

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた血友病遺伝子治療の基礎的検討  
分担研究者：自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部  
教授 小澤敬也、講師 水上浩明

研究要旨 AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて基礎的検討を行った。遺伝子導入効率に大きく影響すると考えられるベクターに対する中和抗体に関して測定系を改良し、中和抗体陰性のサルでは末梢静脈へのベクター投与により治療域に達する効果が長期間持続することを示した。一方、中和抗体陽性の個体ではベクターの静脈内投与によって効果が得られた個体はいなかったが、中和抗体の影響を回避できるように投与方法を工夫することで効果が認められるようになった。また、臨床研究に向けて必要となる臨床グレードのベクターについて、調製の準備を進めた。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法などの基盤技術開発を図る。また、第IX因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用して主に霊長類に対する投与を行って、治療法の有効性と安全性につき検討する。以上を通じて血友病に対する安全な根治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

- AAV ベクターに関する基礎研究：遺伝子導入効率に大きな影響を与える中和抗体に関して、鋭敏なアッセイ系を確立し、医薬基盤研・霊長類医科学研究センターのカニクイザル 188 頭及び、健常者 58 人、血友病患者 43 人を対象とした解析を行った。
- 遺伝子導入動物実験：特にカニクイザルにおいて肝臓を標的として AAV ベクターを投与し、遺伝子発現効率の確認及び免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。また、ベクター溶液の門脈内への注入に際して、ベクター溶液と血流の接触を極力遮断するために投与前後に生理食塩水を急速注入したところ、中和抗体陽

性例でも効果が認められた。さらに安全かつ少ない侵襲で行うため、カテーテルによって同じ方法を行うことで効果が見られるかどうかにつき検討した。

- 臨床研究に向けた AAV ベクターの調製に関する検討：臨床グレードのベクター調製に向けて、実際に作製・精製を担当する VGTC 社 (中国・北京市) との間で情報交換並びに必要な技術指導を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。また、ヒトの血清サンプルに関しては、予め書面にて検査に関する了解を取るとともに、サンプルの匿名化を図り個人の特特定が行えないように配慮した上で実施した。

### C. 研究結果

・ AAV ベクターに関する基礎研究：改良した方法で各血清型のキャプシドに対する中和抗体陽性率をカニクイザル及びヒトにおいて測定したところ、カニクイザルでは2型及び8型の抗体陽性率が69.2%と71.3%に認められた。一方、ヒトでは健常者と血友病者のいずれでも2型、8型ともに約半数が陽性であり、両グループ間に有意な差を認めなかった。

・ 遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して凝固第IX因子遺伝子を搭載した様々な血清型由来のベクターを投与し、治療域に至る効果を得た。また、中和抗体陽性の個体においてもベクター溶液の注入前後にカテーテルにより生理食塩水を急速注入することで、治療域に達する効果を得ることができた。

・ 臨床研究に向けた AAV ベクターの調製に関する検討：VGTC 社において良質のベクターを大量調製する技術を確立した。臨床研究用として十分な量( $2 \times 10^{14}$  ゲノムコピー)を目指して調製を進めているところである（平成23年2月現在）。

### D. 考察

AAV ベクターを用いて肝臓を標的とする場合には8型の有用性が高いものと期待されている。一方、これまでのサルにおける検討では、たとえ低力価であっても中和抗体が存在する場合、遺伝子導入は成功していない。従って、実験に際しては事前に中和抗体のスクリーニングを徹底的に行う必要があり、これはヒトに対して治療を行うことになっても同様に必要な検査である。これまで8型に対する中和抗体の検出感度は不十分であったが、我々はこれまで改良を加えてきており、検出法として確立できたものと考えられる。サルでは8型の陽性率が高いとされ、これま

でのスクリーニングでも陽性の個体は過半数を占めていた。今回まとまった数の個体を対象とすることで、約7割に上る陽性率が見られた。2型に対する中和抗体の陽性率もほぼ同じ水準であり、対象としたサルの間ではこれらのウイルス感染が広まっている事が推定される。

ヒトでは健常人、血友病者のいずれにおいても2型と8型のいずれに対しても陽性率は約半数であり、両群間に差は見られなかった。血友病患者においてはより高い傾向が見られる可能性を懸念していたが、健常者と同様に約半数が8型に対する中和抗体が陰性であり、ベクターを静注することで治療効果が期待できる。まだ対象数がそれほど多くないため、今後はさらに数を増やして検討を行っていききたい。

中和抗体陽性の場合にも効果を得るための方法として、ベクターの注入前後に生理食塩水を急速注入する方法を開発しており、今回は同じ原理に基づき、より安全に実施することを目指してカテーテルを用いることとした。カテーテルを用いてもほぼ同様に実施可能であり、効果も得られていることからヒトに対して実施する上でも特に問題はないものと考えている。これまでは低力価陽性の個体を選択して行っているが、今後はより高い力価の中和抗体を有する個体についても有用性を検討していききたい。

臨床研究に向けた AAV ベクターの調製に関する検討では、VGTC 社において8型のベクターを用いる経験に乏しかったこともあって試行錯誤が続いたが、ようやく作製法・精製法ともに大量調整に見合った方法が確立できた。入手次第、動物実験を含めたさまざまな系でベクターとしての性能を評価していききたいと考えている。

血友病 B に対する遺伝子治療は2型 AAV を用いた方法では効果が不十分であったと考えられていたが、最近になって8型を用い

る臨床研究が始められており、我々も遅れを取ることなく臨床研究を目指す必要がある。

#### E. 結論

AAVを用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響する因子を解析し、そのうち最も重要な中和抗体検出法の改良を通じて肝臓への遺伝子導入効率が確保できるようになった。また、その成果を用いて臨床研究を企画するに至った。以上の取り組みを通じて血友病治療に役立つ遺伝子治療法開発が進展するものと期待される。

#### G. 研究発表 (欧文論文)

1. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I.: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-5, 2010.

