

図5 リボフラビン-UV処理による白血球増殖抑制の確認

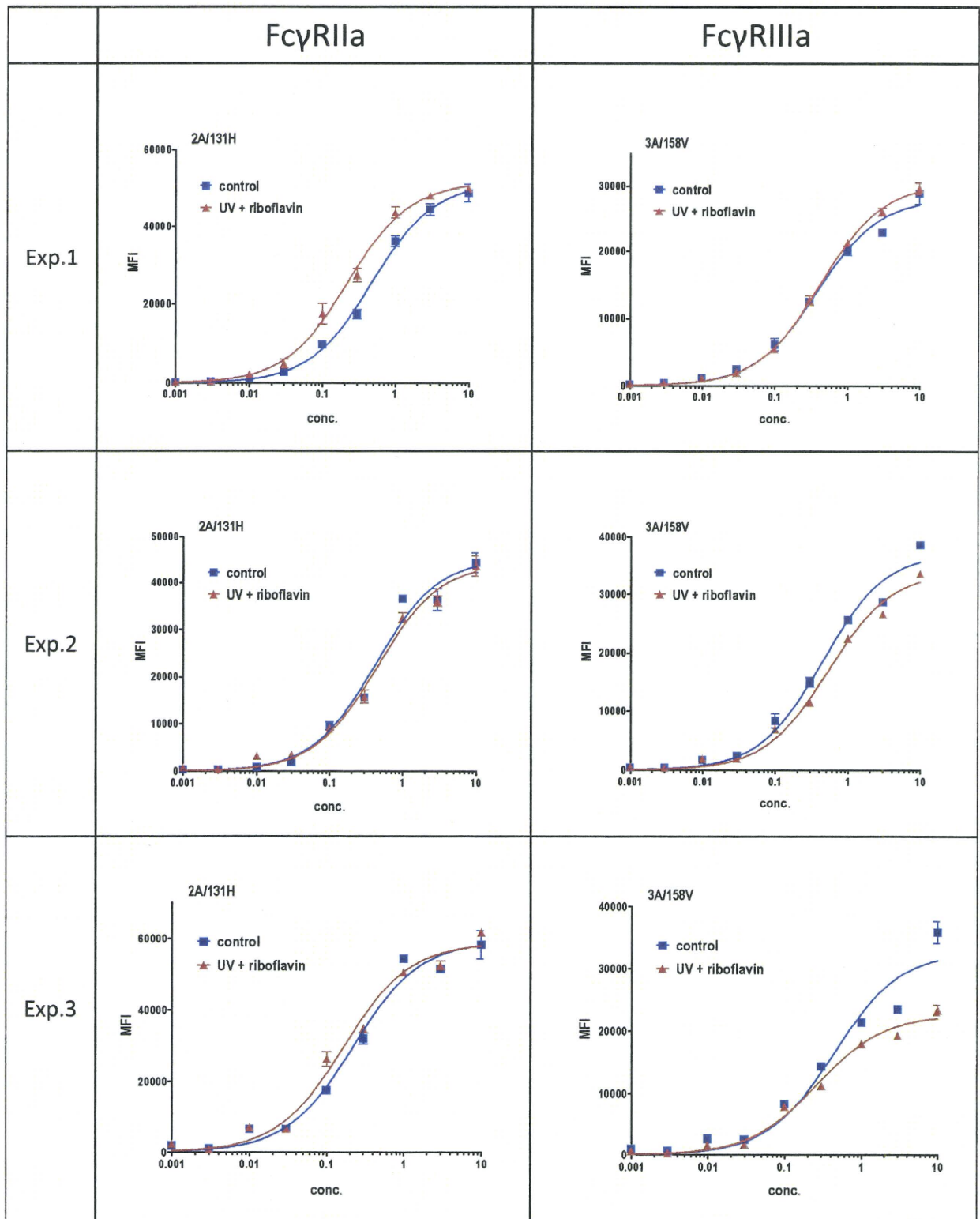


図6 IgGのFcγ受容体結合に対するリボフラビン・UV処理の影響

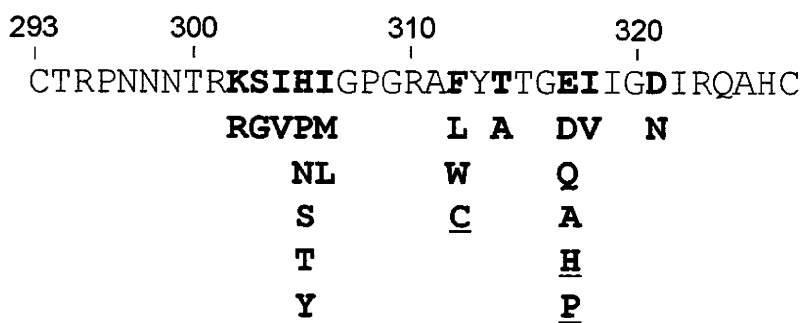


図7 ヒトレトロウイルスエンベロープタンパク質のV3部分に polymorphic なアミノ酸置換を導入し、V3に関するウイルスライブラリーを作製した。この領域は、標的細胞への侵入時にコレセプターと相互作用する。

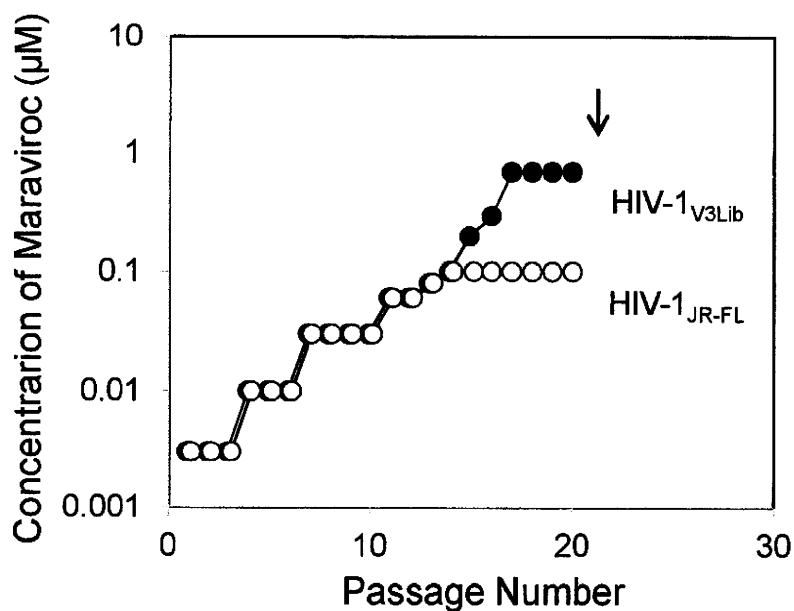


図8 ここでは選択圧として薬剤を使い、特異的なV3構造をもつウイルスが選ばれてくるかどうかを調べた。野生株に比べて、ライブラリーウイルスからは、薬剤に強い抵抗性をもつウイルスが、選択されてくることわかる。

