

血友病 A インヒビター患者におけるブタ第VIII因子製剤 (Hyate : C)の反応性

奈良県立医科大学小児科学教室

寺田 茂 紀

REACTIVITY OF PORCINE FACTOR VIII PREPARATION (HYATE : C) TO FACTOR VIII INHIBITOR IN HEMOPHILIA A

SHIGEKI TERADA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received September 30, 1992

Summary: Human and porcine factor VIII inhibitor titers were measured in the plasma of 15 hemophilia A patients with inhibitor and binding fragment to human factor VIII polypeptide was analyzed by immunoblot method.

1. Human factor VIII inhibitor levels were 4-390 B.U/ml, and porcine factor VIII inhibitor levels that were 0-58 B.U/ml were lower than inhibitor levels to human factor VIII. Cross reactivity (ratio of porcine to human factor VIII inhibitor titer) was 0-100 %.

2. Two cases with factor VIII inhibitor binding to 44 kDa fragment of human factor VIII heavy chain had low crossreactivity (0.5 %-0 %). One case with inhibitor binding to 44 kDa fragment and 72 kDa fragment of human factor VIII light chain had crossreactivity of 11 %. 10 cases with inhibitor binding to 72 kDa fragment had high crossreactivity (24-100 %). Two cases with inhibitor binding to 44 kDa and B domain had crossreactivity of 1 % and 27 %.

3. Hemostatic effect of the porcine factor VIII preparation was observed in 3 cases with factor VIII inhibitor.

Index Terms

hemophilia A, human factor VIII inhibitor, porcine factor VIII inhibitor, porcine factor VIII preparation (Hyate : C)

緒 言

血友病 A は X 染色体上の第VIII因子遺伝子の異常にもとづく第VIII因子合成障害のため、関節内、筋肉その他の臓器、組織の出血症状を反復する先天性出血性疾患である。患者の出血には欠乏する第VIII因子を補充し止血をはかる方法がおこなわれるが、第VIII因子補充療法の経過中数%~10数%に第VIII因子に対する抑制物質(インヒビター)の発生することが知られている¹⁾²⁾。いったん第VIII因子インヒビターが発生すると従来の補充療法は困難と

なるので、インヒビターを中和するため大量の第VIII因子製剤の投与をおこなうか、インヒビター作用を迂回する目的で非活性型または活性型のプロトロンビン複合体製剤(Non activated PCC 剤, Activated PCC 剤)によるバイパス療法^{3)~5)}がおこなわれる。第VIII因子大量療法はインヒビターを中和できれば効果は確実であるが、インヒビター力価が高い場合には超大量を要するため実際にはおこなえない。また第VIII因子製剤投与により anamnestic response をおこし、インヒビター力価が数日後に急激に上昇する high responder 症例ではそれまでに止

血を完了する必要がある。一方、PCC 剤は効果が不確定であり止血効果判定のための客観的指標もなく、また長期反復投与により血栓傾向やDIC 合併例も報告されている^{9)~11)}。1950年代にBrinkhousら¹²⁾¹³⁾、Biggsら¹⁴⁾、Spaetら¹⁵⁾¹⁶⁾により、イヌ、ウシ、ブタなど動物血漿中の第VIII因子量はヒトの数倍高いことが報告され、Macfarlaneら¹⁷⁾によりブタ第VIII因子濃縮製剤が作製され血友病A患者に使用されるようになった^{18)~20)}。しかし、von Willebrand 因子抗原、フィブリノゲンやその他の夾雑蛋白の除去および精製技術の未熟から、種々のアレルギー反応や発熱反応、製剤中の血小板凝集因子による血小板減少などの副作用^{21)~22)}のため、その使用は極めて限られていた。1980年代にはいり、高分子電解質の polyelectrolyte イオン交換樹脂による分画法²³⁾が開発され、高純度のブタ第VIII因子製剤が得られるようになり、欧米では第VIII因子インヒビターを有する血友病A患者の出血症状に用いられるようになった^{24)~27)}。本邦でも平成2年5月~平成3年6月の間に奈良医大小児科学教室を含む11施設によるブタ第VIII因子製剤の臨床治験がおこなわれた²⁸⁾。著者は教室で観察中の第VIII因子インヒビターを保有する15症例について、ヒト第VIII因子に対するインヒビター活性とブタ第VIII因子に対するインヒビター活性とブタ第VIII因子に対するインヒビター活性を比較し、交差反応性を検討した。また、3例のインヒビター症例にブタ第VIII因子製剤を投与し、ヒト第VIII因子およびブタ第VIII因子に対する交差反応性の推移を追及した。

方 法

1. 対象：当教室において観察中のインヒビターを有する血友病A患者15症例について検討した。当該患者のヒト第VIII因子に対するインヒビター力価は4~390 Bethesda 単位/mlである。また、そのうち3例についてはブタ第VIII因子製剤を投与し、その反応についても検討した。

