

すと考えられている AAV ベクター中和抗体陽性症例に対して、その影響を回避するための有力な手段となると思われる。よって本研究は血友病遺伝子治療の臨床応用に向け、その投与方法に極めて重要な示唆を与えるものと考えている。

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。同結果により、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ベクター投与方法の開発」という当初の目的がほぼ達成されたと考えられる。今後は、より効率的でかつ対象患者に負担の少ない投与条件の適正化を図る予定である。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

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向けて、アデノ随伴ウイルス（AAV: adeno-associated virus）ベクターの Good Manufacturing Practice（GMP）グレードの製造を目的とし、医薬品製造支援会社（CMO: Contract Manufacturing Organization）におけるベクター製造について、技術支援を行なった。GMP レベル製造を完了し、前臨床安全性試験も進行中である。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）ベクターについてもベクター製造技術及び品質規格方法の改良を行い、臨床研究実施可能な技術として使用できる見通しとなった。

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、それに相応する技術の確立が必須である。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 8 型（AAV8）ベクターについても、当該基準を満たした製造法で生産する必要がある。本分担研究者は、血友病 B 遺伝子治療臨床研究の実施へ向けて、GMP 対応製造実施についての技術的助言、CMO 支援を実施するとともに、前臨床安全性試験に関わる支援を行ってきた。

一方、サル免疫不全ウイルス（Simian Immunodeficiency Virus: SIV）ベクターは、AAV8 ベクターのバックアップ或いは次世代技術として位置づけ、細胞治療・細胞シートによる臨床応用の可能性を検討している。有効性の検討とともに臨床研究実施を可能とするベクター製造法・品質検査法の確立に取り組んできた。

B. 研究方法

(1) hFIX 搭載 AAV8 ベクターの製造

(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 対応製造の技術的検討支援と CMO 支援を行った。GMP 対応製造は本元正陽基因技術有限公司（Vector Gene Technology Company Limited: VGTC）で行い、ベクターを用いた前臨床安全性試験は（Joinn Laboratories: Joinn）で実施するため、当社の医薬開発の経験に基づき相手方での準備と試験実施の支援を行った。

(2) SIV ベクターの GMP レベル対応製造技術の確立

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 μ m 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最適化を行った。また、製造物の品質検査（QC: Quality Control）に必要な項目を検討して標準作業手順書（SOP: Standard Operating Procedure）を整備し、本ベクター製造に関して統

合的なシステムを整備した。

C. 研究結果

(1) hFIX-AAV8 ベクターの製造

中国の CMO において、hFIX 搭載 AAV8 ベクターの GMP レベルでの製造が実施された。当社はこれに対する技術的支援を行い、各プラスミドの構築と製造法の検討を行った。また、前臨床安全性試験の実施については、試験実施に向けて Joinn と試験内容と実施技術について協議するなどの重要な技術支援を行なった。

(2) SIV ベクターの GMP レベル対応製造技術の確立

SIV ベクターの製造について、上流工程（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）および下流工程（精製条件）を最適化し、また、製造物の品質検査（QC: Quality Control）に必要な項目を検討して標準作業手順書（SOP: Standard Operating Procedure）を整備した。その上で、同ベクター薬剤について、GMP レベル製造を可能とする技術を確立した。

D. 考察

hFIX 搭載 AAV8 ベクターの GMP レベル製造の実施について、技術的支援を行った。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歩であった。GMP レベル製造物を用いた前臨床安全性試験についても進行中である。これらの実施により、本遺伝子治療の臨床研究の実施条件が整備されることになる。次年度予定の臨床研究の実現を目指し、本分担研究者の担当する支援を継続していく方針である。

SIV ベクターについても、生産性の向上とともに、QC 項目の設定と SOP の整備を順次進めてきたことにより、GMP 製造の実施に目処がついた。こちらも臨床応用へ向けての準備が整ってきているが、次年度はその完成を目指す。

E. 結論

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、安全性試験実施を進行させている。このように、次年度以降の臨床研究の実施準備が整いつつある。

SIV ベクターについても、臨床研究実施可能な

技術が確立される見通しとなり、本疾患治療への手厚い技術整備がなされている。

F. 研究発表

1 論文発表

なし

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.

