

血液凝固第 IX 因子国内標準品の力価制定

種市麻衣子¹⁾ 岡田 義昭¹⁾ 上村晃一郎³⁾ 福永 信人³⁾ 赤石 暁弘⁴⁾
猿渡 千尋⁵⁾ 滝本 正敏⁶⁾ 阿武 啓嗣⁶⁾ 堀内 善信²⁾ 山口 一成¹⁾

1995年に2nd第IX因子国際標準品を基準として第一世代第IX因子国内標準品の力価を測定し、我が国の血液凝固第IX因子製剤の国内標準品と定めた。2004年に第二世代第IX因子国内標準品を制定することとなり、5施設が参加して力価測定作業を行った。3rd第IX因子国際標準品を基準として用い、相対力価を測定し、第二世代の国内標準品の力価は75.0国際単位/mlに決定した。

キーワード：血液凝固第IX因子，国内標準品，国際標準品

はじめに

疾病の予防・診断および治療に用いられる生物学的製剤は、その有効成分の含量の測定のためには単に質量を測定するような物理化学的な方法では不十分で、活性を測定するための生物学的方法が必要である。活性を数値として表示するためには指標となる標準物質が必要であり、生物学的製剤として分類される血漿分画製剤である血液凝固因子製剤も、活性力価の測定のための国際標準品が制定されている¹⁾。この国際標準品の単位は、元来は新鮮正常血漿1mlの平均活性値を1国際単位(IU)としており、これを基準に設定されている。実際に各国・各企業で使用している標準品は、この国際標準品を指標に、国内標準品あるいは自家用参照品として製造、力価を設定した2次標準品である。血液凝固第IX因子製剤の我が国の国内標準品は、1995年に第一世代第IX因子国内標準品(FIX STD-M-9501, 73.4国際単位/ml)を定めた。力価は、WHOの制定した当時の最新国際標準品(2nd International standard : 1994年制定, 6.3IU/アンプル, code : 84/683)²⁾を基準として測定し、値を決定した。それから10年近くが経過し、また国際標準品も1996年に更新された(3rd International standard : 10.7IU/アンプル, code : 96/854)³⁾ことから、次の国内標準品の作製・力価の制定が必要であると考えた。なお血液凝固第IX因子の国際標準品

には精製濃縮製品と血漿があり、血漿検体を測定するときには標準血漿を、濃縮製剤を測定するときには標準濃縮製品を使用することが重要である。今回我々は濃縮製剤の力価の測定に用いる、精製濃縮製品の国内標準品に関して報告する。

材料および方法

1) 候補品の作製

第一世代第IX因子国内標準品を作製した施設に依頼した。

候補品は通常の血液凝固第IX因子製剤と同様、人血漿を原料として血液凝固第IX因子をイムノアフィニティクロマトグラフィー及びイオン交換処理により精製・濃縮し、凍結乾燥、加熱の工程を経て製造された。規格は第一世代第IX因子国内標準品(73.4国際単位/ml)と同程度の力価となるように調整し、容量はバイアルあたり1mlとした。

2) 参加施設

血液凝固第IX因子製剤(乾燥人血液凝固第IX因子複合体, 乾燥濃縮人血液凝固第IX因子)を製造している4施設(化学及血清療法研究所, 日本製薬株式会社, バクスター株式会社, 株式会社ベネシス)と国立感染症研究所の計5施設で力価を測定した。

1) 国立感染症研究所血液・安全性研究部

2) 国立感染症研究所細菌第二部

3) 化学及血清療法研究所品質管理部

4) 日本製薬株式会社成田工場品質管理部

5) バクスター株式会社宮崎工場品質管理部

6) 株式会社ベネシス京都工場品質管理部

[受付日：2007年5月1日, 受理日：2007年9月4日]

Table 1 Equipment and reagents

Lab	Coagulation analyzer	FIX Deficient substrate plasma	APTT Reagent
NIID	Coagrex-100S, Sysmex Corp.	Clotting Factor IX-deficient plasma, Dade Behring	Actin, Dade Behring
A	CA-6000, Sysmex Corp.	Clotting Factor IX-deficient plasma, Dade Behring	Actin, Dade Behring
B	CA-7000, Sysmex Corp.	Clotting Factor IX-deficient plasma, Dade Behring	Actin, Dade Behring
C	Coag-Stat SUPER, Sysmex Corp.	Clotting Factor IX-deficient plasma, Dade Behring	Actin, Dade Behring
D	CA-50, Sysmex Corp.	Clotting Factor IX-deficient plasma, Dade Behring	Actin, Dade Behring

