原 著

遺伝子組換えヒト第Ⅷ因子製剤 BAY w 6240の 多施設共同による臨床的検討（長期投与試験）

福井 弘¹⁾ 森 和夫²⁾ 石川 正明²⁾ 柴田 昭³⁾
高橋 芳右³⁾ 藤巻 道男⁴⁾ 福武 勝幸⁴⁾ 腰原 公人⁴⁾
木下 忠俊⁵⁾ 中山 明子⁵⁾ 浜 英永⁵⁾ 稲垣 稔⁶⁾
花房 秀次⁶⁾ 三間屋純一⁷⁾ 斎藤 英彦⁸⁾ 神谷 忠⁸⁾
高松 純樹⁸⁾ 白川 茂⁹⁾ 出口 克巳⁹⁾ 吉岡 章¹⁾
嶋 緑倫¹⁾ 安永幸二郎¹⁰⁾ 大久保 進¹⁰⁾ 吉岡慶一郎¹¹⁾
木下 清二¹¹⁾ 垣下 栄三¹²⁾ 西田 恭治¹²⁾ 白幡 聡¹³⁾

¹⁾奈良県立医科大学小児科, ²⁾東北大学医学部第三内科, ³⁾新潟大学医学部第一内科, ⁴⁾東京医科大学臨床病理学, ⁵⁾帝京大学医学部第一内科, ⁶⁾荻窪病院小児科, ⁷⁾静岡県立こども病院血液腫瘍科, ⁸⁾名古屋大学医学部第一内科, ⁹⁾三重大学医学部第二内科, ¹⁰⁾関西医科大学第一内科, ¹¹⁾国立大阪病院小児科, ¹²⁾兵庫医科大学第二内科, ¹³⁾産業医科大学小児科

（平成 3 年 4 月 25 日受付）

A LONG-TERM, MULTI-CENTER CLINICAL STUDY OF RECOMBINANT HUMAN FACTOR VIII (BAY w 6240) IN TREATMENT OF HEMOPHILIA A

Hiromu Fukui¹⁾, Kazuo Mori²⁾, Masaaki Ishikawa²⁾, Akira Shibata³⁾, Hoyu Takahashi³⁾,
Michio Fujimaki⁴⁾, Katsuyuki Fukutake⁴⁾, Kimihito Koshihara⁴⁾, Tadatosh Kinoshita⁵⁾,
Akiko Nakayama⁵⁾, Hidenaga Hama⁵⁾, Minoru Inagaki⁶⁾, Hideji Hanabusa⁶⁾,
Jun-ichi Mimaya⁷⁾, Hidehiko Saito⁸⁾, Tadashi Kamiya⁸⁾, Junki Takamatsu⁸⁾,
Shigeru Shirakawa⁹⁾, Katsumi Deguchi⁹⁾, Akira Yoshioka¹⁾,
Midori Shima¹⁾, Kojiro Yasunaga¹⁰⁾, Susumu Ohkubo¹⁰⁾,
Keiichiro Yoshioka¹¹⁾, Seiji Kinoshita¹¹⁾, Eizo Kakishita¹²⁾,
Yasuharu Nishida¹²⁾ and Akira Shirahata¹³⁾

1) Department of Pediatrics, Nara Medical University, 2) Third Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, 3) First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, 4) Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, 5) First Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, 6) Department of Pediatrics, Ogikubo Hospital, 7) Department of Hematology-Oncology, Children's Hospital of Shizuoka Prefecture, 8) First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, 9) Second Department of Internal Medicine, Mie University School of Medicine, 10) First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, 11) Department of Pediatrics, National Osaka Hospital, 12) Second Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, 13) Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan

A long-term, multi-center clinical study (Stage III) was performed in 20 patients with moderate or severe hemophilia A to evaluate the safety and efficacy of a recombinant human factor VIII

preparation, BAY w 6240 (rFVIII). Five had participated in a pilot study (Stage I/II) and then entered into this study, and 15 subjects were newly enrolled. One subject discontinued 1 month after treatment and efficacy analysis was excluded in this subject. Treatment period of rFVIII ranged from 24 weeks to 112 weeks.

The mean $T_{1/2}$ value for rFVIII in the newly enrolled patients was 18.0 hours ($n=14$), comparable to that for plasma-derived FVIII concentrates. The mean *in vivo* recovery rate with rFVIII was 72.3% ($n=14$), comparable to that with plasma-derived FVIII concentrates.

Five hundred and sixty-six bleeding episodes were assessed during this study. Hemostatic effect was confirmed with an efficacy rate of 98.8%, which was similar to our pilot study results. Five surgical operations (2 for transurethral resections of bladder tumor and 3 for teeth extractions) were also managed satisfactorily by rFVIII treatment. Only two adverse reactions (0.2%), mild nausea and local vascular pain attributed to rFVIII, were observed in a total of 1247 infusions. Neither FVIII-inhibitor nor antibodies to foreign proteins were detected. No significant changes attributed to rFVIII were seen in vital signs or laboratory findings.

These results led to the conclusion that rFVIII is efficacious and safe for long-term replacement therapy for hemophilia A.

結 言

血友病 A の止血管理には先天的に欠損ないし欠乏している血液凝固第VIII因子を補充することが基本である。1970年代後半より第VIII因子濃縮製剤が開発され、止血管理は比較的容易となった。自己注射も認められ、家庭内治療も可能となったことにより、血友病患者の“Quality of Life”は改善された。しかし、第VIII因子濃縮製剤はヒト血漿を原材料としているので、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス等のヒト血漿由来病原ウイルスの感染が問題となった^{1)~3)}。今日市販されている第VIII因子濃縮製剤は、これら病原ウイルス感染の危険性を減少させるために、HIV抗体およびB型肝炎抗原のドナースクリーニング検査が実施され、それに加え、乾燥、液状または蒸気加熱処理、有機溶媒/界面活性剤処理あるいはモノクローナル抗体による純化精製処理が導入されるようになった⁴⁾。その結果、HIV感染については問題なくなったが、肝炎ウイルスやその他の未知のヒト血漿由来ウイルス伝播の可能性は未だ完全には否定しえない現状である⁵⁾。また、ヒト血漿由来の第VIII因子濃縮製剤では、種々の夾雑蛋白ならびにアロ抗原が混在しており、頻回の投与によって免疫能を低下させるとの考えもある^{6)~8)}。これらのことから、全く新しい製剤、すなわち遺伝子工学を応用した第VIII因子製剤の開発が期待されていた。

