

2) 非感染者、感染者および死亡者別の血友病重症度分類による患者分布

	非感染	感染生存	感染死亡
血友病 A	76	58	23
重症	40 (53%)	48 (83%)	17 (74%)
中等症	17 (22%)	6 (10%)	5 (22%)
軽症	19 (25%)	4 (7%)	1 (4%)
血友病 B	25	19	8
重症	9 (36%)	17 (89%)	5 (63%)
中等症	11 (44%)	2 (11%)	1 (13%)
軽症	5 (20%)	0	1 (13%)

非感染者、感染者および死亡者に分けて、血友病の種類と重症度別の構成割合を見ると、HIV の感染者では重症型の割合が高いことが明らかであった。

3) 出生年次別の検討

出生年を 1926 年以降 5 年毎に区切り、各区分に生まれた患者の状況を下記の表 (1) から (5) にまとめた。

(1)

出生年	-1925	-1930	-1935
総患者数	6	8	11
HIV 感染者	2	5	5
同死亡者数	2	3	3
生存患者数	4	5	8
HCV 感染者	5	6	8
非加熱使用	6	7	8
HIV 感染率	33%	71%	63%
HIV 死亡率	100%	60%	60%
HCV 感染率	83%	75%	73%
非加熱製剤使用率	100%	88%	73%

(2)

出生年	-1940	-1945	-1950
総患者数	8	11	18
HIV 感染者	2	4	13
同死亡者数	2	3	4
生存患者数	6	8	14
HCV 感染者	6	11	15
非加熱使用	6	9	18
HIV 感染率	33%	44%	72%
HIV 死亡率	100%	75%	31%
HCV 感染率	75%	100%	83%
非加熱製剤使用率	75%	82%	100%

(3)

出生年	-1955	-1960	-1965
総患者数	16	23	33
HIV 感染者	7	9	26
同死亡者数	1	1	5
生存患者数	15	22	28
HCV 感染者	15	22	33
非加熱使用	14	21	33
HIV 感染率	50%	43%	79%
HIV 死亡率	14%	11%	19%
HCV 感染率	94%	96%	100%
非加熱製剤使用率	88%	91%	100%

(4)

出生年	-1970	-1975	-1980
総患者数	25	30	13
HIV 感染者	16	14	6
同死亡者数	4	0	1
生存患者数	21	30	12
HCV 感染者	24	29	12
非加熱使用	24	28	11
HIV 感染率	67%	50%	55%
HIV 死亡率	25%	0%	17%
HCV 感染率	96%	97%	92%
非加熱製剤使用率	96%	93%	85%

(5)

出生年	-1985	1986-	
総患者数	4	6	
HIV 感染者	1	0	
同死亡者数	1	0	
生存患者数	3	6	
HCV 感染者	3	0	
非加熱使用	4	0	
HIV 感染率	25%	0%	
HIV 死亡率	100%	0%	
HCV 感染率	75%	0%	
非加熱製剤使用率	100%	0%	

出生年次別にみると、非加熱製剤の使用率と HCV の感染率については 1985 年以前の出生者では各年代区分毎に大きな差は認められなかったが、HIV の感染率は 1950 年代 1960 年代に出生した患者に高く、死亡率は 1945 年以前に出生した高齢の患者に高かった。

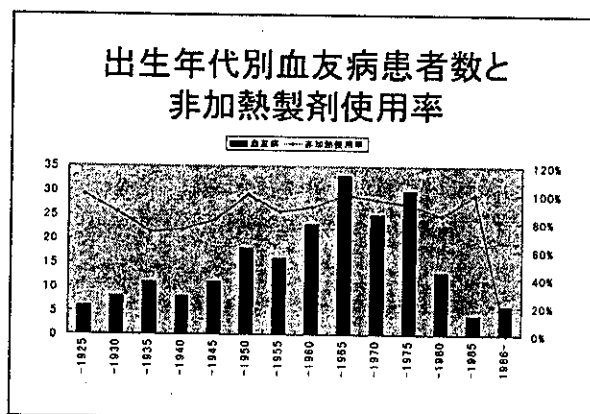
4) 死亡年次別の死亡者数の推移

年	死亡数	年	死亡数
1985	1	1992	1
1986	1	1993	3
1987	1	1994	5
1988	0	1995	4
1989	2	1996	2
1990	5	1997	0
1991	5	1998	0

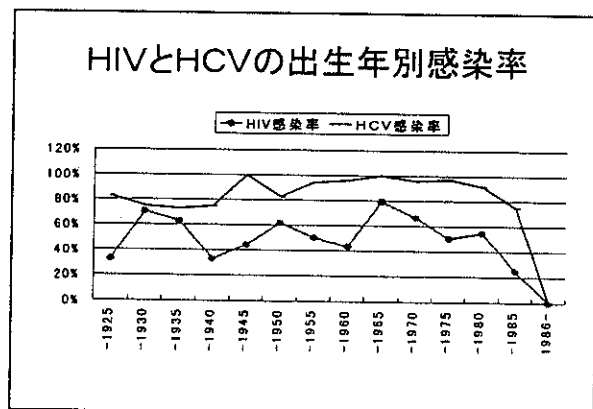
死亡者の推移を死亡年次別にみると、下記の表に示すように死亡者は 1990 年に向けて増加し、その多くが 1990 年代の前半に集中しており、1997 年以降は認められなくなった。

