

201407018B

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～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 27 (2015) 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 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 27 (2015) 年 5 月

別添 2

目次

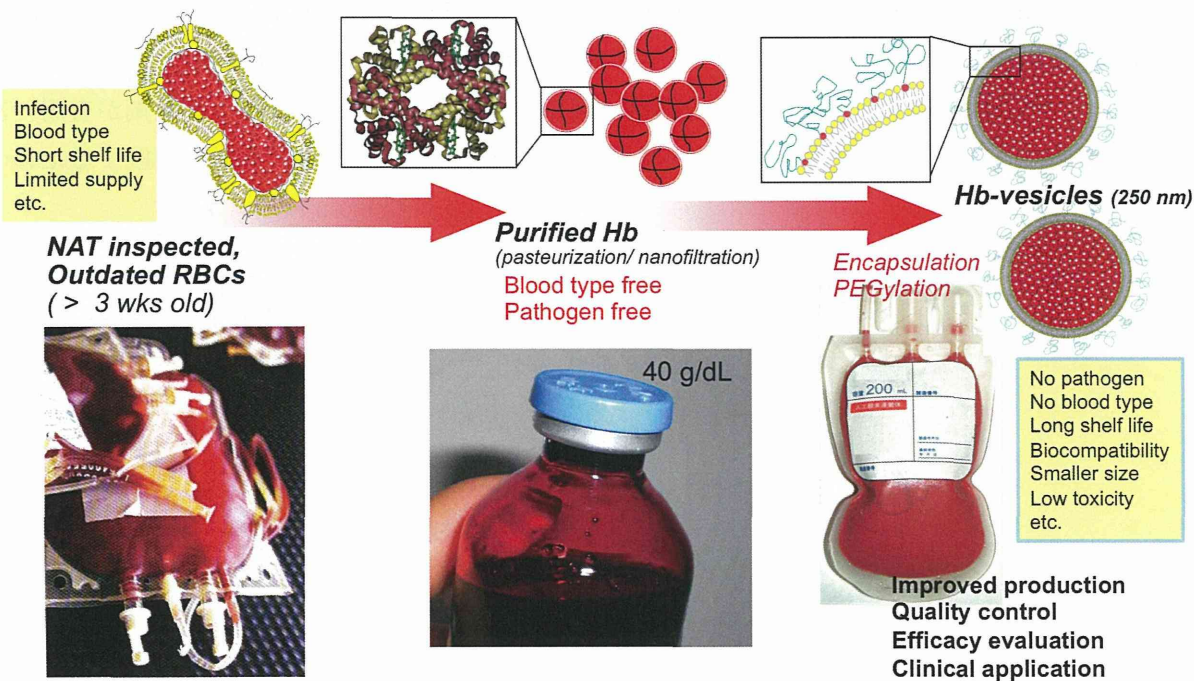
I. 総合研究報告書	1—113
酒井 宏水 (奈良県立医科大学 医学部 教授)	
1) ヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討 (酒井 宏水) … 4	
2) 赤血球からのヘモグロビン精製に関する検討(赤血球の凍結保存法) (酒井 宏水) … 7	
3) ヘモグロビン小胞体の細菌を用いる復帰突然変異試験 (酒井 宏水) … 12	
4) ヘモグロビン溶液およびヘモグロビン小胞体の 無菌試験法妥当性試験と無菌試験 (酒井 宏水) … 24	
5) ヘモグロビン小胞体のβプロピオラクトンによる殺菌効果に関する検討 (酒井 宏水) … 29	
6) ヒト血液由来ヘモグロビンを用いないヘモグロビン小胞体の製造の検討 (酒井 宏水) … 34	
7) 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 (力久 直昭) … 38	
8) 肺切除周術期出血モデル(マウス)におけるヘモグロビン小胞体の投与効果 (河野 光智) … 44	
9) ラット肺切除周術期出血モデルにおいてヘモグロビン小胞体投与が 循環動態と酸素化に及ぼす影響 (河野 光智) … 46	
10) 人工赤血球を用いた臓器組織灌流保存液の開発 (荒木 淳) … 48	
11) 人工赤血球の臨床研究プロトコルに関する研究 (堀之内 宏久) … 54	
12) (独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)の事前面談について (酒井 宏水) … 61	
13) カニクイザルにおける人工赤血球の体内動態評価 (小田切 優樹) … 64	
14) 高脂血症モデルマウスにおける人工赤血球の安全性及び体内動態試験 (小田切 優樹) … 66	
15) CO-HbVの突発性肺線維症への有用性評価 (小田切 優樹) … 71	
16) ヘモグロビン小胞体がサイトカイン・ケモカインの産生動態に 与える影響について (東 寛) … 76	
17) ヘモグロビン小胞体が免疫系に与える影響の容量依存性の検討と 抑制効果軽減の試み (東 寛) … 79	
18) リポソーム捕捉マクロファージの遺伝子発現プロファイルの検討 (東 寛) … 82	
19) プリオンについての考え方 (東 寛) … 83	
20) ヘモグロビン小胞体の出血性ショックにおける有用性に関する研究 (高瀬 凡平) … 86	
21) 研究発表 (2012.4. – 2015.3) … 91	
22) 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況 … 113	
II. 研究成果の刊行に関する一覧	114 – 117
III. 研究成果の刊行物・別冊	118

