

Fig. 5. Profiles after 40% exchange transfusion either with HbV/rHSA, sRBC/rHSA, or rHSA in Wistar rats (n = 5, at each time point). (a) Spleen weight ratios, (b) Plasma EPO levels, and (c) Hct changes. \*:  $p < 0.05$  vs. baseline.

の活発な造血作用を明らかにすることを目的とした。また、保存赤血球の輸血をした場合と比較検討することを目的とした。

## B. 方法

### 1. ラット保存血の調製

ラット輸血モデル実験を実施するにあたり、先ず、保存赤血球の調製を D'Almeida らの方法に従って実施した(*Transfusion Med.* **10**, 291-303, 2000)。Sevoflurane 麻酔下、Wistar 系ラット(400-500g)の右頸動脈にカテーテルを挿管した。血液保存液(川澄化学社製、CPDA-1)2mL を 10 mL シリンジに入れ、カテーテルに繋ぎ、急速脱血した。約 10 mL 採血したところで密封して 4 °C にて 1 週間冷蔵保存した。D'Almeida らの報告によれば、この条件で 1 週間保存したラット赤血球の脆弱性は、ヒト赤血球を同条件で 4 週間保存したものと同等である。保存血液は遠心分離(3,000g, 10 min)して血清と白血球を除去し、再度生理食塩水を等量加えて遠心分離する操作を二回繰り返した。次いで 5 g/dL の rHSA を添加して再分散させ、再度遠心分離して上澄みを除き、rHSA を添加して Hb 濃度を 8.6 g/dL に調節した(sRBC/rHSA)。

### 2. 交換輸血試験

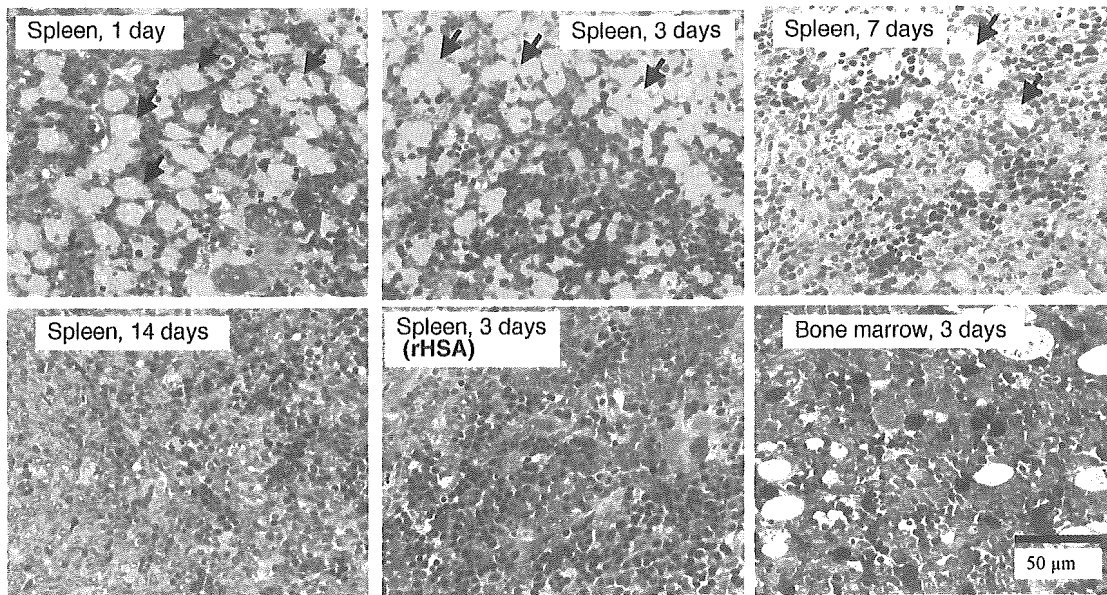
Wistar 系ラット(180 - 200 g, ♂) に対し、ネブ

タール腹腔内投与(1 mL/kg)により全身麻酔とし、右頸動脈に挿管した。1mL の脱血と 1 mL の試料投与を繰返し、40%の血液を交換した。縫合して覚醒させ、最長 14 日間生存させた。血液交換後 1, 3, 7, 14 日後に犠牲死させ(各測定時 n = 5)、血液学的、血液生化学的検査、脾臓の重量の測定、組織病理学的検討(H/E 染色, Berlin-blue 染色, ギムザ染色)を実施した。試料溶液として HbV をリコンビナントアルブミン(rHSA)に分散させた溶液(HbV/rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL)、rHSA 単独、および sRBC/rHSA の 3 群とした。

血液生化学検査、血清中のエリスロポエチンの定量(RIA2 抗体法、BML 社)、脾臓組織切片のギムザ染色を行い、造血の状態について検討した。

## C. 結果および考察

従来検討の結果、HbV/rHSA 投与群だけでなく rHSA 投与群も脾臓重量が増大した。しかし、rHSA の体内動態(ラット)に関する文献によれば、rHSA は脾臓には殆ど移行しないので(岡野ほか, *薬理と治療*, **25**(suppl), 207-218, 1997)、rHSA の捕捉が原因では無いと考えられた。保存赤血球で交換した場合(sRBC/rHSA 群)、体重に対する脾臓の重量比は、血液交換前に  $0.33 \pm 0.04\%$ であったが、1 日後に  $0.42 \pm 0.04\%$ 、3 日後に  $0.48 \pm 0.04\%$ 、7 日後には  $0.46 \pm 0.06\%$ になり、約 1.5 倍の増大が認められた



**Fig. 6.** Histology of rat spleen and bone marrow after exchange transfusion with HbV/rHSA or rHSA alone (Giemsa staining). The presence of the accumulated HbV particles are seen as light-blue domains indicated by black arrows. The nests of erythroblasts were seen as indicated by red arrows.

(Fig. 5)。しかし 14 日後には  $0.37 \pm 0.07\%$  にまで回復した。

Hct 値に関しては、HbV/rHSA 群、および rHSA 群では血液交換により顕著な低下を示したが、7 日後には完全に回復し、14 日後には交換前の値を上回り、また sRBC/rHSA 群よりも高い値を示した。

血中エリスロポエチン濃度は、血液交換 1 日後に全群で有意に上昇したが、sRBC/rHSA 群が最も低かった ( $63 \pm 7$  IU/mL)。特に rHSA 群で顕著で ( $311 \pm 123$  IU/mL)、HbV/rHSA 群 ( $153 \pm 22$  IU/mL) の二倍の値を示し、酸素運搬の効果に依存した結果と考えられる。即ち、HbV/rHSA 群は、rHSA 群より明らかに高い酸素運搬機能を有していることを反映している。しかし、両群ともにエリスロポエチンは有意に上昇しており、造血作用を刺激している。事実、両群ともに 7 日後に Hct 値が血液交換前と同等の値に回復している。

**Fig. 6** に脾臓および骨髄の病理写真(ギムザ染色)を示す。HbV/rHSA 群では、脾臓マクロファージに捕捉された HbV の像が多数認められるが、次第にこれが減少し、14 日後には消失する過程が解る。また、赤芽球が大量に存在する事から、造血が盛

んであることが伺える。rHSA 群でも 3 日目に多量に赤芽球が認められたことから、rHSA 群で認められた脾臓の肥大は、エリスロポエチンにより活性化された造血に拠る結果と考えられた。また、sRBC/rHSA 群で見られた一過性の脾臓肥大は、老化赤血球が脾臓に捕捉されたこと、および造血の作用の両方が考えられた。

Berlin-blue 染色では、sRBC/rHSA 群では脾臓にのみヘモジデリン沈着が認められた。HbV/rHSA 群では、脾臓の一過性肥大とヘモジデリンが脾臓と肝臓に僅かに観測された。従って、HbV が老化赤血球の場合と同様の経路により、脾臓で捕捉代謝される過程が予測された。

#### D. 結論

HbV をリコンビナントアルブミンに分散させた溶液を用い、ラットの循環血液量の 40% を交換したところ、全例が生存し、Hct 値は一週間で回復した。一過性の脾臓肥大と若干のヘモジデリン沈着が認められたが、ラット保存赤血球を同様に投与したところ、脾臓肥大とヘモジデリン沈着が認められた。組織病理学的には HbV は老化赤血球と類

似の経路によって捕捉分解される様相が観察された。しかし、HbVの諸成分の代謝・排泄の過程は、放射化標識してその体内動態を追跡する必要がある。

## 1.1. Hb小胞体による50%出血ショック蘇生後の回復過程

### A. 研究目的

これまでにラット50%出血ショックモデルに対し、rHSAに浮遊させたHb小胞体分散液(HbV/rHSA)が、投与後の生存率を改善し、また循環動態を6時間まで安定に保持させることを明らかにした(Sakai *et al.*, *Crit. Care Med.* **32**, 539-545, 2004)。そこで、本研究では、蘇生させた後の回復過程について最長14日間の観察を行い、安全性に関する知見を得ることを目的とした。

