

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化  
及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉澤 浩司

平成15年(2003)4月

## 目次

### I. 総括研究報告書

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究 ————— 1

吉澤浩司

### II. 分担研究報告書

1. 核酸増幅検査 (NAT) の技術の標準化のために資する標準パネルの作製  
— 中間報告 ————— 3 3

吉澤浩司

2. 頻回の凍結～融解操作が標準血漿中に存在する HCV RNA の安定性に及ぼす  
研究 ————— 4 3

吉澤浩司

3. 血液製剤の安全性確保のための品質管理技術の開発に関する研究—HIV 陽性  
献血液のウイルス量及び HIV のタイプ、サブタイプに関する研究—— 4 8

今井光信

4. 血液製剤のウイルス安全性の確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の国際  
動向に関する研究 ————— 5 8

山口照英

5. 血液製剤の安全確保のための品質管理技術の開発に関する研究: HBs 抗原検  
出キットの検出感度表記の統一 ————— 6 3

竹森利忠

6. 血液保存バッグ中血液製剤に溶出する可塑剤フタル酸ジ(2-エチルヘキシ  
ル)の新規分析法の開発 ————— 6 6

中澤裕之

7. 血液バッグから保存血液中に溶出するテトラヒドロフラン、2-エチル-1-ヘ  
キサノール、トルエンの溶出挙動および血液製剤中の残留実態調査—— 7 6

宮崎 豊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

————— 86

IV. 研究成果の刊行物

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び  
血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

主任研究者 吉澤 浩司 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授

研究要旨

3年計画の2年目にあたる平成14年度は、標記研究課題の目的を全するための基礎を確立するために、下記の研究を実施した。

1. 標準パネル血漿の作製

B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、エイズウイルス (HIV) の核酸増幅検査 (NAT) および血清学的検出系の精度管理に資する標準パネル血漿作製のための作業を継続し、HBV用標準パネル血漿については完成、HCV用、HIV用パネル血漿については作製作業途上の状態にある。

なお、完成したHBV用標準パネル血漿(陰性対照血漿も含めて計100本/セット)については、100セットの準備が完了し、またNIBSCから分与を受けたWHOの標準血清との同時測定を行ない、両者の測定値の整合を図ることが可能な状態となっている。

2. 頻回の凍結 融解操作が標準血漿中に存在するHCV RNAの安全性に及ぼす影響

HCV RNA量が $7.0 \times 10^6$  copy/ の血漿を80°C凍結 37°C温浴融解、および、20°C凍結 37°C温浴融解の条件下で、それぞれ10回凍結 融解操作を加える過程でサンプリングを行ない、Taqman PCR、Amplifire monitor V. 2.0<sup>®</sup>で同時測定を行なった結果、各操作段階のそれぞれの検体から検出されるHCV RNA量には差が認められなかった。この結果は、標準パネル血漿を現場で利用する際の有用な意義を持つものであると考えられた。

3. HIV検査陽性献血血液44例についてウイルス量(HIV-1RNA量)を、PCR法により測定した結果、10,000以上と比較的血中ウイルス量の高い例が33例(75%)と多く、100,000以上とかなり高い例も10例(23%)あった。また、サブタイプ解析の結果、サブタイプBが91%とその大部分を占めており、東南アジアに多く日本でも異性間感染例に多くみられるサブタイプA/Eは9%と少なかった。今回の結果では、HIV検査陽性献血者検体の中にはサブタイプBとA/E以外のサブタイプは見られなかったが、日本のHIV感染者にも数は少ないながらサブタイプC,D,F,G,A/C等のHIVも見出されていることから、今後、血液製剤の安全確保のための技術の標準化・精度管理法を開発していく上で、HIV-2とともにこれら多様なHIV-1サブタイプの存在も考慮しておくことが重要である。

4. 血液製剤のウイルス NAT ガイドライン策定に当たって考慮すべき事項や要素について、

関連する文献や EU 及び米国の NAT ガイドラインについて調査研究を行った。その結果、特異性、感度、再現性等をどの様に担保するか、プライマーやプローブをはじめとする用いる試薬・試液の選択基準等、NAT を導入に際して求められる基本的要件は共通していることが明らかになった。

5. HBs 抗原検出キットに関する国際動向について調査研究を行った。HBs 抗原検出キットに関しては、医療機関、臨床検査医学会、ウイルス学会、体外診断用医薬品業界と連携し、各診断薬キット使用状況を調査し現状を把握するとともに、HBV 検査薬の国内での感度表記の標準化とそれに伴う品質管理について、実施の可能性と方策について研究調査することが今後必要と思われる。

6. 前年度、血液製剤の保存や輸血に利用されているポリ塩化ビニル製血液バッグに残留する化学物質をスクリーニングして、リスク評価の順位を決定した。これに基づき、最も使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)の新規分析法を構築し、その溶出挙動の解明を目的とした。本法は、DEHP 及びその代謝物である MEHP を同時に測定することが可能であり、その分析時間も前処理を含め、一検体 30 分と短く、有用な分析法である。又、試料前処理の操作過程を出来るだけ軽減させるため、HPLC のオンライン前処理システムを利用した結果、汚染の低減や分析・前処理操作時間を短縮化することができた。本法は、血液保存バッグから溶出する DEHP の挙動解明に有用な精度の高い分析法である。

7. 国内メーカー3社(川澄、JMS およびテルモ社)が製造した全血用シングルバッグ(200 mL)各2個を用いて、これらバッグから保存血液(赤血球および血漿)中に溶出するテトラヒドロフラン(THF)、2-エチル1-ヘキサノール(2-EH)、トルエンなどの量を21日間にわたって経時的に測定した。その結果、これら揮発性化合物の保存血液中の濃度は時間とともに増加する傾向が認められ、それぞれの最高濃度は、THF が 13.4ppm(川澄/血漿/14日、実験開始時:10.4ppm)、2-EH が 3.75 ppm(JMS/赤血球/21日、実験開始時:0.13ppm)、トルエンが 45ppb(JMS/血漿/14日、実験開始時:13.6ppb)に達した。THF は保存開始時の濃度が高く、その時間的な増加は非常に緩やかであったのに対し、2-EH には低い濃度から時間とともに急激に増加するという特徴が、また、トルエンには両者の中間的な増加挙動が認められるとともに、THF 濃度に関してはメーカー間に大きな差が存在することが明らかとなった。

一方、バッグの保存場所に使用した愛知県赤十字血液センターの血液製剤冷蔵保管庫の室内環境調査を実施したところ、高い濃度の THF ( $775\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、2-EH ( $21.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、およびトルエン ( $417\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) が検出された。しかしながら、同庫内に設置した活性炭デシケータを用いての保存実験より、これら保存環境中に存在する化合物が血液製剤に移行する量は、バッグからの溶出量に比べると格段に少ないことが示唆された。

