

Figure 1 GFP expression in the pig liver after hydrodynamic injection (plasmid DNA: 3 mg; solution: 150 ml normal saline; and injection speed: 5 ml/s, with the hepatic artery and the portal vein occluded and the liver blood flushed out). GFP expression was shown in almost all areas of the target liver (left outer lobe of the pig liver) in (a) and (b). No GFP expression was shown in the non-hydrodynamic gene-transferred liver in (c). Magnification: (a) $\times 3$; (b) $\times 10$ and (c) $\times 10$.

was detected (161.7 ng/ml) in the serum on 1 day after gene transfer and also during the next 4 days, in No. 2 a not so high serum level of CTLA4Ig was detected (98.1 ng/ml on day 4) and in No. 3 a lower serum level

Table 1 Relationship between gene expression and the preparation of the vessels in the pig liver

PV wash out	PV clamp	HA clamp	Gene expression
-	+	-	No
-	-	+	No
-	+	+	Good
+	+	+	Very good

Abbreviations: clamp, a temporary clamp using the vessel clamp during hydrodynamic injection; good, GFP expression was limitedly observed; HA, hepatic artery; no, no GFP expression was observed; PV, portal vein; very good, GFP expression was widely observed; wash out, PV blood flow was washed out using 200 ml lactate linger solution.

GFP expression was observed 2 days after hydrodynamic gene transfer.

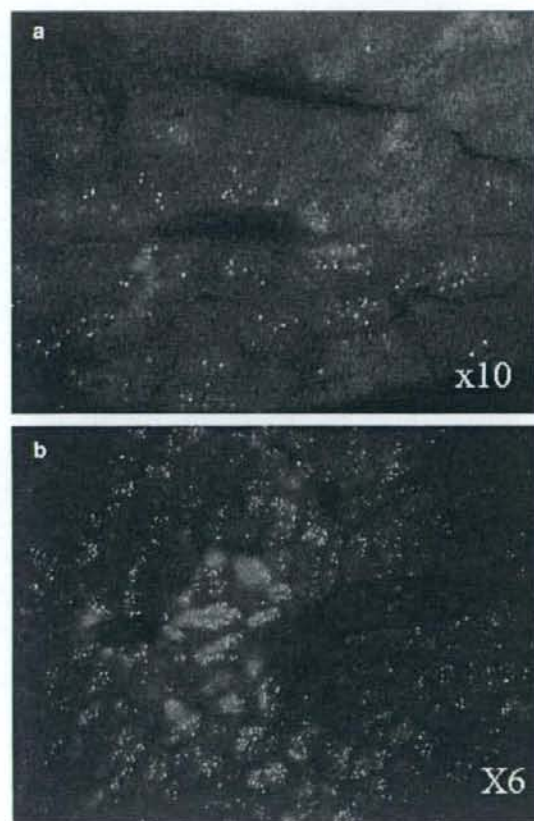


Figure 2 The GFP expression of the pig liver under the blood condition. The portal vein and the left hepatic artery were clamped, and the GFP gene was injected into the left hepatic vein (3 mg of p-DNA containing with 150 ml of normal saline and injection speed was 5 ml/s) (a). After occlusion of the hepatic inflow, 200 ml of the lactate linger solution were injected from the portal vein (b). The GFP expression of hydrodynamically gene delivered pig liver was limited to an area near the hepatic vein (a). Both vessels were clamped and the liver blood was washed out from the portal vein using the lactate linger solution. Gene expression was observed in almost all areas of the target liver (b).

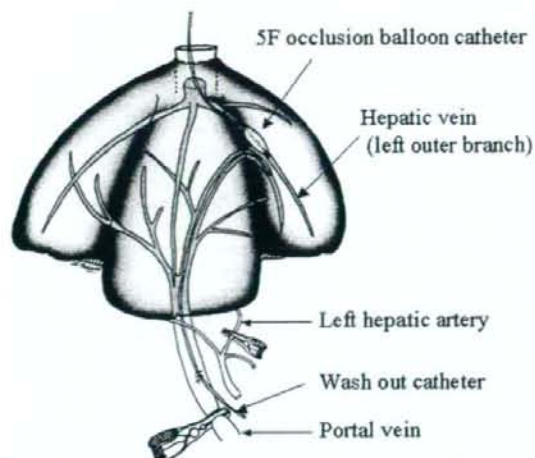


Figure 3 Schema of the catheterization for the left outer lobe of the pig liver. The left outer lobe of the pig liver was the target of gene delivery. The occlusion balloon catheter was inserted from the right outer jugular vein to the left outer branch of the hepatic vein. And the left hepatic artery and the main portal vein were isolated and clamped using vessel clamps. A catheter was inserted from the main portal vein to the left outer branch of the hepatic vein in order to wash out the blood.

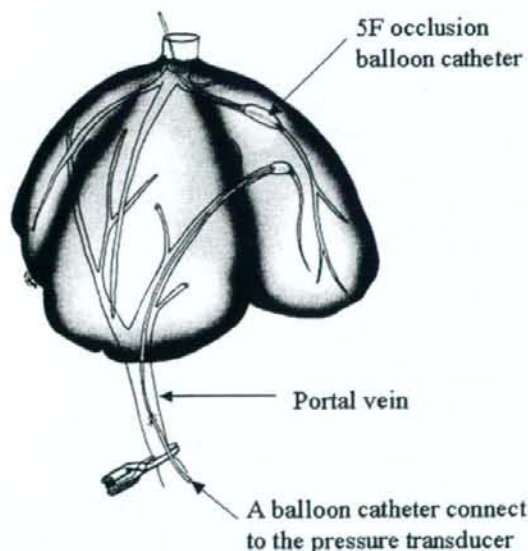


Figure 4 Schema of the portal vein wedge pressure measurement. A balloon catheter was inserted from the main portal vein to the left outer branch of the liver instead of the washing catheter so as to monitor the portal vein wedge pressure as being approximately equal to the pressure of the left outer branch of the hepatic vein pressure.

was detected. The peak of serum levels were seen on 1 day after gene transfer in No. 1 and No. 3, but on 4 days after gene transfer in No. 2, in spite of the same conditions.

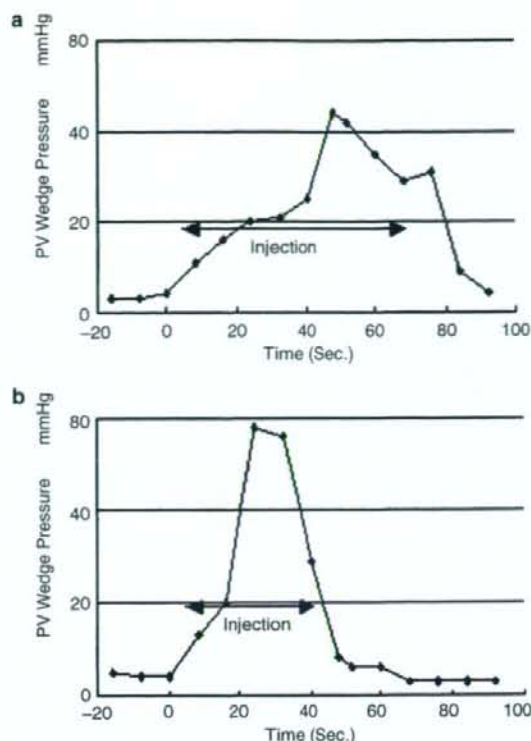


Figure 5 Measurement of the portal vein wedge pressure during hydrodynamic injection. The wedge pressure of the left outer branch of the pig liver during hydrodynamic injection was monitored. (a) Portal vein wedge pressure in 3 ml/s speed injection. Maximum pressure was 44 mm Hg. (b) Pressure in 5 ml/s. Maximum pressure was 58 mm Hg.

The toxicity of the pig liver in hydrodynamic gene transfer

In the CTLA4-Ig experiment, the liver injury induced by the hydrodynamic gene transfer was studied by AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alkaline aminotransferase) in the following phases: pre-operation, 1 day, and 2, 4 and 7 days after gene delivery ($n=3$). AST increased on the first day after hydrodynamic gene transfer (maximum 501.3 IU/l) and decreased on the second day, returning to a normal level on the fourth day after gene delivery (Figure 7).

Discussion

In this study, we found that the hydrodynamic gene transfer method is not only a technique for small animals, such as rodents and rabbits, but also pigs. A paper that reported gene transfer to the dog liver has been published.¹¹ However, the report described mainly rodent data, and the dog data were not clear. Moreover, the method in that report was not highly efficient because it used 10–30 mg plasmid DNA. A paper mentioned naked gene transfer using the hydrodynamic method to the large animals, but no data were shown.¹⁰ There was only one report that transferred naked DNA

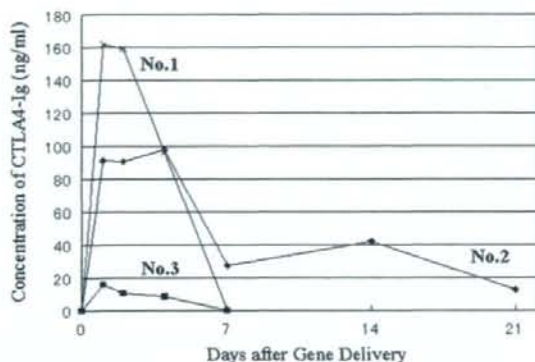


Figure 6 Concentration of the CTLA4-Ig in the serum of gene delivered pig using a hydrodynamic method. Hydrodynamic gene transfer was performed on all pigs (Nos. 1–3) under the same conditions (plasmid DNA: 3 mg; solution volume: 150 ml and injection speed: 5 ml/s). Even under the same conditions, a comparison of No. 1, No. 2 and No. 3 shows that levels of gene expression were quite varied.