### B. 方法

Wistar系ラット(♂、体重240-310g)を吸入麻酔下(1.5% Sevoflurene)、左大腿動静脈に挿管、循環血流量の50%を脱血し、15分後に同量の蘇生液を投与した。蘇生液は、HbV/rHSA(HbV suspended in rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL)、SAB (Shed autologous blood, [Hb] = 13.4 ± 2 g/dL)、およびrHSA (recombinant human serum albumin, 5 g/dL)の三種類である。測定項目として、血圧、心拍数、血液ガス組成、Hct値、血中サイトカインについては、脱血前、脱血後、投与直前、投与直後、1, 3, 6時間後に測定を行った。6時間後の測定を終了後、大腿動静脈のカテーテルを外し縫合して覚醒、最長14日間生存させた。犠牲死させる際には、Sevoflurene吸入麻酔下、右大腿動脈に挿管し、同様の測定を実施した。また、開腹して下大静脈より採血して遠心分離を行い、血漿について生化学検査を実施した。但し、HbV投与3日目ではHbVが血漿に残存しているため、超遠心分離により完全にHbVを沈降除去したものを検体

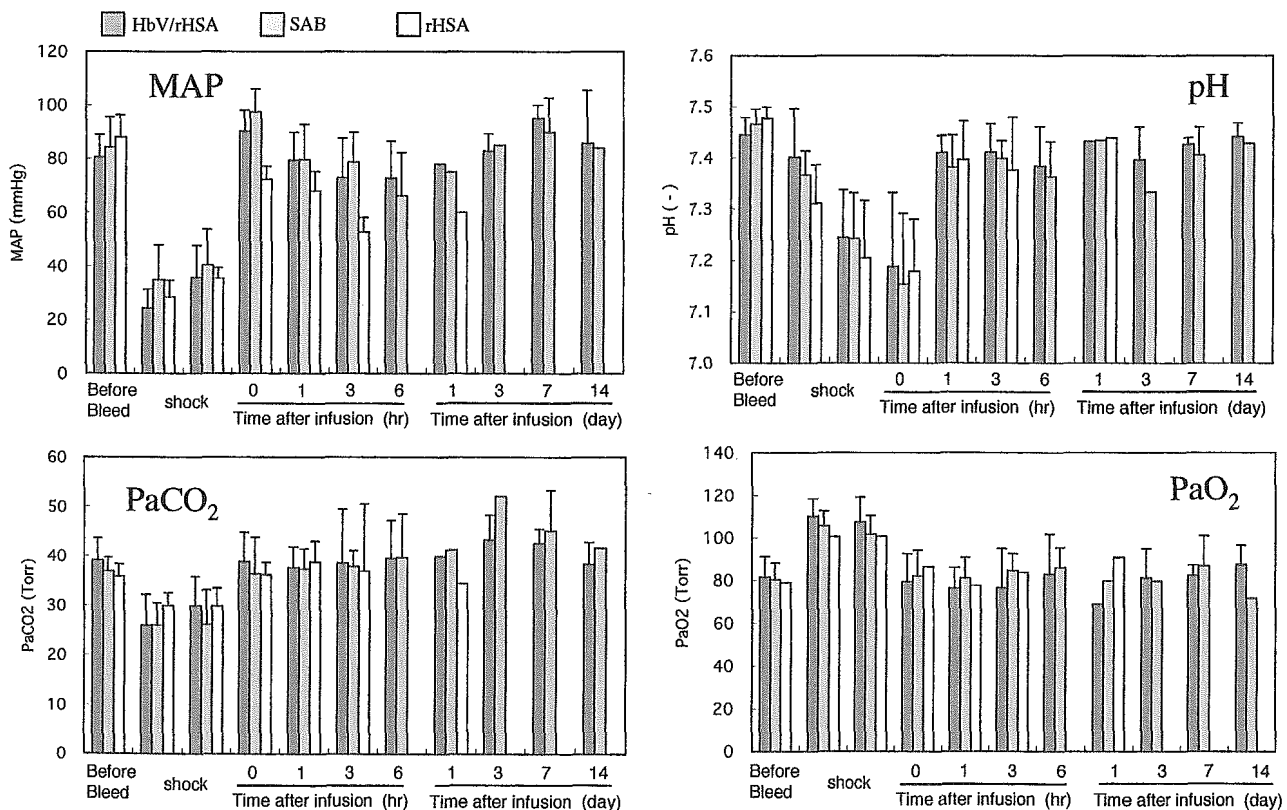
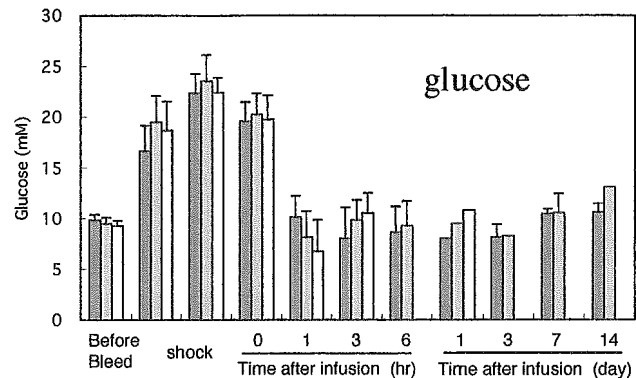
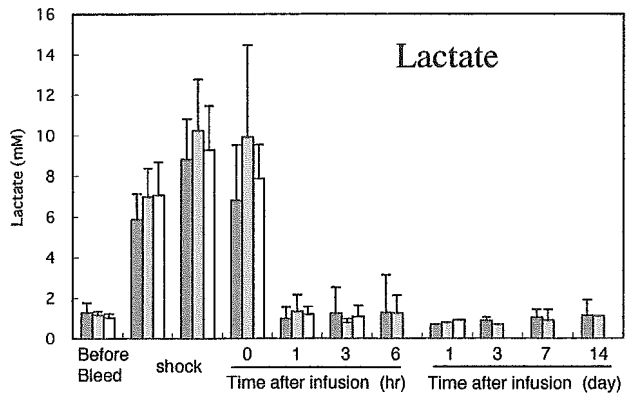
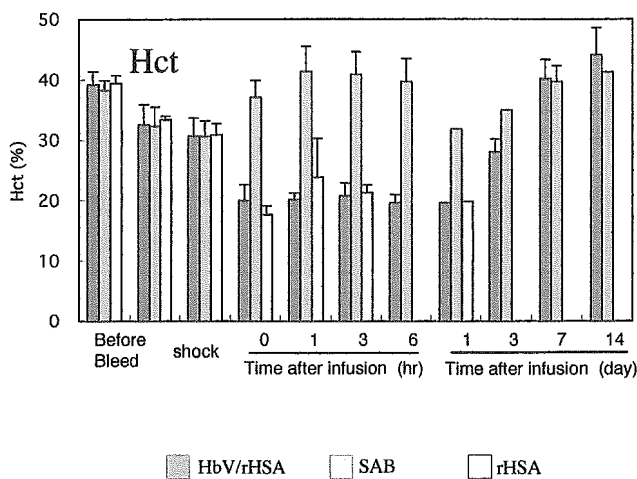


Fig. 7. Systemic changes during hemorrhagic shock (50% blood withdrawal) and resuscitation either with HbV/rHSA, SAB, or rHSA alone. The shock period was 15 min. MAP: mean arterial pressure.



**Fig. 8.** Systemic changes during hemorrhagic shock (50% blood withdrawal) and resuscitation either with HbV/rHSA, SAB, or rHSA alone. The shock period was 15 min.

とした。ラットは放血犠牲死させ、組織病理学的検討を実施した。

サイトカイン測定検体は、Hct値測定後の硝子キャピラリー管上部の血清を採取して冷凍保存した。解凍後、20  $\mu$ Lを採取し遠心分離を行い、アンタイボディオミクス法(Bio-Plex Protein Array System, Bio-Rad社製)により合計9種類のサイトカインを測定した(IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )。

### C. 結果および考察

合計46匹のラットを用いた試験を行った。脱血ショック状態としたところ、投与前に7匹が死亡し、残りの39匹について蘇生液の投与を実施した。HbV/rHSA投与群は21匹中18匹が1日以上生存、SAB投与群が15匹中9匹が生存、rHSA投与群では3匹中1匹が生存した。Fig. 7, Fig. 8に血圧、血液ガス組成、Hct値の推移をまとめた。脱血後に血圧は約30mmHgに低下するが、HbV/rHSAの投与によりほぼ脱血前の値にまで回復したのに対し、rHSAの投与では完全には回復しなかった。血液ガ

ス組成は、脱血に伴う過呼吸とアシドーシス、嫌気性代謝による乳酸値の上昇と、血糖値の上昇が見られたが、投与により全群ともに回復し、その後安定した推移を示した。HbV/rHSA投与後に半減したHct値は、7日後には完全に回復したことから、造血機能に障害が無いと考えられた。アンタイボディオミクス法により9種類の血中サイトカインの測定を実施したところ、HbV/rHSA群、SAB群ともに炎症性サイトカイン濃度に大きな変動は特に認められなかった。

### D. 結論

ラットの循環血液量の50%を脱血しHbVをリコンビナントアルブミンに分散させた溶液によって蘇生させ、最長14日間の回復過程を観察した。出血ショックによる低血圧、過呼吸等は投与後に全て回復した。3日後に肝機能を反映する血液生化学パラメータが高値となったが7日以降に回復した。また、Hct値は7日後にはほぼ脱血前の値にまで増大した。HbVの出血ショック蘇生液としての安全性に関する基礎知見を得ることが出来た。

## 1 2. Hb 小胞体の脳神経組織への影響

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)は、赤血球と同等の酸素運搬機能を有し、更に主要臓器（肝臓、脾臓、腎臓、呼吸器系、循環器系など）への顕著な副作用が無いことが齧歯類への投与試験により確認されてきた。しかし脳神経系への影響についての解析は殆ど報告例が無い。臨床試験開始に当たり、安全性の確認作業が重要となるので、医薬安全総合研究推進事業(外国の研究機関等への委託事業)の一環として、Prof. M. Okamoto (Dept. Pharmacology, Weill Medical College of Cornell Univ.)との共同研究を実施し、脳神経組織への影響の解析を開始した。