2. Lock M, McGorray S, Auricchio A, Ayuso E, Beecham EJ, Blouin V, Bosch F, Bose M, Byrne B, Caton T, Chiorini J, Chtarto A, Clark KR, Conlon T, Darmon C, Doria M, Douar AM, Flotte TR, Francis J, Francois A, Giacca M, Korn M, Korytov I, Leon X, Leuchs B, Lux G, Melas C, Mizukami H, Moullier P, Muller M, Ozawa K, Philipsberg T, Poulard K, Raupp C, Riviere C, Roosendaal S, Samulski RJ, Soltys S, Surosky R, Tenenbaum L, Thomas DL, van Montfort B, Veres G, Wright JF, Xu Y, Zeleniaia O, Zentilin L, Snyder RO.: Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Human Gene Therapy*, 21:1273-85, 2010.

3. Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y.: Mutant Macaque Factor IX T262A: A Tool for

Hemophilia B Gene Therapy Studies in Macaques. *Thromb Res.* 125:533-7, 2010.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特になし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

血友病におけるインヒビター発生機序の解明および  
治療法の確立に関する研究

分担研究者 嶋 緑倫 奈良県立医科大学

研究要旨；補充療法に伴い血友病 A 患者の 5-20% に抗第 VIII 因子同種抗体（インヒビター）が発生することが知られている。インヒビター保有血友病患者の止血管理はきわめて困難となり、未だ解決すべき課題である。インヒビターの発生機序の解明およびインヒビター患者の治療法の確立を目指して基礎的研究を行った。インヒビター患者に対する止血療法として活性型第 VII 因子製剤（rFVIIa）や活性型プロトロンビン複合体製剤（APCC）によるバイパス療法があるが、これらの治療に抵抗する症例が存在することが知られており、その機序は明らかではない。APCC 不応血友病 A インヒビター患者のトロンビン生成試験（TGT）で lagtime の遅延とピーク値の低下がみられたことから凝固初期相における障害を想定し tissue factor pathway inhibitor（TFPI）の関与について検討した。free TFPI 抗原量は APCC 投与後有意に増加し、rFVIIa は投与前後で変化しなかった。TFPI 活性は APCC 不応時に高い傾向を示し、不応時 TGT に特徴的にみられる lagtime 遅延とピーク値低下は抗 TFPI 抗体の添加で消失した。APCC に含有される TFPI が TFPI 抗原および活性位上昇の原因であることが示唆された。

また、我々はこれまでに活性型 VII 因子／組織因子複合体（FVIIa/TF）が第 VIII 因子（FVIII）の重鎖を分解することにより FVIII を活性化した後不活化し、血液凝固反応極初期相において FVIII 活性を上昇することを報告した。今回、FVIII インヒビター存在下での FVIIa/TF の FVIII に対する作用について検討した。凝固一段法では、インヒビター存在下で FVIII に FVIIa/TF を添加すると、正常 IgG 存在下（コントロール）と同様に、30 秒後に FVIII:C は約 2.6 倍に上昇した。その後、コントロールでは約 20 分で FVIII:C は初期レベルに低下するが、抗 C2 type1 抗体存在下では FVIII:C 低下が抑制され、不活化速度は 40% 低下した。ウェスタンブロット法において、FVIII 不活化過程でみられる Arg336 開裂は抗 C2 type1 抗体存在下ではコントロールに比して時間・濃度依存的に遅延がみられた。rFVIIa と FVIII 製剤の併用によるインヒビター保有血友病 A 患者の治療やインヒビターのタイプ診断による治療効果予測の可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

血友病 A および B は、X 染色体上の血液凝固第 VIII 因子遺伝子および第 IX 因子遺伝子の異常に基づく先天性凝固障害性の出血性疾患である。ヒト血漿由来あるいはリコンビナントの第 VIII 因子あるいは第 IX 因子濃縮製剤の投与により、血友病患者の QOL は飛躍的に向上してきている。しかし補充療法に伴い血友病 A 患者の 5-20% に抗第 VIII 因子同種抗体（インヒビター）が発生することが知られている。インヒビター保有血友病患者の止血管理はきわめて困難となる。インヒビター患者に対する止血療法として活性型第 VII 因子製剤（rFVIIa）や活性型プロトロンビン複合体製剤（APCC）によるバイパス療法があるが、バイパス療法の作用機序に関しては不明な点が多く、これらの治療に抵抗する症例も存在する。インヒビターの発生機序の解明およびインヒビター患者の治療法の確立を目指して基礎

的研究を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) APCC 製剤不応機序の解明

血友病インヒビター患者において、APCC や rFVIIa によるバイパス止血療法の不応例が散見されるが、未だ明らかな原因は不明である。我々は APCC 連日投与中に不応となった血友病 A インヒビター例でトロンビン生成試験（TGT）の lagtime が遅延し、かつピーク値が低下することを第 71 回日本血液学会で報告した。今回、不応機序として凝固初期相における障害を想定し tissue factor pathway inhibitor（TFPI）の関与について検討した。インヒビター患者の不応時および休薬後薬効回復時において、TFPI 抗原・活性測定、TGT を含む凝血的検討を実施した。

