

201307032A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 26 (2014) 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す研究

(研究課題番号：H24-創薬総合-一般-009)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
酒井 宏水（奈良県立医科大学 医学部 化学教室 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 酒井 宏水（奈良県立医科大学 医学部 化学教室 教授）	9
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）	49
4. 高瀬 凡平（防衛医科大学校付属病院 集中治療部 准教授（臨床教育教授））	57
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
IV. 研究成果の刊行物・別冊	67

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

研究代表者 酒井 宏水 奈良県立医科大学医学部 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(Hb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25年度の成果は以下の通り。

(1) Hb小胞体の製造において、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。本年度は奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造できる状態になった。脂質量40g, 高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分程度の混錬操作で約300-400mLのHb小胞体を製造出来る条件を見出すことができた。(2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められず、Hb小胞体の安全性が確認された。(3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、 β -プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることを確認している。今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。全例が生存し、食餌量、運動量の回復も比較の赤血球投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1 α 発現量も低いことから、出血時にHb小胞体を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。(5) 毛細管内に分散する人工赤血球は、色素レーザー照射法におけるターゲットになりうる。鶏冠を血管腫モデルとして用い、人工赤血球を投与してレーザー照射したところ、標的部位に強い炎症反応を生起することが解り、レーザー治療への応用の可能性が明らかになった。(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成から組織は酸素代謝を維持しており、これにより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) 高脂血症

モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた³Hが検出されていると推測された。生活習慣病である高脂血症時におけるHb小胞体の安全性(生体蓄積性)を体内動態学的観点より初めて明らかにした。(8)一酸化炭素(CO)を結合させたHb小胞体の特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、IPFの新規治療薬としての可能性が見出された。(9)ラットに投与後、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、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。本年度はT細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。産生誘導が認められないものとしてIL-1 β , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、電気的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、Hb小胞体の有効性を評価するのに適したものと考えられ、次年度に継続して検討する予定である。

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
高瀬 凡平 防衛医科大学校 准教授

岩本美智子 医療法人川村病院 医師
力久 直昭 千葉労災病院 医師

研究協力者

小林 紘一 慶應義塾大学医学部 名誉教授
高折 益彦 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
木下 学 防衛医科大学校 准教授
荒木 淳 東京大学附属病院形成外科 医師

A. 研究目的

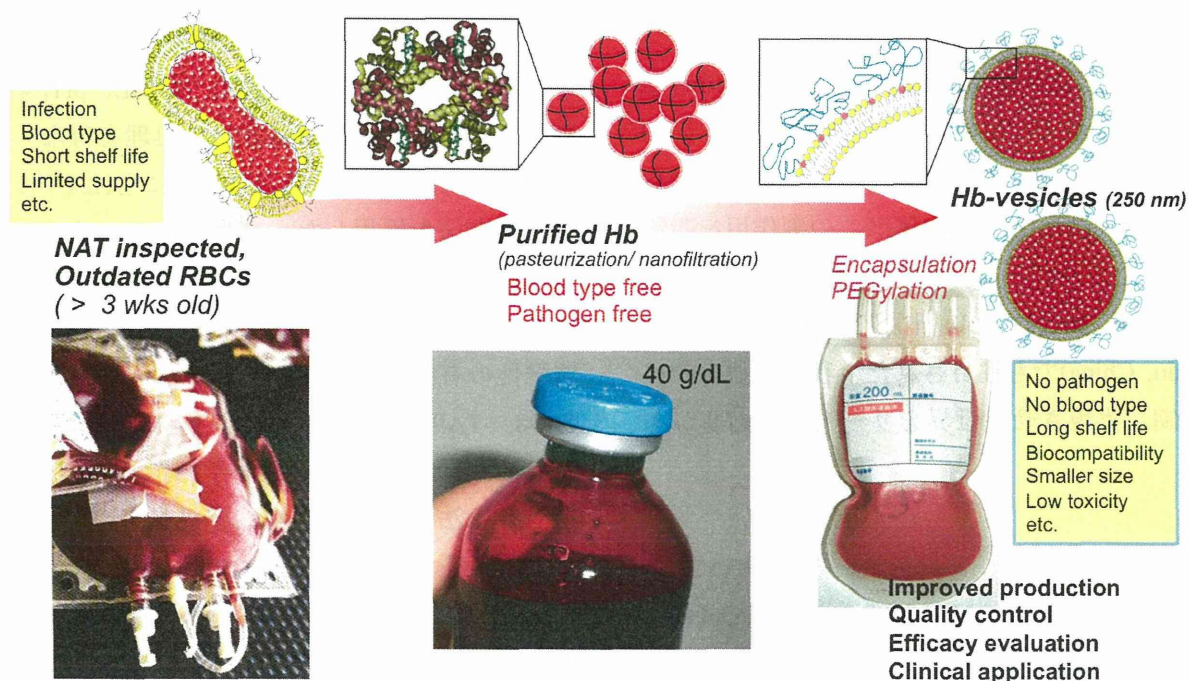
日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、感染の可能性、過誤による血液型不一致、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつある。人工赤血球(Hb小胞体: HbV)は、これらの問題を改善する新しい製剤としてその実現が期待されている。本研究は、期限切れ血液に最も多く含まれるHbの有効利用の観点から政策的に始まった[1]。期

