

血漿分画製剤の安全性に関する検討

III. 人血清アルブミン製剤 (赤十字アルブミン[®], 赤十字アルブミン 25[®]) のパスツリゼーション処理 (60°C, 10 時間) による ウイルスの不活化効果の検討

室塚 剛志¹⁾ 武田 芳於¹⁾ 泉 浩業¹⁾
村井 活史¹⁾ 白川 幸子¹⁾ 江村 博行¹⁾
脇坂 明美¹⁾ 松本 脩三¹⁾ 藤井 暢弘²⁾

¹⁾日本赤十字社血漿分画センター

²⁾札幌医科大学微生物学講座

(平成 10 年 7 月 31 日受付)

(平成 10 年 12 月 19 日受理)

VIRAL SAFETY OF PLASMA-DERIVED BLOOD PRODUCTS

III. Effects of Virus Inactivation by Pasteurization in Human Serum Albumin Concentrates (Sekijyuji Albumin[®] and Sekijyuji Albumin 25[®])

Takashi Murozuka¹⁾, Yoshio Takeda¹⁾, Hironari Izumi¹⁾, Katsushi Murai¹⁾,
Sachiko Shirakawa¹⁾, Hiroyuki Emura¹⁾, Akemi Wakisaka¹⁾,
Shuzo Matsumoto¹⁾ and Nobuhiro Fujii²⁾

¹⁾Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

²⁾Sapporo Medical University, School of Medicine, Department of Microbiology

We investigated virus inactivation by two albumin products (Sekijyuji Albumin[®] and Sekijyuji Albumin 25[®]) derived from human plasma with heat treatment at 60°C in liquid-phase (pasteurization) using several enveloped and non-enveloped viruses as marker viruses. Enveloped viruses were sindbis virus (SIN), vesicular stomatitis virus (VSV), herpes simplex virus type-1 (HSV-1) and human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). Non-enveloped viruses were polio virus (Polio V) and hepatitis A virus (HAV). The infectivity of all viruses except HAV was lost after 1 hr heating, with logarithmic reduction value (LRV) for SIN, VSV, HSV-1, HIV-1 and Polio V of >5.1, >5.7, >4.3, >3.8 and >5.9, respectively. No significant difference in LRVs were observed between the two products. The infectivity of HAV, however, remained at 10^{4.2-5.0} TCID₅₀ even after 10 hr heating and LRV stayed in the range of 1.9 to 2.7.

Key words : virus inactivation, albumin, pasteurization

はじめに

アルブミンは、コーンの低温エタノール分画法における 6 回の遠心分離を経た最後の工程で得られる PV-2 画分を溶解して作られる (Fig. 1)。この

分画・精製過程においてアルブミン製剤はエタノールに暴露される事によるウイルスの不活化と、分離操作によるウイルスの除去が行われる。さらに工程の最終段階においてアルブミンは液状

で60℃, 10時間の加熱処理(パスツリゼーション)が施され, 滅菌とウイルスの不活化が行われる。コーンの低温エタノール分画法は戦前より始められ, 既に長い歴史と高い安全性を有している¹⁾。またパスツリゼーションは1940年代からこの工程へ導入され始め, その後, 現在まで約50年間にわたり行われ, パスツリゼーションを施したアルブミン製剤は世界中で広く使用されている。1994年の統計によると世界中で年間約1900万lの血漿から製造されたアルブミン製剤が供給され²⁾, これによるHBV, HCV, HIV, さらにはパルボウイルスB19, HAVのようなエンベロープを持たないウイルスについてもその伝播の報告はない³⁾。以上の様にアルブミンは原料血漿のウイルススクリーニングが行われる遥か以前から製造されながら, 全く感染の歴史をもたない血漿分画製剤の中では際立って安全性の高いものである。日本赤十字社では濃度を異にする2種の人血清アルブミン製剤, 赤十字アルブミン[®]および赤十字アルブミン25[®]を製造供給している。そのウイルスバリデーションの一貫としてパスツリゼーションにおけるウイルス不活化効果を検討したので報告する。

材料と方法

1. ウイルス液

本論文は同名表題の3連論文の一つであり, ウイルスおよびその測定法は前報¹⁾に詳述しており, 重複を避けるため以下簡単に述べる。

1) ウイルスおよびウイルス液

エンベロープ型ウイルスについてはRNAウイルスとして Sindbis virus (SIN), Vesicular stomatitis virus (VSV), Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) の3種を, DNAウイルスとして Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) を使用した。またノンエンベロープ型ウイルスについては Polio virus (Polio V) および Hepatitis A virus (HAV) の KRM 238 株の2種のRNAウイルスとを使用した。

ウイルス液は SIN, VSV, HSV-1, Polio V については前述の如く各ウイルスに感染した Vero 細胞の, また HIV-1 および HAV については各々に感

