

表 19【診断後早期の実態-診断後1年間の出血回数】

血友病 A

	N	総出血回数	関節内出血	筋肉内出血	頭蓋内出血	それ以外
全体	193	3.1±3.6	0.6	0.2	0.1	2.1
重症	144	3.4±3.5	0.6	0.3	0.1	2.3
中等症	31	2.8±4.0	0.7	0.2	0.0	1.9
軽症	18	0.6±1.0	0.2	0.0	0.0	0.4

血友病 B

	N	総出血回数	関節内出血	筋肉内出血	頭蓋内出血	それ以外
全体	30	2.5±3.9	0.4	0.2	0.0	1.6
重症	16	3.6±4.8	0.7	0.3	0.1	2.4
中等症	9	2.1±2.3	0.2	0	0	1.1
軽症	5	0	0	0	0	0

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)

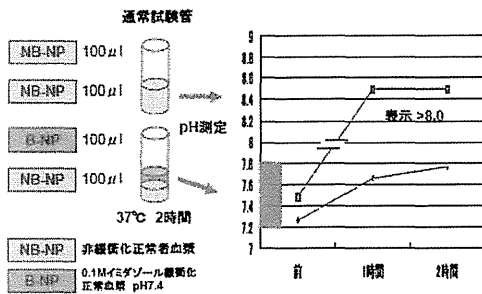


図 4 37°C 2 時間加温後の pH の変化

(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。

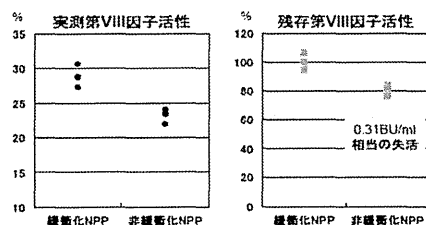


図 5 37°C 2 時間加温後の第 VIII 因子活性の変化

(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。

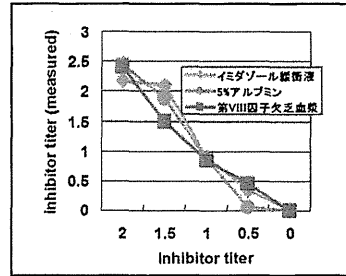


図 6 インヒビター力価への希釈液の影響

(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。

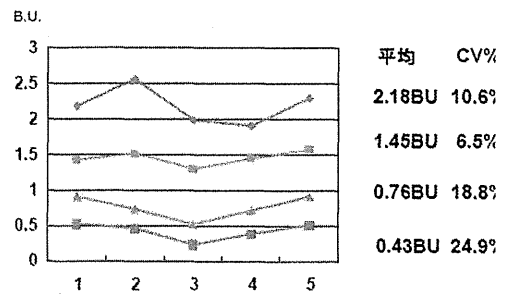


図 7 各インヒビター濃度測定での再現性

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。

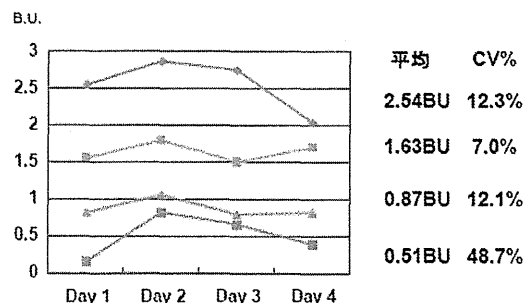


図 8 日差再現性

(5)第 VIII 因子活性とインヒビター力価のサーベイランス  
測定手順マニュアル（詳細な規定と手順書）を作成し、検査室における実用性の検討を加えた。検体配布と調査は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」を実施したため、本年度は以下活動を行った。その結果、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 63 例の検体入手 58 析終了

J-HIS2

対象 245 例中 205 例の検体入手 161 例解析終了

53 施設 351 例の研究対象の内、遺伝子検査を実施したのは 219 例（血友病 A 190 例、血友病 B 29 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はさらに症例が集積した後、一期的に実施する予定である。

表 20 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation	%	
Inversion	21	41.2
Large deletion	7	13.7
Small deletion	10	19.6
Nonsense mutation	4	7.8
Splicing variants	1	2.0
Missense mutation	7	13.7
Unknown	1	2.0
Total	51	100

表 21 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation	Inh+(%)	
Inversion	52*	20 (39)
Large deletion	1	1 (100)
Small deletion/insertion	20	6 (30)
Nonsense mutation	17	6 (35)
Splicing variants	9	4 (44)
Missense mutation	42*	2 (5)
Total	141	39

(\* 25ED に満たない症例を含む)

表 22 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation	%	
Nonsense mutation	4	57
Large deletion	1	14
Small deletion	2	29
Total	7	100

