

る遺伝子治療法にも大きなブレイクスルーが得られた。カニクイザルにヒト FVIII を免疫することで、サル体内でヒト FVIII を検出するポリクローナル抗体を得ることに成功した。この抗体を用いた ELISA ではサル FVIII と 98% 以上の相同性をもつヒト FVIII を見事に区別できる。検出限界は 0.3~1% であり、十分にサルでの前臨床試験が可能である。来年度は本測定系を元に、サルを用いて血友病 A に対する効果、安全性の検討を行う。

血友病患者の QOL を阻害する因子の 1 つとして血友病性関節障害の存在が挙げられる。我々は昨年度に凝固因子発現 MSC の関節腔内投与が血友病の関節出血、関節障害を予防することをマウスモデルで示した。本年度はヒト MSC を用いて、レンチウイルスベクターである SIV により凝固因子が発現可能であることを明らかとした。来年度は、サルにより安全性を検討し、その結果を元にヒト臨床試験へと歩を進めたいと考えている。また、これまでに開発した血友病 A ブタを用いて関節障害への治療効果も検討したい。

PAI-1 と FVIII の重複欠損マウスの結果から、PAI-1 欠損によりインヒビター発生が少ないことが明らかとなった。さらに実際に PAI-1 の阻害薬を用いるとインヒビター発生が減少するため、薬理的な PAI-1 阻害もインヒビター発症に対する制御手法の 1 つと考えられる。我々

は過去に胸腺への FVIII 製剤の投与が、免疫寛容を誘導することを明らかとした。これらの結果を元に iPS 細胞を用いた免疫寛容誘導療法が可能となるかを検討している。本年度は、マウス血友病より iPS 細胞を樹立し、SIV ベクターを用いて凝固因子発現が可能であることを示し、また胸腺上皮細胞への分化条件を決定した。さらに、iPS 細胞や分化した胸腺上皮細胞に適したプロモーターを同定した。これらの基礎的検討を元に、来年度は iPS 細胞を用いた免疫誘導療法の確立を行いたいと考えている。

E. 結論

抗 AAV 抗体の保有に関わらず、血友病 B に対する遺伝子治療技術は確立し、GMP グレードベクターが精製できれば臨床研究が可能な段階である。また、開発が遅れていた血友病 A に対する遺伝子治療法を推進するための準備が整った。今後は、得られた知見を、実際の臨床に還元するために効果・安全性の確認を継続する。

F. 研究発表

1. 原著論文

1. Sakata A, Ohmori T, Nishimura N, Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, Sakata Y. Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation

- in mice. *Thromb J*. Epub ahead of print
2. Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol*. Epub ahead of print
 3. Koyama K, Madoiwa S, Nunomiya S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Combination of thrombin-antithrombin complex, plasminogen activator inhibitor-1, and protein C activity for early identification of severe coagulopathy in initial phase of sepsis: a prospective observational study. *Crit Care*. Epub ahead of print
 4. Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* 20:e40-44, 2014.
 5. Yasumoto, A, Madoiwa, S, Kashiwakura, Y, Ishiwata, A, Ohmori, T, Mizukami, H, Ozawa, K, Sakata, Y, Mimuro, J. Overexpression of factor VII ameliorates bleeding diathesis of factor VIII-deficient mice with inhibitors. *Thromb Res*. 131:444-449, 2013.
 6. Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, Sakata Y, Mimuro J. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb Res*. 132: 457-464, 2013.
 7. Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim I, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B. *Hum Gene Ther*. 24: 283-294, 2013.
 8. Koyama K, Madoiwa S, Tanaka S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Nunomiya S, Sakata Y. Evaluation of hemostatic biomarker abnormalities that precede platelet count decline in critically ill patients with sepsis. *J Crit Care*. 28: 556-563, 2013.

2. 学会発表

1. 柏倉 裕志、三室 淳、大西 彰、岩元 正樹、窓岩 清治、淵本 大一郎、鈴木 俊一、鈴木 美佐枝、千本 昭一郎、石渡 彰、安本 篤史、坂田 飛鳥、大森 司、橋本 径子、矢崎 智子、坂田 洋一：血友病 A クローンブタ 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形
 2. 笠原 浩二、原 裕太、兼田 瑞穂、飯田 和子、林 もゆる、下仲 基之、大森 司、一瀬 白帝、山本 正雅、三木 俊明：血液凝固第 XIII 因子基質としての血小板ビンキュリン分解産物 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形
 3. 坂田 飛鳥、大森 司、西村 智、鈴木 英紀、窓岩 清治、三室 淳、苅尾 七臣、坂田 洋一：Paxillin は Rap1b の修飾を介して血小板活性化を負に制御する 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5/30-6/1 山形
 4. 清水 徹一郎、堀江 久永、細谷 好則、佐田 尚宏、安田 是和、窓岩 清治、大森 司、三室 淳、篠原 貴子、丹羽 康則：当科における術後深部静脈血栓・塞栓症ハイリスク症例への対応 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013.4/11-13 福岡
 5. 窓岩 清治、大森 司、三室 淳、小澤 敬也、坂田 洋一：静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法施行患者における PT-INR 自己測定的安全性に関する臨床研究 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013/10/31 神戸
 6. 窓岩 清治：Progression of thrombosis and hemostasis 血友病におけるインヒビター発生機序とその制御手法 第 75 回日本血液学会学術集会 2013.4/11-13 福岡
 7. 窓岩 清治：DIC 分子マーカーでどこまで分かるか 第 14 回日本検査血液学会学術集会 2013/7/27-28 東京
 8. 清水 徹一郎、窓岩 清治、大森 司、三室 淳、堀江 久永、細谷 好則、佐田 尚宏、安田 是和：当科における術後静脈血栓塞栓症予防の現状 第 75 回日本臨床外科学会総会 2013.11/21-23 名古屋
- 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全例で治療域に達する効果が得られ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も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。サル肝臓に対する遺伝子導入の効果は最長で7年にわたって持続中である。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、新たな委託先を決定し、大量調製に向けた検討を進めた。

