

Hemophilia A Patients with Inhibitor American Society of Hematology San Diego 2011年12月10日

24) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A novel mechanism of Enhancing the Haemostatic Effect in the Combination with Recombinant Factor VIII and Activated Prothrombin Complex Concentrate(APCC) in Hemophilia A Patients with Inhibitor American Society of Hematology San Diego 2011年12月10日

25) Ogiwara K, Hosokawa K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M., Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Matsumoto T "Evaluation of Comprehensive Hemostatic Function of Patients with Von Willebrand Disease (VWD) Under Flow Using a New Microchip Flow Chamber System. American Society of Hematology San Diego 2011年12月10日

26) Ogiwara K, Shinozawa K, Nogami K, Matsumoto T, Nishiya K, Tsujii N, Yada K, Fukutake K, Shima M. Mechanism of the Potent Activated Protein C Resistance of Novel Factor V Mutation with W1920R (FV Nara) Relative to R506Q (FV Leiden) American Society of Hematology San Diego 2011年12月12日

27) Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Matsumoto T, Shima M. Pharmacokinetics of Continuous Infusion Therapy of Factor VIII Concentrates in Hemophilia A Patients with Inhibitors American Society of Hematology San Diego 2011年12月12日

28) Ogiwara K, Hosokawa K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Evaluation of Comprehensive Hemostatic Function of Patients with Von Willebrand Disease (VWD) Under Flow Using a New Microchip Flow Chamber System American Society of Hematology San Diego 2011年12月13日

#### 国内

1) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 篠澤 圭子, 松本 智子, 古川 晶子, 西屋克己, 福武 勝幸, 嶋 緑倫 活性化プロテイン C 抵抗性の新規凝固第V因子分子異常症 (W1920R)の凝血学的特性と抗凝固療法の確立 第73回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日

2) 松井 英人, David Lillicrap, 杉本 充彦, 嶋 緑倫 自己血管内皮前駆細胞移植による血友病Aインヒビターに対する新規免疫寛容導入療法 第73回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日

3) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Nakadate H, Shima M. The first national survey of thrombotic disorders in Japanese children. Division of Hematology, National Center for Child Health and Development 73回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日

4) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Shima M. Evaluation of coagulation function on the clinical phenotype with acquired FV inhibitor patients 第73回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月16日

5) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Effects of anti-FVIII inhibitors on the FVIII neutralization for hemophilia A with inhibitor 第73回 日本血液学会 名古屋市 2011年10月14日

6) 西屋 克己, 柴田 優, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 田中 一郎, 松本 智子, 嶋 緑倫 血友病Aインヒビター保有患児における第VIII因子製剤によるインヒビター中和/持続輸注療法の凝血学的検討 第53回 日本小児血液・がん学会 第9回 日本小児がん看護学会 前橋市 2011年11月25日

7) 古川 晶子, 荻原 建一, 野上 恵嗣, 細川 和也, 松本 智子, 西屋 克己, 嶋 緑倫 第VIII因子欠乏型出血症状であると凝血学的に診断できた type 3 von Willebrand 病の1例 第53回 日本小児血液・がん学会 第9回 日本小児がん看護学会 前橋市 2011年11月25日

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許所得

特許 4671823 血液凝固因子の不活化方法及び血液凝固因子不活化試料 (平成23年1月28日登録)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

AAVベクターの局所投与における選択性・安全性の評価：  
肝臓に対する経門脈的投与法の確立

研究分担者：菱川 修司 自治医科大学 准教授

研究協力者：池本 智一 自治医科大学 循環器内科 助教

研究要旨：本研究計画の前臨床モデルの確立のため、カンクイザル肝臓に対する経門脈的アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの投与治療の可能性について検討した。当初我々が提唱していた「門脈本幹直接穿刺による肝臓への遺伝子導入法」に対する問題点を克服するために、腸間膜静脈の分枝よりマイクロカテーテルを挿入し AAV ベクターを注入する「マイクロカテーテル (による肝臓への遺伝子導入) 法」を考案し、同方法を実践した。前実験と同様に、AAV に対する中和抗体陽性のカンクイザルに対し経門脈的に肝臓左葉に AAV ベクターを投与したところ、3頭全例に、治療域までに達する導入遺伝子由来第 IX 因子の発現を長期間維持することに成功した。同結果により、AAV に対する中和抗体の影響を回避するための「カテーテルを用いた肝臓への選択的な AAV ベクター投与法の開発」という当初の目的がほぼ達成されたと考えられる。今後はより強く臨床治療を意識し、体格が人間により近い実験ブタを使い、効率的かつ対象患者により負担の少ない投与条件の適正化を図りたいと考えている。

A. 研究目的

血友病の治療として、欠損因子を遺伝子治療によって補う試みがこれまでなされてきた。当研究班の前分担者である小林英司氏 (自治医科大学旧臓器置換研究部・現先端治療開発部門教授) はウイルスベクターによる方法や非ウイルス法を用いて、マウスやラットといった小動物を対象とした遺伝子導入実験を行い、その発現と導入効率を確認している。しかし実際の臨床においては、既感染に基づく AAV に対する中和抗体の存在により、投与したベクターの効果が減弱してしまう現象が指摘されている。現在我々は、この中和抗体の影響を回避す

ることを目的として、肝臓への選択的な AAVベクター投与法の開発を試みている。本研究では「すでに前臨床試験として検討が進められている」「種々の血清型 AAV 中和抗体が検出されている」など、ヒトと類似点が多いことを理由に非ヒト霊長類であるカンクイザルを用いて、肝臓へ選択的に遺伝子を導入する手技の開発・確立を目的に検討を行った。また同手法による導入遺伝子由来第 IX 因子の発現の確認後は、臨床における同処置条件の適正化を目的に同様の手技を実験ブタに施行し、画像解析を中心に検討を重ねた。

## B. 研究方法

①医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター（茨城県つくば市）において、カニクイザルを使用し実験を行った。使用した血管留置針やガイドワイヤー、マイクロカテーテル等の詳細については研究結果に記載した。

