

血液凝固第 VIII 因子および血液凝固第 IX 因子国内標準品の力価測定：

多施設共同研究

倉光 球¹⁾ 大隈 和¹⁾ 落合 雅樹²⁾ 中村 徹³⁾ 遠藤 章⁴⁾
阿武 啓嗣⁵⁾ 菅原 理明⁶⁾ 渡邊 嘉治⁷⁾ 小西 久郎⁸⁾ 内田 早苗⁹⁾
浜口 功¹⁾

キーワード：血液凝固第 VIII 因子，血液凝固第 IX 因子，国内標準品，国際標準品

はじめに

血液製剤やワクチンなどの生物学的製剤は，血液や培養細胞などの生物由来の成分を原料とすることから，高度な製造技術と品質管理が必要である．また製剤の有効成分については，単に物理化学的な測定のみならず，生体内で有効に機能することを確認するために生化学的に活性を測定する必要がある．

例えば，乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子や第 IX 因子などの血液凝固因子製剤の有効成分は，凝固一段法の活性化部分トロンボプラスチン時間測定法（APTT法）によって検体の凝固時間を吸光度変化として検出し，製剤中に含まれる凝固因子の活性を力価として表記する．血液凝固因子の力価は，World Health Organization（WHO）によって国際的に標準化され International Unit（IU）で表記される．またその指標となる国際標準品は，WHO Expert Committee on Biological Standardization（ECBS）によりそれぞれ制定されており，National Institute for Biological Standards and Control（NIBSC）から世界に提供されている．血液凝固第 VIII 因子および第 IX 因子については，多施設が参加した国際共同研究により第 8 次国際標準品（NIBSC code：07/350）と第 4 次国際標準品（NIBSC code：07/182）がそれぞれ力価 9.4IU/ampoule，7.9IU/ampoule として定

められ，現在運用されている¹⁾²⁾．国際標準品の力価の値は，参加施設の結果の幾何平均値が現在用いられている．

しかしながら，国際標準品は製造本数が限られていることから，WHO は国際標準品を指標にして，各国で使用できるような国内標準品や各製造所の自家参照品のような 2 次標準品を設定することを推奨している³⁾．我が国においても，1995 年の第 1 次血液凝固第 VIII 因子国内標準品の制定を始めとして，血液凝固第 IX 因子，アンチトロンビン III の国内標準品が整備され，それぞれ第 1 次，第 2 次国内標準品とロット更新を繰り返しながら，日本の血液製剤の力価を IU で規格化することを可能にして来た^{4)~7)}．現在使用している第 2 次血液凝固第 VIII 因子および第 2 次血液凝固第 IX 因子の国内標準品は，それぞれ 2007 年と 2004 年に更新され，血友病 A および血友病 B 等の治療に用いられる乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子や乾燥濃縮人血液凝固第 IX 因子（乾燥人血液凝固第 IX 因子複合体を含む）の力価試験等で，生物学的製剤基準に規定された標準品として使用されてきたが，在庫の減少に伴って更新が必要なため新たに第 3 次国内標準品候補を製造した．

本報告では，血液凝固第 VIII 因子および第 IX 因子の国内標準品候補の力価について，国際標準品の更新の

1) 国立感染症研究所血液・安全性研究部
2) 国立感染症研究所品質保証・管理部
3) 化学及血清療法研究所試験検査部
4) 日本血液製剤機構（JB）千歳工場品質管理部
5) 日本血液製剤機構（JB）京都工場品質管理部
6) バクスアルタ株式会社品質保証部
7) バクスター株式会社品質管理部
8) 日本製薬株式会社成田工場品質管理部
9) CSL ベーリング株式会社品質保証部
〔受付日：2017 年 9 月 21 日，受理日：2017 年 12 月 12 日〕

表1 多施設共同測定に参加施設の力価測定方法

施設名	測定原理	測定機器	測定試薬
血液凝固第 VIII 因子の力価測定方法			
NIID	APTT 凝固一段法	CA-1500	データファイ・APTT
B	APTT 凝固一段法	CS-2000i	トロンボチェック APTT-SLA
C	APTT 凝固一段法	CS-2000i	データファイ・APTT
D	APTT 凝固一段法	CA-50	データファイ・APTT
E	APTT 凝固一段法	CA-6000	データファイ・APTT
血液凝固第 IX 因子の力価測定方法			
NIID	APTT 凝固一段法	CA1500	データファイ・APTT
B	APTT 凝固一段法	コアグレックス 800	データファイ・APTT
C	APTT 凝固一段法	CA-50	データファイ・APTT
D	APTT 凝固一段法	Behring Coagulation System	Pathromtin SL
E	APTT 凝固一段法	CA-6000	データファイ・APTT
F	APTT 凝固一段法	CA-7000	データファイ・APTT

