

図 15 残存第 VIII 因子の 10%変動の影響

4. インヒビターの発生要因の分析と発生機序の解明に関する研究(第 4 研究)

45 施設 180 例の研究対象の内、遺伝子検査を実施したのは 39 例(血友病 A 34 例、血友病 B 5 例)であった(表 3 - 表 6)。血友病 A に関しては、過去に一度でもインヒビターの発生がみられた JHIS-1 対象群では、いわゆる null 変異とされる intron22 逆位、欠失、ナンセンス変異の占める割合が、その他の変異よりも高率(77%)との結果であった。一方、前方視的研究である JHIS-2 の対象群については、治療期間が 25ED に満たない症例を含んでいること、症例絶対数が少ないことの影響は除外されないものの、現在のところ、null 変異の有症例においてインヒビター発生率が高いという結果であった。血友病 B に関しては、表 5、6 に示す通りであった。なお、サイトカイン遺伝子についてはさらに症例が集積した後に一期的に実施する予定である。

Mutation		%
Intron22 inversion	4	31
Large deletion	1	8
Small deletion	2	15
Nonsense mutation	3	23
Missense mutation	3	23
Total	13	100

表 9 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation	Inh+(%)
----------	---------

Intron22 inversion	6*	3(50)
Small deletion	2	1(50)
Insertion	1*	0(0)
Nonsense mutation	3	2(67)
Splicing variants	1	0(0)
Missense mutation	8*	2(25)
Total	21	12(57)

(\*25ED に満たない症例を含む)

表 10 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation		%
Nonsense mutation	1	100
Total	1	100

表 11 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation		Inh+
Splicing variants	2	0
Missense mutation	2	0
Total	4	0

(\*25ED に満たない症例を含む)

表 12 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-2)

D. 考察

1. インヒビター発生患者の実体とインヒビター発生要因

J-HIS1/U20 研究での研究成果は国際学会誌に受理され、本研究の内容と結果については国際的にも認められた。本研究項目ではインヒビターの消失要因についても調査を行った。一旦出現したインヒビターのその後の経過に関する調査は全くされておらず今後データを整

理して投稿する予定である。

## 2. 新規血友病患者のデータベース構築

本年度は新規血友病患者のコホート研究におけるデータが集積された。まだ中間段階で症例数は少ないもののインヒビターの発生要因に関するわが国で初めての知見が得られた。新規登録患者78名中インヒビターは15名に見られた。現時点で患者の重症度別の比率は69.2%、中等症20.5%、軽症8%と一般的な患者背景であった。また、定期補充実施率は38.5%であるが、未治療群をのぞくと定期補充療法群は47.6%で、わが国では新規血友病患者の半数は定期補充療法を実施していることがわかる。インヒビターは全例血友病A患者に発生しているが、発生率は21.7%でわが国でも欧米と同様の発生率であることが確認された。使用製剤は遺伝子組み換え型製剤が8割を超え、本研究の対象患者では圧倒的に遺伝子組み換え型製剤の使用患者が多かった。インヒビター発生までの総投与日数は中央値13日であり、これまでの欧米の報告と同様の結果であった。未だ登録日数は少ないが、わが国における血友病患者のインヒビター発生要因について初めて評価できる重要なデータベースとなりうるということが確認された。今後、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

## 3. インヒビターの検出・診断の標準化

今回、インヒビターの定量的測定法である Bethesda 法の改良法である Nijmegen 変法の更なる改良法として東京変法を開発した。インヒビター測定のための Bethesda 法では、検体の希釈に 0.05M イミダゾール緩衝液を用いているが、Nijmegen 変法では正常プール血漿 (NPP) の pH を安定させるために、固形のイミダゾールを加えて 0.1N

とし 1N の HCl で pH を 7.4 に整える手法を求めている。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合には Nijmegen 変法では操作が難しいことから、Nijmegen 変法の普及はなかなか進まないのが現状であると考えられる。そこで、固形イミダゾールの代わりに、2N の緩衝化イミダゾール液を用いて、Tokyo 変法として緩衝化 NPP の作成の簡便化を図った。本法では 1995 年に B. Verbruggen らが提唱したナイメーゲン変法の報告ほど反応液の pH を安定化できなかったが、同論文の示す第 VIII 因子活性が安定な pH 範囲を維持できた。したがって、本法によっても pH を概ね予定した範囲に保つことができたことにより、Nijmegen 変法と同等の第 VIII 因子活性維持効果が得られることを確認できた。

さらに、インヒビター測定法の施設間差の有無を確認するための標準インヒビター血漿を昨年検討した方法 (10 ベセスダ単位まで生理食塩液で希釈し、その後は第 VIII 因子欠乏血漿によって希釈する方法) により作成し、標準インヒビター血漿を用いて、インヒビター測定法の性能試験を行い、標準化の前試験として同時再現性と日差再現性を検討した。昨年度の検討では、インヒビター測定における第 VIII 因子活性の測定値は、同時再現性の CV% で 4.8~12.8% を示しており、2 時間の加温の影響や検体の個別調整の影響があり、単純な第 VIII 因子活性の測定と比べて再現性の悪化が認められた。この成績を利用して、コントロール血漿に対する第 VIII 因子活性の残存% を計算するため、同時再現性の CV% は 6.6~15.6% とさらに悪化を示した。Bethesda 法ではこの残存% を利

用してインヒビター活性に換算するため、同時再現性のCV%で6.5~24.9%、日差再現性のCV%で7.0~48.7%を示した。

Bethesda法では対数変換が行われるために、残存率自体より測定誤差の縮小と拡大の現象が発生する。この関係を図15に示したが、誤差の関係が逆転していることが明らかとなった。すなわち、計算例として、残存%がそれぞれ25%、35%、50%、75%周辺において10%の差を想定したところ、表に示すように最終的なベセスダ単位の誤差は残存%が低いほど縮小され大きいほど拡大される。