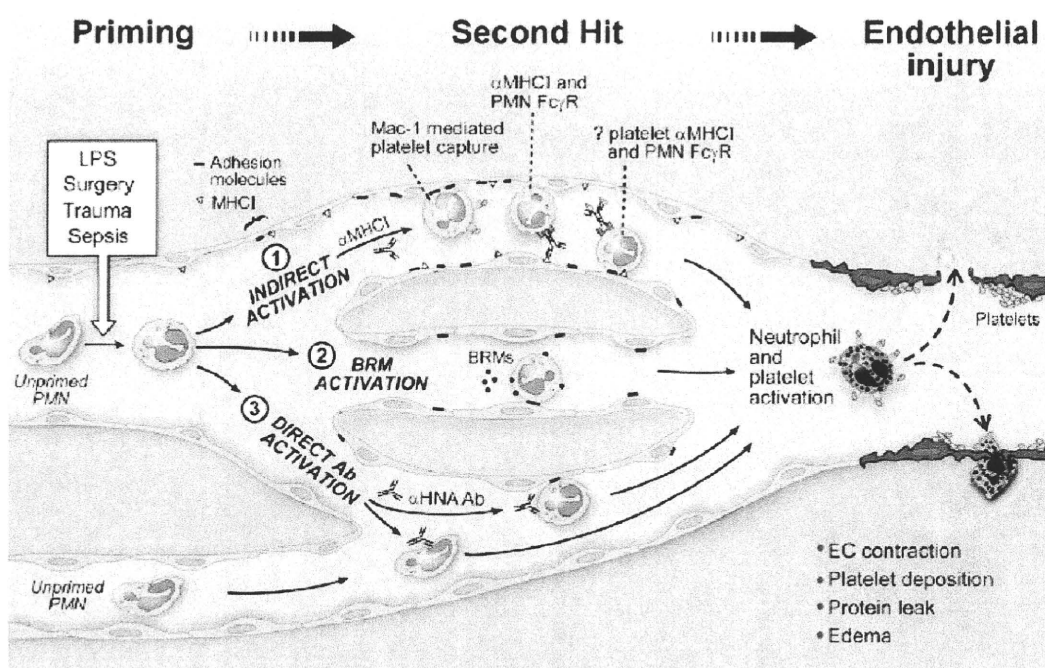


図9 TRALI 発症機構に関する仮説

(Gilliss BM and Looney MR Transfusion Med. Rev. 25, 1, 2011)

表3 選択されたウイルスの薬剤感受性を調べると抵抗性を示した。

	EC ₅₀ ^a (μM)	
	maraviroc ^b	TAK-779 ^b
HIV-1 _{JR-FL}	0.0069 ± 0.0019 ^c (1.0)	0.043 ± 0.009 (1)
HIV-1 _{JR-FL-p17}	0.055 ± 0.0055 (8)	0.15 ± 0.033 (3.5)
HIV-1 _{V3Lib}	0.0055 ± 0.0007 (0.8)	0.025 ± 0.007 (0.6)
HIV-1 _{V3Lib-p17}	> 10 (> 1449)	> 10 (> 233)

^a PM1/CCR5 cells were infected at 100 TCID₅₀ in the presence of the CCR5 inhibitor on day 0. Cytopathic effect was determined on day 6 by the MTT method.

^b Drug concentrations of 50% growth inhibition of the cells (CC₅₀) was > 10 μM.

^c mean ± SD (n = 3).

ウイルス不活化技術の有効成分への影響評価に関する研究

研究分担者 川崎 ナナ

協力研究者 原園 景

研究要旨 光化学反応を利用した新規ウイルス不活化法が血漿製剤の血液凝固因子活性の低下を引き起こすことが知られている。本研究の目的は、血液凝固第八因子を用いて、ウイルス不活化法がタンパク質の一次構造や翻訳後修飾に与える影響を明らかにすることである。前年度に引き続き、LC/MS を用いて遺伝子組換え血液凝固第八因子のペプチドマッピングを行い、19 カ所分の *N* 結合型糖鎖及び 22 カ所分の *O* 結合型糖鎖付加したペプチドを含め、約 85% のアミノ酸配列を確認した。次に、モデルペプチドを用いて、メチレンブルー/光照射及びリボフラビン/照射を行ったところ、認められた主な影響は、酸化体の形成であった。

A. 研究目的

ウイルススクリーニングとして問診や血清学的検査に加えて核酸増幅検査が実施されるようになり、血液製剤のウイルスに対する危険性は、飛躍的に減少した。しかし、スクリーニング法の確立していないウイルスや未知の病原体に対する危険性には対応できないことから、様々な病原体不活化法が研究されてきた。血液製剤には大きく分けて、血漿分画製剤並びに輸血用血液製剤（全血製剤、赤血球製剤、血小板製剤及び血漿製剤）があるが、全ての製剤に適用可能な不活化技術は未だ確立されていない。血漿分画製剤においては、加熱処理、ソルベント/デタージェント（S/D）処理、ウイルス除去膜処理、及び各種分離精製処理等が開発されており、これらのいくつかの方法が組み合わされて用いられている。輸血用血液製剤においては、血小板製剤に対するソラレン/紫外線照射並びにリボフラビン/紫外線照射、また、血漿製剤に対する S/D 処理、ソラレン/紫外線照射並びにメチレンブルー/光照射が開発されている。欧州ではこれらの方法がすでに実用化されているが、その導入は限定的である。また、米国では、現在の不活化技術が全ての感染源を不活化できるわけではないことから、承認されているものの不活化

技術の導入は行われていない。我が国では、ソラレン、メチレンブルー及びリボフラビン等の光増感剤及び光照射を用いたウイルス不活化法の導入の検討がなされているが、不活化処理に伴う製剤の有効成分への影響や不活化に伴う有害事象の発症についての懸念からまだ取り入れられていない。血液製剤の有効性/安全性確保のためには、ウイルス不活化技術の有効成分等への影響を評価する手法の開発が急務である。

光化学反応を利用したウイルス不活化の機序として、光照射による増感剤の活性化、もしくはそれによって生じた活性酸素による核酸等の傷害が考えられている。これらの操作は、タンパク質に対しても、切断、酸化、カルボニル化等の修飾を引き起こす可能性があると推測される。実際、これらの光増感剤及び光照射処理により、様々な血液凝固因子の活性が 15% 前後低下することが報告されている。このような活性の低下は、操作に伴って高次構造が変化したことによるのか、または、タンパク質や糖鎖部分に何らかの修飾が生じたことによるのかを明らかにする必要がある。

本研究の目的は、光化学反応を利用したウイルス不活化操作により、タンパク質がどのような修飾を

受けるのかを明らかにすることである。本研究では、モデル血漿タンパク質として血液凝固第八因子 (FVIII) を選択し、LC/MS/MS を用いたペプチドマッピングにより、光化学反応前後のアミノ酸配列、糖鎖構造並びにその他の翻訳後修飾を比較する。未照射の遺伝子組換え FVIII のペプチドマッピングを行い、ピークの帰属と糖鎖構造の確認を行ってきた。前年度においてはペプチドマップのカバー率が約 70%程度であったことから、更に多くの配列を確認し、O 結合型糖鎖結合状況を明らかにするため検討を行った。次に、メチレンブルー/光照射及びリボフラビン/紫外線照射により引き起こされるタンパク質の変化を明らかにすることを目的に、モデルペプチドの処理を行い、引き起こされた変化の確認を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

組換えヒト FVIII は、コージネイト FS (バイエル薬品社) を使用した。修飾トリプシンはプロメガ社より、 α 2-3, 6, 8, 9 ノイラミニダーゼ、 β 1-4 ガラクトシダーゼはシグマアルドリッチ社より、PNGaseA はロッッシュ社より購入した。その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

2. 還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化

コージネイト FS は、PD10 カラム (GE ヘルスケア) で脱塩し、凍結乾燥した。水に溶解後、アセトン沈殿により界面活性剤を除去した。8 M 塩酸グアニジン、5 mM EDTA 及び 500 mM Tris を含む pH 8.5 の緩衝液 100 μ L に溶解し、1 M DTT を 4 μ L 加え、37°C、1 時間反応させ、その後、1 M ヨード酢酸ナトリウム 9.6 μ L を加え、45 分間、室温で反応させた。PD10 カラムで脱塩、凍結乾燥後、修飾トリプシンにて消化を行った。

3. PNGase A 及びエキソグリコシダーゼ消化

トリプシン消化物を 100°C、5 分加熱した後、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、37°C、12 時間 PNGase A 消化及び/もしくはノイラミニダーゼ及

びガラクトシダーゼ消化を行った。

4. LC MS

LC 装置には、Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社) を、カラムには、MonoCap 0.1 X 250 mm (ジューエルサイエンス) を用いた。溶離液には、0.1% ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液 (A) 及び 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液 (B) を用いた。試料は、0.5 μ L/min で 5 分間に 5% B で流した後、40 分かけて 25% B へ、その後 25 分かけて 45% B となるように溶離液 B の濃度を上昇させ溶出した。質量分析装置には Qstar Elite (Applied Biosystem 社) を用いた。ポジティブイオンモードで、ion spray voltage は 3000~3600 V に設定した。MS の測定範囲を m/z 300-2100, 400-2100, 800-2100, 又は 1000-2100 に、MS/MS の測定範囲を m/z 100-2100 に設定した。

