

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
該当なし			

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

血小板製剤中の血小板機能に関する研究

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 近年、血小板輸血の際、それに伴う副作用を防止する目的で、我が国では一般的に放射線照射後に白血球除去フィルターを使用して輸血を行っている。しかし、この処置により血小板製剤中の血小板機能におよぼす影響についてはほとんど検討されておらず、重要な課題であると考えられる。今回の研究では、血小板製剤中の血小板における放射線照射及び白血球除去フィルター使用前後の血小板機能に及ぼす影響について検討をおこなった。今回の結果から放射線照射のみでは放射線照射前後での血小板数及び血小板凝集能に変化はみられなかった。しかし、白血球除去フィルターの使用で血小板数及び血小板凝集能の有意な低下がみられた。また、これは放射線照射後での使用では放射線の線量に依存して有意に低下していた。

A. 研究目的

血小板輸血が臨床で広く用いられているが、それに伴い輸血後GVHDや頻回輸血時に産生される白血球抗体による血小板輸血不応状態等の血小板輸血副作用も増加している。それらの副作用を防止する目的で我が国では一般的に放射線照射後に白血球除去フィルターを用いて血小板輸血が行われている。現在使用されている白血球除去フィルターは白血球をフィルターの荷電により除去するもので、その種類は陰性荷電、陽性荷電および中性荷電のものである。しかし、それら副作用を防止する反面、陰性荷電をもつフィルターの使用により重篤なショックをおこした副作用も報告された。また、放射線照射後に白血球除去フィルターを使用することにより、血小板製剤中の血小板機能に及ぼす影響についてほとんど検討されておらず、これらの評価は重要な課題であると考えられている。今回の研究では、血小板機能を評価する上で必要となる血小板凝集能測定装置について、従来もつとも広く用いられてきた吸光度法と新たに開発された粒子計測法の評価を行い、放射線照射及び白血球除去フィルター使用前後での血小板数および血小板凝集能の変化について検討をおこなった。

B. 研究方法

・血小板凝集能測定法の評価

今回の研究で用いた血小板凝集能測定装置（PA-20、興和）は血小板凝集塊を大きさ別に小、中、大凝集として検出し、同時に吸光度法でもちいられる透過率も測定出来るという特徴を示す。血小板惹起物質はADP及びコラーゲンをを用いた。検討内容は（1）ACD採血により得た、健常人の多血小板血漿（PRP）をもちいて2法の相関をみた。（2）健常人のPRPを自己貧血小板血漿で希釈し血小板数を10万～40万/ $\mu\text{l}$ の正常域群と10万/ $\mu\text{l}$ 以下の異常域群にわけて検討した。

・放射線照射及び白血球除去フィルター使用による血小板への影響

健常人よりACD採血によりえたPRPを用い、放射線（0、15、30、45Gy）照射後、各荷電をもつ白血球除去フィルターにてPRPを10mlずつ4つのフラクションにわけて濾過し、その濾過前後の血小板回収率及び血小板凝集能について評価した。血小板回収率における血小板数測定にはK-4500

（Sysmex）を、血小板凝集能の測定にはPA-20（興和）を用いた。血小板惹起物質はADPとコラーゲンをもちいた。

## C. 研究結果

### ・血小板凝集能測定法の評価

(1) 粒子計測法と吸光度法では、どの惹起物質でも相関はみられなかった。

(2) 粒子計測法による正常域群の検討では、両惹起物質で、血小板数と大及び中凝集塊に相関が認められた。また異常域群での検討では、両惹起物質とも血小板数と小凝集塊に相関が認められた。

### ・放射線照射及び白血球除去フィルター使用による血小板への影響

(1) 陰性荷電、陽性荷電および中性荷電白血球除去フィルター使用後の血小板回収率は、未照射血小板でそれぞれ約90%、80%及び70%であり、照射後の血小板ではそれより若干低下していた。各フラクションの血小板回収率は、順に血小板回収率が上昇し、最後のフラクションでの血小板回収率は約100%であった。

(2) 放射線照射前後で血小板凝集能に変化は認められなかった。

(3) 図-1に放射線照射後、各荷電の白血球除去フィルター使用後のコラーゲンに対する血小板凝集能の変化を示す。白血球除去フィルター使用後の未照射血小板では、陽性荷電および陰性荷電白血球除去フィルターで両惹起物質に対する血小板凝集能の明らかな低下が認められた。また照射血小板では血小板凝集能が線量依存的にさらに低下していた。しかし、中性荷電のものではほとんど影響が認められなかった。

