

総 説

輸血用血液製剤のウイルス不活化の現状と課題

阿部 英樹 東 寛 池田 久實

日本赤十字社北海道赤十字血液センター

(平成 17 年 4 月 14 日受付)

(平成 17 年 6 月 7 日受理)

CURRENT STATUS AND SUBJECTS IN VIRUS INACTIVATION OF BLOOD PRODUCTS

Hideki Abe, Hiroshi Azuma and Hisami Ikeda

Japanese Red Cross Hokkaido Red Cross Blood Center

Key words : post-transfusion infection, virus screening, pathogen inactivation

はじめに

輸血によるウイルス感染はスクリーニング検査技術の発展と共に激減してきた。しかし、これまでの検査は、ウイルス感染に対し生体が防御反応した結果として産生される抗体や、ウイルス感染中に産生されるウイルス抗原を検出する、いわゆる血清学的検査が主体であった。そのため、病原体が血液中にあるにもかかわらず血清学的検査で陽性と判定されない期間、ウインドウピリオド（感染直後から抗原又は抗体が検出できるまでの感染の事実を検知できない期間）が存在した。つまり検査で陰性と判定されても血液中に病原体が存在するため、このウインドウピリオドが輸血後感染症の要因の一つと考えられた。1999 年 10 月、献血血液全検体を対象にしたウイルス核酸増幅検査（nucleic acid amplification test；NAT）が日赤に導入された¹⁾²⁾。この検査は、血液中で抗体産生が起こる以前の、微量にしか含まれないウイルスの遺伝子を数十億倍に増幅し、ウイルスの有無を検出する方法である。欧米各国でも導入されたが HBV も対象としたのは、我が国だけであった³⁾⁴⁾。当初、NAT では血清学的検査で陰性と判定された 500 人分の血液をプールし、そのプール検体を

用いて検査を行っていたが、検出感度向上を目的として、2000 年 2 月には 50 プールに縮小された。これにより検出感度も向上し、輸血後肝炎と推定される肝炎発症率は、0.0004% となった。そして 2004 年 9 月からは、20 プールに縮小されている。日赤では問診等を含め、複合的な方法で安全な血液の確保に努めているが、現在行われている検査による感染症安全対策を Table 1 に示した。

このように、最新の技術により感染症に関する輸血の安全性は格段に高まってきたが、危険性が全くゼロになったわけではない。NAT といえど、感染極初期の微量のウイルスを検出することはできない。つまり、NAT 導入により検査感度は格段に上昇しウインドウピリオドを短縮したが、依然として NAT にもウインドウピリオドは存在する。NAT のウインドウピリオドによると考えられる HIV 感染も報告されている⁵⁾。そしてウイルスのみならず、依然として様々な残された危険性（residual risk）が存在する⁶⁾⁷⁾。それらの多くは動物から人に感染が広がったウイルス、原虫、寄生虫や、細菌などである⁸⁾。

米国の血液製剤による細菌感染のリスクは、血液製剤 100 万単位に対して約 10 例と報告されて

Table 1 Screening tests performed by the Japanese Red Cross.
(April, 2005)

Pathogen	Tests
Syphilis	Antibody (TPHA)
HBV	Antigen (RPHA), Antibody (PHA), NAT
HCV	Antibody (PHA), NAT
HIV	Antibody (PHA), NAT
HTLV-	Antibody (PA)
Human parvovirus B19	Antigen (RHA), NAT (for source plasma)

Table 2 Pathogens transmissible by blood transfusion and specific tests performed
by the Japanese Red Cross. (April, 2005)

Routine specific testing	Transmission and pathogenesis : definitive	Transmission or pathogenesis : not definitive
Yes	HBV, HCV, HIV, HTLV, parvovirus B19, WNV, Syphilis, Bacteria	
No	HEV, SARS, H5N1 influenza, vCJD, <i>Babesia microti</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>	GBV-C, TTV, SEN-V, HHV-8, Borna virus

いる⁹⁾。汚染菌は皮膚常在菌、腸内細菌が主である。特に血小板製剤は常温で保存されるため、皮膚常在菌や自覚症状の無い菌血症状態の供血者から混入した細菌の増殖が起こり、大きな問題となっている¹⁰⁾。一方、発展途上国や米国北東部という地域性はあるものの、バベシア原虫による血液製剤汚染が深刻な問題となっている¹¹⁾。バベシア原虫はダニを介して動物から人に感染するが、米国において輸血による感染が報告されており¹²⁾、この報告の時点では40例を越えているとのことである。我が国では輸入感染症との位置づけであるが、日本においても海外渡航歴も自覚症状も無い供血者からの輸血によりバベシア感染が発生した¹³⁾。また近年、米国では西ナイルウイルス (WNV) 感染による鳥の大量死発生に伴い人への感染、および人から人への感染が懸念されたが、輸血を介して感染することが現実¹⁴⁾に起きた。英国ではエンテロウイルス感染が懸念されており¹⁵⁾、さらには、輸血による感染の証拠は無いが理論的なリスクがあるとして、変異型 Creutzfeld-Jacob 病 (vCJD) の原因因子である異常プリオン

が大きな問題となってきたが¹⁶⁾、ついに輸血により感染しうることが報告された¹⁷⁾。国内では、野生獣を食することに起因する E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染が問題となっているが、輸血を介した HEV 感染が確認された¹⁸⁾。また、凝固因子製剤による感染で問題となっていた A 型肝炎ウイルス (HAV) も通常の輸血で感染することが報告されているが、供血者と受血者のウイルス遺伝子タイピングで証明されたことにより、より確実となった¹⁹⁾。現時点で、輸血で感染することが確認されている病原体、感染性や病原性が危惧されている病原体、その病原体による感染を特異的に防止する方策が採られているか否かについてまとめた (Table 2)。現在も改良および開発され、発展しつつあるスクリーニング検査ではあるが、このように検査だけでは、直面している、あるいはこれから遭遇するかも知れない病原体に対する安全性確保には限界があると言わざるを得ない。

現在の病原体不活化法

1990 年代に入り、輸血用血液製剤のウイルス不活化法が積極的に研究され始めた。輸血用血液製

Table 3 Model viruses for human blood-born viruses.

Virus	Model virus	Genome	Envelope
HIV	HIV-1	RNA	Yes
HAV	EMCV	RNA	No
HBV	DHBV	DNA	Yes
HCV	BVDV	RNA	Yes
HEV	calicivirus	RNA	No
CMV	HSV	DNA	Yes
Human parvovirus B19	PPV	DNA	No

EMCV, encephalomyocarditis virus ; DHBV, duck HBV ; BVDV, bovine viral diarrhea virus ; PPV, porcine parvovirus.

剤には、細胞成分を含まない血漿製剤（新鮮凍結血漿）と、細胞成分に治療効果が期待される赤血球製剤および血小板製剤の3種類がある。従って、それぞれの製剤に適切なウイルス不活化法が考案されている。また血液により伝播するウイルスも多種存在するため、より広範囲のウイルスに対して不活化効果を示す方法が要求される。ウイルスはその構造形態から、脂質外被を持つエンベロープウイルスとそれを持たないノンエンベロープウイルスに大別される。輸血により伝播するウイルスにも、両種のウイルスが存在する。ほとんど全てのウイルス不活化法において、ノンエンベロープウイルスは不活化されにくい傾向にある。HBV, HCV など *in vitro* での感染性アッセイが行えないウイルスが存在するため、多くの場合、それらのモデルウイルスを用いて評価が行われる（Table 3）。そして、ウイルスのみならず、細菌、原虫、寄生虫に対しても不活化効果を示すことが示され始め、それゆえ「病原体不活化法」と呼ばれるようになった。これまで様々な化合物および方法が研究されてきたが、研究段階で消滅したものの、臨床試験で副作用が認められ中断したものも数多くある。また病原体不活化効果はあるものの、肝心の血液製剤の品質低下、機能低下を来す方法も報告されてきた。本総説では、実際に使用されている方法、あるいは臨床試験に入っているもの、臨床応用を目指して研究がなされているものについて概説する（Table 4）。また、ヨーロッパにおいて既に導入されている血漿製剤に対する不活化法やその他の安全対策（クアランチン；検疫保管）お

