

catalase (Calbiochem), eNOS (BD Biosciences), SERCA2 (Santa-Cruz)、cls2 (Sigma)、plb (Thermo)、GAPDH (Santa-Cruz)。

反応終了後、1次抗体溶液を捨て、PBSTでPVDF膜を洗浄し、PBSTに溶解させた対応する2次抗体[anti-rabbit (Santa Cruz), anti-goat (Santa Cruz), anti-mouse (Cell Signaling)]との反応を1時間室温で行わせた。2次抗体溶液を捨てた後、PBSTで洗浄し、発光検出溶液 Immobilon Western WBKLS0500 (Millipore corporation)と室温で5分間反応させ、LAS 3000 (Fuji Film)で写真撮影した。

### 3. データの計算と統計処理：

各実験群で測定した計数データ(NO<sub>2</sub>含有量と酵素活性測定)はすべて平均値(mean)と標準偏差(SD)で表示した。組織中のNO<sub>2</sub> content (Fig. 10)および酵素活性のデータ (Table 1)は、両側ANOVAを行った後、各実験群の有意差検定をTukey多重比較法で検定した。

Western blottingで撮影した蛋白質の写真は、Multi Gauge Ver. 3.1(Fuji Film)を用いて計数化し、その値を対応するGAPDHの値で補正した。こうして計算した各実験群の蛋白質の個別データをそれぞれのcontrol群の値の平均値で割り算した。control群以外の計算データはcontrol群の平均値を1とした時の比例値として平均値(mean)と標準偏差(SD)で表示した。各実験群での蛋白質の値は、両側ANOVAを行った後、各実験群間の有意差をTukey多重比較法で検定した。

実験(III) HbVは、虚血直後にそれを灌流した時にも、虚血-再灌流後の心機能を回復させるか

#### 1.ラット洗浄赤血球(wRBC)の調製とmKH- bufferへの分散：

ラットにヘパリンとネンブタールを投与後、開腹し、腹部大静脈から血液5mLを採取した。4℃、1570g、で10分間遠心分離した。血漿を捨てた後

同容量のmKH-bufferを加えてよく攪拌し、同じ条件で遠心分離した。上清を捨てた後、同様にmKH-bufferを加えてよく攪拌し、同じ条件で遠心分離した。この操作をもう一度繰り返した後、沈渣の赤血球画分にmKH-bufferを加えて最終volumeを210mLに調製した(42倍希釈)。Wistar系雄性ラットの血中Hb濃度は平均で14g/dLであるので、この操作でHbV30倍希釈分散液と同程度のHb濃度(Hb 0.33g/dL)になる。

#### 2. 5HDのmKH-bufferへの溶解：

5HDを100μM濃度でmKH-bufferに溶解させた。上で作製したwRBC分散液とこの5HD溶液は、37℃に加温し、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを30分以上通気した後実験に用いた。L-NAME溶液は実験(I)と同じものを用いた。

### 3. 実験のプロトコール：

この実験のプロトコールをFig. 3に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

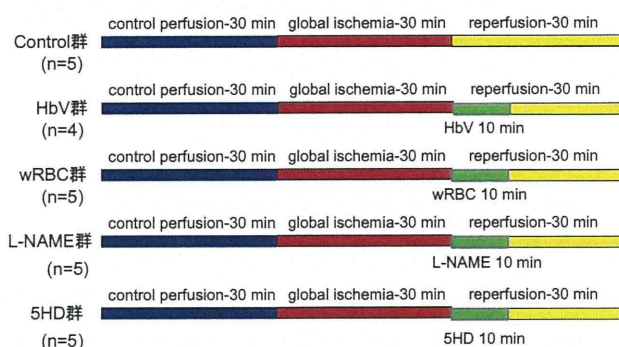


Fig. 3 実験プロトコールと実験例数

#### (1)control 群 (n = 5)

control 灌流を30分間行った後、灌流を停止させて虚血(global ischemia)を惹起し、虚血を30分間継続した後、再灌流を30分間行った。

#### (2)HbV 0.33 g/dL 群 (n=4)：以下 HbV 群

control 群と同様に、30分間のcontrol灌流と30分間の虚血操作を行った後、灌流液をHbV希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。

その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

(3) 洗浄赤血球群 (n = 5) : 以下 wRBC 群

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、灌流液を wRBC 希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

(4) L-NAME 群 (n = 5)

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、L-NAME 100  $\mu$ M 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

(5) 5HD 群 (n = 5)

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、5HD 100  $\mu$ M 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

4. 灌流液中の lactate と pyruvate の測定 :

心機能測定実験で冠灌流量を測定した際、灌流液の一部を採取し、灌流液中の lactate と pyruvate の濃度を Lowry and Passonneau (5)の方法で測定した。採取した時間は、control 灌流時は虚血開始 15 分前と直前、再灌流時は再灌流 5 分、10 分、20 分、30 分の合計 6 ポイントとした。HbV と wRBC が分散した灌流液は 4 $^{\circ}$ C、10,000g で 10 分間遠心分離してその上清を用いた。

5. データの計算と統計処理 :

全ての測定項目について、各実験群で測定した時間毎に平均値(mean)と標準偏差(SD)を計算した。統計処理は、時系列分散分析を行った後、各測定時間ごとに control 群の平均値に対するその他の実

験群の平均値の有意差を Dannett 多重比較法で検定する予定であるが、例数が少ないのでまだ行っていない。なお、以下で結果を図示するが、図が見にくくなるのを避けるため、標準偏差(SD)は省略した。

C. 研究結果

実験 (I) HbV の効果は sarcolemmal  $K_{ATP}$ -channel、アデノシン受容体やプロスタノイドを経由するか

(1) ir 群と HbV 群での LVDP の時間推移の比較 (Fig. 4)

これまでの報告(1)と同じように、ir 群の左室発生圧(LVDP)は、control 灌流時には平均約 150 mmHg で安定的に推移し、虚血開始直後から心臓の拍動は停止し、それ以降再灌流終了まで全例で、LVDP はほとんど 0 mmHg であった。HbV 群でも control 灌流時の LVDP は安定していたが、HbV を灌流すると LVDP が僅かだが有意に低下した。再灌流時には、これまでの報告(1)と同様に LVDP は有意に回復した。

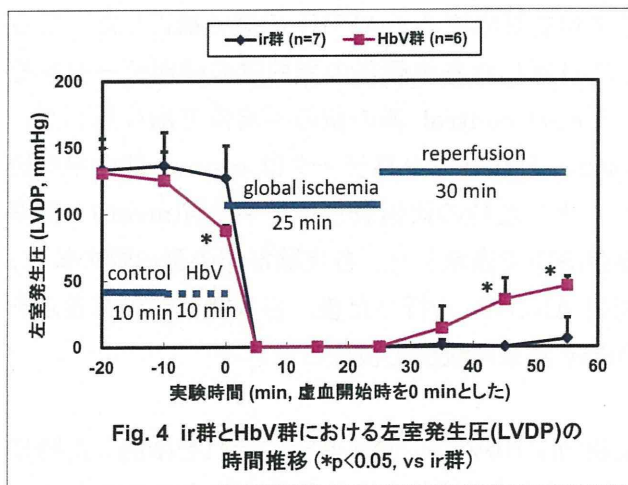
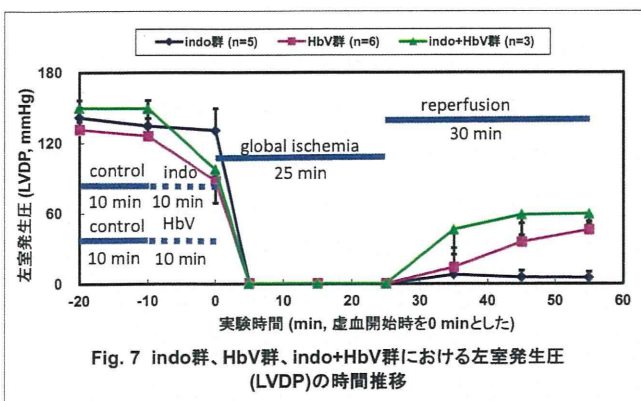
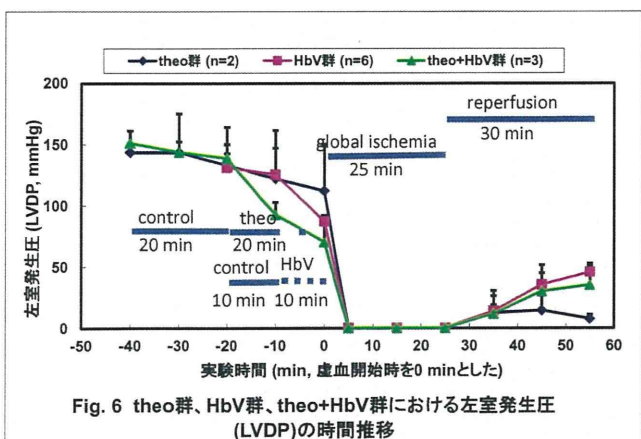
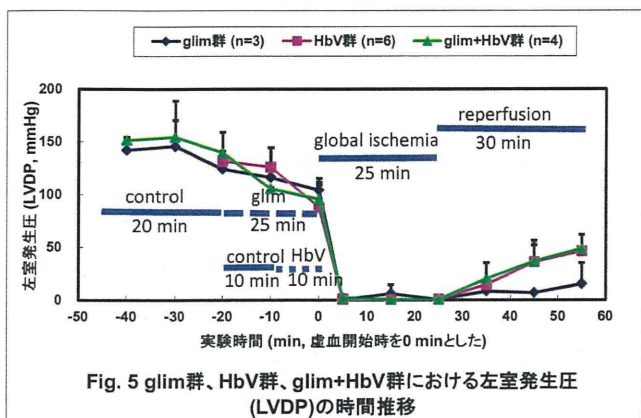


