

学位論文題名

Mechanisms of virus inactivation by photosensitization

(光増感作用によるウイルス不活化の機序)

学位論文内容の要旨

光増感作用によるウイルス不活化において、ウイルス構成成分の傷害の程度と感染性低下との相関関係を定量的に検討した。また、メチレンブルー (MB) によるウイルス光不活化において、光増感作用のタイプI及びタイプII機構の関与を、主として分子状酸素の必要性の点から検討し、またウイルス不活化効率に影響を及ぼす因子についても検討を行った。

親水性の光増感色素としてMBとアルミニウムフタロシアニン四硫酸塩 (AlPcS₄) を、疎水性色素としてメロシアニン540 (MC540) とアルミニウムフタロシアニン (AlPc) を用い、比較検討した。M13ファージ懸濁液に各種色素を添加し光照射したところ、MBとAlPcS₄では照射量依存的にM13が不活化された。その時M13遺伝子一本鎖環状DNA (sc-DNA) 画分は減少し、DNA鎖切断により直鎖状 (sl-DNA) へと転換した。この転換は熱ピペリジン処理により促進された。sc-DNAの残存率はウイルス生存率と良く相関し、抽出DNAを熱ピペリジン処理した場合により1対1の対応に近づいた。MB及びAlPcS₄光処理によるM13コート蛋白質の変化は、SDS-PAGEでは検出されなかった。一方、疎水性色素であるAlPcとMC540ではノンエンベロープウイルスであるM13は不活化されず、DNA及びタンパク質の変化はみられなかった。

エンベロープウイルス vesicular stomatitis virus (VSV) はMB、AlPcS₄及びAlPcにより不活化され、宿主細胞 Vero cell の細胞膜との融合能も阻害された。しかし、例えばMBの場合、融合能低下の程度は43% (0.76 log₁₀) であり、そのときのウイルス不活化率99.998% (4.7 log₁₀) に比べて非常に小さかった。一方、VSV感染は宿主細胞のエンドサイトーシスにより起こることからこの融合能をみたところ、いずれの色素の光不活化処理においても未処理のものとはほとんど違いはみられなかった。また、ウイルスタンパク質にも際だった変化は認められなかった。これらの結果は、親水性及び疎水性いずれの色素によるVSV不活化においても、エンベロープあるいはタンパク質以外の標的が重要であることを示唆する。

MB光増感はタイプII機構により一重項酸素 (¹O₂) を產生するが、¹O₂がウイルス不活化に直接関与しているか否か不明な点も多い。M13不活化は¹O₂の消去剤であるN₃により阻害され、¹O₂の寿命を延長するD₂O中で促進された。このことはMBによるM13光不活化に¹O₂が関与していることを示す。またウイルス懸濁液からArバブリングにより溶存酸素を除去するとM13不活化が抑制され、この反応には分子状酸素が必要であることが判った。しかし、脱酸素条件においても不活化が起こったことから、酸素非依存的な不活化機序の存在が示された。即ち、MB光増感によるM13不活化にはタイプI及びタイプIIの両機構が関与している可能性が示された。

MB光増感によるM13不活化に影響を及ぼす外的因子として、ウイルス懸濁液のpH及び温度の効果を検討した。M13不活化はpHの影響を受け、中性に比べ酸性でより遅く、塩基性でより速く不活化された。このとき不活化曲線はシグモイド型になり、変曲点はpH 7.25であった。M13は室温 (24°C) に比べ低温 (6°C) でより遅く、高温 (38°C) でより速く不活化された。蛍光色素 YOYO-1 を用いてウイルス粒子内への色素の浸入を検討したところ、4°C-37°Cの範囲では、色素の浸入速度及びDNAとの結合量に違いは認められなかった。一方、MB光増感による¹O₂產生の温度依存性を2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (TMPD) をスピントラップ剤としたelectron spin resonance (ESR) で検討したところ、¹O₂產生は温度依存性を示さないこと、しかし¹O₂とTMPDの

反応は温度依存性を示すことが判った。これらの結果から、MB光増感によるM13不活化の温度依存性は、より高温において $^1\text{O}_2$ とウイルス構成分子との反応性が高まった結果であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 茂 直 樹

副 査 教 授 栗 原 堅 三

副 査 助 教 授 三 宅 教 尚

副 査 講 師 宮 内 正 二

学 位 論 文 題 名

Mechanisms of virus inactivation by photosensitization

(光増感作用によるウイルス不活化の機序)

