

肥厚やヘモジデリン沈着など血友病性関節症の発症を有意に抑制した。

血友病 B 遺伝子治療：ヒト FIX の Ala262 位アミノ酸はカニクイサルでは Thr である。この部に対しては抗体産生が見られなかったため、ヒト型 Ala に変えて、この部をエピトープにもつモノクロナル抗体で発現改変 FIX を測定出来るようにした。マウスで 1000%以上の FIX レベル発現をえることができる第 IX 因子遺伝子搭載 AAV8 ベクターを、抗 AAV8 中和抗体陰性のサルの末梢静脈から投与したところ 4 頭において治療域 (2-20%) の FIX 発現が得られた。しかし、既感染に基づく AAV8 に対する中和抗体が低力価であっても存在するサルでは、同ベクターを腸間膜静脈枝から投与しても FIX の発現は 0.1% 以下で治療効果に至る発現は得られなかった。AAV8 ベクターによる遺伝子導入を阻害する中和抗体が存在するカニクイサルに於いて、中和抗体による AAV ベクターの遺伝子導入阻害を回避するために、血流遮断後に門脈内への生理食塩水による血液除去とベクター注入を試み、サル 3 頭において 10%前後の FIX 発現がえられた。この手法を、マイクロカテーテルを用いて 3 頭のサルで行い治療域 (2-5%) の FIX 発現が得られたことから、抗 AAV 抗体が存在しても遺伝子治療が可能であると示唆された。また、いずれの実験においても、マウスで高い遺伝子導入効率のある AAV8 ベクターも、カニク

イザルではマウスと比較し 1/10 以下の遺伝子導入効率であり、非ヒト霊長類を用いた前臨床実験が必須であることが示唆された。血友病患者血液中の抗 AAV8 抗体を測定したところ、年齢が上がるに比例し抗 AAV8 抗体陽性率が上昇することが分かった。血友病 B 遺伝子治療臨床研究に向けて作製された納入された GMP グレードヒト FIX 遺伝子搭載 AAV8 ベクター (GMP-AAV8hFIX) の純度および生物学的活性を検討した。GMP-AAV8hFIX の純度は電気泳動解析で極めて高く、電子顕微鏡による解析でも empty vector の混入は低く抑えられていた。生物学的活性は血友病 B マウスを用いた検討では 5×10^{11} /kg で平均 58%の活性発現がえられマウス血漿中の FIX 蛋白濃度と FIX 活性は一致し、GMP グレードベクターの遺伝子導入効率は、これまでマウス・サル前臨床研究で用いてきたベクターと同等であった。

インヒビター対策：血友病 A マウスに対して、経皮経頸静脈的にカテーテル先端を上大静脈に留置し、背部皮下にマイクロポート本体を植え込む方法を導入することにより、安全で再現性のある手術技法を確立し、血友病 A マウスに対して、FVIII 投与量や投与間隔を変えることにより、免疫寛容誘導が成立するマウスが得られ、ヒトでのインヒビターに対する免疫寛容誘導療法のモデルが得られた。FVIII/PAI-1 ダブルノックアウトマウスは、FVIII 単独欠損マウ

スと比較してFVIII抗原の経静脈的反復感作に対する免疫応答が有意に低下しPAI-1因子の欠損が抗原特異的な免疫寛容をもたらすものと考えられ、PAI-1を介する免疫応答を明らかとすることで、インヒビター産生制御の手がかりがえられると思われた。新生仔血友病AマウスへヒトFVIII遺伝子搭載AAVベクターを投与することで抗体の産生を防ぐことができた。FVIIa遺伝子を搭載したAAV8ベクターを血友病Aマウスへ投与することで血友病Aマウスの出血症状を完全に抑制できた。FVIIaを血小板に、あるいは肝臓に発現させる試みもインヒビター対策の一つになると思われる。

D. 考察

AAVベクターを用いて、標的臓器に血友病因子を発現させる技術は、マウスではほぼ確立した。インスレーターをSIVベクターに組み込むことで遺伝子組み込みによる周辺遺伝子への影響を抑えることができることが示唆され、SIVベクターの安全性を高められると考えられた。しかし、ヒト応用には、これらの成果の中型動物での実験と、サルでの長期安全性の検討が必要と考えられる。AAV8に対する抗体陽性のサルで、選択的バルーンカテーテルを用いてサル肝臓にベクターを投与する投与方法は、抗体の存在にもかかわらず良好なFIXの発現が認められた。血友病患者血液の検討からも既感染に基づくAAVに対する中和抗体による遺伝子導入阻

害はヒトにおいても同様な問題であるが、その解決方法がえられた。血友病B遺伝子治療研究に向けて作製したGMPグレードAAV8ベクターは、純度が高く生物学的活性もこれまでのマウス、サルに用いてきたベクターと同等であった。血友病B遺伝子治療はサルをもちいた前臨床実験が行えているが、血友病A遺伝子治療実験はマウスを用いた実験にとどまっている。中型血友病モデル動物が作製でき解決すべき問題点は明らかになっており、血友病A遺伝子治療の前臨床実験を行うために、導入遺伝子由来サル第VIII因子の検出系を確立しつつある。遺伝子細胞治療では、マウスにおいて局所への投与で成果がえられているが、さらに全身的な効果がえられるように検討を進める。

インヒビター対策としてウイルスベクターによる肝臓への遺伝子導入や胸腺を標的とした免疫寛容誘導により一定の成果がえられた。さらにヒト免疫寛容誘導療法のモデルも確立しえたことから、今後の方向性が明らかとなった。また、FVIIaの肝臓あるいは血小板への遺伝子発現はインヒビター治療の方法となりえると考えられる。

E. 結論

遺伝子治療技術は直接ベクターを生体内に投与する方法においても又体外で遺伝子を導入した細胞を移植する方法でも効率の面ではマ

ウスレベルでは確立出来た。しかし、安全性確保のための十分な基礎的実験はなお必要である。サルを用いた前臨床試験は AAV に対して抗体を持つサルにおいても新たに開発したベクター投与方法により治療レベルに達する第 IX 因子発現がえられているが、現時点ではマウスでの成績に匹敵する結果が得られていない。これらの問題点が明らかにされ、技術的にも克服可能となってきた。インヒビターに対する免疫寛容誘導法に関しては新生児では一定の成果が得られたが、成人に対する有効な治療の確立が今後の課題であるが解決の糸口も見えてきた。

F. 研究発表

1. 原著論文

1. Ohmori, T., Yano, Y., Sakata, A., Ikemoto, T., Shimpo, M., Madoiwa, S., Katsuki, T., Mimuro, J., Shimada, K., Kario, K., Sakata, Y.: Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res.* 2011 Nov 23. [Epub ahead of print]
2. Madoiwa, S., Kobayashi, E., Kashiwakura, Y., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia.* 2011 Nov 2. doi: [Epub ahead of print]
3. Kurosaki, H., Hiratsuka, M., Imaoka, N., Iida, Y., Uno, N., Kazuki, Y., Ishihara, C., Yakura, Y., Mimuro, J., Sakata, Y., Takeya, H., Oshimura, M.: Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial

chromosome. *J Hum Genet.* 56(10):727-33. 2011.

