

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学再生医科学研究所 生体材料学
分担研究者 田畑 泰彦

研究要旨

合併症をともなう重傷の閉塞性動脈硬化症、バージャー病に対する成熟血管新生誘導に関する動物実験を行い、下肢虚血に対する新たな治療法の確立をめざす。

<実験 1：血小板内細胞増殖因子混合物 (PGFM) 徐放化ドラッグデリバリー (DDS) 医薬品の作製>

A. 研究目的

本研究の目的は、患者から採取可能な血小板内の細胞増殖因子混合物 (PGFM) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を用い、2 種類以上の細胞増殖因子を生体内で長期にわたって徐々に放出 (徐放) するドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発、および下肢虚血に対する新たな成熟血管新生誘導治療法の確立である。本研究では、以下に示す 5 点について検討を行った。

1. PGFM のソースである多血小板血漿 (PRP) 採取方法の最適化。
2. 血小板の活性化による PGFM 調製方法の最適化。
3. PGFM 徐放化 DDS 医薬品の調製と PGFM 徐放性の評価。
4. 血管新生を誘導する PGFM 徐放化 DDS の最

適化。

5. PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせによる成熟血管新生の評価。

B. 研究方法

<ゼラチンハイドロゲル粉砕物の作製>

豚皮由来酸性ゼラチン (等電点 5.0) 水溶液へグルタルアルデヒドを加えた後、4℃にて 12 時間静置することによって化学架橋したゼラチンハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルをグリシン水溶液 (100 mM) で 37℃にて 1 時間処理し、未反応のアルデヒド基を不活化した。蒸留水にて 3 回洗浄後、ホモジナイザーで粉砕した。ふるいを用いて、大きさが 32-75 μm のゼラチンハイドロゲル粉砕物を回収し、凍結乾燥した。得られたゼラチンハイドロゲル粉砕物の含水率は 98%であった。

<PRP の調製>

PRP は、ダブルスピン法により調製した。採血した血液 9 ml と抗凝固剤 1 ml を混合し、

2,400 rpm、10 分間遠心分離を行い、血漿成分を回収した。得られた血漿成分を、さらに 3,600 rpm、15 分間の遠心分離を行った。PRP 中の血小板濃度と細胞増殖因子の濃度との相関性を検討した。上記の方法により作製した PRP を希釈し、濃縮度の異なる PRP を調製した。調製した PRP を凍結融解処理することで血小板を破碎した後、放出された PGFM に含まれる代表的な細胞増殖因子である platelet-derived growth factor (PDGF)-BB の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で定量した。

<PGFM の調製>

PGFM の調製方法を最適化するために、血小板の活性化方法について検討した。本研究では、血小板の活性化剤として、他の PRP 療法ですでに臨床応用されている塩化カルシウム水溶液を使用した。0.4、0.6、0.8、1、2、4、および 10 wt% の塩化カルシウム水溶液を添加、または 2 wt% 塩化カルシウム水溶液と自己トロンビン混合液を添加し、室温で 1 時間静置することによって血小板を活性化させた。自己トロンビンは、血液 10 ml を凝固剤入り採血管に採血し、3,600 rpm、30 分間の遠心分離を行い、上清を回収することで作製した。コントロールとして、凍結融解を 3 回繰り返して完全に血小板を破碎した PRP と未処理の PRP を用いた。血小板の活性化後、上清を採取し、放出された PGFM を ELISA 法により定量した。本研究では、PGFM に含まれる主な細胞増殖因子として、PDGF-BB、vascular endothelial growth factor (VEGF)、

transforming growth factor (TGF)- β_1 、および bFGF について検討した。

<PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルの調製>

PGFM をゼラチンハイドロゲルに含浸させる条件を最適化するために、異なる条件で PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルを作製し、ハイドロゲルに含浸されなかった遊離の細胞増殖因子を定量した。1、2、および 4 wt% 塩化カルシウム水溶液を用いて血小板を活性化した PRP を、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲル粉砕物へ滴下した。PGFM を含浸させる条件として、活性化 PRP を滴下後、25 °C と 37 °C において、それぞれ 15、30、および 60 分間静置した。得られた PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルを 37 °C のリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。本研究では、PGFM に含まれる代表的な細胞増殖因子である PDGF-BB を ELISA 法により定量した。

さらに、PGFM のゼラチンハイドロゲルへの収着に最適な PGFM 調製方法を決定するために、異なる活性化方法で調製した PGFM をゼラチンハイドロゲルに含浸させた後、ハイドロゲルに収着した細胞増殖因子を定量した。すなわち、PRP に対して 0.4、0.6、0.8、1、2、4、および 10 wt% の塩化カルシウム水溶液を添加、または 2 wt% 塩化カルシウム水溶液と自己トロンビン混合液を添加し、室温で 1 時間静置した PRP を、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲル粉砕物に滴下し、37°C で 60 分間含浸させた。得られた PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルを 37 °C の PBS 中に 3 時間放置し、PBS 遊離した PDGF-BB を ELISA 法にて定量した。この遊離が少ないほど、細胞増殖因子がハイドロ

ゲルにより多く収着していると考えられる。

<PGFM 徐放性の評価>

in vitro におけるハイドロゲルの分解と PDGF-BB の放出量を検討した。PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルを PBS で 12 時間洗浄後、上清を回収した。さらに、コラゲナーゼ水溶液を添加後、経時的に上清を回収し、280 nm の吸光度を測定することによって、in vitro におけるハイドロゲルの分岐を調べた。同時に、上清に含まれる PDGF-BB を ELISA 法にて定量した。

<PGFM 徐放化 DDS 投与による血管新生誘導の評価>

血管新生を誘導する PGFM 徐放化 DDS の最適化を行うために、濃縮度の異なる PRP より調製した PGFM を含浸させたゼラチンハイドロゲルを作製し、血管新生誘導効果を評価した。1、2.5、5、および 10 倍濃縮した PRP より PGFM を調製し、ドーサルスキンプォールドチャンバーを利用したマウスの血管新生実験を行った。

<PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせによる成熟血管新生の評価>

調製した PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせによる成熟血管新生効果は、正常マウスの下肢虚血モデルを用いた小動物実験にて評価した。下肢虚血モデルは、正常マウスの下肢大腿動静脈、および腸骨回旋動

静脈を結紮・切除することで作製した。PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS を虚血下肢に筋肉内注射し、1 週間後にレーザードップラー血流計を用いた血流解析を行った。さらに、虚血モデルの下肢組織を 4 wt%パラホルムアルデヒドにて固定し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色、ならびに成熟した血管に見られる血管平滑筋細胞のマーカである alpha-smooth muscle actin (α -SMA) に対する免疫染色を行い、新生血管数ならびに成熟血管数を組織学的に評価した。

さらに、正常家兎の下肢虚血モデルを用いて、大動物における血管新生も評価した。家兎下肢虚血モデルは、下肢大腿動脈、および腸骨回旋動脈を結紮・切除することで作製した。PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS を虚血下肢に筋肉内注射し、投与 1 週間後に血管造影、および組織学的解析にて血管新生を評価した。