BAY w 6240はドイツバイエル社グループの米国マイルス社カッターバイオロジカルによって開発された遺伝子組換えヒト第VIII因子製剤(rFVIII)である。本剤は、ヒト第VIII因子cDNAを組み込んだプラスミッドをベビーハムスターの腎細胞(BHK)にtransfectし、これを培養増殖させ⁹⁾、培養液中に放出された第VIII因子をイオン交換クロマトグラフィーおよびマウスモノクローナル抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィー等で純化精製した第VIII因子製剤である。本剤については、すでに日本を含む国際的な初期臨床試験が終了した¹⁰⁾。このうち、本邦の初期臨床試験(ステージIおよびII)は奈良医大小児科と東京医大臨床病理で実施された。成人重症血友病A患者5例に対して6から7カ月にわたって本剤が投与され、ヒト血漿由来第VIII因子製剤と同等の生体内リカバリーと血中半減期($T_{1/2}$)を有するとともに、満足すべき止血効果と安全性を示したことを報告した¹¹⁾。今回、12歳以上の小児を含むさらに多くの血友病A患者を対象とした長期投与による臨床試験(ステージIII)を全国13施設の共同研究により実施し、本剤の有効性と安全性を検討したので報告する。

なお、本試験は1989年6月から1991年2月にかけて実施した。

対象および方法

1. 対象

12歳以上の重症（第Ⅷ因子活性，FVIII：C＜1％）又は中等症（FVIII：C 1～＜5％）の血友病A患者20例を対象とした。5例は初期臨床試験より引き続き本試験に参加した患者で、15例は新たに本試験に参加した患者であった。抗HIV抗体は陰性例、陽性例とも対象としたが、陽性例は無症状で、かつCD4実数が300/ μ l以上のものに限定した。以下の除外規定に該当する患者はあらかじめ対象から除外した。1) 試験前スクリーニングでベセスダ法によってFVIIIインヒビター（1.0ベセスダ単位/ml以上）が検出されたもの、2) 試験前スクリーニングでELISAによってマウスIgG, BHKのタンパクに対する抗体が検出されたもの、3) モノクローナル抗体精製第Ⅷ因子濃縮製剤の投与既往のあるもの、4) なんらかのマウスモノクローナル抗体による治療を受けたことのあるもの、5) ステロイド療法を受けているもの、6) 第Ⅷ因子濃縮製剤注入時に何らかの前投薬（抗ヒスタミン薬など）が必要なもの、7) 他の血液凝固異常のあるもの、8) 臨床経過あるいは臨床検査値の解釈を妨害する可能性がある腎機能障害、肝疾患（GPTについては施設の正常上限値の3倍以上のもの）、糖尿病あるいはその他の代謝系疾患をもつもの、9) 貧血（Hb 12g/dl未満）のあるもの、10) 以前に、第Ⅷ因子濃縮製剤投与により重篤な副作用のみられたもの、11) 試験開始時に大出血あるいは生命に危険が及ぶような出血を起こしているもの、12) その他主治医が不適当と判断したもの。

試験開始に先立ち、患者又は法定代理人に対して、試験の目的、手順、予想される効果および副作用、同意しない場合でも不利益を受けないこと、同意してもいつでも撤回できること、当該疾患についての他の治療方法の有無と内容について説明し、本人又は法定代理人の自由意志による同意を文書で得ることとした。

2. 試験薬剤および投与方法

米国マイルス社カッターバイオリジカルで製造された遺伝子組換えヒト第Ⅷ因子製剤BAY w 6240（rFVIII）を、バイエル薬品（株）から提供を受けた。本剤は、1バイアル中FVIII：Cとして約500単位を含有し、本試験には7ロット

（PR3136, PR3139, PR3144, PR3151, PR3154, PR3154A, PR70H006）を使用した。1バイアル当り添付の注射用蒸留水5mlで溶解し、投与全量を約5分間かけて静脈内投与した。

3. 試験方法

ステージIおよびIIとしてrFVIIIの治療を受けていた5例は、出血エピソードに対する補充療法をさらに24週間（6カ月間）以上継続した。新たに参加した15例は、過去3日以内に血液製剤の投与がなされていないことを確認の上、本剤約50U/kgを単回投与し、血中半減期を測定した後、24週間（6カ月間）以上にわたり出血時の補充療法を行った。投与量は主治医の判断による止血に必要な量（原則として10～40U/kg）とし、1日の投与回数は1回を原則とするも症状に応じて3回までは可とした。

4. 検査・観察項目

1) 血中半減期および生体内リカバリー：新たに試験に参加した患者には、本剤初回投与時に約50U/kgを単回投与し、血漿FVIII：Cを初回投与前および投与完了後10分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間に測定し、血中半減期を算出した。最初の24週間は4週毎に患者を来院させ、その都度、本剤約50U/kgを投与し、投与前および投与完了後10分の血漿FVIII：Cを測定し、生体内リカバリーを算出した。ステージIおよびIIからの5例の患者では、12週毎に来院させ、生体内リカバリーを求めた。

血漿FVIII：Cは、一段法¹²⁾により米国マイルス社カッターバイオリジカルで実施した。

2) FVIIIインヒビターおよび抗体検査：FVIIIインヒビターは各施設にてベセスダ法¹³⁾で測定した。rFVIIIに対する抗体およびマウスIgG、ハムスター由来のタンパクに対する抗体検査はマイルス社カッターバイオリジカルにおいてELISAで測定した。マイクロプレートの各ウェルを抗原で被覆した後、患者血清検体を加えさらにペルオキシダーゼ標識した2次抗体を加えて目的の抗体を検出した。抗体の存在が疑われた症例は、Western blot法で詳細に検討した。rFVIIIをSDSを含む4～12%のポリアクリルアミドゲル

