

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 90% 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た。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、PNGaseA 処理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帰属することができた。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. モデルペプチドを用いた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の検討

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 (図 4)。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。

5. 光化学反応を利用したウイルス不活化操作が FVIII に及ぼす影響の検討

未処理試料、メチレンブルー及び光照射処理試料、並びにリボフラビン及び光照射試料を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^E により分析した。例として、図 5A に対照とメチレンブルー及び光照射試料の液体クロマトグラムを、ミラー表示にて示す。クロマトグラムは非常に複雑であることから、マニュアルでの比較は不可能であり、ソフトウェアにより溶出時間の補正を行い比較を行った。紫の線は、未処理試料と処理試料のクロマトグラムの差分を示す。各試料のクロマトグラムは類似したパターンを示した。差分のクロマ

トグラムにおいて正のピークに見られているが、これは LC/MS へ導入された試料量が対照の方が多かったためと思われる。得られた MS データをヒト FVIII の配列に対してデータベース検索を行ったところアミノ酸配列 90%以上のペプチドを確認することができた(非表示)。次に、メチオニン残基の酸化が起きたペプチドをデータベース検索により帰属した。擬陽性を避けるため、フラグメントイオンが 5 個以上観察されたペプチドのみを示した(図 5B)。リボフラビン及び光照射処理においても同様なペプチドが酸化されていることが確認された。これらのメチオニン残基は、酸化を受けやすい部位であることが示唆された。ただし、対照においても対応する酸化ペプチドのピークが認められることから、処理により特異的に酸化されたのか分析操作中に酸化されたのか不明確であった。

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 90%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アリ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、検出されなかった残りの部分について、その他の修飾が起きている可能性も含めて検討する必要がある。

次に、不活化処理がペプチド・タンパク質に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。

不活化処理により引き起こされる修飾は主に Met の酸化であったことから、FVIII において Met の酸化の生じるペプチドを調べた。メチレンブルー及び光照射処理及びリボフラビン及び光照射処理により、同様のメチオニン残基が酸化されることが確認された。これらの部位は酸化を受けやすいと考えられるが、対照においても酸化ペプチドのピークが認められたことから、不活化処理により生じたのかどうか不明確であり、操作中に生じる酸化を十分に抑制できる条件の開発が必要である。また、生じた酸化の程度を適切に比較・評価できるコンピューターツールが必要であろう。

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 90% 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。

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を確認した。

FVII に光増感剤及び光照射処理を行い、ペプチドマップで解析し、メチオニンの酸化が起りやすい部位を確認した。光化学反応が有効成分へ及ぼす影響を評価するためには、分析操作中に生じる酸化を十分に抑制できる手法、並びに変化の程度を適切に評価する手法を開発することが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

総説など

- 1) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第 1 回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, *ファームテクニク* ジャパン, 27(13), 99(2633)-104(2638)

(2011)

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. Pacificchem 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)
- 3) A. Harazono: 糖タンパク質医薬品の品質評価. 第 38 回 BMS コンファレンス (グループディスカッション), 箱根 (2011, 7, 10)

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
該当なし

謝辞 分析にご協力頂いた日本ウォーターズ株式会社 廣瀬賢治氏及び川瀬 泰司氏に感謝致します。

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) 24.8 分に検出された m/z 1175.1 (+2) の O-結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトル

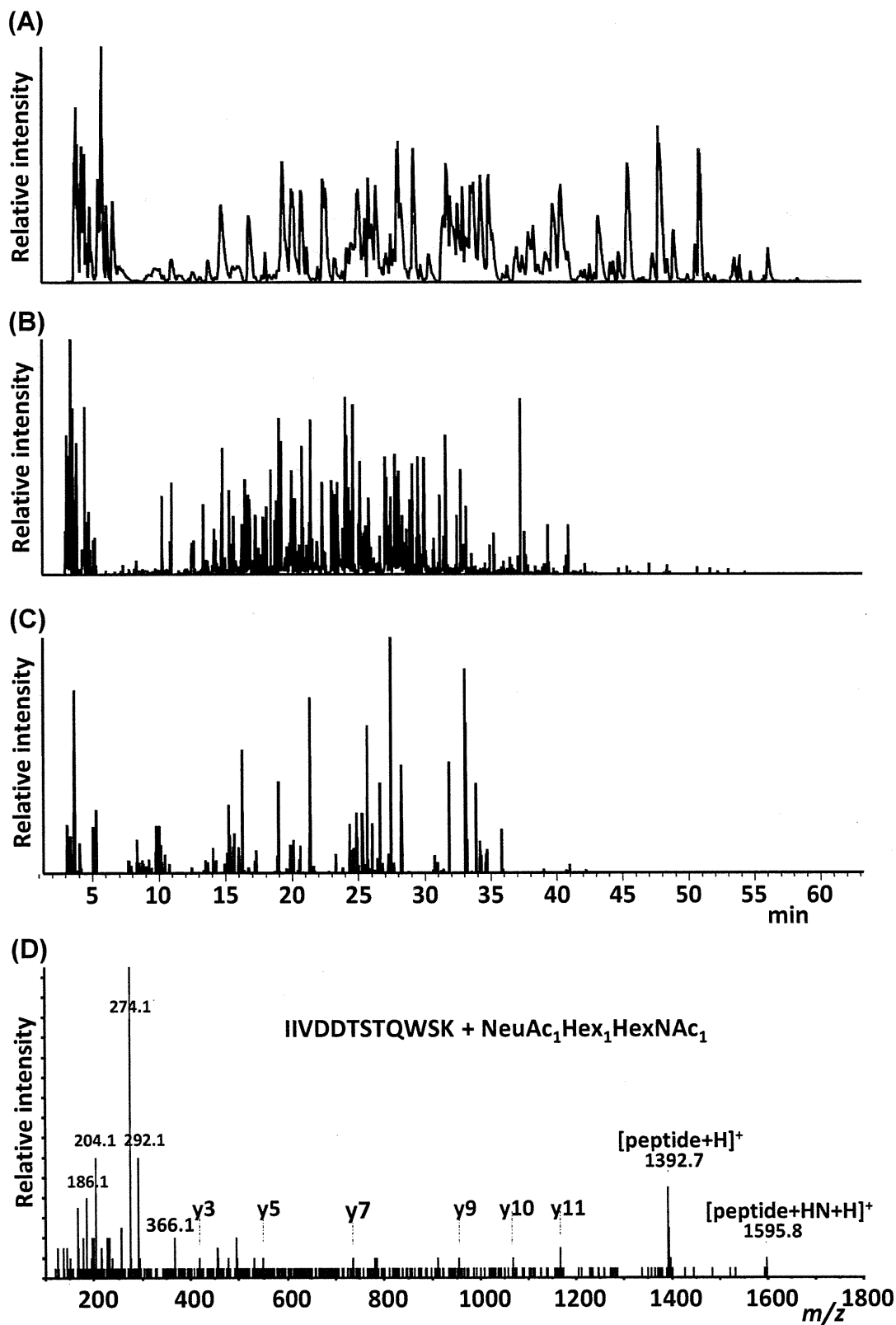


図2. ヒト血液凝固第八因子の一次配列及び翻訳後修飾

1 ATRRYLGA V ELSWDMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFFP NTSVVYKTL FVEFTDHLFN IAKPRPPWVG LLGPTIQAEV YDTVITLKN MASHPVSLSHA
 101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD PLCLTYSYLS HVLDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLT
 301 MDLQGFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAET YDDL TDSEMDVVRV DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKSQ YLNGNPQRIG RYKVKVRFMA YDTEFTKRE AIQHESGILG PLYGVEGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSVFVME RDLASGLIGP LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFPLNPAG
 601 VQLEDPFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTFDLS VFFSGYTFKH KMYEDTTLT FPFSGEIVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYVE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS TROKQINATT IPENDIEKTD PWFAHRTMPM KIQNVSSSDL LMLLFQSPTP
 801 HGLSLSDLQE AKYETFSDDP SPGAIDSNNS LSEMTHFRPQ LHHSGDMVFT PESGLQLRLN EKLGTAAATE LKRLDFK VSS TSNNLISTIP SDNLAAGTIN
 901 TSSLGPPSMP VHYDSQLDIT LFGKSSPLT ESGGPLSLE ENNDSELES GLMNSQESSW GKNSSTESG RLFKGRKRAHG PALLTKDNAL FKVSISLLKT
 1001 NKTSNNSATN RKTHIDGPSL LIENSPSVWQ NILESDTEFK KVTPLIHDM LMDHNATALR LNHMSNKTTT SKNMEMVQOK KEGPIPPDAQ NPDMSFFKML
 1101 FLPESARWIQ RTHGKNSLNS GQGPSKQLV SLGPEKSVEG QNFLSEKNKV VVGKGEFTKD VGLKEMVFPK SRNFLTLNLD NLHENNTHNQ EKKIQEIEIK
 1201 KETLIQENVV LQIHTVTGT KNFMKNLFL STRQVVEGYS DGAYAPVLQD FRSINDSTNR TKKHTAHFSK KGEEENLEGL GNDRQIVEK YACTRISLN
 1301 TSQQNFVTQR SKRALKQFRL PLEETELEKR LIVDDTSTQW SKNMKHLTPS TLTQIDYNEK EKGAITQSPL SDCLTRSHSI QANRSPLEPI AKVSSFFSIR
 1401 PIYLTVLFLQ INSSHLPAAS YRKKDSGVQE SSHFLQGAKE NLSLAILTL EMTGDQREVG SLGTSATNSV TYKKVENTVL PKPDLPK TSG KVELLPKVHI
 1501 YQKDLFPPTET SNSSPGHLDL VEGSLQGTG GAIKWNEANR PGKVPFLRVA TESSAKTPSK LLDPLAWDNH YGTQIPKEEW KSQEKSPEKT AFKKKDTILS
 1601 LNACESNHAI AAINEGQNKP EIEVTWAKQG RTERLCSQNP PVLKRHQREI TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEFDIT DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
 1701 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQPF KKVVFQEFTE GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
 1801 EPRKNEVKN ETKTYFWKVQ HMAPTKDEF DKAWAYFSD VDLEKDVHSG LIGPELLVCHT NTLNPAGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
 1901 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFETVEMLP SKAGIWRVEC
 2001 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTOGAR QKFSSLYISQ
 2101 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF NPPIIARYIR LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
 2201 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR POVNNPKEWL QVDFQRTMKV TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVNSLDPP
 2301 LLTRYLRHHP 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/光照射またはリボフラビン/光照射処理したときの質量変化

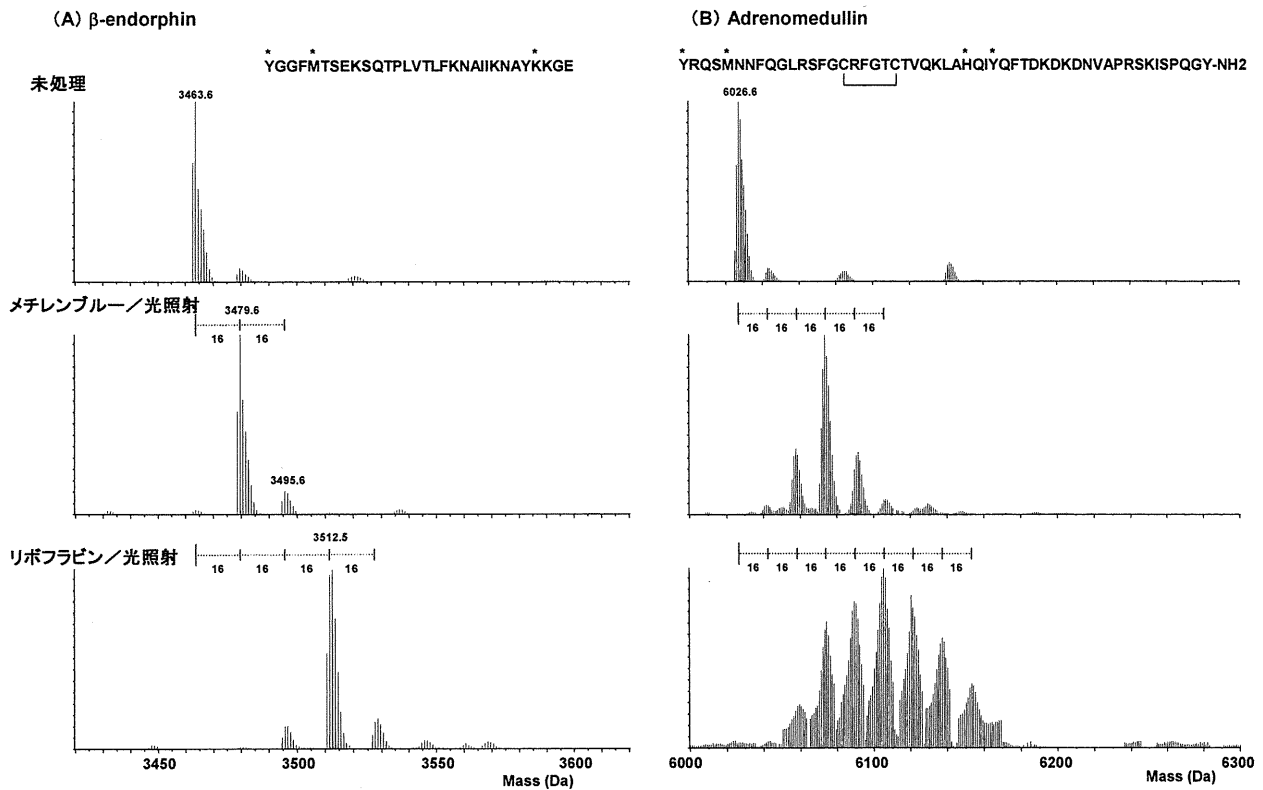


図4. β -エンドルフィン及びメチレンブルー/光照射後質量が16及び32増加した分子種のプロダクトイオンスペクトル(それぞれA、B及びC) 前駆イオンとして、 m/z 866.0, 870.0及び874.0 (+4)を用いた。