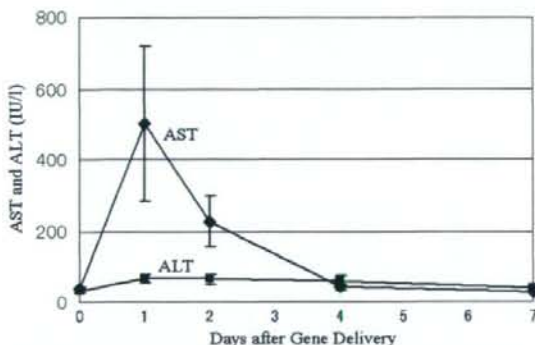


Figure 7 Toxicity of the pig liver in hydrodynamic gene transfer. AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alkaline aminotransferase) level were measured in the serum of the CTLA4-Ig-transferred pigs using a hydrodynamic method in pre-operation, 1 day, and 2, 4 and 7 days after gene delivery ($n=3$).

to the pig liver using a hydrodynamic method.¹² The investigators transferred human α -1 antitrypsin (hAAT) to the whole liver of the pig using a catheter. This paper was very impressive and important because it was the first report of hydrodynamic gene transfer to the pig liver, and the toxicity of the liver was limited (maximum of AST level was 123 U/l). The conditions for injection were 2 mg of naked DNA with 100 ml of solution and 7.5 ml/s injection speed. These conditions were similar to our conditions but not the same, because their target organ was the whole liver and our target was a part of the liver. Moreover, their report said the gene transfer was not so efficient, so a more effective method was still necessary. We found that the hydrodynamic method needs additional techniques when used in pigs.

First, the hydrodynamic gene transfer in pigs required 3 mg of pDNA containing 150 ml of normal saline. We tried 1 mg of pDNA (GFP) and although gene expression was detectable, it was much less than 3 mg. We also tried 100 ml of solution, but GFP expression was not detect-

able. The solution volume was much larger in the pig than the rodent compared to the liver weight. The reason was the occlusion balloon. In this study, we used the 'Dilatation balloon'. The solution containing plasmid DNA leaked easily, so a greater volume of solution might be required in the pig study. A special balloon should be developed for the pig hydrodynamic method for better gene transfer efficiency. In this study, we operated in open surgery to fix the balloon to the best position and to prevent the leakage of solution, but the operative procedure may be performable using laparoscopic surgery to reduce surgical invasion.

Second, the blood flow of the pig liver was important in this study. It was necessary to occlude the portal vein and the hepatic artery. Moreover, effective gene transfer required washing out the liver blood. A paper suggested that the DNAase reduced the plasmid DNA contacting the blood,¹⁷ and this study may support the hypothesis.

In the GFP experiments, GFP expression was identical in almost all of the area that was controlled by the hepatic vein with the balloon catheter clamped. GFP expression was quite effective; however, in the CTLA4-Ig study, the serum level of CTLA4-Ig was not as effective as in the rodent studies. Because in the pig study, the injected area of hydrodynamic gene transfer was $\frac{1}{16}$ to $\frac{1}{18}$ of the whole liver, the production was lower than in whole liver transfer studies (like rodent experiments). Moreover, the hydrodynamic gene transfer method leaves room for improvement in efficiency, such as the use of a specific occlusion catheter to reduce the leakage of the solution containing plasmid DNA.

In the hydrodynamic method, the transferred gene expression was not controllable in spite of using the same procedure and same surgeon. In our study, the CTLA4-Ig expression also suggested uncontrollability. Liver damage and the uncontrollable gene expression were demerits of the hydrodynamic method, but the liver damage improved in a few days and the gene expression level was high enough to meet the goal of objective experiments, such as CTLA4-Ig level in organ transplantation.¹⁸

Gene therapy for the liver is a strategy for various situations, such as an assist therapy for the immunosuppression in organ transplantation, the treatment of patients with metabolic disorders and DNA vaccination for treatment of fulminate hepatitis.¹⁹ Moreover, the non-viral gene transfer method is beneficial for recipients inducing immunosuppressive agents, in whom the clinical application of virus vector may be limited because of cytotoxicity and immune responses. Delivery of naked DNA using an intravascular route results in effective gene transfer to hepatocytes because the vascular system accesses every cell. Furthermore, the immunosuppression-limited graft organ using gene therapy has great potential in solid organ transplantation and also in cell transplantation. We will investigate the hydrodynamic method for the combination therapy of gene transfer and transplantation.

Materials and methods

Plasmid constructs

The expressing construct for enhanced type of mutant in the GFP gene, *ph-GFP-105-c1*, driven under a cyto-

megalovirus promoter, was kindly donated by Dr T Osumi (Himeji Institute of Technology, Hyogo, Japan). The GFP and the human CTLA4-Ig expression plasmid pCAG-CTLA4-Ig were amplified in the DH5 α strain of *Escherichia coli*, and large-scale preparation of plasmid DNA was performed by the alkaline lysis method. Closed circular plasmid DNA was then purified twice by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium-bromide gradients. DNA concentrations were measured by ultraviolet absorption at 260 nm.^{13,14}

Animals

Mail miniature pigs (Mexican hairless pig), weighing 14–27 kg, obtained from the Ibaragi Firm (Ibaragi, Japan), were used. Pigs were kept at our animal center. All experiments were performed in accordance with the 'Jichi Medical University Guide for Laboratory Animals'.

Anesthesia and surgical preparation

As preparation for surgery, the miniature pigs received an intramuscular injection of ketamine (10 mg/kg) and atropine sulfate (0.5 mg/each animal). The pigs were intubated and anesthetized generally by isoflurane.²⁰ The occlusion balloon catheter, Ultra-thin Diamond Balloon Dilatation catheter, 5F, 75 cm, balloon 5 mm \times 4 cm (Boston Scientific, Boston, MA, USA), was inserted from the right external jugular vein with the 8 French angiocatheter sheath, and into the left hepatic vein, navigated under fluoroscopic control. The pigs were operated with inverted T skin incision. The hepatic artery and the portal vein were identified and clamped with vessel clips. The injection catheter was inserted into the portal vein, and 200 ml normal saline was injected for washing out the liver blood. After that, the hepatic vein was occluded with the balloon catheter and the surgeon held the left outer lobe of the liver with the hands to fix the liver and the occlusion balloon and to prevent leakage of the solution.

Hydrodynamic injection

The plasmid DNA was rapidly injected into the hepatic vein with 150 ml cold normal saline using the power injector (Mark five Pro Vis injection system, Medrad Inc., Pittsburgh, PA, USA). The balloon occlusion was continued during rapid injection and 30 s after the injection. After that, the occlusion balloon was deleted, the portal vein and hepatic artery clamps were removed, and the abdominal and cervical wounds were sutured. The pigs were kept in the special cage for the after-operation pigs at our animal center.

The measurement of the portal vein wedge pressure

A balloon catheter was inserted from the main portal vein, and advanced into the left outer branch of the portal vein. The balloon was expanded during the rapid injection and after 30 s. The portal vein wedge pressure was continuously monitored on Pressure Transducer (NEC, Tokyo, Japan).

Detection of marker gene

Expression of the introduced GFP gene was visualized macroscopically under 489-nm wavelength excitation light as specified in previous reports.^{21,22} The pigs were killed 2 days after gene transfer to evaluate the technical procedure.

Detection of serum CTLA4-Ig level

CTLA4-Ig level in serum were assayed by ELISA as specified in a previous report.¹³

References

- Niudome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Therapy* 2002; 9: 1647–1652.
- Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 1999; 6: 1258–1266.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735–1737.
- Murayama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ et al. High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* 2002; 4: 333–341.
- Liang KW, Nishikawa M, Liu F, Sun B, Ye Q, Huang L. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Therapy* 2004; 11: 901–908.
- Danielou G, Comtois AS, Matecki S, Nalbantoglu J, Karpati G, Gilbert R et al. Optimization of regional intraarterial naked DNA-mediated transgene delivery to skeletal muscles in a large animal model. *Mol Ther* 2005; 11: 257–266.
- Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA. Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 427–438.
- Crespo A, Peydro A, Dasi F, Benet M, Calvete JJ, Revert F et al. Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Therapy* 2005; 12: 927–935.
- Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Therapy* 2004; 11: 675–682.
- Eastman SJ, Baskin KM, Hodges BL, Chu Q, Gates A, Dreusicke R et al. Development of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver with plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 2065–2077.
- Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1763–1772.
- Herrero MJ, Dasi F, Noguera I, Sanchez M, Moret I, Sanmartin I et al. Mouse and pig nonviral liver gene therapy: success and trials. *Gene Ther Mol Biol* 2005; 9: 169–180.
- Inoue S, Hakamata Y, Kaneko M, Kobayashi E. Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA: application to the rat liver. *Transplantation* 2004; 77: 997–1003.
- Sato Y, Ajiki T, Inoue S, Hakamata Y, Murakami T, Kaneko T et al. A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation. *Transplantation* 2003; 76: 1294–1298.
- Sato Y, Ajiki T, Inoue S, Fujishiro J, Yoshino H, Igarashi Y et al. Gene silencing in rat-liver and limb grafts by rapid injection of small interference RNA. *Transplantation* 2005; 79: 240–243.
- Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Therapy* 2003; 10: 453–458.
- Kawabata K, Takakura Y, Hashida M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 1995; 12: 825–830.
- Yang Z, Wu X, Tsui TY, Hou Y, Luk JM, Fan ST. Long-term liver allograft survival induced by combined treatment with rAAV-hCTLA4Ig gene transfer and low-dose FK506. *Transplantation* 2003; 75: 303–308.

- 19 Nakamura M, Wang J, Murakami T, Ajiki T, Hakamata Y, Kaneko T *et al*. DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. *Transplantation* 2003; **76**: 1369–1375.
- 20 Komiya K, Sato Y, Wainai T, Murayama T, Yamada M, Hiruta A *et al*. Evaluation of intraoperative infusion solution using a complete anhepatic model in baby pigs. *Transplant Proc* 2005; **37**: 2341–2346.
- 21 Ajiki T, Murakami T, Kobayashi Y, Hakamata Y, Wang J, Inoue S *et al*. Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**: 318–329.
- 22 Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A *et al*. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **286**: 779–785.

