

研究課題：HIV感染症及びその合併症の課題を克服する研究

課題番号：H21-エイズ-一般-005

研究代表者：白阪 琢磨（国立病院機構大阪医療センター臨床研究センター エイズ先端医療研究部長）

研究分担者：渡邊 大（国立病院機構大阪医療センター臨床研究センター HIV 感染制御研究室員）、岩谷 靖雅（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 室長）、栗原 健（国立病院機構東京都病棟薬剤科 薬剤科長）、鯉淵 智彦（東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 助教）、西田 恭治（国立病院機構大阪医療センター感染症内科 医長）、杉浦 互（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 部長）、井端美奈子（大阪府立大学看護学部 准教授）、廣常 秀人（国立病院機構大阪医療センター精神神経科 科長）、仲倉 高広（国立病院機構大阪医療センター臨床心理室 主任心理療法士）、中田 たか志（中田歯科クリニック 院長）、加藤 真吾（慶應義塾大学医学部 専任講師）、桜井 健司（特定非営利活動法人HIVと人権・情報センター 全国事務局長）、藤原 良次（特定非営利活動法人りょうちゃんず 理事長）、井上 洋士（放送大学教養学部 教授）、山内 哲也（武蔵野会八王子生活実習所 施設長）、小西 加保留（関西学院大学人間福祉学部 教授）、下司 有加（国立病院機構大阪医療センター看護部 副看護師長）、高田 清式（愛媛大学医学部第一内科、総合臨床研修センター 教授）、秋田 定伯（長崎大学病院形成外科 助教）、秋葉 隆（東京女子医科大学腎臓病総合医療センター 教授）、横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センター）

1. 研究目的

HIV 感染症はHAARTによって医学的管理ができる慢性疾患となったが、HIV 感染症の治療の分野で克服すべき課題が山積している。本研究ではA. 治療・合併症、B. ケア、C. 長期療養支援、D. 患者支援における課題の抽出と解決方法の提示を目的とし、最終年度に対策と提言を行う。

2. 研究方法

目的達成のため今年度実施した主な研究方法を次に示す。A-1) HIV 感染症治療の開始時期と治療終了指標に関する研究（渡邊）：残存プロウイルス量測定系の開発。A-2) 治療終了のためのプロウイルス DNA 等臨床指標の開発に関する研究（岩谷）：新規臨床指標としてケモカイントロピズム解析系の検討。A-3) 抗HIV療法の実施状況と副作用調査に関する研究（栗原）：拠点病院全施設に実態調査の実施。A-4) 抗HIV療法のガイドラインに関する研究（鯉淵）：主要英文誌や国内外学術集会での新知見を吟味しガイドラインの改訂。A-5) 血友病患者におけるHIV感染症の治療に関する研究（西田）：自覚的副作用と服薬のQOLへの影響等につき調査し血友病と非血友病の二群間での比較検討。A-6) HIV 検査相談所におけるHBVの分子学的研究（杉浦）：HIV、HBV重複感染者のHBVの分子学的解析の実施。A-7) HIV 関連リポジトロフィーの治療に関する研究*（秋田）：小動物を用いたリポジトロフィーモデルでの検討。A-8) HIV 感染患者における透析医療の推進に関する研究*（秋葉）：日本透析医学会施設会員の全施設にHIV 感染患者の受け入れの実態および意識調査を実施。A-9) 診療連携システム開発に関する研究（横幕）*：国立名古屋医療センターと他の施設間でネットを用いた診療連携システムモデルの構築。B-1) エイズ看護の在り方に関する研究（佐保）：看護研修の実施とアンケート調査。B-2) 抗HIV療法に伴う心理的負担、および精神医学的介入の必要性に関する研究（廣常）：