表 23 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation	Inh+	
Large deletion	2	1
Splicing variants	8	
Insertion	1	1
Missense mutation	9	
Promotor mutation	2	
Total	22	2

(\* 25ED に満たない症例を含む)

「サイトカイン遺伝子異常に関する研究」は、表 24 に示した TNF $\alpha$ 、IL-10、CTLA-4 のサイトカイン遺伝子の 10 SNPs について、J-HIS1 の 40 名と J-HIS2 の 126 名の計 166 名を解析した。

表 24 解析対象とした 3 サイトカイン遺伝子の 10SNPs

TNF $\alpha$	G>A -308	rs1800629
	G>A -238	rs361525
	C>T -827	rs1799724
IL-10	A>G 670	rs3093662
	C>T -819	rs1800871
	C>A -592	rs1800872
CTLA-4	A>G -1082	rs1800896
	G>A 49	rs231775
	C>T -318	rs5742909
	A>G CT60	rs3087243

インヒビターと非インヒビター群は、①インヒビター群が J-HIS1 の 40 名、J-HIS2 で 25ED に満たずにインヒビター発生が認められた 21 名の計 61 名（内訳 High responder 40 名、Low responder 20 名、力価不明 1 名）、②非インヒビター群は J-HIS2 の 25ED までにインヒビターを発生しなかった 105 名の、2 つのグループに分類し、TaqMan® SNP Genotyping を実施した。今回の解析から、TNF $\alpha$  の -308 の A allele とインヒビター発生が関連する可能性が示唆された。それ以外の 9 SNPs とインヒビター関連性については、今回の解析結果からは不明であったが、今後解析症例数の増加により、新規知見が得られる可能性がある。

表 25 インヒビター群と非インヒビター群の TNF $\alpha$  G>A -308 遺伝子頻度

TNF $\alpha$	Inhibitor Patients		Non-Inhibitor Patients		P	OR	CI
	n	Frequency	n	Frequency			
G>A -308							
G/G	58	0.95	104	0.99	0.10820	0.1859	0.019-1.828
G/A	3	0.05	1	0.01	0.10820	5.3793	0.547-52.903
A/A	0	0	0	0	-	-	-
Allele frequency							
G	119	0.97	209	0.99	0.11037	0.1898	0.020-1.845
A	3	0.02	1	0.01	0.11037	5.2689	0.542-51.224

## 5. 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（第5研究）

### ① 軽症血友病 A インヒビター解析

1) 患者インヒビター IgG は両者とも FVIII 不活化は type 2 パターンを示した。P1809L インヒビターは正常 FVIII には濃度依存的に不活化反応を示したが、患者 FVIII には不活化を示さなかった。本インヒビターは変異部位と離れた C2 エピトープを認識していた。一方、R1781H インヒビターは両 FVIII に不活化を示した。

2) P1809L インヒビターは FVIII における von Willebrand 因子やリン脂質結合に全く影響なかったが、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。一方、P1809L 変異蛋白は C2 ドメインに結合部位を有する von Willebrand 因子やリン脂質への結合能は著明に低下していた。また C2 モノクローナル抗体への結合能も低下していた。以上、この変異 FVIII は C2 ドメインの抗原性（構造変異）変化を来とし、C2 エピトープ同

種抗体を出現させた。

### ② ITI 中のインヒビター IgG subclass の検討

ITI 成功 3 例、不成功 1 例、再燃 1 例を検討したところ、ITI 初期は IgG1 が上昇し、その後著明に低下を示した。しかし、インヒビターの変動に伴い IgG4 が推移した。また、再燃時は IgG4 が上昇した。IgG1 と IgG4 の推移が ITI の効果を反映している可能性が考えられた。

### ③ MC710 による FVIII 活性化

MC710 はインヒビター血漿でのトロンビン生成を FVIII 存在下で相加的に増加させた。これは MC710 の FVIII 活性化が機序として示唆された。FVIII (10 nM) は MC710 (1nM)/TF(1nM) 添加 1 分以内に FVIII 活性は約 10 倍に上昇し、約 10 分まで頂値 50% まで低下するもその後活性化は持続した。FVIIa 阻害ペプチド(E76)は MC710/TF の FVIII 活性化を抑制したことから、上述の活性化持続は FXa による活性化が推測された。以上から、MC710 の FVIIa が FVIII を活性化させ、引き続き FX 活性化で止血効果を増強させることがわかった。MC710 惹起 FVIII 活性化によるインヒビター影響について、FVIII インヒビターを FVIII と反応させ、MC710/TF の FVIII 活性化を評価した。インヒビターエピトープに関係なく、前述と同様に反応 1 分以内に FVIII 活性は上昇した。