G. 知的財産権の取得状況

「ヘマグルチニン活性を有するシュードタイプレトロウイルス vector」

出願番号：特願 2000-169090

海外出願各国移行済み

「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」(D3-A0103)

出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8)

状態：審査請求済み

「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」(D3-A0204)

出願番号：特願 2002-258576 (2002/9/4)

状態：出願公開中。

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:

本研究班の目標である遺伝子治療や細胞治療を含め、今後の血友病医療においては患者の病態に基くオーダーメイド的な対応が必須である。遺伝子情報は個々の患者の特徴を把握するうえで非常に有用であり、特に責任遺伝子の情報は最も基本的かつ重要である。

これまで我々は日本人血友病 A 患者を対象に、第 VIII 因子遺伝子(F8)における病因遺伝子変異の解析から病態との関連を解析することで、血友病医療に応用可能な知見の獲得を目指してきた。しかしながら病因遺伝子変異は極めて多種多様であり、また変異ごとの病態も画一的ではなかったことから、目的を達成するためにはより多くの症例についての解析が必要であると考えた。今期は病因遺伝子変異の解析をベースとして、1)本邦に特有の創始者効果、2)稀有な挿入変異症例、3)病因遺伝子変異未検出症例、についても検討を行った。またさらに、SNP(single nucleotide polymorphism)に基づく 4 個所の非同義変異(Non-synonymous mutation)が形成する第 VIII 因子(FVIII)ハプロタイプについても解析した。

この 3 年間に血友病 A 26 例の解析を施行し、24 症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。軽症例から高頻度に検出された Tyr473Cys 変異は、F8 のハプロタイプ解析から、本邦における創始者効果であることが強く示唆された。このことから軽症の病因変異の一部は、発生から長い年月を経る中で地域に浸透し、国や民族単位での特徴を形成し得る可能性が推察された。2 例で検出された非 LTR 型レトロトランスポゾン(Alu エlementの約 330bp および LINE-1 エlementの 2, 134bp)の挿入変異はともに非常に稀有であり、このような変異の存在が確認できたことは意義深く、また病因変異の多様性を再認識するものであった。通常の解析法では病因遺伝子変異が検出困難であった症例うちの 2 例では、異所性発現による mRNA の解析などからイントロンの深部に点変異が同定された。両点変異はともに新たなスプライス供与部位を形成することが in silico 解析で予測され、これによる異常スプライシングが血友病を引き起こす可能性が強く示唆された。

FVIII ハプロタイプの解析では、日本人のハプロタイプとその頻度は白人のそれと同様であり、その他の人種とは異なるであろう結果が得られた。

これらの結果は病因遺伝子変異の重要性と多様性を再認識させるものであり、今後も継続的な遺伝子解析が必要であると考えられる。

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。現在、血友病医療は遺伝子組み換え製剤や血漿由来製剤を用いた補充療法が一般的である。しかしながら近年、新規治療薬や新規治療法の研究開発が目覚ましい勢いで進んで来ており、血友病医療は患者の特徴に基づいた本格的なオーダーメイド医療が展開可能な時代を向えつつある。

個々の患者の特徴を把握するうえで遺伝子情報は非常に有用である。特に単一遺伝子疾患である血友病 A では、責任遺伝子からの情報が発生機構や病態を決定する最も基本的かつ重要な情報となる。これまで我々は、日本人血友病 A 患者の病因遺伝子変異の同定・解析を積極的に進め、オーダーメイド医療に応用可能な知見の獲得を目指してきた。しかしながら病因遺伝子変異は極めて多種多様であり、またこれに由来するフェノタイプも画一的ではなく、目的を達成するためにはさらなる症例の解析が必要であると考えられた。

また近年、非同義変異(Non-synonymous mutation)のによって形成されるハプロタイプのミスマッチが、補充療法に伴って発生する抗第 VIII 因子同種抗体(インヒビター)の出現頻度に関与しているのではないかとの仮説が報告された。そこで、このハプロタイプについても併せて解析を行った。

B. 研究方法

1. F8 塩基配列解析

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は 33 反応の 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クエ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. F8 ハプロタイプ解析

F8 のハプロタイプは 3 種類の SNP(rs6649625, rs1470586, rs1800291)と 1 種類の STR(イントロン 13 内 CA リピート)の解析から決定した。SNP と STR はそれぞれ、多型部位を含む領域を PCR にて増幅し、SNP は増幅産物を制限酵素で切断し、STR は増幅産物の塩基配列を決定して解析した。

3. 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)を用いて解析した。

4. F8 mRNA の解析

末梢血白血球から QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出し、サンプルとした。F8 mRNA の解析は El-Maarri らの報告した二段階 RT-PCR 法を用いて行った。すなわち、全長の F8 mRNA をまず 4 分割して RT-PCR にて増幅後、各増幅産物をさらに 2 分割して通常の PCR にて増幅し、得られた産物を観察した。mRNA 量は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)で cDNA を合成した後、4 種類の TaqMan Gene Expression Assay (Hs00240767_m1; エクソン 1-2 間を増幅、Hs01109548_m1; エクソン 6-7 間を増幅、Hs01109541_m1; エクソン 14-15 間を増幅、Hs01109543_m1; エクソン 20-12 間を増幅、Applied Biosystems)を用いて定量化を試みた。定量は白人男性の肝細胞由来の total RNA (Firstchoice human liver total RNA, Ambion)から同様の操作にて作製した cDNA を対照とし、デルタデルタ Ct 法を用いた半定量を行った。

