

原 著

血小板製剤の AMT/UVA ウイルス不活化法におけるルチンの効果

山田 淑子 阿部 英樹 池淵 研二 関口 定美

北海道赤十字血液センター研究部

(平成 10 年 10 月 21 日受付)

(平成 11 年 4 月 9 日受理)

EFFECT OF RUTIN ON VIRUS INACTIVATION BY AMT IN COMBINATION WITH ULTRAVIOLET-A IRRADIATION IN PLATELET CONCENTRATES

Yoshiko Yamada-Ohnishi, Hideki Abe, Kenji Ikebuchi
and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center

Treatment with psoralens and ultraviolet-A (UVA) irradiation have been found to be effective for virus sterilization of platelet concentrates (PCs). We report here a virus inactivation method using a combination of psoralen derivative 4'-aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) and UVA irradiation (AMT/UVA). Further, we also investigated the effect of rutin, a radical scavenger, on the inactivation of vesicular stomatitis virus (VSV) as a model virus administered in PCs and platelet functions were investigated.

Spiked VSV (about $5\log_{10}$) in PCs was inactivated by a combination of AMT ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) and $5.2\text{ J}/\text{cm}^2$ UVA irradiation in the absence of rutin. To obtain equivalent levels of VSV kill in the presence of 0.35 mM rutin, treatment with $13.0\text{ J}/\text{cm}^2$ of UVA irradiation with AMT was performed.

When PCs were treated under each condition in which $5\log_{10}$ VSV was inactivated by AMT/UVA with or without rutin, platelet aggregation function was maintained for more than 80% of untreated platelets. These findings indicate that the presence of rutin during AMT/UVA treatment conferred no beneficial effect. In addition, overnight storage of PCs with AMT induced 40% loss of platelet aggregation in response to $10\mu\text{M}$ ADP. The findings suggest that UVA irradiation is required immediately after the addition of AMT.

Key words : virus inactivation, 4'-aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen, ultraviolet-A, rutin

緒 言

検査技術の向上によって輸血後ウイルス感染は著しく減少したが、現行のスクリーニング検査ではウインドウピリオド期および未知のウイルスを検出することはできないため、ウイルス感染を完全に防止することは難しい。そこで血液製剤の安全性をさらに高めるには、『ウイルスの不活化』が必要であり、すでに血漿分画製剤では、ウイルス不活化法として加熱処理や solvent/detergent 処理 (S/D 処理) が施行され、高い安全性が保証さ

れている。また血漿製剤では、S/D 処理あるいはメチレンブルー光処理が欧米諸国で実施され¹⁾²⁾、わが国でも導入に向けて準備が進められている。一方、細胞成分の血液製剤である血小板製剤 (platelet concentrates ; PC) および赤血球製剤では、ウイルス核酸を標的とした不活化法が最も有効と考えられ、PC では主にソラレン類と紫外線 A (ultraviolet A ; UVA)、赤血球製剤ではフタロシアニン類などの光増感物質と可視光の組み合わせが検討されている。これらの不活化処理によ

て、細胞内および細胞外のウイルスを不活化できること、また活性酸素スカベンジャーの添加によって、不活化処理時に発生する活性酸素による血小板や赤血球機能の障害を効果的に防ぐことが報告されているが^{3,4)}、実用化には至っていない。そこで今回われわれは、PCでのウイルス不活化法の開発を目的として、ソラレン類の一つである4'-aminomethyl-4,5',8-trimethyl psoralen (AMT)とUVAを用いて、vesicular stomatitis virus (VSV)の不活化効果と血小板機能への影響について、活性酸素スカベンジャーの一種であるrutin添加による効果を含めて検討したので報告する。

材料および方法

PC

400ml 全血由来PCをプールし、22°Cで一晩水平振盪保存した後、使用した。

AMT/UVA 処理

AMT (シグマ社)は精製水で5mg/ml溶液を、rutin (シグマ社)は0.15N NaOHで10, 35, 50, 100 mM溶液を調製した。これらは、0.2 μ mのフィルターで濾過後、使用時まで-20°Cで凍結保存した。AMTはPCの1/100量添加し、最終濃度を50 μ g/mlとした。rutin濃度によるVSV不活化効果への影響をみた実験では、rutinをPCの1/100量添加し、最終濃度0, 0.1, 0.35, 1.0mMで検討し、その他の実験では、50mM rutinをPCの1/143量添加し、最終濃度0.35mMで検討した。rutinの溶媒であるNaOHの添加によって、PCのpHはほとんど変化しなかった。AMTおよびrutinを添加したPCを、VSVの不活化実験では24穴プレートに0.5ml/well、血小板機能の測定実験では35mmディッシュに2.6mlずつ分注し、各容器のPC液高を2.6mmにした。室温暗所で15分間放置後、水平振盪しながらUVAを照射した。UVA光源にはBLBランプ6本を平行に並べた照射装置(波長域315~425nm, 強度0.13J/cm²/分)を使用した。