中で電気泳動させ、泳動後直ちにニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜上の rFVIII と患者の血清検体を反応させ、陽性のバンドをアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG ヤギ血清 (Bio-Rad, Richmond, CA) および基質として NBT-BCIP (Bio-Rad) を用いて検出した。

3) vital sign および自覚症状: vital sign は本剤約 50U/kg 投与による生体内リカバリー測定時に観察した。本剤投与前、投与完了後 10 分、30 分、60 分に体温、脈拍数、血圧および呼吸数を測定した。

自覚症状については vital sign 測定時に問診により確認した。

4) 副作用: 試験期間中副作用と考えられたものは、その症状、程度、発現日時、持続時間、処置および本剤との因果関係等詳細に記録した。

5) 臨床検査: 血液検査、血液生化学検査、免疫血清検査 (抗 HIV 抗体、HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体、IgG、 β_2 -ミクログロブリン、抗 CMV-IgG、抗 EBV-VCAIgG)、細胞性免疫検査 (総 T-cell, CD4, CD8, CD4/CD8 比) および尿検査を定期的の実施し、異常変動の有無を判定した。

新たに参加した患者では、細胞性免疫検査 (12 週毎に実施) 以外すべての臨床検査を最初の 24 週間は 4 週毎に、それ以後は 12 週毎に実施した。ステージ I および II より治療を継続した患者では、すべての臨床検査を 12 週毎に行った。また新たに参加した患者では、初回投与前、投与 24 時間後に血液検査、凝固線溶検査 (aPTT, PT, フィブリノゲン、トロンビン時間、FDP)、ハプトグロビン、血液生化学検査および尿検査を実施した。

5. 評価方法

1) 出血症状の評価: 出血部位、本剤の投与日

時、投与量等を記録するとともに、投与前および投与後 24 時間における出血症状の程度を表 1 に従って点数評価した。

2) 止血効果判定: 下記の判定基準に従って投与毎および 1 出血エピソード毎に止血効果を評価した。

i) 投与毎の判定基準: 著効: 投与後 24 時間以内に点数の総和が 4 点以上改善したもの、又は点数が 0 点になったもの、有効: 投与後 24 時間以内に点数の総和が 2 ないし 3 点改善したもの、または点数が 1 点になったもの、やや有効: 著効、有効以外で投与後 24 時間以内に点数が 1 点改善したもの、無効: 投与後 24 時間以内に改善が見られなかったもの、悪化: 悪化したもの。

ii) 1 出血エピソード毎の判定基準: 著効: 1 ~ 2 日以内に止血、有効: 3 ~ 4 日以内に止血、やや有効: 5 ~ 7 日以内に止血、無効: 7 日以内に止血しなかったもの、悪化: 悪化したもの。

3) 有用性: 本試験開始後 25 週目に止血効果、副作用および臨床検査値の異常変動の有無を勘案して、非常に満足、満足、まずまず、不満、非常に不満の 5 段階で評価した。

6. 生体内リカバリー、血中半減期の算出および検定方法

生体内リカバリーは、本剤投与後 10 分の血漿 FVIII: C から投与直前値を差し引いて得た実際の FVIII: C 上昇値と計算から求めた FVIII: C 理論的上昇推定値との百分率として求めた¹⁴⁾。初回投与時の生体内リカバリー値とそれ以後の測定値との比較には対応のある t 検定を用いた。有意水準は Bonferroni の不等式を利用して 0.05/ (比較の数) とした。

血中半減期 ($T_{1/2}$) は、2-コンパートメントモデ

表 1 出血症状の評価

点数	関節出血・筋肉出血			開放性出血	
	自覚痛	圧痛	腫脹	血尿	その他
0	痛みなし	なし	なし	なし	なし
1	軽い痛み	触れると痛みを感じる	軽度	顕微鏡的血尿	わずかな出血
2	明らかな痛み	触れると著しい痛みを感じる	中等度	肉眼的血尿軽度	明らかな出血
3	耐えられない痛み	触診不能	重度	肉眼的血尿著明	貧血を起こすほど多量

ルを想定し、非線形最小2乗法を用いて全測定値に対して curve fitting を行い、best-fit 時における消失相 (β 相) の勾配により算出した¹⁵⁾。

成 績

1. 対象症例

20例中5例(症例1～5)が初期臨床試験(ステージIおよびII)¹¹⁾から引続き本試験(ステージIII)に参加した患者で、15例(症例6～20)が新たに本試験に参加した患者であった。年齢は、13歳から56歳(平均 30 ± 9 歳)で、体重は44～92kg(平均 55.2 ± 10.8 kg)であった。重症(FVIII:C < 1%) 16例、中等症(FVIII:C 1～< 5%) 4例であった。20例中16例が慢性肝炎を合併しており、うち11例でC型肝炎抗体陽性であった。HIV抗体は、陰性13例で、残りの7例については明らかにされなかった。CD4実数は $315/\mu l$ から $1,941/\mu l$ (平均 $829 \pm 432/\mu l$)、CD4/CD8比は、0.25から1.92(平均 1.03 ± 0.49)であった。全例ともスクリーニング時点では、FVIII インヒビターおよびrFVIII に対する抗体、マウス IgG、ハムスター由

来タンパクに対する抗体は認められなかった。しかし、1例(症例19)ではスクリーニング時には0.55BU/mlと有意なFVIII インヒビターは検出されなかったものの、本剤の初回投与直前に採血していた血漿サンプルを本試験開始1カ月後に測定したところ、1.05BU/mlと算定された。したがって、本剤投与直前にインヒビターが存在していたことが判明し、対象としては不適格であるので、その時点で試験は中止した。本症例は有効性(止血効果、生体内リカバリーおよび血中半減期の測定)および有用性の解析対象より除外し、安全性のみ解析対象とした。

本剤初回投与からの治療期間は、症例19を除き24週から112週で(平均 59 ± 29 週)、1年以上投与されたものは13例(症例1～13)であった(平成3年2月時点)。なお、症例1および2は、初期臨床試験のステージIおよびIIに、また症例3、4、5はステージIIにそれぞれ参加し、本ステージIII試験開始時には既に本剤による治療をそれぞれ28週および24週受けていた(表2)。