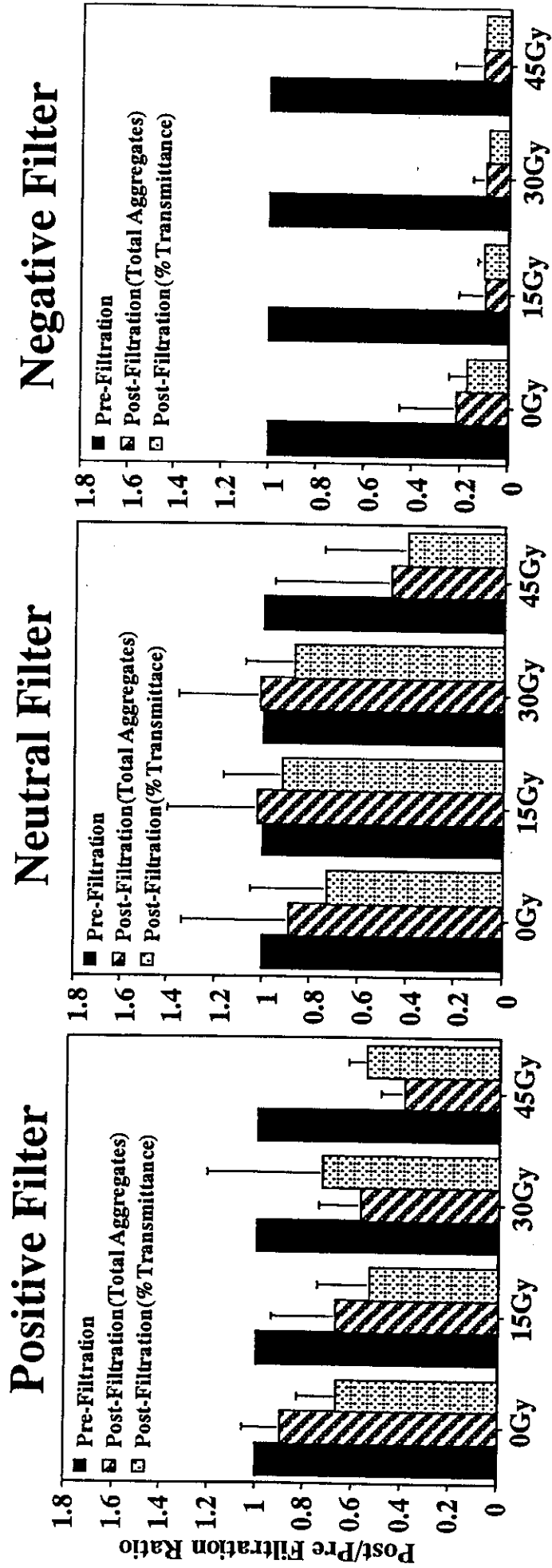
## D. 考察

血小板凝集能測定において粒子計測法は従来の吸光度法に比較して、血小板の凝集塊を直接評価できるという優れた特徴を示し、凝集塊の大きさは血小板数に比例していた。また、従来吸光度法で検出できなかった弱凝集も小凝集塊として検出可能で、血小板が低下している症例(10万/ $\mu$ l以下)でも小凝集塊で評価可能であった。

今回、白血球除去フィルター使用後の血小板凝集能の評価に粒子計測法を用いたのは、白血球除去フィルター使用後に血小板数が低下するため、従来の吸光度法では評価困難であると考えられたためである。放射線照射及び白血球除去フィルター使用による血小板への影響では、白血球除去フィルターを使用することにより血小板回収率は約80%であり、陰性荷電白血球除去フィルターでの血小板回収率がもっとも高かった。放射線照射のみでは血小板回収率に影響はみられなかった。血小板凝集能の影響は、放射線照射のみではほとんど影響はなかったが、白血球除去フィルターの使用により変化がみられた。陰性荷電のもので最も顕著な機能低下が認められた。また、放射線照射後に白血球除去フィルターを使用すると、線量依存的に血小板凝集能が低下していた。このことから放射線照射のみでは血小板数にも血小板凝集能にも影響が認められなかったが、白血球除去フィルターを使用することにより、両者に有意な低下が認められた。実際臨床の場合において、放射線照射後白血球除去フィルターをもちいて輸血が行われていることから血小板製剤中の血小板より機能が低下している血小板が輸血されていると考えられた。今回の研究では、生体外での検討であるため、これらの処置後の生体内の血小板機能について検討を加える必要性があると考えられた。

## E. 結語

今回の研究では、放射線照射による血小板機能の変化はみられなかったが、白血球除去フィルターの使用により血小板機能及び血小板回収率に変化がみられた。このことから白血球除去フィルターの使用は注意して行うべきである。また、輸血後の生体内での血小板の評価について検討が必要であると考えられた。



Dose of Radiation

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomozawa S, Tsuno N, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H : Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 83(3):324-8, 2000 Aug.

Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T, Nagawa H : MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist*. 5(2):108-14, 2000.

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):42-9, 2000 Jan 1.

### 2. 学会発表

Morita S, Handa K, Ishijima A, Yuasa S, Sato K, Nakamura M, Kano K, Shibata Y : Modification of the MPHA test for platelet cross-matching. (ABSTRACT) *Vox Sang*. 78(Suppl 1) : P 39  
26th Congress of the International Society of Blood Transfusion

Nagao N, Taniue A, Tani Y, Tomita T, Shibata H, Shibata Y : Co-relation of platelet antibody production with specific HLA phenotypes. (ABSTRACT) *Vox Sang*. 78(Suppl 1) : P 44  
26th Congress of the International Society of Blood Transfusion

Miyamoto M, Tsuno N, Shibata Y : Platelet alloantibody production and effectiveness of platelet. (ABSTRACT) *Vox Sang*. 78(Suppl 1) : P 251  
26th Congress of the International Society of Blood Transfusion

Tsuno N, Nagura Y, Sone S, Miyamoto M, Osada T, Shibata Y : Effects of irradiation and leukocyte reduction filters on platelet function. (ABSTRACT) *Vox Sang*. 78(Suppl 1) : P 503  
26th Congress of the International Society of Blood Transfusion

