

かったので、本報告では血友病 A のみの解析結果を示す。

血友病 A 153 例中インヒビター (一過性で現在、消失している場合も含む) が発生したのは 41 例 (26. 8%) であった。

以下、インヒビターの発生率に及ぼす背景因子を検討した。

(1) 血友病の重症度はインヒビターの発生率に有意の影響を及ぼした ($p=0.024$) (表 1)。

(2) 血液型に関して A 抗原が無い患者 (O, B 型) の方がインヒビターの発生率が高いが (51. 2%vs36. 7)、その差は有意ではなかった ($p=0.325$) (表 2)。

(3) 関節症のある患者の方がインヒビターの発生率が高いが (35. 9%vs23. 7%)、その差は有意ではなかった ($p=0.204$) (表 3)。

(4) 家系にインヒビター保有血友病患者がいると発生率が有意に高かった ($p<0.001$) (表 4)。

(5) 初回投与後 2 年間の治療法に関して、出血時投与と定期補充との間に有意差はなかった ($p=0.725$) (表 5)。

(6) 初回投与後 2 年間、又はインヒビター発生までに頭蓋内出血があった患者のインヒビター発生率は高いが (42. 1%vs25. 4%)、その差は有意ではなかった ($p=0.216$) (表 6)。

(7) その他の重篤な出血あるいは観血的手術の既往歴がある患者ではむしろ、インヒビターの発生率が低い (それぞれ 11. 1%vs29. 0%, 10. 0%vs29. 0%)、サンプル数が少なくその差は有意ではなかった ($p=0.455$, $p=0.358$) (表 7, 8)。

(8) 初回投与から 2 年間に使用された凝固因子製剤を血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤で比較したところ両者に差が無かった ($p=0.935$) (表 9, 10)。なお、個別の製剤についても検討したがインヒビターの発生率に有意の影響を及ぼす製剤は認められなかった。

(9) インヒビター発生までの間に血漿由来の凝固因子製剤の使用歴があったのは、41 例中 13 例 (31. 7%) であった。一方、インヒビター未発生例で初回投与から 2 年間に血漿由来製剤の投与歴があったのは 112 例中 33 例 (29. 5%) であり、両群に差を認めなかった。

(10) インヒビター発生までの間に遺伝子組換え製剤の投与歴があったのは 41 例中 30 例 (73. 2%) であった。一方、インヒビター未発生例で、初回投与から 2 年間に遺伝子組み換え製剤投与歴があったのは 112 例中 80 例 (76. 8%) であり、両群に差を認めなかった。

(11) インヒビター発生前に使用されていた凝固因子製剤の比較でも (9) 及び (10) と同じく両群に差を認めなかった。

(12) インヒビターが発生していない患者群の初回投与年齢は、 2.1 ± 3.1 歳なのに対して、インヒビター発生群 ($n=39$) のそれは 0.8 ± 0.9 歳で有意差があった (表 11)

(13) インヒビターが発生していない患者群の第 VIII 因子活性は $2.6 \pm 5.3\%$ であるのに対して、インヒビター発生群の、第 VIII 因子活性は $0.6 \pm 0.5\%$ で有意差があった ($p<0.001$)
※第 VIII 因子活性 $<1\%$ は 0.5% , $<0.5\%$ は 0.25% として計算した (表 12)

(14) 有意差が得られた項目について、ロジスティック回帰分析を行った結果、インヒビターの発生に有意の影響が認められたのは、「家族あるいは親戚のインヒビター保有血友病患者の有無」のみであった ($p=0.003$)

(15) 以下の項目についてはインヒビター発生群と非発生群の間に有意差はなかった

- ①人種 (外国人は 1 名のみ)
- ②肝炎 (感染例なし)
- ③HIV (感染例なし)
- ④分娩様式 (表 13)。
- ⑤栄養法 (表 14)。
- ⑥血友病 A 家族歴の有無 (表 15)。

表 1

群項目(縦):1-5:凝固因子活性(1:軽症 2:中等症 3:重症)
分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
軽症	17(100.0)	0(0.0)	17
中等度	13(76.5)	4(23.5)	17
重症	82(68.9)	37(31.1)	119
合計	112(73.2)	41(26.8)	153

・ χ^2 検定(3×2) $\chi^2=7.43486$ 自由度=2
有意確率p=0.0242964*

表 2

群項目(縦):1-6:血液型-A抗原(0:無 1:有)
分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	21(48.8)	22(51.2)	43
有	19(63.3)	11(36.7)	30
合計	40(54.8)	33(45.2)	73

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.971029$ 自由度=1
有意確率p=0.324424
・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.324541

表 3

群項目(縦):2-1:血友病性関節症の合併
分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	87(76.3)	27(23.7)	114
有	25(64.1)	14(35.9)	39
合計	112(73.2)	41(26.8)	153

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=1.63089$ 自由度=1
有意確率p=0.201581
・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.204352

表 4

群項目(縦):4-2:家族あるいは親戚の血友病患者の
インヒビターの有無
分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	26(89.7)	3(10.3)	29
有	3(25.0)	9(75.0)	12
合計	29(70.7)	12(29.3)	41

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=14.1583$ 自由度=1
有意確率p=0.000168051***
・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.000210422***

表 5

群項目(縦):5-1a:初回投与後2年間の治療方法
(U20のみ回答)(1:出血時 2:定期補充療法)
分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
出血時	78(72.2)	30(27.8)	108
定期補充	33(76.7)	10(23.3)	43
合計	111(73.5)	40(26.5)	151

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.132479$ 自由度=1
有意確率p=0.715876
・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.725488

表 6

群項目(縦):7-1:初回投与後2年間、
又はインヒビター発生までの頭蓋内出血の有無
分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	97(74.6)	33(25.4)	130
有	11(57.9)	8(42.1)	19
合計	108(72.5)	41(27.5)	149

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=1.56099$ 自由度=1
有意確率p=0.211521
・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.215968

表 7

群項目(縦) :7-2:初回投与後2年間、
又はインヒビター発生までのその他の重篤な出血の有無
分類項目(横) :1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	98 (71.0)	40 (29.0)	138
有	8 (88.9)	1 (11.1)	9
合計	106 (72.1)	41 (27.9)	147

- ・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.600563$ 自由度=1
有意確率p=0.438363
- ・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.454865

表 8

群項目(縦) :7-3:初回投与後2年間、
又はインヒビター発生までの観血的手術の有無
分類項目(横) :1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	98 (71.0)	40 (29.0)	138
有	9 (90.0)	1 (10.0)	10
合計	107 (72.3)	41 (27.7)	148

- ・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.864034$ 自由度=1
有意確率p=0.352612
- ・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.357727

表 9

群項目(縦) :6-1a_p-VIII:初回投与から2年間の
凝固因子製剤名1-第VIII因子血漿由来製剤 (0:無 1:有)
分類項目(横) :1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	79 (73.8)	28 (26.2)	107
有	33 (71.7)	13 (28.3)	46
合計	112 (73.2)	41 (26.8)	153

