

## 1. 緒言

2003年度4月より大学病院をはじめとする82の特定機能病院は, 入院医療コストの出来高払いに替わって, 「診断群分類」(DPC) 点数表による基づく包括払いを導入した<sup>1)</sup>. この包括払いのシステムは徐々に普及し, 現在では国公立, 私立を問わず大学病院や, 国立病院機構, 一般の総合病院も広く採用されている.

DPCは, WHO(世界保健機関)が定めたICD-10(疾病及び関連保険問題の国際統計分類第10回修正)に基づく16の診断群に属する約600の基礎疾患が根幹であり, それを入院理由, 重症度, 年齢, 手術・処置の有無, 副病名などで1,727に分類したものである. そのため患者数が少ない, 入院機会が少ない, あるいは入院医療コストのばらつきが多い疾患ではDPCの作成が困難であり, 稀少疾患に対してはDPCから除外され包括対象外の疾患となる. それを受けて2003年度包括払いが開始した当初は, 血友病類縁疾患も包括対象外となっていた. しかし2004年度に血友病類縁疾患に対するDPCの導入が検討された際, 1日請求点数は入院理由, 重症度, 年齢, 副病名に関わらず一律7日まで12,959点(129,590円)と設定された. これでは凝固第Ⅷ, IX因子製剤1,000単位2バイアル分の医療コストよりも安く, この案では血友病類縁疾患患者の入院治療は大きな赤字にな

ることが容易に予測され, 結局DPC導入は見送られた.

我々はこういった経緯や医療経済状況を踏まえた上で, 日本血栓止血学会 血友病標準化検討部会(現在の日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会)の委託を受け, 多施設の血友病類縁疾患患者の入院医療コスト(以下, コスト)を集計することで, 果たして血友病類縁疾患がDPC導入すべき疾患かどうか検討した. さらに我々は, 血友病類縁疾患患者のコストの特徴とDPC導入に関する問題点も考察した.

## 2. 対象および方法

本調査の参加者はTable 1のとおり8施設である. 2002年4月から2004年3月の間に各施設に入院した血友病類縁疾患患者のべ507名の各入院に対し, 血友病の種類, 体重, インヒビターの有無, 手術の有無と内容, 在院日数, 使用凝固因子製剤とその輸注量, コストなどを集計した. 集計した全てのデータについて, 血友病の種類, 体重(25kg毎に4群に分類), インヒビターの有無, 手術の有無により分類し, 在院日数と入院医療コストについて, どの因子がそれらに関与しているか, Excelのアドイン統計ソフトStatcelを用いて統計学的検定を行った. データはほとんどが正規分布しないため, ノンパラメトリック検定を行った. 具体的には,

Table 1 Collaborating investigators and institutions

Institution No.	Institution	Investigators
1	Division of Blood Transfusion Services, Hiroshima University Hospital	Teruhisa FUJII
2	Department of Hematology, Hyogo Collage of Medicine	Satoshi HIGASA
3	Department of pediatrics, University of Occupational and Environmental Health	Michio SAKAI
4	Department of Rehabilitation, Fukui National Hospital	Hideyuki TAKEDANI
5	Department of Pediatrics, Nara Medical University	Yoshihiko SAKURAI
6	Department of Hematology, Ogikubo Hospital	Hideji HANABUSA
7	Department of Hematology and Oncology, Hyogo Prefectural Kobe Children's Hospital	Yoshiyuki KOSAKA
8	Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University	Kagehiro AMANO

Table 2 Summary of hospitalized patients in 8 institutions from April 2002 to March 2004

No	Number of patients	Number of operated patients	Patients' age (y) median, range	Patients' weight(kg) median, range	Cumulative days of hospitalization	Hospital days per admission mean $\pm$ SD, median; range	Cumulative hospital charges (yen)	Monthly hospital charges (yen) mean $\pm$ SD, median; range	Daily Hospital charges* (yen) mean; median, range
1	9	4	32 23-67	65 47-105	289	32.1 $\pm$ 33.4 15; 4-90	37,139,430	2,063,300 $\pm$ 1,853,980, 1,762,570; 34,320-6,259,530	128,510; 211,910 56,920-409,020
2	50	18	51 17-77	65 50-88	1702	29.1 $\pm$ 45.4 21; 2-310	309,495,250	2,714,870 $\pm$ 4,341,830, 1,630,170; 79,640-27,625,170	181,840; 117,570 16,710-1,038,070
3	37	5	44 4-74	52 19-89	611	15.8 $\pm$ 11.6 14; 3-58	107,125,490	1,912,960 $\pm$ 313,510, 1,068,600; 19,090-11,353,240	175,330; 137,970 23,520-216,1080
4	52	43	43 13-57	58 40-95	3582	68.9 $\pm$ 67.3 56; 2-327	490,199,570	3,380,690 $\pm$ 3,891,890, 2,664,240; 32,930-42,203,330	136,850; 131,240 8,760-654,960
5	84	14	22 0-82	48 10-81	1597	19.0 $\pm$ 24.8 14; 2-144	318,829,040	2,452,530 $\pm$ 4,250,630, 1,294,050; 19,380-28,291,350	199,640; 107,040 9,470-4,496,480
6	116	11	29 2-70	56 12-107	1319	11.4 $\pm$ 22.8 5; 1-183	292,917,060	2,034,150 $\pm$ 2,763,970, 1,083,090; 36,270-22,719,950	222,080; 168,950 19,150-3,288,450
7	22	0	2 0-12	16 3-50	208	9.4 $\pm$ 8.3 6; 3-37	25,878,710	1,176,260 $\pm$ 2,149,840, 163,680; 40,560-9,533,690	124,110; 22,400 5,300-1,361,950
8	136	21	39 2-79	56 12-104	2835	21.9 $\pm$ 22.4 15; 3-140	434,789,350	2,229,690 $\pm$ 3,236,020, 955,190; 12,990-21,364,590	153,360; 80,360 2,590-1,350,330

\*: These values are calculated as followed. "The mean value" is "Cumulative hospital charges"/"Cumulative days of hospitalization". The median values and ranges are induced by "Hospital charges"/"hospital days" in the individual patient.

2群間の比較には Mann-Whitney 検定を用い、3群以上の比較には Kruskal-Wallis 検定後、Bonferroni 補正 Mann-Whitney 検定で総当たり比較を行った。危険率5%未満を「仮説の棄却域」つまり「有意差あり」とした。

### 3. 結果

#### 1) 各施設のデータの概要 (Table 2) と比較

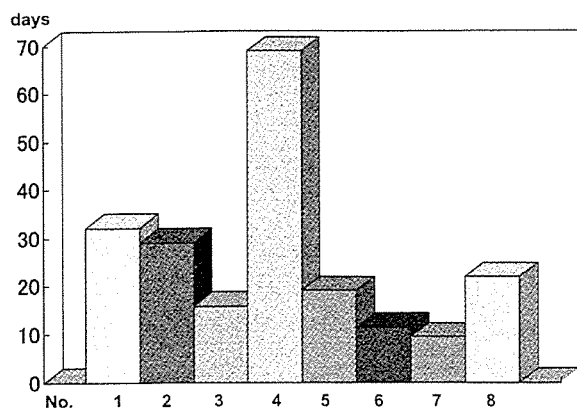
8施設のうち施設番号1, 2, 4, 8は、主に血液内科、整形外科が血友病類縁疾患を診療している施設で、他の施設は主に小児科が診療を行っている。そのため施設間での患者の年齢にばらつきがあり、施設5, 6, 7は他の施設に比べ低年齢の患者が多かった。しかし、小児科が診療をしているにもかかわらず、施設3, 6においてはその年齢分布は大きく中央値も20を越えていた。すなわち一部の施設では、成人になっても小児科でそのまま診療を続けられている現状が明らかになった。体重は他施設に比べ施設7で低かったが、それ以外の施設では差を認めなかった。

各施設とも手術は行っていたが内容は様々であり、見解の統一が必要であった。そのため各

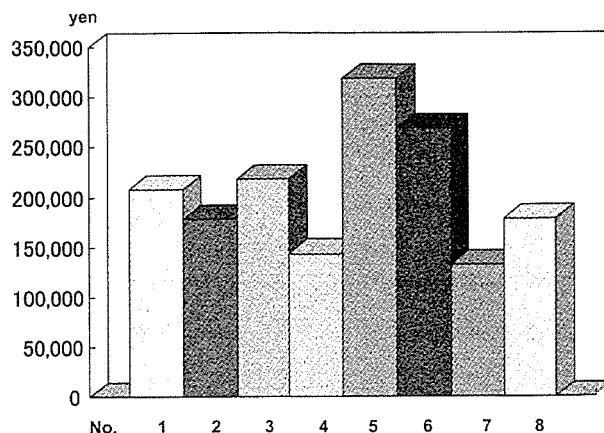
施設で見解の相違があったもののうち、“穿刺(例：中心静脈カテーテル挿入や腹水穿刺、関節穿刺)”“消化管内視鏡的処置(例：ポリペクトミー)”は処置、“生検(例：肝生検)”“抜歯”は手術とした。手術患者数は、施設4で他施設に比べ圧倒的に多かった(43/52名, 82.7%)。

また入院目的(入院の理由)は、施設4で“人工関節置換術”が多かったが、他施設では様々であった。頭蓋内出血、腹腔内出血、消化管出血などの死亡する危険のある出血での入院のみならず、腸腰筋出血や難治性筋肉内出血・関節内出血、あるいは合併症(例：C型肝炎やHIV感染症)の治療などの入院も多く見られた。また小児科の入院では、内科に比べ在宅・自己注射管理導入などの教育入院が多いことも特徴であった。

在院日数、月当たりのコスト、1日当たりのコストは施設間はもとより、同一施設内でも患者により大きなばらつきが見られ、どれも正規分布にならなかった。また各施設の最大値、最小値、中央値もばらつきが大きく、中央値で施設間を比較すると、在院日数で最大11.2倍(施設4と6)、月当たりのコストで最大16.2倍(施設4と7)、1日当たりのコストで9.5倍(施設



**Fig.1** Mean hospital days per admission in 8 institutions. Mean hospital days (MHD) in No.4 is statistically longer than those in any other institutions. MHD in No.2 is statistically longer than that in No.6.



**Fig.2** Mean hospital charges per day in 8 institutions. Mean hospital charges per day (MHCD) in No.5 is statistically higher than those in another 4 institutions except for No.1 and No.6. MHCD in No.6 is statistically higher than that in No.4.

