

201208035A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指す研究

(研究課題番号：H24-創薬総合-一般-009)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(早稲田大学 重点領域研究機構)

平成 25 (2013) 年 5 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指した研究

(研究課題番号 : H24-創薬総合-一般-009)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(早稲田大学 重点領域研究機構)

平成 25 (2013) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告書	1
酒井 宏水（早稲田大学重点領域研究機構 上級研究員(研究院教授)）	
II. 分担研究報告書	
1. 酒井 宏水（早稲田大学重点領域研究機構 上級研究員(研究院教授)）	7
2. 小田切 優樹（崇城大学 薬学部 教授）	39
3. 東 寛（旭川医科大学 医学部 教授）	47
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
IV. 研究成果の刊行物・別冊	57

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指した研究

研究代表者 酒井 宏水 早稲田大学 重点領域研究機構・上級研究員（研究院教授）

研究要旨

日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし感染の可能性、過誤による血液型不一致、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつある。人工赤血球は、これらの問題を改善する製剤としてその実現が期待されている。赤十字血液センターで発生する期限切れ赤血球は、諸工程を経て、感染源を含まず、血液型が無く、長期保存に耐える人工赤血球製剤に「再生」される。輸血の代替のみならず、輸血では対応の出来ない疾患や外科的処置への利用、Unmet Medical Needsへの対応も期待されている。本研究は国策として推進され、製造法や脂質膜構成成分の改良を繰返し、投与実験の結果をフィードバックさせ現行の製剤を確立した。動物試験で得られた安全性と有効性に関する膨大な知見を基に、臨床応用を目指す段階にある。本研究では、日本発の革新的医薬品として人工赤血球(ヘモグロビン小胞体, HbV)の早期実現を目指し、製剤開発者、臨床医、薬理担当者、PMDA審査経験者が共同し、原料製造や製剤化に関わる企業との連携のもと、次の項目について検討し、臨床応用を目指している。平成24年度の成果は以下の通り。1) 従来のHb小胞体の製造において、仕込みのHb溶液の回収率が必ずしも高く無いことが量産に向けて一つの課題であった。そこで、混錬法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討している。従来よりも大型の装置を用い、脂質量40gから短時間(10-15分程度)の混錬操作で50-70%の回収率で約300mLのHb小胞体を製造出来る条件を見出すことができた。2) 脱酸素工程は、人工赤血球を長期保存するために重要な工程である。蛍光プローブを使う残存酸素量の直接観測法により、酸素分圧が0.1Torr以下に達するまで追尾することが可能となった。3) 製剤の無菌試験法について検討し、原料ヘモグロビン溶液については通常のメンブランフィルタ法が、また微粒子分散系であるHb小胞体については、直接法の変法(植継ぎ法)により試験が可能であることを確認した。4) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程を検討し、β-プロピロラクトンが有効であることを確認した。しかし芽胞の不活化には課題を残した。5) ブタ新鮮血からのヘモグロビン精製、およびヘモグロビン小胞体の調製を行なった。ヒトヘモグロビンから調製したものと比較して、酸素親和度や酸化速度に若干の違いがあったものの、調製上の問題点は無く、人工赤血球として使用できることが期待される。6) ラットの切断下肢の灌流試験を行い、8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。7) 臨床研究の実施の可能性に備え「Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強」のprotocolsの草案を行なった。8) PMDAの事前面談を受け、製剤の検査法、安全性試験に関する助言を得た。9) カニクイザルにHb小

胞体を単回大量投与し、血漿中濃度推移について評価を行った。ヒトでの半減期は約5～6日程度と予測された。10) Hb小胞体をラットに投与した後、摘出した脾細胞では一過性のT細胞増殖抑制効果が観察される。iNOS inhibitorであるL-NMMAを内包したDPPC-liposomeを投与するとT細胞の増殖抑制効果が軽減する傾向がみられた。また、iNOSの基質であるarginineを内包したDPPC-liposomeは、T細胞増殖抑制効果の若干の増強効果が認められたのみであった。11) HbVがヒト由来ヘモグロビンを原料として用いているので、プリオン対策についても本研究班において考えておく必要がある。バイオ医薬品としての安全性を論じるにあたり、我が国における血液製剤のプリオン対策を参考にすることが現実的であろうと考えられる。

研究分担者

小田切優樹 崇城大学薬学部 教授
東 寛 旭川医科大学医学部 教授

研究協力者

小林 絃一 奥羽病院 院長
(慶應義塾大学医学部 名誉教授)
高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長
(川崎医科大学 名誉教授)
堀之内宏久 さいたま市立病院 部長
(慶應義塾大学医学部 客員講師)
河野 光智 慶應義塾大学医学部 講師
荒木 淳 東京大学付属病院形成外科 医師
岩本美智子 医療法人川村病院 医師

A. 研究目的

日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、感染の可能性、過誤による血液型不一致、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつある。人工赤血球(ヘモグロビン小胞体: HbV)は、これらの問題を改善する新しい製剤としてその実現が期待されている。本研究は、期限切れ血液に最も多く含まれるHbの有効利用の観点から政策的に始まった。期限切れ赤血球は諸工程を経て、感染源を

含まず、血液型が無く、長期保存に耐え、輸血治療を「補完」する人工赤血球製剤に「再生」される。また、輸血では対応の出来ない疾患や外科的処置、Unmet Medical Needsへの対応も期待されている。本研究は、日本発の革新的医薬品として人工赤血球の早期実用化を目指すことを目的としている。

HbVの研究は厚生労働科学研究として1997年より推進されている(研究代表者: 1997-2002土田英俊、2003-07小林絃一、2008-11堀之内宏久)。Hb精製、Hbの内包、脂質膜の構成成分の改良、投与実験により有効性と安全性を検討し、結果をフィードバックさせ現行の製剤を確立した[1,2]。高Hb濃度、生体適合性、長期保存安定度は、他者の追従を許していない。病態モデル(出血性ショック[3]、体外循環[4]、脳梗塞[5]、皮弁創傷治癒[6]、担がん[7])で有効性を実証し、体内動態[8]や凝固系・免疫系[9]への影響も精査した。臨床検査法[10]や血中からの粒子除去法[11]などME技術も検討した。GMP製造法を確立させて、実用化を目指す段階にある。

本研究では、コアメンバーを中心に新しい研究班を組織し、臨床応用の早期実現を目指す。ヒト由来Hbを含有する特定生物製剤に分類されること、また、大量投与を前提とするリポソーム製剤の特殊性を考慮し、その製造・臨床試験・臨床研究等の方法について検討する。①ヘモグロビンのカプセル化工程について、混錬法を用いる方法の最適

