

# 「ウイルス除去膜による安全性について」

日本赤十字社血漿分画センター副所長 脇坂 明美

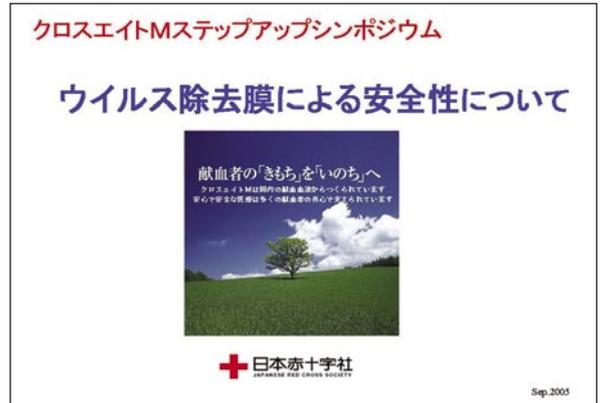
皆さんこんにちは。本日はお忙しい中多数お集まり下さりありがとうございます。また日ごろは日本赤十字社の血液事業にご理解、ご協力を賜りありがとうございます。それではウイルス除去膜による安全性について話させていただきます(図1)。

クロスエイトMの製造にはスライドに表示された4つの主要な工程があります(表1)。有機溶媒・界面活性剤(S/D)処理工程では化学処理によりウイルスを死滅させます。ウイルス除去膜によるナノフィルトレーション工程ではろ過によりウイルスを除去します。またイムノアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーの2つの工程は第Ⅷ因子の純度を上げるための精製工程で、ここで不純物と一緒にウイルスが除かれます。この4つの工程を経てウイルスが含まれない、極めて安全性の高い製剤が作られます。

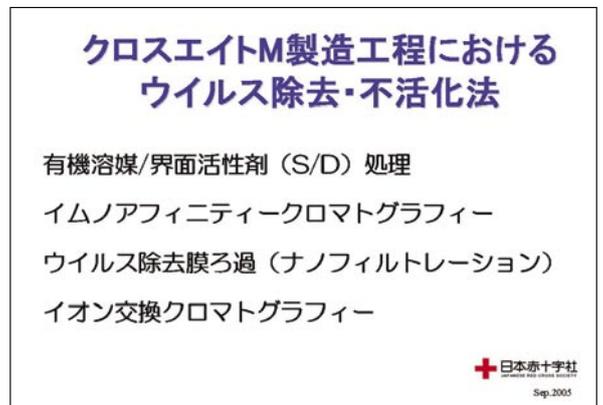
この安全性は、平成3年の供給開始以来これまで170万本のクロスエイトMをお使いいただきながらB型肝炎、C型肝炎、エイズウイルス等のウイルス感染が1例も無いという「実績」で証明されています(表2)。それでは、どのようにしてウイルスが除かれているのかを、少し詳しくお話します。

図2ではウイルスを漫画化して描いてあります。ウイルスはその表面に脂質膜を持つウイルスと持たないウイルスがあります。また遺伝情報を担う核酸の種類で見るとDNAのものとRNAのものがあります。この2つの基準によってウイルスは4つに分けられます。このスライドを見れば、B型肝炎ウイルスは脂質膜を持つDNAウイルスであり、C型肝炎ウイルス、エイズウイルス(HIV)、一昨年新型肺炎の病原体として問題になったSARSウイルス、また最近日本でもアメリカからの帰国者で1例見付き騒がれたウエストナイルウイルス等はすべて脂質膜を持つRNAウイルスということが分かります。先述のS/D処理工程では有機溶媒がウイルスの表面を覆う脂質膜を瞬時に溶かし、ウイルスは死滅いたします。このためクロスエイトMは脂質膜のあるウイルスに対しては極めて安全です。一方、ヒトパルボウイルスB19(B19)やA型肝炎ウイルス、あるいは最近北海道で生の豚レバーを食べると感染するといわれるE型肝炎ウイルスには脂質膜がありません。したがってこれらのウイルスに対してS/D処理は無効です。

