

定の誤差を有意な変化として臨床判断が行われていることを標準化と共に修正する必要がある。

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らが提唱したナイメーゲン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(10ベセスダ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ベセスダ単位の誤差は残存%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、ベセスダ単位への変換後に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、文献的にはベセスダ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。

表21 ベセスダ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)

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		

・達成度について

これまでのBethesda法よりも信頼性が高くNijmegen変法と比べて、導入の容易さが優れた方法を用いた標準化に向けた基本的手法の開発は完成した。現在、サーベイランスに使うための管理血漿の準備を進めているところであり、患者検体が必要なことから待機期間が必要である。

これまでの基礎検討から、検体の希釈倍率は測定値の再現性を確保するうえで重要であり、追加検討が必要と考えられる。

・研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

血友病に発生するインヒビターの問題は、出血に対する治療とインヒビターの排除に関する治療研究

が進められているが、インヒビターの測定法の信頼性についての注目度は低く、臨床研究の信頼性を損なう原因となる可能性が高いままで放置されていると言っても過言ではない。新規治療薬の国際臨床試験においても、インヒビターの評価方法は様々であり、カットオフ値を 0.6BU や 0.4BU にした研究が存在しており、測定法の再現性や施設間差などの問題については国際的に検討が不十分な状態にあることから、広く普及可能な精度の高い方法の開発と標準化の研究は社会的意義は高く、国内での検討から良好な結果を得ることが出来れば、国際的な標準化の検討へ進むことが出来る。

・今後の展望について

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求めていることが分かった。今後、標準化により施設間差が縮まったとしても、その後に精度の限界と検査結果の意味について、臨床医の理解を得る必要があることも分かった。

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しながら、臨床医への啓発が必要である。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ことになっている。

4. インヒビター発生要因と遺伝学的検査

本研究では、J-HIS1 及び J-HIS2 の登録患者を対象とした遺伝子解析が進行しており、血友病 A に関してはかなりの遺伝子変異が同定されている。血友病の原因遺伝子変異とインヒビター発生との関連については既に欧州諸国からは先行する研究結果としていくつかの報告例が存在するが、特に null 変異とインヒビター発生についての関連性が指摘され、イントロン 22 逆位を基準に各遺伝子変異のインヒビター発生率が報告されている。本研究においても、J-HIS2 コホートでは、製剤投与回数が 25 回に満たない症例を含んでいるが、J-HIS1, J-HIS2 とともに null 変異を有する症例でインヒビターの発生率が高いという中間結果が得られた。重症型血友病 A において最も頻度の高い遺伝子変異として知られるイントロン 22 逆位について、最近 mRNA レベルでの発現が報告され、null 変異としての位置付けが見直さ

れる動きもあり、イントロン 22 逆位におけるインヒビター発生リスクを基準とした他の遺伝子変異でのインヒビター発生リスクについても再評価する必要がある。今後は、本研究における症例数を更に集積することで、遺伝子変異毎に詳細にインヒビター発生リスクを評価することが重要である。同じ原因遺伝子変異を有する症例集団で比較検討することにより、様々なインヒビター発生リスクを評価することも期待される。また、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の遺伝子変異との関連性も欧州諸国では報告されている。日本人は、単一民族であるという点で世界の中でも特殊な遺伝学的背景を有すると考えられ、欧州を中心とした既出の報告にとどまらない新たな知見を得る可能性があり、更なる症例集積を進めることが重要である。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、検体をさらに集積して遺伝子変異やサイトカイン遺伝子の動態を解析するとともに、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。

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、測定の誤差を有意な変化として臨床判断が行われていることを標準化と共に修正する必要がある。

インヒビター測定のためのベセスダ法の改良法である Nijmegen 変法をさらに改良し、2Mの緩衝化イミダゾール液を利用して NPP を緩衝化する東京変法として簡便化を図った。基礎的検討において、東京変法では pH を概ね予定した範囲に保つことができ、第 VIII 因子活性の維持も可能であり、簡便で実用的な方法と考えられた。標準インヒビター血漿は最終希釈に第 VIII 因子欠乏血漿を用いることで良好な直線性を得ることができた。

標準インヒビター血漿のインヒビター力価としては、1.5BU 前後にすることが最も安定した成績を得ることができると、実験的考察および計算値から考えられた。

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て行われる。本研究がインヒビター測定の国際的標準化に貢献出来ることを期待している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y, Haraya K, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a

hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost.* 2014 12: 206–2.

2) Chitlur M, Rivard GE, Lillicrap D, Mann K, Shima M, Young G; Factor VIII, Factor IX, and Rare Coagulation Disorders Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendations for performing thromboelastography/thromboelastometry in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014 12(1):103-6.

3) Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, Shima M, Ohashi K, Okano T, Matsui H. A Novel Cell-Sheet Technology That Achieves Durable Factor VIII Delivery in a Mouse Model of Hemophilia A. *PLoS One.* 2013 8(12):e83280.

4) Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Optimal monitoring of bypass-therapy in hemophilia A patients with inhibitor using clot waveform analysis. *J Thromb Haemost.* 2013[Epub ahead of print]

5) 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.* 2013 [Epub ahead of print]

6) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2013 110(4):761-8.