Fig. 4 ir 群と HbV 群における左室発生圧(LVDP)の時間推移 (\* $p < 0.05$ , vs ir 群)

(2) HbV 群の再灌流時心機能回復効果に対する各種阻害剤の効果 (Fig. 5-7)

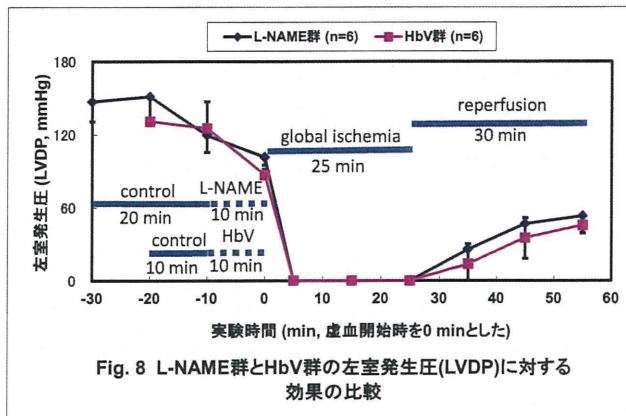
HbV 群では再灌流開始後には全例で左室発生圧の回復が見られた。この心機能回復効果に対して sarcolemmal  $K_{ATP}$ -channel blocker (glibenclamide,

Fig. 5)、アデノシン受容体 blocker (theophylline, Fig. 6)、PG 合成酵素抑制剤(indomethacin, Fig. 7) のいずれも有意の影響を与えなかった。これらの結果は、HbV による再灌流時心機能回復効果が、sarcolemmal  $K_{ATP}$ -channel やアデノシン受容体あるいは PG 合成系を経由しないことを示唆した。(各図の中の blocker あるいは抑制剤単独群と HbV 群あるいは併用群との間の有意差マークは省略した。)

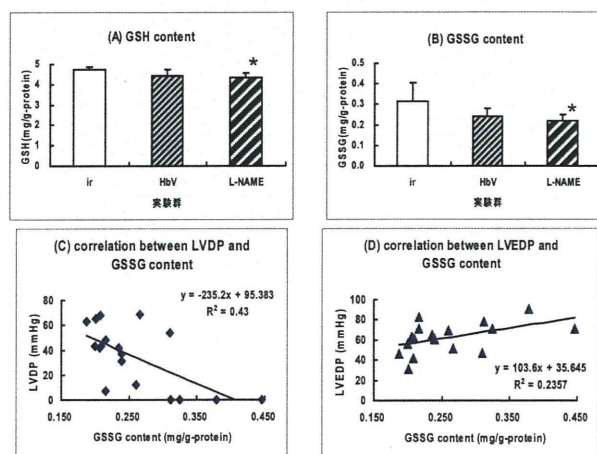


(3)HbV 群と L-NAME 群の再灌流時心機能回復効果の比較 (Fig. 8)

L-NAME を灌流すると HbV 群と同様に LVDP が低下し、再灌流時には LVDP が回復した。この LVDP に対する HbV 群と L-NAME 群の効果の類似性は、HbV と L-NAME が NO の捕捉(HbV)あるいは NO の合成抑制(L-NAME)によって組織中の NO 濃度を低下させるという共通の経路を介することを示唆した。



(4)心筋組織中の GSH, GSSG content と GSSG と LVDP あるいは LVEDP との相関 (Fig. 9)

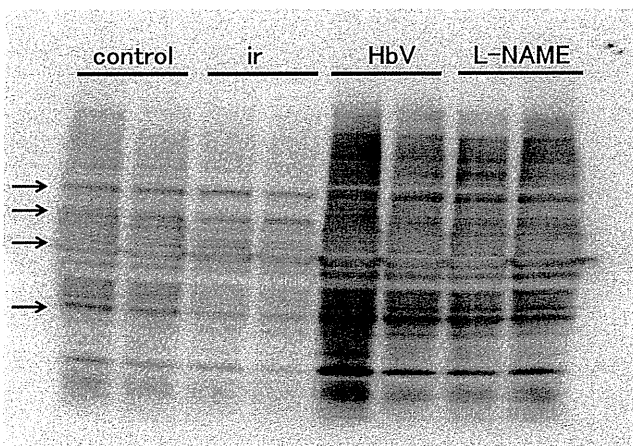


ir 群の再灌流後の GSH content は  $4.72 \pm 0.16$  mg/g-protein であった。HbV 群と L-NAME 群では GSH content が僅かに低下したが、L-NAME 群の値のみが ir 群と比較して有意に低かった。ir 群の再灌流後の GSSG content は  $0.31 \pm 0.09$  mg/g-protein であった。HbV 群と L-NAME 群では GSH content が低下したが、GSH の場合と同様に L-NAME 群の値のみが ir 群と比較して有意に低

かった。

また、この3つの実験群の全データ(16例)を使ってGSSGとLVDPあるいはLVEDPとの相関をとったところ、それぞれ間に有意の相関を認めた(p<0.01, GSSG vs LVDP, p<0.05, GSSG vs LVEDP)。

(5) 組織蛋白質の thiol 残基の酸化度 (Fig. 10)  
control 群と比較して ir 群では、虚血-再灌流によって組織蛋白質の thiol 残基の酸化度が進んでいた。これに対して HbV 群と L-NAME 群ではこの酸化の進行が抑制されていた。この実験結果は、HbV 群と L-NAME 群で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> など蛋白質の thiol 残基を酸化する化合物の合成が抑制されていたことを示唆した。



矢印 (→) はnon-specific bandを示す

Fig. 10 各実験群におけるBIAM staining (各群2例)

実験(II) HbV は、虚血-再灌流で生じる nitroso-redox balance の破綻を改善するか

(1)心筋組織中の NO<sub>2</sub> 含有量 (Fig. 11)

control 群の NO<sub>2</sub> content は 68.1 ± 13.2 nmol/mg-protein であった。HbV 群では NO<sub>2</sub> content が有意に低下した。虚血-再灌流後(ir 群)には、わずかに NO<sub>2</sub> content が増加したが、この増加に対しても HbV は有意の抑制効果(ir + HbV 群)を示した。

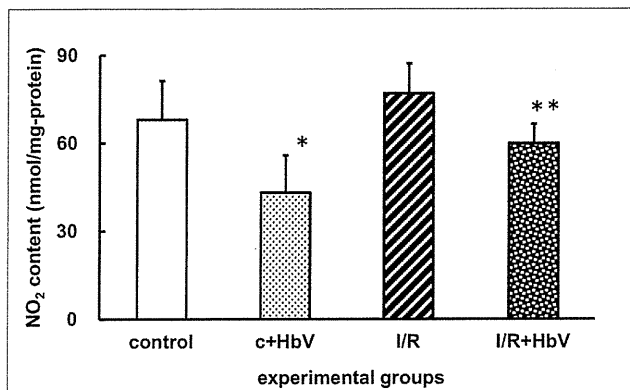


Fig. 11 各実験群における心筋組織中のNO<sub>2</sub>含有量  
\*p<0.05 vs control group, \*\*p<0.05 vs ir group

(2) 心筋組織中の redox に関する酵素活性 (Table 1)

この実験で測定した酵素活性に対して、HbV は虚血前にも虚血-再灌流後にも大きな影響を与えなかった。また、虚血-再灌流後のこれらの酵素活性の変化も大きいものではなかった。

Table 1 Activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) and catalase in the cardiac tissues.

	control group n = 5	HbV group n = 5	ischemia-reperf. (ir) group n = 7	ir + HbV group n = 6
glutathione peroxidase (NADPH, nmol/min/mg-protein)*1	223 ± 23	230 ± 34	248 ± 43	224 ± 72
glutathione reductase (NADPH, nmol/min/mg-protein)*1	11.2 ± 1.8	12.3 ± 1.5	14.6 ± 2.8	13.9 ± 1.6
Cu/Zn-superoxide dismutase (U/mg-protein)	0.92 ± 0.15	0.86 ± 0.38	0.95 ± 0.31	0.91 ± 0.42
Mn-superoxide dismutase (U/mg-protein)	0.44 ± 0.14	0.59 ± 0.19	0.60 ± 0.32	0.59 ± 0.27
Catalase (FA, nmol/min/mg-protein)*2	5.57 ± 0.89	5.65 ± 1.39	6.12 ± 1.29	6.22 ± 1.17

All numerical data are shown as mean ± SD

\*1: Enzyme activity is expressed as the rate of oxidation of NADPH/min/mg-protein extracted.

\*2: Enzyme activity is expressed as the rate of generation of formaldehyde (FA)/min/mg-protein extracted.

