

ルター, 東京)で測定した. 解凍後白血球数/凍結前白血球数 $\times 100$ (%)にて白血球回収率を算出した.

②生細胞率 チュルク試薬(シグマアルドリッチジャパン, 東京)および0.2%トリパンプルー(Gibco BRL, New York)で細胞染色し, 計算板を用いて前者で総有核細胞数, 後者で死細胞数を顕微鏡により計測した. 総有核細胞数から死細胞数を引いた値を生細胞数とし, 生細胞数/総有核細胞数 $\times 100$ (%)にて生細胞率を算出した.

③コロニー形成細胞回収率 凍結前および解凍後の検体をそれぞれ培地(MethoCult GF H4434V, ベリタス, 東京)に加え, 35mm培養皿4枚に播種し, 37°C, 5%CO₂下で2週間培養後, 顕微鏡でコロニー数を計測した. コロニーとして, 顆粒球-マクロファージコロニー(CFU-GM), 赤芽球バースト(BFU-E)および混合コロニー(CFU-Mix)を判定し, その合計をコロニー形成細胞(CFC)とした. コロニー形成細胞回収率は, CFC(解凍後)/CFC(凍結前) $\times 100$ (%)にて算出した.

3 統計学的解析方法

臍帯血本体と保管検体の生細胞率, コロニー回収率はt-testで有意差検定を行い, また相関係数と回帰式を求めた. これらの解析にはStatView 4.0(Abacus concepts, Inc. CA)を用いた.

結 果

1 臍帯血本体と保管検体の生細胞率の比較

臍帯血30件について検討した. 臍帯血本体(CB), セグメント(Seg), チューブ(Tube)の白血球回収率の中央値(範囲)は, CB 99.1%(75.5~130.5), Seg 93.2%(69.9~128.5), Tube 89.7%(65.2~127.3)で, 各群間に有意差はなかった($p > 0.05$). 生細胞率の中央値(範囲)は, CB 70.3%(29.1~87.4), Seg 69.1%(19.6~93.9), Tube 69.6%(25.0~87.9)であった. 臍帯血本体と保管検体の相関係数は, CB vs Seg (Fig. 2A), CB vs Tube (Fig. 2B)でそれぞれ $r = 0.938$, $r = 0.939$ となり, どちらの保管検体も臍帯血本体と非常に良い相関性を示した.

2 臍帯血本体と保管検体のコロニー形成細胞(CFC)回収率の比較

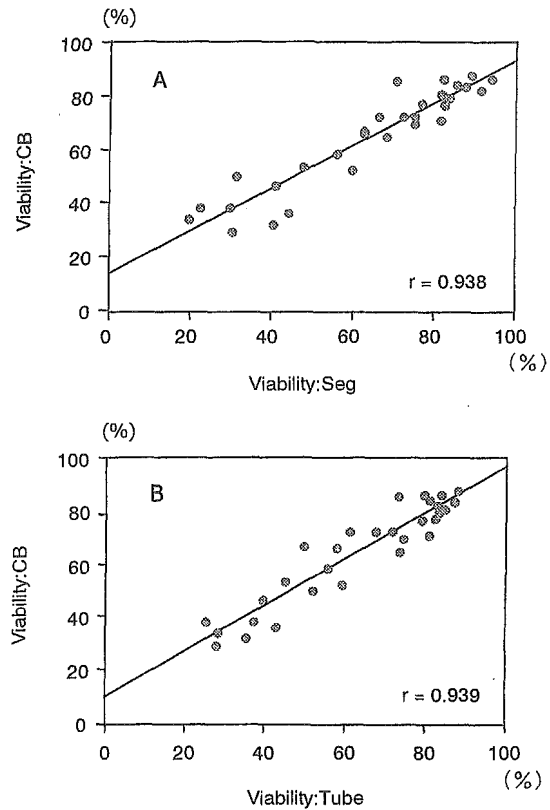


Fig. 2 Comparison of viability between cord blood units and test samples

CFC回収率の中央値(範囲)はCB 89.6%(20.9~146.0), Seg 85.4%(22.9~138.8), Tube 75.2%(9.5~124.4)で, 各群間に有意差はなかった($p > 0.05$). 臍帯血本体と保管検体の相関係数は, CB vs Seg (Fig. 3A), CB vs Tube (Fig. 3B)それぞれ $r = 0.879$, $r = 0.817$ となり, Segの方が若干良い傾向はあるものの, どちらの保管検体も臍帯血本体と良い相関性を示した. また, CFC回収率の回帰式は, CB vs Seg: $Y = 19.635 + 0.845X$, CB vs Tube: $Y = 17.8 + 0.838X$ であった.

3 生細胞率とCFC回収率の関係

生細胞率とコロニー形成細胞回収率の関係を検討した (Fig. 4). CB, Seg, Tubeの生細胞率とCFC回収率の相関係数は, それぞれ $r = 0.782$, $r = 0.808$, $r = 0.688$ となり, いずれも弱いながら正の相関を示した. また, 大部分の例で生細胞率よ

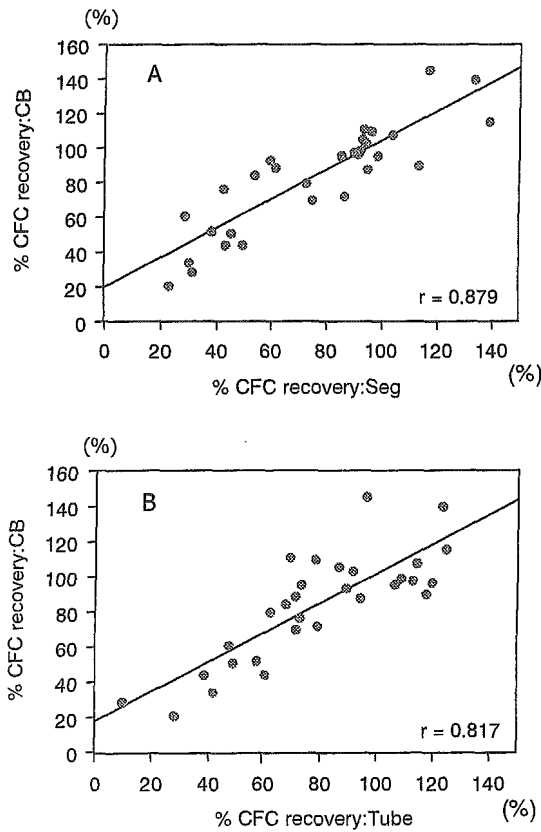


Fig. 3 Comparison of CFC recovery between cord blood units and test samples

り CFC 回収率の方が高い値を示し、特に CB では、生細胞率 60% 以上の領域で検討したすべての臍帯血で、生細胞率より CFC 回収率の方が高い値を示した。

4 保管検体の生細胞率と臍帯血本体のコロニー形成細胞 (CFC) 回収率の比較

次に、保管検体の生細胞率と臍帯血本体の CFC 回収率の相関性を検討した。保管検体 (Seg, Tube) の生細胞率と臍帯血本体 (CB) のコロニー形成細胞回収率の相関係数は、CB vs Seg (Fig. 5A), CB vs Tube (Fig. 5B) それぞれ、 $r = 0.722$, $r = 0.713$ となり、弱いながら正の相関見られた。また、保管検体の生細胞率 (X), 臍帯血本体の CFC 回収率 (Y) の回帰式は、CB vs Seg : $Y = 20.404 + 0.992X$, CB vs Tube : $Y = 14.25 + 1.1X$ であった。

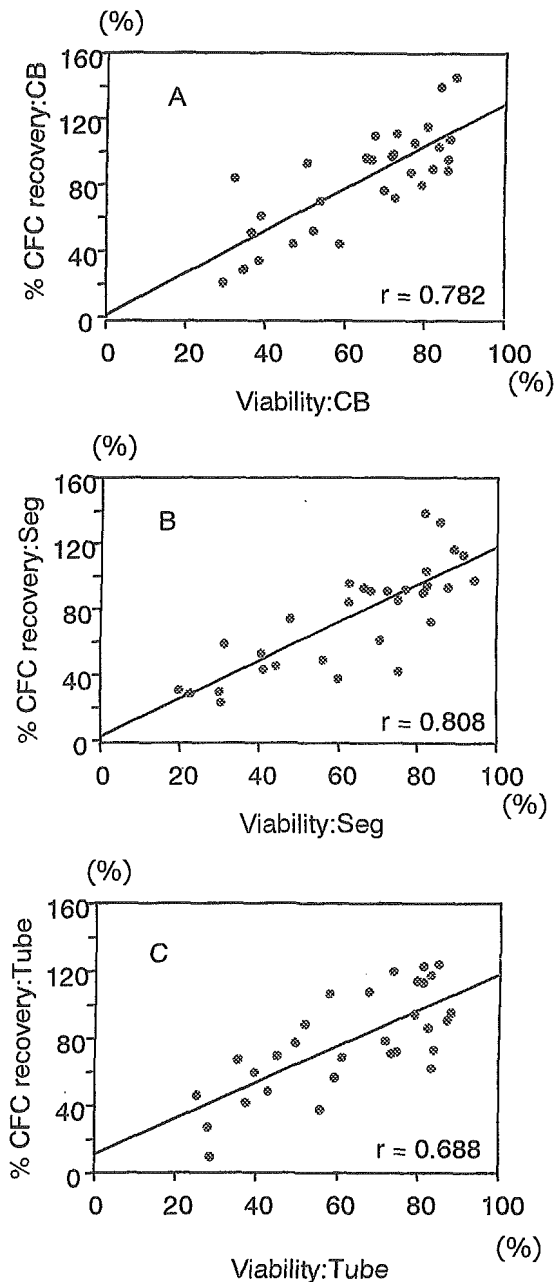


Fig. 4 Comparison of viability with CFC recovery

考 察

保管検体の解凍による移植前検査の結果が、臍帯血本体の凍結保存状態を反映しているか否かを明らかにするため、保管検体と臍帯血本体を解凍し検査結果を比較した。臍帯血バンクでは保管検