1と7)の差があった。在院日数や、月当たりのコスト、1日当たりのコストは全施設で、中央値の方が平均値より低かった。その理由として一部の患者は長期入院を余儀なくされ、それに伴いコストも掛かり平均値を上げている現状があると思われた。

各施設の平均在院日数、1日当たりの平均コストを算出したが(在院日数9.4~68.9日; **Fig. 1**, 1日当たりのコスト124,110~222,080円; **Fig. 2**), 施設間での較差が目立った。各施設別の在院日数、1日当たりのコストをKruskal-Wallis検定で比較検討すると、施設4は他施設に比べ有意に在院日数が長かった。また施設7は施設4のみならず、施設1, 2, 8と比べても有意に在院日数は短かった。

1日あたりのコストでは、施設6は施設5以外の全ての施設より有意に高かった。また施設4と7は施設6に比べても有意に低かった。

## 2) 全患者における各種パラメーターでの比較

全てのデータをMicrosoft Excelを用いて統合し、血友病の種類、体重、インヒビターの有無、手術の有無により在院日数と1日当たりのコストを集計、比較検討をした(**Table 3**)。

血友病の種類は、A(後天性血友病を含む)、B、その他(フォン・ヴィレブランド病や他の

凝固因子異常症)の3群に分類して母集団とし、その母集団の在院日数や1日当たりのコストの基礎統計量を算出し比較した。在院日数は、A, B, その他でそれぞれの群が他群に対し有意差が見られたが、1日当たりのコストはAとBでは差はなく、その他のみが低かった。

体重は25kg毎に4群に分類して母集団とした。体重が重い群ほど在院日数は長く、1日当たりのコストも高くなった。特に75kg以上の群では最大値が107kgであったが、50~75kgの群と1日当たりのコストを比較すると約1.88倍多かった。

インヒビターの有無であるが、凝固因子に対する自己抗体を有する患者、いわゆる後天性血友病は全て“インヒビター有”とした。このように分けると、507名中98名がインヒビターの有る患者の入院であった。また98名のうち後天性血友病を除くと94名となり、全入院に対するインヒビターを保有する患者の入院は18.5%となった。一方、本邦でのインヒビターを保有する患者の割合は、血友病Aで5%、血友病Bで3%と報告されている<sup>2)</sup>ことから、インヒビターの有る患者は無い患者に比べ、入院機会が数倍高いことが示唆された。在院日数と

**Table 3** The comparison of hospital days' per admission and daily hospital charges' by patients' characteristics

Characteristics	Stratum	No. of patients	Hospital days per admission mean±SD(median, range)	Daily hospital charges (yen) mean±SD(median, range)
Type <sup>*1</sup>	A	374	25.2±36.9 (12, 1-310)	241,108±550,141 (113,401; 4,803-4,496,484)
	B	119	20.4±35.4 (10, 1-327)	240,625±317,256 (132,348; 2,598-1,1615,453)
	Others <sup>*2</sup>	14	11.2±5.3 (11, 4-21)	89,228±62,897 (58,496; 22,674-208,315)
Weight(kg)	<25	61	9.6±10.8 (6, 1-53)	127,280±109,773 (80,868; 5,307-428,762)
	25-50	132	22.0±27.8 (12, 1-174)	217,025±511,845 (112,142; 2,598-4,496,484)
	50-75	267	27.1±39.2 (14, 1-327)	280,861±532,736 (114,051; 6,286-2,250,150)
	>75	27	32.3±65.9 (9, 1-310)	526,958±720,846 (228,279; 23,034-3,288,453)
Inhibitor <sup>*3</sup>	Positive	98	15.0±19.9 (8, 1-120)	524,416±712,763 (234,842; 2,598-4,496,484)
	Negative	409	25.8±38.9 (13, 1-327)	147,534±162,298 (103,010; 4,803-1,844,640)
Surgical Operation	Yes	105	52.7±61.7 (30, 2-327)	251,413±506,554 (145,524; 8,760-4,496,484)
	No	402	16.2±19.6 (10, 1-140)	232,380±495,532 (97,397; 2,598-3,288,453)

<sup>\*1</sup> Patients with "acquired factor VIII inhibitor" include "A". <sup>\*2</sup> Others include patients with congenital "coagulation factor" deficiency except for factor VIII or factor IX (ex. von Willebrand disease). <sup>\*3</sup> Patients with acquired hemophilia include "Positive". <sup>\*4</sup> Statistically different using Mann-Whitney's U test with Bonferroni correction after Kruskal-Wallis H test,  $P<0.05$ . <sup>\*5</sup> Statistically different using Mann-Whitney's U test.  $P<0.05$ .

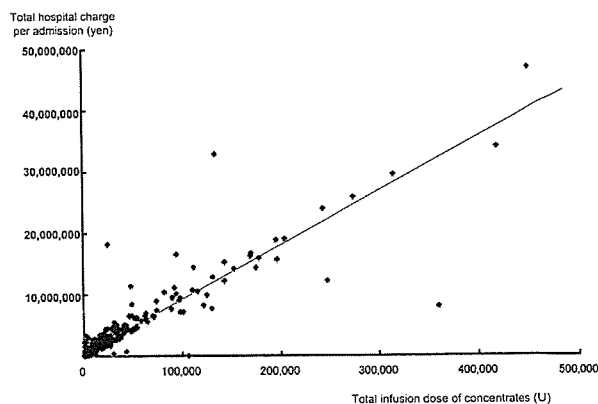
1日当たりのコストを比較すると、“有”が“無”に比べ在院日数は短かったが、1日当たりのコストは“有”が“無”の約3.14倍であった。

手術の有無でみると“無”に比べ“有”の方が、在院日数が長くなっていた(無：中央値10日、有：中央値30日)。しかし、1入院当たり、1日当たりのコストは特に差は認めなかった。

### 3) 1入院当たりのコストとの相関関係

1入院期間内に、プロトロンビン複合体製剤(プロプレックス®)、活性型プロトロンビン複合体製剤(ファイバ®)や活性型第VII因子製剤(ノボセブン®)などのインヒター用製剤を輸注しなかった285例について、1入院当たりのコストと製剤輸注量との関係をみた。スピアマン順位相関係数0.8927であり、 $P<0.05$ で有意な正の相関が見られ、製剤輸注量が多いほどコストが高くなることが分かった(Fig. 3)。

同様に1入院当たりのコストと患者体重との関係を見ると、同順位補正相関係数は0.2496であり、製剤輸注量ほどの強い相関は認めな



**Fig.3** The relationship with total hospital charges and total infusion dose of concentrates. Total hospital charges per admission are positively correlated with total infusion dose of concentrates per admission.  $n=285$ ,  $r_s=0.8927$ ,  $Y=8.346X+77959$ ,  $P<0.05$ .

った。目的変数を1入院当たりのコストとし、製剤輸注量と患者体重を重回帰分析すると、そのP値は製剤輸注量が $<0.05$ 、患者体重が0.202となり、製剤輸注量が1入院当たりのコストを規定していた。

#### 4. 考 察

我々は8施設の血友病類縁疾患患者507名の在院日数, コストを分析した. 8施設は全国でも血友病類縁疾患を多数診療している, いわば“ヘモフィリアセンター”と呼ぶにふさわしい施設である. しかしこのような専門施設でも, 血友病の在院日数やコストにばらつきが多いことが分かった. また凝固第Ⅷ, IX因子製剤は1,000単位が約7万円と高価であり, 入院当たりのコストと製剤輸注量は強い正の相関を認めため, コストは凝固因子製剤の輸注量によって規定されることが想定された. このことより, 製剤使用量を規定する因子(血友病の種類, 体重, インヒビター有無, 手術の有無)がコストに影響を及ぼすと考えられた.

施設4は, 診療科が整形外科で主に“人工関節置換術”を行っている. そのため手術患者の割合が大きく, 術後のリハビリテーションも同一施設で行うため, 平均在院日数は他の施設に比べ長くなっている. また術後のリハビリテーション期間に定期的な凝固因子補充が行われるものの, 再出血を起こさなければ大量の凝固因子製剤を輸注する機会は少ない. そのため, 手術日や術後数日間は大量に凝固因子製剤を使用するにもかかわらず, その後はコストが掛かる機会が少なく経過するのでコスト減となり, 1日当たりのコストは他施設と差がなくなったと考えられた. 8施設のデータを統合し, 手術の有無と在院日数, 1日当たりのコストの関係をみたデータでも同様の結果となり, この推測を支持している.

8施設の統合データについて血友病の種類で見ると, Aの方がBより在院日数は長いものの, 1日当たりのコストはほぼ同じであった. 患者数が違うので推測が難しいが, この原因は凝固因子製剤の使用量にあまり差がないためと思われる. “その他”に含まれる他の凝固因子異常症は, 出血エピソードが血友病に比べ少ないこと, 血友病ほどの製剤量を使用しなくても

止血し得ること, フォン・ヴィレブランド病の場合タイプによっては凝固因子製剤を使用しなくてもデスマプレッシンで止血可能であること<sup>3)4)</sup>, などがコストの低い理由と考えられた.

製剤の輸注量は, 血友病A, B共に体重で規定されている. そのため必然的に体重が多いほど輸注量が多くなり, コストが高くなることが予想されたが, 結果もそのとおりであった. また在院日数も体重が多いほど長くなっている. これは重篤な関節内出血や筋肉内出血を起こすと一時的に臥床状態となり, それから自力移動ができるまで回復するのに期間がかかるからと思われるが, 推定の域を出ない.

インヒビターの有無でみると, “有”が“無”に比べ, 1日当たりのコストは高かった. インヒビター用製剤は, ノボセブン4.8mgが約30万円, ファイバ1,000単位が約20万円と, 第Ⅷ, IX因子製剤1,000単位と比較して3~4倍である. また1出血エピソードに対する輸注量も多く, 通常の関節内出血1エピソードに対して第Ⅷ因子製剤とファイバでその輸注量を比較すると, ファイバの方が1回当たり2倍以上の輸注量を必要とすると報告されている(第Ⅷ, IX因子製剤: 20~40単位/kg/回, ファイバ50~100単位/kg/回)<sup>5)6)</sup>. またノボセブンもその半減期の長さ(2~3時間)<sup>7)</sup>より, 止血に頻回輸注が必要となり, 結果総輸注量は増える. こういった理由より“有”の方が高いのは当然である. しかしそのコストの差は約3.14倍にとどまっている. 一方, 在院日数は“有”が“無”より短かった. この理由として前述したように“有”の方が“無”に比べ入院機会が多いにもかかわらず, 手術を受けた患者の割合が“無”の方が多いたことが挙げられる(有: 手術例中の4.8%). “無”は手術を受けることができるが, “有”の場合, 止血管理の難しさやコストの問題などで手術が敬遠されがちな現状もあると思われる.

2004年4月に血友病類縁疾患に対してDPCによる包括払い案が作成された(特定入院期間

Table 4 Deficits in 8 institutions if the draft of comprehensive costing using DPC in 2004 were adopted

No	Mean hospital days per admission (day)	Mean hospital charges per day (yen)	Mean Hospital charges per admission (yen)	Mean Hospital charges per admission using DPC in 2004 (yen)	Mean deficit per admission (yen)
1	32.1	128,510	4,125,170	3,427,960	697,210
2	29.1	181,840	5,291,540	3,162,160	2,129,380
3	15.8	175,330	2,770,210	1,824,350	945,860
4	68.9	136,850	9,428,970	6,688,440	2,740,530
5	19.0	199,640	3,793,160	2,157,890	1,635,270
6	11.4	222,080	2,531,710	1,365,740	1,165,970
7	9.4	124,110	1,166,630	1,157,280	9,350
8	21.9	153,360	3,358,580	3,144,440	214,140

45日, A日:7, B日:19, A日までの1日請求点数12,959点, B日までの1日請求点数10,423点, B日以降は8,860点). しかしこの案では, 血友病の医療コストを規定する凝固因子製剤の使用量が考慮されておらず, 年齢や体重, インヒビターの有無などでの細分類もなされていないものであった. これを今回の各施設に当てはめると (Table 4), 全ての施設で1入院当たり9,350円~2,740,530円の赤字になる. 手術は包括対象外になるので, 実際はもう少し赤字幅は小さくなると見込まれるが, 病院経営を脅かしかねないDPC案であった. 各関係者からの反対があり, 結局包括対象とすることは見送られたが, 今後も包括対象とするか否かの議論は出てくるものと思われる. ただ, 我々のデータによると, 同じ血友病とは言っても, 入院の目的や体重, インヒビターの有無, 使用製剤によってコストは大きく変動した. それは本邦の患者の10%を越える人数でも正規分布しないデータになることや, 各データの標準偏差の大きさからも伺える. これらより, 血友病類縁疾患を“包括化”することは非常に困難と思われる.