C. 研究結果

1. PRP 採取方法の最適化。

PRP は、採取した 9 ml の血液から 1.0 ml 得られた。得られた PRP 中の血小板数は、末梢血に比べて最低 5 倍以上に濃縮されていた。図 1 は、濃縮度の異なる PRP から放出された PGFM 中の PDGF-BB の定量結果を示す。図から明らかのように、PRP の濃縮度と PGFM に含まれる PDGF-BB の濃度とは相関性があることがわかった。

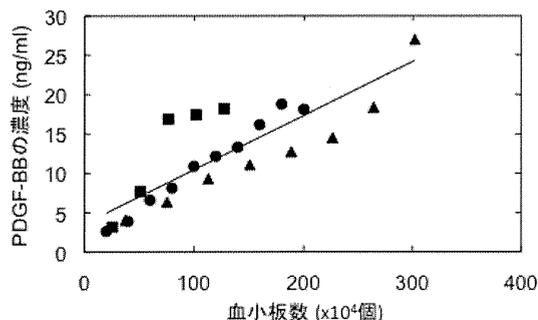


図1 PRP 中の血小板濃度と細胞増殖因子の濃度との相関性。

(●) 検体1、(▲) 検体2、(■) 検体3。

2. 血小板の活性化による PGFM 調製方法の最適化。

凍結融解処理によって血小板を完全に破碎した場合、リソソーム内に含まれるタンパク質分解酵素など、細胞に有害なタンパク質も放出されてしまう可能性が考えられる。この解決法として、本研究では、塩化カルシウム水溶液の添加によって血小板を活性化することにより、PGFMを放出させる方法を検討した。本研究では、血小板の活性化剤として、褥瘡や創傷治癒など、他のPRP療法ですでに臨床応用されている塩化カルシウム水溶液を使用した。調製したPRPに対して、異なる濃度の塩化カルシウム水溶液の添加、または2 wt%塩化カルシウム水溶液と自己トロンビンの混合液を添加し、血小板から放出されたPGFMに含まれるPDGF-BB、VEGF、TGF- β_1 、EGF、ならびにbFGFの量を定量した。図2は、異なる方法で調製したPGFMに含まれるPDGF-BBの定量結果を示す。図から明らかのように、未処理のPRP、および0.4 wt%、あるいは10 wt%塩

化カルシウム水溶液で処理したPRPと比較して、1、2、4 wt%塩化カルシウム水溶液で処理したPRPで、より多くのPDGF-BBが検出された。一方、PGFMに含まれる細胞増殖因子の濃度は、凍結融解したPRPで最大値を示した。

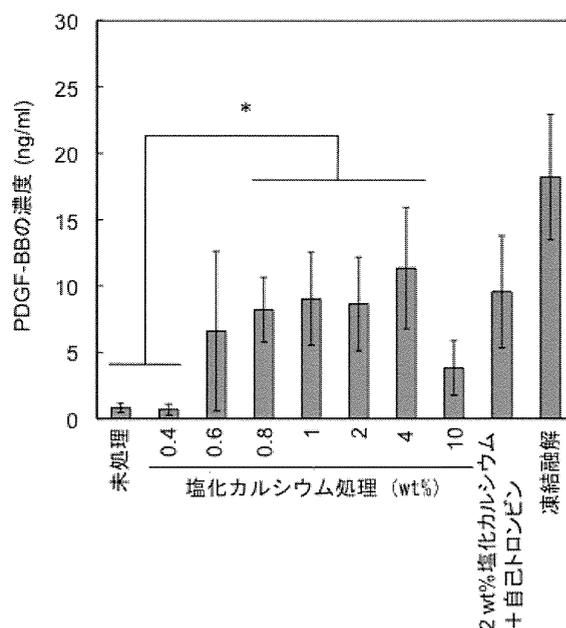


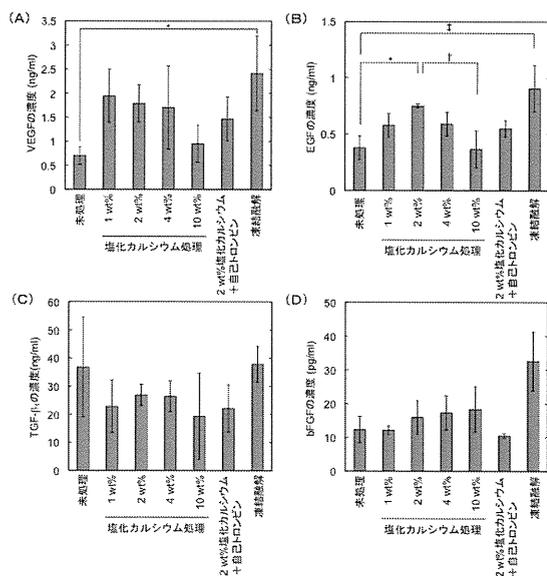
図2 血小板の活性化方法がPGFMに含まれるPDGF-BB濃度に与える影響

血小板活性化方法: 0.4、0.6、0.8、1、2、4、10 wt%塩化カルシウム (CaCl₂)水溶液添加、2 wt%塩化カルシウムと自己トロンビン混合水溶液添加 (2% CaCl₂ + Thrombin)、凍結融解 (Freeze & Thaw)、および未処理 (Non Treatment)。* p<0.05で有意差。

図3には、PDGF-BB以外の細胞増殖因子の定量結果を示す。図2より、血小板の活性化には、1 wt%以上の濃度の塩化カルシウム水溶液を添加する必要があることがわかった。そこで、PRPを1、2、4、および10 wt%塩化カルシウム水溶液、2 wt%塩化カルシウム水溶液と自己トロンビン混合液を用いて処理するこ

とで PGFM を調製した。また、コントロールとして、凍結融解と未処理の PRP を用いた。VEGF、および EGF は、PDGF-BB の結果と同様に、1 wt% 以上の塩化カルシウム水溶液で PRP を処理することにより、PGFM 中に放出されることがわかった (図 3A および B)。一方、TGF- β_1 、および bFGF の濃度は、PRP の処理方法に依存しないことがわかった (図 3C および D)。ここで、TGF- β_1 の ELISA 測定では、サンプルを 1N 塩酸で前処理する必要があるため、その際、血小板から TGF- β_1 が放出された可能性がある。一方、血小板に含まれる bFGF の量は、その他の

異なる条件で PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルを作製し、ハイドロゲルに収着されなかった遊離の PDGF-BB を定量した。表 1 は、含浸された PGFM 中の PDGF-BB 量を 100% として、遊離した PDGF-BB の割合を示す。表 1 から明らかのように、25 °C で PGFM をゼラチンハイドロゲルに含浸させた場合、含浸時間によらず PDGF-BB の遊離が認められた。一方、37 °C で 60 分間 PGFM をゼラチンハイドロゲルに含浸させた場合、ゼラチンハイドロゲルからの PDGF-BB の遊離は少なかった。さらに、PGFM 調製のために添加した塩化カルシウムの濃度が 1、あるいは 2 wt% の場合、他の調製方法と比べて PDGF-BB の遊離が少なかった。



細胞増殖因子と比べて少ないことがわかった。

図 3 血小板活性化方法と細胞増殖因子の放出量

PGFM 調製方法：1、2、4、10 wt% 塩化カルシウム水溶液添加、2 wt% 塩化カルシウム水溶液と自己トロンビン混合水溶液添加、凍結融解、および未処理。(A) VEGF、(B) EGF、(C) TGF- β_1 、および (D) bFGF。

