

培養開始時及び終了時に肉眼的に観察した。

10.4.2. 菌の生育阻害の有無

100倍の実体顕微鏡下で観察した。

10.4.3. 復帰変異コロニー数の計測

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（CA-11D、システムサイエンス株式会社）により計測した。

11. 本試験

11.1. 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。

11.2. 試験濃度

用量設定試験の結果、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、すべての菌株において、菌の生育阻害及び復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、本試験の試験濃度は、用量設定試験と同様に100%を最高濃度として、以下公比2で5濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加及びS9 mix添加のいずれの菌株も6.25、12.5、25、50及び100%とした。また、対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設定した。

11.3. 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。

11.4. 観察項目

10.4.に示した方法で実施した。

12. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入がなく、また、復帰変異コロニー数が陰性対照では試験施設のバックグラウンドデータ

（Attachment 2）の平均 ± 2 S.D.内にあり、陽性対照では陰性対照の2倍以上に増加し、また、用量設定試験と本試験との間に再現性が認められ、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

13. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は、濃度ごとに平均値を算出した。なお、下記の判定基準に従ったため、有意差検定は実施しなかった。

14. 判定基準

被験物質における復帰変異コロニー数が、陰性対照の2倍以上の値を示し、さらに、濃度依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判断した。

C. 結果

1. 用量設定試験（Table 4-1、4-2及びFig. 1-1、1-2）

1.1. プレート上の析出物

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、培養開始時及び培養終了時にプレート上の析出物は認められなかった。なお、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、3%以上の濃度において培養開始時には赤色、培養終了時には茶色の着色が認められた。

1.2. 菌の生育阻害

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

1.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍未満であった。

1.4. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 ± 2 S.D.の範囲内であった。

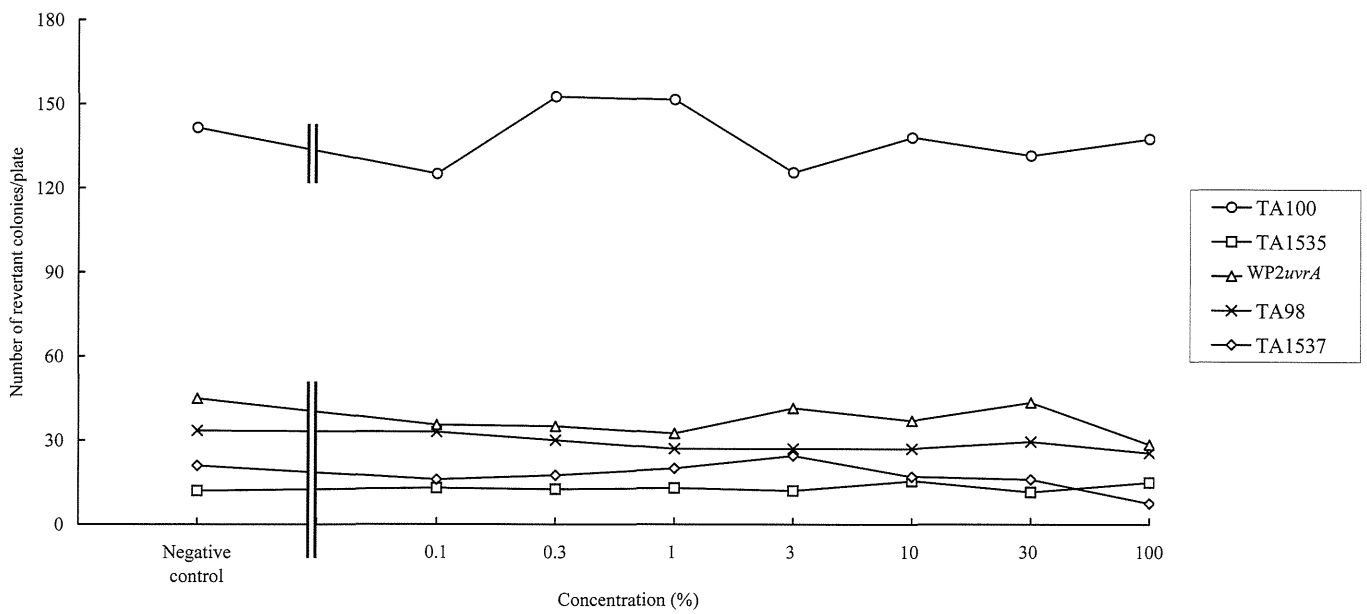


Figure 1-1. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(dose- finding test: without S9 mix)

