

加熱処理活性化プロトロンビン複合体製剤 (APCC_S) の凝血学的特性

奈良県立医科大学小児科学教室, 同薬剤部*

山本和邦, 西久保敏也, 今中康文
中川浩*, 植原善彦*, 吉岡章, 福井弘

IN VITRO CHARACTERIZATION OF HEAT-TREATED ACTIVATED PROTHROMBIN COMPLEX CONCENTRATES (APCC_S)

MASAKUNI YAMAMOTO, TOSHIYA NISHIKUBO, YASUFUMI IMANAKA,
OSAMU NAKAGAWA*, YOSHIHIKO UEHARA*, AKIRA YOSHIOKA and HIROMU FUKUI

Department of Pediatrics and Pharmacy, Nara Medical University*

Received September 28, 1990

Summary: We studied in vitro properties of heat-treated APCCs (Autoplex T and FEIBA TIM4) as compared with a heat-treated PCC (Proplex ST) with special reference to vitamin K dependent factors and F. VIII inhibitor bypassing activity (FEIB-activity). Autoplex and FEIBA were found to contain all of Factors II, VII, IX and X activities equal to or more than those levels in Proplex. While the immunological activity of F. II and F. X in both APCCs was higher than their functional activity, the functional activity of F. VII and F. IX was higher than their immunological activity. With western blot technique, bands of F. VIIa, F. IXa and F. Xa were shown in autoplex, FEIBA and Proplex. The content of FEIB-activity in both APCCs was the same as or more than indicated individually on the label. These findings suggest that activation and inactivation of biological activity and some modification of prothrombin family proteins in Autoplex and FEIBA occurred during production and heating procedures, and that both APCCs are probably effective and useful for managing hemophiliacs with inhibitors.

Index Terms

Factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIB-activity), heated-treated activated prothorombin complex concentrates (APCCs), Autoplex, FEIBA

緒 言

血友病患者の止血管理は血液成分分画製剤の開発進展によって、外科的手術や頭蓋内出血に対する治療も容易に行えるようになった。しかし、これら製剤の反復投与により第VIII因子および第IX因子に対する阻止物質 (inhibitor) の産生されることが知られており、一旦発生す

ると数カ月から数年間存在し、患者の止血管理は甚だ困難となる¹⁾。

これまでに inhibitor の患者の治療には高力価第VIII因子製剤の輸注、交換輸血または Plasmaphoresis が行われてきたが、1972年 Fekete²⁾がプロトロンビン複合体濃縮製剤 (Prothrombin complex concentrate: PCC) の使用を報告して以来、現在各種 PCC 製剤投与に

よる止血療法, すなわち第VIII因子 inhibitor-Bypass 療法の試みが数多くなされている³⁾⁻⁵⁾. 血友病B止血療法剤として用いられているPCC製剤には主としてビタミンK依存性凝固因子(F. II, VII, IX, X)が含まれており, これら諸因子を予め意識的に活性化させた活性型PCC製剤(Activated PCC: APCC)も開発されている.

教室では, すでに福井ら⁶⁾によりAPCC製剤の凝血, 免疫学的特性を, 杉本ら⁷⁾により市販4種の非活性型PCC(Non activated-PCC: NA-PCCと称すこともある.)と2種のAPCC中のFEIB活性(Factor VIII Inhibitor Bypassing Activity)を, 吉岡ら⁸⁾により加熱PCC製剤の凝血, 免疫学的特性を報告してきた. 今回, 加熱処理を含むAPCC中の製造行程中に生じたビタミンK依存性凝固因子の変化, 変性をImmunoblot法を用い, 凝血, 免疫学的に検討し, それらAPCC中の存在様式を分析したので報告する.

材料及び方法

1. 加熱処理-APCCおよびPCC剤: 加熱処理APCC剤として, Autoplex T (Baxter, USA)とFEIBA TIM4 (Immuno, Austria)の各1 lot, 加熱-PCC剤としてProplex ST (Baxter, USA)の1 lotを用いた.

