

of rFVIIa [4] and a polyethylene glycol (PEG)-rFVIIa product with a long half-life is under development for prophylaxis [5]. Furthermore, the development of a recombinant factor IX (FIX) analogue activating factor X (FX) without coenzyme factor VIII (FVIII) is in progress [6].

MC710 is a new bypassing agent that is currently under development by Kaketsuken (Kumamoto, Japan) and which includes plasma-derived FVIIa and its substrate FX (mixing ratio by protein weight 1:10). In manufacturing MC710, three processes for viral elimination and inactivation (solvent/detergent, virus removal membrane and dry-heat process) are included [7]. A minute amount of activated FX (FXa) is produced in the filling process and after reconstitution of lyophilized product; however, it has been confirmed that the FXa is neutralized by the antithrombin (AT) added to the product [7].

The K_m for the FVIIa-catalysed FX activation (0.16–0.25 μM) is higher than the FX concentration in plasma (approximately 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0.14 μM) in the presence or absence of tissue factor (TF), therefore, the increase in blood FX concentration is expected to enhance the efficacy of FVIIa-mediated FX activation [7,8]. In fact, an increase in the haemostatic effect by simultaneous administration of FVIIa and FX has been confirmed in various *in vitro* studies and in animal studies using a haemophilia B inhibitor monkey model and the bypassing effect of MC710 was also confirmed in a study using haemophilia inhibitor-like plasma [7,9]. The 1:10 ratio of FVIIa to FX in MC710 was decided to be optimal based on the results of several *in vitro* studies using haemophilia-like plasma and a reconstituted blood coagulation model. To be specific, in plasma with a FVIIa concentration of 1.0–1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (obtained after intravenous rFVIIa administration at the standard doses of 90–120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [10]) when FX is exogenously added 5–15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the remarkably poor coagulant activity in haemophilic plasma is improved to that when FVIII or FIX is added at 10–20% [7,9].

We conducted a clinical pharmacological study (Phase I trial) of MC710 single administration in haemophilia patients with inhibitors in a non-bleeding state to determine the pharmacokinetic (PK) parameters of FVIIa and FX, and to evaluate the pharmacodynamic (PD) parameters and the safety of MC710.

Materials and methods

Study design and investigation drugs

This was a multi-centre, open-labelled, non-randomized, active controlled crossover, clinical pharmacological study for Japanese male haemophilia patients with inhibitors. All subjects provided written informed consent by using the form approved by the institutional

review board of each participating institute. This trial was performed by the MC710 trial group listed in Appendix. MC710 was intravenously administered at a single dose to the patients in a non-bleeding state using dose escalation (five doses) to evaluate the dose-dependency of the PK and PD parameters and to evaluate safety. Prior to the administration of MC710, NovoSeven and/or FEIBA were administered at a single clinical dose as an active self-control to patients with no haemorrhage. The dose of NovoSeven and FEIBA was set at 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and one usual clinical dose for each patient, 50 or 75 U kg^{-1} , respectively. Haemophilia B patients and haemophilia A patients with allergy or anamnestic response to FEIBA were permitted not to receive FEIBA. The MC710 dose was to be gradually increased from the initial dose of 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (hereinafter the dose of MC710 is expressed as the amount of FVIIa) to 40, 80, 100 and 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In this study, we allowed re-administration of MC710 to the same subjects at the next dose level after an interval of 4 weeks or more. A safety committee was held prior to each increase of the MC710 dose and, after confirming that there were no safety problems, the dose was stepped up to the next level. The minimum sample size for each MC710 dosage was set at $n = 4$, which is the minimum number for statistical evaluation. The key inclusion and exclusion criteria for the subjects are shown in Table 1. Blood samples were taken as follows: prior to and 10 and 30 min, and 1, 2 and 6 h after administration in NovoSeven treated patients; prior to and 10 and 30 min, and 2, 6, 24 and 48 h after administration in FEIBA treated patients; and prior to and 10 and 30 min, and 1, 2, 6, 12, 24 and 48 h after administration in MC710 treated patients.

MC710 was supplied as a lyophilized product and was formulated with FVIIa 0.6 mg mL^{-1} , FX 6 mg mL^{-1} , AT 1.0 U mL^{-1} , human serum albumin 2.0% and other salts after reconstitution [7]. MC710, NovoSeven and FEIBA were provided by Kaketsuken, Novo Nordisk A/S and Baxter International Inc., respectively.

PK/PD assessments

The PK parameters of the MC710 active ingredients were determined measuring FVII clotting activity

Table 1. Key inclusion and exclusion criteria.

Key inclusion criteria
Patients: male congenital haemophilia A or B patients with inhibitors
Age: ≥ 16 years or < 60 years
Inhibitor titer: ≥ 1.0 BU mL^{-1}
Key exclusion criteria
Patients with following symptoms
Hypercoagulability
History of DIC
Development of AIDS
Hypersensitivity to NovoSeven, FEIBA and other plasma products
Decompensated cirrhosis
Heart failure, angina or pathologic arrhythmia such as atrial fibrillation
Anaemia

(FVII:C), FX clotting activity (FX:C), FVII antigen (FVII:Ag) and FX antigen (FX:Ag) and analysed using a non-compartmental model with WinNonlin® (ver 5.1; Pharsight, Mountain View, CA, USA) software using baseline adjusted values (differences from values before administration). Recovery was calculated as the percentage of the dose in the plasma 10 min after administration. In the PD parameter analysis, activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin-antithrombin complex (TAT) and prothrombin fragment F₁₊₂ (F1+2) were determined.

Safety assessments

For the safety assessments, subjective symptoms and objective findings were observed and an electrocardiogram, vital signs tests and a laboratory test were performed before and after MC710 administration. For the evaluation of disseminated intravascular coagulation (DIC), platelet counts, fibrinogen and D-dimer were measured immediately after MC710 administration. The observation period for adverse events of NovoSeven, FEIBA and MC710 was 6 h, 48 h and 4 weeks after the administration, respectively. Twelve weeks after the administration of MC710, the virologic tests and the serologic tests were conducted to detect the production of new viral antigens or antibodies.

Statistical analysis

The MC710 dose-dependency of PK and PD parameters was analysed using a mixed effects model with subject as a random effect and dose (including observation time in the PD parameter analysis) as a fixed effect. The difference in PD parameters between the MC710 and the active control was analysed using a mixed effects model with subject as a random effect and treatment and observation time as fixed effects. For those statistical analyses, SAS Release 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used. All reported *P*-values are two-tailed and not adjusted for multiple testing. *P*-values <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Subjects

A total of 25 administrations of MC710 were given to 11 subjects (seven haemophilia A patients with inhibitors and four haemophilia B patients with inhibitors) at five dose rates after administrations of active controls (Fig. 1). The mean age of the 11 subjects was 27.2 years (17–41 years) and the mean body weight was 61.3 kg (46.5–86.2 kg). The FVIII and FIX inhibitor titres immediately before administration of the investigational

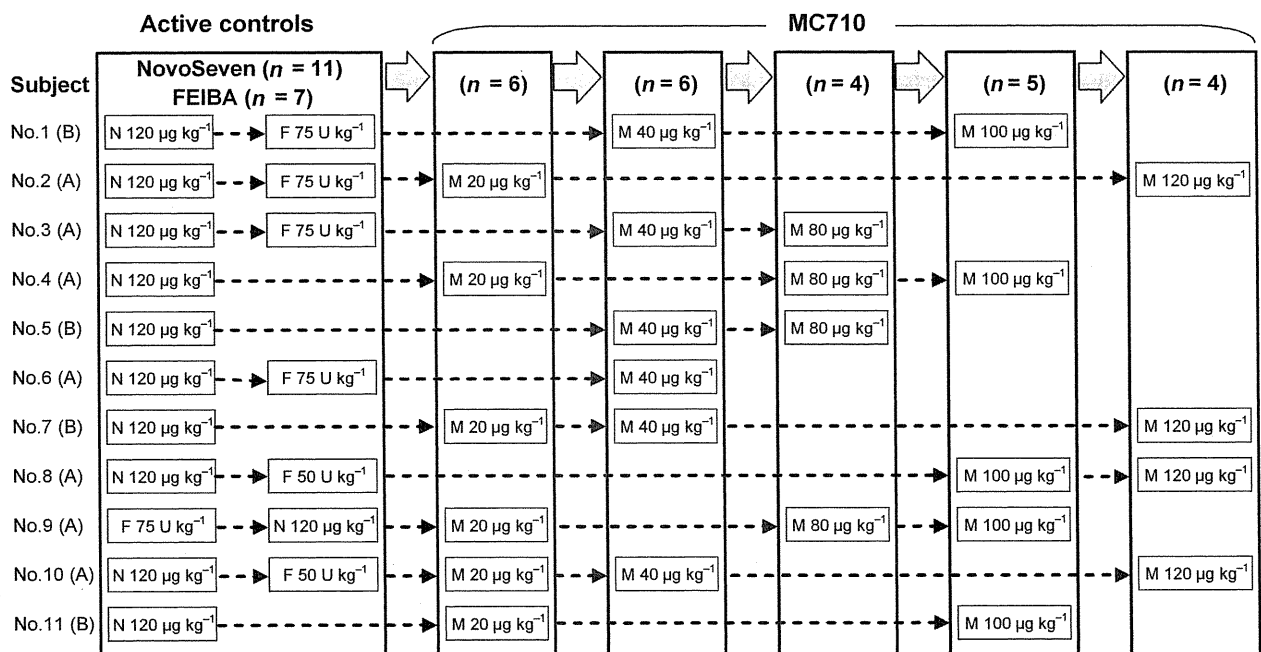


Fig. 1. Study flow chart. Prior to the administration of MC710, NovoSeven at 120 µg kg⁻¹ and/or a dose of FEIBA at 50 or 75 U kg⁻¹ were administered as active controls. MC710 was administered with dose escalation of 20, 40, 80, 100 and 120 µg kg⁻¹. The washout periods were 72 h, 2 weeks and 4 weeks after the administration of NovoSeven, FEIBA and MC710, respectively. The letter with the parenthesis after the subject No. indicates the type of haemophilia patient, with 'A' and 'B' indicating a haemophilia A patient with inhibitors, and a haemophilia B patient with inhibitors, respectively. M, N and F mean MC710, NovoSeven and FEIBA, respectively.

product ranged from 2.9 to 633 BU mL⁻¹ and from 1.9 to 89.3 BU mL⁻¹, respectively.

Pharmacokinetics

Plasma FVII:C, FVII:Ag, FX:C and FX:Ag levels rapidly increased after administration of MC710. FVII:C and FVII:Ag levels returned to the preadministration values 12–24 h after administration (Fig. 2a and its inset, 2b and its inset) and increased levels of FX:C and FX:Ag persisted in the blood until 48 h after administration at MC710 doses of 80 µg kg⁻¹ or more (Fig. 2c,d).

