

SITE ID :

J-HIS 2 新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究

追跡調査報告書（様式 2-2）

【50/75ED 到達時又は 1 年経過時】

報告期間

※研究事務局記入欄

<input type="checkbox"/> 50ED 到達時
<input type="checkbox"/> 75ED 到達時
<input type="checkbox"/> 1 年毎●●●●年●●月●●日～●●●●年▲●月▲●日 報告書提出日：●●●●年▲●月▲●日
<input type="checkbox"/> その他[]

※研究事務局記入欄

Subject ID		
生年月	20 年	月
患者イニシャル	(姓)	(名)

【報告書記入上のお願い】

1. 記入は、ペン又はボールペンを使用して下さい。
2. 記入方法：□には、チェック（ ）を記入して下さい。
記入不可能な項目には、未記入欄との判別のため、該当欄に斜線 (/) を引いて下さい。
3. 訂正がある場合には、二重線 (=) で訂正後、訂正印または署名し、新しい回答を記入して下さい。
4. 訂正箇所には、訂正年月日を記入して下さい

インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究

分担研究者 福武 勝幸（東京医科大学臨床検査医学講座 主任教授）

【研究要旨】

本研究の実施において、最初に重要なことは血液凝固第VIII因子と第IX因子活性測定法の標準化とそれらのインヒビターを測定するベセスダ法の標準化がある。分担研究者として「インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究」を開始する上で、さらにその基本として測定に使用するAPTT試薬の検討を行い、次年度以降の具体的な標準化作業の基準とすることを目標とした。国際的に信頼性の高い測定機器であるMDA IIとAPTT試薬プラテリンLSを基準測定法に用いて、同等以上の性能を示す機器と診断薬の評価を行った。測定機としてACL TOPとMDA II を用い、APTT試薬として①ヒーモスアイエルシンサシルAPTT、②ヒーモスアイエルAPTT-SP、③プラテリンLSを用いた。臨床検体を用いた比較検討とヘパリン添加、第VIII因子欠乏血漿、第IX因子欠乏血漿への感受性を検討した。臨床検体は③に対して①は短縮、②はほぼ同時時間の測定値を示した。ただし、ACL TOPではMDA IIで高度に延長した血友病検体について、通常の凝固速度法ではエラーとなることがあり、その場合は閾値法による再計算で凝固点を判定する必要があった。凝固因子欠乏については①②③はともに似た傾向を示した。

A. 研究目的

本研究の実施において、最初に重要なことは血液凝固第VIII因子と第IX因子活性測定法の標準化とそれらのインヒビターを測定するベセスダ法の標準化がある。分担研究者として「インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究」を開始する上で、さらにその基本として測定に使用するAPTT試薬の検討を行い、次年度以降の作業を高度な自動測定装置のもとで客観的なものとし、具体的な標準化作業の基本とすること

を目標とした。

B. 研究方法

国際的に信頼性の高い測定機器であるMDA IIとAPTT試薬プラテリンLSを基準測定法に用いて、同等以上の性能を示す機器と診断薬の評価を行った。測定機としてACL TOPとMDA II を用い、APTT試薬として①ヒーモスアイエルシンサシルAPTT、②ヒーモスアイエルAPTT-SP、③プラテリンLSを用いた。不特定多数の臨床検体を用い

た比較検討を行い基準機の測定値に対する反応の違いを検証し、ヘパリン添加への感受性や凝固因子の希釈列を用いて第VIII因子欠乏血漿、第IX因子欠乏血漿による希釈諧調を用いて試薬の特性を検証し、凝固因子濃度の変化に対する感受性を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究は基礎的研究であり個人情報が必要としないことから、検査の残余検体について匿名化を行い試験に用いた。

C. 研究結果

臨床検体は③に対して①は短縮、②はほぼ同時間の測定値を示した。ただし、ACL

TOPではMDA IIで高度に延長した血友病検体について、通常の凝固速度法ではエラーとなることがあり、その場合は閾値法による再計算で凝固点を判定する必要があった。治療域でのヘパリン感受性は①より②が鋭敏であり、かつ②は③と同等であった。凝固因子欠乏については①②③はともに似た傾向を示した。

D. 考察

市販されているAPTT試薬はリン脂質の構成の違いなどにより、ヘパリン、抗リン脂質抗体、凝固因子欠乏に対する感受性が著しく異なっており、使用目的を誤ると目的とする結果を見逃す危険がある。①ヒーモスアイエルシンサシルAPTT、②ヒーモスアイエルAPTT-SP、③プラテリンLSの3種はどれも凝固因子の低下に対して良好な感受性を示したが、ヘパリンに対しては①は鈍い傾向にあった。今後、抗リン脂質抗体の影響も吟味する必要があり、本研究の目的の基本となる試薬の選択を慎重に進めなければならない。

E. 結論

今回検討した3種類のAPTT試薬は、凝固因子の欠乏に対して感受性が高いと推定したものを選択したため、良好な成績を示したが、抗リン脂質抗体など患者検体に混入する可能性のある阻害物質の影響もさらに吟味して試薬の選択を進める必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし (※第9回日本検査血液学会にて報告の予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

インヒビターの発生要因の分析と発生機序の解明に関する研究

分担研究者 嶋 緑倫（公立大学法人奈良県立医科大学小児科 准教授）

【研究要旨】

インヒビターの発生要因に関する分子生物学的分析を目的に、血友病Aの遺伝子解析システムを確立した。本システムはキャピラリー型オートシーケンサーを用いて第VIII因子遺伝子全領域を効率的に直接シーケンスする方法で、従来のPCR/CSGE法では検出しなかった遺伝子異常の同定が可能であった。本システムは迅速かつ正確で多数の症例の遺伝子解析が可能であり、全国調査ための重要な方法となりうることが期待される。

インヒビターの阻害機序について新たにトロンビン生成能を用いた評価法を開発した。本法は血友病インヒビターの凝血学的評価・診断法のみならず補充療法の止血モニタリングにも応用できることが示唆された。インヒビターの抑制機序については第VIII因子重鎖A2認識インヒビターがトロンビン活性化作用を阻害すること、また、A2インヒビター結合領域近傍にトロンビンが結合することを初めて明らかにした。さらに、軽鎖C2ドメイン認識インヒビターは第VIII因子とフォンヴィレブランド因子（VWF）およびリン脂質（PL）の結合を阻害するが、インヒビター結合部位がVWFおよびPL近傍に結合すること、また、これら3者の結合領域それぞれ異なることが判明した。