## 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。本研究項目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された。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 245 名中インヒビターは 48 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 25 ED に到達あるいはインヒビターが発生した重症血友病 A 患者を対象に昨年引き続きインヒビターの発生要因の解析を行った。

現時点で有意差が得られたデータは、定期補充療法がオンデマンド治療に比し、インヒビター発生が少ないことのみである。今後、例数を増やして多変量解析を行う予定である。

また、本年度は、J-HIS2研究のうち新規血友病患者の診断後早期の実臨床の一部を示した。今後、本研究を通じてインヒビター発生要因のみならず、長期的に血友病患者の実態を解析し、治療の向上に役立てていきたい。

### 3. インヒビターの検出・診断の標準化

今回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。

各検査室の測定手順には細部に差があり、詳細な手順の統一が必要であることから、施設間差の低減にはより詳細な手順書の作成が必要と考えられた。

表26 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		

### 4. インヒビター発生要因と遺伝子学的検査

本年度は、J-HIS1/U20、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解析」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強化し、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。

## 5. 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

### ① 軽症血友病 A インヒビター解析

新規 FVIII 遺伝子変異 (Pro1809Leu) を有したインヒビター発現の軽症血友病 A は、そのインヒビターは変異部位 (A3 ドメイン) とは離れた C2 ドメインを認識して自己 FVIII と非自己 FVIII を区別する抗体であることがわかった。この変異 Pro1809L の FVIII は C2 ドメインの抗原性 (構造変異) 変化を生じることが、C2 エピトープ同種抗体を出現させていることがわかった。軽症インヒビターの報告は散見されるが、その機序について解析された報告はない。興味あることに、軽症インヒビターは本症例のように自己 FVIII と非自己 FVIII を区別するものもあれば、自己 FVIII と非自己 FVIII を区別しないインヒビターも存在する。その機序の違いは未だ全く不明である。

### ② ITI 中のインヒビター-IgG subclass の検討

血友病インヒビターを消失させる治療として ITI 療法が普及してきており、~70%の成功例が言われているが、ITI の成否に関連する免疫制御機序は不明である。今回の我々の検討では、ITI 時の IgG subclass は以下の特徴的な推移を示した。ITI 初期は IgG1 が上昇し、その後著明に低下を示した。しかし、インヒビターの変動に伴い IgG4 が推移した。また、再燃時は IgG4 が上昇した。IgG1 と IgG4 の推移が ITI の効果を反映している可能性が考えられた。このように IgG subclass を評価する事は、ITI の成功予測、また継続や中断の判断の項目として指標になるかもしれない。

### ③ MC710 による FVIII 活性化

我々は FVIII を中心とした代替凝固機序の新たな概念を提唱してきた。特に FVIII 活性化が外因系凝固機序 (FVIIa) により凝固初期相で駆動している事を報告してきた。今回、さらに FVIIa は FVIII を極初期に活性化し、それに続き FVIIa により活性化された FXa が FVIII の活性化をさらに持続させ促進させることが明らかになった。この機序はインヒビター存在下でもまたエピトープに関係なく、FVIII を活性化させる事は、MC710 と FVIII 併用という血友病 A インヒビターの新

たな止血療法として有用であろう。

## 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。

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、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明し、FVIII 構造を考えていく点で極めて重要であった。現在、もう一つの R1781H 変異 FVIII の機能構造を解析中である。インヒビター消失目的の ITI 機序は解明されていない。今回、ITI 中の免疫学的側面からの解明を目指した。ITI の成功、不成功の機序について、subclass の変動が指標になりうる可能性を示した。今後、免疫学的側面からさらに発展させていく予定である。インヒビター止血管理は非常に難渋する事が多く、また医療経済的にも重要である。バイパス製剤 (MC710) の作用機序の解明や FVIII 併用という血友病 A インヒビターの新たな止血療法として新たな観点から治療戦略を組み立てていく事が可能となった。以上の基礎的研究を今後も進めていく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Matsumoto T, Nogami K, Okuda M, Shima M. Optimization of the automated, CS-2000i™ method for measuring low levels of von Willebrand factor ristocetin cofactor activity (VWF:RCo). Int J Hematol. 2014 [Epub ahead of

print]

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. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(1): 103-6

3) Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation.

*Haematologica*; 2014;99(10):e211-3

4) Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A. Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PLoS One*; 9(8): e104957

5) Shima M, Hermans C, de Moerloose P. Novel products for haemostasis.

*Haemophilia*; 20(4): 29-35

6) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. The anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents spontaneous joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 2014; 124(20):3165-3171

7) 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(2): 206-213.

8) Yada K, Nogami K, Kawamura T, Minami H, Shima M. The first case of int1h-related inversion in Japanese haemophilia A patients.