The results of the PK parameters showed MC710 dose-dependent increases in the area under the curve (AUC) and maximum plasma concentration (C_{max}) of FVII:C, FVII:Ag, FX:C and FX:Ag (*P* < 0.001). On the other hand, other parameters, half-life (*t*_{1/2}), mean residence time (MRT), clearance (CL), volume of distribution at steady state (Vd_{ss}) and recovery were not dependent on the MC710 dose (Table 2a–d).

Pharmacodynamics

APTT and PT. The APTT, prolonged 120 s or more before administration, was improved at a dose-dependent manner after administration of MC710 (*P* = 0.01), and the APTT improvement effect persisted until 12 h after administration at all doses (Fig. 3a). The APTT after administration of 100 and 120 µg kg⁻¹ of MC710 was shorter than that after the administration of 120 µg kg⁻¹ of NovoSeven (100 µg kg⁻¹: *P* = 0.023, 120 µg kg⁻¹: *P* = 0.002, and the APTT after administration of 80, 100 and 120 µg kg⁻¹ of MC710 was shorter than that of 75 U kg⁻¹ of FEIBA (80 µg kg⁻¹: *P* = 0.049, 100 µg kg⁻¹: *P* = 0.022 and 120 µg kg⁻¹: *P* = 0.008).

The PT reached approximately 6 s (the determination limit) after administration of all doses of MC710 except for 20 µg kg⁻¹ and remained at that level for up to 2 h. At 6 h after administration of 80, 100 and 120 µg kg⁻¹ of MC710, PT was shorter than that after the administration of 120 µg kg⁻¹ of NovoSeven. PT reduction

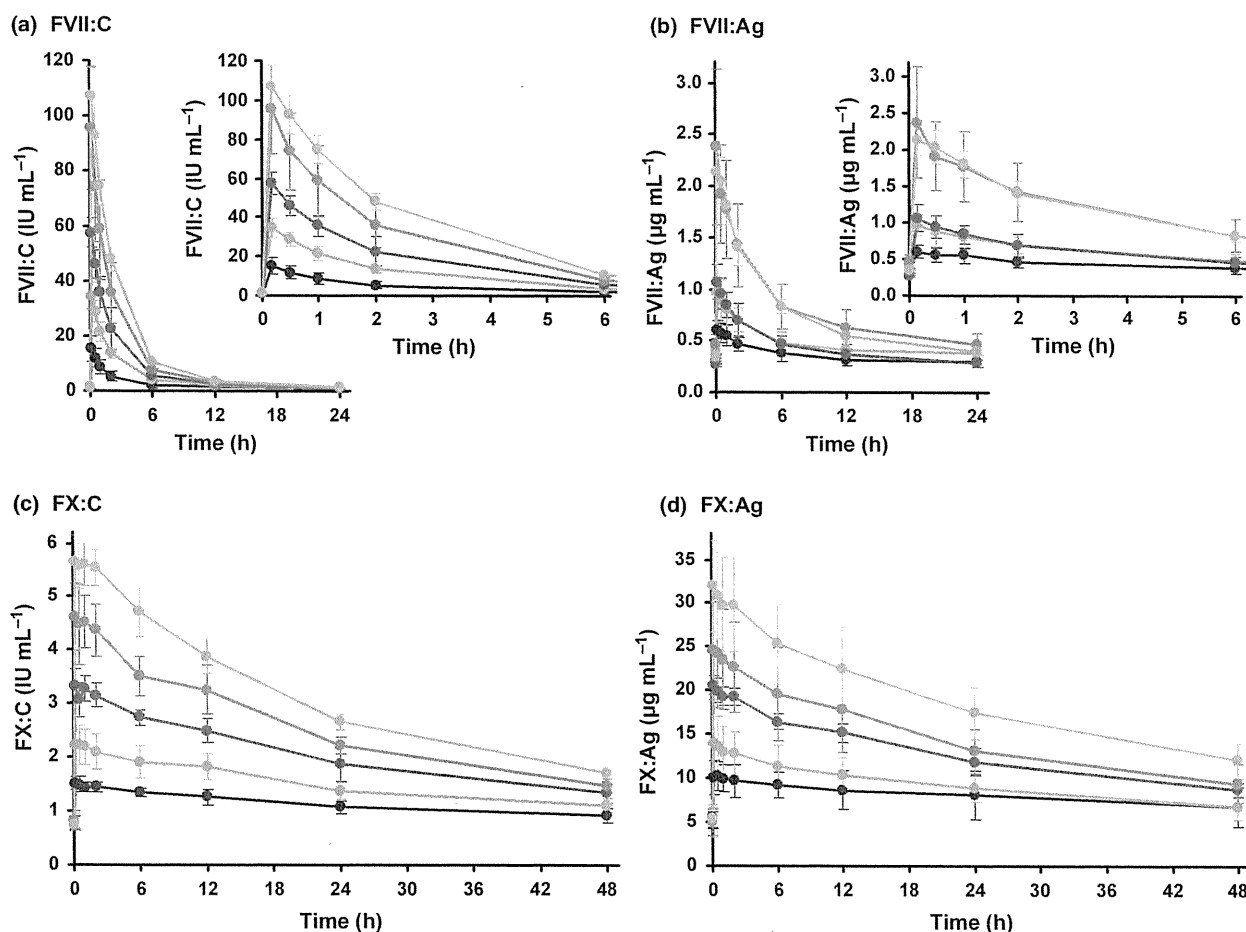


Fig. 2. Pharmacokinetics of MC710 ingredients. Time-dependent changes in the pharmacokinetics of FVII:C (a), FVII:Ag (b), FX:C (c) and FX:Ag (d) are shown. Enlarged figures of the changes in FVII:C and FVII:Ag until 6 h after administration are shown in the right upper corner of each graph. The mark represents the mean ± SD. MC710 doses are denoted as following colour symbols: 20 µg kg⁻¹, (●); 40 µg kg⁻¹, (○); 80 µg kg⁻¹, (■); 100 µg kg⁻¹, (□); 120 µg kg⁻¹, (◆).

Table 2. PK parameters of MC710 ingredients.

(a) FVII:C								
MC710 dose	<i>n</i>	AUC _{0→24} (IU h mL ⁻¹)	C _{max} (IU mL ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (h)	MRT (h)	CL (mL h ⁻¹ kg ⁻¹)	Vd _{ss} (mL kg ⁻¹)	Recovery (%)
20 µg kg ⁻¹	6	31.2 ± 14.7	14.3 ± 4.2	2.1 ± 0.7	2.0 ± 0.7	37.2 ± 15.8	73.5 ± 20.7	70.7 ± 20.7
40 µg kg ⁻¹	6	84.5 ± 11.2	33.2 ± 4.7	3.0 ± 1.2	2.4 ± 0.5	23.5 ± 3.5	61.4 ± 13.4	78.0 ± 9.8
80 µg kg ⁻¹	4	151.8 ± 42.0	56.5 ± 5.5	3.4 ± 0.7	2.7 ± 0.3	27.8 ± 7.8	75.6 ± 13.0	71.1 ± 6.2
100 µg kg ⁻¹	5	228.1 ± 62.7	94.2 ± 22.4	2.3 ± 0.5	2.2 ± 0.2	23.2 ± 6.6	52.8 ± 14.3	90.7 ± 18.6
120 µg kg ⁻¹	4	296.3 ± 14.2	106.0 ± 10.2	2.8 ± 0.6	2.1 ± 0.2	20.1 ± 1.0	50.9 ± 5.5	83.4 ± 7.9
(b) FVII:Ag								
MC710 dose	<i>n</i>	AUC _{0→24} (µg h mL ⁻¹)	C _{max} (µg mL ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (h)	MRT (h)	CL (mL h ⁻¹ kg ⁻¹)	Vd _{ss} (mL kg ⁻¹)	Recovery (%)
20 µg kg ⁻¹	6	0.9 ± 0.7	0.3 ± 0.1	3.5 ± 2.4	2.5 ± 2.2	21.5 ± 12.5	80.0 ± 26.8	68.9 ± 18.1
40 µg kg ⁻¹	6	1.9 ± 0.5	0.6 ± 0.1	4.2 ± 4.1	3.4 ± 2.4	20.0 ± 5.7	101.0 ± 79.1	66.4 ± 9.7
80 µg kg ⁻¹	4	3.4 ± 1.4	0.8 ± 0.2	3.7 ± 1.5	3.8 ± 1.3	25.3 ± 10.8	105.1 ± 19.7	50.0 ± 9.6
100 µg kg ⁻¹	5	7.0 ± 2.8	1.9 ± 0.7	4.9 ± 2.9	3.5 ± 1.4	13.9 ± 4.8	73.0 ± 31.5	92.0 ± 29.0
120 µg kg ⁻¹	4	8.9 ± 1.8	1.8 ± 0.2	4.7 ± 1.5	4.8 ± 1.4	12.8 ± 2.8	79.5 ± 21.1	70.4 ± 7.6
(c) FX:C								
MC710 dose	<i>n</i>	AUC _{0→48} (IU h mL ⁻¹)	C _{max} (IU mL ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (h)	MRT (h)	CL (mL h ⁻¹ kg ⁻¹)	Vd _{ss} (mL kg ⁻¹)	Recovery (%)
20 µg kg ⁻¹	6	16.2 ± 2.8	0.7 ± 0.1	23.2 ± 8.3	16.5 ± 2.1	1.6 ± 0.5	47.0 ± 9.0	112.6 ± 17.9
40 µg kg ⁻¹	6	34.0 ± 5.4	1.5 ± 0.2	22.5 ± 4.8	16.8 ± 1.6	1.5 ± 0.3	45.8 ± 9.0	104.1 ± 12.1
80 µg kg ⁻¹	4	57.4 ± 6.1	2.5 ± 0.1	22.0 ± 0.8	16.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2	53.6 ± 6.1	98.7 ± 7.8
100 µg kg ⁻¹	5	79.8 ± 9.5	3.9 ± 0.6	20.2 ± 2.2	15.9 ± 0.8	1.6 ± 0.2	45.1 ± 6.8	114.7 ± 13.6
120 µg kg ⁻¹	4	111.3 ± 11.6	5.0 ± 0.5	22.7 ± 1.5	16.4 ± 0.5	1.3 ± 0.1	41.5 ± 4.6	120.9 ± 11.4
(d) FX:Ag								
MC710 dose	<i>n</i>	AUC _{0→48} (µg h mL ⁻¹)	C _{max} (µg mL ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (h)	MRT (h)	CL (mL h ⁻¹ kg ⁻¹)	Vd _{ss} (mL kg ⁻¹)	Recovery (%)
20 µg kg ⁻¹	6	119.8 ± 59.5	4.8 ± 0.5	24.5 ± 12.1	17.2 ± 4.3	1.5 ± 0.6	50.8 ± 18.2	109.4 ± 17.6
40 µg kg ⁻¹	6	199.3 ± 40.9	9.6 ± 1.9	22.8 ± 8.7	17.1 ± 2.4	1.6 ± 0.5	48.3 ± 13.2	105.4 ± 15.6
80 µg kg ⁻¹	4	354.4 ± 42.9	15.5 ± 0.6	24.8 ± 1.5	17.4 ± 0.6	1.7 ± 0.2	58.2 ± 6.1	96.6 ± 4.7
100 µg kg ⁻¹	5	441.6 ± 100.0	20.1 ± 4.6	24.8 ± 2.7	17.0 ± 0.7	1.7 ± 0.4	60.0 ± 15.0	94.0 ± 16.9
120 µg kg ⁻¹	4	636.6 ± 81.3	26.6 ± 4.0	27.5 ± 2.5	17.8 ± 0.6	1.3 ± 0.1	51.7 ± 8.3	104.9 ± 16.7

The PK parameters were analysed using a non-compartment model. The PK of FVII:C and FVII:Ag were analysed using the data until 24 h after administration and those of FX:C and FX:Ag using the data until 48 h after administration. Data are shown as the mean ± SD.

persisted until 12 h after administration at all doses (Fig. 3b). The PT after administration of 40, 80, 100 and 120 µg kg⁻¹ of MC710 was shorter than that of 75 U kg⁻¹ of FEIBA (40 µg kg⁻¹: *P* = 0.019, 80 µg kg⁻¹: *P* = 0.006, 100 µg kg⁻¹: *P* = 0.006 and 120 µg kg⁻¹: *P* = 0.005).