6. データベース検索

LC/MS/MS により得られた MS データを、マスコット検索エンジンを用いて、ヒト SwissProt データベース (ver. 51.3) に対して検索し、ペプチドを帰属した。MS の許容範囲を 1.2 Da、MS/MS の許容範囲を 0.6 Da に設定した。アミノ酸の可変修飾として、メチオニンの酸化 (+16.00)、チロシンの硫酸化 (+79.96) を設定した。シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ消化物の MS データの検索の際には、セリン及びスレオニン残基に可変修飾として *N*-アセチルヘキソサミン付加 (+203.08) を設定した。 β 脱離及びマイケル付加した試料の MS データの検索の際には、セリン及びスレオニン残基に可変修飾として脱水 (-18.01) と 2-メルカプトエタノール付加 (+60.00) を設定した。

7. モデルペプチドのウイルス不活化処理

β -エンドルフィン (MW 3465.0) 及びアドレノメデュリン (MW 6028.7) を、10 μ M のメチレンブルーまたはリボフラビンを含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、室温で 27W の白色蛍光灯から約 5 cm の距離に 30 分間放置した。処理後のペプチドは、そのまま、もしくはトリプシンで部分分解後 LC/MS/MS

にて分析した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮していない。

C. 結果

1. ペプチドマップ

FVIII は、アミノ酸 2332 個からなる糖タンパク質である。還元アルキル化及びトリプシン消化して得られた消化物を LC/MS/MS により分析した。ペプチド及び糖ペプチドをできるだけ多く検出・帰属するために、 m/z 300~2100 範囲について、質量分析の測定範囲を変えて複数回の分析を行った。ペプチドは、検索条件として、酵素：トリプシン、許容切断部位数:2、可変修飾:システインのカルボキシメチル化、メチオニンの酸化、チロシンの硫酸化、並びに PNGase A 処理した試料においては、N の D への変換 (+ 1 Da) を設定し、マスコト検索エンジンを用いたマスデータ解析により帰属した。通常、トリプシンは、K 及び R の C 末側が P である場合切断しないとされているが、一部切断される場合があることから、検索に当たってはその可能性も考慮した。その結果、複数のクロマトグラムのデータをあわせて、図 2 に示す一次配列を含むペプチドが確認された。

2. N 結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

データ依存的に測定したプロダクトイオンスペクトル中に観測される m/z 204.1 の N-アセチルヘキサミンに由来するイオンを指標に糖ペプチドイオンを選択し、FVIII の N 結合型糖鎖に関する既報のデータを参照して帰属した。MS の測定範囲を m/z 400-2100, 800-2100 及び 1000-2100 として分析した複数のクロマトグラムのデータを元に、検出された N 結合型糖鎖結合ペプチドを表 1 にまとめる。

FVIII には、25 カ所の推定 N 結合型糖鎖結合部位 (Asn42, 239, 582, 757, 784, 828, 900, 943, 963, 1001, 1005, 1055, 1066, 1185, 1255, 1259, 1282, 1384, 1412, 1442, 1512, 1685, 1810 及び 2118) が存在する。このうち Asn42, 239, 757, 784, 828, 900,

963, 1005, 1055, 1066, 1185, 1412, 1442, 及び 2118 に関しては、糖鎖が結合したペプチドのみが観測された。Asn1255 及び 1259 の両方を含むペプチドについては、糖鎖が 1 個及び 2 個結合した糖ペプチドとして検出された。Asn1282, 1300 及び 1810 を含むペプチドは、糖ペプチド及び糖鎖の結合していないペプチドの両方として観測された。Asn582, 943, 1384, 1685 は、ペプチドとしては観測されたが、糖ペプチドとしては観測されなかった。Asn1001, 及び 1512 はペプチドとしても糖ペプチドとしても観測することはできなかった。

3. O 結合型糖鎖結合ペプチドの推定及び O 結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

O 結合型糖鎖結合は、コンセンサス配列が十分明らかになっておらず、また、結合の有無は高次構造に左右されるため、実際に分析することにより確認する必要がある。前年度の分析では、約 10 カ所に O 結合型糖鎖が結合していることが示唆された。しかし、糖ペプチドはイオン化効率が低いこと及び MS/MS で得られるフラグメントが少ないことから、これまでのペプチドマッピングでは検出されていない O 結合糖鎖が存在する可能性がある。また、N 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドにも O 結合型糖鎖が結合している可能性もある。そこで、1) PNGase A による N 結合型糖鎖の除去、並びに 2) シアリダーゼ及びガラクトシダーゼによる O 結合型糖鎖の還元末端の GalNAc 残基へのトリミングを単独もしくは組み合わせで行い、更なる O 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドの帰属を試みた。図 1A に、PNGase A 及びグリコシダーゼ消化物を m/z 300-2100 の範囲で分析したときの代表的なベースピーククロマトグラムを示す。図 1B には、データ依存的に測定した MS/MS の TIC クロマトグラムを、図 1C には、MS/MS の m/z 204.1 の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示す。糖ペプチドイオンの MS/MS では、糖鎖由来のオキシニウムイオンが強く観測される。本試料は N 結合型糖鎖除去と O 結合型糖鎖トリミング処理を行ったものなので、MS/MS の m/z 204.1 の EIC クロマトグラムのピークは、多くの場合、O 結合型糖鎖のペプチ

ド側の GalNAc だけが付加したペプチドイオンのプロダクトイオンスペクトルが取得されたことを示している。図 1D に一例として GalNAc 付加ペプチド m/z 613.9, 4 価イオンのプロダクトイオンスペクトルを示す。GalNAc 由来のオキソニウムイオン及びその脱水イオン（それぞれ m/z 204.1 及び 186.1）並びにペプチド配列 PQLHHSGDMVFTPEGLQLR 由来の b-及び y-シリーズのプロダクトイオンが観測されていた。Ser 残基や Thr 残基に結合している HexNAc は解離しやすいため、CID-MS/MS によって結合部位を確認することはできなかったが、HexNAc 付加ペプチドは MS データの検索により容易に同定することができた。その結果、22 箇所 HexNAc が結合していたと推定された（表 2）。同定された推定 O 結合型糖ペプチドのうち、ペプチド I782-R795, Y813-R838 については、N 結合型糖鎖も結合すること、I1297-R1310 については、N 結合型糖鎖が結合する場合と結合しない場合があることが確認された。また、D1504-K1534 については、これまで検出できていなかったが、N 及び O 結合型糖鎖が結合していることが示唆された。ペプチド、N 結合型糖鎖結合ペプチド並びに O 結合型糖鎖ペプチドをあわせて、全体の約 85% の一次構造が確認された（図 2）。以上のことから、確認された 22 個の糖鎖結合は、FVIII のほとんどの O 結合型糖鎖結合を網羅していると思われる。これらの結果に、保持時間、MS/MS スペクトルなどの情報を加味し、N 結合型糖鎖を除去した試料で検出された糖ペプチドイオンを帰属することによって、表 2 右列に示すような糖組成をもつ O 結合型糖鎖結合ペプチドを同定することができた。ペプチド D1504-K1534 については、糖ペプチドとしては検出することができなかった。

以上の操作によって 22 箇所の O 結合型糖鎖が結合した 19 個のペプチドを検出することができた。観測された O 結合型糖鎖の組成は、HexNAcHexNeuAc または HexNAcHexNeuAc2 であった。確認された O 結合型糖鎖が結合したペプチドは、糖鎖が結合していないペプチドとしても検出されていたことから、これらの結合部位の糖鎖付加は部分的であることが示された。

