

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 窓岩清治, 小林英司, 石渡 彰, 柏倉裕志, 大森 司, 三室 淳, 坂田洋一: マイクロポート植え込み成体血友病 A マウスを用いた持続的 VIII 因子刺激に対する免疫応答能の解析 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
6. Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Hemophilia gene therapy study with mice and non-human primates. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
7. 大森 司, 窓岩清治, 三室 淳, 坂田洋一: レンチウイルスベクターを用いた血小板標的遺伝子導入法の開発 (シンポジウム) 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
8. Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroaki Mizukami, Yuji Kashiwakura, Katsuhiko Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
9. Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Eiji Akiba, Mamoru Hasegawa, Jun Mimuro, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: The chicken hypersensitive site-4 chromatin insulator sequence protects clonal domains of hematopoietic stem cells transduced with a self-inactivating SIV vector in platelet-directed gene therapy. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
10. Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Silencing of A targeted protein in platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
11. 柏倉裕志, 三室 淳, 石渡 彰, 安本篤史, 坂田飛鳥, 大森 司, 窓岩清治, 水上浩明, 小野文子, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類を用いた血友病 A 遺伝子治療研究に向けたヒト BDDFVIII 特異的検出法の確立 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
12. 石渡 彰, 三室 淳, 水上浩明, 小野文子, 安本篤史, 坂田飛鳥, 柏倉裕志, 大森 司, 窓岩清治, 久米晃啓, 保富康宏, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類を用いた血友病 B 遺伝子治療研究: 末梢静脈投与 AAV8 ベクターによる第 IX 因子遺伝子導入 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
13. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J and Sakata Y Intrathymic administration of factor VIII results in immune tolerance by induction of factor VIII-specific regulatory T cells in murine hemophilia A. XXII ISTH Congress July 16, 2009. Boston, USA
14. 窓岩清治, 三室 淳, 大森 司, 坂田洋一: 敗血症における凝固線溶系異常 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 日本血栓止血学会・日本救急医学会ジョイントシンポジウム 平成 21 年 6 月 5 日北九州

15. Madoiwa S, Yamauchi T, Kobayashi E, Dokai M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Development of immune tolerance induction by intrathymic administration of Factor VIII in murine hemophilia A. 2009 East Asia Hemophilia Forum June 7, 2009. Kitakyushu, Japan
16. 窓岩清治、大森 司、三室 淳、坂田洋一：感染症 DIC を考慮した現厚生労働省診断基準の検討。第 4 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム DIC 部会。2009 年 11 月 21 日 (土) 東京
17. 水上浩明、三室 淳、石渡 彰、八木 洋也、大森 司、窓岩清治、卜部 匡司、久米晃浩、坂田洋一、小澤敬也：Robust and sustained factor IX expression following IV injection of AAV8-based vectors in magaques. 第 71 回日本血液学会学術集会 2009.10/23-24 京都
18. 久米晃浩、八木 洋也、水上浩明、卜部 匡司、塚原 智典、石渡 彰、三室 淳、窓岩清治、大森 司、坂田洋一、小澤敬也：Promoter selection for muscle-directed self-complementary AAV toward hemophilia B gene therapy. 第 71 回日本血液学会学術集会 2009.10/23-24 京都
19. 大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：Platelet-directed gene modification by lentiviral vector:Application to therapies for inherited bleeding disorders and research into platelet signal. シンポジウム 第 71 回日本血液学会学術集会 2009.10/23-24 京都
20. 和田英夫、川杉和夫、久志本成樹、岡本好司、岡村 孝、畑田 剛、内山俊正、関 義信、窓岩清治、丸藤 哲：DIC 診断基準作成のためのプロスペクティブスタディの途中経過報告 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
21. 伊東哲男、林 司、古寺美加、水上浩明、小澤敬也、三室 淳、坂田洋一、村松慎一：中和抗体法と相関性のある抗 AAV2 抗体検出試験の開発 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
22. 石渡 彰、三室 淳、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、水上浩明、久米晃啓、小澤敬也、三室 淳、坂田洋一：高純度 AAV8、AAV9 ベクター精製法ノ確立 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
23. Thasinas Dissayabutra、大森 司、青木 慎也、石渡 彰、柏倉裕志、窓岩清治、秋葉栄治、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：血小板への遺伝子発現増強を目的とした GPIIb/IIIa プロモーターノ改変 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
24. 大森 司、青木 慎也、Thasinas Dissayabutra、石渡 彰、柏倉裕志、窓岩清治、秋葉栄治、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：GPIIb/IIIa 遺伝子近傍のクロマチンインスレーター配列の同定 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009.6/4-6 北九州
25. 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。