2. 各凝固因子測定法: (1)第II, 第IX及び第X因子抗原量(F. II: Ag, F. IX: Ag及びF. X: Ag); Fujimura et al⁹⁾. Sugimoto et al¹⁰⁾. の方法により作製した自家製抗ヒト第II, 第IX及び第X因子家兎血清を用いたLaurellのロケット免疫電気泳動法にて測定した. (2)第VII因子抗原量(F. VII: Ag)¹¹⁾ I 標識抗ヒト第VII因子家兎IgGを用いたtwo-site solid phase immunoradiometric assay (IRMA)法¹²⁾にて測定した. (3)第II, 第VII, 第IX及び第X因子活性(F. II: C, F. VII: C, F. IX: C及びF. X: C); 第II, 第VII, 第IX及び第X因子欠乏血漿を基質にした一段法にて測定した.

3. Factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIB-活性): Elsinger (1977)の方法¹³⁾に準拠し, Kaolin-PTTに対する短縮効果より定量した. 血友病A inhibitor血漿(10 Bethesda U/ml) 0.1 mlに, 5 mg/ml Kaolin 懸濁液(Fisher. USA) 0.1 ml, 10倍希釈したPlatelin液(Organo Tekunika Corporation, NC) 0.1 mlを加え予め37°C 5分インキュベート後, 適当に希釈したサンプル0.1 mlを加え, 15秒間後0.025M CaCl₂ 0.1 mlを加え凝固時間を測定した. 得られた凝固時間を市販FEIBA (500 FEIBA U/vial)を順次希釈し両対数表にプロットして作成した標準直線より換算し, FEIBA U/mlとして表現した.

4. Immunoblot法による解析: Autoplex T, FEIBA TIM4, Proplex STを蒸留水でそれぞれ2倍, 10倍, 2倍に希釈し, 2% SDS及び20%グリセリン(還元処理では5% 2-mercaptoethanolを加える)を含む0.0625M Tris-HCl (PH6.8)と等量混合し90°C 1~2分反応させた. この試料10 μ lを4-12% SDS gradient ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動(SDS-PAGE)に20 mA 2時間展開した. 次にゲルをニトロセルロース膜(BIO-RAD, Richmond, CA)に合わせ, ニュートランスファープロテイング装置トランスプロットセル(BIO-RAD, Richmond, CA)を用いて200 mA, 2時間電氣的にタンパクをニトロセルロース膜に転写させた. さらにウシ血清アルブミン(日本バイオテスト)でブロッキング後抗ヒト第II, 第VII, 第IX及び第X因子ウサギ血清(ヘキスト)とそれぞれ一晚反応させた. 洗浄後ペルオキスターゼ標識抗ウサギIgG血清(TAGO, Burlingame, CA)と2時間反応させ, 4-Cl-1-naphthol (BIO-RAD, Richmond, CA)で発色させ第II, 第VII, 第IX及び第X因子の開裂状態を観察した.

成 績

1. 各種(A) PCC中の第II, 第VII, 第IX及び第X因子含有量及びFEIBA活性:

Proplex, Autoplex, FEIBAともビタミンK依存性のF. II, F. VII, F. IX及びF. Xを含んでいた. F. II: C, F. VII: C及びF. X: CはFEIBA> Proplex> Autoplexの順に多く, F. IX: CはFEIBA> Autoplex> Proplexの順であった. 3製剤ともF. VII: C, F. IX: Cを十分含有していた.

F. II, F. VII, F. IX及びF. Xの抗原量は, F. VII: Ag, F. IX: AgについてはProplex, Autoplexの2製剤については大差なく, FEIBAについては, F. VII: Agは前者の約1/5倍, F. IX: Agは約3倍であった. F. II: AgはFEIBA> Proplex> Autoplexの順に多く, FEIBAはAutoplexの約4倍多く含まれていた. F. X: AgはProplex> FEIBA> Autoplexの順でProplexはAutoplexの約5倍の値を示した. 各製剤については各因子の抗原量と活性の比をみるとF. IIでは約3倍, F. Xでは約2~9倍と凝固活性より抗原量が多く含まれ, F. VII, F. IXではProplexについてはほぼ同じで, Autoplex, FEIBAはむしろ抗原量より凝固活性が多く含まれていた.

FEIB活性はFEIBA, Autoplexとも, 表示力価以上の値を示した. ProplexのそれはFEIBAの8%, Autoplexの5%程度であった(Table 1).

