

厚生科学研究補助金（医薬安全研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための  
第一次国内標準品作製のための共同研究  
分担研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所

C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子増幅法のためのWHO国際標準品(96/790)が1997年に制定された。本研究はHCV-RNA量を国際単位で表示した国内標準品を作製することを目的として実施された共同研究である。国内標準品候補品（以下、候補品と略）の評価を二段階に分けて実施した。第一段階で2つのHCV陽性血漿（119、122）を脱クリオ血漿で希釈して予備的に測定し、血漿122を候補品の原料として選択した。第二段階では、改めて血漿122を脱クリオ血漿で約 $1 \times 10^5$  IU/mlに希釈して候補品122を調製し、エンドポイント法で測定して国際標準品に対する相対力価を推定した。試料を9施設に送付し、7施設から試験結果が返送された。測定法は4施設がロッシュ アンプリコアHCV（Ver. 1）変法、他の3施設が自家法のnested PCR法を用いた。全施設の結果はばらつきの範囲で一致し、候補品122の力価は $10^{5.00}$  ( $10^{4.80} \sim 10^{5.20}$ ) IU/mlと推定された。候補品122は力価100,000 IU/mlの国内標準品として認められ、その性状等は脱クリオ血漿で希釈したHCV genotype 1b 陽性血漿を0.5 mlずつバイアルに分注、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結、保存したものである。

#### A. 研究目的

供血者の抗C型肝炎抗体スクリーニング実施にもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤によるC型肝炎ウイルス（HCV）の感染が報告された。これは、HCVに感染してから抗体が検出されるまでのウィンドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた。そこで、血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは1999年7月1日から原料血漿プールでC型肝炎ウイルスRNAの核酸増幅検査（NAT）を実施することになった。これに先立って、イギリスのNIBSCによってNATのためのHCV-RNAの国際標準品作製のための共同研究が組織され、1997年10月にWHO国際標準品(96/790)が制定された。わが国においても薬事審議会安全技術調査会血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略。委員長 国

立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長 山口照英）で討議の結果、原料血漿プールのHCV-RNAのNATを実施することになった。わが国では既に1999年7月1日以前に日本赤十字の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿でHCV-RNAのNATが実施されている。しかし、施設ごとにNAT試験法が異なるため、その感度と精度を比較検討し評価するには、広く認められた標準品を用いて測定することが必須である。小委員会はHCV-RNA量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、日本赤十字が候補品の製造と配布を、国立感染症研究所が結果の収集と解析を担当した。

#### B. 研究方法

1. 国内標準品候補の原料血漿の選択  
HBs抗原、抗HIV抗体、HBV-NAT、

HIV-NATのすべてが陰性である二つのHCV陽性血漿119（PHA力価 $2^{12}$ 、RNA約 $4 \times 10^6$  IU/ml, 80ml）と122（PHA力価 $2^{14}$ 、RNA  $2 \sim 3 \times 10^6$  IU/ml, 185ml）を標準品の原料血漿の候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約 $10^5$  IU/mlに希釈して $-80^\circ\text{C}$ で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA国際標準品とともに参加施設に配布した（第一回配布）。エンドポイント法で10倍希釈系列（ $10^{-1} \sim 10^{-7}$ ）を2回測定した。このとき使用した国際標準品は小分けして $-80^\circ\text{C}$ 凍結保存して第二回送付試料の測定にも用いた。

#### 2. HCV-RNA国内標準品候補の作製

改めて、原料血漿No122を約 $1 \times 10^5$  IU/mlになるように希釈、0.5mlずつガラス瓶に分注、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結保存して、HCV-RNA国内参照品候補122とした。

#### 3. HCV-RNA国内標準品候補の評価

候補品122を参加施設に送付した（第二回送付）。あらかじめ10倍希釈系列で測定したエンドポイントを挟んで7段階の $10^{0.5}$ 倍希釈系列で日を替えて4回測定した。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA国内標準品候補のWHO国際標準品に対する相対力価を推定した。

#### 4. 参加施設と測定方法

日常的にHIV-NATを実施している9つの施設（国内6施設、米国2施設、ヨーロッパ1施設）に試料を配布し、共通のプロトコール（資料）に従って測定し、7施設から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。本報告書では参加施設をコード番号で表記するが、文末の参加者一覧中の順番とは関連が無い。

