

平成10年度 厚生科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)

研究報告書

血液製剤の試験法・評価法に関する研究

国立感染症研究所

血液製剤の試験法・評価法に関する研究

平成10年度 研究組織

主任研究者

小室勝利 国立感染症研究所 安全性研究部 部長

分担研究者

吉原なみ子 国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長

水澤左衛子 国立感染症研究所 細菌血液・製剤部 主任研究官

福武勝幸 東京医科大学 臨床病理 教授

柴田洋一 東京大学医学部 輸血部 教授

関口定美 北海道赤十字血液センター 所長

脇坂明美 日本赤十字社血漿分画センター 副所長

協力研究者

岡田義昭 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長

新井盛夫 東京医科大学 臨床病理

渡辺 潤 東京医科大学 臨床病理

池淵研二 北海道赤十字血液センター 副所長

阿部英樹 北海道赤十字血液センター 研究員

菅原浩行 北海道赤十字血液センター 研究員

古谷健志 日本赤十字社血漿分画センター

室塚剛志 日本赤十字社血漿分画センター

目 次

| | | | |
|---|-------|-------|----------|
| 1. 総括研究報告書 | 主任研究者 | 小室勝利 | 1 - 3頁 |
| 2. 分担研究報告書 | | | |
| (1) HIV検査試薬の精度管理に関する研究 | | 吉原なみ子 | 4 - 9頁 |
| (2) HBV、HCV検出のための核酸増幅法の改良と評価に関する研究 | | 水澤左衛子 | 10 - 13頁 |
| (3) 第Ⅷ因子製剤の実測第Ⅷ因子活性と規格表示値の乖離に関する研究 | | 福武勝幸 | 14 - 16頁 |
| (4) 血小板抗体の検出についての研究 | | 柴田洋一 | 17 - 19頁 |
| (5) ウイルス不活化製剤の有効性、安全性の評価に関する研究 | | 関口定美 | 20 - 22頁 |
| (6) 500検体ミニプール核酸増幅検査(NAT)の実施状況とその効果に関する研究 | | 脇坂明美 | 23 - 28頁 |

厚生科学研究費補助金（医薬安全研究事業）

総括研究報告書

血液製剤の試験法・評価法に関する研究

主任研究者 小室勝利（国立感染症研究所 安全性研究部 部長）

研究要旨：血液製剤の有効性と安全性向上に役立てることを目的として使用される各種検査法の開発、改良、評価を行うとともに、従来ウイルス不活化処理の行われていない血液成分製剤に対するウイルス不活化法に関する検討を行い以下の結果を得た。

- 1) 抗血小板抗体測定法の改良として、血小板分離の際、遠心荷重を限界まで下げることにより、血小板活性化を抑制すると、抗体測定の精度を向上させることを証明した。
- 2) 凝固第Ⅷ因子製剤の表示力価と、実測力価を比較したところ、実測力価には、表示力価の70%から196%まで大きなばらつきがあることが判明した。測定法の標準化と、実測力価（含有量）の表示が、投与量決定の際に必要なことが示唆された。
- 3) 最近開発された HIV 測定法の感度比較を行った。従来使用している確認法としての WB 法より高感度検出法、従来法と同感度の簡易測定法、スクリーニング時に有用な抗体・抗原同時測定法が充分使用し得ることが確認された。
- 4) 血漿分画製剤の原料血漿につき、500 検体ミニプールによる HCV,HIV,HBV に対する核酸増幅法(NAT 法)検査を実施したところ、250 万検体の中から、HCV5 例、HBV37 例の陽性献血者が同定された。HIV 陽性献血者は認められなかった。NAT 法の導入は、血液製剤の安全性向上に有用であることが示唆された。
- 5) HCV-RNA の遺伝子増幅法に用いる国際標準品を作製する WHO の共同作業に参加した。日本国内標準品又は参照品作りに必要な内容につき紹介した。
- 6) 種々のウイルス除去不活化に抵抗を示すパルボウイルスに対する将来の除去、不活化法の検討をめざし、その際、除去、不活化量を評価するために必要なパルボウイルス感染価の検討を行った。赤血球系幹細胞(CFU-E)にパルボウイルスを感染させ、間接蛍光抗体法により測定する方法で $10^{3.6}$ copies/ 10μ l の感度を有する感染価測定法を開発した。

分担研究者

| | | |
|-------|---------------|----------------|
| 吉原なみ子 | 国立感染症研究所 | エイズ研究センター 室長 |
| 水澤左衛子 | 国立感染症研究所 | 細菌・血液製剤部 主任研究官 |
| 福武勝幸 | 東京医科大学 | 輸血 教授 |
| 柴田洋一 | 東京大学医学部 | 輸血 教授 |
| 関口定美 | 北海道赤十字血液センター | 所長 |
| 脇坂明美 | 日本赤十字血漿分画センター | 副所長 |

A. 研究の目的

血漿分画製剤の有効性と安全性に対する対策には多くの注意がはらわれ、相応の効果をあげているが、赤血球、血小板、新鮮凍結血漿に対する安全性対策は必ずしも充分でない。これら製剤の有効性と安全性向上に寄与することを目的に必要な試験法の開発、改良、評価、標準化に関する研究と、血液成分製剤の安全性をより高めるためのウイルス不活化法に関する研究を行う。

B. 研究方法と結果

全体計画としては、輸血に伴って発生する福作用防止及び有効性確認に役立てるため、血液製剤の有効性と安全性を評価する試験法の開発、改良、及びスクリーニングを通過したウイルスに対する対策を考慮して、研究を進めてきた。個々の方法と結果は以下のごとくである。

- 1) 使用頻度の高い血小板輸血の際の副作用発生頻度は高く、その原因の主たるものに HLA 抗体や血小板特異抗体がある。血小板抗体の検出法として混合受身凝集法(MPHA)があるが、標的となる血小板の分離・固相法について、解決すべき技術的側面として、血小板の遠心分離の際の活性化が膜の性状に変化を来すことが上げられていた。この問題の解決の方法として、血小板分離を行う際、遠心荷重を限界まで下げることにより、血小板活性化を抑制することができ、抗体測定の精度を向上させることを確認した。血小板抗体測定法として、今後広く普及をはかる予定である。

2) 血友病 A の補充療法に用いる第Ⅷ因子製剤の投与量は、製剤に記載されている規格値から設定される。従って、記載上の規格値と実際に製品に含まれる実測値の間に差があった場合、有効性さらには副作用にも影響しかねないので、規格値と含有量の比較を行った。4種類の第Ⅷ因子製剤各10ロットの含有量を比較すると、規格値の70%から196%と大きなばらつきを示した。適正な補充療法を行うためには、測定法の標準化が求められ、製品への実測力価の表示を行うことの必要性が示唆された。

