

Figure 3: Donor species-specific FIX mRNA expressions in uPA/SCID mouse livers transplanted with either canine or human hepatocytes. A) Canine factor IX (FIX) RNA copy numbers relative to canine GAPDH (reflecting RNA copy numbers per canine hepatocyte), based on plasma cFIX:Ag levels. (Low, <40%; Medium, 41–80%; High, >81% of normal canine plasma. n=4, 4, and 5, respectively). N.C.; negative control: non-transplanted uPA/SCID mouse livers (n=4). P.C.; positive control: normal beagle dog livers (n=3). B) Human

FIX RNA copy numbers relative to human GAPDH (reflecting RNA copy numbers per human hepatocyte), based on the repopulation rate (R.R.) estimated from human albumin concentrations as described in *Materials and methods*. (Low, <40%; Medium, 41–65%; High, >66%. n=4, 4, and 4 respectively). N.C., negative control: non-transplanted uPA/SCID mouse livers (n=4); P.C., positive control: normal human liver tissues (n=3).

We also measured canine albumin levels in the plasma of several uPA/SCID mice that received hepatocytes from the seven-year-old beagle, and demonstrated a highly significant correlation between the canine albumin and canine FIX:Ag levels ($R^2=0.9963$) (Fig. 1D). Assuming that the plasma concentrations of albumin and FIX:Ag in normal dogs are 5 g/dl and 5,000 ng/ml, respectively, the weight ratio of albumin to FIX:Ag in normal canine plasma was calculated to be 10,000:1. These data suggested that the synthesis of canine FIX and albumin in the transplanted animals was similar to that of normal canine liver (i.e. 15% FIX:Ag of normal canine plasma corresponds to 750 ng/ml, and the ratio of 0.6 g/dl to 750 ng/ml approximates to 10,000:1). Immunohistochemical staining for canine albumin in sections obtained at day 55 after transplantation demonstrated a large area of the liver was positive in the recipients with high plasma canine FIX:Ag (33.2%) (Fig. 2B-C), whereas only a small area of liver was positive in mice with low plasma FIX:Ag levels (2.0%) (Fig. 2A). Histological examination of serial liver sections revealed that the canine albumin-positive area was composed of morphologically normal hepatocytes (Fig. 2D-E) indicating that the normal canine hepatocytes had progressively propagated in the uPA/SCID livers.

The uPA/SCID mice that received canine hepatocytes were divided into three groups according to their plasma canine FIX:Ag levels (low <40%, medium 41–80%, and high >81%). mRNA levels of canine FIX were normalized using canine GAPDH mRNA measurements (FIX / GAPDH). As shown in Figure 3A, canine FIX / canine GAPDH expression was similar in the three groups with no statistically significant difference. This suggests that canine hepatocytes proliferated within the uPA/SCID livers without reducing the steady-state levels of canine FIX gene expression and/or degradation. We confirmed that RNA samples from untreated uPA/SCID livers were not amplified by the primer set used for canine FIX and GAPDH detection (Fig. 3A).

Proliferation of FIX-producing human hepatocytes in uPA/SCID mouse livers

Human hepatocytes were transplanted into the liver of uPA/SCID mice (n=12). The proliferation and propagation status of the transplanted hepatocytes were assessed by periodic measurement of human albumin levels in the recipient blood, and the repopulation rate of human hepatocytes in the uPA/SCID livers was assessed as described previously (35, 38). Human FIX:Ag was detected in the plasma of 75% of the mice (9 out of 12) between 67 and 84 days after transplantation, and the circulating plasma levels ranged between 6–58% found in normal humans. The results from our study demonstrated that the FIX:Ag levels were highly correlated with the human albumin levels ($R^2=0.8714$) (Fig. 4A). To examine the biological function of the secreted human FIX, we compared the repopulation rate with FIX:C assays (Fig. 4B). Although both murine and human FIX:C could be measured using the clotting assay, we were able to estimate the approximate levels of the *de novo* expressed human FIX:C present in our samples. Plasma levels of FIX:C in untreated uPA/SCID mice were less than 50% of the levels normally found in human plasma, and we expected to increase the FIX:C levels up to 100% following the humanization of the murine livers. Similar to the canine transplants, the results showed that mice with a high repopulation rate had higher FIX:C than those with low repopulation rates ($R^2=0.7245$). These data suggested that secreted human FIX protein was biologically active. To clarify the proliferation status of transplanted human hepatocytes in uPA/SCID mouse liver, we also transplanted human hepatocytes isolated from another human subject (a 2-year-old Caucasian male) into a new set of uPA/SCID mice (n=9). Using these mice, we measured plasma human FIX:Ag levels, total plasma FIX:C levels, and human plasma albumin concentrations from samples obtained periodically from the recipient mice during an eight-week period after transplantation. As shown in Fig-

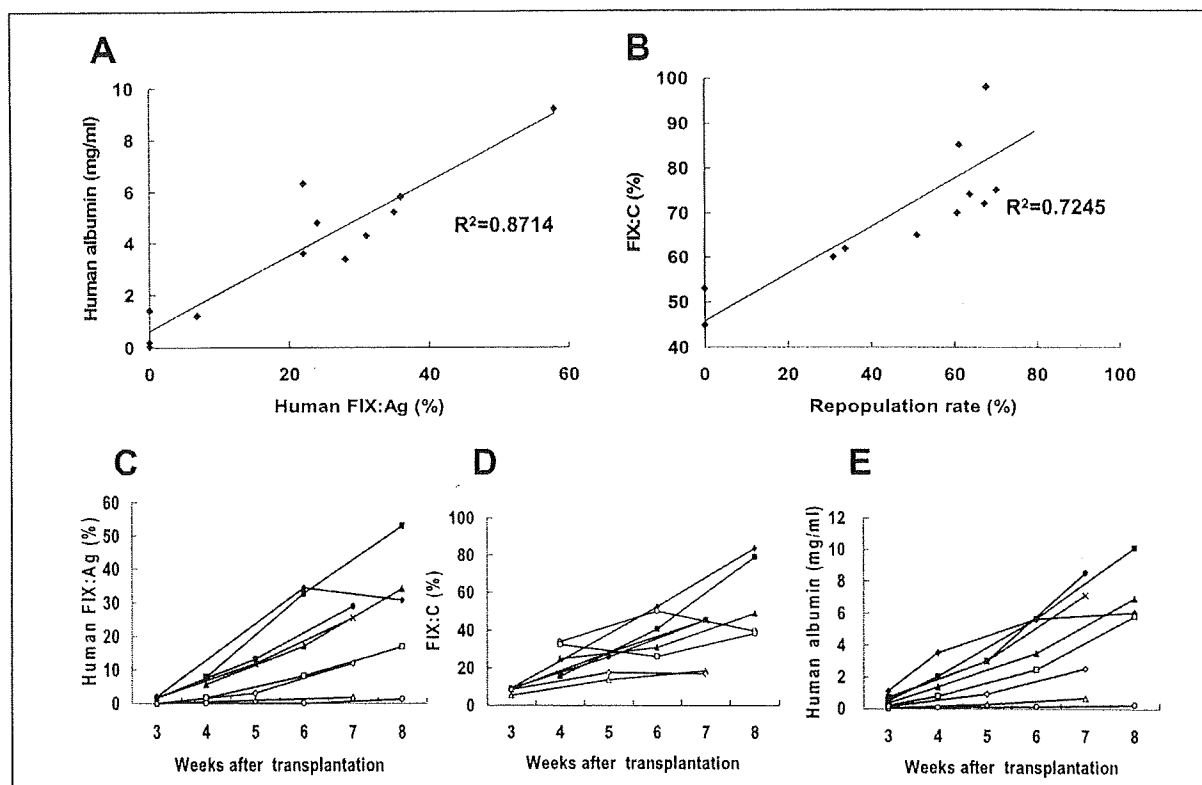


Figure 4: Proliferation of transplanted human hepatocytes in uPA/SCID mouse livers assessed by recipient blood analyses. A) Relationship between blood human albumin and plasma human factor IX (FIX) antigen (hFIX:Ag) concentrations of uPA/SCID mice transplanted with human hepatocytes (n=12). B) Relationship between total plasma FIX coagulation activity (FIX:C; reflecting both murine and human FIX activities) (% of normal human plasma) in uPA/SCID mice transplanted with human hepatocytes based on the repopulation rate

estimated from human albumin concentrations as described in *Materials and methods*. The recipient blood samples used for these assays were obtained 67–84 days after transplantation. C–E) Time course of plasma hFIX:Ag levels (C), total plasma FIX:C levels (D), and blood human albumin levels (E) of the recipient mice after human hepatocyte transplantation (n=9) (different set of experimental data from that shown in A and B).

ure 4C–E, each of our measured parameters were found to be increased after transplantation in most of the mice, which was indicative of a robust proliferative status of the transplanted human hepatocytes.

Liver sections obtained from mice with high plasma human FIX:Ag levels were found to have strong positive staining in the hepatocytes for human FIX as determined by immunohistochemistry (Fig. 5B). In marked contrast, only a small portion of the liver stained positive in sections of recipient mice that were detected to have low (i.e. <1%) circulating levels of plasma FIX:Ag level (Fig. 5A). These results were consistent with the findings that the *de novo* production of haemostatically active human FIX in the circulation was dependent on the viability and persistence of the transplanted hepatocytes in the recipient uPA/SCID livers.

The uPA/SCID mice that received human hepatocytes were divided into three groups according to the repopulation rate (low <40%, medium 41–65%, and high >66%). Human FIX mRNA levels were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehy-

drogenase (GAPDH) mRNA measurements (FIX:GAPDH). As shown in Figure 3B, the ratio of human FIX:GAPDH mRNA expression in the recipient livers was not significantly different among the three groups. We further confirmed that extracted total RNA from untreated uPA/SCID livers were not amplified by the primer set used for human FIX and human GAPDH detection (Fig. 3B), demonstrating the specificity of the primers to human and not murine FIX expression. Similar findings were determined in the canine hepatocyte transplantation experiments in which we confirmed that human hepatocytes proliferated in uPA/SCID mouse livers and retained their ability for transcribing the human FIX gene.