3. PGFM 徐放化 DDS 医薬品の調製と PGFM 徐放性の評価。

| 1 wt% 塩化カルシウム | | | | 2 wt% 塩化カルシウム | | | |
|---------------|------|----------|------|---------------|------|----------|------|
| | | 含浸時間 (分) | | | | 含浸時間 (分) | |
| 含浸温度 (°C) | 15 | 30 | 60 | 含浸温度 (°C) | 15 | 30 | 60 |
| 25°C | 30.1 | 37.4 | 39.5 | 25°C | 51.1 | 39.6 | 42.1 |
| 37°C | 43.3 | 21.5 | 22.6 | 37°C | 44.5 | 39.3 | 35.0 |

| 4 wt% 塩化カルシウム | | | | 凍結融解 | | | |
|---------------|------|----------|------|-----------|------|----------|------|
| | | 含浸時間 (分) | | | | 含浸時間 (分) | |
| 含浸温度 (°C) | 15 | 30 | 60 | 含浸温度 (°C) | 15 | 30 | 60 |
| 25°C | 55.5 | 53.0 | 53.8 | 25°C | 100 | 100 | 100 |
| 37°C | 40.8 | 69.9 | 57.8 | 37°C | 63.1 | 80.3 | 68.5 |

| 未処理 | | | |
|-----------|------|----------|------|
| | | 含浸時間 (分) | |
| 含浸温度 (°C) | 15 | 30 | 60 |
| 25°C | 48.8 | 49.6 | 60.7 |
| 37°C | 34.1 | 38.3 | 31.7 |

表 1 PGFM 含浸条件が PDGF-BB の遊離に与える影響

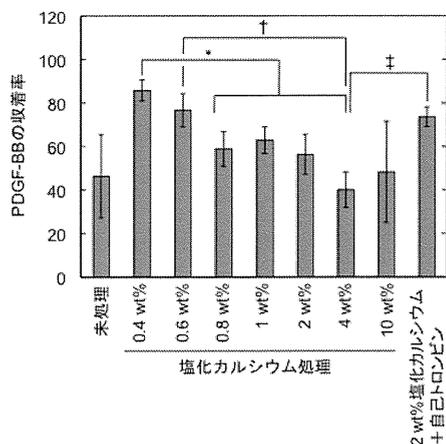
血小板活性化方法：1、2、4 wt% 塩化カルシウム水溶液添加、凍結融解、および未処理。含浸させた PGFM 中に含まれる PDGF-BB 量を 100% とし、遊離した PDGF-BB の割合を示す。

続いて、ゼラチンハイドロゲルへの収着に最適な PGFM 調製方法を評価した。図 4 は、PGFM に含まれる PDGF-BB のゼラチンハイドロゲルへの収着率を示す。図から明らかのように、PGFM 調製に用いた塩化カルシウム水溶液の濃

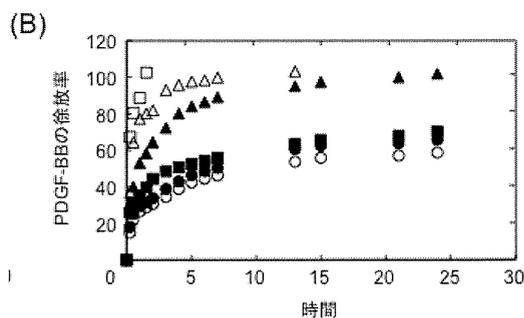
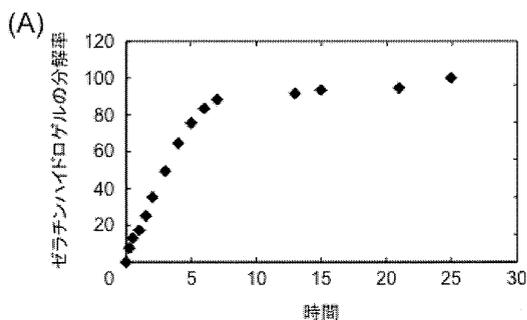
度が増加するとともに、ゼラチンハイドロゲルへの PDGF-BB の収着率が減少した。

図 5 は、得られた PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルをコラゲナーゼにて分解させ、in vitro におけるハイドロゲルの分解とハイドロゲルからの PDGF-BB 徐放の結果を示す。図 5 から明らかなように、2 wt%塩化カルシウム水溶液を用いて調製した PGFM を含浸させたゼラチンハイドロゲルにおいて、ゼラチンハイドロゲルの分解と PDGF-BB の徐放とが良く相関していることがわかった。また、図 6 は、2 wt%塩化カルシウム水溶液を用いて調製した PGFM の徐放率と、ゼラチンハイドロゲルの分解率とをプロットしたグラフである。コラゲナーゼを含まない PBS 中でも少量の PDGF-BB が放出されるものの、コラゲナーゼ水溶液を添加することにより、ゼラチンハイドロゲルが分解され、それにともない PDGF-BB がハイドロゲルから放出されていることがわかった。

図 4 PGFM 調製方法がゼラチンハイドロゲルへの PGFM の収着に与える影響



PGFM 調製方法 : 0.4、0.6、0.8、1、2、4、10 wt% 塩化カルシウム (CaCl₂)水溶液添加、2 wt%塩化カルシウムと自己トロンビン混合水溶液添加 (2%



CaCl₂ + Thrombin)、および未処理 (Non Treatment)。* p<0.05 で有意差。

図 5 コラゲナーゼ水溶液中でのゼラチンハイドロゲルの分解と PGFM の徐放の評価

(A) in vitro におけるコラゲナーゼ水溶液中でのゼラチンハイドロゲル分解、(B) in vitro における PDGF-BB の徐放化。PGFM 調製方法 : (●) 1、(▲) 2、(■) 4 wt%塩化カルシウム水溶液添加、(○) 2 wt%塩化カルシウムと自己トロンビン混合水溶液添加、(△) 凍結融解、および (□) 未処理 矢印: 開始 12 時間後にコラゲナーゼ水溶液に浸漬。

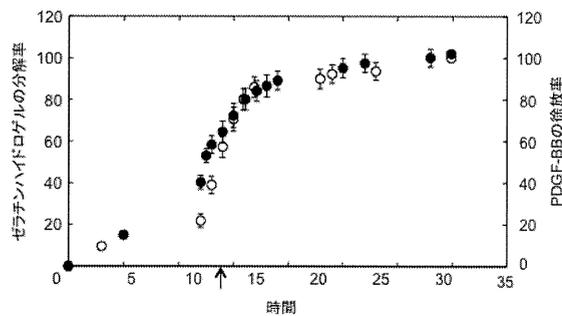


図6 コラゲナーゼ水溶液中でのゼラチンハイドロゲルの分解とPGFMの徐放の評価

(●) in vitroにおけるコラゲナーゼ水溶液中でのゼラチンハイドロゲル分解、(○) in vitroにおけるコラゲナーゼ水溶液中でのPDGF-BBの徐放。矢印：コラゲナーゼ水溶液添加。