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[2]。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、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]。病態モデル(出血性ショック[3]、体外循環[4]、皮弁創傷治癒[5]、担がん[6]など)で有効性を実証、体内動態[7]や凝固系・免疫系[8]への影響も精査した。このように本製剤は実用化を目指す段階にあり、当該研究をH24年度より3年間の研究として開始した。昨年度(H24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内包効率の向上[9]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[10]。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、制御に関与する候補分子の絞り込みを行っている。臓器灌流保存液としての利用について、ラット切断下肢および摘出肺を用いて検討中である。

本研究では、Hb小胞体製剤の臨床応用の早期実現を目指している。これまでの結果を受けて、H25年度は継続して、(1)従来のHb小胞体の製造において、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する。そのため、研究代表者の異動に伴い、奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造で切る体制を早急に構築する。(2) Hb小胞体には、合成脂質(DHSG)が含まれること、またHbO₂の自動酸化の過程でごく僅かではあるが活性酸素種を産生するので、安全性項目として、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なう。(3) β -プロピロラクトン(BPL)の添加による滅菌法について、芽胞を発芽させてからBPLを添加する方法を検討する。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb



小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なうとともに、組織への酸素供給について検討する。(5) 毛細管内に分散する人工赤血球を、色素レーザー照射法におけるターゲットとして利用することを目指し、鶏冠を血管腫モデルとして用いる実験を行なう。(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を継続する。(7) 高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与し、体内動態を検討する。(8) 一酸化炭素を結合させたHb小胞体を特発性肺線維症 (IPF)モデルマウスに投与し、その効果を検討する。(9) ラットに人工赤血球を投与した後の脾細胞は、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。これに関連し、T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定する。(10) 出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミン、赤血球による蘇生を行い、酸素運搬の必要性を明らかにし、人工赤血球評価法として確立する。以上を目的とする。

欧米で先行した修飾Hb溶液系は、内因性NOを急激に捕捉するため、血管収縮や心筋毒性などの副作用が確認され[11]、米国NIH-Workshop(2008)でも議論された。対してHb小胞体はこの副作用を脂質膜で遮蔽でき[12]、第13回国際血液代替物学会 (Boston, July 2011)、第14回国際血液代替物学会 (Chengdu, China)でも注目された。我が国独自の技術を早期に実現させ、世界をリードする必要がある。

【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:I220-5. [5] Plock et al., *Crit Care Med* 2007;35:899-905, Plock et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H905-10. [6] Yamamoto et al., *J Surg Res* 2009;151:48-54. [7] Taguchi et al., *J Control Release* 2009;136:232-9, Taguchi et al., *Drug Metab Dispos* 2009;37:1456-63. [8] Takahashi et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2011;337:42-9. [9] PCT/JP2012/59233:小胞体の製造法. [10] Taguchi et al., *J Drug Metab Toxicol.* 2012;3:1000128. [11] Natanson et al., *JAMA* 2008;299:2304-12. [12] Sakai et al., *J Biol Chem* 2008;283:1508-17, Sakai et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H956-65.

