

原 著

## 献血血液の RHA 検査による第 VIII 因子製剤 (クロスエイト M™)

### 原料血漿からのパルボウイルス B19 除去効果

武田 芳於 阿部 生馬 青木 玄仲 外山 幸司  
木村 成明 下林 雅子 永野 泰子 勝林 祥郎  
室塚 剛志 脇坂 明美 伴野 丞計

日本赤十字社血漿分画センター

(平成13年9月27日受付)

(平成13年11月12日受理)

### RHA SCREENING AND REDUCTION OF PARVOVIRUS B19 DNA FROM FACTOR VIII CONCENTRATE (CROSS EIGHT M™)

Yoshio Takeda, Ikuma Abe, Motonaka Aoki, Koji Sotoyama, Nariaki Kimura, Masako Shimobayashi,  
Yasuko Nagano, Yoshiro Katsubayashi, Takashi Murozuka,  
Akemi Wakisaka and Tsugikazu Tomono  
Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

Since September 1997 the Japanese Red Cross has conducted a nationwide complete screening of human parvovirus B19 (B19) for all donated blood units by the receptor-mediated hemagglutination (RHA) method. RHA-positive units were excluded from source plasma for fractionation. The amounts of B19 DNA in pooled plasma and in factor VIII concentrates (Cross Eight M, plasma derived and monoclonal purified) were measured using a PCR method. All 112 batches of pooled plasma tested in 1996, before implementation of RHA screening, were B19 DNA-positive, with 83% of these contaminated with more than  $3.8 \times 10^5$  IU/ml of B19 DNA. In contrast, after implementing RHA screening, no detectable levels of B19 DNA were observed in 5% (1998) 16% (1999) 21% (2000) and 21% (2001) of batches, and batches contaminated with more than  $3.8 \times 10^5$  IU/ml of B19 DNA decreased to 18% (2001). B19 DNA content in the final products of factor VIII concentrate were reduced significantly when RHA-screened source plasma were used. Since September 1998, B19 DNA has not been detected in any of 78 lots of final products. Furthermore, no B19 DNA could be detected in any of 63 lots even in 1:10 concentrated solution. RHA screening for B19 has markedly reduced the viral load in source plasma for fractionation in Japan.

**Key words** : Human parvovirus B19, Donor screening, Receptor-mediated hemagglutination (RHA), Source plasma for fractionation, Plasma-derived factor VIII concentrate

#### はじめに

ヒトパルボウイルス B19 (以下 B19 と略す) は伝染性紅斑の原因ウイルスであり, 健康人で免疫抗体を持たない場合, 一般的には一過性の風邪様症状を呈するのみであるが, 慢性溶血性貧血や免

疫不全患者では時に重篤な急性赤芽球癆を引き起こすことがある。また免疫抗体を有さない女性の妊娠時には流産に至ったり, その児には胎児水腫を起こすことがあり, 子宮内死亡胎児の 15% が B19 DNA 陽性であったとの報告がある<sup>1)</sup>。

B19 はエンベロープを持たない直径 18~26nm の小型ウイルスで、加熱(60 30分)、酸(pH3)、クロロホルム、有機溶剤/界面活性剤処理に抵抗する<sup>2)</sup>。第 IX 因子製剤ではウイルス除去膜による B19 の効果的なウイルス除去がなされているが、多くの血漿分画製剤には孔径の小さな膜の導入が難しい。

製造工程中での B19 除去が困難であることから、原料血漿への B19 負荷を減らすことを目的に、赤十字血液センターでは 1997 年よりすべての献血血液について Receptor Mediated Hemagglutination(RHA)検査法による B19 スクリーニング検査を実施している。我々は RHA 検査導入前後の第 VIII 因子製剤用原料血漿プールと第 VIII 因子製剤の B19 DNA 量を測定しその効果について評価したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 第 VIII 因子製剤の原料血漿

血漿分画製剤の原料となる献血血液は、血液センターにおける問診、血清学的検査(HBs 抗原、抗 HBe 抗体、抗 HIV-1/2 抗体、抗 HCV 抗体、抗 HTLV-1 抗体、B19、ALT、梅毒)、NAT センターにおけるプール検体 NAT(HBV、HIV-1、HCV、1999 年より)陰性のものであり、更に原料血漿については 6 カ月間の貯留保管を経て安全が確認された血漿だけが製造に供される。