最初に、出血ショック状態のラットに対し、HbV投与による蘇試験を実施し、ショック状態からの回復を観察すると共に、脳組織の病理学的検討から、血液脳関門(Blood Brain Barrier, BBB)の透過性の有無を確認することを目的とした。特に、頸動静脈の結紮により生起する梗塞巣における、HbVの分布について観察を試みた。

更に、脳の外傷や梗塞などにより BBB が破壊されると、ミクログリア細胞が誘導され、肝臓の Kupffer 細胞よりも強い貪食作用が生起する。この場合 HbV 由来の Hb および鉄の毒性が出現すると考えられるが、その程度は赤血球と同等であると予想される。しかし HbV の脂質膜成分には赤血球膜とは異なる成分が含まれるので、異なる作用を示す可能性もある。これらを明らかにするため、BBB が破壊されたときに HbV が直接的に脳神経細胞に接触した状態のモデルとして、HbV をラット側脳室に直接注入した。その後の、行動学および組織病理学的変化を長期間観察し、脳神経細胞への影響と HbV の代謝過程の解明を目的とした。

### B. 方法

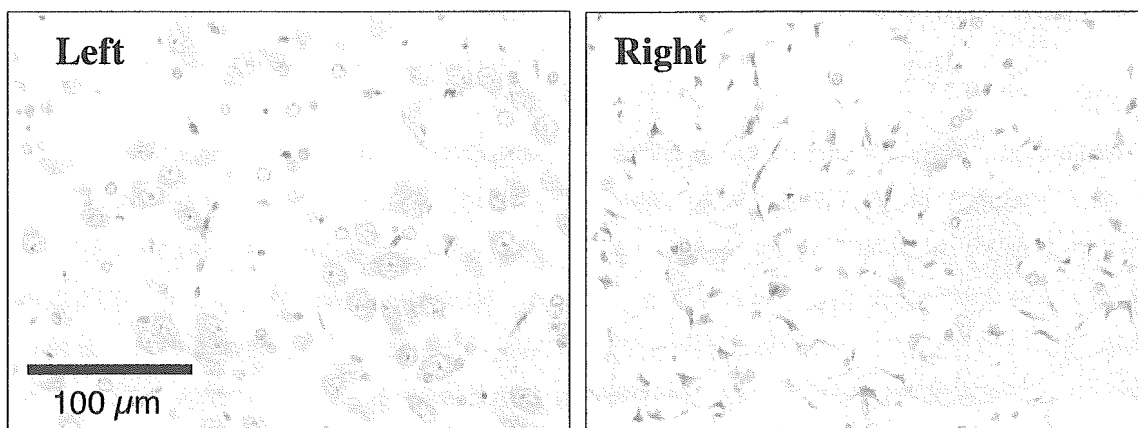
#### a. 血液脳関門の透過性について

雄性 Wistar 系 rat(体重約 250 g)を、1.5%- Sevoflurene

麻酔下、自発呼吸とし、右頸動静脈にカテーテルを挿管した。頸動脈より全血液量(56 mL/kg)の 50%を脱血した。15 分経過後に、試料溶液を投与した。試料溶液は、HbV を 5%リコンビナントアルブミン(rHSA)に分散させた溶液: HbV/rHSA ([Hb] = 8.6 g/dL, n = 8)、脱血液(n = 8)、5%rHSA 溶液とした(n = 8)。測定点は、脱血前、脱血後、投与直後、1hr、3hrs、6 hrs 後とした。測定項目は、血液ガス組成、乳酸値、Hct 値、血圧、心拍数、呼吸数、HbV の濃度、メト化率、血球数とした。測定が終了(6 時間後)した時点で血液を 6 mL 程度採取して採血管に入れて遠心分離し、血球成分を除去した。血清を超遠心分離にかけて HbV を除去し、血液生化学的検査を実施した。摘出脳をホルマリン固定、H/E 染色と抗ヒト Hb 抗体を用いた免疫染色 (Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.* 159, 1079-1088, 2001)を行い、組織病理学的検討を実施した。

#### b. 脳組織への直接注入

Sevoflurene 麻酔下ラットを stereotaxic frame に固定した。頭部の毛を剃って皮膚に 70% ethanol 及びイソジンを塗布して殺菌処理した。頭骸骨上 bregma を確認、caudate nucleus に値する位置(4 mm lateral to midline)をマーク、1mm 径の孔を開け、注射針を右尾状核固定位置まで挿入させた(coordinates: 2mm anterior to bregma, 4 mm lateral to midline and 5 mm ventral from the skull surface)。試料溶液(HbV/rHSA, rRBC/rHSA, rHSA) 20  $\mu$ l を、マイクロシリンジを用いて速度 4 $\mu$ L/min で注入投与した。3 分間放置後、針を除去し、Gelform を孔に入れて孔膜を閉じて、脳脊髄液の漏出を抑えた。ドリルの孔は歯科用セメント(トクヤマ イオノタイト)で封鎖した。筋肉、皮膚組織を縫合し、抗生物質セフメタゾン及び鎮痛剤レペタンを投与した。1, 3, 7 日後に麻酔安楽死後、脳を摘出し、直ちに 10%ホルマリンで固定した。これを 2 mm 毎の 4 枚のスライスとし、パラフィン固定した。組織は H/E 染色、



**Fig. 9.** Immunohistochemical analysis with anti-human Hb antibody to confirm whether HbV penetrates through BBB. (Left) Normal brain. (Right) Ischemic damaged brain. HbV was only seen within the blood vessels and none was found penetrated into the both normal and ischemic brain tissues. Therefore, the permeability of HbV through BBB seemed negligible even after the BBB would be damaged. The particle size of HbV would be important.

Berlin blue 染色などを実施し、観察した。回復後の行動観察を行い、次の項目の運動機能疾患について検討した。

- ・ 驚愕反応(顔面に空気を吹付けた際の反応)
- ・ 立毛
- ・ 旋回行動
- ・ 後足の収縮力(足を引張った際の抵抗力)
- ・ 運動失調, 足取り (床面での不安定な歩行)
- ・ 歩行能力 (1.5cm 幅の角材上の歩行)
- ・ 後足虚弱 (1.5cm 幅の角材上の歩行の際に足を踏み外すか否か)
- ・ 前足での吊下り能力 (4mm 幅の棒に吊り下がる時間)

## C. 結果および考察

### a. 血液脳関門の透過性について

rHSA の単独投与群は 8 匹中 2 匹が 6 時間を待たずに死亡したが、HbV/rHSA 投与群では全例が 6 時間生存した。平均動脈血圧は脱血前約 100 mmHg であったが、脱血後に約 30 mmHg 程度にまで低下した。HbV/rHSA 投与により 98 mmHg にまで回復し、そのまま 6 時間安定した値を推

移した。これは rHSA 単独投与群(74 mmHg)に比較して有意に高い値であり、脱血液を投与した群と同等(92 mmHg)であった。血液ガス組成についても、脱血後に PaO<sub>2</sub> の上昇と PaCO<sub>2</sub> の低下、pH と Base excess の低下を認めたが、HbV/rHSA 投与 1 時間後にはほぼ脱血前の値に回復し、優れた蘇生効果を認めた。

脳の組織病理学的検討の結果、先ず H/E 染色では、左大脳半球には異常は全く認められなかったが、右大脳半球のみ顕著な浮腫(edema)および核濃縮(pyknosis)が認められた。これは、右頸動静脈結紮のため、右脳のみ虚血性の病態が見られたと考えられる。出血性ショック後、蘇生液を投与せずに放置すると 3 時間以内に全例が死亡したが、この場合の脳組織に虚血性の明確な病態を認めないことから、蘇生後に一定時間が経過することによって形態的に確認が出来る病態に達したものと考えられる。しかし最も重要な観点は、HbV の投与によりこの病理的反応が rHSA 群に比べて著しく減少されていることである。rHSA で蘇生した場合にこの虚血性障害の領域は総断面積の 34 ± 3% であり、HbV で蘇生した場合(13 ± 5%)に比較して面積が有意に大きいことから、二つの蘇生液の酸素

輸送効果の差が顕著に現れたものではないかと考えられる。このように、本実験モデルでは、正常な脳組織の領域と虚血状態に陥り血管透過性の亢進している領域の両方を一度に観察できることが特長である。

抗ヒト Hb 抗体を用いる免疫染色を実施し、光学顕微鏡下に観察した限りでは、右脳、左脳ともに、HbV は血管内腔に留まっており、脳実質内には分布を認めなかった(Fig.9)。従って、梗塞領域が拡大した状態になって BBB の透過性が亢進している場合でも、BBB を HbV が透過する可能性は低いと考えられた。これは、HbV の平均粒径が 250 nm であり、血漿蛋白質よりも極めて大きいことに起因していると考えられる。

修飾 Hb(非細胞型)の溶液(分子内架橋型、重合型、水溶性高分子結合型)は、粒子径が大きくてもせいぜい 20 nm であるので、肝臓などの類洞血管では容易に血管外に漏出することが予想できる。正常な脳組織であれば BBB を透過することは考えにくいですが、今回のように透過性の亢進した領域では血管外に漏出する可能性が高い。今後、修飾 Hb 溶液の入手が可能であれば、比較試験を実施し、HbV との相違を明らかにしたい。HbV は輸血代替としての利用だけでなく、物性値を改良することにより虚血梗塞領域へ効率的に酸素運搬することによる治療(Oxygen Therapeutics)が期待されているので、今回、脳実質細胞に HbV が到達しない事実が明らかになったことは、極めて重要であると言える。

