

A patient of mild hemophilia A (CRM⁺) with factor VIII molecular abnormality (Thr1774Asn) who suffered severe hemorrhage after the surgery for suppurative hip joint and developed transient inhibitor

Akira MIURA*¹, Toshihiro ITOH*², Midori SHIMA*³, Hiroshi INABA*⁴, Katsuyuki FUKUTAKE*⁴, Morio ARAI*⁵, Sohzoh SUZUKI*⁶, Masaaki ISHIKAWA*⁶, Hideaki SAKAI*¹

Key words: mild hemophilia A, inhibitor, CRM⁺, nucleotide substitution

The mild hemophilia might be discovered due to a massive hemorrhage at the surgery. A 42 years old man, who had experienced massive hemorrhage during his past hip joint operations, showed a prolonged APTT (53.8 sec) in his preoperative examination for his suppurative hip joint. The results of clotting factor assays were not compatible with prolonged APTT, but the discrepancy between 72% factor VIII activity (FVIII : C) and 326% von Willebrand factor antigen was recognized. After bone curettage operation, he suffered enormous bleeding and hemorrhagic shock. At 1 hour after infusion of recombinant FVIII, his APTT was shortened and also his bleeding was stopped. One month later, he developed inhibitor to FVIII but it disappeared soon after change of treatment to recombinant factor VIIa. His FVIII : C was about 50%, and clot waveform analysis and thrombin generation assay did not normalize, even in his stable coagulative state. Nucleotide sequencing of his FVIII gene revealed a cytosine to adenine transversion in exon 16. The nucleotide substitution resulted in a threonine 1774 to asparagine in A3 domain. He was recognized a CRM⁺ mild hemophilia A, whose FVIII : C level was less than half of its antigen.

原 著

重症型血友病 B の第 IX 因子遺伝子内に検出された 2 つの遺伝子変異の検討

清 田 育 男*¹ 篠 澤 圭 子*² 大 瀧 学*³ 藤 田 進*⁴
鈴 木 隆 史*⁵ 天 野 景 裕*⁶ 稲 葉 浩*⁷ 福 武 勝 幸*⁸

Double Mutation, a 2-bp Deletion and Val211Ile, in the Blood Coagulation Factor IX Gene of a Patient with Severe Hemophilia B

Ikuo SEITA, MD*¹, *Keiko SHINOZAWA*, PhD*², *Manabu OTAKI*, MD, PhD*³,
Susumu FUJITA, MD, PhD*⁴, *Takashi SUZUKI*, MD, PhD*⁵, *Kagehiro AMANO*, MD, PhD*⁶,
Hiroshi INABA, PhD*⁷ and *Katsuyuki FUKUTAKE*, MD, PhD*⁸

Hemophilia B is an X linked bleeding disorder caused by the absence or reduced activity of coagulation factor IX (FIX). Here, we report a double mutation in the FIX gene (*F9*) in a Japanese patient with severe hemophilia B. FIX activity (FIX:C) was measured with a one-step functional assay. FIX antigen (FIX:Ag) levels were determined by ELISA. Genomic DNA was amplified by PCR with *Taq* DNA polymerase. Purified products were sequenced with a Thermo Sequenase™ Pre mixed Cycle Sequencing Kit. To determine whether the sequence changes were a mutation or polymorphism, PCR products from 54 Japanese individuals were investigated using PCR-*Ase* I restriction enzyme digestion. Both FIX:C and FIX:Ag levels in the patient were below 1%. Levels of FIX:C and FIX:Ag in the patient's mother were 42% and 46% of normal, respectively. Sequence analysis of *F9* of the patient revealed two distinct mutations. The first mutation was a G-to-A transition at position 30084 in exon7, which caused a Val211Ile in the region which encodes the protease domain of FIX. The patient's mother was heterozygous for this mutation. This substitution was not detected by restriction enzyme digestion from 54 Japanese alleles. The second mutation was a 2-bp deletion in exon 2 (nt. 6396-6399, del. AG). The patient's mother was also heterozygous for this deletion. The authors identified a rare double mutation of a 2 bp deletion and Val211Ile in the *F9* of a patient with severe hemophilia B. The Val211Ile was confirmed as a novel missense mutation of *F9*.

[Rinsho Byori 57 : 417~424, 2009]

Corresponding author: *Keiko SHINOZAWA*, PhD, Department of Molecular Genetics of Coagulation Disorders, Tokyo Medical University, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan. E-mail: keiko-s@tokyo-med.ac.jp

【Key Words】 hemophilia B (血友病 B), coagulation factor IX gene (血液凝固第 IX 因子遺伝子), double mutation (ダブル変異), deletion (欠失), missense mutation (ミスセンス変異)

受付 2008 年 12 月 26 日・受理 2009 年 3 月 18 日

*1,3-8 東京医科大学臨床検査医学講座,

*2,6,8 同 大学血液凝固異常症遺伝子研究寄附講座 (〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1)

血友病 B は、血液凝固第 IX 因子遺伝子 (*F9*) の変異、欠失や挿入などの遺伝子異常により、第 IX 因子 (FIX) の質的・量的異常が惹き起こされる出血性疾患である。臨床症状の特徴は、幼少期より出現する皮下血腫、関節内出血、筋肉内出血などで、その遺伝形式は X 連鎖劣性遺伝をとる。発症頻度は男子出生 2.5 万人あたり 1 人で¹⁾、平成 19 年度の調査では日本の血友病 B 患者数は 915 人と報告されている²⁾。臨床的重症度は血漿中の FIX 活性 (FIX:C) により、1%未満を重症型、1~5%を中等症型、5~40%を軽症型に分類する。また、他の先天性血液凝固異常症と同様に、血友病 B も活性値と抗原量の乖離を認める分子異常に基づく病型分類³⁾があり、FIX 抗原量 (FIX:Ag) の存在様式から、FIX:Ag の量的欠損である Cross-Reacting Material (CRM)-negative、FIX:Ag が低値を示す CRM-reduced、FIX:Ag はほぼ正常に存在するが比活性が低い CRM-positive の 3 型に分類される。

責任遺伝子の *F9* は X 染色体 q26-27 に全長約 33.3kb で存在し、8 つのエクソン⁴⁾から構成されて

いる (Fig. 1)。FIX 蛋白質はビタミン K 依存性凝固因子であり、NH₂ 基側から 12 個の γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を持つ Gla ドメイン、2 つの EGF 様ドメイン、活性化ペプチド、プロテアーゼドメインから構成されている。その遺伝子や蛋白質構造は他のビタミン K 依存性凝固因子と高い相同性を有している。

国際的な血友病 B 遺伝子変異のデータベース⁵⁾には、1591 種類 (2891 人) の変異が登録されており、全体の約 90%が点変異で、ミスセンス変異は全体の約 78%を占めている。これらの遺伝子変異は、*F9* の 5' 側のプロモーター領域から 3' 側までの位置の広範囲にわたって検出されている。

著者らはこれまでに約 40 症例の血友病 B 患者の遺伝子解析を行ってきた^{6,7)}。今回、新規の重症型血友病 B の患者と母親の遺伝子解析を行い、患者の *F9* に新しく稀なダブル変異として 2 つの遺伝子変異を同定した。また、母親の保因者診断においても、この 2 つの変異をヘテロ接合体として検出した。