B. 研究方法

(1) Hb小胞体の製造において、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た。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-phosphatidylethanol-amine-*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、42 g/dL、0.4 dL、pH7.4)を添加した。そして、混錬装置にて処理を行なった。脱一酸化炭素工程、脱酸素化工程にもH24年度に確立した方法を採用した。奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造できる体制を構築した。(2) Hb小胞体の遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA98, TA1535 及び TA1537, 並びに *Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。(3) β -プロピロラクトン(BPL)の添加による滅菌法について、芽胞*Bacillus subtilis* spores ATCCを添加し、これを加温インキュベートして発芽させて

からBPLを添加する方法を検討した。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なうとともに、組織への酸素供給についてHIF-1 α の免疫染色を行なった。(5) 毛細管内に分散する人工赤血球を、色素レーザー照射法におけるターゲットとして利用することを目指し、鶏にHb小胞体を投与し、鶏冠を血管腫モデルとして利用し、レーザーを照射し、照射部位について組織病理学的に検討した。

(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を継続した。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) 高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスに³H放射化ラベルしたHb小胞体を単回大量投与し、体内動態を検討した。(8) 特発性肺線維症 (IPF) モデルマウスを、ブレオマイシン (5 mg/kg) を経気道投与することにより作成した。そして、一酸化炭素を結合させたHb小胞体を投与し、その効果を組織病理学的に検討した。(9) ラットに人工赤血球を投与した後の脾細胞は、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。これに関連し、T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインをBioPlexにより網羅的に測定した。

(10) “出血性ショック心臓”モデルをラット用いて作成し、生理食塩水、5%アルブミン、赤血球による蘇生を行った。そして、心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel 感受性色素を用いたOptical mapping system (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性 (Action potential duration dispersion :APDd)、致死性不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin 43 (Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。

C. 結果

(1) Hb小胞体の製造において、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。奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設

置し、その中に6ftのクリーンベンチを導入し、定期的に試験製造できる状態が整った。脂質量40g、高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分弱程度の混錬操作で約300-400mLのHb小胞体を繰り返し製造している。(2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められなかった。(3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、 β -プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることを確認している。今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。全例が生存し、食餌量、運動量の回復も比較の赤血球投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1 α 発現量も低いことから、出血時にHb小胞体を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。(5) 毛細管内に分散する人工赤血球は、色素レーザー照射法におけるターゲットになりうる。鶏冠を血管腫モデルとして用い、人工赤血球を投与してレーザー照射したところ、標的部に強い炎症反応を生起することが解り、レーザー治療への応用の可能性が明らかになった。(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成(PO₂, PCO₂, 乳酸値)から組織は酸素代謝を維持していることを確認した。常温8時間保存後再接合を行った例で、移植後約100日の生着を確認した。

(7) 高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた³Hが検出されていると推測された。(8) 一酸化炭素を

結合させたHb小胞体の特発性肺線維症 (IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認された。(9) ラットに投与後、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、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。本年度はT細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。産生誘導が認められないものとしてIL-1 β , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。(10) 出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、電気的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。

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を試み、結果としてHb回収率60%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。奈良医大に奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設

置し、その中に6ftのクリーンベンチを導入し、定期的に試験製造できる状態が整った。既に、混錬法による造粒のあと脱CO操作、脱酸素操作も対応可能であることを確認し、4バッチ分の製造を今年度に終えている。次年度も継続して製造する予定である。(2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められず、Hb小胞体の安全性が確認された。厚労省で開催された中間ヒアリング(平成26年2月26日実施)では、審査員より、本試験の必要性について質問があった。人工赤血球製剤の構成成分の主成分はヘモグロビン、脂質、ビタミンB6であり、生体適合性が高いと考えている。しかし、負電荷脂質であるDHSGは、グルタミン酸を骨格とし、これに二本のヘキサデシルアルコールがエステル結合し、そして一つのコハク酸がアミド結合した物質であり、医薬品として使用された実績も無い。また、Hb小胞体に内包された高純度Hb溶液は、自動酸化によってO₂⁻, H₂O₂などの活性酸素種を産生する。従って、突然変異の可能性についてこれまで検討したことが無い以上、懸念を払拭するためには試験すべきものと考え実施し、安全性が確認された。(3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、 β -プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることから、今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。これは、芽胞が存在する雰囲気は脱酸素化された条件であることや、脂質や蛋白質は多く存在するものの、分散媒が生理食塩水であるため、発芽には不適な条件であったことが考えられる。これまでの結果から、Hb小胞体の滅菌工程については、BPL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、継続し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。

(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。全例が生存し、食餌量、運動量の回復も比較の赤血球投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1 α 発現量も低いことから、出血時にHb小胞体を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。

肺全摘による呼吸機能低下状態でもHb小胞体が有効に機能し、外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えなかった。(5) 人工赤血球を生体に投与することで、レーザー光の血管選択性(血管に光が吸収され、他の皮膚構造物に吸収されないこと)が向上することが、*in vivo*, *in vitro*, 光学的観察、組織学的観察から示された。より多くの熱エネルギーが標的とする血管に選択的に蓄積されことから熱傷などのレーザー治療の合併症を軽減することが可能になり、レーザー治療の安全性向上に寄与することが示唆された。(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成から組織は酸素代謝を維持していた。ET-Kyoto単独での灌流は、初期の段階で組織が代謝を停止、壊死したものと考えられた。