*Haemophilia*. 2014; Aug 25. doi: 10.1111/hae.12509.

9) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(9): 1503-1512.

10) Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (aPCC) moderates the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. *International Journal of Hematology*. 2014; 99(5): 577-587.

11) Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood*. 2014; 123(15): 2420-2428.

12) Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Optimal monitoring of bypass therapy in hemophilia A patients with inhibitors by the use of clot waveform analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014; 12(3): 355-362.

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 講師  
： 牧村 幸敏 自治医科大学 動物資源開発部門 助教

研究要旨：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、日本人の半数以上が陽性とされている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た。我々は現在までにマイクロカテーテルを用い経門脈的・肝区域選択的にAAVベクターを投与し、肝細胞へ遺伝子を導入する独自の方法を開発している。さらに同方法を用い、AAV抗体陽性サルに対し導入遺伝子由来の第IX因子の発現(5~10%)させることにも世界に先駆け成功している。同方法は今後治療が想定される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。今後はさらに臨床治療に配慮し、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、近い将来同手技を用いた臨床治療を実現させたいと考えている。

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。本研究班では同成果を発展させ、「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、肝門脈分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配慮し「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、実験ブタに対しサル実験と同じ条件で門脈急速注入処置を実施し、循環動態や肝機能を中心に副事象発現の有無やその程度に関して検証した。

## B. 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、以下の実験を行った。

対象：マイクロミニブタ・オス・体重17kg  
\*標準肝容積：479ml（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）を挿入した。X線透視下に同ガイドワイヤーを門脈本幹から門脈左枝へと誘導し、更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留置した。カテーテル先端付近のバルーンが門脈左枝の血管楔入に適切な位置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 192 ml（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。検査内容は以下の通りである。

①周術期の循環動態の変化：門脈急速注入前後に収縮期血圧(BP(sys))・心拍数(HR)・酸素飽和度(SpO2)・中心静脈圧(CVP)を測

定した。

②超音波検査装置を用い、門脈急速注入時の肝内血管（特に門脈）の血流状況を観察した。

③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・非拘束下に採血を行い、門脈急速注入直後から術後 7 日目までの肝機能(ALT/γGTP)、凝固能(PT)ならびに血算を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、自治医科大学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。

## C. 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 192ml 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 80 秒、平均注入速度は約 2.4ml/秒であった。

① 周術期の循環動態の変化：

BP(sys)・HR・SpO2・CVP を測定したところ、BP(sys)で 20mmHg 程度・CVP で 3mmHg 程度の上昇が認められたが、HR・SpO2 には変化が認められなかった。(図 1)

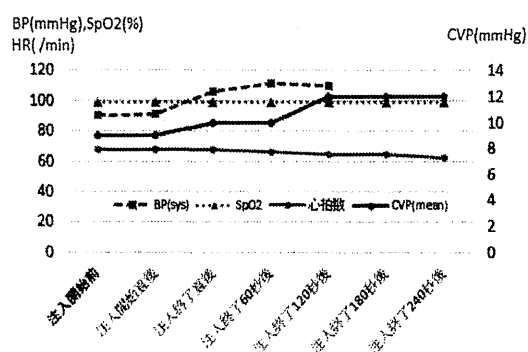


図 1：門脈急速注入前後の血圧・心拍数・酸素飽和度・中心静脈圧値

②術中超音波所見：

門脈急速注入前後の門脈血流の状況を超



音波検査装置により観察したところ、バルーン拡張による門脈血流の途絶・急速注入による門脈血流の乱流化を視覚的に確認した。(図2)



図2：門脈急速注入時の血管内乱流像  
(右側：ドップラー像)

## ② 門脈急速注入の肝臓への影響

門脈急速注入直後から術後7日目まで観察したが、いずれのタイミングでもALT/γGTP/PT値は正常範囲内であった。(図3)

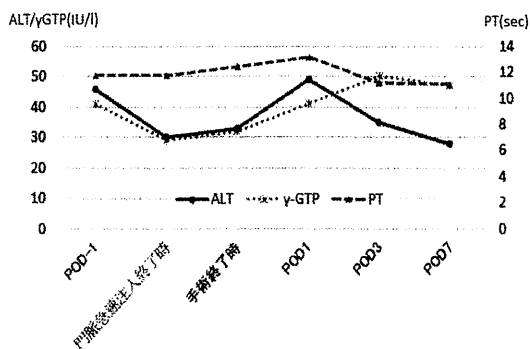


図3：門脈急速注入前後の肝機能(ALT/γGTP)、凝固能(PT)

## \*門脈急速注入の血算系への影響

血算系の検索では術翌日より白血球数が上昇し1週間後まで高値が持続した。ヘマトクリットならびに血小板値はいずれも正常範囲内であった。(図4)

