

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

AAV ベクターの局所投与における選択性・安全性の評価：
カニクイザル肝臓に対する経門脈的投与法の確立

分担研究者 高橋 将文 自治医科大学 教授
研究協力者 菱川 修司 自治医科大学 講師
池本 智一 自治医科大学 助教

研究要旨：本研究計画の前臨床モデルの確立のため、カニクイザル肝臓に対する AAV ベクターの選択的投与の可能性について検討を行った。生体カニクイザルを麻酔下で開腹し、腸間膜静脈の分枝より血管留置針を挿入し、ガイドワイヤーを血管内へと挿入、透視下で確認しながら目的とする門脈左枝へと誘導した。さらに、バルーン付きマイクロカテーテルを用いて門脈左枝への AAV ベクター投与に成功した。本方法は、これまで検討してきた門脈左枝への直接穿刺法に比較してより安全で効果の高い、選択的な AAV ベクター投与法となることが期待される。

A. 研究目的

血友病の治療として、欠損因子を遺伝子治療によって補う試みがなされている。我々もこれまで、ウイルスベクターによる方法や非ウイルス法を用いて、マウスやラットといった小動物で遺伝子導入実験を行い、その発現と導入効率を確認してきた。しかし、実際の臨床においては、アデノ随伴ウイルス (AAV) の既感染に基づく AAV ベクターに対する中和抗体の存在により、この抗体のある患者では投与した AAV ベクターの効果が減弱してしまう可能性が考えられる。このことから、この中和抗体の影響を回避することを目的として、カテーテルを用いた肝臓への選択的な AAV ベクター投与法の開発を試みている。特に、本研究では、すでに前臨床試験として非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いて検討が進められている

ことやカニクイザルにも種々の血清型 AAV 中和抗体が検出されるなどヒトと類似していることから、カニクイザルにおける腸間膜静脈からの門脈左枝への選択的アプローチによる AAV ベクター投与について検討した。

B. 研究方法

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター（茨城県つくば市）において、カニクイザルを使用し、全身麻酔をかけて本実験を行った。使用した血管留置針やガイドワイヤー、マイクロカテーテル等については研究結果に記載した。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、研究施設における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物愛護の精神で実施する。また、遺伝子組み換え実験に関しても、

研究施設における遺伝子組み換え実験安全委員会の指針に従い、承認されたプロトコールで実施する。

C. 研究結果

カニクイザルに全身麻酔をかけ、傍正中で皮膚を切開して小腸を一部体外へとし、末梢で穿刺可能な腸間膜静脈分枝から血管留置針（サーフロー24G、Terumo, Japan）を用いて穿刺した。血液の逆流および生理食塩水のフラッシュによりサーフロー外筒が血管内へ挿入されていることを確認した上で、サーフロー外筒からガイドワイヤー（Runthrough 0.014 [0.36mm]、Terumo, Japan）を挿入した。X線透視下で確認しながら、ガイドワイヤーを門脈本幹から門脈左枝へと誘導し、マイクロカテーテル（イーグマン：3.3F、バルーン径 10 x 6mm）をガイドワイヤーに沿って挿入した。バルーンが門脈左枝の位置にあることを確認した上で、造影剤を用いてインフレーションすることにより血流を一時的に遮断した。カテーテルから生理食塩水 40mL（60 秒）、AAV ベクター10mL（15 秒）、生理食塩水 20mL（30 秒）を順に注入することで、ベクターと血液の接触をできるだけ回避した。カテーテル抜去後、閉腹して手技を終了した。

D. 考察

本研究では、血友病の遺伝子治療の前臨床試験における、より選択的で安全な遺伝子投与手技の確立を目的に検討を行った。特に、本方法は AAV の既感染に基づく AAV ベクターに対する中和抗体の影響を回避するための重要な手法となりえ

ると考えられる。今回の検討により、腸間膜静脈分枝から穿刺してガイドワイヤーを門脈左枝へと選択的に誘導して、実際に径 3.3F（約 1.1 mm）のマイクロカテーテル（Temporary occlusion catheter）が挿入可能であることが示され、さらには、生理食塩水による血液フラッシュ後のベクター注入も特に問題なく行うことができたことから、本手法が AAV ベクターに対する中和抗体を有する患者に対する投与方法として非常に高い実現性を有していることが明らかとなった。今後、実際の第 VIII/XV 因子の測定等により、その発現効率や持続性を検討していく予定である。本研究では、非ヒト霊長類としてカニクイザル（5–6kg 程度）を用いたが、臨床では約 10 倍（成人の場合）の体サイズがあることから、より容易に穿刺からカテーテルの挿入、門脈左枝への誘導が可能であることが予想される。一方、本研究班グループでは、血友病 A のモデルブタを開発中であり、今後は大動物での遺伝子導入効率や治療効果を確認する前臨床試験として、これらモデルブタでの評価も予定している。

E. 結論

非ヒト霊長類において、カテーテルを用いて経門脈的に肝臓左葉に AAV ベクターを投与することに成功した。これは、AAV ベクターに対する中和抗体の影響を回避するためのカテーテルを用いた肝臓への選択的な AAV ベクター投与法の開発という当初の目的を考えるとある程度の達成がなされたと考えられる。本方法は、これまで検討してきた門脈左枝への直接

穿刺法に比較してより安全で効果の高い、
選択的な AAV ベクター投与法となること
が期待される。

F. 研究発表

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）
分担研究報告書

血友病遺伝子治療用ベクター製造技術の開発

分担研究者 長谷川 護 ディナベック株式会社代表取締役社長

研究要旨

血友病遺伝子治療の臨床研究実施に重要な、アデノ随伴ウイルス（AAV: adeno-associated virus）ベクターの Good Manufacturing Practice（GMP）グレードのベクターを製造することを目的とし、医薬品製造支援会社（CMO: Contract Manufacturing Organization）におけるベクター製造の技術的サポートを実施した。また、血友病遺伝子治療の次世代ベクターとしての位置づけであるサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターについて、臨床応用を可能にするための、ベクター製造技術及び品質規格方法の改良を実施した。