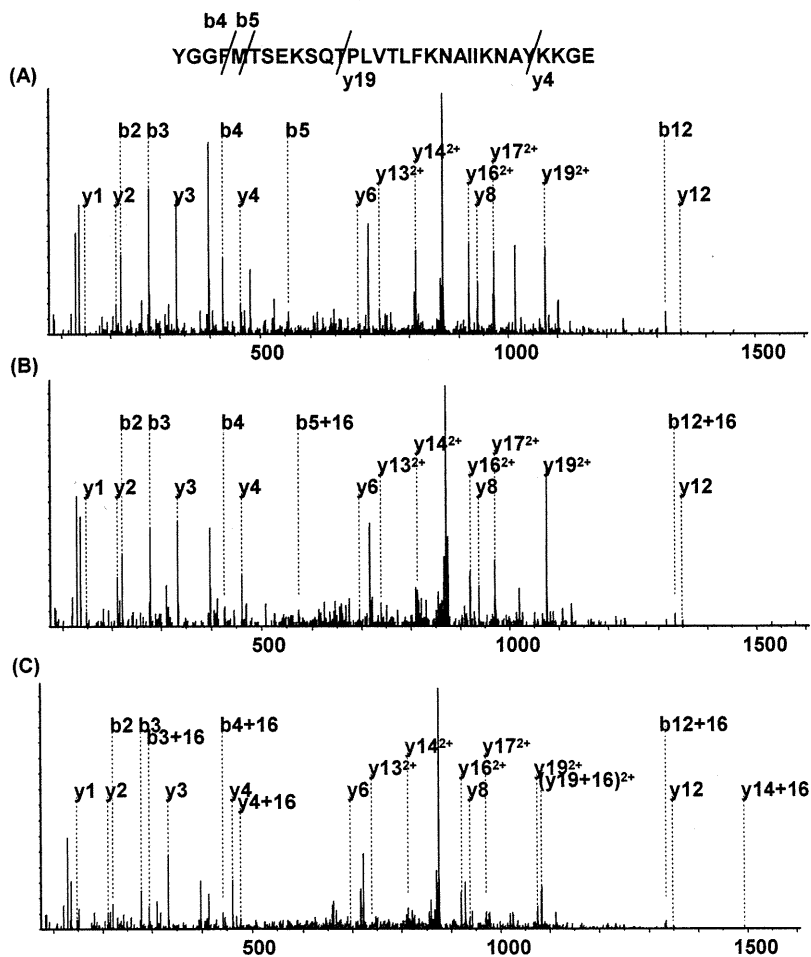
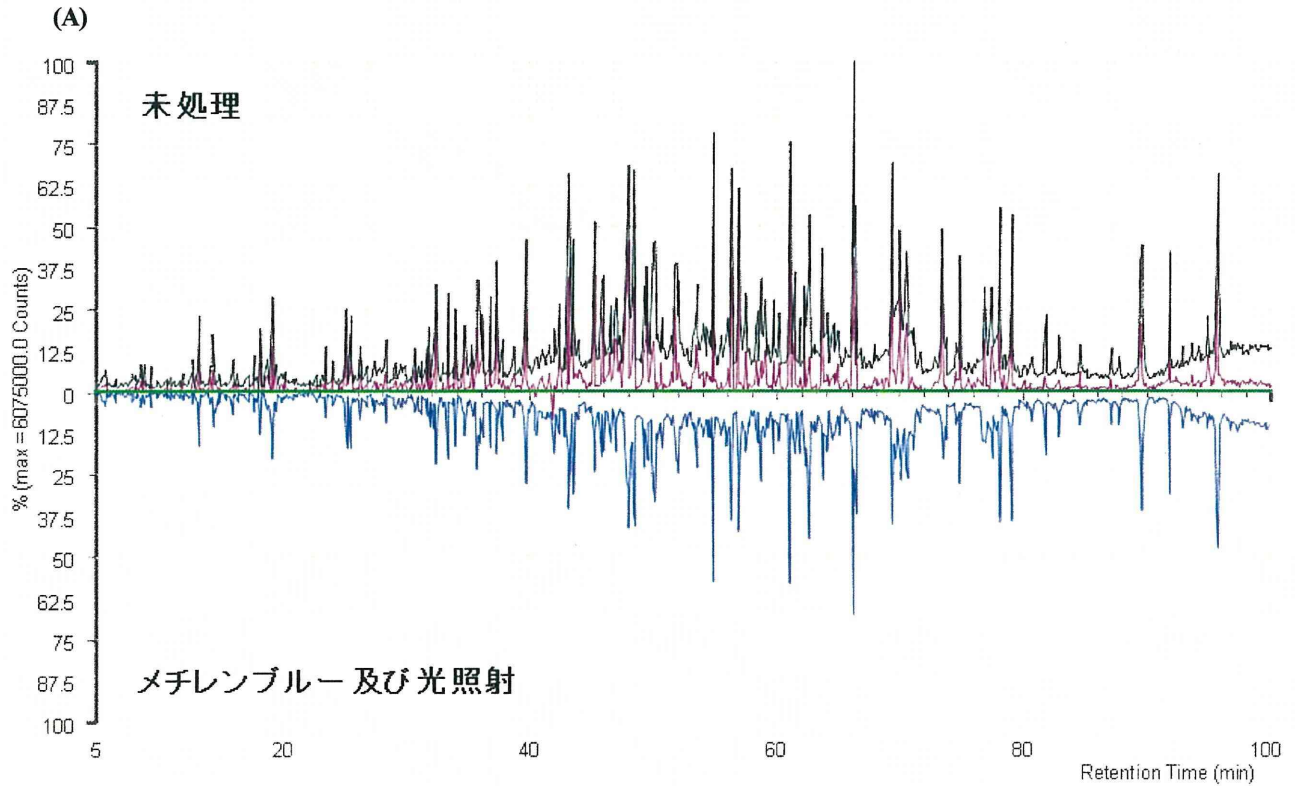


図5. 未処理及び光増感剤及び光照射処理血液第八因子のペプチドマップの比較

(A)対照とメチレンブルー及び光照射のペプチドマップの比較。(B) 帰属された酸化メチオニンを含むペプチド



(B)

1	ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDAR F PPRVPKSFPF NTSVVYKKTLL	1201	KETLIQENVV LPQIHTVTGT KNFMKNLFLLL STRQNVESGY DGAYAPVLQD
51	FVEFTDHLFN IAKPRPPWVG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLSHA	1251	FRSLNDSNTR TKKHTAHFSK KGEENLEGL GNQTKQIVEK YACTTRISP
101	VGVSYWKASE GAEDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVQVQ LKENGPMASD	1301	TSQQNFVTQR SKRALKQFRL PLEETELEKR IIVDDTSTQW SKNMKHLTPS
151	PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA	1351	TLTQIDYNEK EKGAITQSPL SDCLTRSHSI PQANRSPPLPI AKVSSPFSIR
201	VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR	1401	PIYLTRVLVQ DNSSHLPAAS YRKKDQSGVQE SSHFLQGAKK NNLSLAILTL
251	KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL	1451	EMTGDQREVG SLGTSATNSV TYKKVENTVL PKPDLPKTSG KVELLPKVHI
301	MDLGQFLFC HISSHQHGM EAYVKVDSCE EEPQLRMK NN EEAEYDDDL	1501	YQKDLFPET SNGSPGHLDL VEGSLLQGTG GAIKWNEANR PGKVPFLRVA
351	EDSEMDVVR F DDDNSPSFIQ IRVAKKHK TWVHYIAEE EDWDYAPLVL	1551	TESSAKTPSK LLDPLAWDNH YGTQIPKEEW KSQKSPEKT AFKKKTILS
401	APDRSRYKSQ YLNNQPQRIG RYKVKRFMA YDETFKTRE AIQHESGILG	1601	LNACESNHAI AAINEGQNK EIEVWAKQG RTERLCSQNP PVLKRHQREI
451	PLLYGEVGD TLLIFKNQAS RPYNIYPHI TDVRLYSRR LPKGVKHLKD	1651	TRPTLQSDQE EIDYDDTISV EMK KEDFDIY DEDENQSPRS FQKTRHYFI
501	FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSFVME RDLASGLIGP	1701	AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQPF KKVVFQEFTD GSFTQPLYRG
551	LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG	1751	ELNEHLGLLG PYIR AEVEDN TMVTFRN QAS RPYFSYSSLI SYEEDQRQGA
601	VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDLSQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS	1801	EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
651	VFFSGYTFKH KMYEDTLTL FFFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR	1851	LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VIVQEFALFF TIFDETQSWY FTEMNERNCR
701	GMTALLKVSS CDKNTGDYIE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS	1901	APCNIQMEDP TFKENYR FHA INGYIMDTLP GLVMAQDQR I RWYLLSMGSN
751	TRQKQFNATT IPENDIEKTD PWFARHTPMP KIQNVSSSDL LMLLRQSPTP	1951	ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YK MALYNLYP GVFEVEMLP SK AGIWRVEC
801	HGLSLSDLQE AKYETFSDDP SPGAIDSNNS LSEMTHFRPQ LHSGDMVFT	2001	LIGELHAGM STFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYGQWAPKL
851	PESGLQLRLN EKLGTTAATE LKKLDFKVSS TSNLISTIP SDNLAAGTDN	2051	ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
901	TSSLGPPSMP VHYDSQLDIT LFGKKSPLT ESGGPLSLSE ENNDSKLLES	2101	FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGKIHNI NPPIIARYIR
951	GLMNSQESSW GKNVSSSTESG RLFKGRAGH PALLTKDNAL FKVISLTKT	2151	LHPTHYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESK ASDAQI TASSYFTNMF
1001	NKTSNNSATN RKTHIDGDSL LIENSFVWQ NILESDFTEFK KVTPLIHDRM	2201	ATWSPSK ARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTQGVKS
1051	LMDKNATALR LNHMSNKTTS SKNMEMVQOK KEGPIPPDAQ NPDMSFFKML	2251	LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
1101	FLPESARWIQ RTHGKNSLNS GQGSPKQLV SLGPEKSVEG QNFLSEKNKV	2301	LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY
1151	VVGKGEFTKD VGLKEMVFPSS SRNLFLTNLD NLHENHNTNQ EKKIQEEIEK		