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及び第VIII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。現在までに得られた知見からは肝臓を標的として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

者 68 人を対象とした解析を行った。また、更に感度の高いアッセイ系の確立を目指して基礎的な検討を行った。

・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。これまで行ってきた血友病 B に対する取り組みに加えて、より症例数の多い血友病 A に対する検討を開始した。

・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、GMP グレードのベクター調製に関する検討を進めた。

(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・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。更に鋭敏なアッセイ系の開発を目指して、より検出感度の高いシフェラーゼなどを用いたシステムを探索したが、全体としての検出感度にはほとんど差が見られなかった。

・ 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関し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、GMP グレードのベクターの大量調製に向けた検討を進めた。

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、大多数の血友病患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きたい。肝臓に対する遺伝子導入の効果の持続期間に関しては未だ明らかにされていないが、我々の経験では最長 7 年にわたりほぼ同レベルでの効果が認められることが判明しており、ヒトにおける有効性の持続に関しても大いに期待が持てる。

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. 論文発表

Mimuro, J., Mizukami, H., Shima, M., Matsushita, T., Taki, M., Muto, S., Higasa, S., Sakai, M., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ozawa, K., Sakata, Y.: Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. **J Med Virol**, *in press*.

Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Machida, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., Ozawa, K.: Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. **Cancer Sci**, 104:1107-11, 2013.

Shimada, M., Abe, S., Takahashi, T., Shiozaki, K., Okuda, M., Mizukami, H., Klinman, D.M., Ozawa, K., Okuda, K.: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. **PLoS One**, 8(3):e57606. 2013.

2. 学会発表

Mizukami, H., Mimuro, J., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Precise evaluation of NAb status against adeno-associated viral vectors and an approach toward managing its inhibitory effect. The 16th Annual meeting, American Society for Gene and Cell Therapy, Salt Lake City, UA, May 15-18, 2013.

Mizukami, H.: Hemophilia gene therapy – recent progress and current perspectives. In Symposium II: “genetic diseases”. The 19th Annual meeting, Japan Society of Gene Therapy, Okayama, July 4-6, 2013.

Mizukami, H., Mimuro, J., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Sakata, Y., Ozawa, K.: Accurate measurement of NAb status against AAV vector capsids and an approach toward managing its inhibitory effect. The 21st Annual meeting, European Society of Gene and Cell Therapy, Madrid, Spain, October 25-28, 2013.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

【研究要旨】

重症血友病 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。一方、軽症血友病患者への FVIII 製剤投与によるインヒビター出現症例も散見される。軽症例での遺伝子異常の hot spot として Arg593Cys や R2150H が知られているが、発生機序は不明である。今回、Pro1809Leu 点変異を有する軽症血友病 A 患者のインヒビター出現を経験し、その発生機序を解明した。患者インヒビターは type 2 パターンを示し、正常血漿由来 FVIII を不活化するも、患者由来 FVIII 活性は不活化しなかった。この変異 FVIII 残基は Pro1809→Leu で新規点変異であり、FIXa 結合部位領域内 (1804-1818) では初めての報告であった。Pro1809 は A3 ドメイン内であるが、インヒビターは離れた C2 エピトープを認識していた。本インヒビターは FVIII における von Willebrand 因子やリン脂質結合に影響しないが、トロンビンや FXa による FVIII 活性化を抑制することから、本機序が FVIII 不活化に起因していた。この変異 FVIII は、C2 エピトープ同種抗体を出現させ、Pro1809 は C2 ドメインの抗原性（構造変異）を制御するとともに、C2 内の FIXa 結合領域との密接な関連性を示唆した。現在、変異 FVIII 株を作製し機能構造を解析中であり、この変異 FVIII と FIXa ドメインとの関係を明らかにする予定である。

A. 研究目的

血友病 A は、X 染色体上の血液凝固第 VIII 因子 (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型 FVIII 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重症血友病 A 患者の約 20%に抗 FVIII 同種抗体(インヒビター)が発生する。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。一方、軽症血友病 A 患者でも、FVIII 製剤投与によるインヒビター出現症例も散見されている。これら軽症例での遺伝子異常の hot spot として Arg593Cys や R2150H が知られているが、その発生機序は不明である。今回、新規 Pro1809Leu の点変異を有する軽症血友病 A 患者でのインヒビター出現を経験し、その発生機序を解明することを試みた。