#### b. 脳組織への直接注入

予備的試験としてカーボンインク(20  $\mu$ L)を注入し、直ちに犠牲死させ脳の切片を観察し、針の先端が右側脳室内に確実に挿入されたことを確認した(Fig. 10)。この挿入条件のもと、HbV 或は赤血球、血液を直接的に右側の側脳室内に注入し、その後の行動学的変化について観察した。その結果、全群において、驚愕反応、旋回反応、後足の収縮力の変化、運動失調、足取りの

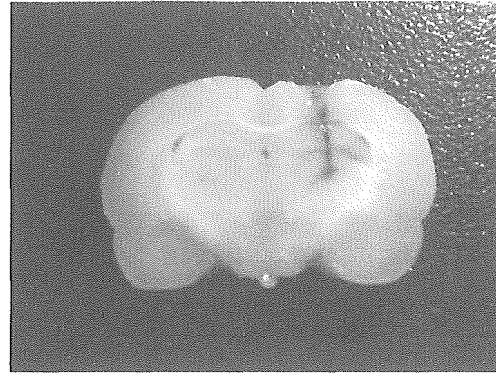


Fig. 10 Confirmation injected site in right caudate of a rat brain by injecting carbon ink.

変化、立毛は認められなかった。しかし、1.5 cm 幅の梁の上の歩行では、左足不安定或は歩行困難となる場合があり、特に赤血球および血液を注入した場合が HbV を注入した場合に比較して顕著に出現する傾向が認められた。また、4 mm 幅の棒に前足で吊下がる時間を計測したところ、処置前は 12 秒程度であるが赤血球および血液注入群では翌日に 6 秒程度に短くなり、その後回復した。しかし HbV 注入群では顕著な時間短縮は認められなかった。これらの行動学的検討から、HbV の方が赤血球および血液に比較して脳組織に与える影響が小さい可能性があることが明らかになった。

組織病理学的検討では、HbV や赤血球を注入した両群ともに、1 日後には注入の痕が認められるのみで特に変化は認められなかったが、3 日後には既にヘモジデリン沈着が認められ(Fig. 11)、7 日後にはそれが顕著となった。HbV を静脈内投与した場合(Sakai *et al.*, *Transfusion* 46, 339-347, 2006)、肝脾のヘモジデリン沈着は 3 日後では認められず、7 日後から確認できるようになることから、脳組織内のミクログリア細胞による Hb の分解が肝クッパー細胞、脾臓マクロファージに比較して迅速であることが考えられた。

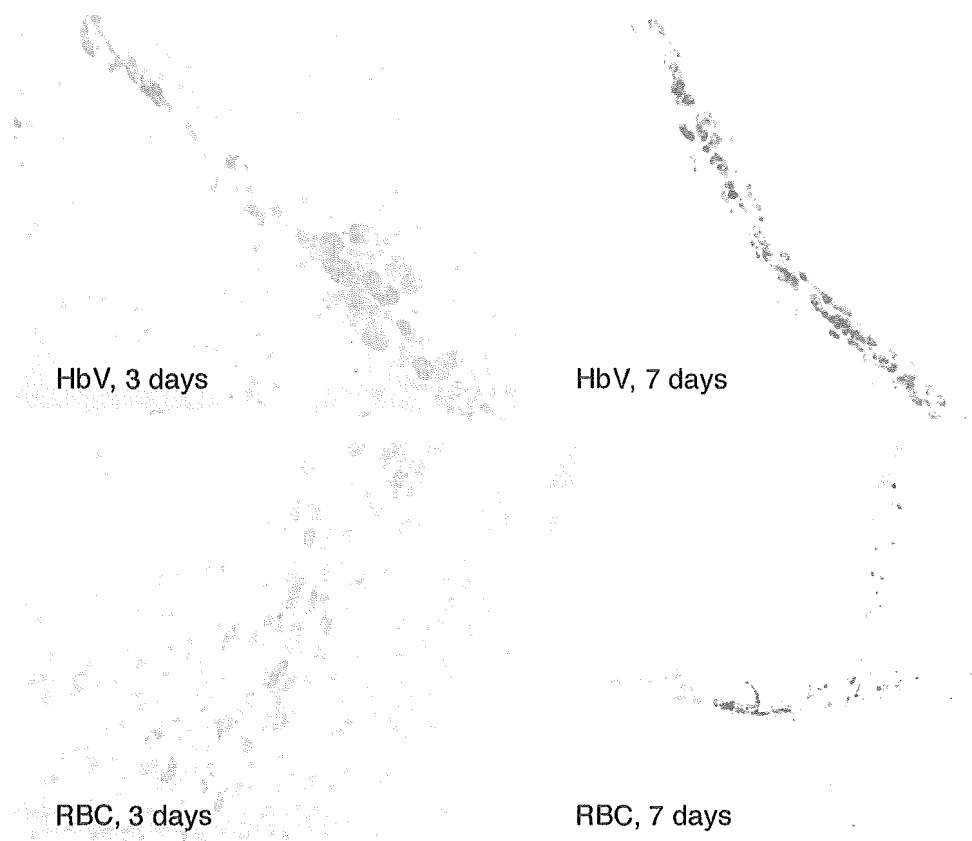


Fig. 11. Histology of rat right brains after injection of HbV or RBC, stained with Berlin blue method. Hemosiderin deposition was confirmed in both groups 3 and 7 days after injection.

## E. 結論

虚血性障害により血液脳関門の透過性が亢進しても、HbV はこれを透過しない。側脳室内への直接注入の影響による著明な行動学的変化は、今回の投与量20 $\mu$ Lでは何れの群も認められなかったが、より詳細な検討として Hanging-time を計測したところ、赤血球よりも HbV の注入の方が運動機能への影響が軽減される傾向が認められた。HbV は側脳室内で速やかに分解され、ヘモジデリンの沈着が3日後に観察された。静注した後の肝脾マクロファージでの分解よりも極めて速い分解であった。現在は免疫染色を検討し、炎症反応の程度を解析中である。

## 13. 各種血漿増量剤に分散希釈させたときの Hb 小胞体の溶液粘度

### A. 研究目的

Hb 小胞体(HbV)分散液の膠質浸透圧は殆どゼロである。従って、大量投与に際して代用血漿剤の併用が循環血液量の維持に必要となる。従来、HbV を5%アルブミン(HSA)溶液、或はリコンビナントアルブミン溶液(rHSA)に分散させ、膠質浸透圧を20 mmHg に調節した分散溶液を用い、出血ショック蘇生試験や、循環血液量の40~90%を置換する試験を実施し、HbV は血液と同等の酸素運搬効果を有することを明らかにしてきた。HbV をアルブミンに分散させて Hb 濃度を8.6-10 g/dLとした場合の粘度は血液と同等であり、剪断速度依存性から Newtonian に近い挙動を示している。しかし、実際の臨床現場ではアルブミン以外に代用血漿剤と



して、デキストランやヒドロキシエチルスターチが使用されており、海外では更に、その高分子量体や修正ゼラチン溶液なども使用されている。また、HbV をこれらの血漿増量剤に分散させて投与することで、虚血領域の酸素化の改善効果も得られている(Erni *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H1702-9, 2003; Contaldo *et al.*, *Crit Care Med.* **33**, 806-12, 2005)。そこで、本研究では、各種代用血漿剤に HbV を分散させ、その粘弾性を検討した。

## B. 研究方法

生理食塩水中に分散している HbV を超遠心分離 (75000 g, 60 min) して生食を除去後、Table 1 に示す各種代用血漿剤中に分散させた ([Hb] = 10 g/dL)。代用血漿剤としては、組換えヒト血清アルブミン (rHSA, Bipla)、デキストラン (小林製薬, Mw.40kDa)、低分子量ヒドロキシエチルスターチ (杏林製薬製, サリンヘス, Mw.70kDa)、高分子量ヒドロキシエチルスターチ (Fresenius, Mw. 200 kDa)、修正ゼラチン (Modified gelatin: Gelofusine, B.Braun, Mw. 30 kDa) を用いた。各 HbV 分散液の粘弾性挙動をキャピラリーレオメータ (Anton Paar 社製) を用いて測定した (37 °C, 周波数 2 Hz, 剪断速度 4.5-320 s<sup>-1</sup>)。

**Table 1** Characteristics of domestic and foreign plasma expanders evaluated in this study.

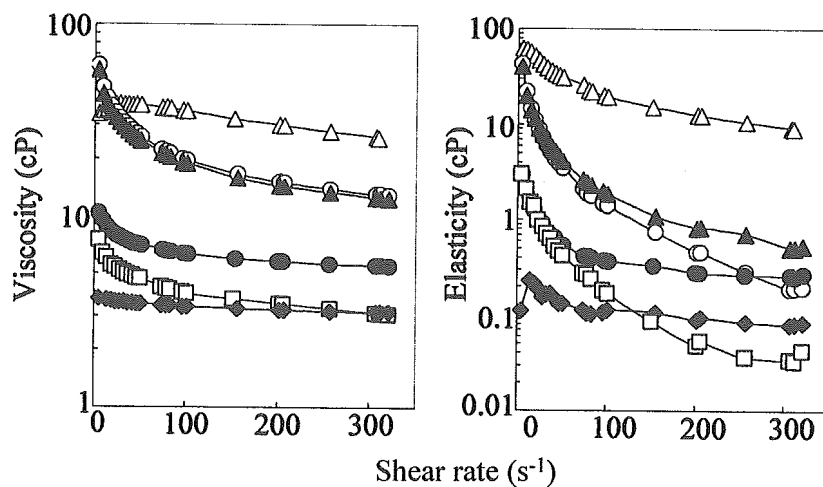
Plasma expander	Mw / Da	Concentration / g/dL	COP / mmHg
Dextran40	40,000	10	22
HES200	200,000	6	28
HES70	70,000	6	26
Gelofusine	30,000	4	52
rHSA	69,000	5	19