4. Watanabe, H., Madoiwa, S., Sekiya, H., Nagahama, Y., Matsuura, S., Kariya, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Hoshino, Y., Hayasaka, S., Sakata, Y.: Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement. *Thromb Res.* 128(6): e137-143. 2011.
5. Mimuro J, Sakata Y.: Gene and cell therapy for hemophilia: recent advances. *Rinsho Ketsueki. Jun;* 52(6):361-7. Review. 2011.
6. Dokai, M., Madoiwa, S., Yasumoto, A., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Sakata, A., Makino, N., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous α 1-antitrypsin in lipopolysaccharide primed hematological cells. *Thromb Res.* 128:283-292. 2011.
7. Madoiwa, S., Tanaka, H., Nagahama, Y., Dokai, M., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 127: 349-355. 2011.

2. 学会発表

1. Yoichi, Sakata., Hoyo, Takahashi., Hajime, Tsuji., Jun, Mimuro., Yutaka, Eguchi., Isao, Kitajima., Tadashi, Matsusita., Tatsuhiko, Kuroda.: Post marketing surveillance of the safety and effectiveness of thrombomodulin alfa in Japanese patients with DIC. *ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting.* 2011. 7/23-28. 京都.

2. Seiji, Madoiwa., Hideyuki, Tanaka., Yutaka, Nagahama., Atsushi, Yasumoto., Asuka, Sakata., Yuji, Kashiwakura., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Yoichi, Sakata.: Leukocyte elastase as an alternative pathway for fibrinolysis. 57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都.
3. Seiji,Madoiwa., Hideyuki,Tanaka., Yutaka,Nagahama., Yuji, Kashiwakura., Asuka,Sakata., Atsushi,Yasumoto., Tsukasa,Ohmori., Jun,Mimuro., Yoichi,Sakata.:Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都.
4. Yuji, Kashiwakura., Tsukasa,Ohmori., Jun,Mimuro., Atsushi,Yasumoto., Akira,Ishiwata., Asuka,Sakata., Seiji,Madoiwa., Makoto,Inoue., Mamoru,Hasegawa., Natsumi,Watanabe.,Kohei,Tatsumi., Kazuo,Ohashi., Teruo,Okano., Yoichi,Sakata.:Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都.
5. Seiji Madoiwa :Alternative pathway for fibrinolysis: Clinical significance and therapeutic opportunities,leukocyte elastase. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.57th Annual SSC Meeting.2011.7/23-28.京都.

G. 知的財産権の出願・登録状況

「血友病Aモデルブタの作出」

出願番号：特願 2010-102569 出願済み。

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

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、准教授 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。サルにおけるベクターの至適用量についても一定の結論を得た。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は認められなかったものの、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治療域に至る発現が認められるようになった。更には、臨床研究に向けて必要となる臨床グレードのベクターを委託調製し、その性質を解析した。

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、ベクターの調製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法、ベクターに対する免疫応答の検出などの基盤技術開発を図る。また、第IX因子などの遺伝子を用い、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い、治療法の有効性と安全性につき検討する。

B. 研究方法

・AAV ベクターに関する基礎研究：導入遺伝子の発現に大きな影響を与える免疫反応に関して、様々なアッセイ系を確立するとともに動物個体レベルでの解析を行った。特にベクターキャプシドに対する中和抗体は低力価であっても大きな影響を与える事が示唆されており、検出感度の向上を目指して改良を行った。また、本法を用いてサルのコロニーにおける各種血清型に対する中和抗体陽性率を測定した。

・遺伝子導入動物実験：様々な構築の AAV ベクターをカニクイザル肝臓を標的として投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、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、中和抗体陽性例に対する投与方法として開発してきた、ベクター溶液の前後に生理食塩水を注入する方法に

関しては、門脈内への投与に伴う侵襲を減らす目的でカテーテルを用いる方法を検討した。

・臨床研究に向けての取組み：臨床グレードの AAV ベクターを準備するため DNAVEC 社と関係の深い VGTC（北京市）にベクター製造を委託した。また、国内外の様々な施設とベクターの検定法などに関して標準化を行った。

（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。医薬基盤研究所・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、医薬基盤研究所「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。

C. 研究結果

・AAV ベクターに関する基礎研究：各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を目指した改良を行った。具体的には、好適な細胞を選択し、シュクロースを培養液中に加えることで AAV 感染効率が飛躍的に上昇する事を見出したため、関連条件を最適化することで、使用

するベクター量を1/100程度に減らすことができ、結果として中和抗体検出感度を高めることに繋がった。また、サルのコロニーでは、190頭を対象として中和抗体陽性率を検討したところ、2、8、9型のいずれにおいても7割前後が陽性であり、3種類の全てに対して陽性の個体が過半数であった。

・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、結果を解析した。その結果、治療域に達する第IX因子濃度を得るために必要なベクター投与量を概ね推定することができた。また、中和抗体陽性の個体に対する投与方法の開発では、ベクター溶液の注入前後に生理食塩水を大量に注入する方法に改良を加え、腸間膜静脈からカテーテルを挿入し、バルーンで門脈血流を遮断することで、中和抗体陽性の3個体全てにおいて治療域に達する導入遺伝子の発現を得ることができた。

・臨床研究に向けての取組み：VGTC（北京市）におけるベクター委託製造では必要に応じて技術的な助言を行い、結果として高純度のベクターを充分量準備することができた。また、ベクターの検定法に関して多くの方法を確立し、それぞれの特性を把握することができた。その結果、関連技術の信頼性を高めることにつながった。