- ・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.00475379$
自由度=1 有意確率p=0.945031
- ・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.93525

表 10

群項目(縦) :6-1a_p-VIII:初回投与から2年間の凝固因子
第VIII因子遺伝子組み換え製剤 (0:無 1:有)
分類項目(横) :1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	26 (68.4)	12 (31.6)	38
有	86 (74.8)	29 (25.2)	115
合計	112 (73.2)	41 (26.8)	153

- ・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.30957$ 自由度=1
有意確率p=0.577944
- ・Fisherの直接確率計算法による検定
有意確率p=0.570557

表 11

群項目(要因A) :1-8:インヒビターの発生
集計項目 :5-1_age:凝固因子製剤の初回投与年齢
群 :群別基礎統計量

	例数	平均値	中央値	標準偏差	標準誤差	75%点	25%点
非発生	109	2.11009	1	3.07721	0.294744	2	1
発生	39	0.794872	1	0.893823	0.143126	1	0
全体	148	1.76351	1	2.73889	0.225135	1.25	0

- ・等分散性の両側F検定:F=11.8526 第1自由度=108
第2自由度=38 p=2.9584e-13***

→不等分散t検定(Welchの検定):t値=-4.01402 自由度=142 p=9.62533e-05***

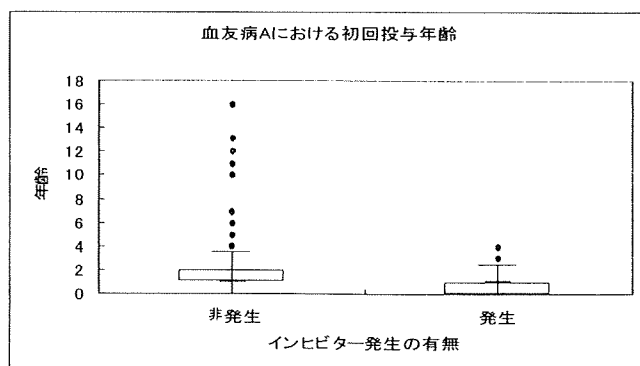


表 12

群項目(要因A):1-8:インヒビターの発生
 集計項目:1-5:凝固因子活性
 群:群別基礎統計量

	例数	平均値	中央値	標準偏差	標準誤差	75%点	25%点
非発生:	112	2.64152	0.5	5.33869	0.504459	1.55	0.5
発生:	41	0.62561	0.5	0.481939	0.0752662	0.5	0.5
全体:	153	2.10131	0.5	4.65589	0.376406	0.5	0.5

・等分散性の両側F検定:F=122.712 第1自由度=111
 第2自由度=40 p=4.56005e-15***
 →不等分散t検定(Welchの検定):t値=-3.95243 自由度=115 p=0.000133975***

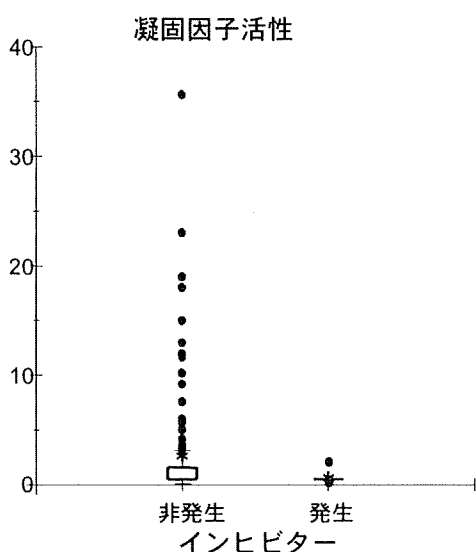


表 13

群項目(縦):3-1:分娩様式
 分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
経膈分娩	67 (71.3)	27 (28.7)	94
帝王切開	12 (80.0)	3 (20.0)	15
合計	79 (72.5)	30 (27.5)	109

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.153052$ 自由度=1
 有意確率p=0.695635
 ・Fisherの直接確率計算法による検定
 有意確率p=0.71977

表 14

群項目(縦):3-2:栄養法
 分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
母乳	26 (63.4)	15 (36.6)	41
人工乳	15 (75.0)	5 (25.0)	20
混合	25 (75.8)	8 (24.2)	33
合計	66 (70.2)	28 (29.8)	94

・ χ^2 検定(3×2) $\chi^2=1.61024$ 自由度=2
 有意確率p=0.447034

表 15

群項目(縦):4-1:血友病の家族歴
 分類項目(横):1-8:インヒビターの発生

縦\横	非発生(%)	発生(%)	合計
無	62 (76.5)	19 (23.5)	81
有	46 (68.7)	21 (31.3)	67
合計	108 (73.0)	40 (27.0)	148

・ χ^2 検定(修正有, 2×2) $\chi^2=0.791088$ 自由度=1
 有意確率p=0.373771
 ・Fisherの直接確率計算法による検定
 有意確率p=0.373596

7. 考察

これまででも多くの報告で指摘されているように、血友病の重症度と家系内のインヒビター保有血友病患者の存在は、インヒビターの発生率に有意の影響を及ぼした。

一方、出血時投与と比べて定期補充療法を受けていた患者では、インヒビター発生率が低いという報告があるが、今回の調査では両群間に差はみられなかった。同様に初回投与後2年間又はインヒビター発生までに頭蓋内出血があった患者のインヒビター発生率は、その既往がなかった患者と比べて高いものの(42.1%対25.4%)、その差は有意ではなかった。

今回の調査の最も大きな目的は、凝固因子製剤、特に血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤の間でインヒビター発生率に差があるか否かを明らかにすることであった。この点について、まず初回

投与から2年間に使用された製剤を比較した結果では両群に全く差が無かった(p=0.935)。

一方インヒビター発生例に対してインヒビター発生までの間、あるいはインヒビター発生時に使用されていた製剤を、インヒビター非発生例(初回投与から2年間に使用されていた製剤)と比較したところ、その頻度も両群間で差がみられなかった。

本調査は後方視的研究という制約はあるものの、本邦で遺伝子組み換え製剤が発売された1988年以降に出生した多数例での検討ということをもとにすると、我が国の血友病患者においても、血液製剤の種類(血漿由来製剤あるいは遺伝子組み換え製剤)はインヒビターの発生に影響を及ぼさない事が示唆された。

8. 結論

J-HIS1/U20の結果よりインヒビター発生要因として、インヒビター保有血友病患者の家族歴が大きく影響を与えている事が強く推測された。一方、血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤の使用はインヒビター発生に差異をもたらさないことが示唆されたが、両群の背景因子に偏りが無いのか、さらに精査する必要がある。

