血清 Guanase 活性値による輸血後非A非B型肝炎発症予防

三原 正和¹⁾ 片山 善章¹⁾ 伊藤 敬一¹⁾ 中島 伸之²⁾

1) 国立循環器病センター臨床検査部

2) 同 心臓血管外科

(昭和59年7月20日受付)

STUDY ON THE PREVENTION OF POST-TRANSFUSION NON-A, NON-B TYPE HEPATITIS BY MEANS OF THE SERUM GUANASE ACTIVITY

Masakazu Mihara*, Yoshiaki Katayama*, Keiichi Ito* and Nobuyuki Nakajima**

*Clinical Laboratory, National Cardiovascular Center

**Department of Surgery, National Cardiovascular Center

Total of 102 patients who received blood transfusion for their cardiovascular surgery were the materials of this investigation.

The incidence of post-transfusion hepatitis in correlation to guanase (guanine deaminase) activity was studied.

Diagnosis of post-transfusion hepatitis was made when a patient showed elevation of s-GPT over 100 units in three weeks after surgery. The follow up periods were ranging from three to six months.

13 patients were developed post-transfusion hepatitis which accounted 12.7% of incidence. Patients were divided into two groups according to the level of guanase activity. Significantly high incidence was observed in the groups of patients who received transfusion with guanase activity over 2.6 IU/L (12.7% VS 64.3%, $\chi^2=18.06 > \chi^2_0(1, 0.001)=10.83$)

The guanase activity in transfusion blood may be feasible as a parameter for the prevention of post-transfusion non-A, non-B type hepatitis.

はじめに

輸血後に発症する肝炎の大部分は非A非B型肝炎であり、当循環器病センターにおいても肝炎発症の95%以上を占めている。この肝炎の発症頻度は現在尚高いにもかかわらず、原因ウイルスの分離・同定及び関連抗原・抗体の確立はまだ成功していない。また感染症疾患としての非A非B型肝炎に特異的な診断法も一般化していない。

この肝炎に対する対策は各分野で実施されつつある。吉原¹⁾は非A非B型肝炎のF株と関連があると思われるAN-6520抗原を、白地²⁾は同じく非A非B型肝炎関連抗原であるHC抗原を、大堀³⁾はSO抗原を、また血液センターにおいてはGPTスクリーニングの改善について検討しつつある。

我々は、この肝炎が輸血用血液を介する感染性をもつ要因によって発症するものと考え、核酸代

謝酵素であるGuanaseを非特異的なマーカーに用い、輸血用血液のGuanase活性値と輸血を受けた症例のretrospectiveな解析を試みた²⁾。その結果、輸血液のGuanase活性高値と輸血後非A非B型肝炎発症との間に高い相関関係が得られた。そこで我々はさらにこの血中Guanase活性を用い、輸血用血液のGuanase活性値を測定し異常値を呈する血液は輸血に供さないというpre-testを試み、輸血後非A非B型肝炎の発症を抑えるべく検討した。

対象及び方法

1) 対象

対象は当センター心臓血管外科において開胸手術の際に輸血を受けた症例であり、麻酔薬として肝毒性の強いハローセンは使用されていない。肝炎の診断基準は厚生省血清肝炎研究班(吉利和班長)の判定基準を参考にして、術後3週間以降に

基質 I 液：8-azaguanine 50.6mg を 0.1N-NaOH 1.0ml に溶解したのち、純水を加え 100ml とする。
 基質 II 液：Dotite bicine 1.63g に純水を加え溶解し、100ml とする。
 発色試薬 A：フェノール 5g と ニトロプルシドナトリウム 25mg に純水を加え溶解し、375ml とする。
 発色試薬 B：水酸化ナトリウム 4.2g とリン酸水素ナトリウム 17.7g に次亜塩素酸ナトリウム 5ml を加え、純水で溶解し 500ml とする。

図1 Guanase 活性測定法

s-GPT が 100 単位以上を 1 回以上認めたものを肝炎発症例とし、s-GPT が 99 単位以下で最低 3 カ月間の経過観察ができたものを肝炎非発症例とした。ウイルス肝炎の診断は RIA 法による IgM 型 HA 抗体陰性、同じく RIA 法による HBc 抗体陰性さらに R-PHA 法による HBs 抗原陰性をもって非 A 非 B 型肝炎と診断した。