4. 光化学反応を利用したウイルス不活化操作がペプチドに及ぼす影響について

光化学反応を利用したウイルス不活化操作がペプチドに及ぼす影響を、 β -エンドルフィン (MW 3465.0 Da) 及びアドレノメデュリン (MW 6028.7) を用いて検討した。 β -エンドルフィン及びアドレノメデュリンをメチレンブルー/光照射もしくはリボフラビン/光照射したときの処理前及び処理後の試料のデコンボリューションスペクトルを図 3 に示す。 β -エンドルフィンにおいては、メチレンブルー/光照射処理により、最大強度質量が 3463.6 Da から 3479.6 及び 3495.6 へと変化し、質量が 16 及び 32 増加することが確認された（図 3）。リボフラビン/光照射処理においては、質量が 32, 48 及び 64 増加した。このことから、ペプチドにそれぞれ酸素が 1~2 個、2~4 個付加したことが推測された。また、アドレノメデュリンにおいても同様に、16 単位の質量の増加が認められ、メチレンブルー/光照射では 2~5 個、リボフラビン/光照射では 2~8 個酸素が付加したことが推測された。また、リボフラビン/光照射においてはメチレンブルー/光照射と比べてピーク幅の変化が認められ、酸素付加以外の変化が起きていることが推測された。なお、これほど酸化が認められたにもかかわらず、ペプチド鎖の切断は観測されていなかったことから、本条件ではペプチド鎖の切断はほとんど起こらないことが推測された。

次に、修飾を受けたアミノ酸を明らかにするために β -エンドルフィン由来のイオン m/z 866.0 (+4) のプロダクトイオンスペクトルと質量が 16 増加した β -エンドルフィン由来のイオン m/z 871.0 (+4) のプロダクトイオンスペクトルを比較したところ、b5 イオンの m/z 値が 16 増加していることが示唆され、Met5 が酸化されていることが示唆された。次に、質量が 32 増加した m/z 875.0 (+4) のプロダクトイオンスペクトルを比較したところ、b3, b4, y4 で m/z 値の 16 増加が観測された。この結果は、Met5 以外に Tyr1 及び Lys28 が酸化されたことを示唆している。同様に、アドレノメデュリンにおいては、プロダクトイオンスペクトル（データ非表示）及びトリプシ

ン消化物のプロダクトイオンスペクトル（データ非表示）から、酸化され得るアミノ酸として Tyr1, Met5, His28, Tyr31 が示唆された。尚、修飾部位の違いによるプロダクトイオンスペクトルの変化はわずかであるため、これら以外の部位も修飾されている可能性も否定できないと思われた。

D. 考察

新しいウイルス不活化技術として、光化学反応を利用した技術が開発され、そのうちいくつかの手法は欧米で既に導入されている。しかし、これらの処理により、15%程度活性が低下する血液凝固因子があることが報告されている。中でも、フィブリノーゲン及び FVIII が比較的影響を受けやすいといわれている。現在までに、光化学反応を利用したウイルス不活化処理に由来する有害事象発症例は報告されていないが、タンパク質構造の変化により、凝集体を形成したり、免疫応答を惹起する可能性があるため、光化学反応が有効成分へ及ぼす影響を評価する必要がある。本研究は、光化学反応を利用したウイルス不活化処理が血液凝固因子の一つである FVIII に与える影響を明らかにすることを目的としている。まず、不活化処理前の FVIII について LC/MS によるペプチドマッピングを行い、その一次構造並びに翻訳後修飾（*N* 及び *O* 結合型糖鎖）を可能な範囲で調べた。

ペプチドマッピングにより、約 85%の配列をトリプシン切断ペプチド及び糖ペプチドとして確認することができた。FVIII には、25 カ所の推定 *N* 結合型糖鎖結合部位があり、そのうち 20 カ所に糖鎖が結合していることが報告されている。今回の検討において、19 カ所について糖鎖が結合していること、そのうち 3 カ所は糖鎖が結合していない場合があることを確認した。また、3 カ所には糖鎖が結合していないことを確認した。しかしながら、残りの 3 カ所分の糖鎖結合部位について、1 カ所については PNGase A 処理した試料から *N* 結合型糖鎖が結合する可能性が示唆されたが結合している糖鎖については情報が得られていない。残りの 2 カ所については確認できなかったため、更なる検討が必要である。結合していた

糖鎖は、ほとんどの部位においてフコシル化されたシリアル二本鎖又は三本鎖糖鎖であったが、Asn239 には、高マンノース型糖鎖、ハイブリッド型糖鎖並びにフコース及びシアル酸が 0 から 1 個結合した二本鎖糖鎖が、Asn2118 には、高マンノース型糖鎖のみが結合していた。これらは、過去の CHO 細胞で産生された FVIII の報告とほぼ同じであったが、Asn239 についてはより多くの糖鎖が検出された。BHK 細胞で産生された組換えタンパク質の糖鎖には、硫酸化が起きる場合があるが、本研究では観測されておらず、その含量は少ないものと考えられた。

本研究では、PNGase A 消化及びエキソグリコシダーゼ消化試料を用いて、*O* 結合型糖鎖結合ペプチドの推定を行い、25 カ所の *O* 結合糖鎖結合部位を含む 20 個のペプチドを推定した。そのうち、22 カ所分の 19 個の *O* 結合型糖鎖結合ペプチドの糖鎖組成を明らかにした。今後、残りの部分についても糖ペプチドとして確認する必要がある。

次に、不活化処理が起こす影響を調べるため、モデルペプチドによる検討を行った。その結果、Met, Tyr, Lys 及び His 等に酸化が認められ、Met が最も酸化されやすいこと、並びにペプチド鎖の断片化は起こりにくいことを確認した。同じ濃度では、光増感剤としてメチレンブルーを用いたときよりもリボフラビンの方がより強い酸化作用を示した。なお、このように著しい修飾が起きたのは、ペプチドの濃度が非常に低いため、生じた活性酸素種の量がペプチドに対して大過剰となったことが原因であると考えられる。

これまでにウイルス不活化処理前の FVIII について LC/MS による詳細なペプチドマッピングを行っている。来年度は、ウイルス不活化処理が一次構造に及ぼす影響をペプチドマップを比較することにより調べる予定である。また、光増感剤及び光照射によるペプチド及びタンパク質の酸化体の形成を評価する方法の検討を行う。

E. 結論

モデル血漿タンパク質として FVIII を用い、還元アルキル化及びトリプシン消化後 LC/MS を行い、ア

ミノ酸配列のうち約 85%に相当するペプチド部分を
確認した。また、既報の N結合型糖ペプチドの分析
データと比較することにより、19カ所の N結合型糖
鎖を確認した。更に、22カ所分の O結合型糖鎖が結
合した19個の糖ペプチドを明らかにした。

該当なし

モデルペプチドに光増感剤及び光照射をしたとこ
ろ、酸素の付加が推定され、その修飾部位として、
メチオニンが最も修飾を受けやすく、Tyr, Lys, His
等も酸化を受けること、ペプチド鎖の切断はほとん
ど起きないこと確認した。今後、未検出の糖ペプチ
ドを探索すると共に、このペプチドマップのデータ
を利用し、光化学反応を利用したウイルス不活化法
がタンパク質一次構造に及ぼす影響を検出する予定
である。また、酸化体の形成を評価する方法の検討
を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表：

- 1) A. Harazono, N. Kawasaki, N. Hashii, S. Itoh, T.
Yamaguchi : Glycosylation analysis of recombinant
human coagulation factor VIII by LC MS/MS.
Pacifichem 2010 conference, Honolulu (2010, 12,
15-20)
- 2) A. Harazono, N. Kawasaki, N. Hashii, S. Itoh, T.
Yamaguchi : N- and O-glycosylation analysis of
recombinant human coagulation factor VIII by
high-performance liquid
chromatography-electrospray ionization mass
spectrometry. The 25th International Carbohydrate
Symposium Chiba (2010, 8, 6-9)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