よび今後の予定を Table 5 にまとめた。

1. 血漿製剤

1-1. Solvent/Detergent (S/D)

血漿分画製剤、特に血液凝固第 VIII 因子製剤のウイルス不活化法として、1985 年に有機溶剤/界面活性剤 (S/D) 処理法が開発され²⁰⁾、1992 年からヨーロッパで輸血用血漿製剤にも応用され始めた。100～1,000 人分（各国で異なる）の同一血液型の新鮮凍結血漿を融解後プールし、有機溶剤として 1% (w/v) tri (n-butyl) phosphate, 界面活性剤として 1% (w/v) Triton X-100 を添加し、30、4 時間処理する。添加した tri (n-butyl) phosphate と Triton X-100 を植物油による抽出と C18 逆相カラムにより除去した後、適当な容量に分注し凍結保存する²¹⁾。

S/D 処理によるウイルス不活化率は、HBV で $> 6 \log_{10} \text{CID}_{50}$ (median chimpanzee-infectious dose), HCV で $> 5 \log_{10} \text{CID}_{50}$, HIV で $> 7.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ (median tissue culture-infectious dose) である。加えて、WNV も容易に不活化できることが示された²²⁾。しかし、ノンエンベロープウイルスである A 型肝炎ウイルス (HAV) やヒトパルボウイルス B19 を不活化することはできない。従って、血漿をプールすることによるウイルス拡散が懸念されるが、一方でプールすることにより中和抗体も拡散することとなり、それらのウイルス感染の危険性は無いと考えられている。

S/D 処理により von Willebrand 因子 マルチマーに著しい減少が認められるが、全体的な凝固因子活性の低下は 2～25% であり²³⁾、先天性なら

Table 4 Pathogen inactivation methods for blood components (April, 2005)

Blood component	Compound	Principle	Developer	Current status
Plasma	Solvent/Detergent	Physicochemical	Octaparma	In the market
	Methylene blue	Photosensitization	Macopharma Baxter Grifols	In the market
	S-59	Photochemical	Cerus/Baxter	Phase (completed)
	Riboflavin	Photosensitization	Navigant	Pre-clinical
Platelets	S-59	Photochemical	Cerus/Baxter	In the market
	Riboflavin	Photosensitization	Navigant	Phase /
	Thyonine	Photosensitization	German Red Cross	Pre-clinical
Red cells	Inactine	Chemical bound	Vitex	Phase (stopped)
	S-303	Chemical bound	Cerus/Baxter	Phase (stopped)
	Dimethylmethylene blue	Photosensitization	American Red Cross	Pre-clinical
	Riboflavin	Photosensitization	Navigant	Pre-clinical

Table 5 Current and future status of plasma safety world-wide (April, 2005)

Country	Current status	Future status
Italy	MB, S/D	MB in application
England	MB, S/D	
Austria		
Netherlands	Quarantine	MB in application
Greece	MB	
Switzerland	S/D, Quarantine	MB approved in 2003
Sweden		MB in application
Spain	MB, Quarantine	
Denmark	Quarantine	MB in application
Germany	S/D, Quarantine	MB in application
France	S/D, Quarantine	MB implemented in 2004
Belgium	MB	
Portugal		MB in application
Norway		MB in application

びに後天性の凝固異常症の治療や血漿交換療法にも、現行の新鮮凍結血漿と同等の治療効果を得られることが、臨床試験により確かめられている。

米国では1998年にFDAの承認があり、Vitex社が米国赤十字社と契約を結び販売を開始した。しかし、臨床試験では良好な成績を収めたものの²⁴⁾、抗プラスミン、抗トリプシン活性の著しい低下が指摘され²⁵⁾、血液凝固や肝臓移植に関連し

て16例の死亡例が発生したこと、ヒトパルボウイルス B19 の混入が認められたことから、1999年にFDAが特定の疾患対象患者には使用しないように勧告を出した。そして、ヒトパルボウイルス B19 が混入した S/D 血漿により受血者が感染、発症し²⁶⁾、2002年4月、米国赤十字は S/D 血漿の供給を停止した。

一方ヨーロッパでは、Octapharma 社が S/D

血漿の製造ライセンスを取得し、1992 年以来、500 万単位の S/D 血漿が輸血されてきているが、現在も副作用例の報告はない。このことから、S/D 処理工程は同じであるはずだが、Octapharma 社と Vitex 社では添加剤等、細かな点での違いに起因することも考えられる。ただ最近になって、血栓性微小血管症の血漿交換に S/D 血漿を用いたところ、急性高リン酸塩血症発生の副作用例が報告された²⁷⁾。S/D 処理によるプロテイン S 活性やプラスミンインヒビター活性低下に起因すると思われる副作用の発生に懸念がもたれているが²⁸⁾、対象疾患によっては薬剤併用措置などにより、安全に S/D 血漿輸血を行えるという見解もある²⁹⁾。ヨーロッパでは S/D 血漿に起因すると思われるウイルス感染は報告されていない。

1-2. メチレンブルー

メチレンブルーによる血漿中ウイルスの不活化法は、ドイツのシュプリング血液センターで開発された³⁰⁾。S/D 処理との大きな違いは、血漿をプールせず、個々の単一血液バッグに対し不活化処理を行う点である。メチレンブルーは可視光照射により励起され、そのエネルギーを酸素分子に供与して一重項酸素を生成する Type II 反応と、基質にエネルギーが移動し、プロトンあるいは電子の移動を伴う Type I 反応により、ウイルスを不活化する³¹⁾。主としてウイルスの核酸が標的となり、ウイルス遺伝子に傷害を与えることで感染性を除去する^{32,33)}。また、ウイルスタンパク質にも影響を及ぼすことも分かっている³⁴⁾。

当初シュプリング血液センターで行われていた方法は、メチレンブルー溶液バッグを個々の血漿バッグに無菌的に接合し、終濃度 1 μ M になるようにメチレンブルー溶液を加える。十分に混和した後、白色蛍光灯光を照射し、再度急速凍結した後、保存する。この方法により、HIV ($> 2.7 \log_{10}$)、vesicular stomatitis virus (VSV) ($> 5.7 \log_{10}$)、herpes simplex virus (HSV) ($> 3.0 \log_{10}$)、influenza virus ($> 5.5 \log_{10}$) の不活化率が得られ、再度融解後の凝固因子活性は第 VIII、IX 因子等、ほぼ 80% 以上保持されている³⁰⁾。しかし、脂質エンベロープを持たないウイルス (HAV 等) には不活化

効果がない。二次元電気泳動による解析では血漿タンパク質の変化はみられず³⁵⁾、新たな抗原性の発現も確認されていない³⁶⁾。メチレンブルー光増感作用では白血球内ウイルスを不活化できないとされているが、血漿の凍結融解を 2 回繰り返すことにより白血球を破壊し、感染性を除去することができる。従来この方法では、添加したメチレンブルーを除去することなく、輸血に使用されてきた。メチレンブルーは光増感作用を示したのち構造変化を来し、leukomethylene blue, azure A, B, and C, チオニンになる。最近、より安全な製剤とするため、白血球とメチレンブルーを除去するフィルターが開発された³⁷⁾。このフィルターにより、血漿中 1 μ M のメチレンブルーは検出限界以下の 0.05 μ M に低下し、白血球も 3 $\log_{10}$ の除去が可能であった。

一方、新鮮血漿からフィルターにより白血球を除去した後、メチレンブルー光処理を行う方法もある。Baxter 社により開発された白血球除去フィルターとメチレンブルー溶液を組み込んだシステムでは、細胞外および細胞内 HIV の感染性をそれぞれ 6 $\log_{10}$ 以上および検出限界以下にまで低下させることができた³⁸⁾。不活化処理後 1 年間凍結保存した後も、凝固活性は未処理のものほとんど変わらず、第 VIII 因子活性、フィブリノーゲン活性もそれぞれ 76% 以上、84% 以上、維持されていた。現在は、白血球除去に加え、メチレンブルー除去フィルターを組み込み、赤色発光ダイオードを光源としたシステムがヨーロッパの一部で使用されている^{39,40)}。