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、人工赤血球(ヘモグロビン小胞体, Hb-V)製剤について、効率の高い製造法を確立するとともに、輸血代替(出血性ショック蘇生液)として大量投与する際の安全性項目(特に細網内皮系や免疫系、心血管系への影響)を動物実験により精査し、GMP製剤による非臨床・臨床試験に備えることを目的とした。また、臓器保存液としての可能性を動物実験から明らかにし、臨床研究の可能性を見極めることも目指した。3年間の研究成果は以下の通り。



1. 人工赤血球製剤の製造法の確立： (i) 混錬法によりHb-Vを繰返し製造し、混錬条件の最適化を行い、内包効率が一定して60%近くを得る条件を見出し、SOPを作成した。また、物性分析法についてもSOPを作成した。(ii) Hb-Vの無菌化工程について多角的に検討し、原料導入から無菌的雰囲気を維持して製造することで、最終製剤の無菌性を担保することができた。(iii)人工赤血球製剤500 mL/バッチを繰返し製造でき、このスケールでfirst-in-humanは達成出来ると考え、GMP製造受託候補企業と今後に向けて準備を開始した。また、PMDA事前面談で製造に関する助言を得た。

2. 輸血代替としての人工赤血球製剤の安全性と有効性： (i) 周術期出血モデル(マウス・肺切除)にて有効性を確認、HIF1 α 発現の低減も酸素運搬効果を支持した(論文投稿中)。ラットの試験に移行し、効果を見出した。(ii) カニクイザル単回投与、一般毒性、血中半減期を明らかにした。(iii) 出血性ショックモデルラットにHb-Vを3回連投し、血中滞留性を比較。1回目投与時に比べ、2回目、3回目投与時ではRES飽和により血中滞留性は向上した。(iv) CO結合Hb-Vの投与が活性酸素種産生の低減と炎症の緩和に有用であった。(v) 高脂血症モデル動物への投与では、血液生化学で脂質関連の数値が一過性に上昇したが、十分な代謝排泄性を示した。(vi) 投与後のラット脾T細胞の一過性増殖抑制について、発現の増強を認めるmRNA遺伝子を見出したが、蛋白レベルでの明らかな増強を確認できたものは無かった。Con A刺激により、Mip-1 α 、RANTES、Mip-3 α 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10の増強傾向があるが、自然免疫系IL-1 β 、IL-8の増強は無かった。(vii) 出血性ショック心臓に特徴的な致死性不整脈の発生抑制に関し、Hb-Vは洗浄赤血球と同等の効果を示した。(viii) ラット切断下肢をHb-Vで6時間灌流した後に、大腿動静脈および大腿神経を吻合し、切断肢再接着術を実施した。灌流中の組織酸素代謝が認められ、3ヶ月後に機能回復も見られた。(ix) 人工赤血球を色素として利用し、port-wine-stainのレーザー治療に応用できる可能性を動物実験から示す事が出来た。

3. その他： (i) 人工赤血球の原料として廃棄血を利用しているので、プリオンの混入の可能性に対する考え方をまとめた。(ii) 人工赤血球をがん患者に投与すること、あるいは臓器保存液として使用する場合について、臨床研究計画(案)の作成に着手した。(iii) 実施企業を探索するため様々な活動を行なったが、これを見出すことは出来なかった。企業が開発を躊躇う理由も明確になった。しかし、本製剤が有用であることは疑いの無いことと判断し、次年度は日本医療研究開発機構の研究費を得て開発を継続するための準備を開始した。

分担研究者

小田切 優樹 崇城大学薬学部・教授
東 寛 旭川医科大学小児科学講座・教授
高瀬 凡平 防衛医科大学校・准教授(臨床教育教授)(平成25～26年度)