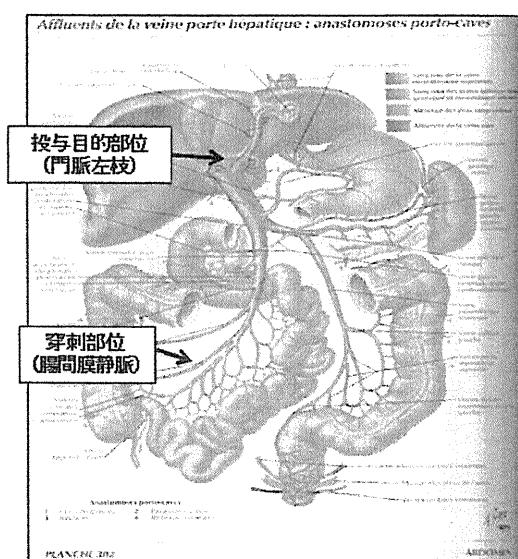
②自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて、実験ブタに同様の処置を施し、血管撮影装置、MRI撮影装置を用いて、同手法に関する画像解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、研究施設における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物愛護の精神で実施した。また、遺伝子組み換え実験に関しても、研究施設における遺伝子組み換え実験安全委員会の指針に従い、承認されたプロトコールで実施した。

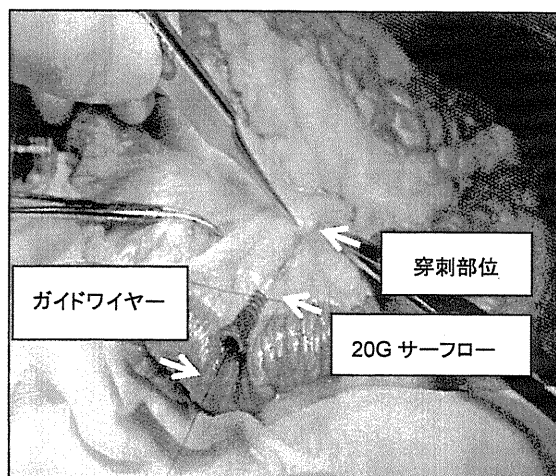
## C. 研究結果

①マイクロカテーテル法（図1）を用いた肝臓への遺伝子導入



（図1：マイクロカテーテル法概略図）

AAV 中和抗体陽性カニクイザルに対し、全身麻酔下に傍正中切開にて開腹し、小腸の一部を体外へ出し、腸間膜静脈分枝の末梢側に血管留置針（サーフロー24G、Terumo, Japan）を穿刺した。サーフロー先端が血管内に留置していることを確認した後に、ガイドワイヤー（Runthrough 0.014 [0.36mm]、Terumo, Japan）を血管内に挿入・留置した。（図2）。



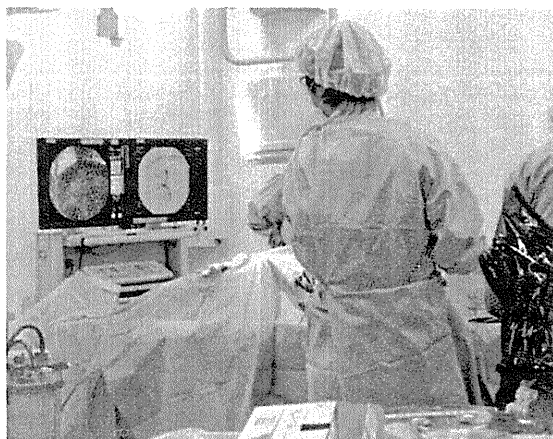
（図2：腸間膜静脈へ挿入された血管内留置針）

X線透視下に、ガイドワイヤーを門脈本幹から門脈左枝へと誘導し、マイクロカテーテル（イーグマン：3.3F（約1.1mm）、バルーン径10 x 6mm）（Temporary occlusion catheter）をガイドワイヤーに沿って挿入した。カテーテル先端付近のバルーンが門脈左枝にあることを確認した後に、造影剤を用いて同バルーンをインフレーションし、同部血流を一時的に遮断した。カテーテルから生理食塩水40mL（60秒）、AAVベクター10mL（15秒）、生理食塩水20mL（30秒）を順に注入し、ベクターと血液の接触を可及的に回避した。カテーテル抜去後同部を結紮閉鎖し、止血確認後閉腹して手技を終了した。手術中に明らかなバイタルの悪化は認められなかった。

同方法を用い AAV 中和抗体陽性カニクイザル計 3 頭に対しベクター導入実験を行ったところ、「門脈本幹直接穿刺法」と同様に全例に導入遺伝子由来第 IX 因子の発現が確認できた。

## ②実験ブタに対する門脈造影実験

全身麻酔下の実験ブタに対し②と同様の実験を行った (図 3)。カテーテルバルーンによる血流遮断後、門脈左枝に造影剤を注入したところ、造影剤が 30~60 秒間、門脈左枝並びにその分枝内に停滞している現象が観察された。その後造影剤は徐々に消失し、肝左葉に吸収分散したものとされた (図 4)。手術中にバイタルに大きな変化は認められなかった。



(図 3：実験ブタを用いた門脈造影)



(図 4：選択的門脈左枝造影像)

## D. 考察

血友病の遺伝子治療の前臨床試験として、より選択的で安全な遺伝子投与手技の確立を目的に検討を行った。平成 23 年度は、当初我々が提唱していた「門脈本幹直接穿刺法」に対する問題点を克服するために考案した「マイクロカテーテル法」を用いて、実際に AAV 中和抗体陽性カニクイザルに対し AAV ベクターを用いた肝臓への遺伝子導入投与実験を行った。検討の結果、腸間膜静脈分枝にガイドワイヤーを挿入し門脈左枝へと誘導することができ、さらに径 3.3F のマイクロカテーテルも挿入可能であることが示された。また生理食塩水による血液フラッシュ後のベクター注入も特に問題なく行えることが判明し、処置後も全頭に導入遺伝子由来第 IX 因子が発現していることが確認された。今回の実験により、本手法が AAV ベクターに対する中和抗体を有する患者に対する投与方法として非常に高い実現性を有していることが明らかとなった。

上記実験においては、「すでに前臨床試験として検討が進められている」「種々の血清型 AAV 中和抗体が検出されている」など、ヒトと類似点が多いことを理由に非ヒト霊長類であるカニクイザル (体重 5~6kg 程度) を用いた。しかしながら臨床における実際のベクター投与治療を想定した場合、約 10 倍 (成人の場合) の体格差による解剖学的な相違点を克服する必要がある。そこで我々は、体格がカニクイザルより大きく解剖も人間に類似している実験ブタ (体重 30~40kg) を用いたシミュレーション実験が必要不可欠と判断し、自治医科大学先端医療技術開発センターにおいて、実験ブタに対し同様の実験を行った。今回の検討では、実験ブタに対してもカニクイザルと全く同