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究を実施するにあたっては、厳格な品質基準を満たした大量のベクターが必要であり、そのための大量製造技術の確立が必須である。ヒトに投与可能な臨床研究用ベクターは、Good Manufacturing Practice（GMP）基準に準拠したグレードで製造することが必要であり、本血友病遺伝子治療に使用するアデノ随伴ウイルス（AAV: adeno-associated virus）ベクターにおいても、当該基準を満たした製造法で生産しなくてはならない。われわれは、血友病 B 遺伝子治療臨床研究の実施へ向けて、実際の GMP 製造における技術的サポートを実施した。

一方、本血友病遺伝子治療の次世代ベクターと期待しているサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターについても、細胞治療・細胞シートの利用などによる臨床応用の可能性を検討している。この臨床研究の実現には、有効性の検討とともに臨床適用を可能とするベクター製造法・品質検査法の確立が必要であり、その改良に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) hFIX 搭載 AAV8 ベクターの製造サポート

(i) AAV ベクタープラスミドの構築、(ii) パッケージング用プラスミドの構築、(iii) ヘルパープラスミドの構築、(iv) (i),(ii),(iii) の 3 種のプラスミドを 293T 細胞（ベクター製造用細胞）へトランスフェクションすることによる AAV ベクターの製造、(v) フィルターろ過、PEG 沈殿、Benzonase 処理、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過による AAV ベクターの精製、の手順での GMP 製

造の実施をサポートした。

(2) SIV ベクターの製造プロトコールの最適化

SIV ベクターは、リン酸カルシウム法による一過的発現で作製した。細胞は 293T/17 細胞を使用し、4 種類のプラスミド（① pGTV/CMV-GFP: CMV プロモーター/GFP 搭載ジーントランスファーベクター、② PV 3rd: 第 3 世代パッケージングベクター、③ pVSVG: VSVG エンベロープ蛋白質発現プラスミド、④ pCI-rev: Rev 発現プラスミド）をトランスフェクションした。1 日後に培地交換、2 日後に培養上清を回収、0.45 μm のフィルターでろ過した。particle titer (viral genomes: vg/ml) を測定し、生産性の比較検討を行った。particle titer の測定は、回収した SIV ベクターから RNA ゲノムの抽出を行い、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法を用い分析した。検討項目として、細胞播種密度、トランスフェクション時の DNA 濃度、温度、時間、その他条件、培地種類他について精査した。また、製造物の品質検査（QC: Quality Control）項目を検証して標準作業手順書（SOP: Standard Operating Procedure）を整備した。

（倫理面への配慮）

現在、分担研究者が用いている実験材料について倫理的な問題は付随しない。

C. 研究結果

(1) hFIX 搭載 AAV8 ベクターの製造

中国の CMO（本元正陽基因技術有限公司）

Vector Gene Technology 社)において、hFIX 搭載 AAV8 ベクターの GMP レベルでの製造が実行された。当社はサポートとして、各プラスミドの構築と製造法の検証を行った。

(2) SIV ベクターの製造プロトコルの最適化

SIV ベクターの製造条件、特にトランスフェクションの条件を各ステップで再検証し、これらの組み合わせの相加的効果により、約3-5倍の生産性の向上が確認された。この最適化により、安定的に高力価の製造が可能になった。QC 項目についても、方法の再検証とともに必要な場合は方法の確立を実施し、順次 SOP としての整備を行った。

D. 考察

hFIX 搭載 AAV8 ベクターの GMP レベル製造の実施にあたり、サポートを実行した。これにより中国 CMO での GMP レベル製造が確保できたことは、今後の臨床研究を実現する重要な進捗である。次年度実施予定の臨床研究を速やかかつ円滑に実現するよう、今後もサポートを行っていく。

SIV ベクターについて、生産性の向上とともに、QC 項目の策定と SOP の整備を順次進めてきた。こちらも臨床応用へ向けた準備が整いつつある。

E. 結論

本血友病B遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、hFIX を搭載した AAV8 ベクターの GMP レベル製造を完了し、そのサポートを行った。次年度以降の臨床研究実施の重要な準備が果たせた。

SIV ベクターについても、臨床研究実施へのバックアップ対応が可能な状況を整えている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. Mitomo K, Griesenbach U, Inoue M, Somerton L, Meng C, Akiba E, Tabata T, Ueda Y, Frankel GM, Farley R, Singh C, Chan M, Munkonge F, Brum A, Xenariou S, Escudero-Garcia S, Hasegawa M, Alton EW. Mol Ther. 2010;18(6):1173-82.
- (2) PEDF gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models. Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Murakami Y, Yoshida N, Tabata T, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. Hum Gene Ther. 2010 Dec 22.

2 学会発表

- (1) The chicken hypersensitive site-4 chromatin insulator sequence protects clonal dominance of hematopoietic stem cells transduced with a self-inactivating SIV vector in platelet-derived gene therapy. Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Madoiwa S, Akiba E, Hasegawa M, Mimuro J, Ozawa K and Sakata Y. (2010) JSGT 日本遺伝子治療学会 (Jul 1-Jul 3) 宇都宮, 栃木.
- (2) A SeV-F/HN-pseudotyped SIV vector enabled long lasting expression in the murine lung, repetitive administration, and efficient transduction to human lung slice/airway models. Inoue M, Griesenbach U, Akiba E, Meng C, Brum A, Farley R, Newman N, Alton E, and Hasegawa M. (2010) JSGT 日本遺伝子治療学会 (Jul 1-Jul 3) 宇都宮, 栃木.
- (3) 脂肪組織由来細胞シートによる皮下組織作製 (遺伝子欠損症に対する新規治療法の開発を目指して). 渡辺夏巳、大橋一夫、辰巳公平、鶴頭理恵、柏倉裕志、大森司、坂田洋一、井上誠、長谷川護、岡野光夫. (2011) 第10回日本再生医療学会 (Mar 1-Mar 2)新宿, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