(3) 心筋組織中の各種蛋白質発現量

Fig. 12 に NO を産生する eNOS の心筋組織内での発現結果を示した。この他に superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) を代謝する SOD (Cu/Zn-SOD および Mn-SOD)、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を還元する catalase、細胞内 Ca 動態に関する SERCA2, cls2 および plb などの、心筋組織内での発現量を測定した。いずれの蛋白質においても、各実験群間でそれらの発現に統計的に有意な差は認められなかった。

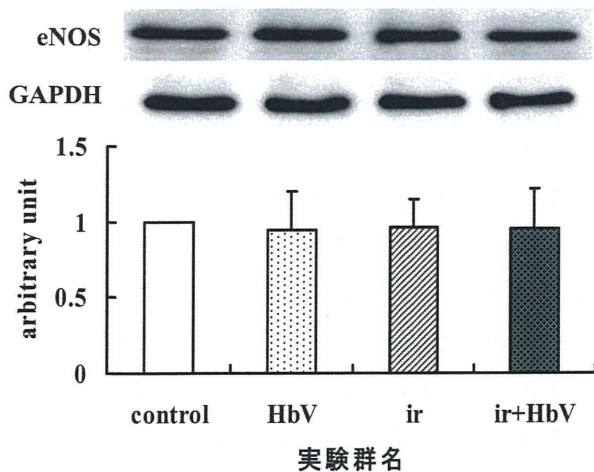


Fig. 12 心筋組織中のeNOS蛋白質の各実験群における発現

実験(III) HbV は、虚血直後にそれを灌流した時にも、虚血-再灌流後の心機能を回復させるか

### 1. 心機能

#### (a)左室発生圧 (LVDP, Fig. 13)

control 群の左室発生圧(LVDP)は、control 灌流時には平均 160 mmHg で推移した。虚血負荷で LVDP はゼロとなるが、再灌流 10 分後には平均 9 mmHg、20 分後には 14 mmHg、30 分後には 22 mmHg と徐々に回復した。

HbV 群では再灌流 10 分後には平均 50 mmHg に回復し、その後も再灌流終了時まで同様に推移した。wRBC 群と 5HD 群でも、再灌流時に HbV 群と同程度の回復効果がみられたが、L-NAME 群では回復効果は少し弱いようであった。

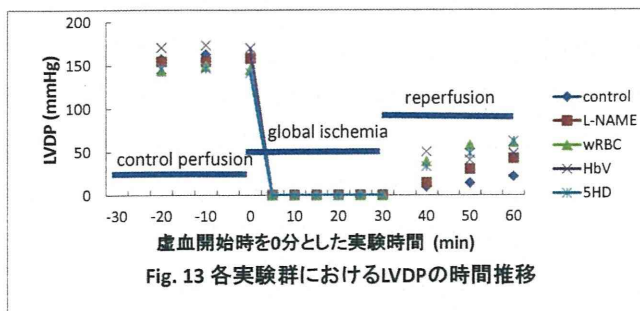


Fig. 13 各実験群におけるLVDPの時間推移

#### (b)左室拡張末期圧 (EDP, Fig. 14)

control 群の左室拡張末期圧(EDP)は、control 灌流時には平均 5 mmHg で推移した。虚血開始 10 分

前後から EDP は上昇を始め、虚血終了時には平均 35 mmHg となった。再灌流 10 分後には平均 95 mmHg まで上昇し、その後徐々に低下した。

HbV 群では再灌流 10 分後の EDP の上昇は軽度であったが、その後は上昇した。他の実験群、特に wRBC 群では再灌流時の EDP の上昇が軽度であるように見えた。

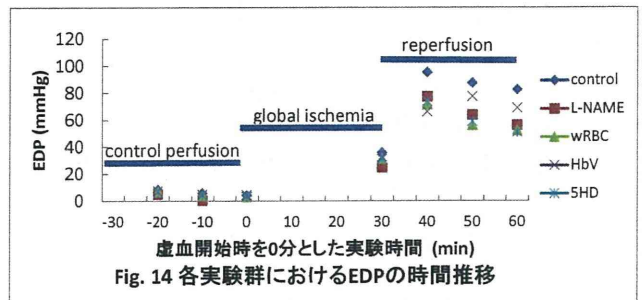


Fig. 14 各実験群におけるEDPの時間推移

#### (c)冠灌流量 (coronary flow, Fig. 15)

control 群の冠灌流量は、control 灌流時の初めにはわずかに高かったが、その後は平均 83 mL/5 min で推移した。再灌流開始時には 50 mL/5 min まで回復したが、その後ゆっくりと低下した。

HbV 群では、control 灌流時の冠灌流量は control 群と同様に推移したが、再灌流時には時間の経過とともに灌流量が低下した。その他の実験群の冠灌流量は、実験を通じて control 群と同様に推移した。

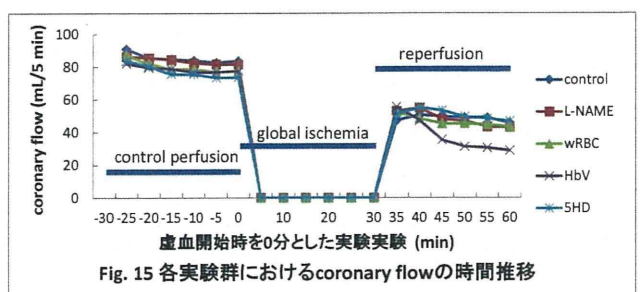


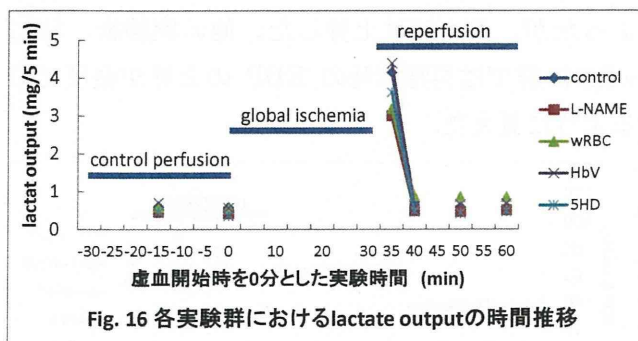
Fig. 15 各実験群におけるcoronary flowの時間推移

### 2. 灌流液中の lactate output、pyruvate output と lactate/pyruvate (L/P) ratio

#### (a) lactate output (Fig. 16)

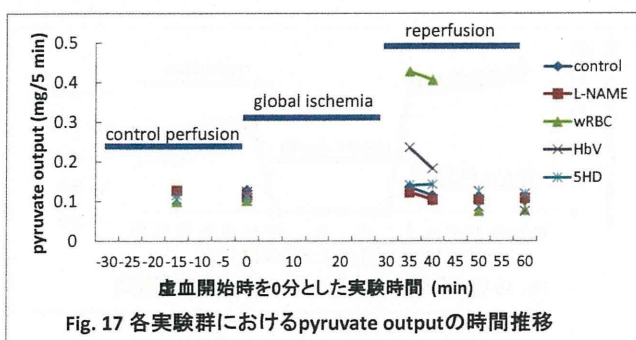
control 群の灌流液中への lactate output は、control 灌流時には平均で 0.6 mg/5 min であった。

再灌流直後に、4 mg/5 min まで急上昇したが、10 分後には control 灌流時の値に戻った。実験を行ったその他の群でも、灌流液中への lactate output は control 群と同様に推移した。



(b) pyruvate output (Fig. 17)

control 群の灌流液中への pyruvate output は、control 灌流時には平均で 0.12 mg/5 min であった。再灌流直後に、わずかに上昇したが、その後はゆっくり低下した。その他の実験群でも control 灌流時の pyruvate output は control 群と同様に推移した。再灌流時には、L-NAME 群と 5HD 群では control 群と同様の变化であったが、wRBC 群では再灌流 5 分と 10 分で急激に増加し、その後、虚血前値に戻った。HbV 群でも、程度は弱かったが、wRBC 群と同様に再灌流 5 分と 10 分で急激に増加し、その後、虚血前値に戻った。

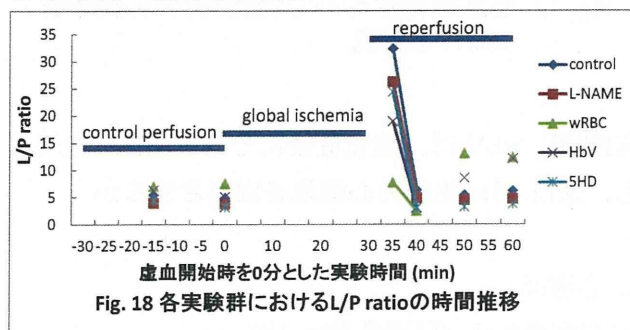


(c) L/P ratio (Fig. 18)

control 群の灌流液中の L/P ratio は、control 灌流時には平均 5 程度で推移した。再灌流直後には、pyruvate output がそれ程変化しなかったのに対して lactate output が急激に増加したため、L/P

ratio は平均で約 32 まで急上昇した。しかし、10 分後には、虚血前値に戻った。再灌流時には、L-NAME 群と 5HD 群では control 群と同様の变化であった。

しかし、wRBC 群では再灌流 5 分でほとんど変化せず、10 分では虚血前値より低くなり、20 分、30 分には control 群よりも高い値となった。HbV 群でも、程度は弱かったが、wRBC 群と同様に再灌流 5 分での上昇程度は低く、10 分では虚血前値より低くなり、その後、20 分、30 分には control 群よりも高い値となった。



#### D. 考察

実験(I)で、虚血直前に灌流した時の HbV の虚血-再灌流後の心機能回復効果が sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blocker、アデノシン受容体 blocker、PG 合成酵素抑制剤によって影響を受けないことが明らかとなった。これらの結果は、HbV の心機能回復効果が sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel 活性、アデノシン受容体、PG 合成酵素などを経由しないことを示唆した。

次に、実験(I)で、①L-NAME が今回の心臓灌流実験系で HbV とほとんど同じ心機能回復効果を引き起こすこと、②虚血-再灌流後の心筋組織中の GSSG content を L-NAME と HbV が同程度に減少させること、③虚血-再灌流後の心筋組織中の蛋白質の thiol 残基の酸化を両者が同程度に抑制すること、そして実験(II)で④HbV が心筋組織中の NO<sub>2</sub> content を control 灌流中でも、虚血-再灌流後も低下させること、を見出した。HbV は、その内包するヘモグロビンによって NO 分子を捕捉する。L-NAME は NO 合成酵素を阻害する。それ故、