Hb小胞体が酸素を供給することにより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) 高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた³Hが検出されていると推測された。生活習慣病である高脂血症時におけるHb小胞体の安全性(生体蓄積性)を体内動態学的観点より初めて明らかにした。今後、血液学的評価や組織学的評価を含めた安全性評価を行っていくことで、脂質代謝異常時(高脂

血症時) における詳細な安全性を明らかにしていけると考えられる。これらの検討項目については、次年度に行っていく予定である。(8) 一酸化炭素(CO)を結合させたHb小胞体を特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、IPFの新規治療薬としての可能性が見出された。Hb小胞体は、COの有効なキャリアとなりうることから、CO-Hb小胞体はIPFの新規治療薬としてだけでなく、炎症や活性酸素が関連する多くの疾患の治療薬候補として有望ではないかと考えられる。来年度以降にCO-Hb小胞体の更なる可能性について追及していこうと考えている。

(9) ラットに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、脾臓を取り出し、Con A刺激を加えて培養し、サイトカイン・ケモカインの産生動態の変化を網羅的に観察した。ケモカイン・一部のT細胞由来サイトカイン、IL10, TNF- α , IFN- γ の産生亢進が観察された。特に、主としてマクロファージ由来と考えられるケモカインの産生増強は、リポソームのマクロファージへの一過性の影響の一端を反映しているものと思われる。得られた結果は、リポソーム貪食マクロファージが、貪食後もその機能を保持していることも示している。また、リポソーム貪食マクロファージに特有な遺伝子プロファイルが示され、その中から、T細胞増殖抑制作用に関与する候補遺伝子と考えられるものが同定された。CD276は、B7-H3分子と同じものであり、免疫応答の制御に関わる分子である。その機能に関しては、T細胞機能を促進するという報告と抑制するという報告の相反する2つの報告がある。我々の系においては、B7-H3がT細胞の増殖を抑制する事に関与している可能性がある。今後B7-H3の役割について、検討を進めて行きたいと考えている。(10) 出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。

ラット出血ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、電氣的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、Hb小胞体の有効性を評価するのに適したものと考えられ、次年度に継続して検討する予定である。

E. 結論

平成25年度の進捗状況として、先ず製造法については奈良医大にも無菌状態で製造できる環境を整備し、混錬法による造粒、光反応による脱CO操作、脱酸素化工程を繰り返し可能であることを確認し、4バッチ分の製造を完了した。輸血代替としての安全性については、先ず遺伝子突然変異誘発性は無いことが確認された。細網内皮系への影響について、人工赤血球は脂質成分を多く含んでいることから、高脂血症時の投与には何らかの影響が出ることが懸念されていたが、高脂血症モデルへの投与試験では体内動態に異常は認められなかった。また、脾T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインの変動、マクロファージが発現増強する遺伝子群を同定した。機能評価としては、術中出血モデルへの投与において、組織酸素化と予後の回復において人工赤血球の効果が確認されたこと、また、臓器灌流試験では切断下肢を人工赤血球で灌流することにより再接着が可能であることが明らかになった。一酸化炭素を結合した人工赤血球が、肺線維化症の治療に有効であることも解って来た。

人工赤血球製剤の開発企業の探索を精力的に実施しており、現在も数社と協議しているが、まだ決定していない。そのため、技術移転作業やGLP製造設備の設置に至っていないので、全体的に計画に遅れが出ている。しかし、これ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ので、その課題に焦点を充てて研究を進めている。Non-GLP製剤は奈良医大で定常的に製造できる体制となり、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. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体 | 4,763,265 |
| 3. 配位子置換型輸液製剤 | 5,020,525 |
| 4. US Patent 6,864,094: Method of preserving oxygen infusions. | |
| 5. Canadian Patent CA2383977: Method of preserving oxygen infusions. | |
| 6. US Patent 7,417,118: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier | |
| 7. European Patent 1,466,649: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier | |
| 8. PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法. (2013年度に国内段階移行完了: 米国, インド, 中国, EP, 日本) | |