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					
						N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
A ₁ domain	42	37-47	SFPFNTSVVYK	1287.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	239	231-240	MHTVNGYVNR	1189.57	High mannose, Hybrid, and Complex	N2H5	N2H6	N2H7	N2H8	N3H5	N3H6
						N4H4	N4H5	N4H5F1	N3H4S1	N3H5S1	N3H6S1
A ₂ domain	582	572-583	NVILFSVFDENR	1451.74	Not glycosylated	Not glycosylated					
B domain	757	755-768	QFNATTIPENDIEK	1618.78	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1				
	784	782-795	IQNVSSDLLMLLR*	1587.87	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	828	813-858	YETFSDDPSGAIDSNNSLSEMTHFR*	5146.35	Complex	N4H5S2F1					
	900	878-925	VSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSM PVHYDSQLDTTLFGKK	4977.42	Complex	N4H5S2F1					
	943	926-946	SSPLTESGGPLSLSEENNDISK	2146.99	Not glycosylated	Not glycosylated					
	963	963-971	NVSTESGR*	935.43	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	1001	1000-1002	TNK	361.20	Complex	Not detected					
	1005	1003-1011	TSNNSA TNR	963.44	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1		
	1055	1050-1060	MLMDKNA TALR	1262.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
						N6H7S2F1	N6H7S3F1	N6H7S4F1			
	1066	1061-1067	LNHMSNK	842.41	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H5F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1
						N5H6S3F1					
	1185	1173-1192	NLFLTNLDNLHENNTNHNQEK	2407.15	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	1255, 1259	1253-1260	SLNDSTNR	905.42	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N8H10S2F2	N8H10S3F2	N9H11S3F2	
	1282	1271-1285	KGEEENLEGLNQTK	1644.80	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1
	1300	1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR*	1618.81	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S3F1	N5H6S4F1	
	1384	1377-1385	SHSIPQANR	1008.51	Not glycosylated	Not glycosylated					
	1412	1407-1422	VLFQDNSSHLPAASYR	1803.89	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	1442	1440-1457	KNNLSLAILTLEMTGDQR	2016.07	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1			
	1512	1504-1534	DLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLQGTGAIAIK	3181.58	Potential	??					
1685	1675-1689	EDFDIYDEDENQSPR	1870.75	Not glycosylated	Not glycosylated						
A ₃ C ₁ C ₂	1810	1804-1813	KNFVKPNETK	1203.66	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1			
	2118	2117-2136	GNSTGTLMVFFGNVDSSGIK	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 PNGaseA and exoglycosydase		Oligosaccharide compositions (treated with or without PNGase A)			
B domain	769-781	TDPWFAHRT T PMPK	1582.77	N		N1H1S1	N1H1S2		
	782-795	IQD V SSDLLMLLR	1588.85	N		N1	N1H1	N1H1S1	N1H1S2
	796-812	QSPTPHGLSLSDLQEAK	1806.91	N		N1H1S1	N1H1S2	(N1H1)2S2	(N1H1)2S3
	813-838	YETFSDDPSPGAID S DNSLSEMTHFR*	2917.23	N		N1H1S1			
	839-858	PQLHHSGDMVFTPE SGLQLR	2248.11	N		N1H1S1	N1H1S2		
	863-872	LGTTA ATELK	1003.55	N	2N	N1H1S1	N1H1S2	(N1H1)2S2	(N1H1)2S3
	947-962	LLESGLMNSQESSWGK	1764.84	N		N1H1S2			
	1041-1049	KV T PLIHDR	1077.63	N		N1H1S3			
	1128-1136	QL V SLGPEK	969.55	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1297-1310	ISP N TSQQNFVTQR	1618.81			N1H1S1	N1H1S2		
	1297-1310	ISP D TSQQNFVTQR*	1619.79	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1331-1342	IIVDDTSTQWSK	1391.69	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1346-1360	HLTPSTLTQIDYNEK	1758.88	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1363-1376	GAITQSPLSD C LTR	1518.73	N		N1H1S1	N1H1S2		
	1393-1406	VSSFPSIRPIYLTR	1634.91	N		N1H1S1	N1H1S2	(N1H1)2S2	
	1458-1473	EVGSLGTSATNSVTYK	1612.79	N	2N	N1H1S2			
	1474-14987	KVENT V LPKPDLPK	1576.92	N		N1H1S2			
	1504-1534	DLFPTET S DGSPGHLDLVEGSLQGTGAIK*	3182.56	N	2N	not detected			
	1549-1556	VATESSAK	791.40	N		N1H1S1	N1H1S2		
1561-1577	LLDPLA WDNHYG T QIPK	1980.01	N		N1H1S1	N1H1S2			

*, 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

輸血用血液製剤の更なる安全性の向上に向けて導入の検討が進められているリボフラビンを用いた病原体不活化技術について、病原体不活化能、及び、血小板への影響の観点から、有用性と解決すべき課題について検討した。また、有害作用発生に関与する可能性がある製剤成分 IgG への不活化処理の影響評価を行った。

(1) 病原体不活化能に関する調査研究

リボフラビン法は、一般には不活化が困難であるとされる小型ノンエンベロープウイルスを含めウイルス不活化が可能であること、細菌や寄生虫の不活化も可能であることが示されており、検査が実施されていない病原体による有害事象発生のリスク低減に資するものと考えられた。

(2) 血小板への影響に関する調査研究

リボフラビン法による不活化処理後、活性化型 GPIIb/IIIa 陽性率が一時的に上昇し、その後、経時的に p-セレクチン陽性率が上昇することが報告されている。p-セレクチン陽性率の上昇は、血小板活性化につながる変化が製剤中で生じていることを反映していると考えられることから、p-セレクチン陽性の血小板を投与することの安全性を評価すると共に、血小板活性化につながる製剤品質特性の変化を明らかにする必要があると考えられた。

