

201235040A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と
不活化法の開発に関する研究

(H24-医薬-一般-007)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリサイエンス総合研究事業

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と
不活化法の開発に関する研究

(H24-医薬-一般-007)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究
研究代表者 岡田 義昭 P 1-P 7

II. 分担研究報告

1. 赤血球製剤の保存方法の開発---赤血球性状に及ぼす保存温度の影響
柴 雅之 P 8-P10
2. 低温下における血小板活性化メカニズムの解明と保存への応用
寺田 周弘 P11-P15
3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発と不活化の評価法の改良
岡田 義昭 P16-P21
4. C型肝炎ウイルスを用いた血液製剤の不活化評価法の開発に関する研究
下池 貴志 P22-P28
5. 末梢単核球由来の赤芽球を用いたパルボウイルス増殖系の開発
野島 清子 P29-P31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P32

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究
研究代表者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

1. 大規模災害等で赤血球製剤の温度管理が不能になった場合を想定して種々の温度に保管し製剤の性状を解析した。温度が高い程、影響は大きかったが 10°C で 72 時間放置した場合 *in vitro* の品質に大きな影響は認められなかった。
2. 高周波散乱光法を用いて保存温度と血小板の形態を検討したところ、冷却によって血小板の形態は変化するが再加温によって復帰可能な可逆性を有していることが判明した。冷却時間が長いと冷却温度に関係なく可逆性は低下した。
3. 紫外線照射による赤血球の病原体不活化において赤血球のダメージを少なくするためにビタミン C (VC) の効果を検討した。VC 添加によって不活化効果は著明に減少したが、洗浄して VC を取り除いた後に照射することによって不活化効果は回復した。VC は、赤血球保護剤として有用であることが示唆された。
4. エキソソーム精製試薬を用いてアルブミン液に添加したウイルスを回収したところ、感染性を有したウイルスが沈殿中に濃縮されることがわかった。この方法は、低速遠心機があれば、簡便にウイルスを感染性を有したまま濃縮できる。
5. 培養可能な C 型肝炎ウイルスクローンを用いて 60°C の液状加熱による不活化を行なったところ、効果的に感染性は減少したが HCV 遺伝子の量は保たれた。また、アルコール分画において 4°C と -5°C では HCV の不活化される速度に差が認められた。
6. 末梢血単核球から誘導した赤芽球にパルボウイルス B19 (以下 B19) を感染させたところ B19-DNA の複製とウイルス抗原の発現を認め、従来から感染性評価に用いられてきた白血病細胞株よりも実際の B19 感染を反映した系だと考えられた。

	分担研究者		中央血液研究所 係長
柴 雅之	日本赤十字社血液事業本部	野島 清子	国立感染症研究所 研究員
	中央血液研究所 課長	下池 貴志	国立感染症研究所
寺田 周弘	日本赤十字社血液事業本部		主任研究官

A. 研究目的

本研究は、大規模自然災害や輸血を介して感染する感染症のパンデミックが発生した場合に備えて、1) 輸血用の血液を備蓄するための保存技術の開発、2) 輸血用の血液製剤における病原体不活化法の開発、及び不活化評価法の開発を行い、輸血用血液の供給と安全性の確保をはかることを主な目的としている。赤血球製剤の保存に関しては、今年度は自然災害による停電等で適正な保管および輸送温度を保てない場合が発生する。このような通常の温度条件(2~6℃)と異なる温度で保存した場合の赤血球製剤の性状について把握するために赤血球濃厚液-LR「日赤」(RCC-LR)の性状に影響を及ぼす温度および放置時間について検討を行った。また、血小板の保存技術開発では、血小板の形態変化が機能変化と関連していることから高周波散乱光法を用いて低温下での血小板の活性化メカニズムを解明し、低温保存への応用を目指す。4℃での保存は困難であっても細菌の増殖が抑えられる温度で保存できれば安全性向上に大きく寄与する。また、病原体に対する安全対策として問診や各種の病原体に対するスクリーニング検査が導入され、安全性は飛躍的に向上したが、検査のすり抜けや新興・再興感染症のアウトブレイクなどスクリーニングだけで血液製剤の安全性を確保することは限界がある。本研究班では、最も重要な赤血球製剤の病原体不活化法の開発を目指し紫外

線照射による病原体不活化法の開発を目指す。

また、C型肝炎ウイルス(HCV)やパルボウイルスB19(B19)など*in vitro*における良い培養系がないウイルスは、動物由来の培養可能なウイルスがモデルウイルスとして病原体の不活化の評価に用いられている。近年、HCVの培養が可能なウイルス株が作成されたので、これまでモデルウイルスとして使用されてきたウシ下痢症ウイルス(BVDV)との各種ウイルス不活化法における相違を解析する。B19の感染系としては、白血病細胞株を用いた系があるが、この系ではB19-DNAの複製やウイルスタンパク質の発現はない。より実際のB19感染に類似した感染系の確立を目的に研究を行った。

B. 研究方法と結果

1. 赤血球製剤の保存方法の開発

大規模災害時において血液を安定供給するには、血液製剤輸送時あるいは保存時の温度等の逸脱した場合の性状について現在の製剤で検討しておく必要がある。そこで、現行の血液製剤が停電等で温度管理が不能になり室温で保管された場合の影響を検討した。赤血球製剤RCC-LRを4、10、15、20、25、30℃の各温度条件で96時間保存し、pH、ATP濃度、2,3-DPG濃度、上清Hb濃度、血球関連試験及び赤血球形態について検討した。pHは温度に依存して低下した。ATP濃度は15℃までは影響が