日本赤十字社血漿分画センターでは貯留保管を終えた血漿を、約 5,000 人から 10,000 人分混合してプール血漿とする。このプール血漿から第 VIII 因子製剤の中間原料であるクリオプレシピテートと、人血清アルブミンの原料となる上清(脱クリオ血漿)を分離する。本報告では RHA 検査導入以前の献血血液で製造したプール血漿 112 バッチ(1996 年)および RHA 検査済み献血血液で製造した 1011 バッチ(1998 年 1 月から 2001 年 7 月に製造。献血血液約 700 万人分に相当)について B19 DNA を定量して比較した。

#### 2. 第 VIII 因子製剤

日本赤十字社の第 VIII 因子製剤クロスエイト M について調べた。その製造工程概要は次のとおりである。すなわち 1 ロットのクロスエイト M

の製造にはプール血漿より得られたクリオプレシピテート数バッチ分(約 8 万人分の血漿)が使用される。クリオプレシピテートの溶解液を有機溶剤/界面活性剤で処理し、イムノアフィニティークロマトグラフィーで第 VIII 因子を精製し、不純物を除去する。次に孔径 35nm のウイルス除去膜でろ過し、イオン交換クロマトグラフィーで更に精製する。原料血漿にウイルスが混入していればこれらの工程で不活化/除去される。その後充填、凍結乾燥して製品となる。

ウイルス除去膜は Lot 2M181(1997 年 6 月製造)から製造工程に導入した。Lot 2M210(1998 年 3 月製造)から RHA 検査済みの原料血漿を製造に使用した。

#### 3. RHA 検査法

RHA 検査法は B19 が血液型 P 抗原をレセプターとする<sup>3)</sup>ことを利用した検査法で、グルタルアルデヒドで固定した P 抗原陽性のヒト O 型赤血球を、pH 5.0~5.8 で血清と反応させ、B19 があれば P 抗原と結合して血球凝集反応を呈する<sup>4,5)</sup>。日本赤十字社の血液センターではオリンパス社製全自動凝集反応検査装置 PK7200 を使用して 1997 年 9 月よりすべての献血血液について RHA スクリーニング検査を開始した。

#### 4. NAT による B19 DNA の定量

検体 100 $\mu$ l を PK/SDS 処理後 Phenol/Chloroform で抽出し、その全量を Nested PCR 法で VP 1 領域を増幅した<sup>6)</sup>。増幅産物を電気泳動後、Ethidium Bromide 染色し、バンドを認めたものを陽性とした。定量法は限界希釈法を用い、抽出物の再溶解液を 10 倍階段希釈して増幅し、陽性となる最大希釈倍率を求めた。NAT の検出感度は国際標準品(WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA NAT Assays, NIBSC Code 99/800.5 $\times$ 10<sup>5</sup> International Unit/vial)を使用して測定し、95% 検出限界は 38IU/ml であった。

クロスエイト M は通例注射用水 10ml で再溶解するが、注射用水 1ml で再溶解することで簡単に 1:10 に濃縮した試料を調製して B19 DNA 定量を行った。