5. 凝固学的解析

VIII 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段階で行った。

6. 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>)と 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. 病因遺伝子変異の同定

今期の研究では、重症18例、中等症3例、軽症5例の計26例の血友病A症例のF8を解析した。その結果、24例で病因と考えられる変異を同定し得た。同定された変異の内訳はミスセンス変異9例、ナンセンス変異1例、逆位7例、欠失5例、挿入2例であった。

2. ミスセンス変異

ミスセンス変異は9種類(Arg282Cys、Tyr473Cys、Arg1689Cys、Asp1740Asn、Thr1985Lys、Gln2087Gly、Gly2088Ser、Thr2161Ile、Thr2245Ala)検出された。同一の変異が検出されなかったことからバリエーションの豊富さが窺われた。このうちThr1985Lysと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が、アミノ酸置換によって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、病因である可能性が示唆された。

CpG ダイヌクレオチドでの変異でないにもかかわらず日本人から高頻度に検出されたTyr473Cysについて、創始者効果である可能性を検討するため3種類のSNPと1種類のSTRによるF8ハプロタイプの解析を行ったところ、この変異を有した6例は独立した同一のハプロタイプを有していた。

3. 欠失変異

今期検出された欠失は、エクソン1を含む大規模(5kb以上)な欠失以外は、1または3塩基の欠失であった。フレームシフトを生じないものやエクソン14内のpoly Aでの欠失など、表現型の軽症化が予想されるものも含まれたが、患者の表現型すべて重症であった。

4. 挿入変異

2例から非LTR型レトロトランスポゾンの挿入変異を同定した。

重症例の1例から検出された挿入変異は約330bpの大きさで、エクソン19から19bp上流のイントロン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エレメントであることが確認された。

臨床症状としては典型的ではないものの、FVIII活性では中等症に分類される1例から検出された挿入変異は約2,134bpの大きさで、エクソン16から98bp下流のイントロン16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、長鎖散在反復配列であるLINE-1エレメントであることが確認された。

5. イントロン深部から検出された点変異

今期の解析ではイントロン深部から2例の点変異を同定した。1例はアデニンからグアニンへのトランジションがエクソン10から325bp下流のイントロン10内で検出された(c.1537+325A>G)。もう1例もアデニンからグアニ

ンへのトランジションで、こちらはエクソン9から602bp下流のイントロン9内で検出された(c.1443+602A>G)。検出された変異はともに変異としてもポリモルフィズムとしてもこれまでに報告されておらず、また我々の行った日本人F8からも検出されない稀有なものであり、新たなスプライス供与部位を形成するであろうことがin silico解析で予測された。

6. 非同義変異(Non-synonymous mutation)の解析とハプロタイプ

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。他人種にて存在が確認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

今後の血友病医療は患者の特徴に基づきオーダーメイド化を図る必要がある。特に本研究班が目標とす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、患者の病態を可能な限り詳細に把握することは必須である。遺伝子情報は個々の患者の特徴を把握するために有用であり、なかでもF8の病因変異は病態を把握するうえで最も基本的かつ有用な情報である。

1. 病因遺伝子変異

血友病Aの病因遺伝子変異は多種多様である。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、個々の患者ごとにユニークであるといっても過言ではない。実際、今期検出された変異も、逆位以外は患者ごとに異なり、HADB(Haemophilia A Mutation Database)に登録のないものも検出された。このことは、血友病A

患者の特徴を明確にするうえでF8の解析は必須であることを示唆していた。

1) ミスセンス変異

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。

Arg282Cysは点変異のホットスポットであるCpGダイヌクレオチドでのシトシンからチミンへの変異でありHADBにも10例の登録がある。一般的にミスセンス変異は軽症または中等症を引き起こす。Arg282はA1ドメイン上のA2ドメインとの接触面に位置しており、10Å以内の近傍に、A1ドメインにはAla284が、A2ドメインにはArg531がある。Ala284とArg531での変異がともに軽症を引き起こし、また測定法によって異なったFVIII活性を示す変異として報告

されていることから、Arg282 も同様の表現型を呈することが予測されたが、本症例は重症型であった。HADBに登録されている10例のうちの9例も重症型であることを考えると、Arg282Cys は重症型を引き起こす変異であると考えられた。荷電が失われることやフリーのCys 残基が生ずることで立体構造が大きく変化することが原因ではないかと考察される。