例えば、残存%が25% (2BU) 付近の10%の変化は、ベセスダ単位への変換後に6.8%へと縮小するが、75% (0.4BU) 付近では37%へと約3.7倍の拡大をきたす。この計算からは35% (1.5BU) 付近の変化が一番少ないことが分かり、文献的にはベセスダ単位へ換算するには50%前後の測定値が推奨されているものの、実際は1.5BU前後が望ましいものと考えられ、標準インヒビター血漿の力価の選定にも注意が必要と考えられた。

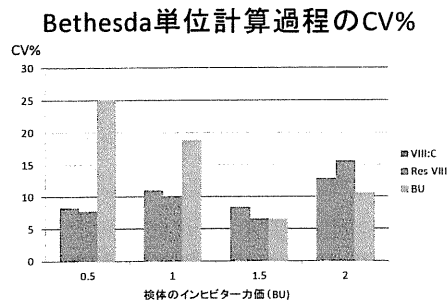


図16 ベセスダ単位への変換に伴う誤差の変化例

一方、臨床試験で問題になる低力価のインヒビターを再現性良く検出するためには、Bethesda法は原理的に問題があると言わざるを得ない。現在、臨床で用いられている凝固因子測定法の精度はそれほど良いとは言えず、低力価の再現性が悪くなるBethesda法に変わる方法の開発が必要である。その一つとして、最も単純なものが残存率の逆数を使うことである。これをTIIとして検討した。図14に示したようにインヒビター濃度に関係なく評価出来るが、図16に示す関係にあり、臨床的な運用には使いにくい面もあり、表示方法などさらなる検討が必要である。

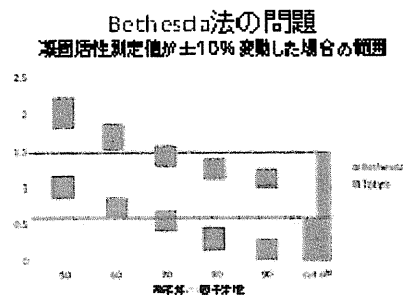


図17 Bethesda法とTIIの関係

#### 4. インヒビター発生要因と遺伝子学的検査

J-HIS1、J-HIS2の登録患者のうち遺伝子解析研究に未登録患者の診療施設に対し、「第VIII因子、第IX因子および各サイトカイン遺伝子解析」への参加の承諾を得た上で、各施設で倫理委員会の承認を得るよう要請した。また、既に構築している検体送付システムを強化し、遺伝子解析研究を実施した。現在、遺伝子解析は進行中である。今後、検体を集積して遺伝子異常やサイトカイン遺伝子の動態を解析すること、第2研究であ

る前方視的調査と連動して臨床的情報を併せて評価する。

## E. 結論

わが国のインヒビター発生において遺伝子組み換え型製剤と血漿由来製剤間の差はみられなかった。本研究成果は国際誌に受理された。インヒビターの発生要因で統計学的に有意であったのは重症度と家系内のインヒビター保有患者の存在であった。新規血友病患者の前向き調査の症例数はまだ予定数に達していないが、すでにインヒビターが21.7%と欧米と同様の発生率が明らかになった。今後遺伝子解析研究とあわせて研究の継続が必須である。インヒビターの測定法はTokyo変法で実施可能であることが明らかになり、標準インヒビター血漿の作成条件も確立した。これらの条件の下にサーベイランス作業を行い、施設間差の検証と実際の施設間差を縮小する手段を検討する必要がある。サーベイランス施設として、大手の衛生検査所および施設内検査を実施している臨床施設の協力を得る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ljung R, Oldenburg J, Auerswald G, van den Berg M, Shima M, Dimichele D. Report of the Fifth Meeting of the International Network for Pediatric Hemophilia: a focus on prophylaxis and immune tolerance induction. *Int J Hematol* 2011 94(4):415-21

2) Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Interactions between residues 2228-2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot

formation. *Thromb Haemost* 2011 22;106(5)

3) Ogiwara K, Nogami K, Shima M. Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor-independent mechanisms. *Thromb Haemost* 2011 106(4):665-674

4) Shibata M, Nakagawa T, Akioka S, Giddings JC, Kanehiro H, Matsumoto T, Ogiwara K, Yada K, Shima M. Hemostatic Treatment Using Factor VIII Concentrates for Neutralizing High-Responding Inhibitors Prior to CVAD Insertion for Immune-Tolerance Induction Therapy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011 [Epub ahead of print]

5) Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya JI, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Taneichi 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* 2011 17(5):771-6

6) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial. *Haemophilia*. 2011 18(1):94-101

7) Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Shima M. Mechanisms of human neutrophil

- elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):968-80.
- 8) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):989-98.
- 9) Kasuda S, Tatsumi K, Sakurai Y, Kato J, Taminishi S, Takeda T, Ohashi K, Okano T, Hatake K, Shima M. Expression of coagulation factors from murine induced pluripotent stem cell-derived liver cells. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2011 22(4):271-9.
- 10) Teitel J, Berntorp E, Dolan G, Fischer K, Gringeri A, Kessler C, Lambert T, Leissingner C, Nemes L, Shima M. A consensus statement on clinical trials of bypassing agent prophylaxis in inhibitor patients. *Haemophilia* 2011 17(3):516-21.
- 11) Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Sakurai Y, Ogiwara K, Yoshioka A, Okano T, Shima M. Regulation of coagulation factors during liver regeneration in mice: Mechanism of factor VIII elevation in plasma. *Thrombosis Research*. 2011 128(1):54-61.
- 12) Tsukamoto S, Tanaka Y, Matsuda T, Shinohara Y, Taniguchi A, Kumai T, Tomiwa K, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Arthroscopic ankle arthrodesis for hemophilic arthropathy: Two cases report. *The Foot* 2011 21(2):103-5.
- 13) Hayashi T, Sakurai Y, Fukuda K, Yada K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshizawa H, Takahashi Y, Yoshikawa Y, Hayata Y, Taniguchi S, Shima M. Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery. *Paediatric Anaesthesia*. [Epub ahead of print]
- 14) Hamada M, Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T, Shida Y, Doi M, Fukushima H, Nishio K, Yoshioka A, Shima M. Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. *Thrombosis and Haemostasis* 2011 105(2):313-20.
- 15) Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010 8(11):2494-503.
- 16) Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2010 21(6):568-76.
- 17) Ohashi K, Koyama F, Tatsumi K, Shima M, Park F, Nakajima Y, Okano T. Functional life-long maintenance of engineered liver tissue in mice following transplantation under the kidney capsule. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2010 4(2):141-8.
- 18) Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Takagi S, Shima M, Okano T. Engineering liver tissues under the kidney capsule site provides therapeutic effects to hemophilia B mice. *Cell Transplantation* 2010 19:807-13.