#### D. 考案

当院では主に成人血友病患者の診療を行なっているため、患者を出生年別に分類すると未成年者の割合が非常に少ない。このため、下図に示すように非加熱製剤の使用率は 1985 年出生の患者まで大きな変化は認められないが、非加熱製剤を用いた最年少患者は 1983 年出生の血友病 B 患者であり、HIV に感染した最年少者は 1981 年出生の血友病 B 患者であった。



HCV の感染率は下図のように 1985 年までの出生群までも高率を示し続けているが、HIV の感染率は 1965 年までの出生群で 80% と高い感染率を示したが、その後 1970 年代の出生者からは低下傾向を示しており、HCV の感染とは明らかに異なる感染態度を示している。



血友病の重症度分類からみると HIV の感染には重症型の患者が多く、高頻度に血液製剤の投与を受けていた可能性が高い。HIV の存在が知られる以前の 1970 年代に入ってから感染率が低下していることは、感染の条件として血液製剤への暴露量が増加するまでの期間が必要であったことを示すものと推測される。1980 年代当初に多くの患者が感染したと考えられているが、約 10 年を経た 1990 年代に入り死亡者が増加した。し

かし、その後の日和見感染症の治療法の進歩と抗 HIV 療法の急速な進歩が加わり死亡者を減らすことが出来た。

#### E. 結論

非加熱製剤使用者の HIV 感染率は、血友病 A で 60.9%、血友病 B で 62.8% であった。HCV の感染率は非加熱製剤使用者では、血友病 A で 96.2%、血友病 B で 95.3% であり、HIV と比べて著しく高率であった。非加熱製剤の非使用者でも、HCV の感染は血友病 A で 54.2%、血友病 B で 33.3% であり、輸血やクリオプレシピテートからの感染も高率であったと考えられる。非感染者、感染者および死亡者に分けて、血友病の種類と重症度別の構成割合を見ると、HIV の感染者では重症型の割合が高いことが明らかであった。出生年次別にみると、非加熱製剤の使用率と HCV の感染率については 1985 年以前の出生者では大きな差は無かったが、HIV の感染率は 1950 年代 1960 年代に出生した患者に高く、死亡率は 1945 年以前に出生した患者に高かった。また、死亡者は 1990 年代前半に集中しており、1997 年以降は見られなくなった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

#### G. 文献

福武勝幸、上田良弘、立浪忍 他；血液凝固因子製剤によるヒト免疫不全ウイルス感染者の死亡数年次推移と死因の解析（1983-1997）、臨床血液、40、550-555、1999。

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

血小板輸血の有効性向上に関する研究

分担研究者

柴田洋一

東京大学医学部輸血部教授

研究要旨 血小板輸血は単位数では一番普及している。しかしながら血小板輸血での有効性については不確実な点が多い。近年、血小板製剤には白除フィルターが使用され又、放射線照射が実施されており以前と状況が異なって来ている。

同種免疫が深く関与していることが推定されているが、血小板抗体の捕捉は十分でなかった。今回の研究で、当院で血小板輸血を最も使用する血液疾患や固形癌患者で、3回以上血小板輸血を受けた患者100人で血小板輸血の有効性について検討した。

今回の研究から（1）血小板輸血患者では86%が有効な血小板輸血で残り14%が血小板輸血は無効に終わっていた。（2）9%の患者に血小板抗体が検出された。

（3）血小板抗体が陰性で血小板輸血不応状態になっている患者は9%であった。

A. 研究目的

血小板製剤は我が国では単位数換算で最も使用量が多く、輸血回数も年間約70万回（バッグ）にのぼっている。また、世界で一番アフェレーシス由来の血小板製剤の割合が高く（97%）有効な血小板輸血を実施しうる環境にある。しかしながら、血小板輸血の有効性については不確実な点が多い。近年、血小板輸血には白除フィルターが使用されていること及び、血小板製剤に放射線照射が実施されていることの影響が加わり、以前と状況は変化している。

今回の研究では（1）血小板輸血の有効性がどの程度確保されているか。（2）血小板輸血不応状態の患者がどの位いるのか。（3）血小板抗体の陽性者がどの位いるのか。以上を検討した。

B. 研究方法

・対象：血小板輸血を3回以上受けた内科患者100人を対象にした。

原疾患の内訳は白血病41人、悪性リンパ腫8人、再生不良性貧血8人、多発性骨髄腫3人、特発性血小板減少性紫斑病3人、肝癌およびその他の固形腫瘍患者等37人

男性63人、女性37人

- ・血小板輸血の効果判定：これらの患者について血小板輸血の効果を補正血小板増加率（CCI）の式で判定した。輸血後の血小板数は翌日（18時間後）の結果を用いた。CCI値が4、500以下を無効、以上を有効と判定した。
- ・血小板抗体の検出：患者の保存血清についてレトロスペクティブに混合受身凝集法（MPHA法）とリンパ球細胞毒性試験（LCT法）で検出した。

C. 研究結果

表1参照

- 1) 補正血小板増加率（CCI）で判定すると100人中86人の患者で有効と判定された。
- 2) 無効と判定されたのは14人だった。
- 3) 無効と判定された中で血小板抗体陽性者は5人、抗体陰性者は9人であった。
- 4) 有効と判定された中に血小板抗体陽性者が4人いた。
- 5) 100人のうち抗体陽性者は9人であった。
- 6) 9人の抗体の特異性は8人は抗HLA抗体残りの一人は抗HPA-2b+抗HLA抗体であった。