図1. (A) ヒト血液凝固第 VIII 因子を還元カルボキシル化及びトリプシン消化後、PNGase A, シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ処理した試料の LC/MS のベースピーククロマトグラム, (B) MS/MS のトータルイオンクロマトグラム, (C) MS/MS の m/z 204.1 の抽出イオンクロマトグラム, (D) 28 分に検出された m/z 613.9 (+4) の GaINAc 付加ペプチドのプロダクトイオンスペクトル

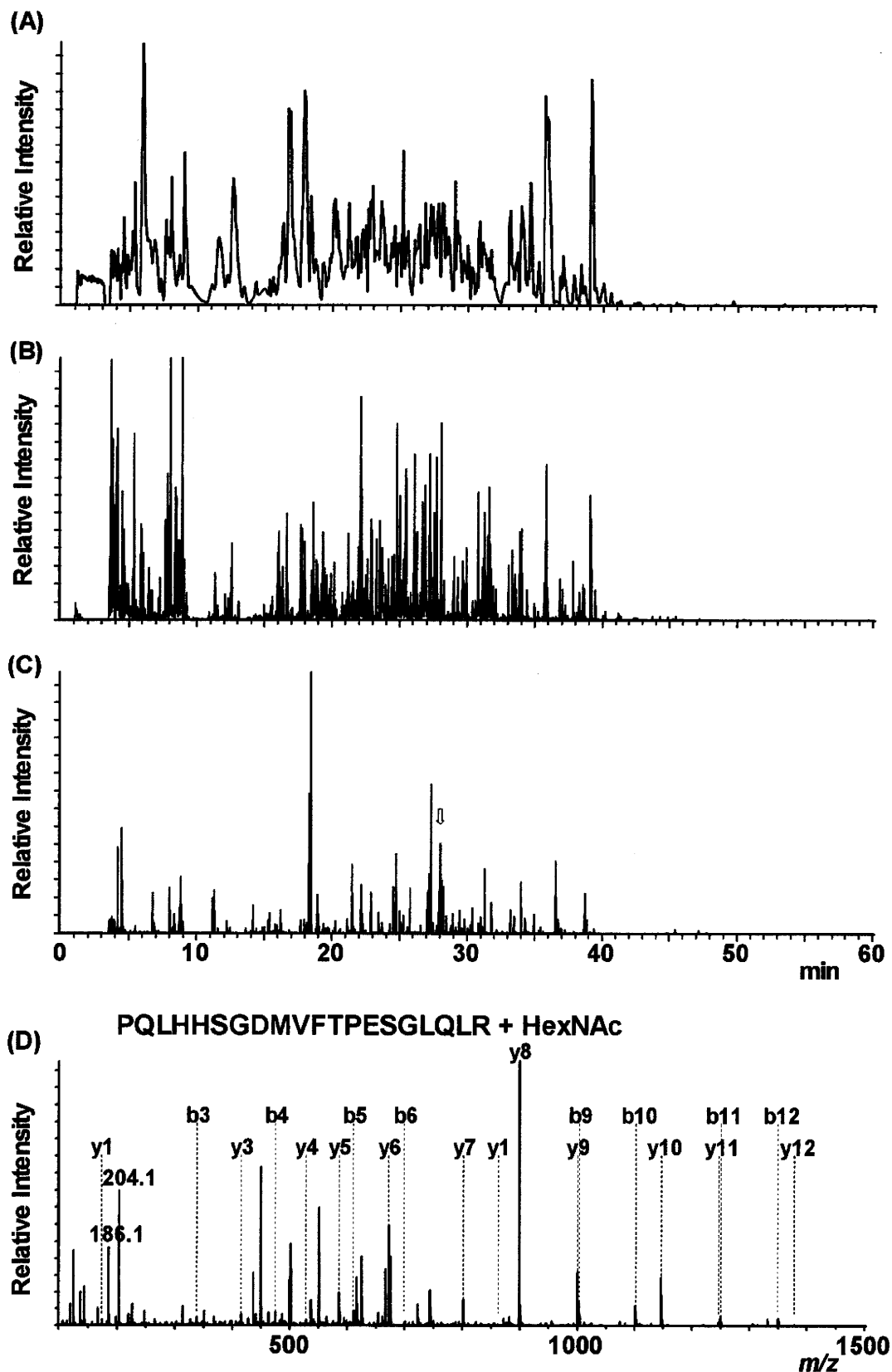


図2. ヒト血液凝固第八因子の一次配列及び翻訳後修飾

```

1  ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDAR F PPRVPKSFFF NTSVVYKKTL FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHFVSLHA
101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYNR SLPGLIGCHR KSVYVHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAELYDDDL TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKVRFMA YDETFKTRE AIQHESGILG PLYYGEVGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSFVNME RDLASGLIGP LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWLTEN IQRFLPNPAG
601 VQLEDPFQA SNIMHSINGY VFDSLQSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS VFFSGYTFKH RMVYEDTLL PPSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDITE DSFEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS TRQKQENATT IPENDIENTD PWFAHRTPMP KQONVSSSDL LMLLRQSFTP
801 HGLSLSDLQE AKYETFSDDP SPGAIDSNNS LSEMTHFRPQ LHHSGDMVFT PESGLQLLN EKLGTTAATE LKLDFKVSS TSNNLISTIP SDNLAAGTIN
901 TSSLGPPSMP VHYDSQLDTT LFGKKSSPLT ESGGPLSLSE ENNDSLLES GLMNSQESSW GHNVSSTESG RLFKGKRAHG PALLTKDNAL FKVSISLLKT
1001 NKTSNNSATN RKTHIDGPSL LIENSPSVWQ NILESDTEFK KVTPLIHDRM LMDKNATALR LNHMSNKTTS SKNMEMVQQK KEGPIPPDAQ NPDMSFFKML
1101 FLPESARWIQ RTHGKNSLNS GQGPSPKOLV SLGPEKSVEG QNFLSEKNKV VVGKGEFTKD VGLKEMVFFS SRNLFLTNLD NLHENTHNQ EKKTQEEIEK
1201 KETLIQENVV LPQIHTVTGT KNFMKNLFLL STRQNVEGSY DGAYAPVLQD FRSINDSTR TKKHTAHFSK KGEEENLEGL GNTKQIVEK YACTTRSEN
1301 TSQQNFVTQR SKRALKQFRL PLEETELEKR /LIVDDSTQW SKNMKHLTPS TLTQIDYNEK /EKSATTQSPL SDCLTRSHSI PQANRSPLPI AKVSSFPSIR
1401 PIYLTHVLFQ INSSHLPAAS YRKKDSGVQE SSHFLQGAKK NNLSLAILLL EMTGDQREVG SLGTSATNSV TYKKVENTVL PKPDLFK/TSG KVELLPKVHI
1501 YQKDLFPTET SNGSPGHLDL VEGSLLQGTE GAIKNEANR PGKVPFLRVA TESSAKTPSK /LLDPLAWDNH YGTQIPKEW KSQEKSPEKT AFKKKDTILS
1601 LNACESNHAI AAINEGQNKP EIEVTWAKQG RTERLCSQNP FVLKRHREI TRTLQSDQE EIDDDTISV EMKKEDFDID DEDENSSPRS FQKKTRHYFI
1701 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVFQEFTD GSFTQPLYRG ELNEHLGLL PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
1801 EPRKNFVKEN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
1901 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALNYLP GVFETVEMLP SKAGIWRVEC
2001 LIGELHAGM STLFLVSSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYGQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQAR QKFSSLYISQ
2101 FIIMYSLDGK KWQTYRQET GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF NPPIIARYIR LHPTHSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
2201 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEW QVDFQTKMKV TGVTTQGVKS LLTSMVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
2301 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

