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政策研究事業）

分担研究報告書

赤血球製剤の病原体不活化法の開発

研究代表者　岡田義昭（埼玉医科大学　医学部　准教授）

研究要旨

赤血球製剤の病原体不活化法として化学物質と可視光の照射を組み合わせることで新しい不活化法を検討してきたが、不活化法だけでは限界があることから今年度は除去法の検討を行った。ウイルスが一般的に陰性荷電していることから陽性荷電のビーズを用いて除去効果を検討した。４時間の吸着で感染価は僅か 1/10 に低下しただけだった。しかもウイルス種によっては、全く除去効果を確認できなかった。pH 等の至適条件を探求する必要がある。

また、不活化法評価のために高感染価のウイルス液を調整する必要があるため、10㎖ 以上の培養液から簡単に感染性ウイルスを濃縮する方法を検討し、20～100 倍濃縮することができた。

A.研究目的

輸血用血液は、スクリーニング検査の進歩によって感染症の発生頻度は激減したが、全ての病原体をスクリーニングすることは困難である。更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるためには、病原体不活化技術の開発は不可欠であると考えられる。新鮮凍結血漿や血小板においては既に病原体不活化技術が臨床に導入されているが、赤血球製剤には実用化されている

不活化技術はない。我々は、メチレンブルー（MB）を用いた赤血球液の病原体が不活化法（これは既に知られていることだが）の改良をこれまで行なってきたが、全ての病原体を均等に不活化できるわけではない。そこで不活化法の限界を打ち破るために病原体を除去する方法を今年度は検討した。また、デングウイルスやチクングニアウイルスの様に血漿中にウイルス量が高いウイルスに対して不活化法の効果を検討する場合、評価に用いるウイルスの感染価も高い必要がある。超遠心による濃縮が一般的だが、操作によって感染価が失われることもある。そこで今年度は、市販されている試薬と低速遠心機を用いて 10㎖ 以上の培養液から感染性ウイルスを濃縮できる方法を検討した。

Ｂ.研究方法

1.ウイルスの感染価測定法

シンドビスウイルスの感染価は Vero 細胞、仮性狂犬病ウイルス（PRV）は CRFK 細胞、牛下痢症ウイルス（BVDV）は MDBK 細胞をそれぞれ用いた。細胞を感染１日前に 96 穴プレートに

１X10^{4}/well 蒔いた。ウイルスを含む検体は、10 倍ずつの 10 の各々独立した希釈系列を作製し、100μL ずつ Vero 細胞に感染させた。シンドビスウイルスと PRV は感染５日後、BVDV は 7 日後にそれぞれ 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.ウイルスの除去

試験的に市販されている陽性荷電のビーズとして Positive charge microcarrier(コーニング)を用いた。生食又は PBS にシンドビスウイルスと PRV をそれぞれ添加し、3mL にビーズ 100mg（約 51cm^{2}相当）を加え緩やかに撹拌しながら１、２、４時間ウイルスを吸着させた。

3.培養液からのウイルス濃縮

市販の exosome 精製試薬（タカラ）を用いてウイルス培養液 10mL に説明書に従って 4mL の試薬を加え、一晩反応させた。3200G で 30 分遠心し、上清を取り除いてから更に 5 分遠心し培養液を除いた。沈殿は、約 70μL の生食に溶解し、濃縮液とした。

C.研究結果

１.ウイルスの除去

シンドビスウイルスは、生食、PBS 共に４時間後もウイルス力価に全く減少は認められなかった。PRV は、生食と PBS 共に４時間吸着させることによって 感染価が約1/10 に減少した。

3.培養液からのウイルス濃縮

3 種のウイルス培養液 10mL を 100μL に濃縮することができた。感染価は 20～150 倍に増加した（図１）。

D. 考察

我々が検討してきた化学物質に可視光を照射する方法は、活性化酸素を介して病原体を不活化する機序であるために赤血球内のヘモグロビンが酸化される欠点がある。そのため酸化されたヘモグロビンを還元するような方法が必要である。その一方で、不活化単独では様々な病原体を不活化することに限界があり、不活化に抵抗性を示す病原体も存在する。更に新たな化学処理を行なえば、肝心の赤血球が傷つき使用できなくなる恐れもある。そこで別の機序による病原体処理法を考案する必要がある。我々は、血漿分画製剤と同様に病原体の除去法を考えた。一般にウイルスは陰性に荷電していることから除去が容易な物質でできた陽性荷電のものと反応させれば、ウイルスとその物質が結合し除去できると想像した。市販の陽性荷電ビーズは、100mg で 51cm^{2}と広い表面積を有することから効果的な除去ができると期待したが、僅か 1/10 に減少しただけであった。今回は pH７の条件であったが､効果的な吸着条件を求める必要がある。

ウイルスの除去効率の評価に必要な高感染価のウイルス液の調整は、超遠心によることが多かったが、ウイルスによっては感染性が低下することもあり、簡便な方法が望まれていた。小我々が使用した試薬は本来の目的とは異なる簡便に感染性を有したまま濃縮できる方法である。

E.結論

赤血球製剤の安全性向上のために病原体の不活化法だけでなく除去法も検討した。ウイルスの多くが陰性に荷電していることから陽性荷電のビーズを用いた方法を検討したが有効

ではなかった。また、市販されている exosome 精製試薬を用いることで高感染価なウイルスを調整することができた。

F. 健康危機情報

なし

G.研究発表

Kiyoko Nojima, Kazu Okumaa, Masaki Ochiai, Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Mieko Ishii, Sadao Ueda, Takashi Miyamoto, Koichiro , Kamimura, Enki Koue, Sanae Uchida, Yoshiharu Watanabe,Yoshiaki Okada, Isao Hamaguchi :Establishment of a reference material for standardization of the anti-complementary activity test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study.Biologicals, vol.46. 68-73. 2017

2.学会発表

1) 岡田義昭、小林清子、池淵研二：輸血用血液製剤の保存温度や白血球除去による Leishmania 原虫の不活化及び除去効果に関する研究、第64回日本輸血･細胞治療学会総会、平成２8年4月、京都

2) 玉栄建次、青木麻衣子、鈴木雅之、内野富美子、山田攻、松本慎二、棚沢敬志、小林清子、池淵研二、斉藤妙子、岡田義昭：当院における不規則性抗体陽性患者への不規則カード発行と今後の課題、第 64 回日本輸血･細胞治療学会総会、平成２8年4月、京都

3) 山田攻、鈴木雅之、内野富美、小林清子、池淵研二、岡田義昭：Ko 解凍赤血球液輸血を経験した抗 Ku 保有症例、第 64 回日本輸血･細胞治療学会総会、平成２8年4月、京都

4) 水沢左衛子、落合雅樹、草川茂、内田理恵子、川村恵理子、岡田 義昭、山口照英、浜口功：HIV-RNA 国内標準品の力価の再評価のための国内共同研究、第64回日本ウイルス学会総会、平成２8年１0月、札幌

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

図１　高感染価ウイルス液の調整

Virus		Pre	Post
Sindbis	Exp.1	$3.2X10^{8}$	$6.2X10^{9}$
	Exp.2	$1.0X10^{8}$	$1.5X10^{10}$
PRV	Exp.1	$1.0X10^{8}$	$1.5X10^{10}$
	Exp.2	$2.4X10^{8}$	$2.4X10^{10}$
BVDV	Exp.1	$3.2X10^{6}$	$3.7X10^{8}$
	Exp.2	$1.2X10^{7}$	$2.1X10^{8}$