#### 5. 測定値の分析

エンドポイント法により国際標準品に対する122の相対力価を求めた。

#### 6. 塩基配列の決定

Genotypeを確認する目的でHCVのコア領域をPCR増幅した断片をTA法によってクローニングし、Big-Dye Terminator Cycle

Sequencing kit(ABI)を用いた反応産物をオートシーケンサーABI Prismで解析した。

### C. 結果

#### 1. 測定に用いられた方法

7施設から結果が送られてきた。血漿分画製剤製造所5ヶ所（国内3、海外2）、公的機関1ヶ所、その他1ヶ所であった。用いた測定法は4施設がアンプリコアHCV（Ver. 1）変法、あとの3施設が自家法のnested PCR法であり、反応当たりの試料の量は $40 \sim 400 \mu\text{l}$ の血漿に相当した（表1）。

#### 2. 原料血漿の選択

第一段階で2つのHCV陽性血漿（119、122）を測定した結果、異なる施設や測定法によっても同程度に測定できることが示されたので、より多くの標準品を作製できるよう、容量が大きい血漿122を候補品の原料として選択した。シーケンシングの結果、血漿122のコア領域の塩基配列を決定してgenotype1bであることを確認した。

#### 3. 候補品122の国際標準品（96/790）に対する相対力価の推定

第2回送付試料を7施設において $10^{0.5}$ 倍希釈系列で測定した。5施設で独立の4回の測定、2施設で各2回繰り返し測定を独立に4回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する122の相対力価を求めた。測定結果が不連続に陽性を示す場合、およびエンドポイントが最大希釈と同等となった場合があったので、次のように取り扱った。① 不連続な陽性結果を含む場合は低濃度のエンドポイントを用いた。② エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。それは、以下のような考えかたによった。施設毎にエンドポイントを測定値とした場合の分散は一定であると仮定して、本来のエンドポイントが最大希釈のさらに1段階希釈したところであると仮定して分散を比較したところ、分散がさらに大きくなる傾向がうかがわれた。従って、施設毎の測定値の

ばらつきは一定であるという仮定との矛盾が広がると考えられたので、概ね得られたエンドポイントは最大希釈を超えないものと考えた。

全施設の測定結果を分析に用いて候補品122の国際標準品に対する相対力価を推定した。各施設毎にエンドポイント濃度の対数値から国際標準品に対する122の相対力価とその95%信頼区間を求めた。全施設の結果はばらつきの範囲で一致し、国際標準品に対する122の相対力価の平均は $\log 10^{0.001}$ であった(表2、図1)。WHO国際標準品(96/790)の力価は $10^5$  IU/mlであるから、表1に示すように122の力価は $10^{5.00}$  ( $10^{4.80} \sim 10^{5.20}$ ) IU/ml、即ち100,000 IU/mlと推定された。また、WHO国際標準品作製で用いた最尤法で本研究の測定値を分析した結果、122の推定力価は $10^{5.07}$  ( $10^{4.86} \sim 10^{5.30}$ ) IU/mlとなり、2つの分析法による推定値はよく一致した。

参加7施設中、施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった。また施設2では不連続な陽性結果が多く、測定結果のばらつきが大きかった。そこで、この2施設を除いて、同様に122の相対力価とその95%信頼区間を求めた。全施設の結果はばらつきの範囲で一致し、国際標準品に対する122の相対力価の平均は $\log 10^{0.066}$ であった(表3、図2)。WHO国際標準品(96/790)の力価は $10^5$  IU/mlであるから、表2に示すように122の力価は $10^{5.07}$  ( $10^{4.84} \sim 10^{5.29}$ ) IU/ml、即ち116,300 IU/mlと推定され、①の結果と大きな相違は認められなかった。

以上、2つの分析結果から、候補品122の国際標準品に対する相対力価は $10^{5.00}$  IU/mlと推定され、力価100,000 IU/mlの国内標準品として小委員会で承認された。

#### D. 考察

共通の標準品を使用すれば異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理が可能になるので、広く認められた標準品の作

製が求められていた。本共同研究によってわが国で初めて、国際単位表示されたHCV-NATのための国内標準品が制定された。血液製剤の安全性確保のためのNAT試験法や診断薬の評価、臨床検査センターにおけHCV-NAT検査の評価に広く国内標準品が用いられるようになれば、相互の性能を容易に比較することが可能になり、試験法・検査技術の向上が期待できる。測定回数の限られた本研究の結果から検出限界を推定するのは困難であるが、今後も各施設で同様な測定を繰り返すことにより有効検出限界単位の推定値を得ることが可能である。こうして得られた有効検出限界単位をもとに、たとえば99%あるいは95%陽性反応を得られる濃度と50%陽性反応濃度の標準品を常に測定に加えた一定期間の測定結果を集積し、継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ると共に、国内参照品の評価と検討を行うことが望まれる。

#### E. 結論

血漿のHCV-RNAのNATのための国内標準品を作製した。国内標準品は脱クリオ血漿で希釈したHCV genotype 1b 陽性血漿を0.5 mlずつバイアルに分注、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存したもので、その力価は100,000 国際単位/mlである。