2. Immunoblot法による解析:

1) F. II : 非還元, 還元系とも 3 本の主バンドを示した。75.5KD, 55KD 及び 40KD のバンドはそれぞれ intact な prothrombin, prothrombin + fragment 2 として prethrombin 2 にほぼ一致するものと考えられた。Thrombin に相当するバンドはいずれの(A) PCC でも見

られなかった (Fig. 1)。

2) F. VII : 非還元系では 3 製剤とも 50KD のバンドを示した。50KD のバンドは還元系では消失していることから F. VII a と考えられた。なお非還元系で 59KD に一致するもう一本のバンドは用いた抗体が抗 F. VII + 抗 F. X

Table 1. The content of factors II, VII, IX and X in (A) PCCs

	Indicated activity (units)	Dissolved volume (ml)	F. II (u/ml)			F. VII (u/ml)			F. IX (u/ml)			F. X (u/ml)			FEIB activity* (ml)
			C**	Ag***	Ag/C	C	Ag	Ag/C	C	Ag	Ag/C	C	Ag	Ag/C	
Proplex ST (F.IX:C)	400	30	9.0	23.2	2.6	31	35.9	1.18	21.9	33.2	1.7	6.7	72	8.7	42
Autoplex T (FECU)	500	30	5.3	13.6	2.5	28	24.6	0.92	31.5	27.0	0.91	8.1	13.8	1.7	865
FEIBA (FEIBA)	500	10	22.1	56.3	2.6	33	6.8	0.23	96.4	83.0	0.82	17.1	53.3	3.1	520

* FEIB activity : Factor VIII inhibitor bypassing activity is expressed as a mean level of 3 lots.

** C : Clotting activity is expressed as a mean level of 3 lots.

*** Ag ; Antigen is expressed as a mean level of 3 lots.

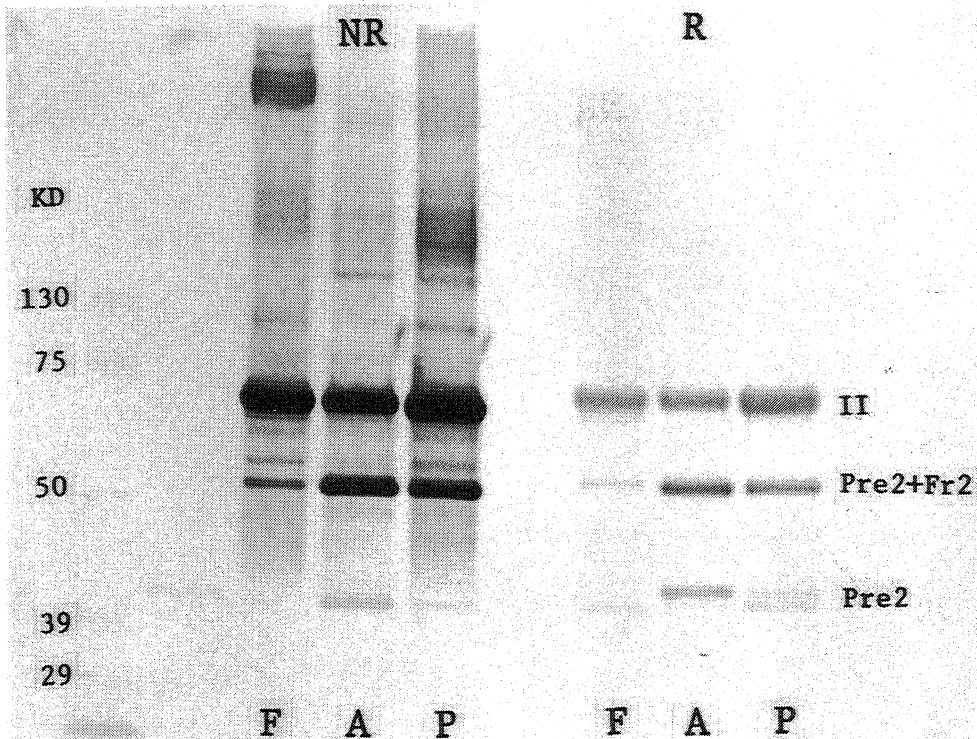


Fig. 1. The molecular analysis of F.II in the heat-treated APCC. A sample (10 μ l) adjusted to approximately 5~9U/ml was subjected to SDS-4~12 % gradient PAGE. Following western blotting of the F.II, the nitrocellulose membrane was reacted with polyclonal anti-F.II antibody and subsequently with goat anti-rabbit IgG peroxidase.