B. 研究方法

1) 患者血漿からインヒビター-IgG 精製

患者血漿を Protein G Sepharose によって患者インヒビター-IgG を精製した。

2) インヒビターによる正常/患者血漿の FVIII 不活化

順次希釈したインヒビター-IgG を正常および患者血漿に 37°C 2 時間反応させ、残存 FVIII 活性を凝固一段法で測定した。

3) 患者インヒビターのエピトープ解析

FVIII、FVIIIa、C2 フラグメント (200 nM) の SDS-PAGE を施行し、PVDF 膜に転写させた。そこに患者血漿を 37°C 2 時間反応させ、ペルオキシダーゼ標識 anti-human IgG を引き続き反応させ、認識エピトープを同定した。

4) 患者 FVIII (F8) 遺伝子解析

研究機関内の倫理委員会承認のもと同意を取得した患者より全血を採取し、そこから genomic DNA を抽出精製した。long PCR 法または multiplex PCR 法を用いてイントロン 22 及びイントロン 1 逆位の存在についてスクリーニングした後、F8 の全 26 エクソン及び隣接領域について Dye terminator 法によりダイレクトシーケンシングを施行した。

5) インヒビターIgGの機能解析

i) すでに確立した microtiter well 上で固相化 von Willebrand 因子およびリン脂質と FVIII との直接結合実験におけるインヒビターIgG の抑制能を ELISA 法で評価した。

ii) FVIII におけるトロンビンおよび FXa 活性化反応におけるインヒビターIgG の抑制能を凝固一段法で評価した。

(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・考察

1) 精製した患者インヒビターIgG は FVIII 不活化 mode において type 2 パターンを示した。本インヒビターは正常血漿由来 FVIII には濃度依存的に不活化反応を示したが、患者由来 FVIII にはほとんど不活化を示さなかった。本インヒビターは immunoblot 解析から C2 エピトープを認識していた。

2) 患者 FVIII は Pro1809→Leu での新規 point mutation であり、FIXa 結合部位領域内(1804-1818)に含まれており、世界で初めての報告であった。非常に興味深いことに、Pro1809 は A3 ドメイン内に位置するも、インヒビターは離れた C2 エピトープを認識していた。

3) 本インヒビターは FVIII における von Willebrand 因子やリン脂質結合には全く影響しなかったが、トロンビンや FXa による FVIII 活性化を濃度依存的に抑制した。このことから、インヒビターの抑制機序はトロンビンや FXa による FVIII 活性化阻害であった。

4) この変異 FVIII は、C2 エピトープ同種抗体を出現させ、Pro1809 は C2 ドメインの抗原性(構造変異)を制御するとともに、C2 内の FIXa 結合領域との密接な関連性を示唆した。

D. 結論

血友病 A インヒビターの発症機序は未だ不明な点が多い。今回、新規 Pro1809Leu 点変異を有する軽症血友病 A 患者のインヒビター出現機序を解析し、Pro1809 は A3 ドメイン内であるが、インヒビターは離れた C2 エピトープを認識していた。軽症血友病でのインヒビターの hot spot である Arg593Cys, Arg2150His でのインヒビターはその部位を含むド

メインをエピトープにしており、本例は FVIII 構造を考えていく点で極めて重要であった。現在、変異 FVIII 株を作製し機能構造を解析中であり、この変異 FVIII と FIXa ドメインとの関係を明らかにする予定である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

学会発表

Yada K, Nogami K, Takeyama M, Shima M. A novel mechanism of development of the inhibitor associated with Pro1809Leu mutation in factor VIII. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013 札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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 25 年 11 月 8 日現在 219 名の症例登録を得た。
3. 第 3 研究として「インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究」を実施した。血友病の治療において、血液凝固第 VIII 因子活性測定法の標準化とインヒビターを測定するベセスダ法の標準化が重要である。国際的に信頼性の高い測定機器のひとつである ACL 9000 と APTT 試薬ヒーモスアイエル APTT-SP を基準測定法と想定し、第 VIII 因子活性測定法の精度を検討したうえで、臨床の場で現実的に利用できるこれらの検査の精度を検証した。そして、インヒビター測定の方法である Bethesda 法を改良した Nijmegen 変法をさらに改良して、多くの検査室において簡便

に導入できるように Tokyo 変法の設定し、共通の方法として普及させることを試みている。

4. 第4研究として第1研究ならびに第2研究に登録された血友病患者の第VIII因子、第IX因子、サイトカイン (TNF- α 、IL-10、CTLA-4) の遺伝子解析を実施して、遺伝子異常を明らかにし、臨床的データとをあわせてわが国における血友病患者のインヒビター発生要因を明らかにすることを目的として、多施設協同にて「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」の実施計画・実施体制の確立を行った。