It has been reported that differentiated liver function (e.g. mRNA expression of albumin) may be suppressed when hepatocytes are subjected to various proliferative stimuli (40, 41). It is not known, however, if hepatocyte proliferation could directly influence FIX mRNA expression. To address this question, we compared FIX mRNA expression in quiescent and proliferating mouse livers. Liver proliferation was induced by performing a

70% hepatectomy in C57/BL6 wild-type mice, and the remnant liver lobes were subsequently harvested two days after the hepatectomy, which is the time point where hepatocyte proliferation is at its peak. The quiescent (non-proliferative) liver samples used in these experiments were the resected liver lobes obtained from the same mice in which the partial hepatectomy was performed. The relative FIX mRNA expression (FIX:GAPDH) was ~35% lower in the proliferating liver compared to the quiescent liver ($p=0.029$; Fig. 6). These results would suggest that the proliferative status of the transplanted hepatocytes may affect the production of FIX, and the reason for the lower FIX mRNA expression found in the recipient mice compared to the control livers as shown in Figure 3 may be due to active proliferation by the transplanted hepatocytes. If the FIX mRNA expression levels found in the normal canine and human livers were recalculated to account for a 35% reduction in response to proliferative stimuli, the significant differences between the four groups shown in Figure 3 became non-significant (data not shown). This suggests that proliferating hepatocytes in uPA/SCID mice have the capability of expressing normal levels of canine and human FIX following transplantation.

Discussion

We have established an *in vivo* system to propagate human and canine hepatocytes in uPA/SCID mouse livers, and these transplanted hepatocytes are capable of retaining their cellular machinery to produce coagulation FIX. The capabilities of these propagating transplanted hepatocytes to synthesize FIX were confirmed by the expression of FIX mRNA, FIX-protein production and secretion, and its coagulation activity. The main reason we decided to study canine hepatocyte in addition to human hepatocytes for transplantation, is the availability of a pre-clinical large animal model for haemophilia B studies (42), which will be able to be used for proof-of-concept experiments.

Hepatocytes are the only cells that are known to synthesize FIX (18), and successful liver transplantation has resulted in restoration of normal coagulative properties in patients with haemophilia B (17). Although there are obvious benefits in surgically transplanting whole livers in haemophilic patients with critical life-threatening liver diseases such as chronic active hepatitis, this approach is likely not appropriate for most patients due to other obvious negative risks associated with this type of procedure. For this reason, the hepatocyte transplantation approach described in the current study, which is less invasive and requires fewer donor livers, may provide a viable alternative strategy to organ transplantation. Recent trials have highlighted successful application of hepatocyte transplantation in two patients with coagulation factor VII deficiency (31, 43). Following hepatocyte transplantation, both patients were found to have achieved significant and prolonged therapeutic benefit with a marked decrease in the infusion of exogenous recombinant factor VIIa due to episodic bleeding (44, 45).

We demonstrated that canine and human hepatocytes progressively proliferated and propagated in the recipient livers of uPA/SCID mice. Real-time PCR analysis at various stages of hepatocyte propagation showed that FIX mRNA expression per transplanted cell (per donor-specific GAPDH mRNA level) was

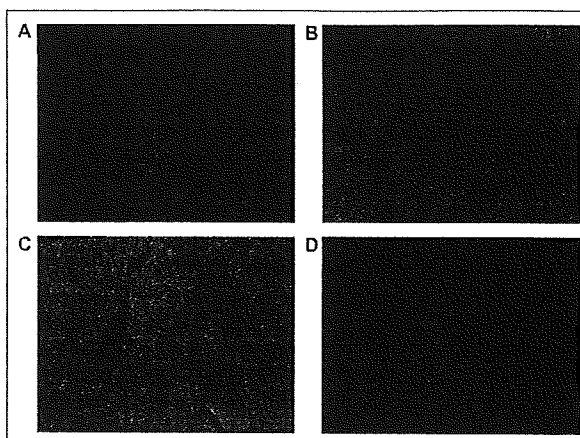


Figure 5: Mouse liver chimerism with proliferated human hepatocytes. Immunofluorescent staining of human FIX in liver sections of uPA/SCID mice after human hepatocyte transplantation. Liver sections of mice with <1% plasma hFIX:Ag level (A) and mice with 34% hFIX:Ag plasma level (B). Red-stained area indicates proliferated human hepatocytes producing hFIX. Positive control (normal human liver tissue) (C) and negative control (non-transplanted uPA/SCID mouse liver) (D) indicate the staining specificity for human FIX. Original magnification, $\times 100$.

stably maintained for the duration of the experiment. Plasma FIX:Ag levels were highly correlated with the propagation status of the transplanted hepatocytes as determined by the blood levels of canine and human albumin. Furthermore, the procoagulant function of the secreted canine and human FIX was confirmed by clotting assays. FIX:C increased from baseline levels (less than 50% of normal human plasma) to normal human or canine FIX:C levels (about 100% and 200%, respectively) as repopu-

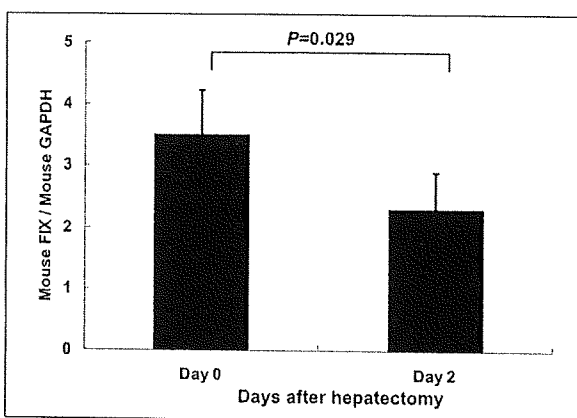


Figure 6: Comparison of factor IX (FIX) mRNA expression levels in quiescent and proliferating livers. Day 0 liver samples (quiescent status) were obtained from C57/BL6 mice at the time of 70% partial hepatectomy ($n=6$). The remnant liver lobes of the mice were harvested at day 2 were used for the assessment for proliferating status ($n=6$). Relative FIX mRNA expression was expressed as murine FIX / murine GAPDH.

lation by transplanted hepatocytes progressed. The data from our experiments indicated that post-transcriptional modification of FIX, including cleavage and removal of the pre-pro leader sequence of 46 amino-acids, γ -carboxylation of the first 12 glutamic acid residues, and partial β -hydroxylation of Asp 64 (46), must have occurred within the transplanted hepatocytes to maintain biologically active haemostatic function.

Hepatocytes from a one-year-old dog demonstrated high proliferation activity compared with cells from an older (7-year-old) dog as evidenced by the more rapid increase and its higher sustained levels of plasma canine FIX:Ag. These results are consistent with earlier findings by our group in which we reported that human hepatocytes from a younger donor occupied a larger proportion in the recipient uPA/SCID mouse liver compared with transplanted hepatocytes from an older donor (47). One possible reason for the enhanced growth potential of hepatocytes in these circumstances may be due to an elevated expression of cell cycle proteins in hepatocytes from younger compared to older donors (48). With the present study as well as previous work in the literature, we believe that the age of the donor makes a difference on the proliferation and repopulation of the transplanted hepatocytes in uPA/SCID mouse livers.

Human hepatocytes propagated in uPA/SCID mice could be isolated and purified using cell-sorting technology (38). Recently, our group has developed a procedure to isolate human hepatocytes that were propagated in uPA/SCID mouse livers, and these isolated hepatocytes were confirmed to be biologically functional compared to original primary hepatocytes, demonstrating the expression of cytochrome P450 (CYP) (38). We have also been experimentally successful in engineering functional liver tissue using isolated hepatocytes transplanted under the kidney capsule or in the subcutaneous space by demonstrating coagulation factor VIII expression (25–30). More recently, Azuma et al. (49) reported an alternate method to propagate human hepatocytes in living mice that furthers the utility of hepatocyte transplantation. Based on these developments, propagated human hepatocytes with FIX expressions should become a valuable cell source in establishing novel cell-based therapies for direct transplantation or development of tissue engineering strategies in the treatment of haemophilia B.

For the eventual translation of cell-based therapies using the propagated human hepatocytes for haemophilia B to be successful in the clinics, several potential obstacles will need to be considered and overcome. First, contamination of murine cells during the isolation of the transplanted human hepatocytes must be

minimized. Second, increasing the engraftment rate of the transplanted hepatocytes into the recipient liver. Lastly, the survival and viability of the transplanted allergenic hepatocytes must be prolonged. With regards to the first issue, the contaminating murine hepatocytes during the isolation of human cells from the mouse liver could be overcome by utilizing recipient transgenic mice that have been incorporated with a inducible suicide gene. In the presence of the inducing agent, the murine cells would be preferentially eliminated and increase the purity of the human hepatocyte mixture leading to enhanced clinical safety. To overcome the low engraftment rate found in the current and previous studies, the recipient livers will require some type of preconditioning regimen to maximize the efficiency and engraftment. Slehria et al. (50) reported an effective and non-invasive pre-treatment protocol in which the administration of phentolamine, an adrenergic receptor blocker, resulted in the dilation of the hepatic sinusoidal vasculature leading to enhanced hepatocyte engraftment rate. For the last issue regarding the limited graft survivability of the donor cells due to the activation of the host immune system, it will be important to design an immunosuppressive regimen specific for hepatocyte transplantation and monitoring systems for the early rejection need be established. These issues will need to be studied and overcome to substantiate the utility of this approach for the treatment of haemophilia and other congenital liver disorders.

In all, the present study has demonstrated the utility of hepatocyte transplantation for the therapeutic production of coagulation factor IX. As we continue to overcome the obstacles associated with this approach, this transplantation methodology will evolve into a novel approach to treat not only liver diseases associated with haemophilia but other forms of congenital liver diseases.

Acknowledgements

The authors thank Takeo Nomi and Eiji Okano (Department of Surgery, Nara Medical University) and Yuichi Komai (Department of Paediatrics, Nara Medical University) for their technical assistance with isolating canine hepatocytes, Jun-ichi Ori (Ori Animal Hospital, Osaka, Japan) for providing pooled normal canine plasma, Yoshihiko Sakurai and Keiji Nogami (Department of Paediatrics, Nara Medical University) for statistical advice. John C. Giddings (Department of Haematology, University of Wales College of Medicine) and Frank Park (Medical College of Wisconsin) for their critical reading of the manuscript, and Hiromi Kohno and Chihiro Yamazaki (Yoshizato Project, CLUSTER, Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology) for breeding and managing the uPA/SCID mice.