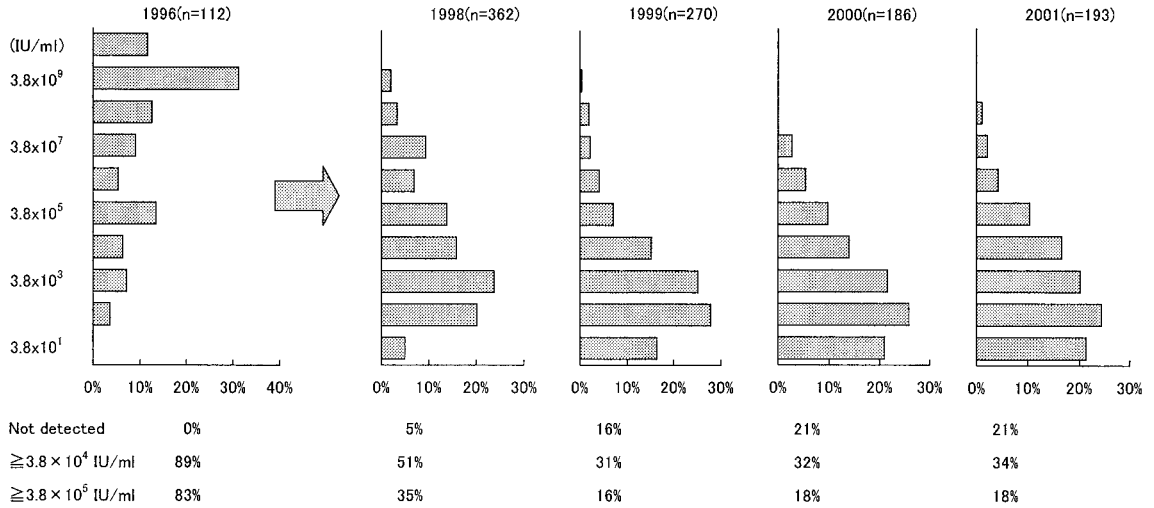


図1 Levels of human parvovirus B19 DNA in pooled plasma for fractionation. Data for 1996 show batches of plasma pools without RHA screening, While batches thereafter were screened.

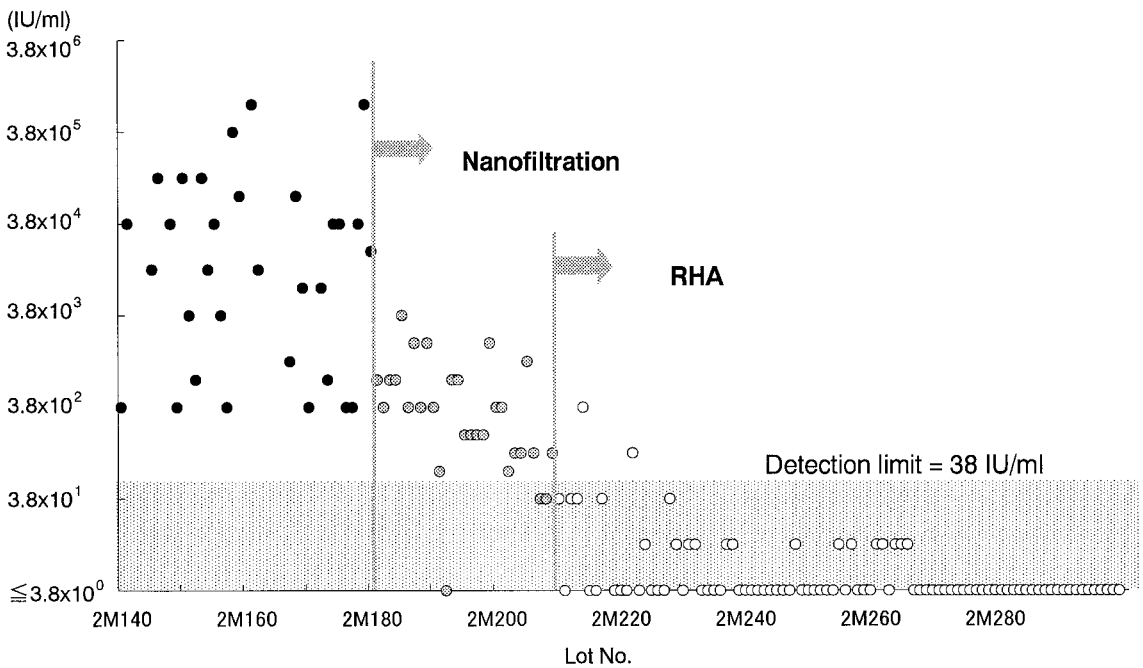


図2 Human parvovirus B19 DNA in plasma-derived monoclonal purified Factor VIII concentrate ( Cross Eight M )  
 Circles in the bottom shaded area show that parvovirus B19 DNA levels in the final products below the PCR detection limit. Circles on the horizontal axis show that even parvovirus B19 DNA levels in the concentrated solution of final products ( 1 : 10 ) were below the PCR detection limit.