- 19) Collins P, Baudo F, Huth-Kuhne A, Ingerslev J, Kessler CM, Mingot Castellano ME, Shima M, St-Louis J, Levesque H. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *BMC Research Notes*. 2010 3:161.
- 20) Nishiya K, Nogami K, Okada K, Matsuo O, Takeyama M, Ogiwara K, Shima M. Determination of a factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII(a). *Thrombosis and Haemostasis*. 2010 104:105-17.
- 21) Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, Shima M. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010 103:94-102.
- 22) Kasuda S, Nishiguchi M, Yoshida S, Ohtsu N, Adachi N, Sakurai Y, Shima M, Takahashi M, Hatake K, Kinoshita H. Enhancement effect of ethanol on lipopolysaccharide-induced procoagulant status in human umbilical endothelial cells. *Soudni Lekarstvi*. 2009 54:44-8.
- 23) Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. Mutant macaque factor IX T262A: a tool for hemophilia B gene therapy studies in macaques. *Thrombosis Research*. 2010 125:533-7.
- 24) Ananyeva NM, Lee TK, Jain N, Shima M, Saenko EL. Inhibitors in hemophilia A: advances in elucidation of inhibitory mechanisms and in inhibitor management with bypassing agents. *Semin Thrombosis and Hemostasis*. 2009 35:735-51.
- 25) Takahashi M, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Sugita C, Matsumoto T, Matsuda S, Sato Y, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y. Inhibition of factor XI reduces thrombus formation in rabbit jugular vein under endothelial denudation and/or blood stasis. *Thrombosis Research*. 2010 125:464-70.
- 26) Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Takagi S, Utoh R, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Effects on coagulation factor production following primary hepatomitogen-induced direct hyperplasia. *World Journal of Gastroenterology*. 2009 15:5307-15.
- 27) Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Nishiya K, Ogiwara K, Shima M. Identification of a protein S-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009 102:645-55.
- 28) Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Shima M. von Willebrand factor protects the Ca<sup>2+</sup>-dependent structure of the factor VIII light chain. *British Journal of Haematology*. 2009 146:531-7.
- 29) Tanaka Y, Shinohara Y, Narikawa K, Kumai T, Takakura Y, Sakurai Y, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Arthroscopic synovectomies combined with reduced weight-bearing using patella tendon-bearing braces were very effective for progressed haemophilic ankle arthropathy in three paediatric patients. *Haemophilia*. 2009 15:833-6.
- 30) Huth-Kühne A, Baudo F, Collins P, Ingerslev J, Kessler CM, Lévesque H,

Castellano ME, Shima M, St-Louis J. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A. *Haematologica*. 2009 94:566-75.

31) Yamashita A, Matsuda S, Matsumoto T, Moriguchi-Goto S, Takahashi M, Sugita C, Sumi T, Imamura T, Shima M, Kitamura K, Asada Y. Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2009 206:418-26.

32) Takeda T, Sakurai Y, Tatsumi K, Kato J, Kasuda S, Yoshioka A, Shima M. Elevation of B cell-activating factor [corrected] family (BAFF) in haemophilia A patients with inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009 101:408-10.

33) Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009 284:6934-45.

34) Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor xase complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009 284: 3379-88.

35) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A modified thrombin

generation test for investigating very low levels of factor VIII activity in hemophilia A. *International Journal of Hematology*. 2009 90:576-582.

## 2. 学会発表 (2011年)

1) Shima M. Basis and clinical practice for hemophilia with inhibitor. 52nd spring meeting of the Korean society of hematology Seoul, Korea 2011年5月23日

2) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsumoto T, Shima M. Functional characterization of immobilized factor VIII in intrathrombus fibrin network formation under whole blood flow conditions with high shear rates XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日

3) 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 VII binding assay and gene analysis. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日

4) Hori Y, Isonishi A, Soejima K, Matsumoto M, Shima M, Fujimura Y. Isoelectric focusing analysis with a large-pore agarose-acrylamide composite gel identified two forms of adamts13, unbound and bound to von willebrand factor, in plasma milieu XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月25日

5) Kitsukawa K, Takedani H, Shima M,

Taki M. Imaging evaluation of arthropathy at the beginning of prophylactic therapy for severe hemophilia children XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 25日

6) Higasa S, Amano K, Hanabusa H, Muto S, Matsushita T, Shima M, Fujii T, Sakai M. Fine (feiba inhibitor entry) post-authorization safety surveillance (pass) : capturing long-term experience in Japanese inhibitor subjects under routine clinical management. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 25日

7) Sugimoto M, Hamada M, Matsui H, Doi M, Matsunami Y, Fukushima H, Nishino K, Yoshioka A, Shima M Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 25日

8) Fujii N, Souri M, Shima M, Tomoyasu C, Isoda K, Ichinose A. Markedly shortened half-life of the administered factor XII concentrates during first replacement therapy in a newborn with severe congenital FXII deficiency XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 25日

9) Fukutake K, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Shima M, Shirahata A. The post-authorization safety Surveillance program confirmed actual clinical safety and efficacy of

recombinant plasma/albumin-free method factor VII in Japan

XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 26日

10) Taki M, Hanabusa H, Fukutake K, Matsushita T, Shima M, Shirahata A. Clinical experience previously untreated patients with antihemophilic factor (recombinant) ,plasma/albumin-free method from post-authorization safety surveillance in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都市 2011年 7月 26日

11) Matsushita T, Hanabusa H, Fukutake K, Taki M, Shima M, Akira S. Prospective advance immune tolerance registry in Japanese hemophilia a patients with inhibitors:an interim report. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 26日

12) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Tsujii N, Shima M. Coagulation velocity and acceleration correlate with clinical phenotype of patients with acquired factor V inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年 7月 26日