Tyr473Cys は CpG ダイヌクレオチドでの変異でないにもかかわらず高頻度に日本人から検出された。F8 ハプロタイプの解析結果、この変異を有する6名のF8は、固有の同一ハプロタイプであることが判明した。このことは本変異の起源が一致する可能性、すなわち創始者効果であることを示唆していた。本変異のように軽症を引き起こす変異であり、かつホットスポットでない場所に起こった点変異は、長い年月を経る中で地域に伝播・浸透し、民族あるいは国に特有な変異の構成の形成に関与している可能性が示唆された。

2) 挿入変異

今期の解析では2例から非LTR型レトロトランスポソンの挿入変異を同定した。このような挿入は極めて稀有であり、検出できたことは非常に意義深いことであった。Alu は全長約300塩基の長さであり、ヒトゲノムの約10%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。今回、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内に挿入していた。LINE-1は全長約6,000塩基の長さであり、ヒトゲノムの約20%を占める。ヒトゲノム中には500,000コピー以上存在し、F8内にも74コピー存在する。今回、検出されたLINE-1挿入は、完全長の約3分の1がイントロン16内に挿入していた。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HADBにも数例が登録されているのみである。特にLINE-1の挿入変異については、病因遺伝子変異としてはエクソン14内で2例が報告されているのみであ

る。両挿入変異はイントロン内に存在していたため、病因であるかは現在のところ明らかではないが、逆位を含めた他の遺伝子変異が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た。in silico 解析ではLINE-1の挿入変異ではスプライシングへの影響が予測されたが、Aluの挿入変異では影響が予測されなかった。今後、患者のmRNAを解析し病因変異であることを確認する予定である。

3) イントロン深部の点変異

今期のF8解析において、通常解析で変異が検出されなかったためmRNAの解析を施行したことによって検出された1例、およびイントロン深部にアニーリングするように設計されていたプライマーを使用したことにより偶然検出された1例から、イントロンの深部にともに新たなスプライス供与部位を形成する点変異(c. 1537+325A>G, c. 1443+602A>G)を検出した。コーディング領域とその近傍をPCRにて増幅して解析する手法は、現在最も一般的に用いられている。しかしながらF8の場合、この方法で解析できる範囲は遺伝子全体のおよそ1割程度にしか過ぎず、このためか約2%の患者では病因遺伝子変異が検出できないとの報告がある。残りのイントロン領域での変異は、mRNAの合成障害などにより間接的に血友病Aを引き起こす可能性がある。実際、今回偶然に検出されたイントロン深部の点変異もmRNAに異常を来たし、これが病因であると考えられた。このことから、異所性発現ではあるが、白血球から抽出したF8 mRNAを解析することは、未知の変異を検出するうえで、また検出された変異が病因であることを検証するうえで非常に有効であると考えられる。

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と仮説が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多く用いられている。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て施行した。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未だ明確にはなっておらず、今後の検討が必要である。しかし今回のハプロタイプ解析結果は、日本人と白人の FVIII の近似性を示唆するものであった。

E. 結論

日本人血友病 A 患者の F8 を対象とし、遺伝子解析から血友病医療に応用可能な知見の獲得を試みた。病因遺伝子変異が非常に多様であったことは、患者の特徴を把握するうえでは患者ごとの解析が必須であること再認識させられるものであった。しかし一方で、軽症型血友病 A を引き起こす一部のミスセンス変異は、創始者効果として本邦に広く浸透していることが確認され、そしてこれが日本人の病因変異の特徴を形成するであろうことが示唆された。遺伝子解析は血友病医療の発展と充実には必要不可欠であり、今後も継続的な解析が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 三浦 明、伊藤 俊広、嶋 緑倫、稲葉 浩、福武 勝幸、新井 盛大、鈴木 宗三、石川 正明、酒井 秀章. 化膿性股関節炎の術後重篤な出血をきたし、インヒビターが一過性に出現した異常第 VIII 因子(Thr1774Asn)を有する軽症血友病 A(CRM+)の一例 日本血栓止血学会誌 20: 56-65, 2009
- 2) 清田育男、篠澤圭子、大瀧 学、藤田進、鈴木隆史、天野景裕、稲葉 浩、福武勝幸 重症型血友病 B の第 IX 因子遺伝子内に検出された2つの遺伝子変異の検討 臨床病理 57:417-424, 2009
- 3) Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Suzuki T, Yamamoto Y, Amano K Fukutake K: Factor VIII haplotypes of Japanese population show similarity to those of Caucasian populations. Haemophilia. 2011 Dec 19. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02715.x. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 篠澤圭子、田中朝志、天野景裕、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 先天性第 V 因子欠乏症複合ヘテロ接合体症例における血小板 FV の検討 日本検査血液学会 2009 年 甲府
- 2) 篠澤圭子、鈴木隆史、天野景裕、稲葉 浩、福武勝幸 シグナルペプチドに検出した先天性第 VII 因子欠乏症のミスセンス変異(L-48P)の解析 日本血栓止血学会 2009 年 小倉
- 3) 佐藤哲司、酒井道生、白幡 聡、稲葉 浩、嶋 緑倫、福武勝幸、山下 文、上玉利 彰 血友病 A 分子異常症の 1 例 日本血栓止血学会 2009 年 小倉
- 4) 稲葉 浩、小山高敏、篠澤圭子、福武勝幸 稀な遺伝子異常を病因とする血友病 A に発生した抗第 VIII 因子抗体 日本血栓止血学会 2009 年 小倉
- 5) 篠澤圭子、大瀧 学、天野景裕、清田育男、