現在ヨーロッパの多くの国で用いられている、あるいは導入が計画および予定されているメチレンブルー光不活化システムは、Macopharma 社により開発された MACO-TRONIC 照射装置に PLASMAFLEX (細胞成分除去)、BLUEFLEX (メチレンブルー除去) フィルターを組み合わせたものである^{41,42)}。血漿バッグを無菌的チューブ接続装置によりメチレンブルーバッグシステムと連結し、細胞成分除去フィルターを通過させた後、タブレット状のメチレンブルーを溶解しながら光照射バッグに血漿を移送する。血漿量が 235 ~ 315

Table 6 Virus inactivation by methylene blue photoinactivation system
(MACO-TRONIX, Macopharma)⁴²⁾

Enveloped		Non-enveloped	
Virus	Log reduction	Virus	Log reduction
HIV	> 5.5	HAV	0.0
BVDV	> 6.2	EMCV	0.0
DHBV	3.9	PPV	0.0
Influenza	5.1	Polio	0.0
Pseudorabies	5.4	SV40	4.3
HSV	> 6.5	Adenovirus	4.0
VSV	> 4.9	Human parvovirus B19	> 4.0
WNV	> 6.5	Calicivirus	> 3.9

ml であれば、メチレンブルー濃度は $1\mu\text{M}$ 前後になる。一度に4バッグを照射でき、照射時間は20分である。過剰、過小照射を防ぐため、正確な照射量を測定する検出器がついており、GMP基準を満たしたバリデーション可能な装置となっている。これまでの多くの報告と同様、ほぼ全てのエンベロープウイルスを不活化することが可能であり (Table 6)⁴²⁾、近年米国を震撼させた WNV も不活化できる⁴³⁾。加えて、今まで困難とされてきたノンエンベロープウイルスであるヒトパルボウイルス B19 や HEV のモデルウイルス calicivirus も、約 $4\log_{10}$ の不活化が可能であることが示された^{42, 44)}。

メチレンブルーの毒性に関して、その変異原性が細菌やウイルスを用いた検討により示されている^{45, 46)}。また、メチレンブルーが培養哺乳動物細胞においても変異原性を有することが報告されている⁴⁷⁾。しかし、この検討で変異原性を検出できたメチレンブルー濃度の下限は $27\mu\text{M}$ であり、実際にウイルス光不活化に用いられている MB 濃度 ($1\mu\text{M}$) と比較すると 30 倍近く高濃度である。加えて、マウスを用いた in vivo 系では変異原性は認められていない⁴⁷⁾。また、ウサギ、マウスにおける先天異常の誘発、ラットにおける癌原性、ラット、ショウジョウバエ、ハムスターにおける変異原性などについて、メチレンブルーは全て陰性であったと述べられている⁴⁸⁾。メチレンブルーは欧米において古くから医薬品として用いられており、メトヘモグロビン血症治療ではウイルス不活化に用

いる量の数百倍もの用量 (2mg/kg) が静注投与されるが、副作用は無いとされている⁴⁹⁾。また、敗血症ショック治療の臨床試験としてメチレンブルーが投与されたが、副作用は観察されてない⁵⁰⁾。1992 年から 1998 年までの間、ドイツ、スイス、オーストリア、デンマーク、英国、ポルトガル、スペインで 100 万単位以上のメチレンブルー処理血漿が使用された。その間に、メチレンブルー処理血漿での副作用発生率は通常の新鮮凍結血漿と変わらないと報告されている⁵¹⁾。

ヨーロッパでは 3 種類のメチレンブルー処理方式があるが、どの方式によっても凝固因子活性、特にフィブリノーゲン、第 V 因子、第 VIII 因子活性が 10~40% 低下することが分かっている^{30, 39, 40, 52, 53)}。細胞成分除去フィルターやメチレンブルー除去フィルターを用いることによる凝固因子活性の更なる変化は無いが、メチレンブルー処理前の凍結は僅かな活性低下を引き起こす⁵³⁾。またフィルターによっては血漿タンパク質の活性化など、影響を及ぼすものもある³⁹⁾。フィブリノーゲン活性の低下は、メチレンブルー処理がフィブリン形成における重合化やゲル化に影響を及ぼすためのようである⁴⁰⁾。スペインのある病院では、シュプリング方式を採用している Grifols 社のメチレンブルー血漿を使用したところ、未処理血漿と同等の治療効果を得るために使用量が増加したとの報告がある⁵⁴⁾。ヨーロッパでは長年に渡り、安全に使用されてきているメチレンブルー血漿であるが、いかに凝固活性を保持させるか、今後の

検討が必要かも知れない。現在では、ヨーロッパ市場のほとんどが MacoPharma システムに切り替わってきている。フランスでは2004年11月に一部地域で MacoPharma 社システムの導入が開始され、2005年中にはクアランチンやS/D処理血漿の使用を停止し、国内全ての血漿をメチレンブルー処理血漿に置き換える方針を打ち出している。

1-3. S-59 (amotosalen)

ソラレンはある種の高等植物に含まれる化合物で、多くの天然誘導体が存在する。紫外線領域の光を吸収し、その光増感作用により殺菌、殺ウイルス作用を示す。核酸一本鎖あるいは二重鎖に入り込んだ (intercalation) ソラレンは、UV 照射により励起されると、核酸とシクロブタン型の共有結合をし (monoadduct, crosslinking), そこで DNA および RNA ポリメラーゼ反応を遮断することにより、ウイルスの複製、細菌の増殖を阻害する。さらには白血球の機能も阻害する。Cerus社は、100種類以上の新たに合成されたソラレン化合物の中から、易溶性かつ細胞侵入性を持ち、核酸親和性が高く、最もウイルス不活化効果の高い化合物として S-59 を見いだした⁵⁵⁾。

S-59 は当初、血小板製剤に対する病原体不活化法として検討されてきた薬剤であるが、血漿への応用も進められている。メチレンブルーと同様、個々の血液バッグに不活化処理を行う。血漿に S-59 を添加し UVA を照射することにより、HIV を $> 6.4 \log_{10}$, WNV を $> 6.7 \log_{10}$, マラリア原虫を $> 7.4 \log_{10}$ を不活化することができ⁵⁶⁾, 凝固因子活性は未処理血漿と同等に維持される⁵⁷⁾。安全性、毒性試験もクリアし⁵⁸⁾, ワルファリン投与健康人による臨床試験において、第VII因子活性の回復能は通常血漿と同等であることが示された⁵⁹⁾。2004年5月には、35名のTTP患者を対象とした血漿交換における治療効果の評価を行う第III相臨床試験を含め、155名の凝固異常患者に対する第III相臨床試験とともに、S-59血漿の治療効果は通常血漿と同等であるという結果を持って終了した。

1-4. リボフラビン

リボフラビンはビタミン B₂ として生体に必須の栄養素である。1960~70年代に、紫外線や可視光をリボフラビンに照射することにより、ウイルスや細菌を不活化できることが報告された。平面構造を持つリボフラビンは、ウイルスや細菌、細胞内の核酸にインターカレートし、光増感作用により核酸に傷害を与え、遺伝子の複製や転写を阻害する⁶⁰⁾。リボフラビンの特徴として、血漿、血小板、赤血球の3製剤への適用が検討されていることであり、血漿製剤も個々のバッグを処理する。

リボフラビン 30 μ M を含む血漿に UVA を 30~60分照射することにより、canine parvovirus を $> 4.7 \log_{10}$, PPV を $> 4.6 \log_{10}$, HAV を 2.5~3.6 $\log_{10}$ と、不活化が困難なノンエンベロープウイルスを不活化することができる⁶¹⁾。また、細胞内および細胞外 HIV の不活化も可能であるとのことである。

2. 血小板

血小板製剤の特徴として、室温で保存することが挙げられる。それゆえ、特に欧米では有効期間が5日間と長いため、細菌の混入、増殖が大きな問題となっている。したがって、血小板製剤のウイルス不活化法では、ウイルスのみならず殺菌効果も重要となる。

2-1. S-59 (amotosalen)