平成 22 年度 分担研究報告書

血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究

研究分担者 稲葉 浩 東京医科大学臨床検査医学講座

研究要旨:

遺伝子治療や細胞治療を含めた今後の血友病医療においては、患者の病態に基づいたオーダーメイド的な対応が必要であり、個々の患者の病態を把握するうえで遺伝子解析は必須である。

これまで我々は日本人血友病 A 患者の第 VIII 因子遺伝子解析を行い、主に病因となる遺伝子変異を同定し、その特徴を明らかとしてきた。しかしながら病因遺伝子変異が極めて多種多様であることから、個人および本邦の血友病 A の特徴を把握するには継続的な遺伝子解析が必要である。

今年度の研究では血友病 A 13 例の解析を施行し、12 例で病因と考えられる遺伝子変異を同定することに成功した。得られたミスセンス変異の 1 例は、第 VIII 因子の活性化第 IX 因子との相互作用を理解するうえで重要であると考えられた。また、非 LTR 型レトロトランスポゾンである Alu エlement がイントロン内に挿入した非常に稀有な症例も確認された。病因遺伝子変異が検出できなかった症例については、新たな血友病 A 発生機序の発見に繋がる可能性もあり、今後の重要な検討課題である。これらの解析結果は遺伝子解析の有用性と必要性を再確認させるものであった。

また今年度は、第 VIII 因子遺伝子の SNP (single nucleotide polymorphism) に基づく 4 個所の非同義変異 (Non-synonymous mutation) についても解析し、これらによって構成される日本人第 VIII 因子ハプロタイプとその頻度が白人のそれと同様であることを確認した。

A. 研究目的

血友病 A は先天性の出血性疾患であり、X 染色体長腕 (Xq28) に位置する血液凝固第 VIII 因子遺伝子 (F8) 内の変異によって引き起こされる。

近年、各種疾患の発生機構や病態が DNA や RNA レベルで解明されてきている。単一遺伝子疾患である血友病 A は、責任遺伝子 F8 に存在する病因変異が発生機構や病態を決定する最も重要な因子であり、病因変異解析は個々の患者の病態把握に必須である。また、血友病 A の病因変異は非常にバリエーションに富んでおり、またその特徴は国や地域で特

有であることも次第に明らかとなってきた。

これまで我々は前述のような見地に基づき、個人および本邦の血友病 A の特徴を把握する目的で F8 の解析を施行してきた。今年度の研究では、これまでの解析の継続により、より一層の充実を目指す。

また近年、塩基の多型性に基づく非同義変異 (Non-synonymous mutation) が、補充療法に伴って発生する第 VIII 因子同種抗体 (インヒビター) の出現頻度に関わっているのではないかと仮説が報告された。そこで、4 個所の SNP (single nucleotide polymorphism) についても併せて解析を行った。

B. 研究方法

1. F8 のゲノム DNA 解析

ゲノム DNA は末梢血白血球から抽出した。F8 の各エクソンとそのイントロンとの境界領域を合計 33 分割して PCR で増幅した。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動後、ゲルから切り出し QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。この精製 PCR 産物をテンプレートとしてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は F8-001 transcript (ENST00000360256) の塩基配列と比較した。

2. 非同義変異の解析

F8 中に存在する 4 つの SNP による非同義変異 (R484H; rs35383156 、 R776G; rs2228152、D1241E; rs1800291、M2238V; rs1800297) は、TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems; Life Technologies) を用いて解析した。

3. 凝固学的解析

第 VIII 因子活性測定は、自動凝固測定装置 ACL9000 (Instrumentation Laboratory) と APTT 試薬 (HemosIL™ APTT-SP; Instrumentation Laboratory) を用いた凝固 1 段法で行った。

4. バイオインフォマティクス解析

検出されたミスセンス変異の特徴を把握するため、検出されたアミノ酸の溶媒へアクセシビリティは Protein Solvent Accessible Surface Area Predictor (ASAP; <http://ccb.imb.uq.edu.au/ASAP/>) で、アミノ酸置換が機能に与える影響 (有害度) は、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) で解析した。また、スプライシングの予測は GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)、Berkeley Drosophila Genome Project

(<http://www.fruitfly.org/index.html>) で行った。

(倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析、およびタンパク質解析については、東京医科大学倫理委員会にて承認された研究計画に基づき、対象者にはインフォームド・コンセントのうえで施行された。特に遺伝子解析結果は重要な個人情報であるため、保護には十分に留意したうえで施行した。

C. 研究結果

1. 遺伝子変異の同定

今年度の研究では、重症 9 例、中等症 1 例、軽症 3 例、計 13 例の血友病 A 症例の F8 を解析した。その結果、重症例の 1 例を除く 12 例で病因と考えられる変異を同定し得た。同定された変異はミスセンス変異 4 例、ナンセンス変異 1 例、逆位 4 例、欠失 2 例、挿入 1 例であった。

2. ミスセンス変異

ミスセンス変異は 4 種類 (Asp1740Asn、Gln2087Gly、Thr2161Ile、Thr2245Ala) 検出された。このうち Thr2161Ile はこれまでに報告のない新しいミスセンス変異であった。今回検出された 4 種類のミスセンス変異は、いずれも種間で非常に良く保持されているアミノ酸で起こっており、またアミノ酸の置換によって第 VIII 因子 (FVIII) の機能が障害されるであろうことが PolyPhen-2 による解析から予測された。

