

因子・活性型第 VII 因子の強発現はいずれもインヒビター陽性血友病 A マウスの出血傾向を軽減しえたことから、第 VII 因子・活性型第 VII 因子の強発現はインヒビター陽性血友病遺伝子治療の候補となると考えられた。特に、第 VII 因子の強発現は活性型第 VII 因子の強発現よりも安全性に優れていると考えられた。第 VIII 因子欠損マウスと PAI-1 欠損マウスとの交配により得られた FVIII^{-/y} , PAI-1^{-/-}マウスを用いた検討からは、第 VIII 因子抗原の反復感作に対する免疫応答性は、FVIII^{-/y} , -/-PAI-1^{+/+} が 62.6 ± 16.4 BU/mL (n=21)であったのに対して、FVIII^{-/y} , -/-PAI-1^{+/-} では 38.7 ± 22.7 BU/mL (n=13)、FVIII^{-/y} , -/-PAI-1^{-/-}で 10.9 ± 4.8 BU/mL (n=16)と、PAI-1 遺伝子を欠損させることにより産生される抗第 VIII 因子抗体価の有意な減少を認めた。また、FVIII 反復刺激を行った FVIII^{-/y} , -/-PAI-1^{-/-}のリンパ節および脾臓では、CD11b⁺細胞や CD45R⁺細胞における MHC-II 抗原提示能の低下とともに、サイトカインプロファイルから T 細胞性アネルギーおよび MHC-Class II 拘束性 CD25⁺FoxP3⁺制御性 T 細胞が誘導された。shRNA 導入用レンチウイルスシステムを血友病マウス由来骨髄細胞 c-kit⁺sca-1⁺Lin⁻(KSL)分画に感染させ、放射線照射レシピエントマウスに移植することにより、PAI-1 shRNA 導入血友病 A マウスを製作した。得られたマウス個体は、PAI-1 scrRNA

導入個体に比較して FVIII 反復刺激後の抗体価が有意に低下した。

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体内法において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。血友病 B 遺伝子治療研究サルを用いた前臨床試験は、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ている。

F. 研究発表

1. 原著論文

1. Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y.: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther.* 21(2):318-23.2013Feb.
2. Makino N, Madoiwa S, Ohmori T, Katoh K, Ookawara S, Kanazawa T, Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Ichimura K, Sakata Y. :Tissue plasminogen activator deficiency promotes early phase regeneration in the olfactory epithelium

- after bulbegtomy. Inpress 2012 Nov 28.
doi: 10.1002/alr.21124.
3. Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y: Porcine model of hemophilia a. *PLoS One*. 7(11):e49450. 2012.
 4. Makino, N., Ookawara, S., Madoiwa, S., Ohta, Y., Ishikawa, T., Katho, K., Takigami, S., Kanazawa, T., Matsuo, O., Ichikawa, M., Mimuro, J., Sakata, Y., Ichimura, K.: Morphological assessment of the luminal surface of olfactory epithelium in mice deficient in tissue plasminogen activator following bulbectomy. *The Journal of Laryngology & Otology*. 126 (11) 114-1120. 2012. Nov.
 5. Hosoya, Y., Matsumura, M., Madoiwa, S., Zuiki, T., Matsumoto, S., Nunomiya, S., Lefor, A., Sata, N., Yasuda, Y.: Acquired hemophilia A caused by factor VIII inhibitors: report of a case. *Surg Today*. 2012 Aug 14. [Epub ahead of print]
 6. Yano, Y., Ohmori, T., Shimada, K., Sakata, Y., Kario, K.: Association of sleep onset of acute coronary syndrome with sleep apnea syndrome and abnormal diurnal variation of hemostasis and adipokine levels. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 23(7):590-596. 2012 Oct.
 7. Suzuki, S., Iwamoto, M., Saito, Y., Fuchimoto, D., Sembon, S., Suzuki, M., Mikawa, S., Hashimoto, M., Aoki, Y., Najima, Y., Takagi, S., Suzuki, N., Suzuki, E., Kubo, M., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Madoiwa, S., Sakata, Y., Perry, AC., Ishikawa, F., Onishi, A.: I12rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell*. 14:10(6):753-8. 2012 Jun.
 8. Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Yasumoto, A., Ishiwata, A., Sakata, A., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Ozawa, K., Sakata, Y.: Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost*. 10(9):1802-1813. 2012 Sep.
 9. Norimatsu, Y., Ohmori, T., Kimura, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Seichi, A., Yatomi, Y., Hoshino, Y., Sakata, Y.: FTY720 improves functional recovery