表2 対象症例

症例	年齢(歳)	体重(kg)	血友病A重症度	慢性肝炎合併の有無	インヒビター及び抗体の有無 ¹⁾	CD4	CD4/CD8比	治療期間 ²⁾	備 考
1	25	54.7	重症	なし	なし	792	0.54	112週(84週)	ステージI・IIより引続き参加
2	25	53.0	重症	なし	なし	734	0.79	106週(78週)	〃
3	35	53.0	重症	あり*	なし	1299	0.89	96週(72週)	ステージIIより引続き参加
4	25	92.0	重症	あり	なし	408	0.41	96週(72週)	〃
5	56	48.0	重症	あり	なし	585	0.42	84週(59週)	〃
6	39	53.0	重症	あり	なし	825	1.92	60週	
7	29	47.6	重症	あり	なし	586	0.86	60週	
8	30	53.0	重症	あり*	なし	787	1.44	58週	
9	28	50.0	重症	あり*	なし	315	0.25	60週	
10	26	48.0	中等症	あり*	なし	678	0.62	59週	
11	32	62.0	重症	あり*	なし	700	1.72	62週	
12	32	54.0	重症	あり*	なし	925	1.72	59週	
13	26	59.0	中等症	あり*	なし	463	0.98	60週	
14	15	52.0	重症	あり*	なし	1941	1.46	24週	
15	26	73.0	中等症	あり*	なし	391	0.54	24週	
16	29	45.0	中等症	なし	なし	652	1.01	24週	
17	28	54.0	重症	あり*	なし	821	1.16	25週	
18	13	44.0	重症	なし	なし	1106	1.01	24週	
19	38	51.0	重症	あり	なし	1840	1.35	4週	投与中止例
20	38	58.0	重症	あり*	なし	732	1.54	25週	
Mean±S.D.	30±9	55.2±10.8				829±432	1.03±0.49	59±29**	

¹⁾ : スクリーニング時における FVIII インヒビター, rFVIII, ハムスター由来のタンパクおよびマウス IgG に対する抗体

²⁾ : 本剤初回投与からの治療期間, () 内は本ステージIII臨床試験での治療期間

* : C型肝炎抗体陽性, ** : 症例19を除く

表3 rFVIII投与後の血漿FVIII:Cの推移及び半減期

症例 No.	投与量 (U/kg)	血漿 FVIII : C (Units/ml) と投与完了後時間										半減期 (時間)
		投与前	10分後	30分後	1時間後	2時間後	4時間後	6時間後	12時間後	24時間後		
6	51.3	N. D.	0.76	0.70	0.70	0.63	0.50	0.40	0.33	0.18	18.0	
7	71.4	N. D.	1.11	1.06	1.12	0.86	0.77	0.68	0.54	0.32	18.3	
8	55.2	N. D.	1.16	1.15	1.60	1.21	0.92	0.66	0.64	0.25	11.6	
9	58.5	N. D.	1.09	1.61	0.85	0.69	0.81	0.71	0.48	0.25	13.9	
10	60.9	N. D.	1.18	1.12	1.09	0.82	0.82	0.81	0.61	0.34	16.4	
11	65.8	N. D.	1.12	1.09	1.09	0.66	0.73	0.70	0.46	0.22	13.2	
12	54.2	N. D.	1.16	1.16	1.11	0.82	0.78	0.74	0.67	0.29	17.0	
13	59.5	0.04	1.43	1.26	1.32	1.02	0.96	0.93	0.70	0.42	17.2	
14	55.4	N. D.	0.98	0.88	0.70	0.78	0.40	0.58	0.39	0.22	16.6	
15	49.3	0.08	0.89	0.98	0.96	0.88	0.82	0.71	0.68*	0.36	36.2	
16	64.0	N. D.	0.66	0.84	0.72	0.73	0.59	0.54	0.44	0.28	19.3	
17	53.3	N. D.	1.01	0.80	0.92	0.89	0.65	0.66	0.35	0.17	9.5	
18	49.1	N. D.	0.62	0.59	0.58	0.49	0.48	0.42	0.29	0.17	13.3	
20	62.1	N. D.	0.87	0.95	1.05	0.87	0.79	0.77	0.64	0.46	32.1	
Mean±S.D.	57.9±6.5	0.01±0.02	1.00±0.22	1.01±0.26	0.99±0.27	0.81±0.18	0.72±0.17	0.67±0.14	0.52±0.14	0.28±0.09	18.0±7.4	

N.D.: 検出限界 (0.03 Units/ml) 以下

*: 8 時間後

全20例における総投与回数は1,247回で、このうち生体内リカバリーもしくは血中半減期検討のための投与は118回、出血エピソードの治療のためは812回、出血エピソードに対して止血を確認後、引続き再出血予防のための投与は41回、抜歯などの外科的処置に対する投与は113回、予防投与が163回であった。

2. 血中半減期および生体内リカバリー

血中半減期の検討がなされた14例における本剤約50U/kg 単回投与時の血漿FVIII:Cの推移は表3および図1の如くであった。各症例の血漿FVIII:C推移から求めた消失相(β 相)の半減期は、平均 18.0 ± 7.4 時間であった。14例における生体内リカバリーの平均値の推移は図2に示す如くで、生体内リカバリーは初回投与時で平均 $72.3 \pm 13.5\%$ 、その後平均で約70%から約80%、治療開始後25週目で平均 $72.9 \pm 11.3\%$ とほぼ一定し、有意な変化は認められなかった。

ステージIおよびIIからの5例のうち1例(症例5)では生体内リカバリーの低下がステージII臨床試験の途中より認められていた。本症例の生体内リカバリーは、初期臨床試験終了時(本剤初回投与後25週)、すなわち本ステージIII臨床試験開始時には25.8%と最も低値を示していたが、その後の12週毎の測定では36.7から51.0%を維持し、

図1 rFVIII投与後の平均血漿FVIII:Cの推移 (Mean±S.D.: n=14) (血漿FVIII:Cは投与量を50 U/kgに標準化した際の値)

図2 新しく本試験に入った症例での生体内リカバリーの推移 (Mean±S.D.: n=14)