7) Shima M. [Hemophilia world] *Rinsho Ketsueki.* 2013 54(8):736-43.

8) Yada K, Nogami K, Shima M. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 2013 163(1):104-11.

9) Sakurai Y, Kasuda S, Tatsumi K, Takeda T, Kato J, Kubo A, Shima M. Repression of Factor VIII Inhibitor Development with Apoptotic Factor

VIII-expressing Embryonic Stem Cells. Hematol Rep. 2013 5(2):30-3.

10) Kajiwara M, Shima M, Yoshioka A. Two haemophilia patients with inhibitors who became ambulatory after physiotherapy under haemostatic cover with bypassing agents. Haemophilia. 2013 19(5):e301-4.

11) Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. J Thromb Haemost. 2013 11(7):1417-20.

12) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. Thromb Haemost. 2013 110(2):316-22.

13) Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y. Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. Thromb Haemost. 2013 110(1):62-75.

14) Oh J, Lim Y, Jang MJ, Huh JY, Shima M, Oh D. Characterization of anti-factor VIII antibody in a patient with acquired hemophilia A. Blood Res. 2013 48(1):58-62.

15) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness. J Thromb Haemost. 2013 11(5):902-10.

16) Shima M. [Hemophilia]. Rinsho Ketsueki. 2013 54(2):189-97.

17) Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, Shima M. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. Thromb Haemost. 2013 109(6):1007-15.

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：本研究計画における前臨床モデルの確立を目的として、肝臓を対象と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。我々はマイクローカテーテルを用い経門脈的に肝臓左葉に AAV ベクターを投与し、肝臓へ遺伝子を導入する独自の方法を開発し、現在までに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世界に先駆け成功した。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。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、近い将来同方法による臨床治療が実施可能な状況まで構築したい。

A. 研究目的

血友病の治療として、これまでこれらの関連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。当研究班の前分担任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。当班では本成果を発展させ、「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 に対して、「中和抗体の影響を回避するためのベクター投与方法を確立する」ことを目的に研究を行っている。

現在までに我々は、肝門脈左葉枝に選択

的にカテーテルを誘導し、同カテーテルより順次「生理的食塩水→AAVベクター溶液→生理的食塩水」を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「サンドイッチ式経門脈的肝選択的AAVベクター投与方法」を開発した。

同法を用いてAAV中和抗体陽性非ヒト霊長類（カニクイザル）を対象とする投与実験を行ったところ、全例に導入遺伝子由来の第IX因子の発現が確認され、既にその成果を世界に先駆け発表している（Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, etc. Mol Ther. Feb;21(2):318-23 2013.）。

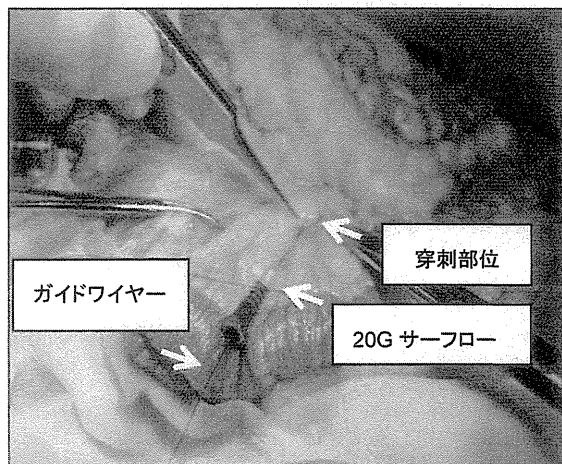
本年度はさらに臨床を意識し「より効率的でかつ患者の負担の少ない投与条件の確立」を図るために、同方法を実験ブタに対し行い、副事象（特に循環器系や肝機能）発現の有無やその程度に関して検証した。

A. 研究方法

- 実験ブタに対する門脈急速注入実験 -
自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて、実験ブタを用い以下の実験を行った。

対象：マイクロミニブタ・オス・体重24kg
*標準肝容積：577ml（計算式より試算）

対象の実験ブタに対し、全身麻酔下に傍正中切開にて開腹後、腸間膜静脈分枝に血管留置針（サーフロー24G、Terumo, Japan）を穿刺し、同血管内にガイドワイヤー（Runthrough 0.014 [0.36mm]、Terumo, Japan）を挿入留置した（図1）。



（図1：腸間膜静脈へ挿入された留置針）

同ガイドワイヤーをX線透視下に、門脈本幹から門脈左枝へと誘導し、次にマイクロカテーテル（イーグマン：3.3F、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、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。遮断直後に同カテより生食230ml（標準肝容積の40%）を可及的速やかに注入した。注入終了後1分間は門脈血流遮断を継続し、その後遮断を解除した。処置終了後、カテーテルを抜去し（穿刺部は結紮

閉鎖）閉腹抜管後、飼育室にて管理した。

①門脈急速注入前後に心電図・酸素飽和度（SpO₂）・中心静脈圧（CVP）・門脈圧を測定した。また事前にテレモニター発信機を埋め込み、同システムを利用して周術期のバイタル（血圧・心電図、体温）を記録し、循環器系を中心とする生理的変化を観察した。