みられず、20℃以上で温度に依存して低下した。2, 3-DPG 濃度は温度に依存して低下し、特に 20℃以上で著しく低下した。また、上清 Hb 濃度は 25℃までは影響はみられなかった。RCC-LR は 10℃, 72 時間程度放置しても、in vitro における品質には大きな影響を認めなかった。また、一過性に温度管理が不能となりその後電気の復旧等で再度 4℃の保管が可能になった場合の影響を解析した。保存温度および時間に依存して ATP 濃度および 2, 3-DPG 濃度は減少し、上清 Hb 濃度は上昇した。

2. 低温下における血小板活性化メカニズムの解明と保存への応用

細菌汚染防止の観点から、濃厚血小板製剤は低温での保存が望ましい。しかし、低温に曝された血小板は生体内寿命が短くなるため実用化されていない。この低温による寿命の短縮は血小板の形態変化と深く関係していると言われている。そこで、低温下における血小板活性化メカニズムを解明するため、開発した高周波散乱光法を用いて冷却が血小板形態へ及ぼす影響について検討した。その結果、冷却による形態変化には再加温で復帰可能な可逆性があることがわかった。冷却時間が長くなると、可逆性は冷却温度に関係なく低下したが、冷却温度が高いほど維持されていた。冷却温度を高めれば、低温下における活性化を軽減できる可能性が示唆された。

3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発と不活化の評価法の改良

赤血球製剤では、実用可能な病原体の不活化法は開発されていないが、我々はこれまでの研究によって紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化が可能であることを示した。不活化効果を高めるためには照射量を増加させることが必要だが、同時に赤血球の障害が増加することが予想される。そこで赤血球へのダメージを少なくするための赤血球保護剤が必要になる。そこで強力な抗酸化剤であるビタミンC(以下VC)を添加して不活化効果を検討した。なお、不活化の評価にはHCVのモデルウイルスであるウシ下痢症ウイルス(BVDV)を用いた。結果として、1) VC添加によって不活化効率が著明に減少し、ほぼ無処理と同等に低下した。2) VCを添加し赤血球にVCを取り込ませた後に遠心で赤血球を浮遊させている溶液からVCを除去し、紫外線照射すると不活化効率は回復した。以上から紫外線照射による病原体不活化は活性化酸素を介した機序が考えられた。また、VCの添加によって赤血球の溶液中に存在するウイルスは活性化酸素から保護され不活化されなくなるが、赤血球内にVCを取り込ませることによって赤血球を保護し、ウイルスのみを不活化することが可能であった。赤血球の保護剤としてVCは有用であることが判明した。

また、不活化法の評価のためには、高い感染価のウイルス液を得る必要がある。こ

れまでは超遠心法や限外濾過法などを用いてウイルスを濃縮していたが、ウイルスによっては濃縮操作によって失活してしまうこともある。今回、市販のエキソソーム精製キットを用いて5%アルブミンに添加したBVDVを沈殿として回収したところ、沈殿中に BVDV が濃縮され、しかも高い感染性を有していることを明らかにした。

4. C型肝炎ウイルスを用いた血液製剤の不活化評価法の開発に関する研究

C型肝炎ウイルス (HCV) は JFH-1 を細胞にトランスフェクションし、培養上清中に産生されるウイルスを集めた。ウイルスは、さらに限外濾過カラムを用いて濃縮し、感染価の高い HCV を作製した。これまで HCV のモデルウイルスとして不活化の評価に使用されてきたウシ下痢症ウイルス (BVDV) についても不活化法に対する感受性の HCV との相違を検討するために、同じ実験を少なくとも3回繰り返し、それらの結果の平均、及び標準偏差を示した。

1. アルブミン中の 60°C 液状加熱により HCV は効率よく不活化されることは、これまでに示したが、このときの HCV RNA がどのようになっているのか解析した。アルブミン製剤に HCV を添加し 60°C で 10 時間の液状加熱によって HCV の感染性は 5.7Log 減少したが、HCV RNA は全く分解されないことが明らかとなった。この結果より HCV の液状加熱による HCV の感染価の減少はゲノム RNA の分解ではなく、ウイルス蛋白質の変

化 (変性、分解など) と考えられた。

2. 8%、及び 40%エタノール添加による HCV の不活化の評価は 4°Cで行ってきたが、今回、Cohn のフラクションで用いられている -5°Cで評価を行った。同時に HCV のモデルウイルスとして用いられてきたウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の場合と比較した。その結果、HCV は-5°Cで、40%エタノール処理5時間で5.9Log 感染性が減少することが明らかとなった。エタノール処理においては、BVDV も HCV と類似した挙動であることが明らかとなった。ただ、40%エタノール処理時の温度を 4°Cで行なった場合、HCV の感染性が-5°Cの場合より、より速く減少することが明らかとなった。

5. 末梢単核球由来の赤芽球を用いたパルボウイルス増殖系の開発

パルボウイルス B19 (以下 B19) は in vitro で増殖させることは困難であるが、全血から分離調整したバツフィコート (Filippone (PLoS one 2010.e9496)らの報告に従って培養したところ、実験に使用できる十分な細胞数の赤芽球細胞を得ることができた。得られた赤芽球細胞は、B19 に感受性を示し、感染細胞において B19-DNA の複製とウイルスタンパク質の発現が確認できた。従来の白血病細胞株では RNA への転写が確認されたが B19-DNA の複製やタンパク質への翻訳は確認できなかった。PBMC から誘導した赤芽球を用いた感染系は実際の B19 感染を反映している系と