13) Paula E (BR), Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz S.R, Morfini M, Nemes L, Salek S.Z, Shima M, Windyga J, Ehrenforth S, Andersen H.F, Chuansumrit A, on behalf of 1804 (adept™ 1) Investigators. Clinical and laboratory results from adept™ 1, a phase 2 trial investigating the use of recombinant activated FVII analogue in



congenital haemophilia patients with inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都市 2011 年 7 月 27 日

14) Matsushita T, Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y. Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase 1 trial. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日

15) Sugita C, Yamashita A, Matsuda S, Goto S, Moriguchi , Matsumoto T, Inoue O, Iwakiri T, Matsuura Y, Shima M. Elevated plasma levels of factor VII enhance thrombus formation though excess thrombin generation in rabbit jugular vein XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日

16) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Shima M. The first national survey of pediatric thromboembolism in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日

17) Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya J, Oka T, Shima M, Takamatsu J, Taki M, Taneichi M, Yoshioka A. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan XXII Congress of the

International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日

18) Furukawa S, Yoshizawa H, Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Tanaka I, Yoshikawa Y, Shima M. Perioperative hemostatic management for coarctation of aorta in an early infant with severe haemophilia A XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日

19) Ogiwara K, Nogami K, Hosokawa K, Matsumoto T, Shima M. Procoagulant effect of tranexamic acid with minimal urokinase on ex vivo human hemophilia model under blood flow XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 27 日

20) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M. Mild clinical phenotype in a severe hemophilia A with age 178 his substitution associated with increased factor Xa generation. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日

21) Shinozawa K, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Shima M, Fukutake K. A novel missense mutation of factor V (factor V nara:W1920R) manifested thrombosis and demonstrated a positive result of activated protein C resistance assay XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月 28 日

22) Nishiya K, Nogami K, Tanaka I, Shibata M, Ogiwara K, Matsumoto T, Shima M. Dynamics of plasma factor

VII during the continuous infusion factor VII concentrates in twenty patient with hemophilia A XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011年7月28日

23) 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

24) 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

25) 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

26) 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

27) 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

28) 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

29) 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

30) 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

31) 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

32) 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

33) 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

34) 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

26) 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

#### (2010年)

1) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 立野 知世, 吉里 勝利, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 血液凝固第 IX 因子産生責任細胞の同定 第9回 日本再生医療学会 3月18日 広島市

2) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 凝固因子遺伝子発現変化からみた肝構成細胞の発育パターンの多様性 第9回 日本再生医療学会 3月18日 広島市

3) 櫻井 嘉彦, 粕田 承吾, 加藤 順子, 竹田 知広, 嶋 緑倫 マウス iPS 細胞の肝細胞への分化過程における凝固関連遺伝子発現プロファイルの変化 第9回 日本再生医療学会 3月18日 広島市

4) 嶋 緑倫 小児の出血性疾患の診療 奈良県小児科医学会学術集会 3月20日 橿原市

5) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 民西 早苗,

嶋 緑倫, 岡野 光夫 発育過程にあるマウスの肝臓における各種凝固因子の遺伝子発現プロファイル 第33回 日本血栓止血学会 4月23日 鹿児島市

6) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 奥田 昌宏, 嶋 緑倫 活性型第VIII因子/組織因子複合体は凝固初期相から内因系 tenase 活性を発動する 第33回 日本血栓止血学会 4月23日 鹿児島市

7) 松井 英人, 杉本 充彦, デービット リリクラップ, 柴田 優, 嶋 緑倫 第VIII因子発現レンチウイルスベクターによる血友病 A インヒビターに対する新規免疫寛容法 第33回 日本血栓止血学会 4月23日 鹿児島市

8) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 細川 和也, 松本 智子, 嶋 緑倫 全血血流下におけるトラネキサム酸の凝固亢進作用 第33回 日本血栓止血学会 4月23日 鹿児島市

9) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 民西 早苗, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 生後の肝臓発育過程における各種凝固因子の遺伝子発現プロファイル 第33回 日本血栓止血学会 4月23日 鹿児島市

10) 松本 智子, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 嶋 緑倫 後天性血友病 A type1 のトロンビン生成能低下とその抑制機序の解明 第33回 日本血栓止血学会 4月24日 鹿児島市

11) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 松本 智子, 柴田 優, 嶋 緑倫 各種第 VIII 因子インヒビターの活性型第 VII 因子による第 VIII 因子活性化/不活性化に対する影響 第33回 日本血栓止血学会 4月24日 鹿児島市

12) 嶋 緑倫 血友病治療ガイドライン:実践と今後の方向性 第113回 日本小児科学会 4月24日 盛岡市

13) Tatsumi K, Sakurai Y, Ohashi K, Kasuda S, Kato J, Okano T, Shima M

Expression of coagulation factors from murine iPS-derived liver cells  
American Society of Gene & Cell Therapy,  
13th Annual Meeting 5月22日  
Washington DC, USA

14) Shima M Towards standardization of clot wave form analysis Report of working party 56th Annual SSC Meeting  
5月24日 Cairo, Egypt

15) 嶋 緑倫 後天性止血・凝固異常と輸血療法 「後天性血友病の診断と治療」 第58回 日本輸血・細胞治療学会  
5月28日 名古屋市

16) 嶋 緑倫 小児出血性疾患の診療 第152回 大阪小児科医会学術講演会  
5月29日 大阪市

17) 嶋 緑倫 血友病の診断と治療—最近の動向を踏まえて 京滋小児血友病研究会  
6月12日 京都市

18) 辰巳 公平, 櫻井 嘉彦, 粕田 承吾, 大橋 一夫, 岡野 光夫, 加藤 順子, 嶋 緑倫 肝細胞様分化 iPS 細胞における血液凝固関連因子発現 第17回 肝細胞研究会  
6月19日 秋田市

19) Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Sakurai Y, Shibata M, Matsumoto T, Shima M Dynamics of Plasma Factor VIII during the Continuous Infusion of Factor VIII Concentrates in Patients with Hemophilia A 2010 East Asia Haemophilia Forum  
6月20日 Taipei, Taiwan