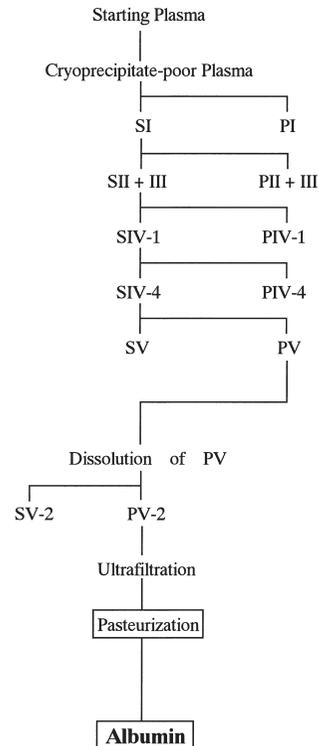


Fig. 1 Manufacturing procedure of albumin

染した Molt-4 あるいは GL 37 細胞の培養上清を用いた。

2) ウイルス量の測定

検体中のウイルスの感染力価は各培養細胞を指示細胞として使用し, VSV, HSV-1 はプラークにより, SIN, HIV-1, Polio V, HAV については 50% Tissue culture infectious dose (TCID₅₀) として測定した³⁾。

2. アルブミン液

赤十字アルブミン[®]の製造では, プールされた原料血漿から血液凝固第 VIII 因子の原料となるクリオプレシピテートを遠心で分離したあとの上清が出発物質となる。この上清の pH を調整し, エタノールを最終濃度 8% になるように加え, -5℃ で攪拌した後に遠心して得られた上清が SI である。SI を pH 調整しエタノールを最終濃度 25% になるように加え, -5℃ で攪拌した後に遠心して得られた上清が SII+III である。SII+III を pH 調整し, 蒸留水をエタノールの最終濃度が 18% にな

Table 1 Inactivation of viruses by heat treatment at 60°C in albumin

Virus	Nucleic acid	Assay Method	Concentration of Albumin	Heating time (hours)					LRV
				0	0.5	1	2	10	
Enveloped virus									
SIN	RNA	TCID ₅₀	20%	10 ^{5.6}	< 10 ^{0.5}	< 10 ^{0.5}	—	< 10 ^{0.5}	> 5.1
			25%	10 ^{5.5}	< 10 ^{0.5}	< 10 ^{0.5}	—	< 10 ^{0.5}	> 5.0
VSV	RNA	pfu	20%	10 ^{6.7}	< 10 ^{1.0}	—	—	< 10 ^{1.0}	> 5.7
			25%	10 ^{6.7}	< 10 ^{1.0}	—	—	< 10 ^{1.0}	> 5.7
HIV-1	RNA	TCID ₅₀	20%	10 ^{4.5}	—	10 ^{1.5}	< 10 ^{0.7}	< 10 ^{0.7}	> 3.8
			25%	10 ^{4.6}	—	< 10 ^{0.7}	< 10 ^{0.7}	< 10 ^{0.7}	> 3.9
HSV-1	DNA	pfu	20%	10 ^{5.3}	< 10 ^{1.0}	—	—	< 10 ^{1.0}	> 4.3
			25%	10 ^{5.3}	< 10 ^{1.0}	—	—	< 10 ^{1.0}	> 4.3
Non-enveloped virus									
Polio V	RNA	TCID ₅₀	20%	10 ^{6.4}	< 10 ^{0.5}	< 10 ^{0.5}	—	< 10 ^{0.5}	> 5.9
			25%	10 ^{6.0}	< 10 ^{0.5}	< 10 ^{0.5}	—	< 10 ^{0.5}	> 5.5
HAV	RNA	TCID ₅₀	20%	10 ^{6.9}	—	10 ^{6.3}	10 ^{6.3}	10 ^{4.2}	2.7
			25%	10 ^{6.9}	—	10 ^{6.0}	10 ^{6.0}	10 ^{5.0}	1.9

LRV : Logarithmic Reduction Value

— : not tested

るように加え、-5°Cで攪拌した後に遠心して得られた上清がSIV+1である。SIV+1をpH調整しエタノールを最終濃度40%になるように加え、-5°Cで攪拌した後に遠心して得られた上清がSIV+4である。SIV+4をpH調整し、-5°Cで攪拌した後に遠心して得られた沈澱がPVである。PVを蒸留水に溶解した後、エタノールを最終濃度10%になるように加え、-3°Cで攪拌したものがSV-1である。SV-1をpH調整しエタノールを最終濃度40%になるように加え、-5°Cで攪拌した後に遠心して得られた沈澱がPV-2である(Fig. 1)。このようにして99%以上に精製されたアルブミン分画であるPV-2を、蒸留水に溶解し、20%および25%に調整し使用した。また、安定剤としてアセチルトリプトファンナトリウムとカプリル酸ナトリウムをそれぞれ0.08 mmol/gとなるように加えた。

3. 加熱処理法 (パストリゼーション)

