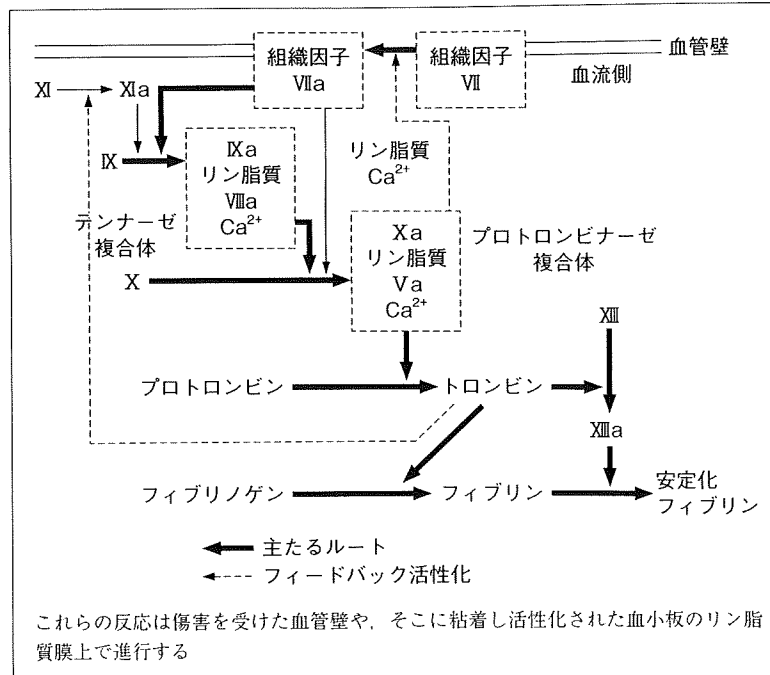


図5 ●血液凝固機構



(白幡聡：凝固線溶系とその制御機構，杉本恒明，矢崎義雄編，内科学，第9版，朝倉書店，東京，2007，p 1570，より引用)

図6 ●血友病の遺伝形式

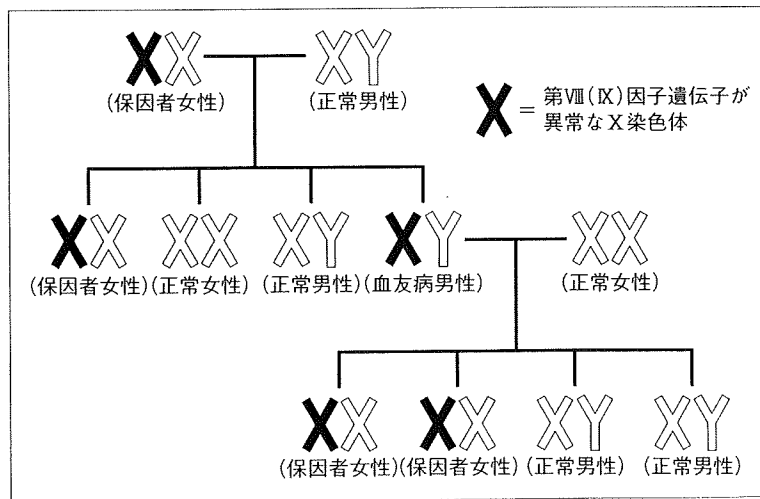
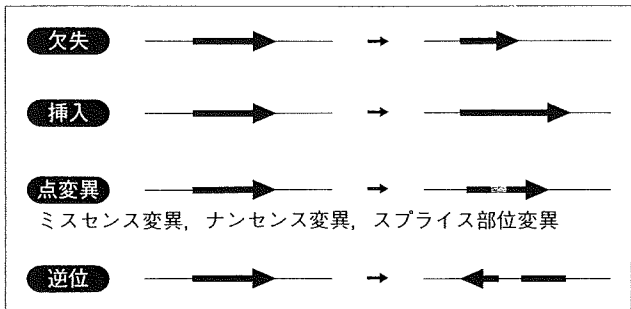
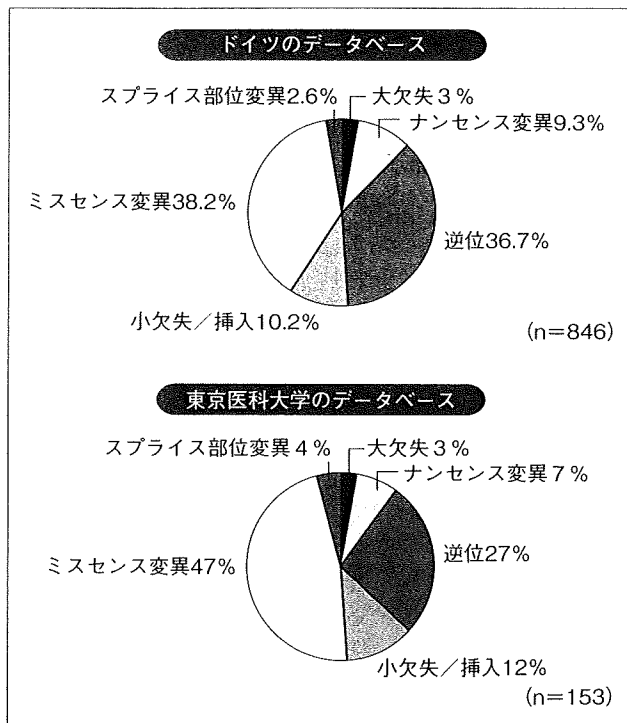


図7 ● 遺伝子変異の種類



(天野景裕, 稲葉治, 篠澤圭子: 血友病の遺伝子解析と臨床応用への可能性. Hemophilia Topics Vol. 18, バイエル薬品, 大阪, 2009. より引用)

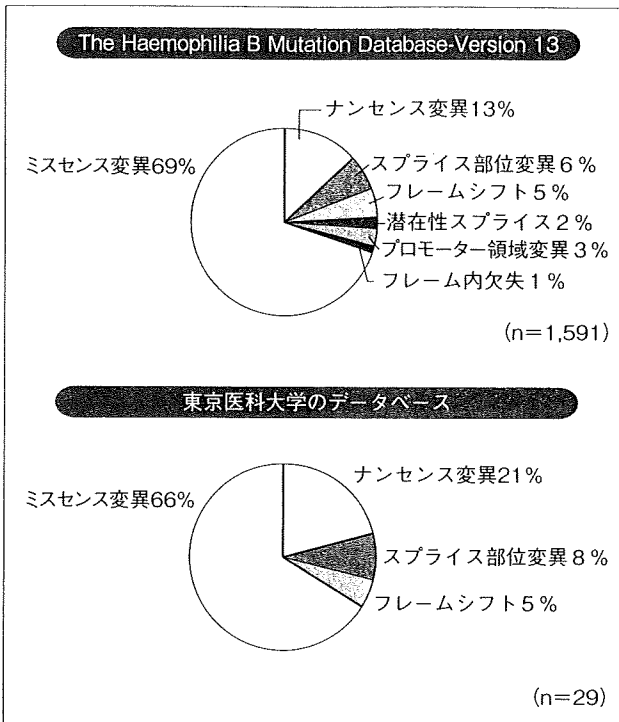
図8 ● 血友病Aの遺伝子変異のタイプ別割合



(天野景裕, 稲葉治, 篠澤圭子: 血友病の遺伝子解析と臨床応用への可能性. Hemophilia Topics Vol. 18, バイエル薬品, 大阪, 2009. より引用)

のみ(ターナー症候群)でそのX染色体上の遺伝子が異常な場合, 女性でも血友病となる。また, 保因者のなかには異常なX染色体上の遺伝子のみがはたらいて, 正常な遺伝子がはたらかず, 凝固因子活性が著しく低下して出

図9 ● 血友病Bの遺伝子変異のタイプ別割合



(天野景裕, 稲葉治, 篠澤圭子: 血友病の遺伝子解析と臨床応用への可能性. Hemophilia Topics Vol. 18, バイエル薬品, 大阪, 2009. より引用)

血傾向を呈することもある。

以上, 母親が保因者の場合の遺伝について述べたが, 血友病の父親と正常な母親との間に生まれた子どもは, 男子の場合は全員が非血友病, 女子の場合は全員が保因者となる(図6)。

第Ⅷ因子の遺伝子は186kbp, 186,000塩基対で構成される大きな遺伝子で26個のエクソン(蛋白質の設計図となる部分)と, 25個のイントロン(設計図のなかに割り込んでいる部分で, 蛋白質の設計には関与していない)から構成されている。一般的に遺伝子変異には欠失(塩基が脱落している), 挿入(余計な塩基が入っている), 点変異(ひとつの塩基が他の塩基に置き替っている), 逆位(塩基の一部が反対方向に向いている)など, いくつかのタイプがあり(図7)<sup>9)</sup>, 結果として正常な蛋白質を合成できなくなる。さらに欠失は, 200以上の塩基が脱落している大欠失と, それ未満の小欠失に分けられる。ま

た、点変異には、ミスセンス変異(異常なアミノ酸が合成される)、ナンセンス変異[蛋白質の合成を終了させるシグナル(ストップコドン)に変わってしまい、そこから先の蛋白質の合成がストップする]、スプライス部位変異(スプライシングのシグナルが出現あるいは消失してしまう)などが含まれる。第Ⅷ因子遺伝子変異の特徴は、イントロン22の逆位が多いことで重症型血友病Aの40%程度、血友病A全体でも20~30%に逆位がかかっていると報告されている。逆位と並んで多いのがミスセンス変異で、小欠失がそれに次ぐ(図8)<sup>9)</sup>。これらの遺伝子変異のうち、臨床的にとくに問題となる重症型を呈するのは、大欠失、ナンセンス変異、逆位、小欠失/挿入(アデニンの少ない部位)、スプライス部位変異である。

一方、第Ⅸ因子の遺伝子は33.5kbpと、第Ⅷ因子の1/5程度の大きさで、8個のエクソンと7個のイントロンで構成されている。血友病Bにおける第Ⅸ因子の遺伝子変異は、ほとんどが点変異または小欠失と挿入で、データベースでもミスセンス変異が7割ちかくを占めている(図9)<sup>9)</sup>。

#### ◎文 献◎

1) 田中一郎, 吉岡章: 血友病の歴史. 白幡聡編, みんな

なに役立つ血友病の基礎と臨床, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2009, pp 20-29.