じカテーテル手技が実施可能なことが判明し、更にカテーテル先端のバルーンをインフレーションし、血流を一時的に遮断した門脈左枝に造影剤を注入すると、一定時間（30~60秒間）門脈左枝内に造影剤が停滞することが確認できた。現在ベクターを使った遺伝子導入の効率に関しては「ベクターが細胞内に移入するためには一定時間以上の接触時間が必要である。」という概念が一般的であり、同現象は本実験の目的である導入遺伝子由来第 IX 因子の発現効果に有利に働いている可能性が示唆された。今後は実験ブタを用いた同様の実験を継続し、臨床治療に即した適正な投与条件（カテーテルサイズ、バルーンサイズ、門脈血流遮断時間、生理食塩水やベクター溶液の投与量等）を検討したいと考えている。我々が取り組んでいる肝臓門脈系への選択的投与法は、日本人のほぼ半数が陽性を示すと考えられている AAV 中和抗体陽性症例に対して、その影響を回避するための有力な手段となると思われる。よって本研究は血友病遺伝子治療の臨床応用に向け、その投与方法に極めて重要な示唆を与えるものと考えている。

#### E. 結論

AAVベクター中和抗体陽性のカニクイザル（非ヒト霊長類）において、カテーテルを用いて経門脈的に肝臓左葉にAAVベクターを投与することに成功した。同結果により、AAVに対する中和抗体の影響を回避するための「カテーテルを用いた肝臓への選択的なAAVベクター投与法の開発」という当初の目的がほぼ達成されたと考えられる。今後は、より効率的でかつ対象患者に負担の少ない投与条件の適正化を図る予定である。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）  
分担研究報告書

血友病遺伝子治療用ベクター製造技術の開発

分担研究者 長谷川 護 ディナベック株式会社 代表取締役社長

研究要旨

アデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8：AAV8）ベクターを利用した血友病遺伝子治療の臨床研究実施に必須である AAV8 ベクターの Good Manufacturing Practice（GMP）グレードの製造および前臨床安全性試験実施に関わる研究支援を行った。GMP レベル製造を完了し、安全性試験も進行中である。また、血友病遺伝子治療の次世代ベクターとしての位置づけであるサル免疫不全ウイルス（SIV）ベクターについて、臨床応用を可能にするためのベクター製造法・品質検査法を整備し、臨床研究実施技術として使用できる見通しとなった。

A. 研究目的

本研究に於いて、アデノ随伴ウイルス 8 型（adeno-associated virus-8：AAV8）ベクターの利用は、血友病遺伝子治療の臨床研究の実現を最優先視するものであり、我々はそれに必須な製造および前臨床安全性試験実施に関わる研究支援を実施している。一方、サル免疫不全ウイルス（Simian Immuno-deficiency Virus：SIV）ベクターは、AAV8 ベクターのバックアップ或いは次世代技術としての性能を持たせ、いつでも代替可能な状況にしておくことを目的とし、臨床研究に対応可能なレベルの製造法・品質検査法を整備しようとしている。

B. 研究方法

(1) hFIX-AAV 8 ベクターの臨床研究実施準備  
hFIX-AAV 8 ベクターのベクター製造は本元正陽基因技術有限公司（Vector Gene Technology Company Limited：VGTC）、ベクターを用いた前臨床安全性試験は（Joinn Laboratories：Joinn）で実施するため、当社の医薬開発の経験に基づき相手方の準備と実施を円滑に行わせる支援を行う。

(2) SIV ベクターの GMP レベル対応製造技術の確立

AAV ベクターのバックアップ技術である SIV ベクターについても、臨床研究の実施が可能なレベルにまで製造技術を向上させる。品質検査技術も同時に整備し、本ベクター製造に関して統合的なシステムを整備する。

（倫理面への配慮）

現在用いている実験材料・方法について倫理的な問題は付随しない。

C. 研究結果

(1) hFIX-AAV 8 ベクターの臨床研究実施準備

昨年度実施の GMP レベルのベクター製造のフォローアップ等、技術的検討も含め VGTC との技術・情報交換、および前臨床安全性試験の実施に向けた Joinn との協議など必要な支援を行った。

(2) SIV ベクターの GMP レベル対応製造技術の確立

SIV ベクターの製造について、上流工程（細胞播種密度、トランスフェクション時の DNA 濃度、温度、時間、その他条件、培地種類他）および下流工程（精製条件）を最適化し、また、製造物の品質検査（QC: Quality Control）に必要な項目を検討して標準作業手順書（SOP: Standard Operating Procedure）を整備した。その上で、実際に同ベクター薬剤について、GMP レベル製造が可能であることを確認した。

D. 考察

hFIX 搭載 AAV8 ベクターの GMP レベル製造物を用いた前臨床安全性試験が本年度（H23 年度）中に実施できる見通しとなった。その実施により、ベクター製造法の確立と合わせて本血友病遺伝

子治療の臨床研究の実施条件が整備されることになる。また、これにより同ベクターを用いた他の遺伝子治療実現にも寄与するものとする。次年度予定の臨床研究実現を目指し担当する支援を継続していく方針である。

SIV ベクターについても、GMP 製造の実施に目処がついた。こちらも臨床応用へ向けての準備が整ってきており、次年度はその完成を目指す。

出願番号：特願 2002-258576 (2002/9/4)  
状態：出願公開中。

#### E. 結論

血友病 B 遺伝子治療の臨床研究実施へ向けて、hFIX を搭載した AAV8 ベクターの GMP レベル製造を完了し、安全性試験実施しつつある。次年度以降の臨床研究の実現に条件整備が大きく前進したと結論される。

SIV ベクターについても、臨床研究実施可能な技術が準備できる見通しとなり、本疾患遺伝子治療への手厚い技術整備がなされた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

1 論文発表  
なし

2 学会発表  
なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

「ヘマグルチニン活性を有するシュードタイプレトロウイルス vector」

出願番号：特願 2000-169090

海外出願各国移行済み

「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」(D3-A0103)

出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8)

状態：審査請求済み

「シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陰性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法」(D3-A0204)

血友病およびその治療に関連した遺伝子解析研究

研究分担者 稲葉 浩 東京医科大学臨床検査医学講座

研究要旨:

これからの血友病医療は患者の特徴に基づいたオーダーメイド的な対応を考慮すべきである。遺伝子情報は個々の患者の特徴を把握するうえで非常に効果的であり、特に責任遺伝子の情報は最も基本的かつ重要である。

これまで我々は、日本人血友病 A 患者の第 VIII 因子遺伝子(F8)における病因遺伝子変異の同定・解析を進め、血友病医療に応用可能な知見の獲得を目指してきた。しかしながら病因遺伝子変異は極めて多種多様であり、またこれに由来するフェノタイプも画一的ではなく、目的を達成するためにはより多くの症例の蓄積が必須であると考え、継続的な遺伝子解析を施行した。

