

Evaluation of the Virus-elimination Efficacy of Nanofiltration (Viresolve NFP) for the Parvovirus B19 and Hepatitis A Virus

Deok Ja Oh, M.D.¹, Yoo La Lee¹, Jae Won Kang¹, So Yong Kwon, M.D.¹, Nam Sun Cho, M.D.², and In Seop Kim, Ph.D.³

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross¹, Central Blood Test Center, Korean Red Cross², Seoul;
Department of Biological Sciences, Hannam University³, Daejeon, Korea

Background : The safety of plasma derivatives has been reinforced since 1980s by variable pathogen inactivation or elimination techniques. Nucleic acid amplification test (NAT) for the source plasma has also been implemented worldwide. Recently nanofiltration has been used in some country for ensuring safety of plasma derivatives to eliminate non-enveloped viruses such as parvovirus B19 (B19V) and hepatitis A virus (HAV). We evaluated the efficacy of nanofiltration for the elimination of B19V and HAV.

Methods : To verify the efficacy of nanofiltration, we adopted a 20 nm Viresolve NFP (Millipore, USA) in the scaling down (1:1,370) model of the antithrombin III production. As virus stock solutions, we used B19V reactive plasma and porcine parvovirus (PPV) and HAV obtained from cell culture. And 50% tissue culture infectious dose was consumed as infectious dose. The methods used to evaluate the virus-elimination efficacy were reverse-transcriptase polymerase chain reaction for B19V and the cytopathic effect calculation after filtration for PPV and HAV.

Results : B19V was not detected by RT-PCR in the filtered antithrombin III solutions with initial viral load of 6.42×10^5 IU/mL and 1.42×10^5 IU/mL before filtration. The virus-elimination efficacy of nanofiltration for PPV and HAV were $\geq 10^{3.32}$ and $\geq 10^{3.31}$, respectively.

Conclusions : Nanofiltration would be an effective method for the elimination of B19V and HAV. It may be used as a substitute for NAT screening of these viruses in source plasma to ensure safety of plasma derivatives in Korea. (*Korean J Lab Med* 2010;30:45-50)

Key Words : Plasma derivatives, Nanofiltration, Human parvovirus B19, Hepatitis A virus

서 론

혈장분획제제는 수많은 개별 단위의 원료혈장을 수집하여 제조되기 때문에 수혈용 혈액제제에 비하여 원료혈장이 바이러스로 오염된 경우 파급 효과가 더 크다[1]. 안전대책으로 원료혈장의 헌혈자 선별검사, 수집혈장 또는 중간 제품에 대한 공정 중 품질관리검사, 그리고 병원체 불활화 및 제거기법의 적용 등이 있다[2]. 최근 혈장분획제제를 통한 사람면역결핍바이러스

(human immunodeficiency virus, HIV), B형간염바이러스(hepatitis B virus, HBV), C형간염바이러스(hepatitis C virus, HCV)와 같은 외피형 바이러스에 대한 감염은 거의 발생하고 있지 않다. 이는 유기용제/계면활성제(solvent/detergent, SD) 처리를 포함한 바이러스 불활화 공정이나 원료혈장 및 중간제품에 대한 핵산증폭검사(nucleic acid amplification test, NAT) 실시로 인한 결과로 보여진다. 그러나 아직도 가열이나 산에 내성을 가지므로 이러한 일반적인 불활화 공정에서는 저항을 보이는 것으로 알려진 parvovirus B19 (B19V)나 A형간염바이러스(hepatitis A virus, HAV)와 같은 비외피형 바이러스에 의한 분획제제의 오염 사례는 최근에도 보고되고 있다. 특히 면역적으로 취약한 환자에게는 문제를 발생할 수 있기 때문에 미국이나 유럽연합에 속한 국가나 일본 등은 원료혈장이나 최종산물에 대한 B19V, HAV NAT를 실시하여 일정한 기준 이하로 선별하도록 권고하고 있다[3-6].

Received : September 30, 2009

Manuscript No : KJLM09-123

Revision received : January 5, 2010

Accepted : January 15, 2010

Corresponding author : Deok Ja Oh, M.D.