- 2) 弘田長: 出血病患者の実験. 東京医学会雑誌 3: 357-361, 1889.
- 3) World Federation of Hemophilia Report on the Annual Global Survey 2006. World Federation of Hemophilia, Montreal, 2007.
- 4) 血液凝固異常症全国調査運営委員会: 厚生労働省委託事業血液凝固異常症全国調査平成20年度報告書. (財)エイズ予防財団, 東京, 2009.
- 5) 福武勝幸, 白幡聡, 瀧正志(厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班): 平成9年度~平成11年度総合研究報告書. 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班事務局, 東京, 2000.
- 6) Biss TT, Chan AK, Blanchette VS, et al: The use of prophylaxis in 2663 children and adults with haemophilia: Results of the 2006 Canadian national haemophilia prophylaxis survey. Haemophilia 14: 923-930, 2008.
- 7) 立浪忍: 血友病の疫学. 白幡聡編, みんなに役立つ血友病の基礎と臨床, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2009, pp 30-37.
- 8) 白幡聡: 凝固線溶系とその制御機構. 杉本恒明, 他編, 内科学, 第9版, 朝倉書店, 東京, 2007, pp 1569-1571.
- 9) 天野景裕, 稲葉治, 篠澤圭子: 血友病の遺伝子解析と臨床応用への可能性. Hemophilia Topics Vol 18, バイエル薬品, 大阪, 2009.

## 血友病に対する補充療法の革新

## — 定期補充療法 —

たき まさし  
瀧 正志

(受付:平成21年9月29日)

## 抄 録

血友病患者の基本的な治療は、出血が顕在化した際に止血を目的として欠乏する凝固因子(第 VIII 因子あるいは第 IX 因子)を一定期間補充する方法であり、オンデマンド治療 (on demand therapy) あるいはエピソード時治療 (episodic therapy) と呼ばれる。近年北欧では、非出血時に出血予防および度重なる関節内出血の結果として生じる血友病性関節症の発症進展抑制を目的として凝固因子を長期間にわたり定期的に補充する治療法、定期補充療法 (regular replacement therapy, 欧米では prophylaxis と呼ぶ) が行われ、その関節障害発症阻止効果、重篤な出血の予防効果などその有用性が報告されていた。しかし、定期補充療法に関する成績は主に後方視的な観察的研究であることより、その有効性および安全性に関するエビデンスに欠けると指摘されていた。最近米国およびカナダで行われている前方視的無作為割り付け比較試験の中間報告により定期補充療法の有効性に科学的に高いエビデンスが付加され、いよいよ血友病に対する補充療法は新たな時代に突入した。

## 索引用語

定期補充療法 (regular replacement therapy; prophylaxis), 一次定期補充療法 (primary regular replacement therapy; primary prophylaxis), オンデマンド治療 (on demand therapy)

## 1) 新たな考え方に基づいた血友病治療法

血友病の止血管理の原則は、出血が顕在化した場合に行う止血を目的とした補充療法(血友病 A では第 VIII 因子, 血友病 B では第 IX 因子)と一般的に考えられてきた。これを欧米ではオンデマンド治療 (on demand therapy) あるいはエピソード時治療 (episodic therapy) と呼ぶ。すなわち、出血が顕在化した後に対応する治療法である。しかしながら、この止血法では重症(凝固第 VIII あるいは第 IX 因子活性が 1%未満)患者の多くは、加齢とともに、反復する関節内出血の結果としての血友病性関節症

の発症を免れず、移動が困難となり、また日常生活動作の障害をきたすなど QOL の低下がもたらされた (Fig. 1)。また、人工関節置換術を必要とする患者もみられた。

血友病の止血管理に対する新たな考え方に基づいた治療法、すなわち重症患者に対して出血、特に関節内出血を阻止すべく非出血時に欠乏する凝固因子を長期間にわたり定期的に補充する止血管理法が北欧では重症血友病の標準的治療法として試みられてきた。この治療法を欧米では prophylaxis と呼ぶ。血友病の中等症・軽症は重症とは数%程度の凝固因子活性の相違しかないが、出血頻度、関節障害発生頻度が明らかに少ない。そこで関節障害の阻止を目的に重症型を軽症化する方法として試みられた方法

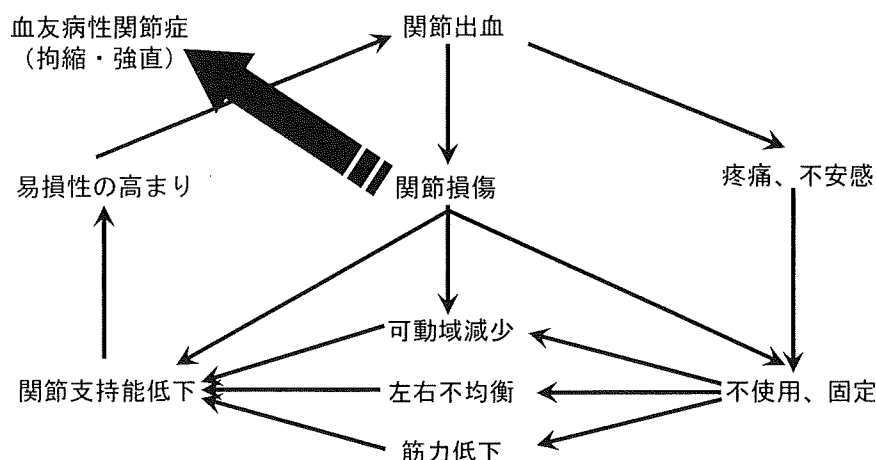


Fig. 1. 血友病性関節症成立への悪循環

Table 1. 定期補充療法の種類とその定義 (modified from Berntorp E, et al, 2003<sup>3)</sup>)

	定義
一次定期補充療法	a) 開始年齢による定義: 2歳未満および顕在化した関節出血の発症前に開始し、成人になるまで長期間、定期的に補充療法を行なう治療法。 b) 初回の関節出血による定義: 年齢にかかわらず関節損傷発症以前に開始し上記と同様長期間行なう方法。暫定的には、過去に1回以下の関節出血(0か1回)の時点で開始する。
二次定期補充療法	一次定期補充療法の基準を満たさないが、成人になるまで長期間、定期的に補充療法を行なう治療法

註1) 一次、二次ともアドヒアランスは少なくとも1年間52週のうち46週以上を満たすこと

註2) 短期間の定期的な補充療法は定期補充療法の範疇に入れない。

である<sup>1)</sup>。わが国では定期補充療法 (regular replacement therapy) と命名された<sup>2)</sup>。

## 2) 定期補充療法の種類とその定義

定期補充療法とは出血を未然に防止するため非出血時に欠乏する凝固因子を長期間にわたり定期的に補充する止血管理法であるが、関節損傷発症前に開始する一次定期補充療法 (primary regular replacement therapy) と関節損傷発症以降に開始する二次定期補充療法 (secondary regular replacement therapy) に分類<sup>3)</sup>される (Table 1)。一次定期補充療法は年齢と初回関節出血の観点からさらに2つに分類されている<sup>3)</sup>。年齢による定義では、2歳未満および顕在化した関節出血の発症前に開始し成人になるまで長期間行なう治療法である。初回出血による定義では、年齢にかかわらず関節損傷の発症前に開始し、上記と同様に定期的に成人になるまで長期間行なう方法である。ただし、関節損傷の発症時期の特

定が困難なため、便宜的には過去の関節出血回数は0あるいは1回の時点で開始する方法と決められている。二次定期補充療法 (secondary regular replacement therapy) は、関節損傷発症後に開始し成人になるまで長期間行なう定期補充療法と定義された<sup>3)</sup>。これら以外に予備的補充療法 (short-term replacement therapy) があり、これは運動会や旅行などのイベント時に短期間あるいは単発の注射で出血を回避する方法である。補充療法の分類のまとめを Table 2 にまとめた。

## 3) 定期補充療法の具体的な方法

スウェーデン方式<sup>4)</sup>は、トラフ値を1%以上に保つことを目標に血友病 A には体重 1kg 当たり 25-40 単位/回を週に3回あるいは隔日、血友病 B には 25-40 単位/回を週に2回あるいは3日毎の投与を行なう方法である。オランダ方式<sup>5)</sup>は、トラフ値を考慮せず、用量は出血パターンに基づき調整さ

Table 2. 補充療法の種類

1) 出血時補充療法 (on demand therapy, episodic therapy)
2) 予備的補充療法 (short-term replacement therapy)
3) 定期補充療法 (regular replacement therapy, prophylaxis)
(a) 一次定期補充療法 (primary regular replacement therapy, primary prophylaxis)
(b) 二次定期補充療法 (secondary regular replacement therapy, secondary prophylaxis)

Table 3. 定期補充療法の効果 (modified from Löfqvist T, et al, 2003<sup>9)</sup>)

