

血漿分画製剤のウイルス安全対策について (報告)

平成 15 年 12 月 9 日事務連絡「血漿分画製剤のウイルス安全性について」で要請のありました件に関して、下記のとおりご報告申し上げます。

記

第 2. ヒトパルボウイルス B19 が混入した原血漿から製造された血漿分画製剤の安全性評価等に係る事項

- ① 【調査事項】 国内で製造され又は国内に輸入されている血漿分画製剤について同ウイルスの感染が疑われた事例の有無及び当該事例がある場合は、その事例の調査結果。

【報告】 ヒトパルボウイルス B19 は HBV、HCV、HIV と異なり、主として飛沫感染するウイルスであり、製剤に起因するかどうかを特定することは難しいのですが、フィブリノゲン加第 XIII 因子製剤投与後に白血球数減少として報告された症例でヒトパルボウイルス B19 の感染が疑われた事例がありました。この当時はヒトパルボウイルス B19 のスクリーニング検査がまだ行われていない血漿が原料として使用されていた時期であったことから、同ウイルスの感染が疑われた事例です。また、フィブリノゲン加第 XIII 因子製剤投与後にヒトパルボウイルス B19 感染疑いとして報告された事例がありましたが、この事例については、既にパルボウイルス B19 の検査等が実施されていること、担当医師も因果関係には否定的な見解であることから、製剤による感染の可能性は極めて低いと考えます。

- ② 【調査事項】 血漿分画製剤の製造工程において同ウイルスの検査の実施の有無及び実施している場合は、混入する理論的可能性のある最大ウイルス量。

【報告】 ヒトパルボウイルス B19 のスクリーニングとして、国内献血血漿は日本赤十字社で個別血漿毎に RHA 検査を実施しています。更に、弊所において、ヒトパルボウイルス B19 の NAT (500 人ミニプール) を実施しています。すなわち、原理の異なる 2 つの方法でヒトパルボウイルス B19 の検査をし、陰性であることを確認した後、製造に投入しています。また、製造後の最終製剤においても、ヒトパルボウイルス B19 の NAT を行い、陰性であることを確認しています。NAT の感度は約 10^2 コピー/ml です。したがって、ヒトパルボウイルス B19 が混入する理論的可能性は、約 10^2 コピー/ml 以下と考えられます。

一方、FDA/CBER/BPAC (June. 17. 1999) において、SD プラズマによるヒトパルボウイルス B19 感染事例の検証結果から、約 10^4 コピー/ml の製剤 (SD プラズマ) では全く感染がなかったこと (感染があった製剤は約 10^7 コピー/ml であったこと) が報告されています。これを受けて、米国においては、品質管理試験としてヒトパルボウイルス B19 の NAT を行うことが推奨され、その目安として、FDA/CBER/BPAC (Dec. 12. 2002) ではプール血漿で約 10^4 コピー/ml 以下とされています。

- ③ 【調査事項】 血漿分画製剤の製造工程における同ウイルスに係るウイルス・プロセスバリデーションの実施の有無及び実施している場合は、その結果。

【報告】 その結果を別紙 2 に示します。

平成15年12月18日

薬事・食品衛生審議血液事業部会事務局
厚生労働省医薬食品局血液対策課 御中

日本製薬株式会社

血漿分画製剤のウイルス安全対策について (回答)

平成15年12月9日付事務連絡にてご依頼のありました掲題の件に関し、下記のとおり、ご報告申し上げます。

記

第2 ヒトパルボウイルスB19が混入した原血漿から製造された血漿分画製剤の安全性評価等に係る以下の事項

① 国内で製造され又は国内に輸入されている血漿分画製剤について同ウイルスの感染が疑われた事例の有無及び該当事例がある場合は、その事例の結果報告

回答

当社血漿分画製剤投与によるヒトパルボウイルスB19(以下「B19」と略す)の感染症例報告は入手していません。

② 血漿分画製剤の製造工程において同ウイルスの検査の実施の有無及び実施している場合は、混入する理論的可能性のある最大ウイルス量

回答

(1) 国内献血血漿由来の製剤について

当社国内献血血漿由来の血漿分画製剤は、日本赤十字社が採血時にRHA法(Receptor mediated Hemagglutination)にてB19をスクリーニングし、適合した献血者血漿を用いて製造しています。