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型などの有用性が高いものと期待されているが、これまでの検討の結果、たとえ低力価であっても中和抗体が存在する場合には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必要な検査であると思われる。実際にサルのコロニーにおいて陽性率の検討を行ったところ、非常に高いことが判明し、スクリーニングの有用性を再認識するに至った。なお、ヒトにおける8型などの陽性率に関してはこれまでに2つの報告があり、2割程度とされている。我々の方法は更に検出感度が高いため、より高い陽性率が得られる可能性がある。

カニクイザルに対する第IX因子遺伝子を搭載したベクターの投与では、8型のベクターを静脈内投与する実験の中で、より低い投与量でも効果が見られるかどうかに関心を以て

検討を行った。その結果、治療域に達する第IX因子濃度を得るために必要なベクター投与量は 2×10^{12} vg/kg程度と考えられた。これは最近報告された血友病Bの臨床研究において顕著な効果が見られた高用量群と同じ投与量であり、ヒト及びサルにおいてほぼ同じ効果が得られることを意味している。しかしながらマウスにおける経験と比較した場合、体重あたりで10倍以上の投与量が必要であり、8型の効果にはかなりの種差があることを示している。

中和抗体を克服するための注入法はベクターの注入前後に生理食塩水を注入することで組織に到達したベクターが不活化されるのを遅延させることを目指している。カテーテルを使用することで低侵襲下に実施可能であり、そのままヒトにも応用可能な技術として期待される。今後は更に高い力価の中和抗体を有する個体において有効であるかどうかを検討していきたい。

臨床研究に向けた取組みでは国内におけるGMP製造施設の不十分さから国外における委託製造が現実的であり、VGTCにおいて実施することとなった。技術的な助言は適宜必要であったものの、当初目標としていたベクターを準備することができた。純度に関しては非常に高いことが判明している。効果や安全性に関しては現在検討中である。このような製造及び解析の機会は今までにないものであり、我々の基盤技術の進化につながった。

血友病Bに対する遺伝子治療はこれまで様々な方法で行われたもののいずれも不成功であった。2011年12月に英国のグループから8型のベクターを用いた方法の成功が報告された。この方法では2本鎖のAAVベクターを用いており、8型を用いることの効果と2本鎖ベクターの有用性から当初は投与量が少なく済むものと期待されていた。しかしながら実際にはベクターの定量時に大きな誤差が生じていたことが判明しており、この点を補正すると1本鎖のベクターで得られた効果と大差ないようである。ベクターに対する中和抗体に関しては近年認識が深まっているものの、中和抗体陽性例に対しては有効な方法は見出されておらず、我々の開発した方法は独自性が高い。また、より患者数の多い血友病Aの場合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかるものと思われる。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段

階にあり、本研究グループが貢献できる部分
は大きいものと思われる。今後更に霊長類モ
デルなどにおいて検討を重ねていくことで、
より良い治療法に結びつく成果を挙げていき
たい。

E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法
につき、基礎研究の成果に基づき臨床研究の
手前までに至る成果を挙げることができた。
今後はこれらの成果が血友病の治療に真に役
立つ遺伝子治療法につながることを期待され
る。

G. 研究発表（欧文論文）

1. Yagi, H., Sanechika, S., Ichinose, H.,
Sumi-Ichinose, C., Mizukami, H., Urabe, M.,
Ozawa, K., Kume, A.: Recovery of neurogenic
amines in phenylketonuria mice following
liver-targeted gene therapy. **Neuroreport**, 23:
30-4, 2012.
2. Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito
C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A,
Muto S, Kusano E, Ozawa K: Interleukin-10
expression induced by adeno-associated virus
vector suppresses proteinuria in Zucker obese
rats. **Gene Ther.** 2011 Nov 24. doi:
10.1038/gt.2011.183. [Epub ahead of print]
3. Kikuchi, Y., Kume, A., Urabe, M., Mizukami,
H., Suzuki, T., Ozaki, K., Nagai, T., Ozawa, K.:
Reciprocal upregulation of Notch signaling
molecules in hematopoietic progenitor and
mesenchymal stromal cells. **J Stem Cell
Regener Med**, *in press*.
4. Rahim, A., Urabe, M., Mizukami, H., Kume,
A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Reduction of
MBS85 gene expression after the targeted
integration of a transgene into the AAVS1 site
using adeno-associated virus integration
machinery. **Int J Genet Gene Ther**, *in press*.
5. Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei,
Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.:
Development of a mouse model for lymph node
metastasis with endometrial cancer. **Cancer Sci**,
102:2272-7, 2011.
6. Kaneda, K., Kasahara, H., Matsui, R., Katoh,
T., Mizukami, H., Ozawa, K., Watanabe, D., Isa,
T.: Selective optical control of synaptic
transmission in the subcortical visual pathway
by activation of viral vector-expressed
halorhodopsin. **PLoS One** 6:e18452, 2011.
7. Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe,
M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K.,
Kume, A.: Complete restoration of
phenylalanine oxidation in phenylketonuria
mouse by a self-complementary
adeno-associated virus vector. **J Gene Med**
13:114-22, 2011.

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

研究分担者 教授 嶋 緑倫 奈良県立医科大学小児科

研究要旨：血友病 A 患者への補充療法により生じる抗第 VIII 因子 (FVIII) 同種抗体 (インヒビター) 保有患者の止血管理は難しい。活性型プロトロンビン複合体製剤 (APCC) は血友病インヒビターにおけるバイパス止血治療製剤であるが、止血機序の本態は不明である。今回、微量 APCC (0.05 U/mL) による FVIII 活性化作用を検討した。APCC/組織因子 (TF) 添加後すぐに FVIII:C は約 3 倍上昇し、約 10 分で前値まで低下した。APCC のみ添加では FVIII 活性に変化なく、10 分後から徐々に上昇し始めた。FVIIa 阻害ペプチド (E76) は APCC/TF の FVIII 活性化を阻害するも、hirudin は阻害しなかった。APCC/TF 添加にて FVIII 重鎖 Arg372 と Arg740 は急速に開裂し、遅れて Arg336 を開裂した。この開裂はリン脂質/TF 依存性で、E76 添加により阻害された。FVIII インヒビター存在下でも、APCC/TF の FVIII 活性化は同様に示した。以上より、APCC 含有の FVIIa が FVIII を活性化し止血効果を増強させることが示唆された。治療域量 (1-2 U/mL) より極少量 APCC でも FVIII を活性化させることは、血友病 A インヒビターの新たな止血療法として有用である。抗 FVIII 自己抗体による後天性血友病 A は先天性より重篤な出血症状を示すが、この機序も不明である。トロンビン生成能や凝固波形解析の包括的凝固能検査により、後天性血友病 A 抗 C2 type 2 インヒビター患者は同程度の活性を持つ中等症血友病 A、さらに重症血友病 A に比べても止血能が極めて劣ることを示した。これは FVIII/インヒビター複合体が、FIXa の FX 活性化を steric に阻害する機序が推測された。これらは本症の病態解明に重要であり、FVIII/インヒビターの基礎的研究の発展と新規 FVIII 製剤の開発に十分寄与すると考えられた。

