クリオプレシピテートの加熱脱フィブリノゲン

五十嵐 滋* 沢田 英子* 伴野 丞計* 徳永 栄一**

Heat defibrination of cryoprecipitate, a new method for the production of the factor VIII concentrate with intermediate purity and high potency

Shigeru IGARASHI*, Eiko SAWADA*, Tsugikazu TOMONO* and Eiichi TOKUNAGA**

Key words: factor VIII concentrate, heat defibrination, VIII:C, VIII:R:RCO, VIII:R:Ag

A new fractionation method is proposed to produce an intermediately purified and highly potent factor VIII concentrate. This method is based on the removal of fibrinogen by heat, which is a major coexisting protein in the conventional AHF products. In this process, VIII:C slightly decreased when 90 % of fibrinogen was removed from non heated material. The test-products, prepared from 370 ml of fresh frozen plasma, contained 150~180 units of VIII:C, and the ratios of VIII:C/VIII:R:Ag, VIII:R:RCO/VIII:R:Ag and VIII:C/VIII:R:RCO were 0.7~1.1. The contents of fibrinogen and total protein were about 0.3 mg and 2 mg per one unit of VIII:C, respectively. These results suggest the usefulness of the heat removal of fibrinogen for the production of the factor VIII concentrate with intermediate purity and high potency.

はじめに

中程度に濃縮した第Ⅷ因子乾燥製剤の調製法を検討するため、クリオプレシピテート中に多量に混在するフィブリノゲンを加熱除去して調

製した乾燥抗血友病人グロブリン製剤の性質を調べた。

I. 方 法

新鮮凍結血漿から急速融解法¹⁾により調製し

* 日本赤十字社血漿分画センター開発研究部〔〒150 渋谷区広尾 4-1-31〕, Department of Research and Development, Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center, Tokyo, Japan.

** 日本赤十字社中央血液センター, Japanese Red Cross Central Blood Center, Tokyo, Japan.

Table 1 Contents of VIII:C, VIII:RCo and VIII:Ag in heat defibrinated freeze dried cryoprecipitates

Preparation	Dissolved Volume[m ℓ]	VIII:C [u/ml]	VIII:RCo [u/ml]	VIII:Ag [u/ml]	VIII:C/VIII:R:Ag	VIII:RCo/VIII:Ag	VIII:C/VIII:RCo
Normal Plasma		1	1	1	1	1	1
Heat Defibrinated Freeze Dried Cryoprecipitates							
No. 1	15	10.3	10.4	12.6	0.817	0.825	0.900
No. 2	15	12.3	11.1	13.6	0.904	0.816	1.11
No. 3	15	11.2	13.9	14.1	0.794	0.986	0.806
No. 4	15	10.9	14.8	15.2	0.717	0.974	0.736

Table 2 Contents of fibrinogen and total protein

Preparation	VIII:C [u/ml]	Fibrinogen [mg/ml]	[mg/VIII:C]	Total Protein [mg/ml]	[mg/VIII:C]
Normal Plasma	1	2.95	2.95	55.9	55.9
Heat Defibrinated Freeze Dried Cryoprecipitates					
No. 1	10.3	3.39	0.33	20.8	2.02
No. 2	12.3	4.12	0.33	25.3	2.06
No. 3	11.2	2.76	0.25	17.8	1.59
No. 4	10.9	3.05	0.28	19.0	1.53

たクリオプレシビテートを、安定剤溶液（グリシン-塩化ナトリウム、pH 7.3）に溶解し、54°C の恒温水槽中で5分間加熱した²⁾。遠心分離して上清を分取し凍結乾燥して、低フィブリノゲン乾燥抗血友病人グロブリン製剤を調製した。なお、製造工程における細菌などの混入を防止するため、一連の操作は連結バック内で行なった。

VIII:C は欠乏血漿を用いた一段法で、VIII:Ag およびフィブリノゲンは免疫一元拡散法³⁾で、VIII:RCo はホルマリン固定血小板を用いた Macfarlane らの方法⁴⁾により、総タンパク質は Biuret 法によりそれぞれ測定した。

II. 結 果

およそ 370 ml の新鮮凍結血漿を原料として調製した、低フィブリノゲン乾燥抗血友病人グロブリン製剤の性質を表 1 および表 2 に示す。健康人10人分の血漿を対照として測定した VIII:C は 10~12 単位/ml であり、新鮮血漿からの回収率は約 45 % と高値を示した。一方、同様に測定した VIII:RCo および VIII:Ag も 10~15 単位/ml の濃度で回収され、VIII:C, VIII:

RCo, VIII:Ag 3 者の比は 0.7~1.1 程度でいずれも正常血漿に近い値を示した。さらにクリオプレシビテート（未加熱）と本製剤の交叉免疫電気泳動像に差は認められず、VIII:Ag の示すマルチマー構造⁵⁾も十分に保持されているものと考えられる。

一方、加熱処理により、クリオプレシビテート中に混入したフィブリノゲンは著しく減少し、VIII:C 1 単位当りでは約 0.3 mg であり、市販第VIII因子濃縮製剤に匹敵する値を示した⁶⁾。また、夾雑タンパク質の多くを占めるフィブリノゲンが減少したことにより、総タンパク質含量も VIII:C 1 単位当り 1.5~2 mg と低値を示している。

結 論

クリオプレシビテートに混入するフィブリノゲンを加熱除去することにより、低フィブリノゲン、低タンパク質の第VIII因子乾燥製剤の調製が可能である。本製剤は従来の乾燥抗血友病人グロブリン製剤の製造工程に加熱処理工程を追加しただけの簡便な方法で調製されるため、VIII:C の回収率は約 45 % と高値であり、VIII:C, VIII:

RCo, VIII:Ag の比は正常血漿の値に近いものであった。なお、本製剤は少人数 (10人以下) の血漿から調製されるため、濃縮製剤と比較して、肝炎ウイルスなどの混入確率も低いものと考えられる。

文 献

- 1) Rock, G. and Tittley, P.: Variations in cryoprecipitation production. Transfusion, **17**; 50~53, 1977.
- 2) 五十嵐 滋, 沢田英子, 伴野丞計, 徳栄永一: 乾燥脱フィブリノゲンクリオプレシビテートの新調整法. 血液事業, **7**; 554~555, 1984.
- 3) Mancini, G., et al.: Immuno-chemical quantitation assay of antigen by immuno-diffusion. Immunochemistry, **2**; 235~242, 1965.
- 4) Macfarlane, D.E., et al.: A method for assay von Willebrand factor (ristocetin cofactor). Thromb. Diath. Haemorrh., **34**; 306~308, 1975.
- 5) Hoyer, L.W. and Shainoff, J.R.: Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. Blood, **55**; 1056~1059, 1980.
- 6) 飯塚敦夫, 長尾 大: 血液凝固因子製剤. Immuno-haematology, **3**; 296~303, 1981.

●代謝と酵素の異常を総まとめ！

赤血球酵素の基礎と臨床

編集 東京大学内科教授 三輪史朗 専門医38氏分担執筆
A 5 判 411頁 図147 表97 定価8,800円(〒300円)

酵素欠乏症は、最近では構造遺伝子変異により構造が異なり、そのため機能上欠陥のある異常酵素の産生によることがわかって、酵素異常症と呼ぶ方が適切と考えられるようになった。本書は赤血球の代謝や酵素の正常と異常の研究の現状をまとめて、genetic markerとしての赤血球酵素のすべてを解説した。臨床医のみならず、血液学、生化学、栄養学、人類学、遺伝学に携わる方々の恰好の参考書である。

●内容: 第1章 赤血球酵素研究の進歩と問題点, 第2章 赤血球の解糖調節と解糖に伴う熱発生, 第3章 Pyruvate kinase deficiency, 第4章 Glucosephosphate isomerase deficiency, 第5章 Glucosephosphate isomerase deficiency, 第6章 赤血球ホスホフルクトキナーゼとその異常症, 第7章 先天性phosphoglycerate kinase欠乏症, 第8章 PGK Matsue, 第9章 PGK欠乏症の筋病変, 第10章 先天性2,3-ジホスホグリセロムターゼ異常症, 第11章 赤血球酵素異常と2,3-DPGおよびヘモグロビンの酸素運搬能, 第12章 2,3-DPGとHbとの結合, 第13章 H型乳酸脱水素酵素欠損症, 第14章 新しく発見された6種のG6PD variantについて, 第15章 Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency, 第16章 赤血球のピリミジン特異性5'-ヌクレオチダーゼ, 第17章 Glutathione reductase, 第18章 二次性赤血球酵素欠乏症, 第19章 鉄芽球性貧血における酵素異常, 第20章 赤血球酵素の遺伝的多型, 第21章 先天性メトヘモグロビン血症とチトクロームbs還元酵素, 第22章 Lesch-Nyhan症候群とHypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, 第23章 東洋における無カタラーゼ血液症と低カタラーゼ血液症, 第24章 赤血球膜ATP ase, 第25章 Protein kinase, 総括。