```

N-glycopeptide , ○ : N-glycosylated , ○ : Not N-glycosylated , ○ : Not detected

/O-linked glycopeptide/, ° : O-glycosylation site , Y : Tyrosin sulfation

図3. β -エンドルフィン(A)及びアドレノメデュリン(B)をメチレンブルー/照射またはリボフラビン/照射処理したときの質量変化

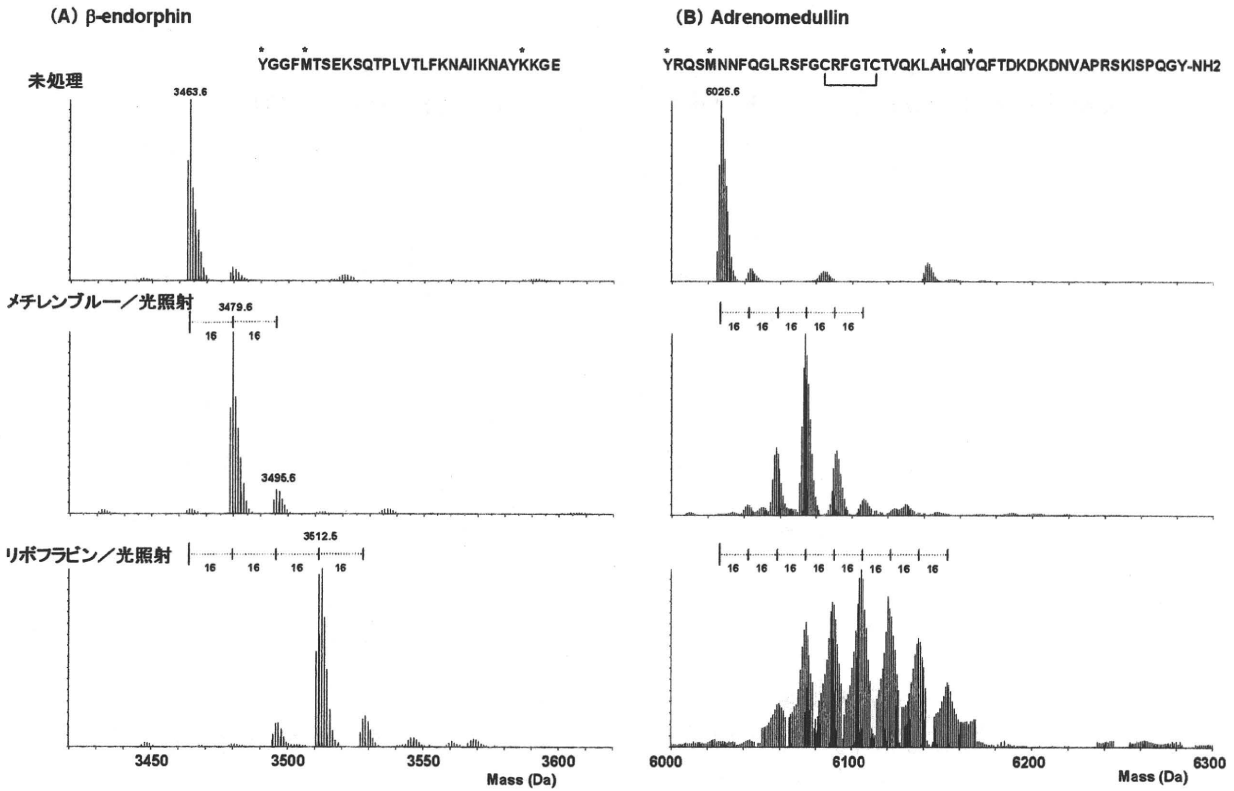


図4. β -エンドルフィン及びメチレンブルー/照射後質量が16及び32増加した分子種のプロダクトイオンスペクトル(それぞれA, B及びC) 前駆イオンとして, m/z 866.0, 870.0及び874.0 (+4)を用いた.

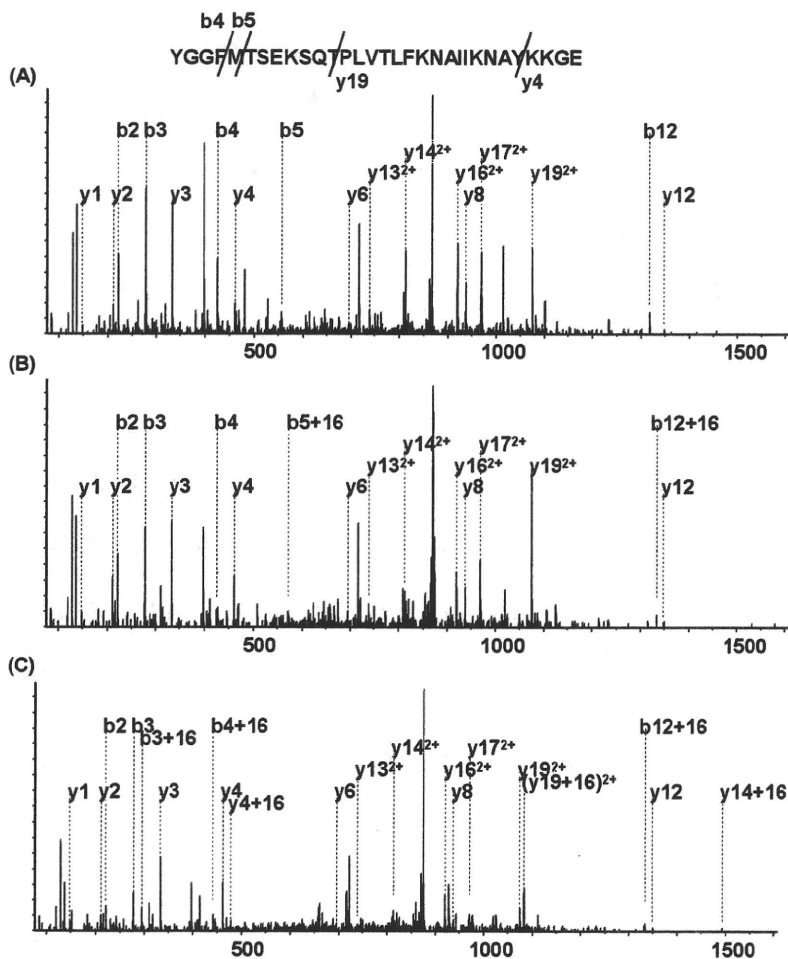


表 1. ヒト血液凝固第 VIII 因子の LC/MS/MS で検出した N 結合型糖鎖結合糖ペプチド

Domain	Site	Position	Peptide sequence	Mass	Previously reported N-linked glycans	Composition of detected N-linked glycans							
A ₁ domain	42	37-47	SFPF ^N TSVVYK	1287.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	N5H6S3F1	
	239	231-240	MHTVNGY ^N NR	1189.57	High mannose, Hybrid, and Complex	N2H5	N2H6	N2H7	N2H8	N3H5	N3H6	N3H6S1	
A ₂ domain	582	572-583	NVILFSVF ^N ENR	1451.74	Not glycosylated	Not glycosylated							
	757	755-768	QFN ^A TTIPENDIEK	1618.78	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1						
A ₃ C ₁ C ₂	784	782-795	IQ ^N VSSSDLLMLLR*	1587.87	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
	828	813-858	YETFSDDPSPGAIDSN ^N SLSEMTHPR*	5146.35	Complex	N5H6S4F1	N6H7S3F1	N6H7S4F1					
B domain	900	878-925	VSS ^T SNILSTIPSDNLAAGTD ^N TSSILGPPSM PVHYDSQLDITLFGKK	4977.42	Complex	N4H5S2F1							
	943	926-946	SSPLTESG ^P LSLEEN ^N DSK	2146.99	Not glycosylated	Not glycosylated							
	963	963-971	N ^V SSTESGR*	935.43	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
	1001	1000-1002	TNK	361.20	Complex	Not detected							
	1005	1003-1011	TS ^N NSATNR	963.44	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1				
	1055	1050-1060	MLMDK ^N A ^T ALR	1262.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
	1066	1061-1067	LNHMS ^N K	842.41	Complex	N6H7S2F1	N6H7S3F1	N6H7S4F1					
	1185	1173-1192	NLFLTNIDNLHEN ^N THNQEK	2407.15	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
	1255, 1259	1253-1260	SL ^N DS ^T NR	905.42	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N8H10S2F2	N8H10S3F2	N9H11S3F2			
	1282	1271-1285	KGEENLE ^G IGNQTK	1644.80	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
1300	1297-1310	ISP ^N TSQQNFVTQR*	1618.81	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1			
1384	1377-1385	SHI ^P QAN ^R	1008.51	Not glycosylated	Not glycosylated								
1412	1407-1422	VLFQD ^N SSHLPAAS ^Y R	1803.89	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1			
1442	1440-1457	KN ^N LSLA ^L IL ^T LEMTGEDQR	2016.07	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1						
1512	1504-1534	DLFFTETS ^N GSPCHLDLVEGSL ^L QGTGAIK	3181.58	Potential	??								
1685	1675-1689	EDFD ^Y DEDEN ^Q SPR	1870.75	Not glycosylated	Not glycosylated								
1810	1804-1813	KNFVKP ^N ETK	1203.66	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1						
2118	2117-2136	G ^N STG ^T ILM ^V FFGN ^V DSSG ^H K	2029.98	High mannose	N2H8	N2H9							