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。ベクターに対する中和抗体の存在が遺伝子導入効率に大きく影響すると考えられたことから、この点に関して測定系を改良し、検出感度を高めることができた。また、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。この際のベクター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る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。この投与法をより少ない侵襲で行えるようにするため、カテーテルを用いた方法の開発を進めた。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により準備し、その効果ならびに性質を解析した。

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 Dनावec 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、糖類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。一方、ヒトでは健康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、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は焦点を当てて検討を行った。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いま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。

F. 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.
8. 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.
9. 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, Zelenia O, Zentilin L, Snyder RO.: Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Human Gene Therapy*, 21:1723-85, 2010.
10. 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.
11. Ishiwata, A., Mimuro, J., Mizukami, H., Kashiwakura, Y., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J Gene Med.* 11:1020-9, 2009.
12. Ito, T., Yamamoto, S., Hayashi, T., Koderu, M., Mizukami, H., Ozawa, K., Muramatsu, SI.: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralizing antibodies. *Ann Clin Biochem.* 46:508-10, 2009.
13. Sato, K., Date, S., Aoyagi, Y., Kasahara, Y., Nawa, A., Mizukami, H., Hidema, S., Ozawa, K., Nishimori, K.: Generation of adeno-associated virus vector enabling functional expression of oxytocin receptor and fluorescence marker genes using the human eIF4G internal ribosome entry site element. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73:2145-8, 2009.
14. Uchibori, R., Okada, T., Ito, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med.* 11:373-81, 2009.
15. Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Machida, S., Fujiwara, H., Ozawa, K., Suzuki, M.: Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *Int J Oncol.* 35:725-9, 2009.
16. Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, KI., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther.* 16:383-91, 2009.
- G. 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）

総合（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:補充療法に伴い血友病 A 患者の 5-20%に抗第 VIII 因子(FVIII)同種抗体(インヒビター)が出現し、その止血管理は困難となる。インヒビター患者の止血療法として活性型 FVII 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、本療法の不応例も存在する。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 の遅延とピーク値低下を示すことから、凝固初期相の障害を想定し tissue factor pathway inhibitor(TFPI)の関与を検討した。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 不応時に高く、不応時の lagtime 遅延とピーク値低下は抗 TFPI 抗体添加で消失した。APCC 含有の TFPI が TFPI 抗原・活性上昇の原因であることが示唆された。ところで、FVIIa/TF は凝固反応極初期相で FVIII 重鎖を分解し FVIII を活性化させる。インヒビター存在下でも同様に FVIIa/TF は 30 秒以内に FVIII 活性を約 2 倍上昇させた。しかし正常 IgG 存在下では約 20 分で FVIII 活性は初期値になるが、抗 C2 type 1 抗体では活性低下速度が 40%低下した。これは FVIII 不活化で認める Arg336 開裂の遅延に寄与していた。一方、微量 APCC(0.05 U/mL)による FVIII 活性化作用の検討で、APCC/TF 添加後直ちに FVIII 活性は約 3 倍上昇し、約 10 分で初期値まで低下した。APCC のみでは FVIII 活性に影響なかった。FVIIa 阻害ペプチド(E76)は APCC/TF の FVIII 活性化を阻害するも、ヒルジンは影響なかった。APCC/TF は FVIII 重鎖 Arg372 と Arg740 を急速に開裂し、遅れて Arg336 を開裂した。リン脂質/TF 依存性のこの反応は、E76 添加で阻害したことから、APCC 含有の FVIIa が FVIII を活性化させることが示唆された。インヒビター存在下でも APCC/TF の FVIII 活性化を同様に認めた。以上から、バイパス製剤(rFVIIa や極少量 APCC(治療量 1 U/mL より低い)と FVIII 製剤の併用による血友病 A インヒビター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。一方、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、この機序は不明であった。TGT や凝固波形解析の包括的凝固能検査から、後天性血友病 A 抗 C2 インヒビター患者は同程度の活性を有する中等症血友病 A、さらには重症血友病 A よりも凝固止血能が極めて劣ることを示した。この機序として FVIII/インヒビター複合体が、FIXa の FX 活性化を steric に阻害することが推測され、このことは本症の病態解明に重要であり、また FVIII/インヒビターの基礎的研究の発展と新規 FVIII 製剤の開発にも寄与するだろう。