##### 2) 第 VIII 因子インヒビターの活性型第 VII 因子によ

## 第 VIII 因子活性化／不活性化に対する影響

我々はこれまでに(第 31 回日本血栓止血学会学術集会)、活性型 VII 因子／組織因子複合体 (FVIIa/TF) が速やかに第 VIII 因子 (FVIII) の重鎖を分解することにより FVIII を活性化した後不活化し、血液凝固反応極初期相において FVIII 活性 (FVIII:C) を上昇することを報告した。今回、我々は、抗 FVIII 同種抗体 (インヒビター) 存在下での FVIIa/TF の FVIII に対する作用について、13 種類のインヒビター (抗 A2type1 抗体 2 種、抗 C2 type1 抗体 7 種と抗 C2 type2 抗体 4 種) を用い、凝固一段法及びウェスタンブロット法により検討した。

### C. 研究結果および考察

#### 1) APCC 製剤不応機序の解明

血小板数、APTT、Fib、PIC、FV、PS、ATIII などに有意な変化はなく、APCC に含有される FII、FVII、FIX、FX、PC は投与後に増加したが、さらに TFPI に APCC と関連する変化を見出した。他の患者血漿も含めて検討したところ、free TFPI 抗原量は APCC 投与後 (有効か不応に拘わらず) 有意に増加し (32.9 vs 43.9 ng/ml, n=8)、rFVIIa 投与前後は変化しなかった (23.0 vs 20.8 ng/ml, n=4)。つまり血漿 free TFPI 抗原量は、APCC (90 U/kg で血漿換算 2 U/ml) 投与後に 11.0±1.9 ng/ml (正常濃度の 30~70%) 上昇した。TFPI 活性は APCC 不応時に高い傾向を示し、不応時 TGT に特徴的にみられる lag time 遅延とピーク値低下は抗 TFPI 抗体の添加で消失した。APCC の TFPI 含有の有無を調べたところ、1 U/ml 中に約 8ng/ml の free TFPI 抗原量を認めた。APCC に含有される TFPI が TFPI 抗原および活性位上昇の原因であることが示唆された。

#### 2) 第 VIII 因子インヒビターの活性型第 VII 因子による第 VIII 因子活性化／不活性化に対する影響

2BU/mL 相当のインヒビター存在下で FVIII 10nM に FVIIa/TF 1nM を添加したところ、インヒビターの認識エピソードに関わらず、正常 IgG 存在下 (コントロール) と同様、凝固一段法にて、反応開始 30 秒の FVIII:C は約 2.6 倍上昇した。その後、抗 A2type1 抗体及び抗 C2type2 抗体存在下ではコントロールと同様に約 20 分で FVIII:C は初期レベルに低下したが、抗 C2 type1 抗体存在下では FVIII:C 低下が抑制され、不活化速度は 40% 低下した。ウェスタンブロット法では、FVIII 10nM に FVIIa/TF 1nM を添加後、速やかに Arg372 と Arg740 開裂が出現し、A1 ドメインの Arg336 開裂が遅れて (~2.5 分) 出現した。全てのインヒビターの存在下で Arg372 開裂はコントロールと同様であった。一方、Arg336 開裂出現は、抗 A2 type1 抗体と抗 C2 type2 抗体存在下ではコントロールと同様であったが、抗 C2 type1 抗体存在下ではコントロールに比して時間・濃度依存的に遅延がみられ、凝固一段法における不活化抑制結果と一致した。FVIIa/TF はインヒビター存在下でもトロンビンや FXa 非依存性に FVIII を活性化し、さ

らに抗 C2 type1 抗体の存在により不活化が抑制された。

このことは、FVIIa 製剤と FVIII 製剤の併用によるインヒビター保有血友病 A 患者の治療やインヒビターのタイプ診断による治療効果予測の可能性を示唆する。

### 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：嶋緑倫、田中一郎、柴田 優、野上恵嗣、荻原建一、矢田弘史。

### 研究発表

1. Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, Shima M. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thromb Haemost.* 103: 94-102, 2010.
2. Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2010
3. Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 21: 568-76, 2010.
4. Nishiya K, Nogami K, Okada K, Matsuo O, Takeyama M, Ogiwara K, Shima M. Determination of a factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII(a). *Thromb Haemost.* 104: 105-17, 2010.
5. Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, Shima M. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thromb Haemost.* 103: 94-102, 2010.
6. 田中一郎, 嶋緑倫. 凝固線溶系 後天性血友病における免疫応答. *Annual Review 血液* 2010: 191-195, 2010.
7. 嶋緑倫. 出血性疾患の病態と管理 後天性凝固異常症の病態と治療 後天性血友病を中心に. *臨床血液* 51, 1531-1538, 2010.
8. 嶋緑倫. 【小児の治療指針】 血液・腫瘍 血友病. *小児科診療* 73: 433-436, 2010.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

「血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究」

分担研究報告書

第 VIII、第 IX 因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究

研究分担者 嶋 緑倫（公立大学法人 奈良県立医科大学 小児科学教室 教授）

【研究要旨】

インヒビター（同種抗体）の発生は血友病治療上最も深刻であり、解決すべき重大な合併症はである。わが国ではインヒビターの発生要因や疫学に関する nation-wide なデータベースはもちろんのこと研究体制も確立されていない。本研究ではインヒビター陽性患者の疫学調査と並行して、全国レベルでの新規血友病の登録システムを新たに構築する。加えてインヒビター検出・診断の検査法の標準化を図るとともに、発生要因の解析と機序の解明を行う。これらは、国際的動向との調和と標準化、さらにインヒビター患者の適正な診療ガイドラインの策定と診療体制の確立に資するものである。その結果、わが国の血友病診療施設が網羅された基盤整備が可能となる。本研究は平成 19 年から 21 年にわたり実施された「第 VIII、第 IX 因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究（主任研究者：吉岡 章）」の研究成果を基盤に血友病診療体制の基盤整備と臨床研究を行うことを目的に以下の研究を実施した。