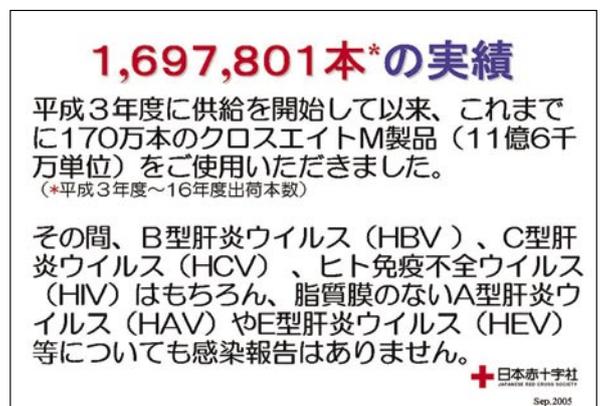
このようなウイルスはウイルス除去膜によるナノフィルトレーションや精製工程で除いています。ナノフィルトレーションに使用されるウイルス除去膜には直径35nmの孔が開いており、これよ



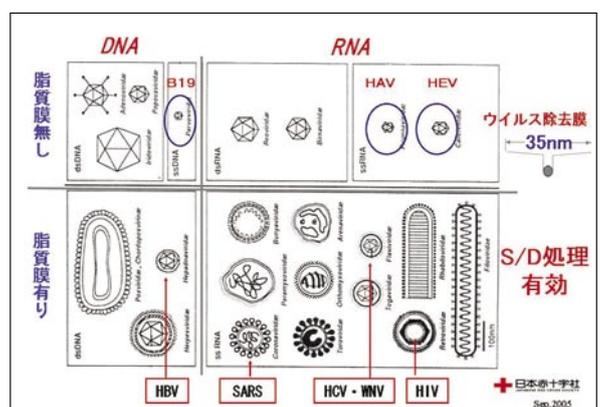
(図 1)



(表 1)



(表 2)



(図 2)

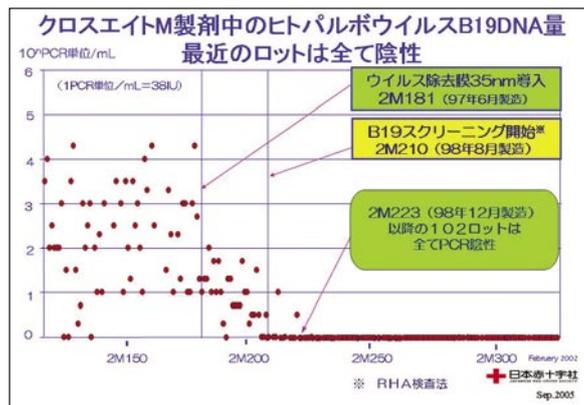
り大きいウイルスは通り抜けることができませんが、これより小さなB19やA型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスは孔を通過して製剤に入ることもあり得ます。

実際にクロスエイトM製剤中に入っていたB19の量を調べたのがこの図です(図3)。横軸がクロスエイトMの製造番号、縦軸がDNAで測ったB19のウイルス量です。このグラフから以前の製剤ではB19が少なからず入っていたことがわかりました。日本赤十字社はこれを重視して98年8月からB19のスクリーニングを始めました。製造工程で除去できないのであれば、B19を含まない血漿を原料にしようというわけです。これによって98年12月以降に作られたすべてのクロスエイトMにはB19が含まれなくなりました。しかしスクリーニングをしていないA型肝炎ウイルスやE型肝炎ウイルスの混入を完全には否定し得ません。

そこで安全性を上げるためにウイルス除去膜の孔のサイズを小さくする、すなわちこれまでの35nmから、20nmに変える事にしました(表3)。20nmは第Ⅷ因子が通り抜けできる大きさで、これより小さくなると第Ⅷ因子が通り抜けできません。