TAT and F1+2. The TAT level increased above the upper limit for healthy individuals (3.2 ng mL⁻¹) 2 h after administration in all subjects except for two subjects with 20 µg kg⁻¹ MC710. The increase in the TAT level was not dependent on the MC710 dose; however, the TAT level at 2 h after administration of MC710 was higher in the higher doses (Fig. 4a-inset). As one subject had an extremely high TAT level (85.8 ng mL⁻¹) at 6 h after administration of MC710 100 µg kg⁻¹, the mean at that point was high (the TAT levels of the other four subjects ranged from 3.0 to 10.4 ng mL⁻¹) (Fig. 4a). The investigator commented that the unusual increase of TAT level was caused by inadequate blood drawing at that time point.

The F1+2 level showed peaks at 2 h at MC710 administrations (>80 µg kg⁻¹), exceeding the upper limit for healthy individuals (229 pm) (Fig. 4b-inset). The increase in F1+2 was dependent on the MC710

dose (*P* = 0.018). The increase in F1+2 after administration of MC710 120 µg kg⁻¹ was higher than that after administration of NovoSeven 120 µg kg⁻¹ (*P* = 0.01). A sharp increase in F1+2 was observed 10 min to 2 h after administration of FEIBA (Fig. 4b). It was confirmed that the FEIBA product contained F1+2 (data not shown), resulting in the remarkable increase of F1+2.

Safety

No serious or severe adverse event was observed within 4 weeks after administration of MC710 and no subject discontinued the study due to an adverse event. The incidences of adverse events were not dependent on the MC710 dose. Headache, abdominal pain and oral herpes (all in one subject) occurred within 4 weeks after administration of MC710 at a dose of 40 µg kg⁻¹ and a causal relationship with MC710 could not be ruled out. No clinical symptoms or changes in laboratory tests (platelet count, fibrinogen, D-dimer) indicating the hypercoagulable state such as DIC were induced after administration of MC710 (data not shown). In addition, the results of virologic and serologic tests confirmed that no subject developed a new viral antigen

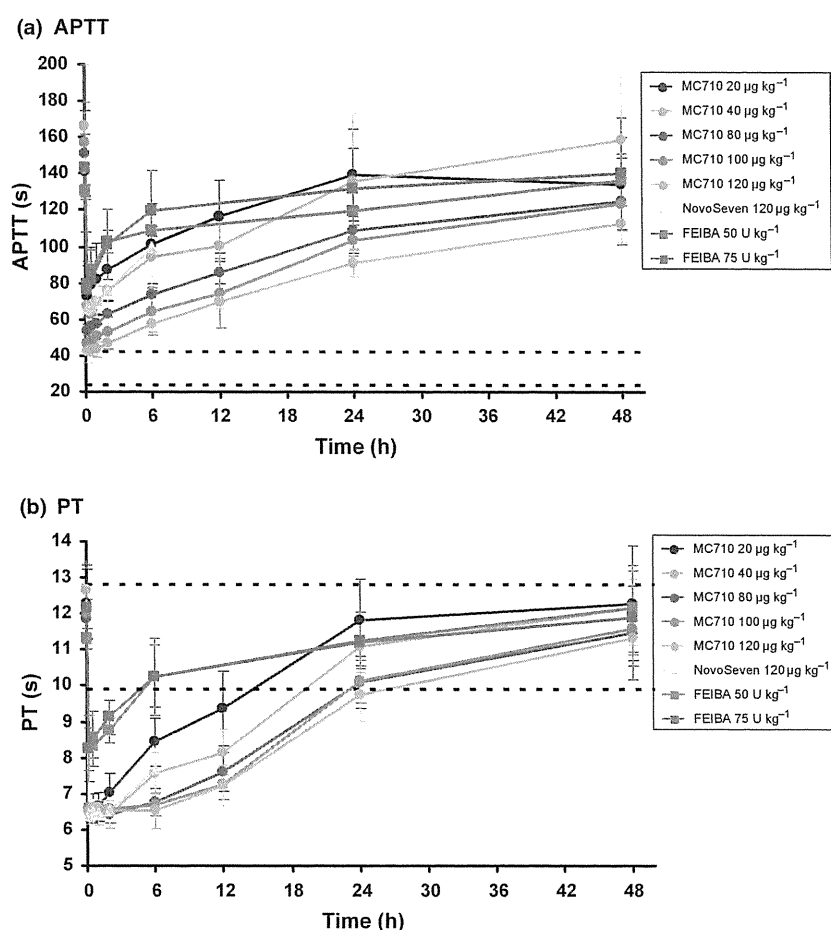


Fig. 3. Changes in APTT and PT. Time-dependent changes in APTT (a) and PT (b) are shown. The normal ranges for healthy individuals (...) for APTT were defined as 42.5 (upper limit) and 23.5 (lower limit) s and for PT as 12.8 (upper limit) and 9.9 (lower limit) s. The mark represents the mean \pm SD.

or produced a new antibody after administration of MC710.

Discussion

The results of PK parameters showed that the AUC and C_{max} of FVII:C, FX:C, FVII:Ag and FX:Ag were dependent on the MC710 dose (Fig. 2a–d and Table 2). The mean $t_{1/2}$ of FVII:C in the MC710-treated ranged from 2.1 to 3.4 h (Table 2a) and was similar to the previous reported value (mean $t_{1/2}$ of FVII:C in haemophilia patients without haemorrhage: 2.82 ± 0.53 h [11]). On the other hand, the mean $t_{1/2}$ of FX:C ranged from 20.2 to 23.2 h (Table 2c) and was shorter than reported values ($t_{1/2}$ of FX:C 24–56 h [12,13]); however, this difference may have been due to the effect of the concurrent presence of FVIIa at a high concentration, different test conditions (agents, blood sampling point) and analytical method.

The results of the PD analysis also showed that MC710 had a strong ability to improve prolonged APTT and shorten PT in haemophilia patients with inhibitors. In fact, the mean APTT at 10 min after

administration of $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ of MC710 was substantially improved to the upper limit for healthy individuals (42.5 s) (Fig. 3a). The APTT improvement effect and PT shortening effect were consistent with the dose-dependent changes in the AUC and C_{max} of MC710 in the PK analysis. In comparison with the active control, from results on APTT and PT, it is suggested that MC710 at $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ may have the haemostatic effect of equivalent to $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ of NovoSeven. TAT and F1+2 was increased after administration of MC710 (Fig. 4a-inset and 4b-inset), indicating the results of prothrombin activation in blood flow; however, similar increases in TAT and F1+2 were also observed after the administration of NovoSeven and FEIBA (Fig. 4a,b) and several studies have also reported the increase in TAT [14,15].

When administration of MC710 increases the plasma FVIIa and FX concentration, FVIIa activates FX at a concentration similar to that in rFVIIa treatment on the activated platelet. An increased FX level in plasma would be beneficial for the amplification of the thrombin burst and would lead to a greater bypassing effect than that of FVIIa administration alone. On the other

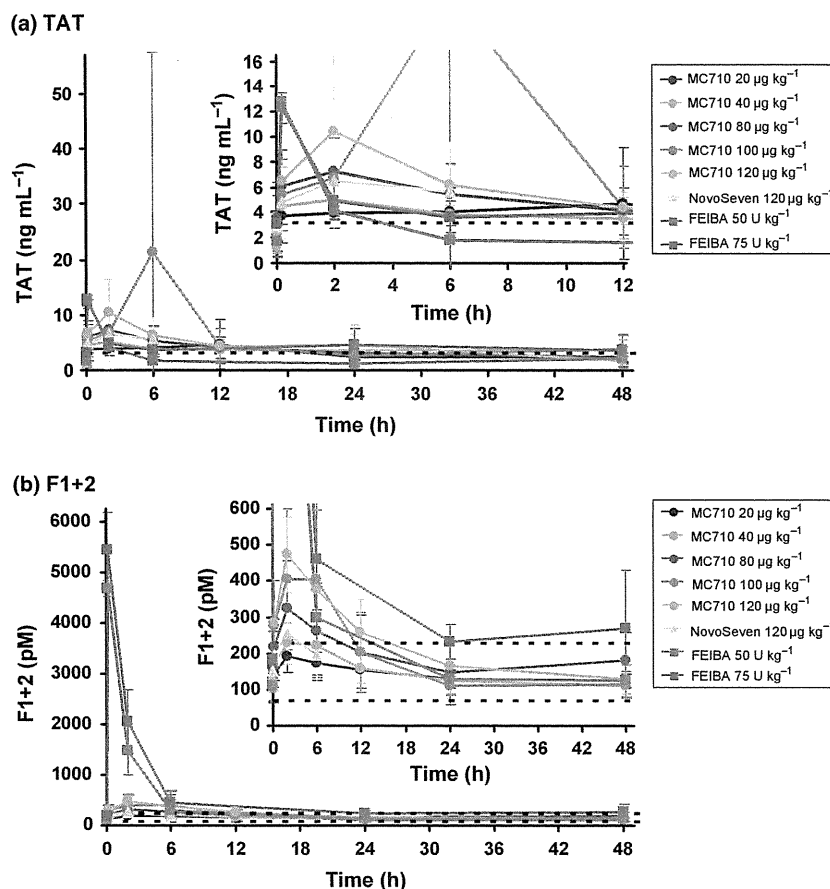


Fig. 4. Changes in TAT and F1+2. Time-dependent changes in TAT (a) and F1+2 (b) are shown. An enlarged figure of changes in TAT until 12 h after administration with an enlarged Y-axis is shown in the right upper corner of the graph. An enlarged figure of changes in F1+2 with an enlarged Y-axis is shown in the right upper corner of the graph. The normal range for healthy individuals (...) for TAT was defined as 3.2 ng mL⁻¹ (upper limit, no lower limit) and for F1+2 as 229 (upper limit) and 69 (lower limit) pM. The mark represents the mean \pm SD.

hand, the effects of MC710 on improving APTT and shortening PT persisted for 6–12 h after administration. These long acting effects may be attributed to the long half-life of FX ($t_{1/2}$ of FX:C: 20.2–23.2 h).