VSV 感染価測定

VSVの感染価はArmstrongの方法に改変を加えた細胞変性効果(CPE)法により求めた⁵⁾。あらかじめ10%FCS加DME培地(日水製薬)に浮遊

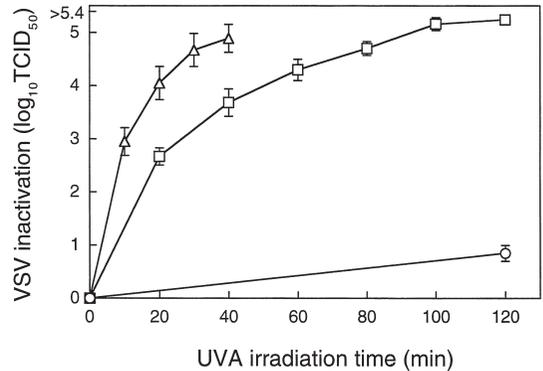


Fig. 1 Inactivation of VSV by AMT/UVA

VSV added to PC was treated with 50 μ g/ml AMT and UVA light in the absence or presence of 0.35 mM rutin. \circ ; non-AMT, \triangle ; AMT, \square ; AMT and rutin. Mean \pm SEM, n=10.

させたVero細胞を、96穴プレートに播種し、一晩培養して単層培養を作成した。PCに1/50量のVSVを添加し、AMT/UVA処理した。遠心(9,000 rpm, 10分)により血小板を除去したPC上清を、DME培地で10倍系列希釈し、Vero細胞の単層培養に100 μ l/well, 6wellずつ分注した。これを、37°C5%CO₂条件下で3日間培養後、CPEの有無を顕微鏡下で観察し、感染価(TCID₅₀)をReed-Muench法により算出した⁶⁾。CPE法の検出限界は10^{0.5}TCID₅₀である。

血小板機能の測定

PCをAMT/UVA処理後、プラスチックチューブに移し、22°Cで水平往復振盪保存した。経時的にサンプリングし、5 μ g/mlコラーゲンまたは10 μ M ADP刺激による血小板の最大凝集率を、NBS Hematracer 801 (アメルング社)にて測定した。結果は、未処理血小板の最大凝集率を100%として、それに対する割合で表した。

結果

AMT/UVA 処理によるウイルスの不活化効果

PCにスパイクしたVSV (5.9 \pm 0.1 log₁₀ TCID₅₀)は、AMT/UVA処理によって、UVA照射時間(照射量)に依存して不活化され、40分間(5.2J/cm²)の照射により約5 log₁₀不活化された(Fig. 1)。また、rutin (0.35mM)添加により、AMT/UVA処理による不活化効果は低下し、VSVをほぼ検出

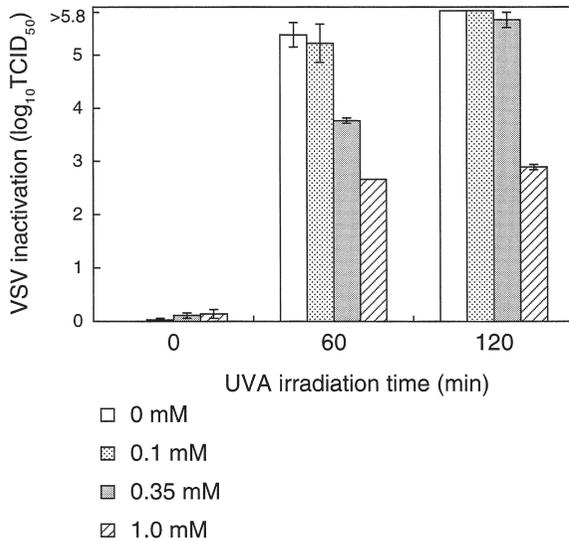


Fig. 2 Effect of rutin on VSV inactivation by AMT/UVA

VSV added to PC was treated with 50 μ g/ml AMT and UVA light in the presence of 0, 0.1, 0.35 or 1.0 mM of rutin. Mean \pm SEM, n=3.