今年度の研究では血友病 A 13 例の解析を施行し、12 例で病因と考えられる遺伝子変異を同定することに成功した。軽症患者の 1 例では、すでに我々が報告した本邦における創始者効果であるミスセンス変異(Tyr473Cys)を検出し、本変異の本邦への浸透度の高さが確認された。また、非 LTR 型レトロトランスポゾンである LINE-1 エLEMENT の 2,134bp がイントロン 16 内に挿入した非常に希少な挿入変異も確認された。さらに、これまでの解析で病因遺伝子変異が検出できなかった 5 症例のうちの 1 症例については、異所性発現による mRNA の解析から、イントロン 9 の深部に新たなスプライス供与部位を形成すると予測される新規点変異を同定した。

これらの結果は病因遺伝子変異の多様性を再認識させるものであり、今後も継続的な遺伝子解析が必要であると考えられる。

A. 研究目的

現在の血友病医療は遺伝子組み換え製剤や血漿由来製剤を用いた補充療法が一般的である。しかしながら近年、新規治療薬や新規治療法の研究開発が目覚ましい勢いで進んで来ており、血友病医療は患者の特徴に基づいた本格的なオーダーメイド医療が展開可能な時代を向えつつある。

遺伝子情報は個々の患者の特徴を把握するうえで非常に効果的であり、特に責任遺伝子の情報は最も基本的かつ重要である。これまで我々は、日本人血友病患者の病因遺伝

子変異の同定・解析を積極的に進め、オーダーメイド医療に応用可能な知見の獲得を目指してきた。しかしながら病因遺伝子変異は極めて多種多様であり、またこれに由来するフェノタイプも決して画一的ではなく、目的を達成するためにはさらなる症例の解析が必要であると考えられた。

本研究では病因遺伝子解析から血友病医療に応用可能な知見の獲得を目指す。

B. 研究方法

1. F8 塩基配列解析



ゲノム DNA は末梢血白血球から抽出した。*F8* の各エクソンとそのイントロンとの境界領域は 33 反応の PCR で増幅した。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動後、ゲルから切り出し QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いて精製した。この精製 PCR 産物をプレートとしてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は *F8*-001 transcript (ENST00000360256)の塩基配列と比較した。

## 2. *F8* ハプロタイプ解析

*F8* のハプロタイプは 3 種類の SNP(rs6649625, rs1470586, rs1800291)と 1 種類の STR(イントロン 13 内 CAリピート)の解析から決定した。SNP と STR はそれぞれ、多型部位を含む領域を PCR にて増幅し、SNP は増幅産物を制限酵素で切断し、STR は増幅産物の塩基配列を決定して解析した。

## 3. *F8* mRNA の解析

末梢血白血球から QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出し、サンプルとした。mRNA の解析は El-Maarri らの報告した二段階 RT-PCR 法を用いて行った。すなわち、全長の *F8* mRNA をまず 4 分割して RT-PCR にて増幅後、各増幅産物をさらに 2 分割して通常の PCR にて増幅し、得られた産物を観察した。mRNA 量は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)で cDNA を合成した後、4 種類の TaqMan Gene Expression Assay(Hs00240767\_m1; エクソン 1-2 間を増幅、Hs01109548\_m1; エクソン 6-7 間を増幅、Hs01109541\_m1; エクソン 14-15 間を増幅、Hs01109543\_m1; エクソン 20-12 間を増幅、Applied Biosystems)を用いて定量化を試みた。定量は白人男性の肝細胞由来の total RNA (Firstchoice human liver total RNA, Ambion)から同様の操作にて作製した cDNA を対照とし、デルタデルタ Ct 法を用いた半定量を行った。

## 4. 凝固学的解析

第 VIII 因子活性測定は自動凝固測定装置 ACL9000(Instrumentation Laboratory)と APTT 試薬(HemosIL™ APTT-SP; Instrumentation Laboratory)を用いた凝固 1 段法で行った。

## 5. バイオインフォマティクス解析

検出されたミスセンス変異の特徴を把握するため、検出されたアミノ酸の溶媒へアクセシビリティは Protein Solvent Accessible Surface Area Predictor (ASAP; <http://ccb.imb.uq.edu.au/ASAP/>)で、アミノ酸置換が機能に与える影響(有害度)は PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)で解析した。また、スプライシングの予測は GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) と Berkeley Drosophila Genome Project (<http://www.fruitfly.org/index.html>)で行った。

## (倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析、およびタンパク質解析については、東京医科大学倫理委員会にて承認された研究計画に基づき、対象者にはインフォームド・コンセントのうえで施行された。特に遺伝子解析結果は重要な個人情報であるため、保護には十分に留意したうえで施行した。

## C. 研究結果

### 1. 病因遺伝子変異の同定

今年度の研究では、重症 9 例、中等症 2 例、軽症 2 例の計 13 例の血友病 A 症例の *F8* を解析した。その結果、重症例の 1 例を除く 12 例で病因と考えられる変異を同定し得た。同定された変異はミスセンス変異 5 例、逆位 3 例、欠失 3 例、挿入 1 例であった。

### 2. ミスセンス変異

ミスセンス変異は 5 種類(Arg282Cys、

Tyr473Cys、Arg1689Cys、Thr1985Lys、Gly2088Ser)検出された。このうち Thr1985Lys はこれまでに報告のない新しいミスセンス変異であった。今回検出された 5 種類のミスセンス変異は、いずれも動物種間で非常に良く保持されているアミノ酸で起こっており、アミノ酸置換によって第 VIII 因子(FVIII)の機能が障害されるであろうことが PolyPhen-2 による解析から予測された。

これまでの我々の解析から創始者効果であることが確認されている Tyr473Cys が新たに検出されたため、この症例の F8 ハプロタイプ解析を確認したところ、これまでの Tyr473Cys 症例と同一のハプロタイプであった。

### 3. 挿入変異

臨床症状としては典型的ではないものの、FVIII 活性では中等症に分類される 1 例から非常に希少な挿入変異を同定した。この挿入は約 2,134bp の大きさで、エクソン 16 から 98bp 下流のイントロン 16 から検出された。ホモロジー解析から挿入されている塩基配列は、非 LTR 型レトロトランスポソンの長鎖散在反復配列である LINE-1 エlement であることが確認された。

### 4. 病因遺伝子変異が不明であった症例の解析

これまでの我々の解析において、今年度の 1 症例を含めた 5 症例では病因と考えられる変異が検出できなかった。今年度はこのうちの 2 例について F8 mRNA の解析を行った。その結果 2 例はともに、観察する部位によって mRNA の量が異なるような現象が観察された。遺伝子の途中で mRNA 量が大きく減少するような現象が確認された 1 例について詳細な解析を行ったところ、エクソン 9 から 602bp 下流のイントロン 9 内で、アデニンからグアニンへのトランジション(c.1443+602A>G)が検出された。このトランジションは、変異としてもポリモルフィズムとしてもこれまでに報告されておらず、また我々の行った 124 本の日本人 F8 から検出されない