- 7) 9人の抗体陽性者のうち男性が6人、女性が3人であった。
- 8) 9人の抗体のうち、MPHA法では全例検出できたが、LCT法では3例しか検出できなかった。
- 9) 抗体陽性者の原疾患は白血病3人、悪性リンパ腫2人、再生不良性貧血、多発性骨髄腫、その他2人であった。

#### D. 考察

血小板輸血がどのくらいの割合で有効と判定されるかについてはあまり報告はない。

外科患者で血小板数が $5万/\mu l$ 以下の場合、血小板輸血の適応になるが、通常は一回きりであり血小板輸血の効果はあがっていると推測される。しかし、血小板製剤の8-9割は内科患者ことに血液疾患、悪性腫瘍患者であり、頻回に投与することが多い。血小板輸血による同種免疫については、白血球除去フィルター使用によって血小板製剤中に含まれるリンパ球を大幅に減少させることにより抗HLA抗体の産生が抑制される。我々のデータでも15年前は頻回の血小板輸血患者では約45%の患者で同種抗体(主として抗HLA抗体)が生じていたが、現在では今回のデータのように9%と約 $1/5$ に抗体の産生は抑制されるようになった。

今回のデータからは86%が有効と判定され白血球除去フィルター使用以前よりかなり有効率は上昇したと考えられた。血小板抗体陽性者9人のうち6人が男性で3人は女性で、母集団の男女比と比例していた。女性は妊娠で抗体を産生した可能性も否定できないが、男女の抗体産生率が同じであることから、白血球除去フィルター使用が普及しているがなお抗体の産生が避けられないことを示している。抗体陽性者に疾患の片寄りはない。このレトロスペクティブな検討の後、抗体陽性で血小板輸血が無効であった3人の患者がHLA適合血小板の輸血を

受けているが、いずれも有効でありHLA適合血小板の有効性を再確認した。抗体陽性者で血小板輸血が無効になった患者では、HLA適合血小板が早急に供給される必要がある。有効と判定された患者で4人抗体陽性者がいたが、これらの患者はまだ少数の人々にしか反応しない抗体をもっていたと推定される。いずれ幅の広い抗体になり無効症例になる予備軍と思われる。リンパ球細胞毒性試験(LCT法)は補体結合抗体のみしか検出できず感度がMPHA法に比較して低いことが判明した。抗体陰性で血小板輸血が無効例では、1) 検出限界以下の抗体があり無効に終わっているのか。それとも2) 発熱、感染、出血、DIC、脾腫など他に血小板が上昇しない理由があるのか今後、症例毎に検討が必要と思われた。

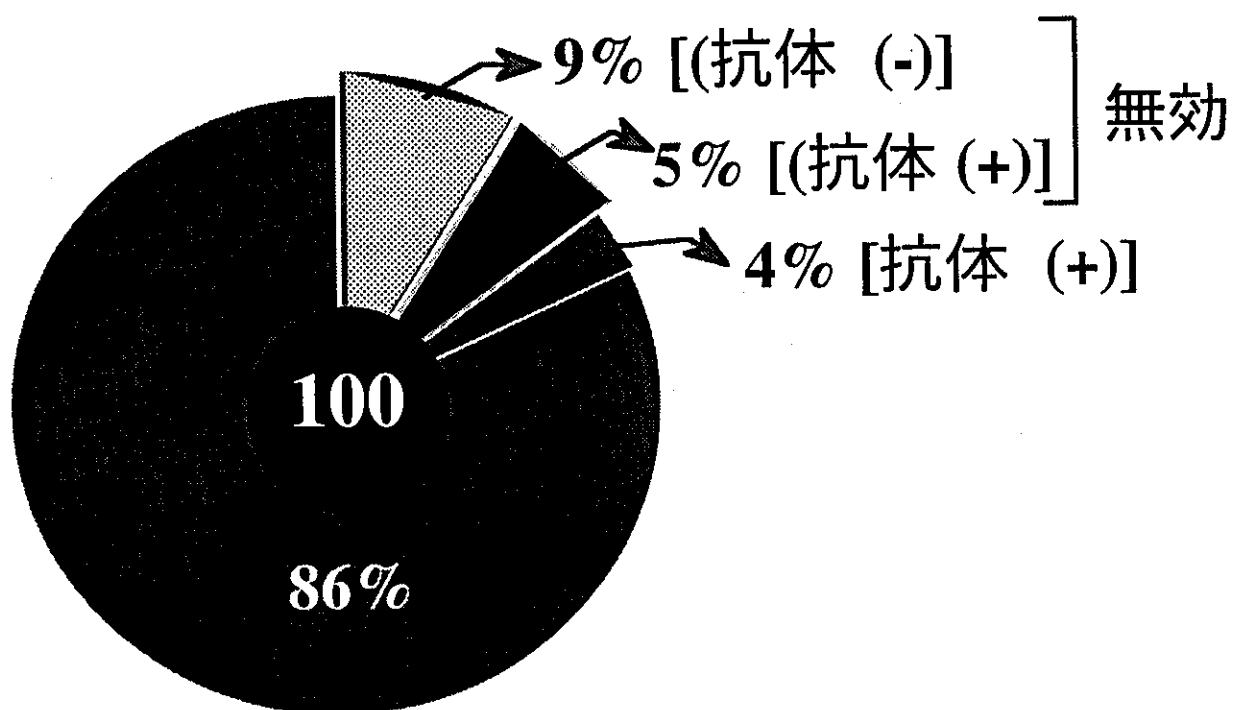
#### E. 結論

今回の血小板輸血の有効性の検討で有効症例は86%であった。白血球除去フィルターを使用するようになり明らかに血小板輸血の有効症例が増加してきた。今回の検討で血小板抗体の患者での産生率が白血球除去フィルター使用前の $1/5$ になっていることが判明した。現在の14%の無効症例は赤血球輸血と比較すればまだまだ比率が高いので、さらに血小板輸血の有効性を追求する必要がある。