#### F. 研究発表

水沢左衛子、堀内善信、山口照英、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会<sup>a</sup>、HCV-NAT国内標準品作製のための共同研究グループ<sup>b</sup>「C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製」(投稿準備中)

a)血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会：山口照英(委員長、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部)、小室勝利(国立感染症研究所安全性研究部) 岡田義昭(国立感染症研究所細菌・血液製剤部)、三代俊二(東芝病院研究部)、真弓忠(自治医科大学分子ウイ

ルス学研究部)、伴野丞計(日本赤十字血漿分画センター事業部)、速水照一(ウェルファイド株式会社品質管理部)宮本誠二(財団法人化学及血清療法研究所血液製剤研究部)金子健二(日本製薬株式会社研究開発本部東京研究所)三上貢一(アベンティス・アーマ株式会社品質保証部)平子一郎(バイエル薬品株式会社QAオペレーション)

b) HCV-RNA国内参照品候補品評価試験参加者:金子健二、高橋勤(日本製薬株式会社)、宮本誠二(財団法人化学及血清療法研究所)、三代俊二、土方美奈子(東芝病院)、速水照一(ウェルファイド株式会社)、平子一郎, Jeff

Price (バイエル薬品株式会社)、三上貢一, Thomas Weimer (アベンティス・アーマ株式会社、アベンティス・ベーリング)、岡田義昭、水沢左衛子(国立感染症研究所)堀内善信(統計処理、国立感染症研究所)

なお、本共同研究については薬事審議会安全技術調査会血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会によって正式に報告される予定である。

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし

表1 各施設の試験法

施設	抽出法	増幅法	血漿(μl)/反応
1	R&D	Amplicor	100
2	NaI(自家)	自家法	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	R&D	Amplicor	100
5	QIAamp	Amplicor	400
6	R&D	nPCR(自家)	100
7	R&D	nPCR(自家)	100

R&D: スマイテストEX-R&D(住友金属工業株式会社)

QIAamp: QIAamp DNA Blood Mini Kit(株式会社キアゲン)

Amplicor (アンプリコアHCV): ロシュ

表2 エンドポイント法による122の推定力価(全施設)

施設	平均	IU/ml(log10)	
		(95%信頼区間)	
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
加重平均	5.00	4.80	5.20

表3 エンドポイント法による122の推定力価(5施設)

施設	平均	IU/ml(log10)	
		(95%信頼区間)	
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
加重平均	5.07	4.84	5.29

図1. 96/790に対する122の相対力価(全施設)

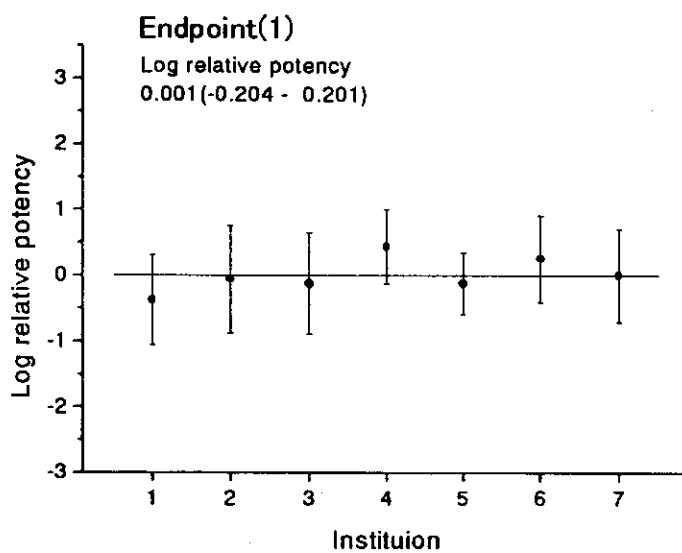
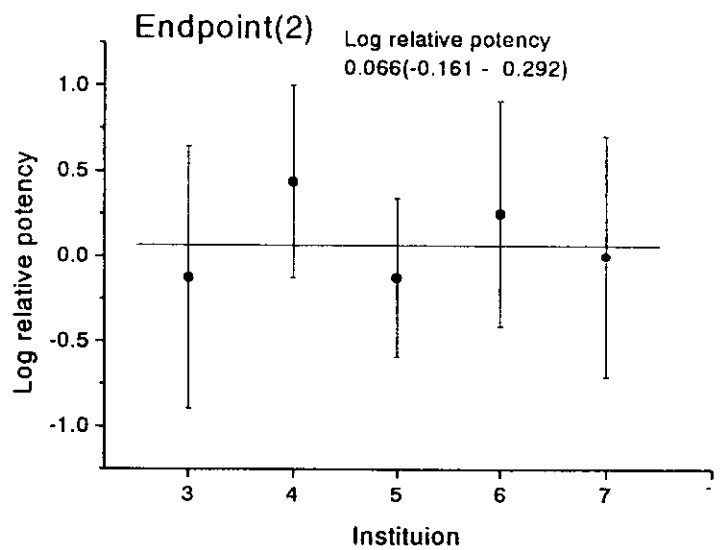