インヒビターの免疫学的評価法としてあらたにガラスビーズを用いた酵素抗体法を開発した。本方法はインヒビターの免疫学的評価法として有用であった。

1. インヒビターの分子生物学的解析：血友病遺伝子解析センター構築

A. 研究目的

血友病に発生するインヒビターは第VIII因子製剤あるいは第IX因子製剤中の第VIII因子あるいは第IX因子を標的として発生する抗第VIII因子あるいは抗第IX因子同種抗体である。インヒビターは原則的には第VIII因子あるいは第IX因子の検出されない重症型に発生するものと考えられているが、同じ重症型でも発生しない例もあり、また、

凝固因子が存在する中等症でも発生することが知られており、インヒビターの分子生物学的な発生要因についてはいまだに不明な点が多い。第VIII因子遺伝子はX染色体長腕（Xq28）に存在し、26個のエクソンと介在する25個のイントロンからなる全長186kbに及ぶ。開始コドン（ATG）の170bp上流に転写開始点は存在し、さらに30bp上流に転写因子の結合部位であるGATAAA配列がある。5'非翻訳領域にはHNF-1、C/EBPなどの cis-element が存在し、第

VIII因子遺伝子の転写に重要な働きをしている。3'非翻訳領域には終止コドン (TGA) から約1780bp下流にmRNAのプロセッシングに重要なポリAシグナルが存在する。mRNAの大きさは約9kbであり、7,053bpがアミノ酸をコードしており、2,351個のアミノ酸からなる第VIII因子前駆体を合成する。1984年に第VIII因子遺伝子がクローニングされて以来、欠失、挿入、点変異、逆位などの遺伝子異常が報告されている。なかでもイントロン22に存在する遺伝子内遺伝子 int22h と、そこから約400kbテロメア側に存在する2つの int22h のうちのいずれかが減数分裂の際に組換えをおこしておこる構造変異である逆位は重症血友病A患者の約40%を占め、血友病Aに特徴的な遺伝子異常である。しかし、その他の小欠失、小挿入、ミスセンス変異、ナンセンス変異は第VIII因子遺伝子の広範囲に確認されており、いわゆるhot spotは存在せず、遺伝子の巨大さゆえに変異の同定は困難かつ時間を要する作業であった。従来、プロモーター領域およびエクソン領域を30-40組の合成プライマーを用いてPCR法にて増幅したフラグメントをCSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis), SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) などの電気泳動を用いて正常フラグメントとの移動度の差異から遺伝子異常をスクリーニングしてきた。しかし、これらの方法は、一般にマニュアル法によるゲルの調整に熟練を要すること、電気泳動の条件も関係して施設間によって検出率にばらつきがあること、最も熟練した施設でもその検出率は80%程度にとどまるなどの問題点があった。われわれは逆位を持たない患者に対して、キャピラリー式のDNAオートシーケンサーを用いてプロモーター領域およびエクソン・イントロン境界領域を含む全エクソンの塩基配列を解

析することにより、患者の遺伝子異常の同定を試みた。

B. 研究方法および結果

あらかじめ文書にてインフォームドコンセントを得た8人の患者からDNAを抽出し、イントロン22およびイントロン1の逆位をスクリーニングした。逆位が陰性であった患者について、ゲノムDNAを鋳型に33組のプライマー、Taqポリメラーゼ (Takara Taq®) を用いてプロモーター領域、エクソン・イントロン境界領域を含む第VIII因子全アミノ酸コード領域をPCR法 (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® mini TP100) により増幅した。目的のPCR産物が得られたかどうかをアガロースゲル電気泳動で確認した後、QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen) を用いて精製した。次にダイターミネーター法により、試料中のDNA塩基配列の複製を塩基特異的に中断した断片を標識し、DNAシーケンサーで塩基配列を決定した。具体的にはBigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kitを用いてDNA断片を蛍光標識し、Centri-Spin Column® (Princeton Separations) で未反応のダイターミネータを除去した後、DNAオートシーケンサーABI310® (Applied Biosystems) にかけて、塩基配列を解析した。CSGE法では6人の患者にのみ変異を検出し、内訳は3つのミスセンス変異 (G236D, E1038K, R1781H)、1つのナンセンス変異 (S210Stop)、2つの小欠失 (c.1895delT, c.5813delA) を検出した。一方、全第VIII因子シーケンシング解析では、CSGE解析で変異を同定できなかった2人の患者からもミスセンス変異 (D1241E, G2325R) を検出した。また全第VIII因子シーケンシングではミスセンス変異E1038Kを持つ患者にさらにナンセンス変異R336Stopを検出し、こちらが血友病Aの表現型に影響したものと考えられた。

1人の患者の遺伝子解析に要した日数は5-7日であった。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては十分な説明を行い、また、文書にて同意書を取って実施した。試料提供者のプライバシーを完全に保護するため、試料や診察記録等は連結可能な方法で匿名化した。さらに、個人情報の管理は厳密に行い、遺伝子情報や診療情報が絶対に外部に漏れないように十分注意した。

C. 考察

全第VIII因子シークエンシング法により、異常の同定を試みた8人の患者すべてから遺伝子異常を検出した。CSGE解析では検出率は67%であったことと比較すると、全第VIII因子シークエンシングは血友病Aの遺伝子解析において非常に有用であることが明らかになった。DNAオートシークエンサーの利用により、簡便・迅速にシークエンシングを完了し、遺伝子変異を同定することができた。我々の用いた1チャンネルキャピラリータイプのオートシークエンサー (ABI310) では全塩基配列の解析に約48時間を要するが、PCRおよびPCR産物の精製を含めても、1人の患者に対して7日以内に第VIII因子プロモーター領域およびエクソン・イントロン境界領域を含む全エクソンの塩基配列の解析を完了することができた。本法により血友病A患者の迅速かつ正確な遺伝子解析が可能となった。本解析システムは従来の方法に比し迅速、かつ、解析精度が高く、我が国におけるインヒビター発生要因の分子生物学的解析に関する全国的な調査に適した方法である。今後、本解析システムを基盤に血友病Aおよび血友病Bの遺伝子解析に関する解析センターを奈良県立医科大学、名古屋大学および東京医科大学に設置すること、全国調査の基盤と