図4では各ウイルスの大きさと、細菌を取り除くための一般的な除菌フィルターやウイルス除去膜の孔のサイズ(35nm、20nm)を相対的に示しています。これを見ると35nmの孔をすり抜けていたB19やA型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスも20nmの孔では通り抜けできないことがイメージとしてよく理解できます。

しかし単なるイメージではなく、これらのウイルスが実際に20nmの孔をすり抜けないことを検証する必要があります(表4)。そのためにはウイルスが混入した血漿を原料として製造し、できた製品にウイルスが残っているか否かを見れば良いのですが、それでは工場を汚染することになりますのでできません。そこで実製造と全く同じ工程を再現したミニチュア版の工場を実験室の中に構築して行います。これをウイルス・バリデーションといいます。



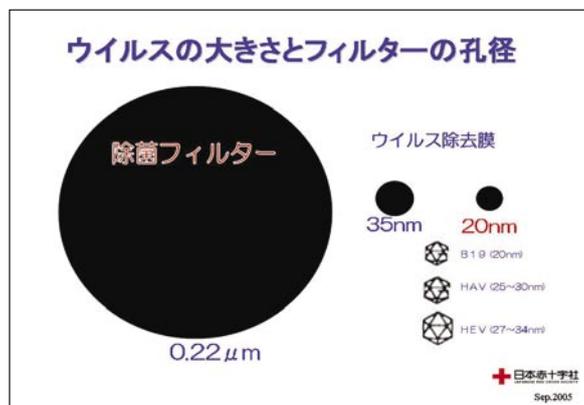
(図3)

更なる安全性のために

ウイルス除去膜の孔径化  
(孔径35nm → 20nm)

日本赤十字社  
Sep. 2005

(表3)



(図4)

バリデーションに使用した脂質膜のないウイルス

ウイルス	ヒトパルボウイルスB19	プタパルボウイルス	A型肝炎ウイルス	ネズミ脳筋炎ウイルス
	B19	PPV	HAV	EMC
核酸	DNA	DNA	RNA	RNA
脂質膜	なし	なし	なし	なし
サイズ	20nm	18~24 nm	25~30 nm	25~30 nm

日本赤十字社  
Sep. 2005

(表4)

表5にはB19、プタパルボウイルス、A型肝炎ウイルスおよびマウス脳心筋炎ウイルスを混入させた場合のウイルス・バリデーション結果を示しています。表では今まで使っていた孔径35nmの膜と新しく導入した20nmの膜のウイルス除去能を比較しています。表で使われている数値は対数減少率(LRV)といい、この工程を経るとウイルスが最初の何分の1になるかを対数で表した数値です。LRV=1は10分の1、2は10<sup>2</sup>分の1つまり100分の1、3は10<sup>3</sup>分の1すなわち1000分の1に添加したウイルス量が下がるという意味です。LRVが1より低い場合は誤差範囲と考え、除去効果なしと評価します。そうしますと35nmの膜ではLRVが1以下と除去できなかった(すなわち孔を通り抜けた)これらのウイルスが20nmの膜では効果的に除去され、LRV >5、10<sup>5</sup>すなわち10万分の1以下になることが分かりました。

ナノフィルトレーション工程だけでなく、S/D処理工程を除く先述の2工程中でもウイルスが除去されますので、クロスエイトMの全工程でみるとB19やA型肝炎ウイルスのLRVは8~9と非常に高くなります(表6)。これは最初の原料血漿にウイルスが入っていた場合でも製品となったときには10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>、つまり1億分の1~10億分の1以下に減ることを示しています。ちなみにB19は一般的にはりんご病、医学的には伝染性紅斑と言われる病気の原因ウイルスで、現在知られている最小の病原性ウイルスです。B19が取り除けることは、現時点ではすべての病原性ウイルスも取り除かれていることを意味します。

次に孔径20nmのウイルス除去膜を通すことによる第Ⅷ因子への影響について検討しました(図5)。まず安定性についてです。11℃に20ヵ月保管したときの力価を比較していますが、従来の35nmのウイルス除去膜と今般20nmで作られた製品には全く違いがありません。

