

会議報告 分子レベルでの挑戦とウイルス性疾患

Molecular challenges and viral diseases

Simon A. Brown, Louis M. Aledort and Christine A. Lee

Katharine Dormandy Haemophilia Centre and Haemostasis Unit, Royal Free Hospital, London, UK;
and Department of Medicine, Mount Sina, School of Medicine, New York, USA.

止血およびこの系の障害に関する我々の理解はこれまでの研究の結果、着実に深まり、同時にこれらの進歩は血液凝固異常症をもつ患者に多くの利益をもたらしてきた。特に、分子生物学の分野における研究は、これらの疾患の理解、診断、治療に大きく貢献してきた。遺伝子治療は一部の血液凝固異常症に治癒をもたらすと考えられてきたが、現状をみる限り、このタイプの治療法をより完全なものにするためにはさらに多くの研究が必要であることは明らかである。しかし、これらの研究は血液伝播性感染症の発生によって妨げられてきたことも事実であり、これらの感染症は現時点においても血友病や他の血液凝固異常症患者に深刻な影響を及ぼし続けている。結果として、未知の病原体の感染の発生が疑われた場合、この患者のコミュニティでは重大な懸念が生じるため、病原体のリスクを定義するとともにそれらの病原体を治療用凝固因子製剤から除去する方法を見いだすための速やかな研究成果・技術的進歩

が求められる。

2003年1月13～14日の2日間にわたってロンドンで会議が開かれ、止血およびその関連事項の新しい研究領域、そしてこれらの研究がどのように血液凝固異常症患者のケアの向上につながるかについて議論された。Louis Aledort博士が議長を務め、招待された少人数の専門家が様々な側面から意見を交換した。出席者は、過去および最近の研究で得られたデータを提示・議論し、現在関心が寄せられている領域と今後研究が必要とされる領域を特定した。この会議は、多数の製薬会社からの教育助成金により開催され、各社からのオブザーバーも招待されている。本報は、この2日間の会議で議論された主な点をまとめたものである。

罹患状態におけるプロテインCの役割

プロテインCは1976年にはじめて純化精製され、以来、抗凝固物質としての有用性が認知されている⁽¹⁾。現在では、プロテインCをはじめとするプロテインC経路の蛋白質が炎症反応の制御に関与していることが明らかになってきている⁽²⁾。Charles Esmon博士はプロテインC経路と、これらの蛋白質の止血および炎症における役割について、特に敗血症との関連に焦点を当てながら包括的に概説した。プロテインCは、血管内皮に発現するトロンボモジュリン(TM)と結合した場合、トロンビンにより活性化されて活性型プロテインC(APC)になる。APCは炎症性サイトカインの放出を阻害するとともに、白血球の接着を減少させ、エンドトキシン誘発性低血圧

Rapporteur: Simon A. Brown; Chair: Louis M. Aledort; Co-chair: Christine A. Lee (London, UK).

Present at the workshop: T. W. Barrowcliffe, K. E. Brummel, L. Cervenakova, M. Colombo, D. Dormont, C. Esmon, M. E. Eyster, J. J. Goedert, F. G. H. Hill, J. Ironside, C. M. Kessler, D. Lillicrap, D. Motto, K. P. Pratt, H. P. Schwarz, A. R. Thompson, Han-Mou Tsai and H. Willkommen.

Correspondence: Dr Simon A. Brown, Katharine Dormandy Haemophilia Centre and Haemostasis Unit, Royal Free Hospital, London NW3 2QG, UK.
Tel.: +44 20 7830 2068; fax: +44 20 7830 2178;
e-mail: simon.brown@royalfree.nhs.co.uk

Haemophilia (2003), 9, 727–737
©Blackwell Publishing Ltd.

を予防することが複数の研究で示されている。APCのこれらの特性は、炎症反応の制御において中心的な役割を果たす転写因子である核因子(NF)κBに対する作用を介していると考えられる。さらに、トロンビン-TM複合体はトロンビン活性型線維素溶解インヒビター(TAFI)を活性化する。これに加え、TAFI(血漿プロカルポキシペプチダーゼBとも呼ばれる)は、補体C5aの不活化を介した補体活性化経路阻害作用を有する⁽³⁾。補体C5aは炎症メディエーターであり、血管拡張、血管透過性亢進、白血球の漸増および活性化をもたらす。APCやTAFIがこのような作用を有する一方で、血管内皮細胞により産生されるプロテインC受容体(EPCR)は炎症反応を調節し、これは部分的にはAPCとの相互作用を介したものであることが明らかにされつつある。これは、EPCRが構造的に主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI分子およびCD1ファミリーに類似していること、細胞核への転移能を有すること、そしてプロテイナーゼ3と複合体を形成するとEPCRは可溶性となり、白血球インテグリンCD11bおよびCD18と結合することにより白血球の接着を阻害することにより支持される。また、EPCRは、その結晶構造にCD1ファミリーと類似した脂質と結合するための溝を有することが示されている⁽⁴⁾。CD1ファミリーでは、この溝は脂質抗原提示のための役割を果たしている。Charles Esmonらのマウスを用いた最近の研究では、EPCRレベルの違いが表現型にもたらす影響について検討され、トロンビン生成とサイトカインの放出においてEPCRが重要な役割を果たしていることを支持する結果が得られている。内皮細胞にEPCRのないLBTCマウスでは、エンドトキシン注入後にトロンビン生成が亢進し、サイトカイン、インターロイキン(IL)-1βおよびIL-6レベルの上昇が認められている。さらに興味深いことに、EPCRを過剰発現しているT2PEマウスは、ブレオマイシン誘発性肺線維症に対する防御能を有することが示されている。プロテインC経路に関する知見は既に臨床試験にも取り入れられており、中でもProwess試験では遺伝子組換え型APC(rAPC)(4日間注入)の重症敗血症における反応が評価された。このセッションではProwess試験のいくつかの側面

について議論された。第一に、血小板数の低下した患者において出血リスクが増加することの説明として出血の合併予防における血小板第V因子(PFV)の役割が挙げられた。第二に、rAPC群とプラセボ群の死亡率の違いは、rAPC投与中止後も継続して拡大したことが強調された。Esmonらは、抗APC抗体を作製するとともに、APCを検出するためのELISAを開発することにより、重症敗血症患者におけるAPC産生を検討した。その結果、生存群と死亡群とではAPC産生が異なることが見いだされた。死亡群では、敗血症を引き起こした後の約14日間はAPC産生がほぼ停止した状態が続いた。したがって、敗血症で生存しない患者群では、TMまたはEPCRあるいはその両者の発現の消失を伴う血管内皮の機能障害が存在する可能性がある。敗血症または他の病態におけるAPCの研究でもう1つの重要な点は、抗リン脂質抗体がAPCの抗凝固作用を消失させると考えられる点である。