2. ブタ第VIII因子製剤：英国 Porton Speywood 社より供給を受けたブタ血漿を原料とし、高分子電解質 polyelectrolyte イオン交換樹脂分画法により得られた高純度ブタ第VIII因子濃縮製剤 (Hyate : C) を使用した。本製剤1バイアル中には血液凝固第VIII因子を約500単位含有し、使用時1バイアルを注射用蒸留水20mlで25単位/mlになるよう溶解し、経静脈的に緩徐に投与した。

3. 第VIII因子活性：Hardisty 1段法²⁹⁾によった。

4. ヒト第VIII因子に対するインヒビター力価：Kasperら³⁰⁾の方法に準じた。正常血漿と被検血漿を等量混合、37°C、2時間加温後の残存第VIII因子活性をもとめた。正常

血漿の第VIII因子活性を50%失活せしめる作用を1 Bethesda 単位/ml (B. U/ml) とした。

5. ブタ第VIII因子に対するインヒビター力価：標準血漿としてブタ第VIII因子濃縮製剤を0.05 M イミダゾール、0.1 M 塩化ナトリウム、pH 7.3の緩衝液でブタ第VIII因子が5単位/mlになるよう溶解、さらにヒト第VIII因子欠乏血漿 (Dade 社) で5倍に希釈しブタ第VIII因子が1単位/mlになるよう調製したものをを用いた。標準血漿と被検血漿を等量混合、37°C、2時間加温後残存するブタ第VIII因子活性をもとめた。標準血漿の第VIII因子活性を50%失活せしめる作用を1 B. U/ml とした。

6. 交差反応性 crossreactivity：同一血漿において測定したヒトおよびブタに対するインヒビター力価より、次の計算式からその比をもとめ交差反応性とした。

$$\frac{\text{ブタ第VIII因子に対するインヒビター力価}}{\text{ヒト第VIII因子に対するインヒビター力価}} \times 100$$

7. インヒビター結合部位の解析：次のステップによった。

i. 純化第VIII因子の作製：第VIII因子濃縮製剤 (ヘモフィル M, Baxter) 3000単位を0.02 M イミダゾール、0.15 M 塩化ナトリウム、0.1 M L-リジン、10 mM ベンザミジンヒドロクロライド、1 mM フェニルメチルスルホンプロライド、pH 6.8に調製した緩衝液60 mlで、第VIII因子活性が50単位/mlになるよう溶解した。1.1 gのシアニ化ブROM活性化セファロース4B (Pharmacia) を0.5 M 塩化ナトリウムで膨化、カラムに充填し、先に溶解した第VIII因子製剤を通し緩衝液で洗浄の後、0.3 M 塩化カルシウム加緩衝液で1 ml ずつ分画を採取し、その void volume を0.05 M トリス、0.15 M 塩化ナトリウム、0.02 % アジ化ナトリウム、pH 7.3 緩衝液で4°C、一昼夜透析し1000単位/ml以上の純化第VIII因子が得られた。これを等量のサンプルバッファー (2 % ドデシル硫酸ナトリウム、20 % グリセリン、0.05 % ブROMフェノールブルー加トリス塩酸緩衝液、pH 8.0) と混和、56°Cで30分反応させた。また、同様にサンプルバッファーと反応させた純化第VIII因子に、終濃度10単位/mlになるようトロンビン添加、37°C、60分反応させトロンビン処理検体とした。

ii. イムノプロット法³¹⁾：トロンビン未処理およびトロンビン処理のおのおのの第VIII因子を、4~15 % 濃度勾配のアクリルアミドゲルに各レーン10 μl ずつ添加、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム、0.025 M トリス、0.192 M グリシン、pH 8.4の泳動用緩衝液下で、まず15 mA で濃縮後、30 mA で120分電気泳動をおこなった³²⁾。電気泳動後、0.025 M トリス、0.192 M グリシン、20 % メタノール溶液下で0.2 A、120分ニトロセルロース膜に電氣的

に転写した。さらに、余剰抗原をふさぐために5%ミルク(雪印スキムミルク, 雪印乳業)を加えた8mMリン酸水素二ナトリウム12水, 1.5mMリン酸二水素カリウム, 0.15M塩化ナトリウム, pH7.2のリン酸緩衝液で2時間室温で反応させた。次にインヒビター患者血漿より得たIgG分画を2時間室温で反応させた。インヒビターIgG分画は、各インヒビター患者血漿を倍量の0.06M酢酸緩衝液, pH4.0と混合, n-カプリル酸を患者血漿1mlにつき68mgの割合で1滴ずつ添加, 30分遠心分離し, この上澄をリン酸緩衝液中で, 4℃, 一昼夜透析したものを5%ミルク加リン酸緩衝液で希釈したものを用いた³³⁾。さらに, 抗ヒトIgG₄モノクローナル抗体(Biomakor社)を2時間室温で反応させた後, ¹²⁵I標識抗マウスIgG抗体(第一化学薬品)で標識しフィルム(XAR5, Kodak社)感光させ観察した。