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す研究

分担課題：

1. ヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討
2. ヘモグロビン小胞体の細菌を用いる復帰突然変異試験
3. ヘモグロビン小胞体製剤の無菌化に関する検討
4. 肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体の投与効果
5. 人工赤血球を利用してport-wine stainのレーザー治療成績を向上させる研究
6. ヘモグロビン小胞体による切断下肢の灌流と再接着試験

研究代表者	酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部化学教室・教授
研究協力者	高折 益彦	川崎医科大学・名誉教授
	小林 紘一	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	東京大学附属病院形成外科・医師
	岩本美智子	医療法人川村病院・医師
	力久 直昭	千葉労災病院形成外科・医師

研究要旨： 1) 従来のHb小胞体の製造において、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。本年度は奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定期的に試験製造できる状態になった。脂質量40g, 高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分程度の混錬操作で約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) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められず、Hb小胞体の安全性が確認された。3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、 β -プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることを確認している。今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、人工赤血球の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。人工赤血球の投与により全例が生存し、食餌量、運動量の回復も赤血球の投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1 α 発現量も低いことから、出血時に人工赤血球を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。5) 毛細管内に分散する人工赤血球は、色素レーザー照射法におけるターゲットになりうる。鶏冠を血管腫モデルとして用い、人工赤血球を投与してレーザー照射したところ、標的部に強い炎症反応を生起することが解り、レーザー治療への応用の可能性が明らかになった。6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成から組織は酸素代謝を維持しており、これにより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。

1. 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、一般的なりボ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を濃度が高い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、マイクロフルイ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

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。今年度は、酒井が研究の拠点を早稲田大学重点領域研究機構(早大シンガポール研究所)から奈良県立医科大学化学教室に移したので、先ず化学教室内にクリーンブース(エアシャワー付、Class 10,000)を設置し、その中に6 ft幅のクリーンベンチを設置。そして早大シンガポール研より研究器材、製造器材等を移設し、奈良医大にて定常的に人工赤血球が製造できる環境を整えた。そして、大型混錬装置を用い、40 gの脂質重量から混錬するスケールアップを行い、最適化を試みるとともに、脱CO操作、脱O₂操作を経て、製剤化する一連の操作が可能であることを確認した。

B. 研究方法と結果

クリーンブース (内寸: 横 2.85 m x 縦3.2m x 高さ2.13 m)は日本エアテック社のclass 10,000の性能のものを導入した。その中に、横幅6 ftのクリーンベンチを装備した(Fig. 1)。人工赤血球の製造に関する操作は全てクリーンベンチ内にて行なった。クリーンブース内の清浄度は常にparticle counterでモニタリングし、class 10,000以上であることを確



Figure 1. 人工赤血球調製用のクリーンブースとクリーンベンチ (奈良医大 化学教室)

認している。

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-phosphatidylethanol-amine-*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一社製の円柱状容器(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40gを入れ、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、40-42 g/dL、1.4 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。次いで、酸素を排除し、50mLバイアル瓶に分注した。

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、国際特許出願を完了している(PCT/JP2012/59233)。今年度は各国への特許申請に移行している。混錬により成分が激しく攪拌されるため、試料の昇温が観察される。しかし、この昇温は脂質の分散にはある程度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。現在では公転速度を1000回転に固定し、僅か10分程度で温度は60-70℃に達し、高い分散性が得られ、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

奈良医大にも製造装置等に移設し、混錬法によるHb小胞体の調製を試みた。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分程度)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. ヘモグロビン小胞体の細菌を用いる復帰突然変異試験

A. 緒言

輸血代替の創製を目的として開発されて来た人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤は、血液と同等の濃厚な微粒子分散液である(ヘモグロビン濃度10g/dL, 粒子占有体積40%程度)。高純度高濃度ヘモグロビンをカプセル化することにより、ヘモグロビンの副作用を完全に遮断出来る。我々は1997年より厚生労働科学研究として本製剤の製造法、有効性と安全性について検討して来た。出血性ショック蘇生液としての利用や、体外循環回路補填液