(3) 製剤成分 IgG への影響評価

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ため、リボフラビン・UV 処理がヒト IgG の機能に与える影響を検討した。ヒト血清にリボフラビンを添加して紫外線を照射し、血清に含まれる IgG の Fc γ 受容体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。次に、この機能変化がリボフラビン・UV 処理に伴い生じ得る酸化が関与している可能性を考え、IgG の酸化がその機能に及ぼす影響について検討した。酸化剤処理を施したモデル IgG では、抗原結合能に変化は認められなかったが、エフェクター細胞の活性化に関与する Fc γ 受容体活性化能の低下が認められ、酸化により IgG による免疫応答が減弱する可能性が示唆された。これらの結果から、病原体不活化に伴い生じ得る酸化により、IgG の機能が変化するものの、免疫細胞活性化能は減弱する傾向となると考えられた。また、リボフラビン・UV 処理では、酸化とは異なる IgG 機能変化が認められていることから、酸化以外の構造変化が生じている可能性が示唆された。病原体不活化処理を施した製剤の安全性評価では、製剤成分の構造及び機能が変化している可能性を踏まえた評価が必要である。

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、平成 20 年度には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。さらに同年、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（平成 21 年 12 月 10 日血液事業部会運営委員会資料）。血小板製剤は、常温で浸透保存されるために細菌の混入及び増殖が問題となりやすく細菌感染症が発症した場合に重篤化しやすいため、細菌の不活化技術の導入による安全性向上や保存期間の延長の可能性が考えられている。

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、不活化技術導入の効果として期待されることは、献血検査が実施されていない病原体やスクリーニング検査で検出されなかった病原体の不活化、及び免疫応答により生じるとされている TRALI（輸血関連急性肺障害）等の有害作用発生頻度の低減である。

本研究ではこれらの背景を踏まえ、まず、リボフラビンを用いた血小板製剤の病原体不活化技術に関して、病原体不活化能および血小板への影響について検討し、導入の可否判断に必要な要件を考察した。次に、製剤中に含まれる IgG が、輸血用血液製剤投与に伴い生じる可能性のある TRALI 等の重篤副作用に関連する場合があるとされていることを踏まえ、病原体不活化処理がヒト IgG の機能に及ぼす影響を解析した。

B. 方法

B.1 リボフラビン法の病原体不活化能に関する調査研究

B.2 リボフラビンによる不活化工程の血小板への影響に関する調査研究

厚生労働省より公表されている薬事・食品衛生審議会の議事録及び配布資料、科学雑誌に掲載された論文、開発企業からの公開情報から情報を収集した。

B.3 製剤成分への影響評価

B.3.1 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、細胞を 50 μ M 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.3.2 リボフラビン存在下で UV 照射した IgG の Fc γ 受容体結合実験

ヒト血清に終濃度 50 μ M でリボフラビンを添加し、B.3.1 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。Fc γ RIIIa あるいは Fc γ RIIIa 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。

B.3.3 酸化剤処理抗体の機能評価に用いた抗体および細胞

ヒト IgG (抗 EGFR 抗体セツキシマブおよびパニツムマブ) は医薬品として販売されているものを購入して使用した。Fc γ 受容体発現細胞株 (Jurkat/Fc γ R あるいは Jurkat/Fc γ R/Luc) は RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清 (ニチレイ、終濃度 10%)、G418 (ナカライテスク、終濃度 1 mg/ml) およびハイグロマイシン (ナカライテスク、終濃度 0.5 mg/ml) を添加した培地を

用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ヒト扁平上皮癌細胞株である A431 細胞は DMEM/High Glucose (Invitrogen) にウシ胎児血清を添加した培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

B.3.4 ヒト IgG の酸化処理

ヒト IgG (抗 EGFR 抗体セツキシマブおよびパニツムマブ) を 5 mg/ml になるようリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に希釈し、tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) (和光純薬) を終濃度 5% で添加した。37°C で 3 時間インキュベーションし、PD Spin Trap (GE Healthcare) を用いた遠心による脱塩操作を 2 回行い、tBHP を除去した。

B.3.5 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によるヒト IgG の結合活性測定

B.3.5.1 FcRn 結合親和性の測定

組換えヒト FcRn 細胞外ドメイン原液を酢酸ナトリウム緩衝液 (10 mM, pH 5.0) で希釈して、アミンカップリングによりセンサーチップ CM5 のフローセル (Fc) 2, 3, 4 に固定化した。ランニングバッファーは、50 mM sodium phosphate / 150 mM NaCl [pH 6.0]、再生バッファーは、100 mM Tris / 200 mM NaCl [pH 8.0] を用いた。アナライト (ヒト IgG) は、ランニングバッファーを用いて各 5 濃度の 2 倍系列希釈液を調製し、670、335、168、84、42 nM とした。流速は 30 μ l/min とし、各フェーズの時間は、結合 2 分、解離 2 分 30 秒とした。データは BIA evaluation software を用い、bivalent analyte RI=0 モデルにより解析した。

B.3.5.2 抗原結合親和性の測定

ヒト抗体キャプチャーキット (GE healthcare) を用い、アミンカップリングにより抗ヒト IgG 抗体をセンサーチップ CM5 に固定化した。ランニングバッファーには HBS-EP+ (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% Surfactant P20, pH 7.4) を用いた。抗 EGFR 抗体は 0.1 μ g/ml、

EGFR (Prospec) は、2.5, 5, 10, 20, 40 nM に希釈した。再生バッファーは 3 M の $MgCl_2$ を用いた。流速は 30 μ l/min、各フェーズの時間は、キャプチャー1分、結合 5分、解離 10分とした。データは BIA evaluation software を用い、1 : 1 モデルにより解析した。

B.3.6 Cell-based Binding Assay

Jurkat/ Fc γ R 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% NaN_3) で洗浄した後、セツキシマブあるいはパニツムマブを各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた。細胞を染色バッファーにより洗浄した後、DyLight488 標識した F(ab')₂ anti-human IgG F(ab')₂ (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二回洗浄を行い、7-AAD (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) による解析を行った。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、生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出した。

B.3.7 Bridging-Luciferase Assay

A431 細胞を 96 穴プレートに播種し (一点あたり 2×10^4 個)、24 時間培養後、培地を取り除き、OPTI-MEM (Invitrogen) に懸濁した Jurkat/Fc γ R/Luc 細胞 (一点あたり 1×10^5 個) を添加した。各ウェルにセツキシマブあるいはパニツムマブを各濃度で添加後、37°C で 5 時間培養した。その後、各ウェルにルシフェラーゼの発光基質である ONE-Glo Reagent (Promega) を加えて懸濁し、発光プレートリーダーを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト血清や培養細胞は、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 リボフラビン法の病原体不活化能に関する調査研究

C.1.1 リボフラビンを用いた病原体不活化技術の概略

Stramer らの総説¹⁾を参考に、リボフラビンを用いた病原体不活化技術の概略を述べる (図 1)。リボフラビンを用いた不活化システムは、紫外線照射用バッグ、リボフラビン溶液、紫外線照射装置から構成される。不活化のための操作としては、まず、血液製剤を紫外線照射用のバッグに移し、500 μ M のリボフラビン溶液 35mL を添加する。次に、バッグを紫外線照射装置に入れ、265~370nm の紫外線 (6.2 J/cm²) を 6~10 分間照射する。リボフラビンはビタミン B であり、その代謝物も血中に存在するものであること²⁾、リボフラビンやその代謝物に毒性はないと考えられていることから³⁾、照射後にリボフラビンを除去する工程は設けられておらず、不活化処理後にそのまま製剤として用いられる。

リボフラビン法による病原体不活化には、紫外線による核酸損傷効果と、光励起リボフラビンと核酸塩基対の接触による電子移動反応に基づく核酸 (主としてグアニン) 損傷の 2 つの機構が関与しているとされている⁴⁾。血小板製剤に含まれ、免疫応答の原因となる白血球は、有核細胞であることから、リボフラビンおよび紫外線照射により不活化されるとされている。リボフラビンの光照射により活性酸素種が発生する可能性があるため⁵⁾、Mirasol システムでは処理前に袋を真空状態にし、核酸に結合した状態のリボフラビンを活性化させる波長の光を選択することで、活性酸素種の発生を防ぐ仕組みになっているとされているが、活性酸素種が生じないことを示した報告はない。