患者群	Group I	Group II	Group III
現在の年齢	16-22	11-15	7-10
患者数 (A/B)	19 (16/3)	9 (8/1)	6 (5/1)
定期補充療法開始年齢	2.6 (1.5-4.5)	1.3 (1-2)	1.2 (1-1.5)
年間の関節出血の回数	2.2 (0-19.8)	0.1 (0-0.4)	0.4 (0-0.8)
整形外科的関節スコア -1990	1.2 (0-7)	0	0
-1995	2.4 (0-18)	0	0
関節のレ線スコア -1990	4.8 (0-22)	0	0
-1995	6.5 (0-31)	0	0
年間欠席/欠勤日数	0.9 (0.6-7)	0	0

れる。一般的には血友病 A には体重 1kg 当たり 15-25 単位/回を週に 2 あるいは 3 回、血友病 B には 30-50 単位/回を週に 1 あるいは 2 回の投与を行なう。カナダ方式<sup>9)</sup>は、週 1 回の注射から開始し、開始後に個々の患者の出血頻度を基に回数を増加させていく方式である。次のステップに進む基準は、3 か月間に同一関節に 3 回以上の出血、3 か月間に 4 回以上の軟部組織あるいは関節出血、あるいは同一関節に 5 回以上の出血である。step 1 で開始し、血友病 A において体重 1kg 当たり 50 単位/回を週に 1 回の定期補充療法を行なう。出血が上記基準を満たす毎に体重 1kg 当たり 30 単位/回を週に 2 回の step 2 へ、そしてさらに最終ステップである体重 1kg 当たり 25 単位/回を週に 3 回の step 3 へと進む。わが国の乳幼児に対する定期補充療法臨床研究のプロトコール<sup>2)</sup>は、スウェーデンの方法を基本とし、一部ステップアップ方式を認めている。すなわち、本治療法の導入開始を目的とした注射練習等の直前数か月以内の週 1 回以下の定期補充療法を認めており、また血管確保の問題などがある場合は血友病 A に対し週に 2 回のプロトコールも選択できるように工夫している。

#### 4) 定期補充療法の後方視的研究報告

定期補充療法の後方視的研究報告は数多くあるが、本領域の先駆的なものとしてスウェーデンの

Nilsson らのグループによるもの<sup>4)</sup>がよく知られている。1973-78 年生まれのグループ I (定期補充療法開始年齢は平均 2.6 歳)、1979-84 年生まれのグループ II (定期補充開始年齢は平均 1.3 歳)、1985-88 年生まれのグループ III (定期補充開始年齢は平均 1.2 歳) の 3 群間の比較成績である。各々の群の年間関節内出血回数、整形外科的関節スコア、関節エックス写真スコアおよび年間欠席 / 欠勤日数が比較された。いずれのグループにおいても従来の出血時補充療法に比較して関節内出血回数は著しく減少したことが明らかとなった。グループ II と III には差異は認められなかったが、グループ I とグループ II, III には若干の相違がみられた。グループ I の年間関節内出血回数は平均 2.2 回であったが、整形外科的関節スコア、関節エックス線写真スコアともに 1990 年時点より 1995 年時点で軽度の悪化が見られた。一方、グループ II, III の年間関節出血回数は共に年間 1 回未満で、整形外科的関節スコア、関節エックス線写真スコアは共に 0 点が維持された。年間欠席 / 欠勤日数は、グループ I では平均 0.9 日 (0.6-7 日)、グループ II, III ではともに 0 日であった。すなわち、いずれのグループにおいても関節障害の進展阻止 / 遅延効果が観察された。さらに、治療開始時期が早期のグループ (グループ II, III) においてはほぼ完璧に関節障害発症を阻止する結果であった (Table 3)。

オランダの Fischer ら<sup>9)</sup>の報告は、関節症の進展のみならず医療経済的な面から前述のスウェーデン方式定期補充療法(スウェーデン群)、オランダ方式定期補充療法(オランダ群)と出血時止血治療(フランス群)で比較したものである。関節エックス線写真において関節障害のない Pettersson スコア<sup>7)0</sup>点の割合は、スウェーデン群46%、オランダ群14%、フランス群2%の順であった。年間凝固因子製剤使用量は、それぞれ4,301単位/kg/年、1,550単位/kg/年、1,260単位/kg/年とオランダ群とフランス群では差異はなく、スウェーデン群は両群の約3倍を要した。コストパフォーマンスが同等であるオランダ群とフランス群の比較では、オランダ群が優れたものと考察されている。

1990年代には欧米各国<sup>8-10)</sup>から定期補充療法の有効性を示す報告が相次いだ。これらの報告は観察的研究でありエビデンスレベルが低いにもかかわらず、1994年全米血友病財団は、一次定期補充療法を重症血友病の小児に対する最も適した治療法であると推奨した<sup>11)</sup>。世界保健機構および世界血友病連合も本治療法を承認した<sup>12)</sup>。筆者らは、1999年から重症血友病に対して積極的に一次定期補充療法を導入している。2005年までの中間成績を示すが、自験例においても本治療法の出血予防効果、特に関節内出血の予防効果<sup>13)</sup>、患者・家族のQOLの改善などの有用性を確認した(Fig. 2)。しかし、これらの

一連の報告はその有効性および安全性に関してエビデンスとして未だ不十分とみなされた<sup>14)</sup>。

### 5) 一次定期補充療法の有効性に関する新たなエビデンス

最近、エビデンスレベルの高い一次定期補充療法に関する前方視的無作為割り付け比較試験の中間成績<sup>15), 16)</sup>が発表された。結果的にはこれまでの後方視的研究結果を支持する成績であり、これで一次定期補充療法の有効性、有用性が証明されたと考えられる。

米国で行われた Joint Outcome Study (JOS) の研究結果<sup>15)</sup>の概要を紹介する。研究は、無作為割り付けオープン試験で行われた。足、膝、肘関節それぞれにつき2回以上出血歴のない6カ月から30カ月齢の重症型血友病A患者を対象とし、一次定期補充療法群(Prophylaxis群; P群)と強化された出血時補充療法群(Enhanced episodic therapy群; E群)の2群に無作為に分け、(1)観察期間終了時の6歳時点での指標関節(足、膝、肘)のMRIおよびエックス線による画像解析および同関節の機能評価、(2)関節および他の部位の出血の回数、輸注回数、第VIII因子製剤の使用量、(3)副作用、コンプライアンスなど、を評価項目とした。P群は体重1kg当たり25単位/回の遺伝子組換え第VIII因子製剤を隔日投与し、E群は出血直後に体重1kg当たり

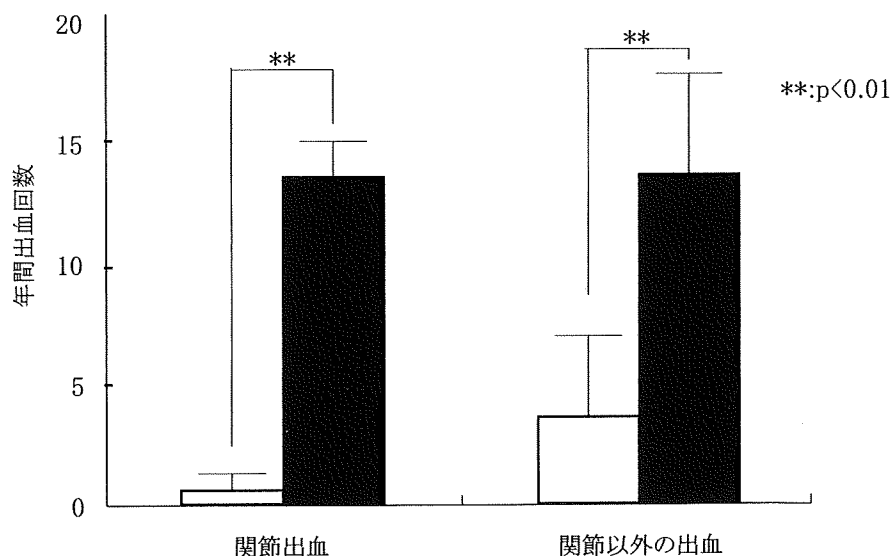


Fig. 2. 自験例における一次定期補充療法と出血時補充療法の年間出血回数の比較(白色スクエアは一次定期補充療法、灰色スクエアは出血時補充療法)(modified from Taki M, et al 2005<sup>13)</sup>)

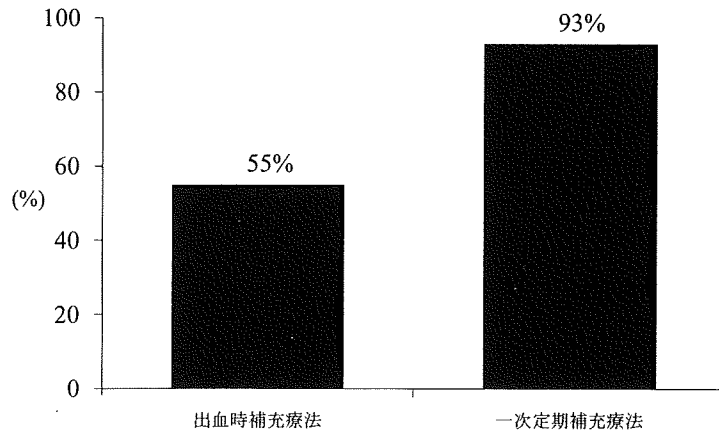


Fig. 3. 指標関節全てが正常であった患者の割合 (6 歳時, MRI 評価)  
(modified from Manco-Johnson MJ, et al, 2007<sup>15)</sup>)