2) 方法

Guanase 活性値の測定には、8-azaguanine を基質とし酵素作用により遊離するアンモニアを直接比色定量法にて測定する血中 Guanase 測定用 Kit (マルホ社製) を用いた。測定操作は図 1 に示すように、試料として血清あるいは血漿、盲検には H₂O、標準として NH₄Cl (20μg・NH₃-N/ml) 液 0.05ml を各試験管に取り、検体のみ基質である 8-azaguanine 溶液と Dotite bicine (N, N-ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン) buffer の等量

混合液 0.2ml を加え、37°C、30 分間 incubate する。次に発色試薬 A を 1.5ml、検体以外の試験管に基質液 0.2ml を加え、さらに発色試薬 B を 2.0ml 加え、37°C、20 分間 incubate 後室温に放置し、630 nm にて比色定量する。Guanase 活性値の計算は以下の通りである。

Guanase Activity [IU/L]

$$= \frac{[S] - [Sb]}{[St] - [B]} \times 47.6$$

[S]：検体の吸光度

[Sb]：検体盲検の吸光度

[B]：盲検の吸光度

[St]：標準液の吸光度

また肝酵素 (GPT, GOT, LDH) は試薬としてモノテスト (ペーリンガー・マンハイム山之内) を用い、生化学自動分析装置 COBAS BIO にて測定し、HBs 抗体は PHA 法によるセロクリット抗

HBs（科血研）を用いて測定した。

成 績

1) 輸血用血液の Guanase 活性値

我々は血液センターから当センターに血液が届いた時点で Guanase 活性測定用のサンプリングを行ない、当日もしくは翌日に Guanase 活性値を測定した。また生血（院内採血分）は交差試験の依頼があった時に血清分離を行ない測定に供した。

本法を用い輸血液（新鮮血，保存血，赤血球濃厚液，新鮮凍結ヒト血漿，生血）4,019単位について Guanase 活性値を測定したところ，表 1 に示す如く $\bar{X}=1.32$, $SD=0.64$ であった。そこで我々は輸血液の Guanase 活性異常値を $\bar{X}+2SD$ を取り 2.6 IU/L 以上とし，以下の検討を実施した。

2) 輸血後肝炎発症率

一般に輸血後肝炎の発症は10～20%とされるが，心臓外科ことに体外循環を用いる開心術では15～50%と幅はあるものの非常に高率に発症し，当センターにおいても中島ら³⁾の報告によれば20～30%の割合で輸血後非A非B型肝炎が発症している。我々の輸血液に対する Guanase 活性の検討において最初に実施した retrospective な解析の結果も表 2 に示す如く99症例中26例に肝炎が発

症し，その発症率は26.3%と高値を呈した。また今回の Guanase 活性による pre-test においても，Guanase 未チェック群では108例中26例に肝炎が発症し，発症率は24.1%と高値を示したが，Guanase チェック群では102例中13例に肝炎が発症し，発症率は12.7%と Guanase 活性で輸血液をチェックすることにより輸血後肝炎の発症を Guanase 未チェック群の約50%に減少することができた。

3) 肝炎の動態

Guanase 活性値の低い輸血液で起きた肝炎は発症してから臨床経過に変化がある。例えば軽症化するのではないかとことを考え，潜伏期間，肝炎発症時における s-GPT のピーク値，治癒までの期間という3点について解析を試みた。

まず潜伏期間についてであるが，Guanase チェック群（以下対象群と略）においては1～2カ月が最も多く13例中6例で46.2%であり，次に2～3カ月の30.8%である。Guanase 未チェック群（以下コントロール群と略）においては1～2カ月が26例中11例で42.3%，次が2～3カ月の23.1%と潜伏期間については対象群とコントロール群との間に有意差は認められなかった。

次に肝炎発症時における s-GPT のピーク値について検討を試みた。対象群においては GPT ピーク値が200 IU/L 以下の症例が13例中4例あり30.8%，コントロール群では26例中5例で19.2%であった。また GPT のピーク値を200 IU/L 以下，201～500 IU/L，501～1,000 IU/L，1,001 IU/L 以上というように区切り，その発症例数について検討したが，発症時における s-GPT のピーク値に有意差は認められなかった。

更に治癒までの期間についても検討を試みた。1カ月以内に治癒した症例は対象群では13例中4例で30.8%であり，コントロール群では26例中3例で11.5%であった。また2カ月以内に治癒した症例は対象群で13例中5例で38.5%，コントロール群で26例中9例の34.6%であった。このように治癒までの期間についても同様の傾向を示し，対象群とコントロール群との間に有意差は得られなかった。