リボフラビンを用いる不活化法に関しては、上

記の第一世代に続き、血漿除去により高濃縮した血小板にリボフラビンを添加して不活化処理を行い、処理後に血小板用添加液（PAS）を加える第二世代、さらに、採血時に PAS 置換してリボフラビンを添加し不活化処理を行う第三世代の方法も開発されている。これら第二世代、第三世代の方法では血漿を別に多く確保できる利点があるが、現在我が国の献血事業で用いられている採血機器とは異なる機器が必要である。そのため、我が国に血液事業に採用する場合は、新たな採血機器を導入せずに実施が可能な第一世代が現実的であると考えられている⁶⁾。

C.1.2 リボフラビンの病原体不活化能

輸血用血液製剤に混入する可能性がある病原体には、ウイルス、細菌、寄生虫が考えられる^{1) 7-10)}。これらのうち、献血時に全ての検体について検査が実施されているのはウイルスの一部であり、無菌試験は血清生化学検査で規格外となった製品を利用して実施されている。

C.1.2.1 ウイルス不活化

リボフラビン法のウイルス不活化能に関しては、製剤に混入する可能性のあるウイルスを念頭に、試験するウイルスが選択され不活化が可能か調べられている。部会参考資料¹¹⁾として報告されている不活化能の試験結果を、バイオ医薬品のウイルス安全性確保の考え方と同様に、関連ウイルス、特異的モデルウイルス、及び非特異的モデルウイルスに分類して記す。

（*はノンエンベロップウイルス。数字はクリアランス指数（log）を示す。）

・関連ウイルス

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）：5.9

西ナイルウイルス（WNV）：5.2

*A型肝炎ウイルス（HAV）：2.0

B型肝炎ウイルス（HBV）：2.5

インフルエンザウイルス：>5.3

・特異的モデルウイルス

*豚パルボウイルス：>5.0

シンドビスウイルス：3.2

・非特異的モデルウイルス

脳心筋炎ウイルス（EMCV）：3.2

牛エンテロウイルス（BEV）：3.0

これらの結果から、リボフラビン法により、輸血用血液製剤に混入する可能性のあるウイルスを不活化できることが分かる。また、HAV やパルボウイルス等、不活化が難しい小型ノンエンベロップウイルスを不活化できる点がリボフラビン法の特徴の一つであるとされている。パルボウイルスのクリアランス指数はエンベロップウイルスに匹敵するレベルであり、同様の結果が文献でも報告されている⁸⁾。わが国で実施されている献血サンプルのウイルス検査は、HBV、HCV、HIV、HTLV-1、ヒトパルボウイルス B19 で計 5 分類であるが、ウイルス検査での検出が困難なウィンドウ期があることや、これらのウイルス以外の混入の可能性を考えると、リボフラビンによる不活化は、ウイルス混入リスクの低減に有効であると考えられる。

C.1.2.2 細菌不活化

細菌感染症は輸血用血液製剤の使用に伴って生じる有害事象の中でも最も重大なものであり、海外での汚染の発生頻度は 0.08~0.22%（1：1230~1：454）との報告もある¹²⁾。特に、血小板は 20~24℃で浸とうしながら貯蔵するため、細菌が増殖しやすいという問題がある。我が国では、輸血用血液製剤の無菌試験は、生化学検査で規格外となった製品を利用して実施されているが、GMP 適合条件下で出発原料から製造される一般の医薬品と比較すると、輸血用血液製剤の原料である血液の採取状況は個々の採血の状況により異なるため、一部の製品の検査で全製品の無菌性を保証することは困難である。また、白血球除去フィルター導入前は、製剤中に含まれる白血球の殺菌作用により細菌の増殖が抑えられていたが、現在では免疫反応による有害事象発生を低減するた

め白血球除去フィルターを用いた白血球除去が行われており、白血球による細菌の増殖抑制が望めなくなっている。これらのことを考えると、不活化技術の導入は、輸血用血液製剤からの細菌感染リスクの低減のために一定の有効性があると期待されている。

リボフラビン法に関して文献では、製剤に混入するリスクのある黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、セレウス菌等のグラム陽性菌、及び大腸菌等のグラム陰性菌、計 13 種類 20 系統について、実際に起こりえる汚染レベルを考慮し、製剤あたり 20CFU 以下をスパイクして不活化効果を調べた結果が報告されている⁹⁾。リボフラビン法による各細菌の不活化試験結果 (%) に、これまでの血液安全監視により報告されている各細菌の汚染発生頻度を乗じた値を合計して算出した overall effectiveness は 98%とされている。

全ての検体での無菌試験の実施が困難であることを考えると、リボフラビン法による細菌不活化は輸血用血液製剤の安全性向上に貢献可能であり、無菌性の向上の観点からは血小板製剤では有効期間の延長が可能になることも考えられる。

C.1.2.3 寄生虫

寄生虫感染したヒトからの献血により、輸血用血液製剤を介して患者が寄生虫に感染するリスクがあるとされているが、寄生虫のスクリーニングは行われておらず、これまでに、トリパノソーマ、リーシュマニア、ファルシパルム (マラリア) などの感染例があるとされている¹¹⁾。リボフラビンによる寄生虫不活化のログリダクション係数として、リーシュマニアの原因となるドノヴァン・リーシュマニアでは 5.0 以上、マラリアの原因となるプラスモディウム・ファルシパルムでは 2.0 以上、シャーガス病の原因となるクルーズ・トリパノソーマでは 6.0 以上、ツツガ虫病の原因となるオリエンティア・ツツガでは 6.0 以上、バベシア病の原因となるバベシア・ミクロディでは 5.0 以上という試験結果が報告されている^{7, 10)}

¹³⁻¹⁵⁾。現在、献血時に寄生虫に関する検査は実施されていないため、不活化工程の導入は安全性の向上に有効であると考えられる。

C.2 リボフラビンによる不活化工程の血小板への影響

血小板は機械的な刺激や温度変化により活性化され、粘着や凝集を起こしやすくなるため、血小板製剤調製時には活性化を最小限にとどめる配慮が必要である。しかし、リボフラビンを用いた不活化処理を施された血小板製剤では、保存期間中に血小板が活性化されることが報告されている。

Perez-Pujol らの論文¹⁶⁾では、リボフラビンによる不活化処理をした血小板を用いて、保存 3 日目および 5 日目に血小板表面分子発現と血小板機能 (血管への接着・粘着・凝集) が検討されている。不活化処理を施した血小板では、血小板活性化マーカーである p-selectin、lysosomal integral membrane protein(LIMP)の血小板表面発現が経時的に上昇し、annexin V の結合も上昇している。紫外線照射量が高い方がその上昇は顕著である。しかし摘出ウサギ大動脈を用いた灌流実験により、血小板製剤中の血小板機能を調べた結果では、不活化処理による内皮下層への血小板の接着、粘着、凝集の上昇は観察されていない。高エネルギー紫外線照射群で 5 日目に接着、粘着、凝集の低下が認められたが、その他では血小板機能がほぼ保たれていることを示す結果となっている。文献上は、保存期間中に低下することが知られている血小板機能が、不活化操作により維持されている可能性が考察されており、血小板活性化が良い影響を与えていると考えられているようである。

上記文献では、対照群が“unilluminated”と記載されており、未処理検体であるのか紫外線照射をしない対照であるのかが明確でない。一方、本不活化技術を評価するための日本赤十字社の検討では、未処理検体を対照とした実験が行われている。図 2 は、平成 21 年 12 月 24 日血液事業部会

