

## 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の検討を行った。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、クロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いてシンドビスウイルスや仮性狂犬病ウイルスの不活化を検討してきたが、今年度は臨床に使用されて赤血球液に近い条件としてヘマトクリット 55%、液深 10mm におけるシンドビスウイルスの不活化を検討した。濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 2.3Log、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 4.1Log の不活化が認められた。5~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までの濃度では細胞の増殖性に差は認められなかった。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。また、新興・再興感染症のアウトブレイク時など検査体制が構築されるまでの対応など、更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるために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。我々は、赤血球製剤に応用できる新しい病原体不活化法として腫瘍の治療に用いられている光化学治療法を応用した新しい方法の開発を目指した。これまで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。今年度は実用化を見据えてより臨床に使用されている赤血球液と同様な条件で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

シンドビスの感染価は Vero 細胞株を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに  $1 \times 10^4/\text{well}$  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  $\text{TCID}_{50}$  を求めた。

##### 2. ウイルスの不活化の評価

譲渡血として日本赤十字社から提供され

た赤血球液を生理食塩水で2回洗浄し、洗浄前と同様のヘマトクリット値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 $\mu$ g/mL及び40 $\mu$ g/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穴ウェルに液深が10mmになるように9mL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、30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。

### 3. Pheophorbide-aの毒性に関する評価

赤芽球に分化傾向があるヒト由来白血病細胞株であるAS-E2とKU821、さらにアフリカミドリザル由来Vero細胞をそれぞれ24穴プレートに $1 \times 10^5$ /well 蒔き、Pheophorbide-aを最終濃度5、10、20、及び40 $\mu$ g/mLになるようにそれぞれ2ウェルずつ添加、3日間培養し細胞数を測定した。2ウェルの細胞数を平均し、添加していないウェルの細胞数と比較した。AS-E2細胞は長崎大学血液内科：宮崎泰司教授から供与していただいた。

## C. 研究結果

### 1. Pheophorbide-aによる不活化の評価

濃度20 $\mu$ g/mL、30分間の照射では2.3Logの不活化が認められた。濃度40 $\mu$ g/mLでは4.1Logの不活化が認められた(図1)。また、赤血球への影響は、僅かな溶血が認められる程度であった。

### 3. Pheophorbide-aの毒性に関する評価

Pheophorbide-aの5、10、20、及び40 $\mu$ g/mLでの細胞数は、無添加のコントロールを100%とした場合、AS-E2:117.0、106.4、

114.9

114.9%、KU812:118.0、124.7、116.9、92.1% Vero細胞:95.2 119.0 100.3 101.6%であった。

40 $\mu$ g/mLにおいても評価に用いた細胞の増殖に影響は認められなかった。また、Pheophorbide-aに赤色光を30分照射した後に5、10、20、及び40 $\mu$ g/mLの濃度に各細胞株に添加して細胞の増殖を評価したが、各濃度で差は認められなかった。

## D. 考察

昨年度までは、赤血球製剤をヘマトクリット40%、液深4mmでシンドビスウイルスや仮性狂犬病ウイルスの不活化を評価してきた。4mmに設定したのは、濃厚血小板製剤のバッグの厚さが約8mmであることからバッグの両面に可視光を照射することが可能なことからその半分の4mmでの評価を行った。しかし、赤血球液のヘマトクリットは約55%、バッグの厚さは2cmであることから実用化を考えると赤血球液のヘマトクリットを55%、液深10mmの条件で不活化効果を評価する必要がある。また、これまでPheophorbide-aの濃度は20 $\mu$ g/mLに設定したがどの程度までPheophorbide-aの濃度を高くすることができるのか検討したことがなかった。今回、少なくとも40 $\mu$ g/mLでも評価に用いた細胞の増殖性に影響を与えないことが確認出来た。その結果、20 $\mu$ g/mLでは2.3Logの不活化効率であったものが4.1Logまで高めることができた。これは昨年度までの研究で濃度が20 $\mu$ g/mLと30 $\mu$ g/mLとでは不活化効率が劇的に変わることを明らかにしていたためである。

## E. 結論

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。今年度は、臨床に使用されている赤血球液と同じ条件下で不活化効果を検討したところ、シンドビスウイルスを約 4Log 不活化することができた。また、検討した範囲内での Pheophorbide-a の濃度では、白血病等の細胞株において非添加と比較して増殖性に差は生じなかった。

F. 健康危機情報  
なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：血液製剤を介する E型肝炎ウイルスの感染リスクとその対策、医学のあゆみ、268巻 514—515、2019年
- 2) 加藤由佳、山田攻、鈴木雅之、内野富子

山麻衣子、本田優未、岡田義昭、

池淵研二：エルトロンボバグ服用中

患者の自己血血漿の色調変化、

日本輸血細胞治療学会誌65巻

6号、845 846、2019年

3) 岡田義昭、山田攻、鈴木雅之、

内野富子、山麻衣子、加藤由佳、

本田優未、池淵研二：交通外傷に

よる敗血症から汎血球凝集反応を呈

した1症例、日本輸血細胞治療学会誌

65巻3号、595 599、2019年

H. 知的財産権の出願・登録状況  
ない

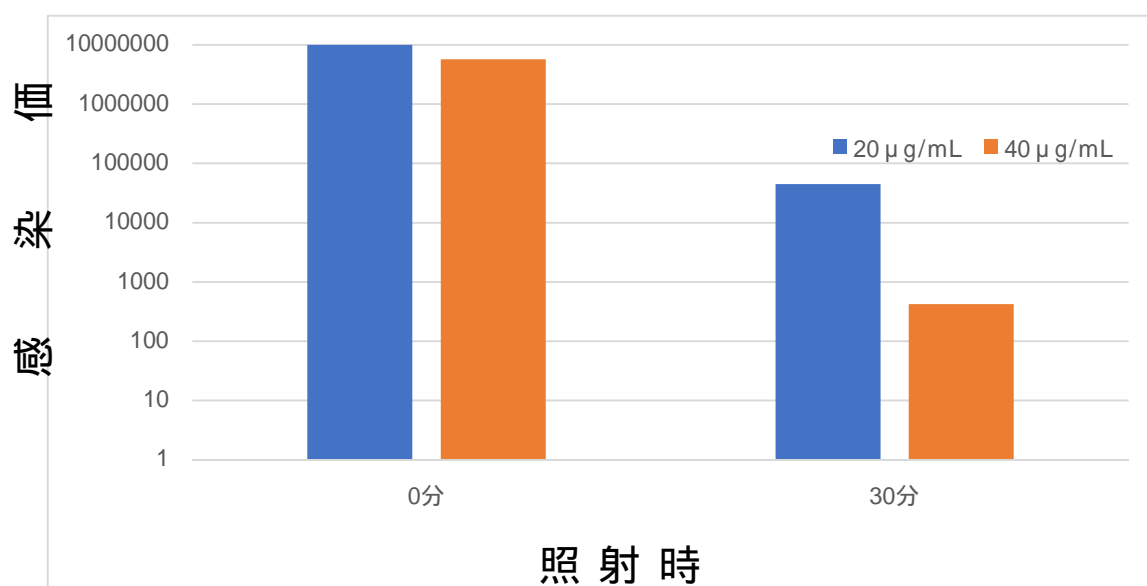


図 1. クロロフィル誘導体による Sindbis virus の不活