A. 研究目的

血友病 A は、X 染色体上の FVIII 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遺伝子組換え FVIII 製剤の投与により、患者の QOL は飛躍的に向上してきた。しかし補充療法に伴い血友病 A 患者の 5-20% に抗 FVIII 同種抗体 (インヒビター) が出現し、インヒビター保有血友病患者の止血管理は極めて困難となる。インヒビター患者に対する止血療法として活性型プロトロンビン複合体製剤 (APCC) や活性型 FVII 製剤 (rFVIIa) 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は不明な点が多い。今回、インヒビター抑制機序の解明およびインヒビター患者の治療法確立を目指し 2 つの基礎的研究を行った。

B. 研究方法

(1) APCC による FVIII 活性化/不活性化

rFVIIa/TF 複合体は急速に FVIII 重鎖を分解し FVIII を活性化させ、凝固反応初期相において FVIII:C を上昇させる。今回、もう 1 つのバイパス製剤 APCC にて、微量 APCC (0.05 U/mL) の FVIII 活性化作用を凝固一段法やトロンビンや FXa 生成試験で評価した。APCC による FVIII 開裂反応は、SDS-PAGE/Western blot 法で検討した。さらに、APCC の FVIII 活性化作用における各種 FVIII インヒビター (抗 A2 type 1、抗 C2 type 1 や type

2) の影響を凝固一段法や Western blot 法にて検討した。

(2) 抗 FVIII 自己抗体保有後天性血友病 A 患者の凝固機能と抑制機序の解明

抗 FVIII 抗体陽性後天性血友病 A は先天性より重篤な出血症状を示すが、この機序は不明である。今回、後天性血友病 A 患者血漿を包括的凝固能検査 (トロンビンや FXa 生成試験、凝固波形解析) にて凝固止血能を評価した。患者血漿から Protein G カラムでインヒビター IgG を精製し、これらのエピトープを同定した。またインヒビターによるトロンビンや FXa の FVIII 活性化や VWF・リン脂質 (PL) の FVIII 結合の抑制能も検討した。さらに FVIII/IgG 複合体でのトロンビン生成や FXa 生成も評価し、その中心的な抑制機序を検討した。

(倫理面への配慮) 被験者の血液採取にあたり、informed consent を厳格に行い同意を得て、得られる個人情報については各種法令等遵守し、個人情報等保護に十分配慮し実験を行った。

C. 研究結果

(1) APCC による FVIII 活性化/不活性化

FVIII (10 nM) は APCC (0.05 U/mL) /TF (0.5 nM) 添加 1 分以内に FVIII 活性は約 3 倍に上昇し、約 10 分で前値まで低下した。APCC のみ添加後 10 分間は FVIII 活性に変化なく、以降徐々に上昇した。FVIIa 阻害ペプチド (E76)

は APCC/TF の FVIII 活性化を抑制したが、hirudin は抑制しなかった。APCC (0.05 U/mL)/TF (0.5 nM) 添加で、FVIII (10 nM) は急速に重鎖 Arg³⁷² と Arg⁷⁴⁰ が開裂し、遅れて Arg³³⁶ 開裂を認めた。この開裂は PL/TF 依存性で、E76 添加で遅延した。以上から、APCC に含有する FVIIa が FVIII を活性化させて止血効果を増強させることが示唆された。APCC 惹起 FVIII 活性化による FVIII インヒビター影響調べるため、FVIII インヒビター (4 BU/mL: A2 type 1, C2 type 1/type 2) を FVIII と反応させ、APCC/TF の FVIII 活性化と開裂を評価した。インヒビターエピトープに関係なく、前述と同様に反応 1 分以内に FVIII:C は約 3 倍上昇した。FVIII 開裂も正常 IgG 添加同様の開裂パターンを示した。一般的な治療用量 (1-2 U/mL) より極少量 APCC でも FVIII を活性化することは、APCC と FVIII 併用という血友病 A インヒビターの新たな止血療法として有用である。

2) 抗 FVIII 抗体保有後天性血友病 A の凝固機能と抑制機序の解明

トロンビン/FXa 生成試験、凝固波形解析により後天性血友病 A type 2 患者 (FVIII:C ~2%) は同程度の活性を持つ中等症先天性血友病 A 患者に比べて止血能が極めて劣っていた。さらに、本症 type 1 や type 2 患者とも重症型血友病 A より止血能が抑制されていた。全例 C2 epitope を有しており、type 1 は FVIII/WF や FVIII/PL 結合を抑制するも、トロンビン惹起 FVIII 活性化は抑制せず、type 2 は反対の特徴を示した。FVIII/C2 インヒビター複合体のトロンビン/FXa 生成試験から、この複合体は、FIXa の FX 活性化を steric に阻害することにより、先天性重症血友病 A よりさらに凝固機能が劣る機序の 1 つを明らかにした。このことは、インヒビターエピトープの詳細な解析は、血友病 インヒビター治療戦略に重要であることを支持させた。

D. 考察、展望、結論

血友病インヒビター患者への止血療法の戦略は、現在トピックスである。今回、微量の APCC が FVIII を限定分解して活性化させ、インヒビター存在下でもこの活性化反応を示した。またさらに C2 インヒビター後天性血友病 A の止血能評価およびその機序を明らかにしたことは血友病 A インヒビター治療の戦略としての基礎的研究として貢献できたと思われる。

インヒビターの FVIII 活性抑制機序の免疫生化学的のさらなる詳細な解明は、血友病 A インヒビターの新たな止血治療戦略 (以下に述べる) の確立につながる。将来的に、①インヒビター存在でさえ FVIII 機能を発揮する改変型 FVIII 製剤やインヒビターを発現させない新規 FVIII 製剤の開発、②血中に FVIII とインヒビターが共存する (後天性) 血友病において、既存のバイパス (APCC, FVIIa) 製剤を用いながら、各患者が有する FVIII インヒビターの特性に適合したより効率の良い新たな治療戦

