

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。昨年度、ク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の不活化を報告したが、今年度はより安定な DNA ウイルスである仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies virus 以下 PRV) を用いて不活化効果を検討した。20 分の照射で検出感度以下まで不活化することができた。この物質は、赤色光によって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、更に赤血球への障害が少ないものと考えられる。

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となると考えられている。一方、腫瘍の治療に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そうな物質を検索した。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

PRV の感染価はネコ腎由来細胞の CRFK 細胞株を用いた。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、 $100 \mu\text{L}$ ずつ CRFK 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 TCID_{50} を求めた。

2. ウイルスの不活化の評価

採血した血液は、生理食塩水で洗浄しヘマトクリット値が40%になるように調整した。これにPBSで溶解したPheophorbide-aを最終濃度 $20\mu\text{g/mL}$ 及び $30\mu\text{g/mL}$ になるように添加した。また、PRV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穴ウェルに深さが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、10~30分間照射した。コントロールとして白色光を30分間20,000ルクス照射した。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

PRVは、Pheophorbide-aの濃度 $30\mu\text{g/mL}$ に10分間の照射では1.8Log程度の不活化が認められたが、20分以上の照射ではPRVは検出感度以下にまで不活化された。5Log以上の不活化が認められた。一方、白色光では30分照射しても1Log未満の不活化効果でしかなかった(図1)。また、 $20\mu\text{g/mL}$ の濃度では20分照射で不活化効果は1Log未満であり、30分照射でも3.5Log程度の不活化しか認められなかった。赤血球への影響は、30分照射において僅かな溶血が認められる程度であった。

D. 考察

昨年度、シンドビスウイルスを用いてクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」と赤色光を組み合わせることでウイルスの不活化効果を確認した。全血に近いヘマトクリット値においても3Log程度の不活化が確認された。今年度は、シンドビスウイルスよりも安定に二重

鎖DNAウイルスであるPRVを検討し、シンドビスウイルス以上の不活化効果を確認出来た。光学的な病原体の不活化では、二重鎖DNAを有するウイルスに不活化効果が弱いことがこれまで報告されているが、この物質は従来にない不活化の活性を示した。また、濃度が $20\mu\text{g/mL}$ と $30\mu\text{g/mL}$ とでは不活化効率が劇的に変わることから細胞毒性の検討が、今後重要になると思われた。

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PRVを効率良く不活化することができた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

松岡佐保子、水沢左衛子、落合雅樹、草川茂、百瀬暖佳、池辺詠美、宮川恵子、五反田裕子、長谷川隆、富樫謙一、中里見哲也、塚原美由紀、前田豊、福田修久、古田美玲、内田絵里子、川村利江子、岡田義昭、山口照英、浜口功:血液製剤の安全性確保のためのウイルス核酸増幅検索(NAT)国内標準品の再評価:日本輸血細胞治療学会誌2018年、64巻、502-509.

2. 学会発表

1. 岡田義昭、池淵研二:RCA(Rolling Circular Amplification)法を用いた血液からの簡便な感染性ウイルスの作製法とその応

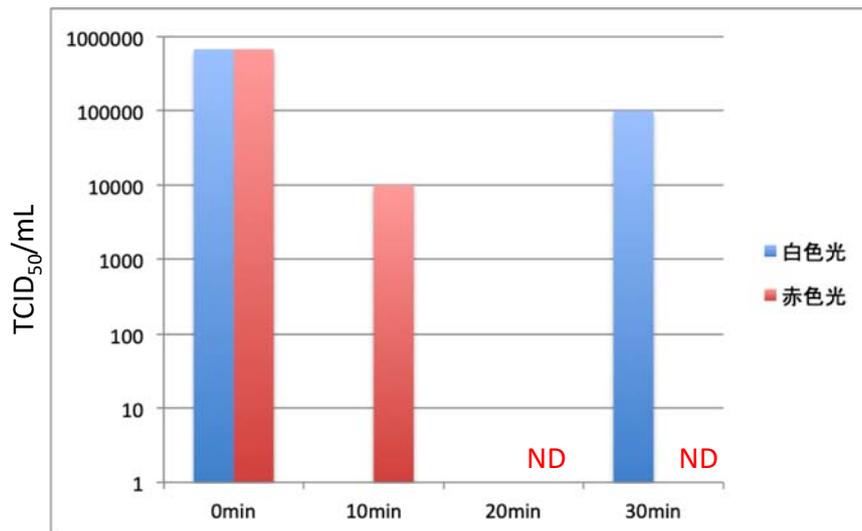
用、第 66 回日本輸血細胞治療学会学術集会、
2018/5/24、

2. 鈴木雅之、本田優未、山麻衣子、加藤由佳、
玉栄建次、内野富美子、山田攻、池淵研二、
岡田義昭：Daratumumab 投与患者の 1 例、
66 回日本輸血細胞治療学会学術集会、
2018/5/26

3. 井手野 祥次、高橋一恵、浦山健、竹内薫、
岡田義昭、前野英毅：細胞培養による E 型肝炎
ウイルス (HEV) の高濃度産生とヒト血漿由来
HEV との性状比較、第 42 回日本血液事業学会
総会、2018/10/5

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

フェオホルビド a による赤血球液における Pseudorabies virus の不活化



照射：20000 Lux
ヘマトクリット：40%
厚さ：4mm

ND: Not Detected