平成25年11月末現在、230症例の検体を入手し178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. 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。日本国内の現状を把握するために第VIII、第IX因子製剤のインヒビター発生要因に関する研究の協力施設に対してアンケート調査を実施し、標準化へ向けての問題点を検討した。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方法である 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。

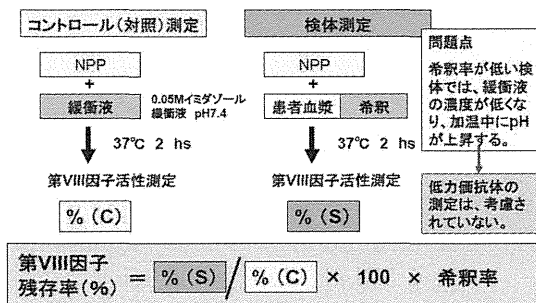


図 1 ベセスダ法の問題点

まず、第 VIII 因子活性の測定法を標準化する必要があるが、これまでの研究において、一般の自動化機器では第 VIII 因子活性測定法において、希釈液として製造会社指定の希釈液（多くは緩衝液）が使われて標準化の妨げとなることから、検体調整操作の一部を用手法にして機器を超えた応用性の高い測定法を設定した。この方法は、検査室間で共通に使用でき、同一条件で第 VIII 因子活性の校正が可能な測定法となった。また、インヒビター測定の方法では正常プール血漿(NPP)の pH を安定させるために、固形のイミダゾールを加えて 0.1N とし 1N の HCl で pH を整えている。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合には操作が難しいことから、Nijmegen 変法を普及させるために 2N の緩衝化イミダゾール液を用いて、20 分の 1 量を NPP に添加することにより緩衝化 NPP 作成の簡便化を図った Tokyo 変法の実用性を検証した。これらを受けて、インヒビター標準血漿の作成手順を確立し、施設間差の検証と実際の施設間差を縮小する手段を検討することを今後の目的とした。

4. 第 4 研究は、第 2 研究における血友病データベースにおいて遺伝子異常に関する情報を提供

するもので、インヒビター発生要因の評価に必須である。21 年度の実績を踏まえ、平成 22 年度から名古屋大学を解析施設として加え、3 施設において全国レベルの遺伝子解析を行うための体制を構築した。本年度は、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 25 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) 第 VIII 因子活性と第 VIII 因子インヒビター測定に関するアンケート調査

対象施設

東京大学医科学研究所病院、三重大学附属病院、奈良県立医科大学附属病院、札幌徳洲会病院、聖マリアンナ医科大学病院、宮城県立こども病院、兵庫医科大学病院、鹿児島市立病院、久留米大学附属病院、神奈川県立こども医療センター、産業医科大学病院、名古屋大学附属病院、北九州八幡東病院、静岡県立こども病院、東京医科大学病院

調査内容

1) 第 VIII 因子活性の測定

() 院内で測定⇒3)へ

結果判明までの最短時間 (時間 または 日)

() 外注で測定⇒会社名

()

結果判明までの最短時間 (時間 または 日)

2) 第 VIII 因子インヒビターの測定

() 院内で測定⇒4)へ

結果判明までの最短時間 (時間 または 日)

() 外注で測定⇒会社名

()

結果判明までの最短時間 (時間 または 日)

3) 第 VIII 因子活性の測定方法

() 凝固 1 段法

() 合成基質法

() 不明

4) 第 VIII 因子インヒビターの測定方法

() ベセスダ法

() ナイメーゲン変法

() その他 ()

() 不明

5) 第 VIII 因子活性の真値 1% の場合の検査結果についてあなたの許容誤差範囲

() 0.9~1.1%

() 0.8~1.2%

() 0.6~1.4%

() 0.5~2.0%

() その他 () ~ () %

6) 第 VIII 因子インヒビターの真値 50BU の場合の検査結果についてあなたの許容誤差範囲 ()

48BU~52BU

() 45BU~55BU

() 40BU~60BU

() 30BU~70BU

() その他 () ~ () BU

7) 第 VIII 因子インヒビターの真値 50BU の場合、何単位変化したら意味があると判断しますか?

() BU 以上の変化があれば意味あると考える。

調査方法

班会議における手渡し回収

(2)Tokyo 変法の血漿 pH への影響

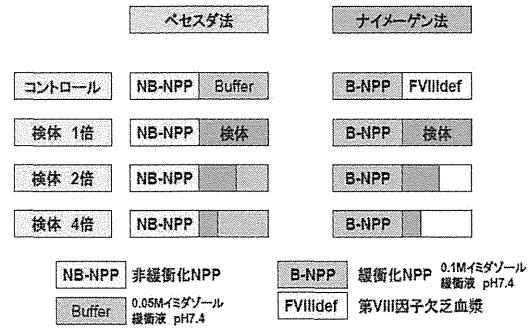


図 2 ベセスダ法とナイメーゲン変法

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。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)。