1. 第 1 研究として平成 19 年度から 21 年度に「インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究：インヒビター発生患者の実態調査（J-HIS1）と 20 歳未満血友病患者のインヒビター発生に関する後方視的研究（J-HIS1/U20）」を実施した。

本年度は、その解析結果をふまえ J-HIS1/U20 の登録データについて、インヒビター発生に関する補充療法関連の要因、特に、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤でのインヒビター発生の影響について、解析を行った。解析可能であった血友病 A 153 例中のインヒビター発生例は 41 例（26.8%）であったが、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤の間でインヒビター発生率に差はなかった、との論文を血栓止血学会並びに Hemophilia へ投稿した。

また、J-HIS1 では、解析可能症例が 106 例集積され、このうち 53 例（50%）でインヒビターが消失していた。この時点で、血液型の病型とインヒビターの消長に影響があるかのデータが得られたため、血液型不明症例の再調査を実施し、再度解析を実施したところ、血液型の影響は消失した。

2. 第 2 研究として「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 J-HIS2」を継続実施した。本年度末における累計登録症例数は 47 例（血友病 A 43 例、血友病 B 4 例）であり、データ収集と症例登録の推進が進まなかった要因を検討し、実施計画書の

改定を行い研究員の承認を得、倫理委員会への改定申請を完了した。

3. 第3研究として「インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究」を実施した。血友病の治療において、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たうえで、臨床の場で現実的に利用できるこれらの検査の精度を検証した。そして、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て、多くの検査室において簡便に導入できるように Tokyo 変法の設定し、共通の方法として普及させることを試みている。
4. 第4研究として第1研究ならびに第2研究に登録された血友病患者の第VIII因子、第IX因子、サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-10、CTLA-4) の遺伝子解析を実施して、遺伝子異常を明らかにし、臨床的データとをあわせてわが国における血友病患者のインヒビター発生病因を明らかにすることを目的として、多施設協同にて「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」の実施計画・実施体制の確立を行った。

#### 【研究協力者】

大賀正一 (九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学寄附講座 客員教授)

岡 敏明 (札幌徳洲会病院 小児科・血液科 部長)

川上 清 (鹿児島市立病院 小児科 部長)

小嶋哲人 (名古屋大学 医学部保健学科 検査技術科学専攻 教授)

酒井道生 (産業医科大学 小児科 助教)

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)

柴田 優 (奈良県立医科大 小児科 講師)

白幡 聡 (北九州八幡東病院 院長)

高木 明 (名古屋大学 医学部保健学科 検査技術科学専攻 学内講師)

高松 純樹 (愛知県赤十字血液センター 所長)

瀧 正志 (聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院 小児科 教授)

種市麻衣子 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官)

花房秀次 (荻窪病院 理事長)

濱口 功 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長)

日笠 聡 (兵庫医科大学 血液内科 講師)

福武 勝幸 (東京医科大学 臨床検査医学講座 主任教授)

堀越泰雄 (静岡県立こども病院 血液腫瘍科 医長)

松下 正 (名古屋大学医学部附属病院 輸血部 教授)

吉岡 章 (奈良県立医科大学 理事長・学長) (50音順)

#### A. 研究目的と必要性

血友病における止血療法の原則は、血漿由来 (pd) または遺伝子組み換え型 (r) の第VIII因子 (FVIII)、または第IX因子 (FIX) 製剤の補充療法である。しかしながら、反復する補充療法の結果、血友病 A、B 患者のそれぞれ 20~30%、1~5%で、FVIII、FIX を不活化 (中和) するインヒビター (同種抗体) が発生し、以後の止血治療は著しく困難となり、患者の QOL は低下する。インヒビター発生には患者関連の要因 (遺

伝子異常、蛋白異常、免疫応答機構、人種、遺伝学的要因など)と治療関連の要因(製剤の種類、投与方法、治療開始年齢、定期補充療法、手術や重篤な出血のための高用量治療)とが関与する。遺伝子異常においては、大きな欠失例で最もインヒビター発生率が高く、ミスセンス点変異例では比較的少ないなど変異により発生率が異なることが知られている。また最近、血友病 A の rFVIII 投与群では pdFVIII 投与群に比べてインヒビターの発生頻度が高いとの報告 (Goudemand J, *et al.* Blood, 107, 2006)があった。さらに、欧州の多施設後方視的調査によるとインヒビターの発生リスクとして、遺伝子異常、インヒビターの家族歴、初回の強力な治療の有無が最も有力な要因であることが報告された (Gouw SC *et al.* Blood 109,2007)。インヒビターの発生リスクを正しく評価して治療を計画することはきわめて重要であるが、我が国では国際的報告と比較できるインヒビターに関する nation-wide なデータベースがなく、遺伝子異常に関する情報も少ない。また、その基礎となる血友病に特化した全国レベルでの前方視的な患者登録システムが構築されておらず、インヒビター発生要因の分析や発生機序の解明はほとんど行われていない。また、その前提となるインヒビター測定法の標準化も未開発、未確立であり、インヒビターの診断面においても課題が多いのが現実である。ここに、本研究の目的と意義があり、本研究を通じてわが国の血友病診療施設を網羅した血友病診療・研究の基盤整備を構築する。

1. 第 1 研究では、吉岡班で得られた登録症例患者を対象 (J-HIS1/U20) に、患者数、年齢、重症度、製剤の種類、手術や感染症の有無、血液型などインヒビター発生要因に関する調査を継続し、データ解析を行う。

2. 第 2 研究では、全新規血友病患者の包括的な情報を前方視的に把握し、解析するための全国登録システムを構築し、調査研究を継続する (J-HIS2)。本システムを確立し、適正に運用することによって、わが国の全血友病の実態が判明し、インヒビター発生に関する前方視的観察と発生要因の解析が可能となる臨床研究基盤が整備される。