HES = hydroxyethyl starch, rHSA = recombinant human serum albumin, COP = colloid osmotic pressure

次に、HbV/代用血漿剤分散系 ([Hb] = 10 g/dL) とヘパリン添加ヒト新鮮血を 1 : 1 の容量比で混合し、キャピラリーレオメータによる粘弾性計測を実施した。さらに、凝集生起の確認として各混合液の光学顕微鏡観察も実施した。

## C. 結果および考察

HbV/代用血漿剤の粘弾性計測結果を弾性項(実部)、粘性項(虚部)に分け Fig. 12 に示した。アルブミン分散系 (HbV/rHSA) では、剪断速度の変化に対する粘弾性値はほぼ一定で、ニュートン流体に近いので、HbV の凝集は殆ど生起していない。また、弾性項(0.1 cP)は粘性項(3 cP)に比較



**Fig. 12.** Shear rate dependence of the viscosity and elasticity of HbV suspended in plasma expanders ([Hb]=10 g/dL) measured with a capillary rheometer at 37°C. ( $\Delta$ ) HbV / Dex40, ( $\circ$ ) HbV / HES200, ( $\blacktriangle$ ) HbV / Gelofusine, ( $\bullet$ ) HbV / HES70, ( $\blacklozenge$ ) HbV / rHSA, ( $\square$ ) blood.

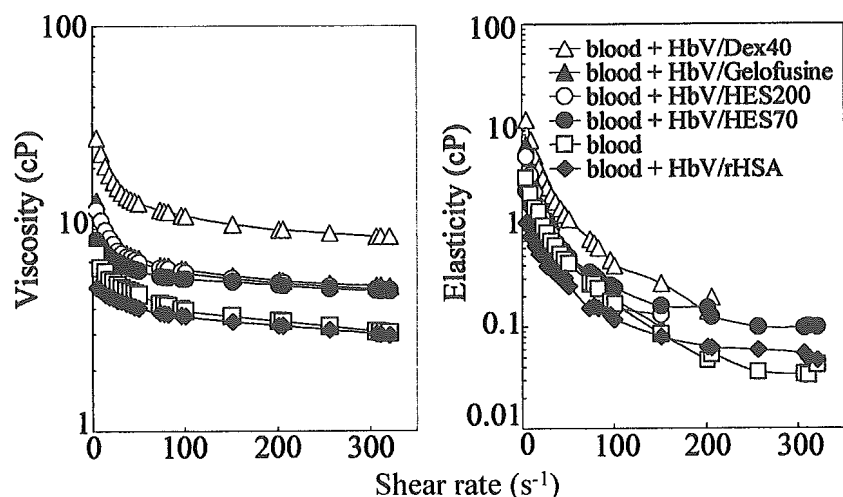


Fig. 13. Shear rate dependence of the viscosity and elasticity of the mixtures of blood and HbV suspended in plasma expanders at a volume ratio of 1/1 measured with a capillary rheometer at 37 °C.

して極めて小さい。これは HbV 粒子表面の PEG 修飾が凝集抑制に働いているためである。

一方、Dex40、HES200、Gelofusine 分散系の粘性項および弾性項は血液に比較して高い値を示し、また弾性項の寄与が低剪断速度で大きくなっている。これは HbV と代用血漿剤の水溶性高分子との相互作用により凝集するものの、剪断力による可逆的解離が生起するためと考えてよい。更に Dex40 分散系では、光学顕微鏡(静止状態)観測では最も著しい凝集体の存在が確認でき、低剪断速度で弾性項が粘性項を上回っていた。これは、水溶性高分子が HbV 粒子間を架橋することによって凝集体が形成され、その高分子鎖による架橋構造が弾性として観測されたものと考えられた。

HbV/代用血漿剤分散系と血液を混合した場合の粘弾性挙動を Fig. 13 に示す。Dex40、HES200、Gelofusine の粘弾性は高い値を示すが、血液を混和して希釈したことにより、Fig. 12 に比べかなり低下している。光学顕微鏡観察(静止状態)では、代用血漿剤に Dex40、HES200、Gelofusine の夫々を使用した場合に HbV の凝集塊の存在を確認した。他方、粘弾性値が血液と同程度であった HES70、rHSA 混合系の観察では凝集体は殆ど確認されず、HbV の分散安定度が高いことが認められた。

#### D. 結論

数種類ある代用血漿剤のうち、rHSA 溶液および HES (Mw.70kDa)では、HbV と混合しても顕著な粘度の増大は見られなかったが、Dextran および欧州や米国で使用されている高分子量 HES、更に修正ゼラチン溶液では凝集が生起し粘度上昇が顕著であった。本実験では、各 HbV 分散液調製には超遠心分離を利用して各血漿増量剤溶液に再分散させ、Hb 濃度を 10 g/dL に設定した。しかし、実際に投与を行う場合には、① 市販の血漿増量剤溶液を投与した後に生理食塩水に分散された HbV を投与、② 或は濃厚な血漿増量剤溶液(例: 25%アルブミン溶液)があればこれを HbV 分散液に添加して同時に投与([Hb] = 8.6 g/dL)、などが想定される。血液交換率はせいぜい 50%程度が想定され、HbV、血漿増量剤ともに更に希釈され、凝集は低減されることが考えられる。事実、当班の共同研究者 Dr. Erni ら(Inselspital University Hospital, Bern)は、デキストラン溶液、或は高分子量 HES を組み合わせ 50%近い血液交換を実施し、皮下微小循環では障害を認めずに、逆に高粘性溶液の投与により血流が改善される効果を得ている。しかし、凝集体の生起の影響については、HbV と代用血漿剤とを組み合わせた投与試験と血液粘弾性試験から、今後詳細を検討する必要がある。

## 1 4. Hb 小胞体と修飾 Hb(非細胞型)溶液の配位子結合反応の相違

### A. 研究目的

Hb 小胞体(HbV)は高濃度ヒト Hb 溶液をリン脂質二分子膜で被覆した人工赤血球であり、急性期の投与において赤血球と同等の酸素運搬機能が得られ、安全性についても明らかになってきている。その中でも、修飾 Hb(非細胞型)は投与直後に血圧亢進が認められるのに対し、HbV ではこれが生起しないことは重要な特徴の一つである。血圧亢進の機序の一つとして、内因性血管弛緩因子である NO や CO が Hb に捕捉されることによる様々な影響が指摘されている。そこで本研究では、HbV 分散液について、CO や NO との結合反応について、HbV の構造に起因する特徴的な反応様式を明らかにするため、非細胞型 Hb 溶液系との比較を検討した。そして、HbV が血管収縮を生起しない実験事実との関連性を検証した。

### B. 研究方法

測定試料は HbV、及び HbV の比較として Hb、Hb に対しアロステリック因子である pyridoxal 5'-phosphate (PLP)を Hb 濃度の 2.5 倍量添加した Hb-PLP、PolyHb (glutaraldehyde 重合ウシ Hb, Oxyglobin, Biopure 社製)を用意し、ストップフロー・ラピッドスキャン分光測定装置(ユニソク社製 RSP-1000 型)による CO、NO 結合速度の解析を行った。A 液: N<sub>2</sub> ガスで脱酸素化した試料 ([heme] = 3 μM) と、B 液: 14.14 % CO/N<sub>2</sub> 混合ガス、或は 0.2004 % NO/N<sub>2</sub> 混合ガスで飽和した PBS を 25 °C にて瞬間混合し、430 nm (deoxyHb の Soret 帯 λ<sub>max</sub>) における吸光度の時間変化を観測し、擬一次反応と仮定し見かけの CO、NO 結合速度定数( $k_{on}(\text{CO})$ ,  $k_{on}(\text{NO})$ )を算出した。

### C. 結果および考察

4 つの試料の測定結果を Table 2 に示す。P<sub>50</sub> の低

い Hb を除いた 3 つの試料の  $k_{on}(\text{CO})$  は、ほぼ同じ値を示した。一方、 $k_{on}(\text{NO})$  では Hb と PolyHb に違いは無いが、HbV の値は約 1/4 であった。HbV 内の Hb は修飾等を一切施していないので、Hb 溶液系と HbV の最も大きな違いは非細胞型と細胞型の相違にあり、高濃度 Hb 溶液がリン脂質小胞体に入れられた構造が NO 結合速度の減少因子であると思われる。NO の結合速度定数は CO よりも約 2 桁大きく、粒子外表面および内部濃厚 Hb 溶液内の拡散律速の影響をより大きく受けたため、NO で顕著な差が認められたものと考えられる。