3. 挿入変異

重症例の 1 例から非常に稀な挿入変異を同定した。この挿入は約 330bp の大きさで、エクソン 19 から 19bp 5' 端側のイントロン 18 から検出された。ホモロジー解析から、挿入されている塩基配列は短鎖散在反復配列である Alu エlement であることが確認された。

4. 欠損

重症例の1例ではエクソン1の PCR 増幅が得られなかった。詳細な解析から、エクソン1のすべてを含む 5kb 以上の欠損であることが確認された。

5. 非同義変異 (Non-synonymous mutation) の解析

148例(血友病A 63例、血友病B 44例、健康者 41例)のF8を対象とし、F8中に分布する4種類の非同義変異(484H/R、776G/R、1241D/E、2238M/V)によるハプロタイプの出現頻度を解析した。2種類のハプロタイプH1;RRDM、H2;RREMが検出され、それぞれの出現頻度は0.899、0.101であった。他民族にて報告されている別のハプロタイプは検出されなかった。

D. 考察

1. 遺伝子変異

本研究班の目標である遺伝子治療や細胞治療を効果的、かつ安全に施行するためには、患者の病態に関する情報を収集し、これに基づくオーダーメイド的な対応が必要である。遺伝子情報は各患者の特徴を把握するために有用であり、中でもF8の病因変異の同定は最も重要である。

血友病Aの病因遺伝子変異は多種多様である。それは、重症血友病Aの約4割に認められる逆位が唯一コンスタントに検出される変異である以外は非常にバリエーションに富んでおり、個々の患者にユニークであるといっても過言ではない。実際、今回の解析で検出された変異も、逆位以外は患者ごとに異なり、またHAMSTeRS (The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site) データベースに登録のない、あるいは少数しか登録のない稀有なものであった。このことは、本邦における血友病Aの特徴を明確にするうえでF8の解析を継続的に行うことの必要性を示唆していた。

軽症患者にみられる分子異常症は、FVIIIの分子病理学的検討や、血友病発生機序の解明に有効である。今回の研究においては、軽症血友病A患者から検出されたAsp1740Asnが活性型凝固第IX因子(FIXa)との相互作用を考えるうえで重要な変異であることが示唆された。Asp1740はFVIII分子のA3ドメインに位置し、その大部分が分子の表面に露出しており、他分子とアクセスをとりやすい部位であることがProtein Solvent Accessible Surface Area Predictorによる解析から確認された。また、このアミノ酸残基のAsnへの置換は周囲のアミノ酸配列から、新たなN-結合型糖鎖の結合部位を形成するであろうことが予測された。これらのことからAsp1740Asn変異は、アミノ酸残基の置換、さらには余剰な糖鎖の付加により、この部位周辺の他分子との相互作用を大きく変化させると考えられる。FVIIIのFIXaとの結合にはGlu1811-Lys1818ストランドが重要であるとの報告があり、このストランドは立体構造上Asp1740と近接していた。したがってAsp1740Asn変異体を作製しFIXaとの結合を解析することで、A3ドメイン内のこの領域のFIXa結合における重要性、および患者の血友病A発生機序がFIXa結合障害であることが確認できると考えられる。現在Asp1740Asn変異体の作製を計画中である。

今年度の解析では非常に稀有なAluエレメントの挿入変異が同定された。Aluは約300塩基の長さの非LTR型レトロトランスポゾンであり、ゲノム全体の約10.7%を占める。ヒトゲノム中には1,000,000コピー以上存在し、F8内にも58コピー存在する。重症血友病A症例から検出されたAlu挿入は、ほぼ完全長でイントロン18内に存在していた。このような反復配列の挿入変異が検出されるのは非常に稀でHAMSTeRSにも数例が登録されているのみである。逆位を含めた他の遺伝子変異がこの重症患者から検出されなかったことは、この挿入が病因である可能性を強く示唆しているが、現

時点で確証は得られていない。この挿入が血友病 A を発生する機序としては、挿入の位置から、3' スプライス部位の異常を引き起こし、これによる mRNA の合成障害が想像されたが、予測ソフトを用いての解析ではスプライシングへの影響は予測されなかった。今後、実際の患者の mRNA を解析し検討する予定である。

今回の解析にて変異が検出できなかった 1 症例の血友病 A 発生機序の解明は今後の研究課題である。PCR をベースにした一般的な F8 解析で変異が検出されない症例は、血友病 A 全体の約 2% で認められることが報告されている。また近年、このような症例の一部では、異所性の発現における解析ではあるが、mRNA の発現がみられないとの報告がなされた。このような症例の血友病 A は、これまでに知られていない新たな機序で発生している可能性もあり検討を要する。

2. 非同義変異によるハプロタイプ解析

近年、塩基の多型性に基づく非同義変異が、補充療法に伴って発生するインヒビターの出現頻度に関わっているのではないかの仮説が Viel らによって報告された。彼らは F8 中に分布する 4 種類の非同義変異 (484H/ R、776G/R、1241D/E、2238M/V) によるハプロタイプの解析から仮説を展開している。現在用いられている遺伝子組み換え製剤は白人の F8 塩基配列をもとに生産されている。また血漿由来製剤もその原血漿には白人の血漿が用いられている。白人の F8 では RRDM、RREM の 2 種類のハプロタイプしか検出されない。しかし、インヒビター発生頻度が高い黒人では、RREV、HREM という異なるアミノ酸を配するハプロタイプがその約 2 割から検出される。このことから Viel らは、インヒビターのエピトープ部位で生じる白人-黒人間のアミノ酸のミスマッチがインヒビター発生リスクを高めているのではないかと推論している。この報告から我々は、日本人のハプロタイプ解析の必要性を感じ、施行した。その結果として、日本人のハプ