化を検討する。② 長期保存の要となる脱酸素化工程において、溶液内の酸素分圧を直接的にモニターする方法を確立する。③ 製剤の無菌試験法を確立する。④ β プロピオラクトンによる無菌化工程の妥当性を検討する。⑤ 人工赤血球の原料として、ブタ血液からのヘモグロビン精製とヘモグロビン小胞体の調製の可能性を検討する。⑥ 人工赤血球を摘出臓器の灌流液・保存液として利用できるかについて検討を開始する。⑦ 将来的な臨床研究の実施の可能性に備え、臨床研究のプロトコルを草案する。⑧ PMDAに事前面談を行い、製造法や試験法に関する助言を得る。⑨ カニクイザルへの投与試験を行い、ヒトに投与した場合の半減期等を推定する。⑩ ラットに投与した際に観察されるT細胞増殖抑制について、NO産生との関連を検討する。⑪ Hb小胞体はヒト血液を原料としているので、プリオン対策について本研究班において意見を集約することを目的とする。

以上を平成24年度の研究の目的とした。

【文献】 [1] 酒井, 土田. *ファルマシア* 2009;45:23-8. [2] Sakai et al., *J Intern Med* 2008;263:4-15, Sakai et al., *Methods Enzymol* 2009;465:363-84. [3] Sakai et al., *Crit Care Med* 2004;32:539-45, Sakai et al., *Shock* 2009;31:192-200. [4] Yamazaki et al., *Circulation* 2006;114:1220-5. [5] Komatsu et al., *Neurosci Lett* 2007;421:121-5. [6] Plock et al., *Crit Care Med* 2007;35:899-905, Plock et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H905-10. [7] Yamamoto et al., *J Surg Res* 2009;151:48-54. [8] Taguchi et al., *J Control Release* 2009;136:232-9, Taguchi et al., *Drug Metab Dispos* 2009;37:1456-63. [9] Takahashi et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2011;337:42-9. [10] Sakai et al., *Clin Chem Lab Med* 2003;41:222-31. [11] Sakai et al., *Artif Organs* 2012;36:202-209.

B. 研究方法

① 複合脂質として 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-

3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol, 1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-glutamate (DHSG)、ならびに 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-Poly(oxyethylene)₅₀₀₀ (DSPE-PEG5000, PEG鎖の分子量5000)がモル比で5/4/0.9/0.03となるように混合された脂質に対し、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、45 g/dL、0.4-1.5 dL、pH7.4)を添加した。そして、内蓋をして封入し、混練装置にて処理を行なった。② 脱酸素を行なう硝子容器の内側に蛍光プローブ(径5mm, 厚さ1mm)をシリコン性接着剤で貼付けた。脱酸素工程中に硝子容器の外側からレーザー光を照射し、蛍光強度の推移から容器内の酸素分圧をモニタした。③ 常法に従い、精製ヘモグロビン溶液の無菌性をメンブランフィルタ法にて検討した。他方、微粒子分散系であるHb小胞体については、メンブランフィルタ法が不可能であるので、直接法の変法(植え継ぎ法)により実施した。④ Hb小胞体に常在性菌 *Staphylococcus aureus* ATCCあるいは芽胞 *Bacillus subtilis* spores ATCCを添加し、 β プロピオラクトンの添加量を段階的に増大し、滅菌法としての有効性を検討した。⑤ ブタ新鮮血からのヘモグロビン精製およびHb小胞体の調製を、ヒト献血液から実施する場合と同じ方法で試した。⑥ ラット切断下肢を8時間、Hb小胞体で灌流したあと、再接着し100日間観察をした。⑦ 放射線照射による抗腫瘍効果の増強に関する動物実験データをもとに、臨床研究プロトコルを草案した。⑧ PMDAに製造法や試験法に関する質問を行なった。⑨ カニクイザルに対し、Hb小胞体を1400 mg Hb/kg bw投与し、血中濃度の推移をモニタした。⑩ ラットに対し、iNOS inhibitorであるL-NMMAを内包したDPPC-liposome、または、iNOSの基質であるarginineを内包したDPPC-liposomeを投与し、T細胞の増殖抑制効果の有無を調べた。⑪ 我が国の血液製剤に関するプリオン対策を検討し、当研究班における考えを集約した。

C. 結果

① 昨年度は混錬中の温度上昇を抑制することに集中していたが、今年度は、ある程度の昇温は脂質分子の分散に必要と考えた。そこで温度を上昇させるため公転速度を1000回転としたところ、僅か10分程度で温度は60-70°Cに達し、しかも十分な分散性が得られ、Hb回収率も60-70%となった。今回のスケールでは、1バッチで300 mLのHb小胞体が調製できた。② 脱酸素中の試料溶液の酸素分圧をモニタする事ができた。初期1時間の酸素分圧の低下が著しく、これは物理的に溶解している酸素が除去されていることを意味する。次第に酸素除去の効率は低下してくるが、これはHbに結合している酸素を除去する段階に入ったことを意味する。Hb小胞体の処理量が250-300mLの場合は、約15-24時間で酸素分圧が0.1Torr以下にまで到達する。この時点での酸素飽和度は、1%以下になっていると見積もれる。処理量が800mLと大量の場合では、27時間後に漸く1Torrにまで低下した。③ 精製Hb溶液の無菌試験がメンブラン法によって、また最終生成物であるHb小胞体分散液については、直接法の変法(一回植継ぐ方法)により無菌試験が可能である事が確認出来た。また、現在保有している精製ヘモグロビン、および、ヘモグロビン小胞体について、無菌であることが確認された。④ 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程を検討し、 β -プロピロラクトンが菌体の不活化に有効であることを確認した。しかし芽胞の不活化は不十分であった。⑤ ブタ新鮮血からのヘモグロビン精製は90%以上の収率で可能であった。およびヘモグロビン小胞体の調製も支障無く行なうことができた。ヒトヘモグロビンから調製したものと比較して、酸素親和度や酸化速度に若干の違いがあったものの、酸素結合解離の可逆性が確認され、酸素運搬体として作動する。⑥ ラットの切断下肢の灌流試験を行い、8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。⑦ 臨床研究の実施の可能性に備え「Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍

に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強」のプロトコルを草案した。⑧ PMDAの事前面談を受けて製剤の検査法、安全性試験に関する質問に対し、助言を得た。⑨ カニクイザルにHb小胞体を単回大量投与し、血漿中濃度推移について評価を行い、解析した結果、ヒトでの半減期は約5~6日程度と予測された。⑩ ラットにHbV(あるいは空リポソーム)溶液を循環血液量の20% (v/v)相当の量を投与した後に、一過性に認められるT細胞増殖抑制効果は循環血液量の5%の投与でも顕著に認められ、2%でもその傾向が認められた。iNOS inhibitorであるL-NMMAを内包したDPPC-liposomeを投与するとT細胞の増殖抑制効果が軽減する傾向がみられた。また、iNOSの基質であるarginineを内包したDPPC-liposomeは、T細胞増殖抑制効果の若干の増強効果が認められたのみであった。⑪ プリオン対策についても本研究室において考えておく必要がある。バイオ医薬品としての安全性を論じるにあたり、我が国における血液製剤のプリオン対策を参考にすることが現実的であろうと考えられる。