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・名誉教授
堀之内 宏久 さいたま市立病院・副院長(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呼吸器外科・講師
松田 信作 慶應義塾大学医学部呼吸器外科・助教
神山 育男 慶應義塾大学医学部呼吸器外科・助教
木下 学 防衛医科大学校免疫学講座・准教授
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
松平 崇 奈良県立医科大学医学部・助教
藤原 満博 北海道赤十字血液センター
力久 直昭 千葉労災病院・医師

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、マイクロフルイダイザー法によって、高压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

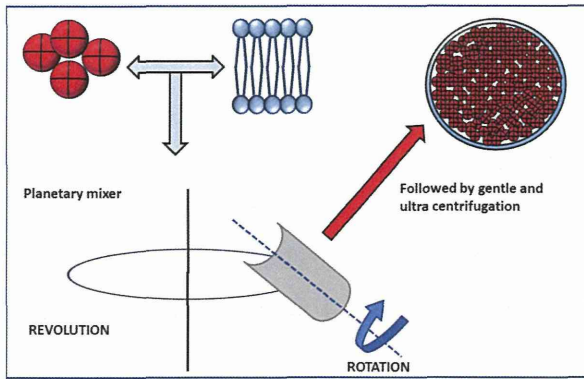


図 1. 混錬法による Hb 小胞体の調製法の概要。容器が遊星運動(自転・公転)をすることにより、内容物の攪拌ができる。高濃度での混合が可能となる。

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「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(図1)。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6ft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、製造器材等に移設し、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



図 2. 人工赤血球調製用のクリーンブースとクリーンベンチ (奈良医大化学教室内)

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6ftのクリーンベンチを装備した(図 2)。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-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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ Cであることから70 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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。平成26年度は合計で35回以上の混錬操作を試み、混錬操作の条件設定の微調整を行なった。一連の製造法、および分析法のSOPを作成した。

2. 赤血球からのヘモグロビン精製に関する検討(赤血球の凍結保存法)

A. 緒言

期限切れ輸血用血液を人工赤血球（人工酸素運搬体）として再生し、有効に活用するために、赤血球から単離Hbをリン脂質小胞体に封入する方法が検討されている。Hbの精製工程としては、①赤血球の洗浄、②限外濾過膜によるHbの単離、③一酸化炭素による安定化(HbCO)、④加熱(60℃,10 hr)によるウィルス不活化処理、⑤ナノフィルトレーションによるウィルス除去、⑥脱塩・透析と濃縮、⑦高純度高濃度HbCO溶液としての原料を保存、という一連の製法が確立されている。期限切れ血液の他に、ALT検査で基準値を超えた血液や、不規則抗体を持つ血液も、輸血には不適であるため廃棄される。廃棄される血液を原料として利用する場合、廃棄量が一年を通して一定ではなく、少量の廃棄血液が発生する度に、一連の工程を繰り返すことは非効率的である。このように一度に発生する量が多くない血液については、①の洗浄赤血球の状態での保存して、十分に量が集まった時点で②以降のHb精製工程を実施することが望ましいと考えた (Figure 1)。

培養細胞¹、微生物²、血液³⁻⁷など、細胞を含む試料を長期間保存する方法の一つとして、凍結保存がよく知られている。赤血球の凍結保存において問題となるのは、溶血(赤血球膜の破壊)ならびにHbの鉄活性中心の酸化反応(メト化反応)である。メト化したHb(メトヘモグロビン, metHb)には酸素運搬能力がなく、変性して不溶化しやすいため⁸、含有率を低く保つ必要がある。メト化などによる血液試料の品質劣化を防ぐために、凍結保護剤³⁻⁶や凍結融解方法の工夫⁵⁻⁷が検討されており、高濃度のグリセリンを使用した凍結保存法により血液試料の年単位の保存が可能であると報告されている^{3,4}。Hb精製の一工程として洗浄赤血球の凍結

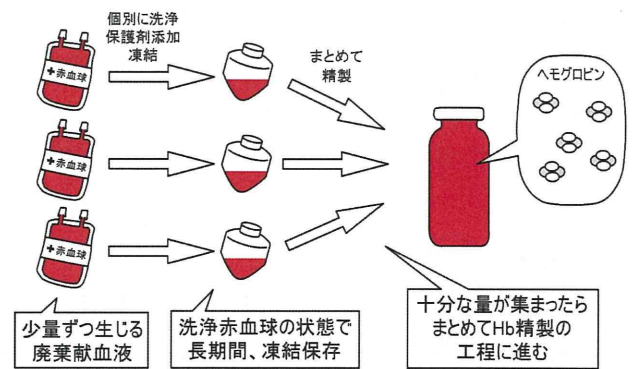


Figure 1. 廃棄血からの赤血球洗浄と Hb 精製

保存を組み込むことを考えた場合、Hbの機能が維持できれば(メト化を抑制できれば)、溶血することには特に支障は無い。凍結保護剤には、水溶性が高く、毒性が低く、Hbと容易に分離できる低分子化合物であるという性質が要求される。また、後に効率よく赤血球からHbを精製するためには、添加剤の量は少ない方が望ましい。本報告書では、赤血球の保存剤として最も多く検討されているグリセリンを試し、Hbをメト化させずに洗浄赤血球を長期凍結保存するために最適な方法を検討した。