3. 第 3 研究では、インヒビターの検出・診断の共通化・標準化に関する研究を行う。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前法である 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。

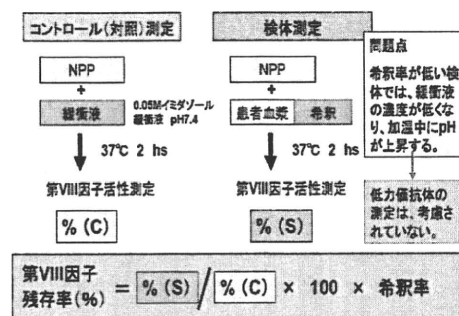


図 1 ベセスダ法の問題点

これらを受けて、インヒビター標準血漿の作成手順を確立し、施設間差の検証と実際の施設間差を縮小する手段



を検討することを今後の目的とした。

4. 第4研究は、第2研究における血友病データベースにおいて遺伝子異常に関する情報を提供するもので、インヒビター発生要因の評価に必須である。21年度の実績を踏まえ、平成22年度から名古屋大学を解析施設として加え、3施設において全国レベルの遺伝子解析を行うための体制を構築する。

本年度は、J-HIS登録症例を対象とした「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」の計画・実施体制の確立を行った。

本研究により、遺伝子解析結果と治療側要因（製剤の種類や投与法の比較検討）を合わせて解析することで、インヒビター発生のリスクファクターの解明の基盤構築が可能となる。

## B. 研究方法

1. インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究（第1研究）

本年度は、平成19年度に作成した実施計画書に従い、平成19年・21年に20歳未満血友病患者のインヒビター発生に関する後方視的調査研究（J-HIS1/U20）を実施し、インヒビター発生に関する補充療法関連の要因、特に、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤でのインヒビター発生の影響について、解析を行った。解析可能であった血友病A 153例中のインヒビター発生例は41例（26.8%）であったが、血漿由来製剤と遺伝子組換え製剤の間で、インヒビター発生率に差はなかったとの論文を日本血栓止血学会並びにHemophiliaへ投稿した。

2. 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（第2研究）

血友病研究の全ての基礎データとなる前方視的な新規患者の全国登録を行う。平成21年度に構築した前方視的登録システムを用いて調査研究を継続実施する。

また症例登録、研究参加施設を増やす為、研究協力者の賛同を得た後、研究計画書の改定を行う。

3. インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究（第3研究）

(1) Tokyo変法の血漿pHへの影響

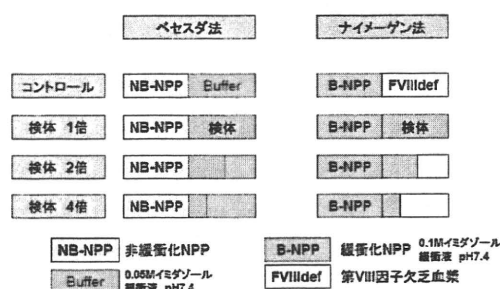


図2 ベセスダ法とナイメーゲン変法

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変した、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)。

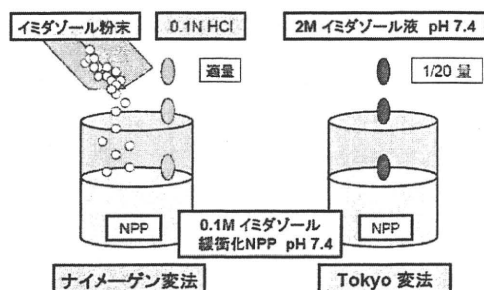


図3 原法とTokyo変法との違い

Bethesda 原法と Tokyo 変法で作成した正常プール血漿を用いて、37°C 2 時間の加温による pH の変化を検討した。

(2)Tokyo 変法の第 VIII 因子活性への影響  
同様の方法により用意した血漿について第 VIII 因子活性の変化を求めた。

(3) Tokyo 変法を用いた 再現性の検討  
標準インヒビター血漿は、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。

#### 4. 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 (第 4 研究)

本年度は、「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」の実施計画書を作成し、多施設共同での遺伝子検査研究体制の構築を行った。

(別紙① 実施計画書を参照)

#### 【倫理面への配慮】

第 1~4 研究のうち、

第 1 研究：インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究

- 1) インヒビター発生患者の実態調査 (J-JIS1)
- 2) 20 歳未満血友病患者のインヒビター

#### 発生に関する後方視的調査研究 (J-HIS1/U20)

第 2 研究：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

ヘルシンキ宣言、疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年 11 月 1 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、奈良県立医科大学附属病院臨床研究審査委員会 (IRB) の審査承認を得る (平成 20 年 4 月 22 日に承認済)。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。

第 3 研究：インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究については、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が必要としない。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。

第 4 研究：「第 VIII 因子、第 IX 因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」では、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に従って実施する。

そのため、同指針に従い、奈良県立医科大学附属病院 医の倫理審査委員会 (IRB) の審査承認を得た (平成 22 年 10 月 13 日に承認済)。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。

#### C. 研究結果

1. インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究 (第 1 研究)

「インヒビター発生患者の実態調査 (J-HIS1)」では、平成 20 年からの 2 年間

にわたる調査の結果、目標症例数 150 例に対して、解析可能症例が 106 例 (70.7%) を登録した。このうち、インヒビター消失例 53 例 (50%) における、各種要因のロジスティック回帰分析を行ったところ、インヒビター発生までの治療方法 (出血時投与か定期補充療法か) とインヒビター最高値が、消失率に強い影響を与えることが判明した。本視点での論文はあまり発表されていないため、次年度には、更なる解析・論文投稿を進める。