ロタイプは白人と同様であり、黒人や中国人とは異なることが示唆された。Viel らの仮説の真偽については今後の検討が必要である。しかし今回の我々のハプロタイプ解析結果は、日本人のインヒビター発生頻度が白人のそれとほぼ同等なことを裏付ける根拠となり得るものであった。

E. 結論

F8 を対象とし、1) 血友病 A 病因遺伝子変異解析、2) 非同義変異によるハプロタイプ解析を行った。得られた結果は遺伝子解析の有用性と必要性を再確認させるものであった。血友病医療の発展と充実には継続的な F8 解析が不可欠である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ① 稲葉 浩、篠澤圭子、清田育男、大瀧 学、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸 F13A1 の部分的重複に起因する先天性第 XIII 因子欠損症の解析 2010 年 鹿児島
- ② 篠澤圭子、天野景裕、尾形享一、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 先天性第 V 因子欠乏症の出血症状における血小板第 V 因子と TFPI 2010 年 鹿児島
- ③ 篠澤圭子、天野景裕、大瀧 学、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 遺伝子解析による血友病の保因者診断の検査システムの構築 2010 年 東京
- ④ Suzuki T, Amano K, Otaki M, Tsujikawa A, Inaba H, Fukutake K. Review of 5 cases with acquired von Willebrand syndrome. WFH meeting 2010 Argentina
- ⑤ 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、花房秀次、山崎雅英、表 美香、酒井道生、榎本 誠、

高木義弘、山崎 哲、瀧 正志、矢富 裕、金子 誠、竹谷英之、松本智子、嶋 緑倫、藤井輝久、家子正裕、内藤澄悦、松本剛史、池尻 誠、福武勝幸 血友病診療施設を対象としたサーベイランスによる第 VIII 因子活性測定の実態調査 2010 年 横浜

⑥ 篠澤圭子、安倍正博、前田和寿、天野景裕、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 出血症状を示さない先天性第 V 因子欠乏症のミスセンス変異のホモ接合体症例：FV Phe190Ser 2010 年 横浜

⑦ Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification and characterization of L1-mediated large tandem duplication, spanning exon 4 to 10 of F13A1, in a patient with congenital factor XIII deficiency. ASH meeting 2010 USA

H.知的財産権の出願・登録状況

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

ウイルス感染血友病患者の手術適応に関する研究

研究分担者 竹谷 英之 東京大学医科学研究所 附属病院 関節外科 講師

研究協力者 鯉淵 智彦 東京大学医科学研究所 附属病院 感染免疫内科 助教

研究要旨：血液製剤により C 型肝炎ウイルス（HCV）やヒト免疫不全ウイルス（HIV）に感染した血友病患者は初期感染からの時間経過により、HCV による肝硬変や肝がんの発症といった問題が起こっている。その一方でこのような患者の高齢化は、従来の血友病性関節症に加齢による退行性変性も加わり、より重症の関節症に苦しむ患者をも増加させている。この問題に HIV 感染による免疫不全も加わっているため、整形外科的手術適応基準のみで整形外科治療を行うことは難しく、内科的にも手術適応基準が必要である。本研究では内科的整形外科手術適応基準（案）を作成し、そしてその検討を現在、症例を積み重ねて行っている。

A:研究目的

血友病性関節症に対する手術は血液製剤の進歩により可能になったその一方で、血液製剤による不幸なウイルス感染は 20 年以上経過して、肝硬変や肝がんの原因として、問題となっている。実際に平成 20 年の血液凝固異常症全国調査報告によれば、年間死亡例のうち非 HIV 非感染者の死因の 50%が、HCV 感染が原因と考えられる重篤な肝疾患である。また成人血友病患者の高齢化（加齢）による退行性変性が血友病性関節症に影響し、より重篤な関節機能障害になっていくために、手術適応となる患者が増加している。このような重篤な肝機能障害を持った血友病患者に対して整形外科手術を行う際に、HIV 感染症のことも含め内科的適応を確立することは重要である。さらにさまざまな血友病に関連する観血的治療の適応を今後考慮する際にも、このような基準を確立させておくことは重要である。そこで当院で整形外科的手術治療を受

ける血友病患者の全身状態と術後の経過を基に、血友病患者の観血的治療の適応基準を作成すること、さらに妥当性を確認することが目的である。

B:研究方法

2006 年 4 月から 2007 年 12 月までに当院で行った血友病患者に対する整形外科的手術の結果を基に、内科的手術適応判定基準（案）を作成した。この判定基準（案）を 2008 年以降の手術に適応し、その結果と適応基準外で手術を行った症例の結果を調査し、適応基準（案）の妥当性を検討した。手術の短期的な影響に対して、術前・術後の肝臓機能や免疫機能や術後早期の創部感染症や日和見感染の発生の有無を調査した。また長期的な手術の影響に対して、術後一年の感染症と生命予後について調査した。なお今回行った術前・術後の検査は通常行われるものばかりで、この研究のために特別な検査を行ってはいない。

C:研究結果

2006年から2007年までの手術件数は33件で、2008年から2010年10月までの手術件数は55件であった。全体として58例88手術が行われ、手術時平均年齢は39.03歳（13歳から60歳）であった。このうちHCV感染もHIV感染もなかったのは10手術（11.4%）であった。HCV抗体が陽性であったのは79手術（89.8%）でこのうちHCV-RNAが検出されたのは26手術、検出されなかったのは42手術であった。一方HIV抗体が陽性であったのは32手術（36.4%）で、このうち1手術だけがHCV抗体陰性で、残りの31手術（35.2%）はHCV/HIV重複感染手術症例であった。