血友病 A 患者に認められた第 VIII 因子 A1 ドメイン内の ミスセンス変異 Asp116Asn の分子病態

内田 泰斗 天野 景裕 篠澤 圭子
稲葉 浩 福武 勝幸

東京医科大学臨床検査医学講座

【要旨】 血友病 A は第 VIII 因子 (FVIII) の異常による出血性疾患である。血友病 A には FVIII 抗原が認められるが FVIII 活性の低い病型があり、Cross-Reacting Material-positive (CRM⁺) と呼ぶ。CRM⁺ 血友病 A 患者に見出されたミスセンス変異 Asp116Asn (D116N) の分子異常を明らかにするために発現実験を行った。ワンステップの site-directed mutagenesis キットにて作製した変異 FVIII を HEK293 細胞にトランスフェクションし培養上清中の FVIII 活性、抗原を測定した。変異 FVIII の活性、抗原はそれぞれ野生型に対して、 $1.8 \pm 0.7\%$ 、 $120.9 \pm 25.5\%$ であり、D116N は CRM⁺ であることを確認した。活性低下の原因として、新しい糖鎖が付加されている可能性について検討した。イムノプロット解析では、抗 A2 抗体を用いた間接証明であるが D116N では糖鎖付加による分子量の増大に伴う易動度の変化は無いと考えられた。N-Glycanase により糖鎖を切断することで FVIII 活性の上昇が得られるかどうかを確認したが、活性は上昇しなかった。これらの結果から、D116N の活性低下要因は新しい糖鎖付加によるものではなく、構造変化に伴うカルシウム結合性の低下によることが示唆された。

はじめに

血友病 A は第 VIII 因子 (FVIII) の量的あるいは質的異常が病因の出血性疾患である。X 染色体性劣性遺伝形式である本症の発生頻度は男児出生 1 万人に 1 人の頻度である。第 VIII 因子遺伝子 (F8) は X 染色体長腕上の末端側 Xq28 に存在し、全長約 186 kb で 26 のエクソンと 25 のイントロンにより構成される。1984 年に FVIII cDNA のクローニングが成功して以来、血友病 A と F8 異常に関する多くの知見が蓄積されてきた。血友病 A の重症度は血漿 FVIII 活性 (FVIII: C) と概ね相関しており、1% 未満を重症型、1~5% を中等症型、5% 以上を軽症型に分類する¹⁾²⁾。また FVIII 抗原量 (FVIII: Ag) が FVIII: C と一致し

ない分子異常の FVIII を有する血友病 A の変異病型があり、正常量 ($\geq 50\%$) の FVIII: Ag を有する病型を Cross-Reacting Material (CRM)-positive (CRM⁺) と呼び、その頻度は全体の約 10% に認められる。それに対し、FVIII: Ag が正常量の $\leq 50\%$ で FVIII: C がそれよりも低下しているものを CRM-reduced、FVIII: Ag も FVIII: C も同様に低下しているものを CRM-negative (CRM⁻) と呼ぶ³⁾⁴⁾。中等症、軽症型にはミスセンス変異による分子異常が原因と考えられる CRM-positive や reduced 症例が多く報告されている⁵⁾。

FVIII は分子量 330 kDa の糖タンパク質で、アミノ酸配列の相同性から A1-A2-B-A3-C1-C2 のドメイン構造をとる⁶⁾。235I 残基の FVIII 前駆体は主に肝臓で

2006 年 2 月 6 日受付、2006 年 2 月 23 日受理

キーワード: 血友病 A、ミスセンス変異、第 VIII 因子

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学臨床検査医学講座 内田 泰斗)

合成される一本鎖糖タンパク質で小胞体内腔に移行する際に種々のタンパク翻訳後修飾が、小胞体内腔でタンパクの折り畳みや糖付加が行われる。ゴルジ体に移行した FVIII は更に糖鎖付加、修飾、硫酸化が行われ、N 末端由来 200 kDa の重鎖 (A1-A2-B) と C 末端由来 80 kDa の軽鎖 (A3-C1-C2) に分解されてヘテロダイマーとなり、成熟した FVIII として分泌される⁷⁻⁹⁾。トロンピンによる活性化に伴い重鎖は 50 kDa の A1 と 43 kDa の A2 フラグメントに、軽鎖は 73 kDa の A3-C1-C2 のフラグメントに分解される¹⁰⁾。

A ドメインは第 V 因子 (FV) や銅結合タンパクのセロプラスミンと相同性があり、FVIII 1 分子内には 1 つの銅イオンの存在が同定されている¹¹⁾。また FVIII の重鎖と軽鎖はマンガンやカルシウムなどの 2 価陽イオンにて再構成されることが報告されており、FVIII 活性の出現のためには、A ドメインと陽イオンの何らかの会合が必要であると考えられている¹²⁾。

本研究では、CRM⁺ 血友病 A 患者に見出された A1 ドメイン内のミスセンス変異 Asp116Asn (D116N) の FVIII 分子異常を明らかにするために、タンパク質発現実験を行った。

研究材料および方法

1. 変異 FVIII プラスミドの作製

フルレングス FVIII cDNA の入った FVIII 合成プラスミド (pMT2 VIII)¹³⁾ は Randal J Kaufman (Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA) より提供を受けた。pMT2 VIII を鋳型として、QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene[®], LA Jolla, CA, USA) を用いて、FVIII D116N プラスミド変異体の作製を行った¹⁴⁾¹⁵⁾。FVIII 合成プラスミドのアスパラギン酸 116 のコドン配列 (gat) からアスパラギン (aat) に点突然変異を発生させる為、5'-gctgaatgatgataatcagaccagctcaa-3'、5'-ttgactggctctgattatcatattcagc-3' のミュータジェニックプライマーを設計した。PfuTurbo[®] DNA polymerase を用いて、pMT2 VIII プラスミド全体を一周増幅させる PCR を行った。PCR 条件は、95°C 30 秒の後、95°C 30 秒、55°C 1 分、68°C 20 分を 12 サイクル行った。PCR 産物は DpnI で 37°C 1 時間の制限酵素処理反応を行い、処理後の PCR 産物 1 μl を、Competent high DH5α (TOYOBO) にトランスフォーメーションした。LB 寒天培地 (Invitrogen) に発育したコロニーを採取し、コロニーの PCR 産物をテンプレートとし、Thermo Se-

quenase[®] core sequencing kit (Amersham) を用いてジデオキシ法によるダイレクトシーケンシスを行った。解析には HITACHI SQ5500E シークエンサーを用いて点変異を確認した。変異が確認できたコロニーは、QIAprep[®] Maxi Kit (Qiagen) にて変異プラスミド精製を行った。精製した変異体プラスミドは、さらにダイレクトシーケンシスにより変異の確認を行った。

2. リコンビナント FVIII の合成

リポフェクタミン試薬 (Invitrogen) を用いて、野生型 (Wild Type, WT) の pMT2 VIII プラスミドと、作製した D116N 変異体を HEK293 細胞に一過性発現させた。トランスフェクション 48 時間後にそれぞれの培養上清 (Conditioned Medium, CM) を採取し、測定までは -80°C に凍結保存した。

3. FVIII 活性 (FVIII: C) と抗原量 (FVIII: Ag) の測定

FVIII: C は、自動血液凝固能測定装置 (ACL9000, Instrumentation Laboratory) に、APTT 試薬 (IL-test[™], Instrumentation Laboratory) と FVIII 欠乏血漿 (George King) を用いて凝固一段法で測定した。FVIII: Ag はポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ EIA 法 (ASSERACROM[®] FVIII: Ag (Roche Diagnostica Stago)) を使用して測定した。

4. 免疫沈降法と SDS-PAGE、イムノプロット法による FVIII タンパクの解析

CM 中のリコンビナント FVIII を抗ヒト FVIII ポリクローナル抗体と反応後、FVIII-抗体複合体をプロテイン A セファロースで免疫沈降させた。終濃度 1 単位/ml の α-トロンピンを添加し 37°C 30 分で処理したりコンビナント FVIII を 2/15 ポリアクリルアミドゲル (PAG ミニ「第一」、第一化学薬品) で SDS-PAGE 電気泳動した。電気泳動したゲルは PVDF 膜 (Immobilon-P, MILLIPORE) にプロットし、抗 FVIII A2 ドメインモノクローナル抗体を反応させ、リコンビナント FVIII の性状を観察した。HRP 基質はコニカイムノステインを用いて発色した⁹⁾。

5. 変異 FVIII の N-Glycanase[®] 処理

WT と変異体リコンビナント FVIII にそれぞれ等量の FVIII 欠乏血漿を混和することで、生理的狀態に近づけた上で、N-Glycanase[®] (Glyko) を反応させた。N-Glycanase[®] と反応後、経時的に FVIII: C の変化を凝固一段法で測定した¹⁶⁾¹⁷⁾。

結 果

FVIII 変異体の作製

QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて血友病 A 遺伝子変異である、血液凝固第 VIII 因子の D116N 変異遺伝子を含むプラスミドを作製した。Fig. 1 に示す DNA のダイレクトシーケンスの結果、目的の遺伝子変異 (gat → aat) が正しく導入されていることが確認された。

変異 FVIII の発現型

FVIII 変異体 D116N についてトランスフェクシ

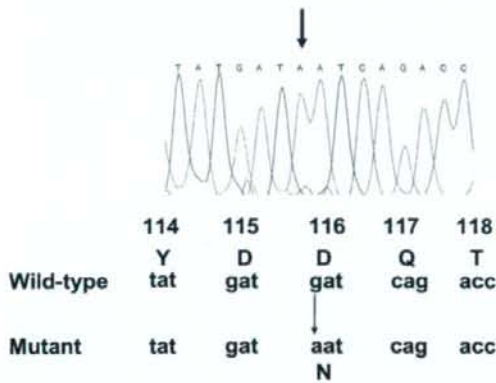


Fig. 1 DNA sequencing electropherogram showing the pMT2-FVIII-D116N mutant. After the pMT2-FVIII-D116N mutant was constructed using QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, nucleotide sequence analysis identified g to a mutation, which causes the FVIII-D116 (gat) to N116 (aat) substitution.