References

- Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; 361: 1801–1809.
- Hsu TC, Nakaya SM, Thompson AR. Severe haemophilia B due to a 6 kb factor IX gene deletion including exon 4: non-homologous recombination associated with a shortened transcript from whole blood. *Thromb Haemost* 2007; 97: 176–180.
- Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EG. Prospects for gene therapy of haemophilia. *Haemophilia* 2004; 10: 309–318.
- Ehrhardt A, Kay MA. A new adenoviral helper-dependent vector results in long-term therapeutic levels of human coagulation factor IX at low doses in vivo. *Blood* 2002; 99: 3923–3930.
- Herzog RW, Yang EY, Couto LB, et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999; 5: 56–63.
- Kay MA, Rothenberg S, Louden CN, et al. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 1993; 262: 117–119.
- Miao CH, Thompson AR, Loeb K, et al. Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo. *Mol Ther* 2001; 3: 947–957.
- Mount JD, Herzog RW, Tillson DM, et al. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 2002; 99: 2670–2676.
- Nathwani AC, Davidoff A, Hanawa H, et al. Factors influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood* 2001; 97: 1258–1265.

10. Park F, Ohashi K, Kay MA. Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* 2000; 96: 1173-1176.
11. Xu L, Gao C, Sands MS, et al. Neonatal or hepatocyte growth factor-potentiated adult gene therapy with a retroviral vector results in therapeutic levels of canine factor IX for hemophilia B. *Blood* 2003; 101: 3924-3932.
12. Yant SR, Meuse L, Chiu W, et al. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 2000; 25: 35-41.
13. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003; 101: 2963-2972.
14. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12: 342-347.
15. Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, et al. Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* 1987; 69: 1721-1724.
16. Ko S, Tanaka I, Kanehiro H, et al. Preclinical experiment of auxiliary partial orthotopic liver transplantation as a curative treatment for hemophilia. *Liver Transpl* 2005; 11: 579-584.
17. Merion RM, Delius RE, Campbell DA, Jr., et al. Orthotopic liver transplantation totally corrects factor IX deficiency in hemophilia B. *Surgery* 1988; 104: 929-931.
18. Boost KA, Auth MK, Woitaschek D, et al. Long-term production of major coagulation factors and inhibitors by primary human hepatocytes in vitro: perspectives for clinical application. *Liver Int* 2007; 27: 832-844.
19. Greenberg D, Miao CH, Ho WT, et al. Liver-specific expression of the human factor VII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12347-12351.
20. Hjortoe G, Sorensen BB, Petersen LC, et al. Factor VIIa binding and internalization in hepatocytes. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2264-2273.
21. Hollestelle MJ, Thimmes T, Craim K, et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo—a closer look. *Thromb Haemost* 2001; 86: 855-861.
22. Kelly DA, Summerfield JA, Tuddenham EG. Localization of factor VIIIc: antigen in guinea-pig tissues and isolated liver cell fractions. *Br J Haematol* 1984; 56: 535-543.
23. Rodriguez-Imigo E, Bartolome J, Quiroga JA, et al. Expression of factor VII in the liver of patients with liver disease: correlations with the disease severity and impairment in the hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 193-199.
24. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, et al. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 1985; 317: 726-729.
25. Ohashi K, Kay MA, Kuge H, et al. Heterotopically transplanted hepatocyte survival depends on extracellular matrix components. *Transplant Proc* 2005; 37: 4587-4588.
26. Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, et al. Stability and repeat regeneration potential of the engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplant* 2005; 14: 621-627.
27. Ohashi K, Marion PL, Nakai H, et al. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nat Med* 2000; 6: 327-331.
28. Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 132-140.
29. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 2007; 13: 880-885.
30. Yokoyama T, Ohashi K, Kuge H, et al. In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity. *Am J Transplant* 2006; 6: 50-59.
31. Dhawan A, Mistry RR, Hughes RD, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004; 78: 1812-1814.
32. Ostrowska A, Bode DC, Pruss J, et al. Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. *Cell Tissue Bank* 2000; 1: 55-68.
33. Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001; 79: 617-630.
34. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000; 287: 1258-1262.
35. Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004; 165: 901-912.
36. Hamatani K, Matsuda Y, Araki R, et al. Cloning and chromosomal mapping of the mouse DNA-dependent protein kinase gene. *Immunogenetics* 1996; 45: 1-5.
37. Emoto K, Tateno C, Hino H, et al. Efficient in vivo xenogeneic retroviral vector-mediated gene transduction into human hepatocytes. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1168-1174.
38. Yoshitsugu H, Nishimura M, Tateno C, et al. Evaluation of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA expression in hepatocytes from chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21: 465-474.
39. Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003; 16: 99-102.
40. Ito Y, Hayashi H, Taira M, et al. Depression of liver-specific gene expression in regenerating rat liver: a putative cause for liver dysfunction after hepatectomy. *J Surg Res* 1991; 51: 143-147.
41. Kurumiya Y, Nozawa K, Sakaguchi K, et al. Differential suppression of liver-specific genes in regenerating rat liver induced by extended hepatectomy. *J Hepatol* 2000; 32: 636-644.
42. Rawle FE, Lilliecrap D. Preclinical animal models for hemophilia gene therapy: predictive value and limitations. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 205-213.
43. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006; 82: 441-449.
44. Huth-Kuhne A, Rott H, Zimmermann R, et al. Recombinant factor VIIa for long-term replacement therapy in patients with congenital factor VII deficiency. *Thromb Haemost* 2007; 98: 912-915.
45. Rosenthal C, Volk T, Spies C, et al. Successful coronary artery bypass graft surgery in severe congenital factor VII deficiency: perioperative treatment with factor VII concentrate. *Thromb Haemost* 2007; 98: 900-902.
46. Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, et al. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* 2001; 97: 130-138.
47. Masumoto N, Tateno C, Tachibana A, et al. GH enhances proliferation of human hepatocytes grafted into immunodeficient mice with damaged liver. *J Endocrinol* 2007; 194: 529-537.
48. Walldorf J, Aurich H, Cai H, et al. Expanding hepatocytes in vitro before cell transplantation: donor age-dependent proliferative capacity of cultured human hepatocytes. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 584-593.
49. Azuma H, Paulk N, Ramade A, et al. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/IL2rg^{-/-}* mice. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 903-910.
50. Slechia S, Rajvanshi P, Ito Y, et al. Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver. *Hepatology* 2002; 35: 1320-1328.



この論文は逆綴じになっています。

第3は50 IU/kgを3〜3.5回/週投与する低用量プロトコルである³⁴⁾。

それぞれの成功率は、成功の定義に若干差があるものの73%、80%および83%である。BonnおよびMalmoプロトコルの実施は困難であるが、低用量プロトコルは我が国でも実施されている。

IT1の成功要因については様々な検討がなされているが、現時点で統計学的に明らかにされているのは、IT1開始時のインビクター力価、今までの最高インビクター力価および開始後のインビクター力価である³⁵⁾。

その他、IT1成功要因として重要視されているのは、製剤の投与量と製剤の種類(血漿由来製剤 vs 遺伝子組み換え型製剤、FⅧ vs FⅧ/VWF製剤)である。現在、製剤の投与量をめぐって国際的な多施設無作為比較対照試験が実施されている。血友病Bインビクターの有効率は一般に低い。またアナフィラキシーを含むアレルギー症状を有する症例も稀でなく今後さらに有効なIT1のプロトコルが必要である。

参考文献

1) 血液凝固異常症全国調査運営委員会(委員長：瀧 正志)編：血液凝固異常症全国調査平成19年度報告書、工業医学防衛団、東京、2008. 2) 嶋 緑倫, 他：三輪血液病学会(浅野茂隆, 他監), 文光堂, 東京, 2006. p1686. 3) Schwartz RS, et al: N Engl J Med 323: 1800, 1990. 4) Bray GL, et al: Blood 83: 2428, 1994. 5) White GC 2nd, et al: Thromb Haemost 77: 660, 1997. 6) Abshire TC, et al: Thromb Haemost 83: 811, 2000. 7) White GC 2nd, et al: N Engl J Med 320: 166, 1989. 8) Roth DA, et al: Blood 98: 3600, 2001. 9) Shapiro AD, et al: Blood 105: 518, 2005. 10) 松下 正, 他: 白血栓止血学会誌 19: 510, 2008. 11) 田中一郎, 他: 白血栓止血学会誌 19: 520, 2008. 12) Löfquist T, et al: J Intern Med 241: 395, 1997. 13) Manco-Johnson MJ, et al: N Engl J Med 357: 535, 2007. 14) White GC 2nd, et al: Thromb Haemost 85: 560, 2001. 15) Inoue T, et al: Haemophilia 12: 110, 2006. 16) Turecek PL, et al: Haemophilia 10 (Suppl 2): 3, 2004. 17) Negrier C, et al: Thromb Haemost 77: 1113, 1997. 18) Dimichele D, et al: Haemophilia 12: 352, 2006. 19) Ehrlich HJ, et al: Haemophilia 8: 83, 2002. 20) Hoffman M, et al: Thromb Haemost 85: 958, 2001. 21) Santagostino E, et al: Br J Haematol 104: 22, 1999. 22) Lusher JM: Blood Coagulation Fibrinolysis 11 (Suppl 1): S45, 2000. 23) 白藤 聡, 他: 白血栓止血会誌 19: 244, 2008. 24) Lusher JM: Haemostasis 26 (Suppl 1): 124, 1996. 25) Takedani H, et al: Haemophilia 10: 179, 2004. 26) Abshire T, et al: J Thrombo Haemost 2: 899, 2004. 27) Parameswaran R, et al: Haemophilia 11: 100, 2005. 28) Kenet G, et al: J Thromb Haemost 1: 450, 2003. 29) 白藤 聡, 他: 白血栓止血会誌 19: 244, 2008. 30) Leissinger CA, et al: Haemophilia 13: 249, 2007. 31) Di Paola J, et al: Haemophilia 13: 124, 2007. 32) Brackmann HH, et al: Lancet ii: 933, 1977. 33) Freiburghaus C, et al: Haemophilia 5: 32, 1999. 34) Mauer-Bunschoten EP, et al: Blood 86: 983, 1995. 35) Dimichele D: J Thromb Haemost 5 (Suppl 1): 143, 2007.