資料 4-6 として、日本赤十字社より報告されたデータをグラフ化したものである。図 2 (A) のデータでは、p-セレクチン陽性率の経時的な上昇が確認されているが、これは、初期活性化型 GPIIb/IIIa 陽性率の上昇が一過的であるのと好対照である (図 2(B))。図 2 (A)と(B)は、別ロットの検体について実施された試験結果であると考えられ、比較対象として適していない可能性もあるが、GPIIb/IIIa の活性化が不活化処理の際の物理的刺激による可能性が考えられる一方で、不活化処理後一定時間を経て上昇する p-セレクチン陽性率は、不活化処理後に生じる製剤中の環境変化を反映している可能性がある。

p-セレクチン陽性率上昇の他に、不活化処理した血小板の保存中には、グルコース消費量の増加、乳酸産生量の増加がおこることも報告されている¹⁷⁾。不活化処理後の保存期間中に ATP 含量の低下も認められたことから、 α 顆粒の放出等が原因となり ATP 消費が増加することが、グルコース消費や乳酸産生の増加の一因と考えられている^{18) 19)}。一方で、2-deoxyglucose の添加により解糖系の亢進を抑制しても、p-セレクチン陽性率の上昇は抑制されなかったことから、解糖系の亢進は p-セレクチン陽性率上昇の原因にはなっていないとされており²⁰⁾、p-セレクチン陽性率上昇の原因究明が不活化処理後の製剤中で起こっている変化を究明する上での重要事項と考えられる。これらの変化は不活化直後ではなく、保存期間中に生じているものである。保存期間中の pH 変動に関しては、文献により結果が異なっており、一定の見解が得られていない。

また、日本赤十字社からの報告⁶⁾によると、リボフラビン処理した血小板製剤中に凝集塊が検出されている。凝集塊はフィルターにより除去可能とされているが、凝集に至らずとも p-セレクチン陽性となった血小板は、患者の白血球活性化に関与する可能性も考えられるため、安全性に関しては十分な検討が必要であると考えられる。

これらの知見から、リボフラビンによる不活化

処理導入の可否判断のためには、p-セレクチン陽性血小板を投与することの安全性を検討する必要があると共に、p-セレクチン陽性率上昇につながる要因を解明し、品質の一定性確保の対策を講じる必要があると考えられる。また、血小板活性化の問題が解決されなければ、有効期間の延長は難しいと考えられる。

C.3 製剤成分への影響評価

C.3.1 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 μ M のリボフラビン存在下で、312 nm の UV を 5.3 J/cm² 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 3 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.3.2 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、Fc γ R 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可能性があることが知られているため、評価対象とする IgG の機能として、Fc γ R 結合性を選択した。

ヒト Fc γ R には、Fc γ R 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 4 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。

C.3.3 酸化処理がヒト IgG の抗原結合および FcRn 結合能に及ぼす影響

リボフラビン・UV 処理の際に、活性酸素種が発生し、製剤成分の酸化が生じる可能性があることを踏まえ、酸化による IgG 機能変化に関する検討を進めた。モデル IgG として、抗原結合や体内動態制御に関わる受容体 FcRn との結合に加えて、エフェクター細胞活性化能の評価が可能な抗 EGFR 抗体 (セツキシマブおよびパニツムマブ) を選択し、酸化剤 tBHP で処理した試料を調製した。

抗原および FcRn への結合を SPR 法により解析した結果を図 5 に示す。セツキシマブ、パニツムマブともに、酸化剤処理による抗原 (EGFR) 結合親和性の変化は認められなかった。一方、FcRn 結合親和性は、セツキシマブ、パニツムマブともに顕著に低下していた。

C.3.4 酸化処理がヒト IgG の Fcγ受容体結合能に及ぼす影響

抗 EGFR 抗体セツキシマブ (ヒト IgG1) ある

いはパニツムマブ (ヒト IgG2) を tBHP 処理により強制酸化した試料を用いて、Fcγ受容体発現細胞に対する結合能を検討した。セツキシマブは FcγRIIIa および FcγRIIIa 発現細胞に対して添加濃度に依存した結合を示し、その結合能に対する酸化処理の影響は認められなかった (図 6)。一方、パニツムマブは FcγRIIIa に対しては結合能を示さず、FcγRIIIa に対してのみ添加濃度に依存した結合を示したが、セツキシマブと同様に酸化処理による結合能の変化は認められなかった (図 6)。

C.3.5 酸化処理がヒト IgG の Fcγ受容体活性化能に及ぼす影響

酸化処理がヒト IgG による Fcγ受容体を介したエフェクター細胞の活性化に及ぼす影響を検討するため、Fcγ受容体およびカルシウムシグナル応答性のレポーター遺伝子を発現する細胞株 (Jurkat/FcγR/Luc) を用いた Bridging-Luc Assay を実施した。標的細胞として EGFR を高発現する A431 細胞を、エフェクター細胞として Jurkat/FcγR/Luc 細胞を用いて、セツキシマブあるいはパニツムマブによるエフェクター細胞の活性化を、ルシフェラーゼ活性を指標に検討した。FcγRIIIa を発現するエフェクター細胞を用いた際には、セツキシマブの添加によるエフェクター細胞の活性化が観察され、酸化処理による影響は認められなかった (図 7)。また、パニツムマブによる FcγRIIIa 発現エフェクター細胞の活性化は検出されなかった (図 7)。一方、FcγRIIIa を発現するエフェクター細胞を用いた場合には、セツキシマブおよびパニツムマブの添加によるエフェクター細胞の活性化が観察された。この際、セツキシマブによるエフェクター細胞の活性化は酸化処理により著しい減少が認められ、パニツムマブに関しても酸化処理による活性化能の低下が観察された (図 7)。

D. 考察

D.1 リボフラビン法の病原体不活性化能

輸血用血液製剤の安全性確保の対策に関しては、感染性因子混入の検出感度や精度の向上を目的とした試験法の改良を含め、継続的に改善が図られてきている。現在我が国では、献血された血液について下記の検査が実施されている。

- ・血液型検査
- ・生化学検査
- ・血球計数検査
- ・抗原・抗体検査：化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)
 - 梅毒血清学的検査
 - HBV (HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体)
 - HCV (HCV 抗体)
 - HIV (HIV-1、2 抗体)
 - HTLV-1 (HTLV-1 抗体)
 - ヒトパルボウイルス B19 (ヒトパルボウイルス B19 抗体)
- ・ウイルス検査：核酸増幅法 (NAT 法)
 - HBV
 - HCV
 - HIV

核酸増幅検査の導入とその後の改良（プールサイズの変更、試薬や機器の変更等）により、感染したウイルスが検出されないウインドウ期が短縮されるなど、安全性確保の対策は向上してきているが、依然としてウインドウ期は存在し、検査による安全性確保は完全なものではない。また、検査により検出できる病原体は特定のものに限られている。さらに、無菌性試験が実施されるのは一部の検体に限られており、寄生虫の検査は実施されていない。特に、血小板は製剤では保存条件が室温であるため細菌が増殖しやすいとされている。このような状況を考えると、病原体不活化技術の導入は輸血用血液製剤の安全性向上に有用性をもっていると考えられる。