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross,
764 Sanggye 6-dong, Nowon-gu, Seoul 139-831, Korea
Tel : +82-2-3210-0331, Fax : +82-2-3210-0360
E-mail : dj57_2000@redcross.or.kr

*본 연구는 2008년도 대한적십자사 혈액관리본부 학술용역사업의 일환으로 지원받아 수행되었음.

이뿐 아니라 최근 nanofiltration을 제조 공정에 투입하여 바이러스 오염을 최소화하는 방안도 시도되고 있는데 일본적십자사에서는 20 nm pore size의 nanofiltration을 anti-HBs 면역글로불린제제, factor VIII product 제조 공정에 투입하여 HAV, B19V와 같은 작은 크기의 비외피형 바이러스 오염을 최소화하여 혈장분획제제의 안전성을 증대시키고 있다. 그러나 국내에서는 아직 원료혈장에 대한 B19V나 HAV에 대한 선별검사나 바이러스 제거를 위한 지침이나 가이드라인은 없으며 최근에는 국내에서 유통되는 혈장분획제제의 안전성을 담보하기 위한 대안을 찾고 있는 실정이다.

본 연구에서는 열처리나 산처리 등의 불활화 공정에 저항을 보이는 것으로 알려진 비외피형 바이러스인 B19V와 HAV에 대하여 현재 국내의 일부 제제의 분획공정에 투입되고 있는 nanofiltration (20 nm pore size)의 효과를 검증하여 보고 국내 혈장분획제제의 안전성 확보를 위한 방안으로서 확대 사용의 가능성 여부를 살펴보고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

B19V DNA 정량검사에서 양성을 보인 2명의 헌혈자로부터 유래된 혈장(B19V DNA 농도 3.21×10^4 IU/mL 및 7.08×10^3 IU/mL)을 B19V 원료로 사용하였다. Porcine parvovirus (PPV)는 PPV (ATCC VR 42)를 Minipic Kidney (MPK) cell (ATCC CCL 166), 그리고 HAV는 HAV (ATCC VR 1402)를 fetal rhesus monkey kidney (FRhK-4) cell (ATCC CRL 1688)에 접종하여 배양시킨 시료를 원료로 이용하였다.

2. 방법

1) 바이러스의 접종 및 배양

(1) PPV

숙주세포인 MPK cell (ATCC, Manassa, VA, USA)을 10% 소태아혈청(fetal bovine serum) (Gibco BRL, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)이 첨가된 Dulbecco's Minimum Essential Medium (Gibco BRL)에 배양하였으며, 단층으로 배양된 세포에 PPV를 접종하여 감염시켰다. 현미경으로 세포를 주기적으로 관찰하여 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)가 나타나는지를 확인하였다. CPE가 명백히 관찰될 때 배양액을 400 g에서 7분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 침전물은

재현탁하였다. 침전물을 동결/해빙 과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400 g에서 7분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 모아두었던 상층액을 혼합한 후에 0.45 μ m 필터로 여과한 다음 소분하여 -70°C 에 보관하였다.

(2) HAV

FRhK-4 cell을 10% 소태아혈청이 첨가된 Dulbecco's Minimum Essential Medium에 배양하였고, 배양된 단층세포에 HAV를 첨가하여 감염시킨 후 현미경으로 CPE를 확인한 후 배양액을 400 g에서 7분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 침전물은 재현탁하였다. 침전물을 동결/해빙 과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400 g에서 7분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 모아두었던 상층액을 혼합한 후에 0.45 μ m 필터로 여과한 다음 소분하여 -70°C 에 보관하였다.

2) PPV 및 HAV의 정량

감염성이 있는 바이러스의 농도는 배양 숙주 세포 50%에서 감염을 일으키는 희석배수를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 표시하기로 하였고, 배양 숙주 세포에서 세포 독성과 간섭효과를 일으키지 않는 시료를 음성대조물질 및 희석액으로 사용함으로써 바이러스 접종 실험에서 바이러스의 농도를 정확하게 측정하도록 하였다.