NR shows the unreduced samples and R shows the reduced samples. F: FEIBA TIM 4, A: Autoplex T, P: Proplex ST.

抗体であったため、F. Xに相当するバンドが出現したと考えられる (Fig. 2).

3) F. IX: Autoplex は非還元系で57KDと47KDの2本のバンドを示した。この2本は還元にて消失し、新たに40KDと30KDのペプチドバンドが出現した。40KDはF. IXのheavy鎖+activation peptide, 30KDはF. IX aのheavy鎖と考えられた。FEIBAとProplexは非還元系で57KDの一本、還元系では57KDがやや退色し、薄い40KDの新しいバンドが出現した (Fig. 3).

以上の成績から、AutoplexはintactなF. IXはほとんどなく、F. IX α及びF. IX αβから構成され、FEIBAとProplexはintactなF. IXと一部F. IX αをもっているものと考えられた。

4) F. X: 非還元系ではFEIBA, Autoplex, Proplexの3者とも59KDと50KDの2本のバンドを示しこれらは還元系では消失し、新たにF. XまたはF. X aのheavy鎖及びlight鎖に相当する新しいバンドが出現した (Fig. 4).

考 案

Fekete²⁾がinhibitorの発症した血友病A患者にPCC製剤を投与し、その止血効果を認めて以来、APCC製剤を含め数多くのinhibitor Bypass療法の試みがなされている。しかし、(A)PCC製剤のBypass効果、F. VIII inhibitor bypassing activityの本態に関しては、F. VII a説¹³⁾¹⁴⁾、F. VIII: Ag説¹⁵⁾、F. X+thrombin説¹⁶⁾等の報告があるが、未だ明確な見解が確立されていないのが現状である。

今回、AutoplexT及びFEIBAの加熱APCCと加熱PCCであるProplexST中のF. II, F. VII, F. IX, F. Xの性状、存在形式を検討したので報告する。

Immunoblot法による解析から、F. IIについてはそれぞれの製剤について75.5KD, 55KD, 40KDの3本の主バンドが認められた。Prothrombinの活性化は2段階によって行われる。まずF. X aとCa²⁺により55KDのprethrombin 2と35KDのfragment 1・2に分かれ、次にprethrombin 2のArg³²³-Ile³²⁴結合が切断されて