非細胞型 Hb 溶液の投与により血圧亢進や、肝臓の類洞血管の収縮などが生起するのに対し、HbV ではこれが認められないことが報告されている。これらの現象は、血管内皮弛緩因子である NO や CO が Hb により捕捉される反応が深く関わっていると考えられるが、今回観測された結合速度の相違だけでは説明できない。修飾 Hb は粒径が 20nm 程度であるのに対し、HbV の粒径が 250 nm と大きいこと、NO が作用する血管平滑筋近傍にまで到達出来ないこと、また肝類洞血管においては Fenestration 径が 100nm 程度なので、CO が産生される肝実細胞近傍にまで到達できず、CO の結合が抑制されること、等が考えられる(Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H908-15, 2000; Goda *et al.*, *J. Clin. Invest.* **101**, 604-12, 1998)。

**Table 2.** CO and NO binding rates of acellular and cellular Hb solutions measured by a stopped flow method at 25 °C.

Parameters	Hb	Hb-PLP	PolyHb	HbV
$k_{on}(\text{CO}) / 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	3.4	2.1	2.7	2.1
$k_{on}(\text{NO}) / 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	2.6	2.4	2.4	0.6
P <sub>50</sub> / mmHg	14	23	38*	25

\*Buehler *et al.*, *Anal. Chem.* **77**, 3466-3478 (2005)

## D. 結論

HbV の NO 結合速度は非細胞型 Hb の約 1/4 と顕著に遅く、細胞型の効果が確認された。他方、CO 結合速度では大きな違いは認められなかった。NO 結合が CO 結合に比較して二桁も速く、HbV 粒子表面の非攪拌層の存在が NO ガスの拡散律速になっているためと考えられる。

## 1 5. 脾臓微小循環動態の計測

### A. 研究目的

HbV に関する動物投与試験(ラット)では、血液希釈液、出血ショック蘇生液、体外循環回路の補填液としての利用を検討し、赤血球と同等の酸素運搬機能を実証してきた。また、HbV は最終的には異物として細網内皮系に捕捉されることが体内動態分析から解っている(Sou *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 702-9, 2005)。実際に剖検では脾臓肥大が最も顕著な変化であった(Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.* **159**, 1079-88, 2001; Sakai *et al.*, *Biomaterials* **25**, 4317-25, 2004)。そこで本研究では、血液の濾過器とも言われる脾臓に大量の HbV が捕捉された後に、HbV が分解される過程を解析するとともに、脾臓の微小循環動態の変動に関する情報を得ることを目的とした。

### B. 研究方法

エーテル麻酔下、雄性 Wistar 系ラットに対し HbV([Hb] = 10 g/dL) 或は比較として生理食塩水を尾静脈より投与した(20 mL/kg, n = 9)。その後 1, 2, 3 日後に、1.5%-Sevoflurane 麻酔下、臓側腹膜を切開し脾臓を露出させた。脾臓表面にレーザー血流計(FLO-C1)のプロープを装着し、組織血流量(mL/min/100g に相当: Flow)、組織血液量

(Mass)、血流速度(Velocity)に関するパラメータを得た( $Flow = Mass \times Velocity$  の関係)。また、摘出脾臓をホルマリン固定、H/E 染色し(株)パナファーム)、脾臓微小循環系について病理学的に検討した。

### C. 結果および考察

Fig. 10にレーザー血流計の結果を示す。HbV の投与により、Mass, Velocity, Flowともに顕著に低下した。これは、HbVを貪食して肥大化したマクロファージが血流の障害になっていると考えられる。しかし、徐々に回復し、投与3日後には投与前の値にまで戻った。HbVの投与により脾臓の肥大が3日後に顕著であるが(Sakai *et al.*, *Biomaterials* **25**, 4317-25, 2004)、脾臓内血流速度は維持されていた。組織病理学的な検討では、マクロファージへのHbV取り込みと分解、髓外

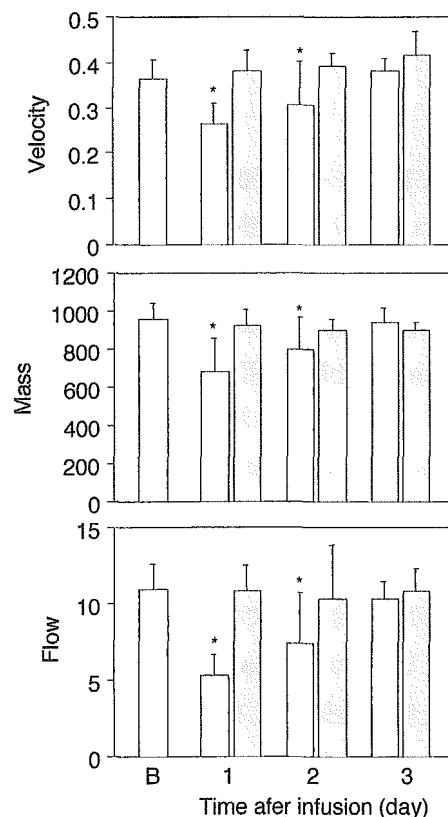


Fig. 14. Splenic microcirculation monitored by a Laser flowmeter (FLO-C1) after infusion of 20 mL/kg HbV (pink bars) or saline (blue bars). The values for velocity, mass and flow are in arbitrary units.

造血が認められた。しかし、脾臓循環系に関する異常は認められなかった[(株)パナファームの所見：脾臓循環系(脾動静脈/脾柱動静脈/中心動脈/筆毛動脈/脾洞)における血管壁構成成分(内皮/中膜/外膜)の変性・壊死や同部への沈着物、炎症細胞浸潤、血管腔の拡張あるいは収縮・狭窄、鬱血、出血、塞栓(血栓形成)といった形態学的変化、異常は無し]。従って、今回のHbVの投与量では、組織病理学的にはHbVが脾臓に対し炎症や壊死を生起しないこと、血流を停止させるような重篤な障害を生起しないこと、が明らかになった。

#### D. 結論

HbVは最終的に細網内皮系にて捕捉代謝される。脾臓の微小循環動態を検討したところ、血流に関する情報(Mass, Velocity, Flow)は投与1日後には低下するが、3日後には完全に回復した。組織病理学的には捕捉されたHbVの像が見られる以外は微小血管系に障害は認められなかった。

### 16. Hb小胞体分散液のHb定量法の検討

#### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)の脂質二分子膜は、赤血球膜と比較して界面活性剤や力学的刺激に対する耐性が高いため、臨床現場で使用されている各種測定装置が正確なHb値を表示しない可能性が指摘されている。そこで、代表的な臨床検査装置4機種についてHbVのHb濃度の測定を実施し、干渉作用の有無とその原因について考察した。

#### B. 研究方法

以下の5機種の臨床検査装置を検討した。

1) KX-21, 自動血球数測定装置(シスメックス社

製), Hb測定原理: SLS-Hb法

2) ABL700, 自動血液ガス測定装置(ラジオメータ社製): Hb測定原理: 可視光領域吸収スペクトル

3) FL-250, 自動血球数測定装置(フクダ電子製), Hb測定原理: シアノメトヘモグロビン法

4) ADVIA120 総合血液学検査装置(バイエルメディカル社製), Hb測定原理: シアノメトヘモグロビン法の変法(特殊な界面活性剤を使用)。

5) IL 682 CO-Oximeter, 自動血液ガス測定装置(Instrumentation Laboratory社製)、Hb測定原理: 近赤外線領域吸収スペクトル。

HbV分散液([Hb] = 10 g/dL)を生理食塩水で10倍、5倍、2倍に希釈し、測定試料とした。正確なHb濃度の測定には、アズワン社製Hb測定試薬キット(シアノメトヘモグロビン法)を使用した。操作法はマニュアル記載の方法とほぼ同じであるが、発色試薬を添加する際に、60°Cにて5分間加温することにより小胞体の溶解を促進し、HbをmetHbCNに変換する反応が完了することを可視吸収スペクトル(500 - 700 nm)から確認し、Hb濃度を算出した。

#### C. 結果および考察

Fig. 15にHbV分散液のHb濃度測定結果を示す。横軸は正確なHb濃度、縦軸は各測定装置が表示した値である。明らかなように、KX-21, IL 682, およびFL-250において顕著な干渉作用が認められたが、ABL700 および ADVIA120 ではより正確な値を示した。

・KX-21では、界面活性剤としてラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を用い、これで赤血球を溶血させ、更にラウリル硫酸イオンが酸化したヘムに結合しヘミクロームの状態として測定する方法である。しかしHbVはSLSでは完全に破壊されず濁度が残るため、実際の値よりも高値となる。SLS共存下、HbVの溶解を促進させたため、加熱する実験を別途実施したが、吸光度が顕著に減少し

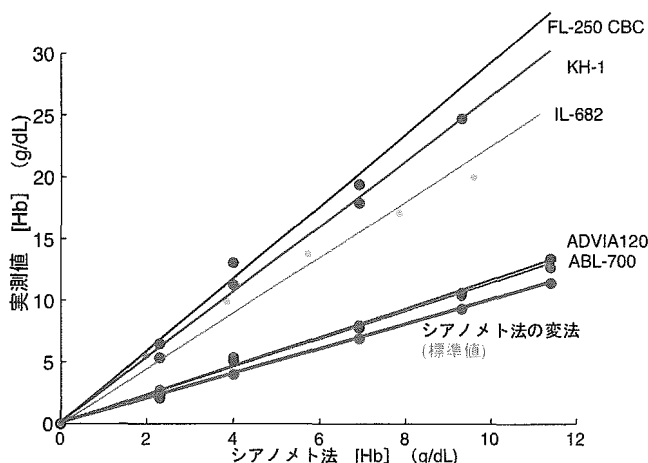


Fig. 15. 各種臨床検査装置による HbV 分散液の Hb 濃度測定結果。標準値とは、HbV の溶解を促進させて干渉因子を排除した方法によって得られた値。ADVIA120 および ABL-700 では干渉作用は 15%以下であった。