3) 力価測定方法

基本的に WHO が国際標準品の力価を決定するときに行っている collaborative study の方法に準じ、参加施設が通常の作業で使用している試薬・機器を用い、通常行っている測定方法で力価を測定した。我が国の生物学的製剤基準には、凝固因子の力価試験¹⁾として、部分トロンボプラスチン時間の試験（一段法）が記載されており⁵⁾、今回もこの方法で測定した。

国際標準品及び候補品はそれぞれ規定量の注射用蒸留水にて溶解したのち、およそ 1 単位/ml になるように第 IX 因子欠乏ヒト血漿を用いて前希釈を行った。この前希釈した検体にヒト血清アルブミンを含む適当な緩衝液を加え、2 倍段階希釈を行い、国際標準品及び候補品各々 4 点の検体希釈液を作製した。この検体希釈液に第 IX 因子欠乏ヒト血漿、活性化トロンボプラスチン液を等量加え軽く攪拌した後に 36.5~37.5℃ で一定時間加温し活性化させた。更に 0.025mol/l 塩化カルシウム溶液を検体希釈液と等量加え、凝固時間を測定した。1 希釈点あたり 2 サンプルを作製・測定し、凝固時間の平均値を算出した。この組み合わせで日を変えて独立した 4 回の試験を行った。溶解した国際標準品及び候補品は特に時間は決めていないが速やかに測定作業に用い、一度溶解したものを保存して再使用はしない。各施設で使用した試薬、機器は Table 1 に示した。

4) 力価算定

測定毎の力価は、2 サンプルの凝固時間の平均値、及び濃度の対数変換値から、平行線定量法を用いて国際標準品に対する相対力価として算出した。

5) 統計処理による候補品力価の決定

各施設の独立した 4 回の試験結果から国際標準品に対する相対力価としてそれぞれ算定した相対力価の値 x_i と、相対力価の分散の逆数を重み w_i として加重平均値 $\sum w_i x_i / \sum w_i$ を求めた。加重平均値は、試験結果全体、各施設毎、 χ^2 検定で均一と判断された結果のそれぞれに

対して求めた。

結 果

各施設の測定力価、及び加重平均の結果を Table 2 に示した。数値は、独立した 4 回の測定により国際標準品との相対力価として得られた候補品の力価及び 95% 信頼区間、各施設毎 (intra Lab)、試験結果全体 (overall)、 χ^2 検定で均一と判断された結果から得られた ($\$$) それぞれの加重平均値を示している。また Table 2 に加え、各施設の候補品の力価及び 95% 信頼区間は図として Fig. 1 に示した。全体の結果から得られた加重平均値 76.263 国際単位/ml は χ^2 検定で均一と判断された結果から得られた加重平均値 74.989 国際単位/ml と大きな差はなかった。 χ^2 検定で均一と判断された結果から得られた加重平均値から小数第 2 位以下を四捨五入し、第二世代第 IX 因子国内標準品の力価は 75.0 国際単位/ml と決定した。この第二世代第 IX 因子国内標準品は Table 3 に示したラベルを貼付し、国立感染症研究所で管理、分与を行っている。国際標準品は WHO のポリシーとして有効期限を設定していない。今回の第二世代国内標準品も特に有効期限は設定していないが、定期的に国際標準品を指標として力価のモニターを行う予定である。

考 察

血液凝固第 IX 因子製剤は第 IX 因子の補給を必要とする血友病 B の治療に用いることを目的とした製剤であり、生物学的製剤基準に規定されている。1993 年の生物学的製剤基準からは血友病 B の治療を目的とした第 IX 因子濃縮製剤と、その他の凝固因子の一部もしくは全部を含むプロトロンビン複合体である製剤の両者に分割表示されるようになった。全ての複合体製剤が適応となっているわけではないが、ある種の複合体製剤は血液凝固第 VIII 因子阻害物質 (インヒビター) 保