成 績

1. 第VIII因子インヒビターを有する血友病A患者血漿中のヒト第VIII因子インヒビター活性およびブタ第VIII因子インヒビター活性

教室で観察中の第VIII因子インヒビターを有する血友病A15症例の血漿について, 正常ヒト血漿を用いて測定したインヒビター活性(ヒト第VIII因子インヒビター活性)とブタ第VIII因子濃縮製剤を用いて測定したインヒビター活性(ブタ第VIII因子インヒビター活性)を比較検討した。

ヒト第VIII因子インヒビター活性は4~390B. U/mlで, 10B. U/ml以下の低力価の症例は4例, 10~100B.

U/mlの中等力価の例は7例, 100B. U/ml以上の高力価例は4例であった。ブタ第VIII因子インヒビター活性は0~58B. U/mlで, ヒト第VIII因子インヒビター活性とブタ第VIII因子インヒビター活性の比をもとめ, 交差反応性として表現すると, 15症例血漿の交差反応性は0~100%にわたり平均33.2%であった。このうち交差反応性の著しく低い症例(No. 1, 3および14)のインヒビターはブタ第VIII因子には反応しないと考えられた。

2. 第VIII因子インヒビターの認識する第VIII因子領域の検索

ヒト第VIII因子蛋白は2332個のアミノ酸より成り, 配列の相同性より蛋白N末よりA₁A₂B₂A₃C₁C₂domain(領域)に分けられている。A₁A₂B₂domainは210kDaのH鎖を, A₃C₁C₂domainは80kDaのL鎖を形成している³⁴⁾³⁵⁾。循環血中では210kDaH鎖はプロテアーゼおよびトロンビンによりB₂鎖が遊離されて90kDaのH鎖に漸次転換されることが観察されている³⁶⁾³⁷⁾。著者は第VIII因子インヒビターが第VIII因子蛋白のどのdomainを認識しているかを, ヒト第VIII因子純化物およびトロンビンの限定分解で生じた第VIII因子フラグメントを用い, 第VIII因子インヒビター症例の血漿よりの部分純化IgGとの反応をイムノプロット法で検討した。15症例のうちNo. 1および14よりの部分純化IgGは第VIII因子純化物との反応で90~210kDaにいたるフラグメントのバンドが観察された。トロンビン処理第VIII因子純化物に対しては淡い90kDaのバンドと44kDaのバンドの出現が観察された。したがって, 両症例のインヒビターは第VIII

Table 1. Inhibitor titer, crossreactivity and inhibitor binding fragments in 15 hemophilia patients with factor VIII inhibitor

Patient No. Name	Inhibitor titer (Bethenda U/ml)		Crossreactivity (%) *	Inhibitor binding fragments (kDa)
	Human	Porcine		
1 N. Ni	390	2	0.5	44
2 M. O.	363	40	11	44, 72
3 K. I.	200	2	1	44, B domain
4 M. Na	176	58	24	72
5 M. T.	58	25	43	72
6 Y. O.	55	25	45	72
7 J. H.	44	29	66	72
8 K. M.	28	7	25	72
9 M. B.	15	8	53	72
10 N. K.	14	5	36	72
11 K. Y.	11	3	27	44, B domain
12 K. S.	6	2	33	72
13 H. H.	6	2	33	72
14 H. A.	6	0	0	44
15 Y. T.	4	4	100	72

* $\frac{\text{Porcine factor VIII inhibitor titer}}{\text{Human factor VIII inhibitor titer}} \times 100 (\%)$

因子H鎖中の44 kDa フラグメントを認識するものと考えられた。No. 2 のIgG は第VIII因子純化物との反応で80 kDa のバンドが、トロンビン処理第VIII因子純化物との反応では72 kDa および44 kDa のバンドが観察された。したがって、本例は第VIII因子L鎖72 kDa とH鎖44 kDa フラグメントの両者を認識していた。No. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, および15の10症例中のIgG は第VIII因子純化物との反応で80 kDa のバンドが出現し、トロンビン処理第VIII因子純化物との反応では72 kDa のバンドの出現が観察された。これらの症例のインヒビターは第VIII因子L鎖72 kDa のみを認識していた。No. 3 および11の2症例のIgG は第VIII因子純化物との反応で90~210 kDa を中心とした領域におよぶバンドが観察され、トロンビン処理第VIII因子純化物との反応では60~150 kDa の領域および44 kDa のバンドが観察された。この2症例では第VIII因子のH鎖のみならず分子サイズおよび不明瞭なバンドパターンより、糖含量の多いB domain を認識しているものと考えられた。