ン 48 時間後の CM の FVIII : C、FVIII : Ag を測定した。3 回の異なるトランスフェクションにおける結果を Fig. 2 に示す。WT に対して、D116N は FVIII : C が $1.8 \pm 0.7\%$ 、FVIII : Ag が $120.9 \pm 25.5\%$ であった。D116N はほぼ正常の抗原量であるが、活性は著しく低下しており CRM⁺ であることが確認された。

変異 FVIII のイムノプロット解析

リコンビナント FVIII のイムノプロット解析を Fig. 3 に示す。抗 A1 モノクローナル抗体では、FVIII の構造変化により A1 フラグメントを認識することができないと考えられるため、抗 A2 モノクローナル抗体を用いて評価を行った。90 kDa の A1-A2 フラグメントと 43 kDa の A2 フラグメントのどちらも同時に検出することができるように、トロンピンによる FVIII 処理を不十分な条件で行った。WT も変異体も同様に 90 kDa の A1-A2、43 kDa の A2 フラグメントが検出された。よって、変異体の A1 ドメインも電気泳動上の易動度に差は無いと考えられた。

変異 FVIII の N-Glycanase® 処理

アスパラギン酸 116 がアスパラギンに置換されると、116 番残基には新しく N-linked glycosylation (糖鎖) が生ずる可能性がある。この変異において新しい糖鎖が出現し、かつ FVIII : C の低下に影響しているかどうかを検討するために、糖鎖を切断する酵素である N-Glycanase® にて変異体を処理した後、経時的に FVIII : C を測定した (Fig. 4)。WT では N-Glycanase® 処理 30 分後に、約 2 倍の活性の上昇を認めたが、その後、徐々に活性は低下した。D116N でも同様に N-Glycanase® 処理後に軽度の活性上昇を認めた

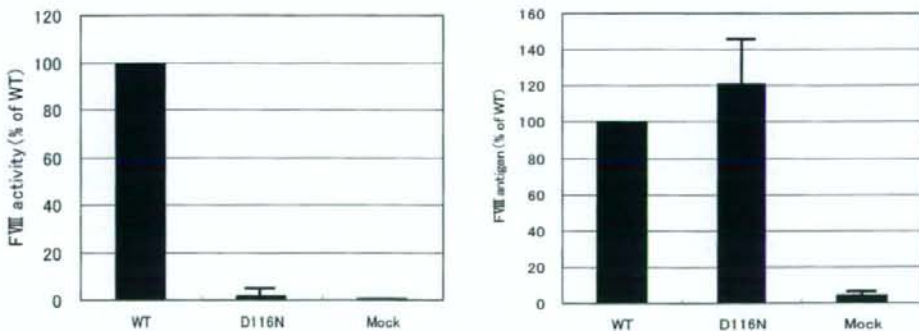


Fig. 2 The activity and antigen of recombinant FVIII. Conditioned medium (CM) of wild type (WT) and D116N mutant FVIII were harvested at 48 hours posttransfection for FVIII assay. The activity and antigen in the CM were measured by one stage clotting assay and ELISA utilizing anti-FVIII light chain monoclonal antibody, respectively. Data are expressed as percentages of WT. Bars indicate means \pm standard deviation of three independent transfection experiments. The mock column indicates cells that did not receive plasmid DNA.

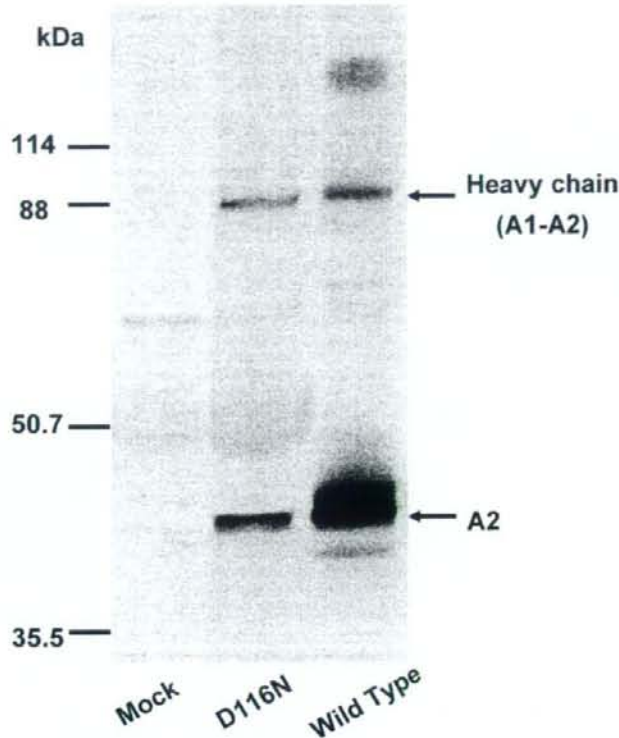


Fig. 3 Immunoblotting analysis of recombinant FVIII.

WT and D116N recombinant FVIII immunoprecipitated by anti-FVIII polyclonal antibody from conditioned medium were analyzed by SDS-PAGE after adequate thrombin digestion. Protein was transferred to PVDF membrane by Western blotting. The membrane was reacted with anti-FVIII A2 monoclonal antibody. The mock column indicates cells that did not receive plasmid DNA. Molecular weight size markers are shown on the left. A1-A2 and A2 fragments are indicated on the right.

が、徐々に活性の低下が観察された。

考 察

血友病 A は先天性凝固障害症の中では最も頻度が高く、出血症状も重篤であり、古くより多くの研究者や臨床家の研究の対象となってきた。しかし血漿含有量が 200~300 ng/ml と非常に少なく、不安定な FVIII タンパクの精製や生化学的解析は 1980 年代前半まで難航していた。cDNA が明らかにされて以来、リコンビナント技術を用いた FVIII 発現実験における研究成果は、より安全な血友病 A の治療薬開発にも大きく貢献することとなった。遺伝子解析において明らかにされている血友病 A 患者の変異 FVIII の合成と解析により、その遺伝子型と発現型との関係の確認が可能となったことで、より確実な病因遺伝子の特定が行えるようになった。さらに、そこから機能上重要な役割を持っている部位を推定し、その部位に人工的に変異

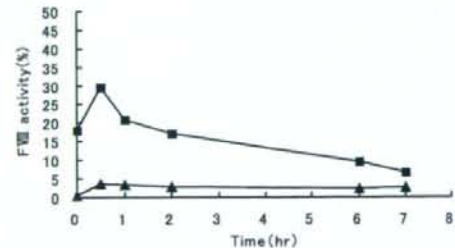


Fig. 4 Effect of N-Glycanase for D116N mutant FVIII.

FVIII (WT: ■, D116N: ▲) in conditioned medium with an equal volume of FVIII deficient plasma was incubated with N-glycanase. FVIII activity after increasing times (0, 0.5, 1, 2, 6, 7 hours) was determined by one stage clotting assay.

を作り出すことによって、FVIII の構造と機能の精密な解析が行われている¹⁸⁾。

いままでの変異体作製技術では、目的とする変異部位を制限酵素にてとりだし、ミスマッチ PCR により

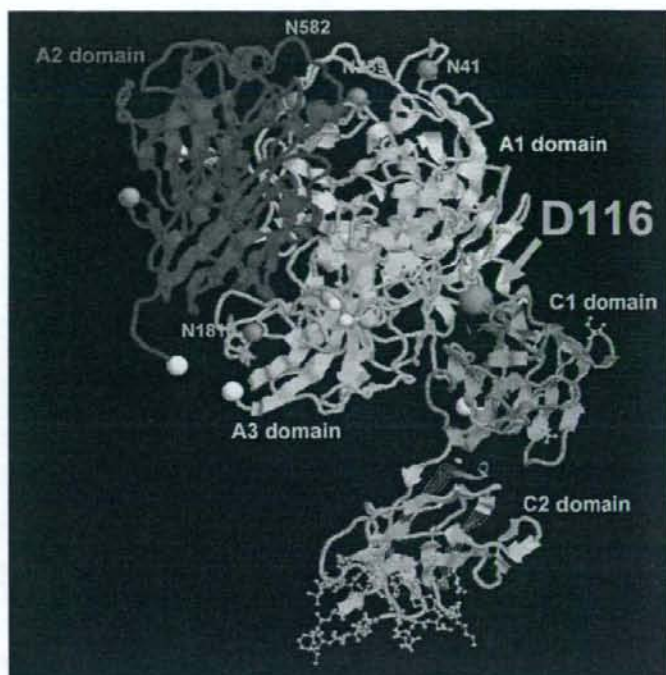


Fig. 5 Location of D116 with FVIII 3-dimensional structure model.

The FVIII molecule model was constructed based on the crystal structure of FIXa, the membrane-bound FVIII structure, and the FIXa/FVIIIa binding sites by Stoilova-McPhie et al.²¹⁾. The FVIII molecule model is illustrated using RasMol. The lower part of the figure shows a phospholipid membrane. The mutation site D116 is represented with a large red spacefill. A1, A2, A3, C1 and C2 domains are shown as pink, purple, orange, brown and violet, respectively. Asparagine residues known to be glycosylated (N41, N239, N582, N1810, and N2118) are represented with sky-blue spacefills.