Hans Peter Schwarz博士は、プレゼンテーションの中で治療におけるプロテインCの使用に関してその論理を説明した。欧州では現時点において、rAPC製剤(Xigris)と血漿由来プロテインC製剤(Ceprotrin)という2種類の治療用プロテインC製剤がある。Prowess試験の結果からは、重症敗血症患者、ならびに敗血症に対する最良の標準的治療を既に受けている多臓器不全患者におけるrAPC製剤の使用が示唆される。血漿由来プロテインC製剤は、電撃性紫斑病症例、クマリン誘発性皮膚壊死症例、および予防目的で遺伝性プロテインC欠乏症症例に使用されており、欧州では「例外的状況」における使用が認められている。敗血症という状況でのプロテインC欠乏症の管理においてこの2種類の製剤の間に有意な臨床的差異があるか否かは未だ明確ではない。髄膜炎菌敗血症2例に関するデータ⁽⁵⁾が提示され、この2例には、TMおよびEPCR発現の障害およびプロテインC活性の欠乏を伴う血管内皮機能障害が認められ、血漿由来プロテインC製剤が投与された。続いてSchwarz博士は、血漿由来プロテインC製剤の活性化を裏づける*in vivo*データについて概説した。健常男性では活性型プロテインCが検出可能であり⁽⁶⁾、髄膜炎菌敗血症では投与されたプロテインCの活性

化が証明されている⁽⁷⁾。敗血症におけるプロテイン C レベルの低下は、プロテイン C の活性化と、APC に対する 2 つの主要なインヒビターと APC との APC-インヒビター複合体の形成を意味している⁽⁸⁾。理論的には、rAPC を投与するよりもプロテイン C を局所的に活性化の方が有利と考えられるが、これはプロテイン C の *in vivo* 活性の欠如により相殺されると考えられる。このような議論は残されているものの、血漿由来プロテイン C 製剤は髄膜炎菌敗血症の治療において成功を収めており^(7,9)、プロテイン C の使用を正当化するものである。さらに、局所的 Schwartzman 反応を利用した前臨床 *in vivo* データでは、Ceprotin によりこの反応が軽減されること、用量依存性に疼痛閾値が上昇することが証明されている。

止血の動力学

Kathleen Brummel 博士は、血液凝固経路の 4 つのモデルに基づく広範なデータを要約して発表した⁽¹⁰⁾。微小血管傷害モデルでは、標準的出血時間の創傷における凝固について検討することができる⁽¹¹⁾。他の 2 つのモデルには、それぞれ合成血漿またはほとんど変化のない全血の凝固における蛋白質およびペプチド産物のモニタリングが含まれている⁽¹²⁾。全血を用いるモデルでは、コーントリプシンインヒビターによる活性型 FXII (FXIIa) の阻害による接触経路の阻害が含まれており、組織因子 (TF) 依存性の凝固の開始について検討することができる。最終的に、このグループは TF により開始される凝固を予測するためのコンピューターモデルを開発した⁽¹³⁾。このようなモデルを活用することにより、凝固開始相の特徴を明らかにすることができる。特徴とは、すなわち、凝固開始相における FVII-TF 複合体によるピコモル単位の FIXa および FXa 産生量、動態学的により効率的な内因性 Xase 複合体によるトロンビン生成に伴う凝固の促進である。凝固開始相では FV と FXIII が活性化され、血小板の活性化が起こり (α 粒子からのオステオネクチン放出量の評価に基づく)、微量のトロンビンが生成される (生成可能な総トロンビン量の 2% 未満)。凝固開始相ではフィブリノゲンが活性化されて有意な量のフィブリノペプチ

ド A が放出され、その後形成されるフィブリンは可視的凝塊の形成 [凝固時間 (CT)] に先立って架橋を形成する⁽¹⁴⁾。これらの方法は、止血の生理学的機序の理解を深めるのに役立つのみならず、病的状態ならびに治療薬 (トロンビン生成や凝固開始相および凝固促進相との関連で) の検討を可能にする。特に、凝固促進相は CT の後に生じるため、これらの方法は凝固に基づく標準的アッセイよりさらに多くの情報を提供してくれる。例えば、重症血友病 A では、CT の延長に加えて、凝固促進相においてトロンビン生成の著明な減少がみられる。また、TF 依存性に凝固が開始した合成血漿またはほとんど変化のない全血のアッセイを用いて検討する場合は、前述の影響因子に加えてアンチトロンビン、プロテイン C-TM 経路、抗 GPIIb および抗 GPIIIa 抗体が凝固促進相において大きな影響を及ぼす。逆に、これらのアッセイでは組織因子経路インヒビター (TFPI) の濃度が凝固開始相に影響を及ぼす。さらに、凝固が低 TF レベル (2.5 pmol/L 未満) で開始された場合は、いずれの相もワルファリン、FVII 濃度、FXI 濃度の影響を受ける。また、用いるアッセイによって結果が異なることもある。微小血管損傷アッセイを用いた場合、アスピリンはほとんど変化していない全血では明確な影響は与えないが、凝固開始相と凝固促進相の双方を阻害する。また、このアッセイでは、シンバスタチンおよび血小板抗原 1 (PLA₁) の血小板多型もアスピリンに類似した影響を及ぼす。これらのデータは、アスピリンが、ほとんど変化していない全血では欠如している血管・血小板インターフェースに影響することを示唆している。先述の方法を用いることにより、生理的に正常な濃度であれ病的な濃度であれ、凝固促進因子と抗凝固因子の双方の止血に対する影響を明らかにできる可能性がある。このようにして止血に関する理解を深めることにより、出血をコントロールするための新しい治療薬の開発とその至適使用法を確立することができるであろう。