略を提供する、③本研究を通じて得られる知見をもとに、血液凝固過程における新たな作用機序を明らかにすること、が多いに期待され、引き続き基礎的研究を行っていく予定である。

研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室: 野上恵嗣、荻原建一、矢田弘史、松本智子

研究発表

[論文発表]

1. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired hemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb Haemost.* 2012 (in press)
2. Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Interactions between residues 2228-2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation. *Thromb Haemost.* 106; 893-900; 2011
3. Ogiwara K, Nogami K, Shima M. Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor-independent mechanisms. *Thromb Haemost.* 106; 665-74; 2011
4. Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Shima M. Mechanisms of human neutrophil elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thromb Haemost.* 105; 968-80; 2011
5. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII. *Thromb Haemost.* 105; 989-98; 2011

2. 口演

1. A novel mechanism of enhancing hemostatic effect in the combination with recombinant factor VIII and activated prothrombin complex concentrate (APCC) in hemophilia A with inhibitor. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. 53th the annual meeting American Society of Hematology, 2011, San Diego, CA
2. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Tsujii N, Shima M. Determination of coagulation functions and inhibitory mechanisms in acquired hemophilia A with type 1 and type 2 inhibitors. 52th the annual meeting American Society of Hematology, 2010, Orland, FL

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-HIS 1）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）」を実施した結果を受け、平成 22 年度より 2 年間で 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 へ投稿し掲載された。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。研究内容を見直し、データ収集方法の再構築を行い、平成 23 年 12 月末現在 78 名の症例登録を得た。
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- α 、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要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。

平成 23 年 12 月末現在、34 名の解析が終了しており、他施設からの受け入れ体制も構築できた。

A. 研究目的

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、補充療法の反復の結果、血友病 A、B 患者のそれぞれ 20~30%、3~5% で、FVIII、FIX を不活化 (中和) するインヒビター (同種抗体) が発生する。この場合、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。インヒビター発生機序は未だ不明であるが、これまでに患者関連の要因として遺伝子異常、凝固因子活性、人種、遺伝学的要因、治療関連の要因として製剤の種類、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などが考えられている。特に、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。さらに、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、データ解析を行った。
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、調査研究を継続した (J-HIS2)。本年度は研究協力者を増やし、症例の登録を促進した。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 Bethesda 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原法である 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。

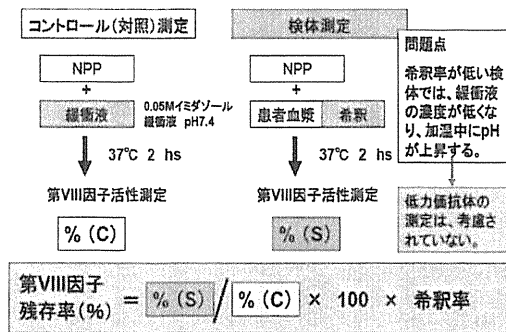


図1 Bethesda 法の問題点

まず、第 VIII 因子活性の測定法を標準化する必要があるが、これまでの研究において、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た。この方法は、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となった。また、インヒビター測定 of 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した。

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した。本年度は、昨年度に確立した 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」を実施し

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)

平成 19 年より継続して 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)を実施しているが、本年度はインヒビターの消失要因についても調査を行った。

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)

平成 21 年度に構築した前方視的登録システムを用いて、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 23 年度は実施計画書の改定し調査研究を継続実施した。

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

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)。

(2) 標準インヒビター血漿の作成

高力価インヒビター保有血漿を、生理食塩水を 1 次希釈液として、約 10BU/ml まで希釈した。さらに 10BU/ml の血漿を、①0.05M イミダゾール緩衝液、②5%ヒトアルブミン液、③ヒト第 VIII 因子欠乏血漿、をそれぞれ 2 次希釈液として希釈し、その影響を検討した。

(3) サーベイランス準備

標準インヒビター血漿(FVIII with Inhibitor 20BU, 50BU, GEORGE KING BIO-MEDICAL Inc.)及び数検体のインヒビター患者血漿を用いて、サー

バイランスを行う。サーベイに参加依頼を予定している施設として、大手の衛生検査所（SRL, BML, 三菱メディエンス）および施設内検査を実施している臨床施設（数施設）の協力依頼を得る。サーベイランス参加施設には、標準インヒビター血漿やインヒビター患者血漿とともに、2Nイミダゾール緩衝液を送付し、Tokyo 変法を各施設で実施し、さらに各施設で実施しているインヒビター測定法でも測定する。サーベイランス結果から、施設間差の検証をすると同時に実際の施設間差を縮小する手段を検討する。

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）

J-HIS1・J-HIS2に登録された患者を対象に遺伝子解析研究「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」を計画し、他施設からの検体の受け入れ体制の構築、国内3施設での共通な解析技術の統一をはかり遺伝子検査体制の基盤を強化した。

研究方法概略については以下の通りである。

まず、事務局を通じて他施設の研究参加の意思確認を行い、各研究協力機関における倫理委員会での承認を得る。承認が得られ次第、事務局より各研究機関の責任医師のもとへ必要症例分の検査キットを送付する。研究責任医師は対象となる患者の同意取得と採血を行い、連結匿名化の上、国内3施設の内、決められた検査実施機関へ検体を速やかに送付する。検体を受領した3施設は、それぞれ決められた手順に従ってDNA抽出を行い、目的とする遺伝子の解析を行う。検査結果については、検査実施施設から事務局を通じて各研究責任医師のもとへ返却し、責任医師より患者への報告説明を行う。

検査実施機関	対象	検査内容
東京医科大学	東日本	血友病A
	全国	免疫系遺伝子
奈良県立医科大学	西日本	血友病A
名古屋大学	全国	血友病B

表1 検査実施機関と検査内容

（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については、

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）の審査承認を得た（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）

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。本研究成果を日本血栓止血学会誌並びに Hemophilia に投稿し掲載された (Shirahata A, Shima M, et al. Haemophilia An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. Haemophilia. ;17: 771.)。また、第 23 回国際血栓止血学会にて発表した (Shirahata A, Shima M, et al. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日)。

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 23 年 5 月に新規血友病患者の人数を把握し、登録ファイルを公布した。平成 23 年 7 月には診断時～平成 23 年 7 月までの追跡調査を行った。平成 23 年 12 月 1 日現在の登録状況は以下のとおりである。

登録者数：78 名 (本年度予定:100 例)
 (血友病 A：69 名 血友病 B：9 名)
 (インヒビターの発生：15 名)
 登録施設数：21 施設
 症例登録医師数：31 名