希少なものであった。

### D. 考察

今後の血友病医療は患者の特徴に基づきオーダーメイド化を図る必要がある。特に本研究班が目標とする遺伝子治療や細胞治療を効果的、かつ安全に施行するためには、患者の病態を可能な限り詳細に把握することは必須である。病因遺伝子変異は患者の病態を把握するうえで最も基本的かつ有用な情報である。

血友病 A の病因遺伝子変異は多種多様であり、今回の解析で検出された変異も、逆位以外は患者ごとに異なり、また HADB (Haemophilia A Mutation Database)データベースに登録のない、あるいは少数しか登録のない希少なものも含まれた。このことは、各患者の血友病 A の特徴を明確にするうえで F8 の解析が必須であることを示唆していた。

Arg282Cys は点変異のホットスポットである CpG ダイヌクレオチドでのシトシンからチミンへの変異であり HADB にも 10 例の登録がある。一般的にミスセンス変異は軽症または中等症を引き起こす。Arg282 は A1 ドメイン上の A2 ドメインとの接触面に位置しており、10 Å 以内の近傍に、A1 ドメインには Ala284 が、A2 ドメインには Arg531 がある。Ala284 と Arg531 での変異がともに軽症を引き起こし、また測定法によって異なる FVIII 活性を示す変異として報告されていることから、Arg282 も同様の表現型を呈することが予測されたが、本症例は重症型であった。HADB に登録されている 10 例のうちの 9 例も重症型であることを考えると、Arg282Cys は重症型を引き起こす変異であると考えられた。荷電が失われることやフリーの Cys 残基が生ずることで立体構造が大きく変化することが原因ではないかと考察される。

Tyr473Cys は我々のこれまでの解析から、日本人での創始者効果であることが示されている。本年度の解析において、また新たに 1 例

検出されたことは、本変異が深く本邦に浸透していることを示唆していた。

今年度の解析では非常に稀有な LINE-1 エレメントの挿入変異が同定された。LINE-1 は約 6,000 塩基の長さの非 LTR 型レトロトランスポゾンであり、ヒトゲノム全体の約 20%を占める。ヒトゲノム中には 500,000 コピー以上存在し、F8 内にも 74 コピー存在する。病因遺伝子変異としての大規模な挿入変異は稀であり、特にこのような反復配列の挿入変異が検出されるのは非常に稀で、これまでにエクソン14内で2数例が報告されているのみである。本症例の挿入部位はイントロンであったため病因であるかは現在のところ確認できていないが、遺伝子の他の領域から変異が検出されなかったこと、および in silico 解析でスプライシングに影響することが予測されたことは、この挿入が病因である可能性を強く示唆していた。今後、患者の mRNA 解析から病因であることを確認する予定である。

今回の解析では、これまで病因遺伝子変異が検出できなかった症例についても検討し、病因の可能性が極めて高い点変異(c.1443+602A>G)をイントロンの深部から同定し得た。F8 解析では、コーディング領域とその近傍をPCRにて増幅し解析する手法が最も一般的に用いられている。しかしながらこの方法で解析される範囲は遺伝子全体のおよそ1割に過ぎない。残りのイントロン領域での変異は、mRNA の合成障害などにより間接的に血友病Aを引き起こす可能性がある。我々は、異所性発現ではあるが、白血球から抽出した F8 mRNA を詳細に解析し、イントロンの深部の点変異を検出した。これまで行われてきた解析では、病因遺伝子変異が検出できない症例が約2%存在するとの報告があり、このような症例に mRNA の解析を施行することは非常に効果的であると考えられた。

## E. 結論

日本人血友病 A 患者の F8 を対象とし病因遺伝子変異の解析を行った。得られた結果は、これまでの解析で確認されてきた多様性を再認識させられるものであり、このことは患者の特徴を把握するうえでは患者ごとの遺伝子解析が必須であることを示した。しかし一方で、軽症型血友病 A を引き起こす一部のミスセンス変異は、創始者効果として本邦に広く浸透している可能性、そしてこれが日本人の血友病 A の病因変異の特徴を形成するであろうことが示唆された。遺伝子解析は血友病医療の発展と充実には必要不可欠であり、今後も継続的な解析が必要である。

## F.健康危険情報

特になし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Suzuki T, Yamamoto Y, Amano K, Fukutake K: Factor VIII haplotypes of Japanese population show similarity to those of Caucasian populations. *Haemophilia*. 2011 Dec 19. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02715.x. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

① Inaba H Laboratorial heterogeneity in moderate to mild hemophilia A. 第4回東アジア血友病フォーラム 2011年6月 天津市

② Inaba H, Shinozawa K, Suzuki T, Otaki M, Seita I, Ogata K, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Hagiwara T, Yamamoto Y, Amano K, Fukutake K Mutation analysis of hemophilia A in the Japanese population: increased prevalence of Tyr473Cys caused by founder effect. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市

③Shinozawa K, Maeda K, Amano K, Abe M, Inaba H, Fukutake K Factor V deficiency due to FV Phe190Ser homozygous mutation, but no bleeding tendency. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市

④ Chikasawa Y, Amano K, Shinozawa K, Matsumoto T, Inaba H, Shima M, Fukutake K Diagnosis of type 2N von Willebrand disease in a Japanese patient by pharmacokinetics, factor VIII binding assay and gene analysis. XXIII congress of the international society on thrombosis and haemostasis 2011年7月 京都市

⑤ 篠澤圭子、沖本由理、天野景裕、萩原剛、角田治美、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 重度の出血症状を示す先天性第 V 因子欠乏症の新しい複合ヘテロ接合体変異 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月 名古屋市

⑥ Hagiwara T, Shinozawa K, Amano K, Inaba H, Yamamoto Y, Suzuki T, Ogata K, Otaki M, Seita I, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Fukutake K Female hemophilia B with homozygous missense mutation p.Ala337Val in the factor IX gene. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月 名古屋市

⑦ 篠澤圭子、天野景裕、大瀧 学、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 遺伝子解析による血友病の保因者診断の検査システムの構築 第58回日本臨床検査医学会学術集会 2011年11月 岡山市

⑧ Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K The etiology of hemophilia hiding deep inside the F8 intronic sequence. 第53回米国血液学会 2011年12月 サンディエゴ市

⑨ Shinozawa K, Okimoto Y, Amano K, Kakuda H, Hagiwara T, Suzuki T, Inaba H,

Fukutake K Severe factor V deficiency caused by a novel compound heterozygous mutation: factor V G1617V and 1-bp insertion. 第53回米国血液学会 2011年12月 サンディエゴ市