文献^{1, 2)}によるとRHA法の感度は $10^5 \sim 10^6$ コピー/mLと報告されていますので、RHA法に適合したB19感染の献血者1人の血漿が200mL使用された場合のB19の混入量は最大 2×10^8 コピー [10^6 コピー/mL \times 200mL]と推定されます。

1) 佐藤博行：日本輸血学会雑誌, Vol.42, No.3, 74～82, 1996

2) C.Wakamatsu, et al. : Vox Sanguinis, 76, 14～21, 1999

(2) 輸入血漿由来の製剤について

輸入の原料血漿の受入試験において、B19の15人ミニプールNAT検査を実施しています。NAT検査の検出限界は約100コピー/mLですので15人ミニプールNAT検査陰性で、個別NAT検査陽性の血漿が800mL使用された場合のB19の混入量は最大 1.2×10^6 コピー [100 コピー/mL \times 15人 \times 800mL] と推定されます。

③ 血漿分画製剤の製造工程における同ウイルスに係るウイルス・プロセスバリデーションの実施の有無及び実施している場合は、その結果

回答

当社血漿分画製剤の全製品について、製造工程におけるB19に関するウイルス・プロセスバリデーションを、ブタバルボウイルス(PPV)をモデルウイルスとして実施しており、その試験成績は別紙(2)のとおりです。

以上

血漿分画製剤のウイルス安全対策について

第2 ヒトパルボウイルス B19 が混入した原血漿から製造された血漿分画製剤の安全性評価等に 係る以下の事項

① 国内で製造され又は国内に輸入されている血漿分画製剤について同ウイルスの感染が疑われた事例の有無及び該当事例がある場合は、その事例の調査結果

⇒ 人血清アルブミン製剤「赤十字アルブミン 20」、「赤十字アルブミン 25」及び抗 HBs 人免疫グロブリン製剤「抗 HBs 人免疫グロブリン『日赤』」については、これまでに、これらの製剤によるヒトパルボウイルス B19 (以下、B19) 感染が疑われた事例は報告されていない。

一方、乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子製剤「クロスエイト M」については、本製剤投与による一過性の B19 感染が疑われた事例が一例、平成 9 年 9 月に報告されている^{1,2)}。

日本赤十字社では平成 9 年 8 月、「クロスエイト M」の製造工程に孔径 35nm のウイルス除去膜によるナノフィルトレーションを導入し、さらに平成 9 年 9 月には全ての献血血液について B19 の RHA (Receptor-mediated Hemagglutination) 検査を導入しており、その後製造された「クロスエイト M」による感染が疑われた事例は報告されていない。

② 血漿分画製剤の製造工程において同ウイルスの検査の実施の有無及び実施している場合は、混入する理論的可能性のある最大ウイルス量

⇒ 日本赤十字社では全ての献血血液について RHA 検査を実施し、陽性の血漿を排除している。さらに血漿分画製剤の製造用プール血漿及び全ての血漿分画製剤の最終製品について B19 の核酸増幅検査 (以下、NAT) を実施している。

製造用プール血漿はその多くで B19 DNA が検出されるが、別添 1 及び 2 の論文に示されているように、献血血液についての RHA 検査導入以降、製造用プール血漿の B19 DNA 含量は著しく減少している。

「赤十字アルブミン 20」、「赤十字アルブミン 25」及び「抗 HBs 人免疫グロブリン『日赤』」については、RHA 検査実施以前もまた以後も、最終製品において全ロットで NAT 陰性である。一方、「クロスエイト M」については、別添 1 及び 2 の論文に示されているように、製造工程変更の効果も相俟って RHA 検査導入以降、最終製品で NAT 陰性となっている。したがって、いずれの血漿分画製剤についても、最終製品に混入する理論的可能性のある最大ウイルス量は 38 IU/mL (NAT の 95%検出限界) である。