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12年度 分担研究報告

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

研究要旨

細胞成分を含む血液製剤の感染性因子不活化法として、S-59、S-303、INACTINE、リボフラビンなどが検討されている。S-59は血漿および血小板製剤を対象としており、UVA照射により細胞内および細胞外ウイルス、細菌、白血球を不活化することができる。S-303とINACTINEは赤血球製剤が対象であり、ウイルスのみならず細菌や白血球の不活化も可能である。リボフラビンは全製剤を対象としており、ウイルス、細菌、白血球を不活化できる。いずれも臨床治験段階であるが、早ければ2002年には米国FDAの承認が下りるものが出てくる。

A. B. 研究目的及び方法

輸血用血液製剤の安全性を高める方法として、新鮮凍結血漿に対してはメチレンブルー光不活化法、SD法が確立されている。しかし、細胞を含む赤血球製剤、血小板製剤の病原体不活化法は開発途上である。各種病原体不活化法の機序、効果、開発段階について国際学術雑誌、学会発表などの資料から情報収集し、調査した。

C. 研究結果

血小板製剤の不活化

S59は、100種類以上の新たに合成されたソラレン化合物のうち、核酸親和性が高いにもかかわらず変異原性が低く、最もウイルス不活化効果の高い化合物である。S-59 150 $\mu$ M、UVA 3 J/cm<sup>2</sup>処理により、細胞外、細胞内HIVとも処理後は検出限界以下となり、 $>6\log_{10}$ の不活化率が得られる。血小板製剤に混入する危険性の高いグラム陽性表皮ブドウ球菌は $>6.6\log_{10}$ 以上、グラム陰性肺炎桿菌は $>5.6\log_{10}$ 以上不活化される。5日間保存においても血小板製剤中に当該細菌は検出されない。S59/UVA処理血小板製剤の生化学的指標（pH、グルコース量、乳酸量など）および機能（凝集能、血小板形態変化、浸透圧抵抗性など）は、7日保存後も未処理の製剤と同等である。HBVおよびHCVを添加した血小板製剤を150  $\mu$ M S-59, 3 J/cm<sup>2</sup>

UVAで処理し、チンパンジーに輸血しても、感染は成立しなかった。また、Tリンパ球の増殖を抑制することから、輸血後GVHDの防止も可能であると考えられる。

S59による血小板製剤の不活化処理は、UVA照射が3分、その後S59を除去するのに6-8時間を要する。S59はヨーロッパにおいて第3相臨床治験が終了した。処理群52例、対照群51例の結果、血球増加数補正值（CCI）は統計的な有意差はあるものの、十分な治療効果があったと報告されている。現在は米国で第3相臨床治験が進められており、2001年中に終了予定である。

もう一つの方法として、リボフラビン+光照射法がある。HIV、ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス（BVDV：bovine viral diarrhea virus、HCVのモデルウイルス）を $5\log_{10}$ および $4.5\log_{10}$ 以上、Staphylococcus epidermidisを $5\log_{10}$ 以上不活化することができる。白血球の不活化については、現在検討中である。血漿含量90%の血小板製剤でも不活化が可能である。ただしその場合、保存液などで置換した血漿含量20%ほどの血小板製剤に比べると、同じ不活化効果を得るのに照射時間が長くかかる。現在のプロトコールでは30-35分間照射である。S59が3分間なので10倍近く時間がかかることになる。しかしS59は照射後化合物を取り除くのに

6-8時間用するのに対し、リポフラビン除去の必要がないためトータルの処理時間はこちらのほうが短い。リポフラビン光処理血小板では、保存7日後、pHとmorphologyはほとんど影響を受けないが、GMP-140の発現がやや上昇し、HSRが低下する。猿を用いた輸注試験では、コントロールと同様のタイムコースでクリアランスされた。

S59は新規化合物で毒性、変異原性に関してどうしても未知の部分が残る。一方リポフラビンはビタミンB2で生体に必須のものであり、ラットなどの動物実験からは全く毒性、変異原性は観察されていない。また光生化学の分野でもよく研究されており、光分解物の毒性についても問題がないことが証明されている。

リポフラビン光不活化法はまだpre-clinicalの段階である。

#### 赤血球製剤の不活化

S303はFRALE (frangible anchor linker effector) 化合物の一つであり、ウイルス核酸に共有結合し、ウイルスを特異的に不活化するアルキル化剤である。この化合物はanchorとして働く核酸結合部位とeffectorとなるアルキル化部位、そしてその2つを繋ぐアルキル鎖からなる。Anchorおよびeffectorには様々な化合物を用いることができる。

150  $\mu$ Mの濃度でヘマトクリット60%の赤血球製剤中のHIV、アヒルB型肝炎ウイルス (HBVのモデルウイルス)、BVDVを $6\log_{10}$ 以上、Yersinia enterocolitica、Staphylococcus epidermidisを $4\log_{10}$ 以上不活化することができる。このときの溶血、ATP、グルコースおよび乳酸レベルは1-6℃、42日間保存後において、コントロールと変わらない。マウス (同種血) およびイヌ (自己血) への投与実験では、処理群と未処理群の赤血球生体内寿命は同等である。イヌへの投与では、臨床症状および臓器特異的な毒性はみられない。しかし、変異原性など遺伝子に対する毒性は明らかではない。

INACTINEの不活化機序は、静電的に核酸に結合し、その後電荷の移動が起こって核酸に共有結合し、ポリメラーゼ反応を阻害してウイルス増殖を防ぐ。静電的であるが故に、インターカレートするS-303に比べgenotoxicityが低いと考えられる。ノンエンベロープウイルスであるバルボウイルス不活化にも有効であり、0.1%INACTINEと6時間、22℃でインキュベーションすることによりブタバウイルスを $>5.9\log_{10}$ 不活化することができる。製剤に添加したYersinia enterocoliticaを不活化し、その増殖を28日間抑えることができる。INACTINE処理した白血球はPHA刺激により増殖することはできず、アポトーシスを起こしてい