た。一般にヘミクロームは不安定で変性し易いので、HbV の定量は困難と考えられた。

- IL 682 は、近赤外スペクトルから Hb 濃度を算出する形式になっている。顕著な干渉作用が認められ、使用不能であった。
- FL-250 は国際基準法であるシアンメトヘモグロビン法に基づく方法を採用しているが、使用している界面活性剤では、HbV を完全に破壊することが出来なかった。装置内に加温して溶解を促進する仕組みを設ける必要があると考えられた。
- ABL700 は、装置内で試料 1  $\mu$ L に周波数約 30 KHz の超音波振動をかけて溶血させ、478-672nm の可視吸光スペクトルを測定し、HbO<sub>2</sub>, deoxyHb, metHb, HbCO のスペクトルの可成性から各成分および総 Hb 濃度を算出している。HbV の測定では若干の高値傾向(15%程度)があるのは、恐らく超音波照射では完全に濁度を消去することが出来ないことが影響していると考えられる。Hb を変性させない程度の少量の界面活性剤を予め

添加するなどの工夫が必要と考えられる。

- ADVIA120 でも HbV の干渉作用は約 15%と僅かであった。本装置では、特殊な界面活性剤(化学構造は開示されていない)を使用しており、HbV の二分子膜を溶解させる能力が高いことが起因している。僅かな干渉作用は、今後、界面活性剤の濃度の変更や溶解に要する時間を延長させる等の工夫により克服できると考えられた。

#### D. 結論

HbV を臨床応用するにあたり、Hb 濃度は臨床現場で治療行為を決定する上で重要なパラメータの一つであるので、正確な値を得るための取り組みが急務である。臨床検査装置により HbV 分散液の Hb 濃度を測定したところ、HbV の干渉作用が顕著な機種があった。他方、測定誤差が 15%以内に収まる干渉作用の影響の少ない機種も存在した。干渉作用の原因は、測定装置内で HbV が完全に破壊されないことであり、適切な前処理を施せば Hb 濃度は測定できると考えられる。

## 1.7. Hb 小胞体の無菌的製造と試料供給

### A. 研究目的

早稲田大学で設定した規格に適合した Hb 小胞体(HbV)試料を分担研究者あるいは研究協力者に配布し、安全性試験に供することを目的とした。製造管理には物性値の再現度を明確にし、無菌試験、エンドトキシン(リポポリサッカライド, LPS)値が基準以下であるなど、製剤としての要件を満足することを確認する。平成 15 年度は製造実績を重ねて無菌的製造工程の確認を目的とした。平成 16 年度は、厚生労働科学研究に供する HbV 分散液の委託製造、さらには GLP 体制への移行と GMP 製造への対応の促進を目的とし、治験担当を目指す開発実施企業に対し、早稲田大学側より技術移転を実施した。

### B. 研究方法

HbV の製造はクリーンルーム(クラス 10,000)内で実施。製造試料について界面活性剤可溶化法による LPS 定量 (リムルス試験)、無菌試験(BML 社提出)を実施し、また、(株)オキシジェニクスでの製造試料(GLP 基準相当)について、物性値の項目として、Hb および脂質濃度、酸素親和度(P<sub>50</sub>)、メト化率について検定を実施した。

**Table 1** HbV の試験結果

バッチ	収量 (L)	LPS 含量 (EU/mL)	無菌試験
1	2.2	0.2	合格
2	1.9	0.1	合格
3	0.5	<0.1	合格
4	0.8	<0.1	合格

### C. 結果および考察

平成 15 年度に実施した計 4 バッチの収量、LPS 含量、および無菌試験結果を **Table 1** にまとめた。LPS 含量は何れも 0.2 EU/mL 以下であり、また、

全てのバッチについて無菌性が証明された。

日本薬局方による LPS 規格値は、下式により設定される。

$$\text{LPS 規格値} = K/M \quad (1)$$

K : 体重 1kg 当りの LPS 量 (EU/kg)

静脈内投与の場合 K = 5.0 (EU/kg)

M : 体重 1kg 当り 1 時間以内に投与する 注射剤最大量 (mL/kg)

これより投与量により規格値は **Table 2** のように設定される。

**Table 2** 投与量による LPS 規格値

単位	投与量 (mL)	M* (mL/kg)	規格値 (EU/mL)
1	200	3.3	1.4
2	400	6.7	0.7
5	1000	16.7	0.3

\*体重 60 kg で換算

従って、本法で調製された試料は高投与量においても LPS の影響がない状態で評価できると判断される。

平成 16 年度からは、HbV の基本製造技術、物性値の測定法を(株)オキシジェニクス (開発実施企業) に技術移転の作業を進行させた。7 ロット (計 13L) の調製を通して HbV 製造の技術移転が終了。バッチ容量を増やしたロットでは [Hb]/[lipid] 値が 0.1 ないし 0.2 の低値となったが、これは分散液中の脂質濃度が 10% 程度高い数値となるためであった。しかし Hb 濃度は 10±0.5 g/dL に調整できている。その他、P<sub>50</sub> 値、粒径、メト Hb 含量、HbCO 含量、エンドトキシン含量は従来値に合致を確認した。試料の物性値は早稲田大学で検定、本研究班での動物投与試験に提供された。平成 17 年度は(株)オキシジェニクスにて製造実績を重ね、GMP 製造への基礎データ取得は完了した。

## D. 結論

平成15年度は計5.4LのHbV分散液を製造した。全てのバッチで無菌試験に合格、LPS値は0.2 EU/mL以下が確認された。その他、粒子径、メト化率、HbCO含量、酸素親和度など諸物性値も再現性よく規格に合致することを確認した。得られた試料は安全性評価のために分担研究者に計画的に配布できた。量産に対応させた工程では、収率の向上に伴い10%程度脂質濃度が上昇するが、酸素輸送に関する係数（Hb濃度、P<sub>50</sub>、MetHb、HbCO含量）は従来同等、また、大量投与される静注製剤に重要となるエンドトキシン値も低値であり、合格圏内で動物投与試料を安定的に供給できる体制が確認できた。治験薬GMP製造が開始される段階へ発展させる根拠となった。

## 18. Hb小胞体製造工程の確立と製剤の規格設定

### 18-1. Hb小胞体の安定製造と規格値の設定

#### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)の安定製造を目的とし、早稲田大学からの技術移転を完了させ、オキシジェニクス社での製造方法を確立させる。安定した品質のHbVを製造するために、基準となる規格値を製造が安定したロットの分析値より暫定値として設定する。

#### B. 研究方法

##### 1. 製造方法の確立

オキシジェニクス社京都研究所内にHbV製造施設を設置した。

慶應義塾大学リサーチパーク内、オキシジェニクス社京都研究所にて、早稲田大学が確立したHbV製造法の技術移転を行った。

##### 2. 規格値の設定

早稲田大学より技術移転を受け、3Lスケールで安定製造できた3ロットについてHbV粒径、Hb濃度等の分析を実施し、その分析実測値より暫定規格値を設定した。

Table 1. HbVの製造実績

項目	Lot.5	Lot.6	Lot.7
製造量(L)	3.2	3.2	3.2
製造日	H16.11.12	H16.12.17	H17.1.20

## C. 結果及び考察

### 1. 製造方法の確立

早稲田大学からのHbV製造の技術移転は平成16年2月より開始し、平成17年1月に終了した。その間、2ロットを慶應義塾大学リサーチパーク内にて、5ロットをオキシジェニクス社京都研究所にて製造した。3Lスケールで安定製造できた3ロットについて製造量、製造日をTable 1に示した。

### 2. 規格値の設定

Table 1に示した3ロットの物性値測定を行い、その分析実測値から安定した製造が確認された。そこでこの3ロットの分析実測値より暫定規格値を設定した。

## D. 結論

オキシジェニクス社でのHbV製造が可能となり、暫定規格値を設定した。

## 18-2. スケールアップしたHb小胞体製造工程の確立と製剤の規格設定

### A. 研究目的

HbVの安定供給を目的として、1ロットでの製造量を増量し、そのスケールで安定して製造できる工程を確立する。また、上記製造方法によって得



**Table 2.** HbV の製造実績

	Lot8	Lot9	Lot10	Lot11
スケール	従来法	従来法	スケールアップ	スケールアップ
製造量 (L)	3.2	2.9	3.8	5.1
製造日	H17.4.15	H17.7.1	H17.8.4	H17.11.24

られるHbV物性値（Hb濃度、粒子径等）をスケールアップする前後で比較し、スケールアップした場合の規格値を検討する。

## B. 研究方法

### 1. スケールアップした製造工程の確立

オキシジェニクス京都研究所内のHbV製造設備において、1ロットでの製造量を3Lから5Lまで段階的に増量させることを試みた。

### 2. 規格値の設定

スケールアップして製造した2ロットについてHbVの粒径、Hb濃度等の分析を実施し、その分析実測値をこれまでの暫定規格値と比較した。

## C. 結果及び考察

### 1. 製造スケールの増大

1ロットでの製造量をこれまでの3Lから5Lへ増量することができた。また、5Lレベルでの安定した製造が可能となった(**Table 2**)。

### 2. 規格値の設定

スケールアップして製造したHbV、2ロット (Lot.10, 11)の粒子径、Hb濃度等の分析実測値より安定した製造が確認された。また、これらの実測値は3Lスケール製造のHbVから設定した規格値の範囲内であり、平均値の比較においても大きな差はなかった(data not shown)。