③ 血漿分画製剤の製造工程における同ウイルスに係るウイルス・プロセスバリデーションの実施の有無及び実施している場合は、その結果

⇒ B19 は脂質膜を有しない DNA ウイルスであることから、モデルウイルスとして適切と考えられるブタパルボウイルス (PPV) 及び B19 自体を用いてウイルス・プロセスバリデーションを行っている。その結果を別紙 8 に示した。

参考文献

1. 松井ら: モノクロナール抗体精製第Ⅷ因子製剤によるヒトパルボウイルス B19 感染症にて骨髄低形成性貧血を発症した血友病 A. 日本小児血液学会誌 11: 289 (1997).
2. H.Matsui et al.: Transient Hypoplastic Anemia Caused by Primary Human Parvovirus B19 Infection in a Previously Untreated Patient With Hemophilia Transfused With a Plasma-Derived, Monoclonal Antibody-Purified Factor VIII Concentrate. J.Pediatric Hematology/Oncology 21(1), 74-76 (1999).
3. A.Omar et al.: Removal of neutralized model parvoviruses and enteroviruses in human IgG solutions by nanofiltration. Transfusion 42, 1005-1010 (2002).
4. J.Blumel et al.: Inactivation of parvovirus B19 during pasteurization of human serum albumin. Transfusion 42, 1011-1018 (2002):

Receptor-mediated haemagglutination screening and reduction in the viral load of parvovirus B19 DNA in immunopurified Factor VIII concentrate (Cross Eight M®)

Y. Takeda¹, A. Wakisaka¹, K. Noguchi¹, T. Murozuka¹,
Y. Katsubayashi¹, S. Matsumoto¹, T. Tomono¹ & K. Nishioka²

¹The Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center, Chitose, Hokkaido, Japan

²The Japanese Red Cross Society, Tokyo, Japan

Human parvovirus B19 (B19) causes erythema infectiosum in childhood. In patients with haemolytic anaemia, it occasionally causes a transient aplastic crisis. It can harm immunocompromised patients, and cause fetal death in pregnant women. Plasma collected from regular blood donors and pooled for fractionation usually contains B19 DNA. B19 infection via blood products prepared from such contaminated plasma is a serious problem. B19 is difficult to inactivate during the preparation of blood fractions as it is a non-enveloped virus and relatively resistant to heat and solvent/detergent. Although nanofiltration with a pore size of less than 15 nm removes B19 from some blood products, so far it has been difficult to work with such a small pore size for filtration of most plasma derivatives. To minimize the risk of transmission of B19, it is important to screen out blood containing B19 and to develop effective B19 elimination methods in manufacturing.

In 1998, the Japanese Red Cross (JRC) began nationwide screening of all donated blood units for B19 by using receptor-mediated haemagglutination (RHA). (This had already been implemented in 1997 on a trial basis.) As the P-antigen on human erythrocyte membranes is a receptor for B19 [1], the presence of B19 can be determined by agglutination of glutaraldehyde-treated human erythrocytes [2]. RHA is simple and easy to implement in conventional viral screening, with a sensitivity of $\approx 10^5$ copies/ml. All voluntarily donated blood units at each blood centre were screened by RHA using a method described previously [2], and RHA-positive units were excluded from the source plasma for fractionation.

We measured the amount of B19 DNA using the polymerase chain reaction (PCR). Briefly, DNA was extracted from 100 μ l of plasma by phenol-chloroform extraction after treatment with proteinase K and sodium dodecyl sulphate (SDS). DNA was amplified by nested PCR using primer, as described by Shade *et al.* [3]. Test samples were serially diluted 10-fold and the final dilution that was positive by PCR was used as the virus titre (PCR unit/ml). For example, 3 PCR units/ml means

that the PCR is positive when a 100- μ l sample at a 1 : 100 dilution is tested and negative when a 100- μ l sample at a 1 : 1000 dilution is tested. Because the 95% cut-off value of our PCR against the World Health Organization (WHO) International Standard (National Institute for Biological Standards and Control [NIBSC], UK code 99/800) is $10^{6.64}$ dilution, 1 (= 10^0) PCR unit/ml corresponds to 38 IU/ml.