また、血液型のインヒビター消失に対する影響値 ( $p=0.0163895^*$ ) が得られたため、本年度は不明症例に対し再度追加調査を行い、母数を増やし再度解析を実施した。次のとおり、関連を示すデータは得られなかった。

群項目(縦) :1-6:血液型-A抗原 (無/有)  
分類項目(横):8-4:現在のインヒビター保有状況

	保有 (%)	消失 (%)	合計 (%)
無	26(43.3)	34(56.7)	60(100.0)
有	27(60.0)	18(40.0)	45(100.0)

合計 53(50.5) 52(49.5) 105(100.0)

・ $\chi^2$ 検定(修正有,  $2 \times 2$ )  $\chi^2=2.22957$

自由度=1 有意確率 $p=0.135392$

Fisherの直接確率計算法による検定

有意確率  $p=0.134969$

群項目(縦) :1-6:血液型-B抗原 (0:無 1:有)  
分類項目(横):8-4:現在のインヒビター保有状況

	保有 (%)	消失 (%)	合計 (%)
無	41(50.6)	40(49.4)	81(100.0)
有	12(50.0)	12(50.0)	24(100.0)

合計 53(50.5) 52(49.5) 105(100.0)

・ $\chi^2$ 検定(修正有,  $2 \times 2$ )  $\chi^2=0.0321458$

自由度=1 有意確率 $p=0.857708$

・Fisherの直接確率計算法による検定

有意確率  $p=1$

「20歳未満血友病患者のインヒビター発生に関する後方視的研究(J-HIS1/U20)」では、遺伝子組換え製剤が発売された1988年以降の治療歴を調査する患者の中で、製剤投与開始後2年間のインヒビター発生状況とインヒビター発生要因、特に、使用凝固因子製剤の種類によるインヒビター発生率の比較検討を行った。解析可能例は、血友病Aが153例で、発生は41例(26.8%)であった。解析の結果、インヒビター発生に及ぼす有意差のある背景因子としては、重症度と家系内のインヒビター保有血友病患者の存在の2つであった。今回の調査の最大の成果は、血漿由来第VIII因子製剤と遺伝子組換え第VIII因子製剤の両者でインヒビター発生率に差異を認めなかった。

本結果は、23年度日本血栓止血学会学会誌並びに Hemophilia へ投稿を行った。

(別紙② 論文参照)

## 2. 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 (第2研究)

平成20年度に策定した、実施計画書、保護者への説明書および同意書及び調査票(症例報告書)を用いて株式会社名古屋臨床薬理研究所(伊藤順治代表、後藤倫代氏)に委託し、調査を継続実施してきた結果、計47例(血友病Aが43例、血友病Bが4例)の登録とデータ収集が完了したが、予定症例数が進まない状況があり、本年度は実施計画書の一部改定並びに患者登録シート(様式7)(別紙③参照)の変更を行った。

### 【変更点】

#### ●対象患者

(修正前) 2007年以降出生患者

(修正後) 2007年以降診断患者

●症例報告書の提出

(修正前) 25・50・75ED 又は 1 年に 1 回  
1 年に 1 回・

(修正後) 7 月末までのデータを毎年 8 月末  
に提出

●頭蓋内出血

(修正前) 出生 1 週間以内の記録

(修正後) 過去すべての頭蓋内出血の記録

●家族歴

(修正前) 記入箇所無し

(修正後) 母親の保因状況の有無

症例数が少ないことから、本年度のデータ  
解析では有意な要因分析は不可能であるが、  
改定等に伴う症例数の確保により、解析が  
可能となり今後の血友病治療における臨床  
研究の基盤構築が可能となる。

なお、平成 23 年 2 月末時点での登録症例の  
結果を以下に示す。

【1.患者背景】

病型

	件数	(%)
血友病A	43	( 91.489%)
血友病B	4	( 8.510%)
合計	47	

性別

	件数	(%)
男	47	( 100.0%)
合計	47	

人種

件数 (%)

日本人 47 ( 100.0%)

合計 47

患者生年月

データ 血友病A 血友病B 全体

2005.出生 1 0 1  
( 2.1%)

2007.出生 22 0 1  
23 ( 48.9%)

2008.出生 19 0 1  
20 ( 42.6%)

2009.出生 1 0 0  
( 2.1%)

2010.出生 0 2 2  
( 4.3%)

合計 43 4 47

血友病診断時の出生年月

	件数	(%)
0歳	8	( 17.0%)
1ヵ月～6ヶ月	16	( 34.0%)
7ヶ月～1歳	18	( 38.3%)
1歳～1歳6ヶ月	2	( 4.3%)
1歳7ヶ月～2歳	1	( 2.1%)
2歳～	2	( 4.3%)

合計 47

診断の契機

件数 (%)

家族歴	15 (31.9%)
出血時	30 (63.8%)
その他	1 (2.1%)
	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 (2.1%)
-----	
合計	47

合計	47
遺伝子変異検査の実施	
	件数 (%)
-----	
未検査	46 (97.8%)
検査済み	1 (2.2%)
-----	
合計	47

凝固因子活性	件数 (%)
-----	
重症 (<1%)	30 (63.8%)
中等症 (1-5%)	14 (29.8%)
軽症 (>5%)	3 (6.4%)
-----	
合計	47

【2.合併症】	
血友病以外の出血性疾患の合併	件数 (%)
-----	
無	46 (97.8%)
有	1 (2.2%)
-----	
合計	47

血液型	件数 (%)
-----	
A	14 (29.8%)
B	9 (19.1%)
O	7 (14.8%)
不明	17 (36.1%)
-----	
合計	47