以上のごとく、患者血漿中の第VIII因子インヒビターがヒト第VIII因子H鎖44 kDa フラグメントを認識したのは2例で、いずれも交差反応性は0.5, 0%の低値の症例であった。第VIII因子L鎖72 kDa のフラグメントのみを認識したのは10症例であった。これらの症例の交差反応性は24~100%であった。第VIII因子H鎖44 kDa フラグメントとB domain 部を認識したのは2例で、交差反応性は1%および27%であった。第VIII因子H鎖44 kDa とL鎖72 kDa の両フラグメントを認識した1例の交差

反応性は11%であった。

3. ブタ第VIII因子製剤投与によるヒトおよびブタ第VIII因子インヒビター活性の推移

3例の第VIII因子インヒビター症例の出血症状に対しブタ第VIII因子製剤(Hyate : C)を投与する機会を得た。その際のヒトおよびブタ第VIII因子インヒビター活性の推移

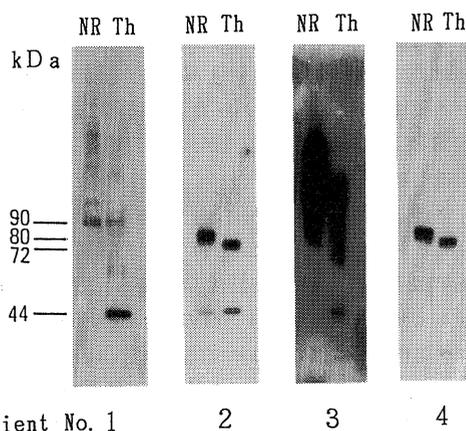


Fig. 1. Autoradiograph of a nitrocellulose membrane containing purified intact (NR) or thrombin-treated factor VIII polypeptides (Th) transferred from a 4-15% polyacrylamide gradient gel. After incubation with factor VIII inhibitor IgG of hemophilia A with inhibitor (Patient No. 1, 2, 3 and 4), the membrane was incubated with ^{125}I -labelled rabbit anti-mouse IgG.

Table 2. Change in factor VIII inhibitor titer, treatment episodes and hemostatic efficacy

Patient No.	Name	Weeks after infusion	Inhibitor titer (B. U/ml)		Crossreactivity (%)*	Infusions		FVIII C (%)		Hemostatic efficacy
			Human	Porcine		Times/days	Dose (U/Kg)	Pre	Post	
3	K. I.	Preinfusion	200	2	1.0	2/2	53	<1	3.0	Good
		1w	232	12.5	5.4					
		2w	208	22.5	10.8					
		4w	110	5	4.5					
		8w	65	3	4.6					
10	N. K.	preinfusion	14	5	35.7	1/1	310	<1	130	Excellent
		1w	46	25	54.3					
		2w	300	103	34.3					
		4w	448	160	35.7					
		8w	219	90	41.1					
14	Hz A.	preinfusion	6	0	0	1/1	52	<1	15.0	Excellent
		1w	9	1	11.1					
		2w	23	2	8.7					
		4w	22	1.5	6.8					
		8w	13	1.5	11.5					

* $\frac{\text{Porcine factor VIII inhibitor titer}}{\text{Human factor VIII inhibitor titer}} \times 100 (\%)$

を追及した。

症例 No. 3(K. I.) 27 才, 血友病 A. 17 才時に第VIII因子インヒビターが検出された。1990 年 9 月左肘および右膝関節出血時, ヒト第VIII因子インヒビター活性 200 B. U/ml, プタ第VIII因子インヒビター活性 2 B. U/ml のため, プタ第VIII因子製剤 2900 単位(53 単位/kg)を 2 日間続けて輸注したところ, 第VIII因子活性は 1%以下より 3%まで上昇, 臨床的な止血効果も良好であった。プタ第VIII因子製剤投与後 1 週目より, ヒト第VIII因子インヒビター力価は 232 B. U/ml と若干の上昇の後, 低下していった。プタ第VIII因子インヒビター力価も前値 2 B. U/ml より 22.5 B. U/ml と上昇をみたが, 交差反応性は 1~10.8%と低く推移した。

症例 No. 10(N. K.) 18 才, 血友病 A. 3 才時第VIII因子インヒビターが検出された。1990 年 11 月左頸部出血時, ヒト第VIII因子インヒビター活性 14 B. U/ml, プタ第VIII因子インヒビター活性 5 B. U/ml のため中和量もあわせてプタ第VIII因子製剤 20000 単位(310 単位/kg)を輸注した。第VIII因子活性は 130%まで上昇, 投与後悪寒の出現があり, 副腎皮質ステロイド剤の併用を必要としたものの止血効果は良好であった。しかしながら, 投与 1 週目より第VIII因子インヒビター, プタ第VIII因子インヒビターともに上昇し, 11 日目には右頰部出血のため Activated PCC 剤も使用, 4 週目にはヒト第VIII因子インヒビターは 448 B. U/ml, プタ第VIII因子インヒビターも 160 B. U/ml にまで急激に上昇したが, 交差反応性は 34.3~54.3%とはほぼ一定の値をとった。