限界まで (5.2log₁₀ 以上) 不活化するには, 約 100 分間 (13.0J/cm²) の UVA 照射が必要であった。

rutin によるウイルス不活化効果の変化

rutin の濃度によって AMT/UVA 処理によるウイルス不活化効果がどの程度抑制されるか, 0, 0.1, 0.35, 1.0mM rutin 存在下で比較した。Fig. 2 に示すように, rutin 濃度に依存して AMT/UVA 処理による VSV の不活化効果は低下した。また, 0.35mM 以下の rutin 存在下では AMT/UVA120 分処理によって VSV (6.3log₁₀TCID₅₀) はほぼ検出限界まで (5.7log₁₀ 以上) 不活化されたが, 1.0mM rutin 存在下では 2.9log₁₀ しか不活化されなかった。

血小板数によるウイルス不活化効果への影響

血小板数によって AMT/UVA 処理によるウイルス不活化効果が変わるか, 自己血漿で 1.0, 1.3, 1.6 $\times 10^9$ /ml に調製した PC を用いて検討した。Fig. 3 に示すように, 血小板数 1.0~1.6 $\times 10^9$ /ml の範囲, つまり臨床的に用いる PC では, VSV (6.3log₁₀TCID₅₀) の不活化効果は同程度であった。

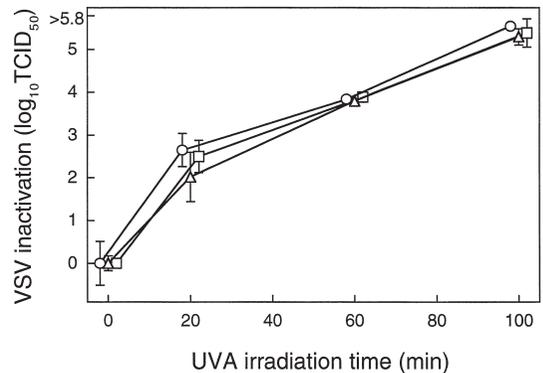


Fig. 3 Effect of platelet concentration on VSV photo-inactivation by AMT/UVA with rutin

VSV added to PC which contained 1.0, 1.3 or 1.6 $\times 10^9$ /ml of platelets was treated with 50 μ g/ml AMT and UVA light in the presence of 0.35 mM rutin.

○; 1.0 $\times 10^9$ /ml, △; 1.3 $\times 10^9$ /ml, □; 1.6 $\times 10^9$ /ml. Mean \pm SD, n=3.

AMT/UVA 処理による血小板凝集能の変化

AMT/UVA 処理により, UVA 照射時間に依存して, コラーゲンまたは ADP 刺激による血小板の最大凝集率は低下したが, 0.35mM rutin 添加によりその低下は抑制された (Fig. 4). rutin 存在下または非存在下で VSV を約 5log₁₀ 以上不活化する AMT/UVA 処理条件では, 処理当日および 1 日保存した PC の血小板の最大凝集率は, いずれも 80% 以上維持された。また, AMT 添加 UVA 未照射の PC を 1 日保存したとき, ADP 刺激による血小板の最大凝集率が 59 \pm 3% と著しく低下し, AMT/UVA120 分処理血小板 (65 \pm 3%) よりも低かった。

考 察

血小板製剤のウイルス不活化法として, ソラレン類の光増感物質と UVA 照射の組み合わせが検討されている。ソラレンは核酸指向性が強く, UVA が照射されると核酸の修飾, 切断を引き起こし, cell-free ウイルスだけでなく, ウイルス感染細胞 (ゲノムに組み込まれたプロウイルスを含む) も不活化する⁷⁸⁾。一方, AMT/UVA 処理時に発生する活性酸素によって血小板が障害されることから, 活性酸素の消去剤であるスカベンジャーについて検討され, rutin を 0.35mM 添加したとき血