B. 方法

使用した非使用廃棄血については、日本赤十字社により、ALT検査落ち献血液の譲渡を受けた。

1) 赤血球の洗浄

70%エタノールで表面を滅菌した血液バッグをクリーンルーム内で開封し、赤血球を500 mL遠沈管に250 mLずつ分注した。赤血球と同量の生理食塩水を加えて均一になるまでゆっくりと転倒攪拌したのち、3,000 rpm、4℃で30分遠心分離し、上澄みを吸引除去した。生理食塩水による洗浄操作をさらに2回繰り返し、各遠沈管あたり約150 mLの洗浄赤血球を得た。

2) メト化率の測定

凍結された赤血球を容器ごと37℃の恒温槽中で加温して融解し、吸光度測定法⁹によるメト化率の

測定を行った。metHbのシアノ化に伴う630 nmの吸光度の減少量を、試料溶液と、試料中の全Hbをメト化した溶液とで比較してメト化率を算出した。吸光度測定には、日本分光製JASCO-V650を用いた。

3) 凍結保存

洗浄赤血球を約6.5 mLずつ15 mL遠沈管に分注した。Table 1の比率に従って日本薬局方のグリセリン添加剤を加え、それぞれ均一になるまでゆっくりと転倒攪拌し、-80 °Cで凍結保存した。

4) 大容量での凍結保存

日本薬局方グリセリン (84~87% glycerol) をオートクレーブで滅菌処理した (121 °C、20分)。受領した献血液をクリーンルーム内で(A)~(D)の方法により洗浄した。

- (A) 3回生理食塩水で洗浄した後、84~87%グリセリンを加える。
- (B) 2回生理食塩水で洗浄した後、3回目は30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄する。
- (C) 1回目は30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄し、2, 3回目は15vol%グリセリン/生食溶液で洗浄する。
- (D) 3回生理食塩水で洗浄した後、洗浄赤血球と等量の30vol%グリセリン/生食溶液を加える。

Table 1

Sample Name	RBC/mL	凍結保護剤/mL (ca. 85% glycerol)	saline/mL	total volume /mL	保護剤終濃度 /vol%
30%	6.5	3.545	0	10.0	30
15%	6.5	1.393	0	7.9	15
7.3%(1M)	6.5	0.611	0	7.1	7.3
5%	6.5	0.406	0	6.9	5
3%	6.5	0.238	0	6.7	3
1%	6.5	0.077	0	6.6	1
0.50%	6.5	0.038	0	6.5	0.5
0.10%	6.5	0.0077	0	6.5	0.1
control	6.5	0.000	0	6.5	0
5% dilute	6.5	0.765	5.735	13.0	5
3% dilute	6.5	0.459	6.041	13.0	3
1% dilute	6.5	0.153	6.347	13.0	1
0.5% dilute	6.5	0.076	6.424	13.0	0.5
0.1% dilute	6.5	0.015	6.485	13.0	0.1

*日本薬局方グリセリン (84~87% glycerol) は、濃度85vol%として濃度計算に使用した

(A)~(D)の洗浄赤血球を、500 mL遠沈管ごと-80 °Cで凍結保存した。保存49日後に37 °C恒温槽中で融解し、クリーンルーム中で開封、一部をエッペンドルフチューブにサンプリングしてメト化率を測定した。エッペンドルフチューブは-30 °Cの冷凍庫、500 mL遠沈管は再び-80 °Cで凍結保存した。冷凍庫に保管したエッペンドルフチューブ中の洗浄赤血球を、保存35日後に37 °C恒温槽中で融解し、メト化率を測定した。