症例 No. 14(H. A.) 6 才, 血友病 A. 5 才時インヒビターが検出された。1990 年 11 月右足関節出血時ヒト第VIII因子インヒビター活性 6 B. U/ml, プタ第VIII因子インヒビター活性 0 B. U/ml のためプタ第VIII因子製剤 1500 単位(52 単位/kg)を輸注した。第VIII因子活性は 15%に上昇, 止血効果も良好であった。ヒト第VIII因子インヒビター力価は前値 6 B. U/ml より 2 週目には 23 B. U/ml まで増加, 以後漸減した。それと並行してプタ第VIII因子インヒビター力価も 0 より 2 B. U/ml まで上昇したが, 経過中交差反応性は 0~11.5%と常に低い値を推移した。

考 案

高純度プタ血液凝固第VIII因子濃縮製剤の Hyate : C (英国 Porton Speywood 社)は, プタ血漿よりのクリオプレシビートを水酸化アルミニウムで吸着してプロトンピン複合体を除去した上澄を無菌濾過後, polyelectrolyte イオン交換樹脂で精製し, さらにウイルス除去処理して得られた凍結乾燥製剤である。本剤は 1

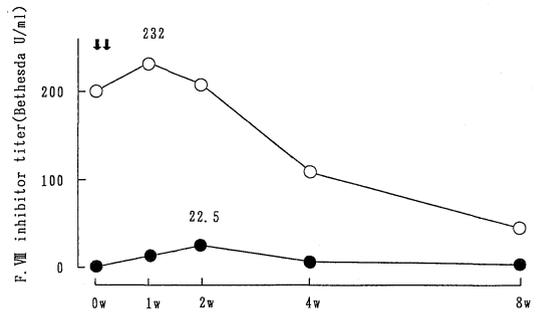


Fig. 2. A hemophilia A (No. 3, K. I.) with factor VIII inhibitor treated with porcine factor VIII preparation.
○ Human factor VIII inhibitor titer
● Porcine factor VIII inhibitor titer
↓ Infusion of porcine factor VIII preparation

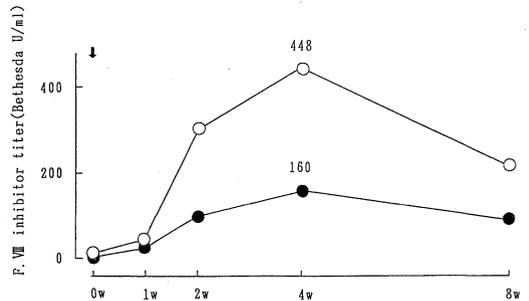


Fig. 3. A hemophilia A (No. 10, N. K.) with factor VIII inhibitor treated with porcine factor VIII preparation.
○ Human factor VIII inhibitor titer
● Porcine factor VIII inhibitor titer
↓ Infusion of porcine factor VIII preparation

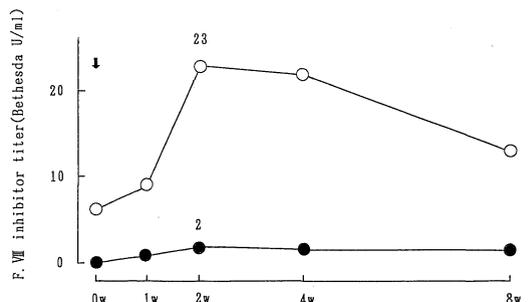


Fig. 4. A hemophilia A (No. 14, H. A.) with factor VIII inhibitor treated with porcine factor VIII preparation.
○ Human factor VIII inhibitor titer
● Porcine factor VIII inhibitor titer
↓ Infusion of porcine factor VIII preparation

バイアルあたり 20 ml の注射用水で溶解するが、第VIII因子活性は 25 単位/ml、蛋白量 0.3 mg/ml、第VIII因子比活性 88 単位/mg で、血小板凝集活性および von Willebrand 因子抗原の含量は少ない。欧米では 1980 年代に本剤の臨床治験がおこなわれ、ヒト第VIII因子インヒビター活性が 50 B. U/ml 以下の症例には極めて有効²⁵⁾で、より高力価のものにも使用しうることが観察されている。本邦では平成 2 年～3 年の 1 年間 11 施設における 12 例の血友病 A インヒビター患者について Hyate : C の臨床治験がおこなわれた。教室でも 3 例の第VIII因子インヒビター保有血友病 A 患者に Hyate : C を投与してその止血効果や有効性を検討した。