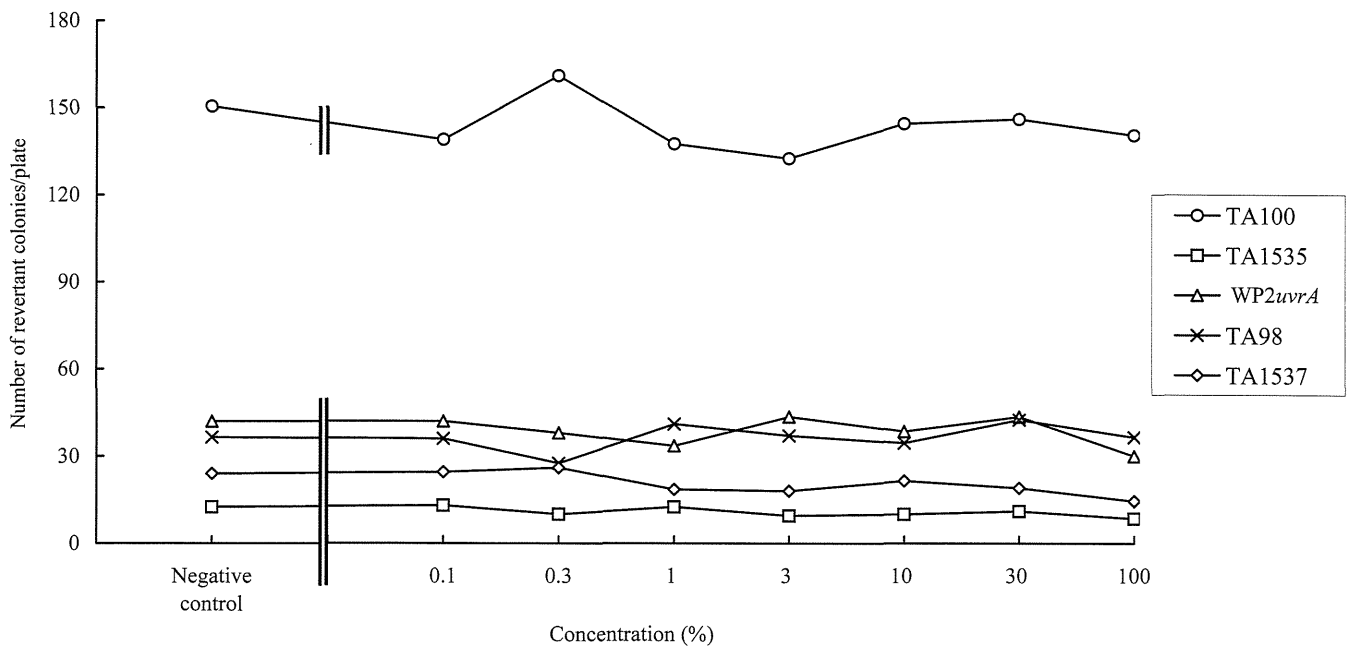


Figure 1-2. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(dose- finding test: with S9 mix)

Table 4-1

Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	140 143 (142)	11 13 (12)	40 50 (45)	32 35 (34)	18 24 (21)
	Artificial red cells	0.1	125 125 (125)	10 16 (13)	31 40 (36)	33 33 (33)	14 18 (16)
		0.3	144 161 (153)	10 15 (13)	33 37 (35)	29 31 (30)	16 19 (18)
		1	144 159 (152)	10 16 (13)	32 33 (33)	24 30 (27)	18 22 (20)
		3	120 131 (126)	7 17 (12)	41 42 (42)	27 27 (27)	23 26 (25)
		10	125 151 (138)	13 18 (16)	30 44 (37)	24 30 (27)	13 21 (17)
		30	128 135 (132)	11 12 (12)	42 45 (44)	27 32 (30)	16 16 (16)
		100	134 141 (138)	15 15 (15)	26 31 (29)	24 27 (26)	7 8 (8)
		Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	Concentration (µg/plate)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of revertant colonies/plate		445 525 (485)	591 638 (615)	106 121 (114)	375 378 (377)	306 371 (339)

Negative control : Saline.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

(): Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 4-2

Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	141 160 (151)	12 13 (13)	37 47 (42)	31 42 (37)	24 24 (24)
	Artificial red cells	0.1	139 139 (139)	12 14 (13)	41 43 (42)	34 38 (36)	22 27 (25)
		0.3	158 164 (161)	10 10 (10)	30 46 (38)	24 31 (28)	23 29 (26)
		1	127 148 (138)	11 14 (13)	32 35 (34)	40 42 (41)	13 24 (19)
		3	125 140 (133)	9 10 (10)	40 47 (44)	35 39 (37)	17 19 (18)
		10	139 150 (145)	9 11 (10)	36 41 (39)	34 35 (35)	18 25 (22)
		30	129 163 (146)	9 13 (11)	38 49 (44)	41 44 (43)	17 21 (19)
		100	128 153 (141)	8 9 (9)	28 32 (30)	34 39 (37)	11 18 (15)
		Positive control	Name	2AA			
	Concentration (µg/plate)		1	2	10	0.5	2
	Number of revertant colonies/plate		1135 1187 (1161)	360 401 (381)	1113 1208 (1161)	451 454 (453)	193 212 (203)

Negative control : Saline.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

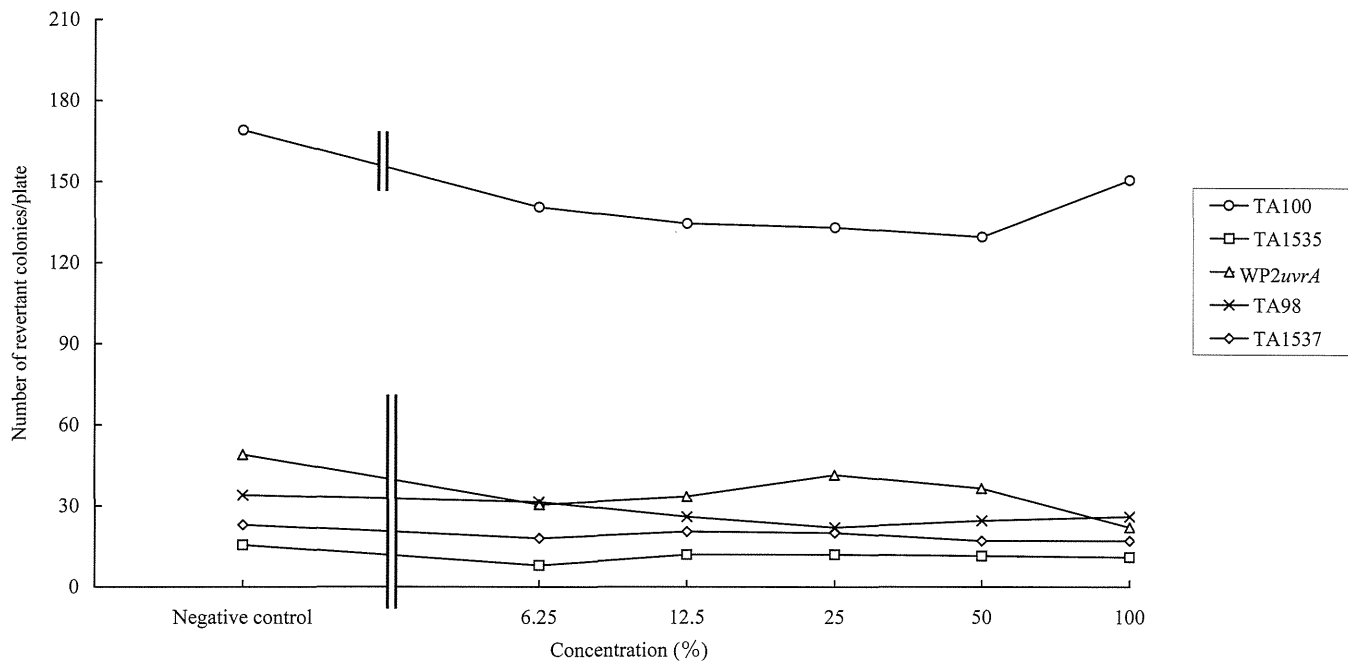


Figure 2-1. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(mutagenicity test: without S9 mix)