3) 축소 공정의 설계 및 Mock test

(1) Antithrombin III의 제조 공정

실험 조건을 분획공정의 일부와 동일하게 구성하기 위하여 현재 nanofiltration이 투입되고 있는 antithrombin III 공정을 scale-down model로 선택하였다. Antithrombin III의 제조 공정은 Fig. 1과 같이 실 제조 공정의 조건을 그대로 맞추어 모든 시약과 완충액을 사용하여 설계하였다. Nanofiltration은 최종 단계에서 진행하였다.

(2) 축소 공정의 설계

바이러스 필터 여과 공정을 Millipore optiscale-25 (Millipore, Massachusetts, MA, USA)를 이용하여 1,370배로 축소하여 진행하였고 buffer는 antithrombin III 제조 공정시 사용되는 것을 그대로 사용하였다. 축소공정에 적용된 조건은 Table 1과 같다.

(3) Mock test

바이러스 stock solution의 성상이 여과 효율에 미치는 영향

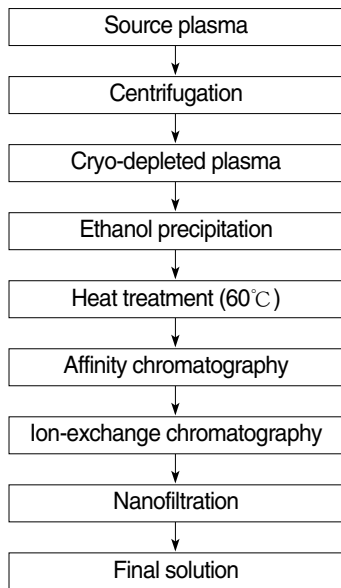


Fig. 1. Manufacturing scheme of antithrombin III.

을 조사하여 적정 희석배수를 설정하고자 mock test를 실시하였다. 바이러스 stock을 희석하여 20배, 200배, 1,000배, 3,000배의 희석액을 제조 후 여과 효율을 조사하였다.

4) 바이러스 접종 및 nanofiltration 시험

혈장 검체 용액에 바이러스 소분액을 적절하게 희석한 희석액 30 mL을 제조하였다. 접종 후 2 mL의 검체를 2개 채취하여 동결 보관하였다. 카트리지에 장착된 20 nm의 필터(Viresolve NFP, Millipore)에 바이러스 접종 시료 18.2 mL을 첨가하고 2 bar의 압력으로 용액을 여과시켰다. 여과된 용액의 부피를 측정하고 B19V 경우 동결보관 후에 reverse-transcriptase-PCR (RT-PCR)로 바이러스 농도를 측정하고 HAV, PPV는 감염역가시험법으로 바이러스 titration을 실시하였다.

5) 바이러스 제거 효과 검증

(1) Real-time PCR

B19V에 대하여 nanofiltration 처리 전후의 시료에 대하여 Lightcycler 2.0 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)와 Parvovirus B19 Quantification kit (Roche, Mannheim, Germany)을 이용한 real-time PCR로 바이러스 핵산의 농도를 측정하였다. Real-time PCR의 검출한계(95% detection limit)는 3.3 IU/mL이었다. Real-time PCR을 위한 핵산의 추출은 MagNa pure LC (Roche)와 MPLC total nucleic acid isolation kit (Roche)를 이용하였다.

Table 1. Parameters of nanofiltration in practical and scale-down schemes

Parameter	Practical scheme	Scale-down scheme	Scale-down ratio
Prefilter type	4 inch cartridge	47 mm prefilter	-
Nanofiltration	10 inch cartridge (4,800 cm ²)	25 mm disk (3.5 cm ²)	≈1,370
Elute volume	25 L	18.2 mL	≈1,370
Pressure	2.0±0.5 bar	2.0±0.5 bar	-
pH	7.0±0.1	7.0±0.1	-

(2) 감염역가시험법

PPV 또는 HAV 제거효과는 nanofiltration 처리 후 시료를 접종한 세포를 CO₂ incubator에서 35°C로 배양하면서 현미경으로 CPE를 관찰하여 TCID₅₀를 적용하여 감염역가시험을 실시하였다. 바이러스 제거 효과는 유럽 의약품국(European Medicine Agency)의 가이드라인[7]에 따라 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Log reduction factor} = \log \{(V1 \times T1)/(V2 \times T2)\}$$

