

インヒビター発現の好発時期として知られている25EDに到達あるいはインヒビターが発生した血友病A患者を対象に昨年に引き続きインヒビターの発生要因の解析を行った。

昨年度は、血液型、診断時の年齢、治療法の項目で有意差がみられたが、今回の検討では、カテーテルの挿入、治療法の項目で有意差が見られた。更に症例数を増やしての検討が必要である。また、遺伝子変異の解析結果を加え、インヒビターの発生要因を疫学的に明らかにしたい。

また、本研究のデータベースを発展させ今後の血友病治療における基盤整備を図りたい。

3. インヒビターの検出・診断の標準化

インヒビターの定量的測定法である Bethesda 法の改良法である Nijmegen 変法の更なる改良法として東京変法を開発した。インヒビター測定のための Bethesda 法では、検体の希釈に 0.05M イミダゾール緩衝液を用いているが、Nijmegen 変法では正常プール血漿(NPP)の pH を安定させるために、固形のイミダゾールを加えて 0.1N とし 1N の HCl で pH を 7.4 に整える手法を求めている。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合には Nijmegen 変法では操作が難しいことから、Nijmegen 変法の普及はなかなか進まないのが現状であると考えられる。そこで、固形イミダゾールの代わりに、2N の緩衝化イミダゾール液を用いて、Tokyo 変法として緩衝化 NPP の作成の簡便化を図った。本法では 1995 年に B. Verbruggen らが提唱した Nijmegen 変法の報告ほど反応液の pH を安定化できなかったが、同論文の示す第 VIII 因子活性が安定な pH 範囲を維持できた。したがって、本法によっても pH を概ね予定した範囲に保つことができたことにより、Nijmegen 変法と同等の第 VIII 因子活性維持効果が得られることを確認できた。

さらに、インヒビター測定法の施設間差の有無を確認するための標準インヒビター血漿を昨年検討した方法（10Bethesda 単位まで生理食塩液で希釈し、その後は第 VIII 因子欠乏血漿によって希釈する方法）により作成し、標準インヒビター血漿を用いて、インヒビター測定法の性能試験を行い、標準化の前試験として同時再現性と日差再現性を検討した。昨年度の検討では、インヒビター測定における第 VIII 因子活性の測定値は、同時再現性

の CV%で 4.8~12.8%を示しており、2 時間の加温の影響や検体の個別調整の影響があり、単純な第 VIII 因子活性の測定と比べて再現性の悪化が認められた。この成績を利用して、コントロール血漿に対する第 VIII 因子活性の残存%を計算するため、同時再現性の CV%は 6.6~15.6%とさらに悪化を示した。Bethesda 法ではこの残存%を利用してインヒビター活性に換算するため、同時再現性の CV%で 6.5~24.9%、日差再現性の CV%で 7.0~48.7%を示した。

Bethesda 法では対数変換が行われるために、残存率により測定誤差の縮小と拡大の現象が発生する。この関係を整理して表に示すが、誤差の関係が逆転していることが明らかとなった。すなわち、計算例として、残存%がそれぞれ 25%、35%、50%、75%周辺において 10%の差を想定したところ、表に示すように最終的な Bethesda 単位の誤差は残存%が低いほど縮小され大きいほど拡大される。例えば、残存%が 25% (2BU) 付近の 10%の変化は、Bethesda 単位への変換後に 6.8%へと縮小するが、75%(0.4BU)付近では 37%へと約 3.7 倍の拡大をきたす。この計算からは 35%(1.5BU)付近の変化が一番少ないことが分かり、文献的には Bethesda 単位へ換算するには 50%前後の測定値が推奨されているものの、実際は 1.5BU 前後が望ましいものと考えられ、標準インヒビター血漿の力価の選定にも注意が必要と考えられた。

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

表 18 Bethesda 単位への変換に伴う誤差の変化例 (残存第 VIII 因子の 10 分の 1 の変動が生む意味の違い)

4. インヒビター発生要因と遺伝子学的検査

J-HIS1 および JHIS2 の登録患者を対象とした遺伝子解析では血友病 A では JHIS1 では null 変異、JHIS2 でも投与回数が<25ED の症例もあるが同様に null 変異遺伝子異常がインヒビターの発生率が高い中間結果であった。インヒビターの発生率と伝子異常との関連性はきわめて重要である。わが国でも null 変異遺伝子例にインヒビター発生例が多いことは国際的にも共通であり今後のインヒビター発生予測に重要な指標となることが予想される。しかしながら、同じ null 変異でも発生率が違うのかについては今後のさらなる症例数の集積が必要である。近年、従来、null 遺伝子異常に分類されていたイントロン 22 由来逆位も蛋白発現の可能性も示唆されていること、イントロン 22 逆位に他の null 遺伝子異常の合併例も報告されておりさらに精度の高い遺伝子解析も必要である。さらに、インヒビターの発生率に関して様々な免疫系・サイトカイン系の遺伝子異常との関連性も欧米では報告されている。わが国は諸外国と比べて単一民族であり、これらの遺伝子異常とインヒビター発生との関連性も重要な課題であり、次年度から解析症例を増やして検討する予定である。

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

E. 結論

わが国のインヒビター発生において遺伝子組み換え型製剤と血漿由来製剤間の差はみられなかった。本研究成果は国際誌に受理された。インヒビターの発生要因で統計学的に有意であったのは重症度と家系内のインヒビター保有患者の存在であった。新規血友病患者の前向き調査の症例数はまだ予定数に達していないが、すでにインヒビター

が 21.7%と欧米と同様の発生率が明らかになった。今後遺伝子解析研究とあわせて研究の継続が必須である。インヒビターの測定法は Tokyo 変法で実施可能であることが明らかになり、標準インヒビター血漿の作成条件も確立した。これらの条件の下にサーベイランス作業を行い、施設間差の検証と実際の施設間差を縮小する手段を検討する必要がある。サーベイランス施設として、大手の衛生検査所および施設内検査を実施している臨床施設の協力を得る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shima M. Overview of current treatment for hemophilia: needs of tailor-made treatment. Rinsho Ketsueki. 53(10):1737-44. 2012
- 2) Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. Nat Med. 18(10):1570-4. 2012
- 3) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Results of clot waveform analysis and thrombin generation test

for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia patients

with inhibitors-phase I trial: 2nd report.