最後にJ-HIS1同様/U20に協力頂いたご施設と先生方のお名前を列挙させていただき深甚なる謝意を表します。

(研究協力医師)	(敬称略・順不同)
医療法人財団荻窪病院	花房秀次
稲垣クリニック	稲垣稔
九州大学病院	土居岳彦
北里大学病院	中舘尚也
黒石市国民健康保険黒石病院	北澤淳一
国立病院機構福井病院	梶原真清恵
佐賀大学医学部附属病院	尾形善康
札幌徳洲会病院	岡敏明
産業医科大学病院	佐藤哲司
鹿児島市立病院	川上清
聖マリアンナ医科大学	武藤真二
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院	瀧正志
静岡県立こども病院	三間屋純一
静岡県立こども病院	堀越泰雄
大館市立総合病院	高橋義博
東京医科大学	天野景裕
東京医科大学	福武勝幸

東京医科大学
獨協医科大学病院
名古屋大学医学部附属病院
奈良県立医科大学附属病院
奈良県立医科大学附属病院
奈良県立医科大学附属病院
奈良県立医科大学附属病院
奈良県立医科大学附属病院
奈良県立医科大学附属病院
奈良県立医科大学附属病院
兵庫医科大学病院

鈴木隆史
杉田憲一
松下正
荻原建一
柴田優
西屋克己
田中一郎
野上恵嗣
矢田弘史
櫻井嘉彦
日笠聡

9. 研究発表

[原著、総説等]

1)白幡 聡：血友病 A の疫学と病因.小児看護
32(12):1564~1571, 2009

10. 知的財産権の出願・登録状況

- 1)特許取得 なし
- 2)実用新案登録 なし
- 3)その他 なし

新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究

分担研究者：瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 小児科学教授

聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院 小児科部長）

研究要旨

「日本における第 VIII 因子、第 IX 因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究」の第二研究として「新規血友病患者のデータベースの構築によるコホート研究」を行うことで、日本でのインヒビター発生に関する補充療法関連の要因、特に、リコンビナント製剤と血漿由来製剤でのインヒビター発生の影響についての解明を行う。また、血友病患者の登録をデータベース化することで、今後の血友病治療における臨床研究の基盤整備を図る。

A. 研究目的

新規血友病患者を長期的に前向きに調査することで、インヒビター発生のリスク要因を解析する。また、血友病患者の登録をデータベース化することで、今後の血友病研究における基盤整備を図る。

B. 研究方法

1. 研究デザイン

新規発生血友病患者を対象としたコホート研究である。

2. 対象患者

- ① 2007 年 1 月 1 日以降に出生した先天性血友病患者
- ② 保護者から文書による同意を得ていること（ただし、未同意の症例については、未同意症例として人数の把握のみ行う。）

3. 研究実施期間

本研究の調査は 2008 年 1 月 1 日より 2027 年 12 月 31 日までの 20 年間とする。
追跡期間：血友病診断後、10 年間

4. 施設登録の手順、症例登録の手順、追跡調査の手順

（施設登録）

研究参加施設は、施設登録票（必要時には、倫理委員会での承認終了後）を J-HIS 事務局宛に FAX し、施設登録を行う。

事務局は、登録施設に対し Site ID を発行し、研究ファイル・症例報告書（調査表）を送付する。

（症例登録）

研究担当医師は、保護者に同意説明文書と口頭で、この研究についての目的と参加の重要性を説明し、保護者の自由意思による研究参加の同意を文書により取得する。同意取得後、新規血友病患者登録書を J-HIS データセンター宛に郵送する。J-HIS データセンターからの受領書の発行により登録終了とする。

（追跡調査）

研究担当医師は、25 累積投与日数（ED: Exposure Days）・50ED・75ED 到達時又は 1 年に 1 回のいずれか早い方、75ED 以降は 1 年に 1 回、追跡報告書を郵送にて J-HIS データセンターに提出する。なお、

インヒビター発症例については、別途報告書をあわせて提出する。

5.調査項目

(血友病患者診断時)

患者背景、合併症、分娩状況、家族歴、治療状況について調査する。

(追跡報告)

治療状況、免疫系への影響、カテーテルについて、インヒビター発症について調査する。

■1年間の凝固因子製剤投与回数が25回を超える場合：25累積投与日数(ED: Exposure Days)・50ED・75ED到達時

■1年間の投与回数が25EDを越えない場合：1年に1回、

(インヒビター症例の報告)

インヒビター保有血友病症例においては、新規発症報告後1年に1回報告する。発生日・発生時のインヒビター値・発症直前の治療薬、治療法、インヒビター値・最高値・出血時の治療薬・治療方法などについて調査する。

6.研究体制

研究代表者は、奈良県立医科大学 吉岡章で、運営委員会のメンバーは◎聖マリアンナ医科大学 横浜市西部病院小児科 瀧 正志、札幌徳州会病院小児科・血液科 岡 敏明、奈良県立医科大学小児科学教室 嶋 緑倫、北九州総合病院 白幡 聡、国立感染症研究所 血液・安全性研究部 種市 麻衣子、東京医科大学 臨床検査医学講座 福武勝幸、静岡県熱海健康福祉センター 三間屋 純一、兵庫県立医科大学血液内科 日笠聡、愛知県赤十字血液センター 高松純樹が担当する。

Japan Hemophilia データセンターが、研究代表者の指示のもとに、症例の登録業務、データ固定を行う。臨床データの情報処理(データ入力、症例一覧表等)、臨床データの集計を行う。

症例を収集するに当たり、(財)血液製剤調査機構 発表資料。厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「法制化後の小児慢性特定疾患治療研究事業の登録・管理・評価・情報提供に関する研究(H19-子ども一般-002)」(主任研究者：藤本純一郎)資料。該当製剤製薬企業に凝固因

子製剤納入リストの提出協力を依頼し、開示された資料を基に研究対象施設リスト・医師リストを作成し、本研究の案内並びに研究参加を依頼した。

(倫理面への配慮)

研究はヘルシンキ宣言、疫学研究に関する倫理指針(平成16年12月28日 文部科学省・厚生労働省)に従って実施する。そのため、同指針に従い、奈良県立医科大学倫理委員会の審査承認を得る。また、各施設での倫理委員会の承認が必要な場合は、各施設にて取得する。また、患者の保護者の自由意思による研究参加の同意を文書により取得する。他人に被験者を特定できるような個人情報は一切収集しない。データは被験者を特定できないように、Subject IDにより管理される。各施設は個人情報保護管理責任者が指名され、管理責任者の管理の下、Subject IDと患者氏名・カルテ番号の判別が可能な対応表を作成し、保管する。(連結可能匿名化)

C. 研究結果

本年度は平成20年4月22日に奈良県立医科大学附属病院 臨床研究審査委員会にて承認を経た実施計画書に基づき、新規血友病患者データ登録の為にデータベースに、参加施設登録並びに、症例報告書の登録を推進し、期間内に収集した40例を対象に基礎集計をおこなった。

2009/12/31 現在の J-HIS2 の進捗状況は以下の通りである。

・研究案内送付施設数	: 344
・研究参加施設数	: 51
・検討中(発症時検討)	: 50
・不参加表明施設数	: 30
・目標症例数	: 200
・症例ファイル設置数	: 128
・登録症例数	: 40 (達成率:20.0%)
	[血友病 A : 38 例
	血友病 B : 2 例