組織因子：治療における役割

Craig Kessler 博士は、FVII-TF 複合体による凝固

の開始および先に述べた方法による厳密な検討について述べてから、血液凝固異常症の治療においてTFが果たし得る役割について論じた。まず、組織因子の生理学がレビューされ、特に血管外組織におけるTFの構成的発現と血管内皮細胞および他の組織における誘導性発現に焦点が当てられた。*In vivo*において休止内皮細胞にはTFが発現しないこと、また血管損傷が発生した後の血栓の形成は内皮下TFの曝露に全面的に依存していると一般的に考えられていることが強調された。ここ数年にわたり、受容体としてのTFの役割が研究されている。*In vitro*では、TFとFVIIaの相互作用により引き起こされる細胞反応の例が多数認められている⁽¹⁵⁾。これまでのところ、血液凝固異常症の臨床的管理に幾分重要であると考えられる2つの興味深い観察所見が得られている。すなわち、TFを発現する循環血中微粒子の詳細⁽¹⁶⁾と、関節炎の発生した関節においてTFが認められたこと⁽¹⁷⁾である。TFを発現する微粒子の観察所見は、血管壁に損傷が生じた後の血栓形成の促進に関連して得られたものであり、この微粒子が血栓形成に重要な役割を果たしている可能性が示された。TF、あるいはFVIIaに高親和性の修飾TF分子を産生している合成微粒子は止血薬として有用であるかもしれない。逆に、血中TF微粒子の検出は、遺伝子組換え型FVIIa (rFVIIa) 製剤や活性型プロトロンビン複合体製剤に関連する血栓性合併症を回避する上でも有益であるかもしれない。関節炎の生じた関節から吸引した滑液内にTFが認められたことに加え、TFは関節炎を誘発することが示されている⁽¹⁸⁾。これら2つの観察所見は、以下の点で血友病において重要であるかもしれない——① 関節内出血に対するrFVIIa製剤の有効性、② 個々の症例における関節血腫の発生頻度の違い、さらには③ 血友病性関節症の病因。

インヒビター

補充療法に対するインヒビターの発生は、依然として血友病治療における主要合併症である。これについては2つのプレゼンテーションが行われ、最初のものはKathleen Pratt博士によるものであり、インヒビターの発生におけるFVIII C2ドメインの役割

について論じられた。FVIIIのC2ドメインは、von Willebrand因子(VWF)および陰性荷電リン脂質との結合部位が存在すること、またインヒビターが発生する血友病患者ではこのドメインに対する同種抗体がしばしばみられることから非常に重要といえる。以前の研究でPratt博士らは、C2ドメインの結晶構造を描写し、C2ドメインと陰性荷電リン脂質との相互作用のメカニズムを提唱した⁽¹⁹⁾。この構造ではC2ドメインの膜結合表面は、2つの β ヘアピンターンと隣接する1つのループから成り、疎水性残基(M2199, F2200, L2251, L2252, V2223)を露呈して「疎水性の脚」を形成し、この「疎水性の脚」はリン脂質(PL)膜に埋まっている。重症度に関係なく血友病A患者にみられる点突然変異の分析では、大多数はC2ドメインの折りたたみに影響を及ぼし、提唱されているこのPL結合部位にはほとんど影響を及ぼさないことが示されている。これは、この領域の構造内にかなりの重複性があることを反映しているのかもしれない。C2ドメインのこの部位が、FVIIIがPLと相互作用する唯一の部位であるか否かは定かではない。遺伝子組換え型C2(rC2)を用いた研究では、rC2が膜部位をめぐるアネキシンと競合し、内因性Xase(第X因子活性化酵素)複合体を阻害することが合成基質法により明らかにされている。しかし、rC2はこれらの*in vitro*実験系のいずれにおいてもFVIIIの軽鎖に比べて結合効率が劣っていた⁽²⁰⁾。FVIIIインヒビターを有する血友病患者の記憶B細胞系に由来するモノクローナル抗体を用いた研究⁽²¹⁾では、これらの抗体が、提唱されているC2ドメインのPL結合部位に結合することが示されている。rC2ドメインに対する免疫応答に関するさらなる研究がFVIII欠損C57BL6を用いて既に開始されている。また、T細胞増殖アッセイを利用した初期の実験では、提唱されたPL結合部位に含まれるヘアピンターンの1つに由来するエピトープを認識するFVIII特異的T細胞系が明らかにされている。今後の研究では、rC2ドメイン変異体の増殖反応誘導能と、これらの変異体の構造・機能解析に焦点が当てられる予定である。これらに関する議論では、C2ドメインの構造をロックしてC2ドメイン内のループが本来持っている柔軟性を低下させることが

できるのだろうかという興味深いコメントが出された。蛋白質が柔軟性をもつ結果の1つが抗体の形成と考えられるため、これは重要と考えられる。さらに、rC2ドメインは、患者の血漿からのFVIIIインヒビターの吸着や、免疫寛容導入 (ITI) 療法を受けている患者のエピトーププロフィールをモニターするためのアッセイでも利用可能であるかもしれない。

2番目のプレゼンテーションは Arthur Thompson 博士によるものであった。博士が所属しているシアトルの研究グループは、インヒビターの形成とFVIII遺伝子における非逆位変異との関連性に関する研究を最近発表した⁽²²⁾。インヒビター形成率が最も高いのは、2つ以上のドメインを含む大欠失のある家系であり、インヒビター発生率は約80%であった。イントロン22の逆位、フレームシフト変異、ナンセンス変異 (特にFVIII軽鎖に影響する変異) のある症例におけるインヒビター発生率は約20%であった。この研究は、さらに領域が拡大され、FVIII遺伝子型とITI療法に対する反応性の関連についても検討される予定である (Table 1)。適用されたITIプロトコルが異なっていたり、データが後方視的であるなど、データに制限はあるものの、大欠失やフレームシフト変異の存在は治療反応性の低さと関連していると考えられた。この前方視的多国籍ITI研究に新たに加わる症例の遺伝子型の判定により、さらなるデータが得られるかもしれない。

ADAMTS13

ADAMTS (トロンボスポンジン1型モチーフを有

Table 1. Factor VIII genotype and response to ITI therapy.

FVIII mutation	Number of patients (inhibitor titre >5 BU mL ⁻¹)	Response to	
		ITI (total no. ITI/CR/PR)	Spontaneous remissions
Inversion intron 22	28	21/17/0	2
Large deletion	8	6/0/0	0
Frameshift	8	5/0/1	0
Nonsense	11	5/4/1	1
Splice	2	2/1/0	0
Missense	18	10/8/1	3

ITI, immune tolerance induction; CR, complete response; PR, partial response.

するジスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ)-13の特徴が明らかにされたことで、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の再評価が可能になった。David Motto 博士は最初のプレゼンテーションの中で、ADAMTS13の構造と機能の解析を可能にする分子レベルの研究を概説した。ADAMTS13はVWFをA2ドメインのTyr1605残基とMet1606残基との間で切断する。このプロセスにより、血漿中におけるVWFマルチマーの大きさが制御されていると考えられる。先天性であれ後天性であれ、ADAMTS13の極度の欠乏はTTPの発症に関連する。ADAMTS13遺伝子の位置を明らかにするための1つのアプローチは、遺伝性TTPのある家系を分析することである⁽²³⁾。ADAMTS13レベルに対して感度の良好なアッセイを用いることにより、家系内の各人を非罹患者、確定保因者、罹患者に分類可能であった。この遺伝子は9番染色体上に存在し、29個のエキソンをもち、長さは45,000 bpであった。ADAMTS13のcDNAは長さ4,500 bpであるが、多数の異なるスプライス形があり、この理由は現時点では不明である。ノーザンブロット法での検討では、完全長mRNAの発現は肝臓でしか検出されていない。これまでのところ、遺伝性TTP (Schulman-Upshaw症候群) の家系で35種のADAMTS13遺伝子の変異が見いだされている。8家系の分析では13種の変異が特定され、これらは保存残基で発生し、いずれの変異も再発性ではなかった。遺伝子組換え型ADAMTS13を発現させると、野生型および変異型ADAMTS13の生成および分泌が可能であり、変異型はVWF切断活性を低下させることが示されている。

次に、Han-Mou Tsai博士が、TTPとADAMTS13欠乏症との関係に関する広範なレビューを発表した。特に、溶血性尿毒症症候群や、血小板減少症あるいは細血管異常性溶血性貧血 (MAHA)⁽²⁴⁾を伴う他の病態に言及しながら、TTP診断において特に問題の多い領域について述べた。MAHAや血小板減少症とTTPとの鑑別は困難であるが、Tsai博士は多数の症例を詳細に分析し、重症ADAMTS13欠乏症例を特定可能な基準を確立した⁽²⁴⁾。Schulman-Upshaw症候群症例を対象とした臨床試験では、新

鮮凍結血漿（FFP）の輸注に対する ADAMTS13 レベルおよび血小板数の反応が検討されていた。FFP 10 mL/kg 輸注後、ADAMTS13 の半減期は 1.5～2 日で、血小板数は 6～7 日でピークに達し、ADAMTS13 レベルは 1% 未満から 15% に上昇した。ADAMTS13 の定量法は未だ標準化されていないことに加え、一部のアッセイでは ADAMTS13 レベルが低く測定されるが、これについては未だ解決されていない。現時点では、アッセイの組合せの条件、培養時間、プロテアーゼ活性検出法という点でアッセイ間に違いが認められる。これらのアッセイはともとも同等とは言い難く、正常被験者においても測定値の範囲にバラツキがみられる。したがって、異なるアッセイが用いられた研究の結果を直接比較することができない状態である。

ADAMTS13 に関する最後の発表として、Hans Peter Schwarz 博士が治療薬としての遺伝子組換え型 ADAMTS13 の可能性について論じた。機能性の遺伝子組換え型 ADAMTS13 を発現させることにより⁽²⁵⁾、この蛋白質の治療薬としての可能性を評価できると考えられる。今後解決すべき問題は免疫原性、体内動態、効果と安全性のマージンの決定である。この遺伝子組換え型治療薬の評価において問題点となる事項として、ADAMTS13 欠乏症の動物モデルがないことが挙げられる。これまでのところ、遺伝子組換え型プロテアーゼが VWF を Tyr1605 残基と Met1606 残基との間で切断すること、後天性 TTP 患者の血漿によりその機能が阻害されることが示されている。この遺伝子組換え型蛋白質は、補充療法ならびに TTP における ADAMTS13 に対する抗体の免疫吸着に利用できる可能性がある。

C 型肝炎

C 型肝炎ウイルス（HCV）感染は、凝固因子製剤の製造工程にウイルス不活化処理が導入される以前に血漿由来凝固因子製剤の輸注を受けた患者の間ではほぼ例外なく認められる。したがって、HCV 感染とその合併症は未だに重要な問題として残されている。Massimo Colombo 博士、James Goedert 博士、Elaine Eyster 博士は、血友病患者における HCV 感染の自

然経過についてそれぞれプレゼンテーションを行った。C 型肝炎は国家レベルにおいても国際レベルにおいても極めて重大な問題である。全世界でキャリア人口は約 2 億人と推定されており、これに関連する肝炎で毎年 60 万人～80 万人が死亡しており、欧米諸国では B 型肝炎の 2 倍の死亡率を記録している。HCV 感染は、結果的に、そして長期にわたる臨床経過として、肝硬変や肝細胞癌（HCC）を増加させると考えられる。オーストラリアでは、2010 年までに C 型肝炎に関連する肝硬変および HCC の発症件数が 1997 年に比べて 2 倍以上になると推定されている⁽²⁶⁾。

個々の症例について言えば、HCV に曝露され慢性 C 型肝炎に罹患する症例、また慢性 C 型肝炎から肝硬変や HCC に進行する症例の割合にはいくつかの因子が関連することが知られている^(27, 28)。急性 HCV 感染の慢性化は高齢者、女性、HIV に重複感染している症例や免疫不全症例、非白人で多く認められている。中間純度の凝固因子製剤の投与を繰り返し受けてきた血友病患者では、免疫異常が慢性 C 型肝炎の発症に影響を及ぼしている可能性があることが報告されており⁽²⁹⁾、これについても議論された。このような免疫学的異常が臨床的に重要な影響をもたらすことを示唆している唯一の報告は血友病小児を対象とした研究で、活動性結核菌（TB）へ曝露された血友病患者児が結核を発症する頻度は、他の血液学的疾患をもつ患児よりも高いことが報告されている⁽³⁰⁾。したがって、繰り返し凝固因子製剤の投与を受けた血友病症例で報告されている免疫異常が慢性 HCV 感染の発症に影響を及ぼすか否かは未だ定かではない。慢性 HCV 感染の進行に影響を及ぼすいくつかの因子がこれまでに特定されている。併存因子がない場合、肝硬変発症までの期間の中央値は 27 年である。この中央値に影響を及ぼす因子は次の通りである（カッコ内はその中央値）—— HIV の重複感染（9 年）、飲酒（50 g/day 以上）（13.5 年）、B 型肝炎ウイルスへの重複感染（15 年）、ヘモクロマトーシスに関連するヘモクロマトーシス（HFE）遺伝子の C282Y 変異のホモ接合（19 年）が挙げられる。最後の HFE 遺伝子の変異は、肥満指数（BMI）の高値と同様に、肝線維症の発生も増加させること

が証明されている⁽³¹⁾。肝組織生検を用いた最近の研究では、血清ALT値が急上昇した症例での線維症の増加が確認されている⁽³²⁾。このような血清ALT値の急上昇は、長年にわたりHCVに感染した症例で認められており、201 U/Lから2,200 U/Lへの上昇が2～3週間続いている。血清ALT値の急上昇は1型HCVよりも2c型HCVでより高頻度に見られるとともに(1.3回/年 vs. 5.2回/年)、有症状率も2c型でより高い(8% vs. 31%)。

