「繊維技術を用いた分離技術」特集

セルロース中空糸膜によるウイルス分離

横 木 正 信

1. プラノバとは

プラノバ(Planova)とは旭化成のウイルス除去用フィルターであり、当社の70年間の銅アンモニア再生セルロース事業における最新の成果である(正確には「プラノバ」は製品としてのフィルターを指し、中空糸膜自体は従来から、BMM(Bemberg Microporous Membrane)と呼んでいるが、本稿においては、特に区別しない)。プラノバは1987年から、血漿分画製剤およびバイオ医薬品などの生物由来医薬品の製造プロセスにおけるウイルス除去フィルターとして内外の製剤メーカー20数社に使用されている。

2. 生物由来医薬品のウイルス安全性

2.1 ウイルス安全性に関する関心の高まり

1980年代中頃、血友病患者が、投与された血液凝固因子製剤によって、AIDSに感染するという不幸な事件が社会問題となったことを契機に、血漿分画製剤やバイオ医薬品などの生物由来医薬品の感染性ウイルス対策が大きな関心事となっている。

現在、免疫グロブリンや血液凝固因子などの血漿分画製剤を経由するウイルス感染防御の観点から、除去・不活化すべきライオリティーの高いウイルスはHIV, HCV, HBV, HAVおよびParvovirusであるとされている。

2.2 規制当局の動き

ヨーロッパ共同体(EU15ヶ国)は、血漿分画製剤のウイルス安全性ガイドライン作成にいち早く取り組み、1996年にCPMPガイドライン(CPMP/269/95: Medicinal

Products Derived from Human Plasma, revised 1996)を公布し、製造工程に少なくとも2つ以上の互いに作用機序の異なるウイルス除去・不活化法を導入すること、それらが実製造において広範囲のウイルスに効果的であることをバリデーションするよう義務づけた。一方、遺伝子組み換えや細胞融合により動物細胞培養で製造される医薬品の安全性に関しても、ICH(International Conference on Harmonization)が、日米欧3極共通の認識に基づくガイドライン作成を検討し、1997年に“Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products”が基本的なガイドラインとして採択され、各国のウイルス安全規制の再編を促すことになった。

2.3 各種のウイルス除去・不活化法

生物由来医薬品の製造工程に導入されるウイルス除去・不活化の方法は、目的物となる生理活性物質(通常はタンパク質)の変性・失活を起こさずに、対象とするウイルスを選択的に排除又は死滅させる方法でなければならない。これらの方法には現在、低pH処理、加熱処理、S/D(Solvent/Detergent)処理、および膜ろ過法が推奨されており、上記ガイドラインには強力(Robust)なウイルス除去・不活化ステップとして位置づけられている。しかし、これらの方法がそれぞれ単独で広範囲のウイルスに対して有効であるということではない。例えば、加熱法は耐熱性の小型ウイルスであるHAVやParvovirusに対する不活化は不完全であり、S/D法では脂質膜を持たないウイルス、例えばSV40, Reovirus3, PoliovirusおよびParvovirusなどに対して、ほとんど効果がない。前述のウイルス安全性ガイドラインが示すように、いくつかの除去・不活

Virus Separation by Cellulose Hollow Fiber Membrane

著者紹介 MASANOBU YOKOGI

Planova Division, Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

旭化成工業株式会社プラノバ事業推進部 技術グループ参事

著者は、化学工学を専門とされている。趣味は、宇宙論、パソコンとのこと。

本稿では、伝統ある銅アンモニア再生セルロース技術が最新のウイルス分離用途に活かされていること、ウイルス安全性に対する極めて高度の要求に応えるための膜構造とろ過原理、生物由来医薬品フィールドの安全についてのコモンセンスについて解説していただいた。

化法の組み合わせによって目標の性能をクリアーしなければならない。

2.4 膜ろ過によるウイルス除去

膜ろ過がウイルス除去法として工業的に実用化された歴史は新しいが、その背景にはウイルスろ過に適合する膜構造の発見とそれを実現する製膜技術の開発がある。膜ろ過法の大きな特徴は、他のウイルス不活化法とは異なり、粒子のサイズにより除去対象物質であるウイルス(大きな粒子)を膜により捕捉・除去し、一方、目的物としてのタンパク質などの生理活性物質(小さな粒子)を透過させるメカニズム(size exclusion原理)にあり、ウイルスの化学的または物理化学的な性質の違いにはほとんど左右されないことである¹⁾。さらに、膜ろ過法は他のウイルス不活化法とは異なり、目的物である生理活性物質を変性させる作用は極めて低い。

3. 膜ろ過によるウイルス分離(除去)の特徴

3.1 阻止対象物質と透過対象物質の粒子サイズ差

タンパク質とウイルスというサイズ差があまり大きくない粒子同士をsize exclusionにより分離することは容易なことではない。すなわち、タンパク質溶液からバクテリアを除去する「除菌膜」に較べて、ウイルス除去膜の実用化が遅れた理由は、ほとんどの血漿タンパク質のサイズが数nm~10数nmであるのに対して、バクテリアは500nm以上、一方、ウイルスのサイズは20~200nmであるという事実によっている(図1)。

3.2 ウイルス阻止性能に対する高い要求レベル

患者を死に至らしめる可能性のあるHIVなどの感染性ウイルスを血漿分画製剤などから分離(除去)するというウイルス分離膜に課せられた任務は自ずからきわめて厳しいものである。特にそのウイルス阻止性能は対数表示(LRV: Logarithmic Removal Rate)で4~5以上という高度なレベルが要求される。LRVは、 $LRV = -\log(C_f/C_o)$ で表される。ここで、 C_o 、 C_f はそれぞれ阻止対象物質(ウイルス除去の場合はウイルス)の元液中およびろ液中の濃度を表している。 $LRV > 4$ とは元液中に10,000個いたウイルスがろ液中には1個以下しか存在しないことを意味している。

3.3 阻止性能と透過性能のバランス

ウイルス阻止性能に対する高度の要求は上述の通りであるが、一方で目的物(多くの場合タンパク質)を効率的に透過させる性能を併せ持たねばならないことはいうまでもない。透過性能は、元液中の目的物の何割がろ液中に得られたかを示す「透過率」、単位時間当たりのろ過量を意味する「ろ過速度」および回分ろ過操作において単位膜面積当たり、どれだけの量のろ過が行われたかを示

す「ろ過容量」などにより表現される。これらはいずれもプロセスの経済性に関わるパラメーターであり、ウイルス阻止性能と並んで、製剤メーカーにおいて膜ろ過法の採否を判断する上で重要なファクターとなっている。

4. プラノバの膜構造とろ過原理

4.1 膜ろ過によるウイルス除去の困難性

そもそも、高分子により構造形成がなされる分離膜においては孔径分布の発生が避けられず、また、阻止対象粒子および透過対象粒子のいずれについても粒径分布の存在が避けられないため、ろ過効果には確率的要素が包含されることになる。このことが阻止性と透過性の両立を困難にしている。ウイルスを膜ろ過により除去する場合には、上述したようにウイルスの大きさとタンパク質の大きさが比較的近いため、前者を阻止し、後者を透過させる(しかもいずれも高率で)という目標に関して二律背反性が高まる。また、この分野ではろ過元液が、ほとんどの場合、濃度の高いタンパク質溶液であるため、膜へのタンパク質の吸着による透過性能の低下が無視できない。これらの理由のため、長い間、膜ろ過によるウイルス除去は信頼感をもって語られなかった。旭化成はこれらの問題を解決するろ過原理とそれを担う膜素材および構造を持つプラノバを開発した。

4.2 異方性膜によるscreenろ過の問題点

水処理の分野などで多く用いられるいわゆる限外ろ過膜(UF膜)、精密ろ過膜(MF膜)もsize exclusion原理で分離を行っているが、そのほとんどが、膜表面の緻密で極めて薄いスキン層と、その下部に接する、力学的に膜構造を支える支持体としての疎な構造のボイド層(ヒトの指状をしているので「フィンガーボイド」と呼ばれることがある)からなっており、阻止すべき粒子はスキン層の外表面ないしは薄いスキン層自体により阻止される(図2-a)。このような膜を、異方性膜といい、ろ過形式をscreenろ過と呼ぶ。水処理のように阻止対象物質と透過対象物質のサイズに大きな差がある場合には異方性膜によるscreenろ過は有効であるが、そのサイズ差が小さい血漿分画製剤などのウイルス除去用途においてはスキン層の偶発的なキズ部をウイルスが透過すれば、そのままウイルスのリーク、製剤中へのコンタミネーションとなり、要求される高い安全性を保証できなくなる。また、元液に含まれるタンパク質の膜表面への吸着のため、せっかくスキン層を薄くしてろ過抵抗を小さくしていても、透過性が低下してしまう。

4.3 プラノバの膜構造とろ過原理

プラノバは厚み方向に段階的な構造の変化があるので、必ずしも「等方性」の膜とはいえないが、スキン層とフ

膜の形態	膜分離操作	孔径	対象粒子・分子
多孔膜	ろ過 [操作圧 kg/cm ²] [0.1~1]	100 μ m	花粉 (10~100 μ m) デンプン粒 (5~30 μ m) 白血球 (10~20 μ m)
		10 μ m	赤血球 (6~9 μ m) がん細胞
	精密濾過 (MF) [0.1~2]	1 μ m (1000nm)	ブドウ球菌 (0.8 μ m)
		0.5 μ m	チフス菌・コレラ菌 (0.6 μ m)
		0.2 μ m	マイコプラズマ (>0.3 μ m) ラテックスエマルジョン
		0.1 μ m (100nm)	ヘルペスウイルス (150~250nm) サイトメガロウイルス (120~150nm)
		50nm	HIV (80~110nm) インフルエンザウイルス (80nm)
		20nm	日本脳炎ウイルス (40~50nm) HBV (42nm) HCV (35nm) ポリオウイルス (25~30nm) バクテリオファージ (20~25nm)
	限外濾過 (UF) [0.5~10]	10nm	パイロジェン (~10nm) ヒトヘモグロビン (6×7×5nm) ヒトγ-グロブリン (5×24nm) ヒト血清アルブミン (3×15nm)
		1nm (10Å)	チトクロムC (2nm) ビタミンB ₁₂ ショ糖 (5×8×16Å)
非多孔膜	逆浸透 (RO) [20~100] 気体分離膜	5 Å	グルタミン酸 (5×8×16Å) Li ⁺ (5Å) Na ⁺ (4.3Å) H ₂ O (3.5Å) O ₂ (2.9Å) He (2.6Å) H ₂ (2.3Å)
		1 Å	

BMM

図1 膜と粒子径の関係

(a) skin-void 構造
(異方性膜 / PAN)

(b) capillary-void 構造
(Planova)

図2 異方性膜とPlanovaの膜構造比較 (SEM写真)

インガー状のボイド層に非連続的な差異がある多くのUF膜やMF膜と違い、基本的には厚み全体にわたって同様の構造が繰り返されており、「異方性の小さい膜」ということができる(図2-b)。また、そのろ過の形式も膜の厚み全体を使うdepthろ過である。プラノバの膜構造は細いキャピラリーと大きな空洞状のボイド部の3次元的ネットワークからなっている²⁾(図3)。空洞状のボイドにはそれに結合した複数のキャピラリーのうち、圧力傾斜上、上流に位置しているキャピラリーから、その径に応じた分離効果を受けて、粒子が流れ込み、ボイド中で混合され、圧力傾斜上、下流に位置するキャピラリーへと流出していく。このような操作が膜厚全体にわたって繰り返されるうちにウイルスとタンパク質のわずかのサイズ差による分離効果が拡大される³⁾。すなわち、簡単のために、プラノバの膜構造が厚み全体にわたって同様であると仮定し、前述のボイドとキャピラリーの組合せの基本単位(こ

れを便宜上、「1層」と呼ぶ)について、あるウイルスの透過率(P_v)が0.9、あるタンパク質の透過率(P_p)が0.999であるとし、かつ膜厚全体での基本単位の繰り返し数が150回(すなわち、150層)であるとして、膜全体でのウイルスの透過率($P_v(ov)$)とタンパク質の透過率($P_p(ov)$)計算すれば、

$$P_v(ov) = (0.9)^{150} = 1.37 \times 10^{-7}$$

$$P_p(ov) = (0.999)^{150} = 8.6 \times 10^{-1} = 0.86$$

となる。すなわち、上記の $P_v(ov)$ をLRVで表現すれば、

$$LRV = -\log(1.37 \times 10^{-7}) = 6.86$$

となり、これは元液中のウイルスがおよそ、 $1/(10^{6.86})$ 、すなわち、約1000万分の1に減少することを表す。一方、タンパク質に関してはその90%近くが膜を透過してくることを示している。

プラノバにおけるもう一つの特徴は素材として、タンパク質の吸着がきわめて少ないセルロースを選んだことにある。このために、タンパク質の透過率(回収率)を高く保つことができる⁴⁾。また、タンパク質の吸着の大きな合成高分子製の異方性膜では、膜表面へのタンパク質吸着を抑制するために常時元液側に循環をかけるtangential方式を取る必要があるが、プラノバでは元液側の循環を行わない簡単なdead end方式でも透過性能の低下が抑制できる。tangential方式では液循環のためにhold up量を多く取る必要があり、低溶液濃度での操作、ないしはろ過後の濃縮操作が必要となり、煩雑である。従って、dead endろ過が可能なのは、最終段階近くで、ウイルス除去操作が行われることの多いタンパク質製剤などの製造工程にプラノバが適している理由の一つとなっている。

図3 キャピラリー・ボイド構造概念図

5. プラノバの製法

プラノバは、血液透析器に広く用いられている銅アンモニア法によるセルロース透析膜と素材は同じだが、血液透析用の膜が基本的にタンパク質を透過させない緻密な構造を有しているの比して、プラノバはその用途上、分子量数万～数10万のタンパク質を透過させる構造でなければならない点が異なっている。プラノバは銅アンモニア法によりコットンリンターを溶解・調製したセルロース紡糸液を2重紡口から、水-アンモニア-アセトンの3成分系凝固液を満たしたU字管形状の紡糸筒(図4)中

図4 U字管紡糸筒

に押し出し、実質的に張力をかけずに巻き取るにより構造形成を行う⁵⁾。上述の特殊な3成分系の凝固液中でマイクロ相分離の原理により、発生したセルロース粒子をゆっくり成長させ、それらの結合により、4.で述べた細かいキャピラリーと大きな空洞状のポイド部からなる3次元ネットワークを完成させる。プラノバの特徴である優れたウイルス阻止性と有用タンパク質の高透過性のバランスの良さを実現するポイントが、この3成分系凝固液組成⁶⁾と独特のU字管による無張力紡糸にある。

6. 今後の展開

生物由来医薬品のウイルス安全規制が益々厳しくなり、製造工程のプロセスバリデーションが重要な管理項目となっている現状で、膜ろ過によるウイルス除去は技術的には未だ若い、除去と不活化という2つのメカニズムのうちの1翼を担う大きな存在になっている。

膜ろ過によるウイルス除去技術に課せられた当面の課題は、Parvovirusなどエンベロープをもたさない小型のウイルスを高率で除去し、かつ、グロブリンや血液凝固第VIII因子などの高分子量のタンパク質透過性を高く保つバランスの良い膜の開発である。この膜により、ウイルス除去の分野でのプラノバの適用領域が広まることが期待される。

文 献

- 1) T. Hirasaki et al., MEMBRANE, 20, 135 (1989).
- 2) 鶴見 隆ほか, 繊維学誌, 51, 386 (1995).
- 3) 佐藤 裕ほか, 組織培養, 21, 485 (1995).
- 4) 石川 元ほか, 化学と工業, 41, 535 (1988).
- 5) 鶴見, 高分子加工, 38, 331 (1989).
- 6) S. Manabe et al., Polym. J., 19, 391 (1987).

第112回 Chemical Abstracts利用法講習会

主 催: 化学情報協会

冊子体Chemical Abstracts(CA)の構成と効果的な調査方法を、多くの実例を挙げて説明し、実際の冊子体を使った実習も行います。あわせて、CD-ROM版のCA(CA on CD)についても、概要および使い方を説明します。普段図書館や研究室でCAをご利用の研究者、教官の方や司書の方に最適です。

日 時: 11月25日(木) 10時～16時

会 場: 中居ビル5F(東京都文京区本駒込6-25-4)

内 容: 1. Chemical Abstractsの構成 2. 冊子体各索引の特徴とその使い方

3. 冊子体Chemical Abstractsの調査方法 4. CA on CD(CD-ROM版CA)の概要と使い方

参加費: 一般12,000円, 大学職員・学生6,000円, 大学教官無料, 化学情報協会維持・賛助会員9,000円, いずれもテキスト代込・消費税別

参加申込締切: 定員(15名)になり次第締切

申込先: 〒113-0021 文京区本駒込6-25-4 中居ビル (社)化学情報協会 講習会係 電話: 03-5978-3621