Cerus社が開発した INTERCEPT と呼ばれるこの方法は、アフエレーシスあるいはパフィーコート由来で得られた血小板を、32~47%の血漿を含む血小板保存液 PAS3 に浮遊して、容量 255~325mL、血小板数 $2.6 \sim 6.0 \times 10^{11}$ に調製する。血小板バッグを不活化処理バッグシステムに無菌的に接続し、一定量の S-59 溶液を加えながら照射バッグに移し、終濃度約 150 μ M とする。一度に2バッグを照射できる装置にセットし、UVA を 3J/cm² (約4分) 照射する。照射後、残留 S-59 吸着剤入りのバッグに移し替え、4~16時間、22℃にて振盪保存して残留 S-59 を除去した後、保存用バッグに移送して輸血に供する。

各種ウイルスの不活化率を Table 7 にまとめた。S-59 システムはウイルス以外にも、細菌や原虫の不活化にも有効である^{55) 62)~64)}。血小板製剤に

Table 7 Virus inactivation by the S-59/UVA system (INTERCEPT, Cerus/Baxter)⁷¹⁾

Enveloped		Non-enveloped	
Virus	Log reduction	Virus	Log reduction
HIV (cell-free)	> 6.2	Blue tongue	6.1-6.4
HIV (cell-associate)	> 6.1	Human parvovirus B19	4.0-4.9
HBV	> 5.5		
DHBV	> 6.2		
HCV	> 4.5		
HTLV /	4.7/5.1		
CMV	> 5.9		
BVDV	> 6.0		
WNV	> 6.0		

混入する危険性の高いグラム陽性表皮ブドウ球菌は $> 6.6 \log_{10}$ 以上, グラム陰性肺炎桿菌は $> 5.6 \log_{10}$ 以上不活化でき, 5 日間保存においても血小板製剤中に当該細菌は検出されない. S-59/UVA 処理血小板製剤の生化学的指標 (pH, グルコース量, 乳酸量など) および機能 (凝集能, 血小板形態変化, 浸透圧抵抗性など) は, 7 日保存後も未処理の製剤と同等である⁵⁵⁾. また, T リンパ球の機能を抑制することから, 輸血後 GVHD や同種抗原感作の防止, 保存中に蓄積するサイトカインが一因ともなる非溶血性副作用の防止にも有効ではないかと考えられている^{65)~67)}.

ソラレン類には発癌性, 変異原性があることが分かっており, S-59 もそれらの毒性を持つことが予想される. 検討の結果, S-59/UVA 処理後に残存 S-59 を除去する操作をしてもしなくても, 急性毒性, 反復投与毒性, 腎, 心臓系への毒性, 生殖性毒性, 遺伝毒性, 発癌性, 変異原性は認められなかった. 僅かに中枢神経系, 心電図, 光毒性が見られたが, それは臨床使用の 30,000 倍もの過剰量で見られた現象であることから, INTERCEPT システムにより製造された血小板は, 毒性に関連する効果を持たないと結論づけられた^{68)~69)}.

1998 年 6 月から 2000 年 6 月にかけて, ヨーロッパにおいて 103 名の血小板減少性患者に対し (テスト群 52 名, 対照群 51 名), S-59/UVA 処理血小板製剤と標準血小板製剤に差があるかどうか, 第 III 相臨床試験が行われた (euroSPRIT)⁷⁰⁾. 長期的回帰分析の結果, 投与 1 時間および 24 時間後

の血小板数増加補正值に両群間で差はなかったが, 輸血血小板数, 輸血前の血小板保存期間, 輸血前患者血小板数, 患者体重により, 統計的有意差が見られた. 全ての患者において, S-59 処理血小板に対する抗体産生はみられなかった. 血小板輸血に関連する副作用 (発熱, 悪寒, 発疹等) はみられたが, 両群間で有意差は無かった. これらのことから, S-59/UVA 処理血小板はこれまでの血小板と同等であると結論づけられた.

次に治療効果と安全性に関する第 III 相臨床試験が米国で行われた (SPRINT)⁷¹⁾. 血小板減少症の患者を対象に, S-59/UVA 処理血小板 (PCT 群) と通常の血小板 (コントロール群) の 28 日間における輸血治療を行った. 645 人の患者 (PCT 群 318 人, コントロール群 327 人) を対象に, 第一のエンドポイントは WHO 基準のグレード 2 出血を示す患者の比率, 次のエンドポイントはグレード 3 や 4 出血, 1 時間あるいは 24 時間血小板数増加値 (CCI) などの比率として行われた. グレード 2 出血の発生率は PCT 群で 58.5%, コントロール群で 57.5%, グレード 3 か 4 の出血は PCT 群 4.1%, コントロール群 6.1% と, 両群で同等であった. 平均 1 時間 CCI は, PCT 群で 11.1×10^3 , コントロール群で 16.0×10^3 , 次の輸血までの平均日数は, PCT 群で 1.9 日, コントロール群で 2.4 日, 輸血回数は PCT 群で 8.4 回, コントロール群で 6.2 回と $P < 0.01$ で有意差があった. これは PCT 群の血小板数が PCT 処理により損失するためと考えられた. PCT 群において輸血反応が有意

Table 8 Current status of the implementation of the INTERCEPT system (S-59/UV-A, Cerus/Baxter)

Country	Requirement for implementation
Norway Italy Spain Belgium Portugal	Possible with CE mark only (Already implemented in 8 blood centers)
UK France	Domestic validation required
Germany	Validation at each blood center required

に少なかったが (PCT 群 3.0%, コントロール群 4.4%, $P = 0.02$), 発症した患者数の割合に差はなかった。輸血反応が有意に少なかったのは, PCT により白血球が不活化され, サイトカインの蓄積が抑えられたためかも知れないと述べられている。血小板輸血不応状態に陥った患者の割合は, PCT 群 6%, コントロール群 9% であった。輸血後の血小板数増加や次回輸血までの日数は PCT 群で低下したものの, グレード 2 出血の発生率には両群間で差はなかった。このことから, S-59/UV 処理血小板製剤の治療効果は従来の血小板製剤と同等であると考えられた。また, 全体を通して, PCT 血小板に由来する異常な毒性反応や副作用は発生しなかった。PCT 血小板は臨床止血効果があり, 輸血感染症のリスクを更に低減できる可能性がある。

この血小板製剤に対する INTERCEPT システムは, 米国ではまだ承認されていないが, ヨーロッパでは CE Mark を取得し 5 カ国 8 血液センターで使用され (Table 8)^{72)~75)}, 既に 1,500 例の輸血例がある (2004 年 1 月時点, FRENCH BLOOD ASSOCIATION-EFS 報告)。

2-2. リボフラビン

血漿に浮遊した血小板製剤 (約 250mL) と 500 μ M リボフラビン溶液 35mL を含むバッグを無菌的に接合し混合する。従って, 血漿は 90% に希釈され, リボフラビンの最終濃度は 60 μ M になる。波長 265~370nm の UV を 6.2J/mL で約 8 分間照射する。リボフラビンは必須栄養素の一つであることから, その毒性は無いに等しい。また光照

射により分解産物であるルミクロームが生成するが, 新生児黄疸の治療に光線療法が用いられてきた経験からしても, ルミクロームの毒性もほとんど無いといえる。Ames テストによる遺伝毒性やマウスによる急性毒性試験においても, ルミクロームは何の毒性も示さなかった⁷⁶⁾。従って, リボフラビン光処理した製剤からは, 薬剤を除く必要が無いといえる。

血小板製剤に添加した病原体は, cell-free/associate HIV では 5.9 $\log_{10}$, latent HIV では 4.5 $\log_{10}$, PPV では 5.0 $\log_{10}$, WNV では 5.2 $\log_{10}$ と不活化され, 細菌も, 表皮ブドウ球菌で >4.2 $\log_{10}$, 大腸菌で >4.4 $\log_{10}$ の不活化率が得られた⁷⁷⁾。パフィーコート由来, アフェレーシス由来の如何に関わらず処理後 1 日保存, 5 日間保存した後の血小板数, pH, は減少し, 乳酸値, グルコース消費量, 形態スコア, P-セレクチン発現量 (活性化マーカー) が有意に上昇した^{77, 78)}。しかし, このような変化も臨床使用上には大きな問題にはならないだろうと考えられている。