考えられた。

C. 考察

大規模自然災害等が発生した場合、電気や水道のライフラインが破壊され、輸血用血液の温度管理が不可能になり被災地では新たな採血も不可能な状態になることが予想される。被害を受けなかった地域からの援助物資が届くまで各医療機関では、手持ちの輸血用血液を使用せざるを得ない。どの程度室温で品質が維持されるのか検討した。室温によって影響は異なるが、10℃では72時間でも *in vitro* のデータからは品質に大きな影響は認められなかった。一方、20℃を超えると影響が大きくなることが示された。災害は何時発生するのか予知することは困難であり、輸血用血液を備蓄することはリスク管理からも必要である。既に稀な血液型の血液は凍結保存されているが、通常の血液型を同様に凍結保存するとなると膨大な費用がかかる。赤血球製剤は現状の保存液を用いて4℃保存では42日間（エルシニア感染の対策として21日で運用）有効であるが、4℃よりも低い凍結しない程度の温度で保管すれば有効期間を延長できる可能性がある。それによって在庫が多くなるが、災害時に速やかに供給できるメリットが生じる。次年度から赤血球の性状を解析しながら保存条件を検討する計画である。

また、血小板の保存方法では、現在の技術では室温保存のため細菌感染が大きな問

題となっている。他の製剤並みに4℃で保存できれば、大いに安全性の向上が期待できる。4℃での保存は血小板の機能から無理だとしても細菌の増殖を抑えられる温度での保存が可能であれば、有用な方法となる。血小板は低温に曝されると活性化することが問題であり、活性化を許容できる範囲に抑えられる温度を見いだすことが重要である。活性化によって血小板の形態が変化することから形態の変化を客観的に評価できる高周波散乱光法を用いて低温での血小板の活性化メカニズムと保村法への応用を目指す。

赤血球の病原体不活化法は、今だ実用的な方法は開発されていない。我々が用いている紫外線による不活化は赤血球製剤に添加した様々な病原体を不活化することはできる。しかし、紫外線照射による赤血球に与える障害については解析していない。今回VCを添加することによって赤血球は守られたが、不活化効果も消失してしまった。赤血球にVCを添加して1時間程静置後、上清中のVCを遠心によって取り除くことによって不活化効果が回復させることに成功した。これは静置することによって赤血球細胞の中にVCが入り赤血球を守り、細胞外のウイルスはVCがないために不活化されたと推定できる。より効果的な病原体不活化を実施する場合、赤血球を保護する保護剤の1つとしてVCは有用であることが判明した。

また、エキソソーム精製試薬によるウイルスの簡便な精製法は、ウイルスが小胞に

放出される場所でエキソソームも同様に放出されるためウイルスとエキソソームの性状は類似しているかもしれないとの予想に基づいて行なった実験である。ウイルスが濃縮されただけでも有用な方法と思われたが、感染性を保持したまま濃縮できることから不活化法の評価域が少なくとも 1 Log 拡大することが期待できる。

HCV の培養系を用いた不活化法の評価では、液状加熱によって感染性は著明に減少するもののウイルス核酸の量に変化はなく、不活化されてもウイルス核酸はよく保存されていることが判明した。また、Cohn のフラクションで用いている -5°C は 4°C よりも不活化速度が抑制されることが判明した。反応温度が高いと過剰に評価される可能性が示された。

また、B19 の感染評価系では末梢単核球から誘導した赤芽球はB19に高感受性を示し、感染すると B19-DNA の複製やウイルス抗原の発現が認められた。無処置の健康人からの末梢単核球から誘導できることから B19 の感染性の評価に大いに役立つと考えられる。原料血漿における基準として米国では 10^4IU/mL 以下に定められている。一方、供血者の約 50%は B19 抗体が陽性であるため、多くの血漿が混ぜ合わされる原料血漿のプールにおいては B19 に対する抗体の評価も考慮する必要がある。さらに、これまで B19 のモデルウイルスとして用いられてきた動物由来のパルボウイルスと B19 とでは液状加熱処理に対する感受性が異なることが報

告されている。より科学的見地から B19 の安全性を評価しなければならないが、PBMC 由来の赤芽球を用いた感染系は、これらを評価する有用な方法になると考えられる。

D. 結論

1. 現行の保存液の赤血球製剤は 10°C 、72 時間では *in vitro* において品質に大きな影響は認められなかった。
2. 血小板を冷温保存後に再加温することで形態的に可逆的に変化することを明らかにした。
3. HCV の液状加熱による不活化は、感染性は減少するがウイルス核酸量は減少しなかった。
4. 紫外線による赤血球の病原体不活化において VC は赤血球の保護剤として有効であった。
5. 末梢血単核球由来の赤芽球は B19 の感染性の評価に有用である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J. Biosci Bioeng.* 2013.115(19): 104-10.

2) Miyauchi K,Urano E,Takeda S,Murakami T,Okada Y,Cheng K,Yin H,Kubo M,and Komano J. Toll-like receptor(TLR)3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012.424(3):519-23

3) Odaka C,Kato H,Ostubo H,Takamoto S,Okada Y,Taneich m,Okuma K,Sagawa K,Hoshi Y,Tasaki T,Fujii Y,Yonemura Y,Iwao N,Tanaka A,Okazaki H.Momose S,Kitazawa J,Mori H,Matsushita A,Nomura H,Yasoshima H,Ohkusa Y,Yamaguchi K,and Hamaguchi I.:Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan,A pilot study. Transfus Apher Sci. 2012 Sep.3

国内標準品の作成について、第 60 回日本輸血細胞治療学会、郡山、2012 年

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

2.学会発表

1) 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功：末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

2) 岡田 義昭：血液製剤のウイルス感染症対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

3) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭：血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

4) 水澤 左衛子、岡田 義昭：核酸増幅試験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際標準品の制定のための共同研究と日本の

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

赤血球製剤の保存方法の開発—赤血球性状に及ぼす保存温度の影響
分担研究者：柴 雅之
(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

研究要旨

大規模災害時において血液を安定供給するには、血液製剤輸送時あるいは保存時の温度等の逸脱した場合の性状について検討しておく必要があると考えられる。そこで、血液製剤の保存温度の影響について検討した。RCC-LR を各温度条件で保存した場合、pH は温度に依存して低下した。ATP 濃度は 15℃までは影響がみられず、20℃以上で温度に依存して低下した。2,3-DPG 濃度は温度に依存して低下し、特に 20℃以上で著しく低下した。上清 Hb 濃度は 25℃までは影響がみられなかった。RCC-LR は 10℃, 72 時間程度放置しても、in vitro における品質には大きな影響を認めなかった。