また、平成 23 年 7 月 31 日までに収集した結果は以下のとおりである。

性別	男	78 (100%)
診断時年齢	0 歳 9 ヶ月 [0 歳 0 ヶ月-6 歳 8 ヶ月]	
重症度	重症	54 (69.2%)
	中等症	16 (20.5%)
	軽症	8 (10.3%)
診断の契機	家族歴	26 (33.3%)
	出血	50 (64.1%)
	その他	2 (2.6%)
家族歴	なし	39 (50.0%)
	あり	37 (47.4%)
	→内 4 名にインヒビターの家族歴あり 不明	2 (2.6%)

表 2 【患者背景】 中央値 [最小値-最大値] / () 内はパーセント

治療法	未治療	15 (19.2%)
	定期補充	30 (38.5%)
	出血時のみ	32 (41.0%)
	出血時+予備的補充	1 (3.1%)
5 日以上の重篤出血	なし	60 (82.2%)
	あり	13 (17.8%)
カテーテルの挿入	なし	59 (80.8%)
	あり	14 (19.2%)
在宅注射の実施	なし	48 (66.7%)
	あり	24 (33.3%)

表 3 【治療状況】 中央値 [最小値-最大値] / () 内はパーセント

使用製剤	アドベイト	25 (80.6%)
	コージネイト FS バイオセット 2	(6.5%)
	コンファクト F	1 (3.2%)
	ノバクト M	3 (9.7%)
開始時投与量	250	[250-500]
投与量/体重	33.90	[19.23-96.15]
投与周期	2	[1-3]

表 4 【定期補充療法】 中央値 [最小値-最大値] / () 内はパーセント

初回投与年齢	0 歳 9 か月 [0 歳 0 ヶ月-3 歳 4 ヶ月]	
初回投与量	300	[125-1000]
体重当りの初回投与量	38.46	[21.42-175.4]
使用製剤	アドベイト	34 (58.6%)
	コージネイト FS バイオセット	16 (27.6%)
	クロスエイト M	1 (1.7%)
	コンファクト F	2 (3.4%)
	ノバクト M	4 (6.9%)
	ベネフィクス	1 (1.7%)

表 5 【初回投与について】 中央値 [最小値-最大値] / () 内はパーセント

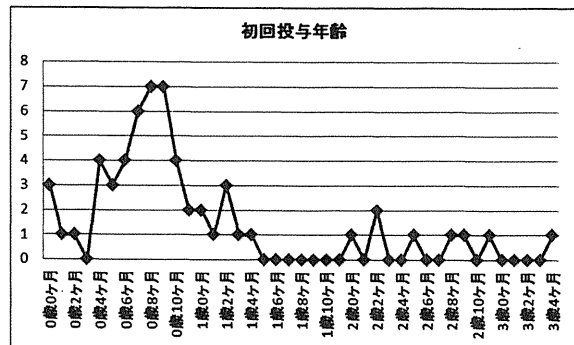


図 2 初回投与年齢

初回投与の目的

	合計 (%)
予備的補充	4 (6.9)
定期補充	2 (3.4)
手術・観血的処置	3 (5.2)
出血	49 (84.5)
皮下出血 (首から上)	9 (18.4)
皮下出血 (それ以外)	7 (14.3)
口中 (歯肉以外)	4 (8.2)
右大腿 (前)	1 (2.0)
右膝	5 (10.2)
左膝	3 (6.1)
右足首	2 (4.1)
左大腿 (前)	1 (2.0)
筋肉内出血_その他	1 (2.0)
採血時	4 (8.2)
歯肉	1 (2.0)
消化管出血	4 (8.2)
鼻血	2 (4.1)
頭蓋内出血	5 (10.2)
くも膜下	1 (2.0)
硬膜下	2 (4.0)
調査中	2 (4.0)
合計	58 (100.0)

発生年齢	1歳0ヶ月 [0歳5ヶ月-1歳9ヶ月]	
総投与日数	13	[4-37]
総投与量	3750	[1000-24000]
診断時 インヒビター値	2.46	[0.64-8]
最大値	4	[0.77-196]
タイプ	High	6 (40.0%)
	Low	9 (60.0%)
出血時治療	出血なし	1 (6.6%)
	バイパス製剤	7 (46.6%)
	中和療法	7 (46.6%)
インヒビター治療	ITI実施	11 (73.3%)
	未実施	4 (26.7%)
消失状況	消失	11 (73.3%)
	未消失	4 (26.7%)

表 6 【インヒビター】中央値 [最小値-最大値] / () 内はパーセント

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)

インヒビター力価への希釈液の影響:

3種類を2次希釈液として、インヒビターの希

釈の影響を検討したところ、第VIII因子欠乏血漿により希釈した場合の直線性が最も優れていた。これは Nijmegen 変法による推奨法と一致した結果となった。

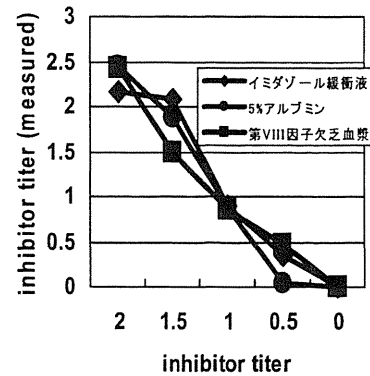


図 3 インヒビター力価への希釈液の影響

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IV因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」実施したため、本年度は以下活動を行った。

研究協力者の所属施設を中心とするB施設(11施設)からの検体の受入を実施した。

その結果、現在の進捗状況は以下のとおりである。

研究対象症例 45施設 180例

(内平成23年度対象 11施設 69例)

遺伝子検査キット送付 6施設 46例*

遺伝子検査の実施 39例

45施設180例の研究対象の内、遺伝子検査を実施したのは39例(血友病A34例、血友病B5例)であった(表1-表4)。血友病Aに関しては、過去に一度でもインヒビターの発生がみられたJHIS-1対象群では、いわゆる null 変異とされる intron22 逆位、欠失、ナンセンス変異の占める割合が、その他の変異よりも高率(77%)との結果であった。一方、前方視的研究であるJHIS-2の対象群については、治療期間が25EDに満たない症例を含んでいること、症例絶対数が少ないことの影響は除外されないものの、現在のところ、null 変異の有症例においてインヒビター発生率が高いという結果であった。