- after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol.* 180(4):1625-1635. 2012 Apr.
10. 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.* 129(4):e36-40. 2012 Apr.
 11. 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.* 18(3):e323-30. 2012 May.
2. 学会発表
1. 窓岩清治: Development of novel strategies for prevention of inhibitor formation in hemophilia The 9th Nikko International Symposium 2012 Understanding Complex Network Systems in Disease Biology 2012.10/12 (栃木)
 2. 窓岩清治: 凝固線溶系データを読み解く (Morning Discussion) 第74回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
 3. 柏倉裕志、大森 司、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一: 人工多能性幹細胞を用いた新規血友病治療法に対する基礎的検討 第74回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
 4. 窓岩清治、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一: A role of plasminogen activator-plasmin system for the immune in murine hemophilia A 第74回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
 5. 水上浩明、三室 淳、塚原智典、卜部匡司、久米晃浩、大森 司、窓岩清治、坂田洋一、小澤敬也: Dose-response relationship of factor IX expression in non-human primates using AAV8-based vector 第74回日本血液学会学術集会 2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)
 6. 坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一: Paxillin negatively regulates integrin signaling pathways in mouse platelets 第74回日本血液学会学術集会

2012.10/19-21 京都 (10/20 発表)

7. 小山寛介, 窓岩清治, 坂田飛鳥, 大森 司, 三室 淳, 坂田洋一.: 敗血症性 DIC における血小板減少の予測因子としての凝固・線溶系マーカーの評価 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
8. 窓岩清治, 小林英司, 坂田飛鳥, 柏倉裕志, 大森 司, 三室 淳, 坂田洋一.: 第 FVIII 因子感作血友病 A マウスにおけるマイクロボードを用いた連続的抗原投与モデルの構築 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
9. 柏倉裕志, 大森 司, 三室 淳, 安本篤史, 石渡 彰, 坂田飛鳥, 窓岩清治, 井上 誠, 長谷川 護, 小澤敬也, 坂田洋一.: FVIII 遺伝子導入 MSC の関節内移植は血友病 A マウスの血友病性関節症を改善する 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
10. 大森 司, 矢野裕一郎, 坂田飛鳥, 池本智一, 新保昌久, 窓岩清治, 勝木孝明, 三室 淳, 島田和幸, 荻尾七臣, 坂田洋一.: 血清パラオキシナーゼ活性は抗血小板薬投与下の凝集能と関連しない 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)
11. 小山寛介, 窓岩清治, 坂田飛鳥, 大森 司,

三室 淳, 坂田洋一.: 敗血症性 DIC—下部消化器官穿孔における凝固障害の特徴—
第 34 回日本血栓止血学会学術集会
2012.6/7-9 東京 (6/9 発表)

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

研究分担者 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検討を行った。遺伝子導入効率に大きく影響するベクターに対する中和抗体に関して測定系を改良し、サル及びヒトにおける陽性率を判定した。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すと共に、サルにおけるベクターの至適用量につき結論を得た。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新たな臨床グレードのベクター調製に関して、委託先を比較検討し、決定した。

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、高効率のベクター作製・精製法、遺伝子導入効率改善法、中和抗体検出法などの基盤技術開発を図る。また、第IX因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用して主に霊長類に対する投与を行って、治療法の有効性と安全性につき検討する。これまでに得られた知見により、肝臓を標的として8型 AAV 由来のベクターを用いることが最適と考えられるため、この方法を利用して臨床への展開を進める。中和抗体が存在する場合血液中への通常の投与方法では効果が得られないことから、ヒトにおける中和抗体陽性率を検討すると共に、陽性例に対して効果のある投与方法の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

・AAV ベクターに関する基礎研究：遺伝子導入効率に大きな影響を与える中和抗体に関して、鋭敏なアッセイ系を確立し、医薬基盤研・霊長類医科学研究センターのカニクイザル190頭及び、日本国内の健常者90人、血友病患者68人を対象とした解析を行った。

・遺伝子導入動物実験：特にカニクイザルにおいて肝臓を標的として AAV ベクターを投与し、遺伝子発現効率の確認及び免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。また、ベクター溶液の門脈内への注入に際して投与方法を工夫したところ、中和抗体陽性例でも効果が認められたため、同じ方法をカテーテルによって行うことでより安全かつ有効に実施可能かどうかにつき検討した。

・臨床研究に向けた取組み：サルにおいて得られた成果をヒトに役立てるため、臨床研究の推進に向けて必要な方策につき検討した。

（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でないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研

究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。また、ヒトサンプルの取扱いに際しては非連結匿名化を行い、測定結果と本人が関連づけられないように配慮した上で実施した。

C. 研究結果

・ AAV ベクターに関する基礎研究：改良した方法で8型のキャプシドに対する中和抗体陽性率をカニクイザル及びヒトにおいて測定したところ、カニクイザルでは抗体陽性率が71.3%に認められた。一方、ヒトでは健常者と血友病者のいずれでも約30%が陽性であり、両グループ間には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、中和抗体陰性例の全てにおいて長期にわたる効果を認めた。また、治療域に至る効果を得るために必要なベクター量についても知見が得られた（ 2.0×10^{12} vg/kg またはそれ以上）。一方、中和抗体陽性の個体においてもベクター溶液の注入前後に門脈内にカテーテルにより生理食塩水を注入することで、治療域に達する効果を得ることができた。

・ 臨床研究に向けた取組み：臨床グレードのベクターに関しては既に作製済みであるが、当初の見込みよりも大量に（10倍程度）必要と考えられ、以前作製を委託したVGTCでは困難な情勢であったことから、再度の作製に向けて国内外の施設に関して改めて調査と交渉を行い、委託先をタカラバイオ株式会社に決定した。