C. 結果

グリセリンを凍結血液の保護剤として使用した報告例は多い³⁻⁵。高濃度 (40w/v%) のグリセリンを添加して10年以上凍結保存した赤血球の例では、

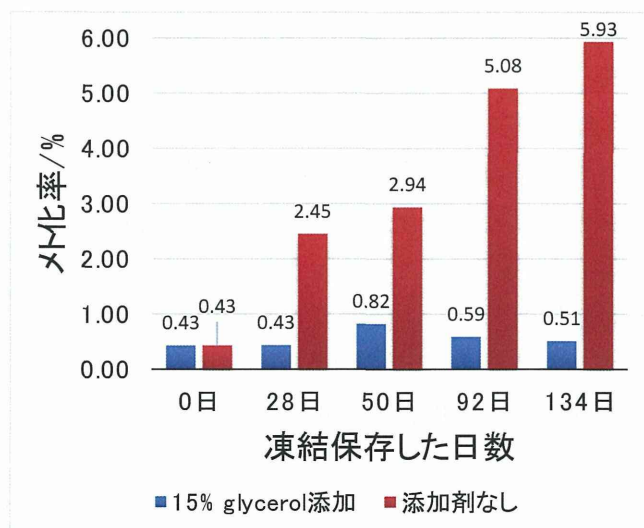
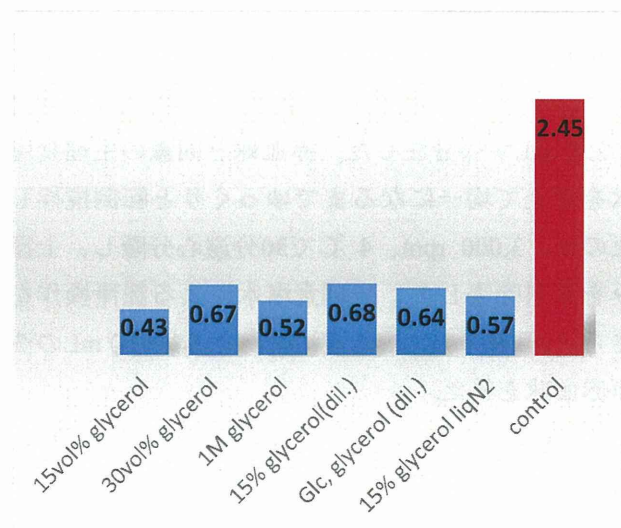


Fig. 2 -80 °C で凍結保存後の洗浄赤血球中に含有される Hb のメト化率。A) グリセリン添加と無添加の試料について、凍結保存 28 日後のメト化率を比較した。B) 15% glycerol 添加について、control とともにメト化率の追跡を継続した。

メト化率が $0.74 \pm 0.26\%$ に抑えられたことが報告されている³。

組成を変えてグリセリンを添加し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で28日間凍結保存した洗浄赤血球中に含有されるHbのメト化率を、保護剤を加えなかった場合 (control) と並べてFigure 2(A)に示す。グリセリンは終濃度が7vol%(1 M)~30vol%になるよう調製した。Glcはグルコースの添加を、Liq.N2は凍結時に液体窒素を使用したことを、(dil.)は生理食塩水により液量を2倍に希釈していることを表している。凍結保存28日後のメト化率は、controlが2.45%であったのに対し、グリセリンを含有する溶液中では0.43~0.68% (ave. 0.59%) と、いずれも1%以下に抑えられており、グリセリンの添加は効果的にHbのメト化を抑制することが明らかになった。グリセリンを終濃度15vol%になるように加えた洗浄赤血球 (15% glycerol) については、controlとともに継続してメト化率を追跡した (Figure 2(B))。赤色の棒グラフがcontrol、青色の棒グラフが15% glycerolを表している。Controlのメト化率は日数の経過に従って増大しているのに対し、15% glycerolは、134日経過後もメト化率0.51と、凍結前とほぼ同等の値を示した。この結果から、終濃度15vol%になるようにグ

リセリンを添加することで、洗浄赤血球を少なくとも4ヶ月間は保存可能であることが分かった。グリセリンには細胞内外で氷晶を形成しにくくする働きがある²。添加されたグリセリンは、水の結晶化による赤血球膜やHbの破壊を阻害することで、メト化を抑制していると考えられる。

<グリセリン濃度の検討>

次にグリセリンについて、最適な濃度を調べるため、グリセリンの終濃度を0.1~30vol%の範囲で変化させて洗浄赤血球に添加し、メト化反応の抑制効果を調べた。洗浄赤血球に日本薬局方84~87%グリセリンを添加した試料の $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 凍結保存後のメト化率をFigure 3(A)に示す。凍結後41日後の結果を比較すると、グリセリンを加えた赤血球試料はすべてメト化率1%未満に抑えられており、わずか0.1vol%のグリセリンの添加でメト化抑制効果があることが明らかになった。1vol%と0.1vol%濃度でグリセリンを添加した赤血球試料については、無添加 (control) とともに凍結後84日後にも追跡を行った (Figure 3(A))。グリセリンを加えた赤血球試料はいずれもメト化率1%未満に抑制されており、controlとの差がより明確になった。