HCV感染に関する最後の2つのプレゼンテーションは、血友病患者に焦点を当てたものであった^(33,34)。最初のプレゼンテーションは、16年間にわたり16の血友病施設から集められた前方視的データ(the Multicentre Haemophilia Centre Study; MHCS)に基づいて末期肝疾患(ESLD)の発症に影響する因子を詳細に分析した結果についてであった(ESLDは、持続性腹水や出血性食道静脈瘤、肝性脳症、肝臓関連の死亡により定義された)。HIVの重複感染は、ESLDの主要危険因子であり、HCV感染後16年間の累積発生率はHIV重複感染症例で10.6%、非重複感染症例で1.6%であった。また、HIV重複感染の有無にかかわらず、加齢はリスクを増加させた。比例ハザードモデルを用いて年齢層別にみた場合、相対危険度は0～16歳で1.0、17～32歳で1.6、33～86歳で5.0であった。HIV重複感染症例では、加齢に加え、HBVへの重複感染およびCD4⁺リンパ球数200/μLがリスク増大因子であった。この研究においてもHIV重複感染が主要危険因子であることが特記され、Royal Free Hospital(英国)での研究の結果を追認するものであった⁽³⁵⁾。最後に、これらのデータの分析から、HCV抗体反応のタイプがESLDの予測因子になることが示唆された。多変量解析の結果、c100抗体の反応が高くc22抗体の反応が低い場合は、リスク増加と関連していた。最後のプレゼンテーションは、HCVのクリアランスとその過程に影響を及ぼす因子に関するものであった。これまでの研究では、PCR法を用いた評価でC型肝炎に急性感染した症例の約15%がHCV RNA陰性になることが示されている。先に述べたように、HCVクリアランス率を高める因子としては女性、若年、HIVに重複感染していないこと、が知られている。

血友病症例を対象とした研究では、HIVに重複感染した症例ではクリアランス率が0～4.8%であったのに対して、HIV陰性症例では18～25%であった(MHCS研究参加症例のデータおよびMessickらの報告⁽³³⁾)。MHCS研究に参加した症例のうち、HIV陰性でHCV抗体陽性である症例に関する分析では、217例中46例がHCV RNA陰性であった。HCV RNAが陰性化したこの患者群では2つの因子、すなわち、初回HCV曝露時に若年であること、クリオプレシピテートのみに曝露されていることがHCVクリアランス率の上昇に関連していた。12例を対象としたクリアランス時期の分析では、クリアランスは非常に早い段階で起こっており、多くの場合は初回感染から1～2年以内であったが、1例では再曝露がないにもかかわらず約5年間HCV RNA陽性の状態が続いた。また、感染早期の段階でウイルス量の低い症例は、ウイルス量の高い症例に比べてクリアランスが生じる割合が高かった。しかし、クリアランスが真に感染の解消を意味するのかどうかは未だ疑問である。場合によっては、HCV RNAの陰性結果が偽陰性であるかもしれない。したがって、これらの結果は、HCVが肝に蓄積している可能性を完全に排除するものではない。

vCJD

依然 vCJD に関する関心が高いことと関連して、昨年の会議⁽³⁶⁾に引き続き、vCJDの疫学、調査研究、治療法、英国当局の対応および血友病施設の対応に関して議論された。エジンバラのNational CJD Surveillance Unit (www.cjd.ed.ac.uk)のJames Ironside博士が、伝播性海綿状脳症(TSE)の生理学と分類について概説した。TSEsはヒトや他の哺乳類を冒す致命的神経変性疾患であり、先天性と後天性の両タイプがある。ヒトにおいては、vCJDの定義と畜牛におけるウシ海綿状脳症(BSE)との関連の可能性が、英国における血液由来製剤の供給に大きな影響を及ぼしてきた。vCJDは、感染性物質と考えられている異常プリオン(PrP^{Sc})が蓄積する結果として生じる。シグナル伝達に関与する正常PrPとPrP^{Sc}とは立体構造が異なり、PrP^{Sc}はPrPに比

べてより多くの β ブリーツシートを有する。この構造の違いが、脳やリンパ組織といった組織内にPrP^{sc}の集塊が蓄積する原因と考えられている。遺伝性CJDおよび致命的な家族性不眠症をもつ症例を対象に正常PrPをコードしているPRNP遺伝子(染色体20)を解析した研究では、PRNP遺伝子中で変異が認められている。これらの知見は、PrPの立体構造の変化がプリオン病の発症において鍵となる事象であるという説と一致する。PRNP遺伝子は、129残基(Met129-Val)に多型性をもつ。これまでに認められているvCJD症例はすべて129番のメチオニン(M)残基(MM)がホモ接合体(MM)である。したがって、129番の多型性(すなわち、MVまたはVV)により伝播様式や潜伏期間が異なる可能性がある。プリオン関連感染症の伝播に影響を与える他の因子として、病原体の量や感染経路(脳内経路は経口の5~10倍効率が高い)、種間障壁、病原体の系統、などが伝播に関する生物学的特徴から明らかにされている。2003年1月現在までのところ、報告されているvCJDの発生は英国129例、カナダ1例*、フランス6例、アイルランド1例*、イタリア1例、米国1例*である(*は英国での滞在歴を有する症例を示す)。vCJDの研究は困難であり、その理由として、稀な感染症であること、地理的分布が特殊であること、標準化された研究方法(解剖の義務化を含む)や治療法がないこと、などが挙げられる。そのため、正確な症例数、ほとんどの症例が若年者である原因、ヒトからヒトへの伝播の可能性など、不確かな点が極めて多い。現在最も重要な研究領域は、正確で信頼性の高い検査法の確立、治療薬の開発、病原体の除去・不活化法の確立の3領域である。

Larisa Cervenakova 博士は、vCJD検査法確立の試みについて総括した⁽³⁷⁾。現時点では、各プリオンの特徴を利用して組織中のPrP^{sc}が検出されている。量と条件さえ正しければ、プロテイナーゼKによりPrPは完全に分解されるが、PrP^{sc}は部分的に分解されるのみである。組織試料の免疫組織化学的検査では、まず蛋白質分解におけるこうした相違を利用してPrPを除去し、次の段階へ進む。例えば、プロテイナーゼKで処理した組織ホモジェネートのウエスタンブロット法では、プリオンの糖化に3つのタイ