②事前にIVHカテーテルを挿入留置し、同カテーテルより継時的に逆行性に採血を行い、肝機能（ALT、血清アルブミン値）の変化を観察した。また門脈急速注入直後並びに術後1週間後に肝生検を行い、病理的検察を追加した。

（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。

B. 研究結果

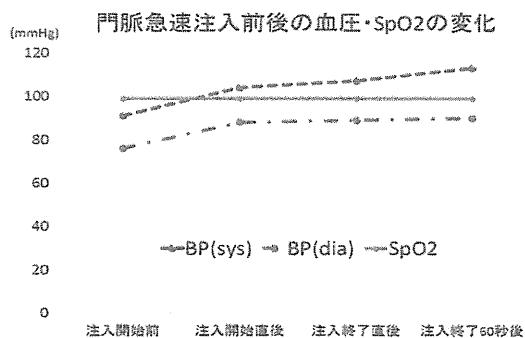
前述した方法で標準肝容積の40%に相当する生理的食塩水230mlを急速注入した。シリンジの付け替え時間も含めた注入時間は149秒、平均注入速度は約1.5ml/秒であった。

① 周術期の循環動態の変化：

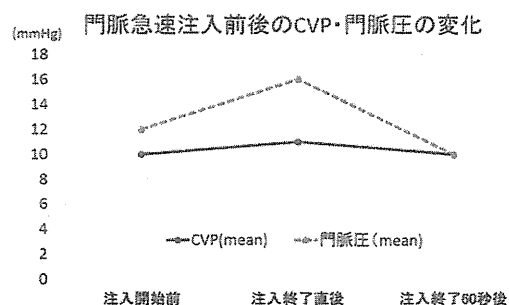
門脈急速注入前後に心電図・酸素飽和度（SpO₂）・中心静脈圧（CVP）・門脈圧を測定したところ、血圧が軽度（10mmHg程度）上昇した以外は、測定値に明らかな変化は認められなかった。（図2、3）

また術後15日間経過を観察したが、全身状態に異常は認められず、循環動態に関しては、術数日後まで心拍数がやや高い値を示したが、1週間以降は正常化した。

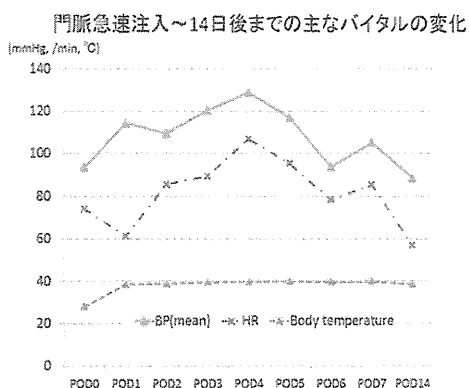
（図4）



(図 2)



(図 3)

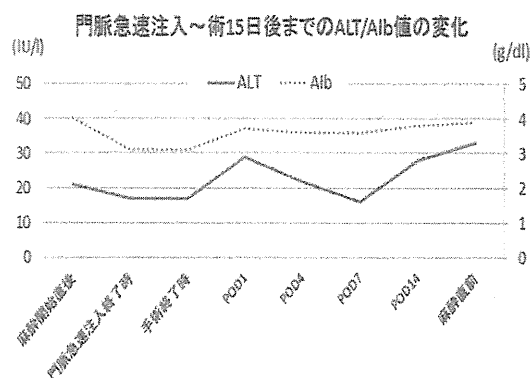


(図 4)

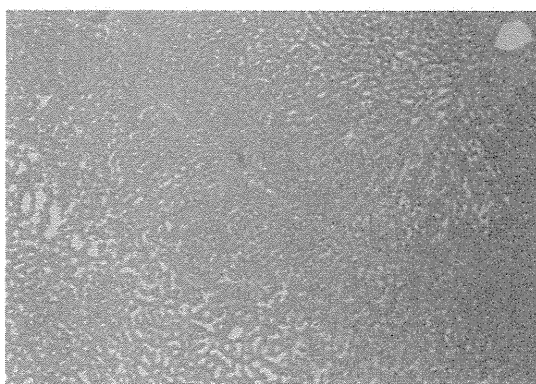
② 門脈急速注入後の肝臓への影響

門脈急速注入直後から術後 15 日目まで観察したが、いずれのタイミングでも ALT、血清アルブミン値は正常範囲内であった。

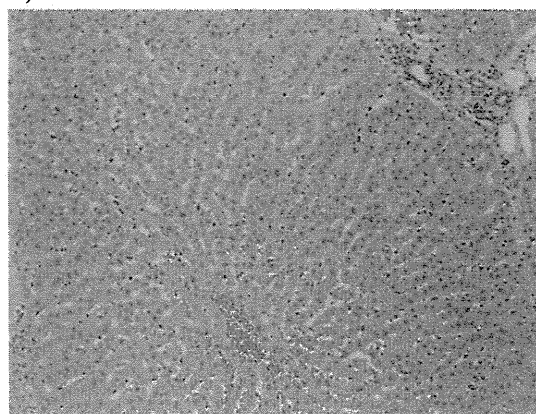
(図 5) また肝生検 (肝左葉部) の所見では、門脈急速注入直後に「軽度から中等度の類洞の拡張像」が認められたものの、術後 15 日目では明らかな異常は認められなかった。(図 6・7)