D. 考察

AAV ベクターを用いて肝臓を標的とする場合には静脈内投与で効果が期待できる8型が最も有望と考えられている。一方、これまでのサルにおける検討では、8型に対する中和抗体の陽性率が高く、中和抗体が存在する場合には、たとえ低力価であっても遺伝子導入は成功していない。従って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際にも同様である。これまで8型に対する中和抗体の検出感度は不十分であったが、我々はこれまで改良を加えてきており、世界的に見ても最も鋭敏な検出法として確立できたものと考えられる。サルでは8型の陽性率が高いとされ、約7割であったが、ヒトでは健常人、血友病者のいずれにおいても陽性率は約3割であり、大多数の血友病者において治療効果が期待できる。今後はさらに数を増やして検討を行っていきたい。

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

血友病 B に対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、2型 AAV を用いた方法では効果が不十分と考えられ、8型を用いることで臨床的な効果が期待できると報告されている。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、導入・発現効率に影響する因子を解析し、そのうち最も重要な中和抗体検出法の改良を通じて肝臓への遺伝子導入効率が確保できるようになった。また、その成果を用いて臨床研究を企画するに至っており、準備を

進めている。以上を通じて血友病に真に役立つ遺伝子治療法の開発を進めていきたい。

G. 研究発表

1. Mimuro, J., Mizukami, H., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Ishiwata, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ono, F., Ozawa, K., Sakata, Y.: Minimizing the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody for Efficient Gene Expression in the Liver with Adeno-associated Virus 8 Vectors. **Mol Ther**, *in press*.
2. Uchibori, R., Tsukahara, T., Mizuguchi, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. **Cancer Res.** 73: 364-372, 2013.
3. 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**, 19:476-82, 2012.

4. 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

「shRNA 発現ベクターによる D1,D2 ドーパミン受容体をノックダウンしたモデル動物の作出法」基礎生物学研究所・生理学研究所・自治医科大学により知的財産権共同出願中（平成 24 年 9 月 12 日職務発明認定・権利譲渡済）

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 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】

血友病 A 患者への補充療法により約 20%に抗第 VIII 因子(FVIII)同種抗体(インヒビター)が出現し、止血管理に難渋することが多い。止血管理は中和療法やバイパス製剤により行われるが、バイパス製剤使用時の凝血的治療効果を正確にモニタリングする汎用性かつ簡便な方法は確立されていないのが現状である。今回、インヒビター保有患者の止血モニタリングにおいて、フィブリン形成過程を real-time にモニタリングできる凝固波形解析を用いた assay での確立を試みた。in vitro でバイパス製剤 (FVIIa 製剤、APCC 製剤) 添加 FVIII 欠乏血漿検体を用い、エラグ酸/組織因子/ (Elg/TF 法) を惹起とする clot formation を観察した結果、本法から得られたパラメータ(CT, |Min1|, |Mis2|)が凝血的効果を最も良く反映することがわかった。さらに、本剤の副作用と懸念される過凝固も同時に観察可能であった。インヒビター患者へのバイパス製剤投与前後での凝血的効果も Elg/TF をトリガーとした本法を用いて、十分に観察可能であり、臨床的止血効果を反映していた。さらに周術期でのバイパス製剤での止血管理も本法の CT/|Min1|/|Min2| を用いてモニタリングすることで、止血管理が可能であった。凝固波形解析は汎用性があり、手技的にも簡便である。そして、Elg/TF を trigger とした凝固反応によりインヒビター保有患者の止血モニタリングを確立することができた。

A. 研究目的

血友病 A および B は、X 染色体上の血液凝固第 VIII 因子(FVIII)遺伝子および FIX 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み換え FVIII や FIX 濃縮製剤の投与により、血友病患者の QOL は飛躍的に向上してきている。しかし補充療法に伴い血友病 A 患者の約 20%に抗 FVIII 同種抗体(インヒビター)が発生することも知られている。その結果、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、バイパス製剤使用時の凝血的治療効果を正確にモニタリングする汎用性かつ簡便な方法は確立されていないのが現状である。今回、インヒビター保有患者の止血モニタリングにおいて、フィブリン形成過程を

real-time にモニタリングできる凝固波形解析を用いた新規 assay の確立を試みた。

B. 研究方法

1) 凝固波形による in vitro でのバイパス製剤での凝血的効果の評価：最適惹起試薬の検討

血漿のフィブリン生成過程における透過率の変化から得た凝固波形から最大凝固速度(|Min1|)、最大凝固加速度(|Min2|)、凝固時間(CT)の 3 パラメータを評価した。凝固惹起試薬は、エラグ酸(Elg 法)、組織因子(TF 法)、混合(Elg/TF 法)の 3 種を用いた(Matsumoto, IJH. 2011)。市販第 VIII 因子欠乏血漿(FVIII-def 血漿)に順次希釈した rFVIIa や APCC を添加した。良好なモニタリングには、FVIII-def 血漿パラメータの健常血漿に対する差異が明瞭で、かつバイパス止血療法の効果判定が健常パラメータに基づいて可能である 2 点が重要と考え、(1)