図2. 96/790に対する122の相対力価(5施設)



## 実験計画

## HCV-RNA 国内標準品作製の手順

1. HCV-RNA 国内標準品候補の選択  
2 つの国内標準品候補 (No119, No122) の一部を稀釈用脱クリオ血漿で約  $1 \times 10^5$  IU/ml に稀釈したものを試料として送付する (第一回送付)。10 倍稀釈系列で測定した結果を集計して end-point を求める。その結果に基づいて候補品を 1 つに決定する。
2. HCV-RNA 国内標準品候補の作製  
候補に決定された血漿を稀釈用脱クリオ血漿を用いて約  $1 \times 10^5$  IU/ml に稀釈する。これをガラス瓶に 0.5ml ずつ分注し、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存する。
3. HCV-RNA 国内標準品候補の評価  
改めて分注した候補品を送付する (第二回送付)。 $10^{-0.5}$  倍稀釈系列で測定した結果を集計して WHO 国際標準品に対する相対力価を決定し、日本の HCV-RNA 国内標準品とする。

## 試料

参加研究室には次の試料等を配布する。受領後直ちに  $-70^\circ\text{C}$  で保存する。(第一回送付)

1.	稀釈用脱クリオ血漿 (HCV-RNA 陰性, HCV 抗体陰性、HBV 抗原陰性、HIV 抗体陰性)	40ml / 遠心管	3 本
2.	HCV-RNA WHO 国際標準品 (Code96/790) 凍結乾燥品、 5 万国際単位/バイアル		1 本
3.	HCV-RNA 国内標準品候補 (119), HCV-RNA 陽性血漿 (Genotype 1b) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結品、 約 10 万国際単位/ml	1 ml/バイアル	7 本
4.	HCV-RNA 国内標準品候補 (122), HCV-RNA 陽性血漿 (Genotype 1b) を脱クリオ血漿で稀釈した凍結品、 約 10 万国際単位/ml	1 ml/バイアル	7 本

- WHO 国際標準品は RNase を含まない脱イオン水 0.5ml に溶かして約 20 分間静かに振とうし、完全に溶解する。溶解後、直ちに  $75 \mu\text{l}$  ずつ 6 本に小分けして  $-70^\circ\text{C}$  で凍結保存する。  
(本数に限りがあり、補充不可能の状況なので使用は慎重に願います。)
- 候補品は余分に入っているのので、予備的な実験に使用してよい。
- 標準品と候補品は感染性が有るので取り扱いには参加研究機関の安全基準に従うこと。
- RNA 抽出に 0.5ml 以上試料を用いる研究室は連絡のこと。  
連絡先：移動責任者 山口照英 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 電話 03-3700-1141、FAX 03-3707-6950

### HCV-NAT 試験

HCV-RNA WHO 国際標準品制定のための共同研究のプロトコルに準じて、本研究では日を変えて独立に繰り返し試験を行う。具体的には次の手順で試験を行う。

#### I) HCV-RNA 国内標準品候補選定のための試験

第一回送付試料を 10 倍稀釈系列で測定し、end-point を決定 (2 回実施する)

国内標準品候補(No. 119 と No. 122)及び小分けした WHO 国際標準品は試験毎に新しいバイアルを 30℃の水浴上で速やかに融解し、直ちに使用する。候補品と WHO 国際標準品を添付の稀釈用脱クリオ血漿(以下血漿と呼ぶ)で 10 倍ずつ 7 段階稀釈( $10^{-1}$ から  $10^{-7}$ )して試験を実施し、end-point (即ち陽性を示す最大の稀釈率)を求める。アッセイは各稀釈毎に 1 本とし、必ずしも二重測定を行う必要はない。試験毎に陰性コントロール(血漿)を必ず置く。日常、弱い陽性コントロールをラン・コントロールに使用している場合はそれもコントロールに加える。日をかえて 2 回試験を実施する。

注意:小分けした WHO 国際標準品の残り 4 本は次に行う試験 III)で使用するので、保管しておく。

稀釈法: 血漿 450  $\mu$ l に試料 50  $\mu$ l を加え、液をピペットで 1 回吸い上げてピペット内に残った試料を洗い出す。次に 1ml のピペットチップで泡立てぬように注意しながら混合する。この操作を繰り返して 10 倍稀釈系列を作る。ピペットチップは 1 段階稀釈毎に新しいものに交換する。