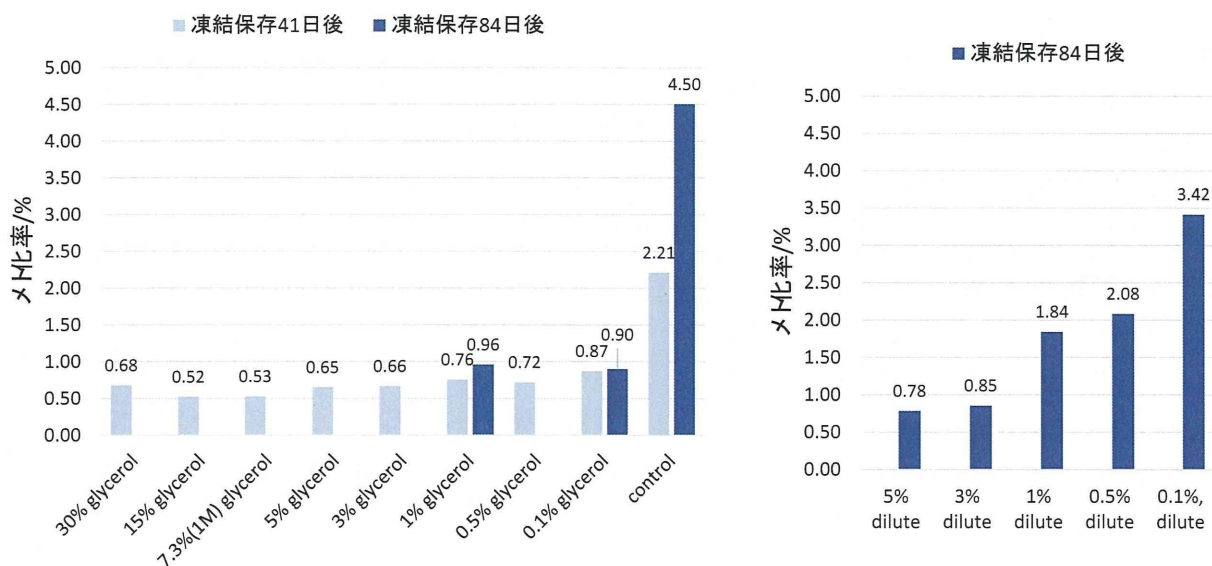


Fig. 3 凍結保存後の赤血球試料に含有されるHbのメト化率。(左)日本薬局方84~87%グリセリンを添加して、グリセリンを任意の濃度に調製した。(右)日本薬局方84~87%グリセリンと生理食塩水を添加して、グリセリンを任意の濃度に、Hb濃度を洗浄赤血球の2倍に調製した。

グリセリンの他に生理食塩水を加えてHb濃度を低下させ、-80℃で84日間凍結保存した赤血球試料のメト化率をFigure 3(B)に示す。生理食塩水でHbを2倍希釈した場合には、グリセリンの終濃度を3vol%以上に保てばメト化率は1%未満に抑制できるが、グリセリン濃度が1vol%、0.5vol%、0.1vol%と低下するに従ってメト化率は上昇し、メト化を抑制する能力が減少していくことが分かった。凍結保存84日後において、同じ終濃度(0.1%, 1%)になるようにグリセリンを添加した赤血球試料を、生理食塩水を加えなかった場合(Fig. 3(A))と、生理食塩水を加えて希釈した場合(Fig. 3(B))とで比較すると、希釈したときの方がメト化率は増大している。より少ない量の添加剤でメト化反応を抑制するためには、ヘモグロビン濃度を低下させないことが重要であることが分かった。

<大容量での保存>

実際に大量の洗浄赤血球を凍結保存することを想定し、クリーンルーム内で一度に精製できる最も大容量の器具(500 mL遠沈管)を用いて、各250 mLの濃厚赤血球を以下に示す4通りの方法で洗浄し、それぞれ-80℃で凍結保存した。

(A) 常法通り3回生理食塩水で洗浄した後、84~87%グリセリンを加えてグリセリンの終濃度を15vol%に調製する

(B) 常法通り2回生理食塩水で洗浄した後、3回目は洗浄赤血球と同量の30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄して、終濃度を15vol%に調製する

(C) 1回目は30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄し、2, 3回目は15vol%グリセリン/生食溶液で洗浄する。