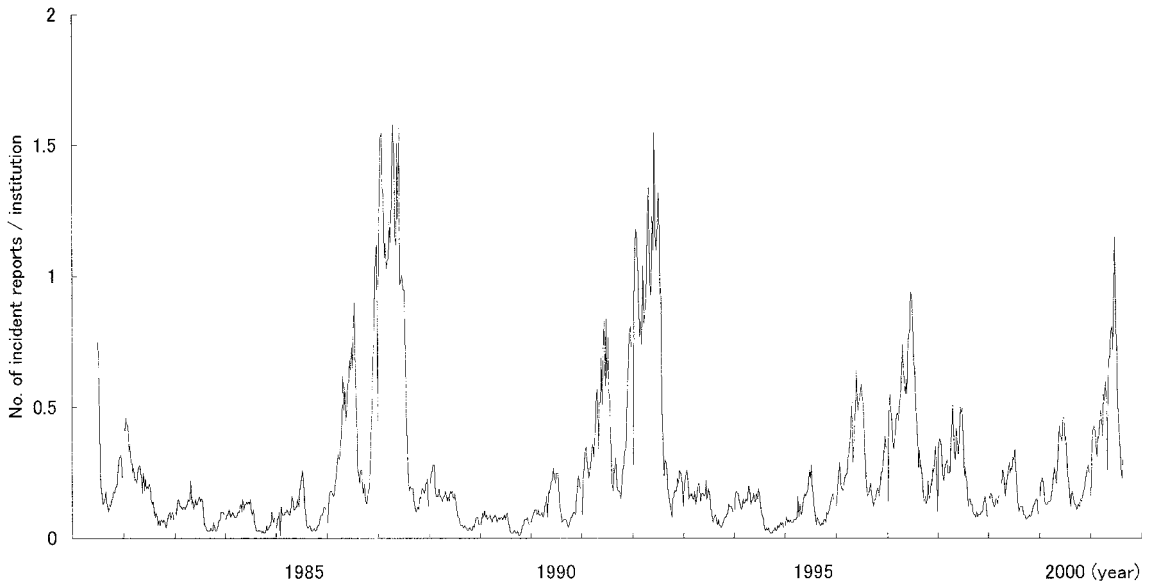


図3 Weekly incident rates of erythema infectiosum at various fixed observation sites. Infectious Diseases Weekly Report Japan ( National Institute of Infectious Diseases. Infectious Disease Surveillance Center )

## 結 果

プール血漿の B19 DNA 量を測定した結果を図 1 に示した。RHA 検査以前の 1996 年に製造した プール血漿は、すべて B19 DNA 陽性で、 $3.8 \times 10^5$  IU/ml 以上のものが全体の 83% を占めていた。RHA 検査導入後から プール血漿中の B19 DNA 量は減少し、1998 年には 5% であった検出限界以下の プール血漿が 2000 年には 21% に増加した。反対に  $3.8 \times 10^5$  IU/ml 以上の プール血漿は 1998 年には 35% あったが、2000 年には 18% まで減少した。献血血液に RHA 検査を導入することで、原料血漿中の B19 DNA 量が減少した。

日本赤十字社の第 VIII 因子製剤、クロスエイト M の製品中の B19 DNA 定量結果を図 2 に示した。製造工程にウイルス除去膜を加えた Lot 2M 181 以降で、製品中の B19 DNA 量が減少している。それでも RHA 検査導入前は製品の 90% が B19 DNA 陽性であったが、RHA 検査済みの原料を用いた Lot 2M210 からは、製品中の B19 DNA 量は更に減少した。1998 年 9 月以降に製造した 78 ロットの製品で検出限界以下となり、そのうちの 63 ロットは検体を 1 : 10 に濃縮しても B19 DNA

を検出しなかった。

## 考 察

日本の献血者における B19 陽性率は推定 0.6 ~ 0.8% と報告されている<sup>7,8)</sup>。感染症サーベイランスの報告によれば 1987 年と 1992 年に伝染性紅斑の大流行があり、1997 年には弱い流行があった(図 3)。今回検査した 1998 ~ 2001 年は間歇期に相当し、必ずしも流行期に反映できない面もあるが、献血血液について RHA 検査で B19 抗原をスクリーニングすることによって、血漿分画製剤の原料血漿の B19 DNA を著しく減少させることができた。

一方 RHA 検査はその原理上 3 ~ 5 日間のウイルス血症期には有効だが、それに続いて B19 抗体の産生が始まると(抗原抗体複合体期) B19 の receptor である P 抗原と抗体が競合し、RHA 反応は著しく阻害される。即ちこの期間に献血された血液は RHA 検査では検出することができない。しかしながら今回測定された プール血漿の B19 DNA 濃度を見ると、必ずしも抗原抗体複合期に献血された血液が RHA 検査をすり抜け、プールされたことが原因と言うことはできない。例えば