表 2. ヒト血液凝固第 VIII 因子の O 結合型糖鎖結合部位を含むと推定されたペプチド及び実際に検出した糖ペプチド

Domain	Position	Peptide sequence	Mass	Treated with PNGase A and exoglycosydase		Oligosaccharide compositions (treated with or without PNGase A)				
						NIH1S1	NIH1S2	NIH1S1	NIH1S2	NIH1S1
B domain	769-781	TDPWFAHRIPMPK	1582.77	N		NIH1S1	NIH1S2	NIH1S1	NIH1S2	
	782-795	IQDVSSDLLMLLR	1588.85	N		NI	NIH1S1	NIH1S1	NIH1S2	NIH1S2
	796-812	QSPFHGLSLDLQEAK	1806.91	N		NIH1S1	NIH1S2	(NIH1)2S2	(NIH1)2S3	
	813-838	YETFSDDPSPGAIDSDNSLSEMTFR*	2917.23	N		NIH1S1				
	839-858	PQLHSGDMVFVPE SGLQLR	2248.11	N		NIH1S1	NIH1S2			
	863-872	LGTAAATELK	1003.55	N	2N	NIH1S1	NIH1S2	(NIH1)2S2	(NIH1)2S3	
	947-962	ILLESGLMNSQESSWGK	1764.84	N		NIH1S2				
	1041-1049	KVTPLIHDR	1077.63	N		NIH1S3				
	1128-1136	QLVSLGPEK	969.55	N		NIH1S1	NIH1S2			
	1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR	1618.81	N		NIH1S1	NIH1S2			
	1297-1310	ISPDTSQQNFVTQR*	1619.79	N		NIH1S1	NIH1S2			
	1331-1342	IIVDDTSTQWSK	1391.69	N		NIH1S1	NIH1S2			
	1346-1360	HLTPSTLTQIDYNEK	1758.88	N		NIH1S1	NIH1S2			
	1363-1376	GAITQSPLSDCLTR	1518.73	N		NIH1S1	NIH1S2			
	1393-1406	VSSFPSIRPIYLTR	1634.91	N		NIH1S1	NIH1S2	(NIH1)2S2		
	1458-1473	EVGSLGTSA TNSVTYK	1612.79	N	2N	NIH1S2				
	1474-14987	KVENI VLPKPDLPK	1576.92	N		NIH1S2				
1504-1534	DLFFTETSDGSPGHLDL VEGSLLQGTEGAIK*	3182.56	N	2N	not detected					
1549-1556	VATESSAK	791.40	N		NIH1S1	NIH1S2				
1561-1577	LLDPLAWDNHYGIQIPK	1980.01	N		NIH1S1	NIH1S2				

*、N 結合型糖鎖が結合していた糖ペプチド
T, S, 推定された O 結合型糖鎖結合部位

ウイルス不活化技術の血小板製剤への影響評価に関する研究

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長
研究協力者 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員

輸血用血液製剤投与後に生じる有害作用には、製剤成分に含まれる IgG が関与する可能性があることが知られている。そこで、リボフラビン添加と紫外線照射による病原体不活化処理が、ヒト IgG の機能に与える影響を検討した。病原体不活化と同じ条件設定として、ヒト血清に終濃度 50 μ M のリボフラビンを添加して波長 312 nm の紫外線を 5.3 J/cm² 照射し、血清に含まれる IgG の Fc 受容体 (Fc γ RIIa 及び Fc γ RIIIa) への結合を評価したところ、Fc γ RIIa への結合性が亢進する傾向が示され、病原体不活化処理により製剤中 IgG の機能変化が生じる可能性が示唆された。

A. 研究目的

輸血用血液製剤の安全性確保のためには、ウイルスや細菌等の感染性因子の混入防止と、免疫応答により生じる有害作用に関する対策が必要となる。これまで感染性因子の混入防止の観点では、皮膚消毒と初流血除去法の採用による皮膚常在菌混入の防止や NAT 試験による混入ウイルスの検出等により、安全性向上が図られてきた。また、免疫反応により生じる有害作用の防止に関しては、保存前白血球除去や γ 線照射の実施等による安全性向上が図られてきている。我が国における輸血用血液製剤への感染性因子混入防止の対策は、国際的にも高水準にあると考えられるが、安全性のさらなる

向上を求めて、厚生労働省では現在、病原体不活化技術の導入に関する検討が進められている。

輸血用血液製剤の病原体不活化技術のうち、実用化に近い段階まで開発されているものは、血漿製剤あるいは血小板製剤を対象とした技術である。これまで、メチレンブルー、アモトサレン、リボフラビンを用いた方法の有用性について、厚生労働省薬事・食品衛生審議会血液事業部会を中心に検討が重ねられ、血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会において、日赤が血小板製剤への不活化技術の導入に向けて準備を開始することが了承された。また、血液事業部会において、不活化剤の

安全性及び我が国の血小板製剤への適合性等の観点から、リボフラビンを用いた技術を重点的に評価することが表明された（参考資料 1, 2）。

リボフラビン法を含め現在開発されている病原体不活化技術は、核酸を標的とする方法であり、輸血用血液製剤に含まれる有核細胞である白血球も不活化することができる。したがって、病原体不活化技術導入に際しては、白血球不活化のために行われているγ線照射を引き続き実施するか判断も必要となる。すなわち、不活化技術の有効性・安全性を考える上では、病原体不活化能に加えて、製剤成分（有効成分、白血球、及びその他の成分）への影響を明らかにすることが必要である。

昨年度の本報告でも述べたように、リボフラビン法の病原体不活化能に関しては、スクリーニングが実施されていない病原体混入への備えとしての有用性が期待される。血小板製剤における有効成分である血小板への影響については、リボフラビン処理により血小板のP-セレクトインの細胞表面への移行を伴う部分活性化が起こるという問題が明らかになっており（参考資料 2）、文献でも同様の現象が報告されている¹⁾。また、リボフラビン法の白血球への影響については日赤において検討が進められており、これまで、PHA (Phytohemagglutinin) 刺激、CD3 刺激、あるいは CD3/CD28 共刺激した際の細胞増殖、及び、同種白血球刺激による増殖に関するデータが報告されている

（参考資料 3）。実験条件の詳細が明らかでないため精査することは難しいが、これらの指標で見る限り、リボフラビン法により白血球の不活化が達成されていると考えられる。

血小板製剤には、これらの細胞性成分の他、血漿が含まれるため、各種血漿タンパク質も投与されることになる。血漿タンパク質に含まれる IgG は、輸血用血液製剤投与に伴い生じる可能性のある重篤副作用に関連する場合があるとされているが、リボフラビン法による病原体不活化が血小板製剤中の IgG に及ぼす影響については報告がなく、検討がなされていないと考えられる。そこで本年度は、リボフラビン・UV 処理がヒト IgG の機能に及ぼす影響を解析した。