【症例登録施設並びに登録数一覧】

	症例登録件数
安城更生病院	1
久留米大学病院	3
九州大学病院	1
札幌徳洲会病院	2
産業医科大学病院	3
鹿児島市立病院	1
聖マリアンナ医科大学	8
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院	3
静岡県立こども病院	2
大分県立病院	2
東京医科大学	2
奈良県立医科大学附属病院	7
名古屋大学医学部附属病院	4
獨協医科大学病院	1
合計	40症例
14施設	

【1.患者背景】

病型	件数	(%)
血友病A	38	(90.476%)
血友病B	2	(9.524%)
合計	40	
性別		
男	40	(100.0%)
合計	40	
人種		
日本人	40	(100.0%)
合計	40	

患者生年月

データ	血友病A	血友病B	全体
2007. 出生	19	1	20
2008. 出生	19	1	20
2009. 出生	0	0	0
合計	38	2	40

血友病診断時の年齢

	件数	(%)
1か月未満	8	(20.0%)
1ヵ月～6ヶ月	19	(47.5%)
7ヶ月～1歳	12	(30.0%)
1歳～1歳6ヶ月	1	(2.5%)
1歳7ヶ月～2歳	0	(0.0%)
合計	40	

診断の契機

	件数	(%)
家族歴	11	(27.5%)
出血時	27	(67.5%)
その他	1	(2.5%)
黄疸のため採血した時、PTTが延長していたため精査して		
不明	1	(2.5%)
合計	40	

凝固因子活性

	件数	(%)
重症 (<1%)	28	(70.0%)
中等症 (1-5%)	11	(27.5%)
軽症 (>5%)	1	(2.5%)
合計	40	

血液型

	件数	(%)
A	10	(25.0%)
B	8	(20.0%)
O	7	(17.5%)
不明	15	(37.5%)
合計	40	

測定ラボ

	件数	(%)
自施設	21	(52.5%)
外注	14	(35.0%)
その他及び不明	5	(12.5%)
合計	40	

遺伝子変異検査の実施

	件数	(%)
未検査	39	(97.5%)
検査済み	1	(2.5%)
合計	40	

【2.合併症】

血友病以外の出血性疾患の合併

	件数	(%)
無	40	(100.0%)
合計	40	

他の重篤な疾患合併

	件数	(%)
無	38	(95.0%)
有	2	(5.0%)
生後4ヶ月 脊髄硬膜外血腫		
生後1週間 頭蓋内出血		
合計	40	

アレルギー疾患の合併

	件数	(%)
なし	31	(77.5%)
あり	7	(17.5%)
不明	2	(5.0%)
合計	40	

【3.分娩について】

分娩様式

	件数	(%)
経膣	27	(69.2%)
帝王切開	12	(30.8%)
合計	39	

経膣分娩の種類

	件数	(%)
自然分娩	20	(76.9%)
鉗子分娩	1	(3.8%)
吸引分娩	3	(11.5%)
未記入	2	(7.7%)
合計	26	

帝王切開の理由

	件数	(%)
血友病の可能性	3	(25.0%)
未記入	1	(8.3%)
それ以外	7	(58.3%)
不明	1	(8.3%)
合計	12	

在胎週数

	件数	(%)
35週	2	(5.1%)
37	9	(23.1%)
38	9	(23.1%)
39	8	(20.5%)
40	9	(23.1%)
41	2	(5.1%)
合計	39	

生後1週間以内の頭蓋内出血

	件数	(%)
無	39	(97.5%)
有	1	(2.5%)
合計	40	

→脳実質

頭蓋内出血と分娩様式

データ	あり	なし	合計
自然分娩	0	20	20
鉗子分娩	0	1	1
吸引分娩	1	2	3
未記入	0	2	2
合計	1 (3.8%)	25 (76.9%)	26

栄養法

	件数	(%)
母乳	21	(52.5%)
人工乳	1	(2.5%)
混合乳	16	(40.0%)
その他	2	(5.0%)
合計	40	

生後1週間以内の頭蓋内出血以外の異常出血

	件数	(%)
無	34	(85.0%)
有	6	(15.0%)
合計	40	

生後1週間以内の頭蓋内出血以外の異常出血部位

	件数	(%)
頭血腫	2	(33.3%)
背部皮下出血	1	(16.6%)
左手背	1	(16.6%)
消化管出血	1	(16.6%)
腎尿路系 (肉眼的血尿)	1	(16.6%)
合計	6	

【4.家族歴】

血友病の家族歴

	件数	(%)
無	20	(50.0%)
有	20	(50.0%)
合計	40	

兄弟(男性)の人数

	件数	(%)
0人	29	(72.5%)
1	8	(20.0%)
2	3	(7.5%)
合計	40	

兄弟(男性)の内血友病患者

	件数	(%)
0人	33	(82.5%)
1	6	(15.0%)
2	1	(2.5%)
合計	40	

家族あるいは親戚の血友病患者のインヒビターの有無

	件数	(%)	続柄	インヒビタータイプ
無	17	(65.3)		
有	2	(7.6)	兄	Low
			従兄弟	Low
未記入	1	(3.8)		
合計	20			

家族のアレルギー疾患の有無

	件数	(%)
0: 無	22	(52.4)
1: 有	14	(33.3)
99: 不明	4	(9.5)
合計	40	

【5.治療状況について】

登録時の止血治療の方法

	件数	(%)
なし	1	(2.5)
出血時	30	(75.0)
定期補充療法	7	(17.5)
まだ決定していない	2	(5.0)
合計	40	

登録時の治療薬

	件数	(%)
アドベイト	28	(71.8)
コージネイト	6	(15.4)
ノバクトM	1	(2.6)
未定	5	(12.5)
合計	40	

登録症例のStage登録件数

	件数
1-25ED 到達時	11
26-50ED 到達時	2
51-75ED 到達時	4
合計	17

本年度総括として、本研究を推進する為には以下の活動が必要と考える。

- 1.研究参加への告知啓蒙活動
- 2.症例登録への更なる推進活動
- 3.待機施設への再登録推進活動

課題対処手段として、以下を提案する。

- 1.班研究委員による、学会他委員会活動時における告知啓蒙活動の実施
- 2.CRO を主要施設に派遣し研究概要の説明並びに報告書記載の支援活動の実施
- 3.他凝固異常実態調査研究との連携
- 4.協力医師並びに患者の希望による遺伝子検査の付加

以上の事を 21 年度の総括として班会議にて提案し承認を経て本年度を終了した。

D. 考察

新規血友病患者を長期的に前向きに調査することで、インヒビター発生のリスク要因を解析する為には、血友病患者の発生時からの登録が簡易なデータベースを構築し、共有できるシステムを構築する事が重要である。またデータ集積は今後の血友病研究並びに診療ガイドライン策定における基盤整備に大きな役割を果たすことが期待される。