血友病 B に関しては、表 3、4 に示す通りであった。

なお、サイトカイン遺伝子についてはさらに症例が集積した後に一期的に実施する予定である。

Mutation		%
Intron22 inversion	4	31
Large deletion	1	8
Small deletion	2	15
Nonsense mutation	3	23
Missense mutation	3	23
Total	13	100

表 7 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation		Inh+(%)
Intron22 inversion	6*	3(50)
Small deletion	2	1(50)
Insertion	1*	0(0)
Nonsense mutation	3	2(67)
Splicing variants	1	0(0)
Missense mutation	8*	2(25)
Total	21	12(57)

(* 25ED に満たない症例を含む)

表 8 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation		%
Nonsense mutation	1	100
Total	1	100

表 9 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation		Inh+
Splicing variants	2	0
Missense mutation	2	0
Total	4	0

(* 25ED に満たない症例を含む)

表 10 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-2)

D. 考察

1. インヒビター発生患者の実体とインヒビター発

生要因

J-HIS1/U20 研究での研究成果は国際学会誌に受理され、本研究の内容と結果については国際的にも認められた。本研究項目ではインヒビターの消失要因についても調査を行った。一旦出現したインヒビターのその後の経過に関する調査は全くされておらず今後データを整理して投稿する予定である。

2. 新規血友病患者のデータベース構築

本年度は新規血友病患者のコホート研究におけるデータが集積された。まだ中間段階で症例数は少ないもののインヒビターの発生要因に関するわが国で初めての知見が得られた。新規登録患者78名中インヒビターは15名に見られた。現時点で患者の重症度別の比率は69.2%、中等症20.5%、軽症8%と一般的な患者背景であった。また、定期補充実施率は38.5%であるが、未治療群をのぞくと定期補充療法群は47.6%で、わが国では新規血友病患者の半数は定期補充療法を実施していることがわかる。インヒビターは全例血友病A患者に発生しているが、発生率は21.7%でわが国でも欧米と同様の発生率であることが確認された。使用製剤は遺伝子組み換え型製剤が8割を超え、本研究の対象患者では圧倒的に遺伝子組み換え型製剤の使用患者が多かった。インヒビター発生までの総投与日数は中央値13日であり、これまでの欧米の報告と同様の結果であった。未だ登録日数は少ないが、わが国における血友病患者のインヒビター発生要因について初めて評価できる重要なデータベースとなりうることを確認された。今後、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

3. インヒビターの検出・診断の標準化

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。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。本法では 1995 年に B. Verbruggen が提唱した Nijmegen 変法の報告ほど反応液の pH を安定化できなかったが、同論文の示す第 VIII 因子活性が安定な pH 範囲を維持できた。したがって、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。

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を昨年検討した方法 (10Bethesda 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) により作成し、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、標準化の前試験として同時再現性と日差再現性を検討した。昨年度の検討では、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、コントロール血漿に対する第 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するため、同時再現性の CV% で 6.5~24.9%、日差再現性の CV% で 7.0~48.7% を示した。

Bethesda 法では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 Bethesda 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、Bethesda 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 Bethesda 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。

BU	Res	Log	BU	BU 差	BU 差%
	FVIII 10%差				
2.0	27.5%	1.439	1.862	0.14	6.9
	25.0%	1.398	2.000		
1.5	35.0%	1.544	1.515	0.15	10.0
	31.5%	1.498	1.667		
1.0	50.0%	1.699	1.000	0.15	15.2
	45.0%	1.653	1.152		
0.5	75.0%	1.875	0.415	0.15	36.6
	67.5%	1.829	0.567		

表 11 Bethesda 単位への変換に伴う誤差の変化例 (残存第 VIII 因子の 10 分の 1 の変動が生む意味の違い)

4. インヒビター発生要因と遺伝子学的検査

本年度は、J-HIS1/U20、J-HIS2 の登録患者のうち遺伝子解析研究に未登録患者の診療施設に対し、「第 VIII 因子、第 IX 因子および各サイトカイン遺伝子解析」への参加の承諾を得た上で、各施設で倫理委員会の承認を得るよう要請した。また、既に構築している検体送付システムを強化し、遺伝子解析研究を実施した。現在、遺伝子解析は進行中である。今後、検体を集積して遺伝子異常やサイトカイン遺伝子の動態を解析すること、第 2 研究である前方視的調査と連動して臨床的情報を併せて評価する。

E. 結論

わが国のインヒビター発生において遺伝子組み換え型製剤と血漿由来製剤間の差はみられなかった。本研究成果は国際誌に受理された。インヒビターの発生要因で統計学的に有意であったのは重症度と家系内のインヒビター保有患者の存在であった。新規血友病患者の前向き調査の症例数はまだ予定数に達していないが、すでにインヒビターが 21.7% と欧米と同様の発生率が明らかになった。今後遺伝子解析研究とあわせて研究の継続が必須である。インヒビターの測定法は Tokyo 変法で実施可能であることが明らかになり、標準イン

ヒビター血漿の作成条件も確立した。これらの条件の下に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。サーベイランス施設として、大手の衛生検査所および施設内検査を実施している臨床施設の協力を得る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired hemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies *Thrombosis and Haemostasis* 2012 107(2) [Epub ahead of print]
- 2) Shimizu T, Kido A, Honoki K, Murata K, Fujii H, Higuchi B, Ishihara T, Takeshita Y, Shima M, Yajima H, Akahane M, Tanaka Y. A Successful Reconstruction Using a Frozen Autograft and a Pedicled Latissimus Dorsi Flap after a S12345B Shoulder Girdle Resection in a Patient with Osteosarcoma. *J Reconstr Microsurg* 2011 [Epub ahead of print]
- 3) Ljung R, Oldenburg J, Auerswald G, van den Berg M, Shima M, Dimichele D. Report of the Fifth Meeting of the International Network for Pediatric Hemophilia: a focus on prophylaxis and immune tolerance induction. *Int J Hematol* 2011 [Epub ahead of print]
- 4) Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Interactions between residues 2228-2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation. *Thromb Haemost* 2011 22;106(5) [Epub ahead of print]
- 5) Ogiwara K, Nogami K, Shima M. Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor-independent mechanisms. *Thromb Haemost* 2011 106(4):665-674
- 6) Shibata M, Nakagawa T, Akioka S, Giddings JC, Kanehiro H, Matsumoto T, Ogiwara K, Yada K, Shima M. Hemostatic Treatment Using Factor VIII Concentrates for Neutralizing High-Responding Inhibitors Prior to CVAD Insertion for Immune-Tolerance Induction Therapy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011 [Epub ahead of print]
- 7) Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya JI, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Taneichi M, Yoshioka A; STUDY GROUP ON FACTORS INVOLVED IN FORMATION OF INHIBITORS TO FACTOR VIII AND IX PREPARATIONS. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. *Haemophilia* 17(5):771-6.
- 8) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial. *Haemophilia*. [Epub ahead of print]
- 9) Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Shima M. Mechanisms of human neutrophil elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):968-80.
- 10) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):989-98.
- 11) Kasuda S, Tatsumi K, Sakurai Y, Kato J, Taminishi S, Takeda T, Ohashi K, Okano T, Hatake K, Shima M. Expression of coagulation factors from murine induced pluripotent stem cell-derived liver cells. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2011 22(4):271-9.