2-3. チオニン

チオニンはメチレンブルーと同じフェノチアジン系色素であり, UV 領域と可視領域に吸収波長を持つ。光吸収したチオニンは光増感作用を示し, ウイルス, 細菌等の遺伝子に傷害を与える。メチレンブルー光処理では血小板の機能を損なうことから, 血小板製剤の病原体不活化法としてチオニンが検討され始めている。血小板浮遊液 (血漿 30~40% + 保存液 T-Sol) に添加した各種エンベロープウイルスは, チオニン 1 μ M と可視光照射により 5~6 $\log_{10}$ 以上不活化された⁷⁹⁾。一方, 白血球や細菌はチオニン/可視光照射では不活化されず, その処理に引き続いて UVB 照射を行うことにより不活化効果が得られたものの, 血漿含量が 30% になるとその不活化効果は減弱した。しかし, 実製造工程を加味し, 実際に混入する細菌数は 10~20pfu/mL と想定されるため, このレベルの不活化には効果があるものと考えられている。

3. 赤血球製剤

赤血球製剤では, 低温でも増殖するエルシニア菌や混入白血球に起因する副作用が問題であり,

それらをも防ぎうるものが病原体不活化法に求められている。赤血球製剤の病原体不活化法には、光増感色素と光照射を組み合わせる方法と、光照射を必要とせずに病原体の核酸と化学反応する化合物を用いる方法がある。

3-1. Inactine (PEN110)

Inactine (PEN110) はエチレンイミン多量体で、易水溶性、陽性荷電、核酸指向性を高めた、新規に合成された化合物である。陽性荷電であるため陰性荷電の核酸に静電的に結合し、特にグアニン塩基をアルキル化して、塩基の破壊と DNA/RNA 鎖の切断を起こし、そこで複製、転写を阻害する。これにより多くの病原体が感染性を失う。光照射は必要としない。

赤血球保存液を含むヘマトクリット 60~70% の赤血球製剤に PEN110 を終濃度 0.1% (vol/vol) で混合し、室温で放置する。それによりエンペロブウイルスは早いもので 3 時間後に感染性が検出限界以下となり、 $5 \sim 7 \log_{10}$ の不活化率 (VSV, sindbis virus) が得られる。中でも、不活化が困難とされている多くのノンエンペロブウイルスも 18 時間処理することにより、検出限界以下まで不活化することが出来る ($> 6.2 \log_{10}$, PPV⁸⁰⁾)。またウイルスとして最も問題となる HIV や、米国を震撼させた WNV にも効果がある^{81, 82)}。赤血球製剤に特徴的な病原体としては、赤血球に寄生するマラリア原虫、赤血球製剤の保存温度である 4~6 °C でも増殖をするエルシニア菌等がある。PEN110 はそれら病原体も不活化できることが報告されている^{83)~85)}。また、白血球に含まれる DNA にも作用し、赤血球製剤の混入白血球が原因となり輸血の重篤な副作用である移植片対宿主病 (GVHD) を防止できることが、マウスモデルにて示され、従来その副作用防止策として用いられていたガンマ線照射に取って代わりうる可能性が示された⁸⁶⁾。

PEN110 の毒性試験は、ラットとウサギを用いて行われた⁸⁷⁾。その結果、PEN110 処理製剤に含まれる量の 48,000~64,000 倍の投与量においても、受精能、生殖能や初期胎児発生に影響を及ぼさなかったと報告されている。

前臨床および臨床試験では、業務標準に則り採血された赤血球製剤に終濃度 0.1% (vol/vol) の PEN110 を添加して 22~24 °C で 6 時間処理し、その後 0.2% dextrose/0.9% NaCl で洗浄して PEN110 除去する。洗浄により PEN110 濃度は 50 ng/mL 以下となり、血漿タンパク質、加えてブリオンも除去されると考えられている。この方法により、BVDV は $> 5.7 \log_{10}$ 、PPV は $> 5.9 \log_{10}$ 不活化され、保存液の違い (CPD/AS-1 と CP2D/AS-3) による不活化効果の差もみられなかった⁸⁸⁾。42 日間保存しても、細胞内、細胞外 K 濃度、溶血率、ATP レベル、pH について、対照群との間に臨床的に問題となるような差はみられていない。ヒトへの輸血実験において、両群間で赤血球の生存率には差はなく、また、この時点では PEN110 処理による新たな抗原性の発現も無かったと考えられていた。健康人ボランティア 12 名による第 I 相臨床試験においても、⁵¹Cr/^{99m}Tc 赤血球を用いた検討結果から、24 時間生存率や生体内半減期に、PEN110 処理群と対象群の間に差はみられておらず、副作用の報告もない⁸⁹⁾。しかし、2003 年に慢性的輸血患者を対象とした第 III 相臨床試験において、PEN110 処理赤血球に対する抗体産生が患者に発生し、その後、対象疾患を心臓外科手術患者に限定し継続されたが 1 名の患者に再び抗体産生がみられたため、2004 年 11 月に臨床試験は中断された。現在、PEN110 処理赤血球の抗原性を低減する方法の開発が進められている。

3-2. S-303

S-303 は FRALE (frangible anchor linker effector) 化合物であり、病原体の核酸に共有結合して不活化するアルキル化剤である。この化合物は anchor として働く核酸結合部位と effector となるアルキル化部位、そしてその 2 つを繋ぐアルキル鎖からなる⁹⁰⁾。S-303 は、150 μ M の濃度でヘマトクリット 60% の赤血球製剤中の HIV、DHBV、BVDV を $6 \log_{10}$ 以上、エルシニア菌、表皮ブドウ球菌を $4 \log_{10}$ 以上不活化することができる^{91, 92)}。このときの溶血、ATP、グルコースおよび乳酸レベルは 1~6 °C、42 日間保存後において、コントロールと変わらない。マウス (同種血) およびイ

ヌ（自己血）への投与実験では、処理群と未処理群の赤血球生体内寿命は同等である⁹²⁾。イヌへの投与では、臨床症状および臓器特異的な毒性はみられていない。その後の検討では、赤血球製剤を200 μ MのS-303で12時間処理し、その後8時間、残存薬剤の除去処理を行う。これにより、多くのウイルスや細菌、白血球、原虫を不活化できることが報告されている^{93,94)}。また、Amesテストによる変異原性は認められず、マウスを用いた検討においても遺伝子毒性、癌原性は認められなかった⁹⁵⁾。これらの前臨床試験を踏まえて臨床試験へと進んだが、第III相臨床試験において臨床的副作用は認められなかったもののS-303処理赤血球に対する抗体産生が2名の患者でみられたため、開発が中断された。

3-3. ジメチルメチレンブルー

ジメチルメチレンブルーはメチレンブルー誘導体であり、より疎水性が強くなって膜透過性が良好な、赤色光により励起される光増感色素である。ジメチルメチレンブルーのDNAに対する親和性はメチレンブルーの約10倍で、一重項酸素の量子収率（吸収した光子数に対して生成した一重項酸素数の比）は0.76とメチレンブルーの0.5よりも大きい⁹⁶⁾。従って、ジメチルメチレンブルーによるウイルス不活化作用の一機序は、一重項酸素による核酸傷害だと考えられる⁹⁷⁾。当初メチレンブルーによる赤血球製剤の病原体不活化が検討され、ウイルス不活化効果が確認されてきたが、細胞内ウイルスや細菌、白血球を不活化できないこと、溶血率が高いこと、膜に傷害を与えIgGやアルブミンが付着すること、赤血球からのカリウム漏出が高いことから^{98,99)}、ジメチルメチレンブルーへと研究は移行した。

ジメチルメチレンブルーによる赤血球製剤の不活化は、ヘモグロビンの吸収波長と重ならない600nm以上の光が有効である。通常の赤血球製剤はヘマトクリットが60%であるため、いくら長波長の光を照射するとしても、そのままの状態では色素まで光が到達しない。そのため、病原体不活化効果を得るためには、ヘマトクリットを30%にまで低下させる必要がある。その結果、種々の細