陽性者のメンタルヘルス調査、精神科診療施設への調査・介入の実態調査、精神科医向け研修会の開催、ハンドブックの作成。B-3) HIV 陽性者の心理学的問題の現状と対応に関する研究（仲倉）：初診患者の神経心理学的障害の実態調査、心理学的問題事例の多職種による事例検討、チーム医療に関するアンケート調査結果の分析と簡易な調査法の開発。B-4) セクシュアルヘルス支援体制のモデル開発と普及に関する研究（井上）：アドバンスコース研修会の試行、セクシュアルヘルス調査の質問項目案の抽出。B-5) 服薬アドヒアランスの評価法の開発に関する研究（加藤）：毛髪を用いた薬剤濃度の測定系の開発。B-6) HIV 外来診療のあり方に関する研究（高田）：地方の診療モデルとして愛媛県および四国のHIV診療の実態調査。C-1) 長期療養者の受け入れにおける福祉施設の課題と対策（山内）：社会福祉施設従事者向けのHIV 陽性者受け入れマニュアルの作成と研修プログラムの開発。C-2) 長期療養患者のソーシャルワークに関する研究（小西）：、退院援助のための支援シートの最終版の作成。政策提言のための要望書の作成。C-3) 長期療養看護の現状と課題に関する研究（下司）：6地域で研修会を開催。全国訪問看護連絡協議会登録3515事業所の調査。全国拠点病院に自立困難なHIV 陽性者の現状調査。D-1) HIV 検査相談所における陽性告知からその後の当事者支援に関する研究（桜井）：平成20年度以降に実施した検査相談での要確認結果告知及び陽性告知の検討。D-2) ケースマネージメントスキルを使った行動変容支援サービスに関する研究（藤原）：CMP基礎研修、ケースマネージャー（CM）育成研修の実施、HPでの広報、CMP研修マニュアルを作成。D-3) HIV 陽性者の歯科診療の課題と対策（中田）：地域行政や歯科医師会等に歯科診療所受診ニーズの認知と受診実現の働きかけ。陽性者の歯科受診ニーズ調査の実施。その他、携帯を用いた服薬支援ツールの改良および検査予約システム開発、HIV 治療の薬剤情報提供ホームページの開発。（*は今年度開始。）倫理面への配慮：研究実施で、疫学研究に関

する倫理指針を遵守した。個人情報を含むデータを扱う研究では施設の倫理委員会の承認を得た。

3. 研究結果

今年度の主な結果を以下に示す。A-1) 良好な再現性で残存プロウイルス量の測定系を開発した。残存プロウイルスでAPOBEC-tyep G→A の変異を認めた。A-2) 臨床検体のトロピズムを判定した (564 検体/602 症例)。一部、血漿ウイルス RNA とプロウイルス DNA 間で不一致があった。A-3) 在庫金額の総額と施設あたりの平均金額は過去 2 年と同様の傾向であった。各施設の処方傾向は受診患者数の多寡に依らない傾向が認められた。院外処方箋発行率は約 20% から 25% に増加した。A-4) ガイドライン改訂作業を進めた。A-5) 血友病患者群では過去に長期服用した d 剤との関連が推定される副作用が多い傾向があった。A-6) HIV、HBV 重複感染者の HBV の分子学的解析を実施した。A-7) 小動物のリポディストロフィーモデルで幹細胞を含む脂肪由来細胞移植の有用性と安全性を検討した。A-8) 全国 4000 施設に無記名調査票を 12 月に送付し、現在、回収中である。A-9) 国立名古屋医療センターと他施設間でネットを用いた診療連携システムモデルを構築した。B-1) 86% が研修目標を「達成、ほぼ達成」できたと回答し、「自分の職場で HIV 陽性者のケアの準備をしたいと思う」が受講前の 25% から受講後に 78% に増加した。B-2) HIV 陽性者の方が精神障害罹患率は高く、特に飲酒など薬物関連障害であった。全国の精神科入院施設への調査結果から HIV 感染症患者の診療協力施設リストを作成し、HIV 感染症診療拠点病院に配布した。精神科医向け研修会を開催。研究成果を基にハンドブックを作成した。B-3) 今年度 10 ヶ月間で 52 名で神経心理学的検査を実施。17%～33% に障害を示唆。チーム医療の充実には MSW やカウンセラーをチームの一員として承認、定期的カンファレンスの開催の 2 つが有意であった。簡易版作成のため重要項目を抽出した。B-4) ベーシックコースの有用性を検討し、アドバンスコースのプログラムを一部試行した。量的調査項目候補案を面接調査から抽出した。B-5) 毛髪を用い PI などの濃度測定系を構築した。B-6) 調査から外来診療の実態把握と愛媛県の病院間連携が図られ、診療マニュアルを作製できた。C-1) 全国社会福祉協議会を通じ約 7500 の社会福祉法人の経営層にマニュアルを配布した。マニュアルを用いた研修やその他の研修教材開発を行った。C-2) 支援シートの最終版を完成し配布した。C-3) 今年度の研修参加者 199 名。全国調査結果では受け入れ意識には、初年度と大きな変化は認めなかったが、研修会参加群では受け入れ可能が有意に高かった。調査で全国に最低で 264 名の自立困難 HIV 陽性者が存在