体としてセグメントと凍結チューブを保存しているため、保管検体としてその2種類を検討した。30件の臍帯血について検討を行ったが、種々の生細胞率で検討を行う目的で、一部の臍帯血は採取から細胞処理までの室温放置時間を延長し、生細胞率を意図的に低下させてから凍結保存した。Bertolini ら⁸⁾は72時間以上の室温放置でCFCが

15%低下すると報告しており、今回の検討ではさらなる低下を期待し、最大140時間放置した。そのため、生細胞率およびコロニー形成細胞回収率の中央値は、実際移植用に保存している臍帯血より低値となっている。

今回の検討結果では、生細胞率、CFC回収率は臍帯血本体と保管検体とで非常に良く相関した(Fig. 2, Fig. 3)。したがって、保管検体の検査結果は臍帯血本体の凍結保存状態を反映しており、保管検体の検査結果から臍帯血本体の凍結保存状態を評価することは可能であると考えられた。2種の保管検体(Seg, Tube)の間には有意差はなく、いずれの保管検体も同程度の有用性があると考えられた。

実際の臍帯血出庫においては、生着不全等の緊急例でCFC回収率の結果を待てない場合がある。この場合、移植前検査として生細胞率のみが指標とならざるを得ない。今回の結果から、保管検体の生細胞率と臍帯血本体のCFC回収率の間には弱いながらも正の相関が見られた(Fig. 5)。したがって、保管検体の生細胞率から臍帯血本体のCFC回収率を推測することは可能であり、緊急出庫の際、保管検体の生細胞率が出庫可否判定の指標になりうると考えられた。

以上の結果より保管検体の検査結果から臍帯血本体の凍結保存状態の評価は可能と考え、北海道臍帯血バンクでは保管検体の検査結果を基準とした臍帯血出庫基準の設定を試みた(Table 1)。

出庫基準の原則として、「保管検体の結果から推測される臍帯血本体のCFC回収率が70%以上を出庫可」とした。移植後の生着と凍結解凍時の細胞回収率の関係についての明確なデータはない

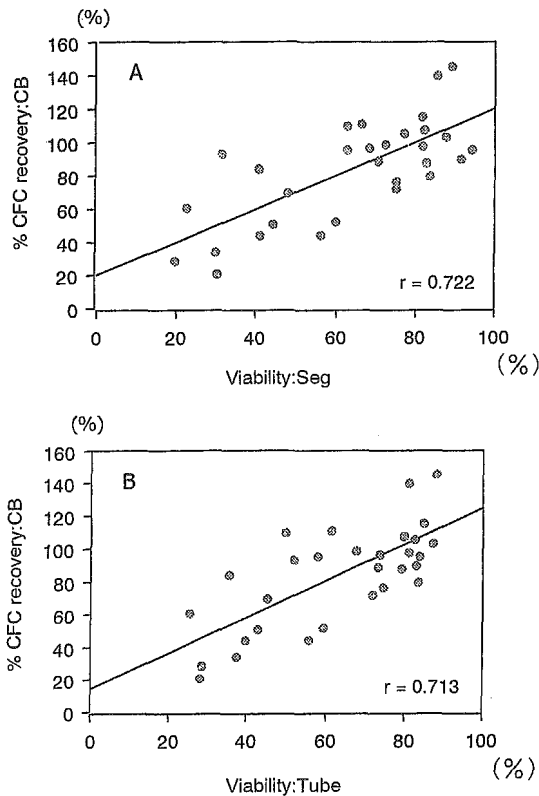


Fig. 5 Comparison of viability of test samples with CFC recovery of cord blood units

Table 1 Criteria for transportation of cord blood units at the Hokkaido Cord Blood Bank

Transportation for standard cases	Recovery of CFC *1	70% ≤ 50% ≤, < 70% < 50%	appropriate Consult with a physician inappropriate
Transportation for urgent cases	Viability of ANC *2	60% ≤ 40% ≤, < 60% < 40%	appropriate Consult with a physician inappropriate

*1CFC: colony forming cells, *2ANC: all nucleated cells

が、造血幹・前駆細胞の凍結条件検討に関する既報によれば、CFC回収率が70%程度で凍結保存状態が良好とする文献が多い^{9)~11)}。よって、70%以上を出庫可とすることとした。一方、出庫不可は50%以下とし、50~70%は主治医との協議により可否を決定することとした。この点に関しては、文献的根拠は乏しいが、他に移植細胞が存在しないなどの場合、一律に70%以下を不可とすれば患者が治療機会を失うことになり、慎重な判断が必要となる。そのための暫定的な基準であり、今後臨床データが蓄積された場合に見直しが必要と考えられる。

臍帯血本体の検査値の推定は、検査検体との回帰式を用いた。通常出庫時は、保管検体のCFC回収率を指標とする。臍帯血本体のCFC回収率 $Y=70\%$ となる保管検体のCFC回収率は、 $X_{Seg}=59.6\%$ 、 $X_{Tube}=62.2\%$ (Fig. 3)であり、安全性を考慮して保管検体のCFC回収率70%以上を出庫可とした。一方、緊急出庫時は生細胞率を指標とする。同様に、臍帯血本体のCFC回収率 $Y=70\%$ となる保管検体の生細胞率は、 $X_{Seg}=50.0\%$ 、 $X_{Tube}=50.7\%$ となり(Fig. 5)、保管検体の生細胞率60%以上を出庫可とした。生細胞率で判断する点に関しては、Fig. 4の結果からわかるように、生細胞率よりもCFC回収率の方が高い傾向があるため、60%以上を出庫可としても問題ないと考えられた。

一方、出庫可否判定の基準は、CFC回収率や生細胞率ではなく、患者体重あたりの細胞数とする考え方もある。実際、現在の臍帯血選択の基準は、患者体重あたりの総白血球数であり、小児など体重の少ない患者の場合、たとえ生細胞率が低くても体重あたりの生細胞数が十分な場合もある。しかし、データでは示さなかったが、生細胞率が低い場合は、個々のコロニーの大きさが小さい傾向があり、また死細胞が多い場合、解凍後に凝集塊を形成しやすい。以上の点から、臍帯血出庫時は患者体重あたりの細胞数ではなく、CFC回収率および生細胞率を出庫可否の判定基準とした。しかし、この点は、上述の出庫時のCFC回収率の数値設定と合わせて、今後臨床データを蓄積して検討

する必要があると考えられる。

まとめ

臍帯血本体と保管検体を解凍し生細胞率、CFC回収率を比較した。両者には良好な相関性が認められ、臍帯血の凍結保存状態の評価に保管検体検査が有用であると考えられた。また、本検討で得られた回帰式をもとに、臍帯血出庫基準を作成した。

文 献

- 1) Grewal, S.S., Barker, J.N., Davies, S.M. et al. : Unrelated donor hematopoietic cell transplantation : marrow or umbilical cord blood?. *Blood*, 101 : 4233—4244, 2003.
- 2) Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammand, A. et al. : Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors : Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.*, 337 : 373—381, 1997.
- 3) Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A. et al. : Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.*, 339 : 1565—1577, 1998.
- 4) Rocha, V., Comish, J., Sievers, E.L. et al. : Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*, 97 : 2962—2971, 2001.
- 5) Laughlin, M.J., Barker, J., Bambach, B. et al. : Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.*, 344 : 1815—1822, 2001.
- 6) 日本さい帯血バンクネットワークホームページ : <http://www.j-cord.gr.jp>
- 7) 日本さい帯血バンクネットワーク : 臍帯血移植のための技術指針, 2002.
- 8) Bertolini, F., Gibelli, N., Lanza, A. et al. : Effects of storage temperature and time on cord blood progenitor cells. *Transfusion*, 38 : 615—617, 1998.
- 9) Donaldson, C., Armitage, W.J., Denning-kendall, P.A. et al. : Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplantation*, 18 : 725—731, 1996.
- 10) Valeri, C.R., Pivacek, L.E. : Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion*, 36 : 303—308, 1996.
- 11) Makino, S., Harada, M., Niho, Y. et al. : A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80°C without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplantation*, 8 : 239—244, 1991.

ウイルス不活化の現状と課題

Virus Inactivation: Current Status and Subject

阿部英樹, 東 寛, 平山順一, 池田久實

Hideki Abe, Hiroshi Azuma, Junichi Hirayama, Hisami Ikeda

和文抄録

核酸増幅検査の導入など, ウイルススクリーニング検査の向上により輸血用血液製剤によるウイルス感染の危険性はかなり減少したものの, 依然として危険性は存在する. その危険性とは, 感染直後でウイルスを検出できないウィンドウピリオドの存在や, 検査対象となっていないウイルスや原虫, 寄生虫の存在, 新たにヒトへの感染が広がったウイルスなどに起因する. このように, 検査だけでは輸血後感染を防ぐことは困難である.

輸血用血液製剤の安全性を高める一つの方法として, 病原体不活化法が開発, 実用化されつつある. 血漿製剤に対してはメチレンブルー光不活化法, Solvent/Detergent処理法が確立されている. 血小板製剤には光増感物質S-59とUVA照射を組み合わせた方法が開発された. その他にも, 血漿, 血小板, 赤血球各製剤に対する不活化法が検討されている. 本総説では, それらの不活化機序や不活化効果, 導入状況や開発状況について概説する. また, ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体におけるウイルス除去・不活化法についても述べる.

Abstract

Although the risk of virus infection via blood transfusion has been remarkably decreased due to the introduction of a nucleic acid amplification test, the risk of virus transmission still exists. The residual risk is caused by 1) a window period of virus infection, 2) viruses, protozoa and parasites excluded from current screening test and 3) pathogens newly spread in human. Thus, it is difficult to prevent post-transfusion infection only by screening test.

Pathogen inactivation methods have been developing and adopted as one of the way to increase the safety of blood products. Methylene blue photosensitizing and solvent/detergent methods for plasma are already established and in use in some countries. Recently, photochemical compound S-59 plus UVA irradiation method for platelets has been approved in Europe. Other methods are still investigated for plasma, platelets or red cell components. In this review, we outline the mechanisms, effects and status of introduction or development of these methods. In addition, we refer to the method of virus removal and inactivation in hemoglobin solution as a source of artificial oxygen carriers.

Keywords

post-transfusion infection, virus screening test, pathogen inactivation methods, artificial oxygen carriers.