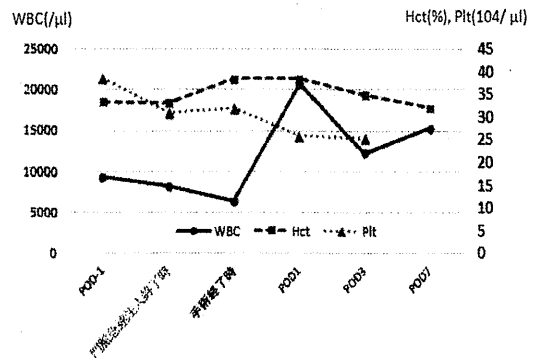


図4：門脈急速注入前後の白血球数・ヘマトクリット・血小板数

## D. 考察

本研究は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、日本人の半数以上が陽性とされている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」ことを目的としている。

我々は現在までに「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、す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成功している。

今年度はさらに臨床治療に配慮し、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ところ、術中の循環動態への影響は軽微なことが判明し、術後の経過も一般的な開腹手術と同

等と推測された。

また超音波検査装置を用い門脈急速注入時における肝内血管の血流状況を観察したところ、バルーン拡張による門脈血流の途絶さらには急速注入による門脈血流乱流化を視覚的に確認できた。急速注入時には注入液中に存在するマイクロバブル

が門脈のみならず肝静脈中に流入する画像も観察され、今後は同現象が肝細胞に与える影響を検討する必要があると考えられた。

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、肝細胞への障害は軽微で可逆的なものと判断された。

以上より、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進展させ、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。また超音波検査装置を用い門脈急速注入時における肝内血管の血流状況を観察したところ、急速注入による門脈血流乱流化を視覚的に確認できた。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 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

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

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社 取締役

**研究要旨**

本血友病遺伝子治療の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、既に確立した GMP 製造工程の、特に精製工程・ろ過工程の再検証を行うとともに、製剤の輸送時或は保管時の高度な安定化を目指した製剤化の検討も実施した。更に、将来的な更なる大量製造を見越し、接着培養法のみでは無く、浮遊培養法での検討も開始し、予備検討において応用可能であることを確認した。

**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を目的として、臨床研究に対応可能な GMP 製造技術を整備する。

**B. 研究方法**

(1) SIV ベクターの GMP 製造技術の確立：

既に確立した接着培養法による SIV ベクターの製造技術について、特に精製工程・ろ過工程の再検証を行った。また繰り返して製造を行うことで、製造の安定性についても検証した。

(2) SIV ベクターの高度な安定化の試み：

輸送条件の緩和（突発的な温度上昇にも対応）や病院での設備要求を下げる（超低温でなくても保管可能）ことを目的に、添加物による安定化を試みた。

(3) SIV ベクターの浮遊培養法の予備検討：

大量の治験薬を高品位・均質に提供することを可能にするために、浮遊培養法での製造の予備検討を開始した。

（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：

既に GMP 製造技術を確立している接着培養法について、再検証後、微調整した同システムで複数回の製造を実施し、安定して製造出来ることを確認した。

(2) SIV ベクターの高度な安定化の試み：

臨床適用可能な添加物の適用条件について、常温に一定期間放置した場合も活性低下の少ない添加物を確認した。

(3) SIV ベクターの浮遊培養法の予備検討：

浮遊培養法において、モデル遺伝子を用いてトランスフェクションによるベクター製造を検出し、製造が可能であることを確認した。今後、本臨床研究用候補製剤（被検薬）に応用するとともに、具体的に製造法・精製法・製剤化法の開発を行う。

**D. 考察**

SIV ベクターについても、血友病治療の被検薬として GMP 製造技術を確立することにより、臨床研究実施へのバックアップ体制は整ったものと考えられる。また、将来的な応用の拡大を目指し、製剤の安定化や、大量・安定的な製造が可能な浮遊培養法についての検討も重要である。

**E. 結論**

血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、SIV ベクターについても、接着培養法による GMP 製造技術を確立するとともに、製剤の安定化へ向けた改善、および将来的な更なる大量・安定製造

を目指し、浮遊培養法についても検討を開始した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Isshiki M, Zhang X, Sato H, Ohashi T, **Inoue M**, Shida H. Effects of different promoters on the virulence and immunogenicity of a HIV-1 Env-expressing recombinant vaccinia vaccine. *Vaccine*. 2014; 32(7):839-45.
- 2) 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*. 2014; 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。