2006-2007年までの33手術において術後1年以内で、それぞれ肝不全と敗血症を死因とする2例の死亡例があったため、下記のような内科的手術適応基準（案）を作成した。HIV抗体陽性患者の場合、①CD4陽性Tリンパ球数が200/ μ l以上、もしくは②CD4陽性Tリンパ球数が150/ μ l以上、かつHIV-RNA量が400コピー/ml以下を手術適応とした。一方HCV抗体陽性患者の場合、①血小板（10万以上）、②ヒアルロン酸（100ng/ml未満）、③IV型コラーゲン7S（9ng/ml未満）、④AFPかつPIVKA-II（基準値以内）、⑤ICG（15分値10%未満）そして⑥腹部エコー（LC/HCCの確認）、以上6項目の基準を満たさない場合には腹部造影CTを行いHCCの有無を確認する。HCCが存在したり、疑われた場合にはHCCの精査や治療後まで手術を延期することとした。HCCがない場合でも上部消化管内視鏡検査を追加し、静脈瘤の状態を確認しChild分類で評価した。Child Aは手術可能、Child Bは手術治療の再検討、Child Cは手術回避とした。この基準で死亡した2症例を再評価すると、HIV

の基準は2例とも満たしていたが、肝機能評価でChild Bに1例2手術、Child Cに1例1手術となる。

2008年-2010年10月までの55手術において、手術回避と判断された症例はなかったが、3例6手術で、手術適応の再検討となった。2例4手術はHIV抗体は陰性でChild Bと判断された症例で、1例はHCCに対する術後症例であった。この2例において術後の肝機能や感染そして術後1年の予後に問題はない。また1例は肝機能基準は満たすもののCD4陽性Tリンパ球数が100/ μ l未満の1例2手術で、術後感染もなく、重篤な合併症は現在のところ発生していない。最終手術より1年以上を経過し日和見感染を含め、創部の感染症は発生していない。

また今回の調査中、手術予定を立てた一例が吐血後肝不全を併発して、入院前の手術適応判断のための検査中に近医で死亡した。血友病BでHCV/HIVの重複感染例であった。検査結果はすべてそろっていないが、Child分類はBと推定されていた。上部消化管からの出血が吐血の原因であり、術前の内視鏡検査の重要性を示すものであった。

D:考察

内科的整形外科手術適応基準（案）で、手術適応が検討された38例において、手術の悪影響が見られる事例は一例も発生していない。しかしそれ以前の33手術の中で術後1年以内の死亡例2例があった。いずれも手術が直接影響したとは言えないが、死亡した症例はいずれも肝機能が低下していた症例であり、Child Bと評価された症例について詳細な今後手術適応検討が必要であろう。またHIV抗体陽性患者の術後経過はいまのところ経過

良好であるが、症例を重ねて検討を行う必要がある。

肝機能評価の基準となる一部の検査項目で実施率が低かったことについては、その検査の必要性を再検討し検査項目の見直しが必要であると考えられた。

HIV の判定基準として、CD4 細胞数が 150 個/ml 以上且つ HIV-RNA が 400 コピー/ml 以下にコントロールされていることとあるが、緒家の報告において 150 個/ml を基準にしている報告はない。そして我々の症例で CD4 細胞数が 50-100 個/ml でも HIV-RNA のコントロールが良い症例 1 例 2 順調であることから、基準値の見直しを検討する必要があると考えている。

今回手術を回避・中止と判断される手術対象患者はなかったことや、手術適応の再検討とされた手術が全体の 16% を占めてはいるが 6 手術と少なかったことから、今後症例を重ねることでより適切な内科的整形外科手術適応基準が作成できると考えている。現在年間約 20 件の手術が行われていることから、5 年間で対象手術件数 100 件での、内科的整形外科手術基準の評価を目標に症例を重ねて、手術のリスク管理になるような基準を作成していく予定である。

E:結論

33 例の手術成績を基に作成した内科的整形外科手術適応基準を、38 例に適応し検討した。その結果、手術回避・中止と判定された症例はなく、手術再検討とされた 3 例 6 手術 (16%) で、手術の影響は認められず、適切な手術適応基準であると、現在のところ評価できた。しかし実施率の悪い検査項目もあり、検査項目についての再検討が必要であること

も判明した。今後対象手術件数 100 件での適応基準の検討を目標に研究を継続する予定である。

G:研究発表

1. 論文発表

•Takedani H, Fujii T, Kobayashi Y, Haga N, Tsunami S, Fujii T. Inter-observer reliability of three different radiographic scores for adult haemophilia. *Haemophilia*. 2010 Sep 2.

•Takedani H. Continuous infusion during total joint arthroplasty in Japanese haemophilia A patients: comparison study among two recombinants and one plasma-derived factor VIII. *Haemophilia*. 2010 Sep 1;16(5):740-6.

•Takedani H, Kawahara H, Kajiwara M. Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa. *Haemophilia*. 2010 Mar;16(2):290-5.

•Imai K, Koibuchi T, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Miura T, Gono T, Yazawa K, Iwamoto A, Fujii T. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia exalbida* complicating *Pneumocystis pneumonia* in an HIV-infected patient. *J Infect Chemother*. 2011 Jan 21. [Epub ahead of print].

•Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases co-infected with

HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011 Jan 19. [Epub ahead of print].

・Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multi-drug resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine and boosted-darunavir. *J Infect Chemother.* 17, 105-110 (2010).

・Koga M, Kawana-Tachikawa A, Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol Immunol.* 54, 196-205 (2010).

・鯉渕智彦「現在の抗 HIV 治療ガイドライン」
日本エイズ学会誌. 12: 129-136 (2010).