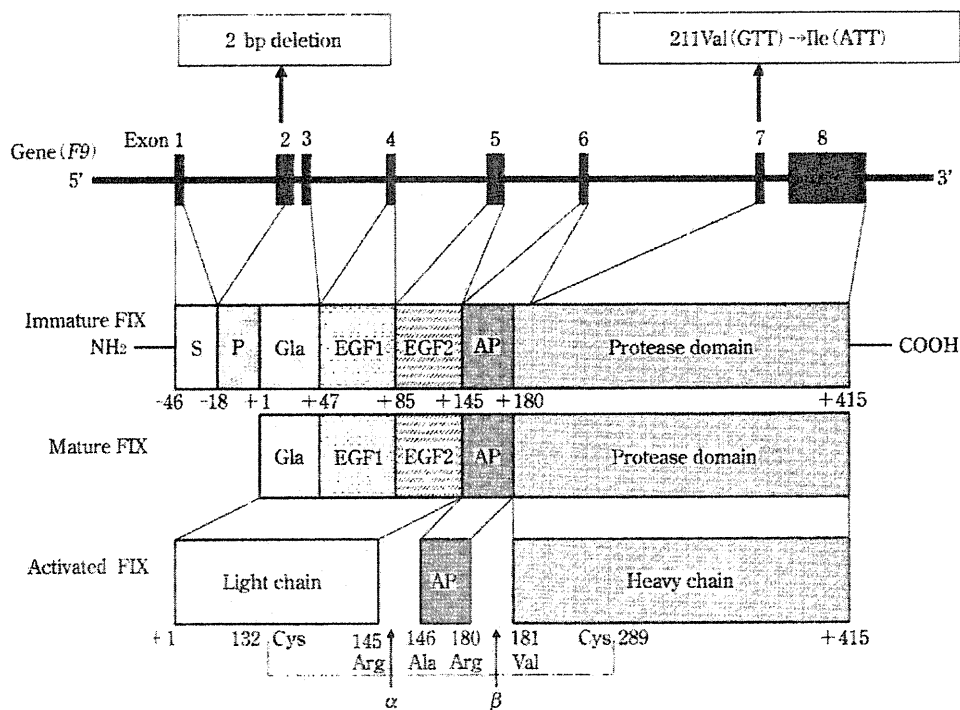


Figure 1 Schematic structure of the factor IX (FIX) protein and the FIX gene (*F9*).

Position of the identified double mutation, a 2-bp deletion and Val211Ile, in the *F9* in a patient with severe hemophilia B.

I. 対象・方法

A. 症 例

患者は10歳代男性。生後数ヵ月で肺炎により入院した時、皮下血腫が認められたため精査を受けて血友病Bと診断された。これまでに、血尿、関節内出血、筋肉内出血、鼻出血の既往があり、出血時には第IX因子製剤投与による止血管理が行われている。インヒビター保有歴はない。両親と弟に明らかな出血性素因を認めない。

B. 方 法

1. FIX:C および FIX:Ag の測定

3.2%クエン酸ナトリウム加血漿を用いた。FIX:CはAPTT試薬(HemosIL™ APTT-SP; Instrumentation Laboratory)とFIX欠乏血漿(George King)を用いた凝固一段法で自動血液凝固能測定装置(ACL9000)にて測定した。FIX:Agはポリクローナル抗体を用いたサンドイッチEIA法(ASSERACROM® FIX:Ag; Roche Diagnostica Stago)で測定した。

2. DNA の抽出

DNAは採血した全血の白血球から得た核分画をSDSおよびProteinase Kで処理した後フェノール・クロロホルム法で抽出した。

3. PCR 法

F9の8つのエクソンおよびそのイントロン境界領域は、設計した9対のプライマー⁶⁾を用いてPCRで増幅した。PCRの増幅は耐熱性DNAポリメラーゼとしてTaKaRa LA Taq™(Takara Bio Inc.)を使って、変性;96°C, 30秒, アニーリング;42~67°C, 30秒, 伸長;72°C 60秒を40サイクルの条件で増幅した。

4. ダイレクトシーケンス法

PCR産物は3% NuSieve® 3:1 アガロース(Cambrex)ゲル電気泳動を行い、目的の大きさのバンドを切り出し、QIAquick®Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて精製した。精製物をテンプレートとし、Thermo Sequenase® core sequencing kit(Amersham)を使いHITACHI SQ5500E(Hitachi)でダイレクトシーケンシングと解析を行った。塩基配列は、Yoshitakeら⁴⁾の報告と比較した。

5. Ase I 制限酵素切断法

検出した未報告例の変異について、PCR-Ase I 制限酵素消化法によりその頻度を確認した。対照者54人について、エクソン7のPCRを行い、それぞれ

のPCR産物をAse I制限酵素(New England Biolabs)により37°C 3時間反応させた。反応物は3%アガロースゲル電気泳動にて、切断の有無を確認し解析した。

C. 倫理審査

本研究の遺伝子解析は、東京医科大学倫理委員会の審査を経て、学長より承認されている「先天性血液凝固線溶因子欠損(欠乏)および異常症に関する研究」に従い、患者および対照者には文書による説明と同意を取得した上で行った。

II. 結 果

A. FIX:C および FIX:Ag の測定結果と病型

患者のFIX:CとFIX:Agはともに1%未満であり、患者の表現型は重症型でCRM-negativeに分類された。母親のFIX:CとFIX:Agは、それぞれ42%と46%であった。

B. 遺伝子解析

患者と母親のF9のコーディング領域とそのスプライシング部位、プロモーター領域をダイレクトシーケンスした結果、コーディング領域に2つの変異を検出した(Fig. 1)。

1. 2-bp 欠失(ag ; nt.6396-6399)

患者のエクソン2のダイレクトシーケンスを行った結果、6396から6399番目のヌクレオチドのagagの配列中にagの2つの塩基が欠失していることを検出した(Fig. 2)。母親のダイレクトシーケンスの蛍光強度波形も6396番目の位置からずれを生じており、agの2-bp欠失と野生型の対立遺伝子をヘテロ接合体で有していることを同定した。

この2-bp欠失は、FIXのGlu7もしくはGlu8をコードしている塩基配列に起こり、蛋白質翻訳の際に14番目のアミノ酸の位置に終止コドン(TGA)を出現させるフレームシフト変異になることが示唆された(Fig. 3)。

2. Val211Ile のミスセンス変異

患者のエクソン7の30084番目のヌクレオチドでg→aの塩基置換を検出した(Fig. 4)。また、母親のエクソン7のダイレクトシーケンスでは、30084番目の位置にはgとaの2つの蛍光強度が検出され、母親はgとaの対立遺伝子のヘテロ接合体であることを確認した。この塩基置換は、211 Val(gtt)→Ile(att)のアミノ酸置換を起こす。このヌクレオチドがa配列の場合には、この領域は新たにAse I制限酵素

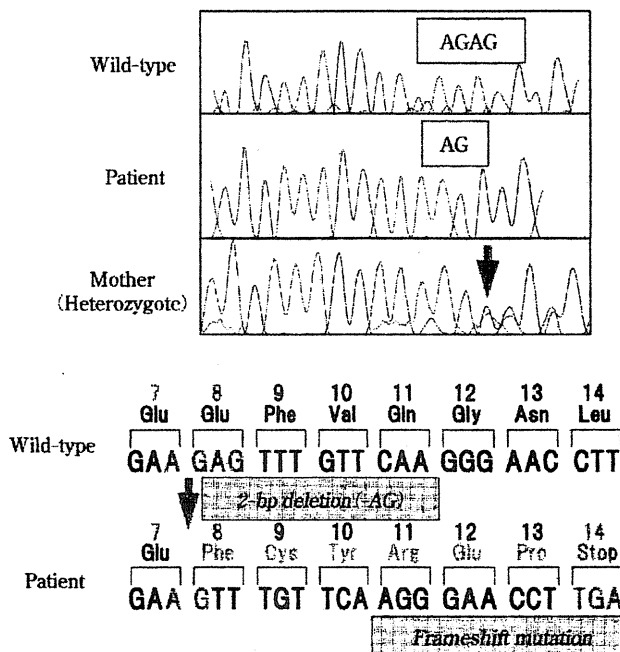


Figure 2 Nucleotide sequence of exon 2 of *F9* in the patient, mother, and normal control (wild-type). The sequence of the patient shows a 2 bp deletion (nt.6396-6399). The sequence of mother shows a heterozygous deletion.