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、インヒビター患者へのバイパス止血製剤での新戦略とインヒビター抑制機序の解明を目指した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、バイパス止血療法の不応例が散見されるが、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、ピーク値が低下することを報告してきた。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)の関与を調べた。インヒビター患者の不応時と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) FVIIa による FVIII 活性化/不活性化における FVIII インヒビターの影響 - 我々は、FVIIa/TF が速やかに FVIII 重鎖を分解して FVIII を活性化したのち不活化し、凝固反応極初期相において FVIII 活性を上昇させることを報告してきた。今回、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、インヒビター(抗 A2 type 1;2 種、抗 C2 type 1;7

種と抗 C2 type 2;4 種)を用い、凝固 1 段法及び Western blot 法により検討した。

(3)APCC による FVIII 活性化/不活性化 - rFVIIa/TF 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 活性を上昇させる。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(2)で上述した)の影響を凝固 1 段法や Western blot 法にて検討した。

(4)抗 FVIII 抗体陽性後天性血友病 A 患者の凝固機能と抑制機序の解明 - 抗 FVIII 自己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(FIIa/FXa 生成試験、凝固波形解析)で止血能を評価した。また患者血漿から Protein G カラムでインヒビター IgG を精製し、エピトープを同定した。インヒビターによる FIIa 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 製剤不応機序の解明 - 血小板数、APTT、Fib、PIC、FV、PS、AT 等に有意に変化なく、APCC 含有の FII、FVII、FIX、FX、PC は投与後増加するが、さらに TFPI に APCC と関連する変化を見出した。TFPI 抗原量は APCC 投与後(有効、不応に無関係)有意に増加し(106.5/138.7 ng/mL, n=7)、rFVIIa では投与前後で変化しなかった。総 TFPI 抗原量は、APCC(80 U/kg で血漿換算 1 U/mL)投与後に 32±3.5 ng/mL(正常濃度の 30~60%)上昇した。TFPI 活性は APCC 不応時に高い傾向を示し、不応時 TGT に特徴的な lagtime 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 量を調べたところ、1 U/mL 中に約 10 ng/mL の総 TFPI 抗原量を認めた。APCC 含有の TFPI が TFPI 抗原や活性上昇の原因であることが示唆された。

(2)FVIIa による FVIII 活性化/不活性化における FVIII インヒビターの影響 - 凝固 1 段法では、全てのインヒビター(200 nM)存在下で FVIII(10 nM)に FVIIa/TF(1 nM)を添加したところ、正常 IgG 存在下(control)と同様に、30 秒後に FVIII 活性は 1.7-2.2 倍に上昇した。その後、抗 A2 抗体及び抗 C2 type 2 存在下では control

と同様に約 20 分で FVIII 活性は前値に低下したが、抗 C2 type 1 では活性低下速度が 40%抑制した。Western blot 法で、FVIIa/TF は FVIII Arg372 と Arg740 を速やかに開裂し、遅れて Arg336 開裂(約 2.5 分後)がみられた。全てのインヒビター存在下では Arg372 開裂は control と同様であった。Arg336 開裂は、抗 A2 抗体と抗 C2 type 2 では control と同様であったが、抗 C2 type 1 では control に比して時間・濃度依存的に遅延がみられ、不活性化抑制結果と一致した。FVIIa/TF はインヒビター存在下でも FIIa や FXa 非依存的に FVIII を活性化し、さらに抗 C2 type 1 では不活性化が抑制される。このことは、rFVIIa と FVIII 製剤の併用による血友病 A インヒビター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。