Haemophilia. 2012 [Epub ahead of print]

4) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global

haemostasis and point of care testing.

Haemophilia. 4:81-8.2012

5) de Paula EV, Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y,

Lentz SR, Morfini M, Nemes L,

Šalek SZ, Shima M, Windyga J, Ehrenforth S,

Chuansumrit A; 1804 (adept(TM)1)

Investigators. Recombinant factor VIIa analog

(vatreptacog alfa [activated]) for

treatment of joint bleeds in hemophilia

patients with inhibitors: a randomized

controlled trial. J Thromb Haemost.10(1):81-9.

2012

6) Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M,

Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T.

Complete immunotolerance induction after

FEIBA prophylaxis in a haemophilia A

patient with high-titre inhibitor. Haemophilia.

18(3):e75-7. 2012

7) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima

M. A putative inhibitory mechanism in

the tenase complex responsible for loss of

coagulation function in acquired

haemophilia A patients with anti-C2

autoantibodies. Thromb

Haemost.107(2):288-301. 2012

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許所得

特許 4671823 血液凝固因子の不活性化及び血液凝固因子

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)
分担研究報告書

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

研究分担者：菱川 修司 自治医科大学 准教授

研究協力者：池本 智一 自治医科大学 循環器内科 助教

研究要旨：本研究計画の前臨床モデルの確立のため、カニクイザル肝臓に対する経門脈的アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの投与治療に関して検討した。我々が考案した「マイクロカテーテル（による肝臓への遺伝子導入）法」を用い経門脈的に肝臓左葉に AAV ベクターを投与することにより、抗体陽性サルに対し導入遺伝子由来第 IX 因子の発現(5~10%)を長期間維持することに成功した。同投与方法は、日本人のほぼ半数が陽性を示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。今後はさらに臨床治療に配意し、より効率的でかつ対象患者の負担の少ない投与条件の適正化を図り、随時同方法による臨床治療が実施可能な状態を構築したいと考えている。

A. 研究目的

血友病の治療として、これまで欠損因子を遺伝子治療によって補う試みがなされてきた。当研究班の前分担班である小林班はマウスやラットといった小動物を対象として、ウイルスベクターや非ウイルス法を用いた遺伝子導入実験を行い、その発現と導入効率を確認してきた。当班では同実験結果を発展させて、血友病患者に対するアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を用いた遺伝子治療の実現に向けて、特に日本人のほぼ半数が陽性であるとされているAAV中和抗体陽性患者に対するベクター投与方法を確立することを目的にしている。現在までに我々は、選択的に肝門脈左葉枝までカテーテルを誘導し、同カテーテルより「生理的食塩水→AAVベクター溶液→生理的食塩

水」の順番で血管内に注入することにより AAVベクターを極力血液に接触させない、いわゆるサンドイッチ式の「経門脈的肝選択的AAVベクター投与方法」を考案し、非ヒト霊長類（カニクイザル）を対象に投与実験を行った。また同法に関して、さらに効率的でかつ対象患者の負担の少ない投与条件（ベクター溶液投与量や投与スピードならびにベクター滞留時間等）の確立を目的に同様の手技を実験ブタに施行し、画像解析を中心に検討を重ねた。

B. 研究方法

①医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター（茨城県つくば市）において、カニクイザルを使用し実験を行った。使用した血管留置針やガイドワイヤー、マイクロカテーテル等の詳細については研究結果に記載

した。

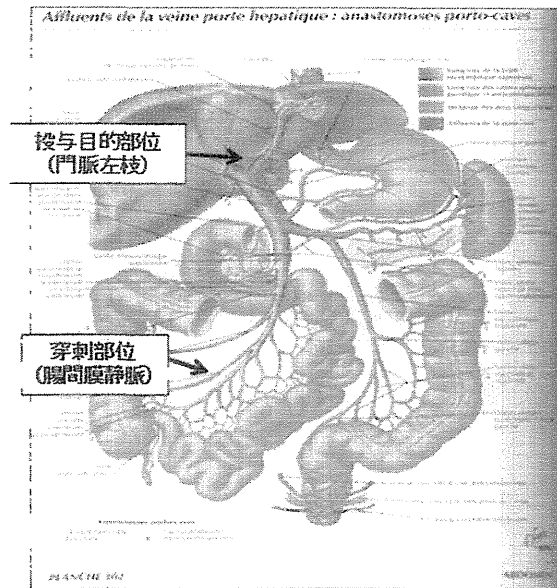
②自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて、実験ブタに対し①と同様の処置を施し、血管撮影装置を用いて同手法に関する画像解析を行った。また処置中に実験ブタのバイタルを測定し、同処置が循環器系に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、研究施設における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物愛護の精神で実施した。また、遺伝子組み換え実験に関しても、研究施設における遺伝子組み換え実験安全委員会の指針に従い、承認されたプロトコールで実施した。