方法と同様に、国際標準品を指標として多施設共同研究にて測定し、各施設の結果の幾何平均値をそれぞれの表示力価を定めたので報告する。

方 法

1. 参加施設

血液凝固第 VIII 因子の国内標準品の力価測定は、日本血液製剤機構 (JB) 千歳工場および京都工場、化学及血清療法研究所、バクスアルタ株式会社、および国立感染症研究所の計 5 施設で測定した。また、血液凝固第 IX 因子の国内標準品の力価測定は、化学及血清療法研究所、日本血液製剤機構 (JB) 京都工場、日本製薬株式会社、バクスアルタ株式会社、CSL ベーリング株式会社、および国立感染症研究所の計 6 施設で測定した。

2. 検体

第 8 次血液凝固第 VIII 因子国際標準品 (8th International Standard Factor VIII Concentrate NIBSC code : 07/350, 9.4IU/ampoule), 第 6 次国際標準血漿 (6th International Standard Factor VIII and von Willebrand Factor in Plasma NIBSC code : 07/316, FVIII : C 0.68IU/ampoule)⁸⁾, 第 4 次血液凝固第 IX 因子国際標準品 (4th International Standard for FIX Concentrate NIBSC code : 07/182, 7.9IU/ampoule) は、NIBSC から入手した。国際標準品は、蒸留水 1ml でそれぞれ溶解した。第 2 次血液凝固第 VIII 国内標準品 (STD-M-02, 13.3IU/ml) および第 2 次血液凝固第 IX 因子国内標準品 (M-0302, 75.0IU/ml) は、国立感染症研究所から参加施設へ配布した。第 3 次血液凝固第 VIII 因子国内標準品候補および第 3 次血液凝固第 IX 因子国内標準品候補はそれぞれ血液製剤製造所において、乾燥濃縮人血液凝固第 VIII 因子および乾燥濃縮人血液凝固第 IX 因子の血液製剤の製造方法に準拠して製造し、国立

感染症研究所が購入した検体を参加施設へ配布した。

3. 力価の測定

WHO が国際標準品の力価を決定する際の collaborative study の方法に沿って、参加施設が通常使用している試薬・機器を用い、施設の測定方法に準じてそれぞれの血液凝固因子の力価を測定した⁹⁾ (表 1)。また International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) /Scientific and Standardization Committee (SSC) (ISTH/SSC) の推奨に従い、検体の前希釈はそれぞれ第 VIII 因子および第 IX 因子の各欠乏血漿を使用した¹⁰⁾¹¹⁾。第 VIII 因子、第 IX 因子の力価は、凝固時間を反応値とし平行線定量法を用いて、第 8 次血液凝固第 VIII 因子国際標準品、第 4 次血液凝固第 IX 因子国際標準品に対する相対力価としてそれぞれ算出した¹²⁾。

結 果

第 3 次第 VIII 因子国内標準品候補の共同測定結果を表 2 に示した。それぞれの施設の結果 (幾何平均値) は、各施設で独立 4 回測定した結果を評価したものである。全施設の結果の幾何平均値は、16.3IU/ml (95% 信頼区間 (confidence interval (CI)) : 14.2~18.7IU/ml) となった。また対照として測定した第 2 次国内標準品と第 6 次国際標準血漿の全施設の幾何平均値は、それぞれ 13.7 IU/ml (95% CI : 12.0~15.7IU/ml), 0.69IU/ml (95% CI : 0.62~0.76IU/ml) となり、表示力価 13.3IU/ml および 0.68IU/ampoule とよく一致した (それぞれ表示力価の 103%, 101%)。

次に第 3 次第 IX 因子国内標準品候補の共同測定結果を表 3 に示した。それぞれの施設の結果 (幾何平均値) は、各施設で独立 4 回測定した結果を評価したものである。全施設の結果の幾何平均値は、77.5IU/ml (95% CI : 76.1~79.1IU/ml) となった。また対照として測定した第 2 次国内標準品の全施設の幾何平均値は、78.9