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
平成 26 年度 分担研究報告書

血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究

研究分担者 稲葉 浩 東京医科大学臨床検査医学分野

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。血友病の特徴を把握するうえで個々の患者の遺伝子情報は不可欠であり、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 患者を対象に病因変異の解析を精力的に進め、血友病診療に応用可能な知見の獲得を目指してきた。また副次的に、効果的な解析法やストラテジーを確立することについても検討してきた。しかしながら病因遺伝子変異は多種多様であり、また同一のジェノタイプにもかかわらず異なるフェノタイプがみられることもあり、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。

本年度は血友病 A 11 例(重症 4 例、中等症 4 例、軽症 3 例)の解析を施行し、10 例で病因変異を同定した。また本年度は、第 VIII 因子遺伝子(*F8*)を網羅的に解析することを目指し、次世代シーケンズの導入を試みた。我々の設計・施行した次世代シーケンズは、良好に機能し、第 VIII 因子遺伝子の詳細な解析に極めて有効であることが確認された。また、次世代シーケンズは、多検体を低コストで解析することも可能であることが示唆された。

本年度の解析ではまた、新たな血友病 A 発症メカニズムの発見に繋がる可能性を有した稀有な同義的変異(c.120C>A; p.(L40=))の存在を確認した。

今後も継続的に遺伝子解析を施行し、血友病の理解を深め、診療に役立つ知見の獲得と集積が必要である。

A. 研究目的

血友病は、遺伝子変異に基づく血液凝固第 VIII 因子または第 IX 因子の量的・質的異常によって引き起こされる。個別化医療の時代を向かえ、診療を効果的、かつ安全に行うために、また今後、さらに高度な診療を実現するに際しては個々の患者の遺伝情報、とりわけ病因となる第 VIII 因子や第 IX 因子の遺伝子情報は必要不可欠である。

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・解析を精力的に行ってきた。しかしながら病因遺伝子変異は非常に多種多様であり、また同一の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いことを確認してきた。

本研究ではより多くの症例の責任遺伝子解析、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. 核酸抽出

ゲノム DNA と mRNA は末梢白血球からそれぞれ、EZ1 DNA Blood 350  $\mu$ l キット(キアゲン)、QIAamp RNA Blood Mini Kit (キアゲン)を用いて抽出した。

2. *F8* 塩基配列解析

*F8* の塩基配列解析には、エクソンとその近傍を解析する PCR-ダイレクトシーケンス法と、*F8* 全体を網羅的に解析する次世代シーケンス法を用いた。

PCR-ダイレクトシーケンス法は、まず、各エクソンとそのイントロンとの境界領域を 33 の領域に分割し PCR で増幅した。得られた PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (キアゲン)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サンガー法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。

次世代シーケンス法 (NGS) は、まず、*F8* の全体を、互いにオーバーラップする 14 の領域に分割してロング PCR で増幅した。得られた PCR 産物は illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE ヘルスケア)で精製した。精製した PCR 産物は、それぞれが等モルとなるように混合し、Nextera XT DNA Sample Prep Kit (イルミナ)を用い、プロトコールに従って、断片化、増幅、精製、ライブラリーノーマライゼーション処理を行い、シーケンス用のサンプルを調製した。MiSeq (イルミナ)と MiSeq reagent kit nano v2 (イルミナ)を用い、フローセルへのハイブリダイゼーション、ブリッジ PCR によるクラスター形成を行い、Paired-End でシーケンスした。得られた配列は GRCh37/hg19 の *F8* にアライメントして解析した。カバレッジは生殖細胞変異を解析するには十分となるように調整した。

### 3. *F8* mRNA の解析

*F8* mRNA は全長約 9kb と大きく、かつ白血球中において *F8* は異所性発現となり 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 法を行い解析した。

### 4. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 解析

*F8* の MLPA 解析は、Salsa MLPA kit P178 (MRC-Holland)を用い、製品のプロトコールに従って行った。

### 5. 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。

### 6. バイオインフォマティクス解析

NGS 結果の解析には、VariantStudio (イルミナ)、BreakDancer、CNVnator を用いた。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 症例の第 VIII 因子遺伝子解析

本年度は、新規血友病 A 患者 11 例 (重症 4 例、中等症 4 例、軽症 3 例) の *F8* 解析を施行した。10 例からは病因遺伝子変異が同定され、1 塩基置換が 7 例 (ミスセンス 5 例、ナンセンス 1 例、スプライス部位 1 例) と最も多く、次いで X 染色体の逆位が 2 例 (イントロン 22 起因 1 例、イントロン 1 起因 1 例)、欠失 1 例であった。し