20) 嶋 緑倫 産婦人科、小児科領域の出血性疾患～後天性血友病を中心に 第20回 日本産婦人科・新生児血液学会  
6月26日 浜松市

21) 松本 智子, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 嶋 緑倫 Latex 法による新規 vonWillebrand 因子測定法の検討 第11回 日本検査血液学会  
7月24日 東京都

22) 嶋 緑倫 ベネフィクスの適正使用を国内外の臨床経験から考える ベネフィクス 国内使用状況 ベネフィクス発売記念全国講演会  
7月31日 大阪市

23) 篠澤圭子, 福武勝幸 血液凝固インヒビター測定法の標準化に向けた改良. 第57回日本臨床検査医学会総会  
8月

24) 嶋 緑倫 凝固波形解析を利用した止血血栓モニタリング シスメックス株式会社社内報告講演会  
8月5日 神戸市

25) 嶋 緑倫 後天性血友病の診断と治療 第62回 神奈川血液研究会  
9月4日 横浜市

26) 荻原 健一, 野上 恵嗣, 南 博明, 田中 一郎, 松本 智子, 嶋 緑倫 先天性血友病Aインヒビター患者の活性型プロトロンビン複合体製剤不応例におけるTFPIの関与 第72回 日本血液学会  
9月24日 横浜市

27) Yada K, Shibata M, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshioka A, Shima M Thrombin generation and genotyping as predictors of clinical manifestation in hemophilia A patients 第72回 日本血液学会  
9月24日 横浜市

28) Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Shibata M, Sakurai Y, Matsumoto T, Shima M Dynamics of plasma factor VIII during the continuous infusion of factor VIII with hemophilia A 第72回 日本血液学会  
9月24日 横浜市

29) Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Nakai H, Nakai H, Yoshizato K, Shima M, Okano T Novel approach for cell and gene therapy of hemophilia B based on a creation of alter ego 第72回 日本血液学会  
9月24日 横浜市

30) 土井 政明, 志田 泰明, 松井 英人, 杉本 充彦, 嶋 緑倫 全血流動状況下での血栓形成における固相化第VIII因子の機能 第72回 日本血液学会  
9月24日

日 横浜市

31) 嶋 緑倫 後天性凝固異常症の病態と治療：後天性血友病を中心に 第 72 回 日本血液学会 9月24日 横浜市

32) 松井 英人, 杉本 充彦, リリクラップ デービット, 嶋 緑倫 microRNA 制御レンチウイルスベクターによる新規血友病 A 遺伝子治療法の開発 第 72 回 日本血液学会 9月24日 横浜市

33) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 立野 知世, 中井 宏之, 吉里 勝利, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 Development of a Novel Approach for Cell and Gene Therapy of Hemophilia B based on a Creation of Alter Ego 第 72 回 日本血液学会 9月24日 横浜市

34) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 松本 智子, 柴田 優, 嶋 緑倫 トロンビン生成および遺伝子変異の血友病 A 患者臨床フェノタイプ評価における有用性 第 72 回 日本血液学会 9月24日 横浜市

35) 稲葉 浩, 篠澤 圭子, 天野 景裕, 花房 秀次, 山崎 雅英, 表 美香, 酒井 道生, 榎本 誠, 高木 義弘, 山崎 哲, 瀧 正志, 矢富 裕, 金子 誠, 竹谷 秀之, 松本 智子, 嶋 緑倫, 藤井 輝久, 金子 正裕, 内藤 澄悦, 松本 剛史, 池尻 誠, 福武 勝幸 血友病診療施設を対象としたサーベイランスによる第Ⅷ因子活性値測定の実態調査 第 72 回 日本血液学会 9月25日 横浜市

36) Shima M Acquired hemophilia A 6th Congress of the Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis 10月13日 Bali, Indonesia

37) 嶋 緑倫 海外からみたわが国の血友病医療 第 5 回 日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 10月30日 東京都

38) 嶋 緑倫 血友病の基礎と臨床 第

1回 関西血友病看護フォーラム 11月6日 大阪市

39) 嶋 緑倫 小児出血性疾患の診断と治療の進歩 第 27 回 小児科勉強会 PSG 11月13日 大阪市

40) Kajiwar M, Shima M, Yoshioka A A haemophilia patient with inhibitors who became ambulant after physiotherapy under cover of bypassing agents 9th Novo Nordisk Symposium on Haemostasis Management 11月15日 Barcelona, Spain

41) 嶋 緑倫 血友病の基礎と臨床 京都府立医科大学講演会 11月19日 京都市

42) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 立野 知世, 吉里 勝利, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 血液凝固第 IX 因子産生責任細胞の同定 ~ 血友病 B の細胞治療確立にむけて~ 第 37 回 日本臓器保存生物医学会 11月20日 新潟市

43) Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Tsujii N, Shima M Procoagulant Activity of Antifibrinolytic Agents; A Novel Hemostatic Mechanism of Tranexamic Acid and Epsilon-Aminocaproic Acid 52th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition 12月4日 Orland, USA

44) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Tsujii N, Shima M Determination of coagulation functions and inhibitory mechanisms in acquired hemophilia A with type 1 and type 2 inhibitors 52th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition 12月6日 Orland, USA

45) Ogiwara K, Nogami K, Tanaka I, Nishiya K, Tsujii N, Shima M Tissue Factor Pathway Inhibitor Causes Unresponsiveness to Activated

Prothrombin Complex Concentrates for Hemophilia A Patients with Inhibitors  
52th American Society of Hematology  
Annual Meeting and Exposition 12月6日  
Orland, USA

46) 嶋 緑倫 インヒビターの基礎と臨床：発生機序からみた臨床応用の可能性  
第52回 日本小児血液学・第26回 日本小児がん学会・第8回 日本小児がん看護学会・第15回 財団法人がんの子供を守る会 12月17日 大阪市

47) 鈴木 信寛, 瀧 正志, 酒井 道生, 中舘 尚也, 気賀沢寿人, 堀越 泰雄, 高野 長邦, 小林 正夫, 藤沢 康司, 白幡 聡, 吉岡 章, 嶋 緑倫 小児血友病患者に対する中心静脈カテーテル使用：日本小児血液学会血友病委員会報告 第52回 日本小児血液学・第26回 日本小児がん学会・第8回 日本小児がん看護学会・第15回 財団法人がんの子供を守る会 12月17日 大阪市