また、同センターで期限切れのため廃棄処分となった血液製剤 113 試料(赤血球 43、血漿 47 および血小板 23)の分与を受け、これら製剤中に残留する上記化合物の濃度を測定した。

その結果、THF が 0.007~76.9ppm、2-EH が 0.18~39.9ppm、トルエンが ND~92.2ppb と 21 日間の保存実験での最高値を超えた値を含む非常に広い範囲で検出された。以上の結果から、これら化合物の血液中の残留には、血液製剤の種類や保存期間だけでなく、メーカーやバッグの材質、構造による違いが大きく関わっていることが示唆された。

#### 分担研究者

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所	部長
中澤裕之	星薬科大学 分析化学教室	教授
山中 烈次	日本赤十字社 血液事業部	次長
宮崎 豊	愛知県衛生研究所	所長
竹森 利忠	国立感染症研究所 免疫部	部長
今井 光信	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	部長

#### 班長研究協力者(班友)

玉造 滋	(株)ロシュ・ダイアグノスティックス 遺伝子診断技術開発部	リーダー
矢萩 則夫	(株)オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス 開発室	室長
皆川 英孝	(株)富士レビオ 商品開発グループ	グループ長
山田 徹	(株)ダイナポット総合研究所 シニア・クリニカルサイエンティスト	学術部
柚木 久雄	日赤中央血液センター NAT 部	部長
飯田 俊二	日本赤十字社 血液事業部	課長
松倉 晴道	大阪赤十字血液センター 試薬製造部	課長
水井 正明	広島赤十字血液センター 技術部	副部長
田中 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	講師
片山 恵子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	助手
熊谷 純子	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	助手
小宮 裕	広島大学大学院 疫学・疾病制御学	
水落 利明	国立感染症研究所細菌	室長
近藤 真規子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	研究員
嶋 貴子	神奈川県衛生研究所 ウイルス部	研究員
岩田 明子	国立医薬品食品衛生研究所	研究員
井之上浩一	星薬科大学	助教授
吉村 吉博	星薬科大学	講師

猪飼 誉友	愛知県衛生研究所
近藤 文雄	愛知県衛生研究所
伊藤 裕子	愛知県衛生研究所
後藤 智美	愛知県衛生研究所
岡 尚男	愛知県衛生研究所
松本 浩	愛知県衛生研究所

## A. 研究目的

1. B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、エイズウイルス(HIV)検出のための核酸増幅検査(NAT)の標準化を目的とした標準パネル血漿の作製
2. 標準パネル血漿を活用し、他施設間での NAT の技術の標準化を図るためのコントロールサーベイの実施とその効果の評価
3. 2002年に新たに入手できた HIV 検査陽性の献血血液 44例について HIV 抗体、血中ウイルス量および HIV のタイプ、サブタイプの解析を行った。
4. 血液製剤のウイルス安全性確保を目的とする NAT ガイドラインの策定にあたって各国の動向を調査し、現時点での科学的水準から NAT ガイドラインに取り入れるべき基本的要件を明らかにすることを目的として、欧米の NAT ガイドラインの調査研究を行った。
5. HBs 抗原検出キットの国際動向について調査研究した。
6. 血液製剤の保存や輸血に利用されているポリ塩化ビニル製血液バッグに残留する化学物質をスクリーニングし、リスク評価の順位を決定した。本研究では、最も使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

(DEHP)の測定をカラムスイッチング-液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)を用いることで、分析前処理時間の短縮化することにより、汚染の低減を目指した。さらに、ヒトへの DEHP 暴露を正確に評価するためには、血液中での DEHP 代謝物であるフタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP)も一斉に分析することが望まれる。本法論的に、両化合物を一括に測定できる新規分析法が必要とされる。本研究では、PVC 製血液バッグから溶出する可塑剤である DEHP の溶出挙動等の解明を行うことを目的として、DEHP 及び MEHP の新規一斉分析法を構築する。

7. テトラヒドロフラン(THF)、2-エチル-1-ヘキサノール(2-EH)、およびトルエンの 3 種類の揮発性有機化合物(VOC)を対象に、血液バッグからの溶出挙動等についてより詳細な調査を行なうとともに、愛知県赤十字血液センターより期限切れのため廃棄処分となった赤血球、血漿、および血小板製剤の分与を受け、これら保存血液製剤中に残留する 3 種類の VOC 濃度を測定し、検討を加えた。

## B. 研究方法

1. 標準パネル血漿の作製
  - 1) 候補血漿の選択

HBV、HCV、HIV の標準パネル血漿(陰性対照検体も含めて、HBV 用、HCV 用、HIV 用それぞれ 100 本/セット)×100 セットを作製する。

日赤血液センターにおいて製剤として調製したヒトへの使用有効期限内の新鮮凍結血漿のうち、上記ウイルスが陽性であったため、又は S-ALT 値高値(60 IU/l 以上)であったことからヒトへの使用ができなかったものを用いた。ウイルス感染のステージは、感染早期(ウインドウ期)、キャリア期、一過性感染の晩期(ウイルス核酸陽性)、および感染既往期のものを選択する。ウイルス遺伝子型(ジェノタイプまたはサブタイプ)は、国内で見出されたすべてのものを網羅するように選定する。ウイルス量は低値から高値に至るものを、また、抗体価は低力価から高力価に至るものを網羅するように選択する。S-ALT 値高値の血漿は 3 種のウイルスマーカー陰性対照候補血漿として選択する。

## 2) ウイルス核酸、ウイルス抗原、抗体の測定

標準パネル血漿作製のための作業部会に参加する班長協力研究者が分担して検出、定量し、その結果をもとに目的に適った検体を標準パネル血漿として選択する。また最終段階で、各ウイルスについて NIBSC から分与を受けた WHO の標準品との同時測定を行ない、本研究班が作製する標準パネル血漿との測定値の整合を図ることができるようにする。

## 2. 標準パネル血漿の安定性の検討

凍結-融解操作が標準血漿中に存在するウイルス核酸の安定性に及ぼす影響を検討する。

3. 作製した標準パネル血漿を活用し、他施設間での NAT の技術の標準化を図るためのコントロールサーベイの実施法とその効果の検

証法を検討する。

## 4. HIV-RNA の定量

HIV 検査陽性検体 44 例の血中ウイルス量の定量は、HIV-RNA 定量用キット(アンプリコア HIV-1 モニター) Ver.1.5 を用いた PCR 法で行った。

## 5. HIV 検査陽性献血検体の HIV 抗体の解析

HIV 抗体検査陽性献血血液について、HIV-1PA 試薬と HIV-2PA 試薬および WB 試薬とを用いて、HIV-1 抗体と HIV-2 抗体の解析を行った。