V1: Nanofiltration 처리 전 시료의 용량

T1: Nanofiltration 처리 전 시료의 바이러스 역가

V2: Nanofiltration 처리 후 시료의 용량

T2: Nanofiltration 처리 후 시료의 바이러스 역가

결 과

1. Mock test 결과

B19V의 경우 20배 희석액은 전혀 여과되지 않았고, 200배 희석액도 아주 미흡하게 여과되었으나, 1,000배 희석액에서는 여과효율이 약간 미치지 못하므로 3,000배 희석이 적절한 것으로 판단되었다. PPV와 HAV의 경우에는 1,000배 희석이 적절하였다.

2. B19V의 제거 효과

B19V 양성혈장을 접종한 antithrombin III 용액을 이용한 검증의 결과는 Table 2와 같다. 첫 번째 검증시험에서 제조된 바이러스 용액의 초기 역가는 8.98×10^6 IU/mL이었으며, 접종된 바이러스의 역가는 6.42×10^5 IU/mL이었다. 두 번째 검증시험에서 제조된 바이러스 용액의 초기 역가는 1.52×10^6 IU/mL이었으며, 접종된 바이러스의 역가는 1.42×10^5 IU/mL이었다. 바이러스 필터 후 여과액에서 B19V는 검출되지 않았다.

Table 2. Virus-elimination efficacy of nanofiltration for human parvovirus B19

Sample description	Virus titer (IU/mL)	Volume (mL)	Total virus (IU)
1st Stock solution	1.36×10^9	0.0066	8.98×10^6
Spiked starting material (load sample)	3.21×10^4	20	6.42×10^5
Filtrate	ND (<3.3)	18.2	<60
2nd Stock solution	2.31×10^9	0.0066	1.52×10^6
Spiked starting material (load sample)	7.08×10^3	20	1.42×10^5
Filtrate	ND (<3.3)	18.2	<60

Abbreviation: ND, not detected.

Table 3. Virus-elimination efficacy of nanofiltration for porcine parvovirus

Sample description	Virus titer (Log_{10} TCID ₅₀ /mL)	Volume (mL)	Total virus (Log_{10} TCID ₅₀)
1st Stock solution	6.39	0.125	5.48
Spiked starting material (load sample)	3.96	20	5.26
Filtrate	ND (≤ 0.58)*	18.2	≤ 1.84
2nd Stock solution	6.18	0.125	5.27
Spiked starting material (load sample)	3.75	20	5.05
Filtrate	ND (≤ 0.58)*	18.2	≤ 1.84

*Theoretical minimum detectable levels were calculated where porcine parvovirus infectivity was not detected.

Abbreviations: TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose; ND, not detected.

3. PPV의 제거효과

첫 번째 검증 실험에서 제조된 PPV stock solution의 바이러스 역가는 5.48 Log_{10} TCID₅₀이었으며, 접종 시의 PPV 역가는 5.26 Log_{10} TCID₅₀이었다. 바이러스 필터 여과액에서는 바이러스가 전혀 검출되지 않아 log reduction factor는 ≥ 3.42 이었다. 두 번째 검증실험에서는 제조된 PPV stock solution의 역가는 5.27 Log_{10} TCID₅₀이었으며, 접종 시의 PPV 역가는 5.05 Log_{10} TCID₅₀이었다. 마찬가지로 바이러스 필터 여과액에서는 바이러스가 전혀 검출되지 않아 log reduction factor는 ≥ 3.21 로 나타났다. 두 실험에서 평균 PPV log reduction factor는 ≥ 3.32 이었다(Table 3).

4. HAV의 제거효과

HAV의 경우 첫 번째 검증 실험에서 제조된 HAV stock sol-

Table 4. Virus-elimination efficacy of nanofiltration for hepatitis A virus

Sample description	Virus titer (Log_{10} TCID ₅₀ /mL)	Volume (mL)	Total virus (Log_{10} TCID ₅₀)
1st Stock solution	6.39	0.125	5.48
Spiked starting material (load sample)	3.85	20	5.15
Filtrate	ND (≤ 0.58)*	18.2	≤ 1.84
2nd Stock solution	6.49	0.125	5.58
Spiked starting material (load sample)	3.75	20	5.14
Filtrate	ND (≤ 0.58)*	18.2	≤ 1.84

*Theoretical minimum detectable levels were calculated where hepatitis A virus infectivity was not detected.