(2009年)

1) 嶋 緑倫 小児の出血性・血栓性疾患 「小児出血性疾患の診断の進歩」 第112回 日本学会 4月19日 奈良市

2) 中川 隆志, 櫻井 嘉彦, 柴田 優, 野上 恵嗣, 西屋 克己, 南 博明, 橋本 直樹, 田中 一郎, 嶋 緑倫 免疫寛容導入療法を施行した血友病A17症例における成功因子の検討 第112回 日本学会 4月19日 奈良市

3) 高橋 幸博, 釜本 智之, 新居 育世, 井崎 和史, 武山 雅博, 内田 賀子, 芳賀 大樹, 嶋 緑倫, 西久保敏也 小児脳波のリアルタイム周波数マップ解析 第112回 日本学会 4月19日 奈良市

4) Tatsumi K, Ohashi K, Okano T, Shima M Hepatocyte transplantation and liver tissue engineering approaches provide long-term and stable

therapeutic effects for hemophilia B  
American Society of Gene Therapy 12th  
Annual Meeting 5月29日 San Diego,  
USA

5) 粕田 承吾, 櫻井 嘉彦, 辰巳 公平, 久保 篤史, 加藤 順子, 民西 早苗, 羽竹 勝彦, 嶋 緑倫 ヒト血液凝固第VIII因子発現マウスES細胞を用いた血友病A細胞療法に関する in vivo 検討 第32回 日本血栓止血学会 6月5日 北九州市

6) 荻原 建一, 野上 恵嗣, 西屋 克己, 松本 智子, 嶋 緑倫 イブシロンアミノカプロン酸およびトラネキサム酸の新規止血機序の検討 第32回 日本血栓止血学会 6月5日 北九州市

7) 西屋 克己, 野上 恵嗣, 荻原 建一, 岡田 清孝, 松尾 理, 嶋 緑倫

Plasmin による新たな血液凝固制御機構 第32回 日本血栓止血学会 6月5日 北九州市

8) 天野 景裕, 瀧 正志, 家子 正裕, 山崎 雅英, 岡 敏明, 酒井 道生, 白幡 聡, 高田 昇, 高松 純樹, 竹谷 英之, 田中 一郎, 花房 秀次, 日笠 聡, 福武 勝幸, 藤井 輝久, 松下 正, 三間屋純一, 三室 淳, 吉岡 章, 嶋 緑倫 後天性血友病Aの診断ガイドライン案 第32回 日本血栓止血学会 6月5日 北九州市

9) 松下 正, 酒井 道生, 藤井 輝久, 家子 正裕, 新谷 憲治, 山崎 雅英, 天野 景裕, 瀧 正志, 岡 敏明, 白幡 聡, 高田 昇, 高松 純樹, 竹谷 英之, 花房 秀次, 日笠 聡, 福武 勝幸, 田中 一郎, 三間屋純一, 三室 淳, 吉岡 章, 嶋 緑倫

後天性血友病Aの止血療法ガイドライン(案) 第32回 日本血栓止血学会 6月5日 北九州市

10) 日笠 聡, 新谷 憲治, 花房 秀次,  
毛利 博, 天野 景裕, 岡 敏明, 酒  
井 道生, 白幡 聡, 高田 昇, 高松  
純樹, 瀧 正志, 竹谷 英之, 田中 一  
郎, 福武 勝幸, 藤井 輝久, 松下 正,  
三間屋純一, 三室 淳, 吉岡 章, 嶋  
緑倫

後天性血友病 A の免疫抑制療法ガイドラ  
イン案 第 32 回 日本血栓止血学会  
6月5日 "北九州市

11) 嶋 緑倫 血友病患者の QOL 改善に  
向けての取組み 2. ネットワークの構築  
第 32 回 日本血栓止血学会 6月6日 "  
北九州市

12) 佐藤 哲司, 酒井 道生, 白幡 聡,  
稲葉 浩, 嶋 緑倫, 福武 勝幸, 山  
下 文, 上玉利 彰 血友病 A 分子異常  
症の 1 例 第 32 回 日本血栓止血学会 6  
月 6 日 北九州市

13) 松本 智子, 野上 恵嗣, 荻原 建一,  
添田 哲弘, 田中 一郎, 嶋 緑倫 後  
天性血友病 A type2 のトロンビン生成能低  
下とその抑制機序の解明 第 32 回 日本  
血栓止血学会 6月6日 北九州市

14) Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K,  
Takeyama M, Shima M Procoagulant  
effect of plasmin dependent on factor V  
and factor VIII during the blood  
coagulation process XXII Congress of  
the International Society on Thrombosis  
and Haemostasis 7月13日 Boston, USA

15) Takeyama M, Nogami K, Soeda T,  
Ogiwara K, Nishiya K, Shima M  
Anti-A2 monoclonal antibody enhancing  
thrombin (and factor Xa)-catalyzed  
factor VIII activity XXII Congress of  
the International Society on Thrombosis  
and Haemostasis 7月15日 Boston, USA

16) Tatsumi K, Ohashi K, Sakurai Y,  
Okano T, Shima M Coagulation Factors  
during Liver Regeneration in Mice

XXII Congress of the International  
Society on Thrombosis and Haemostasis  
7月15日 Boston, USA

17) Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C,  
Yoshizato K, Shima M, Okano T Human  
Hepatocyte Propagation in Mice:  
Potential for Cell Source for  
Coagulation Factor Deficiencies XXII  
Congress of the International Society  
on Thrombosis and Haemostasis 7月15  
日 Boston, USA

18) Nishiya K, Nogami K, Kikukawa Y,  
Shinozawa K, Yada H, Fukutake K, Shima  
M Deep venous thromboembolism in a  
patient of factor V deficiency XXII  
Congress of the International Society  
on Thrombosis and Haemostasis 7月15  
日 Boston, USA