40 単位を投与後, 24, 72 時間後にそれぞれ体重 1 kg 当たり 20 単位を投与する。症状が消失しない場合は, 最大 4 週間まで体重 1 kg 当たり 20 単位の隔日追加投与が許される。観察期間終了時の 6 歳の時点での指標関節の MRI 所見がすべて正常であった割合は, P 群, E 群それぞれ 93%, 55%であった ( $p=0.002$ ) (Fig. 3)。一次定期補充療法を行うことにより関節障害発症のリスクが 83%低減することを示唆する結果であった。また, 年齢別の関節内出血およびその他の出血回数の比較では, P 群では観察期間中のどの年齢においても関節内出血がほとんど認められなかった。一方, E 群においては, 1 歳までは関節内出血は少ないが, 2 歳以降は加齢とともに関節内出血の回数が増加し, P 群と有意な差異が認められた。頭蓋内出血や消化管出血などの重篤な出血が E 群では 33 例中 3 例にみられたが, P 群では 1 例もみられなかった。患者数が少ないことや観察期間が短いために統計学的な有意差はみられなかったが, この結果も注目に値するものである。

もう一つはカナダで行われた研究報告<sup>16)</sup>である。インヒビターのない第 VIII 因子活性 2%以下の血友病 A を対象とし, 前述した 3) の項で示したように出血頻度により用量・用法をステップアップし, 関節症を防ぐ試験である。約 40%の患者が週に 1 あるいは 2 回の定期補充でコントロールされたと報告された。この結果は, スウェーデン方式よりも少ない輸注回数で開始しても定期補充療法の有効性が認められることを示唆するものと考えられ, 血管確保の困難な乳幼児には朗報である。ただし, 対象患者は重症だけではなく第 VIII 因子活性が 1~2%の

中等症も一部含まれていることを差し引いて評価する必要がある。

#### 6) わが国の現状

わが国における定期補充療法の実施率は, 2006 年 1 月に行った調査では血友病 A, B それぞれ 23%, 17%であった<sup>17)</sup>。重症度別では, 重症, 中等症, 軽症それぞれ, 血友病 A ではそれぞれ 27%, 17%, 1%であり, 血友病 B では 18%, 19%, 3%であった。年齢区分別では, 血友病 A, B それぞれ, 2 歳未満は 17%, 25%, 2 歳以上 5 歳以下は 41%, 43%, 6 歳以上 14 歳以下は 44%, 42%, 15 歳以上 19 歳以下は 31%, 4%, 20 歳以上は 12%, 9%であった (Table 4)。2 歳未満および 20 歳以上の実施率は低いが, 2 歳から 20 歳までの年齢層においては 30-40%程度に実施されていることが明らかとなった。すなわち, 小児の血友病に対する定期補充療法の実施率は高率であるが, 2 歳以降に開始する二次定期補充療法が主であり, 一次定期補充療法の割合は最近数年間で増加傾向とはいえまだ少ないことが判明した。二次定期補充療法は一次定期補充療法と比較し, 関節障害予防効果などの有効性に限界性があることが示されており, 今後さらに一次定期補充療法の割合を増やすように努力する必要がある。

#### 7) わが国における定期補充療法の研究の概要

わが国における定期補充療法の研究は, 「乳幼児重症型血友病に対する凝固因子製剤の定期補充療法に関する前方視的研究」として日本小児血液学会血友病部会で企画され, 同学会で 2004 年 11 月に承認



Table 4. わが国の定期補充療法の割合 (modified from Taki M, et al, 2009<sup>17)</sup>)

	重症			中等症			軽症			全体		
	患者数	実施数	%	患者数	実施数	%	患者数	実施数	%	患者数	実施数	%
血友病A (年齢)												
<2	18	4	22	5	0	0	1	0	0	24	4	17
2~5	106	47	44	16	6	38	8	0	0	130	53	41
6~14	160	82	51	23	11	48	28	0	0	211	93	44
15~19	91	38	42	32	7	22	21	0	0	144	45	31
≥20	561	85	15	99	5	5	98	1	1	758	91	12
計	936	256	27	175	29	17	156	1	1	1267	286	23
血友病B (年齢)												
<2	7	2	29	0	0	0	1	0	0	8	2	25
2~5	14	6	43	4	2	50	1	0	0	19	8	43
6~14	32	14	44	8	4	50	5	1	20	45	19	42
15~19	18	1	6	3	0	0	6	0	0	27	1	4
≥20	124	12	10	33	3	9	17	0	0	174	15	9
計	195	35	18	48	9	19	30	1	3	273	45	17

され、現在進行中である。乳幼児の重症型血友病患者に対して定期補充療法を行い、関節症の進展予防効果、出血予防効果、日常生活活動度の改善効果を検討し、さらに安全性および利便性に対する検討を加える。定期補充療法の至適な開始年齢を明らかにすることが大きなテーマとなっている。内容の詳細は、日本小児血液学会のウェブサイト (<http://www.med.hokudai.ac.jp/~ped-w/JSPH-hemo.htm>) に掲載し、多施設、オープン試験として実施中である<sup>18)</sup>。

#### 8) 定期補充療法の課題

定期補充療法(特に一次定期補充療法)に関して今後解決すべきいくつかの課題が挙げられている。その主なものは、開始時期、中止時期、対象患者、用量用法、評価方法、対費用効果、副反応などである。また、患者の心身の発達への影響や親子関係への影響なども今後の重要な研究課題である。

一次定期補充療法の実施にあたっての最大の壁は血管確保である。家庭治療(在宅自己注射)により一次定期補充療法が適切に行なわれると患者および家族のQOLは極めて高まるが、自宅から遠い病院へ週に2~3回通院して行う場合には反対にQOLの低下につながることになる。本治療法をスムーズに導入するには、血管確保の困難な最初の時期には、家庭で注射を失敗した場合の病院でのバックアッ

プ、また病院が自宅から遠い場合には自宅近くの医院などの医療機関との連携、訪問看護の利用、さらに中心静脈カテーテル留置を一時期行うなど患者ごとに対策を講じる必要がある。

#### 9) おわりに

遺伝子治療、肝細胞移植、iPS移植などの先端医療による血友病の治癒を目指した研究に期待が寄せられているが、まだ臨床応用までには克服すべき多くの課題が残されているのが現状である。新たな考え方に基づく治療法である一次定期補充療法は、治癒に匹敵するQOLをもたらす可能性が期待され、適切な実施が望まれる。ただし、その実施は想像するよりも困難なことが多いので、血友病治療の経験豊富な専門の医療機関と連携して実施することが極めて大切である。

#### 10) 謝 辞

聖マリアンナ医科大学病院小児科は、在宅自己注射療法に基づく一次定期補充療法を積極的に行っている。本治療法の導入・継続を可能としているのは、医師だけの力ではなく看護師、臨床検査技師などとのチーム医療の成果であることを明記し、関係各位にこの場を借りて感謝の意を表する次第である。

## 引用文献

- 1) Nilsson IM, Berntorp E, Löfqvist T, et al: Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Int Med* 1992; 232: 25-32.
- 2) 瀧 正志: 血友病に対する定期補充療法 日小血会誌 2005; 19: 67-73.
- 3) Berntorp E, Astermark J, Björkman S, et al: Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. *Haemophilia* 2003; 9 (Suppl. 1): 1-4.
- 4) Löfqvist T, Nilsson IM, Berntorp E, et al: Haemophilia prophylaxis in young patients—a long-term follow up. *J Intern Med* 1997; 241: 395-400.
- 5) Fischer K, van den Berg M: Prophylaxis for severe haemophilia: clinical and economical issues. *Haemophilia* 2003; 9: 376-381.
- 6) Manco-Johnson MJ, Blanchette VS: North American prophylaxis studies for persons with severe haemophilia: background, rationale and design. *Haemophilia* 2003; 9: 44-48.
- 7) Pettersson H: Modern radiologic evaluation and follow up of hemophilia. In: Wiedel J, Gilbert M, eds. *Management of musculoskeletal problems in hemophilia*. New York: The National Hemophilia Foundation, 1986; 7-12.
- 8) Schramm W: Experience with prophylaxis in Germany. *Semin Hematol* 1993; 30: 12-15.
- 9) Manco-Johnson MJ, Nuss R, Geraghty, et al: Results of secondary prophylaxis in children with severe hemophilia. *Am J Hematol* 1994; 47: 113-117.
- 10) Liesner RJ, Khair K, Hann IM: The impact of prophylactic treatment on children with severe haemophilia. *Br J Haematol* 1996; 92: 937-938.
- 11) Skolnick AA: Hemophilia Foundation recommends prophylactic use of clotting factors. *JAMA* 1994; 272: 1153-1154.
- 12) Berntorp E, Boulyjenkov V, Bretteler D, et al: Modern treatment of haemophilia. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 691-701.
- 13) Taki M, Ohi C, Yamashita A: Six years' experience of regular continuous prophylactic infusion of clotting factor concentrates in infants and young children with severe hemophilia A and B in Japan. XXth ISTH, PO235, 2005
- 14) Stobart K, Iorio A, Wu JK: Clotting factor concentrates given to prevent bleeding and bleeding-related complications in people with hemophilia A and B. *Cochrane Database Syst Rev* 18: CD003429, 2005
- 15) Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al: Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007; 357: 535-544.
- 16) Feldman BM, Pai M, Rivard GE, et al: Tailored prophylaxis in severe hemophilia A: interim results from the first 5 years of the Canadian hemophilia primary prophylaxis study. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1228-1236.
- 17) Taki M, Shirahata A, For the fourth seminar on regular replacement therapy: Current situation of regular replacement therapy (prophylaxis) for haemophilia in Japan. *Haemophilia* 2009; 15: 78-82.
- 18) 瀧 正志, 吉岡 章, 白幡 聡, 他: 乳幼児重症型血友病に対する凝固因子製剤の定期補充療法に関する前方視的研究. 日小血会誌 2004; 18: 273.