- 鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 血友病B患者の遺伝子解析における MLPA 法の検討 日本臨床検査医学会 2009年 札幌
- 6) 大瀧 学、篠澤圭子、清田育男、鈴木隆史、稲葉 浩、天野景裕、福武勝幸 先天性アンチトロンビン欠乏症の遺伝子解析に MLPA 法を用いた一例 日本臨床検査医学会 2009年 札幌
- 7) 篠澤圭子、稲葉 浩、天野景裕、清田育男、大瀧 学、鈴木隆史、福武勝幸 血友病Aの遺伝子解析における MLPA 法の検討 日本血液学会 2009年 京都
- 8) 稲葉 浩、篠澤圭子、小山高敏、矢富 裕、三浦 明、福武勝幸 日本人血友病 A 患者の病因遺伝子異常とその由来 -第 VIII 因子遺伝子ハプロタイプの解析から- 日本血液学会 2009年 京都
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) Inaba H Laboratorial heterogeneity in moderate to mild hemophilia A. 第4回東アジア血友病フォーラム 2011年6月 天津市
- 17) Inaba H, Shinozawa K, Suzuki T, Otaki M, Seita I, Ogata K, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Hagiwara T, Yamamoto Y, Amano K, Fukutake K Mutation analysis of hemophilia A in the Japanese population: increased prevalence of Tyr473Cys caused by founder effect. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市
- 18) Shinozawa K, Maeda K, Amano K, Abe M, Inaba H, Fukutake K Factor V deficiency due to FV Phe190Ser homozygous mutation, but no bleeding tendency. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市
- 19) 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 VIII binding assay and gene analysis. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市

20) 篠澤圭子、沖本由理、天野景裕、萩原剛、角田治美、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 重度の出血症状を示す先天性第 V 因子欠乏症の新しい複合ヘテロ接合体変異 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 名古屋市

21) Hagiwara T, Shinozawa K, Amano K, Inaba H, Yamamoto Y, Suzuki T, Ogata K, Otaki M, Seita I, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Fukutake K Female hemophilia B with homozygous missense mutation p. Ala337Val in the factor IX gene. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 名古屋市

22) 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 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 2011 年 11 月 岡山市

23) Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K The etiology of hemophilia hiding deep inside the *F8* intronic sequence. 第 53 回米国血液学会 2011 年 12 月 サンディエゴ市

24) Shinozawa K, Okimoto Y, Amano K, Kakuda H, Hagiwara T, Suzuki T, Inaba H, Fukutake K Severe factor V deficiency caused by a novel compound heterozygous mutation: factor V G1617V and 1-bp insertion. 第 53 回米国血液学会 2011 年 12 月 サンディエゴ市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働省研究費補助金（血友病研究事業）

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、その基準を基に行った 51 例 99 手術の結果を報告する。

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 2006 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症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年の手術件数は14件で、2007年から2011年12月までの手術件数は99件であった。全体として63例113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11手術（9.7%）であった。HCV抗体が陽性であったのは101手術（89.4%）でこのうちHCV-RNAが検出されたのは29手術、検出されなかったのは61手術であった。一方HIV抗体が陽性であったのは39手術（34.5%）で、このうち1手術だけがHCV抗体陰性で、残りの38手術はHCV/HIV重複感染手術症例であった。

2006-の14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①150/ μ l以上、かつHIV-RNA量が検出感度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腹部造影CTを行い、HCCがない場合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。また腹部CTで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。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。

2007年-2012年12月までの99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。

その他手術適応に問題がないと評価された症例における術後合併症は、皮膚縫合不全が4例4手術、感染症が3例5手術で見られた。皮膚縫合不全は足関節手術に多くみられた。感染症は術前に感染が見られた1例3手術以外の2例はインヒビター症例であった。血栓症を呈する症例はなかった。

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、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99例において、HIVやHCVの感染症が手術に悪影響を与えたと判断される事例は一例も発生していない。しかしそれ以前の14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も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/mcl 以上且つ HIV-RNA が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/mcl 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/mcl 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 50 個/mcl とした。その基準であれば、従来の基準で手術検討要と判断された症例が、手術可能となる。