た。

処理方法は、赤血球製剤にINACTINEを添加し (1mg/mL)、室温で6-24時間インキュベート、洗浄後4度で保存するというものである。洗浄により、INACTINE濃度は50ng/mLになり、ウサギを用いた毒性試験の結果からは、一人あたり5万単位の輸血に相当する量における安全性が確認されている。Neoantigenicityは検出されず、上清K濃度、溶血率、ATPレベルに对照群との差はなかった。INACTINEの不活化効果は、温度、化合物濃度、pH、イオン強度の影響を受けるが、タンパク質量、ヘマトクリットの影響は受けない。 $^{51}\text{Cr}$ 標識赤血球を用いた第1相臨床試験では、24時間survivalに对照群との差はみられなかった。2001年第1四半期には、第2相臨床試験を終了する予定である。

#### D. 考察

いずれの方法が最も優れているのか、あるいは我が国の血液事業に合致しているのか、まだ決断を下すことはできない。いずれの方法も、ウイルスのみならず、細菌、原虫、寄生虫などのほか白血球も不活化の対象としてしている点が重要である。しかし、細菌等の混入が血小板有効期限の延長の大きな障害になっているとすれば、不活化法はその障害を除く有力な方法となりうる。

#### E. 結論

感染性因子の不活化法は、NAT、放射線照射血、保存前全製剤白血球除去などとともに、輸血用血液製剤の安全対策の一つにすぎない。従って、他の安全対策との関わりを整理し、効率良い導入を考えていかなければならない。

#### 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。

分担研究報告書

モノクロナール抗体精製乾燥濃縮血液凝固第 VIII 因子製剤(クロスエイト M)の製造におけるヒトパルボウイルス B19に関する研究

分担研究者 脇坂 明美(日本赤十字社血漿分画センター)  
研究協力者 横山 毅,前野 英毅,野口 幸一,武田 芳於,室塚 剛志(日本赤十字社血漿分画センター)

研究要旨

ヒトパルボウイルス B19(B19)の Receptor mediated hemagglutination (RHA)法によるスクリーニング効果をモノクロナール抗体精製乾燥濃縮血液凝固第 VIII 因子製剤(クロスエイト M、日本赤十字社)とその原料血漿プールについて PCR 法により調べた。原料血漿プールにおける RHA スクリーニングの有効性は、導入前に比べ、導入後の B19 DNA 量が著しく減少したことにより確認された。同様に、クロスエイト M 最終製品中の B19 DNA 量も RHA スクリーニングの導入により顕著に減少し、最近製造された 51 ロットについては B19 DNA は検出されなかった。さらに 10 倍濃縮して検査した場合も 36 ロットが検出限界以下であった。また、RHA スクリーニング済みの原料血漿プールに検出される B19 DNA 量をさらに低減させることの可能性についても検討した。

A. 研究目的

ヒトパルボウイルス B19 は伝染性紅斑、慢性溶血性貧血における aplastic crisis、胎児水腫などの疾患を引き起こす脂質エンベロープを持たない小型球状の DNA ウィルスで、熱、酸、クロロホルム処理や界面活性剤処理に対して抵抗性を示し、不活化が困難であり、血漿分画製剤による B19 感染の報告がある。そこで、日本赤十字社では 1997 年から試行的に実施されていた RHA 法を用い、献血された全ての血液に対しスクリーニングを開始した。一方、海外では血漿分画製剤の原料血漿を対象に B19 核酸増幅検査(Nucleic acid amplification test; NAT)の導入が検討され、一部では実施されており、FDA では血漿分画製剤の原料血漿プールは B19 DNA 量が  $10^4$  genome equivalents (geq)/ml 以下のレベルにすることを勧告している。本研究ではこの様な世界情勢をふまえ、原料血漿への RHA スクリーニング導入の効果と更なる B19 の低減化について検討した。

B. 研究方法

B-1 RHA スクリーニングの効果評価  
対象として RHA スクリーニング導入前の 1996 年及び導入後の 1998 年、1999 年に製造されたクロスエイト M 及びその原料血漿プールについて検討を行った。RHA スクリーニングの効果は原料血漿プール中の B19 DNA 量により評価した。RHA

スクリーニング導入前の 1996 年及び導入後の 1998、1999 年の原料血漿プール中の B19 DNA を PCR 法を用いて限界希釈法により行った。100  $\mu$ l の検体を PK/SDS 処理した後、フェノール/クロロホルム法によりウィルス DNA を抽出、精製し、1st プライマーとして 425 (sense; CAGTAT CAGCAGCAGTGGTGGTG)、426 (antisense; GGGATTAGAAGCTCCCACATGGC)を用い、2nd プライマーとして 425IN (sense; ACTGA AACCCCGCGCTCTAG)、426IN (antisense; CAGGTAAACCCCTTACACCGT)を用いた nested-PCR 法で増幅し、アガロース電気泳動法により分離、検出した。