本学位論文は英文で書かれており、序論、第1章、第2章、第3章、結語の5つの部分からなる論文である。序論では、輸血におけるウイルスの不活化の重要性が述べられている。ウイルス感染血液を輸血するという事故は検査法の改良により著しく減少している。しかし、検査法が抗体検査であるので、感染していても抗体が出来るまでの間の献血であれば検査に合格することになる。また、未知のウイルスが存在している恐れもある。このような可能性を少しでも小さくする方法の1つとしてウイルスの不活化がある。不活化の1つの方法として紫外線照射や可視光による光増感作用の利用があり、それによるウイルスや血球細胞への効果に関する過去の研究がレビューされている。ウイルスの光不活化の過去の研究は、遺伝子の傷害、タンパクの変性、またエンベロープウイルスにおいては脂質エンベロープの傷害が起こること等が報告されているが、ただ傷害が起こることを調べたにすぎないで、それらの傷害の程度とウイルス不活化や感染性低下との相関関係を定量的に考察した論文はなかった。また、疎水性色素が脂質膜をもつエンベロープウイルスしか不活化出来ないことの理由はよく分かっていない。このように、問題点、解決すべき点が本章で述べられている。

第1章では、M13ファージをノンエンベロープウイルスのモデルとし、メチレンブルー、アルミニウムフタロシアニン四硫酸塩、メロシアニン540、アルミニウムフタロシアニンを光増感剤として用いて、研究を展開している。親水性光増感剤であるメチレンブルー、アルミニウムフタロシアニンは、可視光照射光量依存的にM13が不活化された。環状DNA残存量とウイルス生存率がよく相関を示した。一方、SDS-PAGEで検討する限り、M13のコートタンパクの変化は見られなかった。エ

ンベロープウイルスとしてvesicular stomatitis virus (VSV) も検討した。この結果もDNAが標的であろうと結論している。また、上記のように疎水性色素を光増感剤として用いたときはエンベロープウイルスしか効果がないが、その原因は、ウイルスが脂質エンベロープという光増感作用に必要な疎水的環境を提供することであろうと結論している。

第2章では、メチレンブルーとM13の組み合わせで、ウイルス不活化の機序を詳細に研究している。メチレンブルーの光増感は一重項酸素生成(タイプⅡ反応と呼ばれる)の量子収率が高く、一重項酸素の産生源として用いられているほどである。しかし、メチレンブルーによるウイルス光不活化が一重項酸素によるとの実験的証明は、未だなされていない。一重項酸素の寿命を長くする重水の中で、不活化は促進された。また、一重項酸素のクエンチャーであるアジドの添加では不活化は低下した。これらのことは、不活化がタイプⅡ反応よるとの考えに矛盾しない。しかし、無酸素状態で光照射をしても不活化が起こることを発見している。このことは、励起三重項色素と物質との間の直接のエネルギー転移や電荷移動に基づく反応、いわゆるタイプⅠ反応が起こっていることを意味している。メチレンブルーがタイプⅡのみでなく、タイプⅠ反応によってもウイルスを不活化することは新しい発見である。

第3章では、メチレンブルーとM13の組み合わせで、ウイルス懸濁液の温度及びpHがタイプⅡ反応による不活化に及ぼす影響を詳細に調べている。温度の効果が見られたが、これはウイルス粒子への色素の進入や核酸へのインターカレーションの速度の変化ではないことを実験的に明らかにしている。メチレンブルーの一重項酸素の生成をスピントラップの方法でESRで調べ、その生成速度の解析を行っている。その結果、一重項酸素の生成速度に温度依存性はなく、生成した一重項酸素とトラップ剤との反応が温度依存性を示すことを明らかにした。このことより、ウイルスの場合は、核酸と一重項酸素との反応が温度依存性をもつのであると推測している。また、アルカリ性で、光照射による不活化の程度が大きく、pH依存性の曲線は三重項メチレンブルーのプロトンの解離曲線とほぼ一致した。このことより、プロトンを解離した三重項メチレンブルーが一重項酸素を産生していると結論している。また、このデータは、現実に光不活化を輸血に用いようとするときに重要な結果である。なぜならば、血液細胞の保存温度が細胞毎に異なるため、細胞毎に最適条件を決める必要があることを改めて明確に示したことになる。

最後の結論の章では、結果を要約し、今後の展望を述べている。

以上、審査の結果、博士(薬学)学位を授与するに十分値すると認めた。