次にトロンビンによる活性化試験の結果です(図6)。20nmを通したクロスエイトMも従来品と全く同じパターンで、トロンビンを添加すると第Ⅷ因子の活性は速やかに立ち上がり、やがて消褪していきました。このことから機能的な面でも変わっていないということが分かります。

次に20nmは第Ⅷ因子がようやく通過できる大きさなので、こ

**脂質膜のない小さなウイルスに対する  
安全性が飛躍的に向上します**

膜孔径	ヒトパルボ ウイルスB19 20nm	プタパルボ ウイルス PPV 18~24nm	A型肝炎 ウイルス HAV 25~30nm	ネズミ脳心筋 炎ウイルス EMC 25~30nm
	35nm	≤1.0	NT	NT
20nm	4.9	≥5.1	≥3.4	≥5.8
向上度	3.9以上	—	—	4.4以上

ナノフィルトレーション工程のウイルスクリアランス指数  Sep.2005

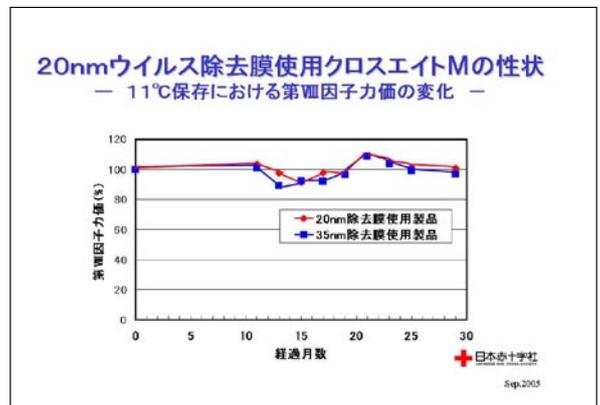
(表5)

**クロスエイトM製造工程における  
脂質膜のないウイルスのクリアランス指数**

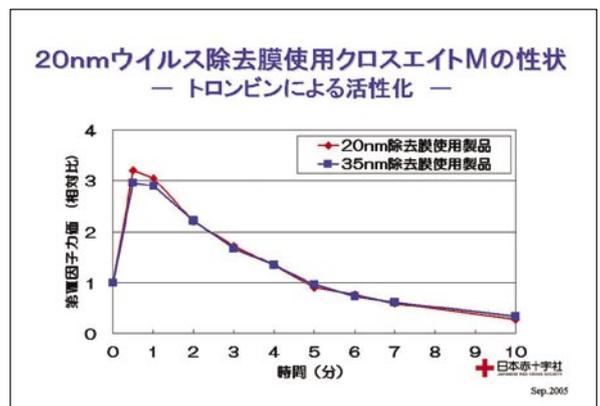
工程名	ウイルス		
	PPV	HAV	EMC
S/D処理	—	—	—
イムノアフィニティークロマトグラフィー	2.8	≥5.6	5.9
ナノフィルトレーション(20nm)	≥5.1	≥3.4	≥5.8
イオン交換クロマトグラフィー	≤1.0	≤1.0	2.4
合計	≥7.9	≥9.0	≥14.1

 Sep.2005

(表6)

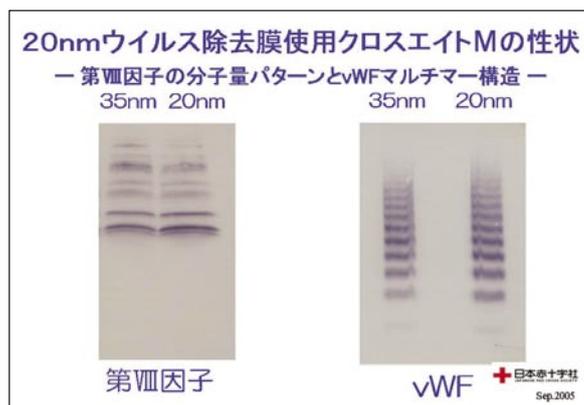


(図5)