## 6. HIV 検査陽性献血検体のサブタイプの解析

1) HIV-1-RNA の抽出と RT-PCR による HIV-1 遺伝子の増幅

各血漿 100ul からグアニジンチオシアネート法で HIV-1RNA を抽出後逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。逆転写酵素の反応後 nested PCR 法により HIV-1 の env V3 領域を増幅し、PCR 産物をカラム精製した。

cDNA 作製プライマー

IC462M : 5-GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCT-3

1st PCR プライマー

ICMK650 : 5-AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC-3

IC462M : 5-GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCT-3

2nd PCR プライマー

KH41 : 5-TCAACTCAACTGCAGTTAAAT-3

C3E : 5-AGAAAAATTCCCCTCTACAATTAA-3

## 2) シークエンス反応

Big Dye ターミネーターサイクルシークエンスキット (ABI)、オートシークエンサー Prism 310 (ABI) を用いて塩基配列を決定し、neighbor-joining 法による系統樹を Clustal x により作成し、サブタイプを決定した。

## 7. 検体

HIV 抗体検査で陽性と確認された献血血液 42 例と抗体検査で陰性、NAT 検査で陽性となった献血血液 2 例について解析した



## 8. NAT ガイドラインの国際動向

主として EU 及び米国の血液製剤のウイルス NAT ガイドラインを調査の対象とし、さらに各国局方等に定められている NAT ガイドライン等も参考にしながら比較検討した。

## 9. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の新規分析法の開発

### 9.1. 試薬・試料

#### 【試薬】

標準品：DEHP 及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-d<sub>4</sub>(DEHP-d<sub>4</sub>)は、関東化学社製を用いた。MEHP 及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)-d<sub>4</sub>(MEHP-d<sub>4</sub>)は、林純薬社製を使用した。

#### 【溶媒】

アセトン：ガラス器具の洗浄液として、関東化学社製(フタル酸エステル試験用)を使用した。

アセトニトリル：移動相として、和光純薬社製(HPLC 分析用)を使用した。

メタノール：標準品溶解液として、和光純薬社製(HPLC 分析用)を使用した。

水：Milli-Q gradient A 10 with EDS polisher (Millipore 社製)で精製したものをを用いた。

ギ酸：和光純薬特級を用いた。

### 9.2. 分析装置・条件

#### 【カラムスイッチング LC/MS 装置】

LC/MS:Agilent 1100 LC/MSD SL system (Agilent Technologies 社製)

前処理用ポンプ:Shimadzu LC-10AS pump (島津社製)

装置図を図 1 に示す。

#### 【測定条件】

分析用カラム：Mightysil RP-18 GP (L) (100 x 2.0 mm, 5 μm) (関東化学社製)

カラム温度：40 °C

分析用移動相：水/アセトニトリル(0.1%ギ酸) (50/50[0-6 min]→10/90 [6-25 min])

分析用移動相の流速：0.2 ml/min

前処理用カラム：Bioptic AV-2 (50 x 4.6 mm, 5 μm) (GL サイエンス社製)

前処理用移動相：水(100%)

前処理用移動相の流速：0.5 ml/min

注入量：10 μL

測定モード：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) ポジティブモード SIM モニタリングイオン m/z=391 (DEHP) m/z=395 (DEHP-d<sub>4</sub>)、ネガティブモード SIM モニタリングイオン m/z=277 (MEHP) m/z=281 (MEHP-d<sub>4</sub>)

### 9.3. ヒト血漿試料の調製

成人の健常人 6 名のボランティアより提供された全血を遠心分離(3000 rpm, 10 min)し、その上清を分析用試料とした。

### 9.4. PVC 製血液バッグ中血清試料の調製

日本赤十字より提供された血液バッグ (2 検体製造番号：020627AT, 020628AT 全量：300 ml) に封入された血清(-20°Cで保存)を室温で解凍し、水で 10 倍に希釈したものを分析用試料とした。

### 9.5. 定量分析

内標準法により、濃度範囲 25~1000 ppb(DEHP) 及び 5~1000 ppb(MEHP)において、検量線を作成して定量を行った。

### 9.6. 添加回収試験

血漿中の DEHP 及び MEHP 最終濃度が、0.05, 1, 10 ppm となるように標準溶液を検体に添加したものを分析用試料とした。

10. 血液バッグから保存血液中に溶出するテトラヒドロフラン、2-エチル-1-ヘキサノール、トルエンの溶出に関する研究

### 10.1. 試薬および材料

THF、2-EH、およびトルエンには和光純薬製を、また、内部標準物質として使用したテトラヒドロフラン-d<sub>8</sub>(THF-d<sub>8</sub>)、2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub>

(2-EH-d17)、およびトルエン-d8 には CDN Isotopes 社製(ケベック、カナダ)を、メタノールには和光純薬製残留農薬分析用を、その他の試薬については和光純薬製の特級試薬を使用した。血液バッグについては、川澄製 カーミ C 液、JMS 社製 S-200、およびテルモ社製テルモ血液バッグ CPD(各バッグとも200mL 採血用、CPD 液 28mL 入)の3種類を用いた。

## 10.2. 溶出挙動および残留実態調査

### 1) 試料の調製

愛知県赤十字血液センターにおいて献血と同様の手順で3種類の血液バッグ各2個に被験者(3名)の血液約200mLを採取し、各1個を同センターの冷蔵保存庫に、別の各1個を同保存庫内に設置した活性炭デシケータ内に保存した。採取当日(0日、約3時間後)、7、14、および21日後に、各バッグから血液20mLを採取し、3000rpmで10分間遠心分離して得られた上層(血漿)および下層(赤血球液)をそれぞれ分析用試料とした。

血液製剤については、同センターの実験室内で、10mL試験管3本に約7mLずつ分注し、スクリュエーキャップで密栓後、測定までの間、衛生研究所の冷凍庫(-40℃)に保存した。

### 2) 分析条件

ヘッドスペース条件 装置: Tekmer 7000 (Tekmer)、バイアル容量: 22mL (Chromacol, CV-22)、バイアル加熱条件: 85℃(20分)、バイアル振とう機能: 使用 (Power 5:10分)、サンプルループ容量: 1mL、サンプルループ温度: 150℃、トランスファーライン温度: 160℃。

GC/MS条件 装置: AUTO MASS SYSTEM II(日本電子)カラム: SPB-1(0.25 mm i.d. x 60m、膜厚: 1.0 μm、Sperco) カラム温度: 40℃で4分間保持し、230℃まで毎分10℃で昇温後、230℃で5分間保持。イオン源温度: 210℃ イオン化: EI、イオン化電圧: 70 eV、検出方法: スキャン法 (m/z