表 1 輸血用血液の Guanase 活性値

輸血用血液の種類	Guanase 活性値		
	N	$\bar{X}$	SD
新鮮血	991	1.24	0.65
保存血	301	1.35	0.64
赤血球濃厚液	1,002	1.42	0.61
新鮮凍結ヒト血漿	801	1.29	0.63
生血	924	1.41	0.62
計	4,019	1.34	0.63

表 2 輸血後肝炎発症率

	発症例数	非発症例数	発症率(%)
対 象 群 S.57.4.1～7.16	13	89	12.7
コントロール群 S.57.1.4～3.31	26	82	24.1
昨 年 同 期 S.56.4.1～6.30	26	73	26.3

表3 平均輸血量

1) コントロール群

	例数	使用総数	平均使用数	SD
肝炎発症	26	577単位	22.2単位	24.7
肝炎非発症	82	1,088単位	13.3単位	9.2

$$t_0 = 1.7982^{\Delta}$$

2) 対象群

	例数	使用総数	平均使用数	SD
肝炎発症	13	164単位	12.6単位	4.7
肝炎非発症	89	943単位	10.8単位	7.4

$$t_0 = 0.8515^{NS}$$

以上の結果より Guanase 活性値の低い輸血液で発症した肝炎でも一度肝炎が発症すると、我々の検討した限りにおいてはあまり肝炎の経過そのものには影響がないと思われる。

4) 輸血量と肝炎発症

一般的に輸血量と肝炎発症との関係は相関関係にあり、輸血量が多くなれば原因ウイルスを含む血液の混入率が高くなる為であると思われる。このことは我々の検討成績においても同様の結果が得られた。表3に示す如く、コントロール群における輸血液の平均使用数は肝炎発症例で22.2単位と肝炎非発症例の13.3単位に比して多いが、対象群においては前者が12.6単位、後者が10.6単位と輸血量と肝炎発症との間に有意差は認められなかった。この結果より Guanase 活性が何らかのマーカーとなり、100%ではないが原因ウイルスを含むと思われる血液を反映し、輸血液を Guanase 活性値でチェックすることにより輸血液中のそのような汚染血を除外でき、Guanase 活性適合血であれば多くの血液を輸血しても肝炎の発症率が上昇するとは限らないと言える。

5) Guanase 活性値と輸血後肝炎

輸血に供された血液の各 Guanase 活性値を症例ごとに整理し、使用された血液の Guanase 活性最高値における肝炎発症及び非発症例数について検討を加え、結果を表4に示した。今回の我々の検討では輸血液の Guanase 活性異常値を $\bar{X} + 2SD$ を取り2.6 IU/L 以上と設定したが、仮に2.3 IU/L 以上を異常値とすると Guanase 活性適合血輸血例において肝炎発症が7例、非発症73例で

表4 輸血液中の Guanase 活性最高値と肝炎発症

輸血された血液の Gu 最高値	非発症例数	発症例数
0~1.0(IU/L)	1	0
1.1~1.3	6	1
1.4~1.6	10	0
1.7~1.9	21	2
2.0~2.2	35	4
2.3~2.5	16	6
2.6~2.8	5	3
2.9~3.1	0	1
3.2~3.4	0	1
3.5~3.7	0	2
3.8~4.0	0	0
4.1~4.3	0	1
4.4~4.6	0	0
4.7~4.9	0	1
計	94	22

*肝炎発症率 19.0%

表5 Guanase 活性異常値と肝炎発症

	Guanase 2.5 IU/L 以下	Guanase 2.6 IU/L 以上	計
肝炎発症例数	13	9	22
肝炎非発症例数	89	5	94
	102	14	116
肝炎発症率	12.7%	64.3%	

$$\chi^2 = 18.06 > \chi^2_0(1, 0.001) = 10.83^{***}$$

肝炎発症率は8.75%である。この場合肝炎発症率は確かに低値を示すが、2.3 IU/L 以上の血液を輸血した症例中21例が肝炎を発症していないし、また血液の破棄量も多くなり現実的に2.3 IU/L 以上を異常値とするのは無理と思われる。次に2.6 IU/L 以上を異常値とすると、Guanase 異常血輸血例において14例中9例に肝炎が発症しその発症率は64.3%であった。更に2.9 IU/L 以上を異常値とすると、6例中6例に肝炎が発症し、発症率は100%となった。