研究 1 で考察されたように今後の血友病の研究において遺伝子変異解析は重要な因子であると考えられる。付随研究として本班研究における研究 3,4 の

進捗とともに J-HIS 2 協力患者に対する全国的な遺伝子解析の実施を追加研究課題として提案する。

E. 結論

最後に、J-HIS2 研究にご協力頂いた施設と先生方を列挙させて頂き、深甚なる謝意を表します。

(研究協力医師)	(敬称略・順不同)
安城更生病院	宮島雄二
大分県立病院	糸長伸能
鹿児島市立病院	川上清
久留米大学病院	松尾陽子
九州大学病院	土居岳彦
札幌徳洲会病院	岡敏明
産業医科大学病院	佐藤哲司
静岡県立こども病院	三間屋純一
聖マリアンナ医科大学	武藤真二
東京医科大学	天野景裕
東京医科大学	鈴木隆史
獨協医科大学病院	杉田憲一
名古屋大学医学部附属病院	松下正
奈良県立医科大学附属病院	荻原建一
奈良県立医科大学附属病院	野上恵嗣
奈良県立医科大学附属病院	櫻井嘉彦

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[原著、総説等]

- 1) 瀧 正志：血友病に対する補充療法の革新—定期補充療法—、聖マリアンナ医科大学雑誌、37(5):319-325,2009
- 2) 山崎哲、山崎法子、鈴木典子、後藤宏実、高山成伸、瀧 正志：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、日本検査血液学会雑誌 10(2):167-173,2009

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究

分担研究者 福武 勝幸（東京医科大学臨床検査医学講座 主任教授）

研究協力者 篠澤 圭子（東京医科大学血液凝固異常症遺伝子研究寄附講座 講師）

【研究要旨】

血液凝固第VIII因子活性測定法の標準化とインヒビターを測定するベセスダ法の標準化がまず重要である。国際的に信頼性の高い測定機器のひとつであるACL 9000とAPTT試薬ヒーモスアイエルAPTT-SPを基準測定法と想定し、第VIII因子活性測定法の精度を検討し、インヒビター測定の方法であるBethesda法を改良したNijmegen変法をさらに改良し、多くの検査室において簡便に導入できるようにTokyo変法の設定を試みた。一般の自動化機器では第VIII因子活性測定法において、希釈液として製造会社指定の希釈液が使われているため標準化の妨げとなることから、検体調整操作の一部を用手法にして機器を超えた応用性を高めた基準測定法を作成した。Nijmegen変法では正常プール血漿のpHを安定させるために、固形のイミダゾールを加えて0.1Nとし1NのHClでpHを整える。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿（NPP）を取り扱う場合にはこの操作が難しいことから、2Nの緩衝化イミダゾール液を用いて、小分け保存したNPPに1/20量の2N緩衝化イミダゾールを添加するTokyo変法として検査精度を確認した。抗第VIII因子抗体測定法の標準化のために、基準となるインヒビター活性を持つ標準血漿の確立が必要である。高力価血漿の適正な希釈法を確立が必要であった。Bethesda法ではイミダゾール緩衝液、Nijmegen変法では第VIII因子欠乏血漿により希釈するが、全ての希釈液を第VIII因子欠乏血漿とすることは費用的に見て実用的ではなく、1次希釈を生理食塩液、2次希釈を第VIII因子欠乏血漿で行うことが適当と考えられた。これらの検討結果をもとに、標準インヒビター血漿を作成し、Tokyo変法の性能試験を行い、pHを保つことができ、第VIII因子活性の維持も可能であり、簡便で実用的な方法と考えられた。標準インヒビター血漿のインヒビター力価としては、1.5BU前後にすることが最も安定した成績を得ることができると、実験的考察および計算値から考えられた。これらの条件の下に、施設間差を解消する更なるサーベイランス作業が必要である。

A. 研究目的

血友病の治療において生じる重要な問題であるインヒビターの発生を研究するには、まず血液凝固第VIII因子活性測定法の標準化とインヒビターを測定するベセスダ法

の標準化が重要である。国際的に信頼性の高い測定機器のひとつであるACL 9000とAPTT試薬ヒーモスアイエルAPTT-SPを基準測定法と想定し、第VIII因子活性測定法の精度を検討し、インヒビター測定の方法であ

るBethesda法を改良したNijmegen変法をさらに改良し、多くの検査室において簡便に導入できるようにTokyo変法を設定し、実用性の高い測定法を標準法として普及を目指した。第VIII因子活性の測定法を標準化する必要があるが、一般の自動化機器では第VIII因子活性測定法において、希釈液として製造会社指定の希釈液（多くは緩衝液）が使われて標準化の妨げとなることから、検体調整操作の一部を用手法にして機器を超えた応用性の高い測定法を設定し、検査室間で共通に使用でき、同一条件で第VIII因子活性の校正が可能な測定法を開発する必要がある。また、インヒビター測定のNijmegen変法では正常プール血漿(NPP)のpHを安定させるために、固形のイミダゾールを加えて0.1Nとし1NのHClでpHを整える。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合には操作が難しいことから、Nijmegen変法を普及させるために2Nの緩衝化イミダゾール液を用いて、20分の1量をNPPに添加することにより緩衝化NPP作成の簡便化を図ったTokyo変法の実用性を検証する。さらに、インヒビター標準血漿の作成手順を確立する必要があり、希釈液と希釈手順を検討する。

B. 研究方法

(1) 凝固因子活性測定法の検討

国際的に信頼性の高い測定機器のひとつであるACL 9000とAPTT試薬ヒーモスアイエルAPTT-SPを基準測定法と想定し、凝固1段法による第VIII因子活性測定法の精度を検討する。

本機の凝固因子活性定量系を利用して第VIII因子活性を測定する際の検量線の再現性について検討した。第VIII因子活性として、①1.563%、②3.125%、③6.25%、④25.0%、⑤50.0%、⑥100.0%相当の6濃度の測定点における凝固時間の再現性を求めた。希釈液には0.05Mイミダゾール緩衝液を用い

て、本機の所定の方法により因子測定を自動測定を行い測定値を収集した。

(2) インヒビター測定法の検討

原法のBethesda法を改良したNijmegen変法の使用が求められているが、一般の検査室に導入するには障害が多いため、どの検査室においても簡便に導入できるように改良した、Tokyo変法の設定を試みた。Nijmegen変法では、被検血漿と正常プール血漿(NPP)を混合した後のpHを安定させるために、NPPに固形のイミダゾールを0.1Nになるよう加えて、1NのHCl溶液でpHを7.4に整える操作が必要であるが、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合にはこの操作が難しい。そこで、2Nの緩衝化イミダゾール液を作成し、NPPの1/20容を添加し、0.1Nイミダゾール加NPPを作成して操作を簡便化した(Tokyo変法)。