FVIII-def 血漿/健常血漿で各パラメータの対健常血漿比を算出し、(2)臨床的血中濃度相当の rFVIIa 25 nM と APCC 1 U/ml 添加時の同比を評価した。

2) インヒビター患者へのバイパス製剤投与時での凝血学的効果の評価

インヒビター保有患者 (7 名) へのバイパス製剤による止血管理時において、製剤投与 (rFVIIa 90-100 ug/kg または APCC 80-90 U/kg) 前後の血漿検体を、従来の当科のモニタリングである Rotational thromboelastmetry (ROTEM) を施行するのとともに、本法による混合法 (TF/Elg) にて凝固波形解析も同時に行い、両者の比較検討も行った。

(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) 凝固波形による in vitro でのバイパス製剤での凝血学的効果の評価：最適惹起試薬の検討

Elg 法では CT $112 \pm 16 / 33 \pm 2$ [比 3.4]、|Min1| $0.79 \pm 0.40 / 4.87 \pm 0.71$ [比 0.16]、|Min2| $54 \pm 32 / 403 \pm 55$ [比 0.13] で健常との差異が明瞭。TF 法では CT 比 1.38、|Min1| 比 1.01、|Min2| 比 1.47 と健常との差異に乏しく、Elg/TF 法では CT 比 1.45、|Min1| 比 0.45、|Min2| 比 0.33 と、Elg 法と TF 法の間を示した。(2) rFVIIa 添加にて Elg、TF、Elg/TF 法で CT 比は 2.46、0.78、0.99、|Min1| 比 0.21、1.97、0.75、|Min2| 比 0.19、3.92、0.75 であり、いずれも Elg/TF 法で比は 1.0 に極めて近かった。APCC 添加では CT 比 1.11、0.53、0.68、|Min1| 比 0.28、2.48、0.95、|Min2| 比 0.34、5.53、1.13 であった。さらに、APCC 2 U/ml 添加では過凝固の状態を示した。以上から対健常の明瞭な差異は Elg 法と Elg/TF 法で得られた。

2) インヒビター患者へのバイパス製剤投与時での凝血学的効果の評価

バイパス製剤 (rFVIIa や APCC) 投与後の Elg/TF 法による凝固波形解析は、ROTEM の効果と乖離した 1 例を除き、正常血漿に類似したパラメータを示した。これらは ROTEM での効果 (凝血学的かつ臨床効果) と一致していた。一方、臨床止血不良であるも、ROTEM で効果ありとみなされた 1 例は、Elg/TF 法による本法では、製剤投与でのパラメータ

の改善は極めて乏しかったことから、ROTEM に比してより正確なモニタリングが可能であることを示した。

D. 考察

1) 凝固波形による in vitro でのバイパス製剤での凝血学的効果の評価：最適惹起試薬の検討

rFVIIa 添加時の全パラメータで Elg/TF 法が優れ、APCC 添加時の CT 比では Elg 法が、Min1 比と Min2 比では Elg/TF 法が優れていた。これら基に、凝固波形解析によるバイパス止血モニタリングは Elg/TF 法が極めて有用と考えられた。また、Elg/TF 法は APCC での過凝固の状態を捉えることが可能であった。

2) インヒビター患者へのバイパス製剤投与時での凝血学的効果の評価

2 症例を周術期のバイパス製剤での止血モニタリングを ROTEM と合わせて Elg/TF 法による本で行い、凝固波形パラメータは正常血漿に類似する範囲内で推移し、臨床効果も十分反映することができた。

E. 結論

血友病 A インヒビターの止血管理に難渋することが多い。これは、1) バイパス製剤の止血効果の不安定さ、2) バイパス製剤使用時の汎用性かつ簡便な止血モニタリング法が全く確立されていない、などが挙げられる。今回、止血モニタリングにおいて、フィブリン形成過程を real-time にモニタリングできる凝固波形解析を用いた新規 assay の確立を試み、Elg/TF を trigger とした本法により汎用性かつ簡便なインヒビター保有患者の新規止血モニタリングを世界で初めて確立することができた。この assay により、今後はインヒビター患者の止血管理を容易に施行することが十分期待されよう。さらに、症例数を蓄積することにより、よりよい最適な条件を検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

研究協力者

奈良県立医科大学 小児科学教室

野上恵嗣、白潤夏、荻原建一、矢田弘史、松本智子

研究発表

口演

1) An optimal monitoring on bypassing therapy for hemophilia A patient with inhibitor using aPTT-based clot waveform analysis with the presence of minimal TF. Haku J, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yada K, Shima M. 54th the annual meeting American Society of Hematology, Dec 8-12 2012, Atlanta, GA

2) 白潤夏、萩原建一、松本智子、野上恵嗣、矢田弘史、嶋緑倫. 凝固波形解析を用いた血友病 A インヒビターバイパス止血療法の新規モニタリング. 第74回日本血液学会 2012. 京都

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

「血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究」

分担研究報告書

第 VIII、第 IX 因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究

研究分担者 嶋 緑倫（公立大学法人 奈良県立医科大学 小児科学教室 教授）

【研究要旨】

インヒビター（同種抗体）の発生は、血友病治療上、最も深刻であり、解決すべき重大な合併症である。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 年から平成 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 年度から平成 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。平成 24 年 11 月 2 日現在 151 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原法である 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、臨床的データとを合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 24 年 11 月末現在、160 症例の検体を入手し 90 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。