表2 第3次血液凝固第VIII因子国内標準品候補の測定結果

施設名	幾何平均値	95% 信頼区間	幾何変動係数 GCV (%)	表示力価との比 (%)
第3次国内標準品候補 (STD-M03)				
A (感染研)	16.4	15.1 ~ 17.8	5.20%	-
B	13.8	13.6 ~ 14.0	0.90%	-
C	15.5	15.1 ~ 15.8	1.80%	-
D	18.1	17.7 ~ 18.3	1.10%	-
E	18.1	17.9 ~ 18.2	0.70%	-
全施設の幾何平均値	16.3	14.2 ~ 18.7	11.30%	-
第2次国内標準品 (STD-M02, 表示力価 13.3IU/ml)				
A (感染研)	14	13.0 ~ 14.6	4.60%	105%
B	11.7	11.4 ~ 12.0	2.00%	88%
C	12.9	12.1 ~ 13.4	4.10%	97%
D	15.5	14.9 ~ 15.9	2.40%	116%
E	14.8	14.4 ~ 15.0	1.50%	111%
全施設の幾何平均値	13.7	12.0 ~ 15.7	11.00%	103%
第6次国際標準血漿 (07/316, 表示力価 0.68IU/ampoule)				
A (感染研)	0.69	0.66 ~ 0.72	3.20%	102%
B	0.63	0.61 ~ 0.65	2.70%	93%
C	0.64	0.57 ~ 0.68	6.90%	94%
D	0.75	0.72 ~ 0.76	2.00%	110%
E	0.74	0.73 ~ 0.75	1.50%	109%
全施設の幾何平均値	0.69	0.62 ~ 0.76	8.10%	101%

表3 第3次血液凝固第IX因子国内標準品候補の測定結果

施設名	幾何平均値	95% 信頼区間	幾何変動係数 GCV (%)	表示力価との比 (%)
第3次国内標準品候補 (NS1201)				
A (感染研)	76.3	74.3 ~ 77.5	1.6%	-
B	79.2	74.9 ~ 82.1	3.5%	-
C	77.0	72.5 ~ 80.0	3.8%	-
D	78.6	76.2 ~ 80.1	2.0%	-
E	77.9	74.4 ~ 80.2	2.9%	-
F	76.3	75.1 ~ 77.1	1.0%	-
全施設の幾何平均値	77.5	76.1 ~ 79.1	1.6%	-
第2次国内標準品 (M-0302, 表示力価 75.0IU/ml)				
A (感染研)	77.6	74.0 ~ 80.0	3.0%	103%
B	78.6	77.8 ~ 79.1	0.6%	105%
C	79.2	77.3 ~ 80.4	1.5%	106%
D	80.2	76.1 ~ 82.9	3.3%	107%
E	79.7	77.0 ~ 81.6	2.2%	106%
F	78.2	75.4 ~ 80.1	2.3%	104%
全施設の幾何平均値	78.9	77.7 ~ 80.1	1.2%	105%

IU/ml (95% CI : 77.7~80.1IU/ml) となり、表示力価 75.0IU/ml とほぼ一致した (表示力価の 105%)。

考 察

表4に示すように血液凝固因子の国際標準品のロットは、それぞれの第2次国内標準品の値付けのための多施設共同測定時から更新されたものの、今回の多施設共同研究において同時に測定した現行の第2次国内

標準品の力価は、表示力価 (前回の多施設共同測定の結果) とほぼ一致したことから、今回の第3次国内標準品の測定は、第2次国内標準品制定時の多施設共同研究とトレーサブルかつ同等の信頼性がある結果を得られたことを示していると考えられる。このことから、国内標準品のロット更新によって発生する力価の乖離はほとんど無いと予想され、血液製剤の有効成分の力価評価の一貫性が確保されると考えられる。

表4 血液凝固第 VIII 因子と第 IX 因子の国内標準品ロット更新のまとめ

ロット番号	表示力価	制定年	使用した国際標準品		
			ロット番号	表示力価	
血液凝固第 VIII 因子国内標準品					
第 1 次	M-01	4.1IU/ml	1995	第 5 次 88/640	5.4IU/ampoule
第 2 次	M-02	13.3IU/ml	2007	第 7 次 99/678	11.0IU/ampoule
第 3 次	M-03	16.3IU/ml	2017	第 8 次 07/350	9.4IU/ampoule
血液凝固第 IX 因子国内標準品					
第 1 次	M-9501	73.4IU/ml	1995	第 2 次 94/683	6.3IU/ampoule
第 2 次	M-0302	75.0IU/ml	2004	第 3 次 96/853	10.7IU/ampoule
第 3 次	NS1201	77.5IU/ml	2015	第 4 次 07/182	7.9IU/ampoule

我が国の生物学的製剤基準には、血液凝固第 VIII 因子および第 IX 因子の力価試験として、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 法の試験 (凝固一段法) が規定されており、今回の第 VIII 因子および第 IX 因子の国内標準品の力価測定もこれまでの測定と同様に全施設で APTT 試薬を用いた凝固一段法で行われたが、国際標準品の力価の評価は、合成基質法でも一部行われている²⁾。国内標準品の用途は、現在のところ血液由来の製剤に限られているため、組換え血液凝固因子製剤や長期間作用型血液凝固因子製剤で生じる測定方法による結果の乖離について考慮する必要性は低いと考えられるが、国内標準品の力価の評価方法として国際標準品のように合成基質法も考慮する必要があるか今後の検討課題である。