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 6%6 手術と少なく、2010 年以降一例もない。手術患者を紹介して頂ける施設に、この診断基準が浸透してきているためかもしれない。

血友病において、ウイルス感染症は内科的手術を決定する際の特徴である。しかし血友病患者の高齢化に伴って、それ以外の問題も最近無視できない状況になってきている。特に整形外科の下肢手術に危険性が高まる深部静脈血栓症の発生については、凝固異常である血友病であっても血液製剤補充により凝固系が手術治療期間中正常化されているため、注意深く状況を把握する必要がある。また一般的な糖尿病や高血圧症などの内科的疾患の罹患率も高率になることが予想される。さらに今回の調査で高率に感染症がインヒビター

症例に見られたなど、手術適応を決定する際の考慮すべき項目をさらに検討する必要があると考えられた。

E: 結論

13 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、99 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 (6%) で、手術への影響は認められず、適切な手術適応基準であると評価できた。しかし深部静脈血栓症など血友病患者の高齢化に伴い、さらに評価すべき項目もあり、手術適応の内科的判断について、今後も検討していく必要があると考えられる。

F: 研究発表

- 1) 竹谷英之. 血友病性関節症. 小児内科. 41 : 1063-1069, 2009
- 2) 竹谷英之. 血友病性関節症に対する関節鏡視下滑膜切除術の経験. 28. 532-535, 2009
- 3) 竹谷英之. 合併症の予防と治療、血友病性関節症の整形外科治療. みんなに役立つ血友病の基礎と臨床. 白幡聡編. 2009.198-206
- 4) Takedani H, Fujii T, Kobayashi Y, Haga N, Tatsunami S, Fujii T. Inter-observer reliability of three different radiographic scores for adult haemophilia. Haemophilia. 2010 Sep 2.
- 5) 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.
- 6) Takedani H, Kawahara H, Kajiwaru M. Major orthopaedic surgeries for haemophilia with inhibitors using rFVIIa. Haemophilia. 2010 Mar;16(2):290-5.

G:知的財産権の出版・登録状況

なし

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）

研究協力者：血液凝固異常症 QOL 調査委員（五十音順）

大平勝美（はばたき福祉事業団）、小島賢一（荻窪病院血液科）、白幡 聡（北九州八幡東病院）、鈴木 輝江（静岡県へモフィリア友の会）、竹谷英之（東京大学医科学研究所附属病院関節外科）、立浪 忍（聖マリアンナ医科大学医学統計学）、仁科 豊（仁科・深道法律事務所）、花井十伍（ネットワーク医療と人権）、堀越泰雄（静岡県立こども病院血液腫瘍科）、牧野健一郎（相生リハビリテーションクリニック）、松本剛史（三重大学医学部附属病院輸血部）、吉川喜美枝（聖マリアンナ医科大学病院看護部）、和田育子（荻窪病院看護部）

研究要旨

本研究は、わが国の血液凝固異常症における生活状況を調査し、現在何が問題となっているのか、また、その QOL を改善するためには何が必要なのかを把握することを目的として行われた。包括的な調査を行なうため血友病医療に関係する各職種および患者を含めた研究協力者を血液凝固異常症 QOL 調査運営委員として新たに選定した。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う方式を取ることにした。前回の調査の不足項目を追加するなど調査票を全面改定し、現在 QOL 改善のために患者の皆様が何を必要とおられるのかにつき最新の情報を集めるため、患者の視点に立脚した包括的な調査票を作成した。また、新たに医療関係者と患者あるいは保護者の QOL に対する意識を比較検討するために医療関係者に対するアンケート調査を行った。詳細は、「血液凝固異常症の QOL に関する研究 平成 22 および 23 年度調査報告書」に記載した。

A. 研究目的

血友病等の血液凝固異常症は出血および出血の後遺症のみならず、非加熱製剤に因る HIV 感染、肝疾患（肝硬変、肝癌）など身体的な問題や社会的偏見・差別などの社会的にも解決されるべき多くの課題が残されている。本研究は血液凝固異常症の QOL

調査を包括的に患者の視点に立脚して行うことにより、血液凝固異常症の QOL を総合的に評価する。また、今回の調査では、前回調査で欠落した項目を追加して最新の情報を集め、前回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患者による評価、患者と医療関係者が

考える QOL 阻害要因が一致しているかどうかについても検討し、さらに自由記載欄から患者でなくては分からない視点からの問題点などを明らかにする。

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配布し、記入された調査用紙を料金後納郵便として匿名で事務局に直接返送してもらった。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・ソーシャルワーカー、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、歯科受診に関すること、筋骨格系障害と整形外科、リハビリの受診状況、医療施設に関すること、社会生活に関するこ