(3) 標準インヒビター血漿の特性

既知の68ベセスダ単位(BU)を示すインヒビター血漿を標準インヒビターとして使用するために、特性の確認を行った。0.05Mイミダゾール緩衝液にて5BU/mlまで希釈後、第VIII因子欠乏血漿で二次希釈を行った検体を用いてベセスダ法によりインヒビターの特性を確認した。

(4) 標準血漿の希釈法の開発

標準インヒビター血漿の希釈液として適当な組成を検討した。生理食塩水を一次希釈液として標準インヒビター血漿を約10BU/mlまで希釈した後、①pH7.4、0.05Mイミダゾール緩衝液、②pH7.4、0.05Mイミダゾール緩衝液加、5%ウシアルブミン、③第VIII因子欠乏血漿の3種類を二次希釈液として、それぞれ約0.5、1.0、1.5、2.0BU/mlへ希釈して検討した。

(5) インヒビター測定法のTokyo変法の性能試験

標準インヒビター血漿を生理食塩水を一

次希釈液として約10BU/mlまで希釈した後、第VIII因子欠乏血漿を二次希釈液として約0.5、1.0、1.5、2.0BU/mlへ希釈し、再現性を検討した。

(倫理面への配慮)

今回の研究は基礎的研究であり患者由来の検体を用いないため個人情報を必要としない。また、先天性第VIII因子欠乏症患者血漿とインヒビター血漿は市販品を用いたので患者の個人情報は取り扱わなかった。

C. 研究結果

(1) 第VIII因子活性測定法の検討

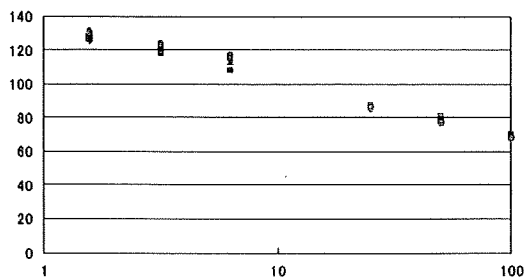
今回使用の全自動血液凝固検査測定装置(ACL 9000)とAPTT試薬(ヒーモスアイエルA PTT-SP)において問題なく応用でき、検量線についての6回測定による再現性試験では、①から⑥の平均秒、SD、CV%は、それぞれ表1に示すとおりで良好な結果を示した。

表 1 検量線の再現性

活性%	平均・秒	SD	CV%
1.563	127.7	2.13	1.67
3.125	120.8	2.27	1.88
6.250	112.7	3.54	3.15
25.0	86.25	1.00	1.16
50.0	77.93	1.61	2.08
100	68.72	0.98	1.42

図1

FVIII用検量線



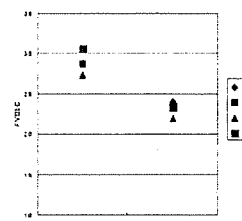
(2) インヒビター測定法の検討

1/20量のpH7.4の2Nイミダゾール緩衝液または精製水をNPPに添加した結果、混合後、37℃2時間後のNPPの残存第VIII因子活性は表2に示すと通りとなり、平均はそれぞれ28.9%と23.2%であった。

表 2 残存第VIII因子活性 (%)

	1	2	3	4
2N, pH7.4	28.8	28.7	27.3	30.6
精製水	24.0	23.4	21.9	23.3

図2 2時間後の残存第VIII因子活性



緩衝化NPPと通常のNPPを用いて、37℃2時間加熱後の第VIII因子活性を測定したところ、緩衝化NPPの残存第VIII因子活性は生理食塩水を添加したNPPに比べて高値を示し、活性維持の緩衝効果を認めた。

(3) 基準インヒビター血漿の特性

図3 残存第VIII因子活性

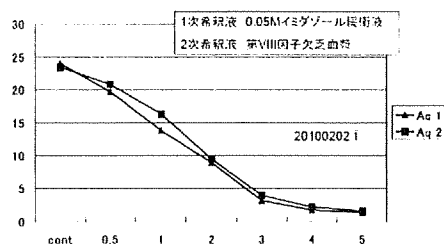


表3 インヒビター力価と第VIII因子活性

BU	cont	0.5	1	2	3	4	5
1	24.0	19.7	13.8	8.93	3.18	1.76	1.36
2	23.4	20.8	16.3	9.53	3.96	2.24	1.61

インヒビター血漿の濃度の増加とともに第VIII因子活性が急激に低下しており、タイプIインヒビターの性質を示した。

(4) 標準血漿の希釈法の開発

図4

希釈液の影響 FVIII:C

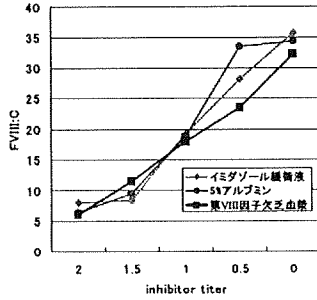
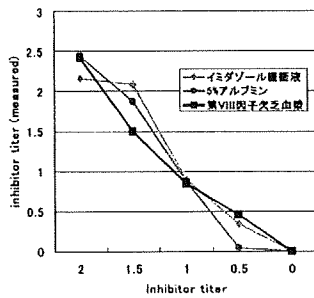


図5

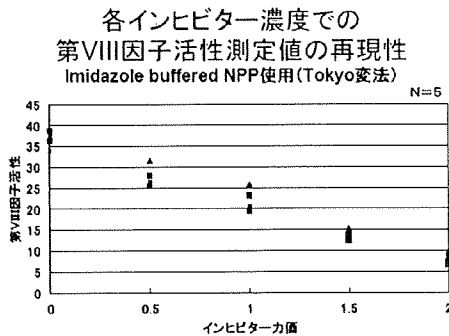
希釈液の影響
インヒビター力価



(5) インヒビター測定 of Tokyo変法の性能試験

a. 第VIII因子活性測定値の再現性

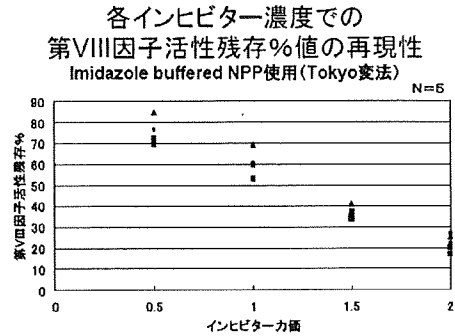
図6



コントロール及び各インヒビター濃度における同時再現性のCV%は、4.8~12.8%を示した。

b. 第VIII因子活性残存%の再現性

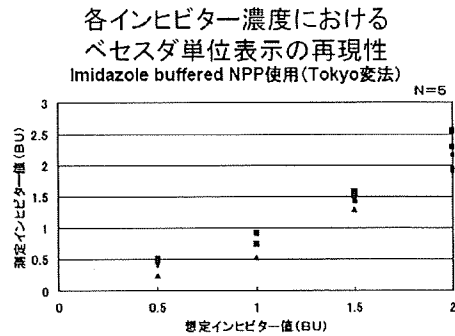
図7



コントロール及び各インヒビター濃度における同時再現性のCV%は、6.6~15.6%を示した。

c. インヒビター力価 (BU) の再現性

図8



コントロール及び各インヒビター濃度における同時再現性のCV%は、6.5~24.9%を示した。

これらの影響を表にまとめると下記の表4のようになる。

表4 各変換工程の同時再現性への影響

想定BU	FVIII:C		Residual VIII		Inhibitor BU	
	M	CV%	M	CV%	M	CV%
0	36.9	4.8	100	-	-	-
0.5	27.4	8.3	74.4	7.7	0.43	24.9
1.0	21.8	11.0	59.2	10.1	0.76	18.8
1.5	13.6	8.4	36.8	6.6	1.45	6.5
2.0	8.2	12.8	22.4	15.6	2.18	10.6