かし、1例ではNGSにて網羅的にF8を解析したにも関わらず病因となるような遺伝子変異が検出できなかった。

## 2. NGSでのF8解析

23名(新規症例10例、既解析症例13例)の血友病A患者のF8解析にNGSを施行し、その特徴を検討した。

我々の設計・施行したNGS解析は、おおむね良好であったが、イントロン22内に低カバレッジ領域があることが確認された。点変異(10例)は、ほぼ理論的な変異体検出頻度で検出できた。欠失については、おおむね良好に検出できたが、変異体検出頻度は点変異に比べて低く、また、既解析の1例では、欠失の捉え方が不適當で正確に検出できなかった。また、逆位や重複は検出できなかった。NGSによる網羅的な解析を行っても、明らかに病因と判定できるような遺伝子異常を検出できない症例が3例(新規症例1例、既解析例2例)存在した。また、この3例を含めた15例から、計24か所、意義が不明な塩基置換を検出した。

## 3. 同義的変異の同定

これまでのPCR-ダイレクトシーケンスによるF8解析では、病因候補として同義的変異(c.120C>A; p.(L40=))しか検出されなかった軽症血友病A患者に対してNGSを施行したが、病因と成り得るような新規遺伝子異常は検出されなかった。

## 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多種多様であることが本年度の研究からも確認された。これは今後の血友病医療に際し、個々の患者の解析が必須であること示唆するものである。

昨年度、本邦では初めてとなるイントロン1に起因する逆位を検出したが、本年度も1例検出した。諸外国においてこの逆位は、重症例の1-5%の頻度で検出されると報告されている。我々の解析では135例中2例(1.5%)から検

出され、低頻度に存在する国と同様の割合で本邦にもこの逆位が存在することが確認された。

## 2. NGSでのF8解析

F8は非常に大きな遺伝子であり、その大半がイントロンによって占められている。近年、イントロン深部から病因と考えられる変異が報告されて来ている。実際我々もイントロン9内と10内の深部から、それぞれc.1443+602A>G、c.1537+325A>Gを病因変異として同定している。したがって血友病Aの病因をもれなく検出するには、イントロンも含めたF8全体を網羅的に解析する必要がある。またイントロン内には、病態に関与するような情報が存在する可能性もある。そこでPCRアンプリコンシーケンスによるNGS解析の導入を試みた。我々の設計・施行した条件でのNGS解析は、全体としては良好な結果が得られ、NGSがF8の網羅的な解析に非常に有効であることが確認できた。特に、点変異の検出には非常に有効であった。しかしながら、イントロン22内に低カバレッジの領域があることが確認された。検討の結果、この領域のGC含量は約70%と非常に高く、これが低カバレッジに原因している可能性が考えられた。この領域はイントロン22の起点となる部分でもあり、十分なカバレッジが得られることが望ましい。さらに、今回我々が用いた解析ソフトでは、一部の欠失が正確に検出できず、また構造変異もうまく検出できないことが確認された。別の解析ソフトの適用を検討する必要がある。

NGS解析を行っても、明らかに病因と判断できる変異が検出できない症例が3例存在した。しかし、これら3例はいずれもイントロンの深部に、意義が不明な塩基置換を1ないし2か所有していた。同様の塩基置換は、既に病因が同定されている他の12名からも計20か所検出された。これらの置換は非常に興味深く、その意義や特徴について検討していく必要がある。

またNGSを用いることにより、F8解析が多検体同時に、しかも安価にできることも確認できた。このことから、NGS解析を病因変異解析のスクリーニングとして用いることも検討する価値があるのではないかと。

### 3. 同義的変異の同定

我々は2012年に、軽症患者のエクソン1から検出したc.120C>A; p.(L40=)は、同義的であり、通常ならサイレント変異と考えられるが、非常にまれであることやレアコドンへの置換であることから、病因となっている可能性が示唆されることを報告した。しかしながら、イントロンの深部などに別の遺伝子異常が病因として存在する可能性は否定できていなかった。しかし本年度、NGS解析を施行し、c.120C>A; p.(L40=)以外に血友病を起こし得るような遺伝子変異はこの患者のF8中には存在しないことが確認できた。今後、この変異について発現実験を行う予定である。この同義的変異と血友病Aとの関わりについて詳細に検討することで、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。

### 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”を再認識するものであった。

多様であることの例として、本年度は同義的変異(c.120C>A; p.(L40=))が病因となっている可能性を確認することができた。これは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非常に興味深い変異であった。