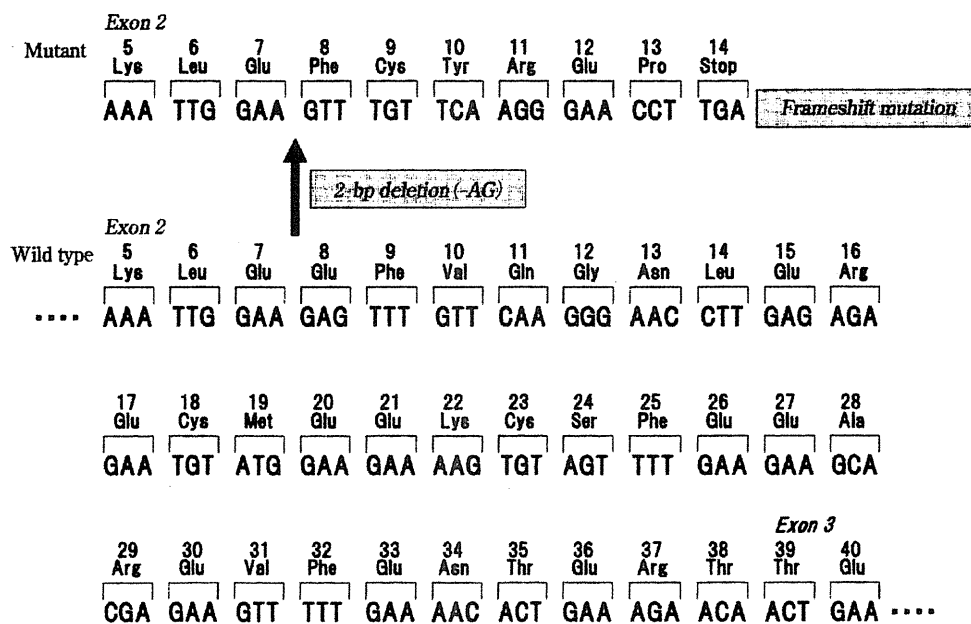


Figure 3

The Gla domain of FIX, located at amino acids 5 to 50, contain a short tandem repeat sequence. A 2-bp deletion creates a frame shift mutation in codon 14 resulting in 5 or 6 novel amino acids downstream followed by premature truncation of the protein.

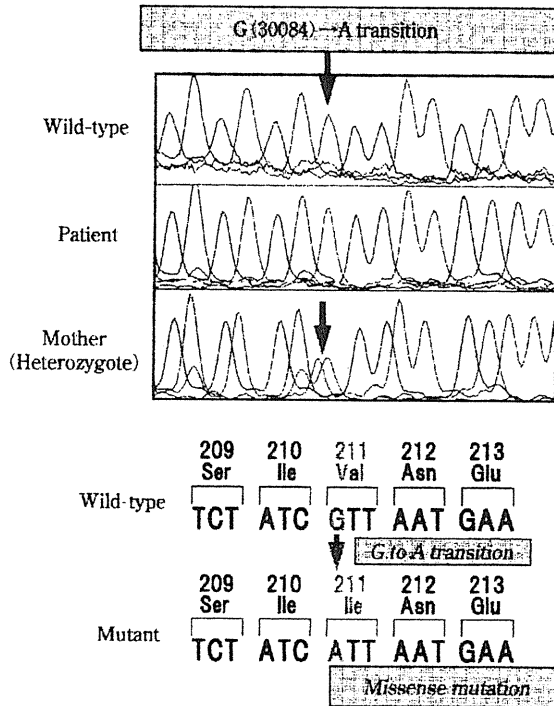


Figure 4 Nucleotide sequence of exon 7 of *F9* in the patient, mother, and normal control (wild-type). The sequence of the patient shows a missense mutation Val211→Ile (G30084→A). The sequence of mother shows a heterozygous missense mutation Val211→Ile.

認識部位 (5'AT↓TAAT3')を生じる。したがって、エクソン7の312-bpのPCR産物は、野生型のg配列の場合にはAse I制限酵素で反応させた後に、アガロースゲル電気泳動でバンドを確認しても312-bpのフラグメントが検出されるが、変異型のa配列の場合には、117-bpと195-bpの2本のフラグメントに切断される。このことを利用したPCR-Ase I制限酵素消化法を用いて、この患者、母親と非血縁関係にある対照者54人について、この変異の頻度を解析した。その結果、アガロースゲル電気泳動にて、患者では117-bpと195-bpのバンドが確認され、母親は312-bp、117-bpと195-bpの3本のバンドが観察された。ゆえに患者はa変異を持ち、母親は野生型のg配列とa変異のヘテロ接合体であることを確認した(Fig. 5)。対照者54人のPCR産物はすべて切断されず312-bpであったことから、すべてが野生型のg配列であることを確認した。したがって、211 Val(gtt)→Ile(att)はポリモルフィズムではなく、未報告の新しいミスセンス変異であることを同定した。

III. 考 察

我々は、重症型血友病B患者の遺伝子解析を行い、FIXのGlaドメインをコードするエクソン2の2-bp欠失と、プロテアーゼドメインをコードするエクソン7の211 Val→Ileのミスセンス変異を同定した。

これまでに血友病Bの変異データベース³⁾には、イントロン領域を含む*F9*上にヌクレオチド置換が2箇所同時に検出された症例が34例登録されていた。さらにその中で、本症例と同様に2つの変異がともにエクソン領域内に認められたダブル変異症例は17例であった。ゆえに、本症例は全体の登録数からの割合ではおよそ0.6%(2891症例中18例)の大変稀少な変異様式の症例であった。データベース⁵⁾の17例の中には、Thompsonらが29 Arg→Glnとドナースプライス部位の変異や、Goossensらの227 Glu→Lysと400Lys→Aspなどのダブル変異が登録されているが、変異と表現型との関連や2つの病因変異について、詳細な検討を行っている報告はなかった。それゆえに、我々は今回検出したダブル変異症例に

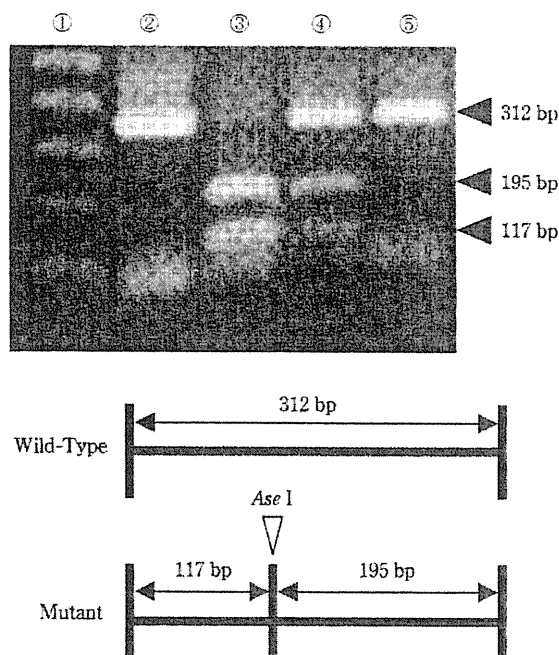


Figure 5

PCR products of the mutant allele were digested with *Ase* I and separated on 3% agarose gel electrophoresis. The G→A substitution results in create of *Ase* I restriction site yielding a 117-bp and 195-bp fragments whereas the normal allele appear as 312-bp fragment. The abnormal 117-bp and 195-bp bands were observed in the patient. The 312-bp, 117-bp and 195-bp bands were observed in mother as heterozygous. The wild type shows 312 bp fragment. ①: Marker, ②: PCR products, ③: Patient, ④: Mother, ⑤: Control (Wild-type).