2001年を例に見ると、 $10^6$  IU/ml以上のB19 DNAを含むプール血漿が193バッチ中14バッチあった。ウイルス血症期におけるウイルス量は $10^{4-13}$  copies/mlであるのに対し、抗原抗体複合体期のウイルス量は $10^{5-6}$  copies/ml以下と遥かに少なく<sup>5)9)</sup>、B19 DNA濃度の高いこの14バッチについては抗原抗体複合物期に献血された血液が多数プールされたとするよりは、少数(少なくとも14ユニット)のウイルス血症期のものが入ったためと思われる。すなわちウイルス血症期といえどもRHA検査で陰性とされる場合があり、精度管理と共にこの検査漏れを無くすることがRHA検査の今後の課題である。

現在各国でB19スクリーニングに対する取り組みが行われている。アメリカではFDAから血漿分画製剤に使用されるプール血漿のB19 DNA量を $10^4$  geq/ml以下にするよう見解が示された(CBER (FDA): 第64回血液製剤諮問委員会(9/16/99)議事録, p144-222)。また、欧米の血漿分画製剤企業の集まりであるPPTA(Plasma Protein Therapeutics Association)は自主的に、2002年6月以降にプール血漿のB19 DNA量を $10^5$  IU/ml以下にする目標を立てている(Announce, "PPTA Voluntary Standard Parvovirus B19", March 2001. www.pptaglobal.org/safety/index.htm)

このような世界的な血漿分画製剤原料血液のB19低減化の流れにあっては、先述したRHA検査の課題が解決できないときには、日本もNATによるB19スクリーニングを考慮する必要がある。NATスクリーニングに関しては、すでに日本赤十字社が世界に先駆けて、血漿分画製剤用原料を含むすべての献血血液に対してHBV, HIV-1, HCVについて実施し、ノウハウを蓄積している。NATスクリーニングを血清学的検査と組み合わせることで、無用な検査や検体汚染を防ぎ、効率性を高めていることもその一つである。B19の場

合その陽性率の高さと、ウイルス血症におけるウイルス量の多さ<sup>10)</sup>がNATスクリーニングの障害になるが、RHA検査はその事前スクリーニングとして有効である。

本報告は日本赤十字社血液事業部、日本赤十字社中央血液センター、北海道、大阪府、福岡県各赤十字血液センターのご指導のもとに実施した検査に基づくものです。本論文の要旨は第49回日本輸血学会総会において報告しました。

## 文 献

- 1) Tolfvenstam T., et al.: Frequency of human Parvovirus B19 infection in intrauterine fetal death. *Lancet*, 357: 1494-1497, 2001.
- 2) 松永泰子: ヒトパルボウイルスB19感染と血液疾患. *immunohaematology*, 11(1): 9-13, 1989.
- 3) Brown, K.E., Anderson, S.M. and Young, N.S.: Erythrocyte P antigen: Cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*, 262: 114-117, 1993.
- 4) Sato H., et al.: Screening of blood donors for human Parvovirus B19. *Lancet*, 346: 1237-1238, 1995.
- 5) 佐藤博行: 最近話題の輸血後感染症。ヒトパルボウイルスB19とその感染症について。日本輸血学会誌, 42(3): 74-82, 1996.
- 6) Shade, R.O., Blundell, M.C., Contmore, S.F., et al.: Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol.*, 58(3): 921-936, 1986.
- 7) Yoto, Y., Kudoh, T., Haseyama, K., et al.: Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br. J. Hematol.*, 91: 1017-1018, 1995.
- 8) 佐藤進一郎, 他: Receptor-mediated hemagglutination (RHA)によるヒトパルボウイルスB19抗原スクリーニングの評価検討。日本輸血学会誌, 42(5): 231-232, 1996.
- 9) 佐藤博行: 編集者への手紙に対するコメント。日本輸血学会誌, 42(6): 299-300, 1996.
- 10) 布上 薫: ヒトパルボウイルス感染の臨床と疫学。ウイルス, 37(2): 159-168, 1987.