HbV と L-NAME は、メカニズムは違うが、組織中の NO 濃度を減少させるという共通の効果を持つと推定される。今回の実験結果は、HbV が心筋組織中の NO 濃度を低下させ、その結果、虚血-再灌流時に引き起こされる nitroso-redox balance の破綻を改善することで虚血-再灌流時の心機能回復効果を発揮するであろうことを示唆した。

実験(III)では、HbV は虚血後に灌流しても虚血-再灌流後の心機能(LVDP)回復を促進することが明らかとなった。また、今回の実験では、これまでの実験では使用しなかった wRBC を対照群の一つとして採用し、wRBC が、ほぼ同じヘモグロビン濃度で HbV と同程度の心機能(LVDP)回復効果を示すことも明らかとなった。

HbV と wRBC の心機能(LVDP)回復効果が同程度だったとは言え、その他の項目、coronary flow や pyruvate output (L/P ratio)などで微かな差があるようにも見えた。これらの違いが、何によって引き起こされているのかは現段階では不明であり、今後の研究で解明されることが期待される。

## E. 結論

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、ヘモグロビン小胞体(HbV) 30 倍希釈分散液(Hb として 0.33 g/dL)を虚血直前に灌流した場合に見られる再灌流時の心機能回復は、アデノシン受容体 blocker、sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blocker、PG 合成酵素抑制剤では抑制されなかった。

HbV によるこの心機能回復効果は L-NAME による効果と類似しており、HbV は L-NAME と同じように虚血-再灌流後の心筋組織中の GSSG を低下させ、蛋白質の thiol 残基の酸化を抑制した。また、HbV は心筋組織中の NO<sub>2</sub> content を control 灌流中も虚血-再灌流後も低下させた。これらの実験結果は、HbV が虚血-再灌流で生じる nitroso-redox balance の破綻を改善することを通じて心筋虚血-再灌流傷害に対して保護効果を発揮することを示唆した。

一方、同じ方法で HbV 30 倍希釈分散液を虚血直後に 10 分間灌流した時にも、虚血負荷後の再灌流時に心機能(左室発生圧、LVDP)の回復が見られた。これと同様の効果は、Hb 濃度を同程度に希釈したラットの洗浄赤血球(wRBC)を虚血直後に 10 分間灌流した時にも見られた。虚血負荷直後に灌流した時に見られた HbV と wRBC の心機能回復効果のメカニズム解明については、今後の研究が待たれる。

## (参考文献)

1. 大鈴文孝, 楠原正俊, 柳田茂樹, 山岸正, 加藤隆一, 別所基明, 浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成 17 年度 総括・分担研究報告書, pp.29-34 (2006).
2. Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Biochem.* 1997 Apr 5; 247(1): 63-8.
3. Kim JR, Yoon HW, Kwon KS, Lee SR, Rhee SG. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem.* 2000 Aug 1;283(2):214-21.
4. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem.* 1993; 214: 11-16.
5. OH. Lowry, JV. Passonneau. *A flexible system of enzymatic analysis.* New York: Academic Press, 1972:194-196.

## 20. ヘモグロビン小胞体制剤の最終滅菌法の検討

### A. 研究目的

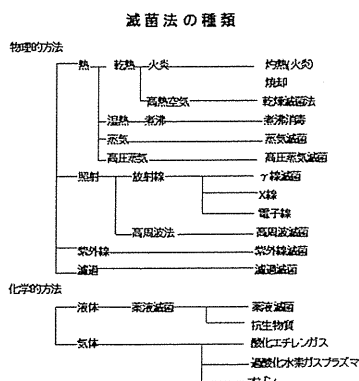
人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(HbV)は、輸血代替物として生体血管内に多量投与するので、血液製剤より感染症・敗血症のリスクが少ないことが肝要で、製品は注射剤と同レベルの無菌状態でなければならない。そのため、HbVの滅菌法の開発を検討した。

従来注射剤の滅菌方法は、一般的に、高温高压など蛋白質を変性させるものが多く用いられている。試料にはHbを含有しているため、Hbを変性させる滅菌法は用いることは出来ない。広く用いられているγ線照射法も試料に変性を起こすことが判明しているので、本試料には不適である。もちろんガス滅菌法も適用できない。文献による血液に対する加熱の限界は、60℃を12時間まで可能と報告されている。これはHbの精製工程においてウイルスの不活化に利用されているが、微生物の滅菌には至らない。ただし、Hb水溶液である最終精製品の無菌ろ過は原理的に可能である。

従来応用されている種々滅菌法がHbVに適応できないことから、新たに以下に述べる4つの微生物殺滅法がHbVに対する滅菌法としての使用可能かを検討した。

- (1) 超高压滅菌法
- (2) β-プロピオラクトン法
- (3) 銀ナノ粒子による滅菌
- (4) 電子線照射法

表一1:滅菌法の種類



### B. 研究方法

#### 1. 超高压滅菌法

本法は再生医療で、脱細胞を主目的として滅菌を兼ねて開発した、超高压静水圧印加による移植用生体組織の処理方法(特許公開2004-97552)である。この応用を検討した。この方法は、本来異種動物の組織を臨床に用いる場合に、拒絶反応を生じさせないように、その動物の組織に超高压(約10,000気圧)を印加して異種動物の細胞および細菌、ウイルスの微生物を死滅、除去させるものである。

##### 1-1方法

超高压滅菌法は各種生細菌、ウイルスにはすでに効果が知られているので、芽胞を形成して滅菌が最も困難なバチルスを指標とし、滅菌効果を検討した。印加圧を10,000と3,000気圧とし、温度を10~60分とした。

##### 1-2結果

滅菌効果を認めたものの、Hbに強い影響を及ぼし、変性せしめた。

##### 1-3結論

超高压滅菌法はHbVの滅菌に適切ではなかった。

#### 2. β-プロピオラクトンによる滅菌法

本法はワクチンの微生物不活化剤として利用されている。

##### 2-1方法

Hb溶液はあらかじめ通常の製造手段に沿って酸素親和性、pH、濃度を調整したものを更に生理食塩水でHb濃度100g/Lとしたものを使用直前に開封し、Hb溶液に所定量添加した。

添加直後に概観を調べサンプリングした後、4℃、室温、および37℃に保存し、経時的にサンプリングした。外観上の変化のあったもので凝集物が明らかでないものは遠心処理により沈殿の有無を確認し、変化の認められないものは念のため吸収スペクトルも調べた。pHは常法に従い、酸素親和性はヘモックスアナライザーを使用し計測した。HbV懸濁液(Hb濃度約100g/L、CO化されたもの)に指標菌液を1/100量接種したところにBPLを添加して、室温に静置し所定時間毎に、0.5mL採取し、生菌数は第十五改正日本薬局方生菌数測定寒天平板混濁法に準じて、SCD培地を用い3日間培養後のコロニー数を測定した。指標菌には、Sta



phylococcus aureus(黄色ブドウ球菌)、Pseudomonas aeruginosa(緑膿菌)、Candida albicans(カンジダ菌)、Escherichia coli(大腸菌)を用いた。

また、指標菌未添加サンプルのを同処理条件における外観、メト化率、pH、酸素親和性も調べた。

## 2-2結果および考察

処理条件が室温、BPL濃度0.05及び0.1%での指標菌への効果を調べた(表-2)。いずれも濃度及び処理時間依存的に菌数の低下を認め、0.1%では全菌種で、5時間以内にコロニーを、検出しなくなった。ただし、抵抗性は菌種による差を認め、ブドウ球菌が0.05%では5時間後も残存菌が認められた。一方、指標菌未添加のHbVに室温、BPL濃度0.05及び0.1%を添加し、24時間以上おいたものについて、外観などを調べたところ、pH低下は前述の実験同様濃度依存的に見られたが、その他の項目には大きな変化は見られなかった(表-2)。

HbV存在下でのBPLの効果

表 1 HbV存在下でのBPLの効果  
A) *Staphylococcus aureus*  
添加濃度:  $0.8 \times 10^7$  CFU/mL (10<sup>7</sup>CFU/mL)

Solvent kind	濃度	Bacterium kind	Time (hour)				
			7hr	1 hr	2 hr	5 hr	
Hb-V 懸濁液 +	0.05%	<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.3 \times 10^7$	$0.5 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$7.1 \times 10^7$	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.2 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	0	
Hb-V 懸濁液 -	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	

B) *Pseudomonas aeruginosa*  
添加濃度:  $3.2 \times 10^7$  CFU/mL (10<sup>7</sup>CFU/mL)

Solvent kind	濃度	Bacterium kind	Time (hour)				
			7hr	1 hr	2 hr	5 hr	
Hb-V 懸濁液 +	0.05%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3.2 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	0	0	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3.0 \times 10^7$	0	0	0	
Hb-V 懸濁液 -	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$0.9 \times 10^7$	$5.5 \times 10^7$	$5.5 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$	

BPLは濃度及び温度依存的にタンパク質であるヘモグロビン自体の影響が見られることが分かった(表3)。

BPL終濃度	外観	メト化率	pH	p50	Hill係数
0.10%	変化なし	1.9	6.25	25.6	1.99
0.05%	変化なし	2.3	6.82	26.9	2.11
0%	N/A	2.2	7.62	28	2.2

特に1.0%でのpH低下は著しく、凝集沈殿まで生じた。これ未満の濃度ではpH低下と酸素親和性のパラメーター変化を伴うものは無く、殺滅効果を発揮し、明らかな凝集は認めなかった。

BPLはその反応性から水溶液中では単体で安定に存在しえず、速やかに分解するか、蛋白質核酸など生体成分に付加して微生物の不活化を示す。したがっ

て、製造工程途中で添加してもそれ自体製品への残留の恐れはすくない。また、効果には持続性はない。さらに、作用原理からHbへの結合も想定され、その点の安全性への影響は新たな課題として残る。