ついて報告し考察することが重要であると考えた。

FIX はビタミン K 依存性凝固因子のグループに属し、主に肝細胞で合成された後、糖鎖付加、プロセッシング酵素によるプレプロ体の分離、64 番目のアスパラギン酸残基の β -ヒドロキシル化などの翻訳後修飾とともに、12 個のグルタミン酸 (Glu) の γ -カルボキシル化を受ける^{43,49}。翻訳後修飾の後にシグナルペプチドを遊離し、415 アミノ酸残基の成熟 FIX 蛋白質として血液中に分泌される。その機構は、他のビタミン K 依存性凝固因子のプロトロンビン、第 VII 因子、第 X 因子、プロテイン C や S とほぼ同じであり、また、これらの遺伝子や蛋白質構造は高い相同性を有し、類似している。

FIX では 12 個の Gla (7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36, 40) が中心となり、Gla ドメインを形成し、 Ca^{2+} イオンとの結合に重要な役割を果たす¹⁰。これらの Glu をコードする塩基配列は gag もしくは gaa であることから、46 アミノ酸残基 (138-bp) から

なる Gla ドメインは非常に類似した塩基配列の繰り返し繋がっている (Fig. 3)。このような短い縦列反復配列のある領域は、しばしばスリップ鎖対合を起こすので突然変異を受けやすく、その結果、反復配列のコピー数が変化し、反復単位の欠失や挿入を来しやすいと考えられている^{11,12}。F9 においても、Gla ドメインには、主に欠失による 24 のフレームシフト変異が報告されており、他の領域に比較して多い。このことは縦列反復配列に欠失が起こりやすいことを支持していると考えられる。しかし、Gla 領域を持っている相同性が高いビタミン K 依存性凝固因子の第 VII 因子、第 X 因子やプロトロンビンなどの先天的な欠乏症においては、Gla ドメイン内の欠失や挿入例の報告はない。血友病 B と違い、これらの疾患が常染色体劣性遺伝形式をとりヘテロ接合体では無症候であるために解析数が少ないことが一つの理由として推測されるが、FIX のみの Gla ドメインに欠失が多く報告されている本質的な理由

は不明である。しかしながら、FIXにおいては、短い縦列反復配列のあるGlaドメインは、欠失や挿入が起きやすいホットスポットであることが特徴といえる。

これまでに血友病Bの変異データベース⁵⁾には、人種の異なる3症例から、今回同定した欠失と同じ位置での2-bp欠失が報告されている。それら3症例のFIX:Cは本症例と同じく、すべて1%未満を示していた。また、3症例中FIX抗原量の報告されている2症例においてはFIX:Agも1%未満の同じ重症型でCRM-negativeであった。また、著者らはこの患者と血縁関係のない血友病Bの重症型患者に同じ2bp欠失を同定している¹³⁾。このエクソン2の6396から6399番目の2bp欠失は、14番目のアミノ酸が終止コドンになるフレームシフト変異であり、いわゆるPremature Termination Codon(PTC)変異になる。正常サイズではない、短いサイズの未成熟な不安定なmRNAができるかと推測されるが、この不安定なmRNAはRNA監視機構(mRNA decay)¹⁴⁾¹⁵⁾によって生体内で速やかに分解されると考えられた。したがって、2-bp欠失は、FIXの発現に重大な影響をもたらしていることが推測される。

血友病Bの変異データベース⁵⁾には、2症例の211 Val→Phe¹⁶⁾と1症例の211 Val→Aspが報告されている。2症例の211 Val→PheのFIX:Cはそれぞれ7%と4%であり、それぞれ軽症型と中等症型に分類されるが、211 Val→Asp症例はFIX:CとFIX:Agともに1%未満の重症型でCRM-negativeであった。これらから、この患者の211 Val→Ile変異が単独でどのような表現型をとるか推測するには、変異体プラスミドを用いたりコンピナントの発現実験などを行う必要があるが、この患者では、1つのX染色体上のF9対立遺伝子上に2つの変異が検出され、5'側の近くのエクソン2の2-bp欠失がフレームシフトを起こしPTC変異となることから、3'側のエクソン7のミスセンス変異の211 Val→Ileよりも、患者のFIX発現には、より強い影響をもたらすと考えられた。したがって、この患者では2つの変異のうち、2-bp欠失によるフレームシフト変異が患者の表現型を重症型、CRM-negativeにしたものと推測される。

IV. 結 語

①血友病B患者の遺伝子解析を行い、F9エクソン

2に2-bp欠失とエクソン7に211Val→Ileのダブル変異を同定した。

②患者の母親から2つの変異をヘテロ接合体で検出し、保因者であることを確定した。

③211Val→Ileミスセンス変異は新しい変異であった。

④FIXのGlaドメインをコードしているエクソン2の領域は、欠失や挿入などの変異が起きやすい変異のホットスポットであると考えられた。

⑤2つの変異のうち、エクソン2の2-bp欠失が表現型を重症型にしたと考えられた。

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) Soucie JM, Evatt B, Jackson D. Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. *Am J Hematol* 1998; 59: 288-94.
- 2) 血液凝固異常症全国調査運営委員会編集. 厚生労働省委託事業血液凝固異常症全国調査平成19年度報告書: 2008. p.3.
- 3) Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, et al. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 313-44.
- 4) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985; 24: 3736-50.
- 5) Haemophilia B Mutation Database-version13. A database of point mutations and short additions and deletions in the factor IX gene. <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>
- 6) 佐々木昭仁, 永泉圭子, 稲葉 浩, 他. 日本人血友病B患者に認められた18種類の遺伝子変異. *日本血栓止血学会誌* 2004; 15: 107-13.
- 7) 篠澤圭子, 清田育男, 大瀧 学, 他. 日本人血友病患者の遺伝子解析 - 第3報 - (抄). *日本血液学会誌 (第69回総会抄録集)* 2007. p.323.
- 8) Anson DS, Choo KH, Rees DJ, et al. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J* 1984; 3: 1053-60.

—臨床病理—

- 9) Mandel JL, Willard HF, Nussbaum RL, et al. Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 49: 107-28.
- 10) 森田隆司, 水野 洋. Glu ドメインの立体構造と機能. *日本血栓止血学会誌* 2000; 11: 391-6.
- 11) Cooper DN, Krawczak M. *Human Gene Mutation*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1993.
- 12) Goldfless SJ, Morag AS, Belisle KA, et al. DNA repeat rearrangements mediated by DnaK dependent replication fork repair. *Mol Cell* 2006; 21: 595-604.
- 13) 篠澤圭子, 天野景裕, 清田育男, 他. 遺伝子解析による血友病 B の保因者診断で生じた問題の検証と課題(抄). *臨床病理(第 55 回総会抄録集)* 2008; 56: 253.
- 14) Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999; 96: 307-10.
- 15) Culbertson MR. RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet* 1999; 15: 74-80.
- 16) Chen SH, Zhang M, Lovrien EW, et al. CG dinucleotide transitions in the factor IX gene account for about half of the point mutations in hemophilia B patients: a Seattle series. *Human Genet* 1991; 87: 177-82.