欧米では, 血友病患者に掛かる医療コストを明らかにして, 現在の治療法がコストベネフィットに合うものかどうかどう検討している文献<sup>8)-10)</sup>

はあるが, 日本では余りそのような文献はない. しかし, 入院に限っているとは言え, 本研究は日本の血友病の医療コストが明らかにした初めての研究とってよく, その意義は大きい. 今後は外来分も含めた医療コストが集計され, 海外のデータと比較検討されるべきである.

## 文 献

- 1) 医学通信社編集部: DPC 点数早見表 - 診断群分類樹形図と包括点数対象疾患一覧, 東京, 医学通信社, 2004.
- 2) 血液凝固異常症全国調査運営委員会: 血液凝固異常症全国調査 - 平成16年度報告書, 東京, (財)エイズ予防財団, 2004.
- 3) Michiels JJ, Gadisseur A, Budde U, Berneman Z, van der Planken M, Schroyens W, van de Velde A, van Vliet H: Characterization, classification, and treatment of von Willebrand diseases; a critical appraisal of the literature and personal experiences. *Semin Thromb Hemost* 31: 577-601, 2005.
- 4) Rodegheiro F, Castaman G: Treatment of von Willebrand disease. *Semin Hematol* 42: 29-35, 2005.
- 5) 長澤俊郎: 血友病 (von Willebrand 病を含む), 山口 徹, 北原光夫, 今日の治療指針2005. 東京, 医学書院, 2005, 491-493.
- 6) Barthels M: Clinical efficacy of prothrombin complex concentrates and recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding episodes in patients with factor VII and IX inhibitors. *Tromb Res* 95: S31-38, 1999.
- 7) Brinkhous KM, Hender U, Garris JB, Dinness V, Read MS: Effect of recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1382-1386, 1989.
- 8) Carlsson KS, Höjgård S, Lindgren A, Lethagen S, Schulman S, Glomstein A, Tengborn L, Berntorp E, Lindgren B: Costs of on-demand and prophylactic treatment for severe haemophilia in Norway and Sweden. *Haemophilia* 10: 515-526, 2004.

- 9) Globe DR, Curtis RG, Koerper MA: Utilization of care in haemophilia; a resource-based method for cost analysis from the Haemophilia Utilization Group Study (HUGS) *Haemophilia* 10 : 63-70, 2004.
- 10) Gautier P, D'Alche-Gautier MJ, Coatmelec B, Marques-Verdier A, Bertrand MA, Dieval J, Berthier AM: Cost related to replacement therapy during hospitalization in haemophiliacs with or without inhibitors: experience of six French haemophilia centres. *Haemophilia* 8 : 674-679, 2002.

## A multi-center survey of hospital charges for hemophilia and the related diseases in Japan

Teruhisa FUJII, Noboru TAKATA, Satoshi HIGASA, Michio SAKAI,  
Hideyuki TAKEDANI, Yoshihiko SAKURAI, Hideji HANABUSA, Yoshiyuki KOSAKA,  
Kagehiro AMANO, Midori SHIMA, Akira YOSHIOKA

---

**Key words:** hospital charges for hemophiliacs, Diagnosis Procedure Combination (DPC), comprehensive costing, inhibitor, total infusion dose

---

We estimated the hospital charges for the patients with hemophilia in eight institutions enlisted in this study, and discussed the characteristic features and points at issue regarding the comprehensive costing system using the Diagnosis Procedure Combination(DPC), when adopted. We calculated the total days of hospital admission and total charges based on the data supplied from the institutions during the period between April 2002 and March 2004. We analyzed various factors such as types of disease, patient's body weight, the presence or absence of inhibitors and whether or not the patients had been treated surgically.

The total days of hospital admission and the mean hospital charges per day(MHCD) varied among the institutions ranging from 124,110 yen to 220,080 yen, and the MHCD appeared to increase in accordance with the patient's body weight and the titer of inhibitors as well. Therefore, the comprehensive costing system using DPC would not be beneficial to the institutions, and its adoption appears to be difficult at this stage of investigation.

# Peptide-Loaded Dendritic-Cell Vaccination Followed by Treatment Interruption for Chronic HIV-1 Infection: A Phase 1 Trial

Fuyuaki Ide,<sup>1</sup> Tetsuya Nakamura,<sup>2\*</sup> Mariko Tomizawa,<sup>1</sup> Ai Kawana-Tachikawa,<sup>1</sup> Takashi Odawara,<sup>2</sup> Noriaki Hosoya,<sup>1</sup> and Aikichi Iwamoto<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Division of Infectious Diseases and Applied Immunology Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Immune response enhanced by therapeutic HIV-1 vaccine may control viral proliferation after discontinuation of highly active antiretroviral therapy (HAART). Although which strategies for therapeutic vaccination are feasible remains controversial, application of dendritic cells (DCs) as a vaccine adjuvant represents a promising approach to improving deteriorated immune function in HIV-1-infected individuals. The safety and efficacy of DC-based vaccine loaded with HIV-1-derived cytotoxic T lymphocytes (CTL) peptides were thus investigated in this study. Autologous DCs loaded with seven CTL peptides with HLA-A\*2402 restriction were immunized to four HIV-1-infected individuals under HAART. In terms of safety, peptide-loaded DCs were well tolerated, and only mild local and general symptoms were observed during vaccine administration. ELISPOT assays to detect IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> lymphocytes revealed a limited breadth of responses to immunized peptides in two of four participants, but no response in the remaining two participants. Differences in immunological response might be attributable to the fact that responders displayed higher nadir CD4 counts before starting HAART and were immunized with a larger number of DCs per reactive peptide than non-responders. Discontinuation of HAART after vaccination failed to lower viral set points compared to those before starting HAART. This early outcome warrants further exploration to elucidate the therapeutic value of vaccination with DCs in HIV-1 infection. **J. Med. Virol. 78: 711–718, 2006.** © 2006 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** HIV-1; vaccine; HAART; treatment interruption

## INTRODUCTION

Although highly active antiretroviral therapy (HAART) has significantly improved prognosis for HIV-1 infection, life-long therapy remains a requirement for continuous viral suppression [Ramratnam et al., 2000; Siliciano et al., 2003]. Long-term toxicity of HAART is therefore of medical concern and the economic cost of HAART has become a major social problem. These issues have facilitated attempts at strategic or structured treatment interruption (STI). However, successful results have not been obtained in patients starting HAART in the chronic phases, as HIV-1-specific immunity is already exhausted at the moment of treatment interruption [Oxenius et al., 2002; Fagard et al., 2003; Kaufmann et al., 2004].

Several lines of evidence have revealed that cytotoxic T lymphocytes (CTLs) play a critical role in control of HIV-1 proliferation, and that maintenance of CTL function during chronic infection requires the presence of CD4<sup>+</sup> helper T cells [Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994; McMichael and Rowland-Jones, 2001]. However, HIV-1 selectively infects and destroys HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cells, and causes quantitative and qualitative

Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; Grant sponsor: The Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology of MEXT.

\*Correspondence to: Dr. Tetsuya Nakamura, Division of Infectious Diseases and Applied Immunology Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.  
E-mail: tnakamur@ims.u-tokyo.ac.jp

Accepted 9 February 2006

DOI 10.1002/jmv.20612

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)



TABLE I. Baseline Subject Characteristics

	Subject			
	1	2	3	4
Age (years)	39	46	52	40
Sex	M	M	M	M
Duration of known seropositivity (months)	66	39	46	67
Duration of HAART (months)	65	37	42	64
HAART menu <sup>a</sup>	AZT + 3TC + EFV	AZT + 3TC + EFV	AZT + 3TC + EFV	d4T + 3TC + NFV
CD4 counts (/ $\mu$ l)				
Before HAART	164	216	50	2
At enrollment	453	658	330	340
Viral load (copies/ml)				
At enrollment	<50	<50	<50	<50
Preparation of vaccine				
Number of PBMCs obtained by leukopheresis	$7.6 \times 10^9$	$9.4 \times 10^9$	$6.8 \times 10^9$	$9.7 \times 10^9$
Number of DCs used for each vaccination	$0.7-1.2 \times 10^7$	$0.9-1.4 \times 10^7$	$1.0-1.5 \times 10^7$	$1.2-1.8 \times 10^7$
Amino acid sequences of epitope portions <sup>b</sup>				
Gag28	3R	3R, 7L <sup>c</sup>	3R	3R, 7V <sup>c</sup>
Gag296	wt	wt	wt	wt
Nef138	2F	5C <sup>c</sup>	2F	2F
Env584	4G <sup>c</sup>	4Q	4K, 7R, 11L <sup>c</sup>	wt and 4K <sup>c</sup>

<sup>a</sup>AZT, azidothymidine; 3TC, lamivudine; EFV, efavirenz; NFV, nelfinavir.

<sup>b</sup>wt (wild-type) represents amino acid sequences are identical to those of SF-2. Others represent amino acid positions of substitution and the substituted amino acids (see Table II).

<sup>c</sup>These substitutions were not included in peptides used in this study.

impairment of HIV-1-specific immunity, as shown by us and other groups [Watanabe et al., 2001; Kawamura et al., 2003]. When HAART is started and viral proliferation is controlled, destruction of CD4<sup>+</sup> T cells stops and naive lymphocytes are provided from the thymus. The immune system, however, is unable to produce and maintain HIV-1-specific immunity due to a loss of antigen stimuli under HAART. Treatment interruption in patients who start HAART in the chronic phase thus results in unfavorable outcomes.

Given this pathogenesis of HIV-1 infection, a therapeutic HIV-1 vaccine that is administered during HAART and potentiates HIV-1-specific immunity would theoretically offer a feasible strategy for achieving better viral control after STI. To test this hypothesis, we conducted a phase I clinical trial in which autologous dendritic cells (DCs) loaded with HIV-1-derived CTL epitope peptides were administered to four HIV-1-infected individuals and HAART was discontinued thereafter. DCs were used as highly specialized antigen-presenting cells that not only restore qualitative impairment of CTLs, but also stimulate naive CD8<sup>+</sup> T cells newly provided from the thymus during HAART [Banchereau et al., 2000]. We report herein the safety and efficacy of this DC-based therapeutic vaccine in addition to clinical outcomes after interruption of HAART.