4. 血管新生を誘導するPGFM徐放化DDSの最適化

図7は、PGFM含浸ゼラチンハイドロゲル埋入3日後における埋入部位の拡大観察の結果を示す。5および10倍濃縮したPRPより調製したPGFMを含浸させたゼラチンハイドロゲルを埋入した群では、他の実験群と比較して、血管の分子構造が増加する傾向が観察された。また、血管の分枝数は、PRPの濃縮度に依存して増加していた。

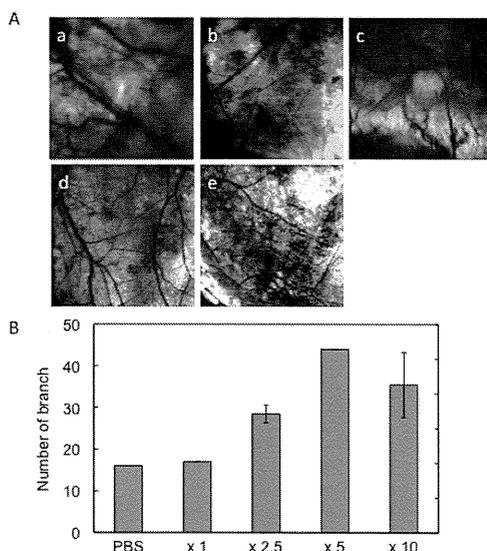


図7 濃縮度の異なるPRPから調製したPGFMを用いたドーサルスキنفォールドチャンバー内の皮下組織での血管新生

(A) 実体顕微鏡像。生理食塩水含浸ハイドロゲル(a)、1倍濃縮(b)、2.5倍濃縮(c)、5倍濃縮(d)、および10倍濃縮(e)したPRPから調製したPGFMを含浸させたゼラチンハイドロゲルを埋入した。

(B) 血管の分岐数。左から、生理食塩水(PBS)、1倍、2.5倍、5倍、および10倍濃縮したPRPから調製したPGFM含浸ゼラチンハイドロゲルを埋入することによって誘導された血管の分岐数を示す。

5. PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSとの組み合わせによる成熟血管新生の評価。

PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSの組み合わせによる成熟血管新生を、組織学的解析、およびレーザードップラー血流計による血流解析にて評価した。図8は、投与1週間におけるPGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSの組み合わせによる虚血下肢に対する血管新生効果を示す。HE染色、ならびに抗 α -SMA抗体を用いた免疫染色を行い、新生血管数、ならびに成熟血管数を組織学的に評価した。その結果、PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSの組み合わせ投与群、PGFM徐放化DDS単独投与群、bFGF徐放化DDS単独投与群において、他の群と比較して有意に血管数が増加していることが観察された(図8A矢頭およびB)。さらに、抗 α -SMA抗体を用いた免疫染色により成熟血管数を定量した結果、PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSの組み合わせ投与群では、それぞれ単独群と比較して、成熟血管数が有意に形成されていた(図8A矢印およびC)。

さらに、レーザードップラー血流計を用いて虚血下肢の血流を観察したところ、PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせ投与群の血流量は、他の実験群と比較して改善されていることがわかった (図 9)。

図 10 には、大動物試験として、正常家兎下肢虚血モデルを作製し、PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS の組み合わせによる成熟血管新生効果を評価した結果を示す。PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせ、PGFM 徐放化 DDS 単独、bFGF 徐放化 DDS 単独をそれぞれ投与し、1 週間後に血管造影、および組織学的解析を行った。血管造影を行った結果、PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS の組み合わせ投与群において、虚血下肢における血流量の回復が認められた。さらに、新生血管数、および成熟血管数を組織学的に解析した結果、小動物実験の結果と同様に、PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS の組み合わせ投与群において、他の群と比較して、増加していることが観察された。

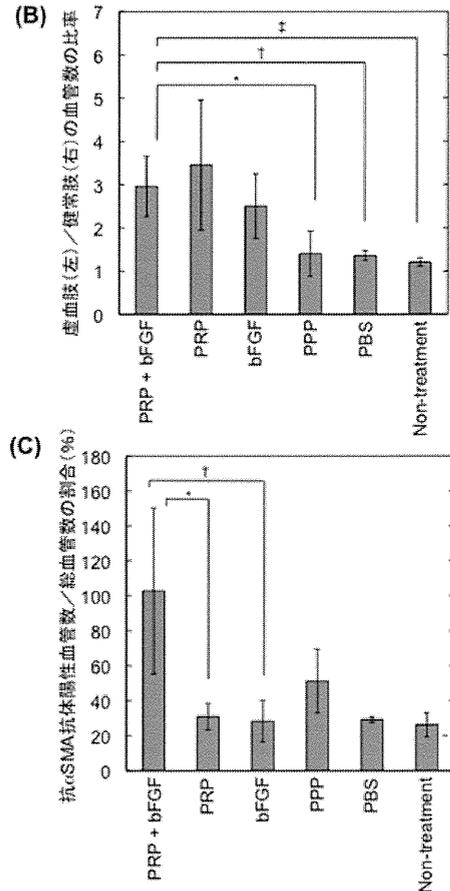
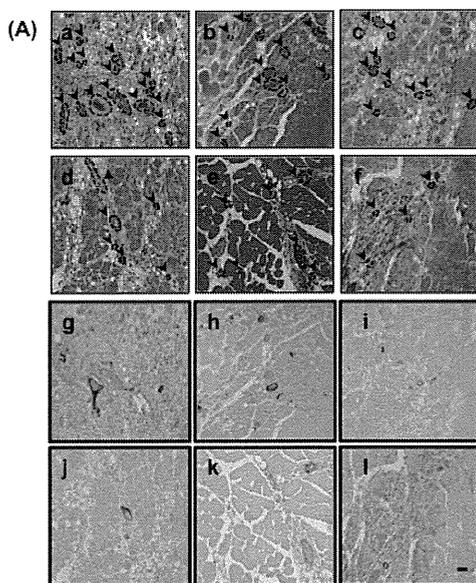


図 8 PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせによる成熟血管新生

(A) 投与 1 週間後の虚血下肢の(a-f) HE 染色像、および(g-l) 抗 α SMA 抗体を用いた免疫染色像。(a、g) PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせ (PRP + bFGF)、(b、h) PGFM 徐放化 DDS 単独 (PRP)、(c、i) bFGF 徐放化 DDS 単独 (bFGF)、(d、j) PPP 徐放化 DDS 単独 (PPP)、(e、k) ゼラチンハイドロゲル (PBS)、(f と l) 未投与 (No Treat)。Bar = 100 μ m。
(B) HE 染色像から解析した総血管数、(C) α SMA 陽性血管率。* $p < 0.05$ で有意差。

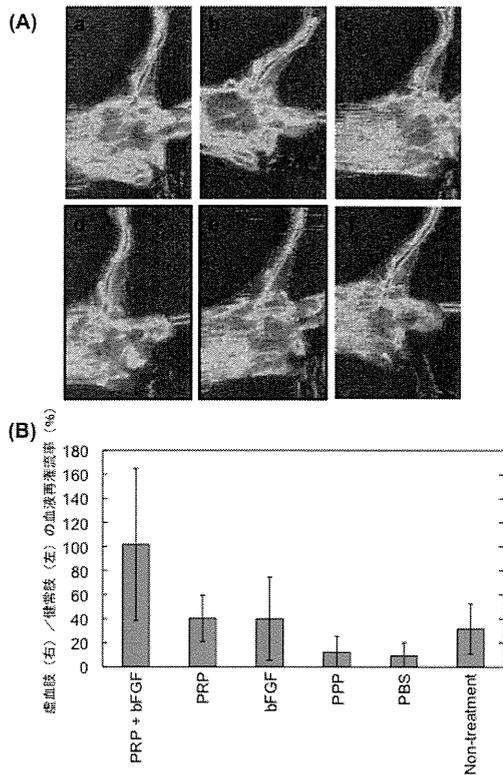


図9 PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSとの組み合わせによる成熟血管新生に対するレーザードップラー解析