変異を作成した後、元のプラスミドにライゲーションする必要があった。しかし、従来のこの方法では変異部位をとりだすための制限酵素は、そのプラスミドにおいて1ヶ所のみを切断するものを選択する必要があり、変異を作製する部位によっては、制限酵素の選択が困難になる場合がある。これに比較すると本研究で用いた QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit は、変異部位のミュータジェニックプライマーを作製するだけで、ワンステップで変異体を作製することができる簡便な方法である。しかし、本法ではプラスミドを全周にわたって PCR することができなければ変異体を作製できない。FVIII の cDNA は全長で 7.2 kb と長く、それを含むプラスミド自体は 12 kb にも及ぶため、本法にて変異体を作製することが可能かどうかは不明であり、今までに報告は無かった。本研究においてフルレングスの FVIII でも本法で変異体を作製できることが確認できた。タンパク質の機能解析の方法として、多部位のアミノ酸をアラニンに変異さ

せ、多種類の変異体を作製して比較検討するアラニンスキャンニング法がある。このように多くの変異体を作製する時には、このワンステップの方法は大変有意義である。今後、FVIII においても制限酵素選択にしばられること無く、本法を用いて多くの変異体の作製、検討が行えるようになると考えられる。

今回作製した D116N 変異は、柴田ら¹⁹⁾の報告した重症血友病 A 患者に見出された遺伝子変異である。患者血漿の FVIII : C は 1% 未満、FVIII : Ag は 50% と報告されている。本研究において、リコンビナント FVIII の D116N 変異体も患者血漿同様に CRM⁺ の表現型を示したことから、この D116N 変異が本患者に血友病 A を惹き起こしている病因遺伝子として確認された。2006 年 1 月現在、血友病遺伝子変異の世界的データベース²⁰⁾には他に D116N の報告は無く、同部位のグリシンへの変異が 1 例報告されているのみである。

D116N ではアスパラギン酸 116 がアスパラギンへ

置換されることで、Asn-X-Thrのアミノ酸配列となり、新たにN-glycosylation部位が出現する。今までにIle566ThrとMet1772Thrの2症例で、SDS-PAGEにおける易動度の違いやN-Glycanase®処理によるFVIII活性の上昇から、この余剰糖鎖の付加が確認されている¹⁶⁾。本研究では、イムノブロット解析においてA1フラグメントを直接確認することはできなかった。しかし、A1-A2フラグメントとA2フラグメントにおいてWTと差が無かったことから、間接的な証明であるがD116Nでは糖鎖付加による分子量の増大に伴う易動度の変化は無いと考えられた。そこで、さらなる確認のためにN-Glycanase®処理によるFVIII活性の変化により推測することとした。酵素処理直後にごく軽度のFVIII活性上昇が認められたが、これはWTにおいても認められたもので、N-Glycanase®による非特異的な反応であり、また糖鎖処理が充分行われたと考えられる。N-Glycanase®処理により明らかなFVIII活性の上昇は得られなかったことから、D116Nには新しい糖鎖は付加されていないことが示唆された。前述の2症例では、実際に糖鎖結合部位となるアスパラギンにはアミノ酸置換は無く、ともに2残基C末端側のスレオニンへの置換により新たな糖鎖結合が生じている。D116Nでは糖鎖結合部位の条件は満たしているが、結合部位となるアスパラギン自体が新たに出現したものであることが、糖鎖結合を引き起こさない原因かもしれない。上記のアミノ酸配列以外に、糖鎖結合を制御するメカニズムの存在が疑える。

柴田らは患者血漿の解析において、抗A1抗体を用いたELISA法ではFVIII抗原量を測定できず、WB法では抗A1抗体、抗A2抗体ともにFVIII重鎖を認識できないため、本変異はA2ドメインの立体構造に変化を及ぼしていると報告している¹⁹⁾。本研究で用いた抗A2モノクローナル抗体ではFVIII重鎖を認識することができた。これは、抗体のエピトープ部位の差異のためと考えられる。我々が使用した抗体では異なる結果であったが、D116NはA1ドメイン内の変異でも抗A2ドメイン抗体の反応性に影響を及ぼすような立体構造の変化をもたらしている可能性は残される。FVIIIの立体構造モデルをFig.5に示す²⁰⁾。モデル上、D116は軽鎖のA3やC1ドメインと近傍で、A2ドメインとは比較的離れた位置にある。近年、FVのカルシウム結合領域と相同性のあるFVIII A1ドメイン内110-126残基領域はFVIIIのカルシウム結合部位であることが提唱された²²⁾⁽²³⁾。D116Nは離れた部位である

A2ドメインの立体構造をも変化させる変異であると考えられることから、より近傍である軽鎖とのカルシウム結合に大きく影響を与えていることが示唆される。このカルシウム結合への影響が、FVIII活性の低下をもたらしていることが推測される。

カルシウム結合がどのように阻害されるのかはまだ明らかにされていない、さらに詳細な検討によってその分子病態が明らかにされることが、今後より高活性で安定性のある新しいFVIII治療薬の開発に寄与することを期待する。

結 論

血友病A患者に認められた第VIII因子重鎖内のミスセンス変異Asp116Asnが発現実験により、病因遺伝子異常であることを確認した。本変異の活性低下要因は新しい糖鎖付加によるものではなく、構造変化に伴うカルシウム結合性の低下によることが示唆された。

謝 辞

材料を快く提供していただいたDr. Kaufmanに心より感謝いたします。また、本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「血友病の治療とその合併症の克服に関する研究」を用いて行った。

文 献

- 1) Lazarichick J, Hoyer LW: Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen. *J Clin Invest* 62: 1048-1052, 1978
- 2) Peake IR, Bloom AL, Giddings JC, Ludlam CA: An immunoradiometric assay for procoagulant VIII antigen: results in haemophilia, von Willebrand's disease and fetal plasma and serum. *Br J Haematol* 42: 269-281, 1979
- 3) Denson KWE, Briggs R, Haddon ME, Barrett R, Cobb K: Two types of haemophilia (A+ and A-): a study of 48 cases. *Br J Haematol* 17: 163-171, 1969
- 4) Hoyer LW, Breckenridge RT: Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII): cross-reacting material in a genetic variant of hemophilia A. *Blood* 32: 962-971, 1968
- 5) McGinnis MJ, Kazazian HH Jr, Hoyer LW, Bi L, Inaba H, Antonarakis SE: Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics* 15: 392-398, 1993
- 6) Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB,

- Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM: Molecular cloning of cDNA encoding human anti-hemophilic factor. *Nature* **312**: 342, 1984
- 7) Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ: Structure of human factor VIII. *Nature* **312**: 337-342, 1984
 - 8) Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ: Synthesis processing and secretion of factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* **263**: 6352-6362, 1988
 - 9) Pittman DD, Tomkinson KN, Kaufman RJ: Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells. *J Biol Chem* **269**: 17329-17337, 1994
 - 10) Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA: Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor X a and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* **25**: 505-512, 1986
 - 11) Lollar P, Parker ET: Structural basis for the decreased procoagulant activity of human factor VIII compared to the porcine homolog. *J Biol Chem* **266**: 12481, 1991
 - 12) Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM: Human factor VIIIa subunit structure. *J Biol Chem* **266**: 8957, 1991
 - 13) Kaufman RJ: Vectors used for expression in mammalian cells, in Goeddel DV (eds): *Methods in Enzymology* (vol. 222). San Diego, CA, Academic Press, p. 487, 1990
 - 14) Lei Z, Ulrich B, Jean-Louis R: An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research* vol. **32** no. 14: e115, 2004
 - 15) Auvray P, Nativelle C, Bureau R, Dallemagne P, Seralini GE, Sourdaine P: Study of substrate specificity of human aromatase by site directed mutagenesis. *Eur J Biochem* **269**: 1393-1405, 2002
 - 16) Aly AM, Higuchi M, Kasper CK, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Hoyer LW: Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Medical Sciences* **89**: 4933-4937, 1992
 - 17) Amano K, Sarkar R, Pemberton S, Kemball-Cook G, Kazazian HH Jr, Kaufman RJ: The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII. *Blood* **91**: 538-548, 1998
 - 18) 天野景裕: 血友病 A の分子病理—異常第 VIII 因子の発現研究の成果—。血栓止血誌 **9**: 344-360, 1998
 - 19) 柴田 優、嶋 緑倫、田中一郎、西尾克己、福田和由、鈴木 博、野上恵嗣、櫻井嘉彦、吉岡 章: 第 VIII 因子重鎖 A1-A2 ドメインの構造変化をきたした血友病 A CRM+ 症例。日本血栓止血学会誌 **12**: 377, 2000
 - 20) Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AL: The factor VIII structure and mutation resource site: HAMSTeRS at <http://europium.csc.mrc.ac.uk/>
 - 21) Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A: 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* **99**: 1215-1223, 2002
 - 22) Wakabayashi H, Su Y, Ahmad SS, Walsh PN, Fay PJ: A Glu 113 Ala mutation within a factor VIII Ca²⁺-binding site enhances cofactor interactions in factor X ase. *Biochemistry* **44**: 10298-10304, 2005
 - 23) Wakabayashi H, Freas J, Zhuo Q, Fay PJ: Residues 110-126 in the A1 domain of factor VIII contain Ca²⁺-Binding Site required for cofactor activity. *J Biol Chem* **279**: 12677-12684, 2004

The molecular basis for hemophilia A due to missense mutation (Asp116Asn) within the A1-domain of factor VIII

Taito UCHIDA, Kagehiro AMANO, Keiko SHINOZAWA
Hiroshi INABA, Katsuyuki FUKUTAKE

Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University

Abstract

Factor VIII (FVIII) is the protein that is defective in the bleeding disorder hemophilia A. Some patients have normal amounts of a dysfunctional FVIII protein and are termed cross-reacting material (CRM)-positive. To investigate the molecular basis of the genetic defects within the A-domain, we constructed an Asp116Asn mutation of FVIII gene that was previously reported in a patient. Mutant was made by a site-directed mutagenesis kit. Wild-type (WT) and mutant FVIII molecules were transiently expressed in HEK293 cells. Conditioned medium (CM) was assayed for clotting activity and antigen levels (ELISA utilizing anti-FVIII light chain monoclonal antibody). FVIII activity and the antigen of this mutant (% of WT) were $1.8 \pm 0.7\%$, $120.9 \pm 25.5\%$, respectively. The phenotype of Asp116Asn was confirmed as CRM-positive. To test whether this mutant would make a new glycosylation site, SDS-PAGE analysis was performed. A2 fragment and the 90 kDa A1-A2 heavy chain of Asp116Asn were detected in the same way as WT by immunoblotting using anti-FVIII A2 domain monoclonal antibody, indicating the mobility of A1 fragment was not reduced. We speculate that there is no additional glycosylation in this mutant FVIII. We then analyzed the FVIII clotting activity after incubation with N-glycanase, to identify whether removal of additional glycosylation would increase FVIII activity of this mutant. N-glycanase digestion did not increase the activity, suggesting no new N-glycosylation in this mutant. These results suggest that the defect in the Asp116Asn is not due to a formation of new N-glycosylation, but may be caused by altering the conformation of the recently proposed calcium binding site.