C. 研究結果

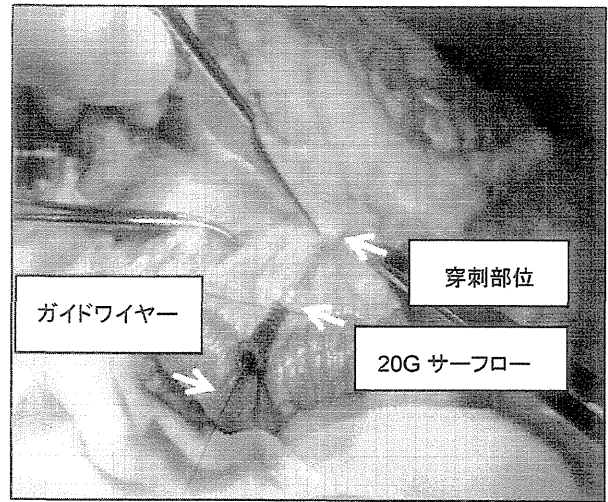
①マイクロカテーテル法 (図 1) を用いた肝臓への遺伝子導入



(図 1: マイクロカテーテル法概略図)

AAV 中和抗体陽性カニクイザルに対し、全身麻酔下に傍正中切開にて開腹し、小腸の一部を体外へ出し、腸間膜静脈分枝の末梢側に血管留置針(サーフロー24G、Terumo, Japan)を穿刺した。サーフロー先端が血管内に留置していることを確認した後に、ガ

イドワイヤー (Runthrough 0.014 [0.36mm]、Terumo, Japan) を血管内に挿入・留置した。(図 2)。



(図2: 腸間膜静脈へ挿入された血管内留置針)

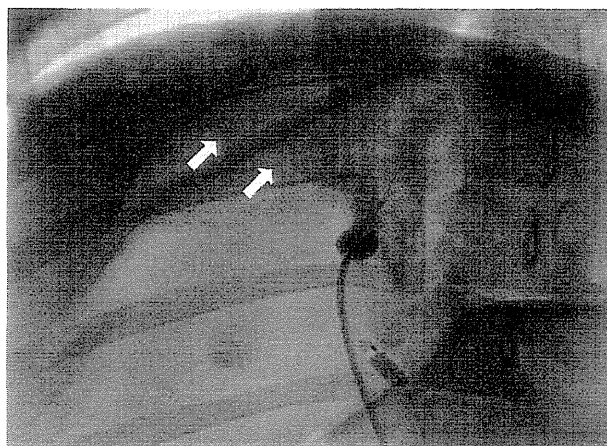
X 線透視下に、ガイドワイヤーを門脈本幹から門脈左枝へと誘導し、マイクロカテーテル(イーグマン: 3.3F (約 1.1 mm)、バルーン径 10 x 6mm) (Temporary occlusion catheter) をガイドワイヤーに沿って挿入した。カテーテル先端付近のバルーンが門脈左枝にあることを確認した後に、造影剤を用いて同バルーンをインフレーションし、同部血流を一時的に遮断した。カテーテルから生理食塩水 40mL (60 秒)、AAV ベクター10mL (15 秒)、生理食塩水 20mL (30 秒) を順に注入し、ベクターと血液の接触を可及的に回避した。カテーテル抜去後同部を結紮閉鎖し、止血確認後閉腹して手技を終了した。手術中に明らかなバイタルの悪化は認められなかった。

同方法を用い AAV 中和抗体陽性カニクイザル計 3 頭に対しベクター導入実験を行ったところ、「門脈本幹直接穿刺法」と同様に全例に導入遺伝子由来第 IX 因子の発現が確認できた。

②実験ブタに対する門脈注入実験

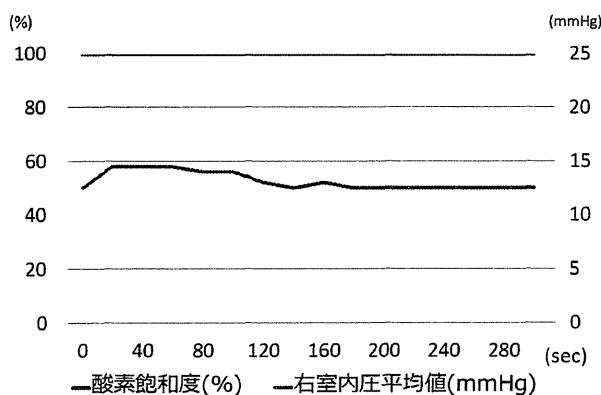
全身麻酔下の実験ブタに対し①と同様の

実験を行った。カテーテルバルーンによる血流遮断後、門脈左枝に造影剤を注入したところ、造影剤が少なくとも60秒間は門脈左枝並びにその分枝内に停滞している現象が観察された。その後造影剤は徐々に消失し、肝左葉に吸収分散したものと思われた。また上記処置に加え肝動脈血流も遮断し門脈造影を行ったところ、僅かだが造影剤の停滞時間が更に延長する現象が認められた(図3)。



(図3：門脈・肝動脈血流遮断時の造影剤の停滞現象)

次に本処置法が循環動態に与える影響を検討するために、臨床治療時に想定されている標準肝容積の25%にあたる140ccの生理的食塩水を、18秒間で注入したところ、心拍数・血圧・酸素飽和度・心右室内圧に明らかな変化は認められなかった。(図4)



(図4：門脈急速注入後の心右房圧・酸素飽和度の変化)