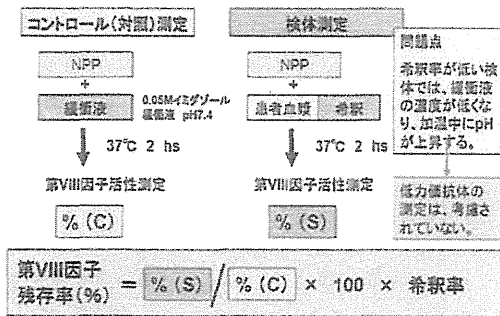


図1 Bethesda 法の問題点

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、検査室間で共通で使用でき、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 変法では正常ブール血漿(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ブ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、平成 22 年度確率した 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」を継続した。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 of 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 24 年度は登録症例数を増やすため、広く告知活動を行った。

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

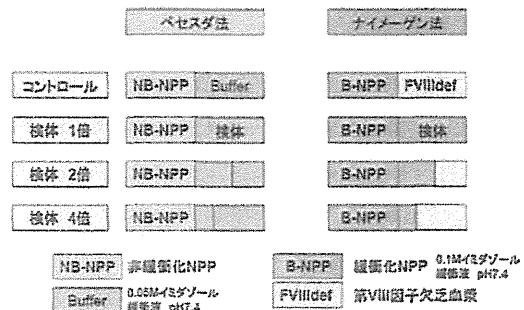


図2 ベセスダ法とナイメーゲン変法

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良した、Tokyo 変法の設定を試みた。Nijmegen 変法では、被検血漿と正常プール血漿 (NPP) を混合した後の pH を安定させるために、NPP に固形のイミダゾールを 0.1N になるよう加えて、1N の HCl 溶液で pH を 7.4 に整える操作が必要であるが、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合にはこの操作が難しい。そこで、2M の緩衝化イミダゾール液を作成し、NPP の 1/20 容を添加し、0.1N イミダゾール加 NPP を作成して操作を簡便化した (Tokyo 変法)。

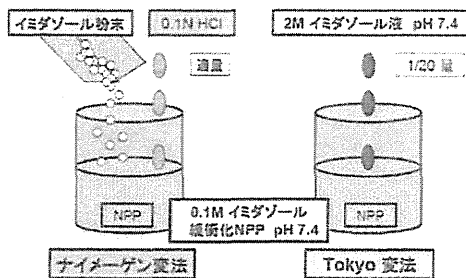


図3 原法と Tokyo 変法との違い

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

(2) Tokyo 変法の第 VIII 因子活性への影響

同様の方法により用意した血漿について第 VIII 因子活性の変化を求めた。

(3) 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。

(4) Tokyo 変法を用いた 再現性の検討

標準インヒビター血漿について生理食塩水を1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。

(5) インヒビター力価のサーベイランス

第 VIII 因子インヒビターを測定している主要施設の協力を得て、サーベイ検体、正常者プール血漿、第 VIII 因子欠乏血漿、pH 調整試薬、検体希釈液、測定手順マニュアルを配布し、各施設の標準測定法と研究班の指定する測定法の両法によりサーベイ検体を測定し、測定値の施設間差を調査する。

1) 参加依頼施設

1. 登録衛生検査所

- ① エスアールエル
- ② ビーエムエル
- ③ 三菱化学メディエンス

2. 臨床施設

- ① 奈良医科大学
- ② 名古屋大学
- ③ 聖マリアンナ医科大学
- ④ 東京大学
- ⑤ 帝京大学
- ⑥ 東京医科大学

2) 配布材料

1. サーベイランス検体セット (2セット)

- ① 血友病 A 血漿 (インヒビターなし)
- ② 血友病 A 血漿 (インヒビターなし)
- ③ 血友病 A 血漿 (インヒビターなし)
- ④ 標準インヒビター血漿 A
- ⑤ 標準インヒビター血漿 B
- ⑥ 標準インヒビター血漿 C
- ⑦ 標準インヒビター血漿 D
- ⑧ 血友病 A 血漿 (インヒビター高力価)
- ⑨ 血友病 A 血漿 (インヒビター高力価)
- ⑩ 血友病 A 血漿 (インヒビター高力価)

2. 正常者プール血漿

3. 第 VIII 因子欠乏血漿

4. pH 調整試薬 (2M 緩衝化イミダゾール液 pH 7.4)

5. 検体希釈液 (0.05M 緩衝化イミダゾール液 pH 7.4)

6. 測定手順マニュアル

① 各施設の標準測定法による第 VIII 因子インヒビター測定

サーベイランス検体セット (配布時順不同) の1セットについて、37℃ 10 分間加温して解凍した後

十分混和する。直ちに各施設の標準測定法により第 VIII 因子インヒビターを測定する。全ての試薬は各施設が日常で使用しているものを用いる。各検体の第 VIII 因子インヒビター測定結果を報告書に記載し、各施設の測定手順書の写しと共に返却する。