41-260)またはSIM法、モニターイオン: THF(m/z 71)、2-EH(m/z 112)、トルエン(m/z 91)、THF-d8(m/z 80)、2-EH-d17(m/z 128)、トルエン-d8(m/z 98)。

### 3) 分析操作

測定 希釈水 14.5mLが入ったヘッドスペースバイアルに、試料 0.5mL および内部標準溶液(250ppm THF-d8、250ppm 2-EH-d17、および25ppmトルエン-d8のメタノール溶液)1μLを加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封した。このバイアルをヘッドスペースオートサンプラーにセットし、ヘッドスペース-GC/MSにより測定を行なった。

検量線および定量 ヘッドスペースバイアルに希釈水 15mL、混合標準溶液(THF、2-EH、およびトルエンのメタノール溶液、濃度: 50 または 1000ppm)1~10μL、および内部標準溶液 1μLを加え、試料と同様に測定した。そこで得られた測定対象物質とその安定同位体内部標準の面積比により検量線を作成し、それを用いて試料中の測定対象物質濃度を算出した。

希釈水 300℃で5時間加熱処理した塩化ナトリウムと MilliQ水とで調製した飽和溶液に対し、高純度ヘリウムを60℃で加温しながら5分間ばっ気(約1L/分)した後、超音波水槽中でアスピレーターにより脱気するという処理を3回繰り返すことにより揮発性の溶質を除去した溶液を使用した。

## 10.3. 保存環境調査

### 1) 試料の調製および測定

同センターの血液製剤冷蔵保管庫、製剤作業室、および製剤課管理室(事務室)内空气中的VOCを0.1L/分の流速で活性炭捕集管(OLBO91L、スペルコ)に24時間通して捕集後、二硫化炭素 2mLで溶出した。その溶液に内部標準物質としてトルエン-d8(100ppmメタノール溶液、2μL)を加え、GC/MS分析に供した。

GC/MS 条件 装置: QP5050A(島津製作所)カラム: DB-1(0.25mm i.d. x 60m、膜厚: 1.0 μm、J&W) カラム温度: 40°Cで5分間保持し、150°Cまで毎分5°Cで昇温後、250°Cまで毎分10°Cで昇温し、250°Cで18分保持。イオン源温度: 280°C イオン化: EI、イオン化電圧: 70 eV、検出: SIM法。

## C. 結果および考察

### 1. 標準パネル血漿の作製

3年計画の2年目にあたる本年度は、HBV用標準パネル血漿(陰性対照血漿を含めて100本/セット)×100セットを完成し、NIBSCから分与を受けたWHOの標準品との同時測定を行ない、測定値の整合を図ることが可能な状態となっている。

HCV用標準パネル血漿は、最終測定の前段階に、またHIV用標準パネル血漿は第1次の測定を終了した段階にある。3年目の研究終了時までには、これらについても完成できる目処が立った状態にある。

### 2. 標準パネル血漿中のウイルス核酸の安定性の検討

HCV RNA陽性のウインドウ期の血漿(7.0×10<sup>6</sup>copy/)を80°C凍結 37°C温浴融解、および20°C凍結 37°C温浴融解の条件で10回凍結 融解の操作を加えても、HCV RNAの定量値には影響が及ぶことはないことを立証した。

### 3. NAT技術の標準化を図るためのコントロールサーベイの実施法とその効果の検証

124施設の参加の下に行なったコントロールサーベイ及びフォローアップサーベイの成績を集計中である。集計結果をもとにコントロールサーベイの方法に多少の修正を加えて再度フォローアップサーベイを行ない、研究が終了する3年目の年度末までには多施設間でのNAT

の標準化を図るためのコントロールサーベイ実施法の指針を提示する予定である。

## 4. HIV陽性献血液のウイルス量およびHIVのタイプ、サブタイプにする研究

### 4.1. HIV検査陽性献血液のHIV量の測定(表1、表4)

HIV検査陽性検体44例の血中ウイルス量のPCR法による定量結果を表1に示した。

HIV-RNAが検出限界以下であったものが1例で、400コピー/mlから10,000コピー/mlが10例、10,000コピー/mlから100,000/mlが23例で、100,000/ml以上が10例で、最高は370,000コピー/mlであった。

### 4.2. HIV抗体陽性献血液のHIV抗体の解析(表1、表2、表3、図2)

HIV抗体陽性献血液42例についてHIV-1抗体とHIV-2抗体の測定を行った結果、HIV-1PA価は1例を除いて100倍以上であった。一方HIV-2抗体価が32倍以上の検体が5例あり、その力価は32倍が1例、64倍が3例、2048倍が1例であった。

これら5例のHIV-1抗体価は10000倍以上と非常に高く、またWB-1とWB-2のパターンの比較およびPCRの結果から、これら5例におけるHIV-2PA試薬との反応はHIV-1感染による交差反応であることが確認できた。

### 4.3. HIV-1検査陽性検体のサブタイプの解析(図2A、図2B、表5)

RT-PCRでHIV-1env領域が増幅され塩基配列が決定できた43検体について行った系統樹解析の結果を図3A、図3Bに示した。これら系統樹解析の結果から今回解析した43検体は欧米に多くみられるサブタイプBとタイ等の東南アジアに多いサブタイプA/Eの2種類に分類された。

また表5に示したように、サブタイプBが

40例(93%)と最も多く、サブタイプ A/E は 3例(7%)であった。

HIV 検査陽性献血血液 44 例についてウイルス量(HIV-1RNA 量)を、PCR 法により測定した結果、10,000 以上と比較的血中ウイルス量の高い例が 33 例(75%)と多く、100,000 以上とかなり高い例も 10 例(23%)あった。

HIV 抗体陽性の献血血液 42 例について、HIV-1 抗体と HIV-2 抗体の PA 価の測定を行った結果、全検体が HIV-1 抗体陽性で、HIV-1 感染例であることが確認された。HIV-2PA 価が 32 倍以上の検体が 5 例あり、その 1 例は 2048 倍と高力価の HIV-2 抗体が検出されたが、WB や PCR の結果から HIV-1 感染例であることが確認され、HIV-2PA の反応は交差反応によることが分かった。また、サブタイプ解析の結果、サブタイプ B が 91%とその大部分を占めており、東南アジアに多く日本でも異性間感染例に多くみられるサブタイプ A/E は 9%と少なかった。今回の結果では、HIV 検査陽性献血者検体の中にはサブタイプ B と A/E 以外のサブタイプは見られなかったが、日本の HIV 感染者にも数は少ないながらサブタイプ C,D,E,G,A/C 等の HIV も見出されている。今後、血液製剤の安全確保のための技術の標準化・精度管理法を開発していく上で、HIV-2 とともにこれら多様な HIV-1 サブタイプの存在も考慮しておくことが重要である。