D. 考察

本研究では、血友病の遺伝子治療の前臨床試験における、「より選択的で安全な遺伝子投与手技の確立」を目的に実験を行っている。今回の検討により、AAV抗体陽性のカニクイザルに対し腸間膜静脈分枝から選択的に門脈左枝へとマイクロカテーテルが挿入可能であることが判明し、さらに生理食塩水による血液フラッシュ後のベクター注入も特に問題なく実施できることが確認された。またこれらの個体は術後の観察により、全頭において導入遺伝子由来第IX因子の発現(5~10%)を長期間維持することが判明した。よって本ベクター投与法は、日本人のほぼ半数が陽性を示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考えられる。

次に同処置法を用いた臨床治療に配意し、より効率的でかつ対象患者の負担の少ない投与条件の適正化を図るために、全く同じ処置を実験ブタに対し実施した。血流を一時的に遮断した門脈左枝に造影剤を注入すると、少なくとも60秒間以上門脈左枝内に造影剤が停滞することが判明し、さらに肝動脈血流の遮断を加えた場合は、停留時間が更に延長することが観察された。現在ベクターを使った遺伝子導入の効率に関しては「ベクターが細胞内に移入するためには一定時間以上の接触時間が必要である。」という概念がほぼ確立しており、同現象は本実験の目的である導入遺伝子由来第IX因子の発現に有利に働いている可能性が示唆された。また門脈内注入試験の結果より、標準肝容積20~25%相当の門脈急速注入負荷では、生体に重大な障害を与える程の循環動態への悪影響はないことが推察された。今後は同様の実験を発展させ、随時同方法による臨床治療が実施可能な状態を構築したいと考えている。

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ベクターを投与し治療域までに達する導入遺伝子由来第IX因子を発現させることに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* Feb;21(2):318-23 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）
分担研究報告書

臨床研究用ベクターの GMP 製造と品質検査法の確立に関する研究

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

アデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8 : AAV8）ベクターを利用した血友病遺伝子治療の臨床研究実施に必須である AAV8 ベクターの Good Manufacturing Practice (GMP) グレードの製造および前臨床安全性試験実施計画において、CMO 及び CRO との協議における必要なサポートを行なった。また、血友病遺伝子治療の次世代ベクターとしての位置づけであるサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターについて、特に製造の下流工程（精製条件）の検討を行い、カラム法での精製を可能にし、大量製造・精製が可能な GMP 製造法を提案した。

A. 研究目的

本研究に於いて、アデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8 : AAV8）ベクターの利用は、血友病遺伝子治療の臨床研究の実現を最優先視するものであり、我々はそれに必要な製造および前臨床安全性試験実施に関わるサポートを実施している。一方、サル免疫不全ウイルス（Simian Immuno-deficiency 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の性能を持たせ、いつでも代替可能な状況としておくことを目的とし、臨床研究に対応可能な製造法・品質検査法を整備している。

B. 研究方法

(1) hFIX-AAV 8 ベクターの臨床研究実施準備のサポート：

中国 CMO における hFIX-AAV8 ベクターの GMP 製造、及び製造したベクターを用いた前臨床安全性試験を実施するにあたり、当社の医薬開発の経験に基づきその準備と実施のサポートを行う。

(2) SIV ベクターの GMP 製造技術の確立：

AAV ベクターのバックアップ技術である SIV ベクターについて、臨床研究の実施が可能なレベルにまで製造技術を向上させる。特に、血友病治療の被検薬として大量製造が可能なシステムを構築する。

（倫理面への配慮）

現在用いている実験材料・方法について倫理的

な問題は付随しない。

C. 研究結果

(1) hFIX-AAV 8 ベクターの臨床研究実施準備のサポート：

GMP 製造および前臨床安全性試験の実施計画において、CMO 及び CRO との協議における必要なサポートを行なった。

(2) SIV ベクターの GMP 製造技術の確立：

SIV ベクターの製造について、特に製造の下流工程（精製条件）を検討した。遠心法での精製からカラム法での精製に変更することに成功し、大量製造・精製が可能な GMP 製造法を提案した。

D. 考察

hFIX 搭載 AAV8 ベクターの GMP 製造および安全性試験の実施について、日本・中国間の諸問題の影響を受けることなく、会社間において引き続きサポート出来る体制を構築・維持している。

SIV ベクターについては、血友病治療の被検薬として大量製造が可能なシステムの構築が可能になった。臨床応用へ向けての準備が整い、実際の GMP 製造施設での検討も可能である。

E. 結論

血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、AAV8 ベクターの GMP 製造および安全性試験の実施につき、サポート出来る体制を引き続き構築・維持している。SIV ベクターについて、カラム法での精製に成功し、血友病遺伝子治療の臨床研究に適用可能な GMP 製造を実現できる見込み

である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Griesenbach U, Inoue M, Meng C, Farley R, Chan M, Newman NK, Brum A, You J, Kerton A, Shoemark A, Boyd AC, Davies JC, Higgins TE, Gill DR, Hyde SC, Innes JA, Porteous DJ, **Hasegawa M**, Alton EW. Assessment of F/HN-Pseudotyped Lentivirus as a Clinically Relevant Vector for Lung Gene Therapy. Am J Respir Crit Care Med. 186(9):846-56, 2012.
- 2) 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):1802-13, 2012

2 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

「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。

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:

これからの血友病診療は、患者の特徴に基づいたオーダーメイド的な対応を考慮していく必要がある。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効であり、特に疾患の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 患者の第 VIII 因子遺伝子(F8)における病因遺伝子変異の同定・解析を行い、血友病診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より多くの症例の蓄積が必須であると考え、継続的な遺伝子解析を施行してきた。