なる血友病診療施設との連携網を構築し、遺伝子解析の実施および解析情報伝達のシステムを構築することを実施する。

2. インヒビターの凝血学的生化学特性に関する研究

A. 研究目的

インヒビターが発生すると通常第VIII因子製剤や第IX因子製剤の有効性は激減～消失する。インヒビターは製剤中の第VIII因子や第IX因子に結合することにより構造・機能に重大な影響を与えることが知られているが、第VIII因子や第IX因子機能の阻害作用の実態についてはいまだに十分に明らかにされていない。インヒビターの凝血学的・生化学的抑制作用を明らかにすることはインヒビター陽性例の止血療法の開発において極めて重要な情報となる。したがって、本研究の第2の目的としてインヒビターの第VIII因子阻害作用について凝血学的および生化学的手法により解析を実施する。さらに、合成ペプチドや遺伝子組み換え型蛋白/ペプチドを用いてアミノ酸レベルの解析を行う。

B. 研究方法

1) インヒビターの抑制能に関する評価法の確立

インヒビターの凝血学的評価法として新たにトロンビン生成能、活性化第X因子生成能の阻害作用を検討する。トロンビン生成能はエラジン酸、CaCl₂および遺伝子組み換え型組織因子 (TF) をトリガーとして、合成リン脂質 (PE:PC:PS=3:6:1) 存在下に蛍光発色基質を用いて測定する。トロンビン生成の生成過程をコンピューターソフトウエアによりリアルタイムに処理してトロンビン生成パターンをトロンボグラムなる波形で描出する。さらにトロンビン生成能を定量的に解析するために、トロンビン生成が開始するまでのLag time, トロンビ

ンのピーク値 (Peak thrombin) , トロンビンピークまでの時間 (Time to peak) , 内因性総トロンビン (Endogenous thrombin potential;ETP) などのパラメーターを算定する。トロンビン生成能の至適条件について検討するとともに、インヒビターのトロンビン生成に対する阻害作用について正常血漿にインヒビター陽性患者血漿から単離したIgGを添加した検体を用いて測定を行う。

(倫理面への配慮)

インヒビター血漿については血友病患者の定期的インヒビター検査の際、Bethesda測定と平行して実施する。トロンビン生成の測定については患者に十分説明して実施する。

2) 血友病Aインヒビターの抑制機序に関する研究

血友病Aインヒビターは第VIII因子阻害作用の本態についてはいまだに不明な点が多い。本研究ではインヒビターの主要結合領域である第VIII因子重鎖A2ドメインと軽鎖C2ドメインに着目してA2およびC2ドメイン認識インヒビターの作用機序について解析を行った。血友病Aインヒビター血漿からIgGを純化しイムノプロット法によりA2およびC2ドメイン認識インヒビターを検出した。遺伝子組み換え型野生型および変異A2ドメインおよびC2ドメインは既報のBac-to-Bac baculovirus 発現システムにより作成した。A2の変異部位はA2ドメイン分子表面上の陽性電荷残基、Arg484, Tyr487, Ser488, Arg489, Arg490, Leu491, Lys493, Lys496, His497, Lys510を標的としてそれぞれアラニンに置換した。A2発現カセットをMHGXベクターに組み込みpFastBac1ベクターにサブクローン化した。野生型および変異A2蛋白はSf9細胞で発現させ抗A2モノクローナル抗体吸着カラムで免疫純化し

た。C2ドメインの解析については12-17のアミノ酸残基からなる合成ペプチドを作成した。トロンビン、フォンヴィレブランド因子 (VWF) 、リン脂質 (PL) の結合と第VIII因子、A2,C2ドメインとの結合については Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) およびリアルタイムバイオモレキュラー反応解析にて実施した。結合能の定量的キネチックスはBIAcore Xを用いたsurface resonance plasmon (SPR) 法によった。

C. 研究結果

1) 血友病Aインヒビター阻害作用の凝血学的評価

TFは遺伝子組み換え型のリン脂質化TFを使用した。TFトリガー系では、リン脂質の濃度は4 μ Mがもっとも測定感度が高かった。また、リン脂質濃度を一定にTFの至適濃度について検討したところ、TFの濃度依存性にトロンビンピーク値は上昇、Time to peakは短縮するが、血友病患者血漿の両パラメーターも同様に変動するために、TF高濃度では微量の血友病Aのような第VIII因子存在下の凝固機能を評価することは困難であった。したがって、TF濃度を1 pM以下の微量濃度で同様に検討したところ、高濃度TF添加時に比し、トロンビンピーク値は低下するものの、第VIII因子とトロンビン生成パラメーター間で良好な濃度依存性パターンを示した。本実験結果より、TFは0.5pMに決定した。エラジン酸トリガー系では、エラジン酸濃度は0.3 μ Mがもっとも測定精度が高かった。以上のTFおよびエラジン酸の実験条件で、エラジン酸トリガー系、TFトリガー系およびエラジン酸・TF混合トリガー系について第VIII因子低濃度 (0-1.0%) と高濃度 (0-250%) に分けてトロンビン生成を測定しパラメーターで評価した。エラジン酸添加系ではLag timeは<1%の微量第VIII因子と濃度依存性に相

関したが、TF系およびエラジン酸・TF混合系では差がなかった。ETPはエラジン酸系では<1%の第VIII因子を濃度依存性に反映したが、TF系や混合系では微量域の評価は困難であった。一方、トロンビンピークおよびTime to peakはエラジン酸系、混合系とも高濃度のみならず微量第VIII因子と相関した。以上より、TFトリガー系ではトロンビン測定精度が低く、血友病の凝固機能評価には不十分であった。一方、エラジン酸添加系では微量の第VIII因子を良好に相関したが、Lag timeが濃度依存性に短縮することから、内因系発動のみの非生理的条件下の評価になる欠点がみられた。エラジン酸・TF混合系はLag timeの変動はなく、内因系トリガーのみならず、出血部位で露出されたTFから開始する生理的な凝固反応を反映していることが判明した。次に、正常血漿にインヒビターIgGを添加してトロンビン生成パラメーターに対する影響について検討した。凝血学的なインヒビター力価はBethesda法で測定した。インヒビターIgGの濃度依存性にトロンビン生成は低下した。パラメーターではトロンビンピーク、ETPが低下し、Time to peakは延長した。同じインヒビター力価であってもパラメーターの変動は異なるインヒビターが存在した。さらに、タイプ2インヒビターではインヒビター力価が低値であってもトロンビン生成能を大きく障害することが判明した。