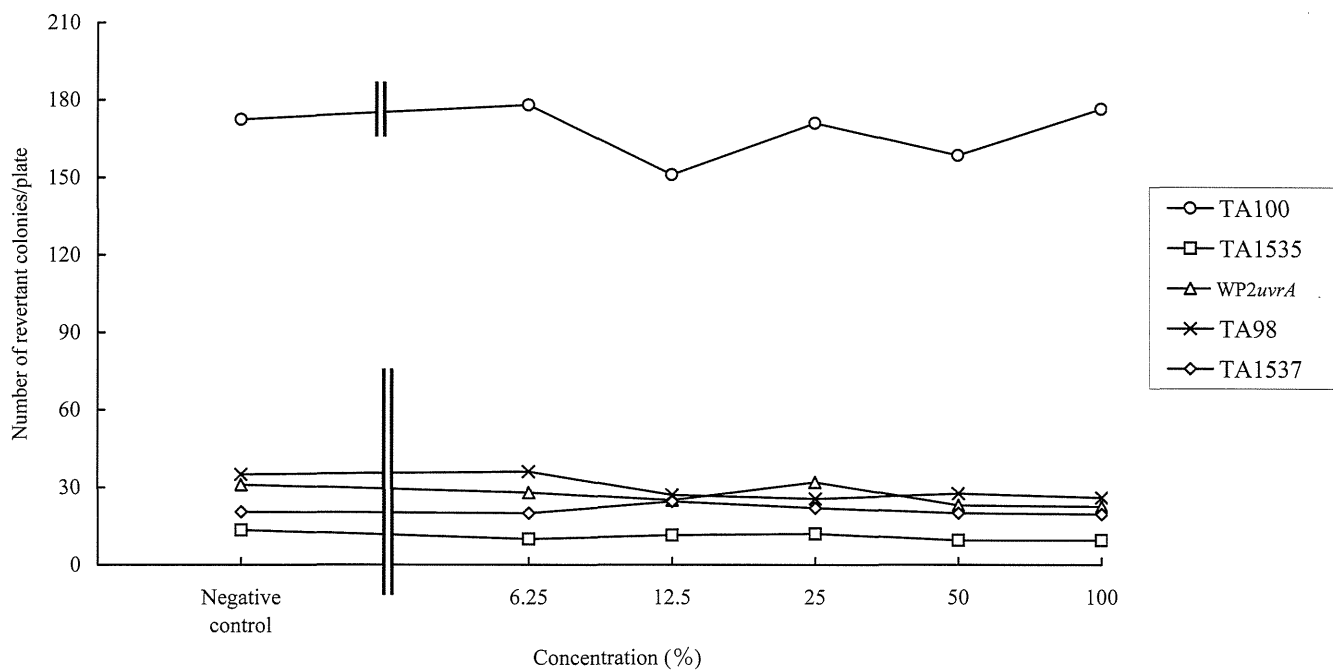


Figure 2-2. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(mutagenicity test: with S9 mix)

Table 5-1 Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	164 174 (169)	12 19 (16)	46 52 (49)	34 34 (34)	22 24 (23)
	Artificial red cells	6.25	120 161 (141)	8 8 (8)	27 34 (31)	30 33 (32)	16 20 (18)
		12.5	134 135 (135)	11 13 (12)	31 36 (34)	22 30 (26)	17 24 (21)
		25	130 136 (133)	11 13 (12)	39 44 (42)	20 24 (22)	20 20 (20)
		50	113 146 (130)	8 15 (12)	34 39 (37)	21 28 (25)	14 20 (17)
		100	134 167 (151)	11 11 (11)	22 22 (22)	24 28 (26)	16 18 (17)
			Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	Positive control	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of revertant colonies/plate	594 609 (602)	580 656 (618)	110 135 (123)	353 383 (368)	386 475 (431)

Negative control : Saline.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

(): Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 5-2 Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	165 180 (173)	13 14 (14)	30 32 (31)	35 35 (35)	17 24 (21)
	Artificial red cells	6.25	170 186 (178)	7 13 (10)	20 36 (28)	34 38 (36)	17 23 (20)
		12.5	141 161 (151)	11 12 (12)	24 26 (25)	25 29 (27)	24 25 (25)
		25	165 177 (171)	12 12 (12)	31 33 (32)	23 28 (26)	19 25 (22)
		50	146 171 (159)	9 10 (10)	22 24 (23)	26 29 (28)	17 23 (20)
		100	160 193 (177)	8 11 (10)	21 24 (23)	23 29 (26)	18 21 (20)
			Name	2AA			
	Positive control	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
		Number of revertant colonies/plate	1089 1168 (1129)	386 406 (396)	1140 1205 (1173)	437 449 (443)	246 255 (251)

Negative control : Saline.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

1.5. 無菌試験

被験物質原液（100%）及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

2. 本試験（Table 5-1、5-2及びFigure 2-1、2-2）

2.1. プレート上の析出物

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、培養開始時及び培養終了時にプレート上の析出物は認められなかった。なお、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、6.25%以上の濃度において培養開始時には赤色、培養終了時には茶色の着色が認められた。

2.2. 菌の生育阻害

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

2.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍未満であった。

2.4. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 ± 2 S.D.の範囲内であった。

2.5. 無菌試験

被験物質原液（100%）及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

D. 結論

人工赤血球の遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。人工赤血球は、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異

コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 ± 2 S.D.の範囲内であった。用量設定試験及び本試験には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、人工赤血球に遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

(参考文献)

労働省安全衛生部化学物質調査課（編）：安衛法における変異原性試験—テストガイドラインとGLP—、中央労働災害防止協会、平成3年3月

(追補)

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た。そして安全性が確認された。

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

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

のフィルターを培地に移動した後、濁度の上昇を起さなかった。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 培地のもは 20-25 $^{\circ}$ Cにて、FTM 培地のもは、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ことが必要である。

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)

- 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に取り出し、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(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。

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

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(*Bacillus subtilis* spores)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 μ L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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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톤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°C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°Cにて5日間培養し、CFU (colony forming unit)を計測した。

Hb小胞体分散液への芽胞の接種と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 22-Feb-2013)

(菌体)

Bacillus subtilis spores ATCC 6633

2.49 x 10⁶ CFU/0.1 mL

3. 芽胞の発芽を促進させてから β-プロピオラク トンを添加する方法の検討

(Test No. SN-2013-0560)

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(10⁶ colony forming unit (CFU)/0.1 mL)。バイアル瓶を37°C、または50°Cにてインキュベートし(**Table 1**)、芽胞の発芽を促進させた。次いで、BPLをマイクロシリンジで5または10 μL注入しそれぞれ、0.05または0.10%になるように設定した。10分程度攪拌したのち、37°Cにて2時間インキュベートした(150±10 rpm)。その後、1 mLを9 mL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 (SCD) agarを添加した。30-35°Cにて5日間培養し、CFU (colony forming unit)を計測した。

Hb小胞体分散液への芽胞の接種と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 Charles River社 (33 Ubi Ave 3, #06-13/14, 27-29 Vertex, Tower B, Singapore 408868)にて実施した(2013年に社名がBRASSからCharles Riverに変更)。

(検体)

Hb小胞体分散液(Lot 30-May-2013)

(菌体)

Bacillus subtilis spores ATCC 6633

1.70 x 10⁶ CFU/0.1 mL

Table 1. Test variables in each test run

Test Run	Variables		
	Germination condition		BPL concentration
	Germination Temperature (°C)	Germination Duration (hr)	
1	37	1	0.05%
2	37	3	0.10%
3	50	1	0.10%
4	50	3	0.05%

C. 結果

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

Staphylococcus aureus に関する結果をTable 2 およびFigure 1左に、また*Pseudomonas aeruginosa* に関する結果をTable 3およびFigure 1右に記す。い

ずれもHb小胞体へのBPL添加濃度が上昇するにつれ、死滅効果が得られ、BPL濃度0.100%のとき、Log reductionが6.69, および>6.99が得られた。従って、BPLにより十分な殺菌効果があることが確認された。(但し、今回用いた試料Lot 21-Nov-2012は、無菌化が保証されたものではなく、接種した菌体

Table 2 (Product Bioburden + *Staphylococcus aureus* ATCC 6538)

Concentration of BPL (%)	Surviving Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Surviving Microorganism	Total Product Bioburden (CFU/mL)	Log Result of Product Bioburden	Log Reduction	Remarks
0.000	9.75×10^8	8.99	9.75×10^8	8.99	0.00	Surviving Microorganism in LEH is derived from test report SN-2012-0689.
0.025	1.04×10^8	8.02			0.97	N/A
0.050	7.17×10^5	5.86			3.13	N/A
0.075	1.37×10^3 ^b	3.14			5.85	< LOQ ^a
0.100	2.00×10^2 ^b	2.30			6.69	< LOQ ^a

^a Limit of Quantification (LOQ) = 30 CFU/plate

^b The results were calculated based on the observed count at selected dilution

Table 3 (Product Bioburden + *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027)

Concentration of BPL (%)	Surviving Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Surviving Microorganism	Total Product Bioburden (CFU/mL)	Log Result of Product Bioburden	Log Reduction	Remarks
0.000	9.75×10^8	8.99	9.76×10^8	8.99	0.00	Surviving Microorganism in LEH is derived from test report SN-2012-0689.
0.025	9.23×10^7	7.97			1.02	N/A
0.050	1.91×10^5	5.28			3.71	N/A
0.075	< 1.00×10^2	< 2.00			> 6.99	< LOD ^c
0.100	< 1.00×10^2	< 2.00			> 6.99	< LOD ^c

^c Limit of Detection (LOD) = 1 CFU / plate (1.00×10^2 CFU/mL after the calculation)

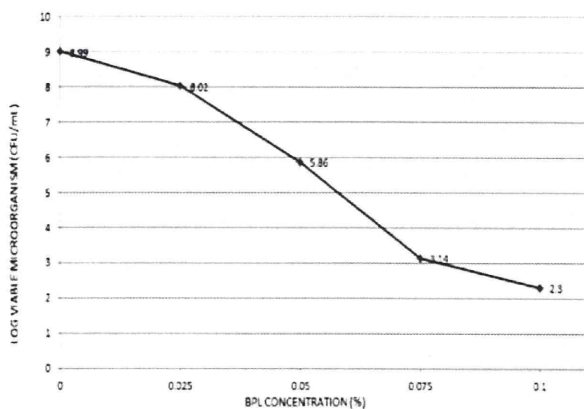


Fig.1 - The effect of different BPL concentrations on product bioburden + *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 in LEH at 37°C

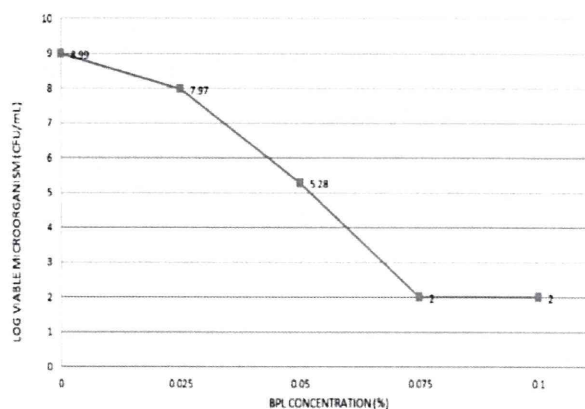


Fig.2 - The effect of different BPL concentrations on product bioburden + *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in LEH at 37°C