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. 1960年代の売血時代に50%以上あった輸血後肝炎は, 献血制度への移行とB型肝炎ウイルス (HBV) の指標となるHBs抗原検査の導入, その後のHBc抗体検査, C型肝炎ウイルス (HCV) 抗体検査の導入がなされ激減した. ヒト免疫不全ウイルス (HIV), ヒトリンパ球向性ウイルスI型 (HTLV-I) の抗体検査も行われてきた.

これまでの検査は, ウイルスに対する抗体や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, ウイルスが血液中にあるにも関わらず血清学的検査で陽性と判定されない期間, ウィンドウピリオド (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ウイルスが存在するため, このウィンドウピリオドが輸血後肝炎の要因の一つと考えられた¹⁾. 1999年, ウイルス核酸増幅検査 (nucleic

acid amplification test; NAT) が日赤に導入された^{2,3)}。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^{4,5)}。NATでは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50プールに縮小され、2004年9月には20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も減少した。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。

Table 1. Screening tests regarding infectious agents. (Oct., 2004)

Test issue	Methods
Syphilis	Antibody
HBV	Antigen, Antibody, NAT
HCV	Antibody, NAT
HIV	Antibody, NAT
HTLV-I	Antibody
Human parvovirus B19	Antigen, NAT (a part of plasma fractionation)
Liver function (ALT)	Enzyme activity

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、依然としてNATにもウィンドウピリオドは存在する。NATのウィ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⁶⁾。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。それらのうちのいくつかは、動物から人に感染が広がったウイルス、原虫、寄生虫や、ヒトが持つ細菌などである⁷⁾。

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例と報告されている⁸⁾。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な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⁹⁾。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¹⁰⁾。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いる¹¹⁾。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¹²⁾。また近年、米国ではウエストナイルウイルス (WNV) 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、輸血による感染が発生した¹³⁾。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、変異型ク

ロイツフェルト・ヤコブ病 (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¹⁴⁾、ついに輸血により感染しうることが報告された¹⁵⁾。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¹⁶⁾。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。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持つことが示され始めた。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。以下に、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があり (Table 2)、それらについて概説する。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安全性対策 (クアランチン; 検疫保管) を Table 3.にまとめた。

1. Solvent/Detergent (S/D)

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¹⁷⁾。

S/D処理によるウイルス不活化は、多くのエンベロープウイルスで5 log₁₀以上の不活化が可能である。加えて、WNVも容易に不活化できることが示された¹⁸⁾。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。現在、分画原料血漿はヒトパルボウイルスB19のNATが行われており、基準値以上のウイルス陽性血漿は用いられていない。

Table 2. Pathogen inactivation methods and blood components. (Oct., 2004)

Compound	Developer	Principle	Blood component	Status
Solvent/Detergent	Octapharma	Physicochemical	Plasma	In the market
Methylene blue	Macopharma	Photosensitization	Plasma	In the market
	Baxter Grifols			
S-59	Cerus/Baxter	Photochemical	Platelet Plasma	In the market Phase III
Riboflavin	Navigant	Photosensitization	Platelet	Phase I/II
			Plasma Red cell	Pre-clinical Pre-clinical
Tionine	German Red Cross	Photosensitization	Platelet	Pre-clinical
Inactine	Vitex	Physicochemical	Red cell	Phase III
Dimethylmethylene blue	American Red Cross	Photosensitization	Red cell	Pre-clinical

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、現在までウイルス感染例も含め副作用例の報告はない。

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¹⁹⁾。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、一重項酸素を生成して、ウイルスを不活化する²⁰⁾。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^{21,22)}。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²³⁾。

メチレンブルーは細胞外ウイルスに対しては不活化効果があるが、細胞内ウイルスに対しては効果がない。そのためシュプリング血液センターで行われていた方法は、血漿の凍結融解を行うことにより白血球を破壊し、その後メチレンブルー光処理を行うことにより細胞内ウイルスの不活化を達成してきた。この方法により、HIV (>2.7 log₁₀)、vesicular stomatitis virus (VSV) (>5.7 log₁₀)、単純ヘルペスウイルス (>3.0 log₁₀)、インフルエンザウイルス (>5.5 log₁₀) 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¹⁹⁾。しかし、脂質エンベロープを持たないウイルス (HAV等) の不活化には効果がない。二次元電気泳動上も血漿タンパク質の変化はみられず²⁴⁾、新たな抗原性の獲得も確認されていない²⁵⁾。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

Table 3. Current measures for plasma safety. (Oct., 2004)

Country	Measures for plasma safety
Austria	S/D
Italy	MB, S/D
United Kingdom	MB, S/D
Netherlands	Quarantine
Greece	MB
Switzerland	S/D, Quarantine
Spain	MB, Quarantine
Denmark	S/D, Quarantine
Germany	S/D, Quarantine
France	S/D, Quarantine
Belgium	MB
Portugal	S/D

Quarantine: Donated plasma is frozen and stored for 6 months. Based on the confirmation that the donor is negative for virus markers on 6 month after first donation, the plasma can be supplied for clinical use.

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。より安全な製剤とするため、白血球とメチレンブルーを同時に除去するフィルターが開発された²⁶⁾。このフィルターにより、血漿中1 μMのメチレンブルーは検出限界以下の0.05 μMに低下し、白血球も3 log₁₀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 log₁₀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²⁷⁾。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とはほとんど変わらず、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。

現在ヨーロッパの多くの国で用いら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 (白血球除去)、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²⁸⁾。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、白血球除去フィル

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 mlであれば、メチレンブルー濃度は1 μ M前後になる。一度に4バッグを照射でき、照射時間は20分以内である。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 4.)²⁹⁾、近年米国を震撼させたWNVも不活化できる³⁰⁾。加えて、今まで困難とされてきたヒトパルボウイルスB19の不活化も、可能であることが示された³¹⁾。

Table 4. Effects of methylene blue phototreatment on virus inactivation²⁹⁾.

Lipid enveloped		Non-lipid enveloped	
Virus	Log reduction	Virus	Log reduction
HIV	>5.5	HAV	0.0
Bovine viral diarrhea	>6.2	Encephalomyocarditis	0.0
Duck HBV	3.9	Porcine parvovirus	0.0
Influenza	5.1	Polio	0.0
Pseudorabies	5.4	Simian virus40	4.3
Herpes simplex	>6.5	Adenovirus	4.0
Vesicular stomatitis	>4.9	Human parvovirus B19	>4.0
West Nile	>6.5	Calicivirus	>3.9

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10-20%低下することが分かっている^{19,32,31)}。種類の異なる白血球除去フィルターやメチレンブルー除去フィルターによる凝固因子活性への影響は無いが、メチレンブルー処理前の凍結は僅かに低下を引き起こす³¹⁾。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ようである³²⁾。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。

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核酸と共有結合し (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。S-59は血小板製剤および血漿製剤の病原体不活化を行うことができる。血小板製剤は22-24°Cで保存するため、細菌の混入、増殖が大きな問題となっている。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。

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³⁹⁾。INTERCEPTと呼ばれるこの方法は、血小板を32-47%の血漿を含む血小板保存液PAS3に浮遊し、不活化処理バッグシステムに無菌的に接続してS-59溶液と混合し、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を照射する。その後、S-59吸着剤の入ったバッグに血小板を移して4-16時間振盪保存し残留S-59を除去し、輸血に供する。

各種ウイルスの不活化率をTable 5.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³⁹⁻³⁸⁾。血小板製剤に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 log₁₀以上、グラム陰性肺炎桿菌は>5.6 log₁₀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。S59/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³⁹⁾。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あると考えられる³⁹⁻⁴¹⁾。

Table 5. Effects of S-59/UVA phototreatment on virus inactivation⁴⁰⁾.

Lipid enveloped		Non-lipid 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		
Duck HBV	>6.2		
HCV	>4.5		
HTLV I/II	4.7/5.1		
Cytomegalovirus	>5.9		
Bovine viral diarrhea	>6.0		
West Nile	>6.0		

ヨーロッパにおいて103名の血小板減少性患者に対し、第III相臨床試験が行われた (euroSPRIT)⁴²⁾。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。血小板輸血に関連する副作用 (発熱, 悪寒, 発疹等) は見られたが、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な臨床効果が得られ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)⁴³⁾。対象患者はWHO基準のgrade 2出血傾向を示す患者645名で、血小板輸血による

維持療法効果を検討した。この検討からも、S-59/UV処理血小板製剤の治療効果は十分であると結論づけられた。ヨーロッパではCE Markを取得し、5カ国（ノルウェー、イタリア、スペイン、ベルギー、ポルトガル）の8血液センターで使用され^{44,47}、既に1500例の輸血例がある（2004年1月時点、FRENCH BLOOD ASSOCIATION-EFS報告）。

また、INTERCEPTシステムS-59/UVAの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。安全性、毒性試験もクリアし⁴⁸、第Ⅶ因子活性の回復能は標準血漿と同等であることが示された⁴⁹。現在、第Ⅲ相臨床試験が進められている。

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。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⁵⁰。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る。

血漿に浮遊した血小板製剤にリボフラビン溶液を加え（血漿濃度90%）、UVを照射する。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。従って、リボフラビン光処理した製剤からは、薬剤を除く必要がないといえる。

血小板製剤に添加した病原体は、cell-free/associate HIVでは5.9 log₁₀、latent HIVでは4.5 log₁₀、porcine parvovirusでは5.0 log₁₀、WNVでは5.2 log₁₀、細菌も、表皮ブドウ球菌では>4.2 log₁₀、大腸菌では>4.4 log₁₀の不活化率が得られた⁵¹。リボフラビン光処理血小板製剤は、保存により血小板数、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^{51,52}。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著者らは考えている。

5. 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。血小板浮遊液に添加した各種エンベロープウイルスは、チオニン1 μMと可視光照射により5-6 log₁₀以上不活化された⁵³。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。

6. 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。他の色素化合物と異なり、光照射を必要としない。

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。それによりエンベロープ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、5-7 log₁₀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ベロープウイルスも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 log₁₀, porcine parvovirus)⁵⁴。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^{55,56}。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℃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^{57,58}。