<Key words> Hemophilia A, Missense mutation, Factor VIII

日本の血友病類縁疾患患者の入院医療コストの集計： 多施設共同研究

藤井輝久^{*1}, 高田 昇^{*1}, 日笠 聡^{*2}, 酒井道生^{*3},
竹谷英之^{*4}, 櫻井嘉彦^{*5}, 花房秀次^{*6}, 小阪嘉之^{*7},
天野景裕^{*8}, 嶋 緑倫^{*5}, 吉岡 章^{*5},

8施設の血友病患者の入院医療コストを集計し、その特徴と診断群分類(DPC)点数表の導入に対する問題点を考察した。2002年4月から2004年3月までの8施設における患者の各入院に対し、血友病の種類、体重、インヒビターの有無、手術の有無、入院日数、請求点数などを集計した。さらにそれらのデータからそれぞれの因子により請求点数を解析し、どの因子が請求点数に関与しているか統計学的検定を行った。入院日数、請求点数は施設間にばらつきがみられ、施設別1日あたりの平均医療コストは最少が124,110円、最大が222,080円であった。体重別では25kg未満127,280円、25-50kg 210,720円、50-75kg 280,861円、75kg以上526,958円で有意差がみられた。インヒビターの有無(524,416円、147,534円)でも有意差がみられた。2004年度の血友病類縁疾患のDPC導入案と比較すると、全施設で病院側の赤字になることが分かった。以上より、血友病患者の入院医療コストは患者の体重や状態により多種多様で、安易にDPCを導入することは問題と思われた。

Key words: hospital charges for hemophiliacs, Diagnosis Procedure Combination (DPC), comprehensive costing, inhibitor, total infusion dose

- ^{*1}広島大学病院輸血部〔〒734-8551 広島市南区霞1-2-3〕
Division of Blood Transfusion Services, Hiroshima University Hospital〔1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima City, Hiroshima 734-8551, Japan〕
Tel: 082-257-5580 Fax: 082-257-5584 e-mail: teruchan@hiroshima-u.ac.jp
- ^{*2}兵庫医科大学血液内科〔〒663-8501 西宮市武庫川町1-1〕
Department of Hematology, Hyogo College of Medicine〔1-1, Mukogawa-cho, Nishinomiya City, Hyogo 663-850, Japan〕
- ^{*3}産業医科大学小児科〔〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1〕
Department of pediatrics, University of Occupational and Environmental Health, Japan〔1-1, Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyusyu City, Fukuoka 807-8555, Japan〕
- ^{*4}国立病院機構福井病院リハビリテーション科〔〒914-0195 敦賀市桜ヶ丘町33-1〕
Department of Rehabilitation, Fukui National Hospital〔33-1, Sakuragaoka-cho, Tsuruga City, Fukui 914-0195, Japan〕
- ^{*5}奈良県立医科大学小児科〔〒634-8522 橿原市四条町840〕
Department of Pediatrics, Nara Medical University〔840, Shijo-cho, Kashihara City, Nara 634-8522, Japan〕
- ^{*6}荻窪病院血液科〔〒167-0035 杉並区今川3-1-24〕
Hideji Hanabusa, Department of Hematology, Ogikubo Hospital〔3-1-24, Imagawa, Suginami-ku, Tokyo 167-0035, Japan〕
- ^{*7}兵庫こども病院血液腫瘍科〔〒654-0081 神戸市須磨区高倉台1-1-1〕
Department of Hematology and Oncology, Hyogo Prefectural Kobe Children's Hospital〔1-1-1, Tkakuradai, Suma-ku, Kobe City, Hyogo 654-0081, Japan〕
- ^{*8}東京医科大学臨床検査医学科〔〒160-0023 新宿区西新宿6-7-1〕
Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University〔6-7-1, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan〕
- 受付日: 2006年4月18日 受理日: 2006年6月8日

1. 緒言

2003年度4月より大学病院をはじめとする82の特定機能病院は, 入院医療コストの出来高払いに替わって, 「診断群分類」(DPC) 点数表による基づく包括払いを導入した¹⁾. この包括払いのシステムは徐々に普及し, 現在では国公立, 私立を問わず大学病院や, 国立病院機構, 一般の総合病院も広く採用されている.

DPCは, WHO(世界保健機関)が定めたICD-10(疾病及び関連保険問題の国際統計分類第10回修正)に基づく16の診断群に属する約600の基礎疾患が根幹であり, それを入院理由, 重症度, 年齢, 手術・処置の有無, 副病名などで1,727に分類したものである. そのため患者数が少ない, 入院機会が少ない, あるいは入院医療コストのばらつきが多い疾患ではDPCの作成が困難であり, 稀少疾患に対してはDPCから除外され包括対象外の疾患となる. それを受けて2003年度包括払いが開始した当初は, 血友病類緑疾患も包括対象外となっていた. しかし2004年度に血友病類緑疾患に対するDPCの導入が検討された際, 1日請求点数は入院理由, 重症度, 年齢, 副病名に関わらず一律7日まで12,959点(129,590円)と設定された. これでは凝固第Ⅷ, IX因子製剤1,000単位2パイアル分の医療コストよりも安く, この案では血友病類緑疾患患者の入院治療は大きな赤字にな

ることが容易に予測され, 結局DPC導入は見送られた.

我々はこういった経緯や医療経済状況を踏まえた上で, 日本血栓止血学会 血友病標準化検討部会(現在の日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会)の委託を受け, 多施設の血友病類緑疾患患者の入院医療コスト(以下, コスト)を集計することで, 果たして血友病類緑疾患がDPC導入すべき疾患かどうか検討した. さらに我々は, 血友病類緑疾患患者のコストの特徴とDPC導入に関する問題点も考察した.

2. 対象および方法

本調査の参加者はTable 1のとおり8施設である. 2002年4月から2004年3月の間に各施設に入院した血友病類緑疾患患者のべ507名の各入院に対し, 血友病の種類, 体重, インヒビターの有無, 手術の有無と内容, 在院日数, 使用凝固因子製剤とその輸注量, コストなどを集計した. 集計した全てのデータについて, 血友病の種類, 体重(25kg毎に4群に分類), インヒビターの有無, 手術の有無により分類し, 在院日数と入院医療コストについて, どの因子がそれらに関与しているか, Excelのアドイン統計ソフトStatcelを用いて統計学的検定を行った. データはほとんどが正規分布しないため, ノンパラメトリック検定を行った. 具体的には,

Table 1 Collaborating investigators and institutions

Institution No.	Institution	Investigators
1	Division of Blood Transfusion Services, Hiroshima University Hospital	Teruhisa FUJII
2	Department of Hematology, Hyogo Collage of Medicine	Satoshi HIGASA
3	Department of pediatrics, University of Occupational and Environmental Health	Michio SAKAI
4	Department of Rehabilitation, Fukui National Hospital	Hideyuki TAKEDANI
5	Department of Pediatrics, Nara Medical University	Yoshihiko SAKURAI
6	Department of Hematology, Ogikubo Hospital	Hideji HANABUSA
7	Department of Hematology and Oncology, Hyogo Prefectural Kobe Children's Hospital	Yoshiyuki KOSAKA
8	Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University	Kagehiro AMANO

Table 2 Summary of hospitalized patients in 8 institutions from April 2002 to March 2004

No	Number of patients	Number of operated patients	Patients' age (y) median, range	Patients' weight(kg) median, range	Cumulative days of hospitalization	Hospital days per admission mean \pm SD, median; range	Cumulative hospital charges (yen)	Monthly hospital charges (yen) mean \pm SD, median; range	Daily Hospital charges* (yen) mean; median, range
1	9	4	32 23-67	65 47-105	289	32.1 \pm 33.4 15; 4-90	37,139,430	2,063,300 \pm 1,853,980, 1,762,570; 34,320-6,259,530	128,510; 211,910 56,920-409,020
2	50	18	51 17-77	65 50-88	1702	29.1 \pm 45.4 21; 2-310	309,495,250	2,714,870 \pm 4,341,830, 1,630,170; 79,640-27,625,170	181,840; 117,570 16,710-1,038,070
3	37	5	44 4-74	52 19-89	611	15.8 \pm 11.6 14; 3-58	107,125,490	1,912,960 \pm 313,510, 1,068,600; 19,090-11,353,240	175,330; 137,970 23,520-216,1080
4	52	43	43 13-57	58 40-95	3582	68.9 \pm 67.3 56; 2-327	490,199,570	3,380,690 \pm 3,891,890, 2,664,240; 32,930-42,203,330	136,850; 131,240 8,760-654,960
5	84	14	22 0-82	48 10-81	1597	19.0 \pm 24.8 14; 2-144	318,829,040	2,452,530 \pm 4,250,630, 1,294,050; 19,380-28,291,350	199,640; 107,040 9,470-4,496,460
6	116	11	2 2-70	9 12-107	56	11.4 \pm 22.8 5; 1-183	292,917,060	2,034,150 \pm 2,763,970, 1,083,090; 36,270-22,719,950	222,080; 168,950 19,150-3,288,450
7	22	0	2 0-12	16 3-50	208	9.4 \pm 8.3 6; 3-37	25,878,710	1,176,260 \pm 2,149,840, 163,680; 40,560-9,533,690	124,110; 22,400 5,300-1,361,950
8	136	21	39 2-79	56 12-104	2835	21.9 \pm 22.4 15; 3-140	434,789,350	2,229,690 \pm 3,236,020, 955,190; 12,990-21,364,590	153,360; 80,360 2,590-1,350,330

*: These values are calculated as followed. "The mean value" is "Cumulative hospital charges"/"Cumulative days of hospitalization". The median values and ranges are induced by "Hospital charges"/"hospital days" in the individual patient.