(A) 投与1週間後のレーザードップラーイメージ。
 (a) PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSとの組み合わせ (PRP + bFGF)、(b) PGFM徐放化DDS単独 (PRP)、
 (c) bFGF徐放化DDS単独 (bFGF)、(d) PPP徐放化DDS単独 (PPP)、(e) ゼラチンハイドロゲル (PBS)、(f) 未投与 (No Treat)。(B) レーザードップラーイメージから算出した虚血下肢の血液再灌流率。

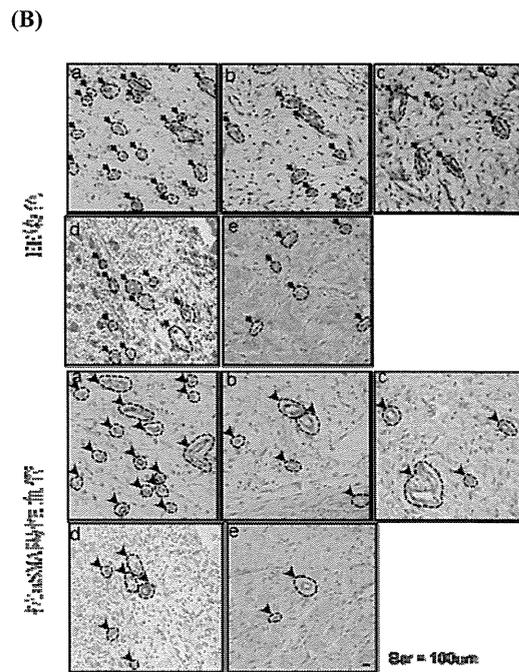
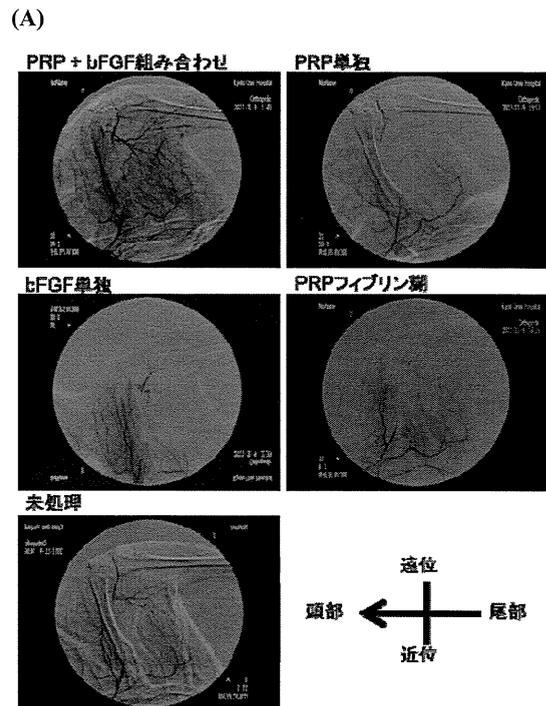


図10 PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSとの組み合わせによる成熟血管新生

(A) 投与1週間後の血管造影解析。PGFM徐放化DDSとbFGF徐放化DDSとの組み合わせ (PRP+bFGF 組み合わせ)、PGFM徐放化DDS単独 (PRP単独)、bFGF徐放化DDS単独 (bFGF単独)、2 wt%塩化カルシウムと

自己トロンビン混合液を添加した PRP (PRP フィブリン糊)、未投与 (未処理)。(B) 投与 1 週間後の虚血下肢の HE 染色像、および抗 α -SMA 抗体を用いた免疫染色像 (a-e)。(a) PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS との組み合わせ (PRP + bFGF)、(b) PGFM 徐放化 DDS 単独 (PRP)、(c) bFGF 徐放化 DDS 単独 (bFGF)、(d) 2 wt%塩化カルシウムと自己トロンビン混合液を添加した PRP (PRP フィブリン糊)、(e) 未投与 (未処理)。Bar = 100 μ m。

D. 考察

本研究では、PRP から調製した PGFM をゼラチンハイドロゲルから徐放させる最適条件を見つけ出し、PGFM 徐放化 DDS を作製した。さらに、下肢虚血モデル動物に対する PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS の組み合わせ投与は、成熟血管新生を誘導できることも示した。

PRP 採取方法の最適化において、PRP の濃縮度と PGFM に含まれる PDGF-BB の濃度とは相関性があることがわかった。このことから、濃縮後の PRP 中の血小板濃度を検査することにより、利用できる PGFM の濃度を見積もることができると考えられる。

PGFM 徐放化 DDS 作製方法では、異なる方法で調製した PGFM に対する細胞増殖因子の濃度、およびゼラチンハイドロゲルへの細胞増殖因子の収着率の結果より、2 wt%塩化カルシウム水溶液を用いて血小板を活性化後、37 $^{\circ}$ C で 60 分間含浸させる方法を採用した。また、市販カルシウム製剤の塩化カルシウム濃度は 2 wt%であるため、臨床試験を実施するにあっても、市販カルシウム製剤を利用できると

考えられる。

本研究では、PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルにおいて、ゼラチンハイドロゲルの分解と PDGF-BB の徐放との間により相関性があることを示した。この結果は、われわれが、他の細胞増殖因子を単独で試験した結果と同じであり、複数種の細胞増殖因子を含む PGFM も同様にゼラチンハイドロゲルから徐放できることを示している。以上のことから、ゼラチンハイドロゲルに含浸された PGFM は、単独の細胞増殖因子の場合と同様に、ハイドロゲルからの単純拡散ではなく、ゼラチンハイドロゲルの分解とともに徐放されると考えられる。

血管新生を誘導する PGFM 徐放化 DDS の最適化実験において、5 および 10 倍濃縮した PRP より調製した PGFM を含浸させたゼラチンハイドロゲルを埋入した群で、血管の分子構造の増加が観察された。この結果より、PRP の濃縮度が 5 倍以上であることが PGFM の血管新生作用の発現に必要であると考えられる。また、下肢虚血モデル動物を用いた成熟血管新生実験においても、5 倍濃縮した PRP から調製した PGFM 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いることで、虚血肢血流の改善、および成熟血管数の増加が認められた。

E. 結論

本研究により、血管新生を誘導するための PGFM 徐放化 DDS 作製の至適な条件を決定することができた。さらに、PGFM 徐放化 DDS と bFGF 徐放化 DDS を組み合わせることにより、成熟血管新生を誘導できることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsui M, Tabata Y: Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. Acta Biomater. 2012; in press.