Table 4 *Bacillus subtilis* spores ATCC 6633)

Concentration of BPL (%)	Surviving Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Surviving Microorganism	Concentration of Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Microorganism in LEH	Log Reduction
0.000	2.62 X 10 ⁵	5.42	2.49 X 10 ⁵	5.40	-0.02
0.025	2.64 X 10 ⁵	5.42			-0.03
0.050	2.26 X 10 ⁵	5.35			0.04
0.075	1.83 X 10 ⁵	5.26			0.14
0.100	1.29 X 10 ⁵	5.11			0.29

Table 5 Log reduction of *Bacillus subtilis* from the positive control counts.

Test Run No.	Replicate	Estimated CFU/mL	Log ₁₀ Result	Average Log ₁₀ of Positive Control	Log Reduction
1	A	2.01 X 10 ⁵	5.30	5.38	0.07
	B	2.27 X 10 ⁵	5.36		0.02
2	A	9.10 X 10 ⁴	4.96	5.46	0.50
	B	9.40 X 10 ⁴	4.97		0.48
3	A	1.03 X 10 ⁵	5.01	5.42	0.41
	B	1.05 X 10 ⁵	5.02		0.40
4	A	2.32 X 10 ⁵	5.37	5.41	0.05
	B	2.01 X 10 ⁵	5.30		0.11

Table 6 Log reduction results shown in the context of the experimental design

Test Run	Test Variables Studied			Outcome (Log reduction against respective positive control)	
	Germination Temperature (°C)	Germination Duration (h)	BPL Concentration (% v/v)	A	B
1	37	1	0.05	0.07	0.02
2	37	3	0.10	0.50	0.48
3	50	1	0.10	0.41	0.40
4	50	3	0.05	0.05	0.11

数よりも多く菌体が存在していた。)

た。

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)

芽胞(*Bacillus subtilis* spores ATCC 6633)に関する結果をTable 4に示す。Hb小胞体へのBPLの添加量を増大させるにつれ、残存菌体数は減少傾向が見られるものの、BPL添加量が0.100%のところ、Log reductionは0.29に留まった。従って、芽胞に対してはBPLの効果は限定的であることが確認され

3. 芽胞の発芽を促進させてからβ-プロピオラクトンを添加する方法の検討

芽胞(*Bacillus subtilis* spores ATCC 6633)に関する結果をTable 5, 6に示す。Hb小胞体へのBPL添加量が0.100%のところ、Log reductionは0.40-0.50に留まった。従って、芽胞に対してはBPLの効果は限定的であることが確認された。

D. 考察

β -プロピオラクトンの作用機序は、ラクトン環が水溶液中で開環し、DNA鎖に結合することにより、バクテリアやウィルスの不活化が行なわれるというものであり、広く血液製剤に使用されている。今回の実験では、*Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa*の添加系においては、BPLの十分な殺菌効果が見出され、これは従来我々が報告した傾向と一致しており、今回別施設で実施した結果の再現性が得られたことになる。しかし、芽胞(*Bacillus subtilis* spores)の添加系においては、十分な殺菌効果が得られなかった。

文献(Wikipedia)によれば、芽胞を作る細菌は限られており、有芽胞菌あるいは芽胞形成菌として、細菌を分類する上での指標の一つにされている。有芽胞菌の中にはアンフィバシラス属、今回使用したバシラス属、クロストリジウム属、スポロサルシナ属などが存在する。このうち、バシラス属とクロストリジウム属が、病原性や微生物の有効利用などの面から、ヒトに対する関わりが深く、代表的な有芽胞菌として取り上げられている。芽胞を作る能力を持った細菌が、栄養や温度などの環境が悪い状態に置かれたり、その細菌に対して毒性を示す化合物と接触したりすると、細菌細胞内部に芽胞が形成される。このとき、細菌の遺伝子が複製されてその片方は芽胞の中に分配される。芽胞は極めて高い耐久性を持っており、さらに環境が悪化して通常の細菌が死滅する状況に陥っても生き残ることが可能である。しかし、芽胞の状態では細菌は新たに分裂することはできず、その代謝も限られている。このため芽胞は耐久型、休眠型と呼ばれることがある。生き残った芽胞が、再びその細菌の増殖に適した環境に置かれると、芽胞は発芽して、通常の増殖・代謝能を有する菌体作られる。芽胞に特化した滅菌方法として間欠滅菌と呼ばれる方法がある。間欠滅菌とは、材料を一旦煮沸したあと一晩室温で放置し、再び煮沸する作業を3回繰り返すもので、室温で放置して

いる間に芽胞が発芽して栄養型になることを利用した方法である。デオキシ型Hbの変性点は80°Cなので、温度の上げ下げでどこまで芽胞の増殖を抑えることができるか、検討する必要があると考え、37°Cおよび50°Cにてインキュベートして発芽させることを試みた。しかし、Log Reductionは限定的であった。これは今回の発芽の条件が不十分であったことを意味している。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。

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

A. 研究目的

現行の人工赤血球の製造に用いているヘモグロビンは、日本赤十字社から提供を受けた期限切れ献血血液から精製をしている。献血血液は緊急時に備えてある程度余分に備蓄すべきであり、従って期限切れ献血血液が無くなることはあり得ないと考えられる。しかし、需給バランスの見直しや保管データ管理によって、期限切れとなる量が低下することは確実である。従って、ヘモグロビンの元となる原料をヒト血液以外に求めることも考えておく必要はある。家畜由来の血液を用いることができれば、供給量には問題は無くなると考えられる。