This study was non-randomized with a small sample size due to the fact that haemophilia patients with inhibitors are rare in Japan. However, by administration of active controls and re-administration of different doses of MC710 to the same subject, the inter-individual variability was reduced and internal validity was increased. Furthermore, a mixed effects model was applied for the statistical analysis to increase the sensitivity of analysis taking account of inter-individual variation.

In this study, PK and PD parameters changed in dose-dependent manners after administration of MC710 and the PD parameter changes were equal to or greater than those of the active controls. Furthermore, MC710 was safely administered at doses up to 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and no serious or severe adverse event, including DIC, was observed. These results suggest that MC710 has a dose-dependent haemostatic effect and the haemostatic effect is greater than that of the NovoSeven and FEIBA, and that MC710 has a tolerability of up to 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$. An

exploratory study (Phase II trial) in haemophilia patients with inhibitors who are haemorrhaging is planned to evaluate the efficacy and safety of MC710.

Addendum

Akira Shirahata developed the clinical trial protocol, evaluated efficacy and safety data and discussed the clinical events in the role of medical expert.

Hidehiko Saito, Katsuyuki Fukutake, Jun-ichi Mimaya, Junki Takamatsu and Midori Shima acted as the coordinating investigators, ensuring that investigators at the different institutions had a common understanding of the protocol and the implementation of the trial and gave general advice on the conduct of the trial.

The investigators had responsibility for all medical judgments associated with this trial in their institution and conducted the trial in accordance with the protocol including the selection of subjects, obtaining of informed consent, provision of data and information, reporting of adverse events, documentation of case reports and storage of essential documents.

Yasuo Ohashi, acting as the statistical advisor, gave advice and instruction on statistical analysis methods for the trial.

Kaketsuken managed the trial overall, including development and amendment of the protocol, data management, statistical analysis, quality control and assurance and data preservation.

Mitsubishi Chemical Medience Corporation collected the samples taken at the trial sites, conducted the tests, maintained measurement results and guaranteed the reliability of the results of the analyses.

Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd. (Kagoshima, Japan) was responsible for the estimation of PK parameters and conducted the statistical analysis.

Acknowledgements

This study was conducted with the support of Kaketsuken (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute).

Disclosures

Akira Shirahata and Yasuo Ohashi received a fee from Kaketsuken for the implementation of the trial. Other authors have declared that no conflict of interest exists in this trial.

References

- Schneiderman J, Rubin E, Nugent DJ, Young G. Sequential therapy with activated prothrombin complex concentrates and recombinant FVIIa in patients with severe haemophilia and inhibitors: update of our previous experience. *Haemophilia* 2007; 13: 244–8.
- Economou M, Teli A, Tzantzaroudi A, Tsatra I, Zavitsanakis A, Athanassiou-Metaxa M. Sequential therapy with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) and recombinant factor VIIa in a patient with severe haemophilia A, inhibitor presence and refractory bleeding. *Haemophilia* 2008; 14: 390–1.
- Livnat T, Martinowitz U, Zivelin A, Seligsohn U. Effects of factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA), recombinant factor VIIa or both on thrombin generation in normal and haemophilia A plasma. *Haemophilia* 2008; 14: 782–6.
- Moss J, Scharling B, Ezban M, Møller Sørensen T. Evaluation of the safety and pharmacokinetics of a fast-acting recombinant FVIIa analogue, NN1731, in healthy male subjects. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 299–305.
- Stennicke HR, Ostergaard H, Bayer RJ *et al.* Generation and biochemical characterization of glycoPEGylated factor VIIa derivatives. *Thromb Haemost* 2008; 100: 920–8.
- Hartmann R, Dockal M, Kammlander W *et al.* Factor IX mutants with enhanced catalytic activity. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1656–62.
- Nakatomi Y, Nakashima T, Gokudan S *et al.* Combining FVIIa and FX into a mixture which imparts a unique thrombin generation potential to hemophilic plasma: an in vitro assessment of FVIIa/FX mixture as an alternative bypassing agent. *Thromb Res* 2010; 125: 457–63.
- Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipide and tissue factors. *Biochemistry* 1990; 29: 9418–25.
- Tomokiyo K, Nakatomi Y, Araki T *et al.* A novel therapeutic approach combining human plasma-derived factors VIIa and X for haemophilia patients 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.
- Hedner U. Dosing with recombinant factor VIIa based on current evidence. *Semin Hematol* 2004; 41(Suppl. 1): 35–9.
- Lindley CM, Sawyer WT, Macik BG *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant factor VIIa. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55: 638–48.
- Mori K, Sakai H, Nakano N *et al.* Congenital factor X deficiency in Japan. *Toboku J Exp Med* 1981; 133: 1–19.
- Ostermann H, Haertel S, Knaub S, Kalina U, Jung K, Pabinger I. Pharmacokinetics of Beriplex P/N prothrombin complex concentrate in healthy volunteers. *Thromb Haemost* 2007; 98: 790–7.
- Shirahata A, Kamiya T, Takamatsu J *et al.* Clinical trial to investigate the pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and efficacy of recombinant factor VIIa in Japanese patients with haemophilia with inhibitors. *Int J Hematol* 2001; 73: 517–25.
- Elg M, Carlsson S, Gustafsson D. Effect of activated prothrombin complex concentrate or recombinant factor VIIa on the bleeding time and thrombus formation during anticoagulation with a direct thrombin inhibitor. *Thromb Res* 2001; 101: 145–57.

Appendix: MC710 Trial group

The institutions and the doctors participating in this trial are listed below.

(1) Department of Haematology, Ogikubo Hospital: Hideji Hanabusa and Ei Kinai. (2) Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University: Katsuyuki Fukutake, Kagehiro Amano, Yasuyuki Yamamoto, Kazuhiko Kagawa, Yasuharu Nishida, Takashi Suzuki, Kyoichi Ogata, Akeshi Ko and Taito Uchida. (3) Department of Joint Surgery, Research Hospital of the Institute of Medical Science, The University of Tokyo; Hideyuki Takedani, Department of Infectious Diseases and Applied Immunology; Takashi Odawara, Takuya Maeda and Tokiomi Endo. (4) Division of Haematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital; Yoshifumi Takashima, Yasuo Horikoshi and Marika Matsumoto. (5) Department of Haematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya University Hospital; Tadashi Matsushita, Akira Katsumi, Department of Transfusion Medicine, Koji Yamamoto. (6) Department of Paediatrics, Nara Medical University; Midori Shima, Akira Yoshioka, Ichiro Tanaka, Keiji Nogami, Masaru Shibata and Yoshihiko Sakurai. (7) Department of Paediatrics, National Hospital Organization Osaka National Hospital; Akio Tawa, Yoshikazu Ozaki, Shizuko Terada and Keiji Ueno. (8) Division of Haematology, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine; Satoshi Higasa, Akihiro Sawada and Tazuko Tokugawa. (9) Division of the Blood Transfusion Services, Hiroshima University Hospital; Noboru Takata, Teruhisa Fujii and Seiji Saito. (10) Department of Paediatrics, University of Occupational and Environmental Health, Japan; Michio Sakai and Tetsuji Sato. (11) Department of Paediatrics, Kagoshima City Hospital; Kiyoshi Kawakami, Takuro Nishikawa and Yuni Yamaki.

HIV 陽性夫婦の生殖補助医療と 母子感染防止対策

なが お すすき 梓* はなぶさ ひでじ 花房 秀次*

要旨

HIV/AIDS 診療は 1996 年以後プロテアーゼ阻害薬を含む多剤併用療法の普及により死の病気ではなく慢性疾患になりつつある。その結果、結婚して子どもを希望する夫婦が増えてきており、QOL の改善が求められている。われわれは HIV 感染男性の精液から HIV RNA, DNA を完全に除去し、体外受精により母子ともに感染することなく挙児可能とした。夫が HIV 陰性で妻が陽性の場合は人工授精を行い、夫婦ともに HIV 陽性の場合は重複感染 (superinfection) を考慮した対応を検討している。HIV 陽性妊婦の感染対策により母子感染を 2% 以下に抑制可能である。HIV 感染者夫婦の状況に応じた挙児方法を相談する必要がある。

はじめに

現在、HIV 感染者は世界中で急速に加速しつつある。WHO によると 2009 年末の世界の HIV 感染者数は 3,330 万人と推測されており、2009 年だけで新規感染者は 260 万人にもものぼる。HIV/AIDS 診療の進歩はめざましく、1996 年にプロテアーゼ阻害薬 (PI) を含む多剤併用療法 (highly active antiretroviral treatment: HAART) が導入された後、AIDS による死亡者は激減した。近年さらなる薬剤の発展に伴い HIV/AIDS はコントロール可能な慢性感染症になりつつあり、WHO では HIV 感染者を “people living with HIV/AIDS” と表現している。そのため、感染者は QOL の改善を求めるとともに、結婚して子どもが欲しいという夫婦も増えてきている。

以前は医療従事者は 2 次感染の危険性を指摘するだけで、HIV 感染者は子どもをあきらめる

か、危険を覚悟して性交渉で子どもを作るしかなく、妻が感染した例もあった。われわれは新潟大学、慶應義塾大学、東京歯科大学などとの共同研究で、妻と子への感染を防ぐため、HIV 感染男性の精液から HIV を完全に除去し、HIV 陰性の女性との間で 100% 安全に子どもができる方法を開発し¹⁾、現在までに 100 名を超す児の出産に成功している。さらに、抗 HIV 薬も初期より安全で効果が強い薬剤の開発が進み、母子感染を 2% 以下に抑制できるようになっている。

最近、抗 HIV 薬療法で 2 次感染がどれだけ防止できるかが大変重要なテーマとなっている。2008 年、スイスのエイズ委員会が抗 HIV 薬療法により血中ウイルス量が検出限界以下に抑制されれば、性交渉での HIV 感染の危険性は少なくコンドーム装着の必要もないと発表し、大変な議論となった。米国 CDC やカナダなどは反対表明を出しコンドームの必要性を訴え、専門誌上や国際会議でも議論が交わされたが、現時点では明確な結論が出ていない。