D. 考察

今回検討した第VIII因子活性測定法は前年度に検討した基準測定法に基づき調整されたものであるが、日常検査として

一般の施設で利用可能な方法である。第VIII因子測定系の再現性は良好であり、低値から高値までの同時再現性CV%は5%以下となっていた。この測定法を利用して、インヒビター測定法であるBethesda法の改良法であるNijmegen変法の更なる改良法として東京変法を開発した。インヒビター測定のためのBethesda法では、検体の希釈に0.05Mイミダゾール緩衝液を用いているが、Nijmegen変法では正常プール血漿(NPP)のpHを安定させるために、固形のイミダゾールを加えて0.1Nとし1NのHClでpHを7.4に整える手法を求めている。

しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合にはNijmegen変法では操作が難しいことから、Nijmegen変法の普及はなかなか進まない状況である。そこで、固形イミダゾールの代わりに、2Nの緩衝化イミダゾール液を用いて、Tokyo変法として緩衝化NPPの作成の簡便化を図った。この方法で、pHを概ね予定した範囲に保つことができ、Nijmegen変法と同等の第VIII因子活性維持効果を示すことを確認した。

さらに、インヒビター測定法の施設間差の有無を確認するための標準インヒビター血漿の作成方法を検討した。10ベセスダ単位まで生理食塩液で希釈し、その後は第VIII因子欠乏血漿によって希釈する方法が希釈直線性の最も良い標準インヒビター血漿の作成に繋がることを確認した。この方法により作成した、標準インヒビター血漿を用いて、インヒビター測定法の性能試験を行い、同時再現性を検討した。インヒビター測定における第VIII因子活性の測定値は、同時再現性のCV%で4.8~12.8%を示しており、2時間の加温の影響や検体の個別調整の影響があり、単純な第VIII因子活性の測定と比べて再現性の悪化が認められた。この成績を

利用して、コントロールに対する第VIII因子活性の残存%を計算するため、同時再現性のCV%は6.6~15.6%とさらに悪化を示した。Bethesda法ではこの残存%を利用してインヒビター活性に換算しているが、この際に対数変換が行われるために、残存率により測定誤差の縮小と拡大の現象が発生する。この関係を整理して表に示すが、誤差の関係が逆転していることが明らかとなった。すなわち、計算例として、残存%がそれぞれ25%、35%、50%、75%周辺において10%の差を想定したところ、表に示すように最終的なベセスダ単位の誤差は残存%が低いほど縮小され大きいほど拡大される。例えば、残存%が25%(2BU)付近の10%の変化は、ベセスダ単位への変換後に6.8%へと縮小するが、75%(0.4BU)付近では37%へと約3.7倍の拡大をきたす。この計算からは35%(1.5BU)付近の変化が一番少ないことが分かり、文献的にはベセスダ単位へ換算するには50%前後の測定値が推奨されているものの、実際は1.5BU前後が望ましいものと考えられ、標準インヒビター血漿の力価の選定にも注意が必要と考えられた。

表5

ベセスダ単位への変換に伴う誤差の変化例

換算式: $BU = (2 \cdot \text{Log}10(\text{res}^{\text{VIII}}) / (2 \cdot \text{Log}10(50)))$

	resFVIII10%差	Log	BU	BU差	BU差%
25%	27.5	1.439	1.862	0.14	6.9
	25.0	1.398	2.000		
35%	35.0	1.544	1.515	0.15	10.0
	31.5	1.498	1.667		
50%	50.0	1.699	1.000	0.15	15.2
	45.0	1.653	1.152		
75%	75.0	1.875	0.415	0.15	36.6
	67.5	1.829	0.567		

res^{VIII}: 残存第VIII因子%

E. 結論

インヒビター測定のためのベセスダ法の改良法であるNijmegen変法をさらに改良し、2Nの緩衝化イミダゾール液を利用してNPPを緩衝化する東京変法として簡便化を図った。東京変法で、pHを概ね予定した範囲に保つことができ、第VIII因子活性の維持

も可能であり、簡便で実用的な方法と考えられた。標準インヒビター血漿は最終希釈に第VIII因子欠乏血漿を用いることで良好な直線性を得ることができた。標準インヒビター血漿のインヒビター力価としては、1.5BU前後にすることが最も安定した成績を得ることができると、実験的考察および計算値から考えられた。これらの条件の下に、施設間差を解消するサーベイランス作業が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

インヒビターの発生要因の分析と発生機序の解明に関する研究

分担研究者 嶋 緑倫（公立大学法人奈良県立医科大学医学部医学科小児科 教授）

【研究要旨】

血友病インヒビターの発生要因およびインヒビターの第VIII因子抑制機序について本年度は以下のとおり、分子生物学的解析、免疫学的解析および第VIII因子の機能からみた生化学的解析にて研究を実施した。まず、血友病Aの分子生物学的解析をこれまでの研究で開発した第VIII因子のプロモーター、全エキソンおよびエキソン/イントロン境界領域を網羅して、直接シーケンシングを行う解析システムを基本に、キャピラリータイプのオートシーケンサーを用いて遺伝子解析を実施した。本年度は13名の遺伝子解析をおこなった。解析したすべての患者から遺伝子変異を検出し、内訳はイントロン22逆位1名、ナンセンス変異6名、ミスセンス変異2名、欠失1名、挿入2名、スプライシング変異1名であった。さらに本年度では患者の家族14人（10家系）に対して保因者診断を実施した。10名が保因者、4名が健常者と、遺伝子解析の実施により確実な保因者診断が可能になった。インヒビターの発生機序については、本年度はT細胞の関与について検討した。血友病Aマウス脾臓由来CD4+CD25+細胞の生細胞数は、遺伝子組み換え型第VIII因子非存在下と存在下では明らかな差はみられなかった。血友病Aおよび血友病Bインヒビターの抑制機序に関する検討において、本年度は、血友病Aの凝固機能をin vivoの細胞基盤モデルに基づいて評価するために、トロンビン生成測定に関する有用性を検討した。組織因子にエラジン酸を添加する測定系が第VIII因子を広域かつ高感度に相関し、かつ細胞基盤モデルをも反映し、極めて有用性の高い測定法であることが判明した。