プがあることが証明される。散発性CJD(sCJD)とvCJDとでは、これらのイソタイプが異なる。他の間接的な生物学的マーカーもvCJDの診断に役立つと考えられる。sCJDやvCJDを含めて、多くの疾患ではCSF内にプロテイン14-3-3が認められるが、vCJDよりもsCJDでより多くの陽性が認められる。血液中のvCJD病原体を検出する診断的スクリーニング検査法の確立は、感染症例の血中で認められるPrP^{sc}の量や、感染力を示すPrP^{sc}の量が未だ不明であることから非常に困難である。いくつかのプリオンについては、感染例における血中異常プリオン量およびその感染力が動物モデル(特にスクレーピーハムスターモデル)を用いて評価されており、これらのモデルを用いた多数の診断的検査法が既に評価されている⁽³⁷⁾。これらの検査法の感受性閾値は<5pg/mLから3 μ g/mLである。しかし、これまでのところ如何なる検査法によってもvCJD潜伏症例のヒト血液でPrP^{sc}は検出されていない。

診断的検査法が未だ確立されていないため、現時点ではvCJDの治療法も見いだされていない。Dominique Dormont 博士は、プリオン関連疾患の治療薬に関する研究をレビューした。治療薬に関する研究のほとんどは、プリオン関連疾患の動物モデル(特にスクレーピー)を利用したものである。治療薬の一例として、病原体の最初の侵入部位、リンパ細網組織、神経-免疫インターフェースに作用し、末梢神経から中枢神経系(CNS)への病原体の広がりを防ぐとともに、CNS内にプリオンが蓄積するのを防ぐことによって、あるいはニューロンの死を防ぐことによってプリオン関連疾患の進展を防止する効果を有する物質が考えられる。スクレーピーやBSEの実験的モデルを用いた広範な研究では生存期間を延長させる多数の分子が見いだされている。例えば、アンホテリシンB(ポリエン系抗生物質)やその誘導体であるMS-8209、デキストラン硫酸500(ポリアニオン)、コンゴレッドなどである⁽³⁸⁾。テトラサイクリンはPrP^{sc}と直接的に相互作用することがわかっており、またPrP^{sc}で前処理したハムスターではテトラサイクリンにより全例の1/3でスクレーピーの発症が防止されている⁽³⁹⁾。また、未だ結果が再現されていないが、dapsonがPrP^{sc}を摂取したラットの生存

率を25%高めることが示されている。TSEの治療法の他のアプローチとして、以下のような方法によりPrP^{sc}の蓄積を抑制する方法が考えられる——① PrP^{sc}のペプチド断片を介してβ プリーツシートの形成を妨げる、② PrP^{sc}に対する抗体を作製する⁽⁴⁰⁾、③ ワクチンを開発する⁽⁴¹⁾。

次に、Frank Hill博士と Trevor Barrowcliffe博士が、vCJDに対する血友病医や英国衛生当局の対応について論じた。英国では、献血後にvCJDを発症したドナーの血液から製造された凝固因子製剤のバッチについて、1997年と1999年に通達が出された。これらの通達は、患者やその家族に知らせるべきか否かという倫理的問題を提起する結果となった。また、通達に対する各施設の対応は、施設ごとに異なっていた。いずれの通達が出された時も、メディアにより大々的に報じられ、事態はより深刻になった。しかしながら、多くの施設は、患者への説明、そして説明を受けることを希望する患者とvCJD関連の問題について話し合う準備に取りかかった。UK Haemophilia Centre Doctors Organisation (UKHCDO)は、英国由来の血漿から製造された凝固因子製剤の安全性に関して懸念を表明した⁽⁴²⁾。その結果、血漿由来凝固因子製剤での治療を受けている患者には米国由来の血漿から製造された凝固因子製剤が使用されるようになった。2回目の通達が出された時点での政府の見解は、患者に告知しないよう医師に助言するものであった。しかし、この通達は第1回目の通達が出されてからかなりの期間が経過した後に出されたため、第1回目の通達に対処していた多くの施設は、既に患者への対応を開始していた。このような経緯があったにもかかわらず、病原体に汚染されたバッチによる影響を受けた患者の総数に関するデータが未だない状態である。これに対応してUKHCDOは、病原体に汚染された可能性のある凝固因子製剤に曝露された血友病患者の全国規模のデータ収集に取りかかった。病原体に汚染された疑いのある凝固因子製剤の投与を受けたことのある患者については感染が疑われるため、外科器具が汚染される危険性があり、外科手術を延期せざるを得ないという問題もある。Trevor Barrowcliffe博士は、血漿プール中にvCJD病原体が混入するリスクを最小

限に抑えるために諸外国で採用されている様々な方法⁽⁴³⁾について概説した後、TSEsの診断と研究のための国際的標準参照試料に関するWHO作業班の活動内容を簡潔に紹介した。この作業班の最終目標は、PrP^{sc}検出法の評価を可能にする血液ベースの標準参照試料を開発することである。PrP^{sc}の検出に関しては主に2つの問題がある。すなわち、血中PrP^{sc}量が正常PrP量に比べてはるかに少量であることに起因する特異度の問題、そして感度の問題である。検出のためのアッセイは血中のPrP^{sc} 10⁻¹⁸ mol/Lを検出できれば十分と考えられるが、現行のアッセイではこれが不可能である。標準参照試料のオプションとしては、感染した脳または脾臓でスパイクした血液、プールされたスクレーピー（またはBSE）のヒツジ血液、スクレーピーに感染したハムスターの血液、そしてヒトvCJD症例の血液が考えられる。これらのいずれの物質も長所と短所を併せもつ。例えば、ヒトvCJD症例の血液は最も適合性のある物質と考えられるが、これまでのところ、感染性が証明されていないばかりか、PrP^{sc}も検出されていない。上記の4つの選択肢のうち最初の3つが将来的に使用される可能性が高く、中でも脳ホモジェネートでスパイクした血液が第一選択になるであろう。

vCJDに関する最後のプレゼンテーションはHannelore Willkommen博士によるもので、凝固因子製剤の製造工程において血液からPrP^{sc}を除去する上での除去効率に関するデータを総括した。先に述べたように、PrP^{sc}はヒトvCJD症例の血液からは未だ検出されていないため、ヒト血液に感染性があるのであればPrP^{sc}が血中に低レベルで存在すると仮定しなければならない。さらに、凝固因子製剤の製造工程で達成される血液からのPrP^{sc}の除去に関するデータは、スパイクされた血液を用いた実験に基づいている。血漿分画工程で除去されるプリオンの量に関するデータの総説⁽⁴⁴⁾では、FVIII製剤の製造で1～6.3 logの減少、FIX製剤の製造で1.4～3 logの減少が証明されている。2000年5月に、血漿処理工程におけるPrP^{sc}の除去に関するデータがEuropean Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)により発表された。このデータの要約では、「血漿由来凝固因子製剤の製造工程は、