B-2 原料血漿についての更なる B19 の低減化のための検討

対象として RHA スクリーニング済みの原料血漿を用いた。血液バッグに付いているセグメントを使用し、約 100 人プールを作成した。NAT の方法は、200  $\mu$ l の検体を QIAGEN 社 QIAamp 96 Virus BioRobot Kit により抽出後、ゲノムサイエンス社パルボウイルス B19 遺伝子定性キットを用い、PCR 法により増幅、検出した。さらに陽性となった検体を 1000 倍まで段階希釈を行った検体を用い、測定を行った。

PCR 法で測定した B19 量はそれぞれの方法での検出限界を  $10^0$  PCRunit/ml と定め、これに検体の希釈倍率を乗じて求めた。



### C. 研究結果

#### C-1 原料血漿に対する RHA スクリーニング導入の効果

RHA スクリーニングの導入により原料血漿中の B19 DNA 量は顕著に減少し、その差異は統計学的に有意であった ( $p < 0.001$ ) (図 1)。原料血漿プールの 1 バッチは約 10000 人の献血者から提供された 1500 L のプール血漿である。RHA スクリーニングが導入される以前の 1996 年の 112 バッチの原料血漿プールでは B19 DNA 量のピークは  $10^8$  PCRunit/ml であり、全体の 55% が  $10^6$  PCRunit/ml 以上であった。一方、スクリーニング導入後の 1998 年には B19 DNA 量のピークは  $10^2$  PCRunit/ml にシフトした。5% が検出限界以下であり、49% が  $10^2$  PCRunit/ml 以下であった。1999 年には 16% が検出限界以下であり、 $10^2$  PCRunit/ml 以下のバッチは 69% であった。しかし、 $10^6$  PCRunit/ml 以上のバッチは 2.2% 含まれていた。

これに伴い、RHA スクリーニング導入後の原料血漿を用いて製造されたクロスエイト M の最終製品中の B19 DNA 量も顕著に減少し、1998 年 6 月以降製造された 51 ロットのクロスエイト M 最終製品では B19 DNA は検出されなかった (図 2)。さらに、10 倍濃縮 ( $10^{-1}$ ) して検査した場合も 36 ロットが B19 DNA は検出限界以下であった。原料血漿プール中に含まれる B19 はクロスエイト M 製造工程で除去されると考えられる。B19 を添加して行ったウイルス除去のバリデーション実験結果からは、B19 DNA の対数減少率はモノクロナール抗体カラムクロマトグラフィー工程で 4.9、イオン交換カラムクロマトグラフィー工程で 1.9 と見積もられ、合計は 6.8 であった。

#### C-2 原料血漿についての更なる B19 の低減化のための検討

現在の状況では RHA スクリーニング導入後も原料血漿プールの段階で比較的高力価のものが少数存在する。数個の高力価の B19 陽性血漿の混入によりプール全体を汚染し、この様な現象が起こると考えた。これらを除くために NAT スクリーニングの検討を行った。100 人プール、849 検体での B19 DNA の NAT スクリーニング

結果を示す (表 1)。100 プール検体に含まれる B19 DNA 含量は  $10^2$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上、 $10^3$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上のものが、それぞれ 11、7 検出された。

### D. 考察

日本赤十字社では HBV、HCV、HIV に対しては献血された全ての血液を対象に、PCR 法を用いた NAT スクリーニングを行っている。また、これらのエンベロープを持つウイルスに対して有効なウイルス不活化法が血漿分画製剤の製造工程に導入されている。

現在の血漿分画製剤に適用されている方法では B19 を不活化、除去するのは難しいと考えられる。そこで、B19 への対応策としては原料血漿について B19 スクリーニングを行い、陽性血漿を排除するとともに、新たに製造工程中での効果的な B19 不活化、除去方法を開発することが重要であると考えられる。

我々は RHA スクリーニングの導入により、B19 DNA 量を顕著に減少させることができた。その結果、最終製品中 51 ロットの B19 DNA は陰性であった。さらに、この 51 ロット中の 36 ロットでの B19 DNA は 10 倍濃縮溶液でも検出されなかった。

このことは、RHA スクリーニングにより原料血漿中のウイルス量が軽減された際には、モノクロナール抗体カラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより残存ウイルスは効果的に除かれることを示している。

次に、RHA スクリーニング導入後も高力価の B19 DNA 陽性血漿が混入した原料プールが存在することから、さらなる安全性向上のため、原料血漿への B19 NAT スクリーニングの導入の可能性を検討した。100 プールのスクリーニングの結果をもとに、スクリーニングした 10000 人の血漿をプールした場合、 $10^3$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上の陽性検体を除いてプールした場合、 $10^3$  及び  $10^2$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上の陽性検体を除いてプールした場合の B19 DNA 量を見積もった (表 2-1)。それぞれ排除して原料プールを構成すると  $10^{1.08}$ 、 $10^{0.74}$  PCRunit/ml と見積もられた。本測定法の 95% 検出感度は 205.5 geq/ml であったので、それをもとに換算すると高力価の検体を排除しない場合、 $10^3$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上

の陽性検体を除いてプールした場合、 $10^3$  及び  $10^2$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上の陽性検体を除いてプールした場合はそれぞれ  $10^{4.04}$ 、 $10^{3.39}$ 、 $10^{3.05}$  geq/ml と推定された。検討を行った 2000 年は伝染性紅斑病の非流行期にあたり、感染者数は流行期であった 1992 年の約 1/5 であることが厚生省の「感染症サーベイランス事業報告」で記されている。そこで、感染者数が 5 倍になった場合の原料血漿プールでの B19 DNA 量を見積もった(表 2-2)。その結果、流行期においても  $10^3$  及び  $10^2$  PCRunit/200  $\mu$ l 以上の陽性検体を排除することにより、原料血漿プールの B19 DNA 量を排除前の 1/10 以下にでき、FDA の勧告する  $10^4$  geq/ml 以下のレベルに抑えられると考えられる。

#### E. 結論

RHA スクリーニングの導入により、原料血漿プールへの B19 DNA の混入は激減した。スクリーニング後の残存ウイルスはクロスエイト M 精製段階で効果的に除かれることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### F-1 論文発表

Y.Takeda et.al: RHA screening and reduction of Parvovirus B19 DNA from Immunopurified Factor VIII concentrate Vox Sanguinis accepted.