2群間の比較には Mann-Whitney 検定を用い、3群以上の比較には Kruskal-Wallis 検定後、Bonferroni 補正 Mann-Whitney 検定で総当たり比較を行った。危険率5%未満を「仮説の棄却域」つまり「有意差あり」とした。

3. 結果

1) 各施設のデータの概要 (Table 2) と比較

8施設のうち施設番号1, 2, 4, 8は、主に血液内科、整形外科が血友病類群疾患を診療している施設で、他の施設は主に小児科が診療を行っている。そのため施設間での患者の年齢にばらつきがあり、施設5, 6, 7は他の施設に比べ低年齢の患者が多かった。しかし、小児科が診療をしているにもかかわらず、施設3, 6においてはその年齢分布は大きく中央値も20を越えていた。すなわち一部の施設では、成人になっても小児科でそのまま診療を続けられている現状が明らかになった。体重は他施設に比べ施設7で低かったが、それ以外の施設では差を認めなかった。

各施設とも手術は行っていたが内容は様々であり、見解の統一が必要であった。そのため各

施設で見解の相違があったもののうち、「穿刺 (例：中心静脈カテーテル挿入や腹水穿刺、関節穿刺)」「消化管内視鏡的処置 (例：ポリペクトミー)」は処置、「生検 (例：肝生検)」「抜歯」は手術とした。手術患者数は、施設4で他施設に比べ圧倒的に多かった (43/52名, 82.7%)。

また入院目的 (入院の理由) は、施設4で「人工関節置換術」が多かったが、他施設では様々であった。頭蓋内出血、腹腔内出血、消化管出血などの死亡する危険のある出血での入院のみならず、腸腰筋出血や難治性筋肉内出血・関節内出血、あるいは合併症 (例：C型肝炎や HIV 感染症) の治療などの入院も多く見られた。また小児科の入院では、内科に比べ在宅・自己注射管理導入などの教育入院が多いことも特徴であった。

在院日数、月当たりのコスト、1日当たりのコストは施設間はもとより、同一施設内でも患者により大きなばらつきが見られ、どれも正規分布にならなかった。また各施設の最大値、最小値、中央値もばらつきが大きく、中央値で施設間を比較すると、在院日数で最大11.2倍 (施設4と6)、月当たりのコストで最大16.2倍 (施設4と7)、1日当たりのコストで9.5倍 (施設

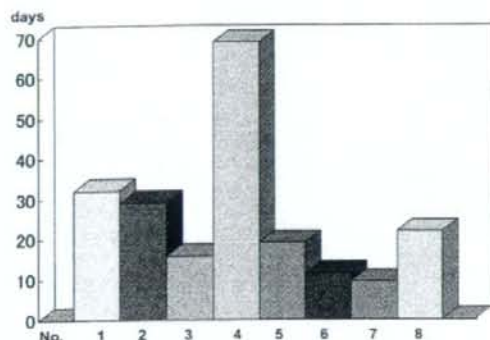


Fig. 1 Mean hospital days per admission in 8 institutions. Mean hospital days (MHD) in No.4 is statistically longer than those in any other institutions. MHD in No.2 is statistically longer than that in No.6.

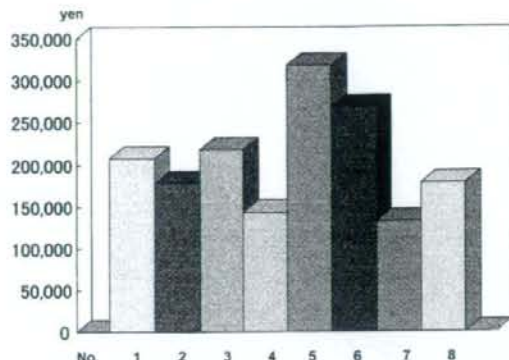


Fig. 2 Mean hospital charges per day in 8 institutions. Mean hospital charges per day (MHCD) in No.5 is statistically higher than those in another 4 institutions except for No.1 and No.6. MHCD in No.6 is statistically higher than that in No.4.

1と7)の差があった。在院日数や、月当たりのコスト、1日当たりのコストは全施設で、中央値の方が平均値より低かった。その理由として一部の患者は長期入院を余儀なくされ、それに伴いコストも掛かり平均値を上げている現状があると思われた。

各施設の平均在院日数、1日当たりの平均コストを算出したが(在院日数9.4~68.9日; Fig. 1, 1日当たりのコスト124,110~222,080円; Fig. 2), 施設間での較差が目立った。各施設別の在院日数、1日当たりのコストをKruskal-Wallis検定で比較検討すると、施設4は他施設に比べ有意に在院日数が長かった。また施設7は施設4のみならず、施設1, 2, 8と比べても有意に在院日数は短かった。

1日あたりのコストでは、施設6は施設5以外の全ての施設より有意に高かった。また施設4と7は施設6に比べても有意に低かった。

2) 全患者における各種パラメーターでの比較

全てのデータをMicrosoft Excelを用いて統合し、血友病の種類、体重、インヒビターの有無、手術の有無により在院日数と1日当たりのコストを集計、比較検討をした(Table 3)。

血友病の種類は、A(後天性血友病を含む)、B、その他(フォン・ヴィレブランド病や他の

凝固因子異常症)の3群に分類して母集団とし、その母集団の在院日数や1日当たりのコストの基礎統計量を算出し比較した。在院日数は、A, B、その他でそれぞれの群が他群に対し有意差が見られたが、1日当たりのコストはAとBでは差はなく、その他のみが低かった。

体重は25kg毎に4群に分類して母集団とした。体重が重い群ほど在院日数は長く、1日当たりのコストも高くなった。特に75kg以上の群では最大値が107kgであったが、50~75kgの群と1日当たりのコストを比較すると約1.88倍多かった。

インヒビターの有無であるが、凝固因子に対する自己抗体を有する患者、いわゆる後天性血友病は全て“インヒビター有”とした。このように分けると、507名中98名がインヒビターの有る患者の入院であった。また98名のうち後天性血友病を除くと94名となり、全入院に対するインヒビターを保有する患者の入院は18.5%となった。一方、本邦でのインヒビターを保有する患者の割合は、血友病Aで5%、血友病Bで3%と報告されている²⁾ことから、インヒビターの有る患者は無い患者に比べ、入院機会が数倍高いことが示唆された。在院日数と

Table 3 The comparison of hospital days' per admission and daily hospital charges' by patients' characteristics

Characteristics	Stratum	No. of patients	Hospital days per admission mean \pm SD (median, range)	Daily hospital charges (yen) mean \pm SD (median, range)
Type ¹⁾	A	374	25.2 \pm 36.9 (12, 1-310)	241,108 \pm 550,141 (113,401; 4,803-4,496,484)
	B	119	20.4 \pm 35.4 (10, 1-327)	240,625 \pm 317,256 (132,348; 2,598-1,1615,453)
	Others ²⁾	14	11.2 \pm 5.3 (11, 4-21)	89,228 \pm 62,897 (58,496; 22,674-208,315)
Weight(kg)	<25	61	9.6 \pm 10.8 (6, 1-53)	127,280 \pm 109,773 (80,868; 5,307-428,762)
	25-50	132	22.0 \pm 27.8 (12, 1-174)	217,025 \pm 511,845 (112,142; 2,598-4,496,484)
	50-75	267	27.1 \pm 39.2 (14, 1-327)	280,861 \pm 532,736 (114,051; 6,286-2,250,150)
	>75	27	32.3 \pm 65.9 (9, 1-310)	526,958 \pm 720,846 (228,279; 23,034-3,288,453)
Inhibitor ³⁾	Positive	98	15.0 \pm 19.9 (8, 1-120)	524,416 \pm 712,763 (234,842; 2,598-4,496,484)
	Negative	409	25.8 \pm 38.9 (13, 1-327)	147,534 \pm 162,298 (103,010; 4,803-1,844,640)
Surgical Operation	Yes	105	52.7 \pm 61.7 (30, 2-327)	251,413 \pm 506,554 (145,524; 8,760-4,496,484)
	No	402	16.2 \pm 19.6 (10, 1-140)	232,380 \pm 495,532 (97,397; 2,598-3,288,453)

¹⁾ Patients with "acquired factor VIII inhibitor" include "A". ²⁾ Others include patients with congenital "coagulation factor" deficiency except for factor VIII or factor IX (ex. von Willebrand disease). ³⁾ Patients with acquired hemophilia include "Positive". ⁴⁾ Statistically different using Mann-Whitney's U test with Bonferroni correction after Kruskal-Wallis H test, $P < 0.05$. ⁵⁾ Statistically different using Mann-Whitney's U test. $P < 0.05$.