また全体では緊急手術や緊急輸血などの理由で破棄したはずの血液が使用され、肝炎の発症は116例中22例で発症率は19.0%であった。しかしながら、本来2.6 IU/L 以上の血液は破棄され使用されていないはずであるから、2.5 IU/L 以下の血液のみを使用した症例について検討してみると、表5

表 6 Guanase と肝酵素との相関

	Guanase	GPT	GOT	LDH
Guanase	1.00			
GPT	0.16	1.00		
GOT	0.24	0.56	1.00	
LDH	0.14	0.09	0.32	1.00

N=1554

に示す如く102例中13例に肝炎が発症し、発症率は12.7%と従来の Guanase 未チェック時の肝炎発症率に比して約半減した。ちなみに Guanase 活性が2.6 IU/L 以上の血液が使用された症例は14例あり、そのうち9例に肝炎が発症し発症率は64.3%と有意差 ($p<0.001$) が得られた。

6) 輸血液における Guanase と他の肝酵素との相関

現在血液センターでは肝機能検査項目として HBs 抗原と GPT 活性を測定し、HBs 抗原陽性及び GPT 36 IU/L 以上の血液は輸血液として供給していない。そこで我々は日赤血つまり GPT が 35 IU/L 以下を呈する血液について Guanase と GOT, GPT, LDH の各項目を測定し相関関係を調べた。結果は表 6 に示す如く、日赤血における Guanase と GOT, GPT, LDH との相関は各々相関係数 $r=0.24$, $r=0.16$, $r=0.14$ と相関関係は認められなかった。また各種血液製剤別に検討を試みたところ同様の成績が得られた。さらに HBs 抗体についても測定を実施し、陽性群と陰性群に分け同様の検討を試みたところ、Guanase と他の肝酵素さらに HBs 抗体との間には何ら相関関係は認められなかった。

考 察

Guanase(グアニンデアミナーゼ, E.C. 3.5.4.3) は Guanine を脱アミノして Xanthine に変換する酵素で、肝、脳、腎組織に多く分布し、肝疾患患者に血中で特異的に増加する⁴⁻⁵⁾と報告されている。

Guanase 活性の測定法は基質の減少量を測定する Knights 法⁶⁾、生成する尿酸を測定する Kalckar 法⁷⁾、生成するアンモニアを測定する Hirschberg 法⁸⁾、アイソトープを用いる Khalidi 法⁹⁾などがあるが、血清中の Guanase 活性が正常人において極めて低く、その検出は日常の臨床検査に応用するには困難を伴った。一方、奥田・藤井ら^{10)~11)}のアンモニア直接比色定量法を応用した血清 Guanase 測定キット(マルホ社製)は再現性に優れている¹²⁾が、乳び血清などにおいて血清盲検値が検体値より大きくなり活性値がマイナスとなる事があった。現在では同キットを用い、この点を改良し RI 法ともよく相関する Guanase 活性測定法(藤井法)が藤井ら¹³⁾により報告されている。また手法では大量検体処理が困難なため、酵素を用いた自動分析法も検討されつつある¹⁴⁾¹⁵⁾。

次に、この Guanase 活性値を用いての輸血後非 A 非 B 型肝炎の発症予防について考えてみる。輸血液を Guanase 活性値でチェックしないコントロール群においては、輸血後非 A 非 B 型肝炎の発症は従来の中島ら³⁾の報告の如く 24.1% と高率を示したが、Guanase 活性で輸血液をチェックすることにより、2.5 IU/L 以下の輸血液を受けた症例では102例中13例に肝炎が発症し、発症率は12.7%

表 7 各種血液製剤における Guanase 活性陽性率

Guanase 活性値	新 鮮 血 (991)	保 存 血 (301)	赤血球濃厚液 (1002)	凍結人血漿 (801)	生 血 (924)	平均陽性率
2.3 IU/L ↑	6.1(%)	11.6(%)	13.5(%)	6.0(%)	10.6(%)	9.4(%)
2.4 "	4.7	8.6	9.9	4.7	8.1	7.1
2.5 "	3.7	6.6	7.5	3.9	6.4	5.5
2.6 "	3.2	5.3	5.7	3.2	5.4	4.5
2.7 "	2.8	4.3	4.8	2.1	4.9	3.8
2.8 "	2.5	4.0	3.6	1.6	4.0	3.1
2.9 "	1.8	2.7	2.8	1.1	3.2	2.3
3.0 "	1.6	2.7	2.5	0.9	2.4	1.9

