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（PRV）の不活化を検討してきた。当初は赤血球液の状態を液深４mmm、ヘマトクリット値40%に調整して不活化を検討したが、最終的に臨床に使用されて赤血球液に近い条件として液深10㎜、ヘマトクリット55%におけるシンドビスウイルスの不活化を検討した。濃度20μg/mLでは約2Log 、40μg/mLでは約4Logの不活化が認められた。5～40μg/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、そのため赤血球に赤色光が吸収され難いのでより深部まで到達できると考えられる。更に赤血球は赤色光を吸収しないので赤血球内部で活性化が生じにくいため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。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。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。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 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。

仮性狂犬病ウイルス(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 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

液深 4mm、Ht 40%の場合

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 20μg/mL 及び 30μg/mL になるように添加した。また、シンドビスウイルスと 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、 10～30 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撹拌した。

液深 10mm、Ht 55%の場合

赤血球液を生理食塩水で 2 回洗浄し、洗浄前と同じ Ht.55% 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 20μg/mL 及び 40μg/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撹拌した。

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１X10^5/well 蒔き、Pheophorbide-a を最終濃度 5、10、20、及び 40μg/mL になるようにそれぞれ 2 ウエルずつ添加、３日間培養し細胞数を測定した。2 ウエルの細胞数を平均し、添加していないウエ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

PRV は、Pheophorbide-a の濃度 30μg/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 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。また、20μg/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。また、シンドビスウイル

スは、10μg/mL では 20 分間の照射で 1Log、30μg/mL では、10 分間照射後で約 2Log、20 分照射で約 3Log の不活化効果が認められた。

一方、液深 10㎜、Ht 55%の場合のシンドビスウイルスでは、濃度 20μg/mL、30 分間の照射では 2.3Log の不活化が認められた. 濃度 40μg/mL では 4.1Log の不活化が認められた。

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 40μg/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。

40μg/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 40μg/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

赤血球製剤のための病原体不活化法としてクロロフィル分解産物である「Pheophorbide a」と赤色光を組み合わせることで、少なくともシンドビスウイルスと PRV を不活化できることを明らかにした。特に PRV においても不活化効果が得られたことは、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対する不活化効果が弱いことが報告されているが、この物質は従来にない不活化の活性を示すことを明らかにできた。することが効果昨年度までは、赤血球製剤をヘマトクリット 40%、液深 4㎜ 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。4㎜ に設定したのは、濃厚血小板製剤のバッグの厚さが約 8㎜ 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 4㎜ 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 2㎝ 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 10㎜ 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 20μg/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、少なくても 40μg/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、20μg/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 20μg/mL と 30μg/mL とでは不活化効率が劇的に変わることからを明らかにしていたためである。

結論

赤血球製剤の病原体不活化法としてクロロフィル由来の化学物質と赤色光を組合わせた新しい不活化法を開発した。最終的に臨床に使用されている赤血球液と類似した条件下でも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、生体に与える毒性の検討では不活化を検討した範囲内での濃度では、白血病等の細胞株において増殖性に差は認められなかっ

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ー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ー599、2019年

H.知的財産権の出願・登録状況

なし