他の重篤な疾患合併	件数 (%)
-----	
無	45 (95.7%)
有	1 (2.1%)
	生後4ヶ月 脊髄硬膜外血腫 生後1週間 頭蓋内出血
不明	1 (2.1%)
-----	
合計	47

測定ラボ	件数 (%)
-----	
自施設	23 (48.9%)
外注	18 (38.3%)
その他及び不明	6 (12.8%)
-----	

アレルギー疾患の合併	件数 (%)
-----	
なし	35 (74.5%)
あり	9 (19.1%)
不明	3 (6.4%)

-----  
 合計 47

【3.分娩について】

分娩様式  
                   件数    (%)

-----  
 経膣          32  (68.1%)  
 帝王切開     14  (29.8%)  
 不明          1   ( 2.1%)  
 -----

合計          47

経膣分娩の種類

                  件数    (%)

-----  
 自然分娩     26  (83.9%)  
 鉗子分娩      1  ( 3.2%)  
 吸引分娩      3  ( 9.7%)  
 未記入        1  ( 3.2%)  
 -----

合計          31

帝王切開の理由

                  件数    (%)

-----  
 血友病の可能性  3  (23.1%)  
 未記入          2  (15.4%)  
 それ以外        7  (53.8%)  
 不明            1  ( 7.7%)  
 -----

合計          13

在胎週数

                  件数    (%)

-----  
 35週          2  ( 4.4%)  
 37            10 (22.2%)  
 38            10 (22.2%)  
 39            11 (24.4%)  
 40            9  (20.0%)  
 41            3  ( 6.7%)  
 -----

合計          45

生後1週間以内の頭蓋内出血

                  件数    (%)

-----  
 無            46  (97.9%)  
 有            1   ( 2.1%) →脳実質  
 -----

合計          47

頭蓋内出血と分娩様式

データ          あり    なし    合計

-----  
 自然分娩      0      26      26  
 鉗子分娩      0      1      1  
 吸引分娩      1      2      3  
 未記入        0      1      1  
 -----

合計          1(3.2%)  30(96.7%)  31

栄養法

                  件数    (%)

-----  
 母乳          26  (55.3%)  
 人工乳        1   ( 2.1%)  
 混合乳        18  (38.3%)  
 不明          2   ( 4.3%)  
 -----

合計          47

生後1週間以内の頭蓋内出血以外の異常出血  
件数 (%)

無 41 (87.2%)  
有 6 (12.8%)

合計 47

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 23 (48.9%)  
有 24 (51.1%)

合計 47

兄弟(男性)の人数

件数 (%)

0人 33 (70.2%)  
1 11 (23.4%)  
2 3 (6.4%)

合計 47

兄弟(男性)の内血友病患者  
件数 (%)

0人 37 (78.7%)  
1 9 (19.1%)  
2 1 (2.1%)

合計 47

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 22 (88.0%)  
有 2 (8.0%) 兄 Low  
従兄弟 Low  
未記入 1 (4.0%)

合計 20

家族のアレルギー疾患の有無  
件数 (%)

0:無 23 (48.9%)  
1:有 15 (31.9%)  
99:不明 9 (19.1%)

合計 47

【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	( 2.1%)
出血時	35	( 74.5%)
定期補充療法	8	( 17.0%)
まだ決定していない	3	( 6.4%)

-----

合計	47
----	----

登録時の治療薬

件数 (%)

アドベイト	31	( 66.0%)
コージネイト	8	( 17.0%)
ノバクトM	1	( 2.1%)
未定	6	( 12.7%)

-----

合計	47
----	----



	インヒビター発生 (n=11)	非発生患者 (n=36)
病型	血友病A 11/11 (100%) 血友病B 0/11 (0%)	血友病A 32/36 (89%) 血友病B 4/36 (11%)
重症度	重症 10/11 (91%) 中等症 1/11 (9%) 軽症 0/11	重症 20/36 (56%) 中等症 13/36 (36%) 軽症 3/36 (8%)
診断年齢	4ヶ月 [0ヶ月・9ヶ月]	7ヶ月 [0ヶ月・2歳2ヶ月]
診断の契機	家族歴 3/11 (27%) 出血時 6/11 (55%) その他・不明 2/11 (18%)	家族歴 12/36 (33%) 出血時 24/36 (66%) その他・不明 0/36
初回投与年齢	8ヶ月 [4ヶ月・11ヶ月]	9ヶ月 [0ヶ月・26ヶ月]
使用製剤	アドベイト 7/11 (64%) コージネイト FS 4/11 (36%)	コンファクト F 1/21 (5%) アドベイト 16/21 (76%) コージネイト FS 3/21 (14%) ノバクト M+クリスマシン M 1/21 (5%)
インヒビター 診断時年齢	1歳 [5ヶ月・1歳6ヶ月]	
インヒビター 診断値	2.46 BU/ml [0.38 - 8]	
インヒビター発生ま での総投与量	4250 [1000-24500]	
インヒビター発生ま での ED	14 ED [4-37]	

3. インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究 (第3研究)

(1) Tokyo 変法の血漿 pH への影響

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、混合後、37°C 2 時間後の両者の pH は、精製水では pH8.0 以上を示したが、緩衝液では pH の維持が可能であった。(図4)