D. 考察

① 混錬法によるHb小胞体の調製のスケールアップ(4倍)を試みた。結果として、Hb回収率60-70%で粒子径250nm程度のHb小胞体分散液約300 mLを一回の混錬操作でしかも短時間(10-20分)で得ることができた。混錬法に用いる容器は、現在の20倍までのスケールアップが可能である。混錬操作自体は、バッチ式となるが、一回の操作時間が極めて短いので、容器を複数準備して繰り返し行なうことにより、量産にも十分に対応が可能と考えられる。② 脱酸素工程では、フラスコを回転させることにより内壁にHb小胞体分散液の液膜が形成され、気液界面を大きくし、ここに窒素を吹き付けることにより酸素の遊離を促進させることを原理としている。従って、より効率を高めるためには、気液界面における物質移動を高めるため、回転速度を高めること、容器内面積に対する導入液量を減ら

すことが考えられる。勿論、いわゆる人工肺を使えばこの工程は更に時間短縮がはかれると考えられるが、如何に簡単な装置で(安価に)操作できるかが重要となる。原理としては単純なものであり、化学工学的見地から更なる効率化が期待される。また、今回、溶液の酸素分圧を蛍光計測システムを使用して持続的に計測した。本システムの特徴は、蛍光プローブは硝子で完全に遮蔽されているので、蛍光色素が漏れだすことが無いこと、蛍光プローブは滅菌が可能なので、無菌系で計測が出来る事、また酸素分圧0.1Torr以下までモニタできることである。このシステムの利用により、脱酸素化工程の終了点を明確にすることができ、バッチ差の縮小に繋がることが期待される。③ Hb小胞体の原料である精製濃縮ヘモグロビン溶液については、常法であるメンブランフィルタ法により無菌性試験が行えることが明らかになった。一方、Hb小胞体はその粒子径のためメンブランフィルタを透過出来ない。そこで直接法による方法を採用した。しかし、濁度が高いため、一回目の接種では濁度による判別が不可能である。そこで薬局方に記載の通り、二回目の植継ぎを行なったところ、判別が可能であった。今回妥当性を明らかにした無菌試験法により、精製Hb溶液およびHb小胞体の無菌性を検証したところ、これらの無菌性が明らかになった。④ 微粒子分散系であるHb小胞体の滅菌工程については、 β プロピオラク톤を添加する方法は滅菌を促進はするものの、完全な滅菌を保証するものではないことが解った。従って、他の無菌化法を今後も探索する必要がある。しかし、我々は無菌試験によって菌が無いことを実証したHb小胞体を何度も製造しているので、製造工程を完全な無菌管理下に置く事によりHb小胞体は製造出来るものと考えている。⑤ ブタヘモグロビンの精製を初めて試みたところ、一酸化炭素化、加熱処理、限外濾過膜処理を経て、ヒトヘモグロビンの場合と同様に、精製濃縮ヘモグロビンを得ることができた。そして、得られたブタヘモグロビン

を用いてHb小胞体を調製することができた。酸素親和度や自動酸化速度に若干の違いはあるものの、酸素運搬機能は同等であり、ブタヘモグロビンは人工赤血球の原料になりうることを確認した。⑥ ラットの切断下肢の灌流試験を行い、8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。人工赤血球が灌流中に酸素運搬体として機能していることが明らかになった。これまでに報告されている常温保存の限界である4時間を超える8時間の後肢保存後の再接合術が可能であった。今後より長時間の保存後、再接合術を行い、生着・機能を観察していく必要がある。⑦ 臨床研究の実施の可能性に備え「Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強」のプロトコルの草案を行なった。今後議論を継続し更に充実させたい。⑧ PMDAの事前面談を受け、製剤の検査法、安全性試験に関する質問に対し、助言を得た。平成25年度以降の研究にこれを反映させたい。⑨ カニクイザルにHb小胞体を単回大量投与し、血漿中濃度推移について評価を行った。ヒトでの半減期は約5～6日程度と予測された。今回得られた知見は、HbVのヒトにおける安全性の予測に有用になるだけでなく、臨床試験の際のプロトコル作成の重要な基盤情報になると考えられる。⑩ Hb小胞体をラットに投与した後、摘出した脾細胞では一過性のT細胞増殖抑制効果が観察される。iNOS inhibitorであるL-NMMAを内包したDPPC-liposomeを投与するとT細胞の増殖抑制効果が軽減する傾向がみられた。また、iNOSの基質であるarginineを内包したDPPC-liposomeは、T細胞増殖抑制効果の若干の増強効果が認められたのみであった。従って、T細胞増殖抑制効果については、調節が可能であることを示唆しており、今後も継続して検討する予定である。⑪ 当研究班としては、我が国に於ける献血由来の白血球除去済みの赤血球を原料としている限り、1) その中にvCJDの原因である異常プリオンの混入の可能性を危惧する必然性は極めて少なく、献血血液に勝るとも

劣らない安全性が担保されている、2) 実際のヘモグロビン精製過程に既知のプリオン除去工程を導入することもできるので更なる安全性の向上を期待できる、と考えている。即ち、特性生物由来製品とみなされるHbVは、vCJD感染予防に関する十分な安全性を保証することができると考えている。

E. 結論

平成24年度の進捗状況として、先ず製造法について、未解決課題の検討を急ぎ、混錬法によるHb内胞効率の向上と無菌試験法を確立した。輸血代替としての安全性は、先ずカニクイザル大量投与後の一般毒性・血中半減期を明らかにした。RES捕捉に関する先見的な研究として、ラット出血性ショック蘇生後の体内動態を検討、また脾T細胞の一過性増殖抑制について投与量との相関やiNOSの寄与を解明した。リポソームを捕捉した細胞の遺伝子発現プロファイルを検討し、制御に関する候補分子の絞り込みを行なっている。臓器灌流保存液としての利用について、ラット切断下肢などを用いて検討中である。

当初N社が本研究班と連携し開発継続する予定であったが、社内方針の変更のためこれが不可能となり、急遽別の開発企業を探索する必要性が出て来た。このため、GLP製造の予定が2013年度以降にずれることになり、臨床研究、臨床試験も遅れることになった。ただ、昨年度までの検討で製造工程や検査法の課題が極めて明確になっていたため、今年度その課題に焦点を充てて研究を進めた。Non-GLP製剤は定常的に製造し、これをもとに先見的な動物投与試験を実施し、安全性・有効性を実証している。実施企業への円滑な技術移転・GLP/GMP製造、非臨床/臨床試験の移行に備えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担研究報告書に詳細を記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(発明者、酒井宏水ほか)

- | | |
|---|-----------|
| 1. 安定保存可能な酸素輸液剤 | 3,466,516 |
| 2. ヘモグロビン小胞体の光還元法 | 4,181,290 |
| 3. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体 | 4,763,265 |
| 4. 配位子置換型輸液製剤 | 5,020,525 |
| 5. US Patent 6,916,303: Photoreduction method for hemoglobin-vesicle | |
| 6. US Patent 6,864,094: Method of preserving oxygen infusions. | |
| 7. Canadian Patent CA2383977: Method of preserving oxygen infusions. | |
| 8. US Patent 7,417,118: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier | |
| 9. European Patent 1,466,649: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier | |
| 10. PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法. | |

