ウイルス除去用中空糸 (BMM) の免疫 グロブリン製剤製造工程への応用

関口 定美¹⁾ 伊藤 碩侯¹⁾ 竹内 次雄¹⁾ 沓沢 久史¹⁾
太田 政一¹⁾ 石川 元²⁾ 鶴見 隆²⁾ 大沢 直樹²⁾
深田 誠司²⁾ 佐谷満州夫²⁾ 山敷 駿²⁾

1) 日本赤十字社血漿分画センター

2) 旭化成工業株式会社

(昭和63年8月26日受付)

APPLICABILITY OF THE HOLLOW FIBER FOR VIRUS REMOVAL (BMM) TO MANUFACTURING PROCESS OF GLOBULIN FROM POOLED PLASMA

Sadayoshi Sekiguchi¹⁾, Hiroyoshi Itoh¹⁾, Tsugio Takeuchi¹⁾, Hisashi Kutsuzawa¹⁾, Masaichi Ohta¹⁾,
Gen Ishikawa²⁾, Takashi Tsurumi²⁾, Naoki Ohsawa²⁾, Seiji Fukada²⁾,
Masuo Satani²⁾ and Takashi Yamashiki²⁾

1) Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

2) Asahi Chemical Ind. Co. Ltd.

The applicability of BMM to Cohn's fractionation process for manufacturing immunoglobulin preparation was investigated from the view point of filtration characteristics such as the values of filtration-capacity (FC), and of sieving-coefficient (SC) of protein, and of the change in electrophoretic pattern (EP) according to filtration.

The filtration conditions for the intermediate products was settled so as to fit the actual manufacturing conditions.

For the semifinal products, the dependences of FC, SC and EP on the filtration-temperature (FT), protein-concentration (PC) and the mean pore size of BMM ($2\bar{r}_f$) were evaluated.

The values of FC and SC increased when the intermediate products approached to the final one or $2\bar{r}_f$ increased or FT elevated or PC decreased.

We concluded that BMM was applicable for the liquid before dispensing into a bottle and for the supernatant-II-3.

序 言

免疫グロブリン製剤の製造工程では、通常加熱処理が実施されていない。これは Cohn の冷エタノール分画法で製造された製剤については、経験的に B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染の報告がなかったことに起因している。しかし近年、硫安法、リバノール硫安法、DEAE Sephadex 法等、種々の分画法により免疫グロブリン製剤が製造されるようになり、HBV、エイズウイルス (HIV) 及び非 A 非 B 肝炎ウイルスによる感染の報告^{1)~3)}も

散見されるようになった。血液中に混入する恐れのあるウイルスを除去する事を目的として、ウイルス除去用中空糸 (旭化成工業株式会社製 BMM) が開発された。除去すべき目標ウイルスの直径に対して、水濾過速度法による平均孔径 ($2\bar{r}_f$) がわずかに下回る BMM で濾過すれば、濾液中の目標ウイルス濃度を検出限界以下にすることができ⁴⁾。前報⁵⁾では Cohn 法による血漿分画工程、特にアルブミン製剤の製造工程に BMM の適用の可能性を検討した。その結果、FV-1 及び分注前の工

程ではアルブミンの透過率95%以上、濾過速度30 l/m²・hr、濾過容量(有効膜面積1m²当りの濾過量) 80l/m²以上となり、BMM は工業的にも適用可能であることを明らかにした。一方、再生セルロースを構成成分とする BMM の濾過性能は共存する蛋白組成の影響のみでなく、エタノール濃度、濾過温度の影響を強く受ける。アルブミンの場合に比較して、免疫グロブリン製剤の製造工程中のエタノール濃度、分画温度、共存蛋白が何れも異なり、また免疫グロブリンの分子量はアルブミンのそれよりも大きい。そのため、BMM が免疫グロブリン製剤製造工程において適用できるかどうかは、アルブミン製剤の場合と比較してはるかに困難な条件にあることがわかる。本論文ではCohn 法による免疫グロブリン製造工程中へのBMM の適用性を検討した。

実 験

材料：(1) ウイルス除去用中空糸 (BMM)；セルロース銅アンモニア溶液からマイクロ相分離法⁶⁾により、水流速平均孔径が30, 50nm の BMM を作製した。(2) 分画工程の中間製品；Cohn 法の免疫グロブリン分画工程中の supernatant-I (SI), filtrated supernatant-III by depth filtration

(SFIII), supernatant-II-3 (SII-3) 及び最終製品を用いた。

方法：予備実験により得られた濾過速度と濾過圧力、濾過時間曲線との関係から最適な濾過速度を決定した。これにより得られた濾過速度で一次側から二次側へ完全濾過する方式(垂直濾過方式)にて濾過を行い、一次圧が1kg/cm²に到達するまでに可能な処理量をその条件下での濾過容量とした。さらに濾過温度、蛋白濃度、BMM の平均孔径を変えて実験を行い、濾過容量、蛋白透過率、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及び電気泳動(EP)を実施し各条件下での評価を行った。

成 績

表－1 に免疫グロブリン製剤の製造工程での各ステップにおける濾過性能をまとめて示す。この表より以下のことが明かである。① 水流速平均孔径が30nm から50nm に上昇すると何れのステップにおいても濾過容量は大幅に増大し、蛋白透過率も高くなる。② 同様に最終製品に近づく程、濾過容量、蛋白透過率は増加する。③ 濾過温度を高くすることにより、免疫グロブリン製剤の濾過性能は上昇した。④ BMM 濾過前にあらかじめ除菌フィルター(0.22μm)を用いると濾過性能は上昇

Table 1 Filtration characteristics of BMM 30 and 50 for solution of intermediate products and solution of immunoglobulin ;

Intermediate product	Filtration temperature (°C)	Mean pore size of BMM (nm)	Filtration characteristics					
			Filtration Shear rate (Sec ⁻¹)	Filtration Capacity (l/m ²)	Filtration rate (ml/m ² min)	Sieving coefficient of immunoglobulin (%)	Total protein (g/m ²)	Change in electrophoretic pattern
SI	-3	30	0	1.1	7.6	26	16.2	Decrease in α ₂
		50	0	1.6	8.2	40	36.8	Decrease in α ₂
SFIII	-5	50	0	10	267	94	64	
SII-3	-5	30	0	3.7	353	63	3.7	
		50	0	120	726	100	231	
globulin 15%	+4	50	0	0.17	22.3	22	4.8	
	+20	50	0	1.33	107	100	177	
globulin 5%	+20	50	0	29	187	98	1701	
after the 0.22μm globulin 5%	+20	30	0	1.67	87	45	42	
		50	0	40	1087	100	2080	
pepsin treated globulin 5%	+20	30	0	17	467	98	1002	
		50	0	60	1873	98	3522	

した。⑤ 特に、ペプシン処理後の溶液では高い濾過性能を示した。⑥ 濾過前後での HPLC による polymer, dimer の混入割合については差は認められなかったが、残液を見ると重合体が若干濃縮されていた。

考 察

濾過中のウイルス濃度を低下させるには BMM の平均孔径を小さくすればよい。この時、SC、FC は低下する。従って、具体的に適用される工程に最適な平均孔径の BMM を設計に組み込むべきである。免疫グロブリン製剤の BMM 濾過前後で高速液体クロマトグラフィーのパターンが変化していないことにより、重合化した免疫グロブリンもほぼ完全に BMM を透過しているといえる。ウイルスのカプシドは蛋白質であるから逆にウイルス径がある臨界値以下になると BMM のウイルス阻止が不可能になることが予想される。このような蛋白透過性及びウイルス阻止性能を支配する臨界粒子径の存在は BMM の製膜原理と関連があると考えられる。BMM の濾過性能は濾過温度の影響を大幅に受ける。濾過温度の低下に伴って、① エタノール水溶液の粘度の増大、② 溶液中の凝集体の増加（除菌フィルターの効果及び BMM の濾過性能からみて、直径 $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ と推定）、③ 溶液中での蛋白質の拡散速度が小さくなるためと推測される。濾過温度の変化による FC、FR の影響は溶液の粘度変化だけでは説明がつかず、粘度以外の原因、たとえばアルコール及び水の混合系での中空糸内における壁面での濃度差等も考えられる。蛋白質の濃度が増大すると BMM の濾過性能が低下する。この原因として濾過温度と同様に濃度増加に伴って、上記①、②、③の原因が考え

られる。

む す び

ウイルス除去機能をもつ BMM は人血漿由来の蛋白質の透過性が大きいため、工業的に血漿分画製造工程へも適用可能である。免疫グロブリン製剤製造工程への応用については、精製度の高い、最終工程での $0.22 \mu\text{m}$ 後、あるいはペプシン処理後の溶液について適用可能である。BMM の 30nm により濾過除去されるウイルス種としては HIV、HBV が確認されているが、ウイルス径が 40nm 以上のものについては検出限界以下まで除去されているものと考えられる。

文 献

- 1) Trepo, C., Hantz, O. and Vitvitski, L.: Non-A, Non-B Hepatitis after intravenous Gamaglobulin. Lancet, I 322, 1986.
- 2) Webster, A.D.B. and Lever, A.M.L.: Non-A, Non-B Hepatitis after intravenous Gammaglobulin. Lancet, I 322, 1986.
- 3) Lever, A.M.L., Webster, A.D.B., Brown, D. and Thomas, H.C.: Non-A, Non-B Hepatitis occurring in Agammaglobulinemic patients after intravenous Immunoglobulin Lancet, II 1062—1064, 1984.
- 4) 伊藤敬三, 小林正友, 池田久實, 関口定美, 飯島秀樹, 鶴見 隆, 石川 元, 真鍋征一, 相沢 秀: BMM 中空糸による盤漿中のウイルス除去の可能性. 医学のあゆみ, 142: 53—54, 1987.
- 5) 関口定美, 伊藤碩侯, 竹内次雄, 沓沢久史, 石川元, 鶴見 隆, 大沢直樹, 深田誠二, 佐谷満州夫, 山敷 駿: ウイルス除去用中空糸(BMM)のアルブミン製造工程への応用. 医学のあゆみ, 146: 859—860, 1988.
- 6) Kamide, K. and Manabe, S.: "Role of microphase separation phenomena in the formation of porous polymeric membrane". Am. Chem. Soc. 9: 197—228, 1985.