H.知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ウイルス感染血友病患者の手術適応に関する研究

研究分担者 竹谷 英之 東京大学医科学研究所 附属病院 関節外科 講師

研究協力者 鯉淵 智彦 東京大学医科学研究所 附属病院 感染免疫内科 助教

研究要旨：血液製剤により C 型肝炎ウイルス（HCV）やヒト免疫不全ウイルス（HIV）に感染した血友病患者は初期感染からの時間経過により、HCV による肝硬変や肝がんの発症といった問題が起こっている。その一方でこのような患者の高齢化は、従来の血友病性関節症に加齢による退行性変性も加わり、より重症の関節症に苦しむ患者をも増加させている。この問題に HIV 感染による免疫不全も加わっているため、整形外科的手術適応基準のみで整形外科治療を行うことは難しく、内科的にも手術適応基準が必要である。本研究では内科的整形外科手術適応基準（案）を作成し、その基準を基に行った 51 例 99 手術の結果を報告する。

#### A:研究目的

血友病性関節症に対する手術は血液製剤の進歩により可能になったその一方で、血液製剤による不幸なウイルス感染は 20 年以上経過して、肝硬変や肝がんの原因として、問題となっている。実際に平成 20 年の血液凝固異常症全国調査報告によれば、年間死亡例のうち非 HIV 非感染者の死因の 50%が、HCV 感染が原因と考えられる重篤な肝疾患である。また成人血友病患者の高齢化（加齢）による退行性変性が血友病性関節症に影響し、より重篤な関節機能障害になっていくために、手術適応となる患者が増加している。このような重篤な肝機能障害を持った血友病患者に対して整形外科手術を行う際に、HIV 感染症のことも含め内科的適応を確立することは重要である。さらにさまざまな血友病に関連する観血的治療の適応を今後考慮する際にも、このような基準を確立させておくことは重要である。そこで当院で整形外科的手術治療を受ける血友病患者の全身状態と術後の経過を基

に、血友病患者の観血的治療の適応基準を作成すること、さらに妥当性を確認することが目的である。

#### B:研究方法

2006 年 4 月から 2006 年 12 月までに当院で行った血友病患者に対する整形外科的手術の結果を基に、内科的手術適応判定基準（案）を作成した。この判定基準（案）を 2008 年以降の手術に適応し、その結果と適応基準外で手術を行った症例の結果を調査し、適応基準（案）の妥当性を検討した。手術の短期的な影響に対して、術前・術後の肝臓機能や免疫機能や術後早期の創部感染症や日和見感染症の発生の有無を調査した。また長期的な手術の影響に対して、術後一年の感染症と生命予後について調査した。なお今回行った術前・術後の検査は通常行われるものばかりで、この研究のために特別な検査を行ってはいない。

#### C:研究結果

2006年の手術件数は14件で、2007年から2011年12月までの手術件数は99件であった。全体として63例113手術が行われ、手術時平均年齢は39.03歳(13歳から60歳)であった。このうちHCV感染もHIV感染もなかったのは11手術(9.7%)であった。HCV抗体が陽性であったのは101手術(89.4%)でこのうちHCV-RNAが検出されたのは29手術、検出されなかったのは61手術であった。一方HIV抗体が陽性であったのは39手術(34.5%)で、このうち1手術だけがHCV抗体陰性で、残りの38手術はHCV/HIV重複感染手術症例であった。

2006-の14手術において術後1年以内で、それぞれ肝不全と敗血症を死因とする2例の死亡例があったため、下記のような内科的手術適応基準(案)を作成した。HIV抗体陽性患者の場合、①CD4陽性Tリンパ球数が200/ $\mu$ l以上、もしくは②CD4陽性Tリンパ球数が①150/ $\mu$ l以上、かつHIV-RNA量が検出感度以下を手術適応とした。一方HCV抗体陽性患者の場合、①血小板(10万以上)、②ヒアルロン酸(100ng/ml未満)、③IV型コラーゲン7S(9ng/ml未満)、④AFPかつPIVKA-II(基準値以内)、⑤ICG(15分値10%未満)そして⑥腹部エコー(LC/HCCの確認)、以上6項目の基準を満たさない場合腹部造影CTを行い、HCCがない場合上部消化管内視鏡検査を追加し、静脈瘤の状態を確認しChild分類で評価した。Child Aは手術可能、Child Bは手術治療の再検討、Child Cは手術回避とした。また腹部CTでHCCが存在したり、疑われた場合にはHCCの精査や治療後まで手術を延期することとした。この基準で死亡した2症例を再評価すると、HIVの基準は2例とも満たしていたが、肝機能評価でChild Bに1例2手術、

Child Cに1例1手術となる。

2007年-2012年12月までの99手術において、手術回避と判断された症例はなかったが、3例6手術で、手術適応の再検討となった。2例4手術はHIV抗体は陰性でChild Bと判断された症例で、1例はHCCに対する術後症例であった。この2例において術後の肝機能や感染そして術後1年の予後に問題はない。また1例は肝機能基準は満たすもののCD4陽性Tリンパ球数が100/ $\mu$ l未満の1例2手術で、術後感染もなく、重篤な合併症は現在のところ発生していない。

その他手術適応に問題がないと評価された症例における術後合併症は、皮膚縫合不全が4例4手術、感染症が3例5手術で見られた。皮膚縫合不全は足関節手術に多くみられた。感染症は術前に感染が見られた1例3手術以外の2例はインヒビター症例であった。血栓症を呈する症例はなかった。

また今回の調査中、手術予定を立てた一例が吐血後肝不全を併発して、入院前の手術適応判断のための検査中に近医で死亡した。血友病BでHCV/HIVの重複感染例であった。検査結果はすべてそろっていないが、上部消化管からの出血が吐血の原因であり、術前の内視鏡検査の重要性を示すものであった。

#### D：考察

内科的整形外科手術適応基準(案)で、手術適応が検討された99例において、HIVやHCVの感染症が手術に悪影響を与えたと判断される事例は一例も発生していない。しかしそれ以前の14手術の中で術後1年以内の死亡例2例があった。いずれも手術が直接影響したとは言えないが、死亡した症例はいずれも肝機能が低下していた症例であり、Child B

と評価された症例について詳細な今後も手術適応検討が必要であろう。また HIV 抗体陽性患者の術後経過はいまのところ経過良好であるが、症例を重ねて検討を行う必要がある。