(D) 常法通り3回生理食塩水で洗浄した後、洗浄赤血球と等量の30vol%グリセリン/生食溶液を加えて、グリセリンの終濃度を15vol%に調製する。

(B) と (C) では、グリセリンを含む溶液で洗浄するため、生理食塩水により洗浄する常法との違

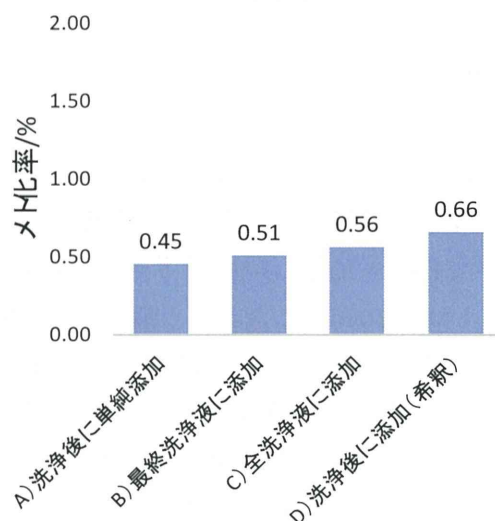


Fig. 4 赤血球の洗浄方法の検討。

いが生じた。(B)では、グリセリンを含む3回目の洗浄液を加えた後、遠心分離すると、底にグリセリンに類似した粘性の高い液体(固まり)の層が、少量生じた。上澄みの除去には問題は生じなかった。(C)では、1回目の洗浄では30分間、3,000 rpmで遠心分離しても明確な分離面が見えなかった。そこで、さらに30分遠心分離を続けたところ、上澄みが濃く着色した状態で分離面が見えたので上層を除去した。2回目、3回目の洗浄では30分の遠心分離で分離した。グリセリンの添加により洗浄液の比重が大きくなり、分離しにくくなったと考えられる。

500 mL遠沈管中で49日間、-80℃凍結保存した赤血球試料(A)~(D)のメト化率をFigure 4に示す。メト化率はいずれも1%未満に抑制されていることが確認された。

<冷凍庫での保存>

大量の赤血球を簡便な方法により保存する工程を考えた場合、-80℃ディープフリーザーではなく、-30℃の薬用保冷庫、あるいは-20℃の業務用冷凍庫での凍結保存が望ましい。しかし、赤血球試料を-20℃で凍結保存した場合、-80℃保存に比べてメト化反応が著しく進行しやすくなることが報告されている⁵。-20℃での凍結保存においても

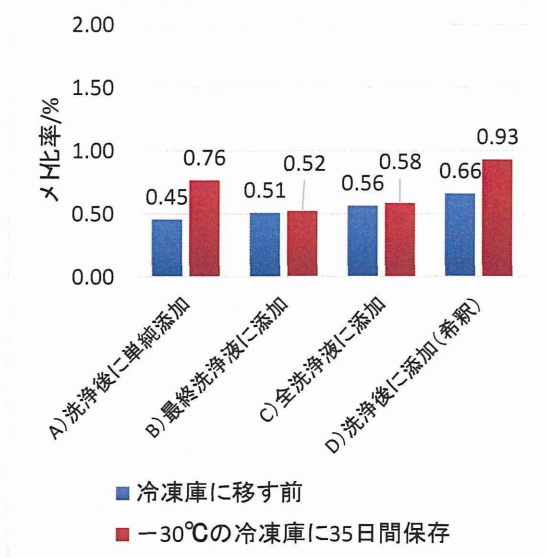


Fig. 5 洗浄赤血球を-30℃、35日間凍結保存した後のメト化率の変化。

いくつかの保護剤が検討されており、終濃度1 Mのグリセリン添加により、7日間、-20℃凍結保存後のメト化率がほぼ0%に抑えられることが報告されている⁵。

そこで、上述の方法により調製した(A)~(D)の赤血球試料が-30℃で保存可能か検討した。Figure 4の測定の後、500 mL遠沈管からエッペンドルフチューブに約300~500 μLほどずつ取り分けられた試料を、Panasonic製薬用保冷庫MPR-215Fの冷凍室に保管した。アルコール温度計で冷凍室の温度を測定したところ、-30℃であった。-30℃で35日間保存した後に、融解してメト化率を測定した結果をFigure 5に示す。-30℃保存によりわずかにメト化率は上昇したが、いずれも1%以下の水準を保っており、-30℃での凍結保存においてもグリセリンの添加はメト化反応の抑制に有効であることが示唆される。(B), (C)に比べて(A), (D)のメト化率の増大量は大きい。(A), (D)では洗浄を終えてから添加剤を加えるため、Hb濃度が減少している。「Hb濃度が減少すると添加剤のメト化抑制効果が低下する」というFig. 3の結果と同じ傾向を示しており、添加剤の効果を最大限に得るためには、洗浄液に