A. 研究目的

輸血用血液製剤はその品質を維持するために定められた貯法のもと保管され、不必要に保存温度の範囲外に曝してはならない。また、輸送時においても製品の安全性を担保しなければならない。しかし、大規模災害時には停電等で適正な保管および輸送温度を保てない場合があり得る。このような通常の温度条件 (2~6℃) と異なる温度で保存した場合の赤血球製剤の性状についても把握しておくことは重要である。そこで、赤血球濃厚液-LR「日赤」(RCC-LR)の性状に影響を及ぼす温度および放置時間について検討を行った。

B. 研究方法

同型 RCC-LR-2 を 3 本プールし混和後、200mL 用血液分離バッグ 6 本に再分割し、以下の条件下で保存した。(1)RCC-LR の品質に及ぼす温度依存的な影響をみるために 4, 10, 15, 20, 25, 30℃の条件で 96 時間保存した。(2) RCC-LR を 4℃保存するうち、保存温度が上昇し再度 4℃に保存した場合の影響をみるために、保存 6 日目、10℃, 24 時間、保存 6 日目、15℃, 24 時間、保存 17 日目、10℃, 24 時間、保存 17 日目、15℃, 24 時間、保存 7 日目、10℃, 72 時間血液を放置後、4℃に再度保存した。経時的にサンプリングを行い、pH 試験、ATP 濃度、2,3-DPG 濃度、上清 Hb 濃度、血球関連試験および赤血球形態について検討した。

C. 結果

(1)RCC-LR を各温度条件で保存した場合、pH は温度に依存して低下した。ATP 濃度は 15°C までは影響がみられず、20°C 以上で温度に依存して低下した。2, 3-DPG 濃度は温度に依存して低下し、特に 20°C 以上で著しく低下した。上清 Hb 濃度は 25°C までは影響はみられなかった。(2)4°C 保存中、保存温度が上昇し再度 4°C に保存した場合、保存温度および時間に依存して ATP 濃度および 2, 3-DPG 濃度は減少し、上清 Hb 濃度は上昇した。4°C 保存, 21 日目と同程度の ATP 濃度を示すのは、10°C, 24 時間放置で保存 20 日目、15°C, 24 時間放置で保存 19 日目、10°C, 72 時間放置で保存 18 日目であった。また、保存 28 日目における赤血球形態は良好であった。

D. 考察

大規模自然災害等に備えた新たな赤血球製剤の保存方法の開発を進めることは重要であるがまず、現行の赤血球製剤の性状について検討することとした。輸血用血液製剤はその品質を維持するために定められた貯法のもと保管され、不必要に保存温度の範囲外に曝してはならない。また、輸送時においても製品の安全性を担保しなければならない。しかし、大規模災害時においては停電等で適正な保管および輸送温度を保てない場合があり得る。このような通常の温度条件 (2~6°C) と異なる温度で保存した場合の赤血球性状についても把握してお

くことは重要である。そこで、赤血球濃厚液-LR「日赤」(RCC-LR)の性状に影響を及ぼす温度および放置時間について検討を行った。

Struss らは全血を 4、10、15、20、25 で保存した時の生体内生存率について検討している (Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch 1974, 101, 232-42.)。生存率が 70%となる日数で評価すると、26 日、13 日、8 日、4 日、4 日以下という結果であった。しかしこの全血にアデニンとグアノシンを添加すると赤血球中の ATP 濃度を保持し、10°C 保存で 26 日間の保存が可能なことを報告している。

Reid らは AS-5RBC を 4°C 保存中に 24 時間 25°C で放置した場合の赤血球生存率について報告している (Transfusion 1999, 39, 991-997.)。4°C、6 週間保存時の生体内寿命は $79 \pm 2\%$ であるが、保存 14 日目あるいは 28 日目に 24 時間 25°C で放置すると 5 週間保存時の生存率は各々 $76 \pm 2\%$ と保存期間が 1 週間短縮する。RCC-LR については、4°C で 42 日間の保存が可能である (生体内生存率 82% で ATP 残存率は約 50%)。しかし、低温で増殖するエルシニア菌の混入リスクが示唆されたことから現在では、有効期間を 21 日間と短縮し運用している。RC-MAP の生体内生存率は 42 日保存後で 82% であったが、ATP 濃度に関しては保存前の約 50% であった (Japanese J Transfusion Medicine 1991, 37, 404-410.)。保存 6 日目に 10°C あるいは 15°C に放置後再度 4°C で保存した今

回の検討結果をATP残存率で評価した。対照製剤の保存21日目のATP濃度は、保存前の70%であった、そこでATP濃度が70%となるのは10°C、24時間が保存20日、15°C24時間が保存19日、10°C72時間で保存18日という結果であった。本来有効期間中4°Cで保存すべきであるが、何らの事情により保管温度が上昇してしまい代謝が亢進し、ATPが消費されているが、これを有効期間の短縮と捉えることも可能と思われる。今回の検討における保存中に一過性に温度が上昇したRCC-LR保存18-20日目のATP残存量は70%とRC-MAPを42日間保存した場合の50%を上回っており生体内生存率については70%以上を保持している可能性がある。ATPの残存率のみで赤血球の生体内生存率を論じることはできないが、緊急避難的な使用においては検討に値するものと思われる。今回の検討では赤血球製剤の保存中における温度上昇の上限を15°Cとしたが(停電時に保管庫内に保管され温度上昇が少ないという想定)、室温(20-25°C)まで上昇した場合についても検討する。血液の長期保存を目的として、赤血球の物質代謝を抑制するため、0°C以下で保存する試みが報告されている。-5°Cくらいまでは凍結のおそれがないとされているが、保護効果を有する血漿存在下(全血)での検討でRCC-LRでは検討されていない。そこでRCC-LRをこれらの温度帯に保存した場合の赤血球性状についても検討する。赤血球輸血の本来の目的は