##### F-2 学会発表

- 1) 前野英毅、古谷健志、泉浩業、室塚剛志、脇坂明美、松本修三 :モノクロナル抗体精製濃縮人血液凝固第 VIII 因子製剤(クロスエイト M) のモノクロナル抗体精製工程における TTV の除去 日本輸血学会雑誌 2000;46:213
- 2) 村井活史、泉浩業、白川幸子、室塚剛志、脇坂明美、松本修三 :S/D 処理によるウイルスの不活化動態の検討 日本輸血学会雑誌 2000;46:213
- 3) 古谷健志、室塚剛志、脇坂明美、松本修三 :ミニプールの核酸増幅検査の有効性 日本輸血学会雑誌 2000;46:211
- 4) 前野英毅、古谷健志、泉浩業、猪股秀昭、室塚剛志、脇坂明美、松本修三 :モノクロナル抗体精製濃縮人血液凝固第 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 TTVirus( TTV)

の挙動について 血液事業 2000;23:483

5) 村井活史、泉浩業、白川幸子、室塚剛志、脇坂明美、松本修三 :モノクロナル抗体精製濃縮人血液凝固第 VIII 因子製剤(クロスエイト M、日本赤十字社) の S/D 処理工程におけるウイルス不活化動態の検討 血液事業 2000;23:484

6) K.Furuya, H.Emura, T.Murozuka, A.Wakisaka,S.Matsumoto,C.Matsumoto,S.Mitsunaga,M.Takahashi,K.Nishioka :5.5 MILLION NAT SCREENING AGAINST HBV-DNA,HCV AND HIV-RNA FOR PRODUCTION OF PLASMA DERIVATIVES IN JAPAN Vox Sanguinis.2000;78:P433

7) 前野英毅、古谷健志、泉浩業、猪股秀昭、室塚剛志、脇坂明美、松本修三 :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 TTV の挙動について 輸血分科会 2000;19

8) 泉浩業、村井活史、白川幸子、前野英毅、室塚剛志、脇坂明美、松本修三、藤井暢弘 : 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性に関する検討 輸血分科会 2000;19