としての有効性などを動物投与試験から明らかにしている。更に、製剤の特性(小粒子径、酸素親和度の調整、比較的高い粘性、CO結合性)を活かし、輸血では対応の出来ない疾患や治療（がん、虚血性疾患、再灌流傷害、臓器保存）など、新しい臨床応用の可能性も実証してきた。他方、人工赤血球製剤の安全性については、投与量が一人当たり数リットル以上になることもあり得るので、生体に対する影響を動物投与試験などから注意深く検討してきた。人工赤血球製剤は従来に無い、大量投与を伴う製剤であるため、その安全性試験法のマニュアルは存在せず、研究班が中心になって試験法を考えるとところから先見的学術研究として進めてきた。これらの結果を総合すると、安全性は担保されており、次段階に進むべき製剤であると考えられる。しかし、臨床試験に向けて、非臨床試験項目のうち未だ手つかずであった、遺伝子突然変異誘発性の可能性の有無について、明らかにすることを目的とした。人工赤血球製剤の構成成分の主成分はヘモグロビン、脂質、ビタミンB₆であり、生体適合性が高いと考えている。負電荷脂質であるDHSGは、グルタミン酸を骨格とし、これに二本のヘキサデシルアルコールがエステル結合し、そして一つのコハク酸がアミド結合した物質である。また、精製Hbを内包したHbVは、metHb還元酵素系を持たないため、HbO₂の自動酸化の過程でごく微量ではあるがO₂⁻やH₂O₂などの活性酸素を生じる。医薬品として使用された実績も無いので、突然変異の可能性については実施例が無い以上、試験すべきものと考えた。そこで、Hb小胞体の遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* のTA100, TA98, TA98, TA1535及びTA1537, 並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

本試験は、株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所にて実施された。

B. 方法

材料及び方法

1. 被験物質、媒体、陰性対照物質及び陽性対照物質

1.1. 被験物質

名称：人工赤血球（ヘモクロビン小胞体）

ロット番号：Deoxy-HbV 30-May-2013

性 状：暗赤色微粒子分散液

保管条件：冷蔵

保管場所：試験施設の被験物質保管室の保管庫〔冷

蔵庫：BMS-500F3、日本フリーザー株式会社、設

定温度：4° C（許容範囲：2.0～8.0° C）〕

製造元：奈良県立医科大学 医学部

取り扱い事項：凍結厳禁

1.2. 媒体

名称：生理食塩液

規格：局方

ロット番号：M1A80

使用期限：2014年1月

保管条件：室温

保管場所：試験施設の被験物質保管室〔設定温度：

23° C（許容範囲：18.0～28.0° C）〕

製造元：株式会社大塚製薬工場

1.3. 陰性対照物質

被験物質の媒体である生理食塩液を用いた。

1.4. 陽性対照物質

名称：ポジコンAMマルチセット

セット番号：M0030

使用期限：2013年11月3日

保管条件：冷凍

保管場所：試験施設の超低温フリーザー〔冷凍庫：

CLN-35CW、日本フリーザー株式会社、設定温度：

-80° C（許容範囲：-90～-70° C）〕

製造元：オリエンタル酵母工業株式会社

下記にポジコンAMマルチセットの内容を記載し

た。

1.4.1. 2-アミノアントラセン
(2-aminoanthracene、略名：2AA)

1.4.1.1. 調製液

5 µg/mL (ロット番号：120404A205)、10 µg/mL (ロット番号：120404A210)、
20 µg/mL (ロット番号：120404A220)、100 µg/mL
(ロット番号：120404A2100)

製造日：2012年 4月 4日

媒体：ジメチルスルホキシド（以下DMSO、紫外
部吸収スペクトル用、ロット番号：CZ068、株式会
社同仁化学研究所）

1.4.1.2. 原体

ロット番号：EPM0250

製造元：和光純薬工業株式会社

1.4.2. アジ化ナトリウム (sodium azide、略名：
NaN₃)

16.1.4.2.1. 調製液

5 µg/mL (ロット番号：120404N)

製造日：2012年 4月 4日

媒体：注射用水（ロット番号：1A97、株式会社大
塚製薬工場）

1.4.2.2. 原体

ロット番号：M0T4966

製造元：ナカライテスク株式会社

1.4.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine
hydrochloride、略名：9AA)

16.1.4.3.1. 調製液

800 µg/mL (ロット番号：120404A9)

製造日：2012年 4月 4日

媒体：DMSO（紫外部吸収スペクトル用、ロット
番号：CZ068、株式会社同仁化学研究所）

1.4.3.2. 原体

ロット番号：HAX01

製造元：東京化成工業株式会社

1.4.4. 2- (2-フリル) -3- (5-ニトロ-2-フリル)
アクリルアミド [2- (2-furyl) -3- (5-nitro-2-furyl)
acrylamide、略名：AF-2]

1.4.4.1. 調製液

0.1 µg/mL (ロット番号：120404AF01)、1.0 µg/mL
(ロット番号：120404AF10)