(3)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、以降緩やかに上昇した。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 含有の FVIIa が FVIII を活性化させ止血効果を増強させることが示唆された。APCC 惹起 FVIII 活性化によるインヒビターの影響を調べるため、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 活性化と開裂を検討した。エピトープに関係なく、反応後極早期に活性は 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、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。

(4)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 - FIIa/FXa 生成試験、凝固波形解析にて後天性血友病 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 患者に比べて凝固止血能が極めて劣っていた。さらに、本症 type 1 や type 2 患者ともさらに重症型血友病 A より止血能が低下していた。全例 C2 エピトープを有し、type 1 は FVIII/VWF や FVIII/PL 結合を抑制するも、FIIa 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 FIIa/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、重症血友病 A よりさらに凝固機能が劣る機序の 1 つとして寄与していた。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示唆する。

D. 考察・展望

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
6. 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.
7. Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2010
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

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. 第53回米国血液学会. 2011
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. 第52回米国血液学会. 2010
3. Ogiwara K, Nogami K, Tanaka I, Nishiya K, Tsujii N, Shima M. Tissue-factor pathway inhibitor causes unresponsiveness to activated prothrombin complex concentrates for hemophilia A patients with inhibitors. 第52回米国血液学会. 2010
4. Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Nishiya K, Takeyama M, Shibata M, Shima M. Effects of anti-FVIII inhibitors on factor VIIa/tissue factor catalyzed activation and inactivation of factor VIII. 第51回米国血液学会. 2009

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」

総合（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ACL9000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、インヒビター発生病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。

- 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。
- 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)。平成22年度は、研究の進捗が穏やかな原因を模索し、データ集積の効率化を進め、実施計画書の見直しを行い、平成23年度から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。
- 第3研究では、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ACL9000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。

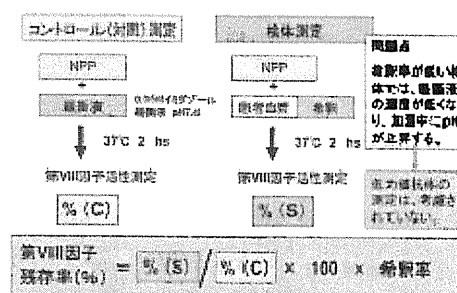


図1 ベセスダ法の問題点

まず、第VIII因子活性の測定法を標準化する必要があるが、昨年の研究において、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的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、インヒビター測定のNijmegen変法では正常プール血漿(NPP)のpHを安定させるために、固形のイミダゾールを加えて0.1Nとし1NのHClでpHを整えている。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。

- 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。平成 22 年度から名古屋大学を解析施設として加え、東京医大・奈良医大の 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。

平成 23 年度からは、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）

平成 19 年より継続し 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、論文投稿を行う。また、インヒビター発生患者を対象（J-HIS1；インヒビター発生患者の実態調査）にインヒビターの消失要因について解析を行う。平成 22 年度には、解析結果で血液型とインヒビターの消長との関連を示すデータが得られたが、欠損値が多いため再調査を実施する。

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 19 年度から構築してき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継続する。平成 23 年度には、より多くの症例集積を進めるため研究計画の見直しを行い、実施計画書を改定し調査研究を継続実施する。