前臨床および第Ⅰ相臨床試験においては、PEN110処理後、赤血球を0.2% dextrose/0.9% NaClで洗浄して除去し、実験に供した。洗浄によりPEN110濃度は50 ng/mL以下となる。その結果、bovine viral diarrhea virusは>5.7 log₁₀、porcine parvovirusは>5.9 log₁₀不活化された⁵⁹。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差はなかった。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、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⁶⁰。

7. 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⁶¹。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⁶²。

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600 nm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、照射光が色素まで効率的に届かないため、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⁶⁵⁾。また白血球の不活化も可能であり⁶⁴⁾、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⁶⁵⁾、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⁶⁶⁾。ジメチルメチレンブルー処理による溶血とカリウムイオン漏出は、赤血球膜タンパク質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の添加により、ウイルス不活化能に影響を及ぼすことなく防ぐことができる^{67,68)}。

人工酸素運搬体のウイルス不活化

ヒトあるいはウシのヘモグロビンを基にする人工酸素運搬体では、生物由来のタンパク質を原料とするため、その製造工程には積極的なウイルス除去・不活化工程を組み込まなければならない。

一般的に、ウイルス除去・不活化工程は、溶血後、赤血球膜成分を取り除いたヘモグロビン溶液に対して行われる。タンパク質溶液となるため、加熱処理による不活化、膜による除去が主流である。また有機溶剤と界面活性剤による方法も検討された⁶⁹⁾。近年、テルモ社がこの方法を検討している⁷⁰⁾。赤血球浮遊液に終濃度0.3% tri(n-butyl)phosphateと0.2% Triton X-100を直接加え、8.5℃で12時間処理する。添加したウイルスは直ちに不活化され、0.5時間後には $>6 \log_{10}$ 以上の不活化率が得られた。タンパク質への影響も無く、ヘモグロビンのメト化も起こらなかった。

加熱処理ではヘモグロビンがメト化してしまうため、脱酸素状態にしてメト化を防ぐ。ヘモグロビン溶液を60℃、10時間処理により不活化が可能である⁷¹⁾。また、ヘモグロビン溶液を74℃、90分間加熱することにより、 $7 \log_{10}$ 以上の不活化率が得られたと報告されている⁷²⁾。より厳密な脱酸素化には電気化学的方法が用いられ、62℃、10時間の処理によりVSVを検出限界以下まで不活化でき、もともと存在しているメトヘモグロビンを変性させ不溶化させることにより、ヘモグロビンの純度を上げることができる⁷³⁾。一方、ヘモグロビンのヘムをCO化することにより熱安定性を持たせることができ、熱処理により他のタンパク質を変性させ不溶化してヘモグロビンの純度を上げることができる⁷⁴⁾。この方法によってもVSVは $>6 \log_{10}$ 不活化され、メトヘモグロビンの生成も認められなかった⁷⁵⁾。しかし、この報告では耐熱性とされるノンエンベロープウイルスの結果は示されていない。ノンエンベロープウイルスの代表であるヒトパルボウイルスB19は、その感染性アッセイ法が煩雑であったことから、同じパルボウイルス属に属し*in vitro*アッセイが可能なイヌパルボやブタパルボがモデルウイルスとして用いられてきた。そしてその両パルボウイルスが耐熱性を示すことから、ヒトパルボウイルスB19も耐熱性であると考えられてきた。しかし、ヒトパルボウイルスB19感受性細胞株が作成され、そ

れを用いた*in vitro*アッセイの結果、ヒトパルボウイルスB19は加熱処理により感染性を失うことが示された⁷⁶⁾。従って、CO化ヘモグロビン加熱処理により、ヒトパルボウイルスB19も十分不活化されているものと推測される。

膜によるウイルス除去も、効果的である。多くの場合限外濾過膜が用いられるが^{77,78)}、血漿分画製剤のウイルス除去工程に採用されている再生セルロース中空糸モジュールによるナノフィルトレーションにより、ヒトパルボウイルスを $>6 \log_{10}$ 除去することができ、メト化も亢進しない⁷⁹⁾。また濾過速度も大量処理に向いており、ヘモグロビン回収率も90%以上であり、小径ウイルスであるバクテリオファージ ϕ X174の除去率も $>7.7 \log_{10}$ であった⁸⁰⁾。

赤血球製剤の病原体不活化に用いられる光増感色素も、ヘモグロビン溶液のウイルス不活化法として検討された。ジメチルメチレンブルーによるVSV不活化では $6.4 \log_{10}$ の不活化率が得られており、メト化も亢進せず、酸素親和性にも影響はなかった⁸¹⁾。ジメチルメチレンブルーは溶液中で単量体と二量体として存在するが、単量体のみを励起させることにより、ヘモグロビンの酸化を来すことなくウイルス不活化効果が得られる。ジメチルメチレンブルーによるウイルス不活化には一重項酸素が関与していると報告されている⁸²⁾。ジメチルメチレンブルーは核酸指向性が強いので、核酸を持つウイルスを不活化するが、ヘモグロビン溶液中に存在する多くの抗酸化系酵素への影響は少ない。スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの活性は、VSVを $6 \log_{10}$ 不活化する条件においても95%以上維持され、還元型グルタチオン濃度も同様に維持されていた⁸²⁾。

このように、人工酸素運搬体の原料となるヘモグロビン溶液のウイルス不活化法は様々であるが、より安全性の高い原料の製造には、原理の異なる複数の方法で処理することも重要であろう。

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治験に入っているものもあるが、多くは未だ前臨床試験段階であり、実用化には今しばらく時間を要すると思われる。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。

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るが、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。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、製剤に添加された薬剤は各種毒性試験で安全とされる濃度まで除去されているが、それでも尚、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。

病原体不活化法は、NAT、放射線照射、保存前白血球除去などととも、輸血用血液製剤の安全対策の一つである。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。

引用文献

1. Matsumoto C, Tadokoro K, Fujimura K, Hirakawa S, Mitsunaga S, Juji T. Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. *Transfusion* 2001;41:878-84.
2. 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* 2000 Oct;53(5):219). *Jpn J Infect Dis* 2000;53:116-23.
3. Tomono T, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R, Lizuka HY, Miyamoto M, Satoh S, Nakahira S, Murozuka T, Emura H, Doi Y, Mine H, Yokoyama S, Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Nishioka K, Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV: experience in Japan. *Dev Biol (Basel)* 2002;29-39.
4. Tabor E, Epstein JS. NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy. *Transfusion* 2002;42:1230-7.
5. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Sally C, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP, National Heart Lung and Blood Institute Nucleic Acid Test Study Group. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004;351:760-8.
6. Phelps R, Robbins K, Liberti T, Machuca A, Leparac G, Chamberland M, Kalish M, Hewlett I, Folks T, Lee LM, McKenna M. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion* 2004;44:929-33.
7. Dodd RY, Leiby DA. Emerging infectious threats to the blood supply. *Annu Rev Med* 2004;55:191-207.
8. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB, Arduino MJ, Holt SC, Carson LA, Banerjee SN, Jarvis WR. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001;41:1493-9.
9. Dodd RY. Bacterial contamination and transfusion safety: experience in the United States. *Transfus Clin Biol* 2003;10:6-9.
10. Dodd RY. Transmission of parasites and bacteria by blood components. *Vox Sang* 2000;78 (suppl 2):239-42.
11. Herwaldt BL, Neitzel DF, Gorlin JB, Jensen KA, Perry EH, Peglow WR, Slemenda SB, Won KY, Nace EK, Pieniazek NJ, Wilson M. Transmission of *Babesia microti* in Minnesota through four blood donations from the same donor over a 6-month period. *Transfusion* 2002;42:1154-8.
12. Wei Q, Tsuji M, Zamoto A, Kohsaki M, Matsui T, Shiota T, Telford 3rd SR, Ishihara C. 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* 2001;39:2178-83.
13. Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, Lanciotti RS, Hand S, Currier M, Chamberland ME, Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 2003;43:1018-22.
14. Budka H. Prions and transfusion medicine. *Vox Sang* 2000;78 (suppl 2):231-8.
15. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417-21.
16. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44:934-40.
17. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/Detergent-treatment plasma: A virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992;79:826-31.
18. Kreil TR, Berting A, Kistner O, Kindermann J. 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* 2003;43:1023-8.
19. Lambrecht B, Mohr H, Knuver-Hopf J, Schmit H. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 1991;60:207-13.
 20. Abe H, Ikebuchi K, Wagner SJ, Kuwabara M, Kamo N, Sekiguchi S. Potential involvement of both Type I and Type II mechanisms in M13 virus inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem Photobiol* 1997;66:204-8.
 21. Abe H, Wagner SJ. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivatives, or merocyanine 540 photosensitization. *Photochem Photobiol* 1995;61:402-9.
 22. Bachmann B, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, Mohr H. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light. *J Med Virol* 1995;47:172-8.
 23. Owada T, Yamada Y, Abe H, Hirayama J, Ikeda H, Sekiguchi S, Ikebuchi K. Elucidation of the HIV-1 virucidal mechanism of methylene blue photosensitization and the effect on primary isolates. *J Med Virol* 2000;62:421-5.
 24. Tissot JD, Hochstrasser DF, Schneider B, Morgenthaler JJ, Schneider P. No evidence for protein modifications in fresh frozen plasma after photochemical treatment: an analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Br J Haematol* 1994;86:143-6.
 25. Mohr H, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, Scheidecker H, Schmitt H. No evidence for neoantigens in human plasma after photochemical virus inactivation. *Ann Hematol* 1992;65:224-8.
 26. AuBuchon JP, Pickard C, Herschel L, O'Connor JL, Lee E. Removal of methylene blue from plasma via an adsorbent filter. *Vox Sang* 1998;74:1-6.
 27. Abe H, Yamada-Ohnishi Y, Hirayama J, Owada T, Ikeda H, Ikebuchi K. Elimination of both cell-free and cell-associated HIV infectivity in plasma by a filtration/methylene blue photoinactivation system. *Transfusion* 2000;40:1081-7.
 28. Hornsey VS, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Maco-Tronic system. *Transfus Med* 2001;11:31-6.
 29. Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322-9.
 30. Mohr H, Knuver-Hopf J, Gravemann U, Redecker-Klein A, Muller TH. West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion* 2004;44:886-90.
 31. Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol* 1997;65:441-5.
 32. Riggert J, Humpe A, Legler TJ, Wolf C, Simson G, Kohler M. Filtration of methylene blue-photooxidized plasma: influence on coagulation and cellular contamination. *Transfusion* 2001;41:82-6.
 33. Suontaka AM, Blomback M, Chapman J. Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light. *Transfusion* 2003;43:568-75.
 34. Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, Hornsey VS, Turner CP, Young D, Williamson LM, Prowse CV. The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2003;43:1238-47.
 35. Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP, Alfonso R, Behrman B, Cimino GD, Corten L, Damonte PB, Dikeman R, Dupuis K, Fang YM, Hanson CV, Hearst JE, Lin CY, Londe HF, Metchette K, Nerio AT, Pu JT, Reames AA, Rheinschmidt M, Tessman J, Isaacs ST, Wollowitz S, Corash L. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 1997;37:423-35.
 36. Knutson F, Alfonso R, Dupuis K, Mayaudon V, Lin L, Corash L, Hogman CF. Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat-derived platelet concentrates under conditions that preserve in vitro platelet function. *Vox Sang* 2000;78:209-16.
 37. Lin L, Dikeman R, Molini B, Lukehart SA, Lane R, Dupuis K, Metzel P, Corash L. Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion* 2004;44:1496-504.
 38. Jordan CT, Saakadze N, Newman JL, Lezhava LJ, Maiers TT, Hillyer WM, Roback JD, Hillyer CD. Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen hydrochloride and ultraviolet A light inactivates free and latent cytomegalovirus in a murine transfusion model. *Transfusion* 2004;44:1159-65.
 39. Grass JA, Wafa T, Reames A, Wages D, Corash L, Ferrara JL, Lin L. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 1999;93:3140-7.
 40. Grass JA, Hei DJ, Metchette K, Cimino GD, Wiesehahn GP, Corash L, Lin L. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood* 1998;91:2180-8.
 41. Hei DJ, Grass J, Lin L, Corash L, Cimino G. Elimination of