原 著

## 第 VIII 因子インヒビター測定法 4 法の特性比較と 補正值による評価法の検討

山崎 哲<sup>1)</sup> 山崎 法子<sup>1)</sup> 鈴木 典子<sup>1)</sup>  
後藤 宏実<sup>1)</sup> 高山 成伸<sup>2)</sup> 瀧 正志<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>聖マリアンナ医科大学病院臨床検査部

<sup>2)</sup>大東文化大学スポーツ・健康科学部

<sup>3)</sup>聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科

### 要 旨

近年、第 VIII 因子 (FVIII) インヒビター測定は、Nijmegen 法 (N 法) による測定が推奨されているが操作が煩雑である事などから我が国においては未だ普及しておらず、従来からの Bethesda 法 (B 法) や B 法の変法が一部の検査室や委託検査企業において用いられている現状にある。今回、それらインヒビター測定法 4 法の差違を明確にするために、N 法、B 法、および被検血漿の不活化処理を用いる B 法の変法である S 法と M 法について比較検討した。

FVIII 欠乏血漿を用いた 4 法の検体希釈操作における FVIII 活性の比較成績は、原液から 8 倍希釈において pH 変化がなかった N、S 法では一定した FVIII 活性値を示し、希釈により pH が低下した B、M 法では 10% 程度の活性値の上昇が観察された。

インヒビター陽性血友病 A 患者血漿 10 例を対象とした比較では、4 法間に著しいバラつき (CV: 22.2%~54.7%) を認め、N 法と比較して B、S、M 法は有意に高値 ( $p < 0.001$ ) を示した。また、5BU/ml を基準とした判定では、N 法で 5BU/ml 未満であった 6 例中、S 法で 5 例、B および M 法では 3 例が 5 BU/ml 以上を示し、一致率は 5/10 (50%) と低かった。

N 法を基準とした補正係数を用いて 4 法を再比較した結果、バラつきは著明に低下 (CV: 5.6%~30.0%) し、さらに、5BU/ml を基準とした判定でも N 法との不一致例は S 法および B 法で 2 例、M 法では 1 例のみと改善し、一致率も 80% (8/10) と向上した。

Yamazaki Satoshi

(〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生  
2-16-1)

アドレス: syamazak@marianna-u.ac.jp

キーワード: 第 VIII 因子, インヒビター, 血友病

A, ベセスダ法, ナイメーゲン法

受付日: 2009年2月3日

受理日: 2009年5月12日

以上の成績は、測定法によってインヒビター値が異なることを明らかにするとともに、各法の液性の違いが較差の主な要因となっていることを示唆している。さらに、4 法間の較差を軽減し是正する補正係数の適用は、容易に利用可能な N 法に準じたインヒビター値の評価法として治療選択において有用と考えられた。

## 緒 言

血友病 A 患者において、第 VIII 因子 (FVIII) インヒビターの検出およびその力価を把握することは、FVIII 補充療法もしくはバイパス療法の選択や免疫寛容導入療法を行う際に重要な指標となる<sup>1)</sup>。

近年、国際血栓止血学会の科学的標準化委員会 (ISTH/SSC) では、Nijmegen 法 (N 法)<sup>2)</sup>を用いることを提唱しているが、緩衝化正常血漿調整の煩雑さなどから我が国においては未だ普及しておらず、現在も Bethesda 法 (B 法)<sup>3)</sup>が広く用いられており、さらに、一部の検査室や委託検査企業では B 法の変法も利用されている。

これら複数の測定法より得られたインヒビター値が、いずれも Bethesda 単位 (BU/ml) で表現されているため、同じインヒビター値であっても病態の程度が同等に反映されてないことが懸念される。一般に 5BU/ml 以下を Low responder、それより高い場合を High responder としてインヒビターを分類し止血管理する血友病治療においては、測定値に関する方法間の差違や互換性を把握することは極めて重要であり、さらには日常検査として適応可能な測定法の設定を踏まえた標準化も必要と考えられる。

既にわれわれは、インヒビター陰性血友病 A 患者を対象とし、N 法、B 法に加え、B 法の変法で凝固因子不活化処理血漿を用い、コントロールの異なる S 法および M 法の 4 種の FVIII インヒビター測定法の比較検討を行い、①インヒビター測定における反応液 pH が FVIII:C 測定値に関連すること、②測定反応液と対照反応液の pH 差が、特に陰性～低力価域でのインヒビター判定に影響すること、③B 法では高い偽陽性率を認めたこと、④被検血漿中に FVIII:C が残存する場合は、FVIII 不活化処理が有用であることを報告した<sup>4)</sup>。今回各法の測定特性の差違をより明確にする

ため、インヒビター陽性検体を対象として比較検討し、補正係数を用いた 4 法の互換性についても検討した。

## 対象および方法

### 1. 対象

N 法で 1.0BU/ml 以上であった FVIII インヒビター陽性血友病 A 患者血漿 10 検体を対象とした。また、正常血漿 (NHP) は 60 人の健常人ボランティアより得られた血漿を混合し作成した。

### 2. サンプル調整

凝固検査用採血管 (ベノジェクト II, テルモ) を用いて、全血 9 容に対して 3.13% クエン酸ナトリウム 1 容となるように採取した血液を 3,000×g, 15 分, 4°C で遠心分離して血漿を得た。血漿検体は直ちに 2 分注し、一方は -80°C に凍結保存、他方は 56°C, 30 分加温して凝固因子を不活化した後、再度遠心分離してその上澄を -80°C に凍結保存した。56°C による不活化処理については、過去の検討結果<sup>4)</sup>に従って 56°C, 30 分とした。

健常人血漿も同様の操作で得た血漿をプールし、NHP および 56°C-NHP の 2 種を作製し -80°C に凍結保存した。

N 法で使用した緩衝化正常血漿 (緩衝化 NHP) は、Verbruggen らの方法<sup>1)</sup>に従って作製した。すなわち、正常血漿を 4°C で攪拌しながらイミダゾールを最終濃度 0.1M になるように添加し、1N HCl で最終的に pH 7.4 に調整した。

### 3. 測定試薬および機器

FVIII:C 測定は FVIII 欠乏血漿 (シスメックス, 神戸) を用いた APTT 一段法により、NHP を FVIII:C 100% とした検量線から求めた。なお、APTT 試薬はトロンボチェック APTT-SLA (シスメックス, 神戸)、測定機器は KC-10Aμ (Amelung, ドイツ) を用いた。また、反応液の pH 測定には ABL-520 (ラジオメーター, デンマーク) を用いた。

表1. インヒビター測定法の比較<sup>4)</sup>

	測定反応液		対照反応液
	患者検体	正常血漿	対照
N法	血漿	緩衝化正常血漿 (pH7.4)	第VIII因子欠乏血漿 (免疫吸着)
B法	血漿	正常血漿	イミダゾール緩衝液 (pH7.4)
S法	56℃処理血漿	正常血漿	56℃処理第VIII因子欠乏血漿
M法	56℃処理血漿	正常血漿	56℃処理正常血漿

表2. 高力価第VIII因子インヒビターを測定する際の検体希釈法の比較

	測定反応液		対照反応液		
	希釈液	血漿成分比率	対照	血漿成分比率	
N法	FVIII欠乏血漿	100%	FVIII欠乏血漿	100%	検体希釈にかかわらず常に一定
B法	イミダゾール緩衝液	100%～50%	イミダゾール緩衝液	50%	
S法	生理食塩水	100%～50%	56℃処理FVIII欠乏血漿	100%	
M法	オーレン緩衝液	100%～50%	56℃処理正常血漿の希釈系列	100%～50%	検体希釈にあわせた希釈対照

## 4. FVIIIインヒビター測定法(4法)

N法, B法, および, 56℃不活化処理患者血漿に対して56℃不活化処理FVIII欠乏血漿をコントロールとするS法と, 56℃-NHPをコントロールとするM法の4法を用いた(表1)。S法は国内某検査委託企業で施行されている方法で米国Scripps社の方法に基づくこととされ, またM法は当院での方法で, これら2法はB法の変法である。カットオフ値については各方法で明確に設定されていないことから0.6BU/ml以上を陽性とした。また, 高力価インヒビター測定時の検体希釈法が4法で異なることから主な相違点を表2に示した。

## 1) N法

Verbruggenらの方法<sup>2)</sup>に従って測定した。すなわち, 0.1Mイミダゾール緩衝化NHP(pH7.4)に患者血漿(測定反応液)または免疫除去FVIII欠乏血漿(対照反応液)を等量混和し, 37℃で2時間加温した後FVIII:Cを測定した。次に, 残存

FVIII:C活性(Z)%=(測定反応液FVIII:C/対照反応液FVIII:C)×100を算出し, インヒビター力価(B)BU/ml=(2-log(Z))/log2を求めた。検体希釈では, 希釈液としてFVIII欠乏血漿を使用し, 対照にもFVIII欠乏血漿を用いるため測定反応液と対照反応液の血漿成分比率は常に100%で両者同一の条件となる。

## 2) B法

Kasperらの方法<sup>2)</sup>に従って測定した。NHPに患者血漿または0.1Mイミダゾール緩衝液(pH7.4)を等量混和し, 以下N法と同様に測定しインヒビター力価(BU/ml)を求めた。検体希釈液としてイミダゾール緩衝液を使用するため, 検体希釈率の上昇に伴って緩衝液比率が高くなる。測定反応液の血漿成分比率は100%から50%程度まで変動することとなり, 一方, 対照反応液は常に一定の血漿成分比率50%となる。