## MATERIALS AND METHODS

### Participants

Subjects comprised four men with chronic HIV-1 infection and HLA genotype A\*2402. All participants were under HAART with undetectable viral loads (VL;

<50 copies/ml) for  $\geq 1$  year before enrollment. The institutional ethics committee approved this clinical trial and all participants provided written informed consent. Baseline characteristics are summarized in Table I.

### Synthetic Peptides

Clinical-grade synthetic peptides (Table II) used for vaccination and ELISPOT assay were purchased from Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Gag(1–115) comprises a pool of 12- to 17-mer peptides with 10 amino acid overlaps that cover the whole Gag protein (subtype B consensus sequence) but do not include peptides containing Gag28 and Gag296 epitopes. Gag overlapping peptides were purchased from Operon Biotechnologies (Huntsville, AL). CMV-pp65 [Kuzushima et al., 2001] and EBV-TL9 [Lee et al., 1997] are both HLA-A24-restricted epitopes derived from Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus and were purchased from Sigma-Genosys Japan (Ishikari, Japan).

TABLE II. A\*2402-restricted CTL Epitope Peptides Used in This Study

Protein	Epitope	Amino acid position	Peptides used in this study	
			Designation	Sequence
Gag	Gag28	28–36	Gag28-wt	KYKCLKHIVW
			Gag28-3R	KYRLKHKHIVW
	Gag296	296–306	Gag296	RDYVDRFYKTL
Nef	Nef138	138–147	Nef138-wt	RYPLTFGWCF
			Nef138-2F	RFPLTFGWCF
Env	Env584	584–594	Env584-wt	RYLRDQQLLGI
			Env584-4Q	RYLQDQQLLGI

### RNA Extraction, PCR Amplification, and Sequencing

Viral RNA was extracted from plasma and subjected to first and second polymerase chain reaction (PCR), as described previously [Furutsuki et al., 2004]. PCR primers for Nef and Env epitope portions have been described previously [Furutsuki et al., 2004], and other primers are listed below (all nucleotide positions are in accordance with the HIV-1 SF2 strain).

For Gag28 epitope, 1st PCR primer set: forward: 5'-CGCAGGACTCGGCTTGCTGAAG-3' (691-712) reverse: 5'-GCTATGTCACTTCCCCTTGGTTC-3' (1506-1484). For Gag28 epitope, 2nd PCR primer set: forward: 5'-GAGAGAGATGGGTGCGAGAGC-3' (784-804) reverse: 5'-TCTCTAAAGCTTCCCTTGGTGTC-3' (1097-1076). For Gag296 epitope, 1st PCR primer set: forward: 5'-AAGTAATACCCATGTTTTTCAG-3' (1296-1316) reverse: 5'-CTAAAATTGCCTCTCTGCATC-3' (1947-1927). For Gag296 epitope, 2nd PCR primer set: forward: 5'-CCAG-ATGAGAGAACCAAGG-3' (1474-1492) reverse: 5'-ATC-TGGGTTTGCATTTTGG-3' (1783-1765). For reverse transcriptase region, 1st primer set: forward: 5'-ATGATAGGGGAATTGGAGGTTT-3' (2393-2415) reverse: 5'-TACTTCTGTTAGTGCTTGGTTCC-3' (3422-3399). For reverse transcriptase region, 2nd primer set #1: forward: 5'-GACCTACACCTGTCAACATAATTGG-3' (2492-2516) reverse: 5'-TAATCCCTGCATAAATCTGACTTGC-3' (3379-3355). For reverse transcriptase region, 2nd primer set #2: forward: 5'-GTACTTTAAATTTCCCATTAGTCC-3' (2543-2567) reverse: 5'-CAGTCCAGC-TGTCTTTTCTGGC-3' (3316-3294). For protease region, 1st primer set: forward: 5'-AGACAGGYTAATTTTTAGGGA-3' (2074-2095) reverse: 5'-TATGGATTTTCAGGCCCAATTTTGA-3' (2716-2691). For protease region, 2nd primer set: forward: 5'-AGAGC-CAACAGCCCCACCAG-3' (2155-2174) reverse: 5'-ACTTTTGGGCCATCCATTCC-3' (2618-2599).

Purified PCR products were either directly sequenced or subcloned into pGEM-T vectors (Promega, Madison, WI) and sequenced using an ABI Prism dye terminator cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a Perkin-Elmer ABI-377 sequencer.

### Preparation of DCs

Leukocytes fractions were collected from participants by leukopheresis of blood samples, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified through a ficoll-hypaque gradient. Obtained PBMCs were aliquoted into cryotubes, and stored at  $-150^{\circ}\text{C}$  until use. For induction of immature DCs, frozen PBMCs were thawed, suspended in PBS and incubated in plastic dishes for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Adherent cells were then cultured in RPMI medium (HyClone, Logan, UT) containing 10% human AB serum (COSMO BIO, Tokyo, Japan), 50 ng/ml GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ), and 50 ng/ml of recombinant human interleukin 4 (PeproTech). After 6–7 days of culture, TNF- $\alpha$  (PeproTech) (50 ng/ml) and 7 CTL epitope peptides (10  $\mu\text{M}$

each) were added and peptide-loaded mature DCs were harvested the next day. Cells were resuspended in 1 ml of saline and kept on ice until inoculation into participants. All procedures were conducted in a dedicated facility based on GCP as defined by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

### Vaccination and Interruption of HAART

DCs loaded with HIV-1-specific epitope peptides were injected subcutaneously into axillary areas six times every 2 weeks. After the 6th vaccination, HAART was discontinued and clinical, immunological, and virological consequences were observed every week. If the HAART regimen contained efavirenz, nevirapine, or lamivudine, these antiretroviral agents were changed at least 2 weeks before treatment interruption to other agents with shorter half-lives. HAART was restarted when participants met any of the following criteria: VL > 50,000 copies/ml; VL > 5,000 copies/ml on three consecutive measurements; or CD4 counts < 200/ $\mu\text{l}$  on two consecutive measurements.

### ELISPOT Assay

For ELISPOT assay, PBMCs were aliquoted to 96-well multiscreen plates precoated with 5  $\mu\text{g/ml}$  anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (mAb) 1-D1K (Mabtech, Nacka Stand, Sweden). Peptides were added at concentrations of  $10^{-6}$  M and incubated for 18 hr at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing wells, 100  $\mu\text{l}$  of 1  $\mu\text{g/ml}$  biotinylated anti-IFN- $\gamma$  mAb 7-B6-1 (Mabtech) was added and incubated at room temperature for 90 min. After unbound mAb was removed, 100  $\mu\text{l}$  of 1:1,000 diluted streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Mabtech) was added and incubated at room temperature for 60 min. Spots were developed using an alkaline phosphatase conjugate substrate kit (BIO-RAD, Hercules, CA), and counted using a KS Elispot compact (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Assays were conducted in triplicate and results were represented as mean numbers of spots per  $10^6$  PBMCs. When the number of spots was more than three-times the number in controls (PBMCs cultured without peptides), the response was considered significant.

## RESULTS

### Selection of CTL Epitope Peptides Derived From HIV-1

As immunogens for vaccination, we used HIV-1-derived peptides that were known to elicit strong CTL response and were restricted to HLA-A\*2402 expressed in approximately 70% of the Japanese population (allele frequency of A\*2402; 36.5%) [Tanaka et al., 1996]. The selected CTL epitope portions with A\*2402 restriction were amino acid positions from 28 to 36 of Gag(Gag28), from 296 to 306 of Gag(Gag296), from 138 to 147 of Nef (Nef138), and from 584 to 594 of Env (Env584) (Table II). Whereas amino acid sequences in the Gag296 epitope portion have been shown to be conserved, other

three-epitope portions have been reported to display amino acid mutations [Ikeda-Moore et al., 1997, 1998; Dorrell et al., 1999; Furutsuki et al., 2004]. Thus, for the three-epitope portions, both wild-type peptides (Gag28-wt, Nef138-wt, and Env584-wt) and one of the representative mutant peptides (Gag28-3R, Nef138-2F, and Env584-4Q) were selected (Table II). Sequence analysis of HIV-1 derived from the four enrolled participants revealed that at least two of four epitope portions displayed amino acid sequences identical to immunized peptides (Table I).

### DC-Based Vaccine Administration and Treatment Interruption

The four men enrolled in this study displayed undetectable VL under HAART (Table I). Leukopheresis was used to collect  $6.8\text{--}9.7 \times 10^9$  PBMCs from each participant, and  $0.7\text{--}1.8 \times 10^7$  mature DCs were harvested for each vaccination without contamination by pathogens or reactivation of autologous HIV-1. Peptides were either loaded to DCs by mixture (Subjects 1 and 2) or separately (Subjects 3 and 4), and peptide-loaded DCs were injected subcutaneously to areas near the axilla in two to three divided doses. During the course of six vaccinations in the four participants, subcutaneous bleeding ( $n = 1$ ), erythema at the injection site ( $n = 1$ ), and general malaise ( $n = 1$ ) were reported as local and generalized adverse events, all of which were non-serious and resolved without specific treatment (Table III).

Serum VLs were examined every week after treatment interruption and became positive above the

detection limit of 50 copies/ml in all four participants, in weeks 3, 3, 1, and 2, respectively (Table III; Fig. 1). Subject 4 experienced fever at  $38^\circ\text{C}$ , myalgia, skin rash, and cervical lymph node swelling at 1 week after interruption, accompanied by mild liver dysfunction and thrombocytopenia, mimicking acute retroviral syndrome, and subsiding spontaneously within 2 weeks. All participants met criteria to restart HAART (at weeks 8, 4, 5, and 3, respectively) and VLs had been suppressed to undetectable levels by 11–30 weeks after restart of original HAART regimens. Differences between peak VL after treatment interruption and VL before start of HAART did not exceed 0.5 in  $\log_{10}$  scale in all four participants (Table III). CD4 counts decreased after discontinuation of HAART in all participants to the level of approximately  $200/\mu\text{l}$  (Fig. 1). After restarting HAART, CD4 counts in Subjects 2 and 4 gradually recovered, but those in Subjects 1 and 3 fluctuated at lower levels than prior to treatment interruption despite successful viral control by restarted HAART.