2) A2ドメインのトロンビン結合とA2インヒビターの抑制能

2例の血友病A患者血漿から分離したA2認識インヒビターは、トロンビンによる第VIII因子活性化および第VIII因子開裂阻害するかの実験を実施した。第VIII因子はトロンビンの添加により重鎖Arg372および軽鎖Arg1689が開裂されて活性型第VIII因子に変換される。インヒビター非添加系では第VIII因子はトロンビンの添加後第VIII

因子活性は添加30秒-1分後に5-10倍急上昇し漸減する。A2認識インヒビター存在下では濃度依存性に抑制した。さらに、SDS-PAGE後のイムノプロット解析によると両抗体はトロンビン添加後の重鎖Arg372の開裂を濃度依存性に抑制した。

3) A2ドメイン内トロンビン結合部位の同定

A2インヒビターのエピトープ領域であるアミノ酸残基484-509に着目し、ペプチドを合成した。本ペプチドはA2ドメインとトロンビンの結合を濃度依存性に抑制した。さらにEDC存在下でビオチン標識合成ペプチドとトロンビンのクロスリンクを非標識ペプチドは抑制した。SPR法によりさらに変異A2とトロンビンとの結合能について比較検討行ったところ、R484A,R489A,R490,H497AおよびK499Aの変異A2のKdが野生型A2と比し高値を示した。

4) C2ドメインにおけるVWF,PL結合部位とC2インヒビター

C2ドメインのN末領域はすでにC2認識インヒビターの結合に重要な領域であることが知られている。C2ドメインはVWFおよびPLの結合部位でもあり、C2インヒビターは第VIII因子とVWFおよび第VIII因子とPLの結合を抑制した。本研究ではさらに第VIII因子のVWFおよびPL結合部位を明らかにするためにC2ドメインN末領域を網羅する合成ペプチドを用いてELISAによる競合実験を行った。ペプチド2303-2317はVWFと第VIII因子結合を濃度依存性に抑制した。したがって、VWFの結合領域はアミノ酸残基2303-2317に存在することが判明した。一方ペプチド2315-2330はPLの結合を濃度依存性に抑制した。さらにペプチド2315-2330のそれぞれのアミノ酸残基をGlyに置換した変異ペプチドによるELISAにより2残基Ile2317, Met2321がPLと第VIII因子結合に必須であることが判明した。

D. 考察

トロンビン生成測定は血液凝固機能をグローバルに評価する上に極めて有用なツールになることが判明した。さらに、本測定法は血友病患者の凝固動態、止血治療のモニタリングおよびやインヒビターの凝血的阻害作用の定量的評価に応用することが可能と考えられた。しかしながら、トロンビン生成測定感度は、使用するリン脂質、組織因子の濃度に左右される。従来報告されてきた組織因子をトリガーとするトロンビン生成測定では測定間のばらつきが大きく、また、測定感度が低いために、本研究では内因系凝固系のトリガーとしてエラジン酸を添加する新たな測定系を確立した。エラジン酸添加トロンビン生成測定では第VIII因子活性が<1%の極めて微量な第VIII因子機能も評価することが可能であった。しかしながら、TF非存在下では、内因系が過度に活性化されて非生理的な測定になる可能性もあり、エラジン酸・TF混合測定系が最も血友病の凝固機能評価に適しているものと考えられた。血友病AインヒビターIgGを添加した測定系ではトロンビン生成能を抑制したが、阻害作用においてインヒビター間に差がみられた。血友病インヒビターの第VIII因子阻害作用は従来、インヒビター血漿と正常血漿を等量混合し37℃2時間反応後の残存第VIII因子活性により算定されるBethesda 単位 (BU) で評価されているが、BUの評価だけでは必ずしも止血治療の現場において第VIII因子製剤の止血効果を判定できないことがしばしば経験されている。特に、第VIII因子や第IX因子活性を比例直線的に阻害しないタイプ2インヒビターの場合、インヒビター力価が低力価であっても補充療法の止血効果はきわめて低い。本研究結果からもインヒビター力価が低値であってもトロンビン生成能が著明に障害されていたことから、さまざまなインヒビターの抗凝固作用をトロンビ

ン生成能で評価してインヒビターの第VIII因子あるいは第IX因子阻害作用の実態について明らかにする必要がある。現在、インヒビター陽性例の止血モニタリングについていまだ適切な方法はない。インヒビター陽性例の止血モニタリングは血友病治療における大きな課題であり本研究成果の臨床応用が期待される。

第VIII因子重鎖A2および軽鎖C2ドメインは血友病Aインヒビターの主要結合領域である。本研究では、これら両ドメイン認識インヒビターの第VIII因子に対する阻害作用を明らかにする目的で、第VIII因子機能に必須であるトロンビン、フォンヴィレブランド因子 (VWF) およびPLとの結合に着目して研究を実施した。A2ドメインにトロンビンが結合したことから、A2ドメイン内にトロンビン結合領域が存在することが明らかになった。さらにA2認識インヒビターがいずれもトロンビンによる第VIII因子の活性化および開裂を抑制したことから、A2認識インヒビターはトロンビン結合を抑制して第VIII因子活性化を阻害する抑制メカニズムが判明した。さらにA2インヒビター結合領域を中心に変異A2蛋白を用いた実験によりトロンビン結合部位はA2インヒビター認識部位近傍に存在することが確認された。一方、C2ドメイン認識インヒビターの結合領域を中心に合成ペプチドを用いて第VIII因子とVWFおよびPLとの結合領域とインヒビター結合領域について検索したところ、C2インヒビターはVWFおよびPLの結合を抑制するが、それぞれの結合領域はお互いに近傍に存在するものの異なることが明らかになった。今後、VWFやPL結合に影響を及ぼさずC2インヒビター結合領域のみ修飾できる可能性も示唆され、インヒビターの第VIII因子抑制メカニズムのみならず、インヒビター陽性例の新たな止血治療の開発にもつながることが期待される。

3. インヒビターの免疫学的特性の解析

A. 研究目的

血友病Aに対する補充療法の結果、その約30%に抗第VIII因子 (FVIII) 同種抗体が発生し、以後止血治療上の障害となることが知られている。FVIII中和抗体 (インヒビター) は、一般に凝血的中和能を反映するBethesda法により測定されている。しかしながら、インヒビターの臨床的評価としては非中和抗体を含むFVIII結合抗体が重要とされている。FVIII結合抗体の測定法としては、免疫沈降法やELISA法が行われているが、いずれもIgG抗体を検出するのみである。そこでまず、我々は第VIII因子被覆ビーズを用いて第VIII因子結合抗体の、免疫グロブリンサブクラスおよびFVIIIエpiteープの解析をおこなう。次に、その時のサイトカインを検討することにより、第VIII因子結合抗体価とサイトカインネットワークの変動の検討を行う。これらにより、インヒビターの免疫学的解析を行う予定である。

