トロンボモデュリン アルファの輸液セットへの吸着性の検討

山本豊彦¹, 菅田俊穂¹, 辻田隆一^{*2}旭化成ファーマ株式会社 医薬研究センター 物性研究部¹,旭化成ファーマ株式会社 医薬営業本部 ARTプロジェクト²

Adsorption of Thrombomodulin alfa with Various Intravenous Sets

Toyohiko Yamamoto¹, Toshio Sugata¹ and Ryuichi Tsujita^{*2}Laboratory for Analytical Research, Pharmaceuticals Research Center, Asahi Kasei Pharma Corporation¹,ART Project, Pharmaceuticals Sales Division, Asahi Kasei Pharma Corporation²[Received May 25, 2011
Accepted August 1, 2011]

Recomodulin® Inj. 12800 is an injectable form of thrombomodulin alfa, the extracellular domain of human thrombomodulin that includes the active site. It is produced as a soluble molecule in CHO cells by recombinant techniques. Thrombomodulin alfa is a novel therapeutic for disseminated intravascular coagulation (DIC) with a mechanism of action completely unlike those of existing drugs. It is conveniently administered by intravenous infusion for 30 min once daily via a peripheral vein.

However, since adsorption on to lines and filters of infusion sets and other medical equipment is a problem with protein formulations such as insulin and G-CSF, we performed adsorption testing on 12 commonly used commercial infusion sets with the aim of assessing the adsorption of thrombomodulin alfa in such sets. The lines of the infusion sets were made of 2 different materials, polyvinyl chloride and polybutadiene, and filters of 3 different materials, polyethersulfone, polysulfone and nylon 66.

The recovery rates of thrombomodulin alfa from the infusion sets were 92–107%. Such very low levels of adsorption indicate that thrombomodulin alfa can be administered without concern over adsorption-related decreases in the amount of drug delivered.

Key words — adsorption, filters, infusion sets, recomodulin, thrombomodulin alfa, DIC

緒言

トロンボモジュリンは血管内皮細胞上に存在する糖タンパク質で、生体内の血液凝固調節を担う生理的な抗凝固因子である。「リコモジュリン®点滴静注用 12800」(旭化成ファーマ(株))は、ヒトトロンボモジュリンの活性部位を含む細胞外ドメインのみを可溶性分子として、遺伝子工学的に動物細胞で産生させたトロンボモデュリン アルファ (thrombomodulin alfa) を成分とする注射剤である。トロンボモデュリン アルファは、凝固系の亢進に伴い過剰に産生されたトロンビンと可逆的に結合することによりトロンビンの基質特異性を変換し、プロテインCから活性化プロテインC (APC) を生成する。このAPCが凝固因子の活性化第Ⅴ因子と活性化第Ⅷ因子を阻害することにより抗凝固活性を示すことから、トロンボモデュリン アルファは既存薬と全く作用機序の異なる新しい汎発

性血管内血液凝固症 (Disseminated intravascular coagulation; DIC) 治療薬である¹⁾。本剤は、未分画ヘパリンを対照とした第Ⅲ相臨床試験において、有効面で優越性が初めて示された製剤であり²⁾、さらに出血等の安全面においても未分画ヘパリンに対し優越性が示されたことから、2008年1月「リコモジュリン®点滴静注用 12800」として、わが国で承認され同5月より発売された。従来のDIC治療薬の多くは24時間点滴静注が必要でありラインの占有を余儀なくされているのに対し、トロンボモデュリン アルファの投与は末梢ラインから1日1回30分の点滴静注であり、ラインの占有時間が短く簡便である。また、既存薬と作用機序が異なり、出血傾向も少ない薬剤である。

注射薬の問題点の一つとして、薬剤の医薬器具への吸着が知られている。例えば、ペプチドであるインスリン製剤やポリペプチドである顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor; G-CSF) 製剤は、輸