II) 上記 I) で得られたデータに基づいて、国内標準品候補(No. 119 と No. 122)のいずれかを選択し、その希釈度を決定する。選択された候補品を、脱クリオ漿にて希釈し、0.5ml ずつバイアルに分注し-80℃に保存する。製品化された本候補品 5 本を各参加ラボに送付し、III) の試験によりその評価を行う。(第二回送付)

#### III)試験 I) で選択した HCV-RNA 国内標準品候補の力価の決定

第二回送付試料を  $10^{0.5}$  倍稀釈系列で測定 (4 回実施する)

I) で求めた end-point を挟んで  $10^{0.5}$  倍ずつ 7 段階稀釈で実施する。II) で作製した候補品と小分けした国際標準品は試験毎に新しいものを使用する。アッセイは各稀釈毎に 1 本とするが、各研究室で通常行っている試験本数(例えば duplicate, triplicate, それ以上)で行ってもよい。その場合、試験毎の結果をすべて別紙 5 に記入して提出すること(triplicate で行った場合、++、+ + -, + - -あるいは - - -と記入)。試験毎に陰性コントロール(血漿)を必ず置く。日常、弱い陽性コントロールをラン・コントロールに使用している場合はそれもコントロールに加える。日をかえて 4 回試験を実施する。各回の測定には 1 週間の間隔を置くことが望ましい。

稀釈法: [例] I) の end-point が  $10^{-4}$  の場合、III) では  $10^{-2.5}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-3.5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-5.5}$  倍稀釈で試験を行う。

まず、 $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  の 10 倍稀釈試料を調製する。

次に血漿 216  $\mu$ l に  $10^{-2}$  稀釈試料 100  $\mu$ l を加え  $10^{-2.5}$  稀釈試料を調製する(1:3.16)。同様に  $10^{-3}$  から  $10^{-3.5}$  を,  $10^{-4}$  から  $10^{-4.5}$  を,  $10^{-5}$  から  $10^{-5.5}$  をそれぞれ調製する。

○結果報告書(別紙 5)の記入について: 1 枚の結果報告書に 1 回の試験結果を記入してください。統計的には end-point よりも濃い試料で陰性となる場合もありうるので、その場合も結果を破棄しないで記入してください。



## HCV-RNA 国内標準品の評価試験法

測定責任者名:

機関名:

連絡先:

住所

TEL

FAX

## 1. HCV-RNA 検出法

 自家開発の方法

A 欄に記入

 Roche AMPLICOR

バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

 Organon Teknica NASBA

バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

 その他の市販キット

キット名 \_\_\_\_\_ バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

製造者名 \_\_\_\_\_

## 2. 血漿からの HCV-RNA 抽出法

抽出に用いた血漿の容量: \_\_\_\_\_  $\mu$ l1 核酸増幅反応当たりの血漿相当量: \_\_\_\_\_  $\mu$ l

方法の分類

 カオトロピック剤による変性とフェノール/クロロホルム抽出。

カオトロピック剤: グアニジウムイソチオシアネート、尿素、塩化リチウム、その他 \_\_\_\_\_

 プロテイナーース K 処理とフェノール/クロロホルム抽出。 プロテイナーース K 処理とカオトロピック剤による変性。

カオトロピック剤: グアニジウムイソチオシアネート、尿素、塩化リチウム、その他 \_\_\_\_\_

方法

 市販キット

キット名 \_\_\_\_\_ バージョン: \_\_\_\_\_ ロット: \_\_\_\_\_

製造者名 \_\_\_\_\_

(使用説明書のコピーを添付)

 自家開発の方法

方法が公表されているときはその文献 (別刷りまたはコピーを添付)

雑誌名 \_\_\_\_\_ 巻 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ ページ  
(簡単に説明)

HCV-RNA の分離に先立つウイルス粒子の濃縮の有無

 無  有 (方法: \_\_\_\_\_)

別紙 4-2

3. 精度管理

内部コントロールとして識別可能なオリゴヌクレオチドを使用しましたか？	<input type="checkbox"/> はい	<input type="checkbox"/> いいえ
内部コントロールを使用した場合はどの段階で添加しましたか？	<input type="checkbox"/> 抽出	<input type="checkbox"/> 増幅
各試験に感度管理のための弱い陽性コントロールを使用しましたか？ 陽性コントロール： _____ ， HCV-RNA 濃度： _____ /ml	<input type="checkbox"/> はい	<input type="checkbox"/> いいえ