## 2-3結論

濃度0.1%で殺滅効果を認めた。しかもHbに影響を及ぼさなかった。

## 3. 銀ナノ粒子による滅菌

銀の抗菌性は、古くから知られており、銀イオンの効果と考えられている。今回従来品に比べて少ない濃度で、効果を発揮出来る銀ナノ粒子と接触させて滅菌する方法を検討した。

### 3-1方法




指標菌には、緑膿菌を用いて、直径8mmのペーパーディスクに、3種類の濃度(1000, 100, 10ppm)の銀ナノ粒子溶液(20 $\mu$ L/ペーパーディスク)を滴下させて、形成される阻止円のサイズを計測した。

### 3-2結果および考察

濃度依存的に、そして1000ppmの濃度で明確な阻止円を認めた(図-1)。一方Hbには、全く影響を認めなかった。

Agナノ粒子殺菌効果確認試験 (形成された阻止円の写真)

使用菌株: *Pseudomonas aeruginosa* G株  
ペーパーディスク直径: 8mm  
Agナノ粒子溶液の添加量: 20 $\mu$ L/ペーパーディスク枚

Agナノ粒子溶液濃度		
1000ppm (Agナノ粒子: 20 $\mu$ g)	100ppm (Agナノ粒子: 2 $\mu$ g)	10ppm (Agナノ粒子: 0.2 $\mu$ g)
		
(14.9mm, 14.3mm)	(10.1mm, 10.1mm)	阻止円形成なし
阻止円サイズ (縦直径、横直径)		

添加物用途以外の銀ナノ粒子のHb-V製造への適用方法としては、プロセス液の銀ナノ粒子保持フィルターでのろ過が考えられる。加熱などが不要なく微生物の殺滅原理としては非常に興味深い手法である。今回の実験で抗菌作用を発揮することが確認できたが、その発現様式は保持させた担体から溶出した銀ナノ粒子が作用したためとも思われる。

生体に取り込まれた銀や他のナノ粒子の安全性に

については議論がようやく始まったばかりといえ、まだ評価が定まったとは言いがたいのが現状である。上の場合にも遊離した銀ナノ粒子の遊離が無菌性保持に必要となれば、Hbへの影響が小さくとも製品への残留については現時点では慎重に考えざるを得ない。

### 3-3 結論

銀ナノ粒子との接触法は、有る程度の滅菌効果を認め、Hbには影響を及ぼさなかった。検討に値する手法であるが、製品に残留する銀ナノ粒子の安全については今後もまだ慎重な評価が必要である。

## 4. 電子線照射による滅菌法

医療機器の滅菌には、 $\gamma$ 線照射、電子線による滅菌がすでに広く利用され、滅菌効果は明らかとなっている。原理的な違いはないが、電子線は $\gamma$ 線に比べ高エネルギーのものを発生させることができ、短時間照射が可能となる特徴がある。今回はまだ調べていない電子線のHbに対する影響に関して検討を行った。

### 4-1 方法

HbV(脱酸素体およびCO付加体)試料5mLをバイアルに封入したサンプルに対し、10MeV電子線により目標線量を表面5、10及び30kGyとして照射した。

### 4-2 結果および考察

ヘモグロビン小胞体(脱酸素体)は、5~30kGy照射のすべてにおいて、Hbの酸化変化を示す赤褐色への変化を認めた。また、照射前に低粘稠な懸濁液であったものが、いずれも粘稠な液(ゾル状)に変化した。

ヘモグロビン小胞体(CO付加体)では、色の変化は脱酸素体に比し抵抗性を示し、低線量での色変化は少なかったものの、30kGy照射においては脱酸素体と同様の変化を示した。また液状の変化は5~30kGy照

射のすべてにおいて脱酸素体と同様であった。

CO付加体での色変化の抵抗性から、電子線の効果は、ラジカル発生による酸化的なタンパク質等への攻撃であることが改めて認識される。医療機器における電離放射線照射による滅菌は30kGy前後の照射が目安となっており、この線量で変化が見られたことから、CO付加体としてヘモグロビンの安定性を高めてもあまり有効でないことがわかった。

HbVへの電子線照射により懸濁液がゾル状にかわるなどの外観上の変化したことから、ヘムの酸化、タンパクの変性だけでなく、リポソームを構成する脂質成分へも影響した可能性は十分にある。

### 4-3 結論

電子線照射は、 $\gamma$ 線と同様、HbVの滅菌には、不適切な滅菌法であった。

## D. 結論

本研究の初年度より、各種の新しい滅菌法の開発、応用に取り組んできたが、新規の滅菌法は、確立し得なかった。蛋白質と脂質の組み合わせであるHb-Vは無菌製剤として最終滅菌法を実施することは困難である。

しかしながら、製剤の初期の工程で蛋白質(Hb)溶液、脂質溶液はそれぞれろ過により無菌化は可能である。そこで、HbVの無菌性を確保するには、その次工程以降無菌操作法による製造を行うこととする。

## E. 研究発表

なし。

## F. 知的財産権の出願。登録状況(予定を含む)

該当なし

## 2.1. ヘモグロビン小胞体の GMP 製剤製造方法の確立

### I. 原料及び Hb-V の脂質分析

#### HPLC法の再構築

##### A. 目的

Hb-V の製造管理において、主要原料である脂質の収支をトレースすることは、リポソームの挙動を理解するとともに、製品の適正な品質管理において重要である。

ヘモグロビンと混合された脂質の定量は、従来臨床検査用の脂質測定キット（酵素法）を利用した方法によるレシチン（DPPC）とコレステロールしか測定することが出来ず、他の 2 成分である PEG-DSPE と DHSG は明らかに出来なかった。Hb-V の品質評価においてリポソームのステルス性の物質的な裏付けを定量的に行うため、4 成分を同時に分離定量できる ODS カラムと示差屈折計検出による HPLC 法がオキシジェニクスにおいても実施されていた。しかしサンプル処理には凍結乾燥による水除去や溶媒抽出法を用いていたため、抽出の再現性や処理時間などの点で労力を要し実用性が必ずしも高くなかった。

そこでまずこの HPLC 法を弊社においても再構築し、定量分析としての分析能を評価した。続いて、サンプルの前処理法に検討を加えて分析の所要時間の短縮と再現性の向上を目指した。この過程において酵素法での Hb-V の可溶化も再検討した。

##### B. 方法

###### 1. HPLC 法の評価

1) 脂質分散液の HPLC による脂質定量は以下の方法に依った。

試験条件

検出器；示差屈折計

カラム；Cadenza CD-C18 150 mm×4.6 mm I. D. (3 μm) Imtact 社製

カラム温度；40 °C

移動相；メタノール：テトラヒドロフラン：蒸留水：トリフルオロ酢酸（950：30：20：1）

流速；1.0 mL/min

注入量；10 μL

###### 2) 脂質分散液の調製

Hb-V の製造原料である混合脂質（DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG からなる混合物）の標準溶液を調製した。

混合脂質 6.0 g をとり、蒸留水 291 mL を加えた後、1 mol/L 水酸化ナトリウム 8.9 mL を添加した。液温を 40 °C 付近にした後、ホモキサーにて 16000 rpm 10 分間攪拌して脂質分散液を調製した。

脂質分散液（混合脂質濃度として 20 mg/mL）100 mL をとり、凍結乾燥機により水を完全に除去した。その後、凍結乾燥粉末 1.0 g をとり、クロロホルム：メタノール（2：1）で溶解し、全量を 10 mL としたものを測定試料溶液とした。

###### 3) 分析能パラメーターの評価

DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG それぞれの検量線を各試験方法に応じて作成することとした。DPPC を 1682.8 mg, Cholesterol を 771 mg, PEG-DSPE を 86.7 mg 及び DHSG を 312 mg 別々に秤取し、クロロホルム：メタノール（2：1）を添加して溶解し、全量を正確に 20 mL とした。この液をクロロホルム：メタノール（2：1）を用いて希釈系列を調製した。標準溶液及び希釈系列 10 μL につき、上記の条件で試験を行った。

## 2. サンプル処理法の検討

1) リポソーム可溶化法の検討では、酵素法の前処理として可溶化剤に n-オクチル-β-チオグルコシド（TG, 同人化学）を使用した。

Hb-V 懸濁液（ヘモグロビン濃度約 100 g/L）を蒸留水で 5 倍希釈したサンプルに種々濃度の TG 溶液を添加し、室温にて 5 分間放置した。この液につき常法により脂質測定キット（酵素法）を用いて DPPC

およびコレステロールを測定し、吸光度の安定するところから TG 濃度を決定した。その後はこの条件にて測定した。

2) HPLC 法サンプルの前処理では、Hb-V 懸濁液 1 mL に 62 mg/L TG 液を等量加え良く攪拌し可溶化する。ここに 2-プロパノールを 2 mL 徐々に加えてさらに攪拌してヘモグロビンを凝集させるとともに凝集塊が大きくなるようにした。これを 3000 rpm で 5 分間遠心処理し、その上清を回収し、さらに残液を 2-プロパノールで洗い込み、5 mL にメスアップした。この液につき異物ろ過のためろ過後、HPLC にて分析した。