* 東京都千代田区神田神保町1-105

表 1. 輸液セット一覧

メーカー・販売名	型式	フィルター材質	孔径	ろ過面積	ライン材質	全長	販売または製造販売
ニプロフィルターセット (I-system) 輸液セットタイプ	FI-02ZYGN	ポリエーテルスルホン	0.2 μ m	10cm ²	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	2.24m	ニプロ株式会社
	FIB-02ZYGN	ポリエーテルスルホン	0.2 μ m	10cm ²	ポリブタジエン (PVC フリー)	2.24m	
ニプロフィルターセット F FG-120 シリーズ	FG-120BT-B	ポリエーテルスルホン	1.2 μ m	10cm ²	ポリブタジエン (PVC フリー)	2.0m	
ニプロフィルターセット	FG-20BY	ポリエーテルスルホン	0.2 μ m	10cm ²	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	1.9m	
ニプロ輸液セット	IPN-201E00	—	—	—	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	1.4m	
テルフュージョン 輸液セット	TI-J352P	ポリスルホン	0.2 μ m	9cm ²	ポリブタジエン (PVC フリー)	2.35m	テルモ株式会社
テルフュージョンポンプ用 輸液セット	TI-PJ352P	ポリスルホン	0.2 μ m	9cm ²	ポリブタジエン (PVC フリー)	2.0m	
	TI-PJ300L	—	—	—	ポリブタジエン (PVC フリー)	2.0m	
ファイナルフィルターセット	FN-2N	ポリエーテルスルホン	0.2 μ m	10cm ²	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	2.4m	川澄化学工業株式会社
ボール輸液フィルター E L D	ELD SF-T20	ナイロン 66 (ボジダイン)	0.2 μ m	11.25cm ²	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	2.40m	日本ボール株式会社
J M S 輸液セット	JY-PFC341F7	ポリエーテルスルホン	0.2 μ m	18cm ²	ポリブタジエン (PVC フリー)	2.2m	株式会社ジェイ・エム・エス
輸液セット T I 型	TI-2C1505	ポリエーテルスルホン	0.22 μ m	10cm ²	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	2.3m	東レ・メディカル株式会社

TOTM : トリメリット酸トリ-2-エチルヘキシル, PVC : ポリ塩化ビニル

液ラインやフィルター等の医療器具に吸着することが報告されており³⁻⁶⁾, 体内に到達する薬物量が減少するため期待された効果が得られない等, 治療上影響を受ける可能性がある。

タンパク質等が吸着する現象には, タンパク質分子と界面との疎水性相互作用および静電的相互作用の関与が広く知られており⁷⁻⁹⁾, タンパク質であるトロンボモデュリン アルファも他製剤と同様に医療器具への吸着を検討する必要がある。今回著者らは, 汎用される市販の輸液セットまたはフィルターセット(以下, 輸液セットと略す)に対するトロンボモデュリン アルファの吸着試験を実施し, 知見を得たので報告する。

方 法

1. 試薬および実験材料

トロンボモデュリン アルファとして, 「リコモジュリン®点滴静注用 12800」を用いた。APC アッセイの試薬として, ヒトプロテイン C は, Human Protein C (Enzyme Research Laboratories, Cat No. HPC 1001) を用いた。ヒトトロンビンは, Thrombin, Human Plasma, High Activity (Calbiochem® Merck KGaA, Cat No.605195) を用いた。ヒトアンチトロンビン III は, ノイアート®(500 単位/vial, 田辺三菱製薬(株))を用いた。ヘパリンナトリウムは, 日局ヘパリンナトリウム(1,000 単位/mL, 持田製薬(株))を用いた。Tween®20 は, Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (ナカライテスク(株), Cat No.35624-02)を用いた。合成基質(吸光基質)は, S-2366 (Glu-Pro-Arg-p-NA)(Chromogenix

Instrumentation Laboratory SpA)を用いた。その他試薬は, 試薬特級または同等品を用いた。吸光度測定には, バイオスベック 1600((株)島津製作所)を用いた。