2. 学会発表

- 1) 松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いたbFGFと多血小板血漿の組み合わせ徐放の血管新生効果. 第10回日本再生医療学会総会（2011. 3. 1-2 東京）
- 2) 松井 誠、古谷洋之、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた徐放化多血小板血漿による骨再生効果. 第32回日本炎症・再生医学会（2011. 6. 2-3 京都）
- 3) 松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルからのbFGFと多血小板血漿組み合わせ徐放による血管新生効果. 第27回日本DDS学会（2011. 6. 9-10 東京）
- 4) 松井 誠、古谷 洋之、田畑 泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた多血小板血漿 (PRP) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の組み合わせ徐放による骨再生効果. 第33回日本バイオマテリアル学会（2011. 11. 21-22 京都）
- 5) 松井 誠、田畑 泰彦：ゼラチンハイドロゲルからの多血小板血漿 (PRP) 徐放による血管新生効果. 第3回 PRP 療法研究会（2011. 11. 20 大阪）
- 6) 松井 誠、田畑 泰彦：ゼラチンハイドロゲルからの多血小板血漿 (PRP) 徐放によ

る血管新生効果第1回 DDS 徐放化再生医療研究会（2011. 12. 3 東京）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター
分担研究者 清水 章

研究要旨

難治性虚血性疾患の新たなオーダーメイド治療法として、生体吸収性の高分子担体であるゼラチンハイドロゲルと細胞増殖因子である塩基性繊維芽細胞増殖因子の組み合わせによる再生医療を開発、実用化するため、難治性下肢虚血に対する高度医療評価制度の下での臨床試験（第3項先進医療）の準備、実施の支援を行った。更にこの方法を虚血性心疾患に応用するための臨床試験の実施に向け、試験計画の立案・設計、非臨床データの収集に対する支援を行った。

A. 研究目的

難治性虚血性疾患に対して、生体吸収性の高分子担体と細胞増殖因子を用いた新たな再生医療を開発することにより、同疾患に対する、オーダーメイド医療の実現に向けた検討を行う。このために行う臨床試験の準備、実施、結果の取り纏めなどについて、これを実施する医師・研究者に必要な支援を行い、試験の円滑な実施を目指す。

B. 研究方法

医学部附属病院の研究者などが、難治性下肢虚血患者を対象とし、高度医療評価制度の下での臨床試験を実施し、結果を取り纏めるにあたり、実践的支援を行うとともに、虚血性心疾患を対象とした臨床試験を開始するために必要な支援活動を行う。

（倫理面への配慮）

上記の臨床試験（難治性下肢虚血を対象とする第3項先進医療）の申請・実施に必要な倫理審査を受け、承認された。実施に際しても必要な報告などを行った

C. 研究結果

難治性下肢虚血に対する高度医療評価制度の下での臨床試験の実施にあたり、プロジェクトの全体を見渡すプロジェクトマネジメントを行い、進捗管理、必要な申請、届出ならびに結

果取り纏めの支援を行った。この試験の結果を虚血性心疾患にも応用し、新たな臨床試験を開始するため、試験計画の立案ならびに安全性等必要となる非臨床データの取得を支援した。

D. 考察

新規・先端医療の開発・実用化における、試験の立案・遂行・取り纏めのノウハウと支援活動の重要性を再認識した。

E. 結論

臨床試験の基盤を形成し、完遂を促進するには、十分なノウハウを持ってこれを支援することが不可欠であるが、本研究によりその実をあげつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugai M, Aoki K, Osato M, Nambu Y, Ito K, Taketo MM, Shimizu A. Runx3 is required for full activation of regulatory T cells to prevent colitis-associated tumor formation. J Immunol. 2011 Jun 1;186(11):6515-20.
2. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T,

Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2011 Apr;39(4):424-433.e2. Epub 2011 Jan 7.

3. Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama , Kim ID, Chiba T, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med.* 2011 May 8;9:55.

2. 学会発表

第18回臨床薬理講習会(平成23年12月、於浜松)「臨床研究の信頼性確保」:臨床研究のプロトコール立案

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター
分担研究者 横出 正之

研究要旨

標記研究の一環として、第3項先進医療「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施にあたり、被験者組み入れを促進する方策を探求するための研究を開始し、その結果として得られた複数の手法を総合的に用いることにより、被験者の登録を加速して先進医療の完遂に貢献することができた。

載内容について

A. 研究目的

再生医療を含む臨床試験の完遂には、迅速な被験者組み入れが必須であるが、診療科の見取り通りに被験者候補が次々と現れることはむしろ稀であり、効率よく被験者を登録する有効な手段は確立されていない。本研究の目的は、京都大学医学部附属病院単施設による第3項先進医療「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施にあたり、被験者組み入れを促進する手法を探求することである。

B. 研究方法

上記目的達成のために、当部(臨床試験管理医師と臨床研究コーディネーター)は、臨床試験支援部門として、被験者リクルート進捗会議を合計12回(うち今年度8回)開催し、以下の諸項目について、試験責任医師(診療科)・プロジェクトマネージャーを含めて検討を重ねた。

- 1) 候補患者および除外患者(いずれも匿名)情報の共有、被験者候補数の現状と傾向について
- 2) 個別の被験者候補の適格性について
- 3) 適格基準等 プロトコルの変更について
- 4) 被験者募集状況のまとめとその効果について
- 5) 先進医療の完遂可能性と試験期間延長の必要性について
- 6) 先進医療に関する診療科ホームページの掲

(倫理面への配慮)

世界医師会ヘルシンキ宣言、薬事法、医療法、臨床研究に関する倫理指針、第3項先進医療に関する諸通知等を遵守して、本研究を遂行した。

C. 研究結果

左記 被験者リクルート進捗会議による検討を通じて、以下の多様な被験者組み入れ促進手法を見出し、いずれも診療科(試験責任医師等)が主体となり実施した。

- 1) 患者会での講演
- 2) 投げ込み記事による新聞・テレビ取材と報道
- 3) 院内(京大病院)ポスターの作成・掲示(倫理委員会と病院事務部広報・法規掛の許可後、診療科外来、入院病棟、総合受付に掲示した)
- 4) 院外(他院)ポスターの作成・掲示(関連病院の医師に送付し、病院長に許可を得て院内に掲示した。医療法の制約内で文案を検討した)
- 5) 医師へのレター作成・送付(京大病院医師、同門会医師、関西一円の皮膚科・形成外科・循環器クリニック・病院)
- 6) 京大病院広報への記事掲載
- 7) 研究会・学会などでの先進医療紹介・発表

上記1)~7)の手法を総合的に駆使することにより、図のように円滑に被験者登録を進めることができた。

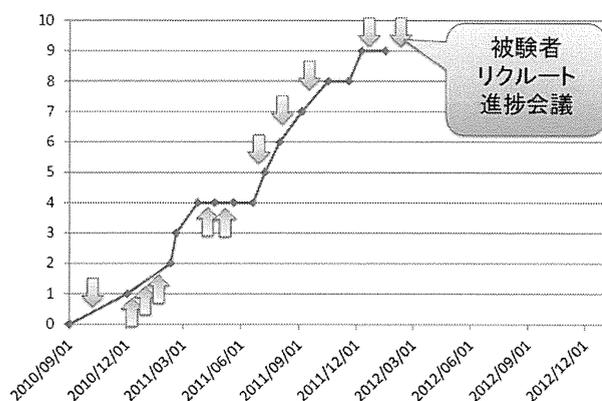


図 被験者登録総数とリクルート進捗会議の開催

D. 考察

診療科研究者とともに、臨床試験支援部門(医師、コーディネーター、プロジェクトマネージャーを含む)が被験者リクルート進捗会議を定期的に開催して、リクルートに関連する情報を共有し、浮かび上がった課題を討議することは、再生医療などの臨床試験の被験者組み入れを促進する有効な手段と考えられる。