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) 凝固因子活性測定法の検討

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

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

(2) Tokyo 変法の血漿 pH への影響

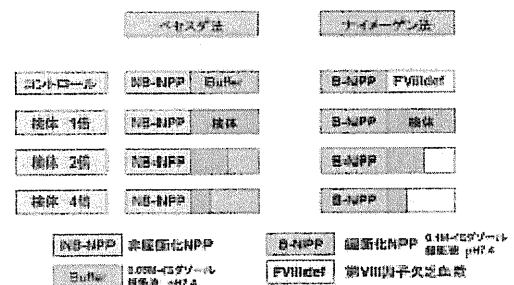


図 2 ベセスダ法とナイメーゲン変法

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。

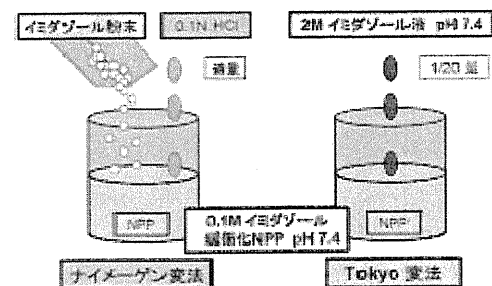


図3 原法とTokyo変法との違い

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)。

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。

(3) 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。

(4) 標準インヒビター血漿の特性

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

(5) 標準血漿の希釈法の開発

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

(6) Tokyo 変法を用いた再現性の検討

標準インヒビター血漿を生理食塩水を一次希釈液として約 10BU/ml まで希釈した後、第 VIII 因子欠乏血漿を二次希釈液として約 0.5、1.0、1.5、2.0BU/ml へ希釈し、再現性を検討した。

(7) Tokyo 変法を用いたインヒビター検出法の改善に向けての検討

これまでの検討の中で、Bethesda 法においては、計算の過程で誤差を拡大することが検証されたが、Bethesda 法の実際の測定範囲が 2.0B.U. 以下であることから、この測定範囲の誤差の発生を最小限にする計算方法の開発が必須である。少なくとも、臨床試験上に問題となりやすい低力価のインヒビターを再現性良く判定する方法を開発する。

(8) サーベイランス

標準インヒビター血漿および数検体のインヒビター患者血漿を用いてサーベイランスを行う。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。サーベイランスの結果から、施設間差の検証と実際の施設間差をさらに縮小する手段を検討する

①配布試料

- インヒビター血漿 (4 濃度: 約 0.5、1.0、1.5、2.0BU/ml)
- 正常プール血漿
- pH 調整液

②方法

- 各施設の通常法
- 研究班指定法

③回収成績

- 第 VIII 因子検量線
- コントロール第 VIII 因子活性 (3 回測)

- 定)
- c. 検体第 VIII 因子活性 (3 回測定)
- d. 残存第 VIII 因子%・ベセスダ単位値
- e. APTT 試薬名
- f. 塩化カルシウム濃度
- g. 測定機器
- h. 各試薬混合量
- h. 接触因子活性化時間
- i. 精度管理法

④集計方法

- a. 検量線の安定性
- b. コントロール第 VIII 因子活性の安定性と施設間差
- c. 検体第 VIII 因子活性の安定性と施設間差
- d. 残存第 VIII 因子%・ベセスダ単位値の安定性と施設間差
- e. APTT 試薬別検討
- f. 塩化カルシウム濃度の影響の検討

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 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）。

なお、J-HIS1 より得られた血液型とインヒビターの消長との関係について再調査を行いデータ数を増やしたところ、血液型の影響は消失した。

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）

平成 23 年度からは、5 月に新規血友病患者数を J-HIS 参加施設で調査し、症例登録予定数を確認するとともに、追跡調査を 1 年に 1 回に変更し、各施設での負担が少ない方法に変更した。

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

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 (80.6%)	25
	コージネイト FS バイオセット (6.5%)	2
	コンファクト F (3.2%)	1
	ノバクト M (9.7%)	3
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	0歳9か月 [0歳0ヶ月-3歳4ヶ月]
-------	---------------------

年齢	
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

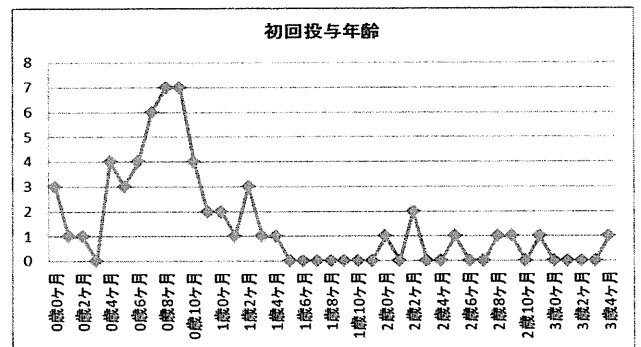


図4 初回投与年齢

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)
口の中(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 (4.1)