Table 2 Potencies estimated using the 3rd international standard

Lab	Assay No	U/mL (95% confidence interval) *: homogeneity of potency by χ^2 -test	Weighted Arithmetic Mean	
			intra Lab	overall
NIID	1	77.164 (74.391-80.035) *	80.342	76.263 (74.989) §
	2	83.118 (79.606-86.787)		
	3	82.636 (77.706-87.884)		
	4	81.509 (77.042-86.237)		
A	1	73.529 (69.499-77.762) *	74.230	
	2	75.392 (73.348-77.486) *		
	3	71.920 (68.590-75.387)		
	4	73.921 (71.381-76.541) *		
B	1	77.432 (75.578-79.327)	77.634	
	2	79.222 (75.482-83.136)		
	3	78.232 (76.544-79.954)		
	4	76.255 (74.022-78.548) *		
C	1	75.267 (73.675-76.891) *	74.582	
	2	73.811 (70.882-76.846) *		
	3	73.071 (70.368-75.863) *		
	4	74.890 (69.724-80.393) *		
D	1	68.721 (60.723-77.564) *	72.611	
	2	73.653 (68.567-79.066) *		
	3	71.019 (67.134-75.093)		
	4	82.890 (72.829-94.299)		

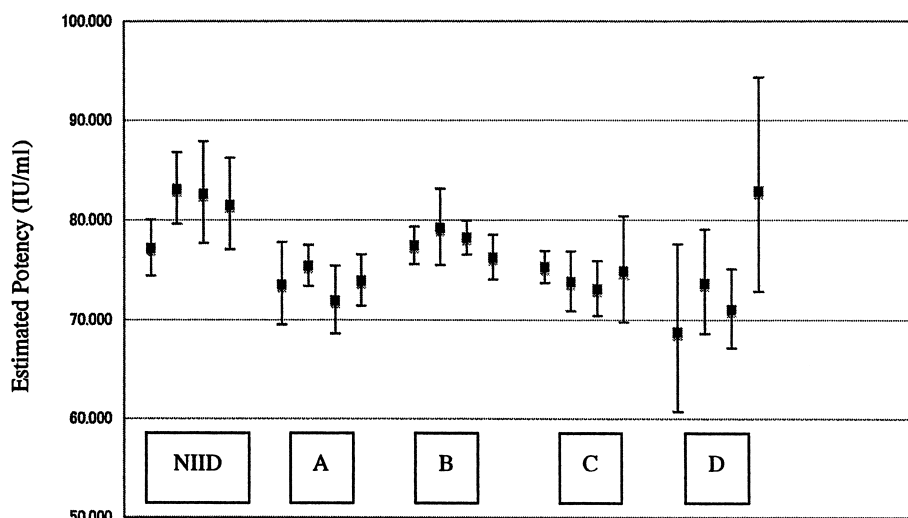


Fig. 1 Potency of the Japanese standard estimated by five different laboratories based on the 3rd international standard.

有患者のインヒターの反応経路をバイパスする目的で用いられることもある。

このような血液凝固第 IX 因子製剤を含め、生物学的製剤は、その有効成分の含量の測定のためには単なる物理化学的な方法だけでは不十分で、活性を測定する生物学的方法が必要である。そのためには指標となる標準物質が必要であり、血液凝固因子製剤も活性力価の測定のための国際標準品が制定されている。血液凝固因子製剤を含めた生物学的製剤の、国際標準品などの製造、管理、分与は WHO International Laboratory

for Biological Standards の一つである英国の National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) が行っている。新しく国際標準品を制定する場合は、NIBSC が中心となって国際共同研究を組織し、各国の国立研究機関、製剤製造企業などが力価測定を行う。ここで得られた成績は、血液凝固に関する国際標準品については、International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)/Scientific and Standardization Committee (SSC) に報告され、討議される。ここでの了承をふまえて、この結果がさらに WHO の Expert

Table 3 Product description attached to the 2nd Japanese standard for factor IX concentrate

名称	血液凝固第IX因子国内標準品
ロットNo.	FIX STD-M-0302
製造年月日	2004.1.28
力価	血液凝固第IX因子 75.0 国際単位/ml
用法	日局注射用水 1ml で溶解
貯法	10℃以下に保存