- cytokine production in stored platelet concentrate aliquots by photochemical treatment with psoralen plus ultraviolet A light. *Transfusion* 1999;39:239-48.
42. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, Vermeij H, Kappers-Klunne M, de Greef G, Laforet M, Lioure B, Davis K, Marblie S, Mayaudon V, Flament J, Conlan M, Lin L, Metzler P, Buchholz D, Corash L, euroSPRITE trial. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101:2426-33.
 43. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, Slichter SJ, Pineda A, Snyder E, Stadtmauer EA, Lopez-Plaza I, Coutre S, Strauss RG, Goodnough LT, Frیده JL, Raife T, Cable R, Murphy S, Howard 4th F, Davis K, Lin JS, Metzler P, Corash L, Koutsoukos A, Lin L, Buchholz DH, Conlan MG. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004;104:1534-41.
 44. 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* 2004;14:217-23.
 45. Picker SM, Speer R, Gathof BS. Functional characteristics of buffy-coat PLTs photochemically treated with amotosalen-HCl for pathogen inactivation. *Transfusion* 2004;44:320-9.
 46. Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, Beckers EA, Leebeek FW, Sonneveld P, van Rhenen DJ. Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion* 2004;44:313-9.
 47. Janetzko K, Lin L, Eichler H, Mayaudon V, Flament J, Kluter H. Implementation of the INTERCEPT Blood System for Platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelets. *Vox Sang* 2004;86:239-45.
 48. Ciaravino V, McCullough T, Cimino G, Sullivan T. Preclinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sang* 2003;85:171-82.
 49. Hambleton J, Wages D, Radu-Radulescu L, Adams M, MacKenzie M, Shafer S, Lee M, Smyers J, Wiesehahn G, Corash L. Pharmacokinetic study of FFP photochemically treated with amotosalen (S-59) and UV light compared to FFP in healthy volunteers anticoagulated with warfarin. *Transfusion* 2002;42:1302-7.
 50. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, Ravanat JL, Cadet J, Goodrich RP. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol* 2004;80:15-21.
 51. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44:877-85.
 52. Li J, de Korte D, Woolum MD, Ruane PH, Keil SD, Lockerbie O, McLean R, Goodrich RP. Pathogen reduction of buffy coat platelet concentrates using riboflavin and light: comparisons with pathogen-reduction technology-treated apheresis platelet products. *Vox Sang* 2004;87:82-90.
 53. Mohr H, Redecker-Klein A. Inactivation of pathogens in platelet concentrates by using a two-step procedure. *Vox Sang* 2003;84:96-104.
 54. Lazo A, Tassello J, Jayarama V, Ohagen A, Gibaja V, Kramer E, Marmorato A, Billia-Shaveet D, Purmal A, Brown F, Chapman J. Broad-spectrum virus reduction in red cell concentrates using INACTINE PEN110 chemistry. *Vox Sang* 2002;83:313-23.
 55. Ohagen A, Gibaja V, Aytay S, Horrigan J, Lunderville D, Lazo A. Inactivation of HIV in blood. *Transfusion* 2002;42:1308-17.
 56. Mather T, Takeda T, Tassello J, Ohagen A, Serebryanik D, Kramer E, Brown F, Tesh R, Alford B, Chapman J, Lazo A. West Nile virus in blood: stability, distribution, and susceptibility to PEN110 inactivation. *Transfusion* 2004;43:1029-37.
 57. Zavizion B, Serebryanik D, Serebryanik I, Chapman J, Purmal A. Prevention of *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas putida* outgrowth in deliberately inoculated blood by a novel pathogen-reduction process. *Transfusion* 2003;43:135-42.
 58. Zavizion B, Pereira M, de Melo Jorge M, Serebryanik D, Mather TN, Chapman J, Miller NJ, Alford B, Bzik DJ, Purmal A. Inactivation of protozoan parasites in red blood cells using INACTINE PEN110 chemistry. *Transfusion* 2004;44:731-8.
 59. Purmal A, Valeri CR, Dzik W, Pivacek L, Ragno G, Lazo A, Chapman J. Process for the preparation of pathogen-inactivated RBC concentrates by using PEN110 chemistry: preclinical studies. *Transfusion* 2002;42:139-45.
 60. AuBuchon JP, Pickard CA, Herschel LH, Roger JC, Tracy JE, Purmal A, Chapman J, Ackerman S, Beach KJ. Production of pathogen-inactivated RBC concentrates using PEN110 chemistry: a Phase I clinical study. *Transfusion* 2002;42:146-52.
 61. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Foley JW, Cincotta L. Factors affecting virus photoinactivation by a

- series of phenothiazine dyes. *Photochem Photobiol* 1998;67:343-9.
62. Hirayama J, Wagner SJ, Abe H, Ikebuchi K, Ikeda H. Involvement of reactive oxygen species in hemoglobin oxidation and virus inactivation by 1,9-dimethylmethylen blue phototreatment. *Biol Pharm Bull* 2001;24:418-21.
 63. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Mallory DA, Cincotta L. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylen blue. *Transfusion* 1998;38:729-37.
 64. Skripchenko AA, Wagner SJ. Inactivation of WBCs in RBC suspensions by photoactive phenothiazine dyes: comparison of dimethylmethylen blue and MB. *Transfusion* 2000;40:968-75.
 65. Wagner SJ, Skripchenko A, Pugh JC, Suchmann DB, Ijaz MK. Duck hepatitis B photoinactivation by dimethylmethylen blue in RBC suspensions. *Transfusion* 2001;41:1154-8.
 66. Wagner SJ, Skripchenko A, Thompson-Montgomery D. Use of a flow-cell system to investigate virucidal dimethylmethylen blue phototreatment in two RBC additive solutions. *Transfusion* 2002;42:1200-5.
 67. van Steveninck J, Trannoy LL, Besselink GA, Dubbelman TM, Brand A, de Korte D, Verhoeven AJ, Lagerberg JW. Selective protection of RBCs against photodynamic damage by the band 3 ligand dipyrindamole. *Transfusion* 2000;40:1330-6.
 68. Besselink GA, van Engelenburg FA, Ebbing IG, Hilarius PM, de Korte D, Verhoeven AJ. Additive effects of dipyrindamole and Trolox in protecting human red cells during photodynamic treatment. *Vox Sang* 2003;85:25-30.
 69. Bechtel MK, Bagdasarian A, Olson WP, Estep TN. Virus removal or inactivation in hemoglobin solutions by ultrafiltration or detergent/solvent treatment. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:123-8.
 70. 小島潤也, 木村哲寛, 後藤博, 上田努, 筒井洋治, 岡本武, 稲葉勝利, 金田伸一, 緒方嘉貴. ヘモグロビン精製工程におけるSD処理を用いたウイルス不活化検討. *人工血液* 2004;12:57.
 71. Estep TN, Bechtel MK, Miller TJ, Bagdasarian A. Virus inactivation in hemoglobin solutions by heat. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:129-34.
 72. Azari M, Ebeling A, Baker R, Burhop K, Camacho T, Estep T, Guzder S, Marshall T, Rohn K, Sarajari R. Validation of the heat treatment step used in the production of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) for viral inactivation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1998;25:577-82.
 73. Huang Y, Takeoka S, Sakai H, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H, Tsuchida E. Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation. *Biotechnol Prog* 2002;18:101-7.
 74. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-9.
 75. Abe H, Ikebuchi K, Hirayama J, Fujihara M, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda H. Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29:381-8.
 76. Miyagawa E, Yoshida T, Takahashi H, Yamaguchi K, Nagano T, Kiriya Y, Okochi K, Sato H. Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J Virol Methods* 1999;83:45-54.
 77. Azari M, Boose JA, Burhop KE, Camacho T, Catarello J, Darling A, Ebeling AA, Estep TN, Pearson L, Guzder S, Herren J, Ogle K, Paine J, Rohn K, Sarajari R, Sun CS, Zhang L. Evaluation and validation of virus removal by ultrafiltration during the production of diaspirin crosslinked haemoglobin (DCLHb). *Biologicals* 2000;28:81-94.
 78. Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-16.
 79. Abe H, Sugawara H, Hirayama J, Ihara H, Kato K, Ikeda H, Ikebuchi K. Removal of parvovirus B19 from hemoglobin solution by nanofiltration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000;28:375-83.
 80. Naito Y, Fukutomi I, Masada Y, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H. Virus removal from hemoglobin solution using Planova Membrane. *Journal of Artificial Organs* 2002;5:141-5.
 81. Hirayama J, Wagner SJ, Gomez C, MacDonald VW, Abe H, Ikeda H, Ikebuchi K, Sekiguchi S. Virus photoinactivation in stroma-free hemoglobin with methylene blue or 1,9-dimethylmethylen blue. *Photochem Photobiol* 2000;71:90-3.
 82. Hirayama J, Abe H, Kamo N, Ikebuchi K, Ikeda H. Comparison of the effects of different antiviral treatments on the antioxidant systems of stroma-free hemoglobin. *Photochem Photobiol* 2001;74:461-4.

Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reactions

S. Wakamoto,¹ M. Fujihara,¹ N. Urushibara,¹ K. Morishita,¹ S. Kaneko,² H. Yasuda,³ H. Takayama,⁴ S. Yamamoto,¹ H. Azuma¹ & H. Ikeda¹

¹Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo, Japan

²Keiwakai Ebetsu Hospital, Ebetsu, Japan

³Kashiwaba Neurosurgical Hospital, Sapporo, Japan

⁴Department of Hematology and Oncology, Clinical Sciences for Pathological Organs, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

Background and Objectives Antibodies to CD36 (anti-CD36) are clinically important. As some platelet immunoglobulins produced by transfusion or pregnancy have been shown to induce platelet activation and to play roles in non-haemolytic transfusion reactions (NHTRs), we investigated the *in vitro* response of platelets to plasma containing anti-CD36.

Materials and Methods Plasma containing anti-CD36, implicated in the development of NHTRs and subsequent thrombocytopenia, was incubated with CD36-positive platelets. Plasma-induced platelet activation was examined by evaluating platelet aggregation and RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and presumably secreted) release.

Results Platelet activation was induced by plasma alone in four out of 20 CD36-positive subjects. In seven subjects, platelet activation was synergistically induced by the combination of epinephrine priming and the plasma. The platelets of the nine remaining subjects failed to respond to the plasma. Platelet activation induced by either the plasma alone or by synergy with epinephrine required the involvement of FcγRIIa. The different responsiveness of the platelets was partially associated with the surface levels of CD36 and FcγRIIa, but not with FcγRIIa polymorphisms.

Conclusions Plasma containing anti-CD36, implicated in the development of NHTRs, exhibited a platelet-activating capability. Additionally, platelets from healthy human subjects exhibited a considerable degree of heterogeneity in their responsiveness to this plasma. The heterogeneity of these responses may determine the occurrence of anti-CD36-related NHTRs.

Key words: anti-CD36 immunoglobulin, interindividual variation, non-haemolytic transfusion reactions, platelet activation, thrombocytopenia.

Received: 6 August 2004,
revised 30 September 2004,
accepted 4 October 2004

Introduction

CD36 is a platelet integral membrane glycoprotein [1–3], and its expression has been observed in monocytes/macrophages, megakaryocytes, erythroid precursors, microvascular (but not large vessel) endothelium, and other tissues [1–3]. CD36 is

a class B scavenger receptor with diverse ligands, including oxidized low-density lipoprotein, thrombospondin-1 (TSP-1), malaria-infected red blood cells (RBCs), long-chain fatty acids, and collagens I and IV [1–3]. Two types of CD36 deficiency have been documented: type I is a deficiency in both platelets and monocytes; and type II is a deficiency in platelets only [4]. Individuals with type I deficiencies produce isoantibodies against CD36, if they are exposed to CD36 during transfusion or pregnancy [5]. Antibodies to CD36 (anti-CD36) are clinically important because they are responsible for the development of refractoriness to platelet transfusion [5],

Correspondence: Mitsuhiro Fujihara, Japanese Red Cross, Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo 063-0002 Japan
E-mail: fujihara@hokkaido.bc.jrc.or.jp

post-transfusion purpura (PTP)-like syndrome [6], and neonatal isoimmune thrombocytopenia [7,8].

Some anti-platelet immunoglobulins, produced after transfusion or pregnancy, have been shown to activate platelets from healthy subjects *in vitro* [9–11]. Such studies imply the potential clinical significance of platelet-activating antibodies in the pathology of non-haemolytic transfusion reactions (NHTRs) [9–11]. Another study also suggested that the ability of anti-platelet immunoglobulins to cause platelet activation plays an important role in determining whether anti-platelet immunoglobulins can induce not only thrombocytopenic states, but also severe NHTRs [12]. However, to the best of our knowledge, the platelet-activating ability of anti-CD36 produced after transfusion or pregnancy has not been previously reported.

Platelets from healthy individuals exhibit a considerable heterogeneity in their responsiveness to anti-platelet immunoglobulins, such as murine monoclonal antibodies (mAbs) and clinical samples from patients with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) [13–19]. Such activating anti-platelet mAbs and HIT serum require interactions between the Fc portion of the antibodies and Fc γ RIIa to activate platelets [13,20–23]. Consequently, the heterogeneous responses of human platelets to these activating anti-platelet immunoglobulins are correlated with either the platelet surface expression level of Fc γ RIIa [13], or with a polymorphism at amino acid 131 of Fc γ RIIa [13,18,20,24–26].

Recently, we experienced the first case of NHTRs followed by thrombocytopenia after the transfusion of anti-CD36 containing fresh-frozen plasma (FFP) [27]. In the present study therefore we addressed the question of whether the anti-CD36-containing plasma could cause platelet activation in healthy subjects *in vitro* and, if so, whether a heterogeneous responsiveness might exist. Our results showed that this plasma exhibited a platelet-activating capability. In addition, CD36-positive platelets derived from healthy subjects showed a considerable heterogeneity in their responsiveness to this plasma. Furthermore, the pretreatment of platelets with a subthreshold concentration of epinephrine synergistically conferred platelet responsiveness to the plasma in a subpopulation of subjects who were unresponsive to the plasma alone. The diversity of platelet responses was partially attributed to the surface levels of CD36 and Fc γ RIIa, but not to Fc γ RIIa polymorphisms. Besides this anti-CD36-containing sample, platelet activation was also caused by one of the 13 anti-CD36-containing serum samples that were tested.

Materials and methods

Anti-CD36-containing plasma or serum

We encountered a patient who suffered from NHTRs followed by thrombocytopenia after transfusion of anti-CD36-containing FFP [27]. Briefly, the patient was a 67-year-old Japanese

female of blood group B. She received red blood cell concentrates (RCCs) and, subsequently, FFP on day 6 to improve anaemia after cerebral surgery. About 10 min after the start of FFP transfusion, she experienced chest tightness, nausea, chills, incontinence and hypotension (systolic pressure 74 mmHg). Transfusion was discontinued immediately and the symptoms showed a gradual improvement. Chest X-ray on the next day revealed no pulmonary oedema. Her platelet count was 171 000/ μ l, which fell to 19 000/ μ l 12 h post-transfusion, and recovered to 154 000/ μ l on post-transfusion day 8. Anti-CD36 composed of predominantly immunoglobulin G1 (IgG1) and a small amount of immunoglobulin G2 (IgG2) were detected in the FFP. The donor of the FFP was a 28-year-old Japanese female (SS) with type I CD36 deficiency, who had delivered two babies with thrombocytopenia and anaemia. She had no history of transfusion. Based on her history, she must have been sensitized by the CD36 antigen during pregnancy. Her blood group was B. The anti-CD36-containing plasma (SS plasma) or serum (SS serum) used in this study was obtained from her with her consent. Except for the anti-CD36 detected in the FFP, no antibodies against human leucocyte antigen (HLA), human platelet antigen (HPA), human neutrophil antigen (HNA) and plasma proteins, including albumin, α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin, Gc-globulin, α_2 -HS-glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin, transferrin, fibrinogen, IgG, IgM, IgA, C3, C4 or C9 were detected in either the patient's serum or in sera from donors for RCCs and FFP.

In addition to the SS serum, we also used anti-CD36-containing sera derived from 12 random healthy donors (serum sample nos 1–12) and from one patient who developed refractoriness to platelet transfusion (serum sample no. 13) [6] in the experiment (shown in Table 3).

Screening for HLA, HPA and HNA antibodies was performed by using the Flow-PRA screening test [28] (One Lambda, Canoga Park, CA), the MPHA (mixed passive haemagglutination) [29] kit (Olympus, Tokyo, Japan), and by standard GIFT-FCM (granulocyte immunofluorescence test–flow cytometry) [30], respectively. Screening for antibodies to plasma protein was performed by an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), except that for the antibody against IgG, which was carried out by passive haemagglutination (PHA).

For the platelet aggregation and release reaction assays, plasma (Figs 1–4 and Table 1) or serum (Table 3) samples containing anti-CD36 were used. For the flow cytometry analyses, serum samples were used.

Preparation of platelet-rich plasma (PRP)

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained from the citrated venous blood of 22 randomly selected healthy subjects with blood group O or B by centrifugation (140 g, 15 min, 22 °C). The platelets from 20 of the 22 subjects were CD36-positive,

Fig. 1 The effects of SS plasma on aggregation (upper panel) and RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and presumably secreted) release (lower panel) of platelets. SS plasma activates CD36-positive platelets from four subjects (a) but not from 16 subjects (b). SS plasma did not activate CD36-negative platelets from two subjects (c). Platelet-rich plasma (PRP) was incubated with SS plasma on an aggregometer for the measurement of platelet aggregation (upper panels). SS plasma or negative control plasma was added at the time-point indicated by the arrow. After the reaction, the RANTES level in the cell-free supernatant was measured (lower panels) as described in the Materials and methods. The data on platelet aggregation from CD36-positive platelets are representative of four (a) and 16 (b) subjects, respectively. The data on RANTES release from CD36-positive platelets represent the mean \pm standard error (SE) of four (a) and 16 (b) subjects, respectively. The results of CD36-negative platelets are representative of two subjects (c).