Abbreviations: TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose; ND, not detected.

ution의 바이러스 역가는 5.48 Log_{10} TCID₅₀이었으며, 접종된 HAV 역가는 5.15 Log_{10} TCID₅₀이었다. 바이러스 필터 여과액에서는 바이러스가 전혀 검출되지 않아 log reduction factor는 ≥ 3.31 이었다. 두 번째 검증실험에서는 제조된 HAV stock solution의 역가는 5.58 Log_{10} TCID₅₀이었으며, 접종 시의 역가는 5.14 Log_{10} TCID₅₀이었다. 바이러스 필터 여과액에서는 바이러스가 전혀 검출되지 않아 log reduction factor는 ≥ 3.30 이었다. 두 실험에서 평균 HAV log reduction factor는 ≥ 3.31 이었다(Table 4).

고 찰

원료혈장에 대한 헌혈자 선별검사가 실시되지 않거나, 현재 사용하고 있는 SD기법을 비롯한 병원체 불활화/제거 공정에서 내성이 있는 것으로 알려져 있는 B19V와 HAV는 혈액응고인자 제제 등 일부 분획제제에 의한 감염의 사례가 보고되어 있다[4-6]. HAV경우 내열성이 강하여 60°C 에서 10시간 동안에도 저항하며, low pH 처리에서도 충분히 불활화되지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 에테르, 클로로포름, 계면활성제 및 단백분해효소 등의 처리에도 저항성이 있는 것으로 알려져 있다[8]. B19V도 HAV와 마찬가지로 여러 가지 불활화 공정에 저항이 있는 것으로 알려졌으나 이는 배양이 까다로운 B19V 대신 PPV를 대상으로 한 연구 결과로서 최근 실제로 배양한 B19V를 대상으로 실시한 연구에서는 열이나 산에 비교적 예민한 것으로 보고되고 있다[9].

B19V의 경우 일반적으로 헌혈자나 수혈자의 중화항체 빈도가 높기 때문에 수혈에 의한 B19V 감염의 위험은 실제적으로는

낮은 것으로 여겨지고 있으며, 설령 감염되었다 하더라도 일과성으로 경과하여 심각한 상태로 진행되는 경우는 드물다고 알려져 있다[10]. 그러나 유전적으로 적혈구 막의 이상을 가지고 있는 용혈성빈혈 환자, 면역억제 상태의 환자, 임신부 및 영아에서 고농도의 B19V 감염 혈액이 수혈되는 경우에는 심각한 결과를 초래할 수도 있다[11]. HAV 감염은 대부분 일과성 감염으로, 특별한 합병증이 발생되지 않는 한 감염 후에는 종신 면역을 획득하고 보균자로 전환되는 경우가 드물다[12]. 그러나 일부에서는 급성 신부전이나 전격성 간염으로 진행하기도 하며[13], 최근에는 감염 환자의 전격성간염증세로 간 이식 사례가 발생하기도 한다.

따라서 심각한 임상 양상을 보이는 경우는 드물지만 B19V 및 HAV에 대한 분획제제의 안전성 확보에 관심이 높아지고 있는 가운데 2004년부터 유럽에서는 혈장분획제제의 안전성 확보를 위하여 'European regulatory requirement'에서 anti-D나 pooled plasma에 쓰이는 원료혈장에는 B19V 역가가 10^4 IU/mL를 넘지 않도록 요구하고 있다[14]. 미국의 FDA guideline도 분획제제를 위한 pooled plasma의 B19V의 역가가 역시 10^4 IU/mL를 넘지 않도록 요구하고, 일본 후생노동성 가이드라인에도 B19V 및 HAV에 대한, 분획제제 공정에서 바이러스 오염을 최소화시킬 수 있도록 'virus process validation' 절차를 규정해 놓고 따르도록 하고 있다[15, 16]. 대부분의 해외 국가에서도 B19V 또는 HAV에 대한 검사를 헌혈자 선별검사로 도입하고 있지는 않으나, 일본이나 독일과 같이 B19V 항원검사 또는 minipool (96 pool) B19V DNA 선별검사를 실시하고 있는 나라도 있는데, 대부분은 원료 혈장의 수집 혈장, 중간 산물 검사나 최종 제품 검사에 NAT pool 검사와 함께 불활화 및 제거 공정을 실시하고 있다[17]. 그런데 원료 혈장 또는 최종 제품에 대한 검사를 실시할 경우에는 한 단위의 오염된 혈액이 포함되었을 경우라도 동일 lot의 모든 제품을 폐기해야 하는 부담이 따를 수 있다. 이러한 risk를 최소화하고 비용 대비 효율적인 방법으로 바이러스를 제거하기 위하여 nanofiltration이 non-enveloped virus의 제거 방법으로 최근 각광을 받게 되었는데, 일본 적십자사의 경우 이미 1997년에 35 nm pore size의 nanofilter를 분획공정에 투입한 이래 2005년부터는 nanofilter의 pore size를 20 nm로 변경하여 8인자응고제제, 면역글로불린, B형 간염 면역글로불린 공정에 까지 적용하고 있다[18].

Nanofiltration은 특별한 인프라 구축이 필요 없이 간단하게 공정 과정에 투입할 수 있는 장점이 있고, 경제적인 측면으로 보아도 분획분량에 대비하여 일정하게 교체되는 필터 비용이 들어가는 것으로, 헌혈 혈액을 대상으로 실시하는 핵산검사 및

항체검사 비용보다는 훨씬 저렴하게 운영이 가능한 방법으로 각광받고 있는 것이다. 본 연구에서도 scale-down시킨 anti-thrombin III 제조 공정에 B19V, PPV, HAV 오염 시킨 시료를 20 nm pore size nanofilter를 통과시킨 후 측정된 검사에서 바이러스 제거 효과가 검증된 바, 이 방법을 좀 더 다양한 제제의 분획공정에도 투입하는 것을 고려해야 할 것으로 사료되었다. 본 연구에서는 필터의 바이러스제거 효과를 검증하는 것이 목적이었으므로 단백질수율 측정이 포함되어 있지는 않았으나 본 연구에 사용된 제품은 이미 일본에서도 상용되고 있고, 국내에서 유통되고 있는 antithrombin III 제제의 분획공정에도 투입되는 필터로, 치료적 효과에 이의가 없는 것으로 보아 단백질수율에 문제는 없을 것으로 추정된다. 그러므로 현재 antithrombin III에만 적용되는 nanofiltration 방법을 응고인자나 면역글로불린제제 등 국내에서 사용량이 더 많고 유전적 및 면역적으로 취약한 환자들에게 투여되는 분획제제의 안전성 확립 차원에서도 투입할 필요성이 있다고 사료된다.

결론적으로 일부 분획제제 공정에 사용되고 있는 nanofiltration 방법이 B19V, HAV를 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하였고, 경제적이고 사용이 간편한 이 방법을 다양한 분획제제 공정에 투입하는 것을 검토해야 할 것으로 사료된다.

요 약

배경 : 1980년대 이후 혈장분획제제의 안전성은 여러 가지의 병원체 불활화 및 제거공정으로 강화되었다. 그리고 원료혈장에 대한 핵산증폭검사도 전세계적으로 실시되고 있는 추세이다. 최근에는 parvovirus B19 (B19V) 및 A형간염바이러스(hepatitis A virus, HAV)와 같은 비외피형 바이러스를 제거함으로써 혈장분획제제의 안전성을 확보하기 위하여 nanofiltration이 일부 국가에서 사용되고 있다. 본 연구에서는 B19V와 HAV에 대하여 nanofiltration의 바이러스 제거효과를 평가하였다.

방법 : Nanofiltration의 제거효과를 검토하기 위하여 anti-thrombin III 제조공정을 축소한 모델(1:1,370)에 20 nm의 Vir-esolve NFP (Millipore, USA)를 사용하였다. 바이러스 균주로는 B19V 양성 혈장과 세포배양을 통하여 증식시킨 porcine parvovirus (PPV)와 HAV를 사용하였다. 감염 가능 농도는 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 맞추었다. 제거 효과 평가를 위한 바이러스 검사로는 B19V에는 reverse-transcriptase-PCR (RT-PCR)를, PPV, HAV에는 nanofiltration 후 세포병변효과 관찰로 확인하였다.

결과 : B19V가 6.42×10^5 IU/mL, 1.42×10^5 IU/mL의 농도

로 포함된 antithrombin III 용액을 나노필터 처리한 후에 측정된 RT-PCR 검사에서 B19V가 검출되지 않았다. PPV 및 HAV가 포함된 antithrombin III 용액을 나노필터 처리한 후에 세포 배양을 시킨 후에 관찰한 결과 바이러스가 각각 $\geq 10^{3.32}$ 와 $\geq 10^{3.31}$ 로 감소하였다.

결론 : Nanofiltration은 B19V 및 HAV의 제거에 좋은 효과를 보이고 있는 것으로 나타났다. Nanofiltration은 국내에서 B19V 및 HAV에 대한 분획제제의 안전성 확보를 위하여 NAT 선별검사를 대체할 좋은 방법으로 사료된다.

참고문헌

1. Mosley JW and Rakela J. Founding viruses and transfusion medicine. *Transfusion* 1999;39:1041-4.
2. World Health Organization. Recommendations for production, control and regulation of human plasma for fractionation. In: WHO Technical Report Series 941. WHO expert committee on biological standardization. Geneva: WHO 2007.
3. Horowitz B. Blood protein derivative viral safety: observations and analysis. *Yale J Biol Med* 1990;63:361-9.
4. Blümel J, Schmidt I, Effenberger W, Seitz H, Willkommen H, Brackmann HH, et al. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion* 2002;42:1473-81.
5. Wu CG, Mason B, Jong J, Erdman D, McKernan L, Oakley M, et al. Parvovirus B19 transmission by a high-purity factor VIII concentrate. *Transfusion* 2005;45:1003-10.
6. Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, McCaustland KA, Neidhold S, Robertson BH, et al. A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *J Med Virol* 1999;57:91-9.
7. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on virus validation studies : the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/026895en.pdf> (Update on Feb 1996)
8. Weibert KE, Cserti CM, Hannon J, Lin Y, Pavenski K, Pendergrast JM, et al. Proceedings of a consensus conference: pathogen inactivation-making decisions about new technologies. *Transfus Med Rev* 2008;22:1-34.
9. Yokoyama T, Murai K, Murozuka T, Wakisaka A, Tanifuji M, Fujii N, et al. Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration. *Vox Sang* 2004;86:225-9.
10. Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, Tobler L, Montalvo L, Todd D, et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion* 2007;47:1756-64.
11. Parsyan A and Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion-an update. *Transfus Med* 2007;17:263-78.
12. Soucie JM, Robertson BH, Bell BP, McCaustland KA, Evatt BL. Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States. *Transfusion* 1998;38:573-9.
13. Lawlor E, Graham S, Davidson E, Yap PL, Cunningham C, Daly H, et al. Hepatitis A transmission by factor IX concentrates. *Vox Sang* 1996;71:126-8.
14. U.S. FDA. Viral clearance processes for plasma derivatives. Guide to inspections of viral clearance process for plasma derivatives. <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074866.htm>. (Update on Nov 2009)
15. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on plasma-derived medical products. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/026995en.pdf>. (Update on Jan 2001)
16. Furuya K, Murai K, Yokoyama T, Maeno H, Takeda Y, Murozuka T, et al. Implementation of a 20-nm pore-size filter in the plasma-derived factor VIII manufacturing process. *Vox Sang* 2006;91:119-25.
17. Kasper CK and Costa e Silva M. eds. Registry of clotting factor concentrates, 6th ed. Quebec: World federation of hemophilia 2005:1-9.
18. Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center. Receipt inspection/virus inactivation and removal. <http://www.pfcjrc.or.jp/01/05.html> (Update on Sep 2009)