(表1)

## 血小板輸血の有効性

(3回以上血小板輸血を受けた患者)



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Saeki H, Nakagawa H, Asahina A, Tamaki K, Shibata Y, Kuwata S: Polymorphisms of HLA-DM genes in Japanese patients with psoriasis vulgaris British Journal of Dermatology.141:113-115, 1999

Tomozawa S, Nagawa H, Tsuno N, Hatano K, Osada T, Kitayama J, Sunami E, Nita ME, Ishihara S, Yano H, Tsuruo T, Shibata Y and Muto T: Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522 British Journal of Cancer 81(8):1274-1279, 1999

Fujiwara K, Watanabe Y, Mitsunaga S, Oka T, Yamane A, Akaza T, Tadokoro K, Tokunaga K, Shibata Y, Juji T: Determination of Granulocyte-Specific Antigens on Neutrophil Fc  $\gamma$  Receptor IIIb by PCR-preferential Homoduplex Formation Assay, and Gene Frequencies in the Japanese Population Vox Sanguinis 77: 218-222,1999

Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T: Expression of Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor Correlates with Good Prognosis in Patients with Colorectal Carcinoma Cancer 88(1):42-49,2000

厚生省血液研究事業  
血液製剤の試験法・評価法に関する研究班

平成11年度 分担研究報告

分担研究計画  
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

分担研究者	池田久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	池淵研二	北海道赤十字血液センター	副所長
	阿部英樹	同上	研究部
	平山順一	同上	研究部
	加茂直樹	北海道大学大学院薬学研究科	教授

研究要旨

血液凝固第VIII因子 (FVIII) 製剤中ヒトパルボウイルスB19 (B19) の、UVC照射による不活化について検討した。B19はUVC照射量依存的に不活化され、B19感染性は2,000 J/m<sup>2</sup>照射では検出限界以下となった。一方FVIII活性は、UVC 2,000 J/m<sup>2</sup>照射により、照射前の55-60%に低下した。しかし、ルチン (1 mM) の添加により90%以上の活性を維持することができた。この結果から、本方法はFVIII製剤の安全性をより高めるのに有用であることが示唆された。

A. 研究目的

現在の血漿分画製剤の残された課題の一つは、S/D処理および加熱処理に耐性を持つヒトパルボウイルスB19 (B19) の不活化である。これまでUVC照射により、B19のモデルウイルスであるブタおよびイヌパルボウイルスが不活化されることは示されている。今回、モデルウイルスではなくB19を用い、UVC照射による第VIII因子 (FVIII) 製剤中のB19の不活化とFVIII活性への影響を検討した。UVC照射によりFVIII活性が低下したことから、その保護剤についても検討した。

B. 研究方法

B19懸濁液は、B19陽性血漿を遠心分離し、得られた沈渣をPBSに懸濁して調製した。FVIII製剤と同一組成の溶液にB19を添加し、UVC (254 nm) を時間を変えて照射した。B19感染性は、CFU-Eを用いた間接蛍光抗体法により測定した (昨年の本研究班で報告)。FVIII製剤は1 U/mlに希釈し、UVCを照射した。FVIII活性は、凝固法により測定した。ルチン存在下でUVC照射し、FVIII活性を測定した。

C. 研究結果

B19はUVC 750 J/m<sup>2</sup>照射で3 log<sub>10</sub>不活化され、1,000および2,000 J/m<sup>2</sup>では検出限界以下となった。標的理論により2,000 J/m<sup>2</sup>では8 log<sub>10</sub>の不活化が得られると考えられた。一方FVIII活性は、UVC 2,000 J/m<sup>2</sup>照射により、照射前の55-60%に低下した。しかし、ルチン (1 mM) の添加により90%以上の活性を維持することができた。

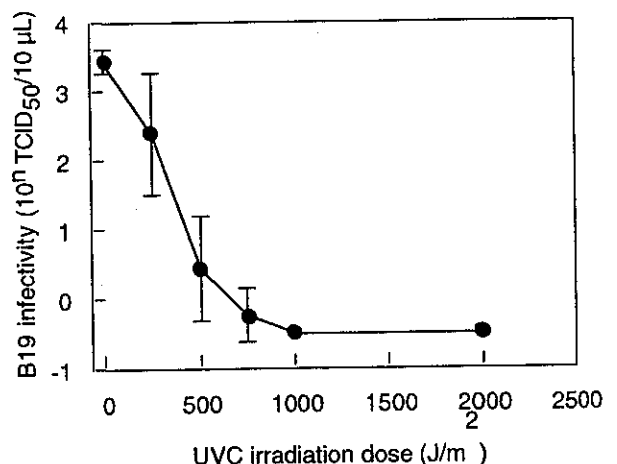


図1. UVC照射によるパルボウイルスB19の不活化。

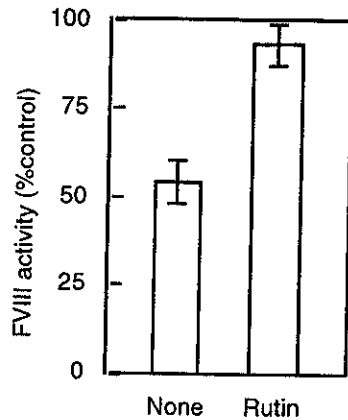


図2. UVC照射後のFVIII活性およびルチンの影響。

#### D. 考察

B19に対するRHAスクリーニング検査導入後、血漿分画製剤原料血漿に混入するB19の量は激減し、 $10^{4.8}$ コピー/20 $\mu$ Lと報告されている。さらにFVIII製剤製造過程でも3 log程度のB19除去が見込まれるとされている。これらのことから、最終製品に近い段階でUVC処理工程を組み込むことにより、FVIII製剤からB19感染性をほぼ完全に除去できると考えられた。