## 5. NAT ガイドラインの国際動向に関する調査研究

EU 及び米国の血液製剤のウイルス NAT ガイドラインにおいて記載されている基本的要件について比較したものが表 6 である。FDA では HCV 及び HIV の NAT を求めているが、CPMP では HCV のみが NAT の対象となっている。これに対して、我が国では、HCV、HIV 及び HBV の NAT

が求められていることも大きく異なっている。この相違点は、FDA 及び EU の NAT ガイドラインが血漿分画製剤を対象として策定されていることがその要因と考えられる。

特異性に関しては、FDA 及び CPMP のガイドラインともプライマー/プローブの選択に当たって遺伝的に保存されている領域かどうかを明らかにすることを求めている。一方、CPMP では分析法バリデーションとして、100 個の HCV RNA 陰性血漿プールを用いての確認を求めている。

検出限界としては 95%の確率で検出されるウイルスゲノム量を求めている。CPMP では、これを陽性カットオフ値として段階希釈した陽性血漿を用いて測定し、統計学的手法を用いて明らかにするように求めている。また、CPMP は、HCV RNA 量として血漿プールでの測定に際して、プール前の個別検体で 5000IU/ml 以上の感度をもとめており、FDA では HCV 及び HIV-1 RNA としてプール血漿での検出感度としてプール前の個別検体レベルで 5000IU/ml を確保するように求めている。

試料の調製に関しては、CPMP ではサンプリング法、ミニプールの調製法、試験までの保存法、クロスコンタミネーション防止策、ウイルスゲノムの回収率を明らかにするように求めている。FDA では、試料中の抗凝固剤や NAT の阻害因子の混入について評価するように求めている。また、ウイルスゲノムの回収の効率を明らかにするように求めている。

標準品としては、CPMP は WHO の HCV 国際標準品 (96/790) に対して較正された参照品や標準品を用いることが求められている。一方、FDA でも WHO の標準品を用いることを推奨しているが、それ以外に CBER あるいは AIDS Clinical Trial Group の Virology Quality Assurance

の標準品や標準パネルを用いることも推奨されている。

分析法としての性能確認として、CPMP では少なくとも 20 検体の陰性血漿と種々のウイルス濃度の少なくとも 20 個の陽性血漿プールを用いて試験することを求めるとともに、日内、日差変動や試験担当者による変動についても明らかにすることを求めている。一方、FDA では少なくとも 500 人の血液あるいは血漿試料を用いて試験することが求められている。このように FDA では大量の血漿検体を用いた試験を求めているが、これは有償での治験として行うことが認められているためと考えられる。

以上のように EU 及び米国の NAT ガイドラインではその基本的要件として感度、精度、及び再現性に関して最も重点を置いた説明責任を血漿分画製剤製造者に求めている。この点に関しては、我が国でも同様であると考えられる。一方、NAT ガイドラインの対象とするウイルスに関しては日米欧で大きく異なっている。この点は我が国独自の安全対策として 3 種のウイルスの NAT を求めているわけであるが、欧米がそこまでの要求をしていない理由についてさらに調査する必要がある。一方標準品に関しては、WHO 国際標準品を用いることが欧米の両ガイドラインとも推奨されているが、FDA では別途、独自の標準品の使用も推奨されている。この点についても、さらに調査する必要があると思われる。

## 6. HBs 抗原検出キットの国際動向について調査研究

WHO は 1985 年に、英国内での標準品として定められていた HBs 抗原凍結乾燥品 (100 British units/ampoule) (Med. Lab. Sci. 38:335, 1981, Lancet 14:391-392, 1982) を国際標準品として承認した (WHO Tech. Rep. Ser. 745:18,

1987)。それ以来一貫して HBs 抗原量については "IU" 表記を推奨してきた。しかし現実には米国はもとより、EU においても HBs 抗原量の表記においては "ng" が official に通用している (EU の CTS: Common Technical Specifications Table 1 には WHO 標準品が available になるまでは、最小検出感度が "0.5ng/ml" と表記されている)。その理由として考えられることは、現在の WHO 国際標準品 (International Standard for HBsAg (subtype ad): 100 IU/ampoule; NIBSC Code 80/549) に対する利用者からの不満がある。ひとつには国際標準品に保存剤として添加されている Na-azide が、キットによっては阻害剤として働くことである。もうひとつは標準品の titer が高い (100 IU/ml) ために、希釈による誤差が生じやすいという危惧からである。さらに重要なことは、"IU" と "ng" とがほとんど等価なものと「誤解」されているために、敢えて "IU" へと移行させる必要を感じないことが挙げられる。

1985 年当時においては "1 IU" はほぼ "1 ng" (Abbott) に相当していたが、現時点においては "IU" と "ng" はもはや等価ではなくなっていることがわかってきた。例えば BBI (Boston Biomedica Inc.) の HBsAg Sensitivity Panel (PHA 807) においては、およそ  $1IU=3-4ng$  の換算となっている。また米国 FDA で用いている Lot-Release Panel ("ng" 表記) と WHO 国際標準品を用いて、国内で販売されている定量性に優れている 3 種類のキットを使用して測定比較したところ、およそ  $1IU=6ng$  という結果が得られた。以前より、HBs 抗原量の "ng" 表記は、各施設での抗原精製方法が異なることから、信頼性に欠ける恐れが指摘されていた (Vox. Sang. 65:249-250, 1993)。さらに "IU" と "ng" との相関が 1:1 ではない現状においては、抗原量を「IU

表記」へと統一することが望ましいと考える。事実 WHO では現在新規に "WHO reference panel for HBsAg" を作成している。これは 0.1IU/ml から 25IU/ml までの濃度範囲（現在世界各国で使用されているキットの最小検出感度をカバーできる範囲）にまたがるパネルで、現在の国際標準品を基準にして値付けされたものである。今後はこの参照パネルを基準にして、少なくとも EU 内では各キットの検出感度表記が "IU" に統一されていくことが予想される。

一方米国においても EU 各国にキットを輸出する際には Directive 98/79/EC に従い CE(Conformite Europeenne) マークの表示が義務づけられる。EU での CTS に "IU/ml" 表記が用いられれば、当然米国のキットでさえも "IU" 表記が用いられるようになるだろう。我が国では、HBs 抗原検出キットの添付文書で表記されている HBs 抗原の最小検出感度は、"IU" (international unit) と "ng"、さらには各社独自の "unit" などが混在しているが、国際的動向にあった品質管理の面から、今後我が国で販売される HBs 抗原検出キットの最小検出感度表記を統一表記する可能性に付いて考慮すべき時期に来ているのではないだろうか。HBs 抗原国内標準感度パネル(統一表記)を整備することは、各メーカーにおいて定期的に実施されるキットの品質管理(Quality Control) に有用であり、また国内で販売される各キットにおける測定結果を添付文書に反映させることは利用者にとっても有用であると考えられる。HBs 抗原検出キットは「定性」キットであり「定量」キットではなく、医療の現場においては「陽性」と「陰性」の判定が重要となる。しかし統一された表記法 (IU/ml) を用いることにより、医療および検査の現場においてキットの特性(感度