PrP および感染性の除去に寄与している。血漿由来凝固因子製剤の製造工程に不活化工程を導入するのは厳格すぎる」と述べられている。凝固因子製剤の製造業者2社が、血漿由来凝固因子製剤の製造工程における除去効率をこれまでに評価している^(45, 46)。これらの研究においても、製造工程においてPrP^{sc}を除去可能であることが確認されている。さらに、スパイクされた試料のタイプによりPrP^{sc}除去動態が異なり、試料のタイプが重要であることが証明されている⁽⁴⁵⁾。もう1つ重要な点は、製造工程全体がPrP^{sc}の除去に寄与し、いずれか1つの工程のみが十分な除去を達成するのではないことである。したがって、凝固因子製剤の製造工程におけるPrP^{sc}の除去効率を評価する場合は、全工程での除去効率を評価すべきであり、全体の除去率は必ずしも各工程での除去効率の合計にはならない⁽⁴⁷⁾。しかし、現時点では十分な感度をもつアッセイがないことや、感染が成立するPrP^{sc}の最低量が不明であること、また製造機器の洗浄・滅菌が果たす役割も不明確であることから、この段階で、病原体に汚染された血漿由来凝固因子製剤の感染性について絶対的コメントはできない。vCJD そのものについてと同様に、多くの疑問が残されている。

遺伝子治療

本会議における最後のプレゼンテーションは、David Lillicrap 博士による「遺伝子治療：夢か現実か？」と題した血友病遺伝子治療の進歩に関するものであった。まず最初に、Lillicrap 博士は彼が1994年に受け取ったファックスを紹介した。そこには、「血友病の遺伝子治療はほんの数年前に現実のものになるかもしれない」と記されていた。このような当初の楽観的見通しとは裏腹に、これまでの遺伝子治療プロトコルのうち、血友病治療のためのプロトコルは全体の1%にも満たない。2003年1月現在、血友病患者33例を対象とした3件の第I・II相臨床試験が既に完了しており、さらなる2件の第I・II相臨床試験に7例が既に登録されている。完了した3件の試験（Avigen社プロトコル8例、Chiron社プロトコル13例、TKT社プロトコル12例）で

は、重大な有害事象やFVIIIまたはFIXインヒビターの発生はみられなかった。しかし、出血症状の減少やFVIIIまたはFIXレベルを測定可能なレベルまで上昇させる効果については、これらのプロトコルの有効性を評価するのは困難である。これらのプロトコルの臨床的有効性の判定については、プラセボ効果の制御や極めて低いFVIIIまたはFIXレベルを測定する上での信頼性といった点で疑問が提起されている。他の2つの試験のうちの1件（GenStar社：完全長FVIII cDNAを組み込んだヘルパー依存性アデノウイルスベクターを用いたプロトコル）では、患者1例が血小板減少症を生じたために登録が中止された。血友病B症例を対象とした第二のAvigen社プロトコル[アデノ随伴ウイルス(AAV)血清型2ベクターを肝動脈注射により肝臓に送達]では、1例において最高12%のFIXレベルの増加が認められている。また、全例において一過性に精液中にベクターが出現し、1例では最高用量のベクター（ 5×10^{12} 粒子/kg）を使用した場合にALT値の有意な増加が認められた。血友病症例を対象としたこれらの研究に加え、2002年10月には重症複合免疫不全症症例における挿入変異誘発が報告された。この小児症例では、転写コアクチベーターであるLM0-2の発現を誘導する遺伝子を挿入したところ、この遺伝子の異常発現が起これ、T細胞クローンが発生してT細胞白血病を発症した。この症例は、遺伝子治療の潜在的問題の1つを明示したが、この他にも既存疾患の増悪や宿主免疫系の活性化、生殖細胞系列への遺伝子導入などの危険性が含まれているとともに、理論的にはあるが、複製能をもつウイルス粒子の生成も懸念される。さらに、血友病の遺伝子治療は、凝固因子レベルが高くなりすぎた場合に血栓症のリスク増大が懸念される。以上のように、血友病の遺伝子治療については導入遺伝子を効率よく送達するためのベクターのデザインや安全性についてさらに多くの研究が必要である。

結 論

血液伝播性感染症に関する懸念が、依然血友病患者そして保因者に暗い影を落としている。また、

vCJD が血漿由来凝固因子製剤を介して伝播するの
か否かについても未だ明確ではない。vCJD の疫学
的知識については著明な進歩がみられるが、診断の
ためのアッセイや治療薬の開発についてはさらなる
研究が必要である。血漿由来凝固因子製剤による病
原体伝播の可能性は今後明確にすべき問題として残
されているが、国家の保健衛生に関する方針につい
て決定を下す当局、そして汚染された可能性のある
血漿由来凝固因子製剤に曝露された患者に対処しな
ければならない医師は、倫理的問題に直面している。
他の血液伝播性病原体 (HCV) が最初に検出された
際にも、同様の問題が持ち上がった。しかし、時間
経過とともに急性および慢性 HCV 感染に関する理
解は深まり、有望な治療法が見いだされつつある。

対照的に、分子生物学の分野では、遺伝子組換え
型製剤や分子診断の導入などにより血液凝固異常症
の管理という点で継続的に改善がもたらされており、
今後も有望である。より基礎的な分野では、止血と
病態に関する科学的知識が深まったことにより、疾
患の経過に関する理解が継続的に向上しており [例
えば、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) や FVIII イ
ンヒビターに関して]、新たな治療選択肢が見いだ
される可能性もある。こうした進歩はみられている
が、遺伝子治療という形での血友病の確約的「治癒」
の実現については、未だ定かではない。分子生物学
のこの最終的な目標に向けての進歩はゆっくりと進
んでおり、未解決の問題も多い。

謝 辞

教育助成金を提供していただいた Alpha Thera-
peutic 社, 米国赤十字社, Aventis-Behring 社, Baxter
Healthcare 社, Bayer Biologics 社, Clearant 社, Ipsen
社, Kedrion 社, Novo Nordisk 社, Wyeth-Ayerst
Pharmaceuticals 社に謝意を表す。

References

1 Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purifi-
cation from bovine plasma and preliminary character-
ization. *J Biol Chem* 1976; **251**: 355-63.

2 Esmon CT. New mechanisms for vascular control of
inflammation mediated by natural anticoagulant pro-
teins. *J Exp Med* 2002; **196**: 561-4.