(図 5)



(図 6 : 門脈急速注入直後の肝生検像 : 類洞に軽度から中等度の拡張像が認められる)



(図 7 : 犠牲死時 (術後 15 日目) の肝生検像 : 明らかな異常は認められない)

D. 考察

本研究は、血友病の遺伝子治療における、「より選択的で安全な遺伝子投与手技の確立」を目的としている。

我々は「マイクロカテーテルを用い経門脈的に肝臓左葉に AAV ベクターを投与し、肝臓へ遺伝子を導入する」独自の方法を開発し、現在までに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世界に先駆け成功した。

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考えられている。

今年度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、近い将来同方法による臨床治療が実施可能な状態を構築するために、全く同じ処置を実験ブタに対し実施し、副事象（特に循環器系や肝機能）発現の有無やその程度に関して検証した。

前述した方法で門脈左枝の血流を一時的に遮断した後に、標準肝容積の 40%に相当する生理的食塩水を急速注入した結果、術中の循環動態への影響は軽微なことが判明し、また術後の経過も一般的な開腹手術と同等と推測された。

さらに門脈急速注入や門脈血流遮断等の一連の操作による肝臓への障害の程度を検索したが、生化学検査ではいずれのタイミングでも異常値は認められず、病理学検査では処置直後は類洞の拡張が認められたものの、15 日後の再検では正常化しており、肝細胞への障害は軽微で可逆的なものと判断された。

今回の実験結果より、標準肝容積 40%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並びに肝細胞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、随時同投与システムによる臨床治療が実施可能な状況を構築したいと考えている。

E. 結論

門脈急速注入処置に関して、標準肝容積 40%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並びに肝細胞への悪影響はないと思われた。

G. 研究発表

該当なし

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（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

臨床研究用製剤候補（SIV ベクター）の GMP 製造技術：臨床応用技術開発

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

本血友病遺伝子治療のバックアップ及び次世代ベクターとして重要であるサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターについて、そのベクター製造・精製工程のブラッシュアップを行うとともに、その製造技術について、医薬品適正製造基準（GMP）製造システムを有する治験薬製造受託機関（CMO）に対する技術移転を行った。すなわち、技術移転における予備製造および大規模製造の過程で発生した各課題について、それぞれのプロセスにおける解決に取り組み、CMO に対する技術移転を実施し、本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がいった。

A. 研究目的

本研究に於いて、サル免疫不全ウイルス（Simian Immuno-deficiency Virus : SIV）ベクターは、臨床研究の実現を最優先視するためとされるアデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8 : AAV8）ベクターのバックアップ及び次世代技術としての性能を持たせ、AAV に問題等があった場合いつでも代替可能な状況にしておくことも目的として、臨床研究に対応可能な製造法・品質検査法を整備する。

B. 研究方法

(1) SIV ベクターの GMP 製造技術の確立：

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ために、製造・精製工程のブラッシュアップを行う（懸濁方法や無菌ろ過法など）。

(2) SIV ベクターの GMP 製造技術について CMO への技術移転：

SIV ベクターの製造技術の中で、遠心法を用いた製造技術について、実際の GMP 製造施設での製造検討を行う。

（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) 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、培養工程（トラ

ンスフェクション）から下流工程（精製条件）まで全体の再検討を行い、遠心法を用いた製造技術について、プロトコルを確立した。

(2) SIV ベクターの GMP 製造技術について CMO への技術移転：

実際の臨床研究薬・治験薬は GMP 製造システムを有する CMO で実施することから、遠心法を用いた SIV ベクターの製造技術について、実際に GMP 製造施設での検討を行い CMO への技術移転を行った。

D. 考察

SIV ベクターについて、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を目的として、製造・精製工程のブラッシュアップを行った。遠心法を用いた製造技術については、CMO への技術移転を実施した。GMP 製造が当該 CMO で実施可能であることを示した。

E. 結論

血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、SIV ベクターについて、遠心法での製造技術の技術移転を行い、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ことを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

1) Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim IK, 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. 2013 Mar;24(3):283-94.

2) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, **Hasegawa M**, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. Haemophilia. 2014 Jan;20(1):e40-4.