## 3) S法

NHPに, 56℃加温処理して凝固因子を不活化

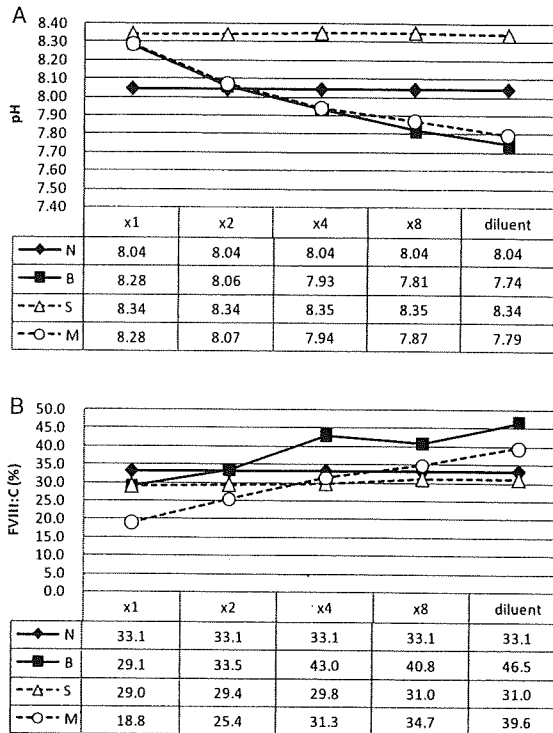


図 1. 4 法における検体希釈に伴う反応液の pH と FVIII : C

した患者血漿, または同じく 56°C 処理した免疫除去 FVIII 欠乏血漿を等量混和し, 以下は B 法と同様に測定しインヒビター力価 (BU/ml) を求めた. 検体希釈液には生理食塩水を使用し, B 法と同様に測定反応液の血漿成分比率は変動するが, 対照には 56°C 処理 FVIII 欠乏血漿を用いるため対照反応液は常に一定で血漿成分比率 100% となる.

#### 4) M 法

NHP に, 56°C 加温処理して凝固因子を不活化した患者血漿, または 56°C-NHP を等量混和し, 以下 B 法と同様に測定しインヒビター力価 (BU/ml) を求めた. 検体希釈に伴う測定反応液の血漿成分比率は B 法, S 法と同様であるが, M 法では対照とする 56°C-NHP も測定反応液と同様に希釈するため, 測定反応液と対照反応液の両者は常に同じ血漿成分比率が保持される.

#### 5. 4 法の検体希釈法の比較

前述 (表 2) の通り, 高力価 FVIII インヒビター検体を測定する際の検体希釈法が 4 法では異なる. そこで, FVIII 欠乏血漿を被検試料として用

い, 各法に従って作製した 1 倍~8 倍希釈検体 (各 4 本), および, それぞれの希釈液のみを加えた反応液について, 37°C, 2 時間加温後の pH と FVIII : C を測定 (n=2) し希釈による差違について検討した. この際, N, B 法では, 希釈液のみを加えた反応液 = 対照反応液となるが, S, M 法では異なる反応液となる.

#### 6. 4 法インヒビター値の比較

対象とした 10 検体を 4 法で測定 (n=2) し, 得られたインヒビター値を検体毎の平均値で除し, Bonferroni/Dunn test を用いて比較検定した.

#### 7. 4 法インヒビター値の互換性の検討

4 法のインヒビター値について, N 法を基準として各法に対する補正係数 (N 法の測定値 / 各法の測定値 : A, 各法の補正係数 (f) =  $\Sigma (A)$  / 検体数 (n=10)) を算出し 4 法の互換性を比較検討した.

### 結 果

#### 1. 検体希釈に伴う反応液の pH と FVIII : C

FVIII 欠乏血漿を被検試料とし各法の検体希釈法を比較した (図 1). N 法では被検血漿と希釈液がともに同じ組成の反応液となるが, 緩衝液で希釈する B 法や M 法では 1 倍の測定反応液 pH 8.28 に対して, 緩衝液のみの反応液 pH は B 法で 7.74, M 法で 7.79 と異なっていた. また, 両者の 8 倍希釈では B 法が 7.81, M 法が 7.87 と希釈率の上昇に伴って緩衝液の pH へと 0.4 程度変化した. 生理食塩水で希釈する S 法は pH 8.34 と高かったが, 希釈による変化は小さく一定していた (図 1-A). 一方, このときの FVIII : C は, N 法では 8 倍まで一定であったが, B 法では 29.1% (1 倍) ~40.8% (8 倍) と希釈に伴って徐々に上昇した. S 法は 1 倍の測定反応液 (29.0%) と希釈液のみの反応液 (31.0%) が同等の FVIII : C を示し, また, M 法は B 法と同様に 18.8% から 34.7% と上昇した (図 1-B).

実際のインヒビター測定において, M 法は同じ希釈率の対照反応液を用いて残存活性を求めるため, 測定反応液と対照反応液は同様となり差違は軽減されるが, B 法は希釈液のみの反応液が対照反応液に相当し, 前述の pH 変動がそのまま反映

表3. インヒビター測定結果

No.	N法	B法	S法	M法	Mean	CV%
1	1.47	3.32	4.15	2.39	2.83	40.9
2	1.85	3.89	6.80	2.97	3.88	54.7
3	2.07	4.47	5.38	4.07	4.00	34.9
4	3.32	7.56	6.98	5.59	5.86	32.2
5	3.38	7.89	9.97	7.59	7.21	38.3
6	3.54	11.32	12.31	10.47	9.41	42.3
7	5.61	10.70	12.93	12.08	10.33	31.7
8	6.02	9.45	8.92	10.69	8.75	22.2
9	6.50	10.35	11.84	11.61	10.08	24.5
10	113.58	211.50	182.15	196.31	175.89	24.6

各法の結果は BU/ml

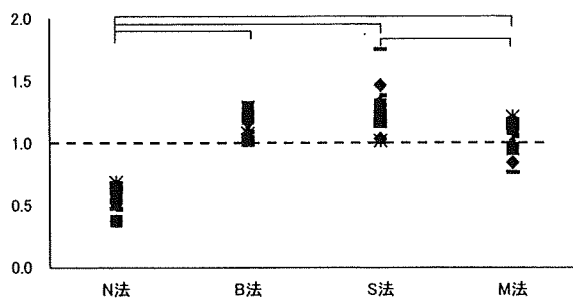


図2. 平均値比による各測定値の比較

Bonferroni/Dunn test :  $p < 0.001$ 

され、FVIII 残存活性 62.6% となり、ゆえに 0.68 BU/ml と算出される。

## 2. 4法によるインヒビター力価の比較

対象とした10検体について、4法のインヒビター値を比較した(表3)。

4法でのインヒビター値のバラつきは、CV値 22.2%~54.7% (平均 34.6%) で、このうち、N法で 5BU/ml 未満の低力価 (=低希釈率)であった6検体 (No. 1~6) では 32.2~54.7% (平均 40.6%) とより大きい CV 値が観察された。N法で 5BU/ml 以上であった4検体 (No. 7~10: 表3 濃い網掛け部) は、他の3法でも全て 5BU/ml 以上の値を示し一致したが、N法が 5BU/ml 未満であった6検体では3法との一致例は1例 (No. 1) のみと極端に低く、残りの5例 (表3 薄い網掛け部) は他の3法のいずれかで 5BU/ml 以上の値を示した。4法の較差を明らかにするため、平均値に対する比で各法を比較した結果 (図2)、ISTHの推奨法であるN法 (平均 0.54) に比べ、他の3法はB法 (1.12)、S法 (1.29)、M法 (1.04) と有意に高い傾向を示した ( $p < 0.001$ )。

3. 補正による4法の互換性の検討

## 3. 補正による4法の互換性の検討

4法のインヒビター値 (BU/ml) について、N法を基準として各法に対する補正係数を算出した (表4)。補正係数 (f) を各測定結果に乗じて再度4法を比較し互換性を検討した。

表5に示すとおり、補正前に示された4法の CV 値 22.2%~54.7% は、補正により CV 値 5.6%~30.0% に低下し、平均値に対する比で比較しても優位差はなく、4法間のバラつきは著しく改善した。さらに、5BU/ml を基準とした判定でも、N法との乖離例は、No. 6 (B, S, M 法) および No. 8 (B, S 法) の2例 (網掛け部) と減少し、一致例は10例中8例 (80%) と顕著に向上した。

## 考 察

血友病 A 患者の止血管理において、FVIII インヒビターの存在の有無およびその力価を把握することは治療選択の際に極めて重要である。しかしながら反応条件の異なる測定法が複数存在し、その全てが同じ単位 (BU/ml) を使用していること

表 4. 算出された補正係数值

No.	N 法	B 法	S 法	M 法
1	1.00	0.44	0.35	0.62
2	1.00	0.48	0.27	0.62
3	1.00	0.46	0.38	0.51
4	1.00	0.44	0.48	0.59
5	1.00	0.43	0.34	0.45
6	1.00	0.31	0.29	0.34
7	1.00	0.52	0.43	0.46
8	1.00	0.64	0.67	0.57
9	1.00	0.63	0.55	0.56
10	1.00	0.54	0.62	0.58
Mean (f)	1.00	0.49	0.44	0.53

(N 法測定値/各法測定値)