### Immunological Analysis of Vaccines

HIV-1-specific CTL response to immunized peptides was evaluated by ELISPOT assay to detect IFN- $\gamma$ -producing cells. Unseparated PBMCs were used for the assay, as preliminary experiments showed that IFN- $\gamma$  production responding to both immunized peptides and control peptides was only seen in the CD8<sup>+</sup> population (data not shown). Significant responses to Nef138-wt were observed in Subjects 1 and 2, with weak responses to Nef138-2F in Subject 1 after the 5th vaccination (Fig. 2; black bars). Response in Subject 2 was

TABLE III. Clinical Outcomes of Vaccine Administration and Interruption of Antiretroviral Therapy

	Subject			
	1	2	3	4
CD4 counts ( $/\mu\text{l}$ )				
At 1st vaccination	512	310	520	428
Nadir after treatment interruption	257	252	181	213
Decrease in CD4 counts <sup>a</sup>	-255	-58	-339	-215
Viral load ( $\log_{10}$ [copies/ml])				
Before start of HAART	4.08	5.15	4.15	5.23
Peak after treatment interruption	4.00	5.04	4.58	5.26
Reduction of VLs <sup>b</sup>	0.08	0.11	-0.43	-0.03
First detectable VLs after interruption (weeks)	3	3	1	2
Duration of interruption (weeks)	10	18	6	5
Adverse events				
During vaccination	Subcutaneous bleeding at injection site		General malaise	Erythema at injection site
After interruption of HAART				Fever, lymph node swelling, thrombocytopenia, elevated liver enzyme
HAART during 2 weeks before interruption	AZT + ddC + NFV	AZT + ddC + NFV	AZT + ABC + NFV	d4T + ABC + NFV
Drug-resistant mutations				
Reverse transcriptase region	None	None	None	None
Protease region	None	None	M36J (4w) none (6w)	None

<sup>a</sup>CD4 count at nadir after treatment interruption subtracted from count at 1st vaccination.

<sup>b</sup>VL before start of HAART subtracted from VL at peak after treatment interruption.

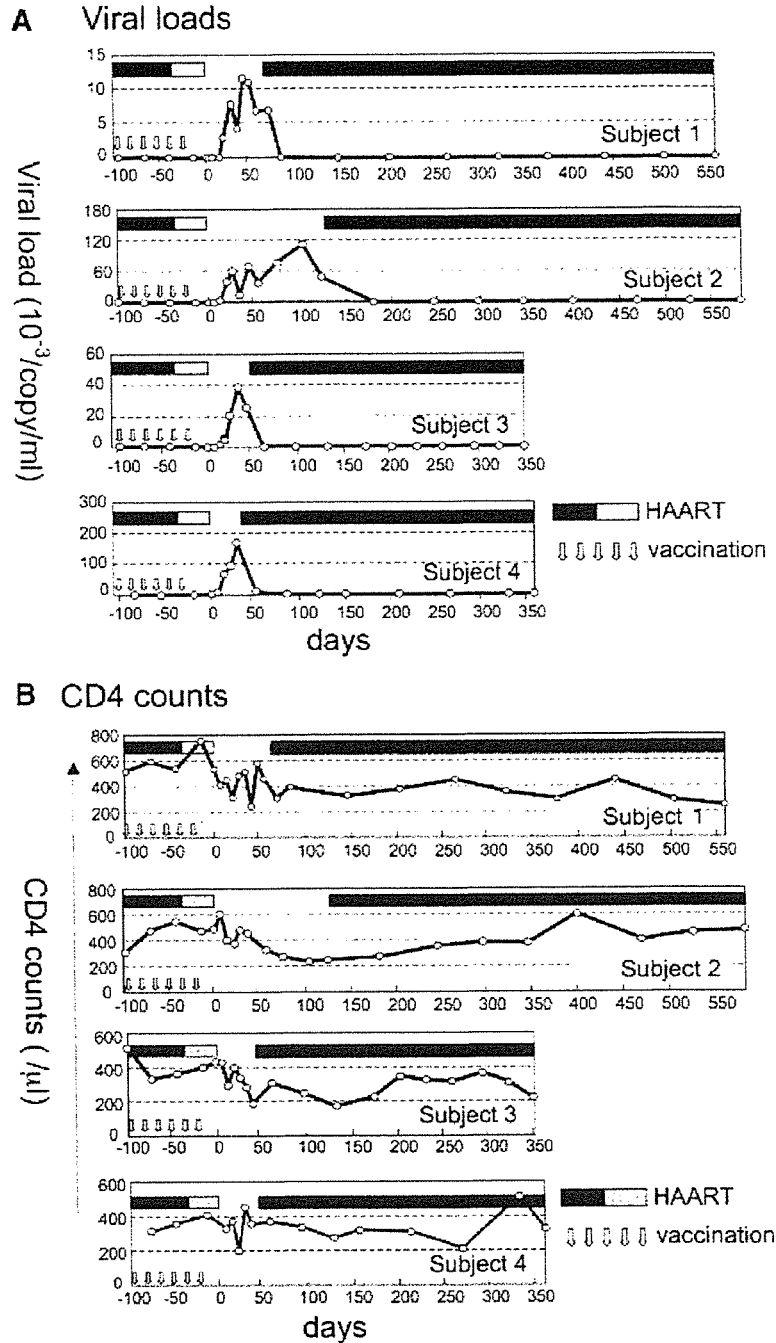


Fig. 1. Clinical courses of the four subjects. Viral loads (A) and CD4 counts (B) of the four subjects during vaccination (downward arrows) are described together with duration of treatment interruption and restart of HAART. Black bars represent duration under original HAART regimens and gray bars represent duration under alternative HAART regimens to avoid drug resistance.

specifically induced by DC-based vaccine, as no responses to control peptides of Gag(1–115), CMV-pp65, or EBV-TL9 were detected. In Subject 1, however, response was also observed to control peptides of Gag(1–115) and EBV-TL9 after the 5th vaccination, suggesting

that this response to Nef138-wt and Nef138-2F included non-specific stimuli by DC injection. When HAART was discontinued and autologous virus rebounded, specific responses in Subjects 1 and 2 were induced to Nef138-wt and Nef138-2F in addition to Gag(1–115), whereas

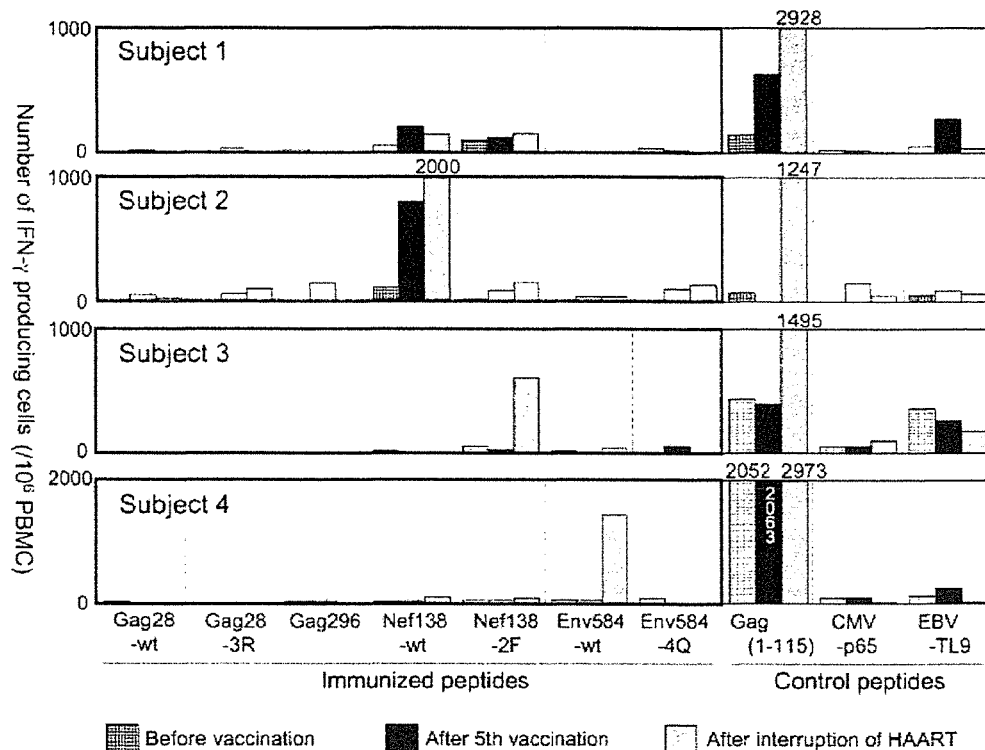


Fig. 2. Peptide-specific responses in PBMCs of vaccinees. PBMCs collected before vaccination (shaded bars), after 5th vaccination (black bars) and 4 weeks after treatment interruption (gray bars), were incubated with immunized peptides: Gag28-wt, Gag28-3R, Gag296, Nef138-wt, Nef138-2F, Env584-wt, and Env584-4Q in addition to control peptides: Gag1-115, CMV-pp65, and EBV-TL9. Response to each peptide was analyzed using ELISPOT assay detecting IFN- $\gamma$ -producing cells. Specific response was calculated by subtracting number of IFN- $\gamma$ -producing cells without peptides from number of cells with each peptide, and the subtracted number of cells was represented as per  $10^5$  PBMCs. When absolute numbers of IFN- $\gamma$ -producing cells with peptides were less than three times numbers of cells without peptides, the response was considered as background and represented with white bars. To show details of data, some bars are scaled out and the specific response is represented by actual numbers of spots per  $10^5$  PBMCs.

no significant responses were observed for other immunized peptides.

The limited breadth of response in Subjects 1 and 2 to immunized peptides raised the possibility that differences in avidity between immunized peptides and HLA-A\*2402 molecules affected the results because seven peptides were loaded by mixture into DCs for these participants. Avidity of the seven peptides was thus tested using a T2-A24 stabilization assay [Foung et al., 1986; Kuzushima et al., 2001], revealing that Env584-wt, Env584-4Q, Nef138-wt, and Nef138-2F bind HLA-A\*2402 with relatively high avidity, whereas Gag28-3R binds with moderate avidity, and both Gag296 and Gag28-wt bind with low avidity (data not shown). Based on this result, each peptide for Subjects 3 and 4 was incubated with DCs separately ( $\sim 1.4 \times 10^6$  DCs/peptide) and used for vaccination. However, injection of separately-loaded DCs did not induce specific response to any of the seven immunized peptides, despite the fact that rebound of autologous HIV-1 after treatment interruption induced strong responses to Nef138-2F, Env584, and Gag(1-115). We also conducted tetramer-binding assay using Nef138-wt-tetramer and ELISPOT assay using autologous DCs as antigen-presenting cells to amplify IFN- $\gamma$  production, but could not find

peptide-specific population or response in Subjects 3 and 4 (data not shown).

### Drug-Resistance Mutations

Since one of the concerns regarding interruption of HAART is the potential emergence of drug-resistance mutations, we sequenced reverse transcriptase and protease genes of HIV-1 derived from plasma before start of HAART and 4 weeks after treatment interruption, when VLs were detectable in all participants (7,100, 58,000, 24,000, and 100,000 copies/ml, respectively). Subject 3 displayed a nucleotide substitution at position 108 in the protease regions on population sequencing, which would result in an amino acid change from methionine to isoleucine at position 36 (Table III). Sequences of clones obtained from the PCR product revealed that five of five clones displayed the M36I mutation. HIV protease genes in the plasma of this participant were further sequenced at 6 weeks after treatment interruption (29,000 copies/ml), but no M36I mutation were identified in any of the eight clones sequenced. No nucleotide substitutions were found in protease genes from the other three participants, or in reverse transcriptase genes from all participants.