添加剤を混入する方法が有効であると考えられる。ただし、保存35日間の段階では差が小さく、明確に結論づけるには、より長期の保存結果を検証する必要がある。

D. 結論

洗浄赤血球の凍結保存におけるメト化反応の抑制方法を検討した。洗浄赤血球に対してグリセリンを終濃度15vol%で添加し、-80℃で凍結保存することによって、4ヶ月以上が経過しても、メト化率を洗浄直後の新鮮な赤血球と同じ水準に保つことができる。また、グリセリンは添加量が0.1vol%という低い濃度であっても2, 3ヶ月という短い期間であれば凍結保護剤として十分な効果を示すという結果が得られたが、生理食塩水により赤血球を希釈すると、保護効果が薄れることも分かった。一方、-30℃凍結保存においてもグリセリンの添加がメト化反応を抑制することが確認されたが、この温度域において最適な添加剤の濃度は、まだ確定していない。現時点で最も簡便かつ有効と考えられる、献血液の洗浄・保存方法は、献血液(濃赤)を生理食塩水で2回洗浄したのち、0.2vol%濃度以上のグリセリンを溶かした生理食塩水で1回洗浄して、上澄みを可能な限り取り除き、-80℃で凍結保存する方法と考えられた。

(文献)

1. F. Mori, Microbiol. Cult. Coll., 23(2), 89-93 (2007).
2. T. Sato and N. Yanai, 生活環境科学研究所研究報告, 45, 11-16 (2013).
3. J. Lecak, K. Scott, C. Young, J. Hannon and J. P. Acker, Transfusion, 44, 1306-1313 (2004).
4. M. Horie, C. Horiki, J. Iida, S. Otani, M. Okada, K. Hirai and Y. Okubo, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 37(5), 651-655 (1991).
5. A. Chanutin and R. R. Curnish, Archives of Biochemistry and Biophysics, 113, 114-121

- (1966).
6. M. Yokohama, K. Tanaka and K. Mogi, Jpn. J. Zootech. Sci., 52 (7) 487-492 (1981).
 7. T. Nei and N. Hanafusa, Low Temperature Science, Ser. B, Biological Science, 22, 101-107 (1964).
 8. 水上茂樹, 赤血球の生化学 [第二版], pp. 156 (1977), 東京大学出版会.
 9. 松原高賢, 蛋白質 核酸 酵素, 32, 672-673 (1987).

3. 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。

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）

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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA100	2AA	10	1
TA1535	2AA	20	2
WP2 <i>uvrA</i>	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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA100	AF-2	0.1	0.01
TA1535	NaN_3	5	0.5
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	0.01
TA98	AF-2	1	0.1
TA1537	9AA	800	80

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

0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （ロット番号：120404AF01）、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

（ロット番号：120404AF10）

製造日：2012年4月4日

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

16.1.4.3.1. 調製液

800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （ロット番号：120404A9）

製造日：2012年4月4日

媒体：DMSO（紫外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

1.4.3.2. 原体

ロット番号：HAX01

製造元：東京化成工業株式会社

1.5. 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。

1.4.4. 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]

1.6. 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。

1.4.4.1. 調製液

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。

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°C、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 µLずつ分注し、-80°C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°C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 ± 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×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 μmol

KCl 33 μmol

グルコース-6-リン酸 5 μmol

NADPH 4 μmol

NADH 4 μmol

Na-リン酸緩衝液（pH7.4）100 μmol

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（φ0.2 μm、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°C、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

Table 3. 生菌数

	生菌数（×10 ⁹ 個/mL）				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	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

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時間培養した。

10. 用量設定試験

被験物質の菌株に対する作用（生育阻害又は殺菌性）並びにプレート上での溶解性を調べ、本試験の試験濃度を設定する目的で実施した。

10.1. 試験方法

プレインキュベーション法により、S9 mix添加及びS9 mix無添加で行った。

10.2. 試験濃度

被験物質原液を最高濃度（100%）として、以下30、10、3、1、0.3及び0.1%の計7濃度と陰性対照及び陽性対照について実施した。

10.3. 使用プレート数

菌株、S9 mix添加、S9 mix無添加及び濃度段階の組み合わせごとに2枚のプレートを用いた。

10.4. 観察項目

10.4.1. プレート上での析出物の有無