表 5. 補正後の 4 法のインヒビター結果

No.	N 法	B 法	S 法	M 法	CV%
1	1.47	1.62	1.82	1.27	15.3
2	1.85	1.90	2.99	1.57	30.0
3	2.07	2.18	2.36	2.16	5.6
4	3.32	3.70	3.07	2.96	10.0
5	3.38	3.86	4.38	4.02	10.6
6	3.54	5.53	5.41	5.54	19.6
7	5.61	5.23	5.68	6.40	8.5
8	6.02	4.62	3.92	5.61	18.9
9	6.50	5.06	5.20	6.15	12.3
10	113.58	103.38	80.05	103.95	14.2

各法の結果は BU/ml

から同一の測定法による結果と誤解されることも少なくない。また、インヒビター測定には様々な変動要因が指摘されており<sup>5)</sup>、中でも FVIII:C の測定に使用する APTT 試薬の組成(リン脂質、活性化剤)とインヒビター間で認められる反応性の違いは著しく<sup>6)</sup>、異なるインヒビター測定法の混在に加え、さらなる問題点も抱えている。われわれは、これまでに FVIII インヒビター陰性の血友病 A 患者検体を対象としてインヒビター測定法 4 法について検討し、その特性に差異があることを報告した<sup>4)</sup>。今回さらに、インヒビター陽性の血友病 A 患者検体を対象として、同様にインヒビター測定法 4 法について比較検討した。

はじめに 4 法の検体希釈法について、FVIII 欠乏血漿を被検材料に用い pH と FVIII:C の変化を比較検討した。N 法では検体希釈に伴う差異は観察されなかったが、被検血漿と希釈液の両者がともに FVIII 欠乏血漿で、同じ反応液条件となるためと思われた。これに対し、緩衝液で希釈する B 法、M 法では検体希釈に伴った中性域への pH 変化が観察され、反応液中の緩衝液比率の漸増によってもたらされる変化と考えられた。また、このとき FVIII:C は 1 倍で B 法: 29.1%, M 法: 18.8% であったが、希釈液のみの反応液ではそれぞれ 46.5%, 39.6% と両測定法内で大きな差を認め、このことは、既にわれわれが報告したインヒビター測定時における反応液 pH と FVIII:C 測

定値の負の関係<sup>4)</sup>と同様の結果(すなわち、反応液の pH が中性域へと低下するにつれて、FVIII:C 測定値は上昇する)と考えられた。実際のインヒビター測定時において、B 法では緩衝液のみの反応液が対照反応液であるため、今回検討した 1 倍反応液がそのまま FVIII 残存活性 62.6% となり、ゆえにインヒビター値は 0.68BU/ml と求められて「陽性」と判定される値となってしまう。一方、M 法では、同じ血漿成分比率に保持された条件下の測定反応液と対照反応液から残存活性を求めため、希釈に伴う pH 等の液性差は小さく、偽陽性を示すことは少ないと考えられる。また、生理食塩水で希釈する S 法は、pH 8.3 前後と高いものの変動は小さく FVIII:C 変化も軽度であったが、pH 緩衝作用の無い生理食塩水がもたらす結果と考えられた。

インヒビター陽性血友病 A 患者血漿 10 検体を対象とした 4 法の各インヒビター値の比較成績(表 3)をみると、方法の違いによるインヒビター値のバラつき程度は著しく、低い検体希釈倍率でより大きい CV 値が観察された。また、平均値に対する比で各法を比較した結果では、ISTH/SSC の推奨法である N 法と比較して他の 3 法のインヒビター値は有意に高く ( $p < 0.001$ )、とりわけ S 法が高値を示すことが明らかとなった。この成績は、N 法で 5BU/ml 未満であった 6



例のうち、S法で5例、B法およびM法で3例が5BU/ml以上を示したことも符合することから、これら4法間の較差を明確に反映した成績と解釈された。

N法を基準として方法ごとに算出した補正係数を適用した補正後の比較成績では、著明な高値例のNo.10を含め前述した方法間のバラつきが補正後にCV値5.6%~30.0%と顕著に改善し、各法間の有意差も認めず、さらに、5BU/mlを基準とした4法間の判定も、補正前の一致率5/10(50%)に比べて補正後は8/10(80%)と向上した。この成績は、補正係数の適用によって各法の測定較差が適切に是正され、さらに、N法以外の方法で得たインヒビター値であってもよりN法に準じた値として評価し得ることを示唆している。これまでにも、new Oxford法とB法間では平均1.21倍の較差があることが示されており<sup>7)</sup>、今回の補正係数もこれと同様に各方法間の較差を表していると思われる。

これまで、各種インヒビター測定法についてその測定特性や差違を詳細にした報告は少なく、また、検査企業に委託される場合が多い今日においては、報告された値から測定方法の違いを察知し比較することは困難であると考えられる。今回示された各インヒビター測定法間の差違を理解し把握することは血友病A患者の止血管理において重要と思われ、加えて、ISTHが推奨するN法がその煩雑さ故に日常検査法として普及しにくい点を考慮すると、補正係数を用いた結果値の評価は、現時点において日常検査法として簡便に利用できる方法であり、従来の測定値をより有用な治療選択の指標として活用し得る方法であると思われた。しかしながら、使用するAPTT試薬の特性も較差の要因となり得ることから、使用する測定法とN法との較差を確認した上で結果の解釈を行う事が望ましいと考えられた。

## 結 論

FVIIIインヒビター陽性検体を対象として、4つのインヒビター測定法を比較検討した。

1)各法より得られるインヒビター値には明らかな差異を認め、反応液の違いや希釈操作の違いが要因となることが示唆された。とくに、Bethesda法の希釈操作は大きな変動要因となると考えられた。

2)Nijmegen法に比較して、Bethesda法、Bethesda変法(S法、M法)は有意に高いインヒビター値を示した( $p < 0.001$ )。

3)Nijmegen法を基準とした補正法の適用により、従来の各法のインヒビター値を容易に比較し得る可能性が示唆され、日常の血友病Aの止血管理において有用と考えられた。

## 文 献

- 1) 瀧 正志：血友病患者のインヒビター、血栓・止血・血管学—血栓症制圧のために— 一瀬白帝編、p402—409、中外医学社、東京、2005。
- 2) Verbruggen B, et al: The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb and Haemost* 73: 247—251, 1995.
- 3) Kasper CK, et al: A more uniform measurement of factor VIII inhibitor. *Thromb Diathes Haemorrh* 34: 869—972, 1975.
- 4) 山崎 哲, 他：第VIII因子インヒビター測定の特性および不活化処理の有用性。日本血栓止血学会誌 19(2)：235—243, 2008。
- 5) 2006 Minutes and Annual Reports; ISTH/SSC, Factor VIII inhibitor assays, (<http://www.med.inc.edu/isth/sc/06sscminutes/06factorviiiifactorix.html>)
- 6) 山崎 哲, 他：循環抗凝血素を有する症例における凝固因子活性測定。日本検査血液学会雑誌 7(2)：270—277, 2006。
- 7) Austen DEG, et al: A comparison of the Bethesda and new Oxford methods of factor VIII antibody assay. *Thromb Haemost* 47: 72—75, 1982。

## Abstract

**Methodological characteristics of Factor VIII: C inhibitor assays, and an evaluation by the application of correction factor**

Satoshi Yamazaki<sup>1)</sup>, Noriko Yamazaki<sup>1)</sup>, Noriko Suzuki<sup>1)</sup>, Hiromi Goto<sup>1)</sup>,  
Shigenobu Takayama<sup>2)</sup>, Masashi Taki<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Hospital,  
2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa, 216-8511 Japan

<sup>2)</sup>Faculty of Health Science, Daito Bunka University

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, St. Marianna University Yokohama City Seibu Hospital

In recent years, for the FVIII inhibitor assay, the Nijmegen method has been recommended by the ISTH. However, it has not yet become common in Japan, and the Bethesda method is still widely used, and modified Bethesda methods also exist.

To clarify the differences between these methods, we compared four FVIII inhibitor assays: the Nijmegen (N), Bethesda (B), and two (S and M) modified Bethesda methods. The two modified methods use pre-treated plasma with an inactivation treatment of coagulation factors at 56°C, method S uses FVIII deficient plasma, and method M uses normal plasma as a control.

In a comparison of sample dilution procedures using FVIII deficient plasma, the N and S methods, with nearly the same pH values in all of the tested samples, showed a constant FVIII: C. However, methods B and M, with a decrease in pH due to sample dilution, showed an elevated FVIII: C of 12%~16%, according to their pH changes.

The results for 10 samples with FVIII: C inhibitor varied remarkably (CV: 22%~55%; mean, 34.6%) among the four methods. The inhibitor values from B, S, and M were significantly higher than the values from method N ( $p < 0.001$ ). Especially, the six cases of  $< 5\text{BU/ml}$  validated by method N were indicated as  $> 5\text{BU/ml}$  in five cases by method S, and in three cases by methods B and M.

By application of the correction factors obtained based on method N, the CV variations were improved markedly to 5.7%~30.0% (mean, 14.5%). Furthermore, the discrepant six cases were corrected, decreasing to two cases in S and B, and to one case in method M.

These results have clearly shown that the inhibitor values obtained via the four methods differ, which may be due to differences in the dilution procedures. An application of the correction factor based on method N may be useful for comparing the inhibitor values.