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

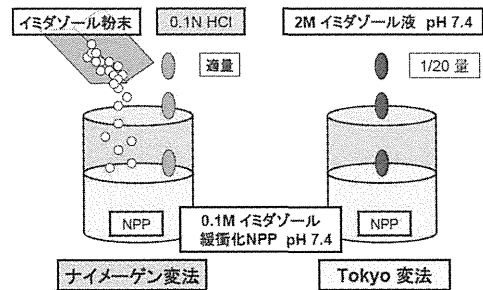


図 3 原法と Tokyo 変法との違い

(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。

(5) 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。

(6)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 pH7.4)

5. 検体希釈液 (0.05M緩衝化イミダゾール液 pH7.4)

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°C10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°C10分間加温して解凍した後、十分混和し、その950μLにpH調整試薬50μL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°C10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100μL+300μL、50μL+350μL、25μL+375μL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°C2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950μLにpH調整試薬50μL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950μLにpH調整試薬50μL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。

f. 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。

表1 検査実施機関と検査内容

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

（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：今回の研究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 25 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 25 年 7 月には診断時～平成 25 年 7 月までの診療内容の追跡調査を行った。

平成 25 年 11 月 2 日現在の登録状況並びに平成 25 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：219 名 (本年度予定:200 例)

登録施設数：40 施設

症例登録医師数：57 名

表 2【登録・追跡状況】

病型	血友病 A	190 (86.8%)
	血友病 B	29 (13.2%)
インヒビター発生	血友病 A	39 (20.5%) *
	血友病 B	2 (6.9%) *
最終追跡年	2013 年	186(84.9%)
	2012 年	15 (6.8%)
	2011 年	2 (0.9%)
	2010 年	3 (1.4%)
	追跡未実施	13 (5.9%)
通院状況	通院中	198 (96.1%)
	転院	7 (3.4%)
	中止	1 (0.5%)

表 3【患者背景】中央値[最小値-最大値]

性別	男	218(99.5%)
	女	1(0.5%)
診断時年齢	0 歳 7 ヶ月 [0 歳 0 ヶ月-78 歳 4 ヶ月]	
診断年	2007 年	22 (10.0%)
	2008 年	39 (17.8%)
	2009 年	20 (9.1%)
	2010 年	32 (14.6%)
	2011 年	46 (21.0%)
	2012 年	53 (24.2%)
	2013 年	7 (3.2%)

重症度	重症	155 (70.8%)
	中等症	40 (18.3%)
	軽症	24 (10.9%)
診断の契機	家族歴	64 (29.4%)
	出血	150 (68.8%)
	その他	4 (1.8%)
家族歴	なし	116 (53.0%)
	あり	96 (44.5%)
	→内 8 名にインヒビターの家族歴あり	
	不明	7 (1.5%)

表 4【治療状況】

治療法*	未治療	15 (7.3%)
	定期補充	115 (56.1%)
	出血時のみ	75 (36.6%)
カテーテルの挿入	なし	170 (82.5%)
	あり	36 (17.5%)
在宅注射の実施	なし	124 (60.2%)
	あり	82 (39.8%)

*: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 5【濃厚治療】

Danger Event*	なし	142 (68.9%)
	あり	64 (31.1%)
重篤出血*	なし	165 (80.1%)
	あり	41 (19.9%)
頭蓋内出血*	なし	186 (90.3%)
	あり	20 (9.7%)
上記以外の重篤出血*	なし	173 (84.0%)
	あり	33 (16.0%)
手術・観血的処置*	なし	169 (82.0%)
	あり	37 (18.0%)

*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

表 6【初回投与について】

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	250	[90-2500]
体重当りの初回投与量	35	[10-180]
使用製剤	アドベイト	102 (54.8%)
	コージネイト FS バイオセット	57(30.6%)
	クロスエイト M	2 (1.1%)
	コンファクト F	5 (2.7%)
	ノバクト M	8 (4.3%)
	ベネフィクス	11 (5.9%)
	クリスマシン M	1 (0.5%)

中央値[最小値-最大値] / () 内はパーセント

表7【初回投与の目的】

初回投与の目的		合計(%)
予備的補充	10(5.3)	
定期補充	13(7.0)	
手術・観血的処置	7(3.7)	
出血	157(84.0)	
頭蓋内出血	13(8.2)	
右大腿(前)	2(1.3)	
左大腿(前)	3(1.9)	
筋肉内出血_その他	1(0.7)	
右肩	1(0.7)	
右腕	1(0.7)	
右膝	8(5.1)	
右足首	4(2.6)	
左肩	2(1.3)	
左腕	5(3.2)	
左膝	11(7.1)	
口の中(歯肉以外)	22(14.1)	
歯肉	1(0.6)	
消化管出血	6(3.8)	
鼻血	3(1.9)	
皮下出血(それ以外)	18(11.5)	
皮下出血(首から上)	18(11.5)	
採血時	15(9.6)	
けが(すり傷、切り傷)	2(1.3)	
All_その他	6(3.8)	
合計	156(100.0)	