ORIGINAL ARTICLE *Paediatrics*

Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa

H. TAKEDANI,* H. KAWAHARA† and M. KAJIWARA‡

*Department of Joint Surgery, Research Hospital of the Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo;

†Department of Orthopedic Surgery, National Hospital Organization Fukui Hospital; and ‡Department of Pediatrics, National Hospital Organization Fukui Hospital, Tsuruga, Japan

Summary. Between 2000 and 2008, 11 major orthopaedic surgeries for 7 congenital haemophilia patients with inhibitors were performed by the first author as the primary doctor using recombinant activated factor VII (rFVIIa). Orthopaedic surgical treatments were performed for six surgeries for four high-responder haemophilia A patients, three surgeries for two high-responder haemophilia B patients and two surgeries for one low-responder haemophilia B patient. This low-responder patient is allergic to factor IX products, so he usually uses rFVIIa as a haemostatic agent. All of the surgeries were major, such as joint arthroplasty, arthroscopic synovectomy, and a combination of both, and excellent surgical results were achieved. Seven cases were controlled by bolus infusion of rFVIIa, and the other four cases were controlled by combined bolus

and continuous infusion of rFVIIa. An anti-fibolytic agent was used for all cases. There were no thrombotic adverse effects, only two bleeding episodes. As for haemostatic control, nine surgeries were excellent, one was good and one was fair. This report is the largest clinical report on major orthopaedic surgeries at a single institute. We have concluded that the combination of bolus and continuous infusion of rFVIIa is safe and effective, and more convenient to administer than simple bolus infusion therapy to achieve haemostasis at peri-operative periods. In addition, our data also concurs with the data of several previous reports which showed that orthopaedic surgery for haemophilia patients with inhibitors by means of rFVIIa is safe and effective.

Keywords: inhibitor, orthopaedic surgery, rFVIIa

Introduction

For haemophilia patients without inhibitors, orthopaedic surgery is becoming popular. However, for haemophilia patients with antibodies for the deficient factor VIII or IX (inhibitor), this surgery is an elective treatment [1,2], because there is still no guideline, based on surgical case studies, which specifies a proper monitoring marker to monitor the coagula-

tion factor plasma levels and how to effectively use concentrates to control bleeding during surgery. However, many haemophilia patients with inhibitors also complain about joint dysfunction and seek out orthopaedic surgical treatments. Surgical results were reported for some surgeries that were performed using bypassing agents, such as activated prothrombin complex concentrate (aPCC) and activated recombinant factor VII (rFVIIa). Most of these results were of minor surgeries such as radioactive synovectomy or tooth extraction. In some multicentre studies [1,3–6], the results of more than 10 major orthopaedic surgeries were reported, but there is no large report from a single treatment centre. This report includes the results of 11 major surgeries that were performed for 7 haemophilia patients by one orthopaedic surgeon as the primary doctor who is

Correspondence: Hideyuki Takedani, Department of Joint Surgery, Research Hospital of the Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shiroganedai, Minatoku, Tokyo, Japan.

Tel.: +81 3 3443 8111; fax: +81 3 6409 2402;
e-mail: takedani@ims.u-tokyo.ac.jp

Accepted after revision 19 October 2009

sufficiently knowledgeable in matters related to haemostasis and an experienced and active surgeon at two hospitals.

Patients

Between 2000 and 2008, the first author as the primary doctor performed 16 orthopaedic surgeries at 2 hospitals for 10 haemophilia patients with inhibitors. During 11 orthopaedic surgeries and postoperative periods for 7 patients, rFVIIa was used to control bleeding. Seven surgeries were performed at the first hospital between 2000 and 2006, and four surgeries were performed at the second hospital between 2007 and 2008. All surgeries were performed by one primary doctor, knowledgeable in haemostasis and an active surgeon, thus, making this the largest clinical report based on major orthopaedic surgeries at a single institute. For Case 1, there was a pseudotumour (20 × 10 cm) in the left femoral region with two skin ulcers. For Case 2, the abduction of both shoulders was less than 80° and flexion was less than 60° owing to osteophytic impingement. Total knee arthroplasty and bipolar hip arthroplasty (Cases 3 and 7) were indicated for end-stage arthropathy with severe pain and recurrent bleeding. Arthroscopic synovectomy (Cases 4, 5 and 6) was indicated for early or progressive arthropathy with recurrent bleeding.

Results

Six orthopaedic surgical treatments were performed for four high-responder haemophilia A patients, three surgeries for two high-responder haemophilia B patients and two surgeries for one low-responder haemophilia B patient. This low-responder patient is allergic to FIX products, so he usually uses rFVIIa as a haemostatic agent (Table 1). The average age at

operation was 26 years (11–52 years old) and the average body weight was 56 kg (43–80 kg). The preoperative inhibitor titres were 1–54.3 Bethesda Units (BU) mL⁻¹ and the plasma-deficient factor levels in all cases were less than 1%, except one (1.7%). All of the surgeries were major, such as joint arthroplasties, arthroscopic synovectomy and a combination of both (Table 2). Four arthroscopic knee synovectomies and two total knee arthroplasties were performed using a tourniquet. There was very little bleeding during the surgeries except for the one that was combined with septoplasty. The blood loss volumes for five orthopaedic surgeries performed for haemophilia patients with inhibitors, without the use of a tourniquet, were comparatively the same with the blood loss volumes for orthopaedic surgeries for haemophilia patients without inhibitors. The average operation period was 125.3 min (69–193 min).

The average of one bolus infusion dose per body weight was 113.6 mcg kg⁻¹ (range 95.2–39.5 mcg kg⁻¹) (Table 3). For the first case (Case 1), which was our first experience, we administered the first bolus infusion before general anaesthesia, and then the second bolus infusion after bleeding occurred following the first incision. For cases that followed, we administered the first bolus infusion before general anaesthesia, and then the second bolus infusion just before the first incision. The average total period for peri-operative bleeding control using rFVIIa was 11.5 days (range 6–23 days). This period, compared with the first two cases (Cases 1 and 2-1), was longer than that of the other cases and the total dose per body weight was also gradually decreased. Bleeding complications during seven surgeries were controlled by bolus infusions of rFVIIa (bolus group) and the other four surgeries were controlled by combined bolus and continuous infusions of rFVIIa (combined group). The total period for peri-operative bleeding control of the bolus group

Table 1. Patient demographics and clinical characteristics: 11 major orthopaedic surgeries were performed for 7 congenital haemophilic patients with inhibitors.

| Case | Age (years) | Body weight (kg) | Deficient factor | Deficient factor level (%) | Inhibitor titre (BU mL ⁻¹) | Anamnestic response |
|------|-------------|------------------|------------------|----------------------------|--|---------------------|
| 1 | 52 | 58 | VIII | 1.70 | 17.5 | Yes |
| 2-1 | 29 | 51 | VIII | <1 | 2.3 | Yes |
| 3-1 | 38 | 60 | VIII | <1 | 6.5 | Yes |
| 4-1 | 11 | 43 | IX | <1 | 28.8 | Yes |
| 5 | 27 | 48 | VIII | <1 | 1 | Yes |
| 3-2 | 39 | 60 | VIII | <1 | 5.8 | |
| 6 | 13 | 45 | IX | <1 | 54.3 | Yes |
| 4-2 | 13 | 47 | IX | <1 | 29 | |
| 2-2 | 33 | 80 | VIII | <1 | 13 | |
| 7-1 | 16 | 63 | IX | <1 | 1 | No |
| 7-2 | 17 | 60 | IX | <1 | 1 | No |

