

ヒト免疫グロブリン製剤における抗サイトメガロウイルス抗体の力価測定とその評価

芝口浩智,^{*,a,b} 山本知佳,^{a,c} 黒木政秀,^b 二神幸次郎^{a,c}

Measurement and Assessment of Cytomegalovirus of Immunoglobulin (Ig) G Titer in Preparations

Hirotomo SHIBAGUCHI,^{*,a,b} Tomoka YAMAMOTO,^{a,c}Masahide KUROKI,^b and Koujiro FUTAGAMI^{a,c}

^aDepartment of Hospital Pharmacy, Fukuoka University Hospital, ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan, and ^cDepartment of Pharmaceutical and Health Care Management, Faculty of Pharmaceutical Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received January 13, 2010; Accepted March 5, 2010)

Cytomegalovirus (CMV) remains the most important pathogen following solid organ transplantation and is the major cause of recipient morbidity and mortality during the first 6 months posttransplantation. To prevent CMV infection and/or to prevent symptomatic CMV disease, immunoglobulin (Ig) G including hyperimmune CMV IgG are used alone or in combination with antiviral medications. The CMV IgG titer, however, has a wide range and frequently depends on the company supplying the Ig preparation even if the preparations come from the plasma pool of a national blood donation agency. In the present study, we therefore simultaneously measured and evaluated the CMV IgG titers in various Ig preparations using two common methods: the neutralizing antibody (NT) and enzyme immunoassay (EIA). The CMV IgG titer in the present study indicated different values using both methods among Ig preparations that were made from the plasma pool of a national blood donation agency (about 3.5- or about 1.7-fold difference using the NT or EIA methods, respectively). Furthermore, there were no correlations in the CMV IgG titer between our findings and published data from the manufacturers, or between the two methods tested here. These findings suggest the importance and necessity of a standard method and/or sample for the measurement and assessment of CMV IgG in Ig preparations.

Key words—simultaneous measurement; immunoglobulin G; anti-cytomegalovirus; neutralizing antibody method; enzyme immunoassay method

緒 言

血液製剤の国内自給と安定供給の推進に関する「安全な血液製剤の安定供給の確保に関する法律（血液新法；2002年）」の施行に伴い、血漿分画製剤を含むすべての血液製剤の国内献血による国内自給と安定供給が求められている。しかしながら、抗 RhoD 免疫グロブリン製剤、抗 HBs 免疫グロブリン製剤など特定の抗原に対する高力価の抗体を含有する、いわゆる特殊免疫グロブリン製剤については日本国内での原料血漿の確保が困難であることから、供血者への免疫などによって得られた売血（非献血）血漿を、主に米国から輸入し製造されてい

る。一方、これら特殊免疫グロブリン製剤以外の血漿分画製剤、中でも使用量の多いヒト血清アルブミン製剤や静注用ヒト免疫グロブリン（IVIG）製剤などについては、いまだに輸入血漿由来の製剤が数多く使用されているものの、血液新法の関連施策の実施に伴い、徐々にではあるが国内献血血漿プールを原料とした IVIG 製剤の使用が増えている。¹⁾

サイトメガロウイルス（CMV）は、他のヘルペスウイルスと同様に、健常人においてはほとんど問題とならない不顕性の感染であるが、胎児や乳幼児、エイズ患者、臓器移植患者、悪性腫瘍患者などの易感染性宿主では重篤な感染症を引き起こす。特に、臓器移植患者においては移植後の感染症発症とそのための死亡が最もよく問題となる病原体であり、移植後 6 ヶ月間の発病率は 30—50% と高率である。^{2,3)} また、CMV の罹患により免疫系の非特異

^a福岡大学病院薬剤部, ^b福岡大学医学部生化学, ^c同薬学部実務薬剤学

e-mail: shiba-h@fukuoka-u.ac.jp

的な反応が起こり、臓器移植では、臓器障害や拒絶反応のリスクが上昇することが報告されている。⁴⁻⁶⁾

日本造血細胞移植学会による造血細胞移植ガイドラインによれば、CMV 感染症に対する発症予防を目的に抗 CMV 抗体 (CMV IgG) や ganciclovir の投与を、また治療目的には ganciclovir の投与を、特に CMV 肺炎の場合には CMV IgG と抗ウイルス薬との併用をそれぞれ推奨している。⁷⁾ ところで、国内で製薬各社より供給されている IVIG 製剤の CMV IgG 力価の公表値には 10 倍以上の大きな違いがあり、実際の使用に当たっては、より強い効果を期待して力価の高い製剤が選ばれる傾向にある。これら IVIG 製剤は、その原料が同じ国内献血血漿プールであり、かつ、日本人成人の 8 割以上が CMV IgG 陽性であることを考えると CMV IgG 力価に公表値ほどの差があるとは考え難い。⁷⁾ CMV 感染予防に対して高力価製剤が好んで使用されている現状で、力価の定量性について評価することは、治療薬の選択や費用対効果への影響を考慮すると重要と考えられる。そこで、国内で製薬各社から供給されている IVIG 製剤中の CMV IgG 力価を同時に測定し、測定方法と CMV IgG 力価の比較と評価を行った。

方 法

日本国内で供給されている国内献血血漿プールを

原料とする 4 社と海外で製造された 2 社の IVIG 製剤のうち、公表された値を元に抗 CMV 抗体 (CMV IgG) 高力価ロット (試料番号 1, 3, 5, 7, 9) とそれ以外のロット (試料番号 2, 4, 6, 8, 10, 11) をそれぞれ 2 種類ずつ (海外の 1 社は 1 種類)、計 11 種類の IVIG 製剤を準備した (Table 1)。

1. IVIG 製剤の調製と pH 測定 IVIG 製剤は、添付文書に従い溶解調製したものを測定用試料とし、それぞれの pH を Waterproof Twin pH (AS-211, アズワン㈱, 大阪) にて測定した。

2. CMV IgG 力価の測定 IVIG 製剤は、中和抗体法 (NT 法) と酵素抗体法 (EIA 法) により製剤中の CMV IgG 力価を測定した。このとき IVIG 製剤中の CMV IgG 力価の測定は、調製した試料を検査機関 SRL (エスアールエル㈱, 東京) に委託し、二重盲検法により行った。NT 法による CMV IgG 力価は、常法に従い plaque assay にて求めた。すなわち、試料の 4 倍希釈系列 (4-4096 倍) を 2 系列作製し、この 4 倍希釈系列 150 μ l に、あらかじめ調製しておいた未処置の条件下で 50-150 個の plaque を形成する CMV ウイルス溶液 150 μ l を加え、総量 300 μ l の検体・ウイルス混合液を作製した。試料とウイルスの混合液を 1 時間室温で静置した後、ヒト繊維芽細胞を単層培養した 24 ウェルプレートに各ウェルに試料とウイルスの混合液 50 μ l を加え、15 分おきに攪拌しながらインキュベータ

Table 1. Source of Plasma Pool, Treatment and Characteristics of IVIG Employed

Company	Sample No.	Treatment	Characteristic	Source of plasma pool	Titer (publication)		pH	
					NT method	EIA method	Publication	Measurement
A	1	pH 4 treat.	Liquid, acidic	National donation	170	41.9	3.2-4.2	4.0
	91				45.1	3.9		
B	3	Polyethylene glycol (PEG) treat.	Liquid, acidic	National donation	158	112.0	3.9-4.4	4.4
	4				145	101.0		4.4
C	5	PEG treat.	Dry powder	National donation	32	113.6	6.4-7.2	6.9
	6				16	88.0		7.0
D	7	Sulfo treat.	Dry powder	National donation	64	90.7	6.4-7.2	7.0
	8				64	89.4		7.1
E	9	Ion exchange treat.	Dry powder	Foreign nondonation	270	99.0	6.4-7.2	6.8
	10				250	78.0		6.8
F	11	pH 4 treat.	Dry powder	Foreign donation	18	N.D.	6.2-7.0	6.8

N.D., no data.

中で1時間37°Cにて感染させた。プレートをPBSにて洗浄後、1.0 mlの2.25%メチルセルロース培養液を加え7日間培養した。7日培養したプレートをPBSで洗浄後10%ホルマリン溶液にて固定した。固定した細胞を0.015%メチレンブルー液にて室温で2時間染色、蒸留水で洗浄・乾燥後、細胞数を計測、各希釈系列におけるplaqueの50%減少率を算出しIg製剤のCMV IgG力価を求めた。一方、CMV IgGのEIA価は、ウイルス抗体EIA「生研」サイトメガロIgG（デンカ生研㈱、東京）を用い製品添付指示書に従って求めた。すなわち、CMVウイルス抗原固層プレートに試料を100 μ lずつ3ウェルに加え、室温で1時間静置し反応させた。各ウェルの反応液を除去後、2度洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識マウス抗ヒトIgG抗体溶液100 μ lを加えた。室温で1時間抗体と反応させた後、各ウェルを4回洗浄しDAB基質液100 μ lを加え、遮光条件下室温で30分反応させた。反応停止液100 μ lにて反応を止め、ブランクを対照にプレートリーダーにて吸光度（波長450 nm/630 nm）を測定し、検量線からEIA価を求めた。

今回、同時に行ったIVIG製剤試料の測定のうちEIA法で得られた製剤間のCMV IgG力価の違いは、GraphPad Prism™（PraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA）を用いて、一元配置分散分析の後にBonferroniの多重比較検定により、危険率5%として統計的に解析した。また、NT法とEIA法で得られたCMV IgG力価と各製造・販売製薬会社が公表しているCMV IgG力価は、Spearmanの順位相関係数によりそれぞれの相関を統計的に解析

した。

結 果

1. IVIG製剤測定用試料のpH 各製薬会社の添付文書に従って調製したIVIG製剤は、いずれも添付文書に記載のあるpH範囲内であった（Table 1）。

2. CMV IgG力価の比較

2-1. NT法によるCMV IgG力価の比較 IVIG製剤の4倍希釈系列から求めたCMV IgG力価は、同時に測定した2系列でほとんど同じ値が得られた。国内献血血漿プール由来製剤間で約3.5倍であり、また、海外の血漿プール由来の製剤間では約3.6倍だった。今回測定した海外の血漿プールを含めた全IVIG製剤間では約4.2倍（公表値では16.9倍）の力価の違いが認められた [Fig. 1(A)]。同時に測定した2系列から求めたCMV IgG力価の平均値は、製造・販売元の製薬会社が公表しているCMV IgG力価とは一部で逆転現象もみられ、また最少で1.1倍、最大で11倍の違いがあり、その相関係数は $p=0.061$ となり、両者の間に相関は認められなかった [Fig. 1(B)]。

2-2. EIA法によるCMV IgG力価の比較 IVIG製剤より同時に求めたEIA価の測定では、良好な再現性が得られたが、製剤間の差は国内献血血漿プール由来で約1.7倍、海外の血漿プールを含めた全IVIG製剤間では約2.2倍（公表値では2.7倍）の違いが認められ、その多くは統計的に有意な差であった [Fig. 2(A)]。EIA価の製薬会社による公表値と今回測定した値の違いはデータのない海外の1

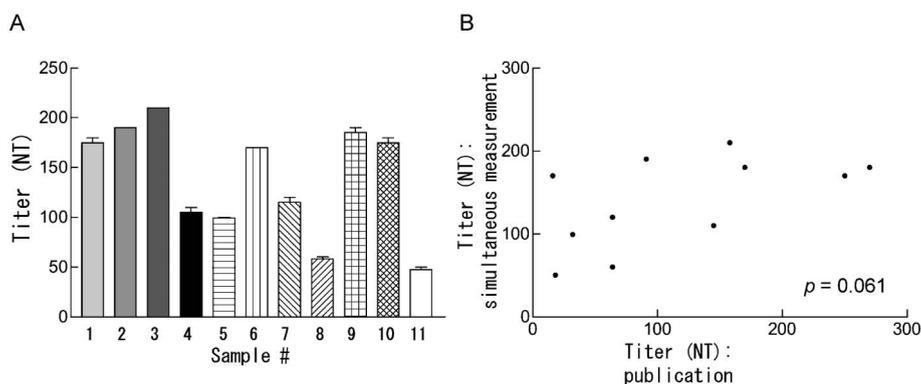


Fig. 1. (A) Measurement of CMV IgG Titer in IVIG Determined by NT Method and (B) Correlation between Findings Obtained by Simultaneous Measurements and Published Data of CMV IgG Titers Determined by NT Method

Data represent mean \pm S.D. ($n=2$).

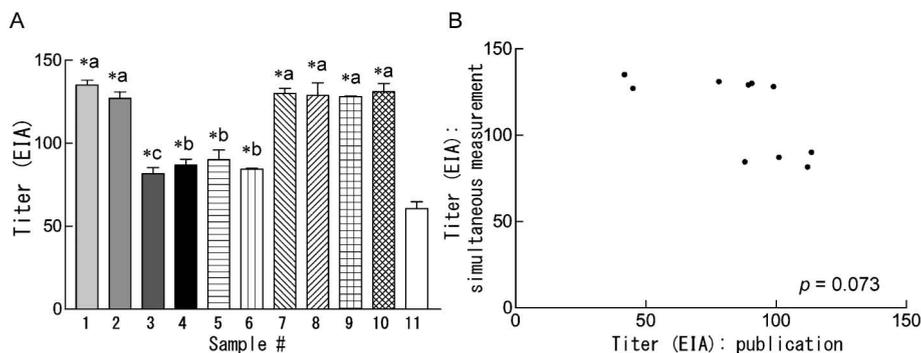


Fig. 2. (A) Measurement of CMV IgG Titers in IVIG Determined by EIA Method and (B) Correlation between Findings Obtained by Simultaneous Measurements and Published Data of CMV IgG Titers Determined by EIA Method

Data represent mean \pm S.D. ($n=3$). Asterisks indicate statistical difference: *a, compared with others ($p<0.001$); *b, compared with *a and sample # 11 ($p<0.05$); *c, compared with *a ($p<0.05$).

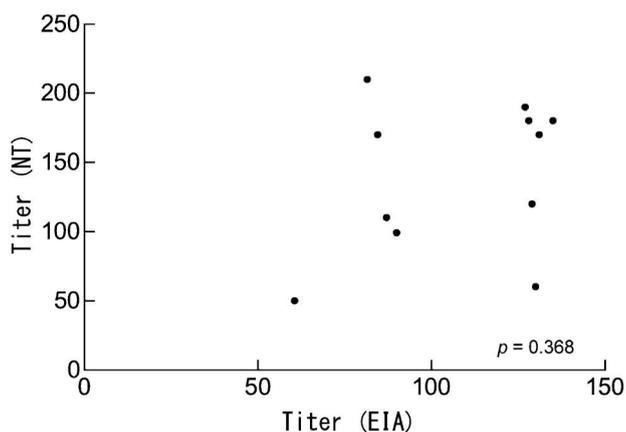


Fig. 3. Correlation of CMV IgG Titers between NT Method and EIA Method Obtained by Simultaneous Measurements

製剤を除くと、最少 1.0 倍、最大 3.2 倍で、相関係数は $p=0.073$ となり、NT 法と同様に両者の間に相関は認められず、また逆転現象もみられた [Fig. 2(B)].

2-3. 測定方法の違いによる CMV IgG 力価の比較 今回用いた NT 法と EIA 法による CMV IgG 力価の測定では、それぞれ良好な再現性が得られたものの、両測定方法間で相関係数は $p=0.368$ となり、測定方法の間に相関は認められなかった (Fig. 3).

考 察

今回、CMV 易感染性患者に感染予防と感染後の治療や発症抑制のために用いられる IVIG 製剤中の CMV IgG 力価を測定した結果と製薬各社が公表している力価の比較から、公表値を元にした製剤力価

の直接の比較には意味のないことが示された。また、CMV IgG 高力価ロットの有用性の検討に必須である IVIG 製剤の CMV IgG 力価の比較・評価のためには、標準化のための方法や標準試料の必要性が示唆された。

今回行った NT 法による CMV IgG 力価の測定では、その差は約 3.5 倍と公表値の 1/5 程度であり極端な差ではなかったが、国内製造の IVIG 製剤は原料の由来が等しいにもかかわらず、同じような値にならなかった。この理由として、1 つには製造方法による違い、あるいは製剤の性状による違いが考えられる。Table 1 に示すように、製造・販売元の製薬会社各社により IVIG 製剤は、製造過程での処理方法と最終的な製剤の性状が異なり、例えば、今回は検討していないが、ウイルスの抗体による中和過程において pH 4 の試料とウイルス溶液の混合時に、ウイルスが抗体非依存的に傷害を受ける可能性も考えられる。事実、今回測定した試料の液性が強い酸性を示す製剤の抗体価はいずれも高くなる傾向を示した [Table 1 and Fig. 1(A)]. また、IVIG 製剤を調製してから測定まで冷所保存ながら約 2 日を要しているために、この間、CMV IgG が製剤によって異なる影響を受けた可能性も否定できない。

今回行ったもう 1 つの測定方法である EIA 法では、力価の製剤間での差は最大 1.7 倍とやはり公表値よりも小さくなった。この程度の差は、国内献血血漿プールが原料であっても起こり得ると考えられるが、NT 法と同じく製造方法や製剤の性状による影響の可能性もある。例えば、他の報告でもみられたように、⁸⁾ 今回、PEG 処理製剤が低めの EIA 値

を示したのは、製造方法の影響を示唆している [Fig. 2(A)].

一方、製造・販売元の製薬会社各社により公表されている NT 法による IVIG 製剤中の CMV IgG 力価については、測定した力価との間に傾向は認められたものの、相関は認められなかった [Fig. 1 (B)]. これは測定に用いるウイルス株や細胞株の種類などの条件が異なるためと考えられる。さらに、NT 法は、同じ検査機関での測定においても、被感染細胞やウイルスの継代数あるいはロットの違い、すなわち測定日が異なるだけでも、同じ試料で違った力価となる。このことは、NT 法による IVIG 製剤中の CMV IgG 力価の測定とその評価のためには、同時に同じ方法で測定する必要性を示唆する。しかし、すべての製剤を同時測定することは事実上不可能であり、現実的な対処法として、測定に用いる試料や方法の標準化が必要であると考えられる。例えば、国内で血漿原料の供給元である日本赤十字社などが、各機関で行われる測定値の標準化のために一定の条件下で測定した標準品を作製、参考力価とともに提供することなどが考えられるかもしれない。

他方、EIA 法における力価は、固層化された CMV 抗原を認識する抗体量そのものを反映することから、製薬各社が公表している EIA 価と今回測定した EIA 価に傾向のみで相関が認められなかったことは意外な結果だった [Fig. 2(B)]. この理由として、測定に用いられる CMV 抗原の違いなど、やはり NT 法同様に、委託を含め製薬各社で行われる測定条件の違いが影響したためと考えられる。したがって、今回の結果からは NT 法のみならず EIA 法においても、測定に用いる試料や方法について標準化の必要性が示唆された。

ところで、CMV IgG の測定原理から考えると、CMV の感染予防や感染症の発症抑制の目的には、CMV IgG の感染阻害能力をより強く反映すると思われる NT 法の力価を指標に製剤を選択するのがよいと考えられるが、結合力の指標である avidity 指数を考慮すべきとの報告⁸⁾や、結合力によらず抗体がウイルス表面を占有する度合いが重要であるとの報告もある。⁹⁾ また、今回は検討していないが、補体によるウイルスの傷害を考慮すると、EIA 価の方がむしろ補体要求性中和抗体価をよく反映してい

るという実験結果もあり、⁸⁾ CMV IgG 力価の有用性の評価には、今後、判断指標の更なる検討が必要と考えられる。その一方で、より根本的な問題として IVIG 製剤中の CMV IgG 力価の高低が、易感染性患者の CMV 感染予防と感染後の治療や発症抑制に大きく影響するのか、という点についてはいまだ結論が出ていないと言えない。最近のメタ解析の報告をみる限り、¹⁰⁻¹²⁾ CMV 感染予防と感染者の治療や発症抑制には IVIG 製剤単独投与の有無や力価の高低は、治療成績に影響しないという結論の方が確からしいようにみえる。また、国内で検討された骨髄移植後の CMV 肺炎の予防効果を検討した結果もこの結論を支持する。¹³⁾ したがって、現状では CMV IgG 高力価ロットを選択する意義は少ないと考えられるものの、その一方で今回の測定でみられたように、製薬各社の公表値が製剤間の力価の高低をかならずしも反映できていないことを考えると、IVIG 製剤投与と CMV IgG 力価の重要性については今後更なる検討が必要であり、さらに、同一検査機関においてすら日差変動がみられることから、CMV IgG 力価の比較・評価のためには少なくとも標準となる製剤の同時測定が必要と考えられる。

REFERENCES

- 1) Shimizu M., *J. Jpn. Soc. Hosp. Pharm.*, **43**, 962-970 (2007).
- 2) Sia I. G., Patel R., *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 83-121 (2000).
- 3) Fishman J. A., Rubin R. H., *N. Engl. J. Med.*, **338**, 1741-1751 (1998).
- 4) Keenan R. J., Lega M. E., Dummer J. S., Paradis I. L., Dauber J. H., Rabinowich H., Yousem S. A., Hardesty R. L., Griffith B. P., Duquesnoy R. J., *Transplantation*, **51**, 433-438 (1991).
- 5) Rubin R. H., *JAMA*, **261**, 3607-3609 (1989).
- 6) Grattan M. T., Moreno-Cabral C. E., Starnes V. A., Oyer P. E., Stinson E. B., Shumway N. E., *JAMA*, **261**, 3561-3566 (1989).
- 7) The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT): (http://www.jshct.com/guide_pdf/1999cmv.pdf), cited 28 April, 2010.
- 8) Minematsu T., Minamishima Y., *J. New Rem. & Clin.*, **52**, 31-42 (2003).

- 9) Klasse P. J., Sattentau Q. J., *J. Gen. Virol.*, **83**, 2091–2108 (2002).
- 10) Bonaros N., Mayer B., Schachner T., Laufer G., Kocher A., *Clin. Transplant.*, **22**, 89–97 (2008).
- 11) Hodson E. M., Jones C. A., Strippoli G. F., Webster A. C., Craig J. C., *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD005129 (2007).
- 12) Raanani P., Gafter-Gvili A., Paul M., Ben-Bassat I., Leibovici L., Shpilberg O., *J. Clin. Oncol.*, **27**, 770–781 (2009).
- 13) Masuda M., *Igaku to Yakugaku*, **36**, 473–476 (1996).