#### G. 知的所有権の取得状況 なし

図1 分画用原料血漿プール中のB19 DNAレベル

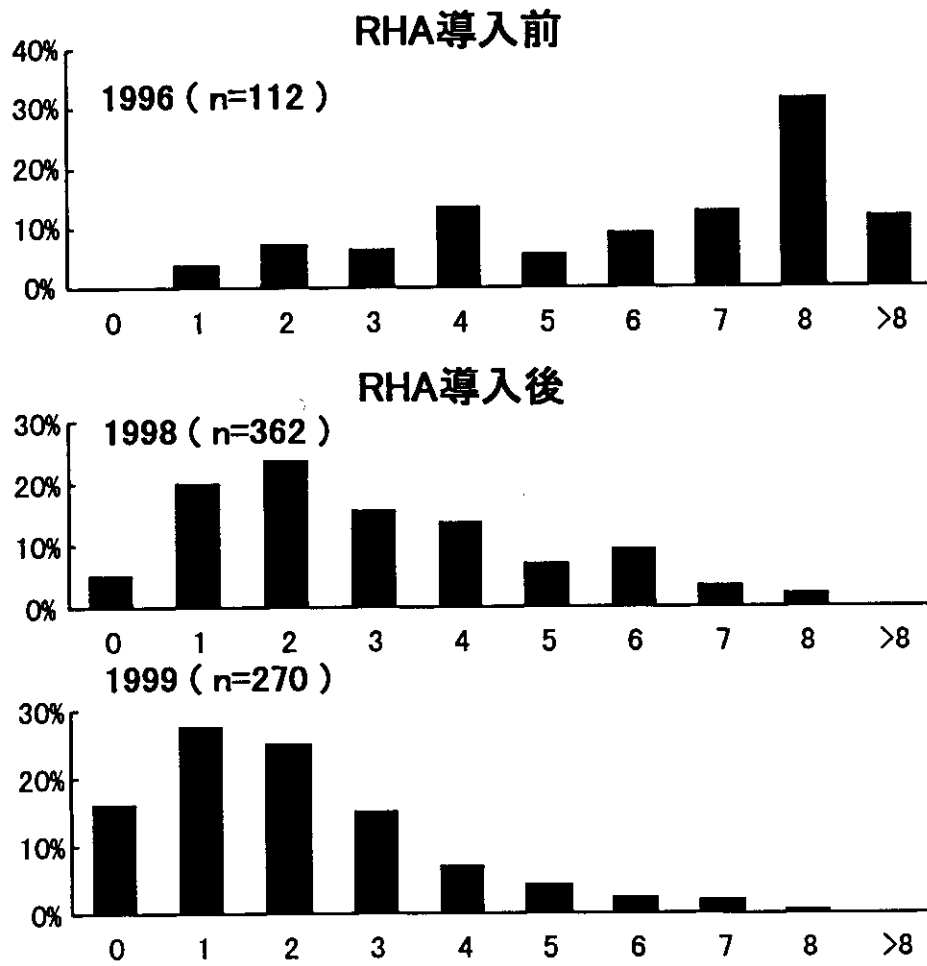


図2 クロスエイトM濃縮製剤中のB19 DNAレベル

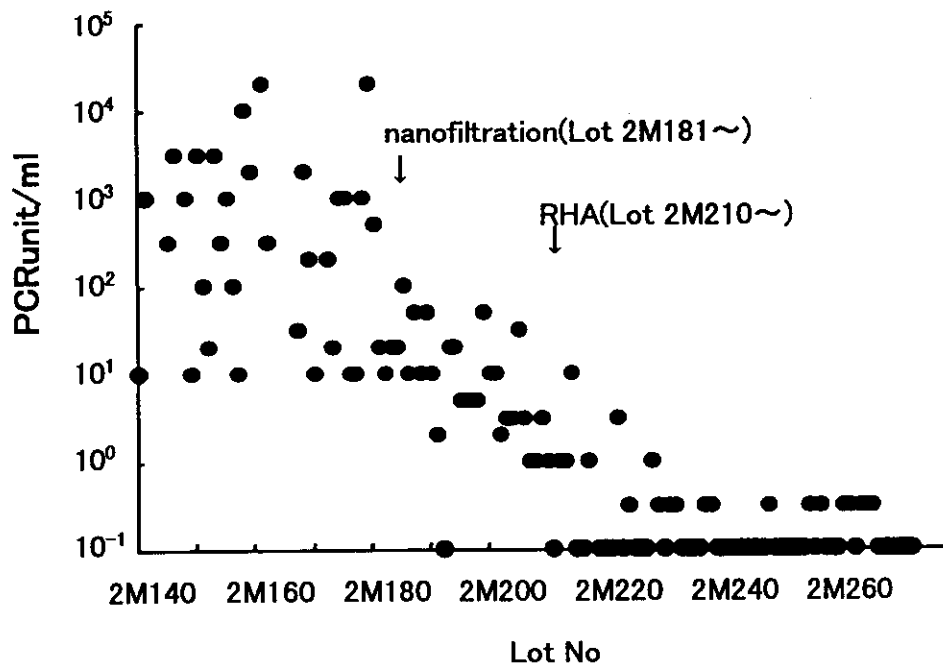


表1 分画用原料血漿のNATスクリーニングの結果

希釈倍率		検体数	陽性率
1倍	陰性	474	
1倍	陽性	293	
陽性検体の内訳		PCRunit/200 $\mu$ l	
1倍	10 <sup>0</sup>	211	24.9%
10倍	10 <sup>1</sup>	64	7.5%
100倍	10 <sup>2</sup>	11	1.3%
1000倍	10 <sup>3</sup>	7	0.8%

表2 高力価B19除去後の原料血漿プールのB19 DNA量

1. 2000年

	10 <sup>x</sup> PCR unit/ml	10 <sup>x</sup> geq/ml
排除前	1.73	4.04
10 <sup>3</sup> PCRunit/200 $\mu$ l陽性検体除去	1.08	3.39
10 <sup>3</sup> 、10 <sup>2</sup> PCRunit/200 $\mu$ l陽性検体除去	0.74	3.05

2. 1992年

	10 <sup>x</sup> PCR unit/ml	10 <sup>x</sup> geq/ml
排除前	2.42	4.79
10 <sup>3</sup> PCRunit/200 $\mu$ l陽性検体除去	1.73	4.03
10 <sup>3</sup> 、10 <sup>2</sup> PCRunit/200 $\mu$ l陽性検体除去	1.34	3.74

研究成果の刊行

なし

## 「体外診断薬評価に使用する国際標準品設定計画」について

分担研究者 小室勝利 国立感染症研究所 部長

### 研究要旨

2000年9月、WHO主催による体外診断薬の性能評価法に使用する国際標準品作製につき、その必要性、今後の進め方等について、専門家協議に向けてその方向性を協議する会議が開かれた。日本国内に於いても種々の標準品作製作業が進められているが、当会議の議論の一部を紹介する。

#### A. 研究目的

会議の目的は、多種多様な体外診断薬の性能評価のためには、各国共通に使用し得る国際標準品を作製することが必要であり、現在作製中のものの次のステップとして、どの様に実施するかを話し合うことであった。当研究報告の目的は、国内で進行している NAT 用標準品作製作業の参考になればとの考えである。

#### B. 研究方法と結果

参加メンバーは、国際生物学的製剤標準化学会 (IABS)、国際血液学会 (ICSH)、国際臨床病理学会 (IFCC)、国際血栓止血学会 (ISTH)、国際免疫学会 (IUIS)、国際応用化学学会 (IUPAC)、国際病理学会 (WASP) に属する標準化委員会のメンバー、WHO コラボレーションセンターで、これに加え政府関係機関 (FDA、ポールエールリッヒ、厚生省) であった。会議は WHO の基本的見解表明、各関連学会より、現状説明、問題点、今後の方向性についての意志表明があり、続いてアメリカ、EU、日本政府関係機関による法的背景、考え方の発表が行われ、各々に対する討議と、全体会議での総括が行われた。主な討議内容は、