「リコモジュリン®点滴静注用 12800」の調製には, 大塚生食注(大塚製薬工場(株))およびテルモ生食(テルモ(株), Cat No.TP-A01NS30)を用いた。送液実験に使用する輸液セットは, 表 1 に示す 12 種類を選択した。

2. 送液実験

1) フィルターの有無による吸着検討

輸液ラインが同材質であり, フィルターの有無による 2 種類の輸液セット, ニプロフィルターセット (FG-20 BY), ニプロ輸液セット (IPN-201E00)(ニプロ(株))およびテルフュージョンポンプ用輸液セット (TI-PJ352P, TI-PJ300L)(テルモ(株))を用いてフィルターへの吸着検討を行った。「リコモジュリン®点滴静注用 12800」1 バイアルに大塚生食注 2 mL を加え溶解し, 全量をテルモ生食 100 mL に添加し投与液とした。各輸液セットに投与液をセットし, 100 mL/30 分の流速にて送液を行い, 20 mL ずつ投与液をポリプロピレン製容器に採取した。採取した投与液を APC アッセイ (Activated Protein C Assay)¹⁰⁾にて濃度を測定し, 投与液濃度からの回収率を算出した。検討方法を図 1 に示した。

2) 各種輸液セットの検討

国内で販売されている各種輸液セットについて, 「リコモジュリン®点滴静注用 12800」1 バイアルに大塚生食注 2 mL を入れ溶解し, 用法に従いテルモ生食 100 mL に添加し投与液とした。各輸液セットに投与液をセットし, 100

図1. 送液実験の方法

mL/30分の流速にて送液を行い、投与液をポリプロピレン製容器に全量採取した。採取した投与液をAPCアッセイにて含量を測定し、投与液含量からの回収率を算出した。検討方法を図1に示した。

3. 吸着の評価

投与液とポリプロピレン製容器で採取した投与液を試料とし、APCアッセイでトロンボモデュリン アルファ量を測定し、投与液からの回収率にて評価を行った。測定方法の原理は図2に示した。本方法は生体での抗凝固作用の一部を *in vitro* にて再現させた方法であり、トロンボモデュリン アルファとトロンビンとを反応させた後にプロ

テインCを活性化させ、合成基質の切断反応にて生じた *p*-NA(パラニトロアニリン)を比色定量することによりトロンボモデュリン アルファの活性を測定するものである。詳細な方法を以下に示す。

各試料に0.05 w/v% ポリソルベート 20 溶液を加え1 mL中に2~4 Uのトロンボモデュリン アルファを含むように調製し、試料溶液とした。力価測定用常用標準物質トロンボモデュリン アルファに0.05 w/v% ポリソルベート 20 溶液を加え1 mL中に5, 4, 3, 2, 1および0 Uのトロンボモデュリン アルファを含むように調製し、標準溶液とした。標準溶液または試料溶液に20 mmol/L 塩化カルシウム溶液およびトロンビン溶液を加えて、トロンボモデュリン アルファとトロンビンを反応させた。さらにプロテインC溶液を加えトロンボモデュリン アルファ/トロンビン複合体によるプロテインCの活性化反応を開始させた。この酵素反応は、ヘパリン-AT III (HP-AT III) 溶液を加えることで停止させた。反応停止後にセリンプロテアーゼである活性化プロテインCの基質であるS-2366 溶液を加え、トロンボモデュリン アルファとトロンビンの複合体により産生された活性化プロテインCで基質を切断させ、パラニトロアニリンを産生させた。最後に精製水で2倍希釈した水酢酸により活性化プロテインCの酵素反応を停止させた。標準溶液および試料溶液は水を対照として405 nmにおける吸光度を測定した。標準溶液による検量線から、試料溶液1 mL中の力価(U/mL)を求め、希釈倍率および各試料の総液量を乗じ含量を求めた。回収率は投与液の濃度または含量を100%として算出した。