E. 結論

以上の分担研究を通じて、「生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発」に寄与することができた。今後、今回用いたそれぞれの手法の効果についても解析を行いたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimada K, Mikami Y, Murayama T, Yokode M, Fujita M, Kita T, Kishimoto C. Atherosclerotic plaques induced by marble-burying behavior are stabilized by exercise training in experimental atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2011;151(3):284-289.
2. Shimada K, Murayama T, Yokode M, Kita T, Fujita M, Kishimoto C. Olmesartan, a novel angiotensin II type 1 receptor antagonist, reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice associated with reducing superoxide production. *Nutr Meta Cardiovasc Dis.* 2011;21(9):672-678.
3. Tamura Y, Murayama T, Minami M,

Yokode M, Arai H. Differential effect of statins on diabetic nephropathy in db/db mice. *Int J Mol Med.* 2011;28(5):683-687.

4. Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba T, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med.* 2011;9:55.
5. Noda H, Iso H, Yamashita S, Ueno H, Yokode M, Yamada N, Ouchi Y; Defining Vascular Disease (DVD) Research Group. Risk stratification based on metabolic syndrome as well as non-metabolic risk factors in the assessment of carotid atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(6):504-512.
6. Wada H, Ura S, Kitaoka S, Satoh-Asahara N, Horie T, Ono K, Takaya T, Takanabe-Mori R, Akao M, Abe M, Morimoto T, Murayama T, Yokode M, Fujita M, Shimatsu A, Hasegawa K. Distinct characteristics of circulating vascular endothelial growth factor-a and C levels in human subjects. *PLoS One.* 2011;6(12):e29351.
7. Arai H, Ouchi Y, Yokode M, Ito H, Uematsu H, Eto F, Oshima S, Ota K, Saito Y, Sasaki H, Tsubota K, Fukuyama H, Honda Y, Iguchi A, Toba K, Hosoi T, Kita T; Members of Subcommittee for Aging. Toward the realization of a better aged society: messages from gerontology and geriatrics. *Geriatr Gerontol Int.* 2012;12(1):16-22.
8. Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents.

Cardiovasc Res. 2012;93(4):666-673.

なし

2. 学会発表

3, その他

国際会議

なし

1. Yokode M. The role of oxidative stress in the development of atherosclerosis. Ninth Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics, Oct. 23-27, 2011, Melbourne, Australia.

国内会議

1. 横出正之. 高齢者高脂血症の診療-これまでのエビデンスと今後の展望-. 日本動脈硬化学会第 11 回動脈硬化教育フォーラム 平成 23 年 2 月 6 日、東京
2. Ito-Ihara T, Hong JH, Sumi E, Kim SY, Tanaka S, Narita K, Hatta T, Choi EK, Choi QJ, Miyagawa T, Jeong MR, Murayama T, Kim OJ, Yokode M. An international survey of physicians and dentists regarding clinical trials: A comparison between Kyoto University Hospital, Japan and Seoul National University Hospital, South Korea. 日本臨床試験研究会第 3 回学術集会総会. 平成 24 年 2 月 23-24, 福岡.
3. 角栄里子, 村山敏典, 猪原登志子, 南学, 新美三由紀, 横出正之. 医師主導治験における安全性情報管理の整備. 日本臨床試験研究会第 3 回学術集会総会. 平成 24 年 2 月 23-24, 福岡.
4. 八田太一、成田慶一、村山敏典、横出正之. “Informed Consent”と『インフォームド・コンセント』～歴史的変遷から浮かび上がるねじれの構造～. 日本臨床試験研究会第 3 回学術集会会. 平成 24 年 2 月 23-24, 福岡.
5. 村山敏典、西村浩美、南学、横出正之. 研究者主導臨床試験のリスクに応じた被験者保護に関する研究 -健康被害補償-. 日本臨床試験研究会第 3 回学術集会会. 平成 24 年 2 月 23-24, 福岡.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学大学院医学研究科
研究分担者 川上 浩司

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター
研究分担者 手良向 聡

研究要旨

研究者主導臨床試験（高度医療評価制度による臨床試験含む）で実施した中央モニタリングについて、探索的に分析し、利点および限界を検討した。中央モニタリングは、マンパワー、費用の面では効率的と考えられるが、早期開発臨床試験など安全性に重きをおく臨床試験では、単独のモニタリング手法としては望ましい方法とはいえない。このため、サンプリングによる施設訪問モニタリングの併用を考慮する必要がある。

A. 研究目的

研究者主導の早期開発臨床試験（高度医療評価制度による臨床試験含む）で実施した中央モニタリングについて、問題の早期検出、対応、再発予防の観点から探索的に分析し、中央モニタリングの利点および限界を検討する。

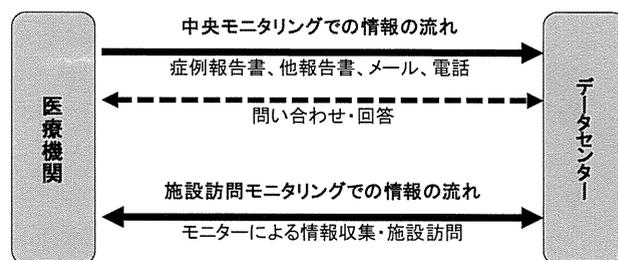
B. 研究方法

【対象】

京都大学医学部附属病院探索医療センターで支援し、2009年6月～2012年2月までに中央モニタリングを実施した8試験。

【方法】

- 中央モニタリング報告書および他のモニタリング関連記録から、モニタリング事項、モニタリングによって明らかとなった当該試験での問題点、その対策、講じられた再発予防、その後の経過についてデータを収集する。
- マトリクス分析により中央モニタリングという手法の利点・欠点を分析し、KJ法および関連図法等で対応できなかった問題点とその原因を分析する。



C. 研究結果

- 研究者主導の早期開発臨床試験、8試験（うち3試験は高度医療評価制度による）で実施した中央モニタリングについて、モニタリング報告書等を後向きに分析し、モニタリングが適切に機能したかという観点から、中央モニタリングという手法の利点と限界について検討した。
- 重篤な有害事象報告の遅れや、症例報告書提出の遅れが繰り返される等、直接モニターが働きかけないことによる問題点が多く認められた。
- データセンター側では、情報不足により問題発見が遅れ、対応が後手に回る傾向があった。このため、1つの報告書で再発予防を講じた結果まで記載されていないことが多かった。
- 問題が発生した時に施設訪問モニタリングを併用した場合も、中央モニタリングにおける問