製造日：2012年 4月 4日

媒体：DMSO（紫外部吸収スペクトル用、ロット
番号：CZ068、株式会社同仁化学研究所）

1.4.4.2. 原体

ロット番号：STQ3987

製造元：和光純薬工業株式会社

1.5. 被験物質及び陽性対照物質の取り扱い
上の注意

被験物質は変異原性物質として取り扱い、被験
物質及び陽性対照物質を使用する際には、マスク、
手袋を着用し、吸入したり口から摂取したり、目
や皮膚につけないように注意した。

1.6. 残余被験物質の取り扱い

残余被験物質は、試験委託者に返却した。

2. 検体液

2.1. 被験物質

2.1.1. 調製方法

用量設定試験及び本試験とも、被験物質原液を
最高濃度（100%）とし、最高濃度液以下の濃度液
は、最高濃度（100%）液の一部を生理食塩液で段
階希釈して、用量設定試験では、30、10、3、1、
0.3及び0.1%を、本試験では50、25、12.5及び6.25%
を調製した。なお、用量設定試験及び本試験とも、
被験物質調製液は用時に調製した。

Table 1. S9 mix（詳細については4.項参照）を必要とする陽性対照

試験菌株の種類	化学物質の名称	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
TA100	2AA	10	1
TA1535	2AA	20	2
WP2 <u>uvrA</u>	2AA	100	10
TA98	2AA	5	0.5
TA1537	2AA	20	2

Table 2. S9 mix を必要としない陽性対照

試験菌株の種類	化学物質の名称	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
TA100	AF-2	0.1	0.01
TA1535	NaN_3	5	0.5
WP2 <u>uvrA</u>	AF-2	0.1	0.01
TA98	AF-2	1	0.1
TA1537	9AA	800	80

2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び濃度測定
被験物質調製液の安定性及び濃度測定は実施しなかった。

2.2. 陽性対照物質

2.2.1. 使用濃度 (Tables 1, 2)

2.2.2. 使用方法

凍結保管されているものを試験の際に融解して使用した。

2.3. 残余検体液の取り扱い
残余検体液は廃棄した。

3. 試験系

3.1. 菌株の種類及び選択理由
菌株の種類：

1) *Salmonella typhimurium*

TA98、TA100、TA1535、TA1537

2) *Escherichia coli*

WP2uvrA

選択理由：「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」に従い採用した。

3.2. 入手先及び入手日

1) *S. typhimurium* : TA98、TA100、TA1535、TA1537

入手先：中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

入手日：TA98、TA100（1996年10月18日）

TA1535、TA1537（1995年2月25日）

2) *E. coli* : WP2uvrA

入手先：中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

入手日：1995年2月25日

3.3. 試験系の環境条件

菌株は-80° Cで維持・管理され、試験には特性検査がなされたものを使用した。菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」1)に従い、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異rfa特性及び薬剤耐性因子R-factorプ

ラスミドの有無を検査し（TA100及びTA98の検査日：2011年7月20日～7月22日、TA1535、TA1537及びWP2uvrAの検査日：2012年7月31日～8月2日）、試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した（Attachment 1）。また、実験操作は空調設備を有したAmes試験室（G棟）で行った。

3.4. 菌株の保管方法

S.typhimurium 及びE.coli とも特性検査の結果から選択したコロニーを培養し、2.5%ニュートリエントブロス溶液〔OXOID NUTRIENT BROTH No.2（OXOID LTD.）2.0 gに注射用水80 mLの割合で加え溶解した後、高圧蒸気滅菌（121℃、15分）して調製〕に接種して、その菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを、チューブ（2 mL容セラムチューブ、住友ベークライト株式会社）に200 μ Lずつ分注し、-80℃設定の超低温フリーザー（ULT-1386-5A、Kendro Laboratory Products）内に凍結保管した（TA100及びTA98の分注日：2011年8月9日、TA1535、TA1537及びWP2uvrAの分注日：2012年8月21日、使用期限：分注凍結後2年以内）。

3.5. 試験系の識別方法

菌株ごとに試験管及びプレートに油性インクで色分けし、識別した。

4. S9 mix

4.1. S9

ロット番号：13032213

製造日：2013年3月22日

購入日：2013年4月17日

製造元：オリエンタル酵母工業株式会社

保管方法：試験施設の-80℃設定の超低温フリーザー（ULT-1386-5A、Kendro Laboratory Products）に凍結保管した。

誘導方法：（オリエンタル酵母工業株式会社発行の検定書より）

7週齢の雄ラット〔CrI：CD（SD）〕74匹（体重：211.6 $\pm$ 10.0 g）に誘導物質としてphenobarbitalを1日目は30 mg/kg、2、3、4日目には60 mg/kgを腹腔内投与し、さらに3日目には5,6-benzoflavone 80 mg/kgを腹腔内投与して誘導した。