組織に酸素を供給することであることから、より有効な輸血とするためには、赤血球の酸素運搬能の向上が必要であるが、現行の赤血球保存液MAPでは2,3-DPGを維持できないことから、赤血球用保存液の改良を試みる。

E. 結論

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法の開発を進める上で、現行の輸血用血液の問題点を把握するためまず、停電等で保管温度を維持できなかった場合を想定した。RCC-LRは10°C、72時間程度放置しても、*in vitro*における品質には大きな影響を認めなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nogawa M, Naito Y, Chatani M, Onodera H, Shiba M, Okazaki H, Matsuzaki K, Satake M, Nakajima K, and Tadokoro K. Platelet components, Platelet concentrates, Platelet function, ApheresisParallel comparison of apheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions (投稿中)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の登録状況

なし

「大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究」
低温下における血小板活性化メカニズムの解明と保存への応用

分担研究者 寺田周弘 日本赤十字社 中央血液研究所 研究三課 研究一係長

研究要旨

細菌汚染防止の観点から、濃厚血小板製剤は低温での保存が望ましい。しかし、低温に曝された血小板は生体内寿命が短くなるため実用化されていない。この低温による寿命の短縮は血小板の形態変化と深く関係していると言われている。そこで、低温下における血小板活性化メカニズムを解明するため、開発した高周波散乱光法を用いて冷却が血小板形態へ及ぼす影響について検討した。その結果、冷却による形態変化には再加温で復帰可能な可逆性があることがわかった。冷却時間が長くなると、可逆性は冷却温度に関係なく低下したが、冷却温度が高いほど維持されていた。冷却温度を高めれば、低温下における活性化を軽減できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

濃厚血小板製剤 (platelet concentrate, PC) の需要は年々増加する傾向にあり、安全な製剤を安定して供給することは重要な課題である。現在、PC は室温 (22℃) で水平振とうしながら保存することと規定されているが、細菌汚染防止の観点から他の血液製剤同様、PC も低温で保存するほうが望ましい。しかし、低温に曝された血小板は活性化 (cold activation) して、輸血後の生体内寿命が短くなるため実用化されていない。この低温保存した血小板の生体内寿命の短縮は形態変化や膜組成の変化が深く関係していると言われている。血小板は循環血液中では disc (円盤) 状の形態をしているが、低温に曝露されると sphere (球) 状に丸くなり、偽足を伸ばす

などの形態変化をおこすことが古くから知られている。冷却した血小板の形態変化は低温下での活性化を解明する上で重要な血小板機能と言える。

一方、形態変化は活性化の指標として鋭敏であるが、凝集計のように標準的な測定手段はなく、客観的な評価は難しい。透過光や散乱光など光学的な手法を用いて形態変化の測定は試みられてきたが、凝集など二次的な反応も影響を及ぼすので形態変化のみの測定はできず、定性的な評価に留まっている。我々は、disc 状血小板比率と散乱光の高周波成分 (高周波散乱光) に良い相関がある点に着目し、形態変化のみを特異的に捕捉できる測定系を開発した。そこで今回、低温下における血小板活性化メカニズムを解明するため、開発した

高周波散乱光法を用いて冷却が血小板形態へ及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) 血小板試料の調製

血小板試料として、常法に従い採取した成分採血由来 PC を用いた。室温 (22°C) または低温 (4°C、10°C、15°C) 保存した PC 100 ~ 20 μ L を PBS に希釈浮遊させて散乱光測定用試料 (血小板最終濃度 8~10 \times 10⁴ 個/ μ L) とした。

2) 散乱光の測定

図 1 に高周波散乱光法を用いた形態測定の概略を示した。水冷ペルチェ型セルホルダを用いて温度制御しながら、一定攪拌下 (500 rpm) で約 1 分間、側方散乱光 ($E_x=635$ nm, $E_m=640$ nm) を測定した。散乱光の測定感度を向上させるため、受光部前にバンドパス・フィルターを取り付け、迷光をカットした。

3) 形態変化の評価

測定した散乱光データは攪拌する角速度とサンプリング時間に依存した周波数データとして周波数解析を行い、高周波散乱光成分 (0.5~3.0 Hz) を抽出した。抽出した散乱光成分の振幅の大きさ (*amp*) を形態変化の指標 (disc 状血小板比率) とした。*amp* は散乱強度の実効値として算出した。形態の可逆性は冷却前の *amp* を 1 とし、冷却、再加温後はその相対値で示した。

4) 形態の観察

4°C 冷却前後の血小板形態を確認するため、血小板を 1% パラホルムアルデヒド溶液で室温にて 1 時間固定後、微分干渉型顕微鏡 (Olympus, BX50) を用いて観察した ($\times 600$)。

C. 研究結果

1) 温度変化が形態へ及ぼす影響

採血→保存→輸血の三段階の温度変化を想定して、加温 (37°C) →冷却 (4°C) →

再加温 (37°C) したときの形態変化について高周波散乱光法を用いて測定した (図 2)。冷却前 37°C で加温した状態で *amp* は最も大きく、disc 状血小板比率が高いことを示した。4°C で 1 時間冷却後、*amp* は顕著に小さくなり、disc 状血小板の存在をほとんど示さなくなった。37°C で再加温すると *amp* は大きくなり、disc 状血小板への可逆的な形態復帰が認められた。しかし、冷却前レベルまで完全には戻らなかった。形態を顕微鏡で観察した結果は *amp* と同様な結果を示した。再加温した血小板中には oval (だ円) 状の血小板が多数存在した。