B. 研究方法

表面にカルボキシル基をコーティングしたCyto-plex蛍光ビーズ (Duke Scientific, Palo Alto, CA) にリコンビナントヒトFVIIIをカップリングさせ、これをFVIII被覆ビーズとした。内部に蛍光色素を含有する直径4マイクロメートルの均一なサイズのビーズである。FVIII被覆ビーズに各種抗FVIII抗体あるいは被検血清 (100 μ L) を混じ、2時間室温で混和しながら孵置、バッファーで洗浄の上、さらに蛍光 (PE) 標識した抗ヒトIgG抗体を加え、30分間、室温で孵置した。余剰のPE標識抗ヒトIgG抗体を洗浄、除去した上で、フローサイトメトリーを用いて、FVIIIコーティング・ビーズ1個ずつビーズに結合したPE標識抗ヒトIgG抗体を測定した。

抗体は、C2ドメインを認識するVIII/5、A2ドメインを認識するJR8、A1A3ドメイン

の立体構造を認識する216の3種類を用いた。また血漿検体は以下のものを用いた。インヒビター陰性群として、健常者pool血漿 (n=20) 1検体、先天性血友病A 4例。インヒビター保有先天性血友病B 1例。次に、過去または現在、ベセスダ法にてインヒビターを認めた先天性血友病A群 10例 (現在のインヒビター力価は、0~57BU/mL)。さらに、過去または現在、ベセスダ法にてインヒビターを認め治療中の後天性血友病A群 3例 (現在のインヒビター力価は、0~184BU/mL)。

650 nmのチャンネルでビーズを、585 nmのチャンネルで結合抗体を検出した。なお、結合抗体の蛍光強度の指標としてフローサイトメトリー解析ソフトにより得られる幾何平均 (Geometric Mean) を用いた。

C. 研究結果

1) 各種抗体の検討

各抗体は、なべてコントロールに比べ蛍光強度が強く、ビーズ表面のFVIIIと結合していることが判明した。このことから各ドメインは、抗原構造が保たれたまま、ビーズ表面上にコートされていることが推測された (図1)。

2) 健常者および患者血漿の検討

縦軸に、蛍光強度の幾何平均をとったところ、インヒビター陰性群は低値をしめした。下図左端の白色のものは、健常者のpool血漿である。カットオフ値を暫定的にこの線 (35) とした。

インヒビター陰性群に比べインヒビター保有先天性血友病A群、後天性血友病群は、全例がカットオフ値より高い値を示した (図2)。

3) ビーズ法とELISA法の相関

インヒビター保有先天性血友病A群において、相関は認めなかったが、ベセスダ法陰性検体においてもビーズ法で陽性値を示した。これらの検体は、ELISA法において

も陽性を示した。後天性血友病群においても同様に、ベセスダ法で陰性であったものが、ビーズ法で陽性値を示している。

D. 考察

今回の結果から、我々が開発したビーズ法は hFVIII結合抗体の検出に有用であることがわかった。ELISA法に比して、少数の検体でも手軽に施行可能であり、今後は、安定したビーズ表面へのFVIII固相化を得るための最適条件の検討を行う。

今回はWholeのFVIIIをコーティングしたビーズのみ用いたが、蛍光強度、サイズの異なるCyto-plexビーズにFVIIIの各ドメインや、フラグメントをコーティングすることが可能であることから、今後これらを用いることにより、一度にFVIII結合抗体の結合ドメインを検索することが可能になるものと思われる。また、本法での定量化（FVIII結合抗体力価）の確立を試みる予定である。また今回の検討ではIgGのみの検討であったが、今後は結合抗体のサブクラス（IgG、IgA、IgM、IgE）またIgGのサブクラス（IgG₁～IgG₄）の検討も行っていく。

また今回は、検討しえなかったが、今後はこれらの第VIII因子結合抗体の解析とともに、同時にサイトカインの解析も行うことにより、抗第VIII因子抗体の免疫学的検

討を行っていきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nogami K, Shima M, Giddings JC, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A. Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain. *International Journal of Hematology* 85(4);317-322, 2007
- 2) Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Giddings JC, Yoshioka A, Shima M. Identification of a thrombin-inert site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *British Journal of Haematology* 140(4); 433-443, 2008