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:

血友病診療は患者の特徴に基づいた個別化医療の時代を迎えている。個々の血友病患者の特徴を把握するうえで遺伝子情報は不可欠であり、血友病においては責任遺伝子である第 VIII 因子や第 IX 因子の遺伝子情報が重症度の把握やインヒビター発生予測に有効である。これまで我々は、日本人血友病 A 患者の第 VIII 因子遺伝子における病因遺伝子変異の同定・解析を行うことで、効果的な解析法やストラテジーを確立するとともに、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多種多様であり、また同じジェノタイプの患者であってもフェノタイプが異なる場合もみられることから、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、継続的に F8 解析を施行している。

今年度は血友病 A 14 例(重症 7 例、中等症 3 例、軽症 4 例)の解析を施行し、13 例で病因と考えられる遺伝子変異を同定した。各種変異が同定される中で稀有な重複変異を 2 例検出し、MLPA 法の有用性を確認した。また mRNA の解析から、これまで本邦での報告がなかったイントロン 1 に起因する逆位を同定した。さらに、これまでの解析で病因遺伝子変異が不明であった症例の解析からは、末梢血からの DNA をサンプルとして用いることの留意点が再確認された。

これからの血友病診療においては、患者の病因遺伝子変異を把握しておくことは必須である。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獲得と集積が必要である。

A. 研究目的

血友病診療は個別化医療の時代を迎えている。個別化医療において遺伝子情報は不可欠である。血友病においては、責任遺伝子である血液凝固第 VIII 因子遺伝子 (F8) や第 IX 因子遺伝子の情報は、患者の血友病の特徴を把握するうえで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、個別化医療に応用可能な知見や技術の獲得を目指してきた。しかしながら病因遺伝子変異は非常に多種多様であり、また同じジェノタイプに由来する患者の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。

本研究では責任遺伝子の解析、特に病因遺伝子変異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 の領域に分割し PCR で増幅した。PCR 産物は QIAquick PCR purification 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 は全長約 9kb と巨大であり、かつ白血球中において *F8* は異所性発現となるため mRNA 量が非常に少ないため、観察する領域を分割し、二段階の RT-PCR 法を行って解析した。

3. MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)解析

末梢白血球から抽出したゲノム DNA をエタノール沈殿して精製したものをサンプルとした。*F8* の MLPA 解析は、Salsa MLPA kit P178 (MRC-Holland)を用い、製品の取り扱い説明書に従って行った。

4. 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。

5. 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。第 VIII 因子の高次構造解析は PDB 2R7E を、分子可視化ソフト Chimera を用いて解析した。

(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 14 例(重症 7 例、中等症 3 例、軽症 4 例)の *F8* の解析を施行し、13 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 6 例と最も多く、次いで X 染色体の逆位(イントロン 22 起因型)が 3 例、欠失が 2 例、重複が 2 例であった。1 例では *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。

ミスセンス変異は 5 種類検出され、このうち 2 種類(Met167Lys、Trp2229Arg)は、これまでに国際的なデータベース HADB(Haemophilia A Mutation Database)に登録されていない新規変異であった。

欠失の 2 例は、2 塩基(AA)がエクソン 23 内で欠失する小規模のものと、エクソン 25 を欠失している大規模なものであった。大規模欠失を有していた症例ではインヒビターの発生が確認された。

本年度の解析においては稀有な重複変異が 2 症例から検出された。1 例はエクソン 2-6、もう 1 例はエクソン 7-18 が重複しているもので、どちらも HADB に登録されていないものであった。

2. これまでの解析で病因遺伝子変異が不明であった症例の解析

我々のこれまでの解析において、病因と考えられる遺伝子変異が一般的な遺伝子解析

では検出できない症例は、本年度の 1 例を加えて 5 症例となった。これらの症例の病因は非常に興味深く、これを探索することは血友病 A に関する理解を深めるために重要であると考えられる。そこで本年度は、より詳細な *F8* 解析から未知の病因遺伝子変異の探索を試みた。

解析した 1 例では MLPA 解析において Y 染色体の存在が確認できなかった。これについて精査したところ、当該患者は急性リンパ性白血病の治療のため、女性から末梢血幹細胞移植を受けていることがわかった。したがって、患者の末梢血はドナーの女性のものに置き換わっており、そのため末梢血由来の *F8* の解析では病因遺伝子変異が検出できなかったと考えられた。そこで DNA を採取する組織を口腔粘膜に替え *F8* の解析を施行したところ、イントロン 21 から 1 塩基置換 (c.6274-8A>G) を検出し、これが病因となり得る可能性が確認された。

もう 1 例では詳細な mRNA 解析を施行した。その結果、当該患者ではエクソン 1 と 2 が繋がっていないことが確認された。同様の mRNA の異常は、イントロン 1 内の配列 (*int1h*) に起因する逆位でみられることから、PCR 法により *int1h* とその近傍の解析を行ったところ、予想通り逆位を示唆する結果が得られ、これが病因であると同定できた。また、この患者ではインヒビターが確認された。

D. 考察

1. 血友病 A 症例の *F8* 解析

血友病 A の病因遺伝子変異が非常に多種多様であることが再確認された。本年度の解析においても、イントロン 22 に起因する逆位の 3 例以外からは異なった病因遺伝子変異が検出された。この結果は、個別化医療に向けて個々の患者の *F8* 解析を施行することが必要であること示唆した。