RHA screening for B19, and subsequent exclusion of B19-positive units, markedly reduced the viral load in the source plasma. The difference in plasma viral load before and after implementation of RHA was statistically significant ($P < 0.001$). Figure 1 shows the amounts of B19 DNA in the batch of source plasma. Each batch of source plasma contained 1500 l of pooled plasma from $\approx 10\ 000$ non-remunerated voluntary donors. In 112 batches of source plasma in 1996, before RHA screening had been introduced, the mode B19 titre was 10^4 PCR units/ml, and 55% of batches were contaminated with more than 10^6 PCR units/ml of B19.

By contrast, after we implemented screening in 1998, the mode B19 titre decreased to 10^2 PCR units/ml. No detectable B19 was found in 18 batches (5%), and 49% of the batches had fewer than 10^2 PCR units/ml. In 1999, no detectable B19 was found in 16% of batches, and 69% had fewer than 10^2 PCR units/ml. Nonetheless, six batches (2.2%) still contained at least 10^5 PCR units/ml [4].

To reduce the B19 viral content of the final Factor VIII product (Cross Eight M®; JRC) from lot No. 2M181 (prepared June 19, 1997) to 2M209 (prepared March 16, 1998), we first introduced nanofiltration using Planova 35N (Asahikasei Corp., Tokyo, Japan). The B19 DNA content of the final Factor VIII product was reduced significantly by this procedure, but was still present in 26 out of 29 lots, as shown in Fig. 2. After implementation of RHA screening for all potential donors of source plasma, B19 DNA was found in two out of 12 lots prepared between March 1998 and June 1998. After that time, B19 DNA could not be detected in any of the final products of 51 lots of Factor VIII prepared from RHA-screened plasma. Even after dissolving the Factor VIII specimen in only 1 ml of water instead of in the prescribed 10 ml for PCR (i.e. a 10-fold concentrated solution), B19 DNA was not detected in any of 36 lots. We then analysed log-reduction rates by monoclonal immunoadsorption and passage through a cation-exchange column. The log-reduction rates were estimated as 4.9 and 1.9 respectively, giving a combined total of 6.8. Therefore, the residual viral load in RHA-screened source plasma could be effectively removed during preparation of Factor VIII. Nucleic acid amplification testing (NAT) of B19 might be considered for