A. 核酸増幅検出法について

1. で市販キットと答えた研究室は使用説明書のコピーを添付して下さい。

1. で自家開発法と答えた研究室は以下の欄に記入して下さい。

方法が公表されているときはその文献（別刷りまたはコピーを添付）

雑誌名 \_\_\_\_\_ 巻 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ ページ

増幅法（single PCR, nested PCR、その他 \_\_\_\_\_ ）

増幅領域（5' 非転写領域、その他 \_\_\_\_\_ 領域）

（増幅法・検出法を簡単に説明）

平成 年 月 日

署名捺印

試験報告書、結果報告書の返送先：小室勝利

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1,

国立感染症研究所 安全性研究部

TEL 042-561-0771、FAX 042-567-2790

## HCV-RNA 国内標準品候補選定試験結果

機関名

測定責任者名

試験実施日

## I) 第 1 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品(96/790)	$10^{-1}$		
	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
候補品(119)	$10^{-1}$		
	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
候補品(122)	$10^{-1}$		
	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

## HCV-RNA 国内標準品候補選定試験結果

機関名

測定責任者名

試験実施日

## 1) 第 2 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品(96/790)	$10^{-1}$		
	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
候補品(119)	$10^{-1}$		
	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
候補品(122)	$10^{-1}$		
	$10^{-2}$		
	$10^{-3}$		
	$10^{-4}$		
	$10^{-5}$		
	$10^{-6}$		
	$10^{-7}$		
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

HCV-RNA 国内標準品評価試験結果

機関名  
測定責任者名  
試験実施日

III) 第 1 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品(96/790)			
候補品			
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

HCV-RNA 国内標準品評価試験結果

機関名

測定責任者名

試験実施日

III) 第 2 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品(96/790)			
候補品			
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

HCV-RNA 国内標準品評価試験結果

機関名  
測定責任者名  
試験実施日

III) 第 3 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品(96/790)			
候補品			
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考

HCV-RNA 国内標準品評価試験結果

機関名  
測定責任者名  
試験実施日

III) 第 4 回目試験

試料	希釈率	陰性/陽性	備考
国際標準品(96/790)			
候補品			
陰性コントロール			
陽性コントロール			

備考



分担研究報告

## 第Ⅷ因子活性定量法の標準化についての研究

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 永泉 圭子 東京医科大学 臨床病理学

血友病Aは先天性第Ⅷ因子欠乏症である血友病Aの治療は、出血症状に応じて必要な第Ⅷ因子凝固活性が得られるように投与量が決定される。製剤中の第Ⅷ因子活性は、血漿分画製剤では製薬会社と国立感染症研究所、遺伝子組換え型製剤は各製薬会社で測定されているが、これまでの検討では表示力価と実測力価の差が製剤によって大きく異なっていた。ヒト血液凝固第Ⅷ因子の測定は、血液凝固一段法により測定されるのが一般的であるが、測定に用いられる機器や試薬は施設により異なっており、標準化された測定法とは言い難い状況にある。この研究では、凝固因子製剤中および血漿中の血液凝固第Ⅷ因子を測定する方法を標準化するための基礎研究を実施した。すなわち、現在、国内で市販されている活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）測定試薬、管理用血漿の実態を調査した。また、国立感染症研究所、日本赤十字社血漿分画センター、各製薬会社ならびに医療施設で行われている第Ⅷ因子活性測定法のプロトコールの実態を調査して、標準化とサーベイのための基礎資料を作成した。

### A. 研究目的

血友病Aは先天性第Ⅷ因子欠乏症である血友病Aの治療には、ヒト血漿由来対Ⅷ因子製剤または遺伝子組換え型第Ⅷ因子製剤が用いられている。治療では出血症状に応じて必要な第Ⅷ因子凝固活性が得られるように投与量が決定される。製剤中の第Ⅷ因子活性は、血漿分画製剤では製薬会社と国立感染症研究所、遺伝子組換え型製剤は各製薬会社で測定されている。また、患者血漿中の第Ⅷ因子活性は各医療施設で測定される。ヒト血液凝固第Ⅷ因子の測定は、血液凝固一段法により測定されるのが一般的

であるが、同一原理でも測定に用いられる機器や試薬は施設により異なっており、標準化された測定法とは言い難い状況で施設間に差があることが知られている。第Ⅷ因子活性の施設間差を是正し標準化することが重要であり、とりわけ、凝固因子製剤の力価が臨床現場に正確に反映されることが临床上重要である。この研究では、血液凝固因子製剤の検定機関、製造機関、臨床検体の測定機関において行われている実際の測定手順と使用試薬等を調査することにより、第Ⅷ因子凝固活性測定法の標準化し施設間差を是正する方策を探り、凝固因子製