分担研究報告書

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指した研究

分担課題：

1. 混錬法によるヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討
2. 脱酸素化工程における酸素分圧モニタリング法に関する検討
3. ヘモグロビン溶液およびヘモグロビン小胞体の無菌試験法妥当性試験と無菌試験
4. ヘモグロビン小胞体のβプロピオラクトンによる無菌化操作
5. ヒト血液由来ヘモグロビンを用いないヘモグロビン小胞体の製造の検討
6. 人工赤血球による臓器灌流の可能性について
7. 人工赤血球の臨床研究プロトコルについて
8. (独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)の事前面談について

研究代表者	酒井 宏水	早稲田大学 重点領域研究機構・上級研究員（研究院教授）
研究協力者	高折 益彦	東宝塚さとう病院・名誉院長（川崎医科大学・名誉教授）
	小林 紘一	奥羽病院・院長（慶應義塾大学医学部・名誉教授）
	堀之内宏久	さいたま市立病院・部長（慶應義塾大学医学部・客員講師）
	河野 光智	慶應義塾大学医学部・講師
	荒木 淳	東京大学付属病院形成外科・医師
	岩本美智子	医療法人川村病院・医師

研究要旨： 1) 従来のHb小胞体の製造において、仕込みのHb溶液の回収率が必ずしも高く無いことが量産に向けて一つの課題であった。そこで、混錬法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討している。従来よりも大型の装置を用い、脂質量40gから短時間(10-15分程度)の混錬操作で50-70%の回収率で約300mLのHb小胞体を製造出来る条件を見出すことができた。 2) 脱酸素工程は、人工赤血球を長期保存するために重要な工程である。蛍光プローブを使う残存酸素量の直接観測法により、酸素分圧が0.1Torr以下にまで追尾することが可能となった。 3) 製剤の無菌試験法について検討し、原料ヘモグロビン溶液については通常のメンブランフィルタ法が、また微粒子分散系であるHb小胞体については、直接法の変法(植継ぎ法)により試験が可能であることを確認した。 4) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程を検討し、β-プロピロラクトンが有効であることを確認した。しかし芽胞の不活化には課題を残した。 5) ブタ新鮮血からのヘモグロビン精製、およびヘモグロビン小胞体の調製を行なった。ヒトヘモグロビンから調製したものと比較して、酸素親和度や酸化速度に若干の違いがあったものの、調製上の問題点は無く、人工赤血球として使用できることが期待される。 6) ラットの切断下肢の灌流試験を行い、8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。 7) 臨床研究の実施の可能性に備え「Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強」のプロトコルの草案を行なった。 8) PMDAの事前面談を受け、製剤の検査法、安全性試験に関する質問に対し、助言を得た。

1. 混練法によるヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討

A. 緒言

リン脂質小胞体の製造方法としては、超音波照射法、有機溶媒を用いる逆相法、界面活性剤を用いて分散させた後これを透析で除去する方法などが知られている。しかし、Hbのような機能蛋白質を扱い、且つ、血管内投与を前提とした製剤の製造においては、工程中の蛋白質の変性や、残存物質の懸念があり、これらの方法は向いていない。また、一般的なリポソーム製剤と比較して大量投与を前提とする人工赤血球製剤の製造法としては、効率が極めて低い。人工赤血球の粒子ひとつの性能を表すパラメータとして、単位脂質重量に対するHb重量の比が使われる。この値が高いほど、Hbに結合した酸素を効率よく運搬できることになる。そのためには、粒子の内水相のHb濃度を出来るだけ高くすることが必要であり、要するに高濃度(例えば35-45 g/dL)のHb溶液中に複合脂質を分散させて、小胞体が形成される時にHbを高濃度の状態で内包させることが要件となる。高濃度Hb溶液は粘度が高く、そこに脂質粉末を分散させると更に粘度が高くなる。

これをいわゆる押し出し法(Extrusion Method)によって孔径の異なるフィルタを段階的に(例えば、Millipore社製MFフィルタ, 孔径 3.0 μm , 0.8 μm , 0.6 μm , 0.45 μm , 0.3 μm , 0.22 μm の順で)透過させて粒子径を調節する場合は、フィルタの交換が煩雑である上に、フィルタの目詰まりが起り易い。それを回避するために、脂質を予め水溶液中で小胞体を形成させて凍結乾燥して得られた粉末を使用する方法が知られている(Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. *Biotechnol Prog.* 2003; 19(5): 1547-1552)。しかし、水を凍結乾燥で除去する操作は極めて長時間を要し、またコストもかかり、産業化を考えた場合には効率が悪いことが課題となった。また、粒子径の小さい乾燥小

胞体が混在し、これはHb溶液に分散させた後、Hbを十分に内包せずに最後まで残ってしまう場合があった。粘稠な濃厚Hb溶液に添加できる乾燥脂質の重量も攪拌効率や押し出し法の効率の面で制約を受け、せいぜい6 g/dLが上限であった(6 gの脂質を1 dLの濃厚Hb溶液に分散させること)。攪拌後に大量に発生する泡を消去するのに時間が要すること、また泡が蛋白質の変性を助長すること、脂質粉末が完全に分散せずに塊になって残存することも課題であった。

また、乾燥した複合脂質粉末を粘稠な濃厚Hb溶液に分散させる方法として、プロペラ式攪拌器を用いる方法は、脂質塊が形成されることがあり結果として長時間を要すること、また脂質粉末が水和するときには発生する気泡は粘稠溶液中ではなかなか消えず、これが押し出し法におけるフィルタの通過性を低下させることや、分散しきれなかった脂質塊がフィルタ上に残り損失となることも問題であった。Hbの回収率はせいぜい20%となり、内包されなかったHbは、再度回収して再濃縮して再利用するか、あるいは廃棄せざるを得ず、極めて効率の悪いものであった。

また、粘稠なHb溶液-複合脂質分散液を、マイクロ流体ダイザー法によって、高圧高速で対面に噴出させて衝突させて剪断応力を発生させ、それにより粒子径を小さくする方法が知られている(Beissinger RL, Farmer MC, Gossage JL. *ASAIO Trans.* 1986; 32: 58-63)。しかしこの方法では、剪断応力の調節が難しいこと、また、Hb脂質分散液を回路に通すためにある程度の流動性が必要であり、従って脂質の濃度を6 g/dL程度にまで低下させることが必要であり、結果としてHbの回収率は20%程度と低いものであった。

また、脂質粉末を予め少量の水で乳化、水和膨潤させてペーストを形成し、これをHb溶液と高速に混合・乳化することでHbを内包させる方法も知られている(特許文献; 特開2009-035517号公報)。しかし、乾燥脂質を少量の水で水和