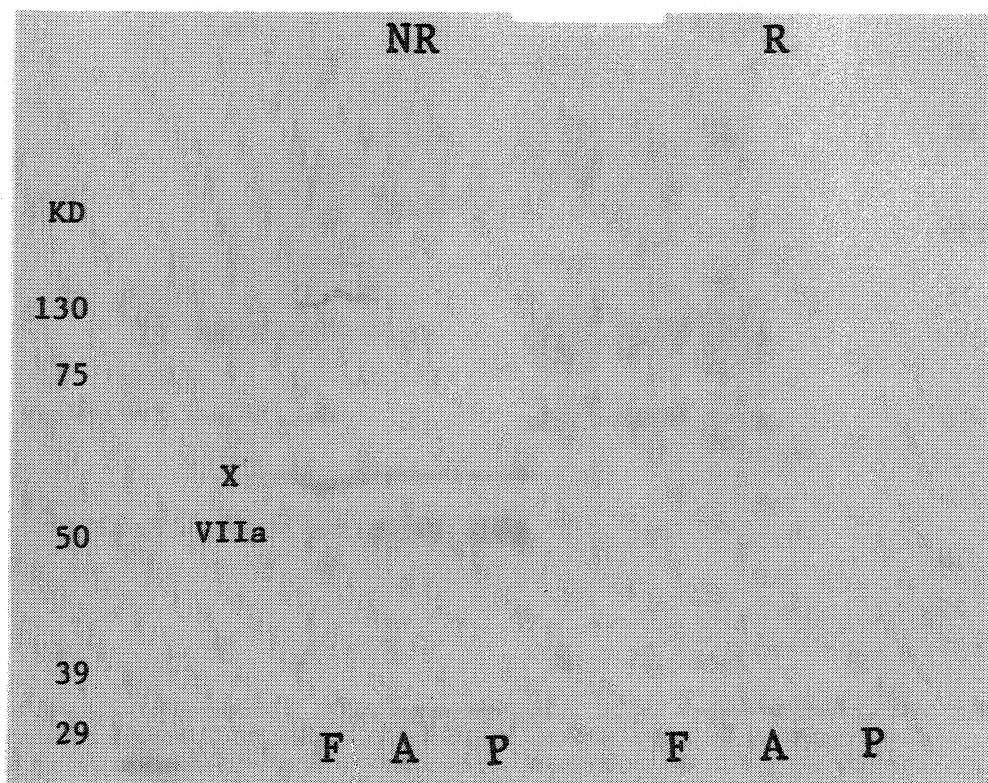


Fig. 2. The molecular analysis of F. VII in the heat-treated APCC. NR shows the unreduced samples and R shows the reduced samples, F: FEIBA TIM 4, A: Autoplex T, P: Proplex ST.

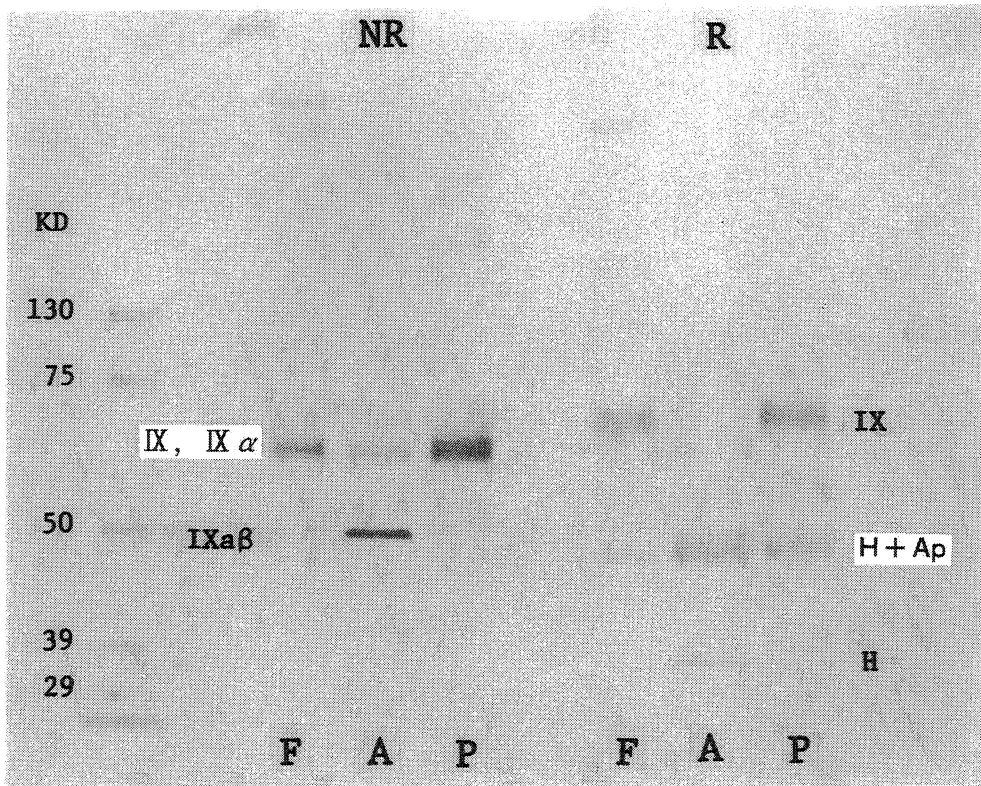


Fig. 3. The molecular analysis of F.IX in the heat-treated APCC. NR shows the unreduced samples and R shows the reduced samples. F: FEIBA TIM 4, A: Autoplex T, P: Proplex ST.

thrombin となる¹⁷⁾. 分子量から 75.5KD, 55KD, 40KD のバンドはそれぞれ intact な prothrombin, prethrombin + fragment 2, prethrombin 2 と推定された. Prothrombin 活性化の第一段階が一部に進行しているものの, thrombin 生成にまで及んでいないことが確かめられた.