を含めた)を十分に理解し選択使用されることとなるであろう。

国際動向を踏まえ、我が国で市販される診断薬の品質管理の向上を図るために、WHO の標準品に準拠する国内用の標準品を作製し、各キットの測定値及びその感度を一定の基準で表示するための基礎データを作製することが必要である。HBs 抗原国内標準感度パネルについては、現在国立感染症研究所において保有/配付している国内標準品(現在の WHO 国際標準品、および前述した新規作成中の WHO 参照パネルとの titer の整合性を確認済み)をもとにして、HBsAg, anti-HBsAb, HCVAb, HIV(1+2)Ab, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA の全てが陰性の血清で段階希釈した検体パネルを作成することを現在検討中である。

HBs 抗原検出キットに関する調査研究を行った。医療機関、臨床検査医学会、ウイルス学会、体外診断用医薬品業界と連携し、各診断薬キット使用状況を調査し現状を把握するとともに、HBV 検査薬の国内での感度表記の標準化とそれに伴う品質管理について、実施の可能性と方策について研究調査することが今後必要と思われる。

#### 7. 血液保存バッグ中血液製剤に溶出する可塑剤フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の新規分析法に関する研究

カラムスイッチング LC/MS を用いて、DEHP 及び MEHP の同時分析法の開発を検討した。測定におけるタイムスケジュールを表7に示す。また、DEHP は、質量分析計において、移動相にギ酸を添加することによるイオン化効率を検討した。ギ酸濃度を 0~ 1.0 %(V/V)の範囲でイオン化効率を比較したところ、0.1 %が最適であった(図4)。

本法を用いることで、DEHP(25~1000 ppb)

及び MEHP (5~1000 ppb) で相関係数 0.999 以上と良好な直線性が得られた (表 8)。また、添加回収試験の結果を表 9 に示す。回収率は 90 % 以上 (RSD 5 % 以下) と良好な結果が得られた。

本法を用いて、6 名 (成人・健常人) のボランティアより提供された血漿試料を分析した結果を表 10 に示す。両化合物共に、定量限界以下であった。また、日本赤十字より提供された製造番号の異なる二つの PVC 製血液バッグ中の血清試料を分析した結果及びクロマトグラムを表 10 と図 5 に示す。製造番号 020627AT において、DEHP 31.7 ppm 及び MEHP 546 ppb、製造番号 020628AT において、DEHP 31.6 ppm 及び MEHP 613 ppb が検出された。

フタル酸エステル類の分析には、GC/MS による分析法が主流であるが、外部環境や分析前処理からのコンタミネーションが危惧されている。本法は、カラムスイッチングを利用したオンライン前処理システムにより、前処理によるコンタミネーションの危険性を極限まで減少させることが可能となった。

本法を用いて、ヒトの血漿を分析した結果から、ヒト血漿中には、DEHP、MEHP 共に検出されなかった。しかし、PVC 製血液バッグ中に保存された血清では、DEHP 約 30 ppm、MEHP 約 500 ppb が検出された。この結果、PVC 製血液バッグから DEHP が溶出し、血液製剤が汚染されることが示唆された。また、溶出した DEHP の一部が血清中の酵素等により加水分解され、MEHP が生成されたと考えられる。DEHP は、生殖系への影響が懸念されており、IARC の発癌性評価でグループ C に属す化合物である。DEHP の代謝物である MEHP は、DEHP より強い毒性があるという報告もなされており、早急なモニタリングや生体影響評価を実施する必要がある。

### 8. 血液バッグから保存血液中に溶出するテト

### ラヒドロフラン、2-エチル-1-ヘキサノール、トルエンの溶出に関する研究

#### 7.1. 血液バッグからの溶出挙動

今回の調査対象は揮発性が高い化合物であり、また、血液バッグにはある程度のガス透過性がある。したがって、これら測定対象化合物はバッグから揮散し、別のバッグに移行する可能性が考えられる。特に血液製剤保存庫のように大量のバッグが常時保存されているような場所では、バッグから揮散した化合物の蒸気が充満していることが想定されることから、そのような環境が保存製剤に与える影響も評価する必要がある。そこで今回、愛知県赤十字血液センターで赤血球製剤が冷蔵保存されている保存庫内の VOC 濃度を測定した。その結果、表 11 に示したように保存庫内の THF ( $775 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )、2-EH ( $21.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )、およびトルエン ( $417 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) の濃度が、隣接する製剤作業室 (THF、2-EH、トルエンがそれぞれ 7.4、7.1、 $29.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) および製剤課管理室 (事務室、5.1、8.1、 $67.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 内の濃度よりも数倍~100 倍以上高いことが判明し、血液バッグから揮散した化合物が保存庫内に滞留していることが示唆された。そこで、今回の溶出挙動調査の対象化合物には、前回の THF および 2-EH にトルエンを加えるとともに、調査の実施場所に同保存庫を選択し、保存環境の影響評価も考慮して、実験には次のような方法を採用した。被験者の血液を調査対象血液バッグ 2 個に採取し、その一方を保存庫内に、もう一方を保存庫内に設けた清浄な環境下、すなわち、保存庫内に設置した活性炭デシケータに保存し、それぞれのバッグから経時的に血液をサンプリングする。保存期間は、輸血用赤血球製剤の保存期限と同じ 21 日間とし、サンプリング間隔は 7 日とする。サンプリングした血液は、赤血球と血漿に分離

後、それぞれを試料として HS-GC/MS 分析を実施し、得られた各化合物の経時変化から溶出挙動を、また、活性炭デシケータの外側（保存庫内）と内側（保存庫内空気の影響を受けない場所）に保存した試料群の濃度差から、保存環境の影響を評価する。

国内メーカー3社（川澄、JMS およびテルモ）が製造した全血用シングルバッグを用いて得られた保存血液中の THF、2-EH、およびトルエンの経時変化を表12に、各バッグに封入されていた CPD 液（クエン酸ナトリウムを主成分とする抗凝固剤水溶液、1 バッグあたり 28mL）の分析結果を表3に示した。全ての血液試料から THF、2-EH、およびトルエンが検出され、それらの濃度は時間とともに増加する傾向が認められた。また、活性炭デシケータの外側と内側に保存した試料群に顕著な濃度差が認められたのは、テルモ製バッグ中のトルエンのみであった。