し、約半数は在宅療養を受け、約 2 割は短期間で転院を繰り返していた。D-1) 検査相談

の実施 281 回、受検者 11,308 名、要確認 62 名、陽性 57 名について状況などを分析した。D-2) CMP 基礎研修、CM 育成研修を実施し新規 4 名の CM (うち陽性者 3 名) を育成した。CM 研修マニュアルを作成した。D-3) ニーズ調査研究を倫理委員会で審査、承認され、現在、アンケートを実施、回収中。その他、携帯を用いた服薬支援ツールの改良および検査予約システム開発、HIV 治療の薬剤情報提供ホームページの開発を行った。

4. 考察

残存プロウイルス量測定、トロピズムアッセイ、毛髪薬剤濃度測定などの系の開発にある程度成功した。臨床的有用性を含めた検討は今後も必要と考えた。種々の調査からそれぞれの実態と問題点が明らかになった。研究成果に基づき、治療ガイドラインとチーム医療マニュアルの改訂、受入支援マニュアルの作成、各種ハンドブックなどを作成できた。有用性が認められた研修の実施には今後の検討が必要と考えた。その他、多くの研究から重要な結果が得られた。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初計画を概ね実施でき目的を達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究は HIV 感染症治療の現時点での課題を明らかにし、その対策につき検討を行うものであり、必要性は高い。種々の測定の開発に取り組み、いずれも学術的意義も高く、国際的にも新規性が高い。治療のガイドライン改訂、外来チーム医療マニュアル改訂、施設の受け入れマニュアル作成など、いずれも重要であり、社会的意義も大きいと考える。本研究は学術的・国際的・社会的意義が高いと考える。

3) 今後の展望について

これまでの研究結果を踏まえさらに研究を深める。

6. 結論

HIV 感染症の治療と関連分野 (治療・合併症、ケア、長期療養支援、患者支援) で克服すべき課題を抽出し現状を分析、検討した。ほぼ計画通りに研究を実施できた。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特になし。

研究発表

研究代表者

白阪琢磨

1) Yoshino M, Yagura H, Kushida H, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Taniguchi T, Watanabe D, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T Assessing recovery of renal function after tenofovir disoproxil fumarate discontinuation Journal of Infection and Chemotherapy, Online FirstTM, 2011

2) Shirasaka T, Tadokoro T, Yamamoto Y, Fukutake K, Kato Y, Odawara T, Nakamura T, Ajisawa A, Negishi M Investigation of emtricitabine-associated skin pigmentation and safety in HIV-1-infected Japanese patients Journal of Infection and Chemotherapy (2011)17:602-608, 2011

研究分担者

渡邊 大

1) Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T. Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration, BMC Infect Dis. 11:146, 2011.

岩谷靖雅

1) Kitamura S, Ode H, Iwatani Y. Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. Frontiers in Microbiology 2:258, 2011.

栗原 健

1) Munehiro Yoshino, Hiroki Yagura, Hiroyuki Kushida, Hitoshi Yonemoto, Hiroki Bando, Yoshihiko Ogawa, Keishiro Yajima, Daisuke Kasai, Tomohiro Taniguchi, Dai Watanabe, Yasuharu Nishida, Takeshi Kuwahara, Tomoko Uehira, Takuma Shirasaka : Assessing recovery of renal function after tenofovir disoproxil fumarate discontinuation. J Infect Chemother. 2011 Oct 4.

鯉淵智彦

1) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. J Clin Microbiol. 2011.49(3):1017-24.