* 荻窪病院血液科

〒167-0035 東京都杉並区今川 3-1-24

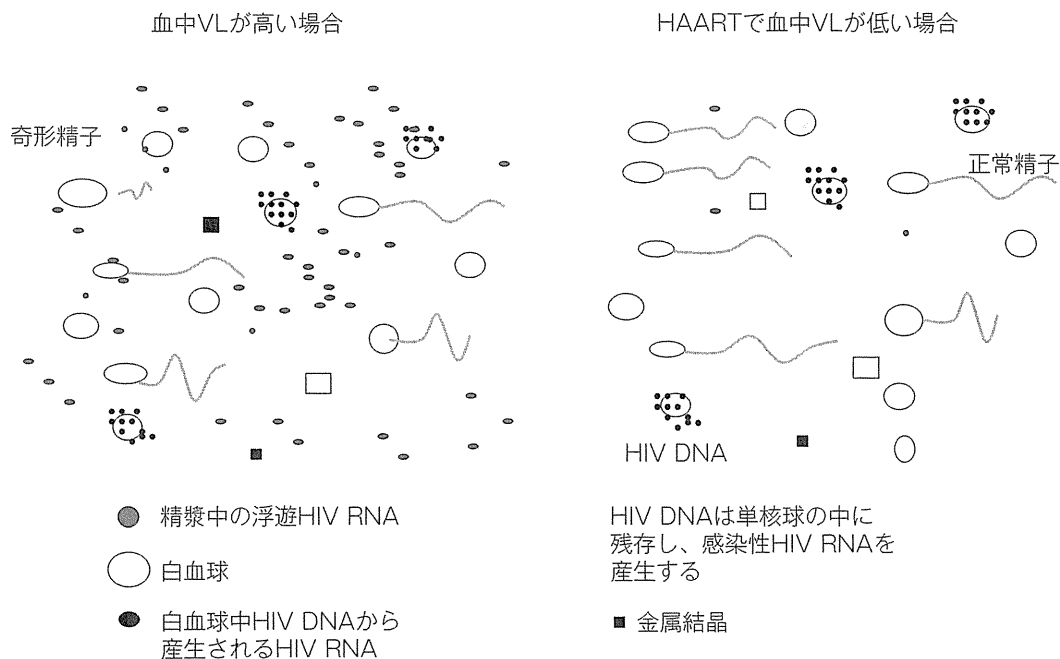


図1 精液中の HIV

われわれは血中 HIV RNA 量と精液中 HIV RNA 量が相関することを 2000 年に報告した²⁾。Quin らも血中ウイルス量が低いほど異性間性交渉での 2 次感染が低いことを報告している。しかし、血液中の HIV RNA をどれだけ抑制しても、体内の HIV DNA は単核球に残存して HIV を産生するので薬剤を中止することはできない。精液や腺分泌液から HIV が消失することはなく、2 次感染の危険性は低くなくても決してゼロにはならない。2009 年 AIDS 誌の editorial review では抗 HIV 薬療法で血中 HIV RNA 量が 400 copies/mL 以下に抑制された時、異性間での 2 次感染の危険性を 0.16 [0.02~1.13, 95% 信頼区間] per 100 person-years と計算している³⁾。性感染症や陰部潰瘍などがある場合や肛門性交渉では危険性がさらに高くなる。しかし、現時点では前向き大規模研究がなく、信頼できるデータが不足しており正確な危険率は不明である。そのため現在先進国ではコンドームの併用が勧告されている。

また、われわれの検討では HIV 感染男性の

約 70% で精子の異常を認める。精子数が減少し、精子の正常形態率が低下し、精子の運動能が障害され男性不妊となっている危険性がある。HIV 陽性女性も卵巣機能や卵管に障害を認める場合も多い。HIV 感染症の治療の進歩とともに HIV 感染者の生殖補助医療も進歩しており、医療従事者は各方法の特徴や安全性を理解して感染者夫婦に説明する必要がある。

I HIV 陽性夫婦の生殖医療対策

HIV 陽性夫婦の生殖医療を考える際、以下の 3 つの組み合わせに分けて現状の対応を検討する必要がある。

1. 夫が HIV 陽性で妻が HIV 陰性の場合
2. 夫も妻も HIV 陽性の場合
3. 夫が HIV 陰性で妻が HIV 陽性の場合

1. 夫が HIV 陽性で妻が HIV 陰性の場合
 精液中には精子のほかに精漿に浮遊する HIV RNA や精液中の単核球中の HIV DNA から作られる HIV RNA などが含まれている (図

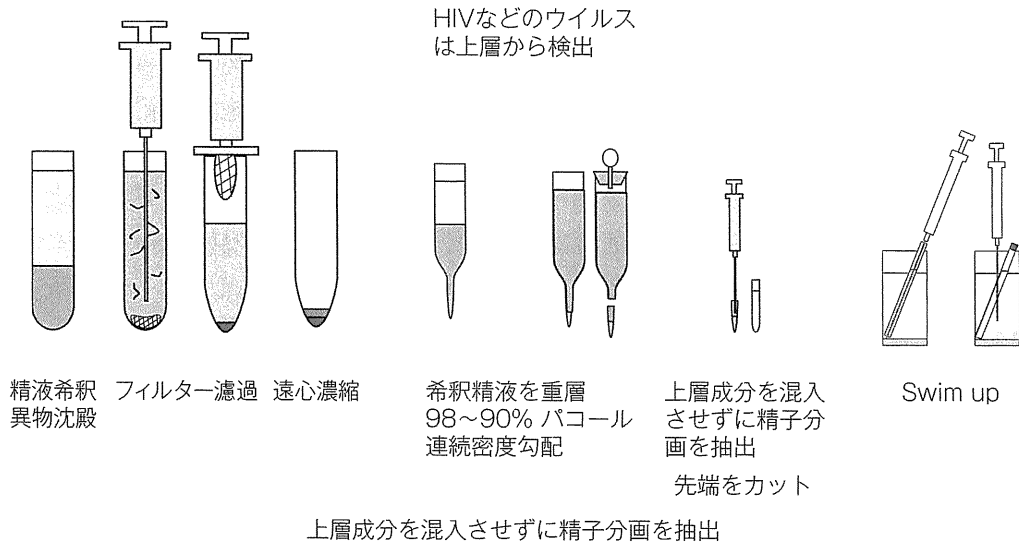


図2 精液から HIV 除去を目的とした方法の開発

1). また、前立腺由来の成分のほかに、尿と同様に白血球や金属結晶、尿道通過時の雑菌や下着の繊維などが混入している。

われわれの検討では精液中の HIV RNA 量と血中 HIV RNA 量には正の相関を認めた²⁾。すなわち、血中ウイルス量が多いと精液中のウイルス量も多く、2次感染の危険性も高い。HIV 感染男性が排卵日だけコンドームを使用しないで妊娠を図ると毎年 4.8% 前後の妻が感染すると推測される⁴⁾。逆に、治療で血中 HIV RNA 量が検出限界以下になると精液中の HIV RNA 量も低くなり、2次感染の危険性も低くなるが、感染の危険性は残存する⁵⁾。

HIV 陽性者の無処理の精液を用いた人工授精では約 3.5% が 2次感染した⁶⁾。それに対して、Semprini らは、swim up 法により精子を処理して 2,000 回以上人工授精を行い、2次感染がないと報告している⁷⁾。しかし、Semprini らの方法はウイルス除去率が十分でなく、HIV DNA の測定も行っておらず、100%安全とはいえない。EU などでは PureCeptionTM などを用いて精液を遠心処理し、swim up 法で精子を回収し、人工授精や体外受精を行うことが多い。しかし、swim up 法といっても施設によって方

法が大きく異なり、結果としてウイルス除去率も異なる。一般的に行われている swim up 法は不妊症で使用されてきた方法で運動精子の回収を目的としており、HIV 除去は十分ではない。

そこで、図 2 に示すように、われわれは HIV 除去を目的とした方法を開発した。遠心前に精液を希釈して静置し、精子より重い成分を沈殿させた後に上層の精子浮遊液を回収し、フィルター濾過して遠心分離した。使用する分離液や濃度設定によってもウイルス除去率が異なる。一般的には 90% と 45% の 2層 PureCeptionTM が使用されることが多いが、PureCeptionTM による HIV 除去効率はパコールより低い⁸⁾。われわれは 98% パコールを用いた連続密度勾配により HIV 除去率を $1/10^6$ 以下に高めた¹⁾。しかし、ウイルス除去率を高めると精子の回収率が悪くなる問題がある。遠心分離後に、一番底の洗浄精子をどのように回収するかも問題である。遠心分離後、HIV は上層に分布し、単核球は中間層に分布している。従来法では、上から吸引して最下層の精子を回収しており、管壁を伝わり上層の HIV や白血球が必ず混入する。

われわれは図 2 のように兼子が開発した特殊試験管を用いて上層成分を完全に遮断して底の

精子を回収した。従来の swim up 法は精子浮遊液に培養液を重層して泳いで上る精子を回収する。遠心後の精子を培養液で洗浄し、そこに培養液を重層すると比重差が少なくウイルスや白血球を攪拌してしまう。われわれは図2に示すようにパコール液の最下層の精子液を乱流が生じないように底に静置し、泳いで上る精子を回収している。

現在世界中で行われている人工授精では、実際に子宮に注入する精子のウイルス除去を確認しておらず、危険性を抱えている。HIV の除去を PCR で確認するためには長時間を要し、その間に精子が損傷して受精率が低下するため実際には検査が行われていない。われわれは、慶應義塾大学の加藤が開発した超高感度 PCR で swim up 法での回収精子や受精卵培養液で HIV RNA や HIV DNA が 1 copy もないことを証明し、100%の安全性を確認することに成功した。そのため体外受精は人工授精に比べて2次感染防止の安全面や妊娠率では数段優れている。

体外受精にはいくつかの課題がある。まず、医療費に健康保険が適応されず、排卵誘発剤などの費用が高い。また、排卵誘発剤投与による女性の負担が大きく、卵巣過剰刺激症候群などを合併すると腹水の治療が必要な場合もある。夫の HIV 感染について周囲に話していない場合が多く、妻の家族や職場などに事情を説明しにくいので、対応を相談する必要がある。

HIV 陽性男性では体外受精でも受精しないほど回収精子数が少ない場合もあり、運動性の良い精子を顕微鏡下で回収して卵細胞に注入する ICSI (intracytoplasmic sperm injection; 顕微授精, 卵細胞内精子注入法) が必要となることも多い。注入精子液は HIV が混入している可能性があるため、事前の精子処理は必要不可欠である。ICSI 自身の安全性を問題視する意見もあり、兼子が開発した DNA 損傷が少ない精子を選択する技術を検討している。

研究班への拳児希望者は荻窪病院を受診して

説明を受け、夫婦個別カウンセリングで参加意思確認後、精子のスクリーニング検査を行う。その後、実施産科施設に紹介して改めて説明を受け、同意書を得た後に実施となる。胚移植後は妊娠の有無にかかわらず妻の感染症検査を行い、出産後は母子の検査で2次感染がないことを確認する。