表13に示した CPD 液の分析結果より、テルモ製バッグ中に残留するトルエンの量（平均：0.11ppb）は、川澄（1.13ppb）および JMS（3.10ppb）製に比べると1/10~1/30と非常に少なく、そこから溶出する量も少ないと推定された。そのため、このバッグにおいてのみ保存庫内の空気からバッグ血液に移行したトルエンが顕著に認められたものと考えられた。このような保存環境の影響は、THF や 2-EH においても考えられるが、これらの溶出レベルはトルエンよりもワンオーダー以上高いことから、その影響の程度はバッグ自体からの溶出に比べると遙かに小さいと考えられた。

THF に関しては、川澄製バッグに保存された血液の濃度最高値（13.4ppm /血漿/14日、実験開始時：10.4ppm）は JMS（最高値：1.12ppm）やテルモ（最高値：0.27ppm）製に保存された

ものよりも十倍以上高く、メーカーによる差が大きかった。濃度の増加は、いずれのバッグも非常に緩慢であり、最高でも採取直後の濃度の1.5倍程度であった。THF は水溶性が高く、バッグに混入したものの大部分は CPD 液に溶け込んだ状態で存在しているため、採取直後の濃度が高く、その後の濃度変化は緩やかであったものと考えられた。

一方、2-EH の最高濃度値は JMS 製バッグの 3.75 ppm（赤血球/21日、実験開始時：0.13ppm）であったが、THF と異なりメーカーによる格差はほとんど認められなかった。また、2-EH は低濃度から時間とともに急激に増加するという挙動が認められた。これらの結果は、2-EH はバッグの樹脂自体から溶出することともに、いずれのメーカーのバッグにも同じような材質の樹脂が使われていることを示唆するものと考えられた。また 2-EH の血漿中濃度（3社平均：0.18ppm/0日、2.96ppm/21日）と赤血球中濃度（3社平均：0.56ppm/0日、2.96ppm/21日）には、採取直後には差が認めれたが、21日後に両者はほぼ同じになるというように、赤血球と血漿では異なった挙動が認められた。

トルエンの最高濃度は JMS 製バッグの 45ppb（JMS/血漿/14日、実験開始時：13.6ppb）であり、川澄（最高値：26.9ppb）やテルモ（最高値：21.5ppb）製との比較から、メーカー間には多少の差があることが認められた。また、この化合物についても濃度上昇幅が比較的大きく、そのほとんどが樹脂自体から溶出することが示唆された。

## 9. 血液製剤の実態調査

日本赤十字社名古屋血液センターで分与を受けた期限切れの赤血球（有効期限：21日、保存温度：4~6℃）、血漿（有効期限：一年、保存温度：-20℃以下）、および血小板（有効期



限：3日、保存方法：20～25℃）製剤中のこれら化学物質濃度の測定結果を、保存バッグのメーカー別に表14に示した。THFは0.007～76.9ppm、2-EHは0.18～39.9ppm、トルエンはND～92.2ppbと非常に広い範囲で検出され、これら化合物の残留には、以下に述べるように保存製剤の種類や保存期間だけでなく、メーカーやバッグの材質、構造による違いが大きく関わっていることが示唆された。

赤血球は43試料（保存バッグ：川澄製14、テルモ製29）を分析し、THFが0.40～76.9ppm、2-EHが0.49～1.45ppm、トルエンがND～11.3ppbの範囲で検出された。THFについては前述した保存実験の結果と同様に、バッグメーカー間の差が大きく、川澄製バッグ（平均63.5ppm）とテルモ製バッグ（平均0.71ppm）の間には100倍近い開きがあった。また、これらの結果と表2に示した21日保存時の濃度（THF：8.92-10.3ppm/川澄、0.17-0.24ppm/テルモ）とを比較したところ、両調査の検出濃度に乖離が認められた。赤血球が保存されているバッグは、容量が400mLであり、採血時には血漿保存用のバッグ等と一体になった複雑な構造をしているだけでなく、製剤過程で血漿や白血球などとの分離処理が行なわれ、MAP液（保存用の栄養液）添加などの操作が加えられるなど、溶出挙動調査に用いたシングルバッグとはいくつかの点で異なっている。また、これらのバッグは保存時には、数個から数十個がひとまとめてされてビニール袋に入れられており、保存状態も同一ではなかった。このようなバッグの構造の違いや処理操作が、上述した検出濃度の乖離を生じた原因であると推察された。

血漿については47試料（保存バッグ：川澄製18、テルモ製29）を分析し、THFが0.36～39.9ppm、2-EHが0.89～1.68ppm、トルエンが

2.4～16.2ppbの範囲でそれぞれ検出された。この試料についても、川澄製バッグ（平均30.3ppm）とテルモ製バッグ（平均0.36ppm）の間でTHF濃度が大きく異なっていた他に、表2に示した21日保存時の濃度（THF：11.0-13.0ppm/川澄、0.20-0.27ppm/テルモ）の間には、赤血球と同様に検出濃度の乖離が認められた。その原因については、赤血球で述べたバッグ構造の違いや処理操作の他に、保存条件や保存期間（-20℃以下で1年）の違いが考えられた。

血小板については23試料（保存バッグ：川澄製14、バクスター製5、コープ製4）を分析し、THFが0.007～0.361ppm、2-EHが1.39～3.50ppm、トルエンが10.2～46.3ppbの範囲でそれぞれ検出された。THFの濃度については、赤血球や血漿と比べると濃度レベルが低く、ばらつきが大きかったが、メーカー間の違いは赤血球や血漿ほど大きくはなかった。一方、2-EHの濃度は赤血球や血漿とほぼ同レベルにあったのに対し、トルエンの濃度は赤血球や血漿と比べワンオーダー高いという傾向にあった。血小板は成分採血により採取され、ガス透過性が高いポリオレフィン系樹脂製バッグ中で、20～25℃と比較的高い温度条件下で振とうしながら3日を限度として保存される。ガス透過性の高いバッグの使用や振とう操作は、THFが揮散して減少する要因になる反面、トルエンなど保存環境中に高濃度に存在する揮発性化合物がバッグ中に移行し、それらの濃度が上昇する要因にもなり得るとともに、高い保存温度はバッグ内に混入したDEHPの酵素分解を促進し、2-EHが増加する要因となるなど、様々な増減要因が考えられる。したがって、この試料に関しては今後、さらに詳細な検討を加えるが必要であると考えられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1. 論文発表及び著書