調査中 2 (40)

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)

(1) 第VIII因子活性測定法の検討

(ACL 9000)とAPTT試薬(ヒモスアイエル APTT-SP)において問題なく応用でき、検量線についての6回測定による再現性試験では、①から⑥の平均秒、SD、CV%は、それぞれ表1に示すとおりで良好な結果を示した。

活性%	平均・秒	SD	CV%
1.563	127.7	2.13	1.67

3.125	120.8	2.27	1.88
6.250	112.7	3.54	3.15
25.0	86.25	1.00	1.16
50.0	77.93	1.61	2.08
100	68.72	0.98	1.42

表7 検量線の再現性

FVIII用検量線

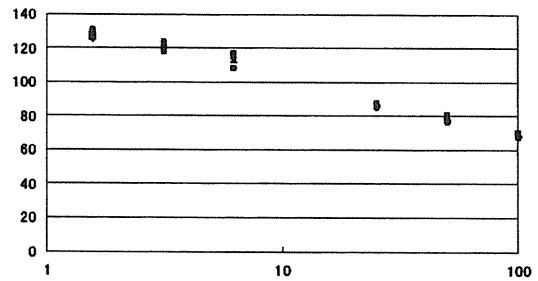


図5 FVIII:C 検量線

(2) Tokyo変法の血漿pHへの影響

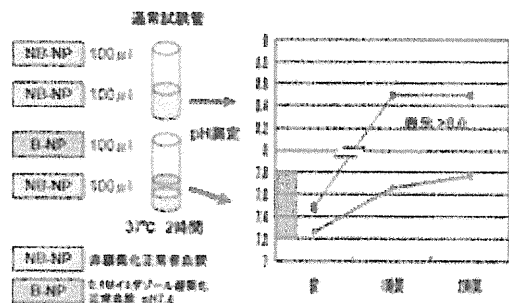


図6 37°C2時間加温後のpHの変化

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°C2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5)

(3) 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℃ 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。

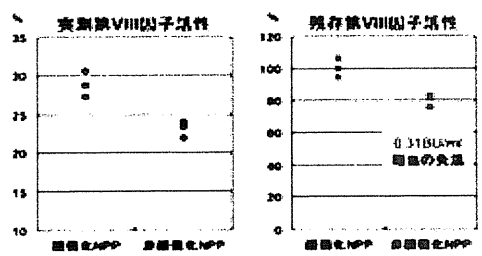


図7 37℃2時間加温後の第VIII因子活性の変化

(4) 基準インヒビター血漿の特性

図8 残存第VIII因子活性

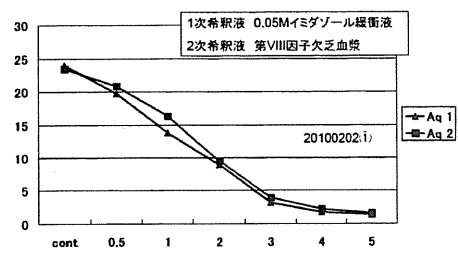


表8 インヒビター力価と第VIII因子活性

B U	co nt	0. 5	1	2	3	4	5
1	24	19	13	8.	3.	1.	1.
	.0	.7	.8	93	18	76	36
2	23	20	16	9.	3.	2.	1.
	.4	.8	.3	53	96	24	61

インヒビター血漿の濃度の増加とともに第VIII因子活性が急激に低下しており、タイプ1インヒビターの性質を示した。

(5) 標準血漿の希釈法の開発

図9

希釈液の影響 FVIII:C

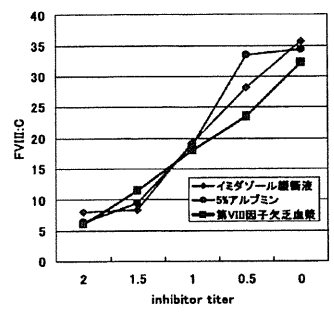
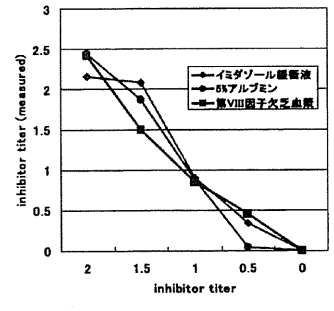