著者は Hyate : C を用い教室で観察中の第VIII因子インヒビター保有血友病 A 15 症例の血漿についてヒト正常血漿に対する第VIII因子インヒビター活性とブタ第VIII因子インヒビター活性の比を求めて、インヒビターのヒトおよびブタ第VIII因子に対する交差反応性を検討した。15 症例のヒト第VIII因子インヒビター活性は 4～390 B. U/ml で、このうち 8 例は 10～100 B. U/ml であったが、3 例は 100 B. U/ml 以上の高力価例であった。一方、ブタ第VIII因子インヒビター活性は 0～58 B. U/ml で、ヒトのそれに比し低値であった。各症例血漿の交差反応性は 0～100 %、平均 33.2 % であったが、3 例は著しく低下しており、これらのインヒビターはブタ第VIII因子に反応しないと考えられた。交差反応性が著しい低下、あるいは部分的であった例がみられたことは、これら症例におけるインヒビターのヒト第VIII因子とブタ第VIII因子に対する認識部位がある程度異なることによると考えられた。したがって、これら 15 症例血漿中の第VIII因子インヒビターが、第VIII因子蛋白中のどの domain を認識しているかを、ヒト第VIII因子純化物およびトロンビンの限定分解で生じた第VIII因子フラグメントとインヒビター IgG 分画を用いイムノプロット法で検討した。2 症例の第VIII因子インヒビターはヒト第VIII因子 H 鎖 44 kDa のフラグメントのみを認識したが、交差反応性は 0 % および 0.5 % であった。第VIII因子 H 鎖 44 kDa フラグメントと B domain 部を認識したのは 2 例で交差反応性は 1 % および 27 % であった。第VIII因子 H 鎖 44 kDa と L 鎖 72 kDa の両フラグメントを認識したのは 1 例で、交差反応性は 11 % であった。第VIII因子 L 鎖 72 kDa フラグメントのみを認識したのは 10 症例で、交差反応性は 24～100 % であった。これらの所見から、第VIII因子 H 鎖(44 kDa 単独、あるいは B domain を含む)を認識するインヒビターに対し、ブタ第VIII因子は交差反応性に乏しく、したがってこれらの症例にはブタ第VIII因子製剤が有効であろうと推察された。

一方、L 鎖を認識するインヒビター例では交差反応性は variable であり、特にインヒビター力価が高い症例に対してはブタ第VIII因子製剤は有効性に乏しいと想定された。

15 症例のうち 3 例の出血症状に対してブタ第VIII因子製剤を投与したところ、ヒト第VIII因子 H 鎖 44 kDa 単独を認識するインヒビター例(No. 14, H. A.)と H 鎖に加え B domain をも認識するインヒビター例(No. 3, K. I.)においては、臨床的には有効性が高く、また投与後の第VIII因子インヒビター活性の上昇も小さく、ヒト対ブタの交差反応性も低く維持され、その有効性が認識された。一方、L 鎖 72 kDa のみを認識するインヒビター例(No. 10, N. K.)においては、ブタ第VIII因子インヒビターが使用前 5 B. U/ml 検出されたため中和量も含め 310 単位/kg のブタ第VIII因子製剤の投与を要し、止血効果は認められたがその後のヒトおよびブタ両第VIII因子インヒビター力価の上昇がみられ、出血症状に対する反復投与の困難さが予想された。

現在、ブタ第VIII因子製剤はヒト第VIII因子インヒビター力価が 50 B. U/ml 以下のインヒビター症例に対しての適応があるとされているが、今回の著者の検討より、ブタ第VIII因子製剤の投与に際して、ヒト第VIII因子インヒビター力価のみならずブタ第VIII因子インヒビター力価をも測定し、両者の交差反応性の低いインヒビター症例ほどブタ第VIII因子製剤の適応があると考えられた。

結 論

インヒビターを有する血友病 A 患者 15 症例についてヒトおよびブタ第VIII因子インヒビター力価を測定し、そのインヒビターの第VIII因子への認識フラグメントを解析した。

1. 15 症例のヒト第VIII因子インヒビター活性は 4～390 B. U/ml で、一方、ブタ第VIII因子活性は 0～58 B. U/ml で、ヒトのそれに比し低値であった。ヒト第VIII因子インヒビター力価に対するブタ第VIII因子インヒビター力価の比、すなわち交差反応性は 0～100 %、平均 33.2 % であった。