- 1). 必要性：全ての参加者は、必要性を主張、合意した。
- 2). 標準品の範囲：予防、治療用生物学的製剤の評価に用いる検査薬及び診断薬として用いる生物由来のもの。但し各学会は希望提出すること。
- 3). 維持、管理、交付：WHO コラボレーションセンターとする。
- 4). 各関連学会は標準品作製の優先順位をつけて、WHO に提出する。であった。

尚、WHO の立場を考慮して、地域性、発展途上国の意見も考慮することが追加された。

#### C. 結論

標準品設定作業に入る。具体的対応は専門家会議に依頼する。

専門家会議の構成は、WHO の調整にゆだねる。

各関連学会は問題点、標準品作製優先順位を早急に明確にすること、が決定された。

後日、寄せられた希望事項を別紙に記載する。

#### D. 考察

世界各国で診断薬評価に使用する標準品の作製の必要性が主張されている。今回の会議は、出席組織に明らかな様に、主に生物学的製剤への要望、血液関連診断薬用の標準品に対する要望が強かった。

まもなく、各関連学会の了解の上で、計画がスタートするものと思われる。

#### E. 研究開発

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshikawa, T. Komuro, K. et al : Suppression of specific Ig E antibody responses by liposome-conjugated ovalbumin in mice sensitized with ovalbumin via the respiratory tract. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 121:108~115, 2000
- 2) Naito, S. Komuro, K. et al : Anti-tetanus toxoid antibody production and protection against lethal doses of tetanus toxin in hu-PBL-SCID mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 123:149~154, 2000

## **ANNEX I: WHO International Biological Standards On-going and Priority Setting of Projects**

### **ICSH: List of Proposed International Reference Materials**

Blood Cells in defined concentration and cell size as counting and sizing standards  
Platelet counting standard  
Reticulocytes  
Various monoclonal antibodies for identification of lineage of abnormal leucocytes  
Glucose-6-phosphate dehydrogenase and other red cell enzymes  
Haemoglobinopathy markers  
Intrinsic factor and intrinsic factor antibodies  
Transcobalamins  
Thrombopoietin  
Transferrin monoclonal antibodies

### **ISBT: Areas of priority**

Blood typing sera  
Viral safety tests

### **ISTH: International Reference Materials to define biological activity Units**

WHO should continue efforts to develop international biological reference standards to apply in standardization for hemostasis and thrombosis *in vitro* assays. In general, the value assigned to the reference material should be in relation to biological activity as opposed to mass. Traceability should be ensured through well described methods and materials.

### **IFCC: Areas of work**

Uniform definition of Biological Reference Materials in relation to medical needs  
Reference Materials in preparation:

HCG Isoforms  
Lp(a)  
Myoglobin, Troponins  
HbA1c  
PSA  
Homocystein, ATIII  
Osteocalcin  
TSH  
T4/T3  
FV Leiden DNA  
Alkaline Phosphatase  
CRP  
STransf. Receptor

**CBER: List of proposals on International Biological Standards**

CBER will continue to be involved in all the WHO projects related to the development of viral safety markers applied in the virological safety testing of blood and blood products, both serology and Nucleic Acid Amplification Technology. CBER is placing a high priority to the development of reference materials on microbial agents which could be transmitted to humans.

HCV: anti-c100-3, anti-c22, anti-c33, anti-NS5

HBsAg: adw, ayw

Anti-HBs: anti-adw, anti-ayw

Anti-HBc: anti-HBc, anti-HBe

HIV-1: p-24, anti-p24, anti-gp41, anti-gp120, anti-gp160

HIV-2: anti-p27, anti-gp36, anti-gp120, anti-gp160 (and p27 if possible)

HIV subtype Group M: anti-gp41, anti-gp120 (and anti-gp160 if possible)

HIV subtype Group O: anti-gp41, anti-gp120 (and anti-gp160 if possible)

HTLV: anti-p19 (gag), anti-p24(gag), anti-gp46(env) (and anti-gp21(env) if possible)

All NAT, coagulation and blood banking reference preparations under development should continue as planned. CBER defers to CDRH for all othermarkers.

**CDRH: List of proposals on International Reference Materials**

CDRH strongly endorse WHO efforts in promoting the development of International Standards, Reference Preparations and Reference Methods for Biological Standards. This effort on the part of WHO will greatly compliment our programs that are emphasizing a standards based review process whenever possible. In general CDRH concurs with the statements and suggestions made by ISTH and other Hematology groups about a pressing need for standards in the areas of general hematology, hemostasis, thrombosis and for factor assays. Included in this would be d-dimers and Leiden Factor V.

In the area of tumor markers development of reference materials are encouraged for any of the markers currently being used clinically such as CA15-3 and CA125. International standards are also needed for FISH assays and immunohistochemical assays for molecular markers such as HER2/neu and many of the other molecular oncology markers.

In vitro allergy testing is another area that would benefit from the development of international standards. Materials for latex and some of the venoms would be particularly interesting.

International reference materials for Lp(a), bone markers, telopeptides and anti cardiolipins could also be considered.

**Notified Bodies: International Reference Materials needed**

HBsAg Reference Panel

HCV Ag (core)

Anti-HCV genotype reference panel

Anti-HIV subtype reference panel

HCV-RNA, HBV-DNA, HIV-RNA (geno-, subtypes)



**National Institute of Health, Japan**

Japan will continue to be involved in all the WHO projects related to the development of viral safety markers applied to the virological safety testing of blood and blood products.