F. VII は 48KD の一本鎖糖蛋白質で, リン脂質と Ca^{2+} の存在下, F. IXa により S-S 結合で結ばれた 28KD と 20KD の二本鎖からなる F. VII a に活性化される¹⁸⁾. 今回, 3 製剤とも 50KD のバンドが認められ, これらのバンドは還元系で消失したことより F. VII a と考えられた. 吉岡らが報告した加熱 PCC 製剤中の F. VII: C と比較して, 今回のそれは 28~33 U/ml と 10 倍~50 倍の高値を示したがこのことは F. VII a そのものを測定していることによるものと考えられた.

F. IX の活性化機構については, F. XI a と Ca^{2+} により Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ 結合が切断され, S-S 結合で結ばれた heavy chain (H鎖) と light chain (L鎖) からなる F. IX α になる. 次に H鎖中の Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ 結合が切断されると, 10KD の activation peptide を遊離し F. IX αβ と

なる¹⁹⁾²⁰⁾. また, F. IX は組織因子と Ca^{2+} 存在下, F. VII a によっても活性化される²¹⁾. Autoplex は非還元系で 57KD と 47KD の二本のバンドを示し, この二本は還元にて消失し, 新たに 40KD と 30KD のペプチドバンドが出現したことから, 40KD は F. IX の heavy 鎖 + activation peptide, 30KD は F. IX a の heavy 鎖と考えられた. すなわち, Autoplex は intact な F. IX はほとんどなく, F. IX α 及び F. IX αβ から構成されていることが確かめられた. FEIBA と Proplex は非還元系で 57KD の一本, 還元系では 57KD がやや退色し, 薄い 40KD の新しいバンドが出現したことから, intact な F. IX と一部 F. IX α をもっているものと考えられた.

F. X は, 内因系 (F. IX a, F. VIII a, リン脂質, Ca^{2+}) と外因系 (F. VII, 組織因子, Ca^{2+}) の両方により活性化される²²⁾. まず活性発現に必須の H鎖中の Arg⁵¹-Ile⁵² 結合が切断され, activation peptide を遊離し F. X aα となる. 次に carboxy terminal peptide の Arg²⁹⁰-Gly²⁹¹ が切断され F. X aβ になる. 今回, 3 製剤とも非還元系では 59KD と 50KD のバンドが認められ, 還元系ではこれら