上述の20%および25%アルブミン溶液に各ウイルス液をアルブミン液の10%(v/v)を越えない量加えて混合した後、1~2.5 mlを試験管に分注した。各試験管を60°Cの恒温槽に移し、所定の時間(0.5, 1, 2, 10時間)加熱して取り出し、直ちに-70°Cで凍結保管した。検体を37°C恒温槽にて急速解

凍後、ウイルス力価を測定した。

結 果

60°C、10時間の加熱によりSIN, VSV, HIV-1, HSV-1およびPolio Vはすべて検出限界以下まで感染力価は低下した(Table 1)。20%アルブミンと25%アルブミンでの違いは認められず、20%アルブミンでの各ウイルスの対数減少率(Logarithmic reduction value : LRV)で見ると、SINで>5.1, VSVで>5.7, HIV-1で>3.8, HSV-1で>4.3, Polio Vで>5.9であった。経時的には30分ではほぼ不活化され、1時間以後10時間までそのまま推移した。一方、HAVについては60°C、2時間の加熱では殆どウイルスの感染価は下がらず、10時間後で漸く1/100程度に減少した。10^{6.9}TCID₅₀添加したHAVは60°C、10時間のパストリゼーションでは感染力は残っており、LRVは20%アルブミンで2.7, 25%アルブミンで1.9であった。

考 察

アルブミンのウイルス不活化法として採用されている60°C、10時間の液状加熱、いわゆるパストリゼーションは、アルブミンに特異的な安定剤としてアセチルトリプトファンナトリウムとカプリル酸ナトリウムを使用することにより、優れた不活化法であることが報告されている³⁾。蔗糖のよ

うな安定剤を加えるとウイルスは加熱による不活化に抵抗性を示すことがあるが⁶⁾、我々の条件においてはSINやHIV-1をはじめとするエンベロープウイルスのみならずPolio Vの様なエンベロープを持たないウイルスも不活化している。Polio Vと同じくエンベロープを持たないウイルス⁷⁾

を同様の温度条件で加熱した際にもそれぞれLRVが3.6, 6.5以上であったという報告¹⁾と併せると今回我々が示した結果を含めパストリゼーションは広い範囲のウイルスに有効であることが改めて確認されたと考える事が出来る。ただし、HAVについては、加熱に対して抵抗性があり⁸⁾有意な不活化効果は見られなかった。同様な事はHilfenhausら⁷⁾が血液凝固第VIII因子(FVIII)製剤のパストリゼーションに関して報告している。しかし歴史的に見てアルブミン製剤によるHAV感染の臨床報告はない事から、その安全性には疑う余地がない。この矛盾を説明する幾つかの可能性がある。第1はコーンの低温エタノール分画工程で既にHAVが不活化/除去されている。第2はHilfenhausら⁷⁾が述べている様に、HAVはウイルス血症の期間が短くしかもウイルス量が多くないので、原料血漿プールに混入したとしてもその量は限られており、効果の乏しいパストリゼーションでも十分不活化/除去されるなどである。したがってパストリゼーション単独ではLRV 4.0以上のウイルス不活化/除去を求めるCPMPのガイドライン⁹⁾の基準に満たないものの、本製剤投与によるHAV感染の危険性は少な

いと考えられる。

文 献

- 1) McClelland, D. B. L. : Safety of human albumin as a constituent of biologic therapeutic products. *Transfusion*, 38 : 690—699, 1998.
- 2) The Marketing Research Bureau Inc. : World-wide market for plasma fractions. 1984 to 1994.
- 3) Roberts, P. : Viral safety of plasma products. *Reviews in Medical Virology*, 6 : 25—38, 1996.
- 4) 室塚剛志, 泉 浩業, 村井活史, 白川幸子, 武田芳於, 江村博行, 脇坂明美, 松本脩三, 藤井暢弘 : 血漿分画製剤の安全性に関する検討, I, モノクローナル抗体精製乾燥濃縮人血液凝固第VIII因子製剤(クロスエイト M[®])の製造工程におけるウイルスの不活化/除去効果について, 日本輸血学会雑誌, 1998 (投稿中).
- 5) Marsh, B.W. and Kangro, H.O. : *Virology methods manual*. Academic Press, London, 1996, 35—44.
- 6) Nissen, E., Koenig, P., Feinstone, S.M. and Pauli, G. : Inactivation of hepatitis A and other enteroviruses during heat treatment (Pasteurization). *Biologicals*, 24 : 339—341, 1996.
- 7) Hilfenhaus, J. and Nowak, T. : Inactivation of hepatitis A virus by pasteurization and elimination of picornaviruses during manufacture of factor VIII concentrate. *Vox Sang.*, 67 (suppl 1) : 62—66, 1994.
- 8) 戸塚敦子, 清原知子, 森次保雄 : A型肝炎ウイルス(HAV)の熱安定性に関する研究. 第45回日本ウイルス学会総会抄録集, 1997, 182
- 9) Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) Biotechnology Working Party : Note for guidance on virus validation studies : the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. The European agency for the evaluation of medicinal products, U. K., 1996, 1—13.