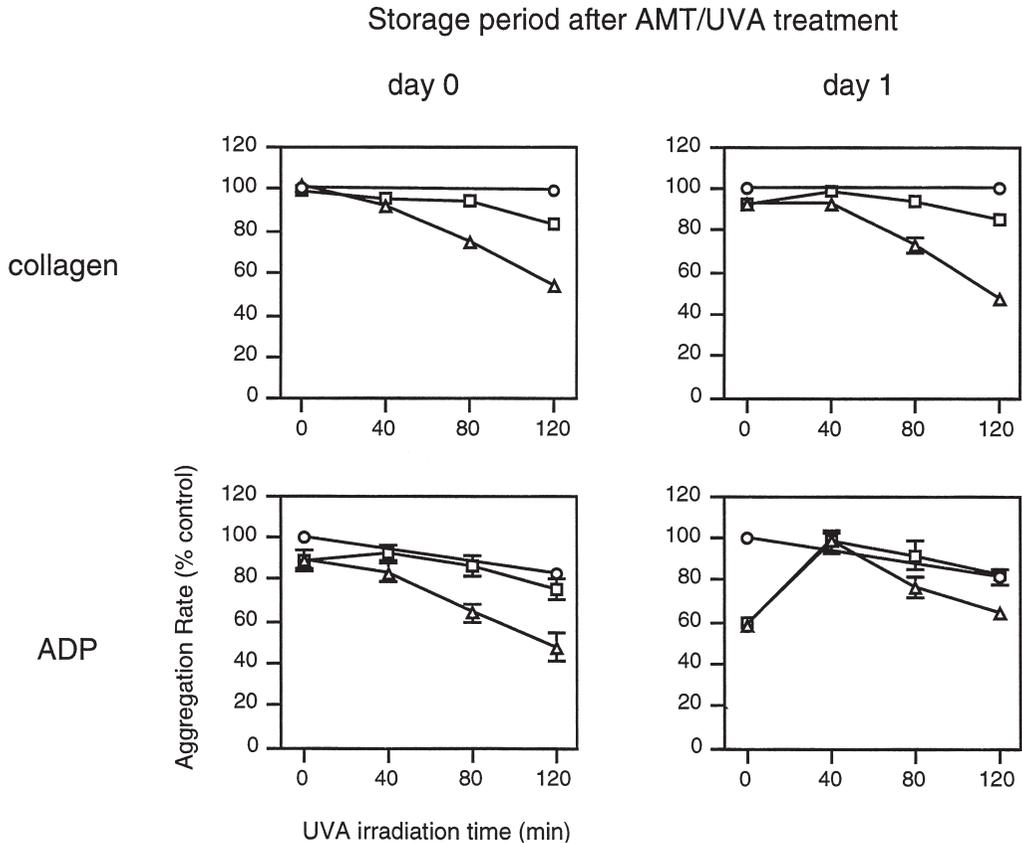


Fig. 4 Aggregation activities of platelets treated by AMT/UVA

PC was treated with 50 μ g/ml AMT and UVA light in the absence or presence of 0.35 mM rutin. After treatment and overnight storage, the rate of platelet aggregation in response to 5 μ g/ml of collagen or 10 μ M of ADP was measured and compared to that of untreated control. Maximum aggregation rate of untreated control in response to collagen or ADP was 81.5 \pm 7.8% or 47.2 \pm 5.4% after treatment and 83.9 \pm 1.3% or 36.1 \pm 2.4% after overnight storage, respectively. ○; non-AMT, △; AMT, □; AMT and rutin. Mean \pm SEM, n=5. Error bars are not shown where smaller than the symbols.

小板に対する障害を最も効果的に防ぐことが、Nunno 等から報告された³⁾。

しかしながら、われわれが検討した結果、rutin は AMT/UVA 処理による血小板凝集能の低下を抑制するが (Fig. 4)、同時に VSV の不活化効果も低下させ (Fig. 1, 2)、rutin 存在下または非存在下で VSV を約 5log₁₀ 不活化する条件 (rutin 存在下 13.0J/cm², rutin 非存在下 5.2J/cm²) で比較すると、血小板の凝集能はいずれも 80% 以上維持された。つまり、rutin には効果的な血小板の保護作用

はないという、Nunno 等とは異なる結果になった。この理由として、UVA の短波長域を除いた場合、AMT/UVA 処理後の血小板機能を良好に維持できたという報告もあることから⁹⁾、UVA 光源の違いがあげられるかもしれない。あるいは、UVA 照射方法、血小板機能の測定方法 (Nunno は 20 μ g/ml の高濃度コラーゲン刺激による最大凝集率を測定している) が異なることも影響しているかもしれない。

AMT 添加 UVA 未照射の PC は、1 日保存に

よってADP刺激に対する血小板の最大凝集率が著しく低下し, AMT/UVA処理したPCよりも低下したことから(Fig. 4), AMT自体に血小板を障害する作用があり, その活性はUVA照射によって消失することが示唆された. 従って, AMT添加後は速やかにUVA照射を行う必要があると考えられる.

さらに, AMTは変異原性が危惧されるため, 不活化処理後は除去すべきであり, Nunno等はC18逆層カラムによる除去についても検討している¹⁰⁾. これによってAMT/UVA処理PCから約40%のAMTが除去され, C18カラムに吸着されなかったAMT(血漿中40%, 血小板中20%)には抗ウイルス活性, 細胞のDNAへの修飾作用はないことから, AMTはUVA照射によって変化し, 変異原性が消失したと推察しているが, 生体内での代謝経路を調べ, 安全性を確認する必要があるだろう.