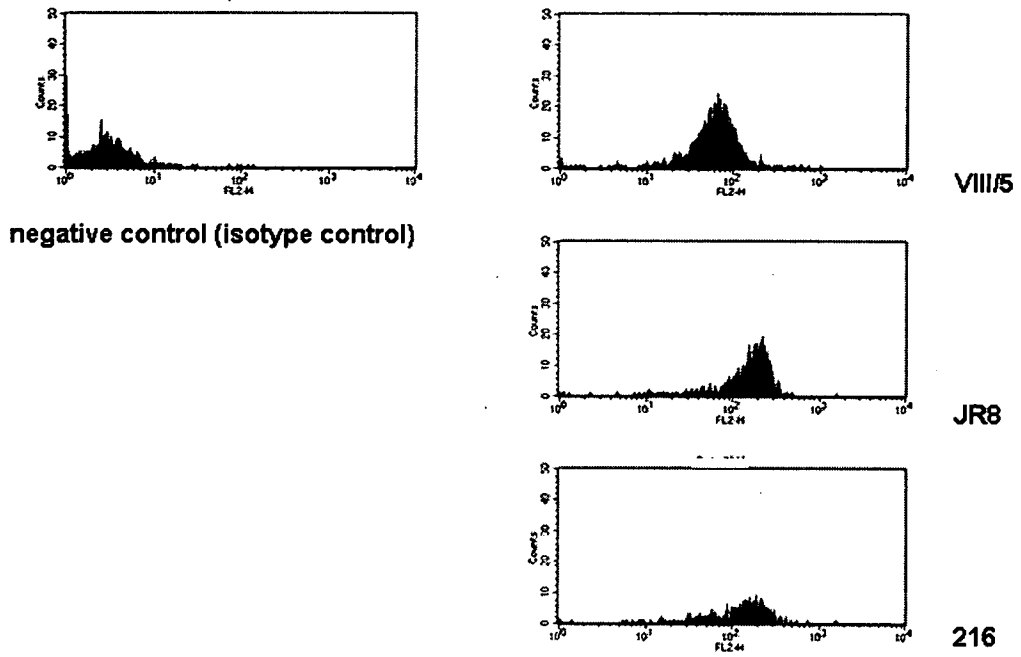
2. 学会発表

なし

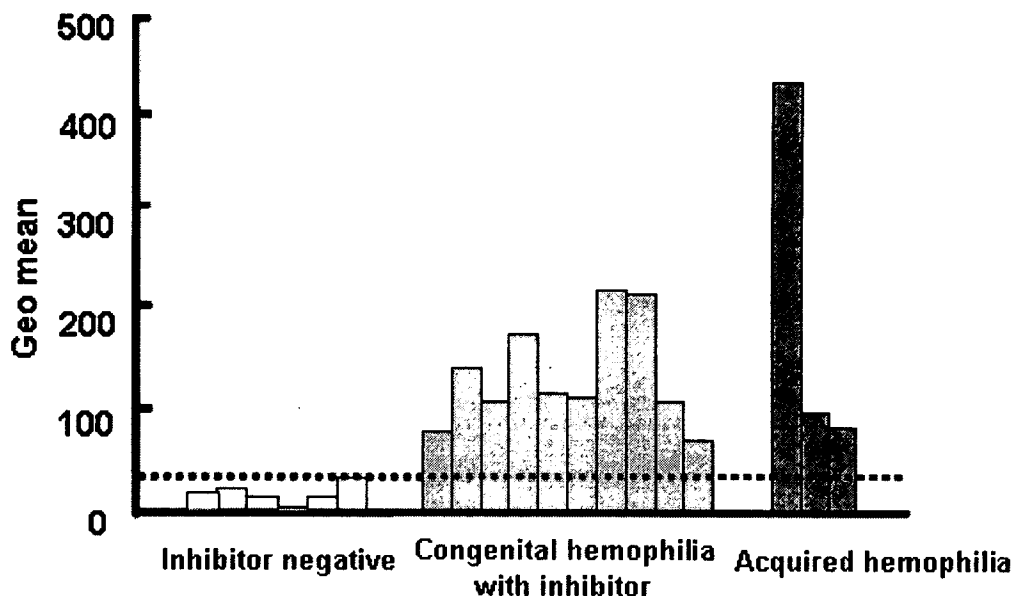
F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

☒1



☒2



研究成果の刊行に関する一覧表

【 書 籍 】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
吉岡 章, 杉本充彦	アンチトロンピン(AT), プロテインC(PC), プロテインS(PS)	橋本信也	最新 臨床検査のABC	医学書院	東京	2007	89-90
吉岡 章, 田中一郎	その他の凝固因子	橋本信也	最新 臨床検査のABC	医学書院	東京	2007	91-93
吉岡 章	血液・造血器疾患	飯沼一字, 有阪治, 竹村司, 渡辺 博	小児科学・新生児学テキスト(全面改訂第5版)	診断と治療社	東京	2007	445-470
田中一郎, 吉岡 章	血友病	大田 健, 奈良信雄	今日の診断基準	南江堂	東京	2007	476-477
田中一郎, 吉岡 章	von Willebrand病	大田 健, 奈良信雄	今日の診断基準	南江堂	東京	2007	478-479
白幡 聡	von Willebrand病に対する治療法は?	押味和夫, 別所正美, 岡本真一郎, 加藤淳	EBM 血液疾患の治療2008-2009	中外医学社	東京	2007	506-510
瀧 正志	血友病	五十嵐 隆	小児科診療ガイドライン-最新の治療方針-	総合医学社	東京	2007	226-229

【 雑 誌 】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
白幡 聡	海外における遺伝子組換え活性化型凝固第VII因子製剤(注射用ノボセブン®)の高用量単回投与に関する臨床研究	日本血栓止血学会誌	18(3)	255-264	2007
白幡 聡, 嶋 緑倫, 岡 敏明, 天野景裕, 花房秀次, 瀧 正志, 三間屋純一, 松下正, 高松純樹, 日笠 聡, 小阪嘉之, 須賀健一, 酒井道生, 梶原真清恵, 高田昇, 吉岡 章	国内における遺伝子組換え活性化型凝固第VII因子製剤(注射用ノボセブン®)の高用量単回投与に関する臨床研究 第I相試験結果-安全性についての報告	日本血栓止血学会誌	18(6)	614-618	2007

<u>白幡 聡</u>	ルリオクトゴクアルファ (遺伝子組換え)	クリニカルブ ラクティス	26(7)	572-574	2007
Tatsunami S, <u>Taki M</u> , Kuwabara R, <u>Mimaya J</u> , <u>Shirahata A</u>	Tracing patients with lipodystrophy on the bubble chart of antiretroviral drug usage resulted from categorical principal component analysis	56 th Session of the ISI		4 pages in CD Rom	2007
Nogami K, <u>Shima M</u> , Giddings JC, Takeyama M, Tanaka I, <u>Yoshioka A</u>	Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain	International Journal of Hematology	85(4)	317-322	2007
Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Giddings JC, <u>Yoshioka A</u> , <u>Shima M</u>	Identification of a thrombin-inert site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372	British Journal of Haematology	140(4)	433-443	2008

アンチトロンピン(AT), プロテインC(PC), プロテインS(PS)

アンチトロンピン(AT)

抗原量 23～34 mg/dl(ELISA法)

活性値 70～130%(凝固時間法)

プロテインC(PC)

抗原量 2.4～4.0 μg/ml(ELISA法)

活性値 67～130%(合成基質法または凝固時間法)

プロテインS(PS)

抗原量 総PS値 15～32 μg/ml(ELISA法)

遊離型PS値 6～13 μg/ml(ELISA法)

複合体型PS値 9～19 μg/ml(ELISA法)

活性値 68～160%(凝固時間法)

臨床的意義

- 生体では血液はよどみなく血管内を流れているが、血液が直接接触する血管内皮上には、この血液の流動性を保つためのシステムが備わっている。すなわち血液凝固制御機構である。
- 1つはアンチトロンピン(AT)制御系であり、血液凝固反応で生成された活性型第X因子(Xa)やトロンビンなどは、主として血管内皮細胞上のヘパラン硫酸に結合したセリンプロテアーゼインヒビターのアンチトロンピン(AT)によって制御・不活性化される(図)。
- 血管内皮上の血液凝固制御系にはほかにプロテインC(PC)制御系とよばれるものが存在する。血管内皮上のトロンボモジュリンと結合したトロンビンは、血管内皮上のPC受容体に結合したPCを活性型(APC)に変える。APCはプロテインS(PS)存在下に、活性型凝固第V因子(Va)および第Ⅷ因子(VⅢa)を不活性化することで、新たなXa, トロンビン形成を強力に阻害する(図)。