胞内、細胞外ウイルスの不活化が可能となり、赤血球に及ぼす影響も、溶血率はコントロール群に比べ若干上昇するものの臨床上許容範囲内であり、形態スコア、カリウムイオン漏出、ATPおよび2,3-DPGレベルはコントロール群とほぼ同程度であった¹⁰⁰⁾。また白血球の不活化も可能であり¹⁰¹⁾、色素濃度を高くし、光源をエネルギーの大きい赤色発光ダイオードにすることにより、ヘマトクリット45%においてもウイルス不活化が可能となったが¹⁰²⁾、赤血球膜への酸化傷害もより大きくなるため、カリウムイオンの漏出を防ぐことが出来なかった¹⁰³⁾。異なるアプローチとして、ジメチルメチレンブルー処理時に赤血球膜タンパク質band 3に特異的に結合するジピリダモールとビタミンEの水溶性アナログであるTroloxを添加することにより、ウイルス不活化能に影響を及ぼすことなく溶血とカリウムイオン漏出をある程度防ぐことができると報告されている^{104,105)}。

3-4. リボフラビン

リボフラビンは血小板、血漿の不活化剤としてのみならず、赤血球への応用も検討されている。学会報告が主体となるため詳細な条件は明らかではないが、赤血球製剤中のウイルス不活化に効果があり^{61,106,107)}、マラリア原虫の不活化や¹⁰⁸⁾、輸血後GVHDの防止¹⁰⁹⁾にも効果があると報告されている。

今後の課題

輸血用血液の安全性を確保するためウイルス不活化は必須であるが、現時点で実用化されているのは血漿製剤に対するS/D法及びMB/光照射法であり、血小板製剤に対してはS-59/UVA照射である。しかし、赤血球製剤については臨床試験に入っているものもあるが、中止になったり未だ前臨床試験段階であったりと、実用化には今しばらく時間を要する。ウイルス感染の防止は、全ての輸血用血液製剤に不活化処理が施されなければ成し得ない。また、現行の方法に変わる技術開発も進んでおり、より良い方法が開発される可能性も含んでいる。それ故、いずれの方法が最も優れているのか、あるいは我が国の血液事業に合致しているのか、まだ決断を下すことはできない。いず

れの方法も、ウイルスのみならず、細菌、原虫、寄生虫などのほか白血球も不活化の対象としている点が重要である。多くの選択肢の中から、我が国にとって最良な方法を採用していくことが今後の課題となるが、その議論は企業の開発速度に依存せざるを得ない。製品の品質、使いやすさ、不活化能力、薬剤毒性など、様々な要因を考慮して、最良の不活化法の採用が望まれる。

現在の輸血によるウイルス感染リスクは数万分の一から数十万分の一であるが、国民意識としては、100% 感染の恐れのない安全な血液製剤を求める風潮にある。さらに米国での WNV 感染や本邦での HEV 感染など、今まで考えられなかった事例が起こり始めている。どこまで輸血の安全性を高めるかは種々の見解があろうが、対費用効果の分析が重要であることは異論のないところであろう¹¹⁰⁾。現在のように問診の強化や NAT 導入などにより血液製剤の安全性が格段に高まった状況で、不活化処理製剤投与群と未処理製剤投与群との比較で有効性を評価することは非常に困難である。しかしながら、今後輸血後ウイルス感染を完全に防止するためには、血液製剤のウイルス不活化が最も有望な方法であると考えられる。新たな技術導入に伴う、設備投資費用、医療費高騰などの議論も今後の課題となる。加えて、血液製剤中に残存した不活化剤による長期毒性や、妊婦や小児への影響なども、懸念として残る。臨床試験で安全性が確認されたとしても、市販後調査により安全性をモニタリングしていくことが重要である。

病原体不活化法は、NAT、放射線照射、保存前白血球除去、細菌検査などとともに、輸血用血液製剤の安全対策の一つである。平成 16 年には、厚生労働省の「輸血医療の安全性確保の総合対策」の中で、日赤が実施すべき安全対策(8 項目)の一つとしての導入が求められることとなった。したがって、他の安全対策との関わりを整理し、効率良い導入を考えていかなければならない¹¹¹⁾。もし将来、全ての血液製剤に病原体不活化法が施されることになるとすれば、他の安全対策の見直しも必要となるかもしれない。病原体不活化技術の導

入により他の安全対策の効果が担保されるのであれば、それらの対策の縮小、廃止なども視野に入れ、効率良い血液事業運営が求められることになる。

文 献

- 1) Japanese Red Cross NAT Screening Research Group : Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors (Erratum in : Jpn J Infect Dis, 53 : 219, 2000) Jpn J Infect Dis, 53 : 116—123, 2000.
- 2) Tomono T, Murokawa H, Minegishi K, et al : Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV : experience in Japan. Dev Biol (Basel) 108 : 29—39, 2002.
- 3) Tabor E, Epstein JS : NAT screening of blood and plasma donations : evolution of technology and regulatory policy. Transfusion, 42 : 1230—1237, 2002.
- 4) Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al : Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. N Engl J Med, 351 : 760—768, 2004.
- 5) Phelps R, Robbins K, Liberti T, et al : Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. Transfusion, 44 : 929—933, 2004.
- 6) Corash L : Inactivation of viruses, bacteria, protozoa and leukocytes in platelet and red cell concentrates. Vox Sang, 78 (suppl 2) : 205—210, 2000.
- 7) Allain JP : Transfusion risks of yesterday and of today. Transfus Clin Biol, 10 : 1—5, 2003.
- 8) Dodd RY, Leiby DA : Emerging infectious threats to the blood supply. Annu Rev Med, 55 : 191—207, 2004.
- 9) Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. Transfusion, 41 : 1493—1499, 2001.
- 10) Dodd RY : Bacterial contamination and transfusion safety : experience in the United States. Transfus Clin Biol, 10 : 6—9, 2003.
- 11) Dodd RY : Transmission of parasites and bacteria by blood components. Vox Sang, 78 (suppl 2) : 239—242, 2000.
- 12) Herwaldt BL, Neitzel DF, Gorlin JB, et al : Trans-