1日当たりのコストを比較すると、“有”が“無”に比べ在院日数は短かったが、1日当たりのコストは“有”が“無”の約3.14倍であった。

手術の有無でみると“無”に比べ“有”の方が、在院日数が長くなっていた(無:中央値10日,有:中央値30日)。しかし、1入院当たり、1日当たりのコストは特に差は認めなかった。

3) 1入院当たりのコストとの相関関係

1入院期間内に、プロトロンビン複合体製剤(プロブレックス[®])、活性型プロトロンビン複合体製剤(ファイバ[®])や活性型第VII因子製剤(ノボセブン[®])などのインヒビター用製剤を輸注しなかった285例について、1入院当たりのコストと製剤輸注量との関係を見た。スピアマン順位相関係数0.8927であり、 $P < 0.05$ で有意な正の相関が見られ、製剤輸注量が多いほどコストが高くなることが分かった(Fig. 3)。

同様に1入院当たりのコストと患者体重との関係を見ると、同順位補正相関係数は0.2496であり、製剤輸注量ほどの強い相関は認めな

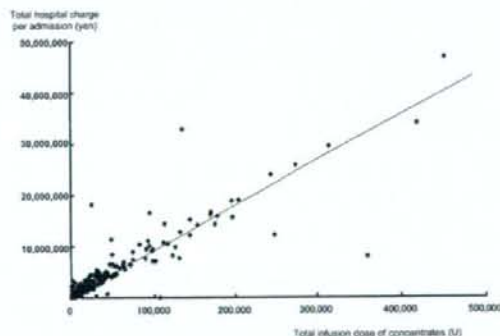


Fig.3 The relationship with total hospital charges and total infusion dose of concentrates. Total hospital charges per admission are positively correlated with total infusion dose of concentrates per admission. $n=285$, $r_s=0.8927$, $Y=8.346X+77959$, $P < 0.05$.

った。目的変数を1入院当たりのコストとし、製剤輸注量と患者体重を重回帰分析すると、そのP値は製剤輸注量が < 0.05 、患者体重が0.202となり、製剤輸注量が1入院当たりのコストを規定していた。

4. 考察

我々は8施設の血友病類縁疾患患者507名の在院日数, コストを分析した。8施設は全国でも血友病類縁疾患を多数診療している, いわば“ヘモフィリアセンター”と呼ぶにふさわしい施設である。しかしこのような専門施設でも, 血友病の在院日数やコストにばらつきが多いことが分かった。また凝固第Ⅷ, IX因子製剤は1,000単位が約7万円と高価であり, 入院当たりのコストと製剤輸注量は強い正の相関を認めため, コストは凝固因子製剤の輸注量によって規定されることが想定された。このことより, 製剤使用量を規定する因子(血友病の種類, 体重, インヒビター有無, 手術の有無)がコストに影響を及ぼすと考えられた。

施設4は, 診療科が整形外科で主に“人工関節置換術”を行っている。そのため手術患者の割合が大きく, 術後のリハビリテーションも同一施設で行うため, 平均在院日数は他の施設に比べ長くなっている。また術後のリハビリテーション期間に定期的な凝固因子補充が行われるものの, 再出血を起こさなければ大量の凝固因子製剤を輸注する機会は少ない。そのため, 手術日や術後数日間は大量に凝固因子製剤を使用するにもかかわらず, その後はコストが掛かる機会が少なく経過するのでコスト減となり, 1日当たりのコストは他施設と差がなくなったと考えられた。8施設のデータを統合し, 手術の有無と在院日数, 1日当たりのコストの関係をみたデータでも同様の結果となり, この推測を支持している。

8施設の統合データについて血友病の種類で見ると, Aの方がBより在院日数は長いものの, 1日当たりのコストはほぼ同じであった。患者数が違うので推測が難しいが, この原因は凝固因子製剤の使用量にあまり差がないためと思われる。“その他”に含まれる他の凝固因子異常症は, 出血エピソードが血友病に比べ少ないこと, 血友病ほどの製剤量を使用しなくても

止血し得ること, フォン・ヴィレブランド病の場合タイプによっては凝固因子製剤を使用しなくてもデスマプレッシンで止血可能であること³⁾⁴⁾, などがコストの低い理由と考えられた。

製剤の輸注量は, 血友病A, B共に体重で規定されている。そのため必然的に体重が多いほど輸注量が多くなり, コストが高くなることが予想されたが, 結果もそのとおりであった。また在院日数も体重が多いほど長くなっている。これは重篤な関節内出血や筋肉内出血を起こすと一時的に臥床状態となり, それから自力移動ができるまで回復するのに期間がかかるからと思われるが, 推定の域を出ない。

インヒビターの有無でみると, “有”が“無”に比べ, 1日当たりのコストは高かった。インヒビター用製剤は, ノボセブ 4.8mgが約30万円, ファイバ1,000単位が約20万円と, 第Ⅷ, IX因子製剤1,000単位と比較して3~4倍である。また1出血エピソードに対する輸注量も多く, 通常関節内出血1エピソードに対して第Ⅷ因子製剤とファイバでその輸注量を比較すると, ファイバの方が1回当たり2倍以上の輸注量を必要とすると報告されている(第Ⅷ, IX因子製剤: 20~40単位/kg/回, ファイバ50~100単位/kg/回)⁵⁾⁶⁾。またノボセブもその半減期の長さ(2~3時間)⁷⁾より, 止血に頻回輸注が必要となり, 結果総輸注量は増える。こういった理由より“有”の方が高いのは当然である。しかしそのコストの差は約3.14倍にとどまっている。一方, 在院日数は“有”が“無”より短かった。この理由として前述したように“有”の方が“無”に比べ入院機会が多いにもかかわらず, 手術を受けた患者の割合が“無”の方が多いたことが挙げられる(有: 手術例中の4.8%)。“無”は手術を受けることができるが, “有”の場合, 止血管理の難しさやコストの問題などで手術が敬遠されがちな現状もあると思われる。

2004年4月に血友病類縁疾患に対してDPCによる包括払い案が作成された(特定入院期間

Table 4 Deficits in 8 institutions if the draft of comprehensive costing using DPC in 2004 were adopted

No	Mean hospital days per admission (day)	Mean hospital charges per day (yen)	Mean Hospital charges per admission (yen)	Mean Hospital charges per admission using DPC in 2004 (yen)	Mean deficit per admission (yen)
1	32.1	128,510	4,125,170	3,427,960	697,210
2	29.1	181,840	5,291,540	3,162,160	2,129,380
3	15.8	175,330	2,770,210	1,824,350	945,860
4	68.9	136,850	9,428,970	6,688,440	2,740,530
5	19.0	199,640	3,793,160	2,157,890	1,635,270
6	11.4	222,080	2,531,710	1,365,740	1,165,970
7	9.4	124,110	1,166,630	1,157,280	9,350
8	21.9	153,360	3,358,580	3,144,440	214,140

45日, A日:7, B日:19, A日までの1日請求点数12,959点, B日までの1日請求点数10,423点, B日以降は8,860点)。しかしこの案では, 血友病の医療コストを規定する凝固因子製剤の使用量が考慮されておらず, 年齢や体重, インヒビターの有無などでの細分類もなされていないものであった。これを今回の各施設に当てはめると (Table 4), 全ての施設で1入院当たり9,350円~2,740,530円の赤字になる。手術は包括対象外になるので, 実際はもう少し赤字幅は小さくなると見込まれるが, 病院経営を脅かしかねないDPC案であった。各関係者からの反対があり, 結局包括対象とすることは見送られたが, 今後も包括対象とするか否かの議論は出てくるものと思われる。ただ, 我々のデータによると, 同じ血友病とは言っても, 入院の目的や体重, インヒビターの有無, 使用製剤によってコストは大きく変動した。それは本邦の患者の10%を越える人数でも正規分布しないデータになることや, 各データの標準偏差の大きさからも伺える。これらより, 血友病類縁疾患を“包括化”することは非常に困難と思われる。

欧米では, 血友病患者に掛かる医療コストを明らかにして, 現在の治療法がコストベネフィットに合うものかどうか検討している文献⁸⁾⁻¹⁰⁾

はあるが, 日本では余りそのような文献はない。しかし, 入院に限っているとは言え, 本研究は日本の血友病の医療コストが明らかにした初めての研究といてよく, その意義は大きい。今後は外来分も含めた医療コストが集計され, 海外のデータと比較検討されるべきである。

文 献

- 1) 医学通信社編集部: DPC点数早見表-診断群分類樹形図と包括点数対象疾患一覧。東京, 医学通信社, 2004。
- 2) 血液凝固異常症全国調査運営委員会: 血液凝固異常症全国調査-平成16年度報告書。東京, (財)エイズ予防財団, 2004。
- 3) Michiels JJ, Gadisseur A, Budde U, Berneman Z, van der Planken M, Schroyens W, van de Velde A, van Vliet H: Characterization, classification, and treatment of von Willebrand diseases; a critical appraisal of the literature and personal experiences. *Semin Thromb Hemost* 31: 577-601, 2005。
- 4) Rodegheiro F, Castaman G: Treatment of von Willebrand disease. *Semin Hematol* 42: 29-35, 2005。
- 5) 長澤俊郎: 血友病 (von Willebrand病を含む)。山口 徹, 北原光夫, 今日の治療指針 2005。東京, 医学書院, 2005, 491-493。
- 6) Barthels M: Clinical efficacy of prothrombin complex concentrates and recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding episodes in patients with factor VII and IX inhibitors. *Tromb Res* 95: S31-38, 1999。
- 7) Brinkhous KM, Hender U, Garris JB, Diness V, Read MS: Effect of recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1382-1386, 1989。
- 8) Carlsson KS, Höjgård S, Lindgren A, Lethagen S, Schulman S, Glomstein A, Tengborn L, Berntorp E, Lindgren B: Costs of on-demand and prophylactic treatment for severe haemophilia in Norway and Sweden. *Haemophilia* 10: 515-526, 2004。