今回の解析において特徴的であったのは 2 例の大規模重複変異症例が確認されたことである。2013 年末の時点で HADB に登録されて

いる大規模な重複変異症例はわずかに 6 例であることを考えると、今回の解析において重複変異がいかにか高頻度で検出されたかがうかがわれる。重複は遺伝子内の相同配列による相同組換え (homologous recombination) によるものと考えられる。ヒトゲノム中には多くの反復配列が存在し、大規模な重複にはおそらくこの反復配列が関与している可能性が高いと考えられる。*F8* は巨大であり、イントロンのサイズも一般的な遺伝子を大きく上回る。ヒトの遺伝子におけるイントロンのサイズの中央値は 1,334bp といわれている。*F8* は 25 のイントロンを有し、このうち 19 イントロンは中央値より大きく、さらにこのうち 6 イントロン (イントロン 1、6、13、14、22、25) は 15kb を超える巨大なものである。HADB に登録されている重複変異と今回同定された重複変異の計 8 種類のうち 7 種類は、両端または片端がこれら 6 つの巨大イントロンに含まれた。重複変異を考える際、この巨大イントロンは重要なポイントとなる。

MLPA 法はエクソンのコピー数を定量できる遺伝子解析法である。重複変異を検出するためには一般的に MLPA 法の施行が不可欠である。これまでの *F8* 解析の戦略として、まず Long-PCR や PCR-ダイレクトシーケンスを施行し、変異が検出されなかった場合にのみ MLPA 法を施行した。しかし、ダイレクトシーケンスで得られた変異から予想されるフェノタイプが患者のそれと異なることが見受けられる場合もあり、このような場合には重複変異とのダブル変異の可能性も考えられる。したがって MLPA 法施行順位を上げた方がより正確に患者のジェノタイプを把握できる可能性もあるのではないだろうか。

2. これまでの解析で病因遺伝子変異が不明であった症例の解析

重複変異の検出を目的に施行した MLPA 法において Y 染色体が確認できなかったことが病因遺伝子変異の同定に繋がった症例の

解析では、F8解析におけるサンプルの重要性が再確認できた。今回の症例は末梢血幹細胞移植により人工的に患者の末梢血の DNA が患者本来のものとは異なっていたが、これと類似する現象は自然にモザイク現象として起こりうることである。未だ明確ではないが第 VIII 因子の産生細胞は肝臓の類洞内皮細胞であると考えられており、この細胞での F8 の異常が血友病 A を引き起こす。しかし、解析をしている F8 は通常末梢血中の細胞のものである。患者の病因遺伝子変異が分化の過程で生じたものであれば末梢血由来の F8 では病因遺伝子変異が検出されない可能性もある。このことを考えると、今回の症例のように病因遺伝子変異が検出されなかった場合、特に家族歴のない血友病 A であった場合には、DNA を採取する組織を替えて解析してみることは効果的であるだろう。

詳細な mRNA の解析を行った症例からはイントロン 1 中の *int1h* に起因する逆位が検出された。このイントロン 1 に起因する逆位は諸外国では報告があるものの、本邦ではこれまでに報告がなく、この症例が本邦での 1 例目であると思われる。欧米においてはこの逆位の頻度は重症例の 1-5%といわれている。しかし、我々の検討では 0.8%となり、本邦でのイントロン 1 の逆位の頻度は欧米のそれに比べて有意に低い可能性がある。

3. インヒビター

今年度の解析症例中、大規模欠失症例とイントロン 1 逆位症例でインヒビターの発生が認められた。第 VIII 因子あるいは第 VIII 因子様タンパク質が全く発現されないヌル変異でのインヒビター発生が高いということはすでに知られているが、これが今年度の解析においても確認された。病因遺伝子変異を明らかにすることは非常に効果的なインヒビター予測因子であり、できるだけ早期の遺伝子解析は有効なインヒビター対策に成り得ると考える。

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”を再認識させられるものであった。特に、今年度の解析のなかでは、これまで本邦では報告のなかったイントロン 1 に起因する逆位が同定されたことは重要で、これによってますます多様性が広がった。

F8 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, Shinozawa K, Seita I, Otaki M, Suzuki T, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K. Genotypic and phenotypic features of Japanese patients with mild to moderate hemophilia A. *Int J Hematol*. 2013 Jun;97(6):758-64. doi: 10.1007/s12185-013-1341-9. Epub 2013 Apr 27.

2. 学会発表

① 稲葉 浩、篠澤圭子、鈴木隆史、清田育男、大瀧 学、萩原 剛、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 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013 年 5 月 山形

② Yushi Chikasawa, Keiko Shinozawa, Kagehiro Amano, Kyoichi Ogata, Takeshi Hagiwara, Takashi Suzuki, Hiroshi Inaba, Katsuyuki Fukutake. Novel homozygous mutation Met362Thr identified as a cause of cross-reacting material reduced factor X deficiency in Japanese brother patients. XXIV congress of the international society on

thrombosis and haemostasis June 29-July 4
Amsterdam Netherlands.

特になし

③ Hiroshi Inaba, Keiko Shinozawa, Manabu Otaki, Takeshi Hagiwara, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake. Identification and characterization of an L1 insertion in intron 16 of F8 in a patient with hemophilia A. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4 Amsterdam Netherlands.

④ Manabu Otaki, Keiko Shinozawa, Hiroshi Inaba, Yushi Chikasawa, Ikuo Seita, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake. A newly diagnosed with congenital factor XI deficiency in a mild hemophilia A patient by gene analysis. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4 Amsterdam Netherlands.