結 果

図3にフィルターの有無による吸着検討結果を示した。ニプロフィルターセット (FG-20BY), ニプロ輸液セット (IPN-201E00) および、テルフュージョンポンプ用輸液セット (TI-PJ352P, TI-PJ300L) を用いてフィルター有無に

図2. APCアッセイの原理

図3. フィルターの有無および回収率の推移

表2. 各輸液セットにおけるトロンボモデュリン アルファの回収率

メーカー・販売名	型式	ライン材質	フィルター材質	回収率
ニプロフィルターセット (I-system) 輸液セットタイプ	FI-02ZYGN	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	ポリエーテルスルホン	102%
	FIB-02ZYGN	ポリブタジエン (PVC フリー)	ポリエーテルスルホン	106%
ニプロフィルターセット F FG-120 シリーズ	FG-120BT-B	ポリブタジエン (PVC フリー)	ポリエーテルスルホン	107%
ニプロフィルターセット	FG-20BY	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	ポリエーテルスルホン	101%
ニプロ輸液セット	IPN-201E00	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	—	100%
テルフュージョン 輸液セット	TI-J352P	ポリブタジエン (PVC フリー)	ポリスルホン	107%
テルフュージョンポンプ用 輸液セット	TI-PJ352P	ポリブタジエン (PVC フリー)	ポリスルホン	103%
	TI-PJ300L	ポリブタジエン (PVC フリー)	—	103%
ファイナルフィルターセット	FN-2N	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	ポリエーテルスルホン	105%
ボール輸液フィルター E L D	ELD SF-T20	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	ナイロン 66 (ポジダイン)	92%
JMS 輸液セット	JY-PFC341F7	ポリブタジエン (PVC フリー)	ポリエーテルスルホン	104%
輸液セット T I 型	TI-2C1505	ポリ塩化ビニル (可塑剤 TOTM 使用)	ポリエーテルスルホン	107%

による吸着検討を行った。20 mL ずつ分液 (Fr.6 は 7 mL) し採取液濃度を求め、投与液濃度に対する採取液濃度回収率を算出した結果、96~107% であり顕著な吸着は認められなかった。ニプロ株式会社製およびテルモ株式会社製輸液セットはフィルターの有無による回収率の低下や初期通過液での回収率低下を認めなかった。

表2に各輸液セットの検討結果を示した。トロンボモデュリン アルファの投与液を約30分かけて各輸液セットへ送液した結果、回収率は92~107% であり、顕著な吸着は認められなかった。市販の輸液セットのラインの

材質は、ポリ塩化ビニル、ポリブタジエンであるが、両素材の回収率に差はなく顕著な吸着は認められなかった。

フィルターの材質は、ポリエーテルスルホン、ポリスルホンが製品の大半を占めているが、わずかにエンドキシン除去目的で使用されるナイロン 66 (ポジダイン) を加えた3種類がある。検討した輸液セットへの顕著な吸着は認められなかったものの、フィルター素材にナイロン 66 (ポジダイン) を使用した輸液セットに8% 程度の回収率の低下が認められた。

考 察

タンパク製剤やポリペプチド・ペプチド製剤の輸液ラインやフィルターへの吸着を調べた試験はこれまでに多くの報告がある^{3-6,11)}。吸着のメカニズムは、疎水性相互作用、静電的相互作用等が考えられるが⁷⁻⁹⁾、その詳細については不明な点が多い。投与液濃度の低いタンパク製剤やポリペプチド・ペプチド製剤が輸液ラインまたはフィルター等に吸着する場合には薬剤量の減少等、治療効果に影響を与える可能性がある。そのため1979年に米国で発行されたNCCLVP基準では、「投与量が5 μ g/mL以下、あるいは24時間の総投与量が5mg以下の場合には、吸着・吸収の問題が解決するまではインラインフィルターを使用すべきではない」と、その考え方の指針を極めて端的に表している¹²⁾。実際にG-CSF製剤を生理食塩液にて1.5 μ g/mLの濃度で輸液ラインおよびフィルターに通した場合、回収率が低値を示すとの報告もある^{9,13)}。インスリン製剤では輸液ラインおよびフィルターへの初期通過液の回収率が低値を示し、アルブミン製剤、脂溶性ビタミン剤、または界面活性剤入りの輸液への添加により吸着防止効果があるとされている⁵⁾。一般的にタンパク製剤やポリペプチド・ペプチド製剤の医療機器や器具への吸着は治療効果のみの影響に留まらず、吸着防止に要する医療現場での利便性の低下や経済性に大きな問題を与えると推察される。