肝機能評価の基準となる一部の検査項目で実施率が低かったことについては、その検査の必要性を再検討し検査項目の見直しが必要であると考えられた。

HIV の判定基準として、CD4 細胞数が 150 個/mcl 以上且つ HIV-RNA がコントロールされていることとあるが、緒家の報告において 150 個/mcl を基準にしている報告はない。そして我々の症例で CD4 細胞数が 50-100 個/mcl でも HIV-RNA のコントロールが良い症例 1 例 2 順調であることから、基準値の見直し 50 個/mcl とした。その基準であれば、従来の基準で手術検討要と判断された症例が、手術可能となる。

今回手術を回避・中止と判断される手術対象患者はなかったことや、手術適応の再検討とされた手術が、全体の 6%6 手術と少なく、2010 年以降一例もない。手術患者を紹介して頂ける施設に、この診断基準が浸透してきているためかもしれない。

血友病において、ウイルス感染症は内科的手術を決定する際の特徴である。しかし血友病患者の高齢化に伴って、それ以外の問題も最近無視できない状況になってきている。特に整形外科の下肢手術に危険性が高まる深部静脈血栓症の発生については、凝固異常である血友病であっても血液製剤補充により凝固系が手術治療期間中正常化されているため、注意深く状況を把握する必要がある。また一般的な糖尿病や高血圧症などの内科的疾患の罹患率も高率になることが予想される。さらに今回の調査で高率に感染症がインヒビター

症例に見られたなど、手術適応を決定する際の考慮すべき項目をさらに検討する必要があると考えられた。

#### E:結論

13 例の手術成績を基に作成した内科的整形外科手術適応基準を、99 例に適応し検討した。その結果、手術回避・中止と判定された症例はなく、手術再検討とされた 3 例 6 手術(6%)で、手術への影響は認められず、適切な手術適応基準であると評価できた。しかし深部静脈血栓症など血友病患者の高齢化に伴い、さらに評価すべき項目もあり、手術適応の内科的判断について、今後も検討していく必要があると考えられる。

#### F:健康危険情報

なし

#### G:研究発表

なし

#### H:知的財産権の出版・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

血液凝固異常症の QOL に関する研究

分担研究者：瀧 正志（聖マリアンナ医科大学小児科学教授 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科部長）

研究協力者：血液凝固異常症 QOL 調査委員（五十音順）

大平勝美（はばたき福祉事業団）、小島賢一（荻窪病院血液科）、白幡 聡（北九州八幡東病院）、鈴木 輝江（静岡県へモフィリア友の会）、竹谷英之（東京大学医科学研究所附属病院関節外科）、立浪 忍（聖マリアンナ医科大学医学統計学）、仁科 豊（仁科・深道法律事務所）、花井十伍（ネットワーク医療と人権）、堀越泰雄（静岡県立こども病院血液腫瘍科）、牧野健一郎（相生リハビリテーションクリニック）、松本剛史（三重大学医学部附属病院輸血部）、吉川喜美枝（聖マリアンナ医科大学病院看護部）、和田育子（荻窪病院看護部）

研究要旨

本研究は、わが国の血液凝固異常症における生活状況を調査し、現在何が問題となっているのか、また、その QOL を改善するためには何が必要なかを把握することを目的として行われた。本年度は昨年度に抽出された QOL を阻害する要因のクロス集計および自由記載欄に記載された内容の解析を行い、血液凝固異常症の QOL 改善のための提言を行った。詳細は、「血液凝固異常症の QOL に関する研究 平成 23 年度調査報告書」に記載した。

A. 研究目的

血友病等の血液凝固異常症は出血および出血の後遺症のみならず、非加熱製剤に因る HIV 感染、肝疾患（肝硬変、肝癌）など身体的な問題や社会的偏見・差別などの社会的にも解決されるべき多くの課題が残されている。本研究は血液凝固異常症の QOL 調査を包括的に患者の視点に立脚して行うことにより、血液凝固異常症の QOL を総合的に評価する。また、今回の調査では、前回調査で欠落した項目を追加して最新の情報を集め、前回調査の報告書および行政・医療関係者・患者および家族への提言に対する患者による評価、患者と医療関係者が

考える QOL 阻害要因が一致しているかどうかについても検討し、さらに自由記載欄から患者でなくては分からない視点からの問題点などを明らかにする。

B. 研究方法

1) 対象と方法

全国の血液凝固異常症患者を対象とした。調査方法はアンケート形式で、血液凝固異常症全国調査で構築されたネットワークもとにした全国の医療施設の担当医および協力が得られた全国の患者組織を介し患者および保護者に配布し、記入された調査用紙を料金後納郵便として匿名で事務局に直



接返送してもらった。また、担当医を含む血友病診療に携わる看護師、臨床心理士・ソーシャルワーカー、PT・OTなどに対して患者の QOL を低下させる要因について患者への質問と同一のアンケート調査を行った。

## 2) 調査項目

患者あるいは保護者に対する調査項目は、全年齢に共通の質問と、22 歳以上の対象に限定した質問の 2 つに分け、全年齢に共通の質問は、調査項目は、疾患、同居家族、アンケートの依頼者、血友病患者会などの患者組織への参加、出血頻度、標的関節、血液製剤の輸注回数、患者自身が重要と考える QOL を低下させる要因、治療状況、在宅自己注射、定期補充療法、製剤の選択者、製剤に関する不安事項、インヒビター、完治を目指した治療法に関する認知度および期待度、歯科受診に関すること、筋骨格系障害と整形外科、リハビリの受診状況、医療施設に関すること、社会生活に関すること、学校生活、差別、周囲への疾病の開示、老後の問題、訪問看護ステーションに関すること、家族の理解、就職、職業、雇用形態、年収などの各項目を調査した。また、前回行った調査の報告書および行政・医療関係者・患者および家族への提言に対する意見などを評価してもらった。22 歳以上の対象に限定した質問は、HIV 感染、肝炎に関することである。さらに対象全例に対して、1) 医療制度・医療体制、2) 社会生活、3) 治療法、4) 病状、5) 患者会、6) 今回の調査内容について意見や希望を述べる自由記載欄を設けた。

医療関係者に対する調査項目は、職種、

勤務している医療施設の形態、地域、血友病などの血液凝固異常症の治療に関わる経験年数、携わった患者の年齢および患者数、そして患者の QOL を低下させる要因について小児と成人に分けて上位 5 番目までを順位を付けて選択してもらった。

(倫理面への配慮)

研究対象者である血友病等の血液凝固異常症患者に対する人権擁護上の配慮は、患者個人が特定できる調査項目を調査項目に含めないなど倫理面への配慮には十分留意する。この調査の実施にあたり、疫学に関する倫理指針 11「他の機関等の試料の利用」に基づく本調査の運用形態について、聖マリアンナ医科大学医科大学倫理委員会臨床試験部会に審査を申請し、承認された（承認番号第 1671 号）。

