

ヒト・フィブリノーゲンに対するプロピオラクトン・ 紫外線併用処理に関する研究

金沢大学医学部第二病理学教室(主任: 石川大刀雄教授)

須 山 忠 和

若 月 喬

(昭和41年4月18日受付)

(本論文の要旨は、第14回日本輸血学会総会・東京、1966において発表した。)

人血漿標品中に実験的に浮遊させた各種ウイルスに対し、**beta-propiolactone (BPL)** と紫外線照射 (UV) との併用処理が、相乗的にウイルス不活化効果を示すことを、**LoGrippe**¹⁾ が明らかとし、この方法で処理した人血液を人体に使用して肝炎の発生を見ないという臨床遠隔成績の集積から、この2種の処理法が、肝炎ウイルス不活化にも極めて有効であるとの結論を得つつある²⁾³⁾。

人血漿に対するこの **BPL・UV** 併用処理は、単にウイルス不活化に有効であるだけでなく、血液諸成分の生理的性質をそこなわないこと、処理血漿を用いても毒性およびアレルギー反応を認めないこと、**toxic level** とウイルス不活化濃度との間に幅広いひらきのあること等の利点をもつことが明らかとされてきた^{1) 2)3)}。

しかし、フィブリノーゲンまたは第Ⅷ因子等に対する **BPL・UV** 併用処理の影響については、それらがかなり不安定な蛋白であるため、その蛋白変性ないし生理的活性に関して慎重に検討されつつある⁴⁾。

われわれは、精製単離されたフィブリノーゲン標品に対して **BPL・UV** 併用処理がおよぼす効果をしらべてきたが、現在肝炎ウイルスを **assay** するための適当な方法が確立されていないので、肝炎ウイルスに対する効果のモデル実験として米国 **NIH** より分与された **Aerobacter aerogenes** を用い、この対照生菌を必要かつ十分に減少させ、その上フィブリノーゲンの蛋白変性を最小限にとどめることを目的として実験を行ない、至適と考えられる処理条件を得たので以下に報告する。

実験材料および実験方法

1. フィブリノーゲン溶液:

ヒトフィブリノーゲン凍結乾燥製剤 (ミドリ十字 **K・K** 製) を注射用蒸留水で溶解濾過し、その溶液 50 ml 中 1 g の割合で凝固性蛋白を含むように調製する。

凝固性蛋白の測定には、フィブリノーゲン溶液を **pH 7.2** の食塩加磷酸緩衝液で適当に希釈した後、これにトロンビンおよびカルシウムの充分量を加え、生じたフィブリンの凝塊を食塩加磷酸緩衝液 (**pH 7.2**) で充分洗った後、**Kjeldahl** 法で窒素量を求めた。これに **6.0** を乗じたものを凝固性蛋白質量とした。

2. ベータ・プロピオラクトン (BPL):

使用まで **-28°C** 以下の冷室に保存する。市販品 (八洲化学製) を用いた。

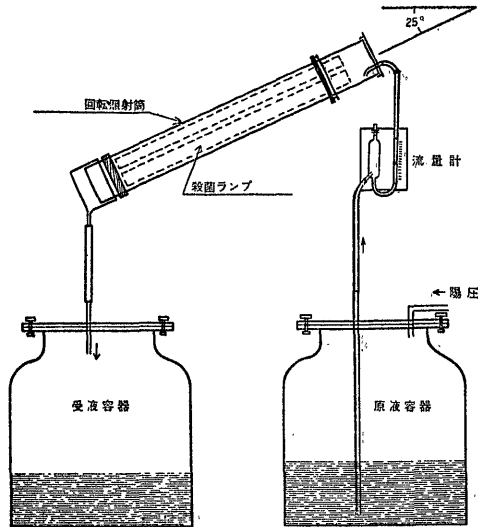
3. 紫外線 (UV) 照射:

照射装置は東芝製を使用した。図1にその概観を示した如く、長さ 40 cm の2本の殺菌ランプを保持する回転照射筒 (有効内表面積 **754 cm²**) が、水平面に対し **25°C** の傾斜角度で装置されており、流量計を通った被照射液が、回転照射筒内面へその上部より一定の噴出圧で流入する。**350 r.p.m.** で長軸のまわりに回転する回転照射筒の遠心力で溶液は筒内面に薄膜となり、殺菌ランプからの紫外線 (**2537 Å**) の照射を受け、回転しながら流下し筒の下端より流出する。この際の流量は流量計で読みとられる。

照射強度は、紫外線出力測定器 (東芝製) のメーターの読み (マイクロアンペア) と溶液の流量とから、フ

Human Fibrinogen Treated with Combined Beta-Propiolactone and Ultraviolet Irradiation Monitored with Aerobacter Aerogenes. **Tadakazu Suyama & Takashi Wakatsuki**, Department of Paththology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

図1: 紫外線照射装置



イブリンノーゲン溶液 1 ml に与えられる紫外線照射エネルギー (joules/ml) として算出される。

上記の装置で、噴出圧 27 cmHg、流量 250~300 ml/min の場合、照射エネルギーは 1 joule/ml となり、流量をかえることにより、目的の照射エネルギーを与えることができる。

4. *Aerobacter aerogenes*:

現在、肝炎ウイルスの assay 法が確立していないので、BPL・UV 併用のこの実験では米国 NIH の紫外線照射基準⁵⁾において対照生菌と定められている *Aerobacter aerogenes* を使用することとした。

NIH の Laboratory of Biologics Control よりこの目的のために Reference culture として分与された *A. aerogenes* を、斜面寒天培地に 32°C 18時間培養する。その 1 白金耳を脳・心臓浸出液培地 10 ml に移植、32°C 20時間培養を 2 回繰返す。この 2 代継代培養菌液を 10 倍希釈し、フィブリンノーゲン溶液 100 ml に対しこの希釈菌液を 1 ml の割合に混合した場合、*A. aerogenes* の 2~5×10⁶個/ml を含む対照生菌液となる。

なお菌数計算には生菌液を 10 倍段階希釈し、その 1 ml をとって寒天平板混濁培養法により発育集落数をしらべる。

5. BPL および UV 処理方法:

A. aerogenes の 2~5×10⁶個/ml を浮遊させたフィブリンノーゲン溶液に、100 mg/l ~ 5,000 mg/l の各種濃度の BPL を加え、24°C 5 時間保つた後、UV 照射を行なう。照射エネルギーとしては 0.6 joule/ml から 2.0 joules/ml までの各種強度を照射する。

実験は次の 4 段階に分けて行なつた。

(1) *A. aerogenes* を加えないフィブリンノーゲン溶液に対する BPL 単独処理。

(2) *A. aerogenes* を加えたフィブリンノーゲン溶液に対する BPL 単独処理。

(3) *A. aerogenes* を加えたフィブリンノーゲン溶液に対する UV 単独処理。

(4) *A. aerogenes* を加えたフィブリンノーゲン溶液に対する BPL・UV 併用処理。

処理効果はそれぞれの処理前後におけるフィブリンノーゲンの凝固性蛋白損失の程度および *A. aerogenes* の生菌数を比較することにより判定した。

対照生菌 *A. aerogenes* に対する殺菌効果は、フィブリンノーゲン溶液中の 2~5×10⁶個/ml の対照生菌を 10 個/ml 以下に減少せしめること⁵⁾を以て併用処理のための充分条件とした。

実験結果

1. BPL 単独処理による蛋白変性の有無:

菌を浮遊しないフィブリンノーゲン溶液に BPL を種々の濃度に添加し、24°C 5 時間保つた後、フィブリンノーゲンの凝固性蛋白におよぼす影響をしらべた結果は表 1 に示した。これから明らかなように、BPL 1,000 mg/l 以下の濃度では凝固性蛋白の損失は比較的少なかったが、BPL 2,000 mg/l 以上の濃度では変性が著しく、5,000 mg/l 以上では殆んど完全にフィブリンノーゲンは変性を受けているようであった。