### C. 結果及び考察

#### 1. HPLC 法の評価

混合脂質を 100 mg/mL で溶解した標準溶液 10  $\mu$ L につき測定を行った。得られたクロマトグラフを図 1 に示す。

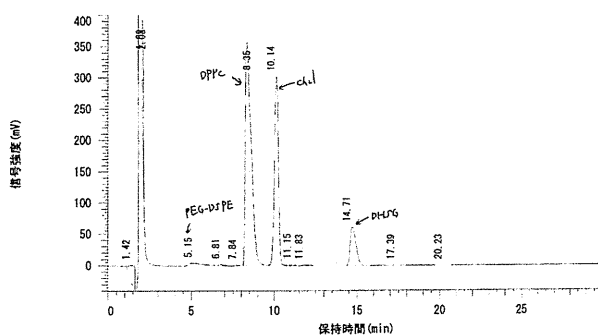


図 1 標準溶液のクロマトグラム

示差屈折計で測定した結果、全ての脂質成分が検出され、かつ単一のピークにて分離可能であった。なお、UV 検出では PEG-DSPE は検出できなかった。

次に分析能パラメーターとして、「特異性」、「直線性」、「範囲」、「検出限界」及び「定量限界」を調べた。

以下には代表として、DPPC と PEG-DSPE について示す。他の 2 成分も同様の結果を得た。

#### 「特異性」

混合脂質を 100 mg/mL で溶解した標準溶液及び脂

質各成分をそれぞれ標準溶液と同濃度になるように溶解したサンプル 10  $\mu$ L につき測定を行った。ブランク及び DPPC と PEG-DSPE について示す。得られたクロマトグラムを図 2-1~2-3 に示す。

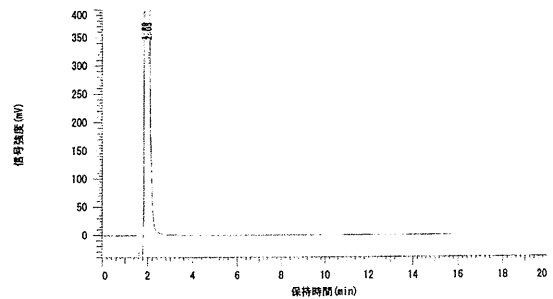


図 2-1 ブランクのクロマトグラム

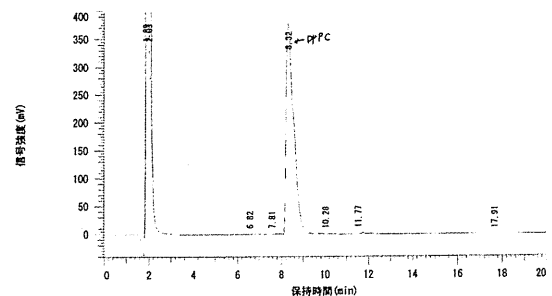


図 2-2 DPPC のクロマトグラム

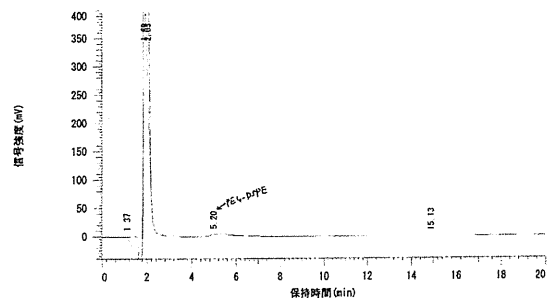


図 2-3 PEG-DSPE のクロマトグラム

分析対象物である DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG のピークの溶出位置は、混合脂質より得た標準溶液の DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG の溶出位置と等しく、ブランク試料のクロマトグラムにおいて、分析対象物の各溶出位置にレスポンスを認めないことを確認した。更に、標準溶液のクロマトグラムにおいて、分析対象物と近接するピークとの分離度が 1.5 以上であった。

#### 「直線性」及び「範囲」

DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG の希釈系列を調製

し、10  $\mu$ L につき測定を行った。

DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG 濃度に対して面積値をプロットしたところ、いずれも視覚的に直線であることが確認できたので、最小 2 乗法による直線回帰を行った。その結果各成分における相関係数は順に、0.9999, 0.9998, 0.9953 及び 0.9999 であり、回帰式はそれぞれ  $y = 133726.2 x - 62037.6$ ,  $y = 187272.4 x - 8876.5$ ,  $y = 93365.4 x - 27585.4$  及び  $y = 144782 x - 9573.6$  であった。得られた回帰直線（検量線）を図 3-1~3-2 に示す。

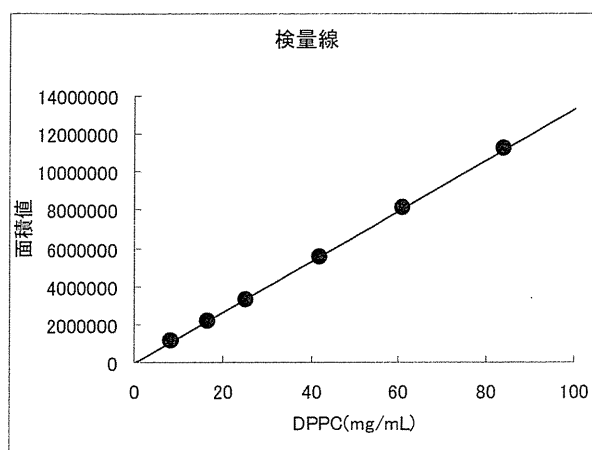


図 3-1 DPPC の検量線

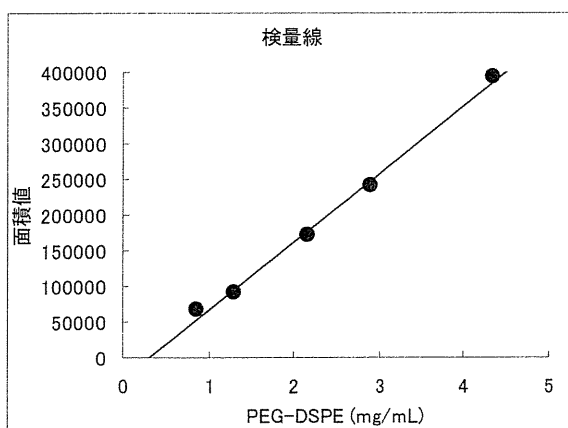


図 3-2 PEG-DSPE の検量線

DPPC 濃度 8.41~84.14 mg/mL, Chol 濃度 3.85~38.53 mg/mL, PEG-DSPE 濃度 0.867~4.335 mg/mL 及び DHSG 濃度 1.56~15.59 mg/mL の範囲において、検量線は良好な直線性を示し、残差グラフから残差に一定の傾向のないことが確認された。さらに、y 切片の 95%信頼区間内に原点が存在することから、DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG のいずれも一点補正法による定量が可能で

あることが明らかとなった。

#### 「検出限界」及び「定量限界」

以上の実験において得られたデータをそれぞれ用いて、検出限界及び定量限界の推定を行った。推定式は、ICH ガイドライン (Q2B) に記載されている通り、それぞれ検出限界 (DL) =  $3.3 \sigma / \text{slope}$ , 定量限界 (QL) =  $10 \sigma / \text{slope}$  を用いた。

表 1 各脂質の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) の推定値

	DL (mg/mL)	QL (mg /mL)
DPPC	0.076	0.230
Chol	0.012	0.037
PEG-DSPE	0.171	0.518
DHSG	0.014	0.043

以上の方法により、DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG のいずれも分離可能であり、一定の範囲内で定量可能であることが明らかとなった。更に各脂質の検出限界及び定量限界値を推定することが可能となった。本法は混合脂質終濃度が 100 mg/mL と高濃度にて測定することから、低含量である PEG-DSPE の測定が可能であった。この混合脂質の分散液からの溶媒抽出を試みたが、水/有機相の分離が完全でなく、PEG-DSPE の回収率が安定しなかった。また有機溶媒乾固の際も突沸を生じやすく定量的な脂質回収が困難で、これは PEG-DSPE の物性によるところが大きいと考えられた。さらに極性の高いと思われる類縁物質（分解物）には溶媒抽出は向いていないと考え、サンプルから直接水を除去する前処理とした。その結果示差屈折計の能力を生かすことのできる高濃度にて測定も可能となった。しかし、凍結乾燥機による水の除去に多大の時間がかかることも問題である。また、示差屈折計自体もベースラインが安定しにくい、グラジエント溶出ができないなどの点で分析効率の向上には難点もある。今後 PEG-DSPE においても十分な感度を以て測定を考える場合、例えば UV 吸収の低い成分の検出に最近汎用され

ている蒸発光散乱検出器 (ELSD : Evaporative Light Scattering Detector) を使用することにより、高感度化とグラジエント溶出が可能となる。その結果分析の効率化が期待でき、類縁物質 (分解物) の評価も可能となるのが気体できる。

## 2. サンプル処理法の検討

1) 前述の方法に従い、種々濃度の TG を添加したのち DPPC と Chol を測定したときの発色の度合いを図 4 に示す。濃度計算にはサンプルの 600 nm の吸光度からブランクの 700 nm の吸光度を差し引くので、その値でプロットした。残存した凝集物のなど要因を除くためここでは遠心処理も加えて方法と比較した。

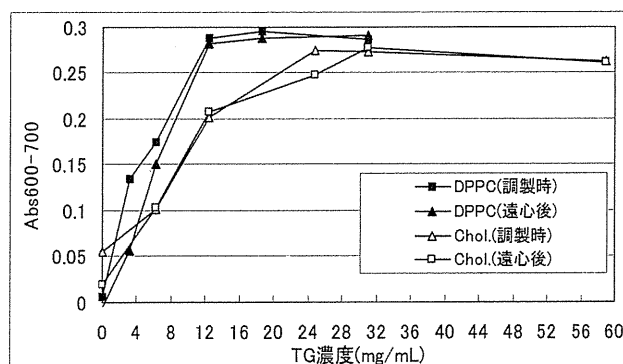


図 4 Hb-V の可溶化に必要な TG 濃度

Chol の方が可溶化は難しいものの TG 最終濃度 31 mg/mL で十分な発色が得られていることがわかった。そこで以降この条件で基本的に可溶化を行うこととした。