と、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こと、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、肝炎に関することである。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 番目までを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に対する人権擁護上の配慮は、患者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する。この調査の実施にあたり、疫学に関する倫理指針 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医科大学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

1) 重症と中等症の年間出血回数の比較

平成 22 年度の一次解析で、1 年間の近似平均による出血回数は、重症、中等症、軽

症でそれぞれ 22.0 回、20.6 回、7.7 回と軽症は他の群に比較し有意に少なかったが、重症と中等症に差が認められなかった。重症と中等症に差異がなかったことに関して、定期補充療法の関与が考えられたため同治療法の「無し」の患者で比較した場合、1 年間の近似平均による出血回数は、重症、中等症、軽症でそれぞれ 30.0 ± 17.2 回（平均 \pm 標準偏差）、 20.3 ± 16.9 回、 6.6 ± 7.5 回と重症 > 中等症 > 軽症の順であった ($p < 0.01$)。したがって、前回の報告での重症と中等症に差が認められなかった理由として、定期補充療法により重症型の出血が減少した結果生じたものと考えられた。

2) 重症と中等症の年間関節内出血回数の比較

出血回数と同様に関節内出血に関しても平成 22 年度の一次解析で、1 年間の近似平均は、重症、中等症、軽症でそれぞれ 17.5 回、18.5 回、5.0 回と軽症は他の群に比較し有意に少なかったが、重症と中等症に差がみられなかった。この結果に関しても、定期補充療法の関与が考えられたので、定期補充療法の「無し」の患者で重症度により比較した。1 年間の近似平均による関節内出血回数は、重症、中等症、軽症でそれぞれ 24.0 ± 17.2 回（平均 \pm 標準偏差）、 18.5 ± 15.8 回、 4.0 ± 3.7 回と軽症は重症 ($p < 0.001$)、中等症 ($p < 0.01$) より有意に少なかったが、重症と中等症には有意な差異はみられず、中等症患者の関節内出血は、予想以上に多いことが示唆された。

3) 在宅自己注射（家庭注射）実施率の 2006 年度調査と 2009 年度調査の比較

在宅自己注射の実施率は、2006 年度では

全体の 77.3%、2009 年度では 83.5%と有意に増加している ($p < 0.01$) ことが示唆された。

4) 定期補充療法の実施率の 2006 年度調査と 2009 年度調査の比較

定期補充療法の実施率は、2006 年度では 50.5%、2009 年度では 59.1%と有意に増加している ($p < 0.01$) ことが示唆された。

5) 定期補充療法の遵守率

2009 年度の調査結果であるが、一部の例を除き、定期補充療法の遵守率は 80%以上が大半を占め、極めて良好であることが示唆された。年齢ごとの遵守率は、10 歳未満の低年齢層の遵守率は極めて良好であるが、10 歳代、20 歳以上、50 歳以上と徐々に低下する傾向がみられた。

6) 整形外科受診状況と関連項目

整形外科受診に有意な関係を示した関連項目は、患者会への参加、血友病の重症度、インヒビターの有無、自己注射の有無、定期補充療法の有無、整形外科・リハビリの必要性であった。一方、標的関節、通常診療施設の状況、訪問看護、そして関節症の生活や治療への影響では有意差を認めなかった。整形外科に受診している患者の多くは、患者会などへの参加状況もよく、自己注射や定期補充療法が行われている血友病治療に対する認識や理解が高い患者、自己注射や定期補充の必要な関節内出血の多い患者、そして重症血友病もしくはインヒビターを保有している関節症への進行が危惧される患者と考えられた。

7) リハビリ受診状況と関連項目

リハビリ受診に有意な関係を示した関連項目はインヒビター、自己注射の可否、定期補充療法の有無であった。さらに過去に足関節や肩関節が標的関節であったことも有意な関係を示したが、これらの項目は整形外科の受診状況には影響を与えていなかった。その他の関連項目については、有意差はみられなかった。

8) 医療施設の受診と受診科

具体的に通院している医療施設は、地元の専門医療施設 60%、遠隔地の専門医療施設 37%、地元の非専門医療施設(以下、一般医療施設と記す)19%となり、実際に専門性を指向し、何らかの形で専門医療施設にかかっている患者は 87%に及んでいた。現在、小児科に通院する血友病患者は 39.1%であるが、その 3 割が成人で、16 歳以上も含めると 4 割になることが分かった。

9) 通院回数と通院時間

通院回数は、地元であるほど、在宅自己注射ができないほど増える傾向であったが、最頻値をみると専門医療施設—一般医療施設、地元専門医療施設—遠隔専門医療施設、いずれも差がなく、最も多い通院回数は月 1 回程度であることも分かった。平均通院時間は地元一般医療施設 28 分、地元専門医療施設 46 分、遠隔の専門医療施設 1 時間 46 分となった。