## DISCUSSION

After DC-based vaccination of the four subjects, immune responses to Nef138-wt in Subjects 1 and 2, and to Nef138-2F in Subject 1 were observed, whereas no detectable responses were obtained in other peptides. The results from Subjects 1 and 2 demonstrating limited breadth of response led us to consider the possibility that differences in avidity between HLA-A\*2402 molecules and each peptide caused preferential presentation of Nef138 epitopes, as seven peptides were added to DCs in mixture. In fact, T2-A24 stabilization assay revealed that Gag epitopes displayed lower avidity to HLA-A\*2402 than Nef138 and Env584 peptides. Thus, in Subjects 3 and 4, the seven peptides were incubated with DCs in separate wells and mixed together before vaccination, but no significant responses were observed to any of these peptides. One explanation for this observation is that when approximately  $1 \times 10^7$  DCs were divided among seven peptides (approximately  $1.4 \times 10^6$  cells/peptide), the numbers of DCs was too small to provide sufficient stimuli to CTLs in vivo. Although Yu et al. [2004] reported that  $1.0 \times 10^6$  autologous DCs loaded with glioma-derived peptides could elicit systemic cytotoxicity in cancer patients, the number of DCs in the present cases might have been insufficient to elicit specific response from HIV-1-infected individuals. Another explanation is that Subjects 3 and 4 displayed lower nadir CD4 counts before starting HAART (50/ $\mu$ l and 2/ $\mu$ l, respectively) than Subjects 1 and 2 (164/ $\mu$ l and 216/ $\mu$ l, respectively). In untreated HIV-1-infected individuals, CD4<sup>+</sup> T cells are continuously destroyed during all stages of HIV-1 infection, causing not only quantitative, but also qualitative abnormalities in HIV-1-specific immunity. These abnormalities are carried over even after CD4 counts are normalized by the initiation of HAART. In fact, Lange et al. [2003] reported that responses to immunization of tetanus and diphtheria toxoids in chronically HIV-1-infected patients under HAART correlate with previous nadir CD4 counts, but not with current circulating CD4 counts. This kind of impaired immune function in HIV-1-infected individuals under HAART may also explain the limited breadth of immune response in Subjects 3 and 4.

In terms of safety, peptide-loaded DCs were well tolerated, and only mild local and general symptoms were observed during vaccine administration, with only one episode of acute retroviral syndrome after STI. Since treatment interruption sometimes causes viral mutation resulting in antiretroviral drug resistance [Schweighardt et al., 2002; Metzner et al., 2003; Tremblay et al., 2003], all participants changed from antiretroviral agents that are known to be susceptible to resistance mutations to other agents with short-half lives before STI. However, an M36I mutation in a protease region was transiently detected in Subject 3 when VL rebounded 4 weeks after treatment interruption, and disappeared 6 weeks after interruption. M36I mutation is regarded as one of the minor resistance

mutations that can appear after emergence of major resistance mutations. We cannot determine the mechanism underlying this transient appearance of M36I in Subject 3, but replication of mono- or oligoclonal HIV-1 from reservoir cells may be responsible.

In this study with a small number of participants, DC-based vaccine elicited a limited breadth and strength of immune response, and treatment interruption failed to control rebound of viral proliferation. Several groups have tried similar therapeutic vaccines to interrupt antiretroviral therapy in both humans [Hejdeman et al., 2003; Bostrom et al., 2004; Harrer et al., 2005; Kinloch-de Loes et al., 2005; Tubiana et al., 2005; Wu et al., 2005] and macaques [Liszewicz et al., 2005] using recombinant proteins or genes expressing HIV-1 proteins, and have reported various results of specific immune reaction and clinical outcomes after treatment interruption. Although the question as to which strategy for therapeutic vaccination is suitable for successful treatment interruption remains controversial, application of DCs as vaccine adjuvant appears theoretically attractive to improve deteriorated immune function in HIV-1-infected individuals. In agreement with this concept, therapeutic vaccine using DCs in cancer treatment has been shown to result in better tumor regression compared to vaccines using peptide alone, viral vectors or tumor cells [Banchereau and Palucka, 2005]. Recently, two groups reported preliminary results of DC-based therapeutic vaccine in HIV-1-infected patients using autologous HIV-1 as immunogens in untreated [Lu et al., 2004] and treated patients [Garcia et al., 2005]. Garcia et al. showed that DC-based HIV-1 vaccine in patients under HAART did not elicit specific immune responses, although the vaccine suppressed viral rebound in 4 of 12 vaccines after treatment interruption. Our result thus provides encouraging evidence that DC-based vaccines can induce specific immune response, albeit insufficient to suppress viral rebound, in patients under HAART. These early outcomes warrant further exploration to establish the therapeutic value of vaccination with DCs in HIV-1 infection.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Terumi Ogawa and Yoshiko Nakai for technical assistance. We also wish to thank translational research coordinators Eriko Miyazaki and Miho Tabata for management of patients. This work was partly supported by grants for AIDS research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and The Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology of MEXT: Strategic cooperation to control emerging and reemerging infections.

## REFERENCES

- Banchereau J, Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296–306.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811.

- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. 1994. Virus-specific CD8 cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68:6103–6110.
- Bostrom AC, Hejdeman B, Matsuda R, Fredriksson M, Fredriksson EL, Bratt G, Sandstrom E, Wahren B. 2004. Long-term persistence of vaccination and HAART to human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 22:1683–1691.
- Dorrell L, Dong T, Ogg GS, Lister S, McAdam S, Rostron T, Conlon C, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 1999. Distinct recognition of non-clade B human immunodeficiency virus type 1 epitopes by cytotoxic T lymphocytes generated from donors infected in Africa. *J Virol* 73:1708–1714.
- Fagard C, Oxenius A, Gunthard H, Garcia F, Le Braz M, Mestre G, Battagay M, Furrer H, Vernazza P, Bernasconi E, Telenti A, Weber R, Leduc D, Yerly S, Price D, Dawson SJ, Klimkait T, Perneger TV, McLean A, Clotet B, Gatell JM, Perrin L, Plana M, Phillips R, Hirschel B, Swiss HIV Cohort Study. 2003. A prospective trial of structured treatment interruptions in human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 163:1220–1226.
- Foung SK, Taidi B, Ness D, Grumet FC. 1986. A monoclonal antibody against HLA-A11 and A24. *Hum Immunol* 15:316–319.
- Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. 2004. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol* 78:8437–8445.
- Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcamí J, Morente V, Alos L, Ruiz A, Setoain J, Fumero E, Castro P, Lopez A, Cruceta A, Píera C, Florence E, Pereira A, Libois A, Gonzalez N, Guila M, Caballero M, Lomena F, Joseph J, Miro JM, Pumarola T, Plana M, Gatell JM, Gallart T. 2005. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 191:1680–1685.
- Harrer E, Bauerle M, Ferstl B, Chaplin P, Petzold B, Mateo L, Handley A, Tzatzaris M, Vollmar J, Bergmann S, Rittmaier M, Eismann K, Muller S, Kalden JR, Spriewald B, Willbold D, Harrer T. 2005. Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: Safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. *Antivir Ther* 10:285–300.
- Hejdeman B, Leandersson AC, Fredriksson EL, Sandstrom E, Wahren B, Bratt G. 2003. Better preserved immune responses after immunization with rgp 160 in HIV-1 infected patients treated with highly active antiretroviral therapy than in untreated patients with similar CD4 levels during at 2 years' follow-up. *HIV Med* 4:101–110.
- Ikeda-Moore Y, Tomiyama H, Miwa K, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M. 1997. Identification and characterization of multiple HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes: Strong epitopes are derived from V regions of HIV-1. *J Immunol* 159:6242–6252.
- Ikeda-Moore Y, Tomiyama H, Ibe M, Oka S, Miwa K, Kaneko Y, Takiguchi M. 1998. Identification of a novel HLA-A24-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope derived from HIV-1 Gag protein. *AIDS* 12:2073–2074.
- Kaufmann DE, Lichterfeld M, Altfeld M, Addo MM, Johnston MN, Lee PK, Wagner BS, Kalife ET, Strick D, Rosenberg ES, Walker BD. 2004. Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS Med* 1:e36.
- Kawamura T, Gatanaga H, Borris DL, Connors M, Mitsuya H, Blauvelt A. 2003. Decreased stimulation of CD4+ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *J Immunol* 170:4260–4266.
- Kinloch-de Loes S, Hoen B, Smith DE, Autran B, Lampe FC, Phillips AN, Goh LE, Andersson J, Tsoukas C, Sonnerborg A, Tambussi G, Girard PM, Bloch M, Battagay M, Carter N, El Habib R, Theofan G, Cooper DA, Perrin L, QUEST Study Group. 2005. Impact of therapeutic immunization on HIV-1 viremia after discontinuation of antiretroviral therapy initiated during acute infection. *J Infect Dis* 192:607–617.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68:4650–4655.
- Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, Tsurumi T. 2001. Efficient identification of HLA-A\*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood* 98:1872–1881.
- Lange CG, Lederman MM, Medvik K, Asaad R, Wild M, Kalayjian R, Valdez H. 2003. Nadir CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 17:2015–2023.
- Lee Sp, Tierney RJ, Thomas WA, Brooks JM, Rickinson AB. 1997. Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2. *J Immunol* 158:3325–3334.
- Lisziewicz J, Trocio J, Xu J, Whitman L, Ryder A, Bakare N, Lewis MG, Wagner W, Pistorio A, Arya S, Lori F. 2005. Control of viral rebound through therapeutic immunization with DermaVir. *AIDS* 19:35–43.
- Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. 2004. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 10:1359–1365.
- McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410:980–987.
- Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M, Karanickolas R, Allers K, Joos B, Weber R, Hirschel B, Kostrikis LG, Gunthard HF, The Swiss HIV Cohort Study. 2003. Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J Infect Dis* 188:1433–1443.
- Oxenius A, Price DA, Gunthard HF, Dawson SJ, Fagard C, Perrin L, Fischer M, Weber R, Plana M, Garcia F, Hirschel B, McLean A, Phillips RE. 2002. Stimulation of HIV-specific cellular immunity by structured treatment interruption fails to enhance viral control in chronic HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13747–13752.
- Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurlley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD. 2000. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 6:82–85.
- Schweighardt B, Ortiz GM, Grant RM, Wellons M, Miralles GD, Kostrikis LG, Bartlett JA, Nixon DF. 2002. Emergence of drug-resistant HIV-1 variants in patients undergoing structured treatment interruptions. *AIDS* 16:2342–2344.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9:727–728.
- Tanaka H, Akaza T, Fuji T. 1996. Report of the Japanese Central Bone Marrow Data Center. *Clin Transpl* 139–144.
- Tremblay CL, Hicks JL, Sutton L, Gigué F, Flynn T, Johnston M, Sax PE, Walker BD, Hirsch MS, Rosenberg ES, D'Aquila RT. 2003. Antiretroviral resistance associated with supervised treatment interruptions in treated acute HIV infection. *AIDS* 17:1086–1089.
- Tubiana R, Carcelain G, Vray M, Gourlain K, Dalban C, Chermak A, Rabian C, Vittecoq D, Simon A, Bouvet E, El Habib R, Costagliola D, Calvez V, Autran B, Katlama C, the Vacciter Study group. 2005. Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094). *Vaccine* 23:4292–4301.
- Watanabe N, Tomizawa M, Tachikawa-Kawana A, Goto M, Ajisawa A, Nakamura T, Iwamoto A. 2001. Quantitative and qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. *AIDS* 15:711–715.
- Wu L, Kong WP, Nabel GJ. 2005. Enhanced breadth of CD4 T-cell immunity by DNA prime and adenovirus boost immunization to human immunodeficiency virus Env and Gag immunogens. *J Virol* 79:8024–8031.
- Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. 2004. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64:4973–4979.