(図6)

れを通すことによってクロスエイトM製剤中の第Ⅷ因子の構造に変化がないかを電気泳動法で調べてみました(図7)。この図のように35nmを通した時と20nmを通したときでは全く同じパターンが得られました。また第Ⅷ因子に結合しているvWFの多量体の構成も全く変わらない、すなわち20nmのウイルス除去膜を通すことで安全性は大きく向上したが、第Ⅷ因子そのものには変化がないということが分かりました。



(図7)

これまでをまとめますと、「ウイルス除去膜の孔径を20nmにすることによって、脂質膜のない小型ウイルスに対する除去効果が向上したが、第Ⅷ因子の性質や安定性への影響は認められなかった」となります(表7)。

### ウイルス除去膜の小孔径化のまとめ

- 脂質膜のない小型ウイルスに対する除去効果が向上した。
- 膜孔径を変更することによる第Ⅷ因子の性質や安定性への影響は認められなかった。

日本赤十字社  
Sep. 2005

(表7)

次に話題を変えて、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)について話したいと思います(表8)。

### vCJDに対する安全性は

日本赤十字社  
Sep. 2005

(表8)

今年の2月5日の新聞に、国内初の変異型ヤコブ病(vCJD)が見つかったと報道されました(図8)。この方は40歳代の男性で、1990年にイギリスに24日間、フランスに3日間滞在したことがありました。この方が日本に戻られて14年たった後vCJDを発症し、2005年に亡くなりました。



(図8)

vCJDは一般に狂牛病といわれている牛海綿状脳症(BSE)に感染した牛の危険部位に蓄積されていた異常プリオンが食事を介して人の体内に入って増殖し、発症します(表9)。ですからvCJD患者のほとんどすべてがBSEの多発したイギリス在住、もしくはイギリス産の牛肉を食べたことのある方です。

### 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD)

- vCJDは牛海綿状脳症 (BSE) 感染牛の**危険部位**に蓄積されていた、異常プリオンが経口的にヒトに伝播し、ヒトの体内で増殖した結果起こる病気です。
- vCJDはBSEが多発した**英国に多く発生**している病気です。

+ 日本赤十字社  
Sep. 2005

(表 9)

2005年8月現在、世界で181名の方がvCJDに感染しました(表10)。うち1人が先ほどの日本人です。181人中157人はイギリス人。続いて13人がフランス人ですが、これはフランスで食べている牛肉の5%はイギリスから輸入しているためです。その他の発症した人を見ますと、基本的には何らかの形でイギリスのBSE感染牛を食べた人になります。

### 各国のvCJD患者数

患者数	備 考
イギリス	157 英国滞在歴ある香港例を含む
フランス	13 肉牛の5%は英国産
アイルランド	3 英国滞在歴あり2名、なし1名
イタリア	1 英国滞在歴なし マフィアが英国産BSE牛を闇取引(シシリー島)
アメリカ	1 英国滞在歴あり(在米英国人)
カナダ	1 英国滞在歴あり
日 本	1 英国滞在歴あり
オランダ	1
スペイン	1 英国滞在歴なし
ポルトガル	1 英国滞在歴なし
サウジアラビア	1 英国滞在歴 数日?
合 計	181

平成17年8月現在  
+ 日本赤十字社  
Sep. 2005

(表 10)

ここで日本人がどういう経路で異常プリオンを摂取し、その結果としてvCJDを発症するか考えてみましょう(表11)。残念ながら日本でも現在までにBSEが20例発生していますので、1つは日本で発生したBSE感染牛を食べた場合です。そしてもう1つは、ヨーロッパ、特にイギリス滞在時にBSE感染牛を食べた場合です。それぞれの経路で発生するであろうvCJD患者数を科学的に推定してみましょう。

### 日本におけるvCJDの発生要因

- ・国内BSE感染牛の経口摂取
- ・欧州渡航時のBSE感染牛摂取(特に英国及び仏国)