2. 夫も妻も HIV 陽性の場合

HIV 感染者同士が結婚した場合の拳児相談や、夫婦間で感染した場合の相談も寄せられている。今後、HIV 感染者の予後が改善するとともに感染者同士の結婚も増え、拳児相談も多くなると推測される。この場合にもどのような対応をとるのかについて、現状では倫理的にも社会的にも幅広い議論が必要である。その妥当性を判断する前提として、重複感染、HIV の薬剤耐性変異、HIV 感染者の精子や卵巣機能、ART の精子への影響など多くの検討が必要であり、感染者夫婦個々の状況に応じた対応が求められる。

HIV は変異速度が速く、宿主の免疫状態によっても感染者個々の HIV の多様性は大きく異なる。すでに HIV に感染していても別の HIV に再度感染すると、HIV の再構築が起こり (recombination), AIDS 発症を早めたり薬剤耐性を誘導する危険性がある⁹⁾¹⁰⁾。また、たとえ夫婦間で感染したとしても夫婦の major clone が異なっていたり、時間とともに大きく変異し、性交渉で再感染が生じる可能性がある。重複感染を防止するためには、HIV 陽性同士でも生殖補助医療が必要となる。夫婦のどちらかのウイルスが薬剤耐性となっていると、性交渉で新たに耐性ウイルスに感染する危険性もある。

2004年にEU特別委員会は、夫婦ともに HIV 陽性の場合には生殖補助医療を実施すべきではないと勧告した¹¹⁾。夫婦ともに HIV に感染していると子どもが成人するまでに両親ともに死亡して孤児になる危険性や子どもの権利を訴え問題になった。HIV 感染症の治療が進歩して予後が改善された現状では、夫婦ごとの状

況に応じて検討すべきと考えられる。夫婦がともに病気をもっている場合に子どもをもつ場合の是非論は、HIV/AIDSに限ったことではない。ただ、HIV/AIDSの最新の医療情報をしっかり得た上で議論すべきである。

3. 夫がHIV陰性で妻がHIV陽性の場合

基本的に夫から精子を採取して人工授精を行えば夫に感染することなく、子どもをもてるので妊娠後の母子感染を防止すれば大きな問題はない。ただ、HIV陽性女性の場合、性感染症などにより卵巣機能や卵管障害を合併して妊娠しにくい場合もあり、注意が必要である。

II HIV陽性妊婦の母子感染予防

1. 抗HIV薬の投与

HIV陽性の女性が妊娠した場合の抗HIV薬投与方法は各ガイドラインにも掲載があるが、大まかには以下のように考える。

a. 分娩前

初回治療で免疫状態が良好であれば妊娠14週以後(28週前)にHAARTを開始する。EFVなどは催奇形性が強く妊娠初期には禁忌である。薬剤耐性や副作用がなければLPV/r+AZT+3TCが推奨される。

b. 分娩中

選択的帝王切開の場合、帝王切開3時間前にAZT 2 mg/kg/doseを1時間かけて点滴静注、以後1 mg/kg/時で持続静注する。分娩開始とともにAZT 2 mg/kgを1時間静注し、引き続き出産まで1 mg/kg/時で持続静注する。

2. 選択的帝王切開

陣痛が起こると母親の血液が胎盤から流入して胎児に感染する危険があるために、陣痛前の在胎38週前後で選択的帝王切開を行うことが推奨されている。しかし、母体血中ウイルス量が1,000 copies/mLより低い場合には感染確率は少なく、帝王切開自体の問題もあり、米国などでは経膈分娩でもよいと考えられている。

3. HIV陽性母体の児に対する管理

HIV陽性母体から産まれた児では母子感染が否定されるまで以下の処置を行う。

a. AZT予防投与

出産後6~12時間までに新生児に対しAZTシロップ経口投与(2 mg/kg内服または1.5 mg/kg静注を6時間ごと1日4回)を開始し、6週間継続する。副作用が強い場合は4週間に短縮する。

以下の副作用に留意する。

- ① 貧血、顆粒球減少：AZTによる骨髄抑制が強い場合には減量や中止が必要となる。
- ② 消化器症状：嘔気・嘔吐に注意する。

b. 母乳禁止

母乳にはHIVや感染細胞(樹状細胞など)が含まれているため、母乳によりHIV感染が生じる。このため、乳房を冷やして断乳する。実際には家族親戚に母親のHIV感染を話せていないことも多く、なぜ母乳を禁止するかの説明理由(乳腺炎など)の相談も必要である。

4. 母子感染対策の今後の課題

出産後の児への抗HIV療法としてAZT単独投与でよいのか、多剤併用療法がよいのかは今後の議論が必要である。AZT単独投与の有効性はHAARTが導入される以前のデータで比較試験は少なく、児における薬物動態試験も十分に行われていない。小児で使用可能な抗HIV薬の種類は少なく、成人でのHIV曝露後の感染予防には多剤併用療法が常識であるにもかかわらず、新生児へは1990年代前半に検討されたAZT単独療法が続けられており、本当にAZT投与が必要か、投与期間は妥当か否か、母体のウイルス量が高い場合や耐性ウイルスが検出された場合に児へのHAARTが必要か否か、母体のウイルス量(DNA, RNA)をどれだけ抑制すれば帝王切開の必要性がなくなるかなど検討すべき課題は多い。

おわりに

HIV/AIDS の治療の進歩により，母子感染対策，生殖補助医療についても対応が変化しつつある．可能な限り安全な生殖補助医療を実施するのか，あるいはある程度の危険性以下であれば自然妊娠を容認するのかなど，どの方法を選択するかは各国の医療情勢や個々の夫婦の考え方によって異なる．現状では，個々の HIV のコントロール状態，精子機能や卵巣機能などを検討し，個別に夫婦とよく相談する必要がある．医療従事者は夫婦への説明責任があり，十分に正確な情報を認識するか，専門医との相談が必要となる．

文献

- 1) Kato S et al : Complete removal of HIV-a RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method : assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS* 2006 ; 20 : 967-973
- 2) Hanabusa H et al : An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS* 2000 ; 14 : 1611-1616
- 3) Wilson DP : Data are lacking for quantifying HIV transmission risk in the presence of effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009 ; 23 : 1431-1433
- 4) European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV : A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners. *N Engl J Med* 1994 ; 331 : 341-346
- 5) Haase AT, Schacker TW : Potential for the transmission of HIV-a despite highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 1846-1848
- 6) Araneta MR et al : HIV transmission through donor artificial insemination. *JAMA* 1995 ; 273 : 854-858
- 7) Semprini AE, Fiore S, Pardi G : Reproductive counseling for HIV-discordant couples. *Lancet* 1997 ; 349 : 1401-1402
- 8) Kuji N et al : Sedimentation Kinetics of HIV-1 in two gradient media. 58th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine. (Seattle) 2002 ; 10 : 12-17
- 9) Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH : Human immunodeficiency virus superinfection and recombination : current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 2002 ; 34 : 1108-1114
- 10) Iwabu Y et al : Superinfection of defective human immunodeficiency virus type I with different subtypes of wild-type virus efficiently produces infectious variants with the initial viral phenotypes by complementation followed by recombination. *Microbes Infect* 2008 ; 10 : 504-513
- 11) Shenfield F et al : ESHRE ETHICS and LAW Task Force Taskforce8 : ethics of medically assisted fertility treatment for HIV positive men and women. *Human Reproduction* 2004 ; 19 : 2454-2456

血友病

長尾 梓* 花房秀次

I 疾患概念

血友病は、血液中の凝固因子の欠乏により出血症状を伴う先天性疾患である。血友病 A は第Ⅷ因子、血友病 B は第Ⅸ因子が欠乏しており、X連鎖性劣性遺伝形式をとるが、家族歴のない突然変異も約 30%ある。有病率は約 1 万人に 1 人（男児 5000 人に 1 人）で、わが国には約 5000 人の血友病患者が報告されているが、実際にはもっと多くの血友病患者がいると推測されており、わが国の診断率は発展途上国並みに低い¹⁾。

血友病は昔から治療として輸血や血漿の投与を行い、輸血感染症との闘いの歴史でもあった。1980 年前後に登場した非加熱濃縮製剤が 1985 年に加熱処理されるまでの間に薬害エイズが生じ、1992 年までに C 型肝炎にも多くの血友病患者が感染した。C 型肝炎は感染後 20 年経過すると肝硬変が増加し、30 年経つと肝臓がんが増加してくる。現在、血友病患者の死因として肝不全や肝臓がんが増加しており、たいへん深刻な問題である。しかし、遺伝子組み換え技術の発展により血友病製剤は進歩し、小児では定期的に製剤投与することにより出血を予防できるようになり、血友病の概念が変わりつつある。現在の血友病医療は、世代によって求められる診療が大きく異なっている。

Nagao Azusa Hanabusa Hideji

* 荻窪病院血液科

〒167-0035 東京都杉並区今川 3-1-24)

TEL 03-3399-1101

II 年齢別健康管理 (表)

1. 検査と臨床評価

血友病家系の女性から生まれた男児や出血傾向を認める児は、まずは凝固系のスクリーニング検査を行う。血友病の確定診断には第Ⅷ・Ⅸ因子レベルの測定が必要であるが、新生児は正常でも第Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ因子が低下しているため診断には注意が必要である。因子レベルによって、重症 (<1%)、中等症 (1~5%)、軽症 (>5%) に分類される。出血時に使用する凝固因子製剤の選択は治療開始前から親と相談しておく。医療者が十分な説明を行ったうえで、最終的に患者（小児では親）が決定する。献血由来製剤と遺伝子組み換え製剤があり、それぞれ製造方法や特色が異なるため事前説明と同意が必要である。

乳児期までは皮下出血が多いが、皮下出血は治療の必要はない。2 歳前後になると体重と運動量の増加により関節に出血しやすくなる。小児の大半がこの頃から定期補充療法を開始する^{注 1)}。血友病 A では週に 1~3 回、血友病 B で 1~2 回の注射を行う。乳幼児での家庭輸注は本人と家族（母）への負担は大きく、長期作用型製剤が開発されれば週に 1 回から数週間に 1 回の注射ですみ負担が軽減される。

補充療法開始後、とくに 50 実投与日以内はインヒビター^{注 2)} 発生の可能性があるため²⁾ (血友病 A では約 30%前後、血友病 B では約 4%)、定期的な検査を要する。献血由来製剤と遺伝子組み換え製剤でインヒビター発生率は変わらないとされている³⁾。インヒビターにより止血が困難になると、バイパス製剤を使用する。また、インヒビター消失を目指して免疫寛容療法 (ITI)^{注 3)} を