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

血液凝固異常症の QOL に関する研究

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

血液凝固異常症の QOL の阻害要因は大別すると、1) 病状、2) 治療法、3) 社会生活、偏見・差別、不安、4) 医療体制、5) 医療制度の 5 つに分けられることが平成 18 年の調査で明らかとなった。本研究は、血液凝固異常症の QOL 調査をこの 5 つの要因に基づき包括的に行い、血液凝固異常症患者の治療の向上と QOL の向上に貢献することを目的とするものである。調査方法はアンケート形式で、全国の医療施設の担当医のみならず患者組織を介し患者および保護者に配布し、調査用紙を匿名で事務局に直接返送してもらった。本年度は、今回は平成 18 年度の調査で欠落していた定年後（老後）の調査項目や就職についての項目加え、さらに医療関係者（医師、看護師、理学療法士、臨床心理士など）にもアンケートを行い、現在 QOL 改善のために患者の皆様が何を必要としておられるかにつき最新の情報を集めた。本年度は一次解析の結果を報告するが、次年度はさらに本調査結果を解析し、さらに有用な情報提供、そして血液凝固異常症患者の治療の向上と QOL の向上に貢献するための提言を行いたい。

A. 研究目的

血友病等の血液凝固異常症における QOL（生活の質）は、出血そのもの、出血の結果として生じる筋骨格系障害、頭蓋内出血などの合併症のほか、HIV 感染症、HCV や HBV 感染に基づく肝疾患など多くの要因に影響される。疾患に対する偏見・差別などの社会的問題の関与が 1980 年台前半に惹き起こされた非加熱凝固因子製剤に因る HIV 感染により加味された。このような背景から、患者の視点に立脚した調査となるよう医師のみならず血友病治療に関係する患者を含めたさまざまな職種の研究協力者による包括的な研究を目指した。患者・保護者および血友病治療に携わる医療

関係者に対してアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1) 対象と方法

全国の血液凝固異常症患者を対象とした。調査方法はアンケート形式で、血液凝固異常症全国調査で構築されたネットワークをもとにした全国の医療施設の担当医および協力が得られた全国の患者組織を介し患者および保護者に平成 22 年 4 月上旬に配布した。調査票の回収は平成 22 年 6 月末日を締切とし、無記名で同封した封筒に入れ事務局（聖マリアンナ医大小児科 瀧宛て）に返送して頂いた。また、担当医を含む血友病診療に携わる看護師、臨床心理士・ソー

シヤルワーカー、PT・OTなどに対して患者の QOL を低下させる要因について患者への質問と同一のアンケート調査を行った。

2) 調査項目

患者あるいは保護者に対する調査項目は、全年齢に共通の質問と、22歳以上の対象に限定した質問の2つに分け、全年齢に共通の質問は、調査項目は、疾患、同居家族、アンケートの依頼者、血友病患者会などの患者組織への参加、出血頻度、標的関節、血液製剤の輸注回数、患者自身が重要と考える QOL を低下させる要因、治療状況、在宅自己注射、定期補充療法、製剤の選択者、製剤に関する不安事項、インヒビター、完治を目指した治療法に関する認知度および期待度、歯科受診に関する事、筋骨格系障害と整形外科、リハビリの受診状況、医療施設に関する事、社会生活に関する事、学校生活、差別、周囲への疾病の開示、老後の問題、訪問看護ステーションに関する事、家族の理解、就職、職業、雇用形態、年収などの各項目を調査した。また、前回は行った調査の報告書および行政・医療関係者・患者および家族への提言に対する意見などを評価してもらった。22歳以上の対象に限定した質問は、HIV感染、肝炎に関する事である。さらに対象全例に対して、1) 医療制度・医療体制、2) 社会生活、3) 治療法、4) 病状、5) 患者会、6) 今回の調査内容について意見や希望を述べる自由記載欄を設けた。

医療関係者に対する調査項目は、職種、勤務している医療施設の形態、地域、血友病などの血液凝固異常症の治療に関わる経験年数、携わった患者の年齢および患者数、そして患者の QOL を低下させる要因につ

いて小児と成人に分けて上位5番目までの順位を付けて選択してもらった。

(倫理面への配慮)

研究対象者である血友病等の血液凝固異常症患者および医療関係者に対する人権擁護上の配慮は、匿名で行うことおよび個人が特定できる調査項目を調査項目に含めないなど倫理面への配慮には十分留意した。この調査の実施にあたり、疫学研究に関する倫理指針11「他の機関等の試料の利用」に基づく本調査の運用形態について、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会に審査を申請し、承認された(承認番号第1671号)。

C. 研究結果

QOL調査票は平成22年7月末までに663例が回収された。調査票の依頼は主治医などの医療関係者を介して325人(49.0%)が、血友病友の会などの患者組織を介して316人(47.7%)が、上記の両者が21人(3.2%)、その他4人(0.6%)であった。

研究結果については、「血液凝固異常症のQOLに関する研究 平成22年度調査報告書」に記載した。

D. 考察

本年度は一次解析の結果を報告した。本年度の解析結果ならびに次年度の二次解析結果をもとに血液凝固異常症患者の治療の向上とQOLの向上に貢献するための提言を行う予定である。なお、患者の考えるQOLを低下させる要因と医療関係者の考えるそれとはほとんど一致していて、今後、QOLについての問題点を考えていくうえで共通の認識を持てるものと考えられた。

E. 結論

本年度は一次解析の結果を報告した。詳細は、「血液凝固異常症の QOL に関する研究 平成 22 年度調査報告書」に記載した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 瀧 正志:各種難治性疾患を持つ患児と保護者へのインフォームドコンセント
④血液疾患 血友病、小児医療とインフォームドコンセント、白幡聡、藤野昭宏(編)、医薬ジャーナル社、2010.4、p 188-194
2. 瀧 正志:各種難治性疾患を持つ患児と保護者へのインフォームドコンセント
④血液疾患 慢性特発性血小板減少性紫斑病、小児医療とインフォームドコンセント、白幡聡、藤野昭宏(編)、医薬ジャーナル社、2010.4、p 195-199
3. 瀧 正志:出血・血栓傾向、『小児科臨床ピクシス』症状からみた検査の選び方・進め方、五十嵐隆、石井栄三郎(編)、中山書店、2011.2、p116-118
4. 長江千愛、瀧 正志:出血性疾患、その他の先天性凝固因子欠損症の診断と治療、血栓止血誌、21(3):297-300, 2010.6
5. 瀧 正志:血友病、von Willebrand 病、小児内科増刊号「必携 小児の薬の使い方」42:587-591, 2010
6. 長江千愛、瀧 正志:小児血液疾患最近の知見—血友病、小児科、51(8):1005-1016, 2010.8
7. 立浪忍、三間屋純一、白幡聡、仁科豊、花井十伍、大平勝美、桑原理恵、浅原美恵子、瀧 正志:HIV 感染血液凝固異常症における AIDS 指標疾患の報告数につ