剤中および血漿中の血液凝固第Ⅷ因子を測定法する方法を標準化するための基礎研究を実施した。

## B. 研究方法

現在、国内で市販されている活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 測定試薬、管理用血漿の実態を調査した。また、国立感染症研究所、日本赤十字社血漿分画センターならびに各製薬会社で行われている第Ⅷ因子活性測定法のプロトコールの実態を調査して、標準化とサーベイのための基礎資料を作成した。調査項目は APTT 試薬 (名称・製造販売会社名)、塩化カルシウム (試薬名・濃度・製造販売会社名)、凝固因子欠乏血漿 (試薬名・由来・製造販売会社名)、標準血漿 (試薬名・由来・製造販売会社名)、標準物質 (試薬名・由来・製造販売会社名)、検体希釈液 (緩衝物質・PH・アルブミン添加有無と濃度・組成)、検体希釈用試験管 (品名・製造販売会社名・材質)、検体希釈用ピペット (商品名・製造販売会社名・容量・用途・専用使用の有無・検定の有無)、検体希釈方法、測定装置 (商品名・製造販売会社名・使用モード・検量線作成用試料・検量線用希釈方法・検量線の作成時期・検量線の定量ポイント・測定プロトコール) について行い、調査は個々の企業名等は公表しないことを前提に研究者が作成した調査票について各施設へ記載を求め、血液凝固因子製剤の検定機関、製造機関、臨床検体の測定機関の分類により集計した。

## C. 研究結果

### 1. 国内で市販されている試薬

第Ⅷ因子測定において重要な役割を持つ

日本で入手可能な APTT 試薬は 10 社から市販されている 14 種類があり、凍結乾燥または液状の試薬であった (表 1)。活性化剤としてはコロイド状シリカ、軽質無水ケイ酸、エラグ酸、カオリン、セライト、シリカ粒子、エラジン酸の 7 種類が使われており、リン脂質としてはウサギ脳由来リン脂質、合成リン脂質、大豆由来リン脂質、セファリン、ヒト胎児抽出リン脂質、大豆レシチン、ウシ脳由来リン脂質、卵黄由来リン脂質およびウシ脳由来リン脂質の 8 種類が使われており、試薬に添付された APTT の参考基準範囲は試薬ごとに大きく異なり、短縮側で 25 から 34.5 秒であり延長側では 31.7 から 45 秒と大きな差が存在していた。管理血漿は 10 社から市販されておりヒト血漿の凍結乾燥または凍結品であった。

### 2. 第Ⅷ因子活性測定プロトコール

第Ⅷ因子測定法プロトコールの実態調査に回答を得た 4 施設の状況を表 2 及び 3 にまとめた。それぞれの施設で異なる機器、APTT 試薬、標準物質を用いており、測定プロトコールでは APTT 試薬との加温時間に差が見られた。1 施設では検体の希釈に第Ⅷ因子欠乏血漿が使われているのが特徴的であった。希釈液はどれも 1% のヒトアルブミンを含有していたが、3 施設はペロナール緩衝液で、1 施設だけがトリス緩衝液を用いていた。検量線の作成手順にも差があったが基本的なポイントの第Ⅷ因子濃度は全ての施設でほぼ一致していた。

表1 日本で市販されている APTT 試薬

試薬名	参考正常値 (秒)	活性化剤	リン脂質	製造元	(輸入)発売元 販売元
データファイAPTT	24~34	エラジン酸	ウサギ脳由来セファリン	DADE BEHRING	シスメックス
IL テスト <sup>®</sup> APTT シリカ	26.5~38.5	シリカ粒子	セファリン	インストゥルメンテーション ラ ボラトリー社	ヤトロン。ダイアヤトロン
ヘモライアンス トロンボシル I APTT	25~45	コロイド状シリカ	(ウサギ脳由来リン脂質)	インストゥルメンテーション ラ ボラトリー社	ヤトロン。ダイアヤトロン
ヘモライアンス シンサシル APTT	25~40	軽質無水ケイ酸	ウサギ脳由来リン脂質	インストゥルメンテーション ラ ボラトリー社	ヤトロン。ダイアヤトロン
トロンボチェック APTT	31~31.7	エラグ酸	化学合成・混合リン脂質	国際試薬	国際試薬
トロンボチェック APTT (S)	34.5~35.4	エラグ酸	ウサギ脳由来リン脂質	国際試薬	国際試薬
PTT 試薬「RD」	30~40	カオリン	大豆由来リン脂質	ロッシュ	ロシュ・ダイアグノスティック
PTT a 試薬「RD」	26~42	セライト	セファリン	ロッシュ	ロシュ・ダイアグノスティック
パトロンチン	30~42	カオリン	セファリン	DADE BEHRING	シスメックス
パトロンチン SL	31~42	シリカ粒子	ヒト胎児抽出リン脂質	DADE BEHRING	シスメックス
セフォテスト <sup>®</sup>	25.9~39.9	エラジン酸	大豆レシチン	AXIS-SHIELD Poc AS (NORWAY)	三光純薬 エーザイ
シリマツ	30~35	軽質無水ケイ酸	ウシ脳由来リン脂質	DADE BEHRING	アズウェル
プラテリン LS	25~40	軽質無水ケイ酸	ウサギ脳セファリン	オルガノン・テクニカ	オルガノン・テクニカ 小野薬品工業
プラテリン-A オート	26~40	軽質無水ケイ酸	卵黄及びウシ脳リン脂質	オルガノン・テクニカ	オルガノン・テクニカ 小野薬品工業