19) Tanaka I, Amano K, Taki M, Oka T,  
Sakai M, Shirahata A, Takata N, Takamatsu  
J, Takedani H, Hanabusa H, Higasa S,  
Fukutake K, Fujii T, Matsushita T,  
Mimaya J, Yoshioka A, Shima M The  
Japanese guideline for the hemostatic  
therapy of patients with congenital  
hemophilia and inhibitors XXII  
Congress of the International Society  
on Thrombosis and Haemostasis 7月15  
日 Boston, USA

20) Matsushita T, Amano K, Taki M, Oka  
T, Sakai M, Shirahata A, Takata N,  
Takamatsu J, Takedani H, Hanabusa H,  
Higasa S, Fukutake K, Fujii T, Tanaka  
I, Mimaya J, Yoshioka A, Shima M The  
Japanese guideline for the practical  
replacement therapy for acute bleeding  
and surgical prophylaxis in hemophilia  
without inhibitors XXII Congress of  
the International Society on Thrombosis  
and Haemostasis 7月15日 Boston, USA"

21) 松井 英人, 杉本 充彦, David

Lillicrap, 吉岡 章, 嶋 緑倫 血友病 A に対する新しい治療法の確立—自己血管内皮前駆細胞を用いた細胞療法の試み 第 71 回 日本血液学会 10 月 23 日 京都市

22) 大橋 一夫, 辰巳 公平, 民西 早苗, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 肝細胞移植と肝 tissue engineering: 血友病 B 治療への有用性 第 71 回 日本血液学会 10 月 23 日 京都市

23) 辰巳 公平, 大橋 一夫, 高木 惣一, 鶴頭 理恵, 民西 早苗, 櫻井 嘉彦, 萩原 建一, 嶋 緑倫, 岡野 光夫 異なる肝再生過程における凝固因子制御パターンの相違 第 71 回 日本血液学会 10 月 24 日 京都市

24) 萩原 建一, 野上 恵嗣, 南 博明, 田中 一郎, 松本 智子, 嶋 緑倫 インヒビター保有血友病 A における活性化型プロトロンビン複合体製剤不応機序 第 71 回 日本血液学会 10 月 24 日 京都市

25) 櫻井 嘉彦, 粕田 承吾, 辰巳 公平, 加藤 順子, 久保 篤史実, 大橋 一夫, 嶋 緑倫 肝細胞様細胞へ分化誘導した iPS 細胞の凝固因子の網羅的検討 第 71 回 日本血液学会 10 月 25 日 京都市

26) 中川 隆志, 柴田 優, 金廣 裕道, 土手 揚子, 西屋 克己, 田中 一郎, 松本 智子, 櫻井 嘉彦, 秋岡 親司, 嶋 緑倫 ITI 導入を目的に第 VIII 因子インヒビター中和療法下で CV ポート留置術を施行した血友病 A の 3 例 第 51 回 日本小児血液学会・第 25 回 日本小児がん学会 11 月 28 日 浦安市

27) 東道 公人, 藤本 一途, 幸道 和樹, 山本 茜, 大前 禎毅, 長村 敏生, 猪田 浩理, 杉本 充彦, 嶋 緑倫, 清沢 伸幸, 今村 俊彦 抜歯後の止血困難を契機に診断された後天性血友病 A の 1 女児例

第 51 回 日本小児血液学会・第 25 回 日本小児がん学会 11 月 28 日 浦安市

28) Nishiya K, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Takeyama M, Shima M Mechanisms of human neutrophil elastase-catalyzed inactivation of the factor VIII (a) 51st ASH Annual Meeting 12 月 6 日 New Orleans, USA

29) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Nishiya K, Takeyama M, Shima M Determination for coagulation functions and novel inhibitory mechanisms in acquired hemophilia A with type 2 inhibitors 51st ASH Annual Meeting 12 月 7 日 New Orleans, USA

30) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Nishiya K, Takeyama M, Shibata M, Shima M Effects of anti-FVIII inhibitors on factor VIIa/tissue factor-catalyzed activation and inactivation of factor VIII 51st ASH Annual Meeting 12 月 7 日 New Orleans, USA

31) Ogiwara K, Nogami K, Okuda M, Nishiya K, Takeyama M, Shima M Interactions of factor VIII with tissue factor contributes to the acceleration of factor Xa generation in the initiation phase of blood coagulation 51st ASH Annual Meeting 12 月 7 日 New Orleans, USA

**G. 知的財産権の出願・登録情報**

1. 特許取得  
血液凝固因子の活性化方法及び血液凝固因子不活性化試料 (特許 4671823)
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）

総合（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：

カニクイザル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

研究分担者：高橋 将文 自治医科大学 教授

研究協力者：池本 智一 自治医科大学 助教

研究要旨：本研究計画の前臨床モデルの確立のため、カニクイザル肝臓に対するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの局所投与治療の可能性について検討した。前任研究班に引き続き初年度は当初我々が提唱していた「門脈本幹直接穿刺による AAV ベクターを用いた肝臓への遺伝子導入法」を実施し、カニクイザル 3 頭全例に対し治療域までに達する導入遺伝子由来第 IX 因子の発現を確認した。しかし同方法に対しては手術技術の難易度が比較的高いことや、術後門脈狭窄が発生する危険性があるという問題点が提起された。そこで 2 年目以降は同問題点を解決するために、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法」を開発し、同方法を実践した。前実験と同様にカニクイザル計 3 頭に対しベクター導入実験を行ったところ、全例に導入遺伝子由来第 IX 因子の発現を確認することができた。

結論：非ヒト霊長類において、経門脈的に肝臓左葉に AAV ベクターを投与し、AAV 抗体陽性サルに対し、導入遺伝子由来第 IX 因子の発現(5~10%)を長期間維持することに成功した。同結果により、AAV ベクター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 ベクター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

類であるカニクイザルを用いて、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更なる適正化を目指して、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・霊長類医科学研究センター（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、実験ブタに対し①と同様の処置を施し、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）