表 血友病患者の年齢と必要な医療

	結婚・出産	出生後	2歳前後	入園・入学前	小学5年生前後	中学・高校	大学	成人	高齢
保因者診断	●								
受精卵診断	倫理?								
頭蓋内出血への対応	●	●							○
凝固検査・重症度		●	●	○					
使用製剤の相談	●	●	●	○	○	○	○	○	○
定期補充療法		△	●	●	●	●	●	○	有用?
インヒビター検査		△	●	●	△	△	△	△	
家庭輸注指導			●親	●親	●本人	○	○	○	
就学相談				●		●	●		
就職相談							●	●	
関節X線検査			○	○	○	○	●	●	●
リハビリ					△	○	○	●	●
在宅・介護問題									●

● 強く推奨 (必要) ○ 推奨される △ 実施が望ましい ? 現状では何ともいえない

行くと、約 70%前後で効果が得られる。ITI の使用製剤の種類や投与量が成功率に関係するかどうかは検討中である。注射が困難な場合は IVH ポートを留置する場合もある。

関節内出血と炎症をくり返し関節軟骨などの破壊が進行すると、血友病性関節症となる (標的関節)。慢性滑膜炎を生じて出血をくり返す場合は、関節鏡視下滑膜切除術を検討する。末期にたった場合、人工関節置換術が適応となるが、そのままに整形外科医と連携し定期的に X 線写真を撮るなどの関節の評価を行うとともに、筋力訓練や可動域訓練などの理学療法を行う。

注 1) 定期補充療法：定期的に製剤を輸注して出血を予防する療法。

注 2) インヒビター：凝固因子に対する同種抗体で、凝固因子活性を阻害する。Bethesda 法や Nijmegen 変法により測定するが、正常血漿 1 mL 中の第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子を 50%失活させる抗体量を 1 Bethesda Unit/mL (BU/mL) と定義する。通常は >0.6BU/mL でインヒビター陽性とする。

注 3) ITI (immune tolerance induction)：血友病 A において、定期的に第Ⅷ因子製剤を投与して生体の免疫寛容を誘導してインヒビターを消失させる。血友病 B では、免疫複合体を生じてネフローゼ症候群となる危険があり、慎重に検討すべきである。

2. 予想される課題に対する指導

血友病児が幼稚園・小学校に入学する際、病気のことをいつ、どのように伝えるかが問題となる。血友病についての理解が十分でないと、受け入れ側の混乱と不適切な対応を招く場合もあり、専門医と相談する必要もある。小学校 5 年生程度になると移動教室などが増えてくるので、その前に自己注射を開始する。

中学・高校になると親離れが進み、思春期の反発が自己管理の妨げとなる。定期補充の定着により出血の症状や対応が理解できない子どもが増えている。

大学生になると病院に来院しなくなり、自己流の止血管理で悪化することもある。

就職相談は医療ソーシャルワーカーと連携して対応している。健保財政が悪化している現状で、高額な医療費のかかる血友病は雇用に支障が生じて、障害者枠での就職を検討することもある。

青年期には結婚を考えると相手に相手の親に病気をどのように話すかが問題で、カウンセリングが必要な場合もある。血友病男性と正常女性の子どもは、男児なら正常、女児なら 100%保因者として生まれてくる。保因者の女性が将来出産すると、男児なら 50%が血友病、女児なら 50%が保因者となる。そのため、産み分けを希望する

夫婦もいるが、倫理的に許可されていない。現在、受精卵のDNAを検査する着床前診断は、日本産婦人科学会のガイドラインに基づき重篤な遺伝性疾患にのみ適応が限られており⁴⁾、血友病は承認されていない。保因者女性は過去の父親の病状をイメージして悩むことも多く、現在の発達した血友病医療について説明し、十分な理解を得ることが重要である。また、血友病の家系に生まれた女性や血友病児出産経験のある女性が保因者診断を希望する場合には遺伝子検査が必要であるが、倫理や費用などの問題からわが国では実施が限られている。

血友病保因者の可能性のある女性が出産する場合、産科医と事前に相談し、分娩時頭蓋内出血を避けるために吸引・鉗子分娩は禁止し、難産であれば早めに帝王切開に切り替える必要がある。

中年期からは生活習慣病の合併が問題となる。血友病患者が長期生存できるようになり、高齢化に伴う問題が新たに生じている。在宅介護や老人施設などで、地域医療と専門医との医療連携を整える必要がある。

III 年齢別健康管理スケジュール

表に各年齢に応じた検査や治療、課題などを示す。血友病の中等症や軽症は成人になって発見される場合もある。インヒビターは、製剤投与後早期の小児期に現れることが多いが、成人でも手術などで大量投与した後に検出される場合もある。家庭輸注訓練は小児期に行うが、成人になってもときどき実施方法や投与量などの再確認を行うことが望ましい。成人の定期補充療法は費用対効果について議論されている。使用製剤の変更は副作用の面から必要最小限にとどめるべきだが、新しい製剤が登場すれば変更の相談が必要である。

* * *

IV 結論

薬害エイズ/薬害肝炎を乗り越えた血友病医療はインフォームドコンセントや患者の権利を重視した医療に変換した。さらに、製剤の安全性と供給体制を整え、新しい世代の血友病患者は出血を予防して関節障害もなく、平均寿命も延長し、健常者と変わらない生活を送れるようになると予想される。

Key Points

- ① 治療薬や方法の発展により、血友病患者の寿命は国民の平均寿命に近づいている。
- ② 定期補充療法により、QOLの向上も期待できる。
- ③ インヒビター保有患者の止血管理はたいへん困難で専門的な知識を要するため、可能な限り血友病専門施設で行われることが望ましい。

文献

- 1) WFH Global Survey 2008
- 2) Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, et al: Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* **107**: 46-51, 2006
- 3) Gouw SC, van der Bom JG, van den Berg M, et al: Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* **109**: 4693-4697, 2007
- 4) 日本産婦人科学会:「着床前診断」に関する見解 http://www.jsog.or.jp/ethic/chakushouzen_20110226.html



HIV感染者の生殖補助医療

荻窪病院 理事長 血液科

花房 秀次

1. はじめに

HIV/AIDS診療の進歩はめざましく、1996年にプロテアーゼ阻害剤(PI)を含む多剤併用療法 Highly Active Antiretroviral Treatment (HAART)が導入された後、AIDSによる死亡者は激減した。近年さらなる薬剤の開発に伴い、HIV/AIDSはコントロール可能な慢性感染症になりつつある。HIV感染者は長期生存が可能になり、QOLの改善を求めるとともに、結婚して子供を望む夫婦も増えてきている。

かつてHIV感染者が拳児の相談をしても医療従事者は2次感染の危険性を指摘するだけで、子供をあきらめるか、危険を覚悟して性交渉で子供を作るしかなく、2次感染した例もあった。われわれは新潟大学、慶應

義塾大学、東京歯科大学などの共同研究で、HIV感染男性の精液からHIVを完全に除去し、HIV陰性の女性との間で100%安全に子供が出来る方法を開発し¹⁾、現在までに100名を超す児の出産に成功している。

2. 抗HIV療法により血中HIV RNA量が低く抑制された場合に生殖補助医療は必要か？ 血中ウィルス量と2次感染の危険性について

最近、抗HIV剤療法の普及で性交渉による新規HIV感染者の発生をどれだけ防止できるか検討されている。2008年、スイスのAIDS委員会が抗HIV療法により血中HIV RNA量が検出限界以下に抑制された場合、性交渉でのHIV感染の危険性は極めて少なくコンドーム装着の必要もないと発表し、大変な議論となった。米国CDC(米国疾病予防センター)やカナダなどは反対表明を出しコンドームの必要性を訴え、専門誌上や国際会議でも議論が交わされたが、現時点では明確な結論が出ていない。

われわれは図1のように血中HIV RNA量と精液中HIV RNA量が相関することを2000年に報告した²⁾。Quinらも血中ウィルス量が低いほど異性間性交渉での2次感染が低いことを報告している³⁾。しかし、血液中のHIV RNAをどれだけ低く抑制しても体内のHIV DNAは単核球に残存してHIVを産生し続けるので、薬剤を中止することはできない。精液や膣分泌液からHIVが消失することはなく、2次感染の危険性は低く

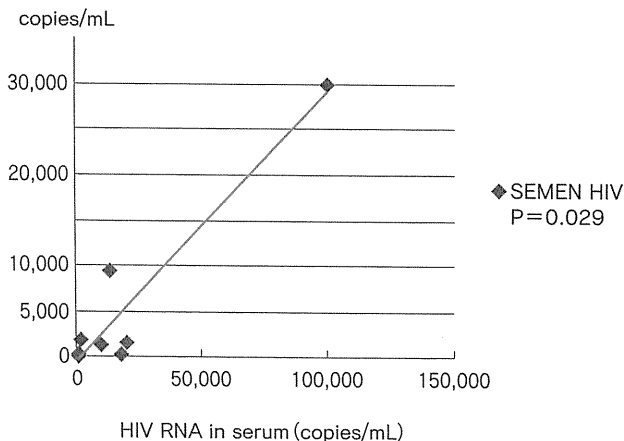


図1 HIV RNA levels in semen
(Hanabusa H, et al. AIDS. 2000 Jul 28; 14(11): 1611-6.)

なっても決してゼロにはならない。

2009年AIDS誌のeditorial reviewでは、抗HIV療法で血中HIV RNA量が 400copies/mL 以下に抑制された時、異性間での性交渉による2次感染の危険性を $0.16[0.02\sim 1.13, 95\% \text{信頼区間}]$ per 100 person-yearsと報告している⁴⁾。Wilson DPらは数学モデルの検討から異性間性交渉(男性がHIV陽性で女性が陰性の場合に1,000回の性交渉)によるHIV感染率は血中HIV RNA量が 400copies/mL 以下の場合約17%前後、血中HIV RNA

量が 50copies/mL 以下の場合でも約8%で、血中HIV RNA量をどれだけ低く抑制しても2次感染の危険があると推測している⁵⁾。女性がHIV陽性で男性が陰性の場合は2次感染の危険性は約半分に低下する。しかし、男性同性愛者では1,000回の性交渉で84%(HIV RNA量が 400copies/mL 以下)～56%(血中HIV RNA量が 50copies/mL 以下)が感染すると計算している。性感染症や陰部潰瘍などがある場合や肛門性交渉では危険性がさらに高くなる。但し、現時点では前向き大規模研究がなく、信頼できるデータが不足しており正確な危険率は不明であり、先進国ではコンドームの併用が勧告されている。

3. HIV感染者の生殖機能障害

われわれの検討ではHIV感染男性の約70%で精子の異常を認めた。精子数が減少し、精子の正常形態率が低下し、精子の運動能が障害され男性不妊となっている危険性がある。HIV陽性女性も卵巣機能や卵管