と約半減した。さらに Guanase 活性が2.9 IU/L 以上の血液を輸血した症例においては全例に肝炎が発症した。これらのことは非A非B型肝炎の原因ウイルスそのものではないが、何らかの形で血清 Guanase 活性がGPT 及び HBs 抗原のスクリーニング・テストでは検出できない汚染血を検出している。換言すれば血清 Guanase は肝機能障害を反映し、原因ウイルスを含む血液で高値を示すと言える。

同様の成績が山崎ら¹⁶⁾によっても報告され、輸血を血清 Guanase 活性でスクリーニングすることによって輸血後非A非B型肝炎の発症は約半分に抑えることができるものと思われる。しかしながら、Guanase 活性値による輸血液のスクリーニング・テストが肝炎発症予防に良いということが解っても、多くの輸血液を破棄することはできない。そこで問題となるのが輸血液の破棄量である。表7に示す如く Guanase 活性2.3 IU/L 以上を異常値とした時の日赤血の平均陽性率は9.0%と高値であるが、2.6 IU/L 以上を異常値とした時の平均陽性率は4.2%、また生血を含む輸血用血液全体でみると平均陽性率は4.5%であった。我々は4~5%の輸血液の破棄は許されるものとし、かつ肝炎発症率とも考え合わせ、2.6 IU/L 以上を異常値とするのは妥当であると考え。

以上、輸血液の Guanase 活性高値と輸血後非A非B型肝炎発症との相関関係は明らかであり、また測定法も自動化が成され輸血用血液のスクリーニング・テストとして有効と思われる。

むすび

輸血用血液を Guanase 活性値でスクリーニングすることにより、輸血後非A非B型肝炎の発症は Guanase 未チェック時に比して約半減した。今後日本赤十字血液センター等におかれても検討を重ねられ、Guanase なる酵素が輸血後非A非B型肝炎の発症予防に有効に使われることを期待する。

文 献

- 1) 第31回日本輸血学会抄録集, (1983年奈良)。
- 2) 三原正和, 他: 輸血用血液のグアナーゼ活性値と術後非-A, 非-B型肝炎の発症に認められる相関性。衛生検査, 32: 737-741, 1983。
- 3) 中島伸之, 他: 心臓・血管外科手術後における輸血後肝炎の発生について。日本外科学会雑誌, 82: 271-276, 1981。
- 4) 伊東 進, 他: Ammonia 直接比色定量法を応用した guanase 測定法の臨床的意義について。肝臓, 16: 10-16, 1975。
- 5) 伊東 進, 他: スクリーニング・テストとしての guanase 測定の臨床的意義。医療, 30: 505-510, 1976。
- 6) Knights, C., et al.: Serum guanase determination: A liver function test. J. Lab. Med., 65: 355-360, 1965。
- 7) Kalckar, H.: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of enzymes of purine metabolism. J. Biol. Chem., 167: 461-475, 1947。
- 8) Hirschberg, E., et al.: Enzymatic determination of 8-azaguanine in normal and neoplastic tissues. Cancer Res., 12: 524-528, 1952。
- 9) Khalidi, A., et al.: A method for the determination of plasma guanase on finger-tip blood. Clin. Chem., Acta, 29: 381-384, 1970。
- 10) 奥田拓道, 藤井節郎: 血中 ammonia 直接比色定量法。最新医学, 21: 622-627, 1966。
- 11) 奥田拓道, 藤井節郎: 種々の血清 deaminase の新定量法とその臨床的意義。臨床化学シンポジウム, 11: 151-155, 1971。
- 12) 江頭静摩, 他: グアナーゼ測定キットの使用経験。衛生検査, 30: 1450-1453, 1981。
- 13) 藤井節郎, 他: 血中グアナーゼ測定法とその正常域。臨床化学, 12: 208-213, 1983。
- 14) 三原正和, 他: Auto Analyzer-IIc システムを用いた血中 Guanase 活性値の自動測定法。日本臨床検査自動化学会会誌, 8: 208-211, 1983。
- 15) 小池恵美子, 他: 自動分析機による Guanase 活性の測定。日本臨床検査自動化学会会誌, 7(補冊): 32, 1982。
- 16) Yamasaki, S., et al.: Study on the clinical importance of guanase assayed by a direct colorimetric method. kurme Med. J., 29: 127-140, 1982。