3) HIV 検査試薬の感度の比較は、ウインドー期短縮を含む陽性血排除の点から極めて重要である。今回は、最近開発された高感度検出法、簡易検査法、抗原抗体同時測定法につき検討した。その結果従来確認試験として使用されている WB ほうが、高感度測定法での陽性血を陰性又は判定保留の判定を示す場合のあること、簡易検査法にも ELISA 法と同等の感度のあること、抗原・抗体同時測定法がスクリーニングには有用であることが確認できた。遺伝子検査法の導入が予定されている様であるが、スクリーニングには、抗体検査等の併用を行うべきとの結果も得た。

4) 血漿分画製剤の原料血漿プールのウイルス検査に遺伝子増幅法 (GAT 法) を導入することは、製剤のウイルス学的安全性の向上が期待されることになり、EU は HCV-GAT 検査を 1999 年 7 月 1 日よりの実施を決定し、日本に於いても同時期の導入を予定している。プール血漿スクリーニングには、製造メーカー各社が使用する標準品の作製は必須であり、性質の規定された標準品は試験法の標準化、検査技術の習熟を促して GAT 検査の信頼度と感度向上のためにも寄与することになる。1997 年に判定された WHO の HCV-RNA 国際標準品作製作業に参加した経過と知見を紹介し、HCV-RNA GAT 試験法の改良と評価につき考察した。1999 年 4 月から、日本の標準品、又は参照品作りの計画を予定している。

5) 日本赤十字社に於いて、1997 年 11 月より、分画製剤原料血漿について 500 検体ミニプールによる HCV, HIV, HBV に対する核酸増幅法 (500NAT) を実施している。1998 年 10 月までに検査総数約 250 万検体となるが、その結果をまとめた。通常行われているスクリーニングで陰性であった原料血漿に使用され得る検体の中、HCV 5 例、HBV 37 例の陽性献血者が同定され、HIV 陽性例は認められなかった。500NAT 実施により、原料へ混入する危険性のあ

ったウインドー期血漿は約 40%減少したことになる。BBI 社が提供する HCV 感染後の血液を経時的に採取したセロコンバージョンパネルを使用して、500NAT の効果を検討したところ、残余危険率は HCV で 20.1%, HIV で 39.1%, HBV で 11.4%の減少が推定された。500NAT の導入は、血漿分画製剤の安全性をより強めることが示唆された。

6) 血液製剤の輸血後ウイルス感染症防御対策としては、よりよいスクリーニング法の導入による陽性血排除と、スクリーニング検査をすりぬけたウイルスの除去・不活化が求められる。血漿分画製剤については、加熱法、SD 処理法あるいは膜濾過法等のウイルス除去・不活化が採用されているので、一部製剤を除いて安全性は確保できていると考えられるが、赤血球、血小板製剤、新鮮凍結血漿 (FFP) については、ウイルス除去・不活化処理が実施されておらず、早期にこれら手段の採用されることが期待される。パルボウイルス (B19) は種々の不活化法に対する抵抗性を示し、現在用いられている方法では不活化できない。将来、このウイルスの不活化法の開発をめざして、その際に使用しなければならぬウイルスの感染価測定法に関する研究を本年度は実施した。末梢血より CD34 陽性細胞を分離し、増殖因子 (SCF), エリスロポイエチン、IL-3 を添加培養後、分化誘導した CFU-E にウイルスを感染させ、間接蛍光抗体法により感染価を測定した。検出感度は $10^{5.6}$ copies/ 10^6 μ l であり、今後感度を上げる方法の改良と、ウイルス不活化量の測定に応用したい。

C. 考察

1998 年に入り血液製剤の安全性対策、特に輸血御ウイルス感染症対策として、ウイルススクリーニングに遺伝子増幅法 (GAT 法又は NAT 法) の導入が検討され、EU はすでに 1999 年 7 月に HCV の NAT 法を血漿分画製剤の原料検査に導入することを決定し、日本に於いても同時期導入を計画している。研究報告にみられる現在のスクリーニング法はすりぬけたウイルス陽性献血者の存在は分画製剤ではウイルス除去、不活化が実施されている現在、問題は少ないとしても、血液成分製剤に於いては、十分な配慮が必要で、ウイルス不活化法の導入、クアランチン等を併用して、早期に実施されるべきと考えられる。近年、急激に使用の増加している血小板製剤については、ウイルス対策とともに、副作用として重要 n 抗血小板抗体への対策が必要であり、測定法の精度向上を実現した方法が、早期に全国各施設で使用されることが期待される。凝固第Ⅷ因子の含有量と表示力価の差の問題は、

従来から一部で指摘されてきたところであるが、臨床的には大きな問題であり、測定法の標準化、実質含有量表示、及び血液製剤基準の改正等、早急に検討しなければならぬ点と考えられる。これら本研究班で提起された点の改良が応用されることが期待される。

D. 結論

血液製剤の有効性、安全性に関する検査法及びその対策として必要な方向性の一部を報告した。現在、対策についての検討が進んでいる部分と、今後の対応の期待される部分が存在する。早期実現のために本研究が役立てられることを期待し検討を継続できれば幸いである。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushima, Y., Lewis, M.J., Monken, C., Komuro, K., Kusagawa, S., Sato, H., Takebe, Y., Yamazaki, S., Hien, N., Anh, H., Long, H. a T., Honda, M., Hall, W.W. : Identification and molecular characterization of human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infections in intravenous drug abusers in the former South Vietnam. *AIDS Research and Human Retroviruses* 14:537-540, 1998.

2. Okada, Y., Abe, E., Komuro, K. and Mizouchi, T. : Heterosexual transmission of murine AIDS virus. *J. Virol.*, 72 : 2541-2543, 1998.

3. Kato, H., Horino, A., Sakurai, S., Ushijima, H., Komuro, K., Uchida, T. : Inhibition of tumor cell growth by murine splenic adherent cells stimulated with INF- γ . *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115 : 115-120, 1998.

4. Naito, S., Horino, A., Komiya, T., Fukuda, T., Takaahashi, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Oka, T., Okuma, K., Morokuma, M., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. : Induction of protection against tetanus toxin in mice by tetanus toxoid-liposome conjugate. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 116 : 215-219, 1998.

5. Fukuda, T., Komiya, T., Takahashi, M., Arakawa, Y., Ami, Y., Suzaki, Y., Naito, S., Horino, A., Nagata, N., Satoh, S., Gondaira, F., Sugiyama, J., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. : Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli*-O157:H7 in mice by Shiga-like toxin-liposome conjugate. *Int.*

Arch. Allergy Immunol., 116 : 313-317, 1998.

6. Kato, H., Horino, A., Taneichi, M., Fukuchi, N., Eto, Y., Ushijima, H., Komuro, K., Uchida, T. : Macrophage inhibition of lymphocyte and tumor cell growth is mediated by 25-hydroxycholesterol in the cell membrane. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 117 : 78-84, 1998.

7. Shoji-Tanaka, A., Tanaka, M., Komuro, K. : A highly efficient method for the site-specific integration of transfected plasmids into the genome of mammalian cells using purified retroviral integrase. *Gene* 216 : 67-76, 1998.

F. 知的所有権の取得状況

なし。

H I V 検査試薬の精度管理に関する研究

分担研究者 吉原なみ子 国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長

研究要旨

H I V 検査試薬の感度を比較検討して、有用性を検討した。比較には国際的な評価も出きるように B B I 社のセロコンパーション[®] を用いた。近年高感度な H I V 抗体検査キットが開発されている。その結果、確認試験の W B がスクリーニングで陽性の感染検体を陰性または判定保留となることがわかった。今まで、日本において承認された簡易検査キットはなかったが昨年イムノクロマトグラフィ (I C A) 法が承認され、E L I S A や P A と同等な感度であることがわかった。また、抗原・抗体コンビネーションキットは抗原検査と抗体検査の長所を備え、スクリーニングには良いと考えられる。遺伝子検査法は高感度であるがウイルス量の少ない検体やサブタイプによっては検出できないこともあるので H I V の感染診断には抗体検査などと併用すべきであることがわかった。P C R のアプライア HIV-1 モーターの add in primer 法はサブタイプ E も測定できることを確認した。

A. 研究目的

抗体検査試薬、抗原検査試薬、抗原・抗体コンビネーション試薬および核酸検査試薬について感度を比較し、それぞれの H I V 検査試薬の有用性および問題点を知ることを目的とした。また、問題点の一部改良を加えて、改良の前後で比較した。

B. 研究方法

現在市場で多く販売されている既承認品および日本では未承認であるが外国では市販されている H I V 検査試薬について検討した。検出感度の比較は B B I (Boston Biomedical Inc.) のセロコンパーション[®] を使用した。このパネルは一人の患者を数日間隔で採血したシリーズ血清であり、世界的に使われているので国際的な評価が可能である。核酸検査試薬は B B I セロコンパーション[®] とサブタイプの分かっている H I V 感染検体を使用し検討した。

C. 研究結果

表 1 は B B I のセロコンパーション[®] (P R B 9 0 9)

による感度比較である。尚、表の 0 日は最初に採血した日にちであり、感染した日にちを示すものではない。表中の A ~ I は製造会社名または販売会社名である。たとえば H I V 抗体検査の A : E L I S A - 1、B : E L I S A - 2、A : I C A (Immuno chromatographic assay) は同一の会社の異なった製品を意味する。I C A は昨年 8 月に承認された簡易検査法である。全血または血清を 5 0 u L 滴下するだけで 1 5 分後に判定できる。1 1 種類のスクリーニングに使われている H I V 抗体検査試薬の中で 8 製品は 7 日目から検出できた。なお、B 社の E L I S A - 2 は 0 日から検出でき、もっとも高感度であった。E 社の E L I S A の 2 製品 (E L I S A - 1 および E L I S A - 2) とも 1 4 日目からであり、もっとも感度が悪く、検出期間に 2 週間の開きが見られた。すべての抗体検査はいつか陽性となると陰性化する製品はなかった。確認法である H 社の S I A (Strip Immune Assay) は 0 日の検体は陰性であり、7 日目の検体も判定保留となり、1 4 日目以後から陽性となった。従って、最近開発されたスクリーニング法は確

認法よりも高感度であるため折角スクリーニングで拾っても確認試験で陰性と判定されることがあることがわかった。

HIV抗原検査の4種類はすべて0日から陽性と判定できたが3製品(A社、H社、I社)が28日目から、C社が30日目から陰性となった。2種類の抗原・抗体コンビネーション法では全期間を通して拾うことができた。表2はBBIパネル:PRB935を用いた感度比較である。抗体検査は43日目から陽性であるが抗原検査および抗原・抗体コンビネーション検査は28日目から陽性となり2週間以上もウィンドウ期間を短縮できることがわかった。表2にはRNA検出法のPCRとTMA(transcription mediated amplification)の結果も加えた。

なお、PCRとTMAの1回の検査に必要な検体量は0.2 mLと0.5 mLであり、検出限界は400 $\text{コピー}/\text{mL}$ と200 $\text{コピー}/\text{mL}$ である。PCRおよびTMAは24日目から陽性となり、抗原検査よりも4日早く検出できた。

表3にTMAの特異性を示した。HIV感染者93例中サブタイプEの1検体を拾うことができなかった。この検体は献血者の検体であり、あらかじめHIV抗体陽性であることが分かっていたため繰り返し7回検査した結果、3回は陽性となったが、4回は検出できなかった。

既承認の定量用PCRはサブタイプEの検体は測定できないことや低く測定されることがわかっている。そこでサブタイプEに対応するプライマーを追加するadd in primer法を検討したのが図1である。11検体のサブタイプBについては既承認品とadd in primer法でRNA量の変化は見られなかったが22検体のサブタイプEに関してはRNA量が高くなった。図2はサブタイプEのHIV感染者の追跡結果である。既承認品で0日は検出限界(400 $\text{コピー}/\text{mL}$)以下で測定できず、28日後には10³ $\text{コピー}/\text{mL}$ 以下と測定できたが56日以降また測定できなくなった。add in primer法で0日、28日は10⁵

$\text{コピー}/\text{mL}$ 以上とRNA量が多いことがわかった。28日目をピークに抗ウイルス剤の効果が現われ、ウイルス量が徐々に減少して28日目で検出限界以下にまで減少した。

D. 結果

- 1) 抗体検査はWBよりも高感度である。
- 2) 抗原・抗体コンビネーション法はスクリーニング検査よりも高感度であり、抗原検査とは違い、感染期間中に陰性化することがないのでスクリーニング検査に有用である。
- 3) 遺伝子検査法のPCRやTMAは高感度であるのでウィンドウ期間を短縮する事ができるが抗体陽性検体でもウイルス量の少ない検体やサブタイプによっては検出できないことがある
- 4) PCR法のアンプリコアHIV-1 モーターは add in primer 法を使えばサブタイプEを測定できるようになる。

E. 考察

HIV検査にはそれぞれ感度や特異性に違いがある。抗体検査法でもキットにより感度差が見られる。近年、高感度な検査法や簡易検査法が望まれている。

高感度なスクリーニング法が開発され、確認法の感度が追いつかない状況である。遺伝子検査は経済的に高価であること以外に精度的な問題点も指摘されている。各々の検査の特徴を熟知して、目的に合致した検査法およびキットを選ぶ必要がある。

F. 発表論文

- 1) 吉原なみ子: HIV-1のサブタイピング 遺伝子医学、vol.2, No.1, 83-88, 1998
- 2) 吉原なみ子: HIV抗体検査法とRNA定量の臨床的意義。臨床成人病、Vol.28, No.8, 917-922, 1998
- 3) 吉原なみ子: HIV検査を巡る最近の話題。日本医事新報、No.3892, 1-8, 1998

表1 Test kits checked in NIID. JAPAN (PRB909)

| HIV-Ab tests (screening) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|----------|---------|--------------|--------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
| day | A ELISA-1 | A ELISA-2 | A ICA | B PA | B ELISA-1 | B ELISA-2 | B CLEIA | C ELISA | D ELISA | E ELISA-1 | E ELISA-2 |
| 0 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Pos | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg |
| 7 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg |
| 14 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 16 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 21 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 23 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 28 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 30 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |

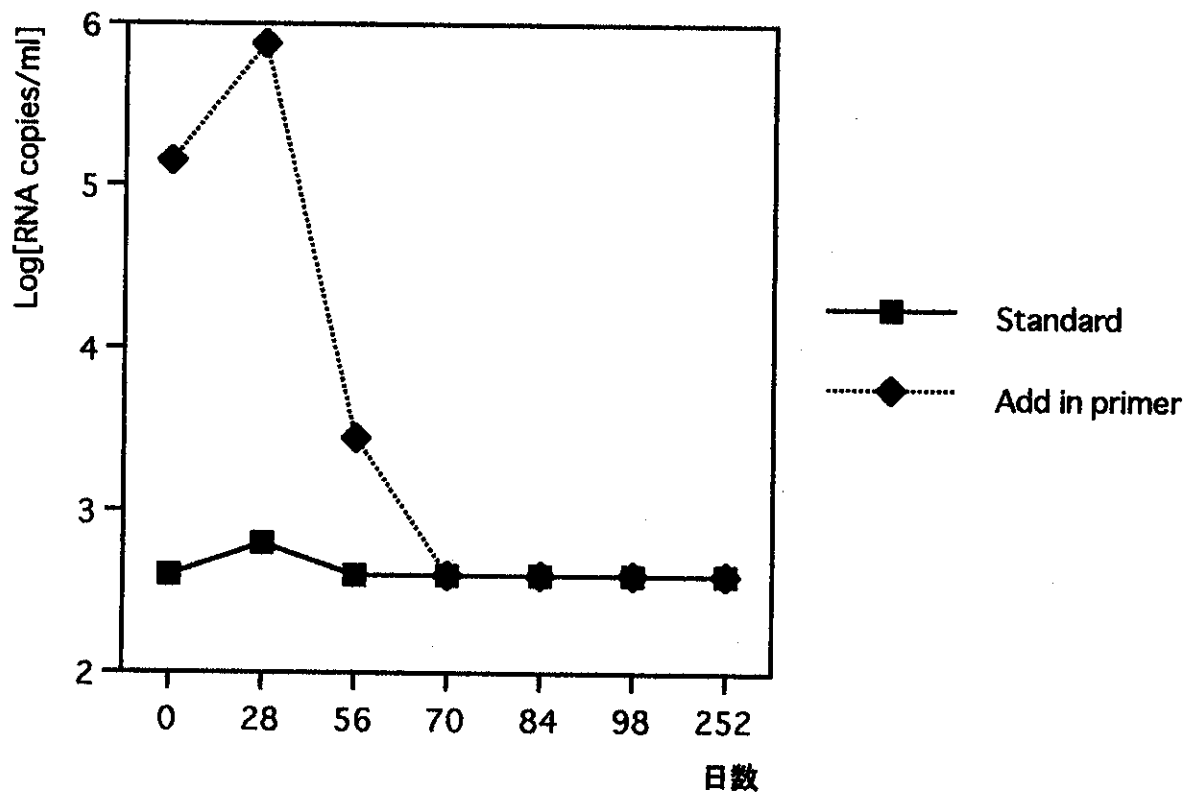
| day | HIV-Ab tests (confirmation) | HIV-Ag tests | | | | HIV-Ag+Ab tests | |
|-----|-----------------------------|--------------|------------|------------|------------|-----------------|------------|
| | H SIA | A ELISA | C ELISA | H ELISA | I ELISA | B ELISA | C ELISA |
| 0 | Neg | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 7 | IND | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 14 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 16 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 21 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 23 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 28 | Pos | Neg | Pos | Neg | Neg | Pos | Pos |
| 30 | Pos | Neg | Neg | Neg | Neg | Pos | Pos |

表2 Comparison of sensitivity with various methods by HIV-1 seroconversion samples (BBI;AJ:PRB935)

| Day | Method | | | | | | | | |
|-----|-------------|----------|-----------|-------------|----------------|----------|------------|------------|-----------------|
| | ELISA Ab | PA Ab | ICA Ab | ELISA Ag | ELISA AG+Ab | WB Ab | PCR RNA | TMA RNA | PCR in house |
| 0 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg |
| 10 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg |
| 16 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg |
| 21 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg |
| 24 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Pos | Pos | Pos |
| 28 | Neg | Neg | Neg | Pos | Pos | Neg | Pos | Pos | Pos |
| 43 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |

表3 TMAの特異性の検討

| | 検査数 | 陽性数 | 陰性数 |
|-----------|-----|-----|-----|
| HIV-1感染者 | | | |
| サブタイプB | 60 | 60 | 0 |
| サブタイプE | 33 | 32 | 1 |
| HIV-1非感染者 | | | |
| HTLV-1感染 | 3 | 0 | 3 |
| 健常者 | 16 | 0 | 16 |



standard法とAdd in primer法の比較

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)

分担研究報告書

HBV, HCV 検出のための核酸増幅法の改良と評価に関する研究

分担研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所

協力研究者 岡田義昭, 小室勝利 国立感染症研究所

血漿分画製剤の原料血漿プールのウイルス検査に遺伝子増幅法(GAT)を導入すれば製剤のウイルス学的安全性の向上が期待できる。EU では血漿プールの HCV GAT 検査が1999年7月1日から実施されることになり、日本でも実施の予定である。血液と血液製剤のウイルス学的安全性検査に用いる遺伝子増幅法の標準化に関する WHO 作業部会 (SoGAT) が組織され、1997年に WHO HCV RNA 国際標準品 (96/790, 10^5 IU/ml) が制定された。それと平行してヨーロッパでは GAT 標準化のための国際共同研究が繰り返し行われた。その結果、性質の規定された参照品は試験法の標準化を行う上で重要であると同時に、技術の習熟を促して GAT 検査の信頼性と感度の向上にも寄与することが示された。我々は、いくつかの国際共同研究と SoGAT Meeting に参加したので、本研究ではその知見もあわせて HCV RNA GAT 試験法の改良と評価について報告する。

A. 研究目的

供血血液や血漿分画製剤の原料血漿プールのウイルスマーカーのスクリーニング実施にもかかわらず、ヨーロッパでグロブリン製剤投与が原因で HCV の感染が起こった。これは、主としてウインドウ期の供血者の血液が混入していることによる。ウイルスの遺伝子増幅法 (GAT) は最も感度の高いウイルス検出法であり、原料血漿プールのウイルス検査として導入すれば血漿分画製剤の安全性の向上が期待できる。血液と血液製剤のウイルス学的安全性検査に用いる遺伝子増幅法の標準化に関する WHO 作業部会 (SoGAT) が組織され、1995年5月に NIBSC において開かれた第1回会議で、NIBSC 所長で SoGAT の座長をつとめる Schild 博士はこの部会の目的は核酸増幅法の科学的進展と標準化に関し結論を出すことであり、そのために PCR 法を用いた検査と同時に PCR 法以外にも広く使用できる性質の規定された参照品の開発が必要とされる。参照品は血液に混入したウイルスの検出検査法の標準化に寄与するであろうと SoGAT の目的を明確化した。1996年10月の SoGAT および NIBSC/EPFA 会議において HCV RNA

国際標準品の候補品の検討のための共同研究を NIBSC と CLB が組織することに決まった。EU で原料血漿プールの HCV GAT 検査実施が1999年7月1日に早まったのを受けて、1997年10月に WHO 生物学的製剤標準化専門家会議に標準品候補を提出し、“遺伝子増幅検査法のための C 型肝炎ウイルス RNA の WHO 国際標準品 (96/790)” が制定された。我が国においても原料血漿プールの HCV GAT 検査について血液製剤安全技術調査会で討議され、1999年7月1日実施予定であり、国内の参照品の作製は緊急の課題となった。

分担研究者は WHO 標準品制定のための共同研究に平行して Lelei 博士 (CLB) が責任者となって行った “World Viral Quality Control (VQC) Programme 1997 ” と NIBSC の “作業用標準品の HCV 国際標準品に対するキャリブレーションのための共同研究 (1998) ” に参加した。また、協力研究者の岡田義昭は1996年10月と1998年6月の SoGAT Meeting に参加し、GAT の標準化や標準品に関する情報を交換したので本研究では、その知見もあわせて報告する。

分担研究報告書

1. HCV RNA 国際血漿標準品のための WHO 共同研究
GAT 検査に用いるための HCV 国際標準品に適した候補品の提示。
候補品の HCV RNA 含量の決定。
2. VQC Programme
ヨーロッパにおいて血漿プールの HCV GAT 検査で求められている検出限界 400geq/ml (または 100 IU/ml) が実行可能であるかを検討する。
3. 作業用標準品の HCV 国際標準品によるキャリブレーションのための共同研究
CLB (オランダ), FDA (アメリカ合衆国), ISS (イタリア), NIBSC (イギリス)と PEI (ドイツ)の作業用標準品の HCV RNA 含量は genome equivalents (geq)/ml, PCR detectable units/ml あるいは copy numbers/ml 等さまざまな単位で表示されている。HCV RNA 含量を国際単位 (IU) で表示して GAT 検査法に関するデータを研究室間で比較検討することを可能にする。

B. 研究方法

1. HCV RNA 国際血漿標準品のための WHO 共同研究
参加者：過去2回の EUROHEP 共同研究と NIBSC 共同研究で成績の優れていた研究室、および NIBSC 標準品を用いて GAT 検査を行い信頼できる結果を得た研究室に参加を呼びかけた。

国際標準品候補品：高力価の HCV RNA を含む抗 HCV 抗体陽性血漿 140ml を 2040ml の脱クリオ血漿 (抗 HCV 抗体陰性, 抗 HIV 抗体陰性) で希釈し, 国際標準品候補品を作製した。候補品は約 10^5 geq/ml の genotype 1 の HCV を含む AA (凍結乾燥品), BB (凍結乾燥品, AA と別ロット) と CC (凍結品) の3つで, HIV, HAV, B19 の PCR 陰性。

GAT 検査実施法：参加者に各候補品を4本ずつ配布した。日を変えて4回 HCV RNA 含量の測定を行なった。定性法の場合には1回目は各試料を 10^{-1} から 10^{-7} まで7段階の10倍希釈で end-point を求め, 2回目以降は1回目の end-point をはさんで8段階の $10^{-0.5}$ 希釈でより正確な end-point を求めた。

end-point の計算：研究室/試験法毎に最尤法で end-point を求めた。計算には統計パッケージ GLIM を用いた。計算により求められた end-point は測定試料当たり平均 1 copy 存在するような希釈, すなわち測定試料の 63%が陽性となる希釈に等しい。逆転写反応効率の補正はしておらず, 必ずしも真のコピー数や genome equivalence number と等価とは限らない。

2. VQC Programme

VQC genotype 1 標準品と EUROHEP genotype 1 標準品の half-log₁₀ 希釈系列と陰性・陽性コントロールのコード番号を付けたパネル2組を参加者に配布した (参加者はコード番号のみを知らされている)。

3. 作業標準品の WHO 国際標準品によるキャリブレーションのための国際共同研究：

オランダ (CLB Pelispy HCV RNA run control, 3600 geq/ml.), アメリカ合衆国 (HCV RNA panel#1 CBER/FDA, 1000 geq/ml), イタリア (HCV-RNA ISS 0498, 2000IU/ml), イギリス (NIBSC HCV RNA PCR ref 96/596, 4000geq/ml) とドイツ (Paul Ehrlich Institut HCV ref 7, 10^5 geq/ml)) の5つの作業用標準品と WHO 国際標準品 (96/790, 10^5 IU/ml) を4本ずつ参加者に配布。参加者, 希釈法は国際標準品の共同研究に準じた。但し, 各作業用標準品の HCV 表示量に応じて1回目の試験は5段階の10倍希釈で, 2回目以降は5段階の $10^{-0.5}$ 希釈で行った。研究室/試験法ごとに得られた HCV RNA 含量の推定値 (PCR detectable units/ml) を国際標準品に対する相対値 (IU) であらわした。

C. 結果

1. HCV RNA 血漿国際標準品のための WHO 共同研究

測定法：26研究室に参加を呼びかけ, 21から結果の報告を受けた (製造業者 7, control laboratory 4, 臨床検査機関 4, reference laboratory 2, その他 4)。定性法は in house single primer が 6 研究室, in house nested 9, Roche

分担研究報告書

Amplificor 3, modified Amplificor 6, 開発中の転写を介した測定法 1 だった。

力価推定値：ほとんどの研究室は推奨した希釈法を実行し、95%信頼の推定値は 0.5-0.8log₁₀ の幅に入っていた。しかし、in house single primer のうち 3 研究室の結果は明らかに低かった。定量法は Roche Amplificor Monitor が 3 研究室, Chiron Bdna 3, Organon Teknika NASBA 1, in house 法 2 だった。定量法の推定値 (geq/ml) は定性法の推定値 (PCR detectable units/ml) より明らかに高かった。in house や市販キット等様々な方法が用いられたにもかかわらず、候補品のタイターを決めることができた。最終的な候補品の PCR detectable units/ml は AA 5.00 log₁₀, BB 5.00log₁₀, CC 4.60log₁₀ だった。

相対値：BB, CC の力価を AA に対する相対力価としてをあらわすと 95%信頼の幅は BB では 2.2log₁₀ PCR detectable units/ml が 1.2 log₁₀ units/ml に CC では 2.7log₁₀ PCR detectable units/ml が 1.2 log₁₀ units/ml に小さくなり、研究室間差が改善された。

2. VQC Programme

81 の研究室から 144 組の結果が返送された。false positive や false negative を含む 33% のデータセットを除いた、67% の信頼できるデータセットから GAT の感度を求めた。信頼のおけるデータセットは in house PCR 法では 29/49 (59%) であったが Roche Amplificor では 27/34 (79%) だった。EUROHEP 標準品の 95% 及び 50% 検出は in house PCR 法 (n=36) で 2700geq/ml と 90geq/ml, Roche Amplificor (n=27) で 3000geq/ml と 370geq/ml, Modified Amplificor (n=19) で 2200geq/ml と 70geq/ml, 全体としての 95% 検出は 3900geq/ml だった。プール血漿の HCV RNA GAT 検査のために EMEA によって提案された 400geq/ml の検出限界での PCR 陽性率は in house PCR 法で 79%, Roche Amplificor 48%, Modified Amplificor 84% だった。信頼できる研究室のデータセットの 35/95 (35%) は EMEA 提案の検出

限界に達しなかった。

次に、CLB では Organon Teknika Nucli Sens シリカ粒子 RNA 抽出法のバリディションを行った。試料 2ml から RNA を抽出し、その半量を Amplificor で増幅・検出した。EUROHEP 標準品の 95% 及び 50% 検出はそれぞれ 50 geq/ml, 4 geq/ml だった。これらの結果により改良された抽出技術を用いれば血漿プールの HCV GAT 検査で EMEA が要求する感度は達成しうることが示された。

3. 作業用標準品の WHO 国際標準品によるキャリブレーションのための国際共同研究

正式な報告書は準備中であるが、タイターの低い標準品の推定値は誤差が大きく、WHO 国際標準品にたいする相対力価で表わしても誤差は小さくならなかった。

D. 考察および結論

1. WHO HCV 国際血漿標準品 (HCV RNA plasma reference material 96/790, 10⁵ IU/ml) が制定された。(1997年)。
2. NIBSC と EUROHEP それぞれの HCV PCR Proficiency 共同研究において、参加者が報告したデータには false negative や false positive を含むものが相当数ある。信頼性の有るデータは EUROHEP 共同研究 (1992) では僅かに 16-23% であったが VQC Programme (1997) では 67% に改善された。しかし、なお 33% の結果に誤りが認められた。
3. 共同研究に参加したり、NIBSC 標準品や EUROHEP 標準品等を用いて日常的に GAT 検査を行なっている研究室では信頼性・感度が向上した。これは性質の規定された標準品をもちいた試験法のバリディションと技術の習熟が HCV-RNA 検査の信頼性・感度の向上につながることを意味しており、我が国においても WHO 国際標準品の相対力価で表示した作業用標準品の作製が必要である。
4. 二次標準品を作製する場合には試験毎に陰性、

分担研究報告書

陽性コントロールを必ず加え、信頼性のあるデータを集めて統計処理して標準品の HCV RNA の推定値 (PCR detectable units/ml) を求め、国際標準品に対する相対力価 (IU/ml) で表示する。HCV RNA 含量が低いと誤差が大きくなるのでその点も考慮しなくては行けない。国際共同研究等に参加する機会にはこの標準品を陽性コントロールの一つとして加え、国際的な評価を受けておくことも大切だ。

5. VQC Programme の結果によると in house PCR 法よりも modified Amplicor のほうが信頼性、感度ともに高い。しかし、Amplicor の HCV genotype3 の検出感度は genotype1 より 1桁低いという報告がある。この点は新しいバージョン (日本では未認可) で改善されたとのことである。採血を行う地域に普遍的な genotype に

ついて試験法毎に検討が望まれる。

6. VQC Programme では信頼できる研究室のデータセットの 35/95 (35%) は EMEA 提案の検出限界に達しなかった。技術の習熟により感度の向上を図る一方、RNA 抽出法の改良も必要であろう。

E. 研究発表

1. P. N. Lelie, H. T. M. Cuypers, A. A. J. Van Drimmelen, W. G. V. Quint and the participants in the Viral Quality Control (VQC) programme. "Quality Assessment of Hepatitis C Virus Nucleic Acid Amplification Methods. An International Proficiency Study" a special PCR issue of the German Journal "Infusiontherapie und Transfusion Medizin" 1998

分担研究報告書

第Ⅷ因子製剤の実測第Ⅷ因子活性と規格表示値の乖離に関する研究

分担研究者 福武勝幸 東京医科大学 臨床病理学
研究協力者 新井盛夫 東京医科大学 臨床病理学
渡辺 潤 東京医科大学 臨床病理学

研究要旨 血友病 A の補充療法に用いる第Ⅷ因子製剤の投与量は、製剤のパッケージに記された規格値から設定される。そこで、製剤の実測第Ⅷ因子含有量と規格値の相違を検討した。4 社から提供された4種類の第Ⅷ因子製剤、各 10 ロットの第Ⅷ因子活性を、自動血液凝固測定装置で同時測定した。各ロットの実測第Ⅷ因子含有量は、規格値の 70%から 196%と大きなばらつきを示した。各製剤ブランドの 10 ロットごとの平均値は 92%から 129%、ロット間の変動係数は 7.7%から 23.5%と大きなメーカー間差が示された。これらの結果より、適正な補充療法を行うためには、第Ⅷ因子活性測定法の標準化が必要であり、第Ⅷ因子製剤の実測力価が表示されることが望まれる。

A.研究目的

血友病 A 患者の補充療法に用いる第Ⅷ因子製剤は、250 単位、500 単位、1000 単位の3種類の規格のバイアルが市販されている。欧米では、各製剤バイアルに、これらの規格値に加えて第Ⅷ因子活性含有量の実測値が表示されている。実測値は、規格値に対してある程度の変動誤差があり、製剤の価格や補充療法の必要量は、この表示実測値を基準にして決められている。ところが本邦では、実測値は表示されておらず、パッケージに示されている規格値が補充療法のよりどころになっている。そこで今回、4 社の製剤の第Ⅷ因子活性規格値と実測値の相違と、ロット間の変動に関して検討した。

B.研究方法

第Ⅷ因子活性は、全自動血液凝固線溶測定装置 STA (F.Hoffmann-La Roche Ltd. Diagnostics Division, Basel, Switzerland)¹⁾ を用い、凝固一段法で測定した。APTT 試薬は STA 標準の APTT リキッド「BM」、塩化カルシウムは STA 標準の 25 mmol/L 塩化カルシウム、第Ⅷ因子欠乏血漿は STA 標準の STA Factor VIII (第Ⅷ因子免疫吸着血漿) を用いた。また血漿検体の希釈には STA 標準のオーレンペロナール緩衝液(pH 7.35) を用いた。

検量線作成に用いる標準物質は、STA 標準の STA ファクターキャリブレーターを使用した。また測定時には、George King Bio-Medical 社の標準血漿 FACT (Overland Park, KS, USA)、第Ⅷ因子製剤検定用の国内製剤標準品 M-01 および米国製剤標準品 Mega 1 (Office of biological research and review, Bethesda, USA)を同時に測定した。

第Ⅷ因子製剤は、コンファクト F (化学及血清療法研究所、熊本)、クロスエイト M (日本赤十字社、東京)、リコネイト (バクスター、東京)、およびコージネイト(バイエル、大阪)の4製剤を各々10ロットずつ各社から供与を受け使用した。製剤は、各社とも250単位、500単位、1000単位の3種類のパッケージが含まれていた。各製剤は添付の蒸留水のバイアルから、表示量(2.5 ml から 40 ml) をメスピペットで正確に測り取り、製剤ビンに注入して溶解した。溶解した製剤液は、室温で 10 分間静置後分注し、-80°C で凍結保存した。24 時間後、これらの凍結保存検体を、37°C の恒温槽中で 5 分間加温して融解した。続いて、オリジナルパッケージの表示単位に基づいて、第Ⅷ因子活性が 1.0 単位/ml となるようにオーレンペロナール緩衝液で予備希釈し(25 倍~100 倍希釈)、さらに血友病 A 患者血漿(George King Bio-Medical)を用い、0.5 単位/ml、0.25 単位/ml となるように希釈した。これらの検体の第Ⅷ因子活性を STA で 4 回同時測定した。2 濃度の実測第Ⅷ因子活性(U/ml)の平均値を求め、製剤溶液の総容量から実測第Ⅷ因子含有単位(U)を算出した。

C.研究結果

各社製剤全 40 ロットの、規格第Ⅷ因子単位に対する実測第Ⅷ因子含有単位の比率(%)は、70%から 196%までを示した(表 1)。各社の製剤 10 ロットの平均値は、コンファクト F では 119%、リコネイトでは 127%、コージネイトでは 129%と表示値を上回る含有量を示したが、クロスエイト M では 92%と表示値を下回っていた。また各社製剤ロット間の第Ⅷ因子含有量のばらつきは、コージネイトで変動係数 23.5%と比較的大きく、コンファクト F では変動係数 7.7%と比較的小さ

かった。今回の検討では、各製剤溶液を一度凍結、融解しているため、ある程度の第Ⅷ因子の失活を考慮する必要がある。しかし同時測定結果により、製剤メーカー間の実測第Ⅷ因子含有量の相対評価

が可能であった。製剤と同時に測定した標準血漿 FACT、国内製剤標準品 M-01 および米国製剤標準品 Mega 1 の第Ⅷ因子活性はそれぞれの規程単位濃度にほぼ一致していた。

Table 1. Ratio of assayed and labeled factor VIII content in 4 factor VIII concentrates

| Type | Plasma-derived | | Recombinant | |
|-------------|-------------------|------------------------------|-------------|----------|
| | FVIII/vWF complex | monoclonal antibody-purified | Recombinate | Kogenate |
| Brand | Confact F | Crosseight M | | |
| | 128 | 118 | 102 | 126 |
| | 116 | 82 | 158 | 104 |
| | 124 | 78 | 138 | 132 |
| | 118 | 96 | 147 | 129 |
| Potency | 120 | 72 | 110 | 196 |
| (% labeled) | 134 | 124 | 152 | 96 |
| | 122 | 94 | 118 | 130 |
| | 106 | 90 | 126 | 114 |
| | 104 | 70 | 108 | 160 |
| | 118 | 92 | 106 | 100 |
| Mean | 119 | 92 | 127 | 129 |
| SD | 9.1 | 18.0 | 20.8 | 30.3 |
| %CV | 7.7 | 19.6 | 16.5 | 23.5 |

D. 考案

製剤を初めて投与する患者や、待機的手術で計画的補充療法を計画する患者には、製剤の投与試験を行って、第Ⅷ因子活性の生体内回収率や血中半減期を計算することがある。1981年に米国の Kasper は、製剤の第Ⅷ因子表示値を基準にすると、製剤のメーカーにより生体内回収率が40%前後異なることを指摘していた²。この原因として、製剤の第Ⅷ因子含有量が、製剤メーカーが測定して表示した値よりも20-35%低いものがあることが示され^{3,4,5}、大きな問題となった。このように、実測値が製剤メーカー間でばらつく原因は、メーカーの品質管理における第Ⅷ因子活性測定法の標準化がなされていないことが指摘された。その後、WHOの第Ⅷ因子製剤国際標準品⁶やそれを原器とした2次製剤標準品を製剤の力価測定に用いることが推奨され⁷、欧米の第Ⅷ因子製剤の

表示力価の信頼性が高まった⁸。

標準化においては、標準物質に加えて、検体の希釈液、測定時の第Ⅷ因子欠乏血漿の種類が重要である。今回検討した製剤メーカーの第Ⅷ因子活性測定法における、標準物質、基質、希釈液は、表2に示すように各社で異なっていた。標準物質に関しては、各々、国際標準品から力価検定された2次標準品であるが、Mega 1、M-01、プールコンファクト F の組成はそれぞれ異なる。凝固一段法の測定の基質として用いる第Ⅷ因子欠乏血漿に関しては、免疫吸着血漿あるいは血友病 A 患者血漿が用いられている。リコンビナント製剤やモノクローナル抗体精製製剤の測定時に免疫吸着血漿を使用すると、血友病患者血漿を使用したときに比較し、見かけ上活性値が低く出ることが報告されている⁹。

Table 2. Conditions of one-stage assay for factor VIII activity

| Manufacturer | Kaketsuken | Japanese Red Cross | Baxter | Bayer | Tokyo Medical University |
|------------------|--|--|---|--------------------------------------|--|
| Brand | Confact F | Crosseight M | Recombinate | Kogenate | |
| Standard | Pooled Confact F | M-01 | Mega 1 | Mega 1 | STA factor calibrator, M-01, Mega 1 |
| Plasma substrate | Immuno-depleted plasma | Immuno-depleted plasma | Immuno-depleted plasma or hemophilic plasma | hemophilic plasma | Immuno-depleted plasma |
| Diluent | 1% albumin, Owren Veronal buffer (pH 7.35) | 1% albumin, Owren Veronal buffer (pH 7.35) | hemophilic plasma | 1% albumin, Tris-HCl buffer (pH 7.4) | Owren Veronal buffer (pH 7.35) and hemophilic plasma |

また、測定検体の希釈には、メーカーにより、1%アルブミン加緩衝液か血友病 A 患者血漿が使われている。リコンビナント製剤やモノクローナル抗体精製製剤は、希釈に緩衝液を用いたときにはコンファクト F のような第Ⅷ因子/von

Willebrand 因子(vWF)複合体製剤に比較して、見かけ上活性値が低く出ること知られている^{10,11}。これらの欠乏血漿や希釈液により測定値が変動する問題は、製剤の vWF の含有量に依存しており、vWF の少ない製剤ほど希釈液や基質で

vWF を補うことで、より正確な活性値を得ることができる。以上のように、各メーカーの第Ⅷ因子活性測定法は統一されていないことが示された。今回の検討では、製剤中の vWF 含有量の違いによる影響を少なくするために、2 次希釈に血友病 A 患者血漿を用いて検体中の vWF を補って行った。

乾燥人血液凝固第Ⅷ因子製剤中の第Ⅷ因子活性の含量規格は、生物学的製剤基準（厚生省）¹²の中で規定されている。本基準は 1993 年に改訂され、それ以前には、実測第Ⅷ因子活性含有量は製剤の「表示値以上」（すなわち規格値以上）とされていたものが、現在では「表示値の 80%以上」となっている。第Ⅷ因子製剤の第Ⅷ因子活性測定は精度管理が難しく、施設間の測定再現性が低いことが指摘されてきた¹³。現在の生物製剤基準では-20%の測定変動幅が勘案されていると思われる。しかし上限値は規定されていないので、各社の製品管理上の方針により、余剰量を含む製剤ロットが出庫される可能性がある。実際、製剤ロットの中には表示値の 150%から 200%近い第Ⅷ因子活性を含むものもあり、250 単位、500 単位、1000 単位のパッケージングの違いに相当するほどのばらつきがあった。

ロットごとの力価の変動は、製造工程により、ある程度は容認せざるをえない。そのため欧米では、各製剤バイアルに実測値が示されており、製剤の価格や補充療法の必要投与量は、この実測表示値を基準として決められている。わが国で用いられている第Ⅷ因子製剤は、規格の単位量が表示されているだけである。今回の検討で判明したのは、これらの規格と実測値が乖離しているものが多く、メーカーごとにロット平均値やロット間差が異なることであった。製剤パッケージの表示値は、血友病患者の日常診療において補充療法の基盤になっている。したがって、適切な補充量を設定しても、使用する製剤のメーカーやロットにより、実際の血中第Ⅷ因子活性は、治療域に達さないことや、反対に過剰になることも考えられる。

E. 結論

製剤の第Ⅷ因子含有量に信頼性が乏しいことは、治療において患者の不利益を招く可能性があり、血友病治療者にとっても、適正補充量を設定する意義が損なわれることになり、看過できない問題である。また第Ⅷ因子製剤の薬価が非常に高価（1000 単位で約 8 万円）であることを考慮すると、過剰量を含む製剤に関しては、薬剤資源の大きな空費にもつながる。

今後は、各社の第Ⅷ因子活性測定の標準化を推進する必要があり、各製剤ロットごとの実測力価が製剤バイアルに明示されることが望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

新井盛夫、渡辺 潤、福武勝幸:第Ⅷ因子製剤の実測第Ⅷ因子活性と規格表示値の乖離。日本血栓止血学会誌掲載予定 1999

2. 学会発表

なし

G. 謝辞

今回の研究の趣旨をご理解の上、第Ⅷ因子製剤を提供していただいた、化学及血清療法研究所、日本赤十字、バクスター、バイエルの各社に感謝いたします。

H. 文献

- ¹ Dufraisse J:全自動血液凝固線溶測定装置 STA について.機器・試薬 17:1075-1078, 1994
- ² Kasper CK: Problems with the potency of factor VIII concentrate. N Engl J Med 305:50-51, 1981.
- ³ Austen DEG, Rhymes IR, Rizza CR: Factor VIII concentrates: what the label says. Lancet 21:1167, 1981.
- ⁴ Rock G, Tittley P, Fuller V: An in vivo assessment of factor VIII concentrates. JAMA 254:777-780, 1985
- ⁵ Over J: Quality control of the one-stage factor VIII (VIII:C) assay in the coagulation laboratory. J Scand Haematol 33 (suppl 41):89-100, 1984
- ⁶ 三浦泰裕:生物学的製剤の標準品の制定—血液凝固因子を中心に—.輸血会誌 44:465-472, 1998
- ⁷ Aronson DL, Thomas DP: The control and standardization of factor VIII. J Scand Haematol 33 (suppl 41):71-78, 1984
- ⁸ Lusher JM: Factor VIII concentrates: Matching what you see with what you get. JAMA 254:802-803, 1985
- ⁹ Dawson NJ, Kembal-Cook G, Barrowcliffe TW: Assay discrepancies with highly purified factor VIII concentrates. Haemostasis 16:131-137, 1989
- ¹⁰ Lee ML, Magalang EA, Kingdon HS: An effect of predilution on potency assays of factor VIII concentrates. Thromb Res 30:511-519, 1983
- ¹¹ Mikaelsson M, Oswaldsson U: Standardization of VIII:C assays: A manufacturer's view. J Scand Haematol 33 (suppl 41):79-86, 1984
- ¹² 生物学的製剤基準.細菌製剤協会.厚生省薬務局監修. 1993
- ¹³ Lusher JM, Ofosu FA, Edson JR, Joist JH, Chavin SI, Weiss AE, Hillman CRL: North American study of factor VIII concentrate potency, in Blombäck M (ed): New Frontiers in Hemophilia Research. Scand J Haematol 33 (suppl 40):149-160, 1984

血小板抗体の検出についての研究

分担研究者 柴田洋一 東京大学医学部附属病院輸血部教授

研究要旨 血小板輸血は単位数では本邦で一番使用頻度が高くなっている。しかしながら、血小板輸血での副作用頻度は高く、中でも血小板抗体が患者に生じると悪寒・発熱および血小板破壊による血小板輸血の無効を将来する。従って、血小板抗体の検出は重要である。血小板は遠心分離操作で活性化することが、検査での偽陽性、偽陰性の原因になることが問題となっていた。今回の研究で、血小板分離を遠心荷重を限界まで下げることにより、血小板活性化を抑制することにより、血小板抗体検査の精度が向上することを確認した。

A. 研究目的

近年、血小板輸血の需要は増大している。その理由は、白血病などの造血器腫瘍や悪性腫瘍に強力な化学療法が実施されており、その副作用としての骨髄抑制による血小板減少に対して血小板の予防的投与が有効であるためである。事実、血小板輸血が普及する以前には、血小板減少による出血死が見られたが、現在では稀である。また、造血幹細胞移植（骨髄移植、末梢血幹細胞移植）が盛んになってきたことも血小板輸血の増大の原因になっている。

しかしながら、輸血副作用の報告の中で血小板輸血の副作用はその頻度が高い。血小板輸血の副作用の中で血小板抗体（HLA抗体と血小板特異抗体）が原因となっているものは重要で、悪寒・発熱および血小板の破壊による血小板輸血の無効を招来する。私は血小板抗体の検出を試み、混合受身凝集法（mixed passive hemagglutination：MPHA）を開発した。本法は実用的な簡便な方法であるが標的となる血小板の分離・固相法につい

ては以下に述べる未解決な点があった。

1. 血小板は遠心分離法により活性化し膜の形態が変化する。
 2. 活性化した血小板を固相し、標的にすると非特異的な反応や偽陰性反応を生じる。
- 今回の研究では如何にして、生体内に存在する血小板の形態に近い状態で、分離固相出来るかその条件を検討した。

B. 研究方法

血小板抗体検出にはMixed Passive Hemagglutination（MPHA第9版）を用いた。

1. 血小板の分離・固相条件の検討
 - 1) 当日血を使用し、ACD-A液を用いて採血する。
 - 2) 458xg（1,600rpm）10分間遠心してPRPを得る。
 - 3) 1mlのPRP量に15%量のACD液を加え258xg（1,200rpm）10分間遠心する。
 - 4) 得られたPlatelet Concentrate（PC）をPBS（PBS:final pH