②研究班の指定する測定法による第 VIII 因子インヒビター測定

a. 緩衝化正常プール血漿の調整

送付した正常プール血漿を 37℃10 分間加温して解凍した後、十分混和し、その 950 μ L に pH 調整試薬 50 μ L を加えて十分混和する。

b. 検体の調整

サーベイランス検体セット（配布時順不同）の 1 セットについて、37℃10 分間加温して解凍した後、十分混和する。検体⑧⑨⑩は添付の 3. 第 VIII 因子欠乏血漿を用いて 4 倍 8 倍 16 倍の希釈液を作成する。（各 100 μ L+300 μ L、50 μ L+350 μ L、25 μ L+375 μ L 混合を推奨）

c. 検体と正常プール血漿とのインキュベーション

緩衝化正常プール血漿と各検体（検体⑧⑨⑩は各希釈検体）とブランクとして添付の 3. 第 VIII 因子欠乏血漿を等量混和し、密閉状態で 37℃2 時間加温する。検体は①から⑦の計 7 本、⑧⑨⑩の 3 濃度の計 9 本、ブランク 1 本の合計 17 本となる。

d. 第 VIII 因子活性の測定

検量線は添付の 3. 第 VIII 因子欠乏血漿 950 μ L に pH 調整試薬 50 μ L を加えたものを用いて作成しておく。検体の測定に用いる第 VIII 因子欠乏血漿も、添付の第 VIII 因子欠乏血漿 950 μ L に pH 調整試薬 50 μ L を加えたものを用いる。c で 2 時間のインキュベーションが終わった 17 本の検体について残存第 VIII 因子活性を速やかに各 2 回測定し、報告書に記載し返却する。

e. 第 VIII 因子インヒビター値の報告

指定の換算式により算出し、報告書に記載し返却する。

7. 施設間差等の検証

サーベイランス結果から、各施設の標準測定法と研究班指定の Tokyo 変法を比較し、施設間差などの変動状態を検証する

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システムの構築を完了した。

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を必要としない。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。本研究結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 24 年 5 月に未登録血友病患者の人数を把握し、新規登録ファイルを公布した。平成 24 年 7 月には診断時～平成 24 年 7 月までの診療内容の追跡調査を行った。

平成 24 年 11 月 2 日現在の登録状況並びに平成 24 年 7 月末時点での登録結果は以下のとおりである。

登録症例数：151 名（本年度予定:150 例）

登録施設数：27 施設

症例登録医師数：45 名

病型	血友病 A	134(88.7%)
	血友病 B	17(11.3%)
インヒビター発生	血友病 A	26 (19.4%) *
	血友病 B	1 (5.8%) *
最終追跡年	2012 年	123(81.4%)
	2011 年	4 (2.2%)
	2010 年	5 (3.3%)
	追跡未実施	19 (12.5%)
通院状況	通院中	127 (96.2%)
	転院	5 (3.8%)

表 2【登録・追跡状況】

性別	男	148(98.7%)
	女	2(1.3%)
診断時年齢	0 歳 7 ヶ月 [0 歳 0 ヶ月-75 歳 9 ヶ月]	
診断年	2007 年	18 (11.9%)
	2008 年	32 (21.1%)
	2009 年	16 (10.6%)
	2010 年	27 (17.8%)
	2011 年	37 (24.5%)
	2012 年	20 (13.2%)
重症度	重症	100 (66.2%)
	中等症	31 (20.5%)
	軽症	20 (13.2%)
診断の契機	家族歴	43 (28.5%)
	出血	105 (69.5%)
	その他	3 (2.0%)
家族歴	なし	80 (53.0%)
	あり	66 (43.7%)
	→内 7 名にインヒビターの家族歴あり	
	不明	5 (2.6%)

表 3【患者背景】中央値[最小値-最大値]

治療法*	未治療	14 (10.7%)
	定期補充	67 (51.1%)
	出血時のみ	50 (38.2%)
カテーテルの挿入*	なし	124 (93.9%)
	あり	8 (6.1%)
在宅注射の実施	なし	91 (68.9%)
	あり	41 (31.1%)

表 4【治療状況】

*インヒビター発生例については、インヒビター発生前の事象

Danger Event*	なし	91 (68.9%)
	あり	41 (31.0%)
重篤出血*	なし	104 (78.7%)
	あり	28 (21.3%)
頭蓋内出血*	なし	119 (90.1%)
	あり	13 (9.8%)
上記以外の重篤出血*	なし	116 (87.8%)
	あり	16 (12.2%)
手術・観血的処置*	なし	117 (88.6%)
	あり	15 (11.4%)

表 5【濃厚治療】

*インヒビター発生例については、インヒビター発生前の事象

初回投与年齢	0歳10か月[0歳0ヶ月-78歳4ヶ月]	
初回投与量	300 [125-2500]	
体重当りの初回投与量	38 [15-175]	
使用製剤	アドベイト	59(53.2%)
	コージネイトFSバイオセット	33(29.7%)
	クロスエイトM	1(0.9%)
	コンファクトF	4(3.6%)
	ノバクトM	7(6.3%)
	ベネフィクス	6(5.4%)
	クリスマシンM	1(0.9%)