表8【インヒビター】

発生年齢	1歳2ヶ月 [1歳4ヶ月-4歳2ヶ月]
総投与日数	13 [4-48]
総投与量	4250 [1000-25400]
診断時インヒビター値	2.5 [0※-47]
最大値	6 [0※-1000]
タイプ	High 23 (56.1%) Low 18 (43.9%)
出血時治療	出血なし 5 (12.2%) バイパス製剤 23 (56.1%) 中和療法 8 (19.5%) 中和+バイパス 3 (7.3%)
インヒビター治療	ITI実施 28 (71.8%) 未治療 11 (28.2%)
消失状況	消失 20 (48.8%) 未消失 21 (51.2%)
消失理由	ITIの成功 12 (63.1%) 自然消失 5 (26.3%) その他 1 (5.2%) 不明 1 (5.2%)

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重症血友病A患者に限定し、現時点で解析可能な110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。

表9【発生要因解析-患者背景①】

		未発生 (n=72)	発生 (n=38)	P値
2013/7/3 1 現在日 齢	(日)	1442	1542	0.39
血液型	A	19	12	0.94
	B	5	2	
	O	14	8	
	AB	4	3	
診断の契 機	家族歴	18	10	0.85
	出血	53	26	
	その他	1	1	
診断時の 年齢	(日)	209.0	206.6	0.96
血友病の 家族歴	なし	45	18	0.18
	あり	27	20	
インヒビ ターの家 族歴	なし	60	30	0.22
	あり	2	4	
分娩様式	経膣	50	28	0.80
	帝王切	20	9	

表10【発生要因解析-患者背景②】

		未発生 (n=72)	発生 (n=38)	P値
在胎週数	(週)	38.35	38.33	0.62
重篤疾患 の合併	なし	68	32	0.17
	あり	3	5	
栄養法	母乳	31	17	0.41
	人工乳	4	4	
	混合	36	14	
家族のア レルギー	なし	50	29	0.33
	あり	17	5	
患者のア レルギー	なし	57	32	0.70
	あり	15	6	

表 11 【発生要因解析-患者背景③】

		未発生 (n=72)	発生 (n=38)	P 値
Danger Event	なし	48	24	0.72
	あり	24	14	
重篤疾患	なし	56	26	0.28
	あり	16	12	
頭蓋内出血	なし	63	30	0.36
	あり	9	8	
上記以外の重篤出血	なし	64	34	0.81
	あり	8	4	
手術・観血的処置	なし	56	33	0.37
	あり	16	5	

表 12 【発生要因解析-治療に関する因子①】

		未発生 (n=72)	発生 (n=38)	P 値
初回投与時の日齢	(日)	317	309	0.88
初回投与日の投与量	(U/kg)	44.5	46.3	0.76
初回投与の目的	定期補充	4	3	0.58
	出血	64	30	
	手術・観血的処置	2	1	
	予備的補充	2	3	
濃厚な治療*	なし	53	26	0.72
	あり	19	12	
治療法**	出血時・予備的	4	25	<0.001
	定期補充	68	13	
カテーテル挿入	なし	61	37	0.03
	あり	11	1	
カテーテル取り出し	なし	67	38	0.43
	あり	5	0	

*: 5 日以上治療を連続する場合を濃厚な治療とした。
 **: 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-定期補充療法】

定期補充の開始時 ED		未発生 (n=72)	発生 (n=38)	P 値
~5ED	未開始 開始	50 22	30 7	0.19
~10ED	未開始 開始	33 39	27 10	<0.01
~15ED	未開始 開始	26 46	26 11	<0.01
~20ED	未開始 開始	20 52	25 12	<0.01
~25ED	未開始 開始	15 57	25 12	<0.01

表 14 【発生要因解析-治療に関する因子②】

		未発生 (n=72)	発生 (n=38)	P 値
25ED までの主要製剤	Recombinant①	52	17	0.012
	Recombinant②	17	20	
	Plasma①	2	0	
	Plasma②	1	0	

表 15 【発生要因解析-治療に関する因子③】

25ED までの主要製剤	出血時	定期補充療法	P 値
Recombinant①	52	17	<0.01
Recombinant②	17	20	

表 16 【発生要因解析-多変量解析】

		HR	P 値
25ED までの主要製剤	Recombinant①	1.237	0.71
	Recombinant②		
F8 遺伝子型	High risk	0.797	0.65
	Low risk		
治療法	出血時 定期補充	0.127	<0.001