させた際に既に小胞体が形成され、それがHb混合

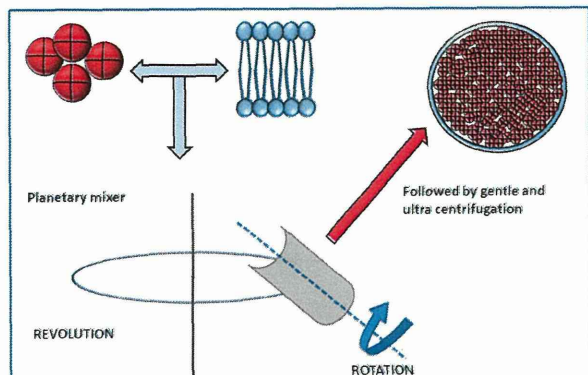


図 1. 混錬法による Hb 小胞体の調製法の概要。容器が遊星運動(自転・公転)をすることにより、内容物の攪拌ができる。高濃度での混合が可能となる。

後もHbを内包することなくそのまま残る可能性があり、結果としてHbを効率よく内包できず、Hbの内包効率が低下することが予想される。

そこで我々は昨年度より「混錬法」による人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の新しい製造方法を検討している。ヘモグロビンの回収率を従来よりも格段と高め、工程を簡略化し、操作時間を短縮でき、また、生体適合性を高めることもできるリン脂質小胞体（リポソーム）製剤の製造方法を提供することを目的としている。粒子ひとつひとつの酸素運搬機能を上げるには、やはり乾燥した複合脂質粉末を濃厚ヘモグロビン溶液と直接的に混合することが重要である。効率よく「多量の嵩高い乾燥状態の複合脂質粉末」と「粘稠な濃厚ヘモグロビン溶液」を混合し、濃厚ヘモグロビン溶液を小胞体に内包し、且つ粒子径を調節し、且つヘモグロビンの回収率を高めることができる。昨年度は仕込みの脂質粉末10gに対して、濃厚ヘモグロビン溶液40mLを添加、混錬する際の最適化を検討した。今年度は大型装置を用い、2-4倍の脂質量から混錬するスケールアップを行い、最適化を試みた。

B. 研究方法と結果

複合脂質として 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-

3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol、1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-glutamate (DHSBG)、ならびに 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-Poly(oxyethylene)5000 (DSPE-PEG5000、PEG鎖の分子量5000)がモル比で5/4/0.9/0.03となるように混合された脂質を用いた。テフロン製のシンキー社製の円柱状容器(内径90mm、内壁を凹凸を加え容器上から見た時にクローバー形になっているもの)に上記混合脂質粉末20-50gを入れ、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、45 g/dL、0.4-1.5 dL、pH7.4)を添加した。そして、内蓋をして封入し、混錬装置（自転公転攪拌器、シンキー社製、ARE-500）にて公転400回転にて3分間混錬処理し、冷却に3分待ったあと、容器内の気相を完全に一酸化炭素ガスで置換して封入した。そして、再度、公転800-1000回転にて10-20分程度の混錬処理を行なった。容器外表面の温度を赤外線温度計にて測定した。次いで、冷却した生理食塩水を添加し、15秒間回転させ、ペーストの粘度を低下させ、分散液とした。溶液を更に生理食塩水で最終的に4倍に希釈したあと、遠心分離(3000rpm、30分、Hitachi社製CF12RX)し、分散しきれていない粒子径の大きい分画の沈殿と、一部変性したHbを沈殿させた。上澄みの相について、孔径0.8 μ mのフィルタ(DISMIC)を透過させたあと、超遠心分離用の遠心チューブ(230mL容器)に入れ、更に生理食塩水を満たし、50,000gにて30分間超遠心分離し(Hitachi社製CP90WX)、得られた沈殿を生理食塩水に再分散させ、Hb濃度を約10 g/dLに調節した。ヘモグロビンの回収率は50-70%となった。粒子径はHORIBA製Nanoparticle analyzerを用いて計測し、中心粒径が220-270 nmであることを確認した。2dLずつ2L茄子型フラスコに入れてロータリーエバポレーターにて回転させ、内部に空気を通気しながら、外部から可視光照射し、COガスを光解離させ、酸素が結合したHbに変換した。

C. 考察

人工赤血球の調製法として、乾燥脂質粉末を濃度高く濃厚Hb溶液に均一に分散させ、且つ粒子径を小さくして調節し、且つHbの回収率を高め、且つ操作中のHbの変性を抑制することのできる、混錬操作の原理を採用する方法を考案し(図1)、国際特許出願を完了している(PCT/JP2012/59233)。昨年度までは、混錬による昇温を考慮し、低回転速度の混錬と冷却を何回も繰り返す方法を検討していたが、ある程度の昇温が脂質の分散に必要であることが解ってきた。用いている脂質の主成分であるDPPCの相転移温度が41℃であることからこの温度以上にすることが好ましいこと、一方でHbCOの変性点が78℃であることから70℃程度までであれば、Hb変性を最小限に抑えて混錬できる。従来、温度上昇を極力抑えるために公転速度を800回転以下にしていたが、結果として混錬時間が数時間に及ぶことがあり、しかも脂質の分散が十分でなく回収率が十分では無かった。今年度は、敢えて温度を上昇させるため公転速度を1000回転としたところ、僅か10分程度で温度は60-70℃に達し、しかも十分な分散性が得られ、Hb回収率も60-70%となった。今回のスケールでは、1バッチで300 mLのHb小胞体が調製できた。

D. 結論

混錬法によるHb小胞体の調製のスケールアップ(4倍)を試みた。結果として、Hb回収率60-70%で粒子径250nm程度のHb小胞体分散液約300 mLを一回の混錬操作でしかも短時間(10-20分)で得ることができた。混錬法に用いる容器は、現在の20倍までのスケールアップが可能である。混錬操作自体は、バッチ式となるが、一回の操作時間が極めて短いため、容器を複数準備して繰り返し行なうことにより、量産にも十分に対応が可能と考えられる。

2. 脱酸素化工程における酸素分圧モニタリング法に関する検討

A. 緒言

人工赤血球(Hb小胞体)の製造工程において、最終的に溶液中に存在する酸素(ヘモグロビンに結合したものと、物理的に溶解しているもの)を完全に排除してデオキシヘモグロビンとすることにより、長期保存中の自動酸化(メト化)を防止することに成功している。しかし、いわば酸素吸収剤であるヘモグロビンから酸素を完全に除去する方法また除去されたことを確認する方法は限られていた。従来、酸素電極を用いる方法を採用していたが、参照電極の併用が必要であり、製造工程に導入することは煩雑であること、またこれにより溶液中にイオンを放出する可能性があることが問題となり、操作条件を決定するために利用しても実際の製剤の調製に使用することは出来なかった。さらに、酸素濃度1%(約7Torr)まで低下させても、ヘモグロビンの酸素飽和度は数十%あり、十分なデオキシ化には、酸素濃度を0.1%以下(酸素分圧1-0.1%以下)にまで低下させること、またそのモニタリングが必要であった。そこで本研究では、新しい脱酸素化法および酸素分圧の確認方法について検討を行なった。

