

ヒト・トロンビン製剤に対する肝炎ウイルス殺滅のための 紫外線・ β -propiolactone 併用処理法に関する研究

株式会社ミドリ十字 中央研究所 研究第3部

高 鍋 温 是

五十嵐 一 雄

佐 古 英 二

(昭和47年6月27日受付)

近年、その確実性の点から極めて注目をあびている Australia 抗原を用いる screening 法は、全血の肝炎ウイルス検出率を著しく高めたと言うものの、人の全血より製された人血漿分画製剤が臨床的に安全に使用されるためには、それでもなお製品に対する肝炎ウイルスの殺滅処理がなされるべきである。

肝炎ウイルス殺滅の方法は多くの研究者によって検討されて来たが、それを大別すると紫外線照射法、紫外線照射と β -propiolactone (BPL) 添加の併用法ならびに60°C—10時間の加熱処理法の3種がある。その他一時、Allen ら¹⁾により32°C 6カ月保存のいわゆる“糊ざらし法”が提唱されたこともあったが、これは現在では完全に否定²⁾されている。

紫外線照射法は、内藤³⁾によって、すでに詳しく紹介されているところであるが、Oliphant ら⁴⁾によって初めてその有効性が報告され、その後、Habel⁵⁾、Blanchard⁶⁾、安東⁷⁾によって連続流下式の照射装置が開発され、現在これが繁用されている。1950年、米国NIHは各種の生物学的製剤に対して紫外線照射を行なうよう定め、現在でもその実施が規定されている⁸⁾⁹⁾。

しかしながら、これらの方法は現在のところ肝炎ウイルスが単離同定されていないので¹⁰⁾、肝炎ウイルスに替えて試料溶液に移植された指標細菌(通常 *A. aerogenes*)が死滅する条件をもって可としている。それは上記のNIH基準に記載されている通り“人体における臨床比較試験の結果、同種血清黄疸の病毒は、より抵抗の強い細菌を殺すに必要な照射度の紫外線で殺されることが判明しており、*Aerobacter aerogenes*はこの菌に該当する”と言う理由に基づいてい

る(同基準は *A. aerogenes* の生菌数が $10^6 \sim 10^7/m$ より10/ml以下となる条件を定めている)。しかしながら、このことに対しては Wolf ら¹¹⁾によって代表されるような異論¹²⁾¹³⁾がない訳ではなく、LoGripp-o¹⁴⁾は、BPLの添加または BPLと紫外線を併用する方法を提唱しており、須山¹⁵⁾はこの方法をヒト・フィブリノーゲンに適用して良好なる成績を得たと報告している。

60°C—10時間の加熱処理法は Hink ら¹⁶⁾によって確立され、Gellis ら¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾の肝炎ウイルス含有が証明されている血漿を25%人血清アルブミン溶液に加え、これを加熱処理した後に、有志者に注射して肝炎伝染の有無を調べる実験によってその処理効果が確実であることが実証され、本邦でもこの処理がなされた製剤(アルブミン、プラスマネート)が広く市販されている。しかしながら、本法は処理を受ける試料が熱安定性に欠ける蛋白質であるため、その実施は今のところ限られている。

今回、肝炎ウイルス殺滅処理を施そうとしているトロンビンも熱に不安定な酵素であり、このものについては今のところ適当なる肝炎ウイルス殺滅処理法が見出されていない。その理由として、トロンビンの周知される血液凝固能(フィブリノーゲンをフィブリンに転換する)を失なわしめることなく同時に肝炎ウイルスを殺滅するに足る方法を見出せなかったことによるものと思われる。

筆者はフィブリノーゲンとトロンビンに介在する相互の関連性に注目し、須山らがフィブリノーゲンにおいて用いている方法をトロンビンに適應することを試み、本法によってほぼ所期の目的が達せられるこ

Human thrombin treated with ultraviolet and β -propiolactone Atuyuki TAKANABE,
Kazuo IGARASHI, Eizi SAKO. 3rd Research Lab., the Green Cross Co. (Osaka)

とを知った。

実験材料と実験方法

ほとんど須山らの方法を準用しながら試験したが、*A. aerogenes* の生菌数の変化とトロンビンの血漿凝固能の変化を処理効果の指標とした。なお、試料溶液に移植した *A. aerogenes* 生菌数の減少 ($10^6 \sim 10^7$ ml の生菌数が 10^4 ml 以下となる) をもって肝炎ウイルス殺滅の指標とした。