表 6【初回投与について】中央値[最小値-最大値] / () 内はパーセント

初回投与の目的

	合計(%)
予備的補充	5(4.5)
定期補充	5(4.5)
手術・観血的処置	5(4.5)
出血	96(86.5)
頭蓋内出血	7(7.4)
右大腿(前)	1(1.1)
左大腿(前)	1(1.1)
筋肉内出血_その他	1(1.1)
右肩	1(1.1)

右腕	1(1.1)
右膝	7(7.4)
右足首	3(3.2)
左肩	1(1.1)
左腕	3(3.2)
左膝	9(9.5)
口の中(歯肉以外)	11(11.6)
歯肉	1(1.1)
消化管出血	4(4.2)
鼻血	3(3.2)
皮下出血(それ以外)	15(15.8)
皮下出血(首から上)	14(14.7)
採血時	7(7.4)
けが(すり傷、切り傷)	1(1.1)
All_その他	4(4.2)

合計 111(100.0)

表 7【初回投与の目的】

発生年齢	1歳1ヶ月[0歳5ヶ月-3歳0ヶ月]	
総投与日数	13	[4-48]
総投与量	3750	[1000-25400]
診断時インヒビター値	2.46	[0※-47]
最大値	7	[0※-631]
タイプ	High (59.8%)	16
	Low (40.7%)	11
出血時治療	出血なし	3 (11.1%)
	バイパス製剤	15 (55.6%)
	中和療法	7 (25.9%)
	中和+バイパス	2 (7.4%)
インヒビター治療	ITI実施	16(59.3%)
	未治療	11 (40.7%)
消失状況	消失	14 (51.9%)
	未消失	13 (48.1%)
消失理由	ITIの成功	11(78.6%)
	自然消失	2 (14.3%)
	その他	1 (7.1%)

表 8【インヒビター】中央値[最小値-最大値] / ()

内はパーセント

※診断時インヒビター値、最大値0の症例は、その他臨床症状等からインヒビター発生と診断されたためです。

今回、解析対象を25ED到達あるいはインヒビターが発生した血友病A患者に限定し、現時点で解析可能な68例を抽出して、(1)患者側の因子、(2)血友病治療に関する因子に分けてインヒビター発生のリスク要因を予備的に検討した。結果は以下のとおりである。

		未発生 (n=42)	発生 (n=26)	P 値
重症度	重症	35	23	0.68
	中等	6	3	
	症	1	0	
	軽症			
血液型	A	8	8	0.10
	B	4	1	
	O	12	2	
	AB	1	3	
	不明	15	12	
診断の契機	家族 歴	9	7	0.75
	出血	32	17	
	その他	1	1	
診断時の年齢	(日)	276.92	138.65	0.10
血友病の家族歴	なし あり	28 14	12 14	0.15
インヒビターの家族歴	なし あり	37 0	18 3	0.08
分娩様式	経膣 帝王切	29 12	20 5	0.58

表 9 【発生要因解析-患者背景①】

		未発生 (n=42)	発生 (n=26)	P 値
在胎週数	(週)	39.45	38.64	0.62
重篤疾患の合併	なし	38	22	0.73
	あり	4	4	
栄養法	母乳	18	13	0.14
	人工乳 混合	1 21	3 8	
家族のアレルギー	なし	27	21	0.13
	あり	13	3	
患者のアレルギー	なし	33	24	0.37
	あり	7	2	
	不明	1	0	
カテーテル挿入	なし あり	34 8	26 0	0.03
カテーテル取り出し	なし あり	39 3	26 0	0.43

表 10 【発生要因解析-患者背景②】

		未発生 (n=42)	発生 (n=26)	P 値
Danger Event	なし	24	16	0.91
	あり	18	10	
重篤疾患	なし	30	17	0.79
	あり	12	9	
頭蓋内出血	なし	37	21	0.63
	あり	5	5	
上記以外の重篤出血	なし	34	22	0.95
	あり	8	4	
手術・観血的処置	なし	30	23	0.17
	あり	12	3	

表 11 【発生要因解析-患者背景③】

		未発生 (n=42)	発生 (n=26)	P 値
初回投与時の日齢	(日)	386.61	259.11	0.12
初回投与日の投与量	(U/kg)	45.45	58.04	0.18
初回投与の使用製剤	クロスエイトM	1	0	0.37
	コンファクトF	1	3	
	アドベイト	28	15	
	コージネイトFS	12	8	
初回投与の目的	定期補充	1	1	0.39
	出血	37	23	
	手術・観血的処置	1	2	
	予備的補充	1	2	

表 12 【発生要因解析-治療に関する因子①】

		未発生 (n=42)	発生 (n=26)	P 値
25ED迄の主な製剤	アドベイト	31	16	0.35
	コージネイトFS	9	10	
	クロスエイトM	1	0	
	コンファクトF	1	0	
濃厚な治療*	なし	27	17	0.86
	あり	15	9	
治療法**	出血時・予備的	10	19	<0.001
	定期補充	32	7	