の止血療法と同様、大手術時には2時間ごとの投与を1〜2日間行い、以後は例えば3、4、6、8、12時間ごとというように、徐々に投与間隔を延ばしていく投与レジメが勧められている¹¹⁾。

⑥ rFVIIaの安全性

rFVIIaが国際的に市販開始された1996年以後、70万回以上標準的な投与(90μg/kg)が実施されたが、血栓性の有害事象は16例であった。内訳は10例が心筋梗塞、脳血管障害などの動脈性、6例が静脈性の血栓症であった²⁶⁾。症例の多くはPCC投与後、細菌感染症の併発など血栓症発症リスクの高いものが多く、rFVIIa投与に直接起因したかについては不明である。しかしながら、rFVIIaにおいてもPCCと同様、感染症や血栓症発症リスクを有する患者においては注意が必要である。

(5) バイパス止血療法の新たな展望

① rFVIIa単回高用量

rFVIIaの1出血エピソードに対する平均投与回数は2・5回で、単回投与で十分な止血効果を得ることは困難である。また、特に小

児では半減期も短く、血管の確保が困難な症例もあり、精神的・身体的負担が大きい。

Parameswaranら²⁷⁾は、200μg/kg以上の投与量における止血率は97%と、通常量での止血率(84%)を上回ることを報告している。さらにKenetら²⁸⁾は通常投与量の3倍量の270μg/kg単回投与が、90μg/kg3回投与と同程度の止血効果が得られることを報告し、高用量単回投与の有効性と安全性が国際的にも認知されるようになった。その後、高用量単回投与と標準用量複数回投与群での比較対照試験が実施され、有効性の差もなく、また特記すべき有害事象も見られないことが明らかにされた。

rFVIIa高用量単回投与については、欧州では2007年に正式に承認された。我が国では未承認であるが、最近、高用量単回投与に関する医師主導型のクロスオーバー試験が実施され、標準投与量と同等の有効性が認められた²⁹⁾。

② 予防的投与

最近、インヒビター保有患者においてバイパス止血療法による

予防的投与法が注目されている。Dimicheleらの集計¹⁸⁾では、血友病Aインヒビター保有14症例で15クルールのaPCC予防投与が実施されていた。投与期間は平均19・5カ月(0・25〜26カ月)で、投与回数は1回/日/週、投与量は平均69単位/kg(15〜100単位/kg)であった。

予防効果は、出血頻度の低下が見られたのは14症例中(15予防投与治療中)11例、QOLの改善が見られた例は3例で、あとは患者から希望された例が1例、外科処置後の予防投与例が1例であった。Leisingerら³⁰⁾も、インヒビター保有5症例に対して6カ月以上にもわたってPCCを定期的に投与して、いずれの症例においても出血頻度は減少し、かつ、特に副作用も見られなかったことを報告している。

一方、rFVIIaは半減期が短いことから、予防投与への応用は困難と考えられてきたが、最近、rFVIIaの予防投与(200〜250μg/kg隔日/220μg/kg連日)を実施した13症例中12例で、実施前に比し出血頻度は減少していたこと

が報告された³¹⁾。したがって、バイパス療法の定期投与による止血効果に関するエビデンスが蓄積しつつある。

今後、バイパス製剤による予防投与に関する国際的な臨床研究が望まれる。

(6) 免疫寛容療法

免疫寛容療法(ITI)はBrackmannら³²⁾が30年前に最初に報告した方法で、第VIII因子や第IX因子製剤を大量に反復して投与することによりインヒビターの産生機構をブロックし、インヒビターの消失を図る治療である。

ITIのプロトコルは大きく3種類ある。第1はBrackmannらの原法に基づいた高用量法(Bornプロトコル)で、ハイレスボンダー症例に200IU/kgの第VIII因子製剤を2回/日連日投与する。

第2はITIの治療期間を短縮させるために、免疫抑制剤、γグロブリンを併用し、さらに、ITI開始時のインヒビター力価を下げるためにプロテインAカラムを用いるMaimoプロトコルである³³⁾。



遺伝子組み換え活性型第Ⅶ因子製剤 (FⅦa、ノボセプン®) の2製剤である(表1)。

① aPCC

① aPCCによる急性出血症状

に対する止血治療

aPCCはビタミンK依存性因子であるプロトロンビン、第Ⅶ因子、第Ⅸ因子および第Ⅹ因子を主成分とするが、活性型第Ⅻ因子(Ⅻa)、活性型第Ⅸ因子(Xa)、活性型第Ⅷ因子(VⅧa)およびトロンピンなどの活性型凝固因子も含まれている。aPCCの止血作用の主なメカニズムは第Ⅴ因子依存性にプロトロンビンと活性型第Ⅹ因子がプロトロンビナーゼ活性を増幅してトロンピン産生を促すことと考えられている¹⁶⁾。

欧州の多施設後向き調査によると、aPCCの急性出血症状に対する有効率は81・3%で、関節内出血に限定すると有効例のうち50・7%が1回、31・2%が2回、7・4%が3回投与されていた¹⁷⁾。さらに、最近、欧米で実施された後向き調査では、169エピソード中110エピソード(65%)が治療中に止血したが、45エピソードで止血が遅延し、無効例は7例であった¹⁸⁾。aPCCの単回投与で止血できた例が21%、2回投与が16%、3回投与が48%であった。したがって、aPCCの単回投与では止血が困難な例も少なからず存在することが分かる。

② aPCCによる外科処置・手術時の止血管理

従来、高力価のH Rインヒビター保有例の外科的処置や手術をaPCC単独で実施することは、止血効果の不確実性、高額な医療費、血栓症や播種性血管内凝固症候群(DIC)発症の危惧、さらにエビデンスが少ないなどの理由によりきわめて困難であった。

しかし、近年、aPCC単独使用による実施例の報告が増加している。Zetterらの多施設後向き調査¹⁷⁾によると、19例の小外科処置に対してaPCCが使用されていた。最も多いのが関節穿刺(10例)であった。大手術では膝関節滑膜切除術、膝関節形成術、皮膚筋肉形成術、前立腺腫瘍摘出術に使用されていた。Dimicheleらの調査報告¹⁸⁾では、足関節、膝関節形成術、下肢のコンパートメント症候

群などで使用されていた。

我が国では、aPCCに関して、インヒビター力価10 BU/ml以上、投与期間3日の使用制限があったために、大手術に使用された経験は少なかった。しかしながら、平成20年度よりこれらの制限が撤廃されたために、我が国でも手術や外科処置時の止血管理にもaPCCを使用できるようになった。

③ aPCCの安全性

Enrich¹⁹⁾の報告によると、計39万5000回のaPCC投与で発生した有害事象(adverse event: AE)は55例で、そのうちの16例がDICと心筋梗塞などの血栓症関連のAEである。しかしながら、AE発症16例中13例(81%)に何らかの血栓症発症リスクが認められた。半数の8例が過剰投与であった。AE発症リスクを十分に考慮して適正な投与量を選択することが重要である。

④ FⅦa

FⅦaは、インヒビター保有血友病症例に対する止血治療製剤として1988年に初めて臨床応用され、今やaPCCと並んで重要なバイパス止血療法製剤である²⁰⁾。

本製剤の止血メカニズムは大量投与により組織因子非依存性に活性化血小板上でトロンビンバーストを惹起することが考えられている。

FⅦaの有効性は、出血後製剤投与までの時間経過に強く依存している。実際、出血症状の出現後、6時間以内に投与を開始することにより、明らかな止血効果を得られることが報告されている²¹⁾。さらに、家庭内投与を基盤に早期投与を開始することにより、より少ない投与回数で止血効果が得られることも明らかにされている²²⁾。我が国で実施された市販後調査によると、3時間以内投与群では有意に有効率が高かった²³⁾。

⑤ FⅦaによる外科処置・手術時の止血管理

大手術21例、小手術57例、抜歯関係25例の計103例の外科手術におけるFⅦaの有効性を検討した報告²⁴⁾によると、FⅦaの著効+有効例はそれぞれ81%、86%、92%であった。我が国でも、偽腫瘍摘出術などの大きな整形外科的手術の止血管理に使用されている²⁵⁾。

ガイドラインでは重篤な出血時

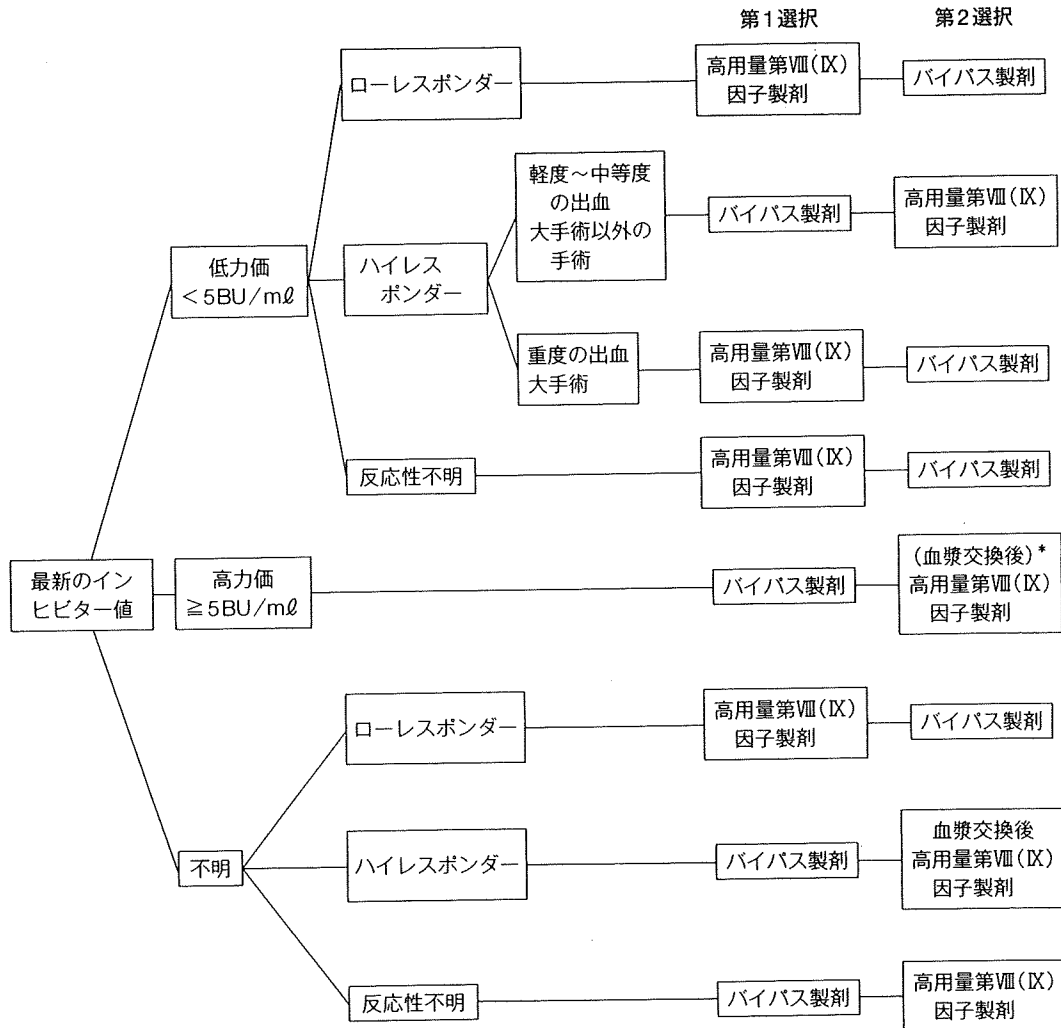


図1 インヒビター保有血友病患者に対する治療製剤選択のアルゴリズム

*インヒビター力価が>10BU/mlの場合は血漿交換の併用も考慮する。

(「日本血栓止血学会血友病部会ガイドライン」¹¹⁾より)