有効期限：2013年9月21日（当試験施設の基準：製造後6ヵ月）

抽出法：酵素誘導処理をしたラットの肝臓を氷冷で冷却しながらホモジナイズし、ホモジネートした肝臓を冷却高速遠心機により遠心（9000 $\times$ g、10分間）して上清画分（S9）を採取。

4.2. S9 mixの組成（1 mL中の量）

A. S9 0.1 mL

B. Cofactor - I （Lot No.999203、オリエンタル酵母工業株式会社）

MgCl₂ 8 μ mol

KCl 33 μ mol

グルコース-6-リン酸 5 μ mol

NADPH 4 μ mol

NADH 4 μ mol

Na-リン酸緩衝液（pH7.4）100 μ mol

C. 注射用水 0.9 mL

4.3. S9 mixの調製方法

試験当日にCofactor-I 1本につき注射用水9 mLを加えて溶解した後、メンブランフィルター（ ϕ 0.2 μ m、NALGENE®）で濾過し、使用直前にS9を1 mL加えて調製した。

5. 菌株の前培養

菌株の前培養には、ニュートリエントブロス（OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号：987078、OXOID LTD.）2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌（121℃、15分）したニュートリエントブロス培養液を使用した。乾熱滅菌したモルトン栓付のL字管（容量：約40 mL）にニュートリエントブロス培養液を10 mL入れ、分注

Table 3. 生菌数

	生菌数 (×10 ⁹ 個/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.9	4.7	5.6	4.8	2.5
本試験	4.0	4.8	5.7	5.0	2.6

凍結菌液を融解してその20 μLを接種した。これを37° C設定の往復振盪型式（振盪数：90回／分）の振盪培養器（MM-10、タイテック株式会社）を用いて、10 時間培養した。培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計（Novaspec II、GE ヘルスケア・ジャパン株式会社）を用いて測定し、そのO.D. 値から生菌数を求めた。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。用量設定試験及び本試験における各菌株の生菌数を**Table 3**に示した。

6. 最少グルコース寒天平板培地

テスメディアAN培地（ロット番号：ANI140CC、製造日：2013年3月7日、オリエンタル酵母工業株式会社）を用いた。

〈テスメディアAN培地の組成〉

- A. MgSO₄・7H₂O 0.2 g
citric acid・H₂O 2 g
K₂HPO₄ 10 g
NaNH₄HPO₄・4H₂O 1.92 g
NaOH 0.66 g
蒸留水 200 mL
- B. glucose 20 g, 蒸留水100 mL
- C. agar 15 g, 蒸留水700 mL

前記組成のA、B、Cをそれぞれ高圧蒸気滅菌した後、冷却して混合し、これを放射線滅菌したシャーレに30 mLずつ分注、凝固させたもの。

7. トップアガー

トップアガーは、注射用水にBacto Agar（ロット番号：2012231、DIFCO）が0.6%、塩化ナトリウムが0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌

（121° C、20分）した。この水溶液に*S. typhimurium* の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を、*E. coli* の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、それぞれ容量比10：1の割合で加えて調製した。

8. 無菌試験

用量設定試験及び本試験実施の際に、被験物質の最高濃度液及びS9 mixの無菌試験をそれぞれ2枚のプレートを用いて実施した。試験は、被験物質の最高濃度液0.1 mL又はS9 mix 0.5 mLに、45° Cに保温したトップアガー 2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して37° C設定の低温恒温器（IN802、ヤマト科学株式会社）内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験及び本試験とも被験物質原液（100%）を用いた。

9. 試験方法

9.1. 試験操作（プレインキュベーション法）

乾熱滅菌した試験管（15.5 × 100 mm、清浄試験管ラルボ、テルモ株式会社）に、（1）被験物質調製液、陰性対照液あるいは陽性対照液0.1 mL、（2）高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5 mL（代謝活性化によらない場合）又はS9 mix 0.5 mL（代謝活性化による場合）、（3）菌懸濁液0.1 mLの順に加え、37° C設定の往復振盪型式の振盪器を用いて20分間インキュベーションした。その後、45° Cに保温したトップアガーを2 mL加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して37° C設定の恒温器（IN802、ヤマト科学株式会社）内で約48時間