2008年5月にわが国において、汎発性血管内血液凝固症の治療薬である「リコモジュリン[®]点滴静注用12800」が発売された。トロンボモデュリン アルファもタンパク製剤であり、輸液セットへの吸着がある場合、治療効果に影響を与える可能性がある。そこで本検討では、トロンボモデュリン アルファを臨床で用いられる用法・用量を考慮し、12800単位/100mL(約20 μ g/mL)の濃度で約30分かけ送液し、輸液セットへの吸着を検討した。

その結果、トロンボモデュリン アルファはポリ塩化ビニルおよびポリブタジエン製の輸液ライン、ポリスルホンまたはポリエーテルスルホン製のフィルターに対して初期通過薬液での吸着も確認されなかった。インスリン製剤では吸着がある場合、初期通過投与液での濃度低下が激しく、徐々に吸着面が飽和するに従って濃度が回復して行く現象が確認されている⁵⁾。トロンボモデュリン アルファではこのような現象も確認されず、初期通過投与液から投与液の終了時まで一定の濃度を保っていることが明らかとなった。また、トロンボモデュリン アルファの市販輸液セットからの回収率は92~107%であり、顕著な吸着を認めなかった。わが国で使用されている輸液セットのラインの素材は、ポリ塩化ビニルとポリブタジエンの2種類であるが、市場でもこの2種類の使用頻度が高い。今回の検討では4社のポリ塩化ビニルと3社のポリブタジエン製のラインを用い吸着試験を行ったが、いずれの製品を用いても吸着の指標であるトロンボモデ

ュリン アルファ含量の低下は認められなかった。吸着現象にはタンパク質分子と界面との疎水性相互作用が大きく関与していることが知られており、フィルター材質の疎水性部分とタンパク質の疎水性部分が相互作用して吸着を起こすと考えられている⁹⁾。トロンボモデュリン アルファはヒトトロンボモジュリンの活性部位を含む細胞外ドメインのみを可溶性分子として、遺伝子工学的に動物細胞で産生させたものであり、糖鎖を有しており極性が高い。そのため、輸液ラインやフィルター材質の疎水性部分と相互作用が低く、吸着をおこし難かったと推察された。

フィルターはポリエーテルスルホン、ポリスルホンが市場の大半を占めているものの、わずかにエンドトキシン除去の目的でナイロン66(ポジダイン)が使用されている。今回、同一素材でもメーカーによる吸着の差を考慮し、3社のポリスルホン製品、4社のポリエーテルスルホン製品およびポール社のナイロン66(ポジダイン)に対する吸着を調べた。すべての製品で顕著な吸着は認められなかったものの、わずかにナイロン66(ポジダイン)の回収率の低下が認められた。

ナイロン66(ポジダイン)はパイロジェン除去を目的にプラスの静電位荷電を帯びた膜であり、酸性糖を多くもつトロンボモデュリン アルファは通常液中でマイナスの静電位荷電を帯びていると考えられる。検討したナイロン66(ポジダイン)は1種類のみではあるが、他の輸液セットと比べわずかに回収率が低下しているのは、この静電位的な吸着現象が影響している可能性が推察された。ナイロン66(ポジダイン)はG-CSF製剤では30%以上の吸着現象があることが報告されている⁹⁾。一方、トロンボモデュリン アルファの回収率の低下は8%程度であり、薬効に大きな影響を与えるべきレベルではないと考えられた。