- 12) Teitel J, Berntorp E, Dolan G, Fischer K, Gringeri A, Kessler C, Lambert T, Leissinger C, Nemes L, Shima M. A consensus statement on clinical trials of bypassing agent prophylaxis in inhibitor patients. *Haemophilia* 2011 17(3):516-21.
- 13) Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Sakurai Y, Ogiwara K, Yoshioka A, Okano T, Shima M. Regulation of coagulation factors during liver regeneration in mice: Mechanism of factor VIII elevation in plasma. *Thrombosis Research*. 2011 128(1):54-61.
- 14) Tsukamoto S, Tanaka Y, Matsuda T, Shinohara Y, Taniguchi A, Kumai T, Tomiwa K, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Arthroscopic ankle arthrodesis for hemophilic arthropathy: Two cases report. *The Foot* 2011 21(2):103-5.
- 15) Hayashi T, Sakurai Y, Fukuda K, Yada K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshizawa H, Takahashi Y, Yoshikawa Y, Hayata Y, Taniguchi S, Shima M. Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery. *Paediatric Anaesthesia*. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Shima M. Basis and clinical practice for hemophilia with inhibitor. 52nd spring meeting of the Korean society of hematology Seoul, Korea 2011年5月23日
- 2) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsumoto T, Shima M. Functional characterization of immobilized factor VIII in intrathrombus fibrin network formation under whole blood flow conditions with high shear rates XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
- 3) Chikasawa Y, Amano K, Shinozawa K, Matsumoto T, Inaba H, Shima M, Fukutake K. Diagnosis of type 2n von willebrand disease in a Japanese patient by pharmacokinetics, factor VII binding assay and gene analysis. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日

- 4) Hori Y, Isonishi A, Soejima K, Matsumoto M, Shima M, Fujimura Y. Isoelectric focusing analysis with a large-pore agarose-acrylamide composite gel identified two forms of adamts13, unbound and bound to von willebrand factor, in plasma milieu XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
- 5) Kitsukawa K, Takedani H, Shima M, Taki M. Imaging evaluation of arthropathy at the beginning of prophylactic therapy for severe hemophilia children XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
- 6) Higasa S, Amano K, Hanabusa H, Muto S, Matsushita T, Shima M, Fujii T, Sakai M. Fine (feiba inhibitor entry) post-authorization safety surveillance (pass) : capturing long-term experience in Japanese inhibitor subjects under routine clinical management. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
- 7) Sugimoto M, Hamada M, Matsui H, Doi M, Matsunami Y, Fukushima H, Nishino K, Yoshioka A, Shima M Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
- 8) Fujii N, Souri M, Shima M, Tomoyasu C, Isoda K, Ichinose A. Markedly shortened half-life of the administered factor XII concentrates during first replacement therapy in a newborn with severe congenital FXII deficiency XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日
- 9) Fukutake K, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Shima M, Shirahata A. The post-authorization safety Surveillance program confirmed actual clinical safety and efficacy of recombinant plasma/albumin-free method factor VII in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月26日
- 10) Taki M, Hanabusa H, Fukutake K, Matsushita T, Shima M, Shirahata A. Clinical experience previously untreated patients with antihemophilic factor

- (recombinant) ,plasma/albumin-free method from post-authorization safety surveillance in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都市 2011 年 7 月 26 日
- 11) Matsushita T, Hanabusa H, Fukutake K, Taki M, Shima M, Akira S. Prospective advate immune tolerance registry in Japanese hemophilia a patients with inhibitors:an interim report. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 26 日
- 12) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Tsujii N, Shima M. Coagulation velocity and acceleration correlate with clinical phenotype of patients with acquired factor V inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 26 日
- 13) Paula E (BR), Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz S.R, Morfini M, Nemes L, Salek S.Z, Shima M, Windyga J, Ehrenforth S, Andersen H.F, Chuansumrit A, on behalf of 1804 (adeptTM 1) Investigators. Clinical and laboratory results from adepttm 1,a phase 2 trial investigating the use of recombinant activated FVII analogue in congenital haemophilia patients with inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 14) Matsushita T, Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase 1 trial. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 15) Sugita C, Yamashita A, Matsuda S, Goto S, Moriguchi , Matsumoto T, Inoue O, Iwakiri T, Matsuura Y, Shima M. Elevated plasma levels of factor VII enhance thrombus formation though excess thrombin generation in rabbit jugular vein XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 16) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Shima M. The first national survey of pediatric thromboembolism in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 17) Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya J, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Taneichi M, Yoshioka A. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 18) Furukawa S, Yoshizawa H, Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Tanaka I, Yoshikawa Y, Shima M. Perioperative hemostatic management for coarctation of aorta in anearly infant with severe haemophilia A XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 19) Ogiwara K, Nogami K, Hosokawa K, Matsumoto T, Shima M. Procoagulant effect of tranexamic acid with minimal urokinase on exvivo human hemophilia model under blood flow XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日
- 20) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Mild clinical phenotype in a severe hemophilia a with age178his substitution associated with increased factor Xa generation. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日
- 21) Shinozawa K, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Shima M, Fukutake K. A novel missense mutation of factor V(factor V nara:W1920R)manifested thrombosis and demonstrated a positive result of activavated protein C resistance assay XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日
- 22) Nishiya K , Nogami K, Tanaka I, Shibata M, Ogiwara K, Matsumoto T, Shima M. Dynamics of plasma factor VII during the continuous infusion factor VII concentrates in twenty patient with hemophilia A XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日
- 23) Yada K, Nogami K , Ogiwara K , Shima M. A novel mechanism of Enhancing the Haemostatic Effect in the Combination with Recombinant Factor VIII and Activated Prothrombin Complex Concentrate(APCC) in