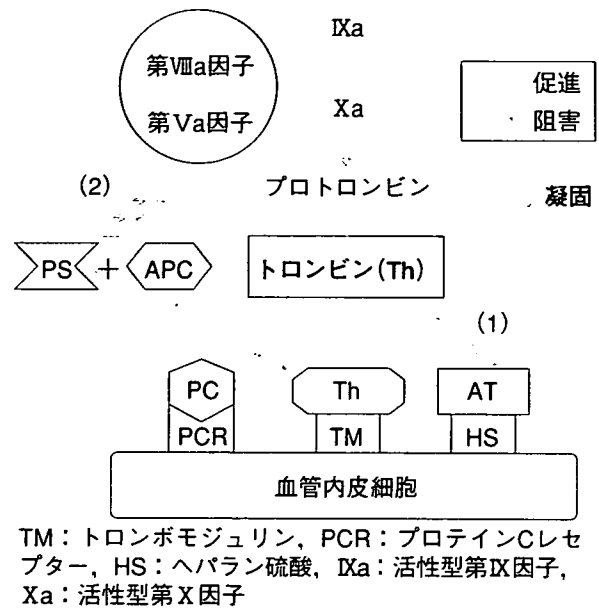


図 血液凝固制御系

異常値を来す時

- 前述のようにAT, PCおよびPSは血液凝固制御機構で中心的な役割を果たす血漿因子である。この制御機構が破綻した場合、血管内で血液が凝固する危険性(血栓症)をはらむことになる。
- したがって、これら因子の先天性欠乏症(または低下症)は常染色体優性の血栓性素因(thrombophilia)である。一般的に活性が約50%の各欠乏症のヘテロ接合体は、比較的若年から反復する深部静脈血栓症や肺血栓塞栓症を反復する。
- 先天性PC欠乏症のホモ接合体は、新生児期に電撃性紫斑病とよばれる壊死性多発性血栓症で発症し、適切な治療がなされないと致死性である。
- 一方、後天的にこれら因子の低下する病態は、血栓症の存在もしくは血栓準備段階を強く示唆する。
- ATの後天的低下で代表的なものはDICであるが、疾患病態の把握にはトロンビン-AT複合体(TAT)をはじめとした追加検査データが必要である。
- PCとPSはビタミンK依存性に肝臓で産生

されるため、非可逆的な肝障害、ビタミンK欠乏やワルファリン投与患者では低下する。

各因子の低下を認めた場合、先天的なものか後天的なものかの判断はきわめて重要であり、各因子の低下が選択的なものかを見極める必要がある。まぎらわしい場合は、疾患病態と合わせて複数回の検査データで総合的に診断する。

- ④ AT, PC, PSの各因子は、それぞれに先天性異常症が報告されている。したがって、抗原量測定とともに、活性値の評価が重要である。
- ④ PSは血中ではその60%が補体蛋白C4b-binding protein (C4bp)と結合しており、C4bpと結合していない遊離型PSのみが抗血栓能を発揮する。実際、遊離型のみが著減するタイプの先天性欠乏症もあり、総抗原量とともに遊離型PS抗原量測定が重要である(基準値参照)。

検体取り扱いの注意

- ④ 所定の採血管での採血(クエン酸Na加採血)を徹底する。ヘパリン採血では正確な活性値が得られない。
- ④ 同様の理由で、ヘパリン使用患者の採血およびデータ解釈は慎重に行う。
- ④ 数日以内に輸血や血液製剤を使用した場

合、測定値に影響を与えることがあるので注意を要する。

- ④ PCとPSはビタミンK依存性抗凝固因子であるので、ビタミンK拮抗薬であるワルファリン服用患者では当然、抗原量・活性値は共に低下する。先天性低下症の診断はPC(またはPS)値と、同じくビタミンK依存性凝固因子であるプロトロンビン値とを比較して、選択的低下症であるとの確認が必要である。正確な確定診断には(可能であれば)ワルファリン断薬後最短1週間以降に再検査する。

フォローアップ

- ④ AT, PCおよびPSの各先天性欠乏症の場合、ワルファリンの内服による抗凝固療法が行われており、血栓症予防の有効性が認められている。ワルファリン内服患者はPT-INR値で2.0~3.0程度を目標にフォローアップする。
- ④ 後天性低下症の場合、低下を来すに至った原疾患の治療が最優先であるのはいうまでもないが、極端な低下に対しては、血漿由来のAT製剤、APC製剤が市販されており適宜補充する。なおPS低下に関してはPS単独因子製剤はない。

(吉岡 章・杉本充彦)

その他の凝固因子

第II因子(プロトロンビン)	50~150%
第V因子	50~150%
第VII因子	50~150%
第VIII因子	50~150%
von Willebrand 因子(VWF)	50~150%
第IX因子	50~150%
第X因子	50~150%
第XI因子	50~150%
第XII因子	50~150%
第XIII因子	50~150%

臨床的意義

- プロトロンビン時間(PT)や活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)によるスクリーニング検査で異常を認めた場合、各凝固因子を測定することで、出血傾向もしくは血栓傾向の確定診断が可能である。
- 先天性欠乏症の場合、凝固因子活性による重症度分類が可能である。さらに、抗原量を測定することで、量的欠乏症か質的異常症かの病型分類も可能である。
- 先天性欠乏症患者に対して凝固因子製剤または新鮮凍結血漿による補充療法を行った際に、凝固因子活性が期待値どおりに上昇しているかどうかの効果判定が可能である。
- 先天性欠乏症の保因者や胎児診断にも利用される。
- 第XIII因子欠乏症の場合、出血時間や血小板数、PT、APTTによるスクリーニング検査では異常を示さず、第XIII因子の定量によって初めて診断が可能である。
- フィブリノゲンやVWF、第VIII因子の増多症・過剰症は血栓傾向の指標になりうる。

異常値を来す時(表)

- 単独の因子が欠乏している場合、通常、当

該因子の先天性欠乏症が疑われる。しかし、臨床症状によっては、第X因子が低下する場合はアミロイドーシスが、第XIII因子が低下する場合はアレルギー性紫斑病も考慮する必要がある。