## インヒビター保有血友病患者における遺伝子組換え活性型血液凝固第VII因子製剤（注射用ノボセブン®）の長期的安全性および有効性：5年間の市販後調査中間解析報告

白幡 聡<sup>\*1</sup>, 岡 敏明<sup>\*2</sup>, 福武勝幸<sup>\*3</sup>, 新井盛大<sup>\*3</sup>, 花房秀次<sup>\*4</sup>,  
 瀧 正志<sup>\*5</sup>, 長尾 大<sup>\*6</sup>, 三間屋純一<sup>\*7</sup>, 芳賀信彦<sup>\*8</sup>, 高松純樹<sup>\*9</sup>,  
 神谷 忠<sup>\*10</sup>, 嶋 緑倫<sup>\*11</sup>, 垣下榮三<sup>\*12</sup>, 竹谷英之<sup>\*13</sup>, 高田 昇<sup>\*14</sup>,  
 小林正夫<sup>\*15</sup>, 内田立身<sup>\*16</sup>, 小野織江<sup>\*17</sup>, 吉岡 章<sup>\*11</sup>

遺伝子組換え活性型血液凝固第VII因子製剤（rFVIIa）の使用成績調査について、5年間の長期有効性および安全性に関する中間解析結果をまとめた。先天性および後天性血友病患者102例、1,580出血エピソードが報告された。全出血エピソードの中で12時間以内に止血効果が認められた、著効あるいは有効と評価された出血エピソードの割合（有効率）は69.6%であった。また、8時間以内に止血効果が認められた著効の割合は、既報の臨床成績（31.2%）のほぼ2倍（60.9%）であった。全出血エピソードのうち、3つの要件（初回投与量90μg/kg以上、出血から初回投与までの時間3時間以内、平均投与間隔3時間以内）を全て満たした群（推奨治療条件群）の有効率は82.4%で、その他の群（非推奨治療条件群）の有効率44.4%に比し有意に高かった。しかし、推奨治療条件を満たした治療エピソードは全体の約40%に過ぎず、rFVIIaの有効性をさらに高めるためには3つの要件を満たすことの重要性が示唆された。安全性について、副作用は20例42件が報告された。重篤な副作用は3例4件報告されたが、いずれも本剤との明らかな関連性は認められなかった。

**Key words:** rFVIIa, haemophilia, inhibitor, bleeding episode

- <sup>\*1</sup> 産業医科大学 小児科〔〒807-8555北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1〕  
 Department of Pediatrics, University of Occupational and Environmental Health, Japan [1-1 Iseigaoka, Yahatanishi, Kitakyushu, 807-8555, Japan]
- <sup>\*2</sup> 札幌徳洲会病院 小児科〔〒003-0021札幌市白石区茶通18-4-10〕  
 Department of Pediatrics, Sapporo Tokushuukai hospital [18-4-10 Sakaedoori, Shiroishi, Sapporo, 003-0021, Japan]
- <sup>\*3</sup> 東京医科大学 臨床検査医学講座〔〒160-0023新宿区西新宿6-7-1〕  
 Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University [6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku, 160-0023, Japan]
- <sup>\*4</sup> 荻窪病院 血液科〔〒167-0035杉並区今川3-1-24〕  
 Department of Hematology, Ogikubo Hospital [3-1-24 Imagawa, Suginami, 167-0035, Japan]
- <sup>\*5</sup> 聖マリアンナ医科大学 小児科〔〒216-8511川崎市宮前区菅生2-16-1〕  
 Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine [2-16-1 Sugao, Miyamae, Kawasaki, 216-8511, Japan]
- <sup>\*6</sup> 神奈川県立子ども医療センター 血液科〔〒232-8555横浜市南区六ツ川2-138-4〕  
 Department of Hematology, Kanagawa Children's Medical Center [2-138-4 Mutsukawa, Minami, Yokohama, 232-8555, Japan]
- <sup>\*7</sup> 静岡県立子ども病院 血液腫瘍科〔〒420-8660静岡市葵区漆山860〕  
 Division of Hematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital [860 Urushiyama, Aoi, Shizuoka, 420-8660, Japan]
- <sup>\*8</sup> 静岡県立子ども病院 整形外科〔〒420-8660静岡市葵区漆山860〕  
 Department of Pediatric Orthopedics, Shizuoka Children's Hospital [860 Urushiyama, Aoi, Shizuoka, 420-8660, Japan]
- <sup>\*9</sup> 名古屋大学医学部附属病院 輸血部〔〒466-8550名古屋市昭和区鶴舞町65〕  
 Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital [65 Turumai, Showa, Nagoya, 466-8550, Japan]
- <sup>\*10</sup> 愛知県赤十字血液センター〔〒489-8555瀬戸市南山口町539-3〕  
 Japanese Red Cross Aichi Blood Center [539-3 Minamiyamaguchi, Seto, 489-8555, Japan]
- <sup>\*11</sup> 奈良県立医科大学 小児科〔〒634-8522橿原市四条町840〕  
 Department of Pediatrics, Nara Medical University [840 Shijo, Kashihara, 634-8522, Japan]
- <sup>\*12</sup> 兵庫医科大学〔〒663-8501西宮市武庫川町1-1〕  
 Hyogo College of Medicine [1-1 Mukogawa, Nishinomiya, 663-8501, Japan]
- <sup>\*13</sup> 独立行政法人国立病院機構福井病院 リハビリテーション科〔〒914-0195敦賀市桜ヶ丘町33-1〕  
 Department of Rehabilitation, Fukui National Hospital [33-1 Sakuragaoka, Turuga, 914-0195, Japan]
- <sup>\*14</sup> 広島大学病院 輸血部〔〒734-8551広島市南区霞1-2-3〕  
 Division of the Blood Transfusion Services, Hiroshima University Hospital [1-2-3 Kasumi, Minami, Hiroshima, 734-8551, Japan]
- <sup>\*15</sup> 広島大学病院 小児科〔〒734-8551広島市南区霞1-2-3〕  
 Department of Pediatrics, Hiroshima University Hospital [1-2-3 Kasumi, Minami, Hiroshima, 734-8551, Japan]
- <sup>\*16</sup> 香川県赤十字血液センター〔〒761-8031高松市郷東町新開587-1〕  
 Kagawa Red Cross Blood Center [587-1 Goutou, Takamatsu, 761-8031, Japan]
- <sup>\*17</sup> 産業医科大学病院 北部九州血友病センター〔〒807-8555北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1〕  
 North Kyushu Hemophilia Center, University Hospital of Occupational and Environmental Health, Japan [1-1 Iseigaoka, Yahatanishi, Kitakyushu, 807-8555, Japan]

受付日：2006年1月25日 受理日：2006年4月18日



## 緒 言

先天性血友病は血液凝固第 VIII 因子または第 IX 因子の欠乏あるいは質的異常により内因系血液凝固機序が障害される遺伝性出血性疾患である。止血管理には第 VIII 因子製剤または第 IX 因子製剤による補充療法を行うが、しばしば当該凝固因子に対する同種抗体（インヒビター）を産生する<sup>1)</sup>。インヒビターの発現後はそれまでの補充療法の効果が失われるため、出血時には特殊な止血療法が必要となる。止血療法としては、大量の第 VIII 因子製剤または第 IX 因子製剤を投与して血漿中のインヒビターを中和し、第 VIII 因子活性または第 IX 因子活性を上昇させる方法、あるいは活性型プロトロンビン複合体製剤または活性型第 VII 因子製剤により、内因系凝固カスケードをバイパスして止血をはかる方法がある。

一方、凝固系に異常がない場合にも稀に各種の血液凝固因子に対する自己抗体の発現することがある。これらの自己抗体の中で最も高頻度に認められるのは、第 VIII 因子に対するインヒビターである<sup>2)</sup>。これらの症例は、先天性血友病 A 患者と類似の臨床所見を示し、後天性血友病 A とも称される。後天性血友病 A の死亡率は 15<sup>2)</sup> ~ 22%<sup>3)</sup> と生命予後が悪い。また、先天性血友病では関節内出血が主な出血症状であるのに対し、後天性血友病では広範な皮下出血、筋肉内出血が多いことが特徴である。

遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子製剤（rFVIIa：注射用ノボセブン<sup>®</sup>、ノボノルディスクファーマ(株)）は、第 VIII 因子または第 IX 因子に対するインヒビターを保有する血友病 A または B 患者の出血抑制を適応として日本では 2000 年 3 月に承認された。この適応症の中に後天性血友病が含まれるか否かが明確でなかったことから<sup>4)</sup>、日本血栓止血学会は記載整備の要望書を厚生労働省に提出した。その結果、2004 年 11 月には後天性血友病も適応症として明確に記載された。

rFVIIa は血管壁の損傷部位において組織因子と複合体を形成し、第 X 因子を活性化する。この活性型第 X 因子は引き続き、血管壁損傷部位に集積した活性化血小板膜上で活性型第 V 因子およびプロトロンビンとプロトロンビナーゼ複合体を形成し、トロンビンが生成される。また、rFVIIa は活性化血小板の表面上で組織因子非依存的に第 X 因子を直接活性化する機序も知られている<sup>5)</sup>。これらの作用で生成されたトロンビンにより局所的にフィブリン形成が進み、血管壁の損傷部位に特異性の高い止血効果をもたらされると考えられている。

rFVIIa は承認時に 10 年間の再審査期間が指定され、現在、使用成績調査（以下、本調査）が実施されている。本稿では、2000 年 3 月から 2004 年 6 月末までに収集したデータを基に rFVIIa の有効性、安全性および使用状況を中間解析した結果を報告する。

## 対象および方法

### 1. 対象と評価項目

ノボノルディスクファーマ(株)と本調査の契約を締結した施設において、rFVIIa（注射用ノボセブン<sup>®</sup> 1.2mg および 4.8mg、ノボノルディスクファーマ(株)）を投与された症例のうち、2000 年 3 月から 2004 年 6 月末までに調査票が収集された症例を有効性評価の対象とした。また、安全性の検討では、本調査に加えて医療関係者から自発的に報告された副作用情報も評価対象とした。

出血エピソードごとに、出血日時、出血部位、投与日時、投与量、初回投与がなされた場所、投与時の症状および止血効果を記録した。日常診療の中で測定された一般臨床検査および凝固系の臨床検査項目として、APTT、PT、TAT、D-ダイマー、FDP およびフィブリノゲンのデータを検討した。また、臨床検査値異常を含む有害事象、発現日、重篤度、治療、因果関係および転帰を検討した。

## 2. rFVIIaの有効性の評価

調査担当医師が, 各出血エピソードにおける止血効果を, 止血効果評価基準に従って「著効」, 「有効」, 「やや有効」および「無効」の4段階で評価した。この基準は, 日本におけるrFVIIaの承認の根拠となった臨床試験(著者ら<sup>6)</sup>)で使用された評価基準を採用した。