図10

希釈液の影響
インヒビター力価



(6) 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。

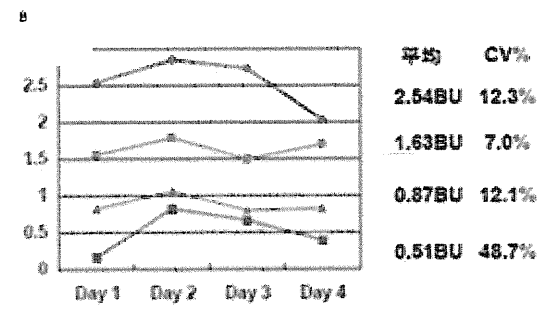


図11 同時再現性

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。

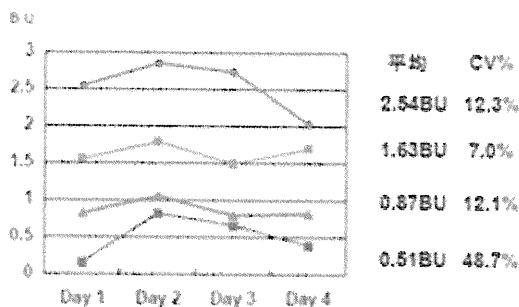


図 12 日差再現性

(7) Tokyo 変法を用たインヒビター検出法の改善に向けての検討

Bethesda 法の原理に基づいて計算式を求めると共に、残存第 VIII 因子活性の 10%変動の影響を求めたところ、インヒビターが低力価になるほど、図 12 に示すように誤差を大きく拡大することが検証された。

凝固活性 - 10% の Bethesda 法への影響
インヒビター濃度に対する変動の割合

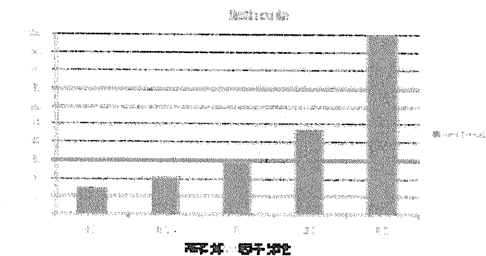


図 13 残存第 VIII 因子の 10%変動の影響

Bethesda 法の原理から、計算式は
 $\text{Log}_{10}(Y) = \text{Log}_{10}(0.5)X + 2$
 $X = (\text{Log}_{10}(Y) - 2) / \text{Log}_{10}(0.5)$
 $= \text{Log}_2(Y)$ となる。

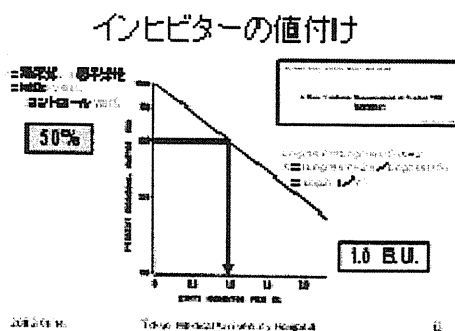


図 14 Bethesda 法の原理と計算式

従って、Bethesda 法は残存第 VIII 因子 %Y 値の逆数に対して関数として 2 を底とする対数関数を与えている。低値域の誤差を拡大する原因がこの対数関数にあることから、この関数を排除して Y 値の逆数を直接扱うことが精度を評価するには望ましい。ここでは、Y 値の逆数を仮の呼称として、Tokyo Inhibitor Index (TII) とし、測定誤差の TII への影響を比較した。

Bethesda 法への影響は図 9 に示したが、図 14 に示すように、各残存濃度において、TII は当然ながら同一の誤差範囲を示す。

凝固活性 - 10% の影響
インヒビター濃度に対する変動の割合