+ 日本赤十字社  
Sep. 2005

(表 11)

まず日本産BSE牛を食べてvCJDに感染する場合がありますが、内閣府食品安全委員会が次のように推定しています(表12)。イギリスは低く見積もって100万頭のBSEが発症し、これが5,000万人のイギリス人の口に入ったことから、vCJD患者数は現在157人でも最終的には5,000人程度になるだろうと予測されています。この割合を日本の人口、BSE発生頭数に当てはめて計算すると、0.1~0.9人となります。すなわち日本国内に居て、日本産BSE牛を食べて発症する可能性は1人以下ということになります。

### 日本におけるvCJD発生数の推定 (国内感染牛由来)

	英国	日本
食物連鎖に混入したと考えられるBSE推定感染牛数	100万頭	5~35頭
人 口	5,000万人	1億2,000万人
vCJD感受性のある遺伝子型(MMタイプ)の割合	40%	90%
最終的なvCJD推定患者数	5,000人	0.1~0.9人

内閣府食品安全委員会 平成16年9月  
「日本における牛海綿状脳症(BSE)対策について-中期とりまとめ」より  
+ 日本赤十字社  
Sep. 2005

(表 12)

次にイギリス、フランスなどへ旅行した人が滞在中にBSE牛を食べて感染する場合があります(表13)。これは厚労省食薬審血液事業部会運営委員会で推定されています。イギリスの人口が6,000万人で最終的に5,900人、すなわち約1万人に1人の率でvCJDが発生すると予想されます。BSEが始まった1980年から1996年の間にイギリスへ行ったことのある日本人の数は364万人です。この人たちがイギリス人と同じリスクと仮定して、1万人に1人の率でvCJDを発症すると360人になります。これは非常に極端な見積もりです。せいぜい3~4日しかイギリスに居ない旅行者と、この間ずっと住んでいるイギリス人が同じリスクであろうはずはありませんが、ここでは最悪のシナリオを想定しています。同じ期間にフランスに行った人は393万人で、この人たちの中からvCJDを発症する人は同様に最高22人と推定されます。

vCJDに感染しているか否かを調べるスクリーニング法は残念ながらまだありません。そこでこれら海外でvCJDの感染を受けた可能性のある方を排除するために、日本赤十字社では欧州36カ国への渡航歴によって献血を制限しています(図9)。特にイギリスに関しては1980年から96年に1日以上滞在したことのある人の献血をご辞退いただいています。またこの時期に西ヨーロッパに6か月以上滞在した方、また東ヨーロッパに5年以上居た方の献血をご辞退いただいています。できればフランスも1日以上滞在した方の献血をお断りしたいのですが、血液が不足する事態を憂慮し、今のところは6か月以上滞在した人だけをお断りしています。

これをまとめてみますと、献血者の中でvCJDに感染している可能性のある人数は、英仏に滞在して発症する可能性のある人で382人です(表14)。これらの人については献血時の渡航歴に関する問診ですべて排除しています。また日本に居て、国産のBSE感染牛食べて発症する確率は0.1~0.9人です。現在の献血率は約5%ですから、実際に献血に来る可能性のある人は0.005~0.045人となります。要するに、vCJDの潜伏期にあつて一見健康だが異常プリオンを持つ人が献血に来る確率は極めて少ないといえます。

世の中にゼロリスクというのはありませんが、それでも原料血漿に異常プリオンが入ったらどうなるのかとやはり心配になります(表15)。

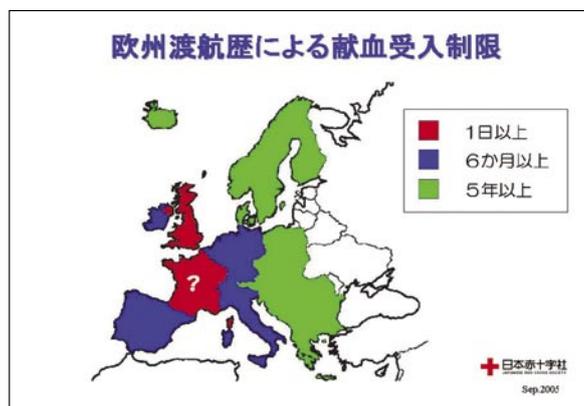
### 日本におけるvCJD発生数の推定 (海外渡航由来)