## D. 結論

HbV製造工程のスケールアップを検討し、約5Lの製造が可能となった。技術移転を受けるところから始まり、2年間で5L/ロットの製造が可能とな

った。平成18年度はニプロ社が確立した新しい製造工程等も導入してロットサイズを大きくし、かつ安定したGMP製造を実施する予定である。

## 19. Hb 小胞体の製造工程に関する検討

### 19-1. 脱 CO 化処理法の検討とその装置開発

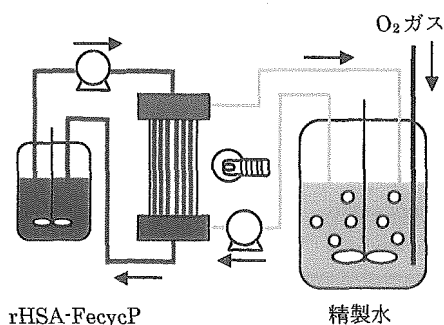
#### A. 研究目的

本研究では、人工赤血球(Hb 小胞体, HbV)の工業化に向け、治験薬製造プラントに導入可能な装置の作成およびシステムの構築を実施することを目的としている。ここでは、ダイアライザーに光照射する新しい型式の脱 CO 化処理を開発、本処理法の工業化に向けた詳細検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 脱 CO 化処理法の開発

モデル人工赤血球として、rHSA-FecycP 200 mL ([FeP]=0.3 mM、[rHSA]=0.5%)をダイアライザー (FB-50U : ニプロ社製)の内部ポート側を 100 mL/min で循環させ、外部ポート側には酸素ガス 2 L/min 又は酸素飽和された精製水 (約 2 L) を 500 mL/min で循環させた。装置図は **Fig. 1, 2** に示す。



**Fig. 1** ダイアライザーを用いた脱 CO 化処理工程 (酸素飽和された精製水を外部ポートに循環)

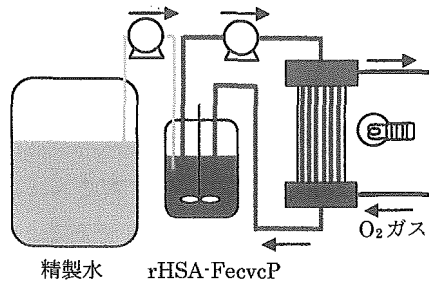


Fig. 2 ダイアライザーを用いた脱CO化処理工程  
(酸素ガスを外部ポートに吹送)

## 2. 本処理法の工業化に向けた詳細検討

HbV 分散液 200 mL([Hb]=2.5 g/dL)をダイアライザー(FB-50U: ニプロ社製)の内部ポート側に 300 mL/min で通過させ、外部ポート側には酸素ガス 2 L/min により酸素飽和された生理食塩水 (約 2 L) を 500 mL/min で循環させた。装置図は Fig. 3 に示す。

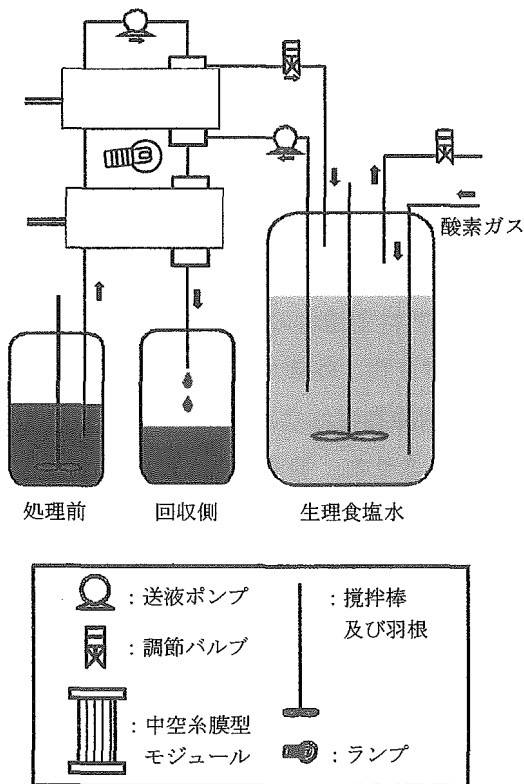


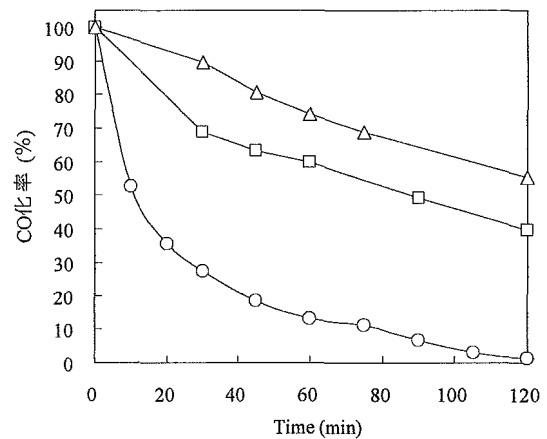
Fig. 3 ダイアライザーを用いた脱CO化処理工程  
(酸素ガスを外部ポートに吹送)

## C. 結果および考察

### 1. 脱CO化処理法の開発

rHSA-FecvCP の CO 化率は Eq. 1 から算出した。rHSA-FecvCP の CO 体の最大吸収波長 427nm、CO 体と Oxy 体の等吸収点波長 435nm より  $Q_s = E_{s427} / E_{s435}$  とした。Fig. 1 と Fig. 2 の装置を用い、更に条件を変えて処理した rHSA-FecvCP 試料溶液の経時変化を次頁の Fig. 4 に示す。

$$CO化率(\%) = \frac{Q_s - Q_0}{Q_{100} - Q_0} \quad \dots \text{Eq. 1}$$



○ : Fig.1 の装置においてランプ照度小  
□ : Fig.1 の装置においてランプ照度小  
△ : Fig.2 の装置においてランプ照度大

Fig. 4 CO 化率の経時変化

ランプの種類としては LED ランプ (ランプ照度小: 10000~15000 lux) とハロゲンランプ (ランプ照度大: 20000 lux 以上) で比較した。Fig. 2 で示した装置においてハロゲンランプを使用した場合、ハウジングが溶解する危険のある温度まで上昇した。一方、Fig. 1 の装置では冷却した精製水を用いて熱交換することで、ハウジング温度は上昇させずに処理できた。CO 化率は 2 時間でほぼ 0%に達し、十分に本法で脱CO化処理可能であると考えら



## B. 研究方法

HbV 分散液としては、オキシジェニクス社にて製造された試料を用いた。脱 CO 処理終了後の試料を 100 mL バイアル瓶にゴム栓で封入し、しもく針を用いて一定流量で約 20 分間窒素バブルし、HbV 溶液中の酸素を除去した。得られた試料のヘッドスペースにおける酸素濃度は、ガスクロマトグラフィー法により測定した(GC-323: GL サイエンス社製, カラム: WG-100…無機ガス分析用)。採取した気体を 150  $\mu$ L 注入し、得られたピーク面積から算出した。

## C. 結果及び考察

オキシジェニクス社より提供された 7 ロットの HbV 試料のヘッドスペースの酸素分圧の測定結果を **Table 1** に示した。

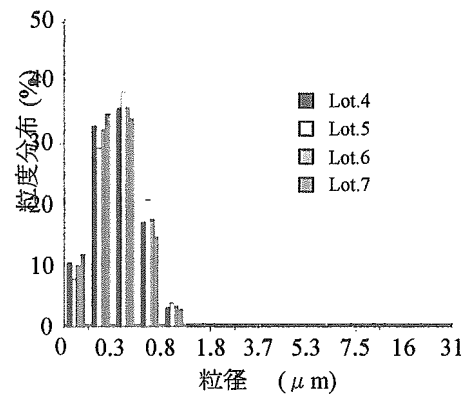
**Table 1** 試料のヘッドスペース酸素分圧

製造番号	酸素分圧 (mmHg)
Lot4-5	3.32
Lot4-50	0.53
Lot5-21	0.00
Lot5-55	2.81      1.06 $\pm$ 1.41
Lot6-6	0.00
Lot6-59	0.00
Lot7-8	0.76

バブル処理により酸素分圧が 1.06  $\pm$  1.41 mmHg を示し、バイアル瓶内が良好に窒素置換されている事が確認された。

## D. 結論

窒素バブルした HbV 試料を、窒素雰囲気下でガラス製バイアル瓶に分注し、ゴム栓で密栓すれば、酸素の混入はほぼ完全に防ぐことができるものと判断された。



**Fig. 8** レーザー回折式粒度分布測定による粒子径測定結果分布図

## 19-3. 粒径制御の確認

### A. 研究目的

本研究では、Hb 小胞体(HbV)製造において最終工程で得られる製剤の平均粒子径及びその均一性、更に凝集物の有無について評価し、製造方法の確認を行った。

### B. 研究方法

オキシジェニクス社が製造した HbV 分散液(Lot.4 ~7)を超純水により適正濃度に希釈調製した。測定方法としては中心粒子径の算出には動的光散乱法(NICOMP-ZLS 380: article sizing systems)にて確認し、凝集物の検出にはレーザー回折式粒度分布測定(SALD-1100、SHIMADZU)を用いた。

### C. 結果及び考察

動的光散乱法により測定した結果を **Table 2** に示した。

Lot4~5 における HbV の中心粒子径はいずれも、260~290nm 付近に観測され、ほぼ粒子径の均一な製剤が得られているものと判断された。