BU, Bethesda Unit.

| Case | Operation | Operation time (min) | Blood loss (mL) | Tourniquet |
|------|--|----------------------|-----------------|------------|
| 1 | Removal of pseudotumour | 193 | 1608 | No |
| 2-1 | Removal of osteophytes and manipulation of right shoulder | 107 | 57 | No |
| 3-1 | Right total knee arthroplasty | 146 | 120 | Yes |
| 4-1 | Arthroscopic synovectomy for right knee | 119 | Little | Yes |
| 5 | Arthroscopic synovectomy for right knee and removal of osteophytes of left ankle | 163 | Little | Yes |
| 3-2 | Left total knee arthroplasty and septoplasty | 160 | 610 | Yes |
| 6 | Arthroscopic synovectomy for right knee | 116 | Little | Yes |
| 4-2 | Arthroscopic synovectomy for left knee | 95 | Little | Yes |
| 2-2 | Removal of osteophytes of left shoulder | 106 | 53 | No |
| 7-1 | Left bipolar hip arthroplasty | 104 | 1056 | No |
| 7-2 | Right bipolar hip arthroplasty | 69 | 519 | No |

Table 2. Surgical data: seven surgeries from Cases 1 to 6 were performed at the former hospital and the others from Cases 4-2 to 7-2 were performed at the present hospital.

(average 12.3 days) was longer than that of the combined group (6.5 days), and the total dose per body weight of the bolus group (7.66 g kg^{-1}) was also more than that of the combined group (3.65 g kg^{-1}), but statistically speaking there were no real differences between the two groups. An anti-fibrotic agent (tranexamic acid) was used during peri-operative bleeding control periods for all patients except three who complained of nausea induced by the agent. Excellent surgical results were achieved for all surgeries. The pseudotumour was removed *en bloc*. After both shoulder osteophytes were removed and the right shoulder was manipulated, the abduction and flexion of both shoulders improved to around 90° . After joint arthroplasties, pain was relieved and bleeding did not recur. After synovectomy, bleeding gradually stopped and did not recur.

However, haemostatic evaluations differed. Nine surgeries had been controlled without unexpected massive bleeding or bleeding complications (excellent), and one of the two performed pseudotumour removals had expected massive bleeding with bleeding complications (good), and another performed bipolar hip arthroplasty had unexpected massive bleeding with bleeding complications (fair).

Complications

There were no thrombogenic adverse effects, only two bleeding episodes. One episode was re-bleeding on day 9 after the operation. This bleeding was controlled with a shortened bolus infusion interval from 6 to 4.5 h. The second episode was continued bleeding from the operative day, despite good haemostasis in the operation room. We continued

Table 3. Overview of dose and periods of recombinant activated factor VII for bleeding control at peri-operative periods and complications.

| Case | One dose per body weight (mcg kg^{-1}) | Total dose per body weight (g kg^{-1}) | Total infusion periods (days) | Bolus infusion periods (days) | Continuous infusion periods (days) | Tranexamic acid (days) | Complications |
|------|---|---|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|---------------|
| 1 | 103.4 | 9.9 | 19 | 19 | 0 | 18 | Bleeding |
| 2-1 | 117.6 | 13.9 | 22 | 22 | 0 | 21 | |
| 3-1 | 120.0 | 8.5 | 12 | 12 | 0 | 13 | |
| 4-1 | 139.5 | 5.3 | 7 | 7 | 0 | 2 | Nausea |
| 5 | 125.0 | 4.5 | 8 | 8 | 0 | 7 | |
| 3-2 | 120.0 | 8.4 | 12 | 12 | 0 | 14 | |
| 6 | 106.7 | 3.1 | 6 | 6 | 0 | 6 | |
| 4-2 | 102.1 | 3.5 | 5 | 2 | 3 | 2 | Nausea |
| 2-2 | 120.0 | 2.4 | 5 | 2 | 3 | 2 | Nausea |
| 7-1 | 95.2 | 3.8 | 7 | 1 | 6 | 8 | |
| 7-2 | 100.0 | 4.9 | 9 | 2 | 7 | 8 | Bleeding |

to administer rFVIIa by bolus injection, 15 times at 2-h intervals, until the bleeding started to ooze and then we changed to continuous infusion. The bleeding stopped on day 3 after the operation.

Discussion

There are two major limitations to performing surgery for haemophilia patients in Japan. First, general insurance in Japan does not permit chemical or radioactive synoviorthesis for any arthropathies or synovitis. The clinical results show that these synoviorthesis procedures are safe and effective. Internationally, these procedures are first-line therapies for haemophilic synovitis, especially for inhibitor patients. However, as we are not able to choose these procedures, arthroscopic synovectomy is the first-line therapy for haemophilic synovitis in Japan. This is the reason why we have many arthroscopic synovectomies for haemophilia with inhibitors. Another limitation concerns the use of aPCC. Until the end of March 2008, we were not permitted to use aPCC over 3 days serially and we were required to change from aPCC to other concentrates on the fourth day even if aPCC had been effective. Most of the cases in this report were performed before April 2008 and they were controlled using rFVIIa.

Orthopaedic surgery had been impossible for haemophilia with inhibitors for the past two decades. The development of bypassing agents, such as aPCC and rFVIIa made orthopaedic surgery possible, and the results of the first operation using rFVIIa was published in 1988 [7]. After this case report, orthopaedic surgery started to be performed internationally for haemophilia with inhibitors, but as an elective surgery performed only by an expert medical haemophilia team. Most of the surgical results were of minor surgeries and major surgical results were mainly reported as case reports. In terms of large major orthopaedic surgical results for haemophilia with inhibitors under rFVIIa cover, Obergfell *et al.* [4] reviewed the orthopaedic surgical results published up until 2006. According to this review, the surgical results of two to six major orthopaedic surgeries were reported among five articles from single institutes. After 2006, Harberman *et al.* [8] reported the surgical results of six surgeries, which was the largest study from a single institute. However, some multicentre studies had reported 6–18 major orthopaedic surgical results [5,9,10]. This report has 11 major orthopaedic surgical results and is the largest study from a single institute.

It is important for bleeding control using rFVIIa to increase plasma rFVIIa levels. Hoffman *et al.* [11]

concluded that the doses of rFVIIa required for efficacy produce plasma levels that are several orders of magnitude greater than the K_d for binding of FVIIa to tissue factor, and a platelet surface mechanism is better able to explain the clinical efficacy of high-dose FVIIa therapy. In a report that included the experiences of seven European haemophilia centres, it was concluded that high doses of rFVIIa are safe and effective for the treatment and prevention of bleeding [12]. Also Salaj *et al.* [13] concluded that initial high doses of rFVIIa were associated with a decline in total rFVIIa consumption, because the rate of thrombin generation is important for fibrin clots that form in the presence of high amounts of rFVIIa and are more resistant to proteolysis, which might be of great importance in the context of joint inflammation where elevated enzyme levels exacerbate proteolysis and the destruction of synovium, cartilage and bone. In two recently published papers in which the sole aim was to establish a consensus protocol, bolus infusion was recommended as routine haemostasis therapy for haemophilia with inhibitors and continuous infusion was not recommended because more clinical studies are required for this mode of administration [6,14]. Giangrade [14] recommended that 120–180 mcg kg⁻¹ be injected at the start of surgery, just prior to the first incision. Then, follow-up doses of 90 mcg kg⁻¹ are given at 2–6-h intervals during the peri-operative periods.