*: 5 日以上治療を連続する場合を濃厚な治療とした。

** : 25ED 迄に定期補充を開始した場合は定期補充とし、それ以外は出血時・予備的とした。

表 13 【発生要因解析-治療に関する因子②】

3. インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究 (第3研究)

(1) Tokyo 変法の血漿 pH への影響

1/20 量の pH7.4 の 2N イミダゾール緩衝液または精製水を NPP に添加し、混合後、37°C 2 時間後の両者の pH は、精製水では pH8.0 以上を示したが、緩衝液では pH の維持が可能であった。(図 4)

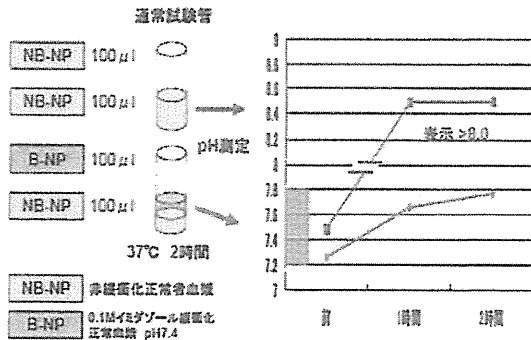


図 4 37°C 2 時間加温後の pH の変化

(2) Tokyo 変法の第 VIII 因子活性への影響

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

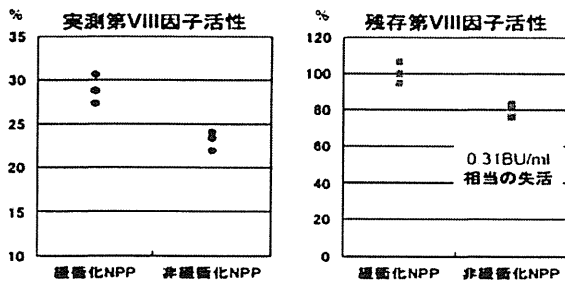


図 5 37°C 2 時間加温後の第 VIII 因子活性の変化

(3) 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。これはナイメーゲン変法による推奨法と一致した結果となった。

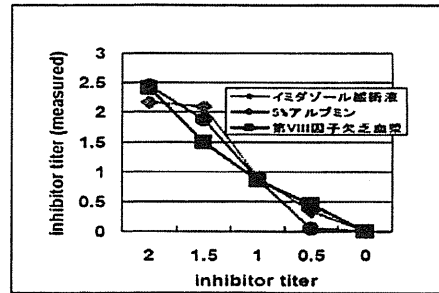


図 6 インヒビター力価への希釈液の影響

(4) Tokyo 変法を用いた再現性の検討

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

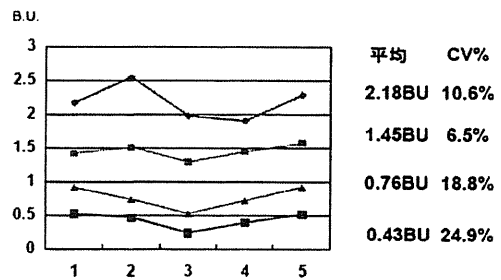


図 7 各インヒビター濃度測定の見直し

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

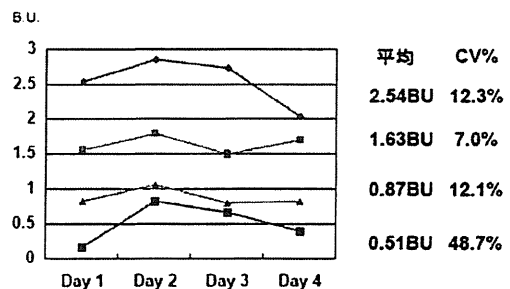


図 8 日差再現性

(5)インヒビター力価のサーベイランス
 気温の低い冬期に実施を予定している。

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）

「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。平成24年11月末現在の進捗状況は以下のとおりである。

J-HIS1

対象 106 例中 53 例の検体入手 31 例解析終了

J-HIS2

対象 161 例中 107 例の検体入手 59 例解析終了

J-HIS 登録 54 施設 267 例の研究対象の内、遺伝子検査を実施したのは 90 例（血友病 A 80 例、血友病 B 10 例）であった（表 14 - 表 17）。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 16、17 に示す通りであった。なお、サイトカイン遺伝子についての解析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		%
Inversion	11	42.9
Large deletion	1	3.6
Small deletion	6	21.4
Nonsense mutation	3	10.7
Splicing variants	1	3.6
Missense mutation	4	14.2
Unknown	1	3.6
Total	28	100

表 14 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation		Inh+(%)
Inversion	20*	8(40)
Small deletion	7	1(14)
Small insertion	1*	0(0)
Nonsense mutation	6	1(16.7)
Splicing variants	3	1(33.3)
Missense mutation	15*	2(13.3)
Total	52	13

(* 25ED に満たない症例を含む)

表 15 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation		%
Nonsense mutation	2	67
Small deletion	1	33
Total	3	100

表 16 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation		Inh+
Splicing variants	4	0
Missense mutation	3	0
Total	7	0

(* 25ED に満たない症例を含む)

表 17 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。また、本研究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を実施した。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151名中インヒビターは27名に見られた。