B. 方法

硝子製二つ口フラスコ(1000 mL)の内壁に、予めPreSens社製の蛍光プローブ(径5mm, 厚さ1mm)をシリコン性接着剤で貼付け、オートクレーブ滅菌した。一酸化炭素を排除し酸素を結合したオキシ型のHb小胞体([Hb]= 10 g/dL, 250-800 mL)をフラスコに入れ、側管はセプタムラバーで封入し、中管をロータリーエバポレータに接続した。回転速度をダイヤル7とし、フラスコ内に窒素を2L/minの速度で吹き付けた。

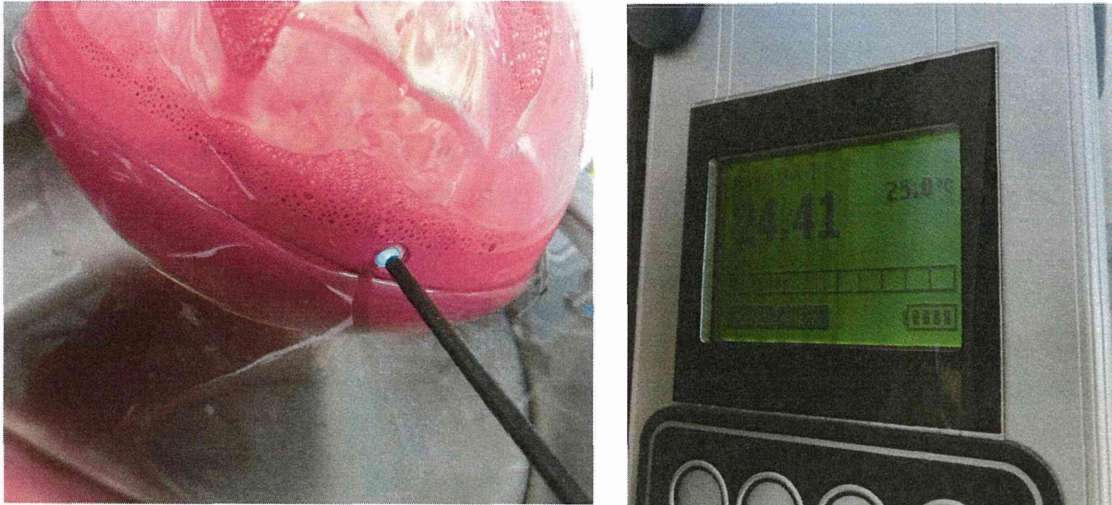


Figure 1. (左)脱酸素化工程において、Hb 小胞体分散液の入っているガラス容器の内壁に接着させた蛍光プローブに対し、外側から光ファイバー経由で青色のレーザー光を照射している様子。プローブから発せられる蛍光強度の寿命をもとに酸素分圧を知る事ができる。(右)脱酸素化工程における酸素分圧(torr)が画面に表示される。

経時的にロータリーエバポレータの回転を止めて、蛍光プローブに対してレーザー光を照射し、Stern-Volmer式から酸素分圧を計測した(**Fig. 1**)。

C. 結果および考察

Fig. 2に酸素分圧の変化を記した。初期1時間の酸素分圧の低下が著しいが、これは物理的に溶解している酸素が除去されていることを意味する。次第に酸素除去の効率は低下してくるが、これはHb に結合している酸素を除去する段階に入ったことを意味する。Hb小胞体の処理量が250-300mLの場合は、約15-24時間で酸素分圧が0.1Torr以下にまで到達する。この時点での酸素飽和度は、1%以下になっていると見積もれる。処理量が800mLと大量の場合では、27時間後に漸く1Torrにまで低下した。

本装置では、フラスコを回転させることにより内壁にHb小胞体分散液の液膜が形成され、気液界面を大きくし、ここに窒素を吹き付けることにより酸素の遊離を促進させることを原理としている。従って、より効率を高めるためには、気液界面における物質移動を高めるため、回転速度を高める

こと、容器内面積に対する導入液量を減らすことが考えられる。勿論、いわゆる人工肺を使えばこの工程は更に時間短縮がはかれると考えられるが、如何に簡単な装置で(安価に)操作できるかが重要となる。原理としては単純なものであり、化学工学的見地から更なる効率化が期待される。

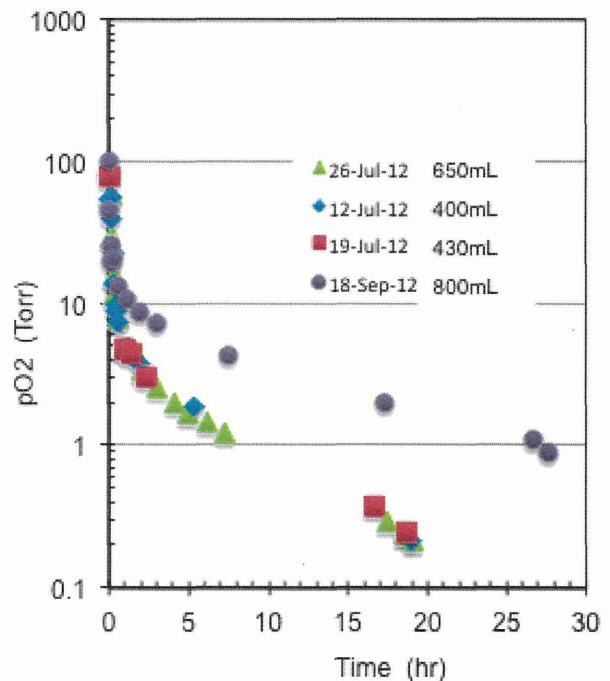


Figure 2. Hb小胞体の脱酸素化工程における酸素分圧の推移。

また、今回、溶液の酸素分圧をPreSens社製のシステムを使用して持続的に計測した。本システムの特徴は、蛍光プローブは硝子で完全に遮蔽されているので、蛍光色素が漏れだすことが無いこと、蛍光プローブは滅菌が可能なので、無菌系で計測が出来る事、また酸素分圧0.1Torr以下までモニタできることである。このシステムの利用により、脱酸素化工程の終了点を明確にすることができ、バッチ差の縮小に繋がることが期待される。

3. ヘモグロビン溶液およびヘモグロビン小胞体の無菌試験法妥当性試験と無菌試験

A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体およびその原料である精製ヘモグロビンともに、無菌性を担保する必要がある。しかし、その色調や微粒子分散液としての特性のため、薬局方に記載の無菌試験法が採用できるかどうか、これまで十分に検討をしていなかった。そこで本研究では、ヘモグロビン溶液およびヘモグロビン小胞体について、無菌試験等の妥当性を確認するとともに、その方法によって無菌性を確認することを目的とした。

(1) 実験実施場所：BRASS Pte. Ltd.
33 Ubi Ave 3, #06-13/14, 27-29 Vertex (Tower B)
Singapore 408868

(2) 実験室環境：隔離室(US Class 100 / ISO Class 5),
クリーンルーム (US Class 100,000 / ISO Class 8)

(3) 試験基準：本試験は、United States Pharmacopoeia Chapter <71>, Sterility Testに従った。

B. 実験方法および結果

B-1. 精製ヘモグロビン溶液のメンブランフィルタ法による無菌試験の妥当性評価 (WBS-MST-002)