B. 方法

B.1 リボフラビン存在下での UV 照射による白血球細胞（Jurkat 細胞）の不活化

ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞は RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清（ニチレイ、終濃度 10%）を添加した培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。文献に記載されている条件を参考に²⁾、細胞を 50 μM のリン酸リボフラビンナトリウム（以下、リボフラビン）（SIGMA）を含むヒト血清（SIGMA）に 1×10^5 cells/ml となるように懸濁した後、24 穴プレートに分注し（1 ml/well）、UV クロスリンカー（Funakoshi, FS-800, 312 nm）を用いて UV 照射を行った（5.3 J/cm²）。UV 照射し

た細胞は遠心後、RPMI1640/10% FCS に懸濁し 96 well プレートで培養を行った。培養後 24, 48, 72 時間の細胞数を CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて測定した。

B.2 リボフラビン存在下で UV 照射した IgG の Fcγ受容体結合実験

ヒト血清に終濃度 50 μM でリボフラビンを添加し、B.1 と同様の条件で UV 照射を行った後、PBS を用いて希釈系列を作製した。FcγRIIIa あるいは FcγRIIIa を安定発現する Jurkat 細胞（一点あたり 2×10^5 個）を染色バッファー（PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN₃）で洗浄した後、ヒト血清の希釈系列を添加し、4°C で 30 分間結合させた。細胞を染色バッファーにより 2 回洗浄した後、DyLight488 標識した F(ab')₂ Fragment Goat anti-human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch) を添加し、さらに 4°C で 30 分間結合させた。その後、染色バッファーを用いて 2 回洗浄を行い、7-AAD (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) で解析を行った。前方散乱光 (FSC), 側方散乱光 (SSC) および 7-AAD の染色強度によりゲートを指定した生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出し結合の指標とした。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト血清は、試薬として市販されているものであり、倫理面への配慮を要するものではない。

C. 結果

C.1. 白血球増殖抑制を指標としたリボフラビン・UV 処理条件設定の確認

輸血用血液製剤の製造工程で用いられる病原体不活化処理には、専用のバッグや専用の照射装置が用いられる。本実験ではそれらの使用ができないため、リボフラビン・UV 処理が IgG の機能に与える影響を評価するための予備検討として、白血球の増殖抑制を指標に、本実験での処理条件設定が適切であることの確認を行った。

まず、ヒト T 細胞系株化培養細胞 Jurkat を試料として、終濃度 50 μM のリボフラビン存在下で、312 nm の UV を 5.3 J/cm^2 照射した。次に、照射後の細胞を培地に懸濁して培養し、リボフラビン・UV 処理 24, 48, 72 時間後に ATP 量を指標として細胞数を測定したところ、図 1 に示すように、24 時間後で既に照射直後より細胞数が減少しており、リボフラビン・UV 処理により白血球が不活化されたことが確認された。リボフラビン・UV 処理を行わなかった対照群では、細胞増殖が認められ、白血球不活化効果が明確であったことから、本処理条件は適切であると考えられた。

C.2. ヒト IgG の機能に対するリボフラビン・UV 照射の影響

輸血用血液製剤の免疫学的副作用には、FcγR を介した製剤中 IgG による患者血液中白血球の活性化が関与する場合があることが知られているため³⁾、評価対象とする IgG の機能として、FcγR 結合性を選択した。

ヒト FcγR には、FcγR I, IIa, IIb, IIc, IIIa, IIIb のサブクラスが存在し、炎症性の反応には主として FcγRIIIa 及び FcγRIIIa が関与している。そこで、FcγRIIIa あるいは FcγRIIIa を発現させた Jurkat 細胞を用い、ヒト血清中 IgG の FcγR 結合に対するリボフラビン-UV 処理の影響を評価した。図 2 に、結合実験 (3 回実施: Exp.1~3) の結果を示す。Exp.1 では、FcγRIIIa への結合に関して、非線形回帰により求められる見かけ上の親和性 (Kd) が対照で 24 nM であるのに対して、リボフラビン-UV 処理群では 12 nM となり、結合性親和性が上昇していることを示す結果となった。また、Exp.3 でも同様の傾向が確認された。一方、同条件で検討した FcγRIIIa との結合については、有意差はないものの、リボフラビン-UV 処理により低下する傾向があり、リボフラビン-UV 処理により、IgG の構造上特定の部位に影響が生じる可能性が示唆された。

D. 考察

輸血用血液製剤投与後におこる重篤副作用には、感染症の他、移植片対宿主病 (GVHD) や、輸血関連急性肺障害 (Transfusion-related Acute Lung Injury : TRALI) 等の免疫学的な副作用

が知られている。GVHD は製剤中の白血球が宿主を攻撃することにより生じるため、有核細胞である白血球も不活化することのできる病原体不活化処理は、GVHD の発症抑制にも有用である可能性がある。TRALI は、輸血中もしくは輸血後 6 時間以内に起こる非心原性の肺水腫を伴う呼吸困難を呈する重篤な非溶血性輸血副作用である。その発症機序は十分明らかでないが、製剤中の IgG (抗 HLA 抗体) や、脂質等の好中球活性化成分が関与する可能性が示唆されており、図 3 のように、活性化された好中球が肺に浸潤することが原因となっている可能性が考えられている³⁾。

輸血用血液製剤中に存在し、TRALI の原因ともなり得る好中球活性化成分については、リボフラビン-UV 処理の有無により活性に違いは生じないと報告されている⁴⁾。これに対して、リボフラビン-UV 処理が IgG の機能に与える影響については、これまでに報告がなかった。TRALI の発症頻度は輸血血液 1 単位あたり 0.014~0.08% とされており、その発生は稀であるが、死亡率は十数%と高い^{5,6)}。

図 2 に示したように、今後さらに再現性を確認する必要があるが、リボフラビン-UV 処理により、FcγRIIIa に対する IgG の結合性が亢進する可能性が示唆された。IgG の修飾構造により、FcγR サブクラスごとの結合性が異なる例はこれまでも知られており、Fc 領域の糖鎖のフコシル化の有無により、FcγRIIIa 結合性が変化すること、そ

の際、FcγRIIIa 結合性には影響がないことが報告されている⁷⁾。リボフラビン・UV 処理により生じる可能性のある IgG の構造ならびに機能変化についても、受容体サブクラス特異的に結合性の変化をもたらすような影響が生じている可能性が考えられる。

FcγRIIIa は好中球にも発現し、IgG を介した炎症反応に関わる受容体である。病原体不活化処理により TRALI の発生頻度が上昇したという報告はないが、不活化処理の有用性を考える際に、IgG の機能に与える影響についても今後検討を進める必要があると考えられる。

E. 結論

製剤中の血漿成分に含まれる IgG が有害作用発症に関与する可能性を踏まえ、病原体不活化処理による IgG の機能変化について検討した。ヒト血漿にリボフラビンを添加し、紫外線を照射したところ、FcγRIIIa に対する結合性が亢進する傾向が認められ、病原体不活化処理により血漿中 IgG の機能変化が生じる可能性が示唆された。

F. 参考資料

- 1) 血液製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の導入に係る検討の経緯（平成 21 年 12 月 10 日 薬事・食品衛生審議会 資料）
- 2) 血小板製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の導入準備について（平成 21 年 12 月 10 日 薬事・食品衛生審

議会 資料）

- 3) 血小板製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の導入準備について（平成 22 年 11 月 24 日 薬事・食品衛生審議会 資料）

参考文献

- 1) Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Galan AM, Li J, Goodrich R, Escolar G. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 45(6), 911-9, 2005
- 2) Jackman RP, Heitman JW, Marschner S, Goodrich RP, Norris PJ. Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity after pathogen reduction: mechanisms of action in ultraviolet illumination and riboflavin treatment. *Transfusion*. 49(12), 2686-99, 2009
- 3) Gilliss BM, Looney MR. Experimental models of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*. 25(1), 1-11, 2011
- 4) Ambruso DR, Thurman G, Tran K, Marschner S, Gathof B, Janetzko K, Goodrich RP. Generation of neutrophil priming activity by cell-containing blood components treated with pathogen reduction technology and