する。しかしながら、HRの場合、既往免疫反応の出現を十分考慮して止血療法を計画することが必要である。インヒビター力価が5~10BU/mlでも、重篤な出血や大手術時には高用量の第VIII因子や第IX因子製剤による中和療法を実施することは可能である。

一部の血友病Aインヒビター症例において、FVIII/VWF製剤の止血効果が第VIII因子製剤よりも上回ることが知られている。これは本インヒビターが第VIII因子軽鎖を認識しFVIII/VWF結合を抑制する抗体で、FVIIIへの反応性が<5BU/mlの存在により低下するためであることが明らかにされている¹⁵⁾。

(4) バイパス止血療法

インヒビター力価が5BU/ml以上の場合の第1選択は、重篤な出血症状や大手術時の止血管理を除いてバイパス止血療法である。現在、使用できるバイパス製剤は、活性型プロトロンビン複合体製剤(activated prothrombin complex concentrates; aPCC, ファイバ®)および



天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン¹⁰⁾が作成された¹¹⁾。

本ガイドラインでは関節内出血、筋肉内出血、口腔内出血、消化管出血など血友病で見られる各種出血症状別に投与量、投与期間などが明記されている。また、外科的処置、手術、内視鏡や生検などの侵襲的処置についても具体的な投与方法が記載されている。

中等症や軽症の血友病A患者の軽く中等度の出血症状では、DDAVP(酢酸デスマプレシン)が第一選択とされている。しかし、反復投与すると効果は減弱するために、止血レベルを高レベルに、かつ長期間維持する必要のある出血症状に対しては、第Ⅷ因子製剤の投与をためらうべきではない。

(3) 定期補充療法と関節症予防

効果

血友病補充療法製剤の品質の向上、家庭療法の普及により、血友病の止血療法は特に小児例を中心に、オンデマンド止血療法から出血予防のための定期補充療法に変わりつつある。

定期補充療法の予防効果に関する根拠は、第Ⅷ因子活性IU/dl

以上の中等症では1IU/dl未満の重症に比し出血頻度が少ないこと、頭蓋内出血など生命の危険を伴う重篤な出血が稀であるというこれまでの経験に基づいている。実際、

25〜40IU/kg 3〜3.5回/週の投与で出血回数は劇的に減少する。さらに、若年の血友病A患者を対象に実施された長期フォローアップ調査によると、定期補充療法を実施した症例のほとんど全例において、整形外科的・放射線学的関節スコアの悪化が見られなかったことが明らかにされた¹²⁾。

最近、さらに定期補充療法が関節障害の発症や進行を予防するかどうかについて、前向き無作為コントロール研究が実施された。これは6〜30カ月の年齢で、第Ⅷ因子活性2IU/dl未満の血友病A患者65例を無作為に割付けして1996年より実施されたものであるが、本研究により定期補充療法群はオンデマンド治療群より関節障害は明らかに軽度であることが初めて実証された¹³⁾。

定期補充療法をいつまで実施するか、成人患者や出血頻度の高い中等症〜軽症患者への適応などが

今後の検討課題である。

インヒビター保有

血友病の治療

(1) インヒビターとは

インヒビターは凝固因子製剤による補充療法の結果、製剤中の第Ⅷ因子や第Ⅸ因子に対して発生する抗第Ⅷ因子あるいは抗第Ⅸ因子同種抗体である。一般に、インヒビター保有症例の止血管理は、非保有例よりも困難である。インヒビターはその反応性により、製剤投与5〜7日後に上昇する既往免疫反応(anamnestic response)が出現するタイプ、製剤投与後もインヒビターの変動が少ないタイプ、そして、インヒビターが一過性に出現して消失するタイプに分けることができる。

既往免疫反応とは、「凝固因子製剤投与前のインヒビター力価の50%以上上昇した場合」と定義されている。国際血栓止血学会学術標準化委員会の第Ⅷ因子・第Ⅸ因子小委員会は、5BU/ml以上のインヒビターが検出された症例をハイレスポンス(High response)・低レスポンス(Low response)と定義することを勧告している¹⁴⁾。

かわらず5BU/ml未満の症例をローレスポンス(Low response)と定義することを勧告している¹⁴⁾。

(2) 急性出血に対する止血治療

インヒビター保有症例の止血治療は一般に困難である。通常、出血症状の重症度、インヒビター力価、反応性、過去の止血効果などから判断する。しかしながら、これまでガイドラインもなく、それぞれの施設の経験に基づいて診療されていることも多い。

最近、インヒビター非保有例と同様にインヒビター保有例の止血治療に関するガイドライン(図1)が発表された¹¹⁾。

(3) 補充療法の選択基準と投与量

5BU/ml未満で、過去に既往免疫反応がないLRの第1選択は補充療法の続行である。確実な止血効果を得るためには、インヒビター中和量に目標止血レベルに必要な製剤を加えて投与する。5BU/ml未満でも過去に5BU/ml以上に上昇したことのあるHRの第1選択は、後述するバイパス止血療法になるが、重度の出血症状や大手術の際は、補充療法を選択



nster kidney)細胞で産生された第Ⅳ因子をイオン交換クロマトグラフィー、size exclusion, 免疫純化などの様々な製法工程にて産生したものである。

1988年に、すでに投与歴のある血友病A患者 (previously treated patients: PTPs) 56例を対象として初めて国際的な臨床試験が実施され、本製剤の安全性および有効性が報告された³⁾。

一方、BHK産生システムのほかに、第Ⅳ因子と von Willebrand 因子 (vWF) の両cDNAをCHO (Chinese hamster ovary) 細胞に組み込んで産生させる製法もほぼ同時に開発された。

本製剤の安全性および有効性は、今までに治療歴のない患者 (previously untreated patients: PUPs) 79例およびPTPs 69例を対象とした多施設臨床試験により確認された^{4) 5)}。第1世代の遺伝子組み換え型製剤はいずれも製法過程で動物由来蛋白を使用し、また、第Ⅳ因子の安定化のために最終製品にヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) を添加することが必要であった。

その後、HSAの代わりに安定剤としてシクロロースを使用した第2世代のrFⅡが開発された。本製剤は第1世代製剤と同様に安全性は高く、止血効果も同等であった⁶⁾。

最近、アルブミンなどの動物由来蛋白を製法工程の中で一切使用しない第3世代のrFⅡ (plasma/albumin-free preparation: rFⅡ-PFM) が開発された。111例のPTPsを対象にしたrFⅡ-PFMと、従来のrFⅡ製剤との二重盲検クロスオーバー比較試験で本製剤の有効性及び安全性が明らかにされており、rFⅡ製剤の安全性はますます向上しつつある⁷⁾。

以上のrFⅡ製剤はフル全長の第Ⅳ因子を有する製剤であるが、Bドメイン除去製剤 (BDDrFⅣ) も開発されている。rFⅡとの比較検討試験により、薬物動態的にもフル全長のrFⅡと同等であることが報告されている。さらに、アルブミンも添加されていないが、BDDrFⅣは未だ我が国では市販されていない。

アルブミン無添加製剤のrFⅡの導入により、安全性とともに製剤の純度も大きく向上した。これは、蛋白1g当たりの第Ⅳ因子の比活性で比較すると、最新型のrFⅡの純度は血漿の約40万倍、クリオ製剤の約20万倍、濃縮製剤の約1万倍に達していることから明らかである。

① 遺伝子組み換え型第Ⅳ因子製剤

遺伝子組み換え型の第Ⅳ因子製剤 (rFⅣ) もすでに開発され、海外や他のアジア諸国で使用されている。

本製剤は、第Ⅳ因子cDNAをCHO細胞に組み込んで産生されたもので、培養製法工程にアルブミンなどの動物由来蛋白は添加されていない。硫酸化やリン酸化などの翻訳後修飾反応の差と回収率の若干の低さを除いて、従来の血漿由来製剤とほぼ同等の機能を有する。

PTPs⁸⁾ およびPUPs⁹⁾ を対象とした臨床試験において、回収率は従来の血漿由来製剤と比較してやや低いものの、同等の有効性および安全性が確認されている。我が国ではまだ承認されておらず、導入が待たれている。

(2) 血友病止血療法とガイドライン

血友病止血療法には、間欠的に投与するボラス投与と、一定期間・一定レベルの凝固因子活性を維持するために実施される持続輸注療法とがある。持続輸注療法は、入院治療を前提とした重篤な出血症状に対する治療や、外科手術時の止血療法に適応される。止血に必要な血中の凝固因子レベルは、一般に凝固因子活性20 IU/dl以上と考えられているが、出血症状の重症度に応じ投与量が増減される。

我が国の血友病の診療は、血友病センターが集約して実施する外国と異なり、診療所から病院まで大計1000カ所にもわたる施設で実施されている。したがって、血友病診療に施設間格差が存在することは否めない。