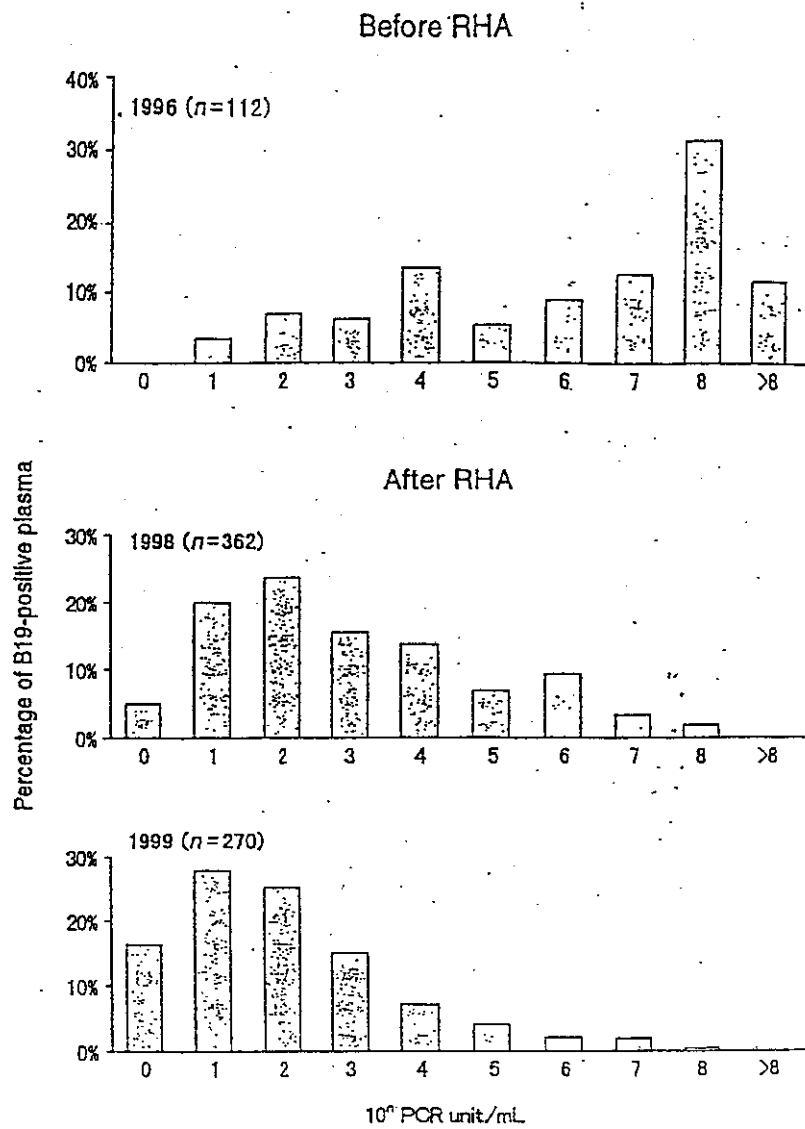


Fig. 1 Parvovirus B19 levels in the pooled source plasma for fractionation.

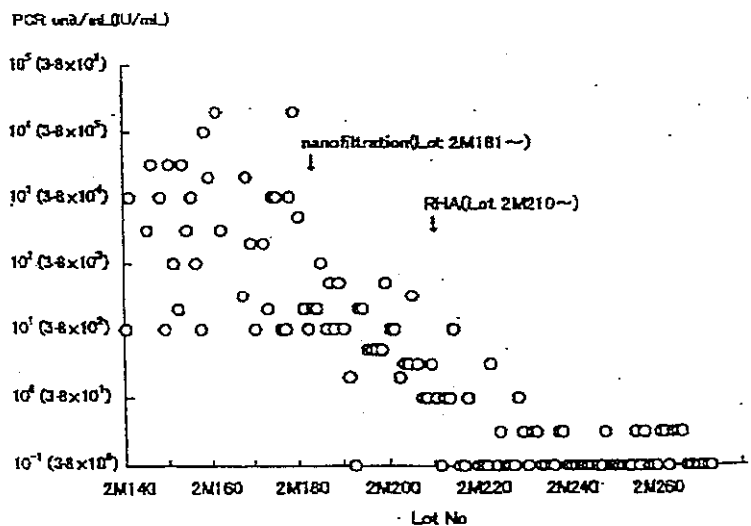


Fig. 2 Levels of parvovirus B19 DNA in Factor VIII concentrate (Cross Eight M®).

future reduction of the viral load in source plasma. However, RHA screening for B19 is still required to avoid cross-contamination or carry-over of the virus prior to NAT testing.

We conclude that RHA screening of individual blood donor specimens is a simple and effective procedure for eliminating high-titre B19 virus from source plasma for fractionation, as well as from blood components for transfusion.

Acknowledgements

We are grateful to Koji Sotoyama, Nariaki Kimura, Masako Shimobayashi and Motonaka Aoki for their skilful assistance.

References

- 1 Brown KE, Anderson SM, Young MS: Erythrocyte P antigen: receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993; 262:114-117
- 2 Wakamatsu C, Takakura F, Kojima E, Kiriya Y, Goto N,

Matsumoto K, Oyama M, Sato H, Okochi K, Maeda Y: Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results. *Vox Sang* 1999; 76:14-21

- 3 Shade RO, Blundell MC, Contmore SF, Tattersall P, Astell CR: Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol* 1986; 58:921-936

- 4 Sakata H, Ihara H, Sato S, Kato T, Ikeda H, Sekiguchi S: Efficiency of donor screening for human parvovirus B19 by receptor-mediated hemagglutination assay method. *Vox Sang* 1999; 77:197-203

Tsugikazu Tomono, PhD

Vice Director

Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

1007-31 Izumisawa

Chitose 066-8610

Japan

E-mail: tomono@pfc.jrc.or.jp

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 3.8×10^5 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 3.8×10^5 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、健常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¹⁾。