3 Campbell W, Okada N, Okada H. Carboxypeptidase
R is an inactivator of complement-derived inflamma-
tory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunol
Rev* 2001; **180**: 162-7.

4 Oganesyan V, Oganesyan N, Terzyan S *et al*. The
crystal structure of the endothelial protein C receptor
and a bound phospholipid. *J Biol Chem* 2002; **277**:
24851-4.

5 Faust SN, Levin M, Harrison OB *et al*. Dysfunction of
endothelial protein C activation in severe meningococ-
cal sepsis. *N Engl J Med* 2001; **345**: 408-16.

6 Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated
protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992;
79: 2340-8.

7 Hazelzet JA, de Kleijn ED, de Groot R. Endothelial
protein C activation in meningococcal sepsis. *N Engl
J Med* 2001; **345**: 1776-7.

8 Heeb MJ, Espana F, Griffin JH. Inhibition and com-
plexation of activated protein C by two major inhibi-
tors in plasma. *Blood* 1989; **73**: 446-54.

9 White B, Livingstone W, Murphy C, Hodgson A,
Rafferty M, Smith OP. An open-label study of the role
of adjuvant hemostatic support with protein C
replacement therapy in purpura fulminans-associated
meningococemia. *Blood* 2000; **96**: 3719-24.

10 Mann KG, Butenas S, Brummel KE. The dynamics of
thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
2003; **23**: 17-25.

11 Thorngren M, Shafi S, Born GV. Thromboxane A2 in
skin-bleeding-time blood and in clotted venous blood
before and after administration of acetylsalicylic acid.
Lancet 1983; **1**: 1075-8.

12 Mann KG. Biochemistry and physiology of blood
coagulation. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 165-74.

13 Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. A model
for the stoichiometric regulation of blood coagulation.
J Biol Chem 2002; **277**: 18322-33.

14 Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An integrated
study of fibrinogen during blood coagulation. *J Biol
Chem* 1999; **274**: 22862-70.

15 Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The plei-
otropic effects of tissue factor: a possible role for factor
VIIa-induced intracellular signalling? *Thromb Hae-
most* 2001; **86**: 1353-9.

16 Balasubramanian V, Grabowski E, Bini A, Nemerson
Y. Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colo-
calize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images
of thrombus formation and propagation under defined
flow conditions. *Blood* 2002; **100**: 2787-92.

17 Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP *et al*. Cell-
derived microparticles in synovial fluid from inflamed
arthritic joints support coagulation exclusively via a
factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*
2002; **46**: 2857-66.

- 18 Bokarewa MI, Morrissey JH, Tarkowski A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res* 2002; 4: 190–5.
- 19 Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* 1999; 402: 439–42.
- 20 Takeshima K, Smith C, Tait J, Fujikawa K. The preparation and phospholipid binding property of the C2 domain of human factor VIII. *Thromb Haemost* 2003; 89: 788–94.
- 21 Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A *et al.* Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* 1998; 92: 496–506.
- 22 Liu ML, Nakaya S, Thompson AR. Non-inversion factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thromb Haemost* 2002; 87: 273–6.
- 23 Levy GG, Nichols WC, Lian EC *et al.* Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488–94.
- 24 Tsai HM. Is severe deficiency of ADAMTS-13 specific for thrombotic thrombocytopenia purpura? Yes. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 625–31.
- 25 Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D *et al.* Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 2002; 100: 3626–32.
- 26 Law MG. Modelling the hepatitis C virus epidemic in Australia. Hepatitis C Virus Projections Working Group. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 1100–7.
- 27 Vogt M, Lang T, Frosner G *et al.* Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999; 341: 866–70.
- 28 Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV *et al.* The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341: 556–62.
- 29 Carr R, Veitch SE, Edmond E *et al.* Abnormalities of circulating lymphocyte subsets in haemophiliacs in an AIDS-free population. *Lancet* 1984; 1: 1431–4.
- 30 Beddall AC, Hill FG, George RH. Haemophilia and tuberculosis. *Lancet* 1983; 1: 1226.
- 31 Smith BC, Gorve J, Guzaill MA *et al.* Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27: 1695–9.
- 32 Rumi MG, De Filippi F, Donato MF, Del Ninno E, Colombo M. Progressive hepatic fibrosis in healthy carriers of hepatitis C virus with a transaminase breakthrough. *J Viral Hepat* 2002; 9: 71–4.
- 33 Messick K, Sanders JC, Goedert JJ, Eyster ME. Hepatitis C viral clearance and antibody reactivity patterns in persons with haemophilia and other congenital bleeding disorders. *Haemophilia* 2001; 7: 568–74.
- 34 Goedert JJ, Eyster ME, Lederman MM *et al.* End-stage liver disease in persons with hemophilia and transfusion-associated infections. *Blood* 2002; 100: 1584–9.
- 35 Yee TT, Griffioen A, Sabin CA, Dusheiko G, Lee CA. The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut* 2000; 47: 845–51.
- 36 Brown SA, Aledort LM, Lee CA. Haemostasis: from bench to bedside. *Haemophilia* 2002; 8: 685–93.
- 37 Brown P, Cervenakova L, Diringer H. Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt–Jakob disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 5–13.
- 38 Beringue V, Adjou KT, Lamoury F *et al.* Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol* 2000; 74: 5432–40.
- 39 Forloni G, Iussich S, Awan T *et al.* Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10849–54.
- 40 Heppner FL, Musahl C, Arrighi I *et al.* Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 2001; 294: 178–82.
- 41 Schenk D, Barbour R, Dunn W *et al.* Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173–7.
- 42 Ludlam CA. New-variant Creutzfeldt–Jakob disease and treatment of haemophilia. Executive Committee of the UKHCDO. United Kingdom Haemophilia Centre Directors' Organisation. *Lancet* 1997; 350: 1704.
- 43 Farrugia A. Risk of variant Creutzfeldt–Jakob disease from factor concentrates: current perspectives. *Haemophilia* 2002; 8: 230–5.
- 44 Foster PR. Prions and blood products. *Ann Med* 2000; 32: 501–13.
- 45 Vey M, Baron H, Weimer T, Groner A. Purity of spiking agent affects partitioning of prions in plasma protein purification. *Biologicals* 2002; 30: 187–96.
- 46 Stenland CJ, Lee DC, Brown P, Petteway SR, Jr, Rubenstein R. Partitioning of human and sheep forms of the pathogenic prion protein during the purification of therapeutic proteins from human plasma. *Transfusion* 2002; 42: 1497–500.
- 47 Reichl HE, Foster PR, Welch AG *et al.* Studies on the removal of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent by processes used in the manufacture of human immunoglobulin. *Vox Sang* 2002; 83: 137–45.