I. 試料溶液

肝炎ウイルス不活性化処理がトロンビン単位に及ぼす影響を検討するときはトロンビン溶液を、他方、肝炎ウイルス殺滅効果を検討するときは、トロンビン溶液 10 ml に *A. aerogenes* 菌液 0.1 ml を加えて、生菌数が $10^6 \sim 10^7$ ml となるように調製したものを試料溶液とした。

1. トロンビン溶液

混合された ACD 加入血漿を Cohn の冷エタノール法によって分画した Fr. III を精製して得たヒト・トロンビン (ミドリ十字製) を 1 ml 当たり約 400 単位となるように注射用蒸留水に溶かした。

2. *A. aerogenes* 菌液

A. aerogenes (NIH 分与株) の培養液 (脳・心臓浸出液培地, 32°C , 20 時間, 2 回) を調製し、その培養液を生理食塩液で 10 倍希釈した液を菌液とした。

II. 肝炎ウイルス不活性化処理

最初に述べたごとく本研究の目的とする処理法は、紫外線照射と BPL 添加の併用にあるが、それに先立って夫々の単独の効果を、試料溶液のトロンビン単位ならびに菌数の変化によって調べ、それらの最適条件を参考としながら、それを組み合わせて行なう併用処理法の至適条件を求めることとした。

1. 紫外線照射法

須山らは殺菌ランプを内蔵した回転照射筒を用いているが、この方法では極めて大量の試料溶液を必要とするので、東ら²⁰⁾の方法を参照して次のごとく行なった。

すなわち、無菌箱内に筒状の紫外線ランプ (2537 Å, 東芝電気製 GL15) を設置し、試料溶液 (液層 0.5 mm) の全面が常にランプの直下 35 cm の位置で照射されるようにして、試料溶液を前後に振盪させた。

試料溶液に照射される紫外線放射照度は殺菌線照度計 (東芝電気製 GI 1) で測定し、又試料溶液に照射する紫外線の強度 (joule/ml) は照射時間を変えることにより任意に調節した。操作は $15 \sim 20^\circ\text{C}$ の環境下で行なった。

2. BPL 法

BPL は市販品の試薬 1 級を用いた。試料溶液 10 ml を $4 \sim 10^\circ\text{C}$ に保存しておき、各種濃度に希釈した BPL 水溶液 0.1 ml を瞬時に加え、直ちに反応液を 25°C の水浴中に移して 5 時間放置した。

3. トロンビン単位測定法

トロンビン溶液を pH 7.2 の食塩加磷酸緩衝液で希釈し、1 ml 中約 5 単位とした後、これに凝固能測定用標準血漿 (Dade 社製) を加え、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で、その血漿を凝固させるに要する時間を求めた。なお、凝固時間の測定にはフィブロメーター (Baltimore Biological Lbts. 社製) を使用した。

別に、標準トロンビン (国立予防衛生研究所配布) を生理食塩液に溶かし、各種標準液と血漿凝固時間との関係を示す標準曲線を作成し、これより試料溶液中のトロンビン単位を算出した。

4. 生菌数計算法

試料溶液を、滅菌した生理食塩液で 10 倍段階希釈し、その 2 ml を 1.5% 普通寒天培地 18 ml と混釈培養して行なった。菌数計算は 3 回行ないその平均値で示した。

実験結果

I. 紫外線照射法によるトロンビン単位の変化と殺菌効果

試料溶液に 0.5 間隔で $0 \sim 2.5$ joule/ml の紫外線を照射したとき、試料溶液のトロンビン単位と *A. aerogenes* の生菌数は表 1 のように変化した。すなわち紫外線照射によるトロンビン単位の減少はあり得るが、その程度は僅少である。他方、生菌数はかなり低下するが、照射量を 1.5 joule/ml としても生菌数の減少度は plateau となるので、紫外線のみで試料溶液 1 ml 中の生菌数を 10 以下とすることは至難であることが判る。

よって、トロンビン溶液に対する紫外線照射量は最高 1.5 joule/ml で充分であり、それ以上の照射は無意味といえる。

II. BPL 法によるトロンビン単位の変化と殺菌効果

BPL の最終濃度を 11 当たり 500 mg 間隔で $0 \sim 3,000$ mg を試料溶液に加え、所定通り反応させたのちのトロンビン単位と *A. aerogenes* の生菌数を調べ、表 2 の成績を得た。なお参考までに反応液の pH を測定した。

須山はフィブリノーゲン溶液の場合、*A. aerogenes* (初期 1.7×10^6 /ml) が 1 ml 中 10 以下となる BPL 添加濃度は $800 \sim 1,000$ mg/l としているが、ここに得