そこで最近、適正かつ有効な標準的診療を全国どこでも実施できるように、日本血栓止血学会血友病部会が中心になって、国内主要血友病診療施設の実態調査、欧米のガイドライン等を参考に、血友病専門医の意見に基づき初めてガイドライン (インヒビター保有先



表1 血友病治療製剤 (平成20年9月現在)

| 分類 | 種類 | 製剤名 | 製造元 | 原料/製法/ ウイルス不活化 | 規 格 (単位/バイアル) | その他 |
|----------------|---------|---------------|------------|---|------------------|----------------------|
| 血友病A治療製剤 | 血漿由来 | クロスエイトM | 日本赤十字社 | 血漿/抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体/有機溶媒/界面活性剤処理, ナノフィルトレーション | 250, 500, 1,000 | アルブミン添加 |
| | 血漿由来 | コンファクトF* | 化学及血清療法研究所 | 血漿/イオン交換クロマト/乾燥加熱, ナノフィルトレーション | 250, 500, 1,000 | FⅧ/vWF複合体製剤, アルブミン添加 |
| | 遺伝子組み換え | コージネイトFS | バイエル | 遺伝子組み換え/抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体/有機溶媒/界面活性剤処理 | 250, 500, 1,000 | アルブミン無添加 |
| | 遺伝子組み換え | アドベイト | バクスター | 遺伝子組み換え/抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体/免疫純化, イオン交換, 液状加熱(アルブミン) | 250, 500, 1,000 | アルブミン無添加 無血清培地 |
| 血友病B治療製剤 | 血漿由来 | ノバクトM | 化学及血清療法研究所 | 血漿/抗第Ⅸ因子モノクローナル抗体/乾燥加熱, ナノフィルトレーション | 250, 500, 1,000 | アルブミン添加 |
| | 血漿由来 | クリスマシン-M | 三菱ウエルファーマ | 血漿/抗第Ⅸ因子モノクローナル抗体/界面活性剤処理 | 400, 1,000 | アルブミン添加 |
| | 血漿由来 | PPSB-HT「ニチヤク」 | 日本製薬 | 血漿/エタノール処理, イオン交換, ナノフィルトレーション, 乾燥加熱 | 200, 500 | 第Ⅸ因子複合体 |
| 治療製剤 インヒビター | 血漿由来 | ファイバ | バクスター | 血漿/凝固因子活性化/蒸気加熱 | 500, 1,000 | 活性型第Ⅸ因子複合体 |
| | 遺伝子組み換え | ノボセプン | ノボ・ノルディスク | 遺伝子組み換え/免疫純化, イオン交換, 界面活性剤 | 1.2mg, 4.8mg | アルブミン無添加 |

* von Willebrand病の治療製剤として使用される。

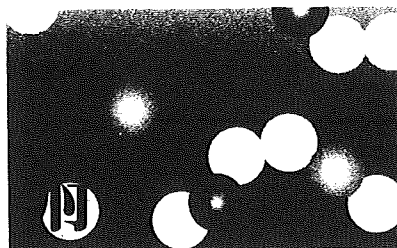
ローナル抗体、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーによる各純化ステップなどにより、ウイルス除去効率は格段に向上し、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)やC型肝炎ウイルス(HCV)の感染リスクはなくなったと言える。

さらに、従来、不活化が困難であったA型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)やヒトパルボB19ウイルスなどの非殻小型ウイルス群についても、20nmや15nmの濾過膜の開発により除去が可能となり、ウイルス感染の危険は大きく減少している。

② 遺伝子組み換え型製剤
a) 遺伝子組み換え型第Ⅷ因子製剤

第Ⅷ因子のcDNA構造の解明を契機に開発された第1世代の遺伝子組み換え型第Ⅷ因子製剤(商品名)が我が国で市販されてからすでに14年が経過した。

本製剤は、第Ⅷ因子cDNAを組み込んだBHK(Baby hamster kidney)細胞に感染させた



血友病の治療—最近の進歩

奈良県立医科大学小児科学准教授

嶋 緑 倫 (しまみどり)

【要旨】

血友病は幼少期より出血症状を反復する。止血治療の原則は第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子製剤の補充療法である。近年、定期補充療法の有用性が明らかにされている。さらに、免疫寛容療法やバイパス療法の進歩により、インヒビター保有例の治療成績も向上している。

はじめに

血友病は幼少期より皮下、関節内、筋肉内、口腔内などの出血症状を反復する疾患で、先天性凝固障害症の中では最も発生頻度が高く、また症状も重篤である。第Ⅷ因子の量的・質的異常が血友病A、第Ⅸ因子の異常症が血友病Bである。平成19年度の全国調査によれば、我が国の血友病Aの生存患者

数は4159名、血友病Bが915名である¹⁾。

血友病の本態は第Ⅷ因子遺伝子異常あるいは第Ⅸ因子遺伝子異常である²⁾。両遺伝子はX染色体に存在し、X連鎖性劣性遺伝形式で伝播する。

血友病の治療は、欠乏する第Ⅷ因子や第Ⅸ因子の補充が原則である。純化精製法、ウイルス不活化処理、遺伝子工学などの進歩によ

って、血友病の治療製剤は大きく進歩した。さらに、近年は出血時のオンデマンド療法主体の補充療法が、特に小児例を中心に出血を予防する定期補充療法にシフトしつつあり、血友病患者における日常生活のQOLは、ますます向上している。

一方、インヒビター保有例の止血管理は困難なことが多く、感染の問題と並び現代の血友病の診療上の大きな問題となっているが、バイパス止血治療の進歩や免疫寛容療法の普及により、新たな展開が見られているのも事実である。そこで、本稿では血友病の治療の現状について解説する。

◆キーワード

血友病
血友病A
血友病B
第Ⅷ因子製剤
インヒビター

インヒビター非保有 血友病の治療

(1) 補充療法製剤の進歩

血友病の急性出血症状に対する止血治療の原則は、第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子製剤による補充療法である。補充療法製剤は、血漿由来製剤と遺伝子組み換え型製剤に大別される(表1)。

① 血漿由来製剤

現在、我が国で使用されている血漿由来第Ⅷ因子、あるいは第Ⅸ因子製剤は、献血血漿のスクリーニングやNAT検査、さらに製法工程における加熱および界面活性剤などによる不活化処理、モノク

血友病 A インヒビターに対する バイパス止血療法の新展開

野上 恵嗣 吉岡 章

奈良県立医科大学小児科

要 旨

血友病 A インヒビター陽性例の止血管理は、現在の血友病治療上極めて重大な問題となっている。近年、インヒビター症例の臨床において、中和療法、バイパス止血療法や免疫寛容療法など、治療の選択肢が増えてきた。特に、我が国ではバイパス止血療法として使用されている 2 製剤(活性型プロトロンビン複合体製剤と遺伝子組換え型活性型第 VII 因子製剤)は、いずれも出血局所におけるトロンビン生成反応を増幅させることにより止血させ、患者の QOL の向上に大きく貢献している。しかしながら、適切な止血モニターの選定、投与回数とも関連する止血の不確実性、予後の評価の問題、医療経済などの未解決の問題も多いのが現状である。そこで、さらなる有効、有用なインヒビター治療製剤(バイパス止血製剤)の開発が期待されている。

緒 言

血友病 A は血液凝固第 VIII 因子の量的あるいは質的異常にもとづく先天性の出血性凝固障害症で、発生頻度が最も高く、かつ、出血傾向も最も重篤である¹⁾²⁾。通常、出血症状に対しては第 VIII 因子製剤による補充療法が行われるが、患者の 10~30% に製剤中の第 VIII 因子に対する同種抗体(インヒビター)が出現することがある³⁾。一旦、インヒビターが発生すると、第 VIII 因子による補充療法の止血効果は消失ないし激減するために、以後の止血管理はきわめて困難になる。従って、インヒビター陽性の血友病 A 患者の止血管理は、

現在の血友病治療において極めて重大な問題となっている³⁾。近年、インヒビター症例の臨床において、1)大量の第 VIII 因子製剤投与による中和療法、2)第 VIII 因子を介さずに止血をはかるバイパス止血療法、3)免疫寛容療法など、治療の選択肢が増えてきた。本稿では、血友病 A インヒビターの止血治療としてのバイパス止血療法について、その現状とさらに新しい知見を加え解説する。

なお、インヒビター力価<5 ベセスダ単位/ml (BU/ml)で持続する場合を Low responder、インヒビター力価の最高値が ≥ 5 BU/ml を High responder と分類されている。

1. インヒビター陽性血友病 A 患者の止血療法の原則

インヒビター陽性患者の急性出血症状に対する止血療法には、バイパス止血療法と大量の第 VIII 因子による中和補充療法がある。インヒビターの力価、反応性および出血症状の重症度にもとづき

Nogami Keiji

(〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840)

アドレス: roc-noga@naramed-u.ac.jp

キーワード: 血友病 A, インヒビター, バイパス止血療法, 活性型第 VII 因子

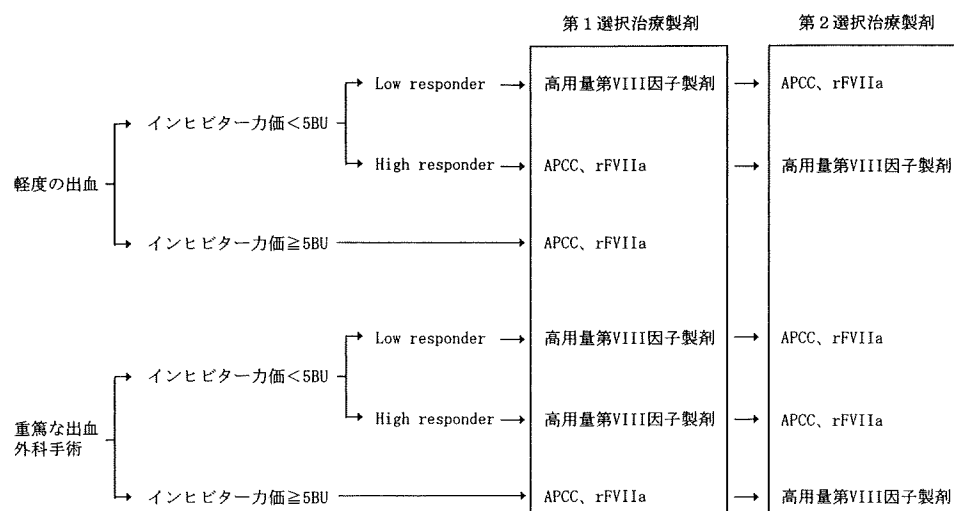


図1. 第VIII因子インヒビター陽性例の止血療法

インヒビター陽性血友病 A での止血治療製剤の選択は、主に出血症状の重症度およびインヒビターの力価により決定する。

表1. 我が国で市販されているバイパス止血治療製剤 (2007年)

| 製剤の分類 | 製剤名 | 製造会社 | 原料 / 製法 / ウイルス不活化 | 規格 (/vial) | その他 |
|---------------------|-------|------------|-----------------------------|--------------|--------------------|
| 活性化型プロトロンビン製剤 | ファイバ | バクスター社 | 血漿 / 凝固因子活性化 / 蒸気加熱 | 500U, 1,000U | 活性化第IX因子複合体とも呼称される |
| 遺伝子組換え型活性化型第VII因子製剤 | ノボセブン | ノボ・ノルディスク社 | 遺伝子組換え / 免疫純化, イオン交換, 界面活性剤 | 1.2mg, 4.8mg | アルブミン無添加 |