これまでAMT/UVA処理によるウイルスの不活化効果は, 様々なモデルウイルスを用いて検討され, ウイルスごとに感受性が異なり, ノンエンベロープウイルスはエンベロープウイルスに比べ不活化されにくいという報告もある³⁾. 従って, 今後は輸血後感染症の原因となるウイルスに対する不活化効果について, 実用化を考慮したバッグスケールでの検討を行っていく必要がある.

結 語

PCでのAMT/UVA処理によるVSV不活化効果と血小板機能への影響について, rutin添加による効果を含めて検討した.

1. VSVは, AMT(50 μ g/ml)/UVA処理によって照射時間(照射量)に依存して不活化され, 40分間(5.2J/cm²)の照射により, 約5log₁₀不活化された.

2. rutin濃度に依存してAMT/UVA処理によるVSVの不活化効果は低下したが, 0.35mMのrutin存在下では, UVA照射時間を延長することによって検出限界まで不活化可能であり, 5log₁₀以上の不活化効果を得るには100分間(13.0J/cm²)の照射を要した.

3. rutin(0.35mM)存在下あるいは非存在下で

VSVを5log₁₀不活化するAMT/UVA処理条件では, 1日保存後も血小板の最大凝集率は80%以上維持されており, rutinによる効果的な血小板保護作用は認められなかった.

4. 血小板濃度が1.0~1.6 $\times 10^9$ /mlの範囲ではAMT/UVA処理によるVSVの不活化効果は同程度であった.

5. AMT添加UVA未照射のPCを1日保存したとき, ADP刺激による最大凝集率は約60%と著しく低下し, AMT/UVA120分処理よりも低下したことから, AMT添加後は速やかにUVAを照射する必要があると考えられた.

文 献

- 1) Horowitz, B., Bonomo, R., Prince, A.M., Chin, S.N., Brotman, B. and Shulman, R. W. : Solvent/Detergent-treated plasma : A virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood*, 79 : 826—831, 1992.
- 2) Lambrecht, B., Mohr, H., Knuver-Hopf, J. and Schmitt, H. : Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang.*, 60 : 207—213, 1991.
- 3) Margolis-Nunno, H., Robinson, R., Ben-Hur, E. and Horowitz, B. : Quencher-enhanced specificity of psoralen-photosensitized virus inactivation in platelet concentrates. *Transfusion*, 34 : 802—810, 1994.
- 4) Ben-Hur, E., Rywkin, S., Rosenthal, I., Geacintov, N.E. and Horowitz, B. : Virus inactivation in red cell concentrates by photosensitization with phthalocyanines : Protection of red cells but not of vesicular stomatitis virus with a water-soluble analogue of vitamin E. *Transfusion*, 35 : 401—406, 1995.
- 5) Armstrong, J.A. : Cytopathic effect inhibition assay for interferon : Microculture plate assay. *Methods Enzymol.*, 78 : 381—387, 1981.
- 6) Reed, L.J. and Muench, H. : A simple method of estimating 50 percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27 : 493—497, 1938.
- 7) Margolis-Nunno, H., Bardossy, L., Robinson, R., Ben-Hur, E., Horowitz, B. and Blajchman, M.A. : Psoralen-mediated photodecontamination of platelet concentrates : inactivation of cell-free and cell-associated forms of human immunodeficiency virus and assessment of platelet function in vivo. *Transfusion*, 37 : 889—895, 1997.

- 8) Benade, L.E., Shumaker, J., Xu, Y., Chen, X. and Dodd, R.Y. : Inactivation of free and cell-associated human immunodeficiency virus in platelet suspensions by aminomethyltrimethylpsoralen and ultraviolet light. *Transfusion*, 34 : 680—684, 1994.
 - 9) Margolis-Nunno, H., Robinson, R., Horowitz, B., Geacintov, N.E. and Ben-Hur, E. : Psoralen-mediated virus photoinactivation in platelet concentrates : Enhanced specificity of virus kill in the absence of shorter UVA wavelengths. *Photochem. Photobiol.*, 62 : 917—922, 1995.
 - 10) Margolis-Nunno, H., Robinson, R., Ben-Hur, E., Chin, S., Orme, T. and Horowitz, B. : Elimination of potential mutagenicity in platelet concentrates that are virally inactivated with psoralens and ultraviolet A light. *Transfusion*, 35 : 855—862, 1995.
-