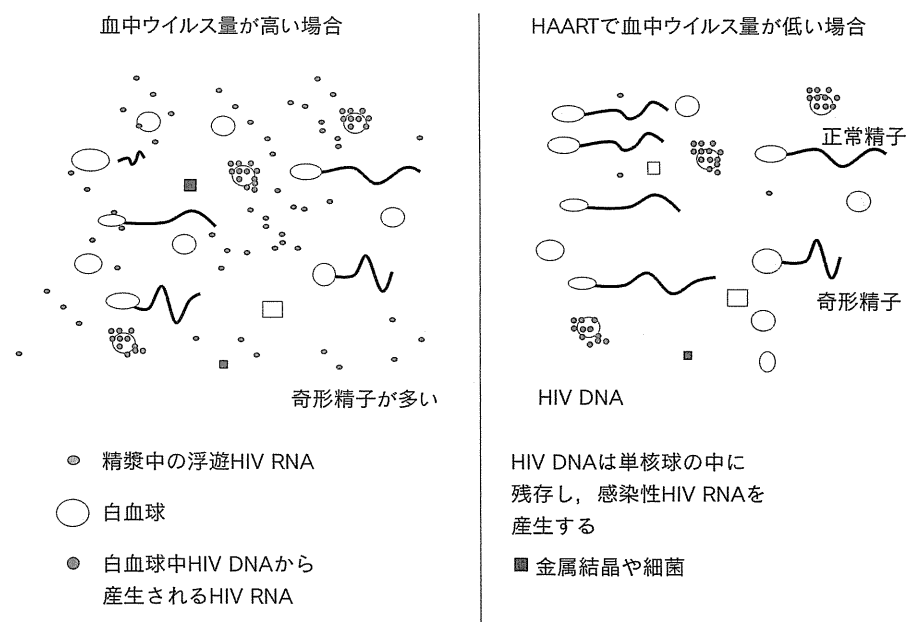


図2 HIV感染者の精液所見：精子数が少ない・運動率が低下・奇形精子の増加

に障害を認める場合も多い。HIV感染症の治療の進歩とともにHIV感染者の生殖補助医療も進歩しており、医療従事者は各方法の特徴や安全性を理解して感染者夫婦に説明する必要がある。

4. HIV感染者の生殖補助医療

HIV陽性夫婦の生殖補助医療を考える際、以下の3つの組み合わせに分けて現状の対応を検討する必要がある。

- ①夫がHIV陽性で妻がHIV陰性の場合
 - ②夫も妻もHIV陽性の場合
 - ③夫がHIV陰性で妻がHIV陽性の場合
- ①夫がHIV陽性で妻がHIV陰性の場合

精液中には精子の他に精漿に浮遊するHIV RNAや精液中の単核球中のHIV DNAから作られるHIV RNAなどが含まれている(図2)。また、前立腺由来の成分の他に、尿と同様に白血球や金属結晶、尿道通過時の雑菌や下着の繊維などが混入している。

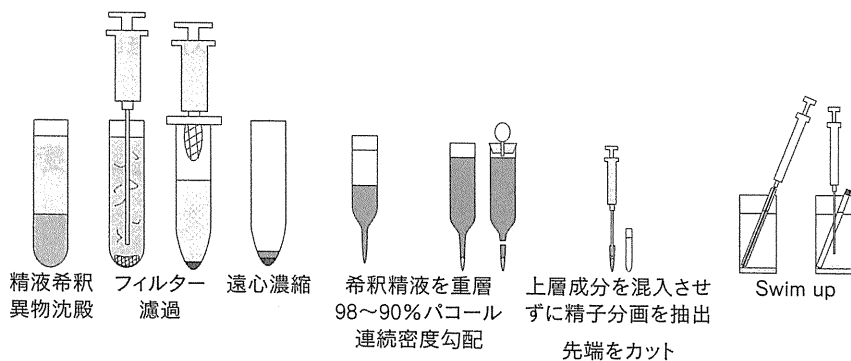


図3 精液からHIV除去を目的とした方法の開発
上層成分を混入させずに精子分画を抽出

われわれの検討では精液中のHIV RNA量と血中HIV RNA量には正の相関を認めた²⁾。すなわち、血中ウイルス量が多いと精液中のウイルス量も多く、2次感染の危険性も高い。HIV感染男性が排卵日だけコンドームを使用しないで妊娠を図ると毎年4.8%前後の妻が感染すると推測される⁶⁾。逆に、治療で血中HIV RNA量が検出限界以下になると精液中のHIV RNA量も低くなり、2次感染の危険性も低くなるが、感染の危険性は残存する。

HIV陽性者の無処理の精液を用いた人工授精では約3.5%が2次感染した⁷⁾。それに対して、Sempriniらは、Swim up法により精子を処理して2,000回以上人工授精を行い、2次感染がないと報告している⁸⁾。しかし、Sempriniらの方法はウイルス除去率が十分でなく、HIV DNAの測定も行っておらず、100%安全とはいえない。EUなどではPureceptionなどを用いて精液を遠心処理し、Swim up法で精子を回収し、人工授精や体外受精を行うことが多い。しかし、Swim up法と言っても施設によって方法が大きく異なり、結果としてウイルス除去率も異なる。一般的に行われているSwim up法は不妊症で使用されてきた方法で運動精子の回収を目的としており、HIV除去は十分でない。

そこで、図3に示すように、われわれはHIV除去を目的とした方法を開発した。遠心前に精液を希釈して静置し、精子より重い成分を沈殿させた後に上層の精

子浮遊液を回収し、フィルター濾過して遠心分離した。使用する分離液や濃度設定によってもウイルス除去率が異なる。一般的には90%と45%の2層Pureceptionが使用されることが多いが、PureceptionによるHIV除去効率はパコールより低い⁹⁾。われわれは98%パコールを用いた連続密度勾配によりHIV除去率を1/10⁶以下に高めた¹⁾。

しかし、ウイルス除去率を高めると精子の回収率が悪くなる問題がある。遠心分離後に、一番底の洗浄精子をどのように回収するかも問題である。遠心分離後、HIVは上層に分布し、単核球は中間層に分布している。従来法では、上から吸引して最下層の精子を回収しており、管壁を伝わり上層のHIVや白血球が必ず混入する。われわれは図3のように兼子が開発した特殊試験管を用いて上層成分を完全に遮断して底の精子を回収した。従来のSwim up法は精子浮遊液に培養液を重層して泳いで上る精子を回収する。遠心後の精子を培養液で洗浄し、そこに培養液を重層すると比重差が少なくウイルスや白血球を攪拌してしまう。われわれは図3に示すようにパコール液の最下層の精子液を乱流が生じないように底に静置し、泳いで上る精子を回収している。

現在、海外で行われている人工授精では、実際に子宮に注入する精子のウイルス除去を確認しておらず、危険性を抱えている。HIVの除去をPCRで確認するためには長時間を要し、その間に精子が損傷して受精率が低下するため、実際には検査が行われていない。われわれは、慶應義塾大学の加藤が開発した超高感度PCRでSwim upでの回収精子や受精卵培養液でHIV RNAやHIV DNAが1 copyもないことを証明し、100%の安全性を確認することに成功した。そのため体外受精は、人工授精に比べて2次感染防止の

安全面や妊娠率では数段優れている。

体外受精にはいくつかの課題がある。まず、医療費に保険が適応されず、排卵誘発剤などの費用が高い。また、排卵誘発剤投与による女性の負担が大きく、卵巣過剰刺激症候群などを合併すると腹水の治療が必要な場合もある。夫のHIV感染について周囲に話していない場合が多く、妻の家族や職場などに事情を説明しにくいので、対応を相談する必要がある。

HIV陽性男性では、体外受精でも受精しないほど回収精子数が少ない場合もあり、運動性の良い精子を顕微鏡下で回収して卵細胞に注入するICSI (intracytoplasmic sperm injection; 顕微授精, 卵細胞内精子注入法)が必要となることも多い。注入精子液はHIVが混入している可能性があるため、事前の精子処理は必要不可欠である。ICSI自身の安全性を問題視する意見もあり、兼子が開発したDNA損傷が少ない精子を選択する技術を検討している。

研究班への拳児希望者は荻窪病院を受診して説明を受け、夫婦個別カウンセリングで参加意思確認後、精子のスクリーニング検査を行う。その後、実施産科施設に紹介して改めて説明を受け、同意書を得た後に実施となる。胚移植後は妊娠の有無にかかわらず妻の感染症検査を行い、出産後は母子の検査で2次感染がないことを確認する。

②夫も妻もHIV陽性の場合

HIV感染者同士が結婚した場合の拳児相談や、夫婦間で感染した場合の相談も寄せられている。今後、HIV感染者の予後が改善するとともに感染者同士の結婚も増え、拳児相談も多くなると推測される。この場合にどのような対応を取るのかについて、現状では倫理的にも社会的にも幅広い議論が必要である。その妥当性を判断する前提として、superinfection, HIVの薬剤耐性変異, HIV感染者の精子や卵巣機能, HAARTの精子への影響など多くの検討が必要であり、感染者夫婦個々の状況に応じた対応が求められる。

HIVは変異速度が速く、宿主の免疫状態によっても

感染者個々のHIV diversityは大きく異なる。既にHIVに感染していても別のHIVに再度感染すると、HIVの再構築が起こり (recombination), AIDS発症を早めたり薬剤耐性を誘導する危険性がある。また、たとえ夫婦間で感染したとしても、夫婦のmajor cloneが時間とともに大きく変異し、性交渉で再感染が生じる可能性がある。Superinfectionを防止するためには、HIV陽性同士でも生殖補助医療が必要となる場合もある。夫婦のどちらかのウイルスが薬剤耐性となっていると、性交渉で新たに耐性ウイルスに感染する危険性もある。

2004年にEU特別委員会は、夫婦ともにHIV陽性の場合には生殖補助医療を実施すべきではないと警告した¹⁰⁾。夫婦ともにHIVに感染していると、子供が成人するまでに両親ともに死亡して孤児になる危険性や子どもの権利を訴え問題になった。HIV感染症の治療が進歩して予後が改善された現状では、夫婦ごとの状況に応じて検討すべきと考えられる。夫婦が共に病気を持っている場合に子供を持つ場合の是非論はHIV/AIDSに限ったことではない。ただ、HIV/AIDSの最新の医療情報をしっかり得た上で議論すべきである。

③HIV陰性男性とHIV陽性女性の場合

基本的に夫から精子を採取して人工授精を行えば、夫に感染することなく子供を持てるので、妊娠後の母子感染を防止すれば大きな問題はない。ただ、HIV陽性女性の場合、性感染症などにより卵巣機能や卵管障害を合併して妊娠しにくい場合もあり注意が必要である。

抗HIV薬も初期より安全で効果が強い薬剤の開発が進み、母子感染を2%以下に抑制できるようになっている。陣痛が起ると母親の血液が胎盤から流入して胎児に感染する危険があるために、陣痛前の在胎38週前後で選択的帝王切開を行うことが推奨されている。しかし、母体血中ウイルス量が1,000copies/mLより低い場合には感染確率は少なく、帝王切開の問題もあり、米国などでは経膈分娩でもよいと考えられている。