本試験終了時（本剤初回投与後85週目）には rFVIII による治療継続にもかかわらず、69.7%と回復して来ていた。残りの4例の生体内リカバリは本試験開始時、開始後13週目、25週目（それぞれ本剤初回投与後25～29週目、37～41週目、49～53週目）で、それぞれ75.0±13.5%、83.5±21.9%、78.8±17.5%とほぼ一定していた。

3. 出血エピソードに対する治療成績

本ステージIII試験期間中の有効性解析例19例において認められた総出血エピソードは573回であった。このうち生体内リカバリ測定のための50U/kg投与と出血エピソードに対する治療が重なった2出血エピソードでは、50U/kgは止血に

必要な投与量としてはやや多く、止血効果判定の集計から除外した。また、合併した膀胱癌に起因してみられた5エピソードの血尿は止血効果判定上問題があるので除外し、これら7出血エピソードを除いた566出血エピソードについて検討した。また、同時に2カ所の部位から出血した5出血エピソードについては治療上より重要と考えられる部位の出血エピソードを採用した。

566エピソードの出血部位は関節が466エピソード（82.3%）と最も多く、次いで筋肉43エピソード（7.6%）、歯肉20エピソード（3.5%）、皮下15エピソード（2.7%）、消化管9エピソード（1.6%）で、そのほか鼻腔内等が13エピソード（2.3%）であった。各出血エピソードの治療に要した投与回数を見ると、1回のみの投与で止血し得た出血エピソードは、437回と全体の77.2%を占め、2回投与で止血し得たものを加えると、519回（91.7%）

表4 出血エピソードと1エピソード毎のrFVIIIの投与回数

出血部位	出血回数	投 与 回 数			
		1	2	3	4 ≤
関節出血	466 (82.3%)	364	65	23	14
筋肉出血	43 (7.6%)	36	1	2	4
歯肉出血	20 (3.5%)	17	3		
皮下出血	15 (2.7%)	11	3		1
消化管出血	9 (1.6%)		6	3	
鼻出血	4 (0.7%)	2	2		
その他*	9 (1.6%)	7	2		
計	566 (100.0%)	437 (77.2%)	82 (14.5%)	28 (4.9%)	19 (3.4%)

*：血尿(3)、咽頭内出血(2)、肛門出血(1)、外耳道出血(1)、舌出血(1)および切創(1)

表5 出血部位とrFVIIIの1回投与量

出血部位	投与回数	1回投与量 (U/kg)			
		10～<20	20～<30	30～<40	40 ≤
関節出血	621	379	161	74	7
筋肉出血	71	28	20	15	8
歯肉出血	23	11	6	6	
皮下出血	23	8		15	
消化管出血	21		5	11	5
鼻出血	6	4	1	1	
その他*	11	5	3	3	
計	776 (100.0%)	435 (56.1%)	196 (25.3%)	125 (16.1%)	20 (2.6%)

*：血尿(4)、咽頭内出血(2)、肛門出血(1)、外耳道出血(1)、舌出血(2)および切創(1)

表6 rFVIIIの止血効果（投与毎）

出血部位	投与回数	止 血 効 果					有 効 率 著効+有効
		著 効	有 効	やや有効	無 効	悪 化	
関節出血	621	361	143	91	25	1	81.2% (504/621)
筋肉出血	71	33	17	11	9	1	70.4% (50/71)
歯肉出血	23	20	3				100.0% (23/23)
皮下出血	23	10	9	4			82.6% (19/23)
消化管出血	21	9	8		4		81.0% (17/21)
鼻出血	6	4	2				100.0% (6/6)
その他*	11	8	2		1		90.9% (10/11)
計	776 (100.0%)	445 (57.3%)	184 (23.7%)	106 (13.7%)	39 (5.0%)	2 (0.3%)	81.1% (629/776)

*：血尿(4)、咽頭内出血(2)、肛門出血(1)、外耳道出血(1)、舌出血(2)および切創(1)

とほとんどが1～2回の投与で治療がなされた(表4)。出血エピソードに対する本剤の総投与回数は776回で、投与量は、10～<20U/kgが435回(56.1%)、20～<30U/kgが196回(25.3%)、30～<40U/kgが125回(16.1%)、40U/kg以上が20回(2.6%)で、大部分(81.3%)が10～<30U/kgの範囲内にあった(表5)。

投与毎の止血効果判定は、総投与回数776回中「著効」445回(57.3%)、「有効」184回(23.7%)、「やや有効」106回(13.7%)、「無効」39回(5.0%)、「悪化」2回(0.3%)で、「著効」と「有効」を合わせた有効率は、81.1%(629/776回)であった。出血部位別の有効率は、関節出血で81.2%(504/621回)、筋肉出血で70.4%(50/71回)、歯肉出血で100%(23/23回)、皮下出血で82.6%(19/23回)、

消化管出血で81.0%(17/21回)であった(表6)。

出血エピソード毎の止血効果判定では、566エピソード中「著効」533エピソード(94.2%)、「有効」26エピソード(4.6%)、「やや有効」6エピソード(1.1%)、「無効」1エピソード(0.2%)で、悪化と判定されたものはなく、「著効」+「有効」は98.8%(559/566エピソード)と高い有効率を示した。出血部位別では、関節出血で99.6%(464/466エピソード)、筋肉出血で90.7%(39/43エピソード)、皮下出血で93.3%(14/15エピソード)であった。歯肉、消化管などの出血エピソードは、すべて有効以上で、100%の有効率であった(表7)。

4. 外科的処置に対する止血管理

3例(症例3, 12, 17)で、それぞれ1回抜歯し、また、1例(症例5)は経尿道的膀胱腫瘍切

表7 rFVIIIの止血効果(出血エピソード毎)

出血部位	出血回数	止血効果					有効率 著効+有効
		著効	有効	やや有効	無効	悪化	
関節出血	466	442	22	2			99.6%(464/466)
筋肉出血	43	37	2	3	1		90.7%(39/43)
歯肉出血	20	20					100.0%(20/20)
皮下出血	15	13	1	1			93.3%(14/15)
消化管出血	9	8	1				100.0%(9/9)
鼻出血	4	4					100.0%(4/4)
その他*	9	9					100.0%(9/9)
計	566 (100.0%)	533 (94.2%)	26 (4.6%)	6 (1.1%)	1 (0.2%)	0 (0.0%)	98.8%(559/566)