**Key words:** Factor VIII, Inhibitor, Haemophilia A, Bethesda method, Nijmegen method

# Von Willebrand factor protects the Ca<sup>2+</sup>-dependent structure of the factor VIII light chain

Masahiro Takeyama,<sup>1</sup> Keiji Nogami,<sup>1</sup>  
Masahiro Okuda<sup>2</sup> and Midori Shima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatrics, Nara Medical  
University, Shijo-cho, Kashihara, Nara, and

<sup>2</sup>Department of Reagent, Sysmex Corporation,  
Nishi-ku, Kobe, Hyogo

## Summary

We have recently reported that cation-exchange iminodiacetate resin completely inactivated factor VIII (FVIII) by direct deprivation of metal ions, predominantly Ca<sup>2+</sup>, from its molecules, and that von Willebrand factor (VWF) protected FVIII antigen from resin-induced degradation. The present study was further developed to investigate this mechanism. Western blotting analysis and enzyme-linked immunosorbent assay showed that the antigenic structure of the FVIII light chain, especially the C2 domain, was completely impaired by the resin, whilst that of the heavy chain was little affected. However, the complex formation with VWF protected the C2 domain from the resin-induced degradation. The resin-treated C2 domain failed to interact with VWF and phospholipid. Furthermore, the addition of Ca<sup>2+</sup> competitively blocked the resin-induced impairment of the C2 domain structure. These results demonstrate that VWF protects the Ca<sup>2+</sup>-dependent conformational structure of the FVIII light chain, especially the C2 domain, and may indicate that the C2 domain contains the Ca<sup>2+</sup>-binding site(s).

**Keywords:** factor VIII, C2 domain, von Willebrand factor, Ca<sup>2+</sup>, iminodiacetate resin.

Received 3 March 2009; accepted for publication  
2 June 2009

Correspondence: Keiji Nogami, Department of  
Paediatrics, Nara Medical University, 840  
Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8522, Japan.  
E-mail: roc-noga@naramed-u.ac.jp

Factor VIII (VIII), a plasma protein that is either deficient or defective in individuals with the severe congenital coagulopathy, haemophilia A, functions as a cofactor in the tenase complex responsible for anionic phospholipids surface-dependent conversion of factor X (FX) to activated FX (FXa) by activated factor IX (FIXa) (Mann *et al*, 1990). FVIII is synthesized as a multi-domain, single chain molecule (A1-A2-B-A3-C1-C2) consisting of 2,332 amino acid residues with a molecular mass of c. 300 kDa. It is processed into a series of divalent metal ion-dependent heterodimers by cleavage at the B-A3 junction, generating a heavy chain (HCh; 90~210 kDa) consisting of the A1, A2, plus heterogeneous fragments of partially proteolyzed B domains, together with a light chain (LCh; 80 kDa) consisting of the A3, C1, and C2 domains (Vehar *et al*, 1984; Wood *et al*, 1984). The procofactor is activated by cleavage at Arg<sup>372</sup>, Arg<sup>740</sup>, and Arg<sup>1689</sup> by thrombin and FXa, converting into the activated FVIII (FVIIIa) trimer composed of the A1, A2, and A3-C1-C2 subunits (Eaton *et al*, 1986).

FVIII circulates as a non-covalent complex with von Willebrand factor (VWF), which regulates the synthesis and

stabilizes the cofactor activity of FVIII (Kaufman *et al*, 1989). Quantitative or qualitative defects in VWF result in a decrease of the circulating FVIII level. Critical sites for VWF interaction in FVIII have been localized to the amino-terminal acidic region of the A3 domain (Lollar *et al*, 1988) and the carboxy-terminal region of the C2 domain (Saenko *et al*, 1994). The association of FVIII with VWF results in an increased circulatory half-life (Saenko *et al*, 1999) and enhanced stability of HCh-LCh interactions (Fay, 1988). Activation by thrombin dissociates FVIIIa from VWF and markedly enhances the activity of tenase complexes on the phospholipid surfaces (van Dieijen *et al*, 1981). VWF protects FVIIIa from proteolysis by several serine proteases, including activated protein C (Fay *et al*, 1991; Nogami *et al*, 2002) and FXa (Koedam *et al*, 1990; Nogami *et al*, 1999a).

FVIII possesses a similar metal-binding motif to factor V (FV). Binding reactions of the HCh and LCh require a metal ion-dependent linkage with the A1 and A3 domains (Fay, 1988). Cu<sup>2+</sup>-binding sites have been identified in the A1 and/or A3 domains of FVIII (Tagliavacca *et al*, 1997). Ca<sup>2+</sup> also binds to both chains, and recently, Ca<sup>2+</sup>-binding site(s) in the

HCh have been identified using site-directed mutagenesis within residues 110–126 in the A1 domain (Wakabayashi *et al*, 2004). The binding site(s) in the LCh, however, remains to be identified. FVIII activity can be reconstituted from isolated HCh and LCh in the presence of metal ions,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  (Fay, 1988).  $\text{Cu}^{2+}$  enhances the inter-chain affinity by *c.*100-fold rather than contributing to the specific activity of FVIII (Wakabayashi *et al*, 2001), whilst  $\text{Ca}^{2+}$  promotes cofactor activity by modulating the conformation of heterodimers on membrane surfaces (Wakabayashi *et al*, 2005), indicating that both metal ions,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , are essential for conserving the functional structure of FVIII.

More recently, we have demonstrated that the cation-exchange iminodiacetate resin resulted in the complete loss of FVIII activity by direct deprivation of metal ions, predominantly  $\text{Ca}^{2+}$ , from the molecules, but complex formation with VWF protected FVIII from the resin-induced degradation (Takeyama *et al*, 2008). In the present study, we further demonstrate that VWF protects the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent conformational structure of the FVIII LCh, especially the C2 domain, indicating that the C2 domain may contain the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding site(s).

## Materials and methods

### Reagents

Recombinant FVIII (Kogenate FS<sup>®</sup>) was generous gifts from Bayer Corp. Japan (Osaka, Japan). A cDNA coding the C2 domain sequence of human FVIII was constructed, transformed into *Pichia pastoris* cells and expressed in a yeast secretion system (Takeshima *et al*, 2003). The recombinant C2 protein was purified by ammonium sulphate fractionation and CM Sepharose (Amersham Bio-Science, Uppsala, Sweden). Recombinant VWF was purchased from Hematologic Technologies, Inc. (Essex Junction, VT). Monoclonal antibodies (mAb), C5 recognizing the A1 domain and R8B12 recognizing the A2 domain, were kind gifts from Dr. Fulcher (Scripps Clinic Research Institute, La Jolla, CA, USA) and Dr Saenko (University of Maryland, Baltimore, MD, USA), respectively. Another anti-A2 mAb JR8 was obtained from JR Scientific Inc. (Woodland, CA, USA). The mAbs NMC-VIII/10 and NMC-VIII/5 recognizing the N-terminus of the A3 domain and the C2 domain, respectively, were purified as previously described (Shima *et al*, 1992, 1993). Inhibitor alloantibodies (alloAbs) with C2 epitopes were obtained from multi-transfused patients with severe haemophilia A. IgG preparations were fractionated by affinity chromatography using protein A Sepharose (Amersham Bio-Sciences). Biotinylated IgG was prepared using *N*-hydroxysuccinimido-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA). Cation-exchange iminodiacetate resin was obtained from Muromachi Chemicals (Fukuoka, Japan) and was stored according to the manufacturer's instruction. Phospholipid vesicles containing 10% phosphatidylserine, 60% phosphatidylcholine, and 30% phosphatidylethanolamine (Avanti Polar

Lipid Inc., Alabaster, AL, USA) were prepared as previously described (Mimms *et al*, 1981).

### Preparation of resin-treated FVIII and C2

The iminodiacetate resin was dialyzed in 0.9% NaCl buffer with 0.1% EDTA for 4 h at 4°C to remove free metal ions in the resins, followed by further dialysis in 0.9% NaCl buffer overnight prior to use (Takeyama *et al*, 2008). Proteins were mixed with 10% (w/v) resin in polystyrene tubes for 4 h at 22 °C with stirring. After centrifuging at 3000 g, the supernatants were adjusted to a standard volume with 10 mmol/l HEPES buffer, pH 7.0, prior to analysis.

### Measurement of $\text{Ca}^{2+}$ concentrations in C2

Samples were heated at 95 °C for 2 min and centrifuged at 5000 g for 30 min (Takeyama *et al*, 2008). The  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the supernatant were measured in the modification by the *o*-cresolphthalein complexone method (Connerty & Briggs, 1966, Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The lowest limited value for detection in this assays using the spectrophotometer was 0.0125 mmol/l.

### Surface plasmon resonance (SPR)-based assay

The kinetics of FVIII (or C2) interaction with VWF or phospholipid vesicles was determined using a BIAcore X instrument (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). VWF or phospholipid vesicles was covalently coupled to the surfaces of CM5 and HPA sensor chips at density of 10 or 5 ng/mm<sup>2</sup>, respectively. Binding (association) of the ligand was monitored in filtered, degassed buffer (10 mmol/l HEPES pH 7.4, 150 mmol/l NaCl, 0.005% polysorbate 20) at a flow rate of 10 µl/min. Dissociation was monitored for 2 min. After each analysis, chip surfaces were regenerated by treatment with 20 mmol/l NaOH for 1 min. The rate constants of association ( $k_{\text{on}}$ ) and dissociation ( $k_{\text{off}}$ ) were determined by nonlinear regression analysis using the evaluation software provided by BIAcore AB. Equilibrium dissociation constants ( $K_{\text{d}}$ ) were calculated as  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ .

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of HCh and LCh of FVIII

Both chains of FVIII were detected by ELISA that was modified according to previous reports (Shima *et al*, 1993). Two anti-A2 mAbs with different epitopes, JR8 (for capture) and biotinylated R8B12 (for detection), were used for analysis of the HCh. For detection of the LCh, an alloAb with C2 epitope (for capture) and a biotinylated C2 antibody (for detection) were used. The amounts of bound HCh and LCh were determined using a streptavidin-linked horseradish peroxidase with *o*-phenylenediamine dihydrochloride as substrate.