治療製剤を選択する(図1)⁹⁾。基本的には、治療時点のインヒビター力価 ≥ 5 BU/mlであれば、バイパス止血療法製剤を選択する。また、インヒビター力価 < 5 BU/mlであっても、High responderならば同様にバイパス止血製剤を選択する。

2. バイパス止血療法とは

バイパス止血療法とは、外因系の凝固機転を活性化させることにより、第VIII因子や第IX因子活性化機構を迂回(バイパス)して凝固反応を促進し、止血をはかることにある。現在、わが国で使用可能なバイパス止血療法製剤には、活性化型プロトロンビン複合体製剤(APCC:ファイバ[®]; Baxter社)と遺伝子組換え型活性化型第VII因子製

剤(rFVIIa:ノボセブン[®]; NovoNordisk社)の2製剤がある(表1)。前者は血漿由来製剤であり、蒸気加熱によるウイルス不活化処理が施されている。一方、後者は遺伝子組換え型製剤である。いずれの製剤も出血局所におけるトロンビン生成反応を増幅させて止血する。バイパス止血療法の原則は早期投与が原則であるが、止血効果は必ずしも確実でない。したがって、無効な場合は他剤に変更することも必要である。

3. バイパス止血療法製剤

1) 活性化型プロトロンビン複合体製剤(APCC) APCC製剤は複数の活性化型凝固因子(トロンビン, 第VIIa, 第IXa, 第Xa因子)を含有しており、

第 VIII 因子を介した凝固経路をバイパスして凝固を促進し止血をはかる⁹⁾。Turecek らは、抗第 VIII 因子抗体により作製した家兎インヒビターモデルにおいて、プロトロンビンと活性型第 X 因子が APCC と同様な止血効果をもたらすこと、さらに第 V 因子が APCC のトロンビン生成促進作用に必須であることを明らかにした⁹⁾。したがって、APCC の止血作用の主なメカニズムは第 V 因子存在下にプロトロンビンと活性型第 X 因子がプロトロンビナーゼ活性を増幅することにある。投与量は 1 回 50~100 単位/kg で、出血症状によっては 2~3 回/日投与する。ただし、一日の総投与量は 200 単位/kg を超えないようにする。APCC の有効性は 50~65% と報告されているが、止血効果は症例毎に、また出血症状により左右される⁷⁸⁾。APCC 投与に起因する副反応としては血栓傾向が最も危惧されているが、Ehrlich らの報告によると⁹⁾、10 年間計 3.95×10^5 回の投与で血栓症の発症例は 16 例であった。血栓の内訳は、DIC (disseminated intravascular coagulation) と心筋梗塞が多く、過剰投与、肥満、高脂血症が発生リスクとして挙げられている^{9)~11)}。APCC 中には微量であるが、第 VIII 因子や第 VIII 因子フラグメントを含有している。特に、第 VIII 因子軽鎖フラグメントを一定量含有することから、軽鎖 C2 ドメインを認識するインヒビターでは、APCC の反復投与後インヒビター力価が上昇することがある (アナムネスティック反応)¹²⁾。

2) 活性型第 VII 因子 (rFVIIa) 製剤

血友病 A では、第 VIII 因子欠乏により内因系 tenase 活性が阻害される。第 VII/組織因子を中心とする外因系は正常に機能しているが、各因子が生理的な濃度の範囲であれば、外因系のみでは血友病の凝固障害を代償できない。しかし、rFVIIa の血友病 A における止血作用のメカニズムは、Hoffman らの cell-based model の実験により説明されている¹³⁾。血管壁の傷害に引き続き組織因子が血液に露出された結果、組織因子発現細胞上で形成される FVIIa-組織因子複合体が第 X 因子を活性化させ、トロンビン生成が起こる。しかし、この初期の時点で生成されるトロンビンはごく微量で、安定したフィブリン形成には至らず、止血

作用としては不十分である。一方、生成されたトロンビンが、第 V、VIII や XI 因子および血小板を positive feedback 機構によって活性化する結果、活性化血小板上でトロンビンバースト (大量発現) が生じる¹⁴⁾。この血小板依存性かつ組織因子非依存性のトロンビン生成反応が thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)¹⁵⁾ により線溶を抑制し、その結果安定した血栓が生じる¹⁶⁾。この rFVIIa の止血作用は濃度依存性であり、高濃度の rFVIIa は第 VIII 因子や第 IX 因子の非存在下でも止血作用を発揮できることになる¹⁷⁾。rFVIIa は組織因子や血小板が凝集する出血局所を中心に作用するため、全身の凝固系に対する影響が少ない。多施設調査研究によると、rFVIIa 製剤の有効率は関節内出血で 79%、筋肉内出血で 65% である¹⁸⁾。rFVIIa の有効性には出血から投与までの時間が大きく関係しており、早期投与を行えば有効率はほぼ 90% に達すると報告されている¹⁹⁾。1 回の投与量は 60~120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である。

rFVIIa の有利な点は、遺伝子組換え型製剤であること、第 VII 因子単一製剤であり APCC のようなアナムネスティック反応が見られないこと、溶解量が少なく少量の静注で投与できることから、自己注射の導入が APCC より容易であること、などが挙げられる。一方、欠点としては、半減期が成人で 2.7 時間、小児では 1.3 時間と短く²⁰⁾、通常 2~3 時間毎に投与する必要がある点である。rFVIIa 投与に起因する血栓傾向は稀とされているが、心筋梗塞、肺塞栓症および深部静脈血栓症などの報告がある^{21)~23)}。

4. バイパス止血療法製剤の選択

バイパス止血療法の製剤選択においては、それぞれの製剤の止血効果の評価が重要である。これまで APCC と rFVIIa の両製剤における臨床的止血効果の差に関する十分な知見はなかったが、最近、両製剤の止血効果に関する無作為比較検討試験が実施された²⁴⁾。本研究は計 48 症例の足、膝および肘の典型的な関節内出血の 96 エピソードの治療における両製剤の効果を比較検討したものである。結果は、関節内出血に対する両製剤の止血

効果は同等であった。しかしながら、いくつかの患者群では両製剤の止血効果に差がみられた。

もし、ひとつの製剤で止血効果が得られなかった場合には他剤への変更を考慮することが重要である。また、単一の製剤を高用量かつ長期投与した場合に反応性が低下することがある。Hayashiらは大量の消化管出血をきたした血友病 A インヒビター成人例でのバイパス止血治療経過中に、APCCを10日間連日投与した後、トロンボエラストグラフィー (TEG) で止血効果を認めなくなったために、rFVIIa 製剤に変更したところ、再度 TEG の改善を認めた。さらに興味あることに、この患者ではその後 rFVIIa 製剤を連日投与した結果、再び反応が低下した²⁵⁾と報告している。

5. バイパス止血療法の新展開

1) 高用量 rFVIIa 製剤の単回投与

rFVIIa 製剤によりバイパス止血療法が大きく発展することになった。しかしながら、1 出血エピソードに対する平均投与回数が 2.5 時間毎の 2.2 回で²⁶⁾、頻回投与の必要性が最も不利な点である。また、小児の半減期はさらに短い¹⁹⁾。前述したように、rFVIIa の止血効果の本態は活性化血小板依存性に産生されるトロンビン量の増加 (トロンビンバースト) であり¹¹⁾、これは血漿中の rFVIIa の薬理的濃度に依存する。したがって、血友病インヒビター患者に出血が起きた時には、標準容量の rFVIIa 製剤を複数回投与するよりも、より高用量の製剤を単回投与した方が、より高いトロンビン生成が得られ止血効果が高くなると考えられる。Kenet らは、270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与が 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 3 回投与と同等の止血効果を得たことを報告した。しかも、明らかな副作用はみられなかった²⁷⁾。Parameswaran らは、rFVIIa の投与量に応じた止血効果と安全性の両面を後方視的に検討したところ、高用量群 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 超) は、それ以下の用量群と比べ非常に良好な止血コントロールをもたらし、血栓などの有害事象は全く認めなかったと報告した²⁸⁾。さらに最近、高用量単回投与の有効性は無作為比較対照試験によっても明らかにされた²⁹⁾³⁰⁾。したがって、高用量単回投与は標準用量複数回投与に比べて、有効性、安全性および経

済性のいずれの点でも同等あるいはそれ以上との成績が得られていることから、投与回数を減らして患者・家族の QOL を改善するという観点からも明らかに優れた投与法であるとされる。最近、我が国でも、270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与と 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 3 回投与の安全性と有効性をクロスオーバー方式で比較する医師指導型臨床研究が終了し、解析中である。我が国でも高用量単回投与の有効性と安全性が確認され、患者や家族の QOL の改善が期待されている。