実際の工程サンプルである凍結乾燥前の脂質分散液およびヘモグロビン脂質混合液 (水和攪拌後) について、この方法で DPPC を見積もった結果を、表 2 に示す。これから、可溶化による全脂質推定値に仕込みの実績値と良い一致がみられ、この定量法が妥当なものであることがわかる。Chol を指標にした場合も同様の結果が得られた

表 2 DPPC 濃度の測定と全脂質の推定

試料溶液	濃度	単位 ; (mg/mL)	
		全脂質濃度 推定値	仕込量 計算値
脂質分散液 1	11.85	19.43	19.33
脂質分散液 2	12.55	20.57	19.82
脂質分散液 3	12.50	20.49	20.01
ヘモグロビン脂質 混合液 1	42.20	69.18	69.25
ヘモグロビン脂質 混合液 2	42.55	69.76	71.77

全脂質中 DPPC 含量を 61%として全脂質濃度推定値を算出し、仕込み実績と比較した。

2) さらにこの手法を応用し、ヘモグロビンを含むサンプルを TG にて予め可溶化し均一化した後、アルコール類を添加することにより除蛋白とサンプルの均一化を図った。予備検討の結果、検出可能な脂質濃度を維持するにはプロパノールがメタノール、エタノールに比べ有効で、また蛋白変性には 2-プロパノールが 1-プロパノールより勝ることがわかった。この方法により、脂質分散液と同様の HPLC チャートが得られることも確認できた。

そこで、Hb-V 中の脂質濃度を脂質測定キット (酵素法) と HPLC 法で比較した。HPLC 法のサンプル前処理法は前記方法の欄に記載の通りである。結果を表 3 に示す

表 3 Hb-V 中の脂質濃度の比較

分析法	単位 ; (mg/mL)			
	DPPC	Chol	PEG- DSPE	DHSG
酵素法	54.2	21.0	-	-
HPLC 法	52.13 (61.0)	21.99 (25.7)	2.818 (3.28)	8.87 (10.3)

括弧内は実測値より脂質構成比 (%) を算出したもの

以上の結果、酵素法と HPLC 法は良い一致を示し、HPLC 法により最終 Hb-V においても脂質の構成比

が原料の混合脂質とほとんど変わらないことが実証できた。また工程中の脂質の収支評価においては、酵素法であっても一度脂質構成についてデータを得ておれば、十分妥当な結果が得られることもわかった。

## 原料と製品の脂質ロット間差

### A. 目的

HPLCによる脂質分析の条件および性能が確認できたので、さらに原料の脂質と製品であるHb-Vそれぞれのロット間差を調べ、この脂質定量法によりHb-V製造の製造管理および品質管理における有用性を検討した。

### B. 方法

#### 1. HPLC法

HPLCによる脂質定量は以下の方法に依った。

##### 1) 試験条件

検出器；示差屈折計

カラム；Cadenza CD-C18 150 mm×4.6 mm I.D. (3 μm) Imtact社製

カラム温度；40℃

移動相；メタノール：テトラヒドロフラン：蒸留水：トリフルオロ酢酸 (950：30：20：1)

流速；1.0 mL/min

注入量；80 μL

##### 2) サンプルの前処理

Hb-Vは常法に従い調製したものを使用した。Hb-V懸濁液（ヘモグロビン濃度約100 g/L）に可溶化剤として62 mg/L n-オクタシル-β-チオグルコシド（TG，同人化学）溶液を等量添加し、室温にて5分間放置した後、除蛋白と溶液の均一化を目的に2-プロパノールを加えて所定量にメスアップし、そのろ過した液をHPLC分析の測定試料溶液とした。

製造原料である混合脂質（DPPC，Cholesterol，PEG-DSPE及びDHSGからなる混合物）は、直接2-プロパノール：水（4：1）に溶解し測定試料溶液

とした。

## C. 結果及び考察

### 1. 混合脂質の評価

ロットの異なる混合脂質を7 mg/mLに溶解しHPLCにて分析した。構成脂質4成分のピーク面積比を表1に、得られたクロマトグラムを図1に示した。

表1 混合脂質中構成成分のピーク面積比 (%)

脂質成分	lot FFH-006	lot KJK-41161
DPPC	57.0	56.8
Cholesterol	31.9	31.8
PEG-DSPE	1.4	1.3
DHSG	9.7	9.7
その他	0.6	0.5

主要4成分以外のピーク面積はその他にまとめ、全ピークの面積合計を100%として表した。

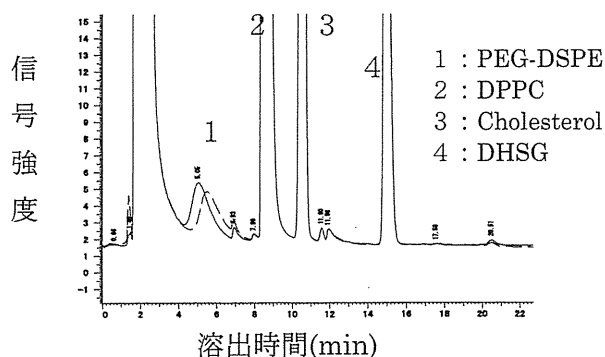


図1 混合脂質のクロマトグラム

2ロットのクロマトグラムを重ね書きした。実線；lot FFH-006，破線；lot KJK-41161。

今回評価したこの2ロットでは、主要4成分およびその他成分のピーク面積比は良く一致し、溶出ピークパターンもロット間差の無いことが示された。

すなわち、クロマトグラムも含量の多いDPPC，Cholesterol，DHSGは各ピークの溶出位置，形状が良く一致していた。さらに構成脂肪酸の異なるPC（レシチン）などマイナーな成分のピークも溶出

位置、形状が良く一致していた。

原料として各構成成分はロット違いを使用して  
いるものの、混合脂質の製品品質としては良く同  
等性が保たれていることが示された。

PEG-DSPE には、ピーク形状に若干差が認められ  
た。おそらく PEG 鎖の分子量分布の違いなどに由  
来する物性のわずかな差が表れたものと考えられ  
る。

このピーク形状の違いが Hb-V の生体内安定性に  
どの程度影響するものかは今後留意する必要はあ  
る。しかしながら、表 2 の値から見て分かるよう  
にピーク面積から算出される含量には両者に違い  
は出てこない。また Hb-V 表層に一定の PEG 水和層  
を形成することが機能発現に効いていると考えれ  
ば、この違いが直ちに Hb-V の性能差になる可能性  
は少ない。

今回は混合脂質の成分比較を 2 ロットについて  
調べた。しかし、これだけでロット間の同等性を  
結論づけられるものでなく、ロット間差の議論に  
はさらにロット数を重ねなければならない。

むしろ今回の結果は、本脂質量法が下記の点か  
ら混合脂質の品質評価において有用であることを  
示したと考えられる。

- ・ 主要 4 成分を分離定量出来ること。
- ・ 主要成分だけでなく PEG-DSPE や微量成分の  
ピーク（ピーク面積比で 2%未満）の特徴を良  
く捉えられること。

本分析法は、Hb-V 製造の工程管理において脂質  
の収支を明らかにし、脂質の挙動を理解するには  
十分な性能を持っている。また、上記特徴の 2 点  
目は、特に今後安定性など類縁物質の消長を評価  
してゆくに当たって、十分な分離性能を示したも  
のである。ただし、類縁物質は含量として 0.1%レ  
ベルで定量的評価が出来ることが望ましく、また  
構造についても知見が要求される。

一般的に示差屈折計検出自体は検出感度が低く、  
ベースラインの変動の影響も受けやすいので微量  
成分の定量的評価には不向きであり、また原理的  
にも構造解析に不向きである。したがって、製品

の品質管理にはより高感度な検出系との組み合わ  
せが好ましいと考えられる。そのような検出系に  
は、例えば ELSD（光散乱式検出器）や MS（マス  
スペクトル）などが挙げられる。

## 2. Hb-V の評価

同じロットの混合脂質 (lot FFH-006) を原料に使  
用したロットの異なる Hb-V の脂質成分を HPLC に  
て分析した。結果を表 2 に示す。

表 2 Hb-V 中構成脂質ピーク面積比 (%)

脂質成分	lot 1008	lot 1010	lot 1011
DPPC	56.8	57.0	56.4
Cholesterol	31.9	31.5	32.3
PEG-DSPE	1.0	1.1	1.1
DHSG	9.7	9.7	9.5
その他	0.7	0.6	0.6

表 1 と同様に主要 4 成分以外のピーク面積はその他にま  
とめ、全ピークの面積合計を 100%とした。

前半の HPLC 法の条件検討では 1 ロットのみ分析  
結果を示しただけであったが、今回複数のロット  
について調べることができた。表 1 はその一部で  
ある。この結果から製剤中の脂質は原料の混合脂  
質の組成比を良く保持していると考えられる。主要  
成分は各検量線から定量値を求めているが、少なく  
とも DPPC, Cholesterol, DHSG は回収率にも問題はな  
かった。PEG-DSPE は若干低値を示した。その他成分  
は製造前後でピーク面積において顕著な増加を示  
さなかった。PEG-DSPE やその他成分は微量である  
ので、これらの増減を定量的に考察するには現状の分析  
法ではまだ難しい。それでも工程中の脂質の分解な  
どは問題となるような変化はないと考えられる。  
現行製造法においては製造工程中脂質組成の変動  
がほとんどないこと、ロット間差も少ないことを  
確認出来た。

ここで見た脂質組成比は Hb-V 懸濁液全体の平均  
像である。懸濁液の内部構造（リポソームの大き



さ、膜枚数、Hb 含有量) を考えると局所的に不均一性を生じている可能性はまだ残っている。これらを物性に基づき分ける手段と組み合わせればさらに詳細な脂質の挙動を考察することが出来るであろう。