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°C30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²⁾。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 HBc 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³⁾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⁴⁾。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 μ l を PK/SDS 処理後 Phenol/Chloroform で抽出し、その全量を Nested PCR 法で VP1 領域を増幅した⁵⁾。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, 5×10^5 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便に 1:10 に濃縮した試料を調製して B19 DNA 定量を行った。

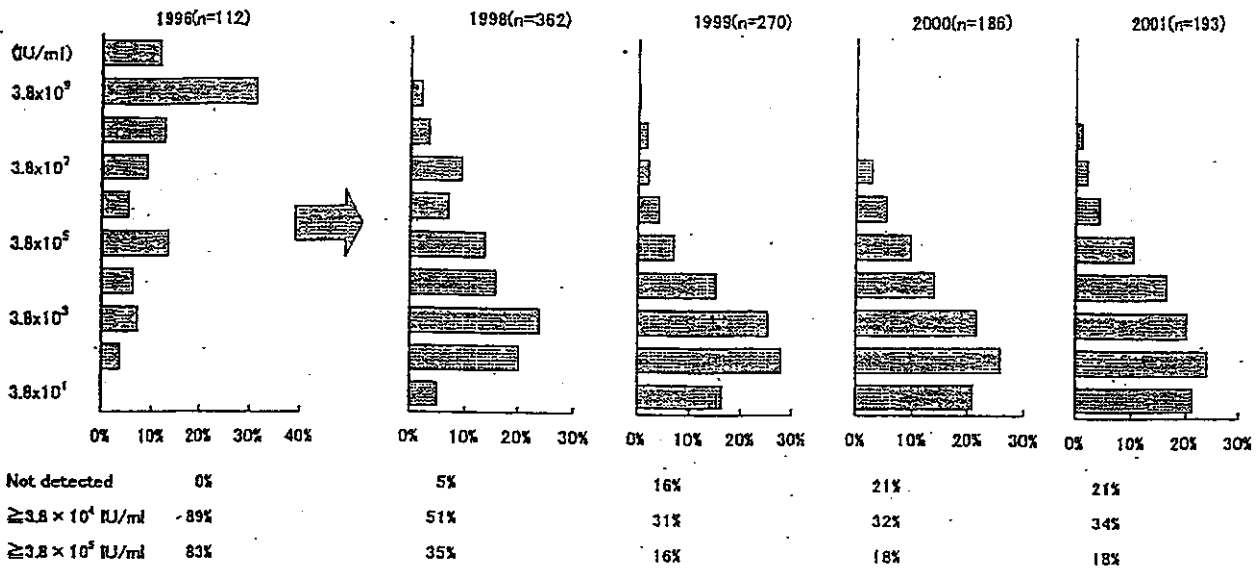


図1 Levels of human parvovirus B19 DNA in pooled plasma for fractionation. Data for 1996 show batches of plasma pools without RHA screening, While batches thereafter were screened.