試験の目的

精製ヘモグロビン溶液(45 g/dL) の無菌試験がメンブランフィルタ法にて実施できるか妥当性を検討することを目的とした。

対照試料

陽性対照：Peptone polysorbate 80液(Peptone P80) 100 mLを3回、孔径0.45 μ mのメンブランフィルタで濾過し、最後に次の試験用菌株を<100コロニー形成単位 (colony forming unit, CFU) 接種された溶液で処理する。各メンブランを200 mLの培地が入っている容器に移す。

- 1) 液状チオグリコール酸培地(Fluid Thioglycollate Medium, FTM)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの
 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (好気性細菌)
 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (好気性細菌)
 3. *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (嫌気性細菌)
- 2) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (Soybean Casein Digest, SCD)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの
 1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (好気性細菌)
 2. *Candida albicans* ATCC 10231 (真菌)
 3. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (真菌)

陰性対照：

- 1) 200 mLのSCD培養液
- 2) 200 mLのFTM培養液

被検体

濃厚ヘモグロビン溶液 (加熱処理、ナノフィルトレーションを経て精製されたもの)

試験方法 (Appr. Ref.: WBS-MST-002)

精製ヘモグロビン溶液1mLをPeptone P80溶液で1:100の比で希釈し、これを孔径0.45 μ mのメンブランフィルタで濾過する。このフィルタを試験用菌株<100 CFU接種されたPeptone P80溶液100 mLで三回処理する。各メンブランを200 mLの培地が入っている容器に移す。そして、各培養温度にて5日間培養する。

培地	菌株	培養温度 /°C
FTM	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	30 - 35
SCD	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	20 - 25

評価法

培養液中の菌の増殖は、目視にて濁度変化から判断する。被検体を処理した培養液の色調および濁度の変化がある場合は全て記録する。菌の増殖による変化と見分けることが出来る必要がある。

もし、被検体を処理した培養液が5日の培養期間後に濁度が高い場合、その1 mLを別のSCDまたはFTM培地に接種する。陽性対照についても同様の操作を行ない、培養を数日間行なう。

もし、被検体を処理した培養液が陽性対照と同等の菌の増殖がみられた場合、手法の妥当性が確認

されたことになる。

もし、被検体を処理した培養液が陽性対照と異なった増殖がみられた場合、手法の妥当性が確認されなかったことになる。

若し、陰性対照で増殖が見られた場合、または陽性対照で増殖がみられなかった場合、本試験は無効となる。

試験結果 (Test No.: SN-2012-0279; Appr. Ref.: WBS-MST-002)

陽性対照、陰性対照ともに有効であった。濾過後のフィルタを培地に移動した後、濁度の上昇を起こさなかった。被検体を処理した培養液は5日後、陽性対照と同等の菌の増殖がみられた。従って、本試験の被検体(精製ヘモグロビン溶液)は、メンブランフィルタ法による無菌試験が可能である。

B-2. 精製ヘモグロビン溶液のメンブランフィルタ法による無菌試験 (WBS-STR-002)

試験の目的

精製ヘモグロビン溶液の無菌性をメンブランフィルタ法にて確認することを目的とした。

対照試料

増殖加速試験：

次の試験用菌株を同量の培地に接種する。

- 1) 10 mL 液状チオグリコール酸培地 (Fluid Thioglycollate Medium, FTM)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの
 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (好気性細菌)
 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (好気性細菌)
 3. *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (嫌気

性細菌)

- 2) 10 mL ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地(Soybean Casein Digest, SCD)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの
 1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (好気性細菌)
 2. *Candida albicans* ATCC 10231 (真菌)
 3. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (真菌)

陰性対照：

- 1) 200 mLのSCD培養液, 2回
- 2) 200 mLのFTM培養液, 2回
- 3) 100 mLのPeptone P80を濾過し、200mLのSCD培養液に移したもの
- 4) 100 mLのPeptone P80を濾過し、200mLのFTM培養液に移したもの

内部試験対照：

2つのSCDプレート、隔離室の右端と左端に試験期間中に置いたもの。

被検体

濃厚ヘモグロビン溶液(加熱処理、ナノフィルトレーションを経て精製されたもの)

試験方法 (Appr. Ref.: WBS-STR-002)

被検体溶液 1mL を、Peptone P80 溶液で 1:100 比で希釈し、孔径 0.45 μ m のフィルタで濾過する。100 mL の Peptone P80 で 3 回、フィルタを洗浄し、200 mL の SCD 培養液が入った容器に移す。200 mL の FTM 培養液についても同様に処理する。

培養条件

SCD 培地のものは 20-25 $^{\circ}$ Cにて、FTM 培地のものは、30-35 $^{\circ}$ Cにて 14 日間培養する。

評価法

培養液中の菌の増殖は、目視にて濁度変化から判断する。被検体を処理した培養液の色調および濁

度の変化がある場合は全て記録する。菌の増殖による変化と見分けることが出来る必要がある。

もし、被検体を処理した培養液が14日の培養期間後に濁度が高い場合、その1 mLを別のSCDまたはFTM培地に接種する。陽性対照についても同様の操作を行ない、培養を最低4日間行なう。

もし、被検体を処理した培養液に菌の増殖がみられなかった場合、無菌性が確認されたことになる。

もし、被検体を処理した培養液に増殖がみられた場合、無菌性が無いことになる。

もし、陰性対照で増殖が見られた場合、または陽性対照で増殖がみられなかった場合、本試験は無効となる。

試験結果 (Test No.: SN-2012-0344; Appr. Ref.: WBS-STR-002)

陽性対照、陰性対照ともに有効であった。被検体の無菌性が確認された。

B-3. ヘモグロビン小胞体の直接法による無菌試験の妥当性評価(WBS-MST-001 V1)

試験の目的

Hb小胞体分散液の無菌試験が直接法にて実施できるか妥当性を検討することを目的とした。

対照試料

陽性対照：

次の試験用菌株をそれぞれ、200 mLの培地に入れる。

- 1) 液状チオグリコール酸培地(Fluid Thioglycollate Medium, FTM)で、次の菌株<100 CFUを接種し

たもの

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (好気性細菌)
 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (好気性細菌)
 3. *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (嫌気性細菌)
- 2) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (Soybean Casein Digest, SCD)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの
1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (好気性細菌)
 2. *Candida albicans* ATCC 10231 (真菌)
 3. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (真菌)

陰性対照：

- 3) 200 mLのSCD培養液
- 4) 200 mLのFTM培養液

被検体

ヘモグロビン小胞体 分散液

試験方法 (Appr. Ref.: WBS-MST-001 V1)

試験用菌株<100 CFUを200mLの培地に接種する。

培地	菌株	培養温度 / °C
FTM	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	30 - 35
SCD	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	20 - 25

被検体1mLを無菌的に瓶から取り出して、各培地に混合する。

全てのFTM, SCD培地を5日間培養する。

評価法

培養液中の菌の増殖は、目視にて濁度変化から判断する。被検体を処理した培養液の色調および濁度の変化がある場合は全て記録する。菌の増殖による変化と見分けることが出来ることが必要である。