今年度の研究では血友病 A 19 例(重症 9 例、中等症 4 例、軽症 6 例)の解析を施行し、17 例で病因と考えられる遺伝子変異を同定した。変異が検出できなかった 2 例のうちの軽症患者の 1 例では、成熟第 VIII 因子の Leu13(CTC)でのシトシンからアデニンへのトランスポージョンが検出された。この置換はコドンの 3 番目の塩基であったためアミノ酸の置換を伴わず、サイレント変異と考えるのが一般的であるが、この置換が変異やポリモルフィズムとしてこれまでに報告のない非常に稀有なものであったことは synonymous 変異である可能性を示唆した。

病因遺伝子変異とインヒビター発生リスクについて、日本人の F8 解析結果から検討した。日本人においても 1) 第 VIII 因子を発現することができない、いわゆるヌル変異を有する患者でインヒビター発生頻度が高いこと、2) ヌル変異であっても、複数のエクソンを欠くような大規模な欠失が最も高頻度で、逆位はそれほどではなく、変異のタイプによってリスクに明らかな差があること、が確認された。

責任遺伝子解析は今後の血友病診療では必須である。今後も継続的な遺伝子解析を施行し、診療に有益な知見の取得と集積が必要である。

A. 研究目的

現在の血友病診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・治療法の研究開発が目覚ましい勢いで進んで来ており、血友病診療は患者の特徴に基づくオーダーメイド医療を考慮すべき時代を向えつつ

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効果的であり、特に疾患の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、日本人血友病患者の病因遺伝子変異の同定・解析を積極的に行うことで、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決して画一的ではなく、目的を達成するためにはより多くの症例の解析が必要であると考えられた。

本研究では病因遺伝子解析から血友病診療に応用可能な知見の獲得を目指す。

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ケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は *F8*-001 transcript (ENST00000360256)の塩基配列と比較した。

2. *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。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、Hs00252034_m1; エクソン 25-26 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。

3. 凝固学的解析

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

4. バイオインフォマティクス解析

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/>)および SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)で解析した。スプライシング予測は GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)および 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. 血友病 A 症例の *F8* 解析

血友病 A 患者 19 例(重症 9 例、中等症 4 例、軽症 6 例)の *F8* の解析を施行し、17 例で病因と考えられる遺伝子変異を同定した。

検出された変異は 1 塩基置換が 10 例と最も多く、次いで X 染色体の逆位が 4 例、小規模欠失が 3 例であった。2 例からは *F8* を構成する全エクソンとその近傍、および 5'、3' 非翻訳領域のシーケンシングによる解析を行ったが、明らかに病因と判定できる遺伝子変異を検出することができなかった。

1 塩基置換の 10 例に同一変異はなかった。

ミスセンス変異は 9 種類検出され、このうち 5 種類 (W382C、R471S、W688L、R1764G、G2285E)は、これまでに国際的なデータベースにも登録されていない新規の変異であった。ナンセンス変異は重症の 1 例からのみ検出された。

明らかに病因と判定できる変異を検出できなかった 2 例のうちの 1 例で、第 VIII 因子活性を 20-40%有する非常に軽症の患者から、エクソン 1 内においてシトシンからアデニンへの 1 塩基置換(c.120C>A)を同定した。この置換は、これまでに変異やポリモルフィズムとしての報告のない非常に稀有なものであった。

2. 病因遺伝子変異とインヒビター発生に関する解析

これまでに行った 216 例の日本人血友病 A 患者の F8 解析結果から、病因遺伝子変異とインヒビター発生との関連性について検討してみた。

対象患者の重症度は、重症 124 例、中等症・軽症 91 例であり、各群におけるインヒビター発生頻度はそれぞれ 13.7%、5.5%であった。インヒビターを発生しやすい重症例においては、欠失、特に大規模欠失でのインヒビター発生頻度が 50%と非常に高値であった。次いでナンセンス変異がおよそ 25%と高値であった。逆位のインヒビター発生頻度は 14%であり、重症例全体の発生頻度とほぼ同等であった。

逆位患者 2 名の F8 mRNA を解析したところ、異所性の発現を検出しているにも拘らず、少量ながらも検出可能な mRNA の存在が確認された。

非重症症例でインヒビターを発生した 5 例の病因遺伝子変異は、点変異 4 例(G479R、R1781H、H1859P、c.1478+325A>G)と、1 塩基置換 1 例であった。

D. 考察

1. 血友病 A 症例の F8 解析

血友病 A 症例の病因遺伝子変異は非常に

多種多様であることが再確認された。この結果は、今後の血友病診療の有効性・安全性の向上を目指したオーダーメイド化に向けては、個々の患者で F8 解析を施行することが必須であること示唆するものと考えられる。