⑤ Keiko Shinozawa, Hiroshi Inaba, Takeshi Hagiwara, Manabu Otaki, Takashi Suzuki, Kagehiro Amano, Fukutake Katsuyuki. Sixteen different mutations in the SERPINC1 gene with antithrombin deficiency causing venous thrombosis. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis June 29-July 4 Amsterdam Netherlands.

⑥ 村松 崇、稲葉 浩、篠澤圭子、近澤悠志、備後真登、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原 剛、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸 遺伝子解析によって確定診断に至った軽症血友病 A 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 11 月 神戸市

⑦ 篠澤圭子、天野景裕、萩原 剛、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への取り組み 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 11 月 神戸市

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

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 講師

研究協力者 廣瀬 旬 東京大学医科学研究所 附属病院 関節外科 特任助教

研究要旨：血友病は関節内出血による関節破壊とその後の退行性変性により、人工関節置換術を必要とする成人患者は多い。しかし通常患者とは違い、手術を行うにあたって様々な特徴的な問題点がある。最も特徴的な凝固異常に関しては、血液製剤の開発や投与方法の工夫によって、その止血方法は確立されつつある。その一方、凝固管理が十分に行えるようになったことで、今まであまり問題視されていなかった術後深部静脈血栓症（DVT）の発生が問題視されている。この問題を検討するだけの十分な資料はなく、今後の重要な検討課題となった。DVTの危険性の高いとされる人工膝関節置換術を行った自験例 36 例 46 膝において、術前術後の DVT 関連の検査結果を解析したが、無症候性も含めて一例も DVT の発生を認めなかった。そこで今後は前方視的に調査を行い、その発生率や危険因子を検討していきたい。次に C 型肝炎ウイルス（HCV）やヒト免疫不全ウイルス（HIV）の感染症が問題としてあげられる。特に血友病患者の HCV 感染症は、初期感染からの 20 年以上の時間が経過しているため、感染症よりも肝硬変や肝がんの発症といった問題になっている。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結果、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、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などを報告した。手術は現在も行われており、より信頼性のある検討を行うために、今後 200 例を目標に再検討したい。

A:研究目的

血友病患者に対する手術治療は止血管理方法が確立されていなかったために、以前はごく限られていた施設で行われていた。しかし血液製剤の改善と投与方法の工夫により、止血管理は確立されつつあり、多くの施設で手術が行える時代になってきた。このように十分な凝固管理が行えるようになったことで、今まで問題視されていなかった術後の深部静

脈血栓症（DVT）の発生リスクに関して関心が高まってきている。またその一方で、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 24 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 非感染血友病患者の死因の 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。したがって血友病患者に対して整形外科手術を行っていくためには、このように特徴的な問題に対する対策を確立する必要がある。これは、人工関節置換術だけでなく、その他の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、重要である。そこで当院で整形外科的の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際の問題点を解析し適応基準や対策を作成し、さらに手術の妥当性を確認することが目的である。

B:研究方法

B-1:人工関節置換術後のDVT発生

2008年から2013年までに行われた人工関節置換術は41例52関節で、このうち凝固因子製剤に対する抗体（インヒビター）を有する5例6関節を除く36例46関節を対象とした。DVTに関する評価項目として、その発生に影響を与えると考えられている以下の項目について調査した。患者情報として、年齢、BMI、既往歴、合併疾患そして内服薬を調査した。周術期の検査としては、下肢超音波検査、凝固因子活性の動向、D-dimerそしてFDPを術前と周術期に調査した。なおDVT予防として、以下のことを対象患者全例に行った。術中・周術期のfoot pumpを利用した物理的DVT予防、術中タンニケットを使用しない、早期離床、適切な凝固因子活性の維持である。

B-2:ウイルス感染症合併患者の手術適応

2006年から2012年6月までに行った80例126手術と、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

件を対象として行ったHCVとHIV感染症の手術に対する影響について調査検討し論文報告した。術前検査項目として診断、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。ま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。

C:結果

C-1:人工関節置換術後のDVT発生

対象患者の年齢は22歳から69歳、平均44.7歳で、危険因子とされる65歳以上の症例は1例のみであった。BMIに関しては17.6から28.7、平均21.6であった。やせ型（ <18.5 ）は3件、肥満型（ $25.0 \leq <30.0$ ）も3件でその他40件は標準であった。DVTの既往歴や潰瘍性大腸炎の合併などDVT発生リスクを上昇させるとされている疾患の合併や既往を持つものは1件もなかった。悪影響を与える内服薬としてステロイドがあげられるが、内服している症例はなかった。一方、DVTの発生を抑制する可能性がある消炎鎮痛剤について、術前一月と術後一月で内服状況について調査した。術前では日常的内服例は6例、必要時内服例は1例そして未使用例は39例であった。術後はそれぞれ、17例、16例、13例であった。下肢超音波検査は大腿部と下腿部の血栓の有無、静脈の怒張など精査を目的に術前1週間以内と術後3日目に行われた。術前のみ検査が行われたのは、13件、術前・術後とも検査を行ったのは25件、検査が行われなかったのは8件であった。行われたすべて