- 1) A. IWATA, K. SATOH, M. MURATA, M. HIKATA, T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press)
- 2) K. SATOH, A. IWATA, M. MURATA, M. HIKATA, T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine- conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Method.*, (in press)
- 3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T.: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharm.* (in press)
- 4) TKANEYASU-TOYODA, T YAMAGUCHI, T OSHIZAWA T HAYAKAWA: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells, *J Cell Physiol.*, 195, 119-129 (2003)
- 5) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T.: Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells-a study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide- or retinoic acid-treated HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 405, 21-31 (2002)
- 6) 山口照英: ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保について. *ファルマシア*, 38, 523-525 (2002)
- 7) 早川堯夫, 山口照英, 石井(渡部)明子, 押澤 正: 核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ. *医薬品研究*, 33, 275-284 (2002)
- 8) 早川堯夫, 山口照英, 押澤 正: 日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究—ウイルス安全性確保の基本要件—, *医薬品研究—33*, 210-230 (2002)
- 9) S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi, T. Hayakawa, Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 300, 770-774 (2003)
- 10) K. Inoue, H. Okumura, T. Higuchi, H. Oka, Y. Yoshimura and H. Nakazawa, "Characterization of the estrogenic containers in medical polyvinyl-chloride tubing by gas chromatography - mass spectrometry and estrogen receptor binding assay" *Clin. Chim. Acta* 325, 157-163 (2002)
- 11) Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, and H. Nakazawa, "Column-switching high-performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry with on-line coupling of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples" *K. Anal. Bioanal. Chem.* 375, 527-533 (2003)

## 2. 学会発表

1) 豊田淑江、山口照英、押澤正、早川堯夫: AC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析第1回日本再生医療学会. 京都、平成 14 年 4 月 18

2) 豊田淑江、山口照英、押澤正、早川堯夫: ヒト末梢血におけるAC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析. 第23回日本炎症・再生医学会. 東京、平成 14 年 7 月 3 日

3) 豊田淑江、押澤正、内田恵理子、早川堯夫、山口照英: G-CSFによるHL-60細胞中球分化亢進と増殖促進におけるPKC $\epsilon$ の役割. 第75回日本生化学大会. 京都、平成 14 年 10 月 15 日

4) 押澤正、山口照英、豊田淑江、内田恵理子、早川堯夫: HL-60細胞の好中球様細胞への分化に關与するタンパク質の解析. 第75回日本生化学大会. 京都、平成 14 年 10 月 15 日

5) 豊田淑江、押澤正、鈴木孝昌、早川堯夫、山口照英: 臍帯血における AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析、第2回再生医療学会、神戸、平成15年3月11日

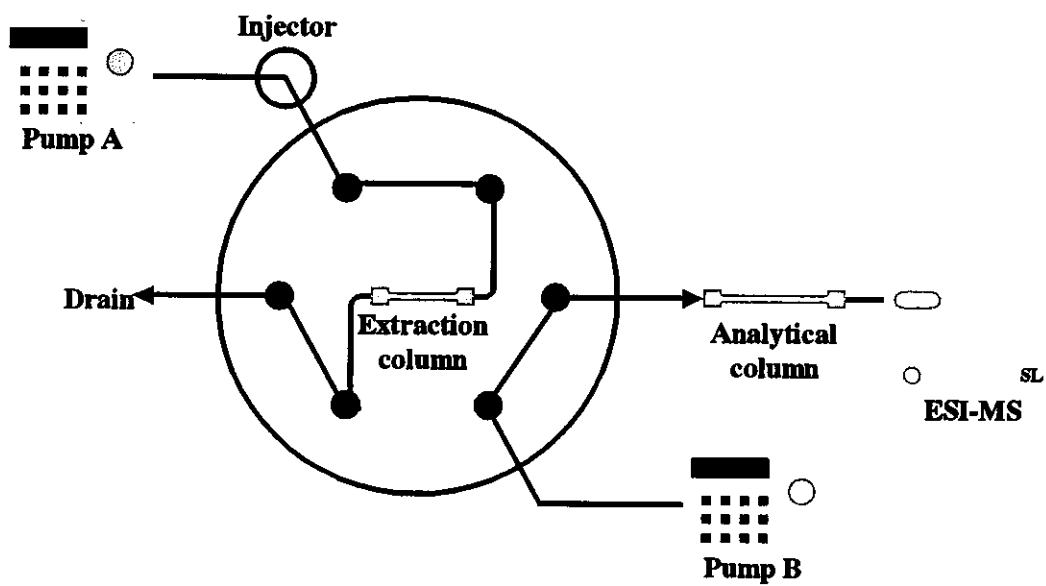
第 122 年会日本薬学会:

6) “ポリ塩化ビニル製医療用具の安全性評価(第1報): GC/MSによる点滴用チューブ中の残留物質添加剤の分析” 井之上浩一, 奥村紘代, 吉村吉博, 中澤裕之, 伊藤裕子, 岡尚男, 月岡忠, 寺澤潤一, 牧野恒久

7) PITTCON 2003

“Development of high-throughput analysis of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate using column-switching LC/MS” M, Kawaguchi, T, Higuchi, K, Inoue, Y, Yoshimura, H, Nakazawa

### Configuration A



### Configuration B

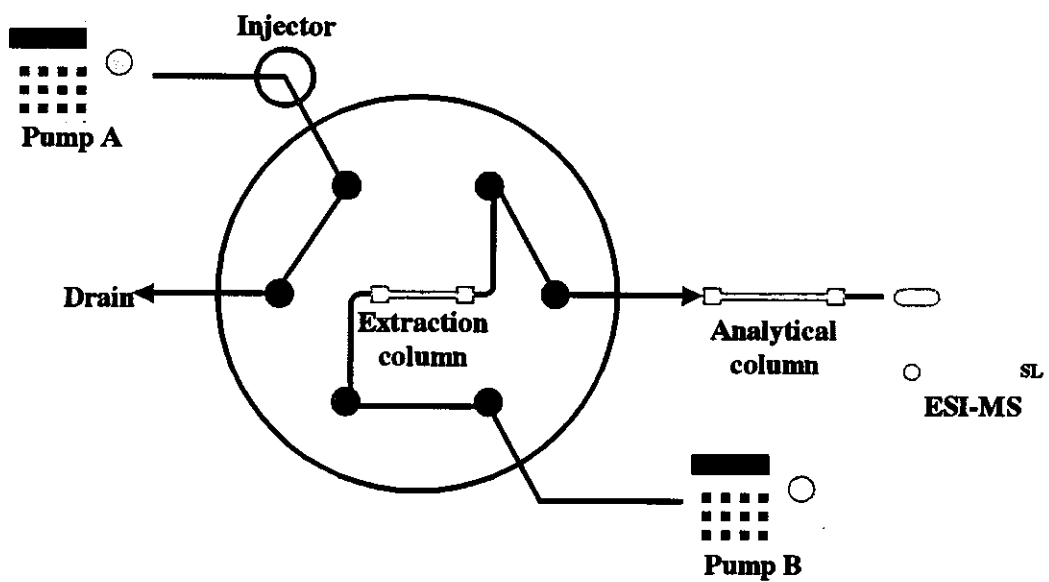


図1 カラムスイッチング LC/MS の装置図