今回の解析において、明らかに病因と考えられる変異を持たなかった非常に軽症の患者の解析から稀有な 1 塩基置換を検出した。このシトシンからアデニンへのトランスバージョンは、エクソン 1 にコードされている Leu21(CTC)の第 3 番目のシトシンで検出されたため、翻訳に関してはアミノ酸置換を伴わず、サイレントであろうことが通常予測される。しかしながら、患者の F8 の他の部位に血友病を起こし得るような遺伝子変異が検出されず、検出された置換が国際的な変異やポリモルフィズムとして報告されていないことは、この置換が Synonymous mutation として血友病 A の病因となっている可能性を示唆するものであった。この置換が第 VIII 因子の産生に影響する可能性として、まずスプライシングに異常をきたす可能性が挙げられる。実際、シトシンがアデニンに置換した場合には、新たな acceptor splice site や silencer motifs が生じることが *in silico* 解析にて予測された。さらに、この置換が病因となり得るもう一つの可能性として、codon usage の影響が考えられた。第 VIII 因子 Leu21 が野生型である CTC のコドン、ヒトにおいては 2 番目に使用頻度が高い。これに対して変異体の CTA では最も使用頻度が低くなる。したがって、置換による翻訳効率が大幅な低下が、第 VIII 因子タンパク質が十分に産生できない状態を引き起こす可能性が示唆される。患者のフェノタイプが非常に軽症であり、20-40%程度の第 VIII 因子タンパク質が患者の血液中に存在しているということは、これらの推測と合致しているように考えられる。今後、発現実験によりこの 1 塩基置換の病因としての可能性を解析することで、新たな血友病発生メカニズムの発見に繋がる可能性

がある。

2. 病因遺伝子変異とインヒビター発生に関する解析

この班の目的のひとつは、遺伝子解析から血友病診療に有用な情報を得ることである。血友病の診療において補充療法の有効性を著しく低下させるインヒビターの発生は最も深刻な問題であり、その発生機序やリスクの解明、新規治療法の開発は非常に重要である。これまでにインヒビター発生リスクは、*F8* の病因遺伝子変異のタイプによって異なることが報告されて来ている。しかし、わが国における本格的な検討はこれまででなされていなかった。そこで今年度は、現在までに我々が行ってきた 216 例の *F8* 解析結果を、インヒビター発生情報とリンクさせ、その関連性について検討した。

欧米を中心とした多施設からの解析では、血中の第 VIII 因子をゼロに至らしめるヌル変異はインヒビター発生の高リスクであると報告されている。今回の日本人での解析結果でも、このことは確認され、欠失、なかでも複数のエクソンにまたがる大規模な欠失は非常に高リスクであることが確認された。しかし、典型的なヌル変異である逆位は、それほど高リスクではなく、重症例においては標準的な発生頻度であることが確認された。近年、逆位の場合では、*F8* 内外のプロモーターの存在により、血中に第 VIII 因子は確認できないが、細胞内に第 VIII 因子様のタンパク質が発現しており、これが自己と認識されている可能性があるとの報告がある。本年度の研究で、血液細胞中に *F8* mRNA が検出されたことは、その可能性を示唆する結果であった。したがって逆位がヌル変異でありながらインヒビターの高リスクとならない要因のひとつには、細胞内における第 VIII 因子様タンパク質の発現による免疫寛容があるのではないかと考察される。

今回の解析において、遺伝子変異のタイプによるインヒビター発生リスクは、日本人は欧米人と同様であることが確認された。この関連

については J-HIS 研究によってさらに明確になることが期待される。

E. 結論

日本人血友病 A 患者の *F8* を対象とし病因遺伝子変異の解析を行った。得られた結果は、これまでの解析で確認されてきた“多様性”が再認識させられるものであり、このことは患者の特徴を把握するうえでは患者ごとの遺伝子解析が必須であることを示した。

今年度の解析のなかで検出された 1 塩基置換は Synonymous mutation である可能性が高く、新たな血友病 A 発症メカニズムとして注目される。

遺伝子解析は血友病診療の発展と充実に必要不可欠であり、今後も継続的な解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Inaba H, Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild haemophilia A. *Haemophilia*. 2013 Jan;19(1):100-5. doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02906.x. Epub 2012 Jul 9.

2. 学会発表

① 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、福武勝幸 血友病 A の病因遺伝子変異はイントロンの深部にも隠れている 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年 6 月 東京
② 鈴木隆史、天野景裕、清田育男、村松崇、稲葉 浩、福武勝幸 重症型血友病 A

の成人患者に発生した高力価インヒビターに対する免疫寛容導入療法 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012年6月 東京

特になし

③ 篠澤圭子、鈴木隆史、天野景裕、萩原剛、稲葉 浩、田中朝志、福武勝幸 重症型先天性血液凝固第V因子欠乏症の血小板FVのトロンビン生成 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012年6月 東京

④ 血友病A インヒビターの免疫寛容療法に活性型第VII因子製剤定期投与併用で出血頻度が低下した1例 天野景裕、近澤悠志、篠澤圭子、村松 崇、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原 剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武 勝幸 第34回日本血栓止血学会学術集会 2012年6月 東京

⑤ 血友病A患者の第VIII因子遺伝子イントロン16内で検出されたLINE-1挿入変異 稲葉 浩、篠澤圭子、大瀧 学、天野景裕、福武勝幸 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月 京都市

⑥ Genetic analysis of antithrombin deficient patients with deep vein thrombosis. Keiko Shinozawa、Hiroshi Inaba、Manabu Otaki、Takeshi Hagiwara、Takashi Suzuki、Kagehiro Amano、Katsuyuki Fukutake 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月 京都市

⑦ 血友病B患者で同定した3つの遺伝子変異 近澤悠志、篠澤圭子、天野景裕、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原 剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月 京都市

⑧ 新たに第XI因子欠乏症の合併が診断された軽症型血友病Aの一例 大瀧 学、篠澤圭子、近澤悠志、清田育男、稲葉 浩、天野景裕、福武勝幸 第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月 京都市

H.知的財産権の出願・登録状況

厚生労働省研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ウイルス感染血友病患者の手術適応に関する研究