多施設共同測定において力価を決定した国内標準品は、血友病 A および血友病 B 等の治療に用いられる血液製剤の国家検定 (血液凝固第 VIII 因子) や抜き取り試験 (血液凝固第 IX 因子) の力価試験において、生物学的製剤基準に規定された標準品として使用される。また、血液製剤製造所において、製造時の力価の管理のために使用される。今回更新する国内標準品は、国立感染症研究所において定期的に国際標準品を指標として力価のモニタリングを行い、制定時の表示力価が維持されていることが確認される。

なお、第 3 次血液凝固第 VIII 因子国内標準品および第 3 次血液凝固第 IX 因子国内標準品の制定は、それぞれ 2017 年 5 月、2015 年 12 月の国立感染症研究所の検定検査協議会において承認された。現在、国立感染症研究所で保管および交付している。

結 論

血液凝固第 VIII 因子と血液凝固第 IX 因子の第 3 次国内標準品候補について、それぞれの力価を多施設共同研究にて測定した結果、第 3 次血液凝固第 VIII 因子国内標準品力価を 16.3IU/ml、第 3 次第 IX 因子国内標準

品力価を 77.5IU/ml と決定した (表 3)。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Gray E, Pickering W, Hockley J, et al: Collaborative study for the establishment of replacement batches for human coagulation factor IX concentrate reference standards. *Pharmeuropa Bio*, 1: 19—30, 2008.
- 2) Raut S, Daniels S, Heath AB, et al: Value assignment of the WHO 8th International Standard for factor VIII concentrate (07/350). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10: 1175—1176, 2012.
- 3) World Health Organization: TSR 932 International Biological Reference Standards, WHO Technical Report Series No. 932, 2006, 84—85.
- 4) 種市麻衣子, 岡田義昭, 上村晃一郎, 他: 血液凝固第 IX 因子国内標準品の力価制定. *日本輸血細胞治療学会誌*, 54: 43—47, 2008.
- 5) 種市麻衣子, 岡田義昭, 上村晃一郎, 他: 血液凝固第 VIII 因子国内標準品の力価制定. *日本血栓止血学会誌*, 19: 822—825, 2008.
- 6) 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—. *日本輸血血液学会雑誌*, 44: 465—472, 1998.
- 7) 生物学的製剤基準改正平成 29 年 3 月 30 日. 厚生労働省, 2017, 250—255.
- 8) Hubbard AR, Hamill M, Beeharry M, et al: Value assignment of the WHO 6th International Standard for blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor in plasma (07/316). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9: 2100—2102, 2011.

- 9) 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 biologicals, 2002, 31—64.
- 10) Barrowcliffe TW: Standardization of FVIII & FIX assays. *Haemophilia*, 9: 397—402, 2003.
- 11) Raut S, Sands D, Heath AB, et al: Variability in factor VIII concentrate measurement: results from SSC field collaborative studies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1: 1927—1934, 2003.
- 12) Finney DJ: *Statistical methods in biological assay*, 3rd ed, Charles Griffin & Co., London, 1978.

VALUE ASSIGNMENT OF THE 3RD JAPANESE NATIONAL STANDARDS FOR BLOOD COAGULATION FACTOR VIII AND FACTOR IX; A COLLABORATIVE STUDY

*Madoka Kuramitsu*¹⁾, *Kazu Okuma*¹⁾, *Masaki Ochiai*²⁾, *Toru Nakamura*³⁾, *Akira Endo*⁴⁾, *Keiji Abu*⁵⁾, *Masaaki Sugawara*⁶⁾, *Yoshiharu Watanabe*⁷⁾, *Hisao Konishi*⁸⁾, *Sanae Uchida*⁹⁾ and *Isao Hamaguchi*¹⁾

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

²⁾Department of Quality Assurance and Radiological Protection, National Institute of Infectious Diseases

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

⁴⁾Quality Control Department, Chitose Plant, Japan Blood Products Organization

⁵⁾Quality Control Department, Kyoto Plant, Japan Blood Products Organization

⁶⁾Quality Assurance Department, Baxalta Japan Limited

⁷⁾Quality Control Department, Baxter Limited

⁸⁾Quality Control Department, Narita Plant, Nihon Pharmaceutical Co. Ltd

⁹⁾Quality Assurance Department, CSL Behring

Keywords:

Human Coagulation Factor VIII, Human Coagulation Factor IX, Japanese National Standard, International Standard