表2 施設別の検査法プロトコールの調査結果 (1)

項目	A	B	C	D
APTT試薬	データファイ APTT	トロンボチェック	プラテリンAオート	パトロンチン
活性化剤	エラジン酸	エラグ酸	軽質無水ケイ酸	カオリン
リン脂質	ウサギ脳	化学合成・混合	卵黄・ウシ脳	セファリン
塩化カルシウム	0.025M	0.025M	0.025M	0.025M
製造	富士レビオ	富士レビオ	自家調整	自家調整
因子欠乏血漿由来	吸着血漿	吸着血漿	患者由来	免疫吸着
標準物質	国内参照品	精製第Ⅷ因子	Mega1	Mega1
希釈液	ペロナール	ペロナール	トリス	ペロナール
PH	7.35	7.35	7.40	7.40
アルブミン添加	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
試験管材質	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン

#### D. 考察

日本では多数の APTT 試薬が市販されており、その組成も様々である。その結果、日本では第Ⅷ因子活性の測定に数多くの試薬の組み合わせが使われている。今回の調査で血液凝固第Ⅷ因子測定に少なからず影響を与える APTT 試薬、測定機器、測定プロトコールが製剤の検定機関、製造機関のそれぞれで異なっていた。4 施設も標準物質

として国際標準品を基に力価を設定した二次標準品のモノクローナル抗体精製第Ⅷ因子製剤を用いていた。2 施設ずつ国産と米国製に分かれたが、どちらもほぼ同じ製法で作られたものであり力価の設定も昨年の報告書に述べた通り、当施設での検討で規定の濃度と一致していた。昨年度の報告書では国産のモノクローナル抗体精製第Ⅷ因子製剤に力価が低めのロットが多いことを

指摘したが、標準物質には差が認められないため、測定系の他の要素に原因がある可能性が残っていた。APTT 試薬の違いは具体的には活性化剤の違いとリン脂質の違いであるが、われわれの検討では試薬間差は検量線の傾きの違いとして現れると考えてい

る。検量線の傾きに差があると、第Ⅷ因子の定量においては少なくとも正確度や再現性に影響すると考えられ、試薬間差の影響の度合いを評価するとともに施設間のサーベイを実施して実態を把握した上で、標準化に取り組む必要があると考えられた。

表3 施設別の検査法プロトコールの調査結果 (2)

項目	A	B	C	D
測定装置	コアクレックス 100S	コアクレックス 700	Electra1000	-
検体希釈液 1	検体希釈液	検体希釈液	検体希釈液	第Ⅷ因子欠乏血漿
検体希釈液 2				検体希釈液
APTT試薬量	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
欠乏血漿量	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
検体量	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
加温時間	3min	165sec	5min	5min
塩化カルシウム量	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
検量線希釈法	用手法	用手法	用手法	用手法
検量線物質	標準物質	標準物質	標準物質	標準物質
濃度 1(U/mL)	0.205	0.20	0.17	0.20
濃度 2(U/mL)	0.1025	0.10	0.085	0.10
濃度 3(U/mL)	0.05125	0.05	0.0425	0.05
濃度 4(U/mL)	0.025625	0.025	0.0213	0.025
濃度 5(U/mL)		0.0125	0.0106	
濃度 6(U/mL)		0.0062		
濃度 7(U/mL)		blank		

## E. 結論

血液凝固第Ⅷ因子活性の測定法については、日本では標準化作業が全く行われておらず、個々の施設の値がどれだけ一致しているかは不明である。治療上重要な意味のある第Ⅷ因子活性測定法の標準化に向けて、今回の調査を基にサーベイランスを行い、具体的な標準化作業に取り組む必要がある。

## F. 研究発表

- 論文発表  
なし
- 学会発表  
なし

## G. 謝辞

今年度の研究に際して、調査にご協力いただきました国立感染症研究所ならびに血液凝固第Ⅷ因子製造会社各社に感謝いたします。

## H. 文献

- 新井盛夫、渡邊潤、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 1999
- 香川和彦、福武勝幸：プロトロンビン時間 (PT) と活性化ブントロンボプラスチン時間 (APTT) 測定の現状と標準化に向けての課題。臨床病理 47, 431-437, 1999