1. インヒビターの分子生物学的解析：血友病遺伝子解析センター構築
- A. 研究目的
- 血友病に発生するインヒビターは第VIII因子製剤あるいは第IX因子製剤中の第VIII因子あるいは第IX因子を標的として発生する抗第VIII因子あるいは抗第IX因子同種抗体である。インヒビターが出現すると、第VIII因子や第IX因子製剤による補充療法の止血効果は消失～激減するために、現代の血友病の治療管理上、インヒビターの発現は重大な問題である。第VIII因子遺伝子はX染色体長腕（Xq28）に存在し、26個のエキソンと介在する25個のイントロンからなり、全長186kbに及ぶ。その巨大さゆえに、血友病A患者の遺伝子変異の同定は困難かつ時間を要する作業であった。われわれはキャピラリータイプのオートシーケンサー（ABI310）を用いて、プロモーター領域およびエクソン・イントロン境界領域を含む全エキソンのシーケンシング解析が、従

来のCSGE, SSCPなどのスクリーニング法に較べて、検出率および作業効率の点で優れていることを明らかにしてきた。今年度は本方法により、11人(11家系)の血友病A患者の遺伝子解析をおこなった。

B. 研究方法および結果

あらかじめ文書にてインフォームドコンセントを得た8人の患者からDNAを抽出し、イントロン22およびイントロン1の逆位をスクリーニングした。逆位が陰性であった患者について、ゲノムDNAを鋳型に33組のプライマー、Taqポリメラーゼ(Takara Taq®)を用いてプロモーター領域、エクソン・イントロン境界領域を含む第VIII因子全アミノ酸コード領域をPCR法(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® mini TP100)により増幅した。目的のPCR産物が得られたかどうかをアガロースゲル電気泳動で確認した後、QIAquick Gel Extraction Kit®(Qiagen)を用いて精製した。次にダイターミネーター法により、試料中のDNA塩基配列の複製を塩基特異的に中断した断片を標識し、DNAシーケンサーで塩基配列を決定した。具体的にはBigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kitを用いてDNA断片を蛍光標識し、Centri-Spin Column®(Princeton Separations)で未反応のダイターミネーターを除去した後、DNAオートシーケンサーABI310®(Applied Biosystems)にかけ、塩基配列を解析した。

解析したすべての患者から遺伝子変異を検出し、内訳はイントロン22逆位1名、ナンセンス変異6名、ミスセンス変異2名、欠失1名、挿入2名、スプライシング変異1名であった。患者の家族14人(10家系)に対して

保因者診断を行った。保因者診断は、患者から検出された変異に関してヘテロ接合体であるか否かを直接的に解析し、10名が保因者、4名が健常者と判明した。本法により、正確な遺伝子診断および保因者診断が可能となり、患者家族には正確な遺伝情報を提供することができた。

C. 考察

昨年度に引き続き、追加された8名の血友病A患者全例の遺伝子解析に成功した。さらに、本年度では10家系1名の保因者診断も実施したが、保因者と健常者の判断が遺伝子解析により確実に可能となった。したがって、教室で確立した血友病A遺伝子解析法は、血友病Aおよび保因者の遺伝子解析に極めて有用である。欧米では血友病患者の臨床的情報が血友病治療センターを中心に国家的プロジェクトにより整備され、そのなかで遺伝子異常のデータベースも確立されている。わが国ではいまだにナショナルデータベースの構築は整備されておらず、インヒビターの発生要因に関しても諸外国と比較検討することが困難な状況である。今年度の研究成果を踏まえると、わが国でも数箇所の遺伝子解析センターを整備することにより、ナショナルデータベース構築の基盤が確立されるものと期待される。

2. インヒビターの発生機序に関する研究

A. 研究目的

インヒビター発症機序における免疫細胞のふるまいについては、インヒビター発症時点前後での採血、免疫担当臓器の採取などが可能なことから動物モデルを用いて初めて検討可能となることが多い。

われわれは、血友病Aモデルマウスを用いてインヒビター発症機序におけるT細胞の関与についての検討を行う。今回は、インヒビター発症血友病Aマウスにおいて、FVIII抗原による特異的刺激により誘導される、T細胞増殖の検出法についての検討を行った。放射性物質標識チミジン（あるいはアナログ）を用いた方法が主流であるが、放射性物質を用いないFVIII刺激T細胞増殖の検出法を確立する。これが確立されれば、CD4+CD25+制御性T細胞をはじめとする各種細胞、あるいはサイトカインによる“FVIII抗原誘導T細胞増殖”の抑制を検出する際に有用なツールとして用いることができる。

B. 研究方法

血友病Aモデルマウス（FVIIIノックアウトC57BL/6マウス）に遺伝子組換えFVIII製剤（コージネイトFS®）（rhFVIII）、4 IU/bodyを1週間ごとに腹腔内投与し、その直前にクエン酸加採血をおこない、インヒビター値を測定した。その結果rhFVIIIの投与回数に応じてインヒビター値が上昇することを確認した。

まず、予備的検討としてFVIII抗原特異的CD4+CD25-細胞増殖の検討を行った。すなわち、インヒビター発症血友病Aマウスから脾臓を摘出し、有核細胞を分離し（ 2×10^3 /ul）、さらにDynabeads FlowComp Mouse CD4+CD25+ Treg Kitを用いてCD4+CD25+制御性T細胞を分離した。CD4+CD25+制御性T細胞が除かれたbeads非結合細胞から、Dynabeads FlowComp Mouse CD4+を用いてCD4+CD25-細胞を分離し、 2×10^3 /ulになるよう培養液 10%

FCS RPMI1640 50uM 2MEで調整した。得られたCD4+CD25-細胞に対し、Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 for physiological activation of mouse T cellsを用いてCD3 とCD28 への共刺激シグナルを誘導するとともに、特異抗原としてrhFVIII（5IU）を加え4日間培養を行った後、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assayを用いて生細胞数を測定し、rhFVIII存在下あるいは非存在下での細胞増殖の差異を検討した。

C. 結果と考察

これまでのところ、血友病Aマウス脾臓由来CD4+CD25-細胞の生細胞数は、rhFVIII非存在下と存在下で差が見られていない。原因として、rhFVIII添加濃度が適切でない可能性、また、Dynabeads CD3/CD28を用いた刺激が弱い可能性が考えられる。現在、rhFVIII添加濃度の検討、また、細胞刺激をDynabeads CD3/CD28から放射線照射抗原提示細胞（irradiated APC）への変更について検討中である。

3.インヒビターの凝血学的生化学特性に関する研究

A. 研究目的

インヒビターは製剤中の第VIII因子や第IX因子に結合することにより、第VIII因子の機能に重大な影響をあたえる。第VIII因子は、凝固内因系において活性型第IX因子が第X因子を活性化する、いわゆるtenase複体の必須の補因子として機能している。血友病Aインヒビターは、第VIII因子重鎖A2ドメインと軽鎖C2ドメインに主に結合して第VIII因子補因子活性を阻害することから、