- mission of *Babesia microti* in Minnesota through four blood donations from the same donor over a 6-month period. *Transfusion*, 42 : 1154—1158, 2002.
- 13) Wei Q, Tsuji M, Zamoto A, et al : Human babesiosis in Japan : isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J Clin Microbiol*, 39 : 2178—2183, 2001.
- 14) Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, et al : West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion*, 43 : 1018—1022, 2003.
- 15) Welch J, Maclaran K, Jordan T, et al : Frequency, viral loads, and serotype identification of enterovirus infections in Scottish blood donors. *Transfusion*, 43 : 1060—1066, 2003.
- 16) Budka H : Prions and transfusion medicine. *Vox Sang*, 78 (suppl 2) : 231—238, 2000.
- 17) Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, et al : Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363 : 417—421, 2004.
- 18) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al : Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*, 44 : 934—940, 2004.
- 19) Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, et al : Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. *Transfusion*, 44 : 1555—1561, 2004.
- 20) Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, et al : Inactivation of viruses in labile blood derivatives. II. Physical methods. *Transfusion*, 25 : 523—527, 1985.
- 21) Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, et al : Solvent/Detergent-treatment plasma : A virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood*, 79 : 826—831, 1992.
- 22) Kreil TR, Berting A, Kistner O, et al : West Nile virus and the safety of plasma derivatives : verification of high safety margins, and the validity of predictions based on model virus data. *Transfusion*, 43 : 1023—1028, 2003.
- 23) Vezon G : Viral inactivation of fresh plasma by solvent detergent. *Transfus Today*, 14 : 2—4, 1992.
- 24) Williamson LM, Llewelyn CA, Fisher NC, et al : A randomized trial of solvent/detergent-treated and standard fresh-frozen plasma in the coagulopathy of liver disease and liver transplantation. *Transfusion*, 39 : 1227—1234, 1999.
- 25) Mast AE, Stadanlick JE, Lockett JM, et al : Solvent/detergent-treated plasma has decreased antitrypsin activity and absent antiplasmin activity. *Blood*, 94 : 3922—3927, 1999.
- 26) Koenigbauer UF, Eastlund T, Day JW : Clinical illness due to parvovirus B19 infection after infusion of solvent/detergent-treated pooled plasma. *Transfusion*, 40 : 1203—1206, 2000.
- 27) Thiery G, Jacobs F, Bussel A, et al : Acute hyperphosphatemia after plasma exchange with S/D-treated plasma. *Transfusion*, 44 : 947—948, 2004.
- 28) Flamholz R, Jeon HR, Baron JM, et al : Study of three patients with thrombotic thrombocytopenic purpura exchanged with solvent/detergent-treated plasma : is its decreased protein S activity clinically related to their development of deep venous thromboses? *J Clin Apheresis*, 15 : 169—172, 2000.
- 29) Solheim BG, Hellstern P : Composition, efficacy, and safety of S/D-treated plasma. *Transfusion*, 43 : 1176—1178, 2003.
- 30) Lambrecht B, Mohr H, Knuver-Hopf J, et al : Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang*, 60 : 207—213, 1991.
- 31) Abe H, Ikebuchi K, Wagner SJ, et al : Potential involvement of both Type I and Type II mechanisms in M13 virus inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem Photobiol*, 66 : 204—208, 1997.
- 32) Abe H, Wagner SJ : Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivatives, or merocyanine 540 photosensitization. *Photochem Photobiol*, 61 : 402—409, 1995.
- 33) Bachmann B, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, et al : Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light. *J Med Virol*, 47 : 172—178, 1995.
- 34) Owada T, Yamada Y, Abe H, et al : Elucidation of the HIV-1 virucidal mechanism of methylene blue photosensitization and the effect on primary isolates. *J Med Virol*, 62 : 421—425, 2000.
- 35) Tissot JD, Hochstrasser DF, Schneider B, et al : No evidence for protein modifications in fresh frozen plasma after photochemical treatment : an analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Br J Haematol*, 86 : 143—146, 1994.
- 36) Mohr H, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, et al : No evidence for neoantigens in human plasma after photochemical virus inactivation. *Ann Hematol*, 65 : 224—228, 1992.
- 37) AuBuchon JP, Pickard C, Herschel L, et al : Re-

- removal of methylene blue from plasma via an adsorbent filter. *Vox Sang*, 74 : 1—6, 1998.
- 38) Abe H, Yamada-Ohnishi Y, Hirayama J, et al : Elimination of both cell-free and cell-associated HIV infectivity in plasma by a filtration/methylene blue photoinactivation system. *Transfusion*, 40 : 1081—1087, 2000.
 - 39) Riggert J, Humpe A, Legler TJ, et al : Filtration of methylene blue-photooxidized plasma : influence on coagulation and cellular contamination. *Transfusion*, 41 : 82—86, 2001.
 - 40) Suontaka AM, Blomback M, Chapman J : Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light. *Transfusion*, 43 : 568—575, 2003.
 - 41) Hornsey VS, Drummond O, Young D, et al : A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma : the Maco Pharma Maco-Tronic system. *Transfus Med*, 11 : 31—36, 2001.
 - 42) Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV : Methylene blue-treated fresh-frozen plasma : what is its contribution to blood safety? *Transfusion*, 43 : 1322—1329, 2003.
 - 43) Mohr H, Knuver-Hopf J, Gravemann U, et al : West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion*, 44 : 886—890, 2004.
 - 44) Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, et al : Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol*, 65 : 441—445, 1997.
 - 45) Gutter B, Speck WT, Rosenkranz HS : A study of the photoinduced mutagenicity of methylene blue. *Mutat Res*, 44 : 177—182, 1977.
 - 46) Tudek B, Laval J, Boiteux S : SOS-independent mutagenesis in lacZ induced by methylene blue plus visible light. *Mol Gen Genet*, 236 : 433—439, 1993.
 - 47) Wagner SJ, Cifone MA, Murli H, et al : Mammalian genotoxicity assessment of methylene blue in plasma : implications for virus inactivation. *Transfusion*, 35 : 407—413, 1995.
 - 48) Chapman J : Virus inactivation of plasma by methylene blue photoactivation : approaches and toxicology. *Transfus Today*, 20 : 2—4, 1994.
 - 49) Martindale W : Methylene Blue : The Extra Pharmacopoeia. 29th Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1989, 843—844.
 - 50) Preiser JC, Lejeune P, Roman A, et al : Methylene blue administration in septic shock : A clinical trial. *Crit Care Med*, 23 : 259—264, 1995.
 - 51) Pohl U, Mohr H : Experiences in the clinical use of plasma photodynamically virus inactivated by the methylene blue/light procedure. *Vox Sang*, 70 (Suppl. 2) : 121, 1996.
 - 52) Hornsey VS, Krailadsiri P, MacDonald S, et al : Coagulation factor content of cryoprecipitate prepared from methylene blue plus light virus-inactivated plasma. *Br J Haematol*, 109 : 665—670, 2000.
 - 53) Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, et al : The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion*, 43 : 1238—1247, 2003.
 - 54) Atance R, Pereira A, Ramirez B : Transfusing methylene blue-photoinactivated plasma instead of FFP is associated with an increased demand for plasma and cryoprecipitate. *Transfusion*, 41 : 1548—1552, 2001.
 - 55) Lin L, Cook DN, Wieseahn GP, et al : Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion*, 37 : 423—435, 1997.
 - 56) Sawyer L, Mababangloob R, Sampson-Johannes A, et al : Inactivation of blood-borne pathogens in apheresis plasma using the INTERCEPT blood system. *Transfusion*, 44 : SP248, 2004.
 - 57) Donnelly B, Pinkoski L, Corash L : INTERCEPT blood system for plasma retains in vitro coagulation factor activity over a range of processing conditions. *Transfusion*, 44 : SP246, 2004.
 - 58) Ciaravino V, McCullough T, Cimino G, et al : Pre-clinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sang*, 85 : 171—182, 2003.
 - 59) Hambleton J, Wages D, Radu-Radulescu L, et al : Pharmacokinetic study of FFP photochemically treated with amotosalen(S-59)and UV light compared to FFP in healthy volunteers anticoagulated with warfarin. *Transfusion*, 42 : 1302—1307, 2002.
 - 60) Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, et al : Riboflavin and UV-light based pathogen reduction : extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol*, 80 : 15—21, 2004.
 - 61) Samar BM, Goodrich RP, Services V : Viral inactivation in plasma using riboflavin-based technology. *Transfusion*, 41 (9S) : 88S, 2001.
 - 62) Knutson F, Alfonso R, Dupuis K, et al : Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat-derived platelet concentrates under conditions that preserve in vitro platelet function. *Vox Sang*, 78 : 209—216, 2000.