しかし、病原体の不活化が安全性向上に貢献することは確かと考えられる一方で、輸血用血液製剤の安全性確保に関するこれまでの努力により、

我が国の輸血用血液製剤の安全性は、実際には極めて高くなっているという事実もある。平成 20 年 2 月 27 日血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会資料 2-1 によると、現在、ウイルス残存リスクは、HBV に関して 100 万件に対して 7 件 (0.0007%)、HCV 及び HIV ではいずれも 100 万件に対して 0.09 件 (0.000009%) である。また、細菌の残存リスクは症例がわずかであるためリスクの推定が困難とされるレベルとなっている。ちなみに FDA は現在検討されている不活化技術に対して、現在高感度に検査が実施されているウイルス等についてウインドウ期等の理由により残存しているリスクを低減化するために導入することはリスクベネフィットの観点からは否定的であると報告している。

感染性因子混入のリスクを完全に回避できる不活可能の程度を定めることは困難であり、リボフラビンの不活化能が十分であるかを判断することは難しいが、製造工程中にウイルス不活化処理が導入されている血漿分画製剤の場合は、ウイルスに関して 9 log のクリアランスがあればよいとされていること²¹⁾、ウイルス血症の最大値がパルボウイルスでは $10^8 \sim 10^{12}$ gEq/mL に達する可能性がある¹¹⁾ことを考えると、リボフラビンによる不活可能として報告されているクリアランス（例えば、ブタパルボウイルスに対して 5 log 以上）で十分であるとは言い難い。すなわち、リボフラビン法による不活化により病原体混入リスクは低下し、安全性向上が期待できるものの、不活化能は完全ではなく、依然として感染性因子混入のリスクはなくなる。したがって、現状では極めて低い病原体混入リスクをさらに低下させるために、製剤中に新たな成分を添加する不活化技術を導入することに関しては慎重な対応が必要である。

D.2 リボフラビン法による不活化工程導入の安全性への影響

血小板製剤の有効成分である血小板機能への

影響に関しては、C.2 に述べた通りである。不活化技術の安全性に関しては、その他に、リボフラビンやその代謝物の影響も考慮する必要がある。リボフラビンはビタミン B2 であり、生体内に存在する物質であること、光照射により生じる主要な代謝物（2'-ketoflavin, 4'-ketoflavin, formylmethylflavin, lumichrome）についてもリボフラビン処理していない血液中に検出される成分であるとされ²⁾、不活化後の除去操作が不要とされている。ただし、リボフラビンとその代謝物は生体内に元来存在する物質であるとは言え、その含量はリボフラビン処理後には未処理検体の約 1000 倍になるため³⁾、多量に含まれる場合にその代謝産物を含めた安全性への影響は十分に検討が必要と思われる。

一方、リボフラビンによる不活化を実施した製剤の投与により、ヒトに取り入れられるリボフラビンの量は、リボフラビンの濃度が 500uM、リボフラビン溶液の体積が 35mL リボフラビンのフォトコンバージョンが 18% であるという前提のもとで、ヒトの体重を 70kg とすると、輸血ごとの暴露量が 0.077 mg/kg になると算出されている¹¹⁾。FAO/WHO により定められた食品中リボフラビンの一日摂取許容量は 0.5mg/ kg / day である³⁾。血液中への投与と、食物としての摂取という違いはあるが、少なくとも、不活化した製剤中に含まれるリボフラビンの量は一日摂取許容量を超えていないとは言える。

これまで、リボフラビン及びその代謝物に問題となる毒性は検出されていない³⁾。しかし、リボフラビン及びルミフラビンの変異原性を調べた Kale らの 2 つの論文 "Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin A. Effect of metabolic enzymes. B. Effect of light"^{5, 22)} の一つでは、リボフラビンへの可視光照射により生成される活性酸素種には変異原性があると報告されている⁵⁾。リボフラビンを用いた不活化処理に際して発生する可能性のある活性酸素種に関しては、平成 20 年 5 月 23 日の血液事

業部会参考資料 4 の p.11 に記載があるが、その他には議論されていないようである。紫外線照射により発生する可能性のある活性酸素種と、Kale らの実験で生じていた活性酸素種の異同については明らかでないが、不活化処理の際にリボフラビン由来の活性酸素種が生じる可能性とその安全性への影響については、検討が必要かもしれない。

D.3 製剤成分 IgG への影響評価

D.3.1 リボフラビン・UV 処理が Fcγ受容体結合性に及ぼす影響

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 8 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²³⁾。

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²⁴⁾。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^{25, 26)}。

図 4 に示したように、今後さらに再現性を確認する必要はあるが、リボフラビン・UV 処理により、

FcγRIIa 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、FcγRIIa 結合性には影響がないことが報告されている²⁷⁾。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。FcγRIIa 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考慮する必要があるだろう。

D.3.2 酸化処理が抗原結合および Fc 受容体結合性に及ぼす影響

リボフラビン・UV 処理時に生じうる IgG の構造変化のうち特に酸化修飾に着目し、ヒト IgG の酸化がその機能に及ぼす影響について検討を進めた。ヒト血清中の IgG のサブクラスの割合は IgG1 が 65~70%、IgG2 が 20~30%、IgG3 が約 8%、IgG4 が約 2% とされているが、各々 IgG サブクラスの酸化がその機能に及ぼす影響については詳細な報告はない。そこで本研究では主要な IgG サブクラスである IgG1 および IgG2 の酸化が Fcγ受容体結合能および Fcγ受容体活性化能に及ぼす影響を検討するため、市販されている抗 EGFR 抗体医薬品であるセツキシマブ (IgG1) およびパニツムマブ (IgG2) をモデルとして実験を行った。

tBHP 処理により強制酸化したセツキシマブあるいはパニツムマブの抗原 (EGFR) 結合能を SPR 法により解析した結果、両者の抗原結合能に関しては酸化処理の有無による顕著な差は認められなかった。一方、血中 IgG の動態制御に関与するとされる新生児性 Fc 受容体 FcRn 結合能は

過去の報告と同様に酸化処理により著しく減少したことから、本研究で実施した tBHP による強制酸化により、IgG の Fc 領域に構造的な変化が生じていると考えられた。FcRn 結合親和性は、血中半減期に関連することが知られているため、酸化により IgG の血中半減期が短縮される可能性が考えられる。

次に、Fcγ受容体結合能について検討を行った。ヒト IgG1 は FcγRIIIa、FcγRIIa のどちらにも結合するのに対し、ヒト IgG2 は FcγRIIIa に対する親和性が低く、FcγRIIa と強く結合することが知られており、本実験においてもセツキシマブは FcγRIIIa、FcγRIIa に対する結合能を示したのに対し、パニツムマブは FcγRIIa に対してのみ結合能を示した。この際、何れの結合においても酸化処理による有意な差は認められなかったことから、ヒト IgG1 および IgG2 の酸化修飾は Fcγ受容体結合能に影響を及ぼさないと考えられた。

一般に、抗原に結合していない IgG の FcγRIIIa あるいは FcγRIIa に対する結合親和性は低く、抗原結合によりこれら受容体との親和性が増大することにより Fcγ受容体を介したエフェクター活性が発揮される。輸血用血液製剤の投与時にドナー由来の抗 MHC 抗体がレシピエントの MHC を認識することで免疫エフェクター細胞上の Fcγ受容体を活性化し、細胞傷害活性を発揮することが TRALI の発症メカニズムの一因であるという報告もあり、抗原結合に依存した IgG による Fcγ受容体の活性化が輸血用血液製剤の副作用発現に関与する可能性が考えられる。

Fcγ受容体を発現するレポーター細胞を用いてセツキシマブおよびパニツムマブの Fcγ受容体活性化能について検討した結果、結合実験と同様にセツキシマブでは FcγRIIIa および FcγRIIa、パニツムマブでは FcγRIIa の活性化が検出された。この際、酸化処理はセツキシマブによる FcγRIIIa の活性化には影響を及ぼさなかったのに対し、FcγRIIa の活性化を著しく低下させた。またパニツムマブによる FcγRIIa の活性化に関しても酸化