研究分担者 竹谷 英之 東京大学医科学研究所 附属病院 関節外科 講師

研究協力者 鯉渕 智彦 東京大学医科学研究所 附属病院 感染免疫内科 講師

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 of 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。本研究では血友病患者の HIV と HCV の術前の状態と術後合併症の関係について 127 件の手術を対象に検討した。HIV 感染状況よりも HCV 感染による肝機能障害が術後合併症に大きな影響を与えることがわかった。また欠損因子に対する抗体（インヒビター）を保有する患者で感染などの合併症が高率に起こることがわかった。

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 25 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 23 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 35%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。今回は手術症例の術前の内科的背景と術後合併症の関係を統計解析した。

B:研究方法

2006 年の手術件数は 14 件で、2007 年から 2012 年 6 月までの手術件数は 112 件であった。全体として 80 例 126 手術が行われ、この期間中に手術を予定し、入院直前に吐血により死亡した 1 例を加えた 127 件を対象とした。なお、手術時平均年齢は 39.03 歳（13 歳から 60 歳）であった。

術前の内科的項目として、診断、術式、インヒビターの有無、ウイルス感染（HBs 抗原、

HCV 抗体、HIV 抗体、CD4 細胞数、HCV-Viral Load (VL)、HIV-VL)、術前の感染、採血検査 (GOT, GPT, ALP, TP, ALB, PLT、ヒアルロン酸、AFP)、画像検査 (腹水、脾腫) そして Child 分類を評価した。

術後の合併症として、術後感染、創部皮膚癒合不全、生命予後、血栓症そして日和見感染を調査した。

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。

術前の評価項目を、有無もしくは基準値内外、CD4 細胞数は 200 未満と 200 以上、Child の分類は A&B と C の 2 つに分類し、術後合併症との関係を SPSS にて統計解析し、P 値が 0.05 以下を有意と判定した。また 95%信頼区間でのオッズ比も求めた。

C : 結果

C-1 : 評価結果

血友病 A97 手術、血友病 B28 手術、その他の凝固因子異常 2 手術であった。欠損因子に対する抗体 (インヒビター) を有していた症例の手術は 18 手術であった。術式は、人工関節置換術は 81 手術、関節鏡視下滑膜切除術は 15 手術、その他の手術は 24 手術であった。ウイルス感染に関しては、HCV 抗体が陽性であったのは 113 手術 (96.8%) でこのうち HCV-RNA が検出されたのは 37 手術、検出されなかったのは 62 手術であった。一方 HIV 抗体が陽性であったのは 42 手術 (33.3%) で、このうち 1 手術だけが HCV 抗体陰性で、残りの 41 手術は HCV/HIV 重複感染手術症例であった。HCV 感染も HIV 感染もなかったのは 12 手術 (9.5%) であった。術前の感染は 4 件に認めた。術前の採血結果については表 1 に示した。

腹水は 1 件で、脾腫は 18 件で認めた。Child の分類では、A が 65 件、B が 7 件、C が 1 件であった。

術後合併症として、術後感染が 4 件、皮膚癒合不全 4 件、死亡例 4 件、そして血栓症や日和見感染は認めなかった。

C-2 : 統計解析の結果 (表 2-a, b, c)

術後感染を有意に合併したのは、インヒビターを保有した患者に手術を行った場合 ($p < 0.05$, Odds : 6.13) と術前に感染があった場合 ($p < 0.0001$, Odds : 56.0) であった。皮膚癒合不全との間に有意な関係を示す術前の評価項目はなかった。生命予後に関しては、ALP 高値例 ($p < 0.05$, Odds : 9.13)、TP 低下例 ($p < 0.005$, Odds : 11.63)、血小板低下例 ($p < 0.05$, Odds : 7.75)、AFP 高値例 ($p < 0.05$, Odds : 7.25)、腹水 ($p < 0.0001$, Odds : 2)、Child 分類 C 例 ($p < 0.0001$, Odds : 11.83) であった。

D : 考察

HIV は免疫が低下することから、以前から術後感染の合併に関して、様々な報告がある。HIV 感染治療が困難であった時代には、CD4 細胞数が 400 もしくは 200 以下で、術後感染率が増加するという報告が大多数を占めていたが、抗 HIV 薬が開発され、投与方法も ART が行われ、HIV がコントロールできるようになり、術前の CD4 細胞数は感染に関係ないという報告が増えてきた。今回の我々の結果から、CD4 細胞数 200 以下と以上で感染合併症の発生に有意な差はなく、術前の CD4 細胞数は術後感染に関係ないという結果となった。しかし今回手術を行った HIV 陽性例全例が HIV-VL が検出感度以下か、検出されてい

ても長期間安定している患者であり、HIV 治療が良好な患者を対象としていることも、HIV 感染症が細菌感染発生に影響しなかった理由かもしれない。また CD4 細胞数が 50 以下の症例への手術は含まれておらず、今後の検討課題と考えている。その一方でインヒビター保有患者に対する手術後に感染が有意に発生した理由として、術後止血が十分ではなく、創部血腫を併発し、その血腫が感染培地になったためと考えた。そのため止血管理をより厳重にすることと、創部のドレナージにより創部血腫発生を予防することは重要であると考えた。

創部の微小出血が創部縫合不全を起こすとの動物実験結果が報告されている。また CD4 細胞数が低下した例では、皮膚癒合が遅延するとの報告もある。今回創部癒合不全が 4 例見られたが、有意な関連性を示す術前の評価項目はなかった。インヒビターで止血管理が困難となるため、皮膚癒合不全の高率発生が危惧されたが、有意な関係を認めなかった。また CD4 細胞数が 50 以下の手術例がなかったため、200 以下では皮膚癒合は遅延しないという結果となった。今後も症例数を重ね検討していく必要があると考えている。