表1 紫外線照射が Thrombin 単位と *A. aerogenes* の生菌数に及ぼす影響

紫外線照射 線量 (j-cule/ml)	Thrombin 単位		<i>A. aerogenes</i> 生菌数(個/ml)			
	(単位/ml)	残存率(%)	プレート 1	No. 2	No. 3	平均
0	424	100	$\times 10^6$ 12	5	8'	7.8
0.5	434	102.2	$\times 10^4$ 1	6	7	3.4
1.0	440	103.8	$\times 10^2$ 6	3	1	2.6
1.5	414	97.6	$\times 10$ 2	4	8	4.0
2.0	392	92.4	$\times 10$ 4	1	17	4.1
2.5	376	88.6	$\times 10$ 2	3	9	3.8

表2 BPL 処理が Thrombin 単位と *A. aerogenes* 生菌数に及ぼす影響

* BPL 終濃度 (mg/l)	pH	Thrombin 単位		<i>A. aerogenes</i> 生菌数(個/ml)			
		(単位/ml)	残存率 (%)	プレート 1	No. 2	No. 3	平均
0	6.7	424	100	$\times 10^6$ 3	3	8	4.2
500	6.3	402	94.7	$\times 10^4$ 2	7	5	4.1
1,000	5.9	362	85.3	$\times 10^2$ 2	2	1	1.6
1,500	5.7	280	66.0	13	5	4	6.4
2,000	5.1	196	46.2	0	0	0	0
2,500	4.9	0	0	0	0	0	0
3,000	4.8	0	0	0	0	0	0

*反応液：試料溶液 10ml+BPL 液 0.1ml

られた成績はそれよりも多量のBPLを必要とし、少なくとも、1,500mg/lを必要とする。

このとき、トロンビン単位は初期単位の66%と著減する。トロンビンは比較的その安定pH領域が広いので(Seegers²¹⁾によればpH4.8~10と言われている)、ここに認められたトロンビン単位の低下は反応

液のpH低下によるものでなくBPL自体の影響によるものと思われる。

表2の成績からトロンビン単位の低下を考慮するとき、1,000~1,500mg/lのBPL添加が限度であろうと思われる。

Ⅲ. 紫外線とBPL併用法によるトロンビン単位の変化と殺菌効果

試料溶液を1,500mg/l以下の濃度で25°C, 5時間放置のBPL処理をしたのち, 引続き1.5 joule/mlの線量で紫外線照射を行ない, この処理溶液につき、ロンビン単位と A. aerogenes 生菌数を測定した結果は表3のとおりであった。

表3の成績から判るように, BPLと紫外線の併用は A. aerogenes 生菌の殺滅化に極めて効果的に作用し(図1), かつ紫外線照射は, あらかじめBPL処理を受けたトロンビン単位の低下を加速しない(図2)。

BPL500mg/l(あるいはまた750mg/l)添加と紫外

線照射 1.5 joule/ml の条件で所期の目的が達せられる。

考 察

紫外線照射には通常連続流下式の回転照射装置が使用されるが, この装置は大量の試料溶液を必要とするので, 本報告では使用しなかった。

紫外線照射の効果は, 米国NIHの紫外線照射基準に述べられている通り, 要は照射を受ける試料液の蛋白変性を引き起こすことなく, かつ試料溶液に充分量加えられた指標菌の殺菌が行なわれればよい訳であるから, 紫外線照射条件の設定のためには本報告で使用した装