2) バイパス止血療法による予防的治療

バイパス止血療法製剤は一般に作用時間が短く、また、高額なために長期に定期的に出血を予防する治療については困難と考えられてきた。しかしながら、予防に必要な投与量は、止血に必要な投与量に比較してはるかに少量ですむことから、最近インヒビター陽性血友病患者の予防的投与が注目されてきている。Lessinger らは、5 症例の血友病 A インヒビター保有例に 6 カ月以上にわたる APCC 製剤を定期的に投与してその予防効果を検討した³¹⁾。投与レジメは 4 症例で 50~75 単位/kg 週 3 回、1 症例で 100 単位/kg 連日であった。いずれの症例も実施前に比し、出血頻度は減少して整形外科所見でも良好であり、さらに副作用は認められなかった。rFVIIa 製剤の定期的予防投与に関する臨床研究も最近、欧州で実施された³²⁾。投与レジメは、200~250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 隔日または 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 連日であり、13 症例中 12 例で実施前に比し出血頻度は減少していたと報告されている。また、APCC 製剤の多施設臨床研究も現在実施されている。

3) 新たなバイパス止血療法製剤

rFVIIa 製剤の導入により、血友病インヒビター症例のバイパス止血療法はさらに進んだが、インヒビター陰性例に対する補充療法と比較するとその効果ははるかに劣っており、かつ不確実であることは否めない。そこで、さらなる有効なインヒビター治療製剤が期待されている。現在、次の 2 つの製剤の臨床的応用がクローズアップされている。

A) 活性型第 VII 因子 (FVIIa) / 第 X 因子 (FX) 複合製剤

Tomokiyoらは血友病AおよびB血漿における血漿由来FVIIa製剤の止血効果を、APTT, TEG, トロンビン生成試験による凝血学的検査で評価したところ、FXの添加は、FVIIa単独と比較して、いずれの項目も濃度依存的に著明に改善することを明らかにした³³⁾。さらに、第VIIIまたは第IX因子インヒビター陽性血友病Aまたは血友病B血漿でも同様に、FVIIaとFXの混合添加により、凝血学的にFVIIa単独よりも著明に改善した。さらにサルを用いた後天性血友病Bモデルでの*in vivo*実験でも、FXと混合したFVIIaの添加は、出血症状を著しく改善した。また、その効果はFVIIa:FXのモル比は1:10がより効果的であったと報告している。したがって、FVIIaとFXの複合製剤は、FVIIa製剤とAPCC製剤の欠点を代償することができる可能性のある有効・有用なバイパス止血製剤として臨床応用が期待されており、現在、我が国でこの混合製剤の治験が行われ始めたところである。

B) rFVIIa変異体(rFVIIa analog)製剤

近年、rFVIIa製剤の変異体であるrFVIIa analogの止血効果が、野生型rFVIIaと比較して極めて高いことが報告されて注目を浴びている。特に、FVIIa分子のcatalytic domain内のactive pocketを構成するアミノ酸残基の内、3残基を他のアミノ酸に置換する(158Val→Asp, 296Glu→Val, 298Met→Gln)ことにより、thrombinにmimicした変異体(V158D/E296V/M298Q; NN1731)が、血友病A血漿を用いた*in vitro*実験や血友病Aノックアウトマウスを用いた*in vivo*実験系で、ともに凝血学的諸検査値(APTT, Xa生成, トロンビン生成)を、野生型rFVIIaに比べ著しく改善させたと報告されている^{34)~36)}。この変異体は今後の臨床研究の進展において極めて注目されることになると思われる。

文 献

- 厚生省 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班報告書, 1997.
- 嶋 緑倫, 他: 第 VIII 因子欠乏症(血友病 A). 柳沢正義監修, 小に慢性特定疾患治療マニュアル, 1 版, 診断と治療社, 東京, 1999.
- 田中一郎, 他: 血友病インヒビター. 日血栓止血会誌 2000; 11: 559—71.
- 嶋 緑倫, 他: 第 VIII 因子インヒビターの発症要因と対策. 血液フロンティア 2006; 16: 49—60.
- 嶋 緑倫: 血漿蛋白製剤第 VIII・IX 因子製剤バイパス療法. Biomedical Perspectives 1999; 8: 118—124.
- Turecek PL, et al: FEIBA: mode of action. Haemophilia 2004; 10 (Suppl 2): 3—9.
- Lusher JM, et al: Efficacy of prothrombin-complex concentrates in hemophiliacs with antibodies to factor VIII: a multicenter therapeutic trial. N Engl J Med 1980; 303: 421—5.
- Sjamsodin LJ, et al: The effect of activated prothrombin-complex (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. A double-blind clinical trial. N Engl J Med 1981; 305: 717—21.
- Ehrlich HJ, et al: Safety of factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events. Haemophilia 2002; 8: 83—90.
- Negrier C, et al: Multicenter retrospective study on the utilization of FEIBA in France in patients with factor VIII and factor IX inhibitors. French FEIBA Study Group. Factor Eight Bypassing Activity. Thromb Haemost 1997; 77: 1113—9.
- Schimpf K, et al: Myocardial infarction complicating activated prothrombin complex concentrate substitution in a patient with haemophilia A. Lancet 1982; 2: 1043.
- Yoshioka A, et al: Anamnestic response following infusion of prothrombin complex concentrates (PCC) and activated prothrombin complex concentrates (APCC) in haemophilia A patients with inhibitors. Blood Coagul Fibrinolysis 1991; 2 (Suppl 1): S51—8.
- Hoffman M, et al: A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost 2001; 85: 958—65.
- Monroe DM, et al: Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. Br J Haematol 1997; 99: 542—47.
- Bajzar L, et al: Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. J Biol Chem 1995; 270: 14477—84.
- Lisman T, et al: Inhibition of fibrinolysis by recombinant factor VIIa in plasma from patients with severe hemophilia A. Blood 2002; 99: 175—9.
- Roberts HR, et al: The use of recombinant factor VIIa

- in the treatment of bleeding disorders. *Blood* 2004; 104: 3858—64.
- 18) Lusher JM, et al: A randomized, double-blind comparison of two dosage levels of recombinant factor VIIa in the treatment of joint, muscle and mucocutaneous haemorrhages in persons with haemophilia A and B, with and without inhibitors. *Haemophilia* 1998; 4: 790—8.
 - 19) Santagostino E, et al: Home treatment with recombinant activated factor VII in patients with factor VIII inhibitors: the advantages of early intervention. *Br J Haematol* 1999; 104: 22—6.
 - 20) Lindley CM, et al: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant factor VIIa. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55: 638—48.
 - 21) Peerlinck K, et al: Acute myocardial infarction following administration of recombinant activated factor VII (NovoSeven) in a patient with haemophilia A and inhibitor. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1775—6.
 - 22) Rosenfield SB, et al: Pulmonary embolism after sequential use of recombinant factor VIIa and activated prothrombin complex concentrate in a factor VIII inhibitor patient. *Thromb Haemost* 2002; 87: 925—6.
 - 23) van der Planken MG, et al: Distal deep venous thrombosis in a hemophilia A patient with inhibitor and severe infectious disease, 18 days after recombinant activated factor VII transfusion. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 369—70.
 - 24) Astermark J, et al: FENOC Study Group. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. *Blood* 2007; 109: 546—51.
 - 25) Hayashi T, et al: Unresponsiveness to factor VIII inhibitor bypassing agents during haemostatic treatment for life-threatening massive bleeding in a patient with haemophilia A and a high responding inhibitor. *Haemophilia* 2004; 10: 397—400.
 - 26) Villar A, et al: Pharmacokinetics of activated recombinant coagulation factor VII (NovoSeven) in children vs. adults with haemophilia A. *Haemophilia* 2004; 10: 352—9.
 - 27) Kenet G, et al: A new approach to treatment of bleeding episodes in young hemophilia patients: a single bolus megadose of recombinant activated factor VII (NovoSeven). *J Thromb Haemost* 2003; 1: 450—5.
 - 28) Parameswaran R, et al: HTRS Registry Investigators. Dose effect and efficacy of rFVIIa in the treatment of hemophiliac patients with inhibitors: analysis from the Hemophilia and Thrombosis Research Society Registry. *Haemophilia* 2005; 11: 100—6.
 - 29) Santagostino E, et al: A prospective randomized trial of high and standard doses of recombinant factor VIIa for treatment of hemarthroses in hemophiliacs with inhibitors. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 367—73.
 - 30) Kavakli K, et al: NovoSeven trial (F7HAEM-1510) investigators. Home treatment of hemarthroses using a single dose regimen of recombinant activated factor VII in patients with haemophilia and inhibitors. *Thromb Haemost* 2006; 95: 600—5.
 - 31) Leissing CA, et al: Prophylactic treatment with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) reduces the frequency of bleeding episodes in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13: 249—55.
 - 32) Di Paola J, et al: ReFacto and Advate: a single-dose, randomized, two-period crossover pharmacokinetics study in subjects with haemophilia A. *Haemophilia* 2007; 13: 124—30.
 - 33) Tomokiyo K, et al: A novel therapeutic approach combining human plasma-derived Factors VIIa and X for hemophiliacs with inhibitors: evidence of a higher thrombin generation rate in vitro and more sustained haemostatic activity in vivo than obtained with Factor VIIa alone. *Vox Sang* 2003; 85: 290—9.
 - 34) Persson E, et al: Rational design of coagulation factor VIIa variants with substantially increased intrinsic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 13583—8.
 - 35) Tranholm M, et al: Improved hemostasis with superactive analogs of factor VIIa in a mouse model of hemophilia A. *Blood* 2003; 102: 3615—20.
 - 36) Allen GA, et al: A variant of recombinant factor VIIa with enhanced procoagulant and antifibrinolytic activities in an in vitro model of hemophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 683—9.

Abstract

Establishment of a novel bypassing hemostatic treatment in hemophilia A patients with inhibitors

Keiji Nogami, Akira Yoshioka

Department of Pediatrics, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8522, Japan

Hemostatic management with inhibitors for acute bleeding in hemophilia A patients is currently considered as a serious task for treatment. In recent years, the treatment of hemophilia A with inhibitors includes three options: infusion with high-dose factor VIII concentrates, bypassing hemostatic therapy, and immune tolerance induction therapy. Two therapeutic products used for bypassing therapy, activated prothrombin complex concentrates (APCC) and recombinant factor VIIa (rFVIIa), have contributed significantly to improving the quality of life for these patients. However, many unsolved problems still remain, including: (i) the monitoring of hemostasis; (ii) hemostatic uncertainty related to the number of doses per day; (iii) prognostic assessment; and, (iv) the economics of treatment. We therefore anticipate the development of further effective and efficacious therapeutic products against factor VIII inhibitors (new bypassing therapeutic products).

Key words: Hemophilia A, Inhibitor, Bypassing hemostatic treatment, FVIIa