我々は以前に新鮮ウシ血液からヘモグロビンを精製し、これをもとにHb小胞体が調製できることを確認した(Sakai et al., 2002)。しかし狂牛病の問題から、ウシを含む反芻動物由来の生物材料を用いる製剤の開発には困難を伴うことが予想される。さらに、ウシ由来の成分を用いる製剤について、宗教的な問題もありうる。

そこで本研究では、ブタ由来ヘモグロビンを用いることを検討した。ブタ由来の成分を用いる製剤についても、宗教的な問題はありうると考えられるが、反芻動物では無いので、プリオンに関する問題は回避できると考えられる。

B. 方法

1. ブタ血液からのヘモグロビン精製

EDTA加ブタ新鮮血は、Innovative Research Inc. (Michigan, USA)より購入した。総量1004g ([sHb]=10.78g/dLを先ず、250 mL遠心チューブに分配し、遠心分離(3000 rpm, 20 min)処理し、上澄みを除去した。沈降した赤血球は再度生理食塩水で再分散した。この操作を4回繰り返す、洗浄濃厚赤血球を得た。これを2Lのパイレックス硝子容器にいれ、

純水を加えて1.5Lとした。タンジェンシャルフロー限外濾過システム Biomax V-screen (cutoff Mw. 1000 kDa, Millipore)を用い、溶血とストロマ成分の除去を同時に行ない、sHb溶液を得た。sHb溶液(オキシ型)は、一酸化炭素ガスを通気することによって、カルボニルヘモグロビン(sHbCO)に変換した。sHbCO溶液を60°Cにて一晚(15時間)インキュベートしたのち、氷水で冷却し、3000 rpmで30分遠心分離する操作を二回繰り返し、変性不溶化した夾雑蛋白質を除去した。透析と濃縮をタンジェンシャルフロー限外濾過システム Biomax V-screen (cutoff Mw. 8kDa, Millipore)を用いて行なった。塩濃度が0.01%以下になったことを確認したあと、sHbCO濃度42g/dLまで濃縮した。

2. sHb小胞体(sHbV)の調製

調製法は従来法に従った。ピリドキサル5'-リン酸(PLP)を、精製濃縮sHb溶液に対し、PLP/sHb = 0, 0.5, 1.0, 2.5の比で添加した。孔径0.45 μ mのフィルタ(Advantec Co.)を透過させたあと、混合脂質粉末(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG₅₀₀₀-DSPE=5/4/0.9/0.03モル比)を添加、混合し、粒径制御を行った。外水相の未内包Hb溶液を除去し、可視光照射によって一酸化炭素を除去し、オキシ体に変換した。Hb濃度はシアノメトヘモグロビン法(Alfreda Parma Co.)の変法にて、またリン脂質濃度はコリンオキシダーゼ-DAOS法(和光純薬)の変法により測定した。最終的にsHbV分散液のHb濃度を10g/dLに調節した。粒子径は光散乱法にて測定した(Nanoparticle analyzer SZ-100, Horiba Ltd)。

3. sHb溶液の熱的安定性に関する分析

オキシ型、デオキシ型、カルボニル型sHb溶液の耐熱性について、示差走査型熱量計(DSC8500, Perkin Elmer Inc.)を用いて分析した。Hb溶液(10g/dL, 60 μ L)をステンレス製微小カプセルに封入し(Large volume capsules, LVC, Perkin Elmer Inc.)、昇温時の水の蒸発の影響を最小限にした。30°Cか

ら120℃まで、昇温速度1.0℃/minでスキャンした。

4. sHb溶液およびsHbVの酸素平衡曲線の測定

sHbCO溶液を生理食塩水で希釈して2.5g/dLとし、酸素気流下、可視光照射してオキシ体に変換した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4, Gibco)または30 mMリン酸緩衝液(PB, pH7.4, Cl⁻イオンなし)に希釈して測定を行なった。PLP内包量の異なるsHbVについては、ヘモックス緩衝液に分散させた。ヘモックスアナライザー(TCS Scientific Corp)を用いて酸素平衡曲線を測定した。

5. sHbおよびsHbVの自動酸化速度の測定

sHbV およびsHbVをPBS(pH7.4)に分散させ、インキュベータに浸漬し37℃にて震盪した。sHb溶液のメト化率は、CN⁻の結合を原理とするEvenly-Malloy法により計測した。sHbVのメト化率の測定については、先ずThunburgキュベットにPBS 3 mLを入れ、検体を10 μL加えてから窒素バブルを行い、キュベット中の酸素を完全に排除し、デオキシ型とメトHbの二成分系とした。可視吸収スペクトルを測定し(V-650 積分球付き, JASCO)、メトHbに起因する405nmの吸光度と、デオキシHbに由来する430nmの吸光度の比から、メト化率を算出した。算出法は、従来法に従った。

上記すべての計測について、比較としてヒトヘモグロビン(_HHb)についても実施した。

C. 結果

1. sHbの精製とsHbVの調製

採血2週間以内のブタ血液からsHbの精製を行なった。比較的新鮮な血液からの精製であるので、溶血度が低く、結果として98%の収率で洗浄赤血球を得た。タンジェンシャルフロー限外濾過膜(1000kDa)によるストロマ除去も支障無く行なえた。一酸化炭素結合sHbの加熱処理(60℃, 15時間)のあと、変性不溶化した夾雑タンパク質を除去し、濁

りの無いsHbCO溶液が90%の収率で得られた。更にタンジェンシャルフロー限外濾過膜(8kDa)による脱塩、濃縮によって、42g/dLにまで濃縮した。これにPLPをPLP/sHb比0, 0.5, 1.0, 2.5となるように添加し、リン脂質小胞体に内包した。粒子径は250nm程度に調節され、またHb/Lipid重量比は1.0-1.1であった。

2. sHbの熱的安定性に関する評価

示差走査型熱量分析(DSC)の結果、sHbO₂, deoxy-sHb, sHbCOの変性温度はそれぞれ、71, 81, 83℃であった(Figure 1)。Deoxy-sHbについては、70℃付近に小さな熱吸収のピークが見られるが、これは微量のオキシ体が残存していたことに起因すると考えられた。sHbの変性温度は_HHbと同等であった(Table 1)。

Table 1. Thermal stability of swine Hb (_SHb) compared with those of human Hb (_HHb) and _BHb.