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) アンケート調査

a. 第 VIII 因子活性の測定
実施施設

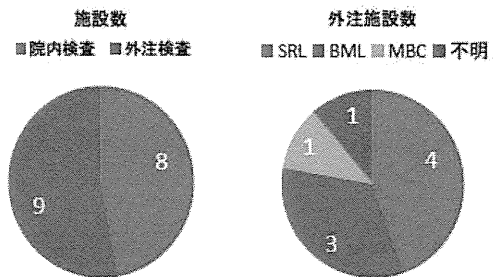


図 4 検査の実施場所

17 施設中 8 施設が内部測定、9 施設が外部委託であり、委託先はエスアールエル 4、ビーエムエル 3、三菱メディエンス 1、不明 1 であった。

所要時間

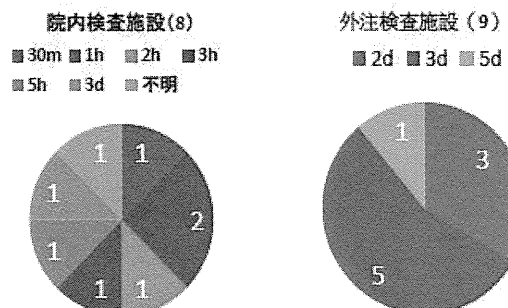


図 5 検査の所要時間

b. 第 VIII 因子インヒター活性の測定検査の実施場所

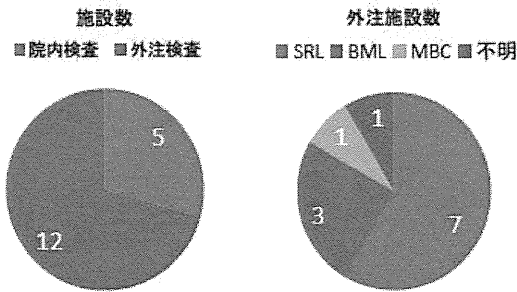


図 6 インヒビターの測定施設

所要時間

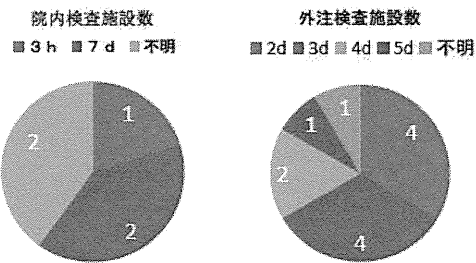


図 7 インヒビター測定の所要時間

c. 測定方法

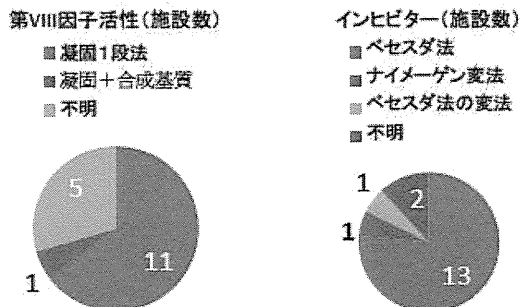


図 8 測定方法

d. 検査結果の許容誤差範囲

- 第 VIII 因子活性の真値 1 % の場合
- 第 VIII 因子インヒビターの真値 50BU の場合

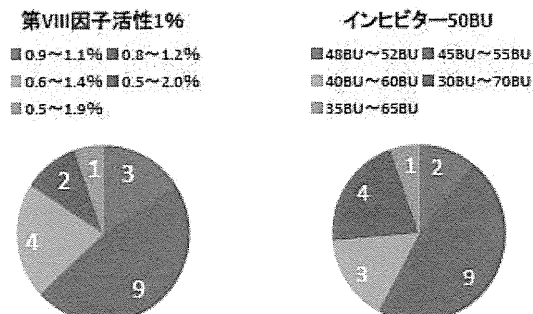


図 9 検査結果の許容誤差範囲

e. 医師の判断するインヒビター50 単位からの有意な変化とは

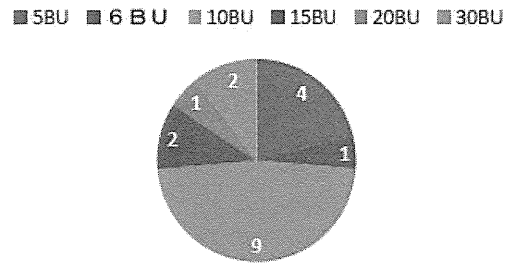


図 10 インヒビター50 単位からの有意な変化

(2)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 10)

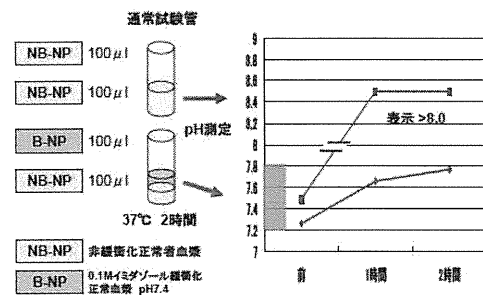


図 11 37°C 2 時間加温後の pH の変化

(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°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。