2) 冷却温度と時間が形態へ及ぼす影響

冷却温度と時間が可逆的な形態復帰に及ぼす影響をについて検討した (図 3)。加温 (37°C、30 分間) →冷却 (4、10、15、22°C、0~72 時間) →再加温 (37°C、30 分間) 後の形態変化を高周波散乱光法で測定した (各温度 $n=5$)。冷却 1 時間後の各温度における *amp* は、冷却前加温時の *amp* を 1 とし、4°C (0.70 \pm 0.13)、10°C (0.83 \pm 0.15)、15°C (0.90 \pm 0.37)、22°C (1.13 \pm 0.28) であった。冷却温度が低いほど、可逆的な形態復帰は低下した。冷却 72 時間後の各温度における *amp* は、4°C (0.18 \pm 0.02)、10°C (0.23 \pm 0.02)、15°C (0.41 \pm 0.02)、22°C (0.64 \pm 0.18) であった。冷却時間が長くなるにつれて、可逆的な形態復帰は冷却温度に関係なく低下したが、冷却温度は高いほど維持されていた。

D. 考察

高周波散乱光を用いて、cold activation の指標である血小板の形態変化を測定した。4°C 冷却後、再加温すると形態は可逆的に約 70% 復帰した。ただし、散乱光法と顕微鏡観察の結果はともに形態が完全に元に戻らないことも示した。冷却による形態変化には可逆的な変化と不可逆的な変

化が存在しているようだ。高周波散乱光法は、形態の可逆性を客観的に評価できる。

さらに我々はこの形態の可逆性には冷却温度と冷却時間により大きく変わること示した。可逆性は冷却時間が長くなるにつれて冷却温度に関係なく低下したが、冷却温度が高いほど維持されていた。図 4 に示すように冷却温度が 10~15℃以上であればある程度、形態の可逆性を維持することは可能かもしれない。この形態の可逆性が低温保存した血小板の生体内寿命とどのような関係があるのかは明らかではない。しかしながら、冷却温度を高めにするすることで cold activation を軽減できる可能性は示唆された。cold activation を軽減でき、細菌増殖をある程度、抑制できる至適な冷却温度を見つかれば、新たな低温

保存法の開発へ繋がるかもしれない。

E. 結論

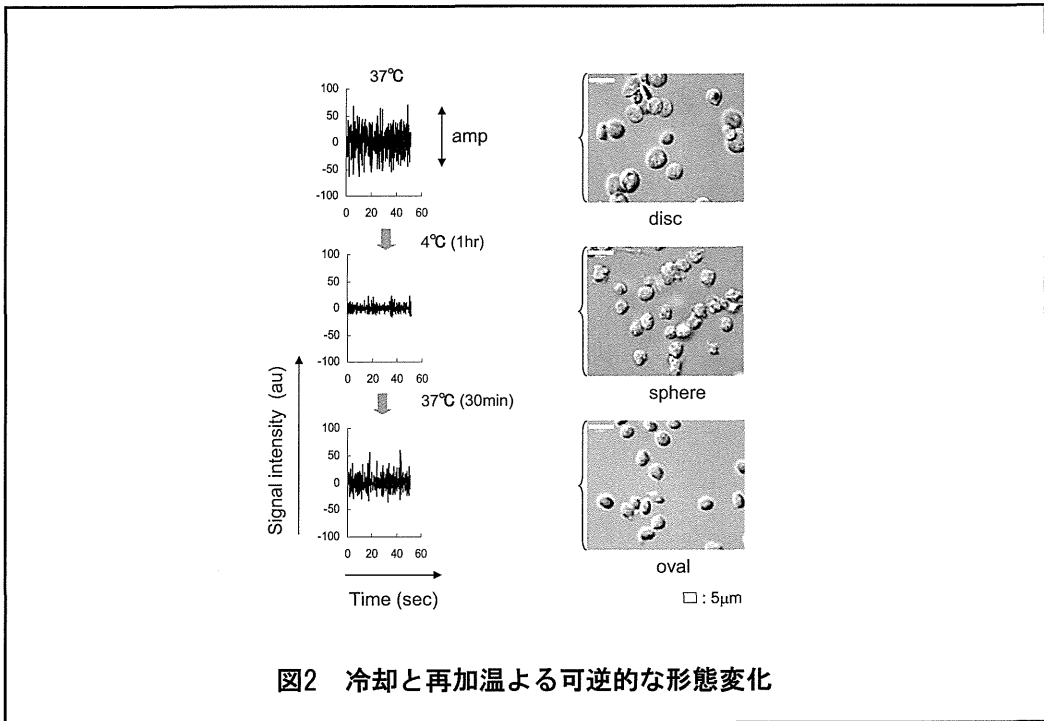
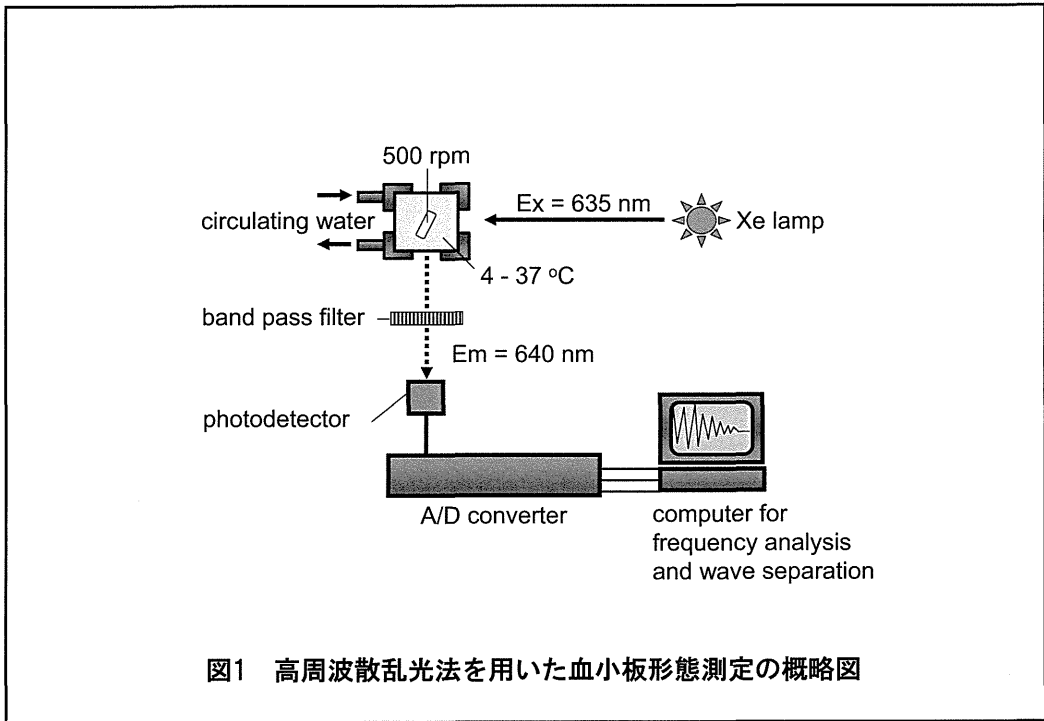
冷却によって生じる形態変化には再加温により復帰可能な可逆性があった。形態の可逆性は冷却時間が長くなるにつれて冷却温度に関係なく低下したが、冷却温度が高いほど維持されていた。冷却温度を高めにするすることで cold activation を軽減できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