	Denaturation temperature (°C)			Reference
	HbO ₂	HbCO	deoxyHb	
_S Hb	71	83	81	This study
_H Hb	64	78	80	Sakai et al. 2002
_B Hb	70	87	83	Sakai et al. 2002

2. sHbおよびsHbVの酸素親和度の測定

全ての試料について、PLP/sHb比が増大するにつれて、P₅₀値は増大した。PBS中にあるCl⁻イオンが酸素親和度に影響する可能性が考えられたので、Cl⁻の無いPBに希釈した場合についても測定を行なった(Fig. 2)。しかし、Cl⁻の影響は殆どみられなかった。従って、Cl⁻は_HHbと同様、sHbに対しても影響しないことが解った。PBS, PBの両方においてsHbと_HHbには余り違いは見られなかったが、PLPを添加して小胞体に内包させると、sHbVがより大きなP₅₀値(低い酸素親和度)を示した。sHbのヒル計数は、PLP/_SHb値が増大するにつれ、2.5から2.0に低下した。しかしsHbVについては、PLP/_SHb値

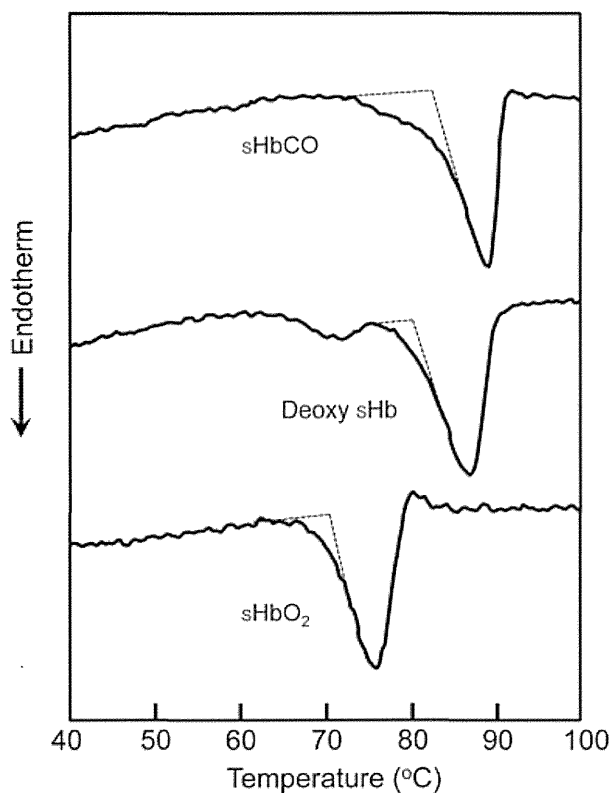


Figure 1. Calorimetric thermograms of sHbs in oxy, deoxy, and carbonyl forms. [Hb] = 10 g/dl, 60 μ l, scanning rate = 1.0 $^{\circ}$ C/min.

が増大するにつれ、1.4から1.9に増大した。

3. sHbおよびsHbVの自動酸化速度に関する検討

Figure 3にsHbO₂と_HHbO₂をPBSに分散させて37 $^{\circ}$ Cにインキュベートしたときの自動酸化によってメト化率が増大する様相を示した。metHb還元系が全く存在していない状況では、metHbは否応無く増大する。両者において特段の相違は認められなかった。

Figure 4にsHbVと_HHbVをPBSに分散させて37 $^{\circ}$ Cにインキュベートしたときのメト化率が増大する様相を示した。sHbVの方が_HHbVに比較して、あらゆるPLP/Hb比においてメト化が速いことが解った。

D. 考察

今回、初めてブタ由来ヘモグロビンを原料にHb小胞体を調製することを試みた。まずヘモグロビ

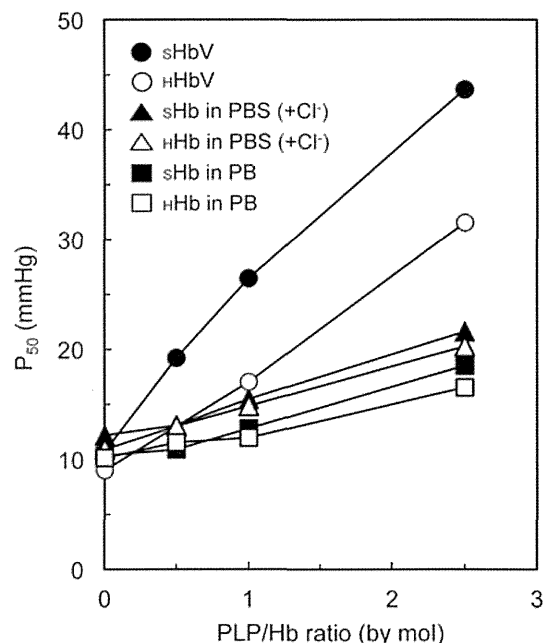


Figure 2. Oxygen affinities (P_{50} values) of sHb and _HHb samples containing different amounts of pyridoxal 5'-phosphate (PLP), obtained from oxygen equilibrium curves measured using a Hemox analyzer at 37 $^{\circ}$ C. Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and phosphate buffer (PB, pH 7.4) were used for dissolving Hb to confirm the effect of Cl⁻ anion. HbV is dispersed in hemox buffer.