2) Koga M, Koibuchi T, Kikuchi T, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Kinetics of serum β -D-glucan after Pneumocystis pneumonia treatment in patients with AIDS. Intern Med. 2011;50(13):1397-401.

西田恭治

1) 矢倉裕輝、櫛田宏幸、吉野宗宏、米本仁史、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、笠井大介、谷口智宏、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨、栗原健：Darunavir の 1 日 1 回投与法におけるトラフ濃度と副作用に関する検討。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月

中田たか志

1) 中田たか志、澤悦夫、鈴木治仁、花岡新八：東京 HIV デンタルネットワークに参加する歯科医師およびスタッフを対象にした、HIV 陽性者歯科診療に関するアンケート調査によるスタッフの意識と風評被害の実態。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

高田清式

1) Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Kimura S, Oka S and Takada K (behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group). Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. Intern Med 50: 699-705, 2011

佐保美奈子

1) 古山美穂、佐保美奈子、豊田百合子、畑井由美子、泉柚岐、飯沼恵子、澤口智登里、熊谷祐子、下司有加：エイズ看護及び教育に対する看護管理者のニーズ、日本看護学会論文集：(掲載決定)、2012 年

2) 古山美穂、佐保美奈子、豊田百合子、畑井由美子、泉柚岐、飯沼恵子、澤口智登里、熊谷祐子、下司有加：エイズ看護及び教育に対する看護職者のニーズ、日本看護学会論文集：(掲載決定)、2012 年

廣常秀人

1) 大谷ありさ、仲倉高広、安尾利彦、森田真子、藤本恵里、倉谷昂志、宮本哲雄、西川歩美、下司有加、治川知子、東政美、今井敏幸、白阪琢磨、廣常秀人：初診時から 1 年後の HIV 感染症者のメンタルヘルス。第 25 回日本エイズ学

会学術集会・総会、2011年11月

仲倉高広

- 1) 仲倉高広：チーム医療。『心理臨床事典』日本心理臨床学会編、丸善出版、2011年7月
- 2) Takahiro Nakakura、Toshihiko Yasuo、Yuka Otani、Yuka Shimoji、Takuma Shirasaka : Neuropsychological impairments in patients infected with HIV in Japan、ICCAP 10th、韓国、2011年8月

小西加保留

- 1) 清水茂徳、磐井静江、小西加保留：要介護状態にある HIV 陽性者を支える地域の社会資源・制度の課題—エイズ拠点病院ソーシャルワーカーへの実態調査から—。医療社会福祉研究 (20) : 2012 年掲載予定。
- 2) 小西加保留、石川雅子、関矢早苗、山田由紀、武田謙治、小澤あかね、井上洋士、白阪琢磨：「退院援助困難事例のための支援シート」に関する研究。第 25 回日本エイズ学会、東京、2011 年 11 月

下司有加

- 1) 下司有加：血友病保因者である女性が抱える心理社会的問題。第 8 回血友病看護フォーラム (旧名称：血友病看護研究会)、群馬、2011 年 11 月

藤原良次

- 1) 藤原良次、早坂典生、橋本謙、山縣真矢、間島孝子、太田裕治、坂本裕敬、羽島潤、白阪琢磨：ケースマネージメントスキルを使った行動変容支援サービスに関する研究。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

井上洋士

- 1) 井上洋士：HIV 陽性者のセクシュアルヘルス研修会開催を主軸とした研究プロジェクトの取り組みを通して、日本エイズ学会誌 (13) : 125-131、2011 年
- 2) 井上洋士、村上未知子、有馬美奈、大野稔子、岡野江美、豊島裕子、岡本学、安尾利彦、白阪琢磨：「HIV 陽性者のセクシュアルヘルス支援のための研修会」の 5 年間の経緯—参加者によるプログラム評価の比較分析を主軸として。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

山内哲也

- 1) 山内哲也：社会福祉施設における HIV 陽性者の受入れ課題と対策—施設長のフォーカスグループインタビューによる課題探索、2011 年、査読中
- 2) 山内哲也：福祉施設における HIV 陽性者の受け入れに関する要因とプロセス、第 21 回日本医療福祉学会、京都、2011 年 9 月

桜井健司

- 1) 大郷宏基、塩入康史、