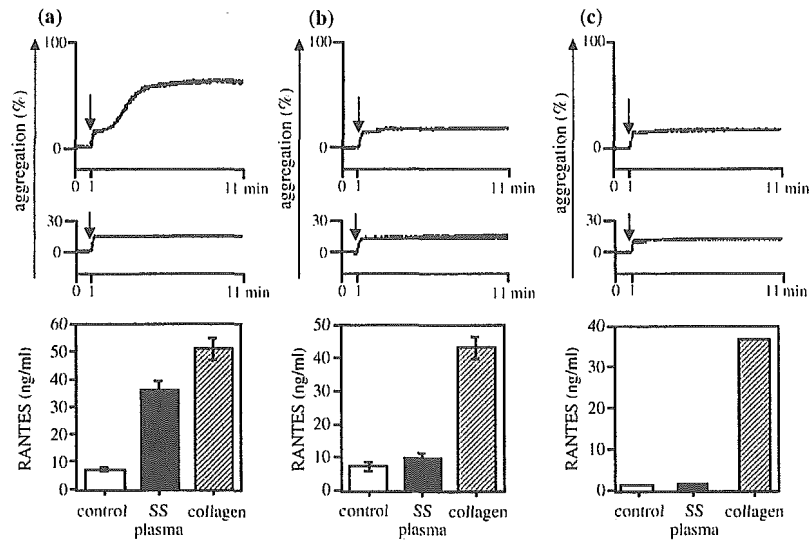


Table 1 Synergistic effects of SS plasma and epinephrine on platelet activation

Maximum aggregation (%) ^a		RANTES release (ng/ml) ^b	
Epinephrine -	Epinephrine +	Epinephrine -	Epinephrine +
<20	64 (27-77)	5.4 (-3.1 to 11.2)	23.1 ^c (4.5-32.4)

Values are expressed as the median (range) of seven subjects.

Platelet-rich plasma (PRP) from five and two subjects was pretreated with 2 μ M and 1 μ M of epinephrine, respectively.

^aMaximum aggregation 9 min after stimulation with SS plasma.

^bRANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and presumably secreted) levels were adjusted by subtracting the release induced by the control plasma.

^c $P < 0.05$ vs. epinephrine (-).

and those from two subjects were CD36-negative. Flow cytometry analysis showed that the platelets from all the CD36-positive subjects reacted with the anti-CD36-containing serum, whereas platelets from the two CD36-negative subjects were not reactive.

Measurement of the platelet aggregation and release reaction

The platelet aggregation and release reaction was carried out as described by Dettke *et al.* [11], with slight modifications. PRP was incubated with SS plasma at a ratio of 4 : 1 at 37 °C on an aggregometer (PA-200; Kowa, Tokyo, Japan) for the measurement of platelet aggregation. The platelet concentra-

tion was adjusted to $17 \times 10^4/\mu$ l in 300 μ l of total reaction volume. PRP incubated with pooled plasma from blood group AB donors was used as a negative control. As a positive control, PRP was stimulated with 1 μ g/ml of collagen (Nycomed Pharma GmbH, Unterschleißheim, Germany). To test the inhibitory effect of prostaglandin E₁ (PGE₁) on the response to SS plasma, PRP was preincubated with PGE₁ (500 nM) for 5 min followed by the addition of plasma. In a study examining the effect of epinephrine on SS plasma-induced platelet activation, before the addition of SS plasma, the PRP was pretreated with epinephrine (Arklay Inc., Kyoto, Japan) for 5 min. For each platelet donor, epinephrine was first titrated to find the concentration that elicited less than 20% aggregation during 14 min of stimulation. Individual donors varied in their sensitivity to epinephrine, and the concentrations used in this study ranged from 0.25 μ M to 8 μ M. In some experiments, the PRP was stimulated with 1 μ M ADP (Sigma, Steinheim, Germany) after incubation with SS plasma or control plasma for 3 min. For inhibition of Fc γ RIIa on platelets, IV.3 (Medarex Inc., Annandale, NJ) or mouse IgG (Jackson, West Grove, PA) was added to the PRP 2 min prior to the addition of SS plasma. After the measurement of aggregation, the mixture was transferred into another tube and centrifuged at 10 000 g for 10 min. The cell-free supernatant was maintained at -40 °C until measurement of release. The level of RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and presumably secreted) was measured by using an ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) in duplicate, according to the manufacturer's recommendations. In the experiment from which the results shown in Table 3 were derived, we used serum samples containing anti-CD36 as the platelet stimulus, and serum from the blood group AB donor as a negative control.

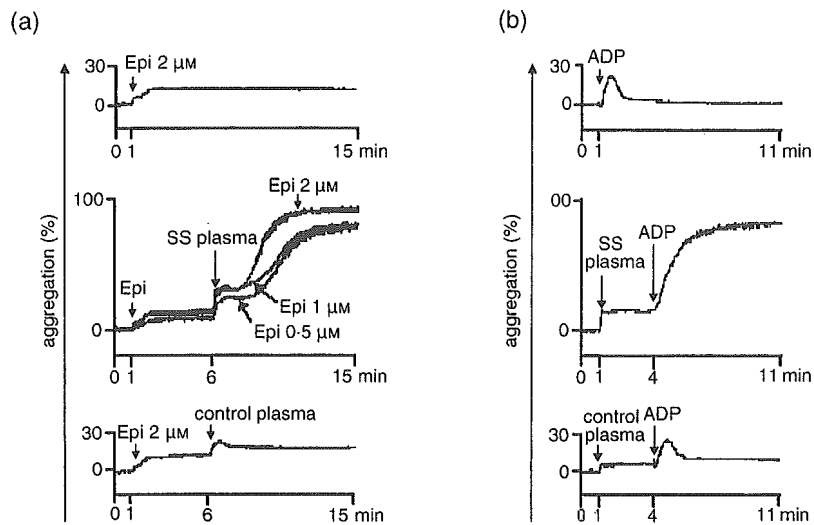


Fig. 2 Synergistic effects of SS plasma and epinephrine on platelet activation. In the presence of a subthreshold concentration of epinephrine (Epi), SS plasma caused activation of CD36-positive platelets derived from seven out of 16 subjects. (a) Platelet-rich plasma (PRP) obtained from 16 subjects who were unresponsive to the SS plasma alone, was stimulated with Epi alone (upper panel), with SS plasma (middle panel) or with negative control plasma (lower panel) after pretreatment with Epi for 5 min on an aggregometer for the measurement of platelet aggregation. Representative data of the aggregation tracings obtained from seven subjects are shown. (b) PRP obtained from three subjects who were unresponsive to the SS plasma alone was stimulated with ADP alone (upper panel), with SS plasma (middle panel) or with negative control plasma (lower panel) for 3 min before the addition of ADP. Representative data showing the aggregation tracings obtained from three subjects are shown.

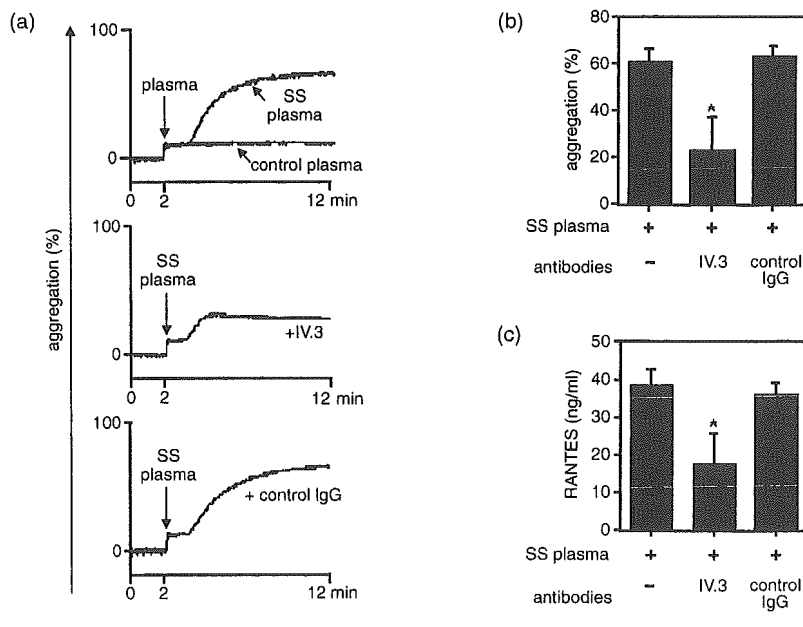


Fig. 3 Effect of anti-Fc γ RIIa blocking immunoglobulin on platelet activation induced by SS plasma. An anti-Fc γ RIIa blocking immunoglobulin (IV.3) reduced the platelet aggregation and RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and presumably secreted) release induced by SS plasma. (a) Platelet-rich plasma (PRP) was stimulated with SS plasma or negative control plasma (upper panel). Prior to stimulation, PRP was pretreated with 20 μ g/ml of IV.3 (middle panel) or with the control antibody (lower panel) for 2 min. Representative data of the aggregation tracings obtained from three subjects are shown. (b) Values given are the maximal aggregation 10 min after the stimulation with SS plasma and are expressed as mean \pm SE from three subjects. (c) After the reaction, the RANTES level in the cell-free supernatant was measured, as described in the Materials and methods, section. Values given are expressed as the mean \pm SE of three subjects. The levels of RANTES released by the control plasma in three subjects were 7.5 \pm 3.3 ng/ml (mean \pm SE). (b) and (c) * P < 0.05 vs. SS plasma alone.

Flow cytometry

The flow cytometry analysis was performed according to the procedure described by Tomiyama *et al.* [13], with slight modifications. PRP was washed once with phosphate-buffered saline (PBS) containing 10 mM EDTA (EDTA-PBS) (1800 *g*, 5 min, 22 °C). Platelets were resuspended in PBS.

To test the binding of SS serum to the platelets, 20 μ l of the platelet suspension (1 \times 10⁶/20 μ l) was incubated with 250 μ l of SS serum for 30 min at room temperature. This serum volume was more than 10-fold the amount required for saturation. Platelet suspension incubated with serum from a blood group AB donor served as a negative control.

