

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。これまでの検討から赤血球の病原体不活化において、赤血球に可視光が吸収され難い波長によって活性を有する化学物質が候補となると考えられた。今回、クロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いてヘマトクリット 40%の赤血球液においてシンドビスウイルスを 3 Log 不活化することができた。この物質は、赤色光によって不活化の活性を示す性質があり、そのため赤血球に吸収され難いのでより深部まで到達できる。

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重要である。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方法はない。赤血球製剤の場合、赤血球によって光線が吸収され深部まで達しないため不活化効率が悪くなると考えられている。一方、腫瘍に取り込まれ易い化学物質からレーザーや可視光を照射すると発光する化学物質や活性酸素を産生する物質を選択し、腫瘍の治療に応用する光化学治療法が開発されている。それらの候補物質から赤血球製剤の病原体不活化に応用できる物質を検索した。

赤血球に応用する場合、赤色光によって候補物質が活性化することが必要である。赤血球は赤色光を吸収しないから深部まで到達できるからである。この条件に適合する物質としてクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いて不活化効率を検討した。

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 細胞を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /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、100 μ L ずつ Vero 細胞に感染させた。感染 5 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って TCID₅₀ を求めた。

2. ウイルスの不活化の評価

Pheophorbide-a を PBS で溶解し、5% アルブ

ミン液とヘマトクリット 40%の赤血球液にそれぞれ最終濃度が 10mg/mL と 30mg/mL になるように添加した。また、シンドビスウイルスは、それぞれの検体量の 1/10 以下になるように添加した。6 穴ウエルに深さが 4mm になるようにそれぞれの検体を入れ、液表面が 20,000 ルクス の照度になるように赤色光を調製し、10~20 分間照射した。また、照射中は、スターラーを用いてゆっくり攪拌した。

C. 研究結果

1. 5%アルブミン製剤における不活化

シンドビスウイルスは、10mg/mL と 30mg/mL とも 10 分間の照射後にはウイルスは検出感度以下まで不活化された (図 1)。

2. 赤血球における不活化

シンドビスウイルスは、10mg/mL では 20 分間の照射で 1Log 程度の不活化効果が認められた。30mg/mL では、10 分間照射後で約 2Log、20 分照射で約 3Log のシンドビスウイルスの不活化効果が確認できた。

D. 考察

今回検討したクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」は、これまで黄色ブドウ球菌を不活化できることが報告されているが、ウイルスにも不活化効果があることを確認できたのは初めてだと思われる。予想通り全血に近いヘマトクリット値においても 3Log の不活化効果が確認された。アルブミンでは僅か 10 分でシンドビスウイルスは検出感度以下まで不活化された。今回はエンベロープを保有する RNA ウイルスだけの評価であり、最も不活化し

やすいウイルスでの評価である。紫外線等光を用いた病原体の不活化では、二重鎖 DNA を有するウイルスが抵抗性を示すことがこれまでの実験で報告されており、次年度に検討を予定している。

なお、赤血球液での不活化効率が 3 Log だが、バッグを上下から照射することによって不活化効率は改善することが期待で記、これも次年度に実施したい。

E. 結論

赤血球製剤の安全性向上のためにクロロフィル由来の化学物質を用いて病原体の不活化法を検討した。この物質は、赤色光の照射によって活性化されるため赤血球に可視光が吸収されることなくウイルスを不活化できた。

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：国内血液製剤における E 型肝炎ウイルス感染リスクの評価と規制、第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6 月、千葉

2) 岡田 義昭、小林 清子、池淵 研二：Exosome 精製試薬を用いたウイルス濃縮法とその応用(第 2 報)、第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6 月、千葉

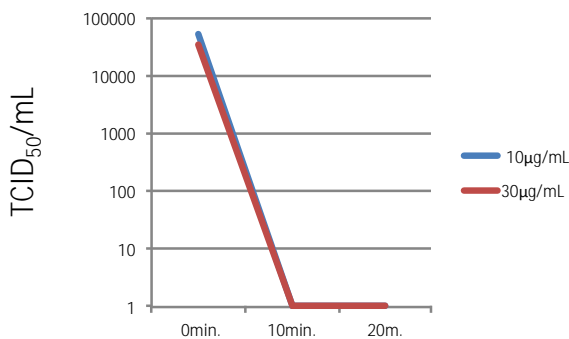
3) 山田攻、青木麻衣子、玉栄建次、鈴木雅之、内野富美子、池淵研二、岡田義昭：当院輸血部における電子カルテオーダー・照合システムとリンクしたアルブミン製剤の一元化運用について、第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6

月、千葉

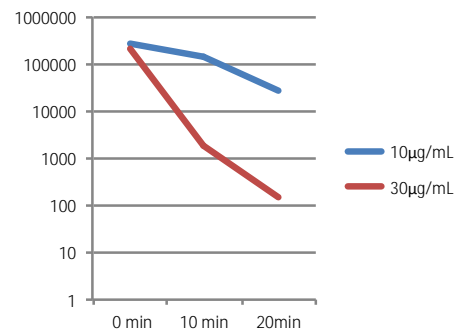
4) 下池貴志、野島清子、脇田隆字、濱口功
岡田義昭：エタノール法における 17%エタノール処理による HCV の変化の解析、第 65 回日本ウイルス学会、2017 年 10 月、大阪

5) 野島清子、下池貴志、脇田隆字、濱口功、岡田義昭：実験室レベルの Cohn エタノール法による血液製剤の各画分中の HCV の解析、第 65 回日本ウイルス学会、2017 年 10 月、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし



5% albumin
4mm in depth
20,000ルクス



Ht. 40% RBC
4mmL in depth
20000ルクス照射

図 1. フェオホルビド a による Sindbis virus の不活化