2. インヒビターの第VIII因子への認識フラグメントを解析すると、15 症例のうち 2 例は第VIII因子 H 鎖 44 kDa フラグメントを認識し、1 例は第VIII因子 L 鎖 72 kDa と H 鎖 44 kDa フラグメントの両者を認識、10 例のインヒビターは第VIII因子 L 鎖 72 kDa のみを認識していた。他の 2 例は第VIII因子 H 鎖のみならず B domain を認識していた。44 kDa フラグメントを認識した 2 例の交差反応性は 0.5 %、0 % と低値で 72 kDa フラグメントのみを認識した 10 例の交差反応性は 24～100 % であった。44

kDa, B domain 部位を認識していた2例の交差反応性は1%, 27%であった。44 kDa と 72 kDa の両フラグメントを認識した1例の交差反応性は11%であった。

3. ヒトおよびブタ第Ⅷ因子インヒビター活性が200 B. U/ml と 2 B. U/ml (交差反応性1%) で 44 kDa, B domain 認識のインヒビター症例, 両活性が14 B. U/ml と 5 B. U/ml (交差反応性36%) で 72 kDa フラグメントのみを認識するインヒビター症例, 両活性がそれぞれ6 B. U/ml と 0 B. U/ml (交差反応性0%) で 44 kDa のみを認識するインヒビター症例の3例に対し, ブタ第Ⅷ因子製剤(Hyate : C)を投与したところ, 3例とも止血効果は良好であった。

(本論文の要旨は第33回日本臨床血液学会において発表した。)

文 献

- 1) 福井 弘 : 血友病および類縁疾患. 日本臨床 41 : 704-714, 1987.
- 2) Roberts, H. R. and Cromartie, R. : Overview of inhibitors to factor VIII and IX (Hoyer, L. W., ed. : Factor VIII Inhibitors.). Alan R. Liss, Inc., New York, NY, p 1-18, 1984.
- 3) Kasper, C. K. : Incidence and course of inhibitors among patients with classical haemophilia. Thromb. Diath. hemorrh. 30 : 263-271, 1973.
- 4) Biggs, R. : Haemophilia treatment in the United Kingdom from 1969 to 1974. Br. J. Haematol. 35 : 487-504, 1977.
- 5) Rizza, C. R. and Mathews, J. M. : Effect of frequent factor VIII placement on the level of factor VIII antibodies in haemophiliacs. Br. J. Haematol. 52 : 13-24, 1982.
- 6) Allain, J. P. and Frommel, D. : Antibodies to factor VIII. V. Patients of immune response to factor VIII in haemophilia A. Blood 47 : 973-982, 1976.
- 7) Sjamsoedin, L. J. M., Heijnen, L., Mauser-Buuschten, E. P., van Geijlvisk, J. L., van Hounelingen, H., van Asteb, P. and Sixa, J. J. : The effect of activated prothrombin-complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with haemophilia A and antibodies to factor VIII. N. Engl. J. Med. 305 : 717-721, 1981.
- 8) Lusher, J. M., Shapiro, S. S., Palascak, J. E., Rao, A. V., Levine, P. H., Blatt, P. M. and the Haemophilia Study Group : Efficacy of prothrombin-complex concentrates in haemophiliacs with antibodies to factor VIII. N. Engl. J. Med. 303 : 421-425, 1980.
- 9) Abildgaard, C. F., Penner, J. A. and Watson-Williams, E. J. : Anti-inhibitor coagulant complex (Autoplex) for treatment of factor VIII inhibitors in hemophilia. Blood 56 : 978-984, 1980.
- 10) Stenjerg, S. and Jorgensen, J. : Activated FIX concentrate (FEIBA) used in the treatment of hemophilic patients with antibody to F VIII. Acta Med. Scand. 203 : 471-476, 1978.
- 11) Kasper, C. K. : Thromboembolic complications, Task force report. Thromb. Diath. hemorrh. 33 : 640-644, 1975.
- 12) Graham, J. B., Collins, D. L., Godwin, I. D. and Brinkhous, K. M. : Assay of plasma antihemophilic activity in normal heterozygous (hemophilia) and prothrombinopenic dogs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 77 : 294-296, 1951.
- 13) Graham, J. B., Penick, G. D. and Brishpous, K. M. : Utilization of the antihemophilic factor during clotting of canine blood and plasma. Am. J. Physiol. 164 : 710-715, 1951.
- 14) Macfarlane, R. G., Biggs, R. and Bidwell, E. : Bovine anti-haemophilic globulin in treatment of haemophilia. Lancet 1 : 1316-1319, 1954.
- 15) Spaet, T. H. and Kinsell, B. G. : Properties of bovine anti-hemophilic factor. Proc. Soc. Exp. Biol. 83 : 314-317, 1953.
- 16) Pool, J. G. and Spaet, T. H. : Ethionine-induced depression of plasma antihemophilic globulin in rat. Proc. Soc. Exp. Biol. 87 : 54-57, 1954.
- 17) Macfarlane, R. G., Mallam, P. C., Witts, L. J., Bidwell, E., Biggs, R., Fraenkel, G. J., Honey, G. E. and Taylor, K. B. : Surgery in haemophilia. The use of animal anti-hemophilic globulin and human plasma in thirteen cases. Lancet 2 : 251-259, 1957.
- 18) Bidwell, E. : The purification of antihemophilic globulin from animal plasma. Br. J. Haematol. 1 : 386-389, 1955.
- 19) Fraenkel, G. J. and Honey, G. E. : Gunshot