複数の因子が低下している場合、高度の肝障害やビタミンK欠乏症、DICなどの後天性疾患が考えられる。第VIII因子とVWFが共に低下する場合はvon Willebrand病(VWD)を、第V因子と第VIII因子が共に低下する場合は第V、VIII因子合併欠乏症も鑑別しなければならない。

- ビタミンK依存性凝固因子である第II、VII、IXおよびX因子はいずれも出生直後は低値(低出生体重児では顕著)であるが、経月的に第VII、X、II、IX因子の順に徐々に成人値に近づく。
- 血液型がO型の場合、しばしばVWFおよび第VIII因子が正常の70~80%と低下していることがあり、VWDタイプ1との鑑別を要する。
- PIVKA(protein-induced by vitamin K absence or antagonists)-IIが陽性の場合、ビタミンK欠乏性出血症や肝細胞癌が強く疑われる。
- 複数の因子が低下している場合、ヘパリン(VWFと第XIII因子を除く全因子)やワルファリン(第II、VII、IX、X因子)の使用のほか、広域抗菌薬(第II、VII、IX、X因子)やL-アスパラギナーゼ(第II、IX、X、XI、XII因子)の長期使用による薬剤性のものも考慮する必要がある。
- 悪性腫瘍や自己免疫疾患、分娩後、高齢などに続発して後天性に抑制物質(インヒビター)が発生することがある。多くは第VIII因子に対するインヒビターで、他に第V因子やVWFなどに対するインヒビターがみられる。
- 複数の因子(主として第VIII、IX、XI、XII因子)の低下があり、出血症状ではなく血栓

表 凝固因子の低下および上昇を来す主要な疾患・病態

疾患・病態	凝固因子												
	II	V	VII	VIII	VWF	IX	X	XI	XII	XIII	PIVKA II		
先天性凝固障害症													
プロトロンビン欠乏(異常)症	↓												
第V因子欠乏(異常)症		↓											
第VII因子欠乏(異常)症			↓										
血友病 A				↓									
血友病 A 保因者				↓									
von Willebrand 病 (VWD)				↓	↓								
血友病 B						↓							
血友病 B 保因者						↓							
第 X 因子欠乏(異常)症							↓						
第 XI 因子欠乏(異常)症								↓					
第 XII 因子欠乏(異常)症									↓				
第 XIII 因子欠乏(異常)症										↓			
第 V, VIII 因子合併欠乏症		↓		↓									
ビタミン K 依存性凝固因子低下症													
低出生体重児・新生児	↓		↓			↓	↓						
新生児一次性出血症	↓		↓			↓	↓					↑	
乳児特発性ビタミン K 欠乏症	↓		↓			↓	↓					↑	
胆道閉鎖症・胆汁瘻	↓		↓			↓	↓					↑	
肝細胞障害(肝炎・肝硬変の一部)	↓	↓	↓									↑	
肝細胞癌												↑	
ワルファリンの投与	↓		↓			↓	↓					↑	
コレステラミン・広域抗菌薬の長期投与	↓		↓			↓	↓					↑	
重度栄養失調・慢性下痢	↓		↓			↓	↓					↑	
凝固因子の消費													
DIC の準備状態		↑		↑	↑								
DIC	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓			
アミロイドーシス							↓						
アレルギー性紫斑病										↓			
インヒビターの発生													
・先天性欠乏症に対する補充療法の結果続発するもの													
血友病 A インヒビター				↓									
血友病 B インヒビター							↓						
VWF インヒビター(VWD タイプ 3 患者)				↓	↓								

(つづく)

(つづき)

疾患・病態	凝固因子												
	II	V	VII	VIII	VWF	IX	X	XI	XII	XIII	PIVKA II		
・後天性の病態(癌・膠原病・妊娠など)に続発するもの													
後天性血友病 A				↓									
後天性第V因子低下症		↓											
後天性 von Willebrand 症候群				↓	↓								
抗リン脂質抗体症候群	↓			↓		↓		↓	↓	↓			
その他													
L-アスパラギナーゼの連日投与	↓					↓	↓	↓	↓				
ヘパリンの投与	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓				
HUS・TTP					↑								
DDAVP の投与				↑	↑								
経口避妊薬の服用										↑			
妊娠	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			↑			
運動負荷				↑	↑				↑	↑			
肝不全を伴った肝炎				↑	↑								
一部の腎疾患				↑	↑								

↓：低下， ↓：軽度低下， ↑：上昇， ↑：軽度上昇， PIVKA：protein-induced by vitamin K absence or antagonists, VWF：von Willebrand 因子， HUS：溶血性尿毒症症候群， TTP：血栓性血小板減少性紫斑病 (吉岡 章：臨床検査ガイド 2003-2004. 文光堂， 2003；682-689, 表 1・4)

血液・凝固・線溶系検査

症状がある場合は，抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントによる抗リン脂質抗体症候群が疑われる。

- ⑥ 先天性第XII因子欠乏症では通常，出血症状は伴わず，検査で偶然発見されることが多い。なかには血栓傾向を呈する例も報告されている。
- ⑦ 運動負荷では第VIII，XI，XII因子とVWFが増加し，妊娠では第XI因子を除く全因子(特に第VIII因子とVWF)が増加することが知られている。
- ⑧ 酢酸デスマプレシン(DDAVP)の使用で第VIII因子とVWFが増加し，経口避妊薬の服用で第XII因子が増加する。

検体取り扱いの注意

運動や過度の興奮で第VIII因子やVWFが上昇するので，安静時に採血する。
数日以内の輸血や血液製剤の投与は測定値

に影響を及ぼす可能性がある。

- ⑨ 抗凝固剤として3.8(もしくは3.2)%(w/v)クエン酸Na1容を全血9容の割合で用いる。EDTAやヘパリンは使用しない。また，ヘパリンで維持している中心静脈ルートからの採血の場合，ヘパリンの影響を十分に除く必要がある。
- ⑩ 採血に時間がかかったり，組織因子が混入した場合など，採血手技によって測定値が大きく影響を受ける。
特に，第Vおよび第VIII因子は室温では不安定であるため，血漿分離後は可及的速やかに測定し，保存する場合は-20℃以下，できれば-80℃以下で凍結保存する。

フォローアップ

検査結果が臨床症状と合致しない場合は，症例の経過を観察しながら再検査を行う。

(吉岡 章・田中一郎)