*: 血尿(3)、咽頭内出血(2)、肛門出血(1)、外耳道出血(1)、舌出血(1)および切創(1)

表8 rFVIIIによる外科的処置時の止血管理

症例	外科的処置	治療期間	1回平均投与量 (体重当たり)	投与回数	止血効果
3	抜歯(智歯2本)	5日	2,267 U (42.8 U/kg)	9回*	抜歯翌日に止血
5	経尿道的膀胱腫瘍切除術	31日	3,654 U (76.1 U/kg)	38回	良好な止血管理がなされた
	〃	32日	2,373 U (49.4 U/kg)	44回	〃
12	抜歯(智歯1本)	8日	1,163 U (21.5 U/kg)	16回	抜歯当日に止血
17	抜歯(大臼歯1本)	4日	2,057 U (38.1 U/kg)	7回	抜歯翌日に止血

*: 9回のうち1回は初期臨床試験終了時の生体内リカバリー算出のための投与と重複

除術 (TUR-BT) を2回施行した。抜歯に対しては1日1～2回、4～8日間で計7～16回本剤を投与した。1回の平均投与量は、1,163～2,267U (21.5～42.8U/kg)、1回の抜歯に要した総投与量は14,400～20,400Uであった。2回のTUR-BTには、1日1～2回、31日間で計38回あるいは32日間で計44回本剤を投与した。1回平均投与量は、それぞれ3,654U (76.1U/kg) と2,373U (49.4U/kg)、総投与量は138,840U と104,400U であった。いずれの外科的処置においても本剤により良好な止血管理が行われた (表8)。

5. 副作用

20例に対して本剤が総計1,247回投与されたが、副作用のみられたのは2回のみで、0.2% (2/1,247) にすぎなかった。内訳は、症例11で嘔気が1回、症例19で注射局所の血管痛が1回で、いずれも軽度かつ一過性のものであった。

6. FVIII インヒビターおよび抗体検査

本試験開始後新たに FVIII インヒビターを発生した症例は1例も認められなかった。本試験参加後、本剤投与前にすでにインヒビター (1.05 BU/ml) を有しているのが判明した症例19については、1カ月後に試験を中止するまでに本剤が計6回12,240U 投与されていた。しかし、中止時点のインヒビター力価が1.45BU/ml と本剤の投与によって特に上昇することはなかった。本症例は、rFVIII 試験中止後インヒビターに対する治療は特に行われず、ヒト血漿由来の第VIII因子濃縮製剤で止血管理がなされている。

rFVIII に対する抗体およびマウス IgG、ハムスター由来のタンパクに対する抗体の産生は、認められなかった。

7. 臨床検査および vital sign

肝機能検査をはじめとして各種臨床検査におい

表9 臨床検査成績

(Mean±S.D., n=20)

検 査 項 目		治療前 ¹⁾	治療後
血液検査	赤血球数 ($\times 10^6/\mu l$)	4.86±0.42	4.85±0.45
	ヘモグロビン (g/dl)	14.5±1.5	14.5±1.4
	ヘマトクリット (%)	45.0±4.9	44.3±4.4
	白血球数 ($/\mu l$)	5,565±1,085	5,585±1,513
	血小板数 ($\times 10^3/\mu l$)	216±60	214±56
	網状赤血球数 (pro%)	12±6	11±7 ²⁾
血液生化学検査	GOT (IU/l)	39±23	49±31
	GPT (IU/l)	45±31	58±41
	Al-p (IU/l)	193±73	179±58
	総ビリルビン (mg/dl)	0.5±0.3	0.6±0.4
	直接ビリルビン (mg/dl)	0.1±0.1	0.2±0.1
	LDH (IU/l)	335±135	365±89
	BUN (mg/dl)	13.3±3.3	13.7±3.3
	クレアチニン (mg/dl)	0.9±0.1	0.8±0.2
	総蛋白 (g/dl)	7.7±0.5	7.8±0.7
	アルブミン (mg/dl)	4,314±358	4,245±420
	Na (mEq/l)	140±1	142±2
	K (mEq/l)	4.2±0.6	4.2±0.3
	Cl (mEq/l)	105±2	104±3
免疫血清検査	IgG (mg/dl)	1,717±607	1,776±653 ²⁾
	β_2 -マイクログロブリン (mg/l)	1.9±0.8	2.1±1.0 ²⁾
細胞性免疫検査	CD4 ($/\mu l$)	829±432	765±377
	CD8 ($/\mu l$)	899±380	724±337
	CD4/CD8 比	1.03±0.49	1.20±0.61

¹⁾: 本剤初回投与前 ²⁾: 本試験開始24週後

て本剤によると考えられる検査値の悪化はなかった。細胞性免疫検査については、CD4実数はrFVIII治療開始前平均 $829 \pm 432/\mu\text{l}$ が治療終了後 $765 \pm 377/\mu\text{l}$ 、CD4/CD8比は開始前平均 1.03 ± 0.49 が終了後 1.20 ± 0.61 と変化はみられなかった(表9)。また、vital signについても臨床上問題となるような変化は認められなかった。

8. 有用性

止血効果、副作用および臨床検査値等を勘案して有用性の判定を行った。試験開始後25週目で19例中17例は「非常に満足」、2例は「満足」で有用率は100% (19/19例)であった。さらに治療が継続された13例で本試験終了時にも有用性を判定したが、いずれも試験開始後25週目のものと同一であった。

考 察

1984年に米国の研究グループがヒト第VIII因子のクローニングに成功して以来⁹⁾¹⁶⁾、第VIII因子遺伝子および蛋白構造に関する知識は飛躍的に増大し、血友病Aの遺伝子診断が可能になるとともに病因、病態も分子レベルで解明されつつある。これらの研究成果をもとに遺伝子工学を応用して製造したヒト第VIII因子製剤が開発された。本製剤は、従来の第VIII因子濃縮製剤の欠点であるヒト血漿由来病原ウイルスの混入による感染の可能性、アロ抗原による免疫能低下、および安定供給という三つの大問題を一挙に解決し得る新しい世代の第VIII因子製剤として注目されている。