ン精製工程については、ヒト由来赤血球から実施している精製方法がそのまま採用され、一酸化炭素の結合、加熱処理、限外濾過膜処理など全く問題なく処理することができた。新鮮血からの精製が可能なので、収率が高いことが利点となる。また、ヘモグロビンの内包についても特に支障となることは見出されなかった。物性値もヒト由来ヘモグロビンを用いている場合と同等であった。ただ、酸素親和度と自動酸化速度に差異が認められた。

カルボニル型、デオキシ型sHbともに、オキシ型に比較して変性点が高かった。これは以前に我々が確認したヒト由来ヘモグロビン、ウシ由来ヘモグロビンと同等の結果であった。オキシ型sHbは変性点が60 $^{\circ}$ C付近であるものの、これよりも低い温度でも自動酸化によってFigure 3に示した如くメト化が進行する。事実、metHbは非可逆的にグロビン鎖が次第に変性してしまう。カルボニル型、で

オキシ型のみがmetHb生成を抑制する事ができるのである。ここで示されたカルボニル型 $s\text{Hb}$ の熱的安定性から、 $s\text{Hb}$ は 60°C における加熱処理においても変性することなく、機能を保持できることを意味している。

$s\text{Hb}$ の酸素親和度について、PBS(Cl^- あり), PB(Cl^- なし)において差異は認められなかった。この傾向はヒト由来 $\text{Hb}(\text{H}\text{Hb})$ と一致するが、ウシ由来 $\text{Hb}(\text{B}\text{Hb})$ とは異なっている。文献によれば、 BHb は Cl^- の影響を強く受ける。哺乳類のヘモグロビンは大きく二つに(低酸素親和度 Hb と高酸素親和度 Hb)分類される。 HHb と $s\text{Hb}$ は高酸素親和度 Hb に分類され、 BHb は低酸素親和度 Hb に分類される。齧歯類、イヌ、ブタ、馬、ラクダ、有袋類、および殆どの霊長類が高酸素親和度 Hb であり、ウシ、ヒツジ、ヤギ、鹿、ネコ、霊長類の例外としてキツネザルが低酸素親和度 Hb に該当する。高酸素親和度 Hb を内包する赤血球では、解糖系で産生されるアロステリック因子2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG)により酸素親和度が適度に調節される。 $s\text{Hb}$ をもとに Hb 小胞体を調製する際は、2,3-DPGの代わりにPLPを添加している。小胞体に内包させる前は、PLP添加による酸素親和度の低下は $s\text{Hb}$ と HHb では同等であった。小胞体化した場合、 $s\text{HbV}$ は HHbV と

同様に酸素親和度が低下(P_{50} 値が上昇)する。しかし、 $s\text{HbV}$ の方が HHbV に比較して酸素親和度が低い(P_{50} 値が高い)傾向を示した。従って、小胞体内の濃度が極めて高い状況においては、 $s\text{Hb}$ はより強くPLPと結合している可能性が示唆された。

文献によれば、低温において $s\text{Hb}$ は HHb に比較して酸素親和度が低い(P_{50} 値が大きい)ことが知られており、また $s\text{Hb}$ は温度変化の影響を受け難いことが報告されている。このことは、ブタが元来低温に対して耐性があることと関連があるかもしれない。 $s\text{HbV}$ は低体温における利用に有効である可能性がある。

精製 $s\text{HbO}_2$ と HHbO_2 の自動酸化速度は同等であったが、小胞体に内包させると、 $s\text{HbO}_2$ の方が明らかに自動酸化が速くなった。この理由については不明である。両者のグロビン鎖の構造は殆ど同じであるが、相違点としては、(i) β サブユニットのHelix Aのシフト、(ii) β サブユニットのアミノ基末端Helix B、またカルボニル基末端Helix Eのヘリックスが一部コイルを巻いていないこと、(iii) α -ヘリックスを繋げているループの位置が若干異なることなどが挙げられる。これらの僅かな違いが、自動酸化速度の違いに(特に小胞体に内包された濃厚系において)影響している可能性はある。自動酸化を

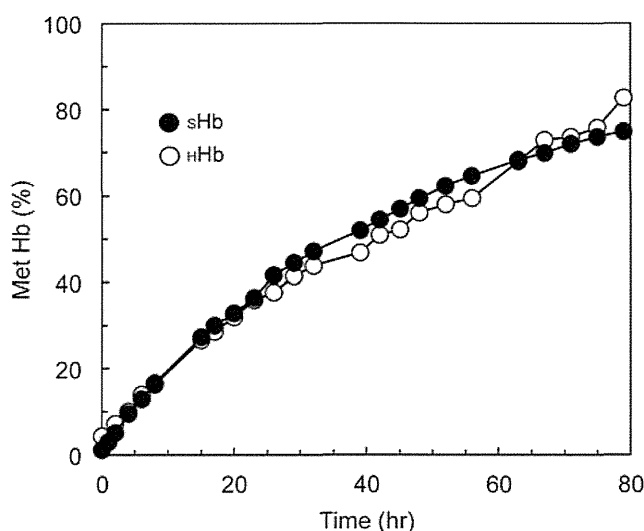


Figure 3. Autoxidation of $s\text{HbO}_2$ in pH 7.4 PBS compared with that of HHbO_2 in aerobic conditions at 37°C .

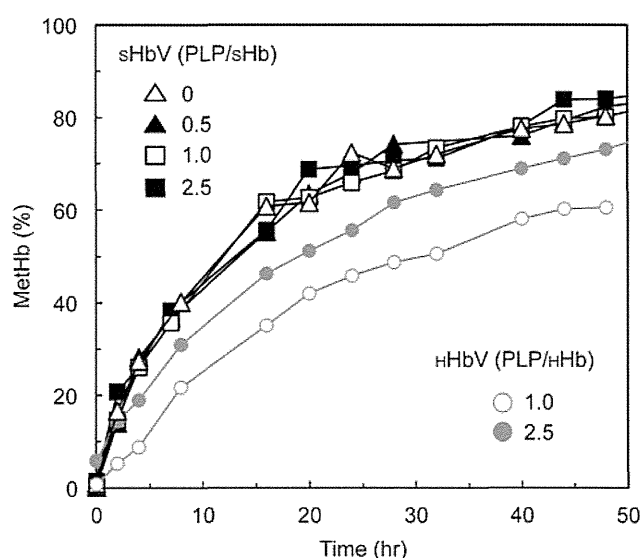


Figure 4. Autoxidation of $s\text{HbV}$ in pH 7.4 PBS in comparison with HHbV in aerobic conditions at 37°C .