発表予定である。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



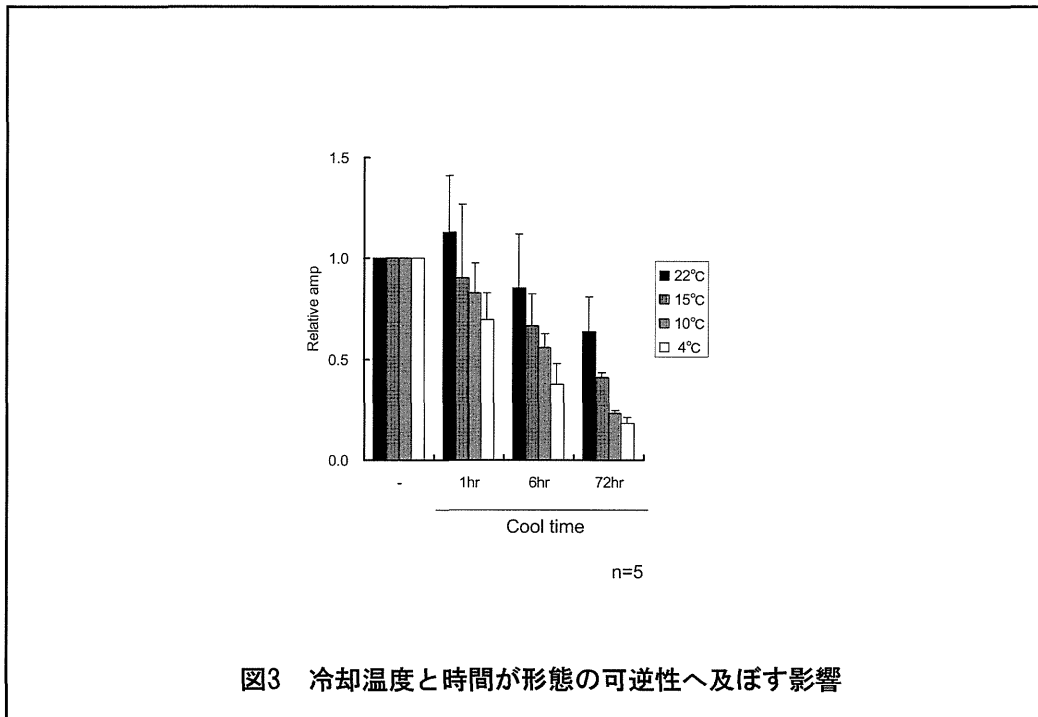


図3 冷却温度と時間が形態の可逆性へ及ぼす影響

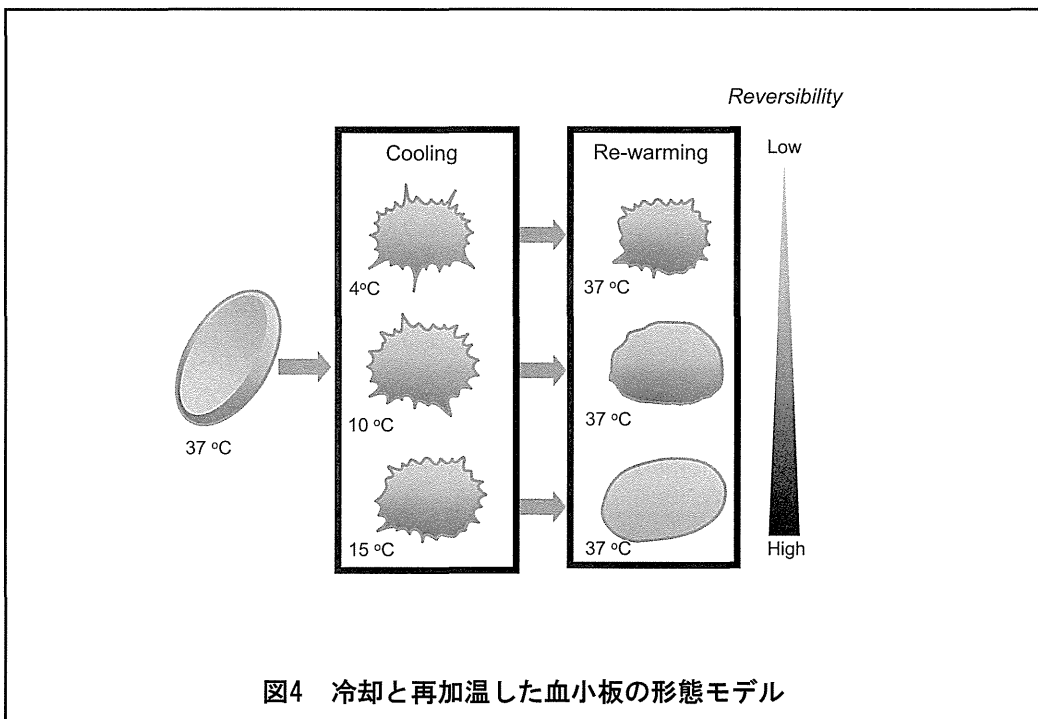


図4 冷却と再加温した血小板の形態モデル

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

赤血球製剤における病原体不活化法の開発と不活化の評価法の改良

研究代表者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

1.赤血球製剤では、実用可能な病原体の不活化法は開発されていないが、我々はこれまでの研究によって紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化が可能なことを示した。赤血球へのダメージをより少なくするために抗酸化剤であるビタミンC(以下VC)を添加して照射したところ、1) VC添加によって不活化効率が著明に低下し、ほぼ無処理と同等に低下した。2) VCを添加し、遠心でVCを除去後に紫外線照射すると不活化効率は回復した。以上から紫外線照射による病原体不活化は活性化酸素を介した機序が考えられた。また、赤血球の保護剤としてVCは有用であることが判明した。

2.不活化法の評価のためには、高い感染価のウイルス液を得る必要がある。市販のエキソソーム精製キットを用いることで容易に高感染価を有するウイルスが得られることを明らかにした。

A.研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤は、ヒトの血液を原料に製造される医薬品であり、血液を介して病原体が混入する可能性がある。安全対策として問診や各種の病原体に対するスクリーニング検査が導入され、最近では血小板製剤や新鮮凍結血漿中の病原体を不活化する技術が開発されている。一方、最も重要な赤血球製剤の病原体不活化法はいまだ実用化されていない。我々は、赤血球製剤に使用できる新しい病原体の不活化技術の開発を目指し、本研究を行ってきた。短波長の紫外線(UV-C)照射によって赤血球製中の病原体の不活化に成功した。これ

まで、赤血球製剤は、照射する紫外線が赤血球に吸収されるために病原体の不活化は困難とされてきたが、赤血球を均一に照射することによって病原体の不活化に成功した。紫外線照射によって赤血球は溶血しないまでも機能的な障害を受けている可能性があるため、それを軽減させる目的でVCを添加してその影響を解析した。

また、不活化法の評価において、不活化効果が評価できる範囲が広いことが重要である。2~3 Log程度感染性が落ちると検出感度以下になるような系では、本当に有効な不活化効果があるのか判断に迷う。最も簡単な方法としては、濃縮によって高感染