また、Hb-V でも微量成分に関する課題と将来的な可能性は1. 混合脂質の評価で指摘したと同様の

ことが言える。検出法の点で改善を組み合わせれば、原料脂質だけでなく Hb-V の工程管理や品質管理においてさらに有用な手段になると考えられる。

## II. メトヘモグロビン化の推移を指標にした Hb-V の保存安定性

### A. 目的

Hb-V 中のヘモグロビンが機能するためには、その酸化つまりメトヘモグロビン化を防止する必要があることは論ずるまでもない。赤血球からのヘモグロビンの精製および Hb-V 調製の工程途中では積極的に CO をヘム鉄に配位させる酸化防止策によりヘモグロビンの機能維持を図っている。最終製品化に際してはこの CO は一度酸素に置換しさらに脱酸素化を行う。このとき微量の酸素が残存すると保存中にメトヘモグロビン化が進行し、酸素運搬体としての機能を果たし得なくなることが分かっている。

今回脱酸素化した複数のロットについてその保管中のメトヘモグロビン化の推移を調べ、初期値や保存温度の影響などを考察した。

### B. 方法

#### 1. Hb-V の調製と保存

脱 CO 化後の Hb-V を窒素気流下(流量約 20 L/hr)において約 10 時間攪拌しながら脱酸素化した。これを同じく窒素気流下においてガラスバイアルに充填し、ブチルゴム栓にて封栓した。これらの充填サンプルを成り行き室温(約 25℃)および冷蔵(2~8℃)に保存した。サンプリングの際には環境中の酸素の影響を最小となるよう、窒素気流下(酸素濃度 0.1%未満)にてバイアルより Hb-V を抜き取った。なおこれら Hb-V 懸濁液中には抗酸化(還元)作用のある成分はどの工程中也添加していない。

#### 2. Hb-V のメトヘモグロビン化率の測定

62 mg/L n-オクチル-β-チオグルコシド溶液を等量添加して Hb-V を可溶化した。この溶液につきシアノメトヘモグロビン法によりメトヘモグロビン化率を求めた。

### C. 結果及び考察

(1) 脱酸素環境下ガラスバイアルに充填したサンプルのメトヘモグロビン化率の推移を図 1 に示した。

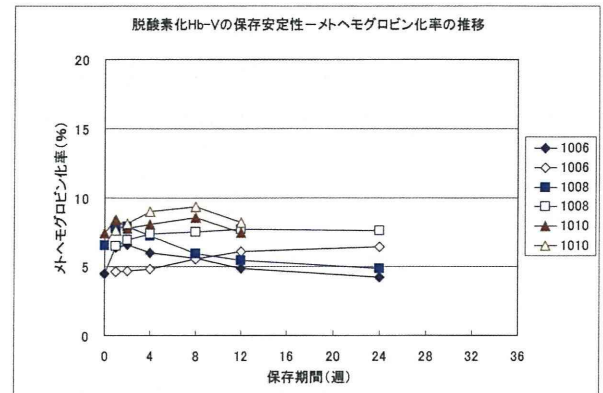


図 1 脱酸素化 Hb-V の保存安定性  
—メトヘモグロビン化率の推移

室温(クローズドシンボル)および冷蔵(オープンシンボル)に保管した時のメトヘモグロビン化率を示す。

ここでは、メトヘモグロビン化率の初期値に若干の差のあるロットを実験に供した。各初期値は、lot1006 が 4.49%、lot1008 が 6.56%、lot1010 が 7.40%であった。初期値にかかわらずその後の経過には大差が無く、1~2%の範囲内で測定値が変動するにとどまっていた。これは保存温度による違いはなかった。初めの 2 ロットは 24 週までの実績を見ており、すべてのロットで試験を継続中である。これら 3 ロットとも保存中のメトヘモグロビンの生成は室温に置いて十分に抑えられていると判断している。初期のメトヘモグロビン量の違いはその後の推移には直接影響しないようだ。

結果は示していないが、初期値のメトヘモグロビン化率が 6~8%に達したものであっても、脱酸素化の処理時間が短いものでは室温保存で速やかなメトヘモグロビン化率の上昇が認められ、一方脱酸素化の処理をさらに継続した後のサンプルでは、初期値は変わらずともその後のメトヘモグロビン化率の上昇は観察されていない。前者では計測困難なレベルの微量酸素が残存していたことが伺える。

脱酸素化処理の処理条件や工程管理方法の設定についてはまだ検討の余地を残すが、試験に供した3ロットの初期値は脱酸素化終了までの履歴の違いにより酸化を受けたことを示しており、この程度にメトヘモグロビンが残存していても一旦脱酸素化が達成でき、その環境を保ったまま容器充填まで出来ればその後の酸化は進まないと考えられる。

(2)前年度に比べロット数も増やしメトヘモグロビン化率の初期値に幅のあるロットについて、より長期(48週まで)の安定性を調べた(図2)。各初期値は、4~8%台であり、このあたりが現状の製造品質を反映した値と考えられる。このメトヘモグロビン化率は初期値にかかわらずその後の経過には大差が無く、48週後にいたるも2~3%の範囲内で測定値が変動するにとどまっていた。ここでも保存温度による違いはなかった。

長期間にわたる分析のばらつきも考慮するとこれらの数値の違いは本質的な差異ではなく、10%を超えるような変化はなかったことから、今回の製造ロットでは十分に酸化防止できていたと考えられる。

すなわち、一度脱酸素化が達成されると保存中のメトヘモグロビンの生成は室温に置いてても十分に抑えられ、保存安定性の点では酸化防止剤などは必ずしも必要としないと考えられる。

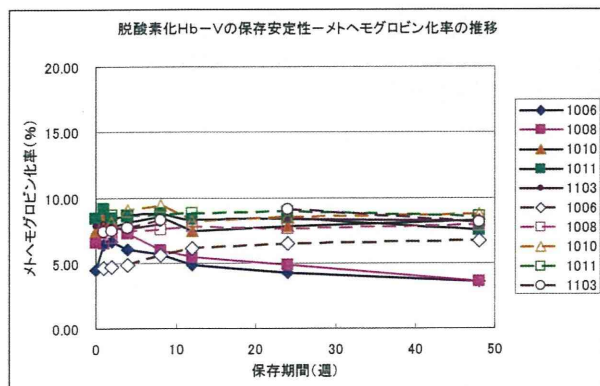


図2 脱酸素化Hb-Vの保存安定性  
-メトヘモグロビン化率の推移

室温(クローズドシンボル)および冷蔵(オープンシンボル)に保管した時のメトヘモグロビン化率を示す。

今回の試験では、注射剤の容器として、そのガスバリア能でも十分に実績のあるガラスバイアルとブチルゴム栓を用いたので保存中の外部環境の影響が及ばなかったと考えられ、脱酸素終了時点のサンプルの状態と環境の効果を評価することが出来たと考えている。最終製品の実用化に当たっては、充填時の無酸素環境と容器のガスバリア能が重要な役割を果たすことは間違いない。

なお、初期のメトヘモグロビン量の違いはその後の推移には直接影響しないというものの、より低値であることが好ましいことはいうまでもない。メトヘモグロビン化率の初期値を低減し脱酸素化工程の再現性を高める要因をこれまでのサンプル調製の実績(これには不成功事例も含む)から回顧的に探った。以下の項目に留意が必要と考えられる。

すなわち、品質に関する製造条件・要因として、ロットサイズ(気液界面の大きさ)、攪拌、液温、通気流量、時間、反応容器外部の環境中酸素、前工程(脱CO工程)でのメトヘモグロビン化率、原薬の保存期間、接液する樹脂素材(とくにシリコン)中の残留酸素、容器充填環境の酸素分圧などが挙げられる。

このうち、気液界面の大きさは処理液量の影響がもっとも出やすく、これがスケールアップファクターの最大の要因となる。

### Ⅲ. 品質向上のための製造方法の検討

#### A. 目的

Hb-V の製造方法全般について生産性、品質および安全性の向上などの観点から今後の製造工程や設備設計に必要な事項を以下取り上げ考察した。

表1 ヘモグロビン精製収率の実績

ロット 工程	0921		0931		0951		0961		0971
	A	B	A	B	A	B	A	B	—
期限切れ赤血球	100	100	100	100	100	100	100	100	100
血球洗浄	93.7	93.4	79.5	82.5	66.9	75.7	68.6	69.1	64.3
ストローマ除去	83.7	83.5		72.9	68.9	70.1	66.8	61.6	51.4
CO化	83.5	82.4	71.3	71.8	68.0	68.4	65.6	60.5	50.5
ウイルス不活化(加熱)	78.7	76.0	69.1	67.7	64.9	64.9	61.3	52.9	48.0
ウイルス除去膜処理	77.3		67.0		64.9		57.5		48.2
脱塩・濃縮	76.9		65.7		63.9		54.4		41.9
最終ろ過(0.2 $\mu$ m)	71.3		60.7		58.3		50.5		36.0

赤血球製剤の130～170単位を1バッチとして洗浄処理からウイルス不活化処理まで行った後2バッチを1ロットに合一して、ウイルス除去膜にかける。ただし、受け入れ製剤量が少ないときには前半の1バッチで最終1ロットを構成する。初発の赤血球製剤の総ヘモグロビン量を100%として各工程の収量を収率にて示した。

#### B. 方法

期限切れ赤血球製剤の受け入れ・保管からヘモグロビン精製品を得る工程およびHb-V製剤とする工程を検討対象とした(図1参照)。

これまでの製造実績を集約し、目的にあげた生産性、品質および安全性の向上の観点から留意すべきポイントを抽出した。