2. BPL 単独処理の殺菌効果:

フィブリンノーゲン溶液に対照生菌として *A. aerogenes* を 2~5×10⁶ 個/ml の割合に混合、これに B

表 1 BPL のフィブリンノーゲン凝固性蛋白に及ぼす影響

BPL 終濃度 (mg/l)	24°C 5 時間放置後の pH	凝固性蛋白*	
		(g/50ml)	(% Recovery)
0	7.03	1.00	100
200	6.88	0.95	95
400	6.75	0.94	94
600	6.63	0.91	91
1,000	6.57	0.81	81
2,000	6.26	0.38	38
3,000	6.08	0.11	11
4,000	5.89	0.016	1.6
5,000	5.72	0.001	0.1

* フィブリンノーゲン変性の程度を凝固性蛋白の損失により判定した。

PL を種々の濃度に添加し、24°C 5時間放置後、フィブリノーゲン溶液中の生残菌数をしらべた結果は図2に示した。この実験では、BPL は蛋白変性の比較的少ない 1,000 mg/l 以下の階段的希釈濃度を横軸にとり、縦軸に生残菌数の対数をとつてプロットしたが、図から明らかなようにほぼ直線関係を示した。すなわち BPL 濃度が増加するに従つて殺菌効果は大となり、1,000 mg/l では生菌残数が 0~1、それ以上の濃度では完全殺菌をうかがわしめる結果を得た。

3. UV 単独処理による殺菌効果:

A. aerogenes を $2\sim5\times 10^6$ 個/ml の割合に浮遊させたフィブリノーゲン溶液に種々の強度の紫外線照射を行なつた成績は図3のようで、UV の各種強度に対して生残菌数の対数をプロットした場合、照射エネルギーが 1.0 joule/ml までは大凡直線関係を示して溶液中の生残菌数が減少し、1.0 joule/ml では平均して

$2\sim3\times 10^1$ 個/ml にまで減少するが、それ以上の照射エネルギーを与えても殺菌効果は増大しないようであつた。

4. BPL・UV 併用処理効果:

BPL および UV のそれぞれの単独処理では、添加する BPL 濃度が 1,000 mg/l 以下では蛋白変性が少なく、且つこの濃度で対照生菌の生菌数はほぼ 0 になり、また UV 照射エネルギーが 1 joule/ml において最も有効な殺菌効果のあることも以上の実験よりわかつた。そこで BPL・UV の併用処理の実験では対照生菌を $2\sim5\times 10^6$ 個/ml に浮遊させたフィブリノーゲン溶液に BPL を 200 mg/l, 400 mg/l, 600 mg/l, 800 mg/l の濃度に添加、24°C 5時間放置後、1 joule/ml の UV 照射を行ない、生残菌数の減少程度をしらべた。結果は表2および図4に示すようで、BPL

図2 フィブリノーゲン溶液に浮遊させた A. aerogenes に対する BPL の殺菌効果

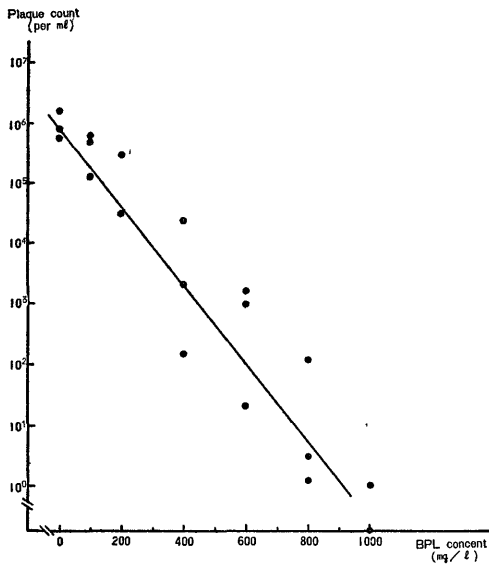


図3 フィブリノーゲン溶液に浮遊させた A. aerogenes に対する紫外線照射の殺菌効果

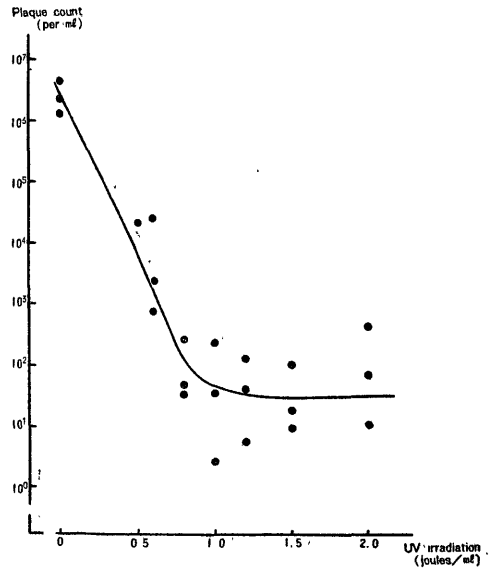
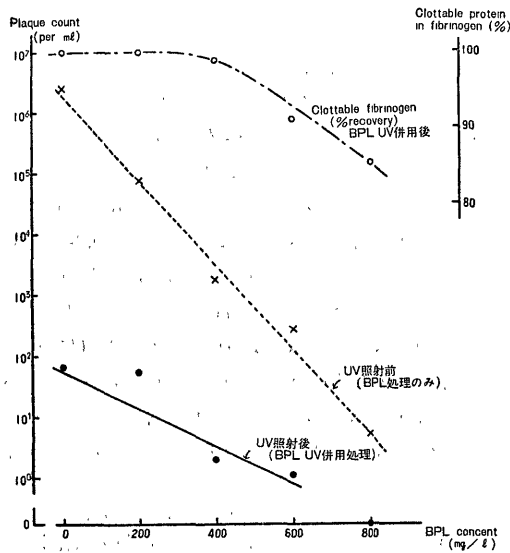


表2 フィブリノーゲンの BPL・UV 併用処理効果 (monitored with Aerobacter aerogenes)

BPL 終濃度 (mg/l)	UV 照射 (joules/ml)	フィブリノーゲンの凝固性蛋白 (%Recovery)		フィブリノーゲン中の残存生菌数 (plaque/ml)	
		UV 照射前 (BPL のみ)	UV 照射後 (BPL+UV)	UV 照射前 (BPL のみ)	UV 照射後 (BPL+UV)
0	0.1	100		1.7×10^6	
0	1	100	99.8	2.3×10^6	7.2×10^1
200	1	99.6	100.2	9.8×10^4	7×10^1
400	1	99.0	98.8	1.3×10^3	2
600	1	94.2	91.0	3.6×10^2	1
800	1	88.2	85.2	7	0

図4 A. aerogenes を浮遊させたフィブリノーゲン溶液に対する BPL・UV 併用処理



処理を行なった後 UV 照射をまだ行なわない前の凝固性蛋白量および残存生菌数をもしらべ、BPL・UV 併用処理後のそれらと比較した。

これらの結果から明らかなように、BPL の各濃度において、UV 照射との併用殺菌効果がみられたが、特に BPL 400 mg/l またはそれ以上における UV との併用において生残菌数を 10^1 個/ml 以下に減少せしめることができた。さらに BPL 400 mg/l ~ 600 mg/l における UV との併用は、フィブリノーゲンの変性も比較的少なく、凝固性蛋白の損失は 10% あるいはそれ以下にすぎなかつた。

総 括

BPL と紫外線との併用処理が、人血漿製剤中の細菌またはウイルスの不活化に相乗的な効果をもたらすことを LoGrip¹⁾ は実験的に明らかとしたが、臨床遠隔成績からこの処理が肝炎ウイルス不活化にも著効のあることがわかつてきた²⁾³⁾。

われわれは、ヒト・フィブリノーゲン製剤について BPL・UV 併用処理効果を検討するため、この monitoring system の対照生菌として A. aerogenes を用いた。フィブリノーゲン溶液にこの対照生菌を $2 \sim 5 \times 10^6$ 個/ml の割合に浮遊させた後、各種濃度の BPL を添加、 24°C 5 時間放置後、UV 照射を行なった結果、凝固性蛋白を示標とする蛋白変性が少なく、その上対照生菌に対する不活化～殺菌効果もまた充分大きな BPL・UV 併用処理条件を求めることができた。

まず、BPL の水解温度条件であるが、BPL による

細菌またはウイルスの不活化は、BPL が純粋な状態においてラクトン型の安定な形をとっているが、水溶液中では不安定で水解されやすいという性質に基づいている。それ故フィブリノーゲン溶液中で BPL の水解されることが必須であろう。ところがフィブリノーゲンは 20°C 以下では溶解性が悪く、 32°C 以上では変性をおこしやすいといわれているので、われわれは添加した BPL の水解条件として 24°C 5 時間の条件を選んだ。血漿中では、水解による BPL の半減期が 37°C で 24~32 分、 4°C で 16~20 時間であり、ウイルス不活化は 37°C で 15 分、 4°C で 8 時間と報告されているので、われわれの行なつた 24°C 5 時間の処理条件はほぼ妥当と考えられる。

BPL の蛋白変性におよぼす影響については、1,000 mg/l 以下において凝固性蛋白の損失が比較的少なかつたが、一方、血漿成分ことにフィブリノーゲンの変性は pH にかなりの程度依存しているから²⁾、 24°C 5 時間放置の際の pH を 6.6~7.0 に保つことが必要条件として考慮されるべきであろう (表 1 参照)。

殺菌効果の判定のため、対照生菌として、A. aerogenes を $2 \sim 5 \times 10^6$ 個/ml の割合にフィブリノーゲン溶液に浮遊させたが、BPL・UV 併用処理後、生残菌数を 10^1 個/ml 以下に減少させる条件を以て充分条件とした。これは人血漿の紫外線処理による殺菌のために認められている条件であり⁵⁾、フィブリノーゲンの併用処理においてもこれを一応の判定のめやすとした。

勿論、肝炎ウイルス不活化に関しては、充分な臨床遠隔成績を以て判定する必要がある。少数例ではあるが、われわれの BPL・UV 併用至適条件で処理されたフィブリノーゲンを臨床使用して、今までのところ肝炎発生は報告されていない。今後とも臨床データの集積が望まれるところである。

結 論

精製単離されたヒト・フィブリノーゲン製剤に対する beta-propiolactone 処理と紫外線照射の併用処理効果を、monitoring system として Aerobacter aerogenes を用い検討した。

フィブリノーゲン溶液に対照生菌を浮遊させ、各種濃度の beta-propiolactone を添加、 24°C 5 時間放置後紫外線照射を行なった結果、凝固性蛋白を示標とする蛋白変性を最少限にとどめ、その上対照生菌に対する不活化～殺菌効果も必要且つ十分に大きい併用処理条件を求めることができた。

この propiolactone・紫外線併用至適条件で処理

されたフィブリノーゲンを使用した臨床症例については、現在までのところ、肝炎発生の報告を受けていない。

稿を終るに当り御指導を頂いた恩師石川大刀雄教授、倉田自章助教授に感謝します。

文 献

1) **LoGrippto, G. A.** : Ann. N.Y. Acad. Sci., 83, 578 (1960).
 2) **LoGrippto, G. A.** : Proc. 8th Congr. Int. Soc. Blood. Transf.,

Tokyo. 504~509 (1962).
 3) **LoGrippto, G. A.** : J. Am. Med. Assoc., 187, 722 (1964).
 4) **Sgouris, J. T., Brackenbury, D., Hyndman, L. A. & Anderson, H. D.** : Vox Sang., 8, 105 (1963).
 5) **National Institutes of Health. Minimum requirements** : Ultraviolet irradiation for the sterilization of biologic products. U.S.A., Nov. 10 (1950).

A b s t r a c t

Human fibrinogen preparation seeded with *Aerobacter aerogenes* was irradiated with various ultraviolet intensity after treatment with various concentration of beta-propiolactone (BPL) for 5 hours at 24°C.

Results showed that the viable organisms in the fibrinogen solution were markedly reduced in number without any appreciable loss of clottable fibrinogen under the condition of suitable BPL concentration and UV intensity. Recommended combination of BPL concentration and UV intensity was determined for efficient sterilization of fibrinogen preparation.

Although the fibrinogen treated with this recommended condition has been administered to volunteers, any incidence of clinical hepatitis have not been reported so far. Human clinical trial should be continued to obtain more exact and reliable follow-up results.