図1. BPL 処理と BPL・紫外線併用処理における A. aerogenes の殺菌効果比較

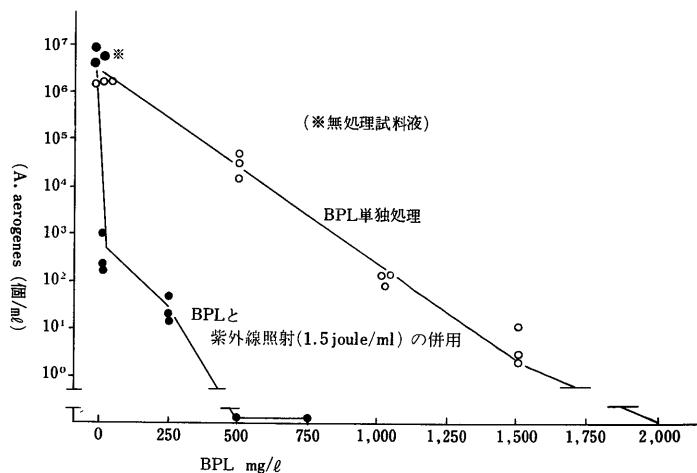


図2. BPL 処理と BPL・紫外線併用処理における Thrombin 力価の変動比較

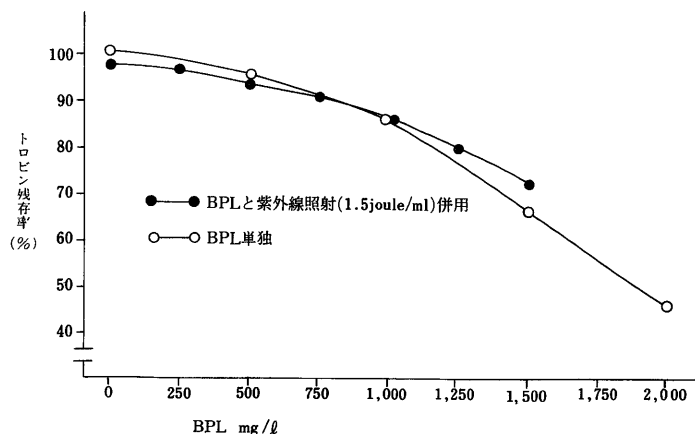
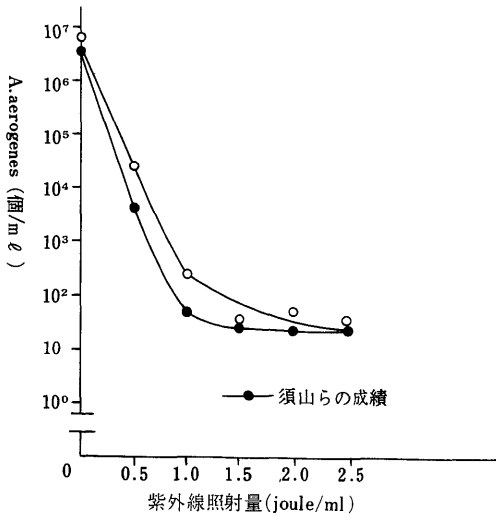


表3 BPL 処理後紫外線照射したときの Thrombin 単位と A. aerogenes 生菌数の変化

処 理 条 件		Thrombin 単位		A. aerogenes 生菌数(個/ml)			
BPL 濃度 ml/ℓ	紫 外 線 照 射 線 量 (joule/ml)	(単位/ml)	残 存 率 (%)	プレート 1	No. 2	3	平 均
0	0	424	100	×10 ⁶ 2	10	7	5.2
0	1.5	416	98.2	×10 ² 4	3	13	5.4
250	1.5	410	96.6	×10 ³ 3	4	7	4.4
500	1.5	398	93.7	0	0	0	0
750	1.5	386	91.0	0	0	0	0
1,000	1.5	362	85.3	0	0	0	0
1,250	1.5	332	78.3	0	0	0	0
1,500	1.5	306	72.1	0	0	0	0

図3. 紫外線照射による A. aerogenes の殺菌効果
— 須山らの成績を含む —



置で充分である。

本報告では試料溶液の蛋白変性の程度をトロンビン単位の減衰度で求め、殺菌効果はNIH基準が規定する通り、試料溶液に加えられた A. aerogenes (10⁶~10⁷/ml) が 10/ml 以下となることで求めた。本報告における紫外線効果について見ると、紫外線のある程度までの照射量は、効果の指標として試料溶液に加えた

A. aerogenes の生菌数を減少せしめるけれども、ある照射量をこえると、もはやそれ以上の殺菌効果は顕われなかった。この成績は須山の報告と一致する(表1および図3)。

BPLの単独処理は LoGrippe らの報告するとおり、遠隔臨床成績からみて、ほぼ確実な肝炎ウイルス殺滅処理法と思われるが、少なくともトロンビンにこれを適用する場合、肝炎ウイルス殺滅に充分なる処理条件ではトロンビンの失活が著しい(表2)。

BPL単独処理の欠点を補うために、トロンビンの単位がある程度保持される条件でのBPL処理に引続いて紫外線を照射することは、紫外線がほとんどトロンビンに悪い影響を与えないから、極めて好都合な方法といえる。

本実験で設定された条件、すなわちBPLを500~750 mg/l添加して、25°Cで5時間放置したのち、さらに1.5 joule/mlの紫外線を照射する方法は、須山らがフィブリノーゲンに適用して、その遠隔臨床成績で肝炎発生の報告を受けていないという条件(BPL 400mg/l, 25°C, 5時間放置後1 joule/mlの紫外線照射)に比べてより厳しいものであるから、その効果も確実であろうと推察される。

結 論

混合されたACD加入血漿より Cohn の冷エタノール法によって分画，精製されたヒト・トロンビン溶液に β -propiolactone を加えて，25°Cで5時間放置したのち，紫外線を照射し，混在するかも知れない肝炎ウイルス殺滅の尺度として，トロンビン溶液に加えた *A. aerogenes* の殺滅とトロンビンの血液凝固能を著しく低下せしめないことを期待し得る条件を検討した結果次の結論を得た。

1. BPLの添加濃度は500~750mg/lが良い。
2. 紫外線照射線量は1.5 joule/mlで充分である。
3. 上記の条件によるトロンビン単位の低下は10%以下であり，添加した *A. aerogenes* の生菌数は1 ml当り0~10個となる。

この条件は，すでにフィブリノーゲン製剤に適應されており，かつ，そのフィブリノーゲン製剤を使用した臨床例において肝炎発生の報告を受けていないと報告されている条件よりも，多少とも厳しいものである。

文 献

- 1) Allen, J. G., C. Sykes, D. M. Enerson, F. V. Moulder, R. M. Elghammer, B. J. Grossman, C. L. Mckeen & N. Galluzzi : J. A. M. A., 144, 1069 (1950).
- 2) Committee on Plasma and Plasma Substitutes of the Division of Medical Sciences, National Research Council (U. S. A.) : Transfusion, 8, 57~59 (1968).
- 3) 内藤良一・生垣 賢・越智三穂子・天野安之・若月 喬 : 細菌時報, 第12号, 1~6 (1953).
- 4) Oliphant, J. W. & Hollander, A. : Publ. Health Rep., 61, 598~602 (1946).
- 5) Habel, K. & Sockrider, B. T. : J. Immuno., 56 (3), 273~279 (1953).
- 6) Blanchard, M. C., Stokes, J. Jr., Hampil, B., Wade, G. R. & Spizen, J. : J. A. M. A., 138, 341 (1948).
- 7) 安東 清・石井慶蔵・藤崎次郎・岡 右之・入沢純開 : 細菌時報, 第19号, 1~11, 昭和28年3月.
- 8) National Institute of Health, Minimum Requirements : Normal Human Plasma, 8th revision, Jan. 15, 1951.
- 9) National Institute of Health, Minimum Requirements : Ultraviolet irradiation for the sterilization of biologic Products, 1st revision, Nov. 10, 1950.
- 10) 鳥居有人 : 医学のあゆみ, 71 (3), 126~128 (1969).
- 11) Wolf, A. M., Mason, J. Fitzpatrick, W. J., Schwarz, S. T. & Levinson, S. O. : J. A. M. A., 135, 476 (1947).
- 12) Rosenthal, N., Bassen, F. A. & Michael, S. R. : J. A. M. A., 144, 224 (1950).
- 13) Barnett, R. N., Fox, R. A. & Snavel, J. G. : J. A. M. A., 144, 226 (1950).
- 14) LoGrippe, G. A. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 83, 578~594 (1960).
- 15) 須山忠和・若月 喬 : 十全医会誌, 74 (2), 251~255 (1966).
- 16) Hink, J. H. & Johnson, F. F. : J. Am. Pharm. Assoc., 15 (10), 517~520 (1951).
- 17) Gellis, S. S., J. R. Neefe, J. Stokes, Jr., L. E. Strong, C. A. Janeway & G. Scatchard : J. Clin. Invest., 27, 239 (1943).
- 18) Nitschman, H., P. Kistler, H. R. Renfer, A. Hässig & A. Joss : Vox Sang., 1, 183 (1956).
- 19) Kistler, P. & Nitschman, Hs. : Vox Sang., 7, 414 (1962).
- 20) 東 堯・白石啓文 : 東芝レビュー, 11 (9), 1~9 (1956).
- 21) Walter H. Seegers : J. Biol. Chem., 136, 103~111 (1940). 1940.

Abstract

Human thrombin solution was subjected to test by combined treatments with β -propiolactone (BPL) and ultraviolet (UV) irradiation under several conditions in order to eliminate the risk of contamination by homologous serum hepatitis virus.

As a result of our studies, it was determined to be the best procedure, an addition of 500--750 mg of BPL per liter to the thrombin solution and incubation for 5 hours at 25 c followed by irradiation at 1.5 joule per ml.

It was proved that the procedure caused no significant decrease of thrombin potency and also the effectiveness of sterilization against *Aerobacter aerogenes* which had been inoculated into the thrombin solution as the antimicroorganismic control.