- wounds in a haemophilic patient. Successful treatment animal anti-haemophilic globulin and surgery. *Lancet* 2 : 1117-1120, 1955.
- 20) **Biggs, R.** : Major surgery in hemophilic patients. *in* Treatment of Haemophilia and other Coagulation Disorders (Biggs, R. and Macfarlane, R. G., eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 166-194, 1966.
- 21) **Bidwell, E.** : Immunological aspects of haemophilia. *in* Treatment of Haemophilia and other Coagulation Disorders (Cacfarlane, R. G. ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 93-106, 1966.
- 22) **Rubin, R., Niemetz, J. and Esren, S.** : Use of animal AHG concentrates (factor VIII) in the treatment of life-threatening hemorrhage in patients with factor VIII antibodies. *Ann. NY. Acad. Sci.* 240 : 362-369, 1975.
- 23) **Middleton, S.** : Polyelectrolytes and preparation of factor VIII C. *in*. Unresolved Problems in Hemophilia (Forbes, C. P. and Lowe, G. D., eds.) MTP Press, Lancaster, United Kingdom, p 109-120, 1982.
- 24) **Ciavarella, N., Antoncicchi, S., Raniei, P. and Blood Coagulation Service** : Efficacy of porcine factor VIII in the management of haemophiliacs with inhibitors. *Br. J. Haematol.* 58 : 641-648, 1984.
- 25) **Kernoff, P. B., Thomas, N. D., Lilley, P. A., Mathews, K. B., Goldman, E. and Tuddenham, E. G. D.** : Clinical experience with polyelectrolyte-fractionated porcine factor VIII concentrate in the treatment of hemophiliacs with antibodies to factor VIII. *Blood* 63 : 31-41, 1984.
- 26) **Gatti, L. and Mannucci, P. M.** : Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb. Haemostas.* 51 : 369-384, 1984.
- 27) **Brettler, D. B., Doreen, B. B., Forsberg, D., Leine, P. H., Aledort, L. M., Hilgartner, M. W., Kasper, C. K., Lusher, J. M., McMillan, C., Roberts, H. and Cooperating Investigators** : The use of porcine factor VIII concentrate (Hyate : C) in the treatment of patients with inhibitor antibodies to factor VIII. *Arch. Intern. Med.* 149 : 1381-1385, 1989.
- 28) **福井 弘, 吉岡 章, 嶋 緑倫, 森 和夫, 依藤 壽, 木下忠俊, 小田中圭子, 浜 英永, 本多康次郎, 三間屋純一, 齋藤英彦, 高松純樹, 安永幸二郎, 大久保進 垣下榮三, 西田恭治** : インヒビター保有血友病 A 患者に対する乾燥濃縮ブタ血液凝固第VIII因子製剤「MTI-9002(Hyate : C)」の臨床評価. *日本血栓止血学会誌.* 2 : 501-504, 1991.
- 29) **Hardisty, R. H., MacPherson, J. C.** : A one-stage factor VIII (anti-haemophilic globulin) assay and its use on venous and capillary plasma. *Thromb. Diath. haemorrh.* 7 : 215-229, 1962.
- 30) **Kasper, C. K., Aledort, L. M., Counts, R. B., Edson, J. R., Fratantoni, J., Levine, P. H., McMillan, C. W., Pool, J. G., Shapiro, S. S., Shulman, N. R. and Eys, J. V.** : A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb. Diath. hemorrh.* 34 : 869-872, 1975.
- 31) **Fulcher, C. A., Mahoney, SdeG., Roberts, J. R., Kasper, C. K. and Zimmerman, T. S.** : Localization of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 7728-7732, 1985.
- 32) **Laemmli, U. K.** : Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T 4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 33) **Steinbuch, M. and Audran, R.** : The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 134 : 279-284, 1969.
- 34) **Toole, J. J., Knopf, L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker C., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N. and Hewick, R. M.** : Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 312 : 342-347, 1984.
- 35) **Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P. H., Srith, D. H., Hollingshead, P., Wion, P. L., Delwart, E., Tuddenham, E. G. D., Vehar, G. A. and Lawn, R. M.** : Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312 : 330-337, 1984.

- 36) **Fulcher, C. A. and Zimmerman, T. S. :** Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** : 1648-1652, 1982.
- 37) **Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Opperman, H., Keck, R., Wood, W. I., Harleins, R. N., Tuddenham, E. G. D., Lamn, R. M. and Capon, D. J. :** Structure of human factor VIII. Nature **312** : 337-342, 1984.