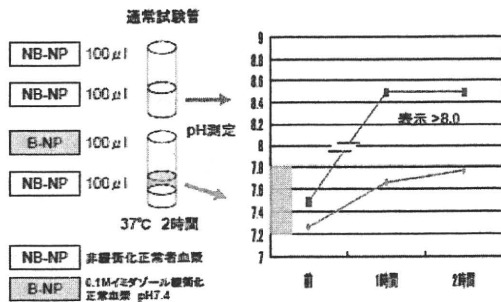


図4 37°C 2時間加温後の pH の変化

(2) Tokyo 変法の第 VIII 因子活性への影響

同様の方法により、第 VIII 因子活性の保存状態を検討したところ、精製水では 37°C 2 時間の加温により、残存活性が約 80% となり、ベセスダ単位にして約 0.31BU 相当の偽陽性反応を示した。一方、1/20 量の pH7.4 の 2N イミダゾール緩衝液添加では、残存活性がおおむね 100% 保たれていた。

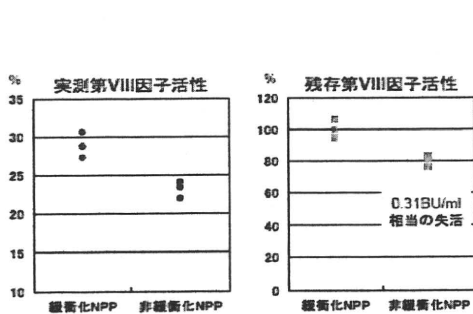


図6 37°C 2時間加温後の第 VIII 因子活性の変化

(3) Tokyo 変法を用いた再現性の検討

第 VIII 因子欠乏血漿で希釈した 4 濃度の標準血漿を用いて、インヒビター力価 (BU) としての同時再現性を検討した。各濃度の同時再現性は CV% として 6.5~24.9% を示し、1.5BU 付近の再現性が最も良い結果を示した。

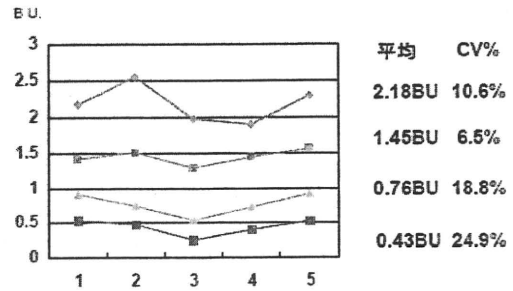


図7 同時再現性

同時再現性と同様に第 VIII 因子欠乏血漿で希釈した 4 濃度の標準血漿を用いて、インヒビター力価 (BU) としての日差再現性を検討した。各濃度の再現性は、CV% として 7.0%~48.7% を示し、1.5BU 付近では 7.0% を得たが、0.5BU 付近の低値域では 48.7% を示しており、良好な信頼性を保つことが難しいことが確認できた。日差再現性においても 1.5BU 付近の再現性が最も良い結果を示した。

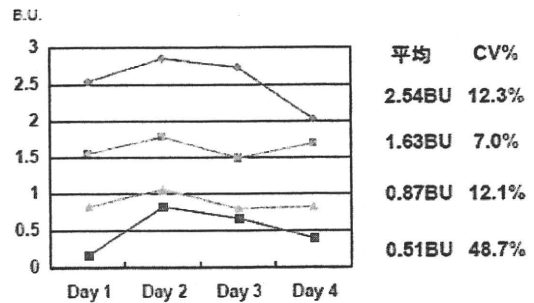


図8 日差再現性

4. 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 (第4研究)

「第 VIII 因子、第 IX 因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」実施のため、本年度は以下活動を行った。

●平成 22 年 4 月 遺伝子検査準備検討会を発足させ、遺伝子検査項目・検査担当・個人情報保護等について検討し、実施計画書の素案を作成した。

●平成 22 年 11 月 第 2 回会議を開催 研究協力者に研究告知を行い、倫理委員会への申請を依頼した。

●平成 23 年 2 月 実務担当者会議を開催 事務的事項を含め、検体送付時の手順書作成、遺伝子データの標記統一化、保管の統一を図った。

#### D. 考察

J-HIS1/U20 研究ではわが国で初めてインヒビター発生例の疫学的背景を明らかにすることができた。特に、遺伝子組み換え型製剤の発売後の調査研究であり、インヒビター発生において血漿由来製剤と遺伝子組み換え型製剤との比較検討が可能であった。インヒビターの発生率と製剤との関連性は現在の血友病診療において国際的な課題であり、未だに結論は出ていない。今回の調査研究では、両製剤に明らかな有意差が見られなかった。さらに、家族歴におけるインヒビターの有無もインヒビターの発生率に関連があることも示されたが、インヒビターの発生要因に遺伝学的素因が関連していることを強く示唆するものである。JHIS-1/U20 の調査では患者の遺伝子的背景が明らかでなく、今後さらにわが国のインヒビター発生要因について明らかにしていくためには、第 VIII 因子あるいは第 IX 因子の遺伝子異常を明らかにすることが必須と考えられた。また、新規血友病の前向

き調査およびそのデータベース化が必要である。

今回、インヒビターの定量的測定法である 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。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のが現状であると考えられる。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。本法によっても pH を概ね予定した範囲に保つことができたことにより、Nijmegen 変法と同等の第 VIII 因子活性維持効果が得られることを確認できた。

#### E. 結論

わが国のインヒビター発生において製剤間の差はみられなかった。血友病患者の遺伝子異常に関する調査や新規血友病患者の前向き調査の継続が必須である。

インヒビター測定に関するサーベイランス作業を行い、施設間差の検証と実際の施設間差を縮小する手段を検討する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

【論文】

1. 柴田優：【遺伝子検査の最近の展開 ヒトゲノム多様性と医療応用】出血凝固系疾患の遺伝子検査、臨床検査 54(13)：1661-1667, 2010

##### 2. 学会発表

篠澤圭子、福武勝幸. 血液凝固インヒビ

ター測定法の標準化に向けた改良. 第 57  
回日本臨床検査医学会総会 2010.08.

**G. 知的財産権の出願・登録情報**

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし