

厚生労働行政推進調査事業費補助金研究報告書
 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
 分担研究報告書

フィブリノゲン投与による C 型肝炎感染、及び製法からみた感染リスクの研究
 研究分担者 岡田 義昭 埼玉医科大学 医学部 准教授

研究要旨：昨年度の論文調査等から製造方法と C 型肝炎ウイルス感染リスクは、関連していることが示唆された。β-プロピオラクトン (BPL) 処理が行われなくなった後に感染者が増加していることから BPL のウイルス不活化効果を実験的に確認した。メーカーで実施されていた不活化実験の条件で実験したが、HCV のモデルウイルスとして使用されている牛下痢症ウイルスに対し、2 回の実験で平均 4.3×10^3 以上不活化されることが示された。実際の工程では粗精製の段階で BPL 処理が行われているが我々は最終製品を用いて検討しており、最終製剤の方がより不活化効果を得やすい可能性もあるが、BPL 処理によって完全ではないにしろ HCV を不活化していたことが示唆された。

A. 研究目的

フィブリノゲン投与による C 型肝炎感染者の救済のために保存されているカルテ等の調査が実施されているが、膨大なカルテ等から効率良く探すための方法が検討されている。昨年度の研究によってフィブリノゲン製剤の製法は年代によって 4 つ分けられる。1985 年 8 月までは β-プロピオラクトン (以下 BPL)/紫外線照射処理 (第 1 期)、1985 年 8 月から 1987 年 2 月までは紫外線照射と抗 HBs 免疫グロブリンの添加による製造 (第 2 期)、1987 年 3 月から 1994 年 6 月までは 60 度 96 時間の乾燥加熱処理 (第 3 期)、1994 年 9 月以降は乾燥加熱と界面活性剤によるウイルス不活化処理が導入されている (第 4 期)。それぞれの製法による製造方法と製造企業が保存していた肝炎の副作用件数を比較すると製造本数あたりの肝炎関連の頻度 (輸血有りや不明を除く) は第 1 期 : 1 例/24.5 万本、第 2 期 : 1 例/5.6 千本、第 3 期 : 1 例/2.4 千本と製法によって C 型肝炎ウイルス (以下 HCV) に感染するリスクが異なる可能性が明らかとなった。なお第 4 期は界面活性剤による

ウイルス不活化が導入されており HCV の感染は理論的に極めて起こり難いので除外した。更に文献調査によって BPL 処理は、3 ~ 4 Log 程度 C 型肝炎ウイルス (以下 HCV) を不活化できることや血液凝固因子製剤の乾燥加熱処理の実例から加熱温度によっては HCV を完全に不活化できないことも明らかになった。以上の結果から今年度は実際に BPL 処理によってどの程度ウイルスの不活化が可能であったか実験的に評価することにした。

B. 研究方法

1. 牛下痢症ウイルスの感染価測定法

牛下痢症ウイルス (Bovine viral diarrhea Virus: BVDV) の感染価は MDBK 細胞株を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに 5×10^4 /well 蒔いた。BPL 処理されたフィブリノゲン製剤は、10 倍ずつの 10 の各々独立した希釈系列を作成し、100 μL ずつ MDBK 細胞に感染させた。感染 7 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って TCID₅₀ を求めた。

2. BVDV を添加したフィブリノゲン製剤の BPL 処理法

製造メーカーが実際に実施していたフィブリノゲン製剤の BPL 処理によるウイルス不活化の評価実験に忠実に従って不活化効果を評価した。フィブリノゲン製剤は添付されている溶解液を 37 度に加温して 50 mL に溶解し、12 mL に分注した。0.5 mL の BVDV 液を添加してよく混ぜ 0.5 mL を採取した（処理前検体）。次に製造法と同じ濃度になるように BPL を添加し、よく混合して 0.5 mL を採取、直ちに同量のチオ硫酸ナトリウムを添加し BPL の活性を止めた。BPL を添加されたフィブリノゲン液は、pH が酸性に傾くので 10 分毎に pH を測定し、必要に応じてクエン酸バッファーにて pH を製法と同等の範囲に保った。また、室温で緩やかに攪拌しながら添加 1 時間後に検体を 0.5 mL サンプルングして直ちに同量のチオ硫酸を加えた（1 時間後検体）。残りのフィブリノゲン液は、23 度に設定した恒温槽の中で更に 5 時間反応させた（6 時間後検体）。その間の pH は調整しなかった。

C. 研究結果

独立して 2 回の BPL によるフィブリノゲン液中における BVDV の不活化実験を行った。2 回の実験とも 1 時間後、6 時間後の検体からウイルスは検出されなかった。細胞毒性を考慮してウイルスの検出は 10 倍以上に希釈したもので評価した。原液で全てのウエルからウイルスが検出されたと仮定して計算するとそれぞれ 5.9×10^3 、 2.6×10^3 以上不活化されたことになった（表 1）。

D. 考察

昨年度の文献検索やフィブリノゲン製剤による HCV 感染報告件数から感染リスクは製法に依存していることが明らかとなった。BPL 処理が出

来なくなり製法を変えた後から感染者数が増加していたことから BPL が HCV を不活化している可能性が推定されていた。当時の文献では血漿を 0.3% の BPL で処理することでウイルスの不活化効果が報告されていた。更に WHO の報告書にも同様の記載があり、ウイルスの不活化法として期待されていたが推定できる。具体的にどの程度の不活化効果があったのかは、評価に用いたウイルスの種類が異なっていたり、BPL の濃度が異なっている可能性もあり文献からは推定は不可能である。そこで今年度は、フィブリノゲンを製造した企業が自社で評価した際の詳細な不活化の評価方法を提供していただき本研究班でも評価することになった。最終的には HCV を用いて評価する予定であるがその前段階として BVDV について不活化の評価を行った。結果は、企業が提示した不活化効果よりも高い不活化活性が認められた。原因として企業では実際に BPL 処理が行われる分画を用いていたが、我々は最終製剤のフィブリノゲンをを用いた点が考えられる。Sindbis ウイルスを用いて他の血液製剤の BPL による不活化効果も検討したが、その製剤では 6 時間後でもウイルスが検出され reduction rate は 3 log であった。それに対しフィブリノゲンでは 5 Log 以上でありフィブリノゲン製剤の方がより不活化されやすい可能性が示唆された。また、ウイルス種によっても不活化法に対する感受性が異なることから来年度は HCV を用いて不活化を評価する予定である。

E. 結論

BVDV は HCV のモデルウイルスとして使用されていることから BPL 処理はフィブリノゲン製剤中の HCV をある程度不活化出来たと推定される。そのことは製造方法によって HCV に感染したリスクが異なっていたことと一致している。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：赤血球製剤の病原体不活化法の開発、第 68 回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020 年
- 2) 山麻衣子、鈴木雅之、加藤由佳、

内野富子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：

幼少期に自己免疫疾患を発症し、増悪寛解を繰り返すうちに自己抗体の特異性が変化した一症例、第 68 回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 BPLによる牛下痢症ウイルスの不活化

	Exp. 1	Exp.2
添加前	3.5×10^5	4.2×10^5
0時間	1.9×10^5	8.3×10^4
1時間	N.D.	N.D.
6時間	N.D.	N.D.
Reduction Rate	$5.9 \times 10^3 >$	$2.6 \times 10^3 >$

N. D. : Not Detecte