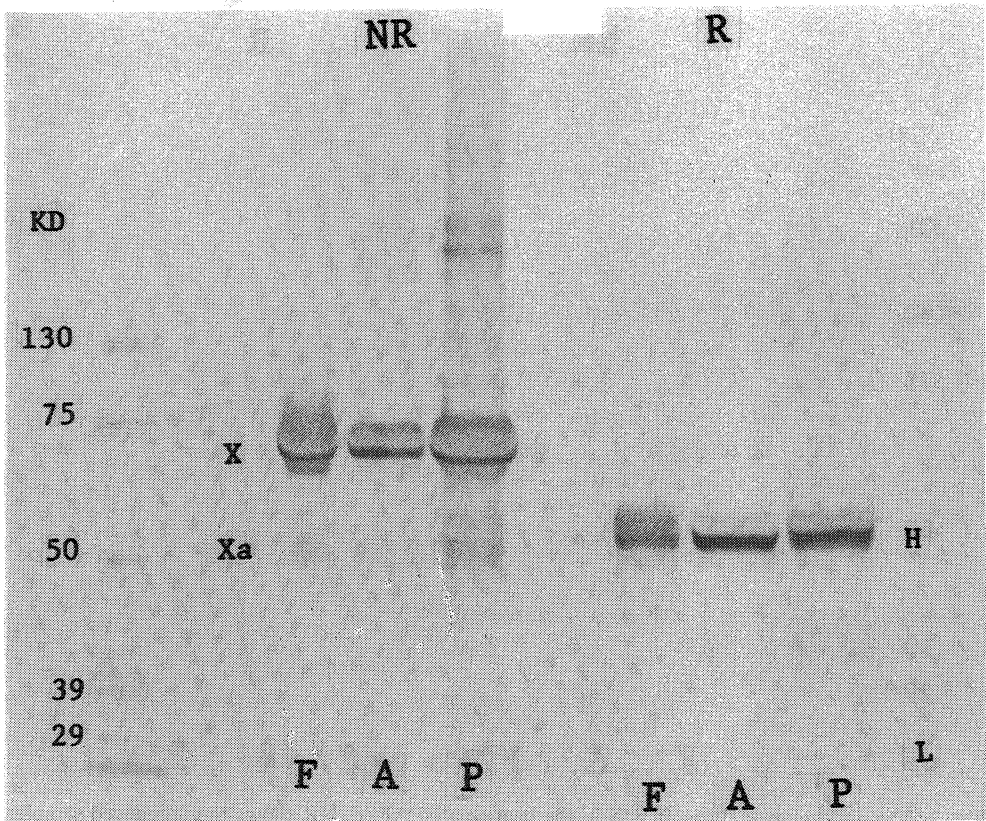


Fig. 4. The molecular analysis of F.X in the heat-treated APCC. NR shows the unreduced samples and R shows the reduced samples. F: FEIBA TIM 4, A: Autoplex T, P: Proplex ST.

のバンドが消失し、50KDと20KDに新たにバンドが出現した。非還元系でのバンドはそれぞれF. X, F. X $\alpha\alpha$ と考えられ、還元系の二つのバンドはF. X, F. X $\alpha\alpha$ のH鎖及びL鎖と推察された。

以上より、Autoplex及びFEIBAについてF. II, F. VII, F. IX, F. Xの活性型凝固因子を含んでいることが確かめられた。活性に対する抗原の比をみると、加熱PCC製剤に比べF. II, F. IX, F. Xについては大差なく、加熱APCC製剤においてもごく一部が活性化されているものと考えられた。杉本ら²³⁾は、加熱APCC製剤よりFEIB活性発現物質を純化し、このものがF. II蛋白由来のfragmentとF. X蛋白由来のfragmentによるcomplexであると報告しているが、今回immunoblot法により直接に一部活性化されたF. II, F. Xを認めたことにより、これらがFEIB activityを高め、さらにこのcomplexがprothrombinの活性化のみならずF. VII aの生成をも促した結果、Autoplex及びFEIBAについてF. VII: Cが高い値を示したと考えられた。Seligsohnら¹³⁾

(1979)はFEIB activityを示す機序について、製剤中のF. VII aの重要性を強調した。これは、F. VII aの血中半減期が製剤の臨床効果持続時間とよく相関すること、Φsterudら²¹⁾(1977)の報告したF. VII aによるF. IXの活性化(Alternative pathway)に基づくものであるが、加熱APCC製剤においてF. VII aのFEIB activityに及ぼす影響は大きいものと考えられた。

結 論

Autoplex及びFEIBAは加熱処理を含む製剤製造工程でビタミンK依存性凝固因子の活性化及び不活化を受け、抗原性も変化、変性を受けているものと考えられた。Immunoblot法を用いてこれらAPCC_s中のintact及びactivatedF. II, F. VII, F. IX, F. Xを直接証明した。Autoplex, FEIBAは共に十分量のFEIB activityを有しており、これらは部分的に及び完全に活性化したF. II, F. VII, F. IX, F. Xのすべて、または一部に依存していると推察された。

本論文の要旨は、第36回日本輸血学会総会(昭和63年5月19日~21日)及びXth International Congress on Thrombosis Athens (1988年5月22日~27日)において発表した。