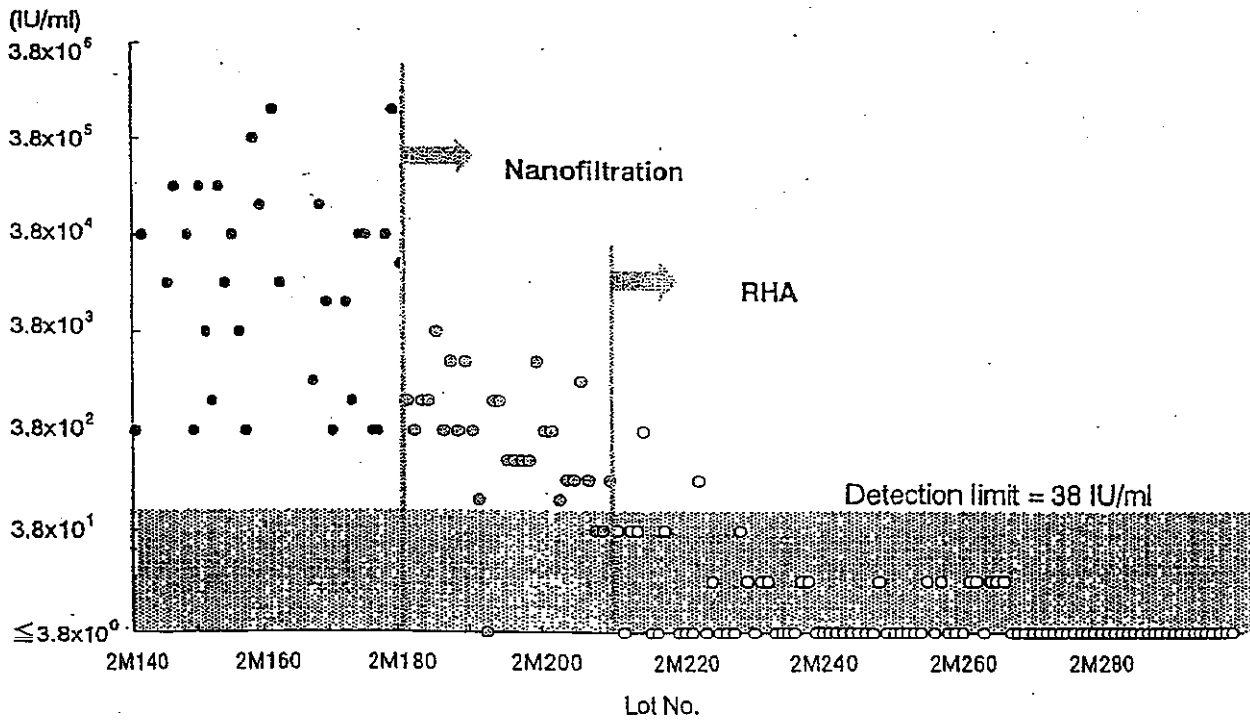


図2 Human parvovirus B19 DNA in plasma-derived monoclonal purified Factor VIII concentrate (Cross Eight M).

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.