の検査で、DVT 発生を示唆する所見は認めなかった。FDP と D-dimer の周術期の平均値の動向は、手術直後にピークを示し、翌日から減少し術後 7 日目には大きく改善したが、その後の変化は少なく、術後 2 週では術前までは回復しなかった。

C-2 : ウイルス感染合併患者の手術適応

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。手術時平均年齢は 39.03 歳（13 歳から 60 歳）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。このような手術症例において、術前評価と合併症との関連について検討した。

術後感染（4 件）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。術後感染皮膚癒合不全（4 件）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（死亡例 4 例）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。そして血栓症や日和見感染は認めなかった。

D : 考察

D-1 : 人工関節置換術後の DVT 発生

血友病患者の場合、凝固異常症で比較的手術時年齢も若く合併症が少ないため、一般的に DVT の危険因子は少ない。また凝固因子製剤を補充しながら予防的に抗凝固療法を行うことは、同時に拮抗する治療を行う事にもなるため、多くの施設では物理的な DVT 予防が行われ、深刻な術後 DVT は発生は報告されていない。しかし血友病患者の術後 10% に無症候性ではあるが DVT が下肢超音波検査で検出されたことが報告されている。そしてその予防として、調査を行った施設の約半数で、弾性ストッキングや間欠的空気圧迫法といった物理的な方法だけでなく、抗凝固療法まで行っていた。術前・術後に行った下肢超音波検査の自験例 25 例では、術前・術後とも DVT は検出されていない。さらに術後の D-dimer の変動も平均値で術後 7 日目には $10 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。そのため現在でも当院では DVT 予防として抗凝固療法は行っておらず、間欠的空気圧迫法と術後早期離床・早期可動域訓練によるリハビリで対応している。

しかし今後、前方視的な調査を行う必要があると考えている。

ところ、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。

D-2 : ウイルス感染合併患者の手術適応

HIV の手術に対する影響は、以前の報告では 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、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。今回の我々の結果も影響は見られなかったが、CD4細胞数200以下の症例は少なく、今後の検討課題として残った。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。

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、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。

これらの問題に対して、今後も症例数を重ね検討していく必要がある。2012年7月以降2013年末までに30例の手術症例を行い、総数200例となった時点で再検討を行いたい。

E:結論

このように血友病において整形外科的機能

再建手術を行う場合、様々な問題が未解決である。特にDVTやHCV感染症は重要な問題になってきている。また血友病患者の高齢化に伴い、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。そのためより詳細な術前評価と手術への影響について、症例を重ね調査していく必要がある。

F:健康危険情報
なし

G:研究発表

Hirose J, Takedani H, Koibuchi T. The risk of elective orthopaedic surgery for haemophilia patients: Japanese single-centre experience. *Haemophilia* 2013;19:951-5.

H:知的財産権の出版・登録状況
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

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）、小野織江（産業医科大学血友病センター）、小島賢一（荻窪病院血液科臨床心理士）、白幡 聡（北九州八幡東病院）、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）、長江千愛（聖マリアンナ医科大学小児科）、仁科 豊（仁科・深道法律事務所）、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）、村上由則（宮城教育大学・岩手ヘモヒリー友の会）、森戸克則（むさしの会・つつじの会）、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

わが国の血液凝固異常症患者の QOL を健康関連 QOL として国際的に定量化された SF-36 を用いて評価した。血液凝固異常症を対象とした SF-36 による全国規模の調査は本邦初である。血液凝固異常症患者は、身体機能 (PF-N)、日常役割機能 (RP-N)、体の痛み (BP-N) といった身体に関する下位尺度がいずれもわが国の国民標準値よりも低いことが示された。一方、社会生活機能 (SF-N)、日常役割機能 (精神) (RE-N)、心の健康 (MH-N) などの精神に関する下位尺度は国民標準値との差異が極めて少ないことが示された。ただし、活力 (VT-N) および全体的健康感 (GH-N) は国民標準値よりも低く、これらは精神に関する下位尺度よりも身体に関する下位尺度の影響を強く受けた結果と考えられた。また、SF-36 の調査対象とならない小児に対して、別途作成した調査票で検討したが、小児の凝固異常症の患者は家族からの活動抑制を受けつつも、学校生活や行事、スポーツにも積極的に参加し、友人も多く作り、楽しく前向きに生活していることが示唆された。小児では、定期補充療法を適正に行うことにより身体・心理両面において QOL の向上が期待できること、インヒビターは身体・心理両面において日常生活の活動制限を余儀なくさせ QOL を低下させる要因であることが改めて確認された。

A. 研究目的

血友病等の血液凝固異常症の生活の質 (quality of life; QOL) を低下させる要因として、出血、関節障害、頻回の製剤の静脈注射が小児、成人の共通の要因であること

が平成 18 年度から本研究班の分担研究として行った「血液凝固異常症の QOL に関する研究」で明らかになった。また、上記以外に QOL を低下させる要因として、小児では幼稚園・学校生活の制限、インヒビター、