Committee on Biological Standardization (ECBS) において討議、承認され、新しい国際標準品が制定される。今回の国内標準品の測定も、この国際標準品制定のための国際共同研究の実施方法に準じて行った⁶⁾。

力価の測定値は用いた試薬、ロット、使用機器などにも影響を受ける。そのために標準品を用いた相対的な測定が必要なのであるが、通常の測定と今回の力価制定のための測定で差の生じる可能性を少なくするために、WHO の collaborative study に準じ、試薬・機器の統一は行わず、通常使用している試薬を用い、試薬商品名、ロット番号をデータシートに記載する方法とした。今回使用機器は、メーカーは同じであるものの機種はすべて異なっていた。また、使用試薬商品名は共通であった。測定結果を統計処理したところ、多少のばらつきはあるもののどの施設の結果からも均一と判断される力価が得られた。測定値の再現性のためには稀釈用緩衝液にアルブミンの添加が必要であるという報告があり²⁾、我が国の生物学的製剤基準にも使用する緩衝液は「ヒト血清アルブミンを含む適当な緩衝液」と記載されている。今回の測定は国際標準品と候補品を同一方法で測定し、国際標準品に対する相対力価から候補品の力価の値を求めているので理論的にはばら

つきは生じないのだが、機器の性能の違い、測定手技の違いなどがばらつきの原因になった可能性がある。

おわりに

血漿分画製剤である血液凝固因子製剤は広く知られているが、その力価を決定する際に重要な標準品という存在は製剤ほど周知されていないように思われる。今回、血液凝固第IX因子製剤の国内標準品を更新する機会を得たので、国際標準品についての概説を加えて報告した。

文 献

- 1) 三浦泰裕：生物学的製剤の標準品の制定—血液凝固因子を中心に—。日本輸血学会雑誌，44：465—472，1998。
- 2) Barrowcliffe TW, Kembal-Cook G: Establishment of 2nd International Standard for Factors II, IX and X, concentrate, 84/683: Additional collaborative study on Factors II and X. WHO BS/94.1.1784, 1994.
- 3) Ballowcliffe TW, Macnab J, Weinstein MJ, et al: International Collaborative Study on Factor IX Concentrate Standards Report to ECBS, WHO. WHO BS/96.1845, 1996.
- 4) Barrowcliffe TW: Standardization of FVIII & FIX assays. Haemophilia, 9: 397—402, 2003.
- 5) 厚生労働省：生物学的製剤基準，2004，184—187。
- 6) Kirschbaum N, Wood L, Lachenbruch P, et al: Calibration of the Ph. Eur. BRP Batch 3/Mega 2 (US/FDA) Standard for Human Coagulation Factor VIII Concentrate for use in the Potency Assay. Pharmeuropa Special Issue BIO, 2002-1: 31—64, 2002.

ESTABLISHMENT OF THE JAPANESE STANDARD FOR HUMAN COAGULATION FACTOR IX

*Maiko Taneichi*¹⁾, *Yoshiaki Okada*¹⁾, *Kouichiro Kamimura*³⁾, *Nobuto Fukunaga*³⁾, *Akihiro Akaishi*⁴⁾, *Chihiro Saruwatari*⁵⁾, *Masatoshi Takimoto*⁶⁾, *Keiji Abu*⁶⁾, *Yoshinobu Horiuchi*²⁾ and *Kazunari Yamaguchi*¹⁾

¹⁾Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

²⁾Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases

³⁾Quality Control Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

⁴⁾Quality Control Department, Nihon Pharmaceutical Corporation

⁵⁾Quality Control Department, Baxter Limited, Miyazaki Plant

⁶⁾Quality Control Department, Benesis Corporation, Kyoto Plant

Abstract:

The first Japanese standard for human coagulation factor IX was established in 1995 using the 2nd International standard as a reference. In 2004, the 2nd Japanese standard for human coagulation factor IX was developed. This report describes a collaborative study among five laboratories conducted to assign the potency of the 2nd Japanese standard. The data shown here are the results obtained with the one-stage assay followed by parallel line analysis using the 3rd international standard as a reference. In conclusion, the 2nd Japanese standard was established with a potency of 75.0 IU/ml.

Keywords:

Human Coagulation Factor IX, Japanese Standard, International Standard

©2008 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.gr.jp>