もし、被検体を処理した培養液が5日の培養期間後に濁度が高い場合、その1 mLを別のSCDまたはFTM培地に接種する。陽性対照についても同様の操作を行ない、培養を5日間行なう。

もし、被検体を処理した培養液が陽性対照と同等の菌の増殖がみられた場合、手法の妥当性が確認されたことになる。

もし、被検体を処理した培養液が陽性対照と異なった増殖がみられた場合、手法の妥当性が確認されなかったことになる。

若し、陰性対照で増殖が見られた場合、または陽性対照で増殖がみられなかった場合、本試験は無効となる。

試験結果 (Test No.: SN-2012-0261; Appr. Ref.: WBS-MST-001 V1)

被検体を処理した培養液について、5日の培養期間後の濁度が非常に高く判別が不可能であった。そこで、プロトコルに従い、その1 mLを別のSCDまたはFTM培地に接種した。陽性対照についても同様の操作を行ない、培養を5日間行なった。陽性対照、陰性対照ともに有効であった。被検体を処理した培養液は、陽性対照と同等の菌の増殖がみられた。従って、本試験の被検体(ヘモグロビン小胞体分散液)は、直接法による無菌試験が可能である。

B-4. ヘモグロビン小胞体の直接法による無菌

試験 (WBS-STR-001 V2)

試験の目的

ヘモグロビン小胞体分散液の無菌性を直接法にて確認することを目的とした。

対照試料

陽性対照：

次の試験用菌株をそれぞれ、同量の培地に添加する。

3) 10 mLの液状チオグリコール酸培地(Fluid Thioglycollate Medium, FTM)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (好気性細菌)
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (好気性細菌)
3. *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (嫌気性細菌)

4) 10 mLのソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地(Soybean Casein Digest, SCD)で、次の菌株<100 CFUを接種したもの

1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (好気性細菌)
2. *Candida albicans* ATCC 10231 (真菌)
3. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (真菌)

陰性対照：

- 1) 200 mLのSCD培養液, 2回
- 2) 200 mLのFTM培養液, 2回

被検体

ヘモグロビン小胞体 分散液

試験方法 (Appr. Ref.: WBS-MST-001 V1)

1 mLの被検体を無菌的雰囲気を取り出し、各培地に混合する。

培養条件

SCD 培地のものは 20-25℃にて、FTM 培地のものは、30-35℃にて 14 日間培養する。

評価法

培養液中の菌の増殖は、目視にて濁度変化から判断する。被検体を処理した培養液の色調および濁度の変化がある場合は全て記録する。菌の増殖による変化と見分けることが出来る必要がある。

もし、被検体を処理した培養液が5日の培養期間後に濁度が高い場合、その1 mLを別のSCDまたはFTM培地に接種する(植継ぐ)。陽性対照についても同様の操作を行ない、培養を最低4日間行なう。

もし、被検体を処理した培養液に菌の増殖がみられなかった場合、無菌性が確認されたことになる。

もし、被検体を処理した培養液に増殖がみられた場合、無菌性が無いことになる。

若し、陰性対照で増殖が見られた場合、または陽性対照で増殖がみられなかった場合、本試験は無効となる。

試験結果 (Test No.: SN-2012-0386; SN-2012-0397; Appr. Ref.: WBS-STR-001 V2)

被検体は二つの培地において著しい濁度の上昇を生起した。目視による観察では、菌の増殖による濁度上昇と見分けることが不可能であった。培養 14 日後に、別の培地に接種(植継ぎ)する試験を開始した。植継ぐ試験の結果、陽性対照、陰性対照ともに有効であった。被検体の無菌性が確認された。

C. 結論

Hb小胞体の原料である精製濃縮ヘモグロビン溶

液については、常法であるメンブランフィルタ法により無菌性試験が行えることが明らかになった。一方、Hb小胞体はその粒子径のためメンブランフィルタを透過出来ない。そこで直接法による方法を採用した。しかし、濁度が高いため、一回目の接種では濁度による判別が不可能である。そこで薬局方に記載の通り、二回目の植継ぎを行なったところ、判別が可能であった。

今回妥当性を明らかにした無菌試験法により、精製Hb溶液およびHb小胞体の無菌性を検証したところ、これらの無菌性が明らかになった。

4. ヘモグロビン小胞体のβプロピオラクトンによる殺菌効果に関する検討

A. 研究目的

Hb小胞体の製造工程において、最終段階で滅菌操作を導入することが望まれている。しかし、その粒子径が250nmであるため、滅菌フィルタを低圧で透過させることが出来ない。そのため、他の滅菌法の可能性を追求している。既に当研究班では、β-プロピオラクトン(BPL)の有効性についてある程度の確認をしている。BPLは血液製剤等の微生物不活化剤として利用されているので、Hb小胞体の製造工程にも導入出来るものと考えている。そこで本年度はBPL添加法について、再度検証するとともに、特に耐性のある芽胞(spore)の死滅効果の有無について検討した。

B. 実験方法

1. β-プロピオラクトンの殺菌効果の検証 (Test No. SN-2012-0651)

硝子バイアル瓶に封入したHb小胞体分散液(10mL, 計5本, 攪拌子入り)に対し、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538を0.1mL 添加したのち、BPL(和光純薬)

をマイクロシリンジで0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μL注入し(各0.000%, 0.025%, 0.050%, 0.075%, 0.100%)、10分程度攪拌したのち、37℃にて2時間インキュベートした。その後、1mLを9mLの生理食塩水で段階的に希釈した。各希釈系列から1mLを採取し、滅菌済みのペトリ皿に播種し(x 3)、20mLのSoybean-Casein Digest agarを添加した。*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027についても同様に操作した。30-35℃にて5日間培養し、CFU (colony forming unit)を計測した。

Hb小胞体分散液への菌体の接種とBPLの添加は、早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所にて実施した。また、菌体の培養とCFU計測は BRASS Pte. Ltd. (33 Ubi Ave 3, #06-13/14, 27-29 Vertex, Tower B, Singapore 408868)にて実施した。

(検体)

Hb小胞体分散液(Lot 21-Nov-2012)

(菌体)

Staphylococcus aureus ATCC 6538,

2.06 x 10⁶ CFU / 0.1 mL

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

8.13 x 10⁶ CFU / 0.1 mL

2. β-プロピオラクトンの芽胞に対する効果の検証 (Test No. SN-2013-0103)

硝子バイアル瓶に封入したHb小胞体分散液(10mL, 計5本, 攪拌子入り)に対し、*Bacillus subtilis* spores ATCC 6633を0.1 mL添加したのち、BPLをマイクロシリンジで0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μL注入し(各0.000%, 0.025%, 0.050%, 0.075%, 0.100%)、10分程度攪拌したのち、37℃にて2時間インキュベートした。その後、1mLを9mLの生理食塩水で段階的に希釈した。各希釈系列から1mLを採取し、滅菌済みのペトリ皿に播種し(x 3)、20mLのSoybean-Casein Digest agarを添加した。30-35℃にて5日間培養し、CFU (colony forming unit)を計測した。