死亡例に関しては、肝機能低下を示す血液検査や画像検査結果との関連が強く示唆された。これは HCV に罹患してからの期間が 20 年を超え、危惧されていた肝硬変や肝細胞癌へ進行した血友病患者に対する手術適応基準に関して検討する必要があることを示している。特に整形外科手術の多くは、機能回復を目的とした待機手術であるため、生命予後に係わる手術適応基準は厳密に規定されなければいけない。そのために、適切な時期に整形外科手術を行うためには、今後 HCV を保有

する患者の肝機能評価や治療は、今後の ADL を維持し QOL を保つためにも重要であると考えられる。また HCV-VL を検出感度以下に治療が可能であると予想された場合には、積極的に治療する必要があると考えられた。

このように血友病において、HCV 感染症は間接的に患者の身体機能改善のための手術施行を阻害することが、今回の調査結果で示された。また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。特に今回は術後合併が見られなかったが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

整形外科的機能再建手術を行う場合、HIV 感染症の影響より、HCV 感染症の影響が大きかった。HIV 感染の影響については CD4 細胞数の少ない症例での影響を評価する必要があると必要であると考えられた。また HCV 感染症の適切な治療を行う・行っておくことが、QOL 改善に有効であると考えられた。また、深部静脈血栓症や血友病患者の高齢化に伴う内科的疾患の影響も今後強まると予想され、今後も症例を積み重ねて検討していく必要があると考えられた。

F: 健康危険情報

なし

なし

H: 知的財産権の出版・登録状況

G: 研究発表

なし

表 1

検査項目	件数	平均値	標準偏差	中央値	最小値	最大値
GOT	111	33.64	2.15	25.0	13	146
GPT	111	33.5	2.4	24.0	6	168
ALP	111	320.63	11.64	287.0	159	823
TP	111	7.32	0.05	7.3	6.1	8.7
ALB	111	4.20	0.05	4.3	2.4	5.0
PLT	110	19.98	0.73	19.8	4.3	47.5
ヒアルロン酸	61	312.5	56.8	143.0	11	2060
AFP	71	6.9	1.13	4.0	1	67
CD4 数	35	427.0	36.0	388.0	56	979

表 2-a : 術前評価因子と術後感染

術前評価因子	カテゴリー	件数	p 値	Odds	95% CI
診断	血友病 A/B	116	0.9	1.16	0.12-11.65
術式	TJA/その他	118	0.41	2.26	0.31-16.68
HB s	Pos./Neg.	118	0.74	0.97	0.95-1.00
HCV-III	Pos./Neg.	118	0.47	0.89	0.83-0.95
HIV	Pos./Neg.	118	0.75	0.69	0.70-6.70
GOP	基準値内/外	110	0.23	0.74	0.66-0.83
GPT	基準値内/外	110	0.23	0.74	0.66-0.83
ALP	基準値内/外	110	0.74	1.48	0.15-14.74
TP	基準値内/外	110	0.16	0.26	0.04-1.97
ALB	基準値内/外	110	0.45	0.42	0.04-4.34
CD4 細胞数	200 以上/以下	35	0.76	1.03	0.97-1.10
HIV-VL	検出あり/なし	38	0.44	0.62	0.48-0.78
HCV-VL	検出あり/なし	99	0.12	0.61	0.52-0.72
PLT	基準値内/外	106	0.54	0.91	0.86-0.97
ヒアルロン酸	基準値内/外	61	0.75	0.04	0.75-1.00
AFP	基準値内/外	70	0.5	0.87	0.79-0.95
腹水	あり/なし	43	0.82	0.98	0.93-1.02
脾腫	あり/なし	43	0.22	0.56	0.43-0.74
Child 分類	A&B/C	73	0.47	0.88	0.81-0.96
インヒビター	あり/なし	118	0.05	6.13	0.80-46.6
術前感染	あり/なし	118	0	56	5.04-622.0

表 2-b : 術前評価因子と皮膚癒合不全

術前評価因子	カテゴリー	件数	p 値	Odds	95% CI
診断	血友病 A/B	116	0.9	1.16	0.12-11.65
術式	TJA/その他	118	0.41	2.26	0.31-16.68
HB s	Pos./Neg.	118	0.74	0.97	0.95-1.00
HCV-III	Pos./Neg.	118	0.47	0.89	0.83-0.95
HIV	Pos./Neg.	118	0.75	0.69	0.07-7.90
GOP	基準値内/外	110	0.98	1.03	0.10-10.28
GPT	基準値内/外	110	0.98	1.03	0.10-10.28
ALP	基準値内/外	110	0.74	1.48	0.15-14.74
TP	基準値内/外	110	0.16	0.26	0.04-197
ALB	基準値内/外	110	0.44	0.87	0.81-0.94
CD4 細胞数	200 以上/以下	35	0.76	1.03	0.97-1.10
HIV-VL	検出あり/なし	38	0.44	0.62	0.48-0.80
HCV-VL	検出あり/なし	99	0.6	1.83	0.18-18.27
PLT	基準値内/外	106	0.54	0.91	0.86-0.97
ヒアルロン酸	基準値内/外	61	0.75	1.57	0.93-26.28
AFP	基準値内/外	70	0.5	0.87	0.79-0.95
腹水	あり/なし	43	0.82	0.98	0.93-1.02
脾腫	あり/なし	43	0.22	0.56	0.43-0.74
Child 分類	A&B/C	73	0.54	0.89	0.81-0.96
インヒビター	あり/なし	118	0.39	0.84	0.78-0.91
術前感染	あり/なし	118	0.7	0.97	0.93-1.00