題発見の遅れがその後も影響し、対応が後手に回る傾向があった。

D. 考察

- ・医療機関側からの症例報告書提出の遅れは、問題が発生した時の情報伝達の遅れに繋がる。
- ・中央モニタリングのみでは、施設の状況を十分に把握する担当モニターがいないため、情報伝達は医療機関側に依存する。
- ・情報不足・不備と、情報伝達の遅れは、問題発見が遅れ、対応も遅れ、再発予防になかなか繋がらない。
- ・治験でない、お金がないという理由で施設訪問モニタリングを除くことは、早期開発臨床試験では安全性確保が不十分となる可能性がある。

E. 結論

中央モニタリングは、マンパワー、費用の面では効率的と考えられるが、早期開発臨床試験など安全性に重きをおく臨床試験では、単独のモニタリング手法としては望ましい方法とはいえない。このため、サンプリングによる施設訪問モニタリングの併用を考慮する必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山本卓資、新美三由紀、多田春江、木下明美、横橋祐子、川上浩司. 臨床試験における中央モニタリング. 日本臨床試験研究会第3回学術集会総会(ポスター)
福岡県 2012. 2. 23

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学医学部附属病院 薬剤部
分担研究者 桂 敏也

研究要旨

治験薬GMP基準を満たす生体吸収性高分子担体凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造方法を確立し、安全性試験を実施した。注射薬としての品質や、短期間の安全性に問題は認められなかった。今後、製造法、規格等を最終決定し、臨床試験用試験薬の製造を行う。

A. 研究目的

これまでに研究代表者及び分担者のグループでは、下肢虚血性疾患に対して、生体吸収性高分子担体（細粒）を用いた高度医療を実施してきた。虚血性心疾患へ生体吸収性高分子担体を用いた臨床研究を実施するにあたり、生体吸収性高分子担体（シート）の製造方法を確立し、安全性を担保することが必要である。

本年度は、院内製剤として生体吸収性高分子担体ゼラチンハイドロゲルシートの製造方法を確立することを目的とした。すなわち、治験薬GMPに基づいて、ゼラチンハイドロゲルシート製造に関して「治験薬に関する文書（臨床研究用）」を作成する。また、製造したゼラチンハイドロゲルシートを用いて、無菌試験、エンドトキシン試験ならびに安全性試験を実施する（一部他の分担研究者が担当）。医薬品の容器は、薬局方にその規格が規定されていることから、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの容器についても規格試験を実施する。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. 製造：「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬GMP）第2 7. 治験薬に関する文書」に従って、ゼラチンハイドロゲルシート製造・品質試験等に関する「治験薬に関する文書（安全性試験用）」を作成し、製造方法を決定した。「治験薬に

する文書（安全性試験用）」に従って、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを作製した。

2. 品質試験：第十五改正日本薬局方 4.01 エンドトキシン試験法および 4.06 無菌試験法に従って、製造したゼラチンハイドロゲルシートの試験を実施した。また、性能の検査については分担研究者田畑が *in vitro* 分解性試験を実施した。さらに、製造した凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを用いて、イヌにおける安全性試験を分担研究者丸井が実施した。
3. 第十五改正日本薬局方 7.02 プラスチック製医薬品容器試験法に従って、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート容器であるステリパウチ（三田理科工業）の規格試験を実施した。

C. 研究結果

1. 「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬GMP）第2 治験薬の製造管理及び品質管理 7. 治験薬に関する文書」に従って、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート（安全性試験用）の「治験薬に関する文書（安全性試験用）」（第1版）を2011年12月16日に制定した（図1）。17

頁から成り、原料の規格試験、保管、製造方法、規格・試験、出荷基準等を定めている。

治文 6

治験薬に関する文書
(安全性試験用試験薬)

試験薬：凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート (安全性試験用)

作成者 (所属)：桂 聡也 (京都大学医学部附属病院薬務部)

作成年月日：2011年12月16日 第1版

作成理由：生体内吸収性高分子担体と塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた重症虚血性心疾患に対する心筋再生治療の臨床応用に関する研究(仮名)の実施に際し、高分子担体として凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート(仮名)を用いる。本臨床試験の開始に先立ち、安全性試験を行うため、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート(安全性試験用)に関する文書を作成した。また、本安全性試験用製剤は治験薬 GMP(薬食発第 0709002号：治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬 GMP)について)に基づき製造を行うため、「治験薬に関する文書(安全性試験用)」を作成した。

| | | |
|---|---|---|
| 製剤部門 | 治験薬製造部門 | 治験薬品質部門 |
| 責任者 | 責任者 | 責任者 |
| 2011年12月16日 | 2011年12月16日 | 2011年12月16日 |
|  |  |  |

図 1. 治験薬に関する文書

薬剤部 GMP 特殊無菌製剤室において、「治験薬に関する文書(安全性試験用)」に従って、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを 2ロット作製した。それぞれ、53 枚、31 枚完成した。なお、製造においては、指図・記録書に記録を残している。



図 2. 凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート

2. 製造した凍結ゼラチンハイドロゲルシートについて、第十五改正日本薬局方 4.01 エンドトキシン試験法および 4.06 無菌試験法に従って、製造したゼラチンハイドロゲルシートの試験を実施した。その結果、無菌性試験では陰性であった。また、エンドトキシン試験では、1.0 EU/mg 未満であり規格値を満たしていた。

また、凍結ゼラチンハイドロゲルシートを用いた In vitro 分解性試験およびイヌにおける安全性試験については、研究分担者

| 試験項目 | 結果 | プラスチック製水性注射剤容器の規格(参考) |
|-----------------|---------------|-----------------------|
| プラスチック製医薬品容器試験 | | |
| 灰化試験 | | |
| 強熱残分 | 0.86 % | 0.1 %以下 |
| 重金属 | 分析不能* | 検液の色は比較液より濃くない |
| 鉛 | 1 μg/g以下 | |
| カドミウム | 0.1 μg/g以下 | |
| スズ | | 標準溶液の吸光度以下 |
| 試料溶液の吸光度 | 0.12 | |
| 標準溶液の吸光度 | 0.23 | |
| 溶出物試験 | | |
| 泡立ち | 1分以内に消失 | 3分以内にほとんど消失 |
| pH | 薬 0.5 以下 | 薬 1.5 以下 |
| 過マンガン酸カリウム還元性物質 | 薬 0.5 mL 以下 | 薬 1.0 mL 以下 |
| 紫外吸収スペクトル | | |
| 220~240 nm | 0.13 (220 nm) | 0.08 以下 |
| 241~350 nm | 0.08 (241 nm) | 0.05 以下 |
| 蒸発残留物 | 1.0 mg 以下 | 1.0 mg 以下 |
| 微粒試験 | | |
| 5~10 μm | 2 個/mL | 100 個以下/mL |
| 10~25 μm | 0 個/mL | 10 個以下/mL |
| 25 μm 以上 | 0 個/mL | 1 個以下/mL |
| 透明性試験 | | |
| 1回目 | 1 % | 55 % 以上 |
| 2回目 | 1 % | |
| 3回目 | 1 % | |
| 4回目 | 1 % | |
| 5回目 | 1 % | |
| 漏れ試験 | 漏れを認めず | 漏れはない |
| 水蒸気透過性 | 0.18 % | 0.20 % 以下 |
| 無菌試験 | 陰性 | 陰性 |
| エンドトキシン試験 | 0.3 EU/個未満 | 個別設定 |