	英国	仏国
vCJD患者数/人口	154人/6,000万人	9人/6,000万人
潜在的感染リスク者数	5,900人	340人
日本人渡航者数 (1980~1996年)	364万人	393万人
渡航者中の潜在的感染リスクのある人数	360人	22人

(H17.3.31 厚労省食薬審血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会資料)

日本赤十字社  
Sep.2005

(表 13)



(図 9)

### 国内献血由来原料血漿に 異常プリオンが混入する確率は？

	国内感染牛由来	英仏渡航由来	
		英国	仏国
vCJD推定患者数	0.1~0.9人	360人	22人
		計 382人	
潜在的感染リスクのある献血者数 (献血率5%として)	0.005 ~ 0.045人	19人	

原料血漿に異常プリオンが混入する確率は極めて少ない

問診にて除外

日本赤十字社  
Sep.2005

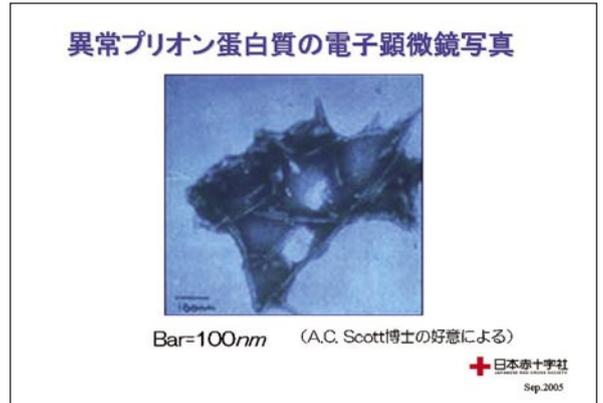
(表 14)

## それでも原料血漿に異常プリオンが入ったら……？

日本赤十字社  
Sep.2005

(表 15)

これは異常プリオンの電子顕微鏡写真です(図10)。ここに100nmのスケールが書いてあります。プリオンは分子量27,000の小さな蛋白ですが、異常型では相互に集って大きな凝集体となります。この凝集体は先述の20nmのウイルス除去フィルターで十分除けます。



(図 10)

またクロスエイトMのように純度の高い製剤では、異常プリオンそのものが不純物として精製工程で除去されます(表16)。バリデーションの結果全工程ではLRV>10、10<sup>10</sup>分の1以下になることが分かっています。原料血漿に異常プリオンが入る確率は極めて少ない上に、もし入ったとしても製造工程で万が一をはるかに越える、10億が一以下になります。