- 63) Lin L, Dikeman R, Molini B, et al : Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion*, 44 : 1496—1504, 2004.
- 64) Jordan CT, Saakadze N, Newman JL, et al : Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen hydrochloride and ultraviolet A light inactivates free and latent cytomegalovirus in a murine transfusion model. *Transfusion*, 44 : 1159—1165, 2004.
- 65) Grass JA, Wafa T, Reames A, et al : Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood*, 93 : 3140—3147, 1999.
- 66) Grass JA, Hei DJ, Metchette K, et al : Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood*, 91 : 2180—2188, 1998.
- 67) Hei DJ, Grass J, Lin L, et al : Elimination of cytokine production in stored platelet concentrate aliquots by photochemical treatment with psoralen plus ultraviolet A light. *Transfusion*, 39 : 239—248, 1999.
- 68) Ciaravino V, McCullough T, Dayan AD : Pharmacokinetic and toxicology assessment of INTERCEPT (S-59 and UVA treated) platelets. *Hum Exp Toxicol*, 20 : 533—550, 2001.
- 69) Ciaravino V : Preclinical safety of a nucleic acid-targeted Helinx compound : a clinical perspective. *Semin Hematol*, 38 : 12—19, 2001.
- 70) van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, et al : Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment : the euroSPRITE trial. *Blood*, 101 : 2426—2433, 2003.
- 71) McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al : Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation : the SPRINT Trial. *Blood*, 104 : 1534—1541, 2004.
- 72) Picker SM, Speer R, Gathof BS : Evaluation of processing characteristics of photochemically treated pooled platelets : target requirements for the INTERCEPT Blood System comply with routine use after process optimization. *Transfus Med*, 14 : 217—223, 2004.
- 73) Picker SM, Speer R, Gathof BS : Functional characteristics of buffy-coat PLTs photochemically treated with amotosalen-HCl for pathogen inactivation. *Transfusion*, 44 : 320—329, 2004.
- 74) Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, et al : Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion*, 44 : 313—319, 2004.
- 75) Janetzko K, Lin L, Eichler H, et al : Implementation of the INTERCEPT Blood System for Platelets into routine blood bank manufacturing procedures : evaluation of apheresis platelets. *Vox Sang*, 86 : 239—245, 2004.
- 76) Piper S, Murphy S, Schuyler R, et al : Assessment of the acute toxicity and genotoxicity risks associated with lumichrome, the primary photoproduct of riboflavin. *Vox Sang*, 83 (Suppl 2) : 192, 2002.
- 77) Ruane PH, Edrich R, Gampp D, et al : Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*, 44 : 877—885, 2004.
- 78) Li J, de Korte D, Woolum MD, et al : Pathogen reduction of buffy coat platelet concentrates using riboflavin and light : comparisons with pathogen-reduction technology-treated apheresis platelet products. *Vox Sang*, 87 : 82—90, 2004.
- 79) Mohr H, Redecker-Klein A : Inactivation of pathogens in platelet concentrates by using a two-step procedure. *Vox Sang*, 84 : 96—104, 2003.
- 80) Lazo A, Tassello J, Jayarama V, et al : Broad-spectrum virus reduction in red cell concentrates using INACTINE PEN110 chemistry. *Vox Sang*, 83 : 313—323, 2002.
- 81) Ohagen A, Gibaja V, Aytay S, et al : Inactivation of HIV in blood. *Transfusion*, 42 : 1308—1317, 2002.
- 82) Mather T, Takeda T, Tassello J, et al : West Nile virus in blood : stability, distribution, and susceptibility to PEN110 inactivation. *Transfusion*, 43 : 1029—1037, 2004.
- 83) Zavizion B, Serebryanik D, Serebryanik I, et al : Prevention of *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas putida* outgrowth in deliberately inoculated blood by a novel pathogen-reduction process. *Transfusion*, 43 : 135—142, 2003.
- 84) Zavizion B, Purmal A, Chapman J, et al : Inactivation of mycoplasma species in blood by INACTINE PEN110 process. *Transfusion*, 44 : 286—293, 2004.
- 85) Zavizion B, Pereira M, de Melo Jorge M, et al : Inactivation of protozoan parasites in red blood cells using INACTINE PEN110 chemistry. *Transfusion*, 44 : 731—738, 2004.
- 86) Fast LD, Semple JW, DiLeone G, et al : Inhibition of xenogeneic GVHD by PEN110 treatment of donor human PBMCs. *Transfusion*, 44 : 282—285, 2004.
- 87) Chapman JR, Moore K, Butterworth BE : Patho-

- gen inactivation of RBCs : PEN110 reproductive toxicology studies. *Transfusion*, 43 : 1386—1393, 2003.
- 88) Purmal A, Valeri CR, Dzik W, et al : Process for the preparation of pathogen-inactivated RBC concentrates by using PEN110 chemistry : preclinical studies. *Transfusion*, 42 : 139—145, 2002.
- 89) AuBuchon JP, Pickard CA, Herschel LH, et al : Production of pathogen-inactivated RBC concentrates using PEN110 chemistry : a Phase I clinical study. *Transfusion*, 42 : 146—152, 2002.
- 90) Cook D, Wollowitz D : Method for inactivating pathogens in red cell compositions using quina-craine mustard. US Patent #5691132 : 1996.
- 91) Cook D, Stassinopoulos A, Merritt J, et al : Inactivation of pathogens in packed red blood cells (PRBC) concentrates using S-303. *Blood*, 90S : 409a, 1997.
- 92) Cook D, Stassinopoulos A, Wollowitz S, et al : In vivo analysis of packed red blood cells treated with S-303 to inactivate pathogens. *Blood*, 92S : 503a, 1998.
- 93) Guillemain B, Jauvin V, Dupuis K, et al : Helinx technology inactivates human T-cell leukemia virus (HTLV I/II) in human red blood cells. *Transfusion*, 43 : SP417, 2003.
- 94) Dupuis K, Bernard K, Jones S, et al : Helinx technology inactivates pathogens of emerging importance in red cell concentrates. *Blood*, 102 : 816a, 2003.
- 95) Ciaravino V, Stassinopoulos A, Singh Y, et al : IN-TERCEPT red blood cells are not genotoxic or carcinogenic in a series of in vitro and in vivo tests. *Blood*, 100 : 143b, 2002.
- 96) Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, et al : Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. *Photochem Photobiol*, 67 : 343—349, 1998.
- 97) Hirayama J, Wagner SJ, Abe H, et al : Involvement of reactive oxygen species in hemoglobin oxidation and virus inactivation by 1,9-dimethylmethylene blue phototreatment. *Biol Pharm Bull*, 24 : 418—421, 2001.
- 98) Wagner SJ, Storry JR, Mallory DA, et al : Red cell alterations associated with virucidal methylene blue phototreatment. *Transfusion*, 33 : 30—36, 1993.
- 99) Wagner SJ, Robinette D, Storry J, et al : Differential sensitivities of viruses in red cell suspensions to methylene blue photosensitization. *Transfusion*, 34 : 521—526, 1994.
- 100) Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, et al : Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylene blue. *Transfusion*, 38 : 729—737, 1998.
- 101) Skripchenko AA, Wagner SJ : Inactivation of WBCs in RBC suspensions by photoactive phenothiazine dyes : comparison of dimethylmethylene blue and MB. *Transfusion*, 40 : 968—975, 2000.
- 102) Wagner SJ, Skripchenko A, Pugh JC, et al : Duck hepatitis B photoinactivation by dimethylmethylene blue in RBC suspensions. *Transfusion*, 41 : 1154—1158, 2001.
- 103) Wagner SJ, Skripchenko A, Thompson-Montgomery D : Use of a flow-cell system to investigate virucidal dimethylmethylene blue phototreatment in two RBC additive solutions. *Transfusion*, 42 : 1200—1205, 2002.
- 104) Van Steveninck J, Trannoy LL, Besselink GA, et al : Selective protection of RBCs against photodynamic damage by the band 3 ligand dipyrindamole. *Transfusion*, 40 : 1330—1336, 2000.
- 105) Besselink GA, van Engelenburg FA, Ebbing IG, et al : Additive effects of dipyrindamole and Trolox in protecting human red cells during photodynamic treatment. *Vox Sang*, 85 : 25—30, 2003.
- 106) McAteer MJ, Tay-Goodrich BH, Doane S, et al : Photoinactivation of virus in packed red blood cell units using riboflavin and visible light. *Transfusion*, 40 (10S) : 99S, 2000.
- 107) Reddy HL : Riboflavin and light inactivate West Nile virus. *Transfusion*, 43 (9S) : 8A, 2003.
- 108) Lippert L, Watson R, Doane S, et al : Inactivation of *P. Falciparum* by riboflavin and light. *Vox Sang*, 83 (Suppl 2) : 163, 2002.
- 109) Lockerbie O, Rice J, Janssens M, et al : Prevention of graft-versus-host disease using a pathogen reduction process for blood products using riboflavin and UV illumination. 14th Congress of the Interdisciplinary European Society for Haemapheresis and Haemotherapy (abstract) 2103 ; O44, 19 : 19, 2003.
- 110) Pereira A : Cost-effectiveness of transfusing virus-inactivated plasma instead of standard plasma. *Transfusion*, 39 : 479—487, 1999.
- 111) 阿部英樹, 池田久實 : 安全な血液供給の現状と将来. *臨床病理*, 118 (suppl) : 1—8, 2002.