In our experiences, the first bolus infusion was given before general anaesthesia and the second bolus infusion was given just before the first incision. The interval between the first and second infusions was shorter than 2 h. This administration mode achieved higher plasma rFVIIa levels without changing the dose and prevented bleeding incidents for unconscious patients.

However, rFVIIa has a short half-life and requires frequent administrations to keep the plasma levels of FVIIa above that required to maintain haemostasis for haemophilia with inhibitors. Therefore, there were some reports that already confirmed the stability and microbiological safety *in vitro* and *in vivo* of rFVIIa after being reconstituted [15–17]; also, the good surgical results noted in the clinical reports [15,18–20] were increased by the continuous infusion of rFVIIa as an economical mode of administration. Continuous infusion was started after initial bolus infusion. The bolus dose range was from 90 to 104 mcg kg⁻¹. The continuous infusion rate range at the start was from 16.5 to 50 mcg kg⁻¹ h⁻¹, and the duration range was from 1 to 26 days. In terms of the continuous infusion rate, Schulman [15] concluded that it was possible to use 10 IU mL⁻¹ as a

maintenance level for most situations provided that precautions are taken to avoid the risk factors for hemorrhagic complications. This 10 IU mL⁻¹ was calculated to be 660 IU kg⁻¹ h⁻¹ or 13.2 mcg kg⁻¹ h⁻¹. In all the reports, the continuous infusion rates were more than 13.2 mcg kg⁻¹ h⁻¹ and achieved good haemostasis, except one. This continuous infusion rate at the start was 16.5 mcg kg⁻¹ h⁻¹. To achieve good haemostasis during surgery and just after operation, the rFVIIa plasma levels must be higher than 10 IU mL⁻¹ as a maintenance level.

Furthermore, we have another administration mode that is a combination of bolus and continuous infusion and had already been reported as continuous infusion [21–24], but here we refer to this mode as combination infusion because it consists of several bolus infusions as opposed to one bolus infusion prior to continuous infusion [18,20,25]. As for continuous infusion, Ludlam *et al.* [18] reported nine major orthopaedic surgeries in which rFVIIa was infused at a rate of 50 mcg kg⁻¹ h⁻¹ for 7–20 days after an initial preoperative bolus of 90 mcg kg⁻¹. Postoperatively, there were bleeds in six patients. Santagostino *et al.* [20] reported 11 major orthopaedic surgeries in which rFVIIa was infused at a rate of 20 mcg kg⁻¹ h⁻¹ for 3–14 days after an initial preoperative bolus of 90–135 mcg kg⁻¹. Postoperatively, there were bleeds in two patients. Smith *et al.* [25] also reported eight elective surgeries in which rFVIIa was infused at a rate of 16.5 mcg kg⁻¹ h⁻¹ for 1–26 days after an initial preoperative bolus of 90 mcg kg⁻¹, and they concluded that the 16.5 mcg kg⁻¹ h⁻¹ infusion rate reliably achieves plasma FVII activity levels of 10 IU mL⁻¹, but this level does not provide reliable haemostasis. However, for case studies related to the administration mode we referred to as combination infusion, Tagariello *et al.* [24] reported two cases in which rFVIIa was infused at a rate of 11–42 mcg kg⁻¹ h⁻¹ for 12–29 days after bolus infusion of 120 mcg kg⁻¹ for 2–3 days. In both cases, bleeding complications occurred on days 8 and 14 after surgery, respectively. He also reported another successful case in which rFVIIa was infused five times at 2-h intervals prior to continuous infusion [23]. Pepez *et al.* [22] reported one case of a total hip arthroplasty in which rFVIIa was infused at a rate of 7–15 mcg kg⁻¹ h⁻¹ for 12 days after bolus infusion of 90–150 mcg kg⁻¹ for 5 days, and no bleeding complications occurred. Lorenzo *et al.* [21] reported one case of an open evacuation of a large knee haemarthrosis in which rFVIIa was infused at a rate of 20 mcg kg⁻¹ h⁻¹ for 7 days after bolus infusion of 120 mcg kg⁻¹ for 3 days, and they concluded that

FVIIa plasma levels of 6–10 IU mL⁻¹ were safe and effective at preventing postoperative haemorrhaging in this patient.

Based on published articles, we thought that the continuous infusion rate of 16.5 mcg kg⁻¹ h⁻¹, which reliably achieves plasma FVII activity levels of 10 IU mL⁻¹, is good enough to maintain a haemostatic condition, but not to achieve good haemostasis. A higher rate of continuous infusion might achieve good haemostasis, however, two recent reports [6,14] concluded that bolus infusion is more reliable to achieve good haemostasis than continuous infusion. We believe it is most important for peri-operative haemostasis to achieve a good haemostatic condition just after surgery, and also believe that the administration of bolus infusion during surgery is more effective at stopping bleeding than continuous infusion. However, theoretically the total dose of bolus infusion administered during the peri-operative period is more than that of continuous infusion, so from an economical point of view it is also important to change from bolus infusion to continuous infusion once all bleeding has stopped. We recommend the administration of the referred to combination infusion that consists of two parts: a bolus infusion (i.e. several bolus infusions) to achieve good haemostasis and a continuous infusion to maintain a good haemostatic condition. We also believe that this combination infusion mode is the most effective and economical mode to administer.

We have performed numerous major orthopaedic surgeries for haemophilia patients with inhibitors and have achieved good haemostasis. Based on those results, we have concluded that the combination of bolus and continuous infusions of rFVIIa is safe and effective, and more convenient to administer than simple bolus infusion therapy to achieve haemostasis at peri-operative periods. In addition, our data also concurs with the data of several previous reports which showed that orthopaedic surgery for haemophilia patients with inhibitors by means of rFVIIa is safe and effective.

Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

References

- 1 Rodriguez-Merchan EC, Quintana M, Jimenez-Yuste V, Hernandez-Navarro F. Orthopaedic surgery for inhibitor patients: a series of 27 procedures (25 patients). *Haemophilia* 2007; 13: 613–9.

- 2 Jimenez-Yuste V, Rodriguez-Merchan EC, Alvarez MT, Quintana M, Fernandez I, Hernandez-Navarro F. Controversies and challenges in elective orthopedic surgery in patients with hemophilia and inhibitors. *Semin Hematol* 2008; 45: S64–7.
- 3 Morfini M, Haya S, Tagariello G *et al.* European study on orthopaedic status of haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13: 606–12.
- 4 Oberfell A, Auvinen MK, Mathew P. Recombinant activated factor VII for haemophilia patients with inhibitors undergoing orthopaedic surgery: a review of the literature. *Haemophilia* 2008; 14: 233–41.
- 5 Pruthi RK, Mathew P, Valentino LA, Sumner MJ, Seremetis S, Hoots WK. Haemostatic efficacy and safety of bolus and continuous infusion of recombinant factor VIIa are comparable in haemophilia patients with inhibitors undergoing major surgery. Results from an open-label, randomized, multicenter trial. *Thromb Haemost* 2007; 98: 726–32.
- 6 Teitel JM, Carcao M, Lillicrap D *et al.* Orthopaedic surgery in haemophilia patients with inhibitors: a practical guide to haemostatic, surgical and rehabilitative care. *Haemophilia* 2009; 15: 227–39.
- 7 Hedner U, Glazer S, Pingel K *et al.* Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe haemophilia A during synovectomy. *Lancet* 1988; 2: 1193.
- 8 Habermann B, Hochmuth K, Hovy L, Scharrer I, Kurth AH. Management of haemophilic patients with inhibitors in major orthopaedic surgery by immunoadsorption, substitution of factor VIII and recombinant factor VIIa (NovoSeven): a single centre experience. *Haemophilia* 2004; 10: 705–12.
- 9 Rodriguez-Merchan EC, Wiedel JD, Wallny T *et al.* Elective orthopaedic surgery for inhibitor patients. *Haemophilia* 2003; 9: 625–31.
- 10 Solimeno LP, Perfetto OS, Pasta G, Santagostino E. Total joint replacement in patients with inhibitors. *Haemophilia* 2006; 12(Suppl. 3): 113–16.
- 11 Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 958–65.
- 12 Pan-Petes B, Laguna P, Mital A *et al.* Single-dose (270 microg kg⁻¹) recombinant activated factor VII for the treatment and prevention of bleeds in haemophilia A patients with inhibitors: experience from seven European haemophilia centres. *Haemophilia* 2009; 15: 760–5.
- 13 Salaj P, Brabec P, Penka M *et al.* Effect of rFVIIa dose and time to treatment on patients with haemophilia and inhibitors: analysis of HemoRec registry data from the Czech Republic. *Haemophilia* 2009; 15: 752–9.
- 14 Giangrande PL, Wilde JT, Madan B *et al.* Consensus protocol for the use of recombinant activated factor VII [eptacog alfa (activated); NovoSeven] in elective orthopaedic surgery in haemophilic patients with inhibitors. *Haemophilia* 2009; 15: 501–8.
- 15 Schulman S. Continuous infusion of recombinant factor VIIa in hemophilic patients with inhibitors: safety, monitoring, and cost effectiveness. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 421–4.
- 16 Schulman S, Bech Jensen M, Varon D *et al.* Feasibility of using recombinant factor VIIa in continuous infusion. *Thromb Haemost* 1996; 75: 432–6.
- 17 Schulman S, Varon D, Keller N, Gitel S, Martinowitz U. Monoclonal purified FVIII for continuous infusion: stability, microbiological safety and clinical experience. *Thromb Haemost* 1994; 72: 403–7.
- 18 Ludlam CA, Smith MP, Morfini M, Gringeri A, Santagostino E, Savidge GF. A prospective study of recombinant activated factor VII administered by continuous infusion to inhibitor patients undergoing elective major orthopaedic surgery: a pharmacokinetic and efficacy evaluation. *Br J Haematol* 2003; 120: 808–13.
- 19 Mauser-Bunschoten EP, de Goede-Bolder A, Wielenga JJ, Levi M, Peerlinck K. Continuous infusion of recombinant factor VIIa in patients with haemophilia and inhibitors. Experience in the Netherlands and Belgium. *Neth J Med* 1998; 53: 249–55.
- 20 Santagostino E, Morfini M, Rocino A, Baudo F, Scarggi FA, Gringeri A. Relationship between factor VII activity and clinical efficacy of recombinant factor VIIa given by continuous infusion to patients with factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 954–8.
- 21 Lorenzo JI, Montoro JM, Aznar JA. Postoperative use of rFVIIa by continuous infusion in a haemophilic boy. *Haemophilia* 1999; 5: 135–8.
- 22 Perez R, Martinez RL, Pinero A, Sosa R. Sequential treatment with bolus and continuous infusion of recombinant factor VIIa for hip arthroplasty in a patient with haemophilia A and inhibitor. *Haemophilia* 2002; 8: 822–5.
- 23 Tagariello G, Bisson R, Radossi P *et al.* Concurrent total hip and knee replacements in a patient with haemophilia with inhibitors using recombinant factor VIIa by continuous infusion. *Haemophilia* 2003; 9: 738–40.
- 24 Tagariello G, De Biasi E, Gajo GB *et al.* Recombinant FVIIa (NovoSeven) continuous infusion and total hip replacement in patients with haemophilia and high titre of inhibitors to FVIII: experience of two cases. *Haemophilia* 2000; 6: 581–3.
- 25 Smith MP, Ludlam CA, Collins PW, *et al.* Elective surgery on factor VIII inhibitor patients using continuous infusion of recombinant activated factor VII: plasma factor VII activity of 10 IU/ml is associated with an increased incidence of bleeding. *Thromb Haemost* 2001; 86: 949–53.

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¹⁾ 山崎 法子¹⁾ 鈴木 典子¹⁾
後藤 宏実¹⁾ 高山 成伸²⁾ 瀧 正志³⁾

¹⁾聖マリアンナ医科大学病院臨床検査部

²⁾大東文化大学スポーツ・健康科学部

³⁾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¹⁾。

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)²⁾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)³⁾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い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、③ B 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⁴⁾。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⁴⁾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¹⁾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-10A μ (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⁴⁾

| | 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% | |
| 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¹⁾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)) / log 2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²⁾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

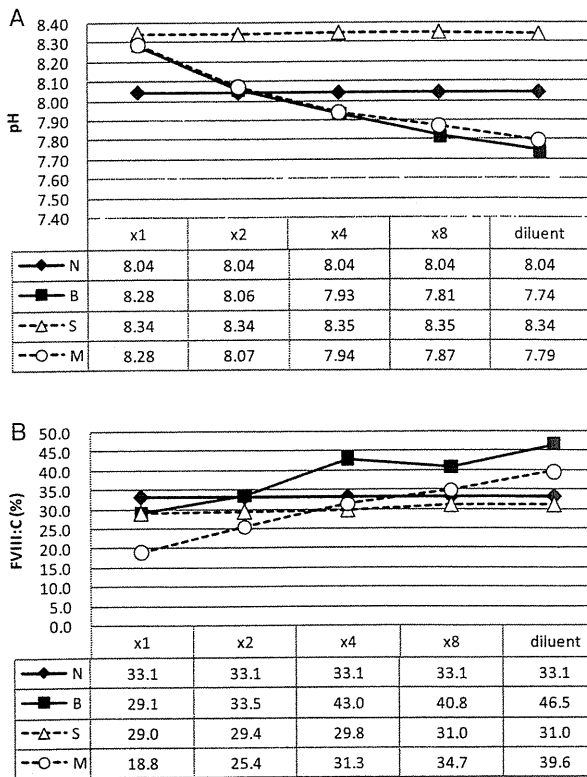


図 1. 4 法における検体希釈に伴う反応液の pH と FVIII : C

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) = $\Sigma (A) / \text{検体数}$ (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 | 10.59 | 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

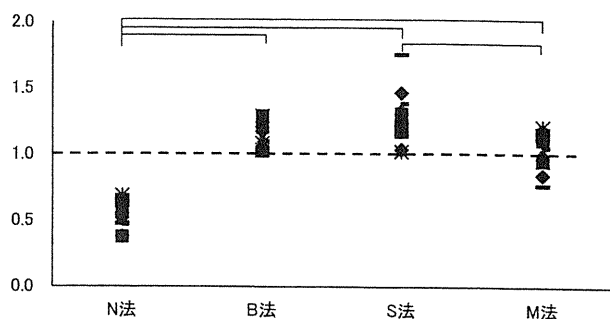


図2. 平均値比による各測定値の比較

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

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