BAY w 6240は米国マイルス社カッターバイオリジカルで製造された遺伝子組換えヒト第VIII因子製剤(rFVIII)で、*in vitro*の成績では構造と機能は血漿由来第VIII因子製剤と同様であったことが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

現在、米国、ヨーロッパ諸国をはじめ全世界的には107例の血友病A患者が本剤の臨床試験に参加しており、これまでに得られた成績では血漿由来第VIII因子製剤と同様の血中半減期と生体内リカバリーを示すとともに止血効果も良好で、安全であったことが報告されている¹⁰⁾。本邦において我々が実施した成人重症血友病A患者5例を対象とした初期臨床試験でも同様の成績が得られて

いる¹¹⁾。

今回、我々は12歳以上の小児を含む血友病A患者20例を対象としてrFVIIIの体内動態ならびに長期投与時における本剤の有効性と安全性を多施設共同研究により検討した。20例中5例が初期臨床試験から引続き本試験に入った患者で、15例が新たに参加した患者であった。このうち1例(症例19)で本試験開始以前からFVIIIインヒビターの存在していたことが、本試験開始1ヵ月後に判明し、1ヵ月で試験を中止した。有効性、有用性は19例、安全性は20例で検討された。本剤初回投与からの治療期間は、症例19を除き24週から112週で、1年以上投与されたものは13例あった。

14例での第VIII因子の血中半減期は平均 18.0 ± 7.4 時間であった。この値は、前回の初期臨床試験(ステージIおよびII)で得られた 16.8 ± 7.4 時間($n=5$)とほぼ一致する値であった¹¹⁾。血漿由来第VIII因子濃縮製剤の血中半減期を安部ら¹⁹⁾は 15.4 ± 3.8 時間($n=10$)、福井ら²⁰⁾は 15.0 ± 4.7 時間($n=11$)と報告しており、rFVIIIの血中半減期は血漿由来第VIII因子濃縮製剤と同様であると考ええる。生体内リカバリーについても、14例の初回投与時では平均 $72.3 \pm 13.5\%$ と従来の血漿由来第VIII因子濃縮製剤の生体内リカバリーと同様の値を示した²⁰⁾。これらの例で、生体内リカバリーの経時的変動は初回投与時から24週間後まではほぼ一定の値であった。また、初期臨床試験(ステージIおよびII)より継続した5例のうち症例5を除く4例についても約1年間に及ぶ観察のなかで低下傾向を示さなかったことから、rFVIIIの生体内リカバリーは長期投与しても十分維持されることを認めた。初期臨床試験の途中より生体内リカバリーが徐々に低下した1例(症例5)はWestern blot法にて本剤投与開始前より第VIII因子のL鎖(80KD)に対する抗体を有していたことが判明している¹¹⁾。

出血エピソードに対して本剤の1ないし2回の投与で、全出血エピソードの約90%以上が十分な止血を得ており、1回投与量では $10 \sim 30\text{U/kg}$ が全体の80%以上を占めた。投与毎に判定された止血効果は、81.1% (629/776回)、また、1出血エ

ピソード毎の止血効果は、98.8% (559/566エピソード) といずれも高い有効率を示した。これらの成績は過去に報告されている血漿由来第VIII因子濃縮製剤の臨床試験成績^{19)~21)}と同様で、また我々が初期臨床試験 (ステージ I および II) で報告した5例の治療成績とも同様であった。

一方、遺伝子工学を応用して製造された本剤の安全面での課題として、ネオ抗原によるインヒビターの出現、製造工程中に極微量混入しているBHKやマウスIgGのタンパクによる抗体産生の可能性が考えられる。24週から最長112週の長期にわたり本剤による補充療法を行ったが、FVIIIインヒビターやrFVIIIに対する抗体の産生は認められず、また異種タンパクに対する抗体の産生も検出されなかった。副作用に関しては、1,247回の投与のうち、2回にのみ軽度一過性の副作用が認められた。その内訳は嘔気と血管痛で、従来の製剤でも報告されているものであった。免疫機能の1つのパラメーターである細胞性免疫検査では長期にわたる観察でも低下傾向は認められず、また肝機能検査をはじめとする各種臨床検査でも本剤に起因すると考えられる検査値の異常変動は認められなかった。

以上のことにより、本剤は長期投与においても血友病A患者の補充療法剤として有効かつ安全な第VIII因子製剤と考えられる。

結 語

20例の血友病A患者について、遺伝子組換えヒト第VIII因子製剤BAY w 6240の体内動態ならびに長期投与時の有効性と安全性を検討した。1例では本剤投与1カ月後に、投与前よりFVIIIインヒビターを有していることが判明し、投与を中止したので、安全性のみ検討した。有効性検討例19例での治療期間は24週から最長112週で、13例が1年以上投与された。

1) 本剤投与後の血中半減期と生体内リカバリーの平均値はそれぞれ18.0時間、72.3% (n=14) で従来のヒト血漿由来の第VIII因子濃縮製剤と同様であった。

2) 出血エピソードに対しては大部分が1~2回の投与で止血し、98.8% (559/566エピソード)

と高い有効率を示した。

3) FVIII インヒビターおよびrFVIIIに対する抗体の産生は認められなかった。また異種タンパクに対する抗体も検出されなかった。

4) 副作用は1,247回投与中わずか2回 (0.2%) に認められた。臨床検査値では本剤に起因するような悪化は認められなかった。

以上の成績からBAY w 6240は従来のヒト血漿由来の第VIII因子濃縮製剤と同様の血中半減期と生体内リカバリーを有するとともに長期投与時においても有効かつ安全で、血友病A患者の補充療法剤として期待し得る製剤であると考えられた。

謝辞：治験薬を提供頂いたバイエル薬品(株)ならびにFVIII:Cの測定、抗体検査およびWestern blotを実施して頂いたマイルス社 Cutter バイオロジカルに深謝致します。

本論文の要旨は第32回日本臨床血液学会(札幌, 1990年) および第39回日本輸血学会(京都, 1991年) で発表した。

文 献

- 1) 安部 英, 木下忠俊：血友病, 日本臨床, 39: 3647-3656, 1981.
- 2) 服部俊夫, 池松正次郎, 内田隆徳, 松岡雅雄, 山本晴香, 日吉保彦, 福武勝博, 高月 清：血友病患者血清中の抗HTLV-III抗体一わが国における拡がりとは検出法の検討一, 臨床血液, 27: 1057-1063, 1986.
- 3) 大久保進, 山岡 学, 岡山桂子, 石田萌子, 安永幸二郎：血友病患者ならびに人血漿分画製剤におけるC型肝炎ウイルス(HCV)抗体の検討, 日輸血会誌, 36: 524-527, 1990.
- 4) 池松正次郎, 依藤 寿, 新井盛夫, 福武勝幸：加熱濃縮製剤, 臨床血液, 29: 628-634, 1988.
- 5) 山田兼雄：輸血, 血液製剤輸注とHIV, HCV感染, とくに血友病における感染と予防対策, クリニカルニュース, 11: 77-83, 1990.
- 6) 池松正次郎：血友病患者の免疫異常, 血液と脈管, 16: 1-12, 1985.
- 7) Sullivan, J.L., Brewster, F.E., Brettler, D.B., Forsberg, A.D., Cheeseman, S.H., Byron, K.S., Baker, S.M., Willitts, D.L., Lew, R.A. and Levine, P.H.: Hemophiliac immunodeficiency: Influence of exposure to factor VIII concentrate, LAV/HTLV-III and herpesviruses. J. Pediatr., 108: 504-510, 1986.
- 8) 池松正次郎：血友病の免疫異常, 日輸血会誌, 33: 586-593, 1987.
- 9) Wood, W.I., Capon, D.J., Simonsen, C.C., Eaton, D.L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P.H.,

- Smith, D.H., Hollingshead, P., Wion, K.L., Delwart, E., Tuddenham, E.G.D., Vehar, G.A. and Lawn, R.M.: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*, 312: 330—337, 1984.
- 10) Schwartz, R.S., Abildgaard, C.F., Aledort, L. M., Arkin, S., Bloom, A.L., Brackmann, H.H., Brettler, D.B., Fukui, H., Hilgartner, M.W., Inwood, M.J., Kasper, C.K., Kernoff, P.B.A., Levine, P.H., Lusher, J.M., Mannucci, P.M., Scharrer, I., MacKenzie, M.A., Pancham, N., Kuo, H.S. and Allred, R.U.: Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. *N. Engl. J. Med.*, 323: 1800—1805, 1990.
 - 11) Fukui, H., Yoshioka, A., Shima, M., Tanaka, I., Koshihara, K., Fukutake, K. and Fujimaki, M.: Clinical evaluation of recombinant human factor VIII (BAYw6240) in the treatment of hemophilia A. *Int. J. Hematol.*, in press.
 - 12) Langdell, R.D., Wagner, R.H. and Brinkhous, K.M.: Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. *J. Lab. Clin. Med.*, 41: 637—647, 1953.
 - 13) Kasper, C.K., Aledort, L.M., Counts, R.B., Edson, J.R., Fratantoni, J., Green, D., Hampton, J.W., Hilgartner, M.W., Lazerson, J., Levine, P.H., McMillan, C.W., Pool, J.G., Shapiro, S.S., Shulman, N.R. and van Eys, J.: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 34: 869—872, 1975.
 - 14) 安永幸二郎: 血友病の治療。「血友病」, 福永勝博, 藤巻道男, 長尾 大 編, p. 247—253, 名古屋, 全国ヘモフィリア友の会, 1981.
 - 15) RSTRIP, Polyexponential Curve Stripping/Least Squares Parameter Estimation, Version 4. RSTRIP USER Handbook, Micromath Scientific Software, Salt Lake City, Utah.
 - 16) Toole, J.J., Knopf, J.L., Wozney, J.M., Sultzman, L.A., Buecker, J.L., Pittman, D.D., Kaufman, R.J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E.C., Amphlett, G.W., Foster, W.B., Coe, M.L., Knutson, G.J., Fass, D.N. and Hewick, R.M.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, 312: 342—347, 1984.
 - 17) Eaton, D.L., Hass, P.E., Riddle, L., Mather, J., Wiebe, M., Gregory, T. and Vehar, G.A.: Characterization of recombinant human factor VIII. *J. Biol. Chem.*, 262: 3285—3290, 1987.
 - 18) 吉岡 章, 田中一郎, 嶋 緑倫, 藤原利治, 寺田茂紀, 中井寛明, 澤本好克, 神末政樹, 福井 弘: 遺伝子組換え型第 VIII 因子製剤 (BAYw6240) 中の第 VIII 因子の性状, 血栓止血誌, 1: 212—218, 1990.
 - 19) 安部 英, 池松正次郎, 神谷 忠, 木下忠俊, 後藤三雄, 古波倉正照, 白川 茂, 塚田恒安, 長尾大, 中村克巳, 日吉保彦, 福井 弘, 福武勝博, 三間屋純一, 森 和夫, 吉田 豊: 加熱第 VIII 因子濃縮製剤, BI8.021 の臨床評価. 診療と新薬, 22: 1889—1916, 1985.
 - 20) 福井 弘, 松本脩三, 森 和夫, 木下忠俊, 池松正次郎, 稲垣 稔, 長尾 大, 三間屋純一, 斎藤英彦, 高松純樹, 吉岡 章, 田中一郎, 吉岡慶一郎, 垣下栄三, 西田恭治, 白幡 聡: 抗第 VIII 因子モノクローナル抗体を用いて高度に純化した第 VIII 因子濃縮製剤 (BTL-150) の臨床試験成績. 基礎と臨床, 23: 2363—2382, 1989.
 - 21) 安部 英, 伊藤正一, 稲垣 稔, 遠藤安行, 緒方完治, 垣下栄三, 神谷 忠, 岸田邦雄, 木下忠俊, 蔵本 淳, 後藤三雄, 桜川信男, 白川 充, 高橋芳右, 長尾 大, 福井 弘, 福武勝博, 前川 正, 南 秀樹, 三間屋純一, 森 和夫, 安永幸二郎, 横山 登: 加熱処理第 VIII 因子濃縮製剤 (HT-84) の臨床試験. 薬理と治療, 13: 4463—4480, 1985.