今回検討した12種類の輸液セットは、国内の代表的な製品が使用している材質に注目して選定した。その結果、トロンボモデュリン アルファは材質やメーカーを問わず高回収率であったことから、既存の輸液セットに対する吸着の影響が極めて低いと推察された。しかしながら、医療器具の進歩は目覚しく、新たな機能をもった製品や材質が生まれる可能性がある。輸液セットの開発状況に目を向け、トロンボモデュリン アルファの吸着試験の情報蓄積に努めることが必要と考えられた。

引用文献

- 1) 鈴木宏治, 血液製剤輸血の適応と使用法 3. トロンボモジュリン製剤: リコモジュリン, 血栓止血学会誌, **20**, 9-11 (2009).
- 2) H. Saito, I. Maruyama, S. Shimazaki, Y. Yamamoto, N. Aikawa, R. Ohno, A. Hirayama, T. Masuda, H. Asakura, M. Nakashima, N. Aoki, Efficacy and safety of recombinant

- human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized double-blind clinical trial, *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 31–41 (2006).
- 3) 倉本加代, 青木隆夫, 中島克佳, 中村幸一, 小滝一, 伊賀立二, 顆粒球コロニー刺激因子(ナルトグラスチム)の輸液容器への吸着とその防止法の検討, *病院薬学*, **23**, 491–496 (1997).
 - 4) 倉本加代, 青木隆夫, 杉浦宗敏, 清野敏一, 山田安彦, 伊賀立二, G-CSF 製剤(ナルトグラスチム)の持続注入時におけるシリンジへの吸着とその対策, *医療薬学*, **29**, 691–697 (2003).
 - 5) 丹下マリ子, 柴部敏, 近藤俊夫, 尾山秀樹, インスリンの輸液容器等への吸着, *医薬ジャーナル*, **31**, 392–397 (1995).
 - 6) 村岡勲, 松田いずみ, 長谷川雅哉, 山本雅人, 笠野俊彦, 中村敏明, 長谷川高明, 鍋島俊隆, 注射剤中各種薬物の輸液用器材への吸着, *医薬ジャーナル*, **32**, 217–231 (1996).
 - 7) S.H. Mollmann, J.L. Bukrinsky, S. Frokjaer, U. Elofsson, Adsorption of human insulin and AspB28 insulin on a PTFE-like surface, *J. Colloid Interface Sci.*, **286**, 28–35 (2005).
 - 8) D.L. Butler, J.M. Munson, P.P. DeLuca, Effect of inline filtration on the potency of low-dose drugs, *Am. J. Hosp. Pharm.*, **37**, 935–941 (1980).
 - 9) 松原肇, 矢後和夫, 輸液フィルターへの薬剤吸着, *静脈経腸栄養*, **24**, 1169–1174 (2009).
 - 10) S. Niimi, T. Oshizawa, M. Naotsuka, S. Ohba, A. Yokozawa, T. Murata, T. Hayakawa, Establishment of a Standard assay method for human thrombomodulin and determination of the activity of the Japanese reference standard, *Biologicals.*, **30**, 69–76 (2002).
 - 11) 石川朋樹, 杉山恵理花, 佐藤均, 注射薬混合時に用いる各種シリンジフィルターへの薬物吸着に関する検討, *医療薬学*, **35**, 189–194 (2009).
 - 12) K. N. Baker, Recommendation for action on an important problem regarding large volume parenterals. National coordinating committee on large volume parenterals.(NCCLVP) Nov.30 (1979)
 - 13) 矢後和夫, 松原肇, 尾島勝也, 佐久間正彦, 島田慈彦, rhG-CSF製剤の各種輸液フィルターに対する吸着性(第2報), *病院薬学*, **24**, 697–703 (1998).