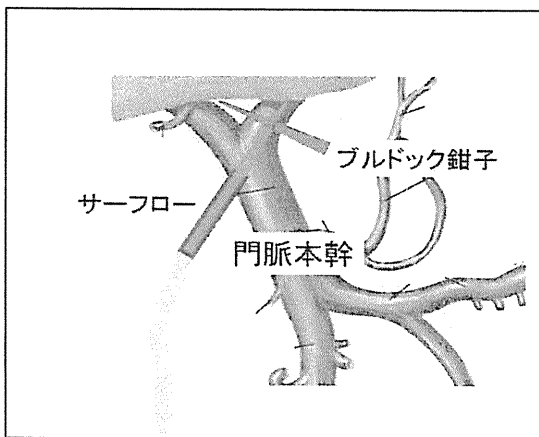
本研究における動物実験は、研究施設における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物愛護の精神で実施した。また、遺伝子組み換え実験に関しても、研究施設における遺伝子組み換え実験安全委員会の指針に従い、承認されたプロトコールで実施した。

## C. 研究結果

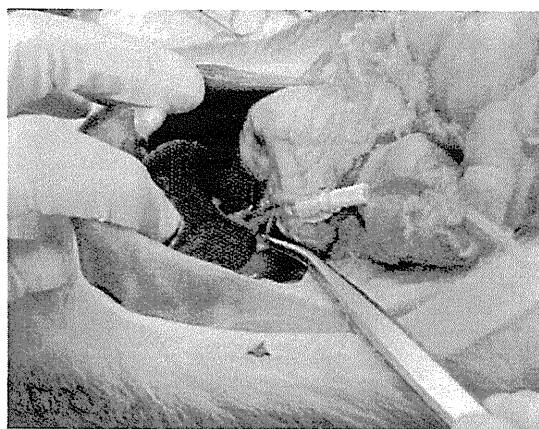
① 門脈本幹直接穿刺による AAV ベクターを用いた肝臓への遺伝子導入法

カニクイザルに対し、全身麻酔下に右季肋下切開にて開腹し、その後肝門部を明らかにした。門脈本幹ならびに門脈左右分枝を露出した後に、門脈本幹より血管留置針（サーフロー20G, Terumo, Japan）を挿入し、

先端を門脈左枝に誘導した（図1）。門脈左枝をブルドック鉗子にてクランプした後に、同留置針を通じて生理食塩水（flash out）→AAV ベクター溶液→生理食塩水を順に門脈左枝に直接注入した（図2）。門脈注入終了後血管留置針を抜去し、血管壁穿孔部を8-0 ナイロンにて縫合閉鎖した。止血確認後、腹壁を4層にて閉鎖し手術を終了した。同様の処置をカニクイザル計3頭に実施し、全ケースにおいて総手術時間が2時間以内かつ門脈阻血時間も8分以内で処置を完遂でき、出血や門脈狭窄等の術後合併症も認められなかった。



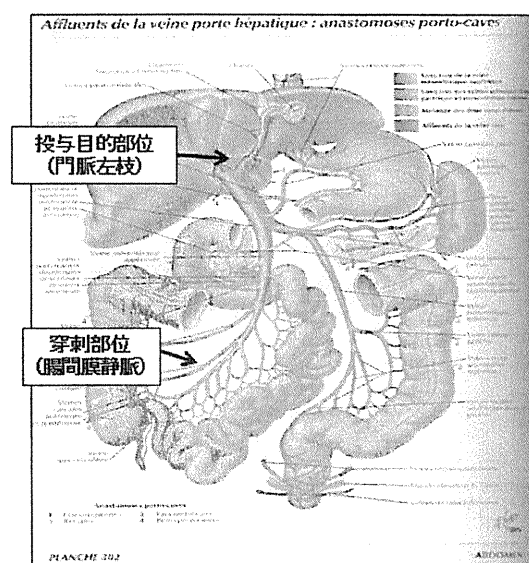
（図1：門脈本幹直接穿刺法スキーマ）



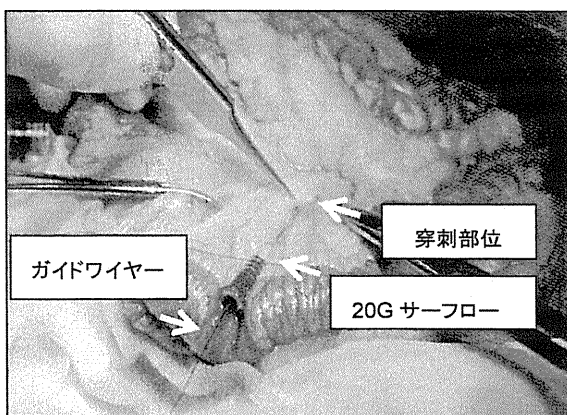
（図2：AAV ベクター注入時画像）

②マイクロカテーテル法（図 3）を用いた肝臓への遺伝子導入

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 4）。



（図3：マイクロカテーテル法概略図）



（図4：腸間膜静脈へ挿入された血管留置針）

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 1.1 mm）、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、抜去部を結紮閉鎖し、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 因子の発現を確認した。

### ③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。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 5）



（図 5：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。本方法は AAV の既感染に基づく AAV ベクターに対する中和抗体の影響を回避するための重要な手法になりえると考えられる。

初年度は当研究前任分担班に引き続き「門脈本幹直接穿刺による AAV ベクターを用いた肝臓への遺伝子導入実験」を実施した。全ケースにおいて総手術時間が 2 時間以内かつ門脈阻血時間も 8 分以内で処置を完遂でき、特に術後の合併症も認められなかった。しかし同方法に対しては「(1) 肝門部処理時に比較的複雑な手術手技を要する。

(2) 留置針抜去部の閉鎖処置が必要で、同手技に難渋すると門脈狭窄が発生する可能性がある。」という 2 つの問題点が提起された。

同問題点を解決するために 2 年目以降は、腸間膜静脈の分枝よりマイクロカテーテルを挿入し、カテーテル先端を門脈左枝に誘導した後に 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、同方法を用いたベクター導入実験を行った。開腹後カニクイザルの腸間膜静脈分枝にガイドワイヤーを挿入し、門脈左枝へと選択的に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、処置後全頭に導入遺伝子由来第 IX 因子の発現が確認された。今回の検討により、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、前述のように「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。今回の検討により、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た。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も確認できた。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