「著効」と「有効」に分類された両出血エピソード数が解析に含めた全出血エピソード数に占める割合(%)を有効率とした。なお, 「著効」および「有効」と判断されたものは, rFVIIa投与からそれぞれ8時間以内および8~12時間に止血効果が認められた出血エピソードである。全体的な有効率のほか, 全出血エピソードをrFVIIaの止血効果の判定に影響を与えると考えられる薬剤が併用された「rFVIIaと他剤併用治療群」と「rFVIIa単独治療群」に分け, それぞれの群についての有効率も算出した。rFVIIaの止血効果の判定に影響を与えると考えられる薬剤として, 他の血液凝固因子製剤, 非ステロイド系消炎鎮痛剤, ステロイド剤およびトランネキサム酸を含めた。

rFVIIa投与に関する各種パラメータ(出血部位, 重症度, 初回投与がなされた場所, 初回投与量, 出血から初回投与までの時間, 平均投与間隔, 投与回数)についての連続変数をカテゴリ化し, 有効率を算出した。著者ら<sup>6)</sup>, Parameswaranら<sup>7)</sup>およびKeyら<sup>8)</sup>の報告で本剤の止血効果に対して, 初回投与量, 出血から初回投与までの時間および平均投与間隔が重要と述べられていることから, 「初回投与量が90 $\mu$ g/kg以上」, 「出血から初回投与までの時間が3時間以内」かつ「平均投与間隔が3時間以内」の3つの要件を全て満たす治療群(以下, 推奨治療条件群)とそれ以外の治療群(以下, 非推奨治療条件群)に分け, 2群間で有効率を比較した。なお, 本解析対象は, 上記の全パラメータが得られた「rFVIIa単独治療群」および「rFVIIaと他剤併用治療群」の関節内, 筋肉内および皮下出血とした。なお, 本解析においては止血効果に最も

大きな影響を与えると考えられる血液凝固因子製剤は他剤併用治療薬から除外した。

## 3. 統計解析

各パラメータごとにカテゴリ間の有効率の差を $\chi^2$ 検定で比較した。「推奨治療条件群」と「非推奨治療条件群」の有効率に及ぼす影響についてロジスティック回帰分析を行った。また, 有効性に影響を及ぼすと考えられる因子(初回投与量, 出血から初回投与までの時間, 平均投与間隔)についてもロジスティック回帰分析を行い検討した。有意水準は両側 $p=0.05$ とした。

## 結 果

### 1. 解析対象症例数および出血エピソード数

rFVIIaを投与された102例の1,580出血エピソードを解析対象とした。解析対象症例の内訳はインヒビターを保有する先天性血友病75例(血友病A 59例, 血友病B 16例), インヒビターを保有しない先天性血友病3例(血友病A 2例, 血友病B 1例), 先天性第VII因子欠乏症1例, 後天性血友病A 23例であった。

安全性は102例全例を対象として解析したが有効性については, i) 適応外使用, ii) 出血部位, 投与日時, 投与時の症状および効果判定が不明なもの, iii) 定期補充療法, 予備的補充療法, 静脈内持続投与および試験投与(非出血時における薬物動態検査のための投与)を除いた, 88例1,105出血エピソードを対象として解析した。内訳は, インヒビター保有の先天性血友病が71例1,060出血エピソード, 後天性血友病Aが17例45出血エピソードであった。

全出血エピソードのうち半数弱の528出血エピソード(47.8%)が「rFVIIa単独治療群」で残りの577出血エピソード(52.2%)が「rFVIIaと他剤併用治療群」であった。

1,105出血エピソードのうち216出血エピソード(19.5%), また「rFVIIa単独治療群」528出血エピソードのうち104出血エピソード(19.7%)は本剤投与前の出血症状(スコア)が

重症であった。

## 2. 有効性

有効性解析に含めた全出血エピソードにおける rFVIIa の有効性評価では著効 64.9%, 有効 4.7%, やや有効 19.2%, 無効 11.2% で, その有効率は 69.6% であった。このうち「rFVIIa 単独治療群」に限ると著効 60.2%, 有効 5.5% で有効率は 65.7% であった。一方, 「rFVIIa と他剤併用治療群」では著効 69.2%, 有効 4.0% で有効率は 73.1% であった (Table 1)。「rFVIIa 単独治療群」と「rFVIIa と他剤併用治療群」を併せて, 疾患別に有効率を求めた結果では血友病 A が 71.4% (623/872 出血エピソード), 血友病 B が 64.9% (122/188 出血エピソード), 後天性血友病 A が 53.3% (24/45 出血エピソード) で後天性血友病 A で有効率が低かった。

「rFVIIa 単独治療群」528 出血エピソードにおけるカテゴリー別解析結果は, Table 2a に示したごとく出血部位, 初回投与がなされた場所 (自宅あるいは病院), 初回投与量, 平均投与間隔および投与回数に有意差が認められた。すなわち, 初回投与がなされた場所に関しては, 病院治療に比べ在宅治療群で有意に有効率が高く, 投与回数については 3 回以内では 70% 以上の高い有効率を示したが, それより多い回数では有効率が低かった。また, 平均投与間隔については 3 時間以内で 71.4% の有効率を示したのに対し, 3 時間を越えた場合の有効率は 39.4% であった。

出血から治療開始までの時間は, 先天性血友病では在宅治療群で平均 2.9 時間 (SD; 3.9 時間, 範囲; 0 ~ 44.5 時間, 中央値; 2.0 時間), 病院治療群で平均 12.3 時間 (SD; 33.6 時間, 範囲; 0 ~ 367.8 時間, 中央値; 3.0 時間), 一方, 後天性血友病 A の初回出血エピソードで平均 5 日 (SD; 8 日, 範囲; 2.5 時間 ~ 36 日, 中央値; 2 日) であり, 後天性血友病 A 患者の初回出血エピソードにおいて著しく長かった。

「rFVIIa と他剤併用治療群」の 577 出血エピソードについて, カテゴリー別に解析した結果

(Table 2b) は, 「rFVIIa 単独治療群」の 528 出血エピソード (Table 2a) とほぼ同様の成績であった。

「推奨治療条件群 (112 出血エピソード)」および「非推奨治療条件群 (170 出血エピソード)」の有効率の比較では, 併用治療の有無に関わらず前者の有効率が有意に高かった (オッズ比; 2.42,  $p=0.0020$  およびオッズ比; 5.83,  $p < 0.0001$ ) (Table 3a および 3b)。これらの群で, 3 つの要件のうち平均投与間隔が有効率の差に最も大きく寄与しており次いで初回投与量の順で, いずれも統計学的に有意であった。しかし, 出血から初回投与までの時間を 3 時間で区切った場合の寄与は統計学的に有意ではなかった (Table 4)。

1,105 出血エピソードのうち, 消化管出血 17 エピソード, 頭蓋内出血 7 エピソードで rFVIIa が使用された。有効率は消化管出血で 41.2% (7/17 出血エピソード), 頭蓋内出血で 85.7% (6/7 出血エピソード) であった。投与回数は, 消化管出血で 1 ~ 117 回, 頭蓋内出血で 5 ~ 122 回であった。投与間隔をみると, 投与早期は 2 ~ 3 時間ごとで, その後徐々に 4 ~ 12 時間に延長された。

## 3. 安全性

102 例中 20 例で報告された副作用 42 件中 30 件 (71%) は臨床検査値異常であった (Table 5)。臨床検査値異常を除く 12 件のうち, 中心静脈カテーテル閉塞, 視野異常, 脳梗塞の疑いおよび間質性肺炎の 3 例 4 件が重篤な副作用であった。これらの重篤な副作用はいずれも軽快または回復した (Table 6)。また, rFVIIa 投与との明らかな関連性は認められなかった。

本剤の重篤な副作用の発現症例率は, インヒビターを保有する先天性および後天性血友病で, それぞれ 2.7% (2 例/75 例), 4.3% (1 例/23 例) で統計学的な有意差は認められなかった。本剤の総出血エピソードに占める重篤な副作用発現率は, 先天性および後天性血友病で, それぞれ 0.2% (3 件/1,383 出血エピソード),

**Table 1** Comparison of efficacy rate between “rFVIIa group” and “rFVIIa + concomitant medications group”

	Excellent	Good	Partial	Poor	Total	Efficacy rate,% (effective*/total episodes)
rFVIIa	318 (60.2%)	29 (5.5%)	95 (18.0%)	86 (16.3%)	528 (100.0%)	65.7% (347/528)
rFVIIa + concomitant medications †	399 (69.2%)	23 (4.0%)	117 (20.3%)	38 (6.6%)	577 (100.0%)	73.1% (422/577)
Total	717 (64.9%)	52 (4.7%)	212 (19.2%)	124 (11.2%)	1,105 (100.0%)	69.6% (769/1,105)

\* effective: ‘Excellent’ and ‘Good’

† concomitant medications: coagulation factor products, non-steroidal anti-inflammatory drugs, steroids, and/or tranexamic acid

**Table 2a** Efficacy rate according to investigated variables (rFVIIa group)

	No. of effective† /total episodes	Efficacy rate (%)	<i>p</i> -value $\chi^2$ test
<b>Type of bleeding</b>			
Haemarthrosis	242 / 366	66.1	<i>p</i> = 0.013*
Intramuscular bleeding	41 / 62	66.1	
Subcutaneous bleeding	27 / 41	65.9	
Intraoral bleeding	11 / 15	73.3	
Open bleeding	10 / 12	83.3	
Haematuria	2 / 12	16.7	
Epistaxis	8 / 9	88.9	
Gastrointestinal bleeding	4 / 8	50.0	
Intracranial bleeding	2 / 2	100.0	
Haemophilic pseudotumor	0 / 1	0.0	
<b>Severity of bleeding symptom</b>			
Mild	107 / 165	64.8	<i>p</i> = 0.159
Moderate	179 / 259	69.1	
Severe	61 / 104	58.7	
<b>Treatment status at initial dosing</b>			
At home	188 / 264	71.2	<i>p</i> = 0.010*
At hospital	159 / 264	60.2	
<b>Initial dose, <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>			
<90	85 / 145	58.6	<i>p</i> = 0.042 *
90 ≤	261 / 381	68.5	
Unknown	1 / 2	50.0	
<b>Time from the onset of haemorrhage to initial dosing, hours</b>			
≥3	187 / 259	72.2	<i>p</i> = 0.500
3 <	100 / 146	68.5	
Unknown	60 / 123	48.8	
<b>Mean dosing interval, hours ‡</b>			
≥3	232 / 325	71.4	<i>p</i> < 0.001**
3 <	41 / 104	39.4	
Unknown	0 / 6	0.0	
<b>No. of doses</b>			
1	74 / 93	79.6	<i>p</i> < 0.001**
2	122 / 155	78.7	
3	86 / 116	74.1	
4-6	48 / 94	51.1	
7-	17 / 69	24.6	
Unknown	0 / 1	0.0	
<b>Total</b>	<b>347 / 528</b>	<b>65.7</b>	

† effective: ‘Excellent’ and ‘Good’

‡ Mean dosing interval, hours: The episodes of the single dose are excluded.