いて:血液凝固異常症全国調査に基づく集計、日本エイズ学会誌、12(1):34-41, 2010.4

8. 武藤真二、長江千愛、庄司朋子、山下敦己、瀧 正志:新生児・小児 DIC に対する遺伝子組換えヒトロネモジュリン製剤の治療、日産婦新生児血会誌、18(1):S71-72, 2010
9. 瀧 正志:序文—インヒビター保有先天性血友病患者の quality of life (QOL)、血栓止血誌、21(5):475-476, 2010.10
10. 山崎 哲、瀧 正志:インヒビター測定の問題点、血栓止血誌、21(5):484-488, 2010.10

学会報告

1. 瀧 正志:インヒビター保有先天性血友病患者の QOL、第 33 回日本血栓止血学会、2010, 4
2. 山崎 哲、鈴木典子、高山成伸、山下敦己、瀧 正志:凝固第 VIII 因子に対するインヒビター測定法の問題点、第 33 回日本血栓止血学会、2010, 4
3. S. Tatsunami, M. Mimaya, A. Shirahata, J. Hanai, Y. Nishina, K. Ohira and M. Taki: Long-term observation of Japanese HIV-infected hemophiliacs: Changes in survival curve and coinfection with HCV, East Asia Hemophilia Forum 2010, 2010,6
4. 鈴木典子、山崎 哲、山崎法子、高山成伸、浅原美恵子、庄司朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、瀧 正志:ELISA 法による第 VIII 因子抗体と Bethesda 法の比較、第 11 回日本検査血液学会、2010 年 7 月

5. M.Taki, S.Tatsunami, A.Shirahata, J.Mimaya, H.Takedani, K.Makino, K.Ohira, K. Kojima I.Wada, K. Yoshikawa: Quality of life in patients with congenital hemophilia and inhibitors in Japan, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
6. M.Taki, H.Hanabusa, K.Fukutake, M. Shima, A.Shirahata and the Advate PASS study group :Clinical experience with ADVATE during the first 50 exposure days: Data from two post-authorization safety surveillance (PASS) programs in Japan, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
7. K.Fukutake, M.Taki, H.Hanabusa, M. Shima, A.Shirahata and the Advate PASS study group : Prophylaxis usage among different age groups with hemophilia in Japan: Results from the ADVATE post-authorization safety surveillance (PASS) studies, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
8. K.Fukutake, H.Hanabusa, M.Taki, M. Shima, A.Shirahata and the Advate PASS study group: Long-term clinical safety of ADVATE [antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method] among Japanese subjects: A two-year update of the post-authorization safety surveillance program, XXIX International Congress of the WFH, 2010,7
9. Tatsunami S., Ueno T., Taki M., and The Research Committee on QOL regarding Coagulation Disorders in Japan: Analysis of free answered descriptions from patients with coagulation disorders in Japan. The 34th Annual Conference of the German Classification Society & German-Japanese Workshop, 2010.7
10. 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、花房秀次、山崎 雅英、表 美香、酒井道生、榎本誠、高木義弘、山崎哲、瀧 正志、矢富裕、金子誠、竹谷英之、松本智子、嶋緑倫、藤井輝久、家子正裕、内藤澄悦、松本剛史、池尻誠、福武勝幸：血友病診療施設を対象としたサーベイランスによる第Ⅷ因子活性測定の実態調査、第72回日本血液学会、2010.9
11. 立浪 忍、三間屋純一、白幡 聡、瀧 正志：本邦の血液凝固異常症における生活習慣病の合併症・既往症の調査結果、第72回日本血液学会、2010.9
12. Tatsunami S, Kuwabara R, Mimaya J, Shirahata A, Taki M: Status of hepatitis C virus infection in long-term survivors among human immunodeficiency virus-infected Japanese patients with coagulation disorders, 22th Annual Conference of the Australasian Society for HIV Medicine, 2010.10
13. 立浪 忍、桑原理恵、浅原美恵子、三間屋 純一、白幡 聡、瀧 正志：HIV 感染血液凝固異常症における糖尿病、高血圧症、高脂血症の合併について、第24回日本エイズ学会、2010.11
14. 足利朋子、長江千愛、山下敦己、武藤真二、瀧 正志：当院における過去5年間の血友病入院症例の動向、第52回日本小児血液学会、2010.12
15. 橘川 薫、竹谷 英之、瀧 正志、日本小児血液学会血友病委員会：乳幼児重症

型血友病に対する定期補充療法研究 -
補充療法開始時における関節症の画像
評価、第 52 回日本小児血液学会、
2010.12

16. 武藤真二、橘川 薫、長江千愛、山下敦
己、庄司朋子、瀧 正志： MRI にて膝
関節のヘモジデリン沈着の消失を認め
た血友病 B 乳児例、第 52 回日本小児血
液学会、2010.12

H. 知的所有権の出願・取得状況

本研究とは関係がない。

厚生労働科学エイズ対策事業

「血友病の治療とその合併症の克服に関する研究（研究代表者：坂田洋一）」分担研究

「血液凝固異常症の QOL に関する研究」

平成 22 年度調査報告書

編著：瀧 正志（研究分担者）、血液凝固異常症 QOL 調査委員