#### E. 結論

UVC 2,000 J/m<sup>2</sup>照射することにより、B19を3.7 log<sub>10</sub>不活化できることが示された。FVIII活性は1 mMルチンの添加により保護することが出来たことから、本方法はFVIII製剤の安全性をより高めるのに有用であることが示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当無し。
2. 学会発表  
該当無し。

#### G. 知的所有権の取得状況

該当無し。



# 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 TT Virus (TTV) の挙動について

分担研究者 日本赤十字社血漿分画センター 脇坂 明美  
研究協力者 日本赤十字社血漿分画センター 前野 英毅 古谷 健志 泉 浩業  
猪股 秀昭 室塚 剛志

## 研究要旨

モノクローナル抗体精製人血液凝固第 VIII 因子製剤 (クロスエイト M, 日本赤十字社) の製造工程における TTV の挙動を確認するために、seminested-PCR 法によりクロスエイト M 実製造工程液における TTV-DNA の検出を試みた。その結果、測定した原料血漿<sup>7</sup>全てに TTV-DNA が検出され、<sup>7</sup>の溶解液、脱フィブリン後液、S/D 処理後液までは TTV-DNA が検出されるロットがみられた。ところが、モノクローナル抗体精製工程 (モノアフィニティカマクグラフィー工程) 以降では TTV-DNA が検出されず、最終製品 10 ロットは全て TTV-DNA 陰性であった。そこで、モノアフィニティカマクグラフィー工程が TTV-DNA 除去に効果的であると考え、糞便より抽出した TTV (TTV-DNA 濃度  $10^5$  PCR 単位/ml) をこの工程前液に 1/20 量添加し、TTV の除去効果を観察した。その結果、この工程における対数減少率 (Logarithmic Reduction Value : LRV) は  $>2.6$  であり、モノアフィニティカマクグラフィー工程が TTV 除去に有効な工程の一つであることが明らかになった。

## A. 研究目的

TTV は 1997 年に真弓らのゲル<sup>7</sup>により発見され、非 A-G 型肝炎を引き起こし得るウイルスとして注目されている<sup>1)</sup>。献血者における TTV-DNA 陽性率は世界的に高頻度 (日本人献血者では 12%<sup>1)</sup>) であり、血漿分画製剤の原料血漿<sup>7</sup>は TTV-DNA が陽性となる確率が高い<sup>2)</sup>。また、血友病患者の TTV-DNA 陽性率は高く、ある種の血液凝固第 VIII 因子製剤には TTV-DNA が検出されると報告されている<sup>2), 3), 4)</sup>。一方、TTV は一本鎖 DNA をゲルとするノエンバロー<sup>7</sup>ウイルスであるが<sup>1)</sup>、この様なウイルスは一般的に不活化や除去が難しいと考えられている。そこで、本研究ではクロスエイト M 製造工程における TTV の混入状況及び除去状況の確認を行うこととした。

## B. 研究方法

### B-1 工程液

TTV-DNA 検出に関わる全ての工程液は、クロスエイト M の実製造における工程液を用いた。

### B-2 工程液に添加した TTV

TTV ジェノタイプ 1a の DNA 陽性者の糞便を簡易精製<sup>5)</sup>して得られた TTV 液 (TTV-DNA 濃度が  $10^5$  PCR 単位/ml) をモノアフィニティカマクグラフィー工程前液に 1/20 量添加した。なお、TTV 液は自治医科大学 真弓教授より譲り受けた。

### B-3 モノアフィニティカマクグラフィーの TTV 添加縮小実験

TTV 添加縮小実験は実製造の 2150 分の 1 スケルで行い、<sup>7</sup>操作は全て実製造と同様に行った。実験は 2 回独立に行い、測定用検体は採取後直ちに凍結した。

#### B-4 TTV-DNA の測定

測定検体 50 $\mu$ l よりマテイト EX R&D (住友金属) を用いて DNA を抽出後、半量を Okamoto らの報告に従った seminested-PCR 法にて増幅した<sup>1)</sup>。ファスト PCR には、7 $^{\circ}$ ライマーとして NG059(sense:5'-ACAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3')と NG063(antisense:5'-CTGGCATTTCACATTTCCAAAGTT-3')を用い、カット PCR には、NG063 と NG060 (sense:5'-GGCAACATGTTATGGATAGACTGG-3')を用いた。増幅産物は電気泳動法により検出同定した。

#### B-5 TTV-DNA 濃度の測定

測定検体より TTV-DNA を抽出後、グリコゲン溶液 (2ng/ml) を用いて希釈系列を作製し、1希釈産物につき2~4回の増幅と検出を行い、50%の検出率を示す希釈倍数を Behrens-Kärber 法<sup>6)</sup>により算出した。また、50%の検出率における TTV-DNA 濃度を 1PCR 単位/ml と定義し、測定検体原液における TTV-DNA 濃度 ( $10^n$  PCR 単位/ml) を求めた。

#### B-6 TTV-DNA 総量の算出

TTV-DNA 総量は、TTV-DNA 濃度と TTV-DNA 濃度を測定した工程液量の積で表した。測定検体原液において 100%の検出率が得られなかった場合には TTV-DNA 総量を「 $\leq 10^n$  PCR 単位」と表した。ただし、表 2 の表記については、測定検体原液において TTV-DNA が検出された場合には「 $\leq 10^n$  PCR 単位」、検出されなかった場合には「 $< 10^n$  PCR 単位」と区別して表記を行った。

#### B-7 TTV 添加回収実験

各工程液間で TTV-DNA の検出感度に差が見られないことを確認するために、糞便より簡易精製した TTV-DNA 濃度が  $10^5$  PCR 単位/ml の TTV を各工程液に 1/10 あるいは 1/20 量添加し、添加した TTV 原液の TTV-DNA 濃度を各工程液について求め、各工程液間でその濃度を比較した。

#### C. 研究結果

##### C-1 加工用 M の原料血漿における TTV-DNA の検出

1ロットの加工用 M は、約 13000 人分の7 $^{\circ}$ -血漿 (パック血漿) から得られるクオアプレシテートをさらに数パック合わせて製造されている。ある3ロットの加工用 M を構成する 13 のパック血漿を seminested-PCR で TTV-DNA の検出を試みたところ、13 のパック血漿全てに TTV-DNA が検出された。また、これら 13 のパック血漿から、各ロットに使用されたパック血漿を組み合わせ混合し、そのロットを構成する7 $^{\circ}$ -血漿 (ロット血漿) を人為的に作製し、ロット血漿における TTV-DNA 濃度を求めると  $10^{3.1} \sim 10^{3.8}$  PCR 単位/ml であった。

##### C-2 加工用 M 最終製品における TTV

加工用 M は凍結乾燥製剤で、10ml の注射用水に溶解して用いられるが、この濃度において前述の 3 ロットを含めた 10 ロットの最終製品にはすべて TTV-DNA が検出されなかった。更に、注射用水 1ml で加工用 M を溶解することにより最終製品を 10 倍に濃縮した場合においても TTV-DNA は検出されなかった。なお、TTV 添加回収実験により、最終製品を 10 倍に濃縮することによる TTV-DNA 検出感度への影響が無いことを確認している。

##### C-3 加工用 M 実製造工程液における TTV

加工用 M は主要な 6 工程 (クオ分取、脱フィブリン、リパント・デタージェント (S/D) 処理、イムノアフィニティークマトグラフィー、ウイルス除去膜濾過、イオン交換マトグラフィー) を経て製造されている。これらの工程中のどの工程で TTV が除去されているのかを確認するために、クオ分取後のクオ溶解液、脱フィブリン後液、S/D 処理後液、イムノアフィニティークマトグラフィー溶出後液の 4 工程液を各々 3 ロットについて TTV-DNA の検出を試みた。その結果、クオ溶解液、脱フィブリン後液、S/D 処理後液までは TTV-DNA が検出されるロットが見られたが、イムノアフィニティークマトグラフィー溶出後液には 3 ロットとも TTV-DNA が検出されなかった (表 1)。なお、TTV 添加回収実験によりこれらの工程液間には TTV-DNA 検出感度の差は認められなかった。これらの結果より、イムノアフィニティークマトグラフィー工程が TTV 除去に有効であると考えられた。

#### C-4 仏ノアインティークマトグラーフイ工程における TTV 添加実験

仏ノアインティークマトグラーフイ工程における TTV の消長を更に詳細に解析するために、仏ノアインティークマトグラーフイ工程の前液 (S/D 処理後液) に TTV-DNA 陽性者の糞便より簡易精製した TTV (TTV-DNA 濃度が  $10^5$  PCR 単位/ml) を 1/20 量添加し、仏ノアインティークマトグラーフイ工程の縮小実験を行った (表 2)。S/D 処理後液に TTV を添加した工程液 (TTV 添加液) の TTV-DNA 総量は  $10^{5.8}$  PCR 単位であり、仏ノアインティークマトグラーフイに吸着せずに通過してきた液 (ロード通過液) 中の TTV-DNA 総量は  $10^{6.0}$  PCR 単位であった。第 VIII 因子を吸着させた仏ノアインティークマトグラーフイは、その後、不純物除去のために洗浄操作を行う。本実験では洗浄液を 8 フラクションに分けて回収したが、フラクションの 1, 2, 4, 8 の原液に TTV-DNA が検出され、その他のフラクションには検出されなかった。洗浄後、仏ノアインティークマトグラーフイから第 VIII 因子を溶出させるが、この溶出後液の原液には TTV-DNA が検出されなかった (TTV-DNA 総量は  $\leq 10^{3.2}$  PCR 単位)。また、仏ノアインティークマトグラーフイを再生する際溶出した液 (再生後液) の原液には TTV-DNA が検出された。なお、TTV 添加回収実験では各工程液間で TTV-DNA 検出感度の差は見られなかった。

これらの結果より、仏ノアインティークマトグラーフイ工程における TTV-DNA の LRV は  $>2.6$  であった。

#### D. 考察

日本の献血者における TTV-DNA 陽性率が 12% であることから推測されたことではあるが、本研究で測定した 3 ヶつの知スイト M に関わる原料血漿プールは、全てに TTV-DNA が検出された。同様に、オーストリア、ドイツ、イタリア、アメリカのプール血漿の TTV-DNA 陽性率はそれぞれ 50% (2 ヶット/4 ヶット)、100% (6 ヶット/6 ヶット)、50% (16 ヶット/32 ヶット)、85% (29 ヶット/34 ヶット) と報告されており、いずれも高い陽性率となっている<sup>3)</sup>。

1 ヶットの知スイト M1000 単位製剤は、ドット血漿で約 15000L から各工程で精製濃縮され、最終製品においてはおよそ 500 倍に濃縮されて 30L 程度となる。ド

ット血漿における TTV-DNA 濃度は  $10^{3.1} \sim 10^{3.8}$  PCR 単位/ml であり、ドット血漿の TTV-DNA 総量は、 $10^{10.3} \sim 10^{11.0}$  PCR 単位である ( $10^{3.1 \sim 3.8}$  PCR 単位/ml  $\times 15000L \times 10^3 \text{ml} = 10^{10.3 \sim 11.0}$  PCR 単位)。一方、10 倍濃縮最終製品では TTV-DNA が検出されず、TTV-DNA 濃度は  $\leq 10^{2.1}$  PCR 単位/ml と計算され、TTV-DNA 総量は  $\leq 10^{5.6}$  PCR 単位となる ( $10^{2.1}$  PCR 単位/ml  $\times 30L \times 1/10 \times 10^3 \text{ml} = 10^{5.6}$  PCR 単位)。従って、知スイト M の全工程における TTV-DNA の LRV は  $>4.7 \sim >5.4$  であった。

TTV 添加実験の結果では、仏ノアインティークマトグラーフイから第 VIII 因子を溶出させた溶出後液中に TTV-DNA が検出されなかったが、その後のカラム再生後液に微量の TTV-DNA が検出された。これは、カラムに吸着した微量の TTV が溶出液では溶出されないが、溶出液とは性質の異なる再生液の使用により、再生後液において TTV が溶出していると考えられる。また、本実験での TTV の挙動は TTV-DNA を指標としており、仏ノアインティークマトグラーフイに吸着した TTV が感染性のあるウイルス粒子なのかそれとも TTV の核酸のみなのか不明である。今後、この点を明らかにする必要があるだろう。

血漿由来の血液凝固第 VIII 製剤 2 種類及び第 IX 因子製剤 1 種類の最終製品のうち仏ノアインティークマトグラーフイ工程を経て製造される製剤には全く TTV-DNA が検出されないと報告されている<sup>7)</sup>。また、本実験では、仏ノアインティークマトグラーフイ工程での LRV が  $>2.6$  であり、実製造工程液において仏ノアインティークマトグラーフイ工程以降には TTV-DNA が検出されないという結果を得ている。これらの結果を総括すると、仏ノアインティークマトグラーフイ工程は TTV 除去に重要な工程の一つであるといえた。

#### E. 結論

知スイト M 製造工程の仏ノアインティークマトグラーフイ工程は TTV-DNA 除去に重要な工程の一つであった。

表1 クロエイトM実製造工程液におけるTTV-DNA陽性率

工程名	TTV-DNA陽性率
原料血漿( バッチ血漿)	13 / 13
原料血漿( ロット血漿)	3 / 3
クオ溶解液	3 / 3
脱フィブリン後液	2 / 3
S/D処理後液	1 / 3
イムノアフィニティークロマトグラフィー溶出後液	0 / 3
最終製品	0 / 10

TTV-DNA 陽性率は、(TTV-DNA が検出されたロット数)/(TTV-DNA 検出を試みたロット数)を表す。

表2 イムノアフィニティークロマトグラフィーのTTV添加実験結果

	原液における TTV-DNA 検出率		TTV-DNA 濃度の平均 (PCR単位/ml)	TTV-DNA 総量の平均 (PCR単位/工程液量)
	実験1	実験2		
TTV添加液	N.T.	N.T.	$10^{3.5}$	$10^{5.8}/160\text{ml}$
ロード通過液	N.T.	N.T.	$10^{3.8}$	$10^{6.0}/168\text{ml}$
洗浄液				
フラクション1	2/4	3/4	$\leq 10^{2.4}$	$\leq 10^{4.0}/40\text{ml}$
フラクション2	1/4	0/4	$\leq 10^{2.0}$	$\leq 10^{3.8}/40\text{ml}$
フラクション3	0/4	0/4	$< 10^{2.0}$	$< 10^{3.6}/40\text{ml}$
フラクション4	0/4	1/4	$\leq 10^{2.0}$	$\leq 10^{3.6}/40\text{ml}$
フラクション5	0/4	0/4	$< 10^{2.0}$	$< 10^{3.6}/40\text{ml}$
フラクション6	0/4	0/4	$< 10^{2.0}$	$< 10^{3.6}/40\text{ml}$
フラクション7	0/4	0/4	$< 10^{2.0}$	$< 10^{3.6}/40\text{ml}$
フラクション8	1/4	1/4	$\leq 10^{2.1}$	$\leq 10^{3.6}/40\text{ml}$
溶出後液	0/4	0/4	$< 10^{2.0}$	$< 10^{3.2}/16\text{ml}$
再生後液	1/4	1/4	$\leq 10^{2.1}$	$\leq 10^{3.8}/48\text{ml}$
LRV				$> 2.6$

原液における TTV-DNA 検出率：2回の独立な実験（実験1と実験2）を行い、「TTV-DNA が検出された回数」/「TTV-DNA 検出を試みた回数」を表す。また、N.T.は測定していないことを示す。

TTV-DNA 濃度：段階希釈した各検体について TTV-DNA の測定を行い、Behrens-Karber 法にて検出率が50%である希釈倍数をもとめた。検出率50%における TTV-DNA 濃度を1PCR単位/mlと定義し、実験1と実験2における同じ工程の測定検体原液の TTV-DNA 濃度を平均した。なお、測定検体原液において TTV-DNA が検出された場合には「 $\leq 10^n$ 」、検出されなかった場合には「 $< 10^n$ 」と便宜上区別して表記を行った。

対数減少率 (Logarithmic Reduction Value : LRV) : LRV は、「TTV 添加液の TTV 総量」を「溶出後液の TTV 総量」で除し、その値を対数で表したものである。

## F. 引用文献

- 1) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Res.* 1998; 10: 1-16.
- 2) Pisani G, Cristiano K, Wirz M, Bisso G, Beneduce F, Morace G, Rapicetta M, Gentili G. Prevalence of TT virus in plasma pools and blood products. *Br. J. Haematol.* 1999; 106: 431-435
- 3) Takayama S, Miura T, Matsuo S, Taki M, Sugii S. Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br. J. Haematol.* 1999; 104: 626-629.
- 4) Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott L E, MacDonald D M, Ellender J, Yap P L, Ludlam C A, Haaydon G H, Gillon J, Javis L M. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998; 352: 191-195.
- 5) Okamoto H, Akhane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal Excretion of a Nonenveloped DNA Virus (TTV) Associated With Posttransfusion Non-A-G Hepatitis. *J. Med. Virol.* 1998; 56: 128-132.
- 6) K ärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.* 1931; 162: 480.
- 7) Yokozawa S, Fukuda Y, Nakano I, Katano Y, Toyoda H. Detection of TT Virus DNA in Plasma-Derived Clotting Factor Concentrates. *Blood.* 1999; 94: 3617.

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

- 1) 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(カスイトM)の製造工程におけるウイルス除去/不活化効果について. *日本輸血学会雑誌.* 1999; 45: 349-356.
- 2) 泉浩業, 村井活史, 白川幸子, 武田芳於, 江村博行, 室塚剛志, 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 II.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(カスイトM)及び筋注用人免疫グロブリン製剤(抗HBs人免疫グロブリン「日赤」,人免疫グロブリン「日赤」)の製造工程におけるウイルス除去膜の効果について. *日本輸血学会雑誌.* 1999; 45: 357-361.
- 3) 室塚剛志, 武田芳於, 泉浩業, 村井活史, 白川幸子, 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 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)によるウイルス不活化効果の検討. *日本輸血学会雑誌.* 1999; 45: 362-365.
- 4) 野口幸一, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三. ウイルススクリーニングのための核酸増幅検査法の自動化に関する検討—HCV RNA PCR 検査における自動核酸抽出装置 GT-12 の評価—. *日本輸血学会雑誌.* 1999; 45: 623-628.

### G-2 学会発表

- 1) 前野英毅, 岩田明子, 吉川昭, 猪股秀昭, 江村博行, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三. 第47回日本輸血学会.モノクローナル抗体精製濃縮人血液凝固第Ⅷ因子製剤(カスイトM)の製造工程におけるTTVの除去. *日本輸血学会雑誌.* 1999; 45: 187.
- 2) 野口幸一, 前野英毅, 鈴木徹哉, 江村博行, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三. 第47回日本輸血学会. 核酸増幅検査の自動化に向けて HCV-PCR における核酸自動抽出装置 GT-12 の評価. *日本輸血学会雑誌.* 1999; 45: 281.

- 3) 古谷健志, 柴田洋伸, 武田芳於, 江村博行, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三. 第 47 回日本輸血学会. 核酸増幅検査の自動化に向けて HCV-PCR における核酸自動抽出装置 GT-12 の評価. 日本輸血学会雑誌. 1999; 45: 281.
- 4) 猪股秀昭, 須磨展子, 前野英毅, 江村博行, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三, 後藤進, 黒江謙治, 宮野正明. 第 23 回日本血液事業学会. ミニプル NAT のための Gen-Probe 製 TMA-HPA 法 HIV-1/HCV 同時検出試薬の評価結果. 日本血液事業. 1999; 22: 301.
- 5) 村井活史, 泉浩業, 白川幸子, 前野英毅, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三, 藤井暢弘. 第 23 回日本血液事業学会. 人血清アガミ製剤の製造工程におけるウイルス不活化/除去の検討. 日本血液事業. 1999; 22: 314.
- 6) 猪股秀昭, 須磨展子, 前野英毅, 江村博行, 室塚

剛志, 脇坂明美, 松本脩三. 第 43 回日本輸血学会北海道支部例会. Gen-Probe 製 TMA-HPA 法 HIV-1/HCV 同時検出試薬の評価結果. 日本輸血学会雑誌. 1999; 45: 951.

7) 古谷健志, 室塚剛志, 脇坂明美, 松本脩三. 第 43 回日本輸血学会北海道支部例会. ミニプル核酸増幅検査の有効性. 日本輸血学会雑誌. 1999; 45: 951.

H. 知的所有権の取得状況

H-1 特許取得

なし

H-2 実用新案登録

なし

H-3 その他