10) 医療施設への満足度

情報提供・相談体制・患者会等についての満足度は、一般医療施設の方が低く評価された。救急時対応は患者が医療施設を選

択する要因として重要視される要因のひとつである。遠隔地の専門医療施設への患者の満足度の方が一般医療施設より高い実態が判明した。血友病患者は医療機関を選ぶ時、疾病に関する専門性を重視して判断するが、その医療施設に満足できるかについては、相談機能や情報提供など、施設のコミュニケーション機能が深く関係していることが分かった。

11) 就業と所得

血友病患者の就業率は一般男性と比較し全年齢層で就労率が低かった。所得階層別でみると血友病患者は一般男性と比較し低所得に分布していた ($p < 0.001$)。被雇用者を雇用形態別にみると、血友病患者では一般男性と比較して契約社員(派遣社員)の割合が高かった ($p < 0.05$)。正規雇用されている血友病患者で身障者枠利用をした就業割合は HIV 感染者と非感染者で有意差はみられなかった。25 歳から 64 歳の血友病患者で HIV 感染者と非感染者の就業者割合の比較を行ったところ、HIV 感染者では非感染者に比べて有意に就業率が低かった ($p < 0.05$)。肝硬変・肝癌発症患者とそれ以外の患者の就業者割合の比較を行ったところ、肝硬変・肝癌発症患者では就業率が低い傾向があった傾向があったが、統計学的な有意差は見られなかった ($p = 0.08$)。

12) 職場の理解に対する心配や不安

身障者枠採用では病気の申告がなされており職場の理解を得やすいと推測されたが、有意差はなかった (NS)。正規雇用者における HIV 感染者と非感染者での比較では、感染者で職場の理解に対して心配や不安を

持つ患者が多かった ($p<0.05$)。HCV に感染し肝硬変・肝癌を発症している血友病患者は、そうではない血友病患者に比べ職場の理解に対して心配や不安を持つ患者が多かった ($p<0.05$)。

13) 自由記載欄のテキスト型解析

自由記載に使用された単語の中で、使用頻度の上位 3 つの単語は、「血友病」、「注射」、「不安」であった。各項目、即ち 1) 医療制度・医療体制については、「血友病」、「病院」、「Dr・医師」；2) 社会・生活については、「生活」、「不安」、「病気」；3) 治療法については、「注射」、「治療法」、「治療」、「治療法」と「治療」を除くと「完治」と「製剤」が同数で 2 位)；4) 病状については、「出血」、「関節」、「今」；5) 患者会などについては、「患者会」、「参加」、「情報」；6) その他 (今回の調査票の内容についてなど) については、「患者」、「調査」、「血友病」となっていた。回答に使用された単語の関係性、いくつかの単語と使用頻度と背景因子との関係などについては、「血友病」という単語が「偏見」や「差別」といった単語と結びついており、また、「病気」という単語は「イジメ」という単語とも近い。「遺伝子治療」の単語を用いた記載が増え、単語の配置図にも登場した。「飲み薬」という単語は「注射」および「効果」とつながっている。「整形」あるいは「整形外科」という単語は高頻度では使用されていなかった。病状に関して高頻度で使用された「関節」という単語は、医療体制・医療制度あるいは治療法についての配置図では高頻度単語として現れず、社会・生活についての記載において登場している。肝炎についての記載

があまり多くはなかった。患者会などについての記載の中では、「参加」という単語が「できない」とも結びつきが強く、患者会が情報交換に有用であると考えられる回答が多いながら、「参加できない」という回答もみられた。

14) 患者・家族と医療関係者の考える QOL を低下させる要因の比較

小児に対して患者・家族が考える患者の QOL を低下させる原因の上位 5 位は、出血、頻回の静脈注射、関節障害、幼稚園・学校生活の制限、インヒビターの順で、医療関係者と全く同一であった。一方、成人に対して患者・家族が考える患者の QOL を低下させる原因の上位 5 位は、関節障害、出血、肝疾患、頻回の静脈注射、就業の問題で、医療関係者では上位 3 位までは同一で、次いで就業の問題、HIV 感染であった。

D. 考察

中等症患者の関節内出血が想定以上に多いことが明らかとなり、少なくとも関節内出血頻度が増加した中等症患者に対しては、定期補充療法、整形外科、リハビリテーション科との連携により関節出血の悪循環を断つ対策を講じる必要があると考えられた。今回得られた成績から、遺伝子治療の凝固因子の目標レベルは従来 1%以上とされているが、関節障害発症の予防的観点からは数%以上できれば 5%以上となるように設定する必要性が示唆された。

整形外科や理学療法を受診する動機は、関節症状の発生であり、その治療のために一時的に受診する傾向が強く、さらに受診を継続している患者には関節症の把握と進