価のウイルス液を調整することである。これまでの方法として超遠心法や限外濾過法などが用いられてきたが、我々は市販されているエキソソーム試薬を用いて検討したところ、簡便で回収率の良好な方法であることが明らかになった。

B.研究方法

1.ウシ下痢症ウイルスの感染価測定

感染 1 日前に 96 穴プレートに 5×10^4 /well のウシ腎細胞株 MDBK を蒔いた。不活化処理したウシ下痢症ウイルス (BVDV) は 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、100 μ L ずつ細胞に感染させた。感染 10~14 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の $TCID_{50}$ を求めた。

2.赤血球の調整

日本赤十字社から譲渡された輸血に使用できない濃厚赤血球液を遠心し、生理食塩水を用いてヘマトクリットが約 40% になるように調整し評価用の赤血球製剤とした。これらに容量の 10% 相当の BVDV を添加した。

3.紫外線強度の測定

短波長の紫外線を発生させることができる紫外線ランプを使用した。照射量は UV ライトメーター (UVC-254) を用いて測定した。強度は W (ワット) / cm^2 で表示され、これに照射時間 (秒) を掛けるとエネルギー J (ジュール) となる。今回の紫外線照射

量は、2J である。なお、実験毎に照射面での紫外線量を測定し、目的の線量に必要な照射時間を計算した。

4.紫外線照射によるウシ下痢症ウイルスの不活化

紫外線の透過性が良い素材を用いて照射用の実験バッグを作製した。10mL の赤血球製剤を実験用バッグに入れると液層の厚さは約 4.1mm となった。照射方法は、BVDV を添加した赤血球を照射用バッグに入れ、バッグの赤血球が良く混合できるように工夫した装置の上に乗せ赤血球全体に照射した。VC は生食で溶解し、最終濃度 10mg/mL と 20mg/mL になるように添加し、直ちに紫外線照射、或は 1 時間室温で反応後遠心によって VC を除去した後紫外線照射した。VC によっても不活化される可能性があるため VC 添加のみの検体も評価した。照射後の検体は、3000rpm で 10 分間遠心し、上清を集め BVDV の感染価を測定した。

4.エキソソーム精製試薬を用いた BVDV の濃縮の検討

5%アルブミン 10mL に BVDV を添加し、混合後 10 μ L を濃縮前の検体として採取した。残りの約 10mL のアルブミンに ExoQuick-TC (System Biosciences 社) を 2mL 添加し、4°C にて 14 時間以上静置後 1500g で 30 分遠心し沈殿を得た。沈殿を PBS にて溶解した。濃縮前と濃縮後の検体を PBS で 500 μ L に調整後、10 倍ずつの段階希釈を各々独立した 10 系列を作製し、100 μ L ずつ MDBK 細胞