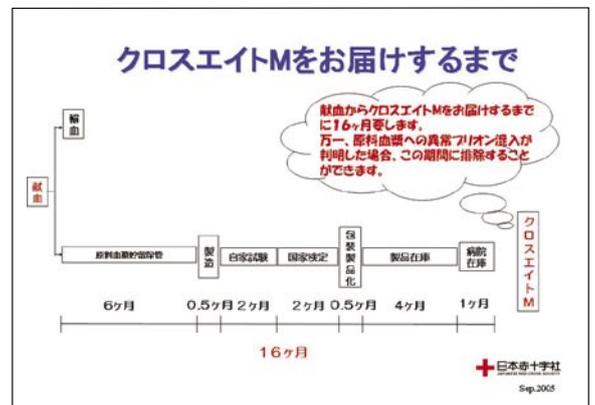
### 異常プリオンの除去が期待される製造工程

- イムノアフィニティークロマトグラフィー
- ウイルス除去膜ろ過 (ナノフィルトレーション)
- イオン交換クロマトグラフィー

日本赤十字社  
Sep. 2005

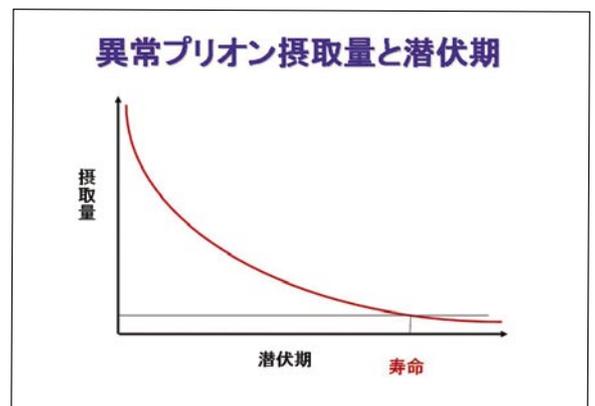
(表 16)

クロスエイトMは献血してから実際に病院でお使いいただくまでには16か月かかります(図11)。先述のごとく、日本ではvCJDの潜伏期の方が献血をされること自体がないのですが、もし後日vCJDを発症したことが判明した場合には、この間であればいつでも使用を差し止めすることができます。つまり献血後16か月が最後の関門となって安全性に寄与しております。



(図 11)

もう1つ重要なことは、異常プリオンの摂取量とvCJD発症までの潜伏期には反比例の関係があることです(図12)。しかもvCJDは非常に潜伏期が長いことが分かっています。たとえば、先ほどの日本人初のvCJDの方は異常プリオン摂取14年後に発症しています。摂取量が少なくなればなるほど、潜伏期は長くなります。明らかに異常プリオンを摂取したにもかかわらず、摂取量が少なくして潜伏期が伸びて寿命を超え、死ぬまで発症しないこともあることが分かっています。つまり、異常プリオンの摂取量が必ずしもゼロである必要がないということです。ですから、製造工程で10億分の1以下になるということは、製剤を介しての感染は実際上起こりえないであろうことを意味します。



(図 12)

以上、これらをまとめますと、表の4項目になります(表17)。

**vCJD**

- 全頭検査と危険部位除去の対策により、**日本国内**で罹患する確率はきわめて**低い**と推定されます。
- 献血血液については、**海外**で罹患するリスクを問診で**排除**しています。
- クロスエイトM製造工程で異常プリオンの**除去**が期待できます。
- クロスエイトMに異常プリオンが含まれる可能性は、**極めて少ない**と言えます。

+ 日本赤十字社  
Sep.2005

(表 17)

最後に、「安全」と「安心」の違いについてお話ししたいと思います(表18)。安全性は科学的根拠に基づいて、確率で表すことができます。一方「安心」は情緒の問題で科学的に表すことができません。世の中にゼロリスクはありえません。「安心」のためには膨大なコストをかけることは必ずしも賢い選択ではありません。日本赤十字社は皆様のご理解をいただきながら、「安全」と「安心」をお届けします。

**安全と安心の指標**

- 安全性は**科学的根拠**に基づいて、確率で表すことができます。
- 安心は**情緒的な**問題です。個人差が大きく、科学的には表せません。
- 全てに「**ゼロリスク**」はあり得ませんが、日本赤十字社は「安全」と「安心」をお届けします。

+ 日本赤十字社  
Sep.2005

(表 18)

6万人の献血者の血漿をプールして、クロスエイトMの1ロット、3,000本を作っています(図13)。その1本1本に、貴方のお役に立ちたいと願う6万人の方の第Ⅷ因子が入っています。言い換えればあなたの血友病が治ることを願っている6万人の心が入っています。どうか献血者の心に代えてクロスエイトMを末永くお使いいただくようお願い申し上げます。

ご清聴ありがとうございました。

**6万人の善意の献血血液から……  
3,000本のクロスエイトMができます**



クロスエイトM一本一本に、「あなたのお役に立ちたい」と願う人々の心が入っています

+ 日本赤十字社  
Sep.2005

(図 13)