NGSをF8の解析に応用することに成功した。NGS解析はF8解析に非常に効果的であり、多くの興味深い知見が得られ、今後、さらなる成果が期待できる。

F8解析は血友病診療の発展と充実には必要不可欠であり、今後も継続的な解析が必要である。

### F.健康危険情報

特になし

### G.研究発表

#### 1. 学会発表

- ① 稲葉 浩、篠澤圭子、鈴木隆史、大瀧学、清田育男、四本美保子、近澤悠志、村松 崇、備後真登、丹羽一貴、萩原 剛、山元泰之、天野景裕、福武勝幸 非重症型血友病Aを引き起こす遺伝子変異の特徴 第36回日本血栓止血学会 2014年5月 大阪
- ② 鈴木隆史、稲葉 浩、村松 崇、清田育男、近澤悠志、備後真登、丹羽一貴、四本美保子、大瀧学、萩原 剛、篠澤圭子、天野景裕、福武勝幸 DDAVPが無効であった中等症型血友病Aの解析 第36回日本血栓止血学会 2014年5月 大阪
- ③ 村松 崇、稲葉 浩、篠澤圭子、萩原剛、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸 ポリリン酸の血液凝固に与える影響 第36回日本血栓止血学会 2014年5月 大阪
- ④ 篠澤圭子、近澤悠志、天野景裕、備後真登、萩原 剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 第X因子CRM-reduced分子異常症をおこしたFX Met362Thr変異の特徴 第36回日本血栓止血学会 2014年5月 大阪
- ⑤ Keiko Shinozawa, Kagehiro Amano, Takeshi Hagiwara, Takashi Suzuki, Hiroshi Inaba, Katsuyuki Fukutake A total management system of carrier diagnosis for hemophilia using gene analysis: results of 24 individuals in 15 Japanese families with hemophilia. The World Federation of Hemophilia (WFH) 2014 World Congress May 11-15, Melbourne, Australia
- ⑥ Hiroshi Inaba, Keiko Shinozawa, Kagehiro Amano, Katsuyuki Fukutake Application of next-generation sequencing to the etiological mutation analysis of hemophilia A 第76回日



本血液学会 2014年11月 大阪

⑦ 稲葉 浩、篠澤圭子、萩原 剛、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸 血友病Aの病因遺伝子解析に対する次世代シーケンス応用の試み 第61回日本臨床検査医学会 2014年11月 福岡

⑧ 篠澤圭子、天野景裕、備後真登、村松崇、清田育男、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で同定した病因遺伝子変異 第61回日本臨床検査医学会 2014年11月 福岡

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働省研究費補助金（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。継続して手術結果を蓄積しており、2006 年～2014 年の 9 年間の間に手術件数は 175 件となった。より信頼性のある検討を行うために、来期には 200 例以上での検討を行う予定である。

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

2013 年に報告した 81 例 127 手術（2006 年

から 2012 年 6 月まで）の HCV と HIV 感染症の手術に対する影響について関する調査結果を踏まえ、2 同様な術前検査と術後評価（以下参照）を行いながら、012 年 7 月以降も手術症例を蓄積している。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 ≤ <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、術前一か月と術後一か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 (in press)。

#### C-2: ウイルス感染合併患者の手術適応

2013年に報告した結果から、手術に対する影響は特に慢性C型肝炎や肝硬変となった患者において、生命予後を脅かす危険性が高いこと、凝固因子に対する抗体(インヒビター)を有する患者で感染率が高いことが示された。但し今回手術を行ったHIV感染者の中に、CD4細胞数が50以下の症例は含まれておらず、術前CD4細胞数の影響については言及できなかった。また肝硬変に関しても、Child分類のCにおいては、関節手術は禁忌と考えられるが、Child分類のBにおいては、関節手術の適応をより詳細に評価する必要があると考えられた。

そこで2012年7月以降も手術を行い、2014年末現在175件の手術成績を蓄積した。しかし、CD4細胞数が50以下手術症例はなく、Child分類Bに該当する手術も少ないため、現時点での解析は困難と思われる。今後200例以上での解析を目指し、手術症例の蓄積を行っていく予定である。

#### D: 考察

##### D-1: 人工関節置換術後のDVT発生

従来DVTに関する臨床報告によれば、よりの確かなDVT評価には、術後7~10日頃での造

影CTや静脈造影による評価が適切とされる。したがって、このretrospective調査における主な問題点は、術後下肢エコーの施行時期が早いことと、検査方法(エコーのみ)が上げられる。そこで2015年からprospective研究として、術後1週目での造影CTを追加した形の調査を開始した。

##### D-2: ウイルス感染合併患者の手術適応

そこで2012年7月以降も手術を行い、2014年末現在175件の手術成績を蓄積した。しかし、CD4細胞数が50以下手術症例はなく、Child分類Bに該当する手術も少ないため、現時点での解析は困難と思われる。今後200例以上での解析を目指し、手術症例の蓄積を行っていく予定である。

#### 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

Nagao, A. Hanabusa, H, Takedani, H. "Continuous infusion of rFVIIa during surgery in a FVII-deficient patient: a case report from Japan." Haemophilia 2014