## C. 研究結果

研究結果については、「血液凝固異常症の QOL に関する研究 平成 23 年度調査報告書」に記載した。

## D. 考察

本年度は昨年度の一次解析を基にして、各項目間のクロス集計を行い分析した。また、自由記載については、テキストデータの分類手法により、統計的な解析を行い、患者および家族の心配ごとおよび関心などについて分析を行った。さらに、昨年度の一次解析結果ならびに本年度の二次解析結果をもとに、血液凝固異常症患者の QOL の現状の総括と QOL の向上に貢献するための提言を行った。

## E. 結論

昨年度に抽出された QOL を阻害する要因のクロス集計および自由記載欄に記載された内容の解析を行い、QOL の総括および血液凝固異常症の QOL 改善のための提言を行った。

## F. 研究発表

### (1) 論文発表

1. 瀧 正志：血友病、小児科診療ガイドライン第2版、総合医学社（五十嵐隆編集）、p276-279, 2011
2. 山下敦己、長江千愛、庄司朋子、武藤真二、吉川喜美枝、脇坂宗親、北川博昭、瀧 正志：乳幼児の重症型血友病患者に対する中心静脈カテーテル(CVADs)の使用経験、日小血会誌、25(3):123--129, 2011
3. 田中一郎、天野景裕、瀧 正志、岡敏明、酒井道生、嶋緑倫、白幡 聡、竹谷英之、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、堀越泰雄、松下正、松本剛史、三室淳、吉岡章：東日本大震災で被災された血友病患者への支援、血栓止血誌、22(5):259-265, 2011
4. Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya J, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Tanaichi M, Yoshioka A, Study group on factors involved in formation of inhibitors to factor VIII and IX preparations: An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. Haemophilia, 17:771-776, 2011.11

### (2) 学会発表

1. 瀧 正志：(教育講演) 血友病治療の現状と展望、第12回日本検査血液学会、2011.7
2. 山崎 哲、鈴木典子、山崎法子、高山成伸、瀧 正志、血栓止血検査標準化小委員会：APTT 標準化に向けたパネル血漿作成の検討—ヘパリン感受性—、第12回日本検査血液学会、2011.7
3. 鈴木典子、山崎 哲、辻村浩司、高山成伸、瀧 正志、向出佳恵：VWF 測定試薬「BC フォンビレブランド試薬およびvWF Ag 試薬」の評価、第12回日本検査血液学会、2011.7
4. Masashi Taki, Hideji Hanabusa, Katsuyuki Fukutake, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group :Clinical experience of previously untreated patients (PUPs) with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method (rAHF-PFM) from post-authorization safety surveillance (PASS) program in Japan, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
5. Chiai Nagae, Tomoko Shoji, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Masashi Taki: The interim results of the usefulness of primary prophylaxis in hemophilia patients at our hemophilia center, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
6. Kaoru Kitsukawa, Hideyuki Takedani, Midori Shima, Masashi Taki, Hemophilia Committee, Japan Society of Pediatric Hematology: Imaging evaluation of arthropathy at the beginning of prophylactic therapy for severe hemophilia children, The 23th Congress of ISTH, 2011.7

7. Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Tomoko Shoji, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Chiai Nagae, Masashi Taki: Interpretation and significance of anti-FVIII antibodies detected by ELISA and Western blotting, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
8. Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Tomoko Shoji, Shinji Muto, Masashi Taki: Comparison of in vivo recovery of recombinant factor IX and plasma derived factor IX in previously treated Japanese hemophilia B patients, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
9. Katsuyuki Fukutake, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group: The post-authorization safety surveillance (PASS) program confirmed actual clinical safety and efficacy of antihemophilia factor (recombinant) plasma/albumin-free method factor VIII among Japanese subjects, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
10. Tadashi Matsushita, Hideji Hanabusa, Katsuyuki Fukutake, Masashi Taki, Midori Shima, Akira Shirahata and the Advate PASS study group: Prospective Advate immune tolerance registry (PAIR) in Japanese hemophilia A patients with inhibitors: an interim report, The 23th Congress of ISTH, 2011.7
11. 長江千愛、庄司朋子、山下敦己、武藤真二、瀧 正志：二度目の免疫寛容導入療法で免疫寛容が得られた血友病Aインヒビターの2症例、第114回日本小児科学会、2011.8
12. 山下敦己、足利朋子、武藤真二、長江千愛、浅原美恵子、鈴木典子、山崎法子、山崎 哲、高山成伸、瀧 正志：免疫寛容導入療法中のインヒビター測定に関する検討—Bethesda 変法と ELISA 法の比較—、第114回日本小児科学会、2011.8
13. 武藤真二、長江千愛、足利朋子、山下敦己、平本準、橘川薫、瀧正志：脊髄硬膜外血腫を来した血友病の2症例、第114回日本小児科学会、2011.8
14. 瀧 正志：(コーポレートセミナー27) 日本における血友病患者のQOLの現状と課題、第73回日本血液学会、2011.10
15. Chiai Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Kaoru Kitsukawa, Kimie Yoshikawa, Satoshi Yamazaki, Masashi Taki: Usefulness of primary prophylaxis in hemophilia patients. The 73<sup>rd</sup> annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2011.10
16. Shinobu Tatsunami, Jyunichi Mimaya, Akira Shirahata, Masashi Taki: 2010 update on the number of patients with coagulation disorders in Japan. The 73<sup>rd</sup> annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2011.10
17. 長江千愛、小倉妙美、堀越泰雄、工藤寿子、瀧 正志：血友病包括医療における今後の課題 ～静岡県立こども病院でのアンケート調査の結果をもとに～第53回日本小児血液・がん学会、2011.11
18. 藤野和恵 下村由美、吉川喜美枝、熊田知佳、足利朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、瀧正志：血友病患者の心理的援助を考える～思春期を向かえた患児

を通して学んだこと～、第 53 回日本小  
児血液・がん学会、2011.11

19. 立浪 忍、桑原理恵、秋田美恵子、三間  
屋 純一、白幡 聡、瀧 正志：2010 年度  
の HIV 感染血液凝固異常症の死亡例に  
ついて一血液凝固異常症全国調査より、  
第 25 回日本エイズ学会、2010.12
20. 長江千愛、足利朋子、武藤真二、吉川  
喜美枝、山下敦己、瀧 正志：わが国  
における定期補充療法のあり方  
-CVAD も含めて-、第 6 回日本血栓止  
血学会学術標準化委員会シンポジウ  
ム、2012.1

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

本研究とは関係がない。