After incubation, the platelets were washed three times with EDTA-PBS and incubated with 20 μ l of 1 : 15-diluted phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human IgG (Jackson) for 20 min at room temperature in the dark. For the detection of Fc γ RIIa expression on platelets, 50 μ l of platelet suspension (1 \times 10⁷/50 μ l) was incubated with 50 μ l of IV.3 (2 μ g/ml) for 30 min at room temperature. As a negative control, anti-mouse IgG (Jackson) was used. After incubation, the platelets were washed twice with EDTA-PBS and incubated with 20 μ l of 1 : 16-diluted PE-conjugated anti-mouse IgG (Jackson) for 20 min at room temperature in the dark. For the detection of CD36 expression on platelets, 20 μ l of the platelet suspension (5 \times 10⁵/20 μ l) was incubated with 20 μ l of fluorescein

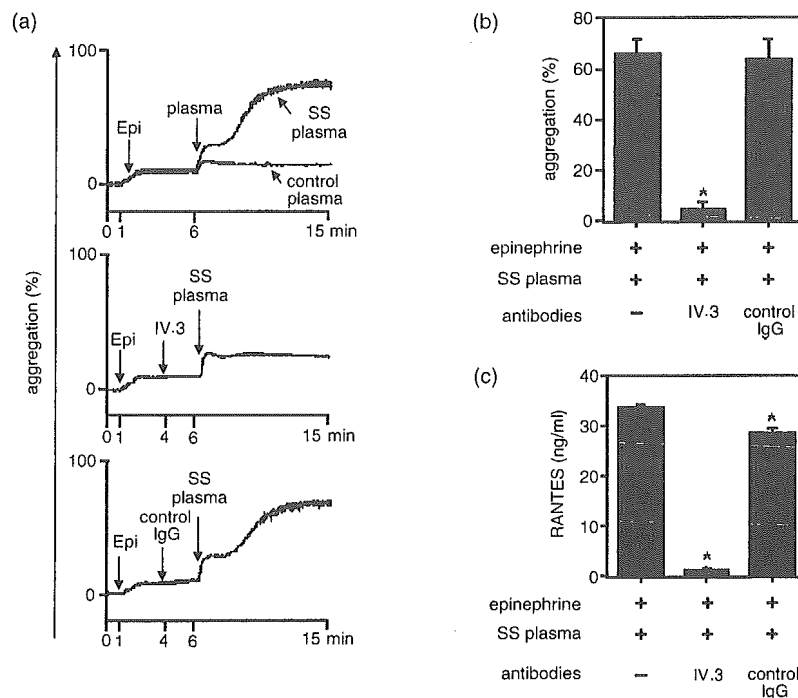


Fig. 4 Effect of anti-Fc γ RIIIa blocking immunoglobulin on platelet activation induced by the synergistic effect of SS plasma and epinephrine (Epi). IV.3 reduced the platelet aggregation and RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed, and presumably secreted) release induced by the synergistic effects of SS plasma and epinephrine. (a) Platelet-rich plasma (PRP) was stimulated with SS plasma or with negative-control plasma after pretreatment with 2 μ M of Epi for 5 min (upper panel). PRP was preincubated with 2 μ M of Epi. During the preincubation, 20 μ g/ml of IV.3 (middle panel) or the control antibody (lower panel) was added at the time-point indicated by the arrows, and platelets were incubated for 2 min. Platelets were then stimulated with SS plasma. Representative data of the aggregation tracings obtained from three subjects are shown. (b) Values given are of maximal aggregation 10 min after the stimulation by SS plasma and are expressed as mean \pm standard error (SE) from three subjects. (c) After the reaction, the RANTES level in the cell-free supernatant was measured as described in the Materials and methods. Values given are expressed as the mean \pm SE of three subjects. The levels of RANTES released by control plasma in the presence of epinephrine in three subjects were 4.2 ± 1.1 ng/ml (mean \pm SE). (b) and (c) * $P < 0.05$ vs. SS plasma alone.

isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD36 mAb (FA6-152; Immunotech, Marseille, France) for 20 min at room temperature in the dark. As a negative control, FITC-conjugated anti-mouse IgG (BD Bioscience-Pharmingen, San Jose, CA) was used. To determine the titre of the anti-CD36 in the sera used in our experiments, 20 μ l of the platelet suspension ($2 \times 10^6/20 \mu$ l) was incubated with 20 μ l of each serum sample at multiple dilutions or with control serum for 30 min at room temperature, washed twice, and then stained with PE-conjugated anti-human IgG for 20 min at room temperature.

After the incubation, the platelets were washed with EDTA-PBS once and resuspended in 500 μ l of EDTA-PBS, and samples were then analysed with flow cytometry (LSR; Becton-Dickinson, San Jose, CA). The platelet population was identified by means of its light-scatter characteristics and enclosed in an electronic collection gate. A total of 10 000 platelet events were collected. Titres were determined as the last dilution of each anti-CD36-containing serum that showed a mean fluorescence intensity (MFI) ratio (anti-CD36-containing serum/control plasma) of ≥ 2 .

Fc γ RIIIa polymorphism analysis

Fc γ RIIIa polymorphism at amino acid 131 (His or Arg) was determined as a single nucleotide substitution in exon 4. Intronic primers encompassing exon 4 of the Fc γ RIIIa gene were synthesized as follows: s301 (5'-ggaagtacacctgagactg-3') and as666 (5'-tctcccctccctacatcttggc-3'). Genomic DNA was purified from heparinized peripheral blood on Qiagen columns (Qiamp Blood Kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed with PCR primers (above) and LA-taq polymerase (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan) under the following conditions: 30 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, 60 $^{\circ}$ C for 30 seconds, 72 $^{\circ}$ C for 1 min.

The amplified fragment of ≈ 330 bp was purified with a MinElute PCR purification kit (Qiagen) and subjected to sequence analysis using a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data collection and analysis were performed on an automated DNA sequencer (ABI PRISM 377; Applied Biosystems). Sequencing in both directions was performed by using the PCR primers.

Statistical analyses

To analyse the synergistic effect of epinephrine or ADP on SS plasma-induced platelet activation, the unpaired non-parametric Mann-Whitney test was used. For the effect of IV.3 on platelet aggregation and RANTES release induced by SS plasma, statistical differences were tested by using the two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni correction. A *P*-value of < 0.05 was considered to indicate significant differences. To analyse the relationship between the surface expression of CD36, FcγRIIa, or the binding of SS serum and the heterogeneity of the responsiveness to SS plasma, the Kruskal-Wallis *H*-test was used for unpaired non-parametric multiple comparisons (significant at a *P*-value of < 0.05) and the Mann-Whitney *U*-test was used for unpaired non-parametric comparisons. Significance was taken as *P* < 0.0167 (0.05 divided by 3), to adjust the *P*-value for the three comparisons (group 1 vs. group 2; group 1 vs. group 3; and group 2 vs. group 3). The linear association between two variables was ascertained with Pearson's *R*-test. A *P*-value of < 0.05 was considered to indicate significance.

Results

Platelet activation induced by SS plasma

We first investigated the platelet responsiveness of 22 adult human subjects to SS plasma for the induction of aggregation and RANTES release. Platelets from the 22 subjects tested showed similar aggregation responses to 1 µg/ml of collagen [mean ± standard error (SE): 91.1 ± 2.7%; *n* = 22]. In four of the 20 CD36-positive subjects, the incubation of PRP with SS plasma caused remarkable platelet aggregation and increased the level of RANTES in the cell-free supernatant (Fig. 1a). PGE₁ inhibited the platelet aggregation and RANTES release (data not shown). On the other hand, SS plasma did not induce platelet activation in 16 of the 20 CD36-positive subjects (Fig. 1b). The same phenomenon applied to the platelets from the two CD36-negative subjects (Fig. 1c). These results suggest that there were significant differences among the subjects in the platelet responses to the SS plasma.

Synergistic effect of SS plasma with pretreatment of epinephrine on platelet activation

It was reported that in the presence of a subthreshold concentration of platelet agonist, platelets were activated by anti-platelet immunoglobulin, which, by itself, had no stimulatory effect on platelets [15,31,32]. Therefore, we next investigated whether there was any synergism between a platelet agonist and SS plasma on activation of the platelets

Table 2 Responsiveness of platelets to SS plasma and genotype of FcγRIIa in subjects

	Subject number	Genotype of FcγRIIa
Group 1	1	His/His
	2	His/His
	3	His/His
	4	His/Arg
Group 2	5	His/His
	6	His/His
	7	His/His
	8	His/Arg
	9	His/Arg
	10	Arg/Arg
Group 3	11	His/His
	12	His/His
	13	His/His
	14	His/Arg
	15	His/Arg
	16	His/Arg

obtained from the 16 subjects whose platelets were not activated by the plasma alone. To do this, we measured SS plasma-induced platelet activation under conditions where the platelets were pretreated with a subthreshold concentration of a platelet agonist, as it was assumed that platelet priming might be required for platelet activation by the triggering effect of the passively transfused anti-CD36 in some recipients. In preliminary experiments, PRP from three of the 16 subjects was pretreated with epinephrine at concentrations such that epinephrine alone elicited an aggregation of less than 20% (Fig. 2a) or were pretreated with 1 µM ADP, an ADP value that alone elicited transient aggregation of less than 20% in each subject. The stimulation of epinephrine-pretreated platelets with SS plasma elicited full aggregation (Fig. 2a). Negative control plasma did not cause such platelet activation (Fig. 2a). On the other hand, ADP did not show such effects (data not shown). Therefore, we focused on the priming effect of epinephrine on SS plasma-induced platelet activation by testing PRP from all 16 subjects whose platelets were not activated by SS plasma alone. Platelet aggregation and RANTES release were synergistically induced by pretreatment with epinephrine and the subsequent addition of SS plasma in seven subjects (Fig. 2a, and Table 2). However, the platelets of nine subjects failed to respond (data not shown). These results indicate that SS plasma had a synergistic effect with the priming activity of epinephrine on the induction of platelet activation in a subpopulation of subjects.

Additionally, we also attempted to determine whether a subthreshold concentration of ADP could cause platelet activation synergistically with SS plasma when the order of