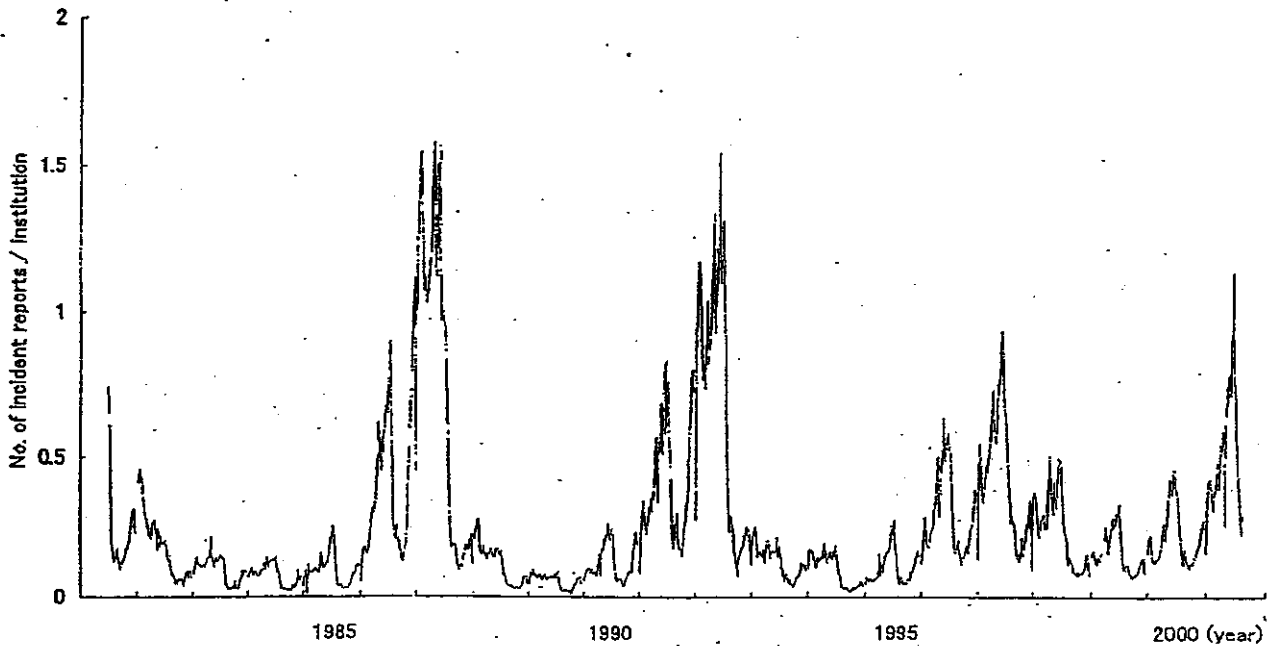


図3 Weekly incident rates of erythema infectiosum at various fixed observation sites. Infectious Diseases Weekly Report Japan (National Institute of Infectious Diseases, Infectious Disease Surveillance Center).

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、 3.8×10^5 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 3.8×10^5 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⁷⁾。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体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、 10^5 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 $10^{4.5}$ copies/mlであるのに対し、抗原抗体複合体期のウイルス量は $10^{5.5}$ copies/ml以下と遥かに少なく⁹⁾、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われるプール血漿の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低減化の流れにあつては、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¹⁰⁾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.

平成 15 年 12 月 18 日

厚生労働省医薬食品局血液対策課御中

株式会社ベネシス

血漿分画製剤のウイルス安全対策について

平成 15 年 12 月 9 日付事務連絡「血漿分画製剤のウイルス安全対策について」にてご要請のありました事項について、以下のとおりご報告申し上げます。

記

報告事項 第2

ヒトパルボウイルス B 19 が混入した原血漿から製造された血漿分画製剤の安全性評価等に係る以下の事項

- ① 国内で製造され又は国内に輸入されている血漿分画製剤について同ウイルスの感染が疑われた事例の有無及び該当事例がある場合は、その事例の調査結果

現在までに、弊社血漿分画製剤投与に関連してヒトパルボウイルス B19 感染が疑われた事例を 7 例受けておりますが、因果関係が確認された事例報告は 1 例もございません。

- ② 血漿分画製剤の製造工程において同ウイルスの検査の実施の有無及び実施している場合は、混入する理論的可能性のある最大ウイルス量

製造工程における同ウイルスの検査については、別紙 2 に示すように国内及び輸入血漿とも原料段階でスクリーニングを実施しています（国内血漿に関してはドナー毎の RHA 検査及び一部でミニプール NAT を、輸入血漿ではミニプール NAT を実施）。

さらに弊社では、製剤の小分け段階で全ロットについて同ウイルスの NAT を行い陰性を確認しています。

混入する理論的可能性のある最大ウイルス量については、ドナーにおける同ウイルスの検出頻度（文献におけるNAT検出頻度の最大値：0.6%）から計算すると、別紙2に示すように原血漿1ロット（全容量を3000Lとし、容量200mLの個別の分離血漿を15,000バッグプールするとした場合）にウイルス含有バッグが最大で90バッグ混入し、上述の原料段階での各検査の検出限界値から計算して、原血漿1ロット中に $6 \times 10^8 \sim 4 \times 10^{11}$ コピー含有する可能性があるとして推定されます。

なお、平成12年6月26日の安全技術調査会において、日本赤十字社からRHA検査導入後に製造した実際の原血漿のNAT成績が示されています。それによると原血漿のウイルス濃度は 1×10^8 コピー/mL程度のものが僅かにあるが、ほとんどが 1×10^4 コピー/mL以下であるとのことから、原血漿1ロット中のウイルス量は概ね 3×10^{10} コピー（3000L/プール血漿と仮定： 1×10^4 コピー/mL $\times 1000$ mL $\times 3000$ ）以下と考えられます。この成績は、上述の検出頻度の文献値とNAT検出感度から推定した最大ウイルス量とほぼ一致した結果になっております。

③ 血漿分画製剤の製造工程における同ウイルスに係るウイルス・プロセスバリデーションの実施の有無及び実施している場合は、その結果

弊社においては、全ての血漿分画製剤についてヒトパルボウイルス B19 と同じパルボウイルス属に属している CPV（イヌパルボウイルス）をモデルウイルスとしたウイルス・プロセスバリデーション試験を実施しています。

本試験により現在得られております総ウイルスクリアランス指数につき、別紙3に示します。

以上