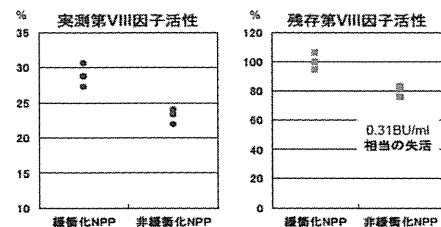


図 12 37°C 2 時間加温後の第 VIII 因子活性の変化

(4)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 因子欠乏血書による

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。

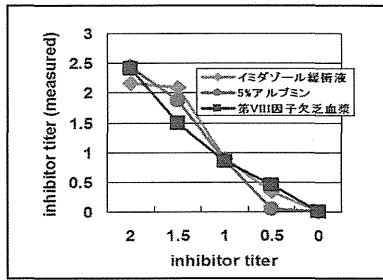


図 13 インヒビター力価への希釈液の影響

(5)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。

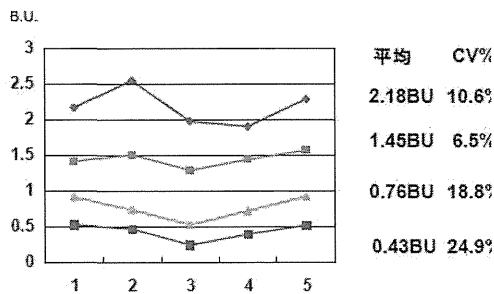


図 14 各インヒビター濃度測定再現性

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。

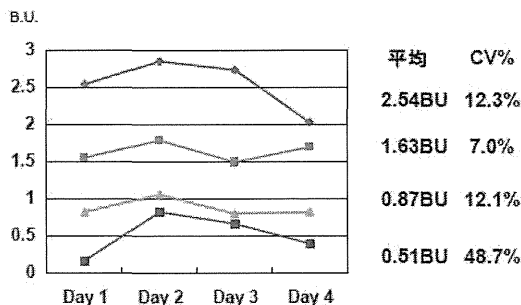


図 15 日差再現性

(6)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 25 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 61 例の検体入手 51 例解析終了

J-HIS2

対象 161 例中 169 例の検体入手 127 例解析終了

J-HIS 登録 61 施設 325 例の研究対象の内、遺伝子検査を実施したのは 127 例（血友病 A 153 例、血友病 B 26 例）であった(表 17 - 表 20)。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 J-HIS1 対象群では、いわゆる null 変異とされるイントロン 22 逆位、欠失、ナンセンス変異、polyA runs 外の小欠失・挿入の占める割合が、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 J-HIS2 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。各遺伝子変異のインヒビター発生についてイントロン 22 逆位における相対危険度を基準として算出した結果を図 9 に示す。血友病 B に関しては、表 19、20 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。

表 17 血友病 A 遺伝子解析結果(J-HIS1)

Mutation		%
Inversion	20	43.9
Large deletion	4	12.1
Small deletion	8	22.0
Nonsense mutation	3	7.32
Splicing variants	1	2.44
Missense mutation	5	9.80
Unknown	1	2.44
Total	42	100

表 18 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation	Inh+	
Inversion	34*	11
Large deletion	1	1
Small del/ins	17	4
Outside poly A runs	11	3
Inside poly A runs	6	1
Nonsense mutation	12	5
Light chain	2	2
Non light chain	10	3
Splicing variants	9	4
Conserved	6	3
Non-conserved	3	1
Missense mutation	37*	1
Light chain	21	0
Non light chain	16	1
Total	111	26

(*25ED に満たない症例を含む)

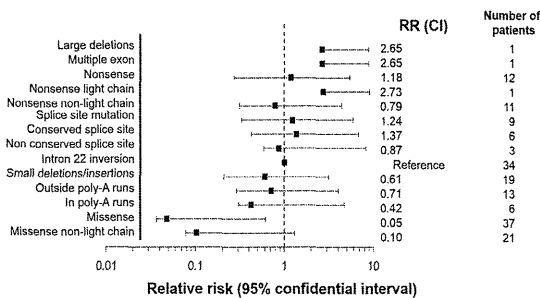


図 16 F8 遺伝子変異とインヒビター発生相対危険度 (J-HIS2)

表 19 血友病 B 遺伝子解析結果(J-HIS1)

Mutation	%	
Nonsense mutation	4	57.1
Small deletion	2	28.6
Large deletion	1	14.3
Total	7	100

表 20 血友病 B 遺伝子解析結果(J-HIS2)

Mutation	Inh+	
Splicing variants	6	0
Missense mutation	9	0
Promotor	2	0
Large deletion	2	1
Total	19	0

(*25ED に満たない症例を含む)

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219名中インヒビターは41名に見られた。

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重症血友病A患者を対象にインヒビターの発生要因の解析を行った。

昨年度は、カテーテルの挿入、治療法の項目で有意差が見られたが、今回の検討ではインヒビター発生要因として、治療法(出血時 v s 定期)および製剤による相違がみられたが、多変量解析の結果、後者の差異は治療法が影響した可能性が示唆され、本研究では現在のところ唯一、治療法の相違がインヒビター発生に関連している可能性が示唆された。更に症例数を増やしての検討が必要である。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

第VIII因子活性と第VIII因子インヒビター測定に関するアンケート調査の結果をみると、臨床医は実際の臨床検査の精度を上回る水準によって検査成績を読んでおり、その結果、検査値の変動に対して過大な意味を感じて解釈していることが分かった。例えば第VIII因子が1%レベルの測定では、同時再現性のCV%を10%程度にするのが限界であり、95%信頼域は $1 \pm 0.3\%$ 程度になるが、19人中12人の医師は $1 \pm 0.2\%$ を求めている。インヒビター測定では誤差は更に広がり、50BU付近ではCV%を20%程度にするのが限界であり、95%信頼域は $50 \pm 20\text{BU}$ 程度になるが、19人中14人の医師は $50 \pm 10\text{BU}$ を求めている。この様にして、測