文 献

- 1) **Bloom, A. L. and Hutton, R. D.** : Fresh-platelet transfusion in haemophilic patients with factor VIII antibody. *Lancet* ii : 369-370, 1975.
- 2) **Fekete, L. E., Holst, S. L., Peetoom, F. and Deveber, L. L.** : "Auto" factor IX concentrate ; A new therapeutic approach to the treatment of hemophilia A patients with inhibitors. Presented at the 14th International Congress of Hematology, San paulo, Brazil, (abst. 295), 1972.
- 3) **Abildgaard, C. F., Brittom, M. and Harrison, J.** : Prothrombin complex concentrates (Konyne) in the treatment of haemophiliac patients with factor VIII inhibitors. *J. Pediat.* 88 : 200-205, 1976.
- 4) **Mannucci, P. M., Federici, A., Vigano, S. and Cattaneo, M.** : Multiple dental extractions with a new prothrombin complex concentrate in two patient with factor VIII inhibitors. *Thromb. Res.* 15 : 359-364, 1979.
- 5) **Penner, J. A.** : Efficacy of activated prothrombin complexes management of hemophiliacs. *Scand. J. Haematol.* 24 : Suppl. 35 : 146-164, 1980.
- 6) 福井 弘, 吉岡 章, 三上定昭, 上辻秀和, 藤村吉博, 市川正裕, 三村良明, 大村令子, 阪井利幸, 嶋緑倫 : FEIBA 製剤の凝血, 免疫学的検討. 基礎と臨床 14 : 237-246, 1980.
- 7) 杉本充彦 : Factor VIII inhibitor Bypassing Activity (FEIB-活性) に関する研究 1. 数種市販活性型及び非活性型プロトロンビン複合体濃縮製剤中のFEIB-活性の解析. 奈医誌. 37 : 144-156, 1986.
- 8) **Yoshioka, A., Nakagawa, O., Uehara, Y., Sakai, T., Sugimoto, M., Takamiya, O., Tanaka, I. and Fukui, H.** : In vitro characterization of various heat-treated prothrombin complex concentrations (PCC). *Thromb. Res.* 47 : 449-458, 1987.
- 9) **Fujimura, Y., Sakai, T., Matsuyama, I., Mikami, S., Yoshioka, A. and Fukui, H.** : A simultaneous purification of human prothrombin and factor IX. *Blood & Vessel* 13 : 63-71, 1982.
- 10) **Sugimoto, M., Fujimura, Y., Ōhkubo, Y., Takase, T., Yoshioka, A. and Fukui, H.** : Purification of human coagulation factor X and the immunochemical studies of factor X antigen in patients with congenital or acquired factor X deficiency. *J. Nara Med. Ass.* 35 : 138-148, 1984.
- 11) **Takamiya, O., Kinoshita, S. and Yoshioka, A.** : Electroimmunoassay of Factor VII antigen. *Thromb. Res.* 42 : 847-853, 1986.
- 12) **Elsinger, F.** : Preparations with factor VIII inhibitor bypassing activity. Workshop on inhibitors of factor VIII and IX. *Facultas-Verlag, Wien*, p. 101-103, 1977.
- 13) **Seligsohn, U., Kasper, C. K., Østerud, B. and Rapaport, S. I.** : Activated factor VII : Presence in factor IX concentrates and presence in the circulation after infusion. *Blood* 53 : 828-837, 1979.
- 14) **Hedner, U. and Kisiel, W.** : Use of human VII a in the treatment of two hemophilita A patients with high-titer inhibitors. *J. Clin. Invest.* 71 : 1836-1841, 1983.
- 15) **Barrowcliffe, T. W., Kambell-Cook, G. and Grey, E.** : Factor VIII inhibitor bypassing activity : A suggested mechanism of action. *Thromb. Res.* 21 : 181-186, 1981.
- 16) **Tishkoff, G. H.** : Factor IX concentrate to treat factor VIII inhibitor : Biochemical studies on its mode of action. Workshop on inhibitors of factor VIII and IX. *Facultas-Verlag, Wien*, p. 103, 1977.
- 17) **Jacson, C. M. and Nemerson, Y.** : Bloodcoagulation. *Ann. Rev. Biochem.* 49 : 765-811, 1980.
- 18) **Kisiel, W. and Davie, E. W.** : Isolation and characterization of bovine factor VII. *Biochemistry* 14 : 4928-4934, 1975.
- 19) **Discipio, R. G., Kurachi, K. and Davie, E. W.** : Activation of human factor IX (Christmas factor). *J. Clin. Invest.* 62 : 1528-1538, 1978.
- 20) **Byrne, R., Link, R. P. and Castellino, F. J.** : A kinetic evaluation of activated bovine blood coagulation factor IX toward synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* 255 : 5336-5341, 1980.
- 21) **Østerud, B. and Rapaport, S. I.** : Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII : Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

74: 5260-5264, 1977.

- 22) **Dahlback, B. and Stenflo, J.**: The activation of prothrombin by platelet-bound factor Xa. *Eur. J. Biochem.* **104**: 549-557, 1980.

- 23) **杉本充彦, 福井 弘**: 加熱処理 Autoplex (BTL-130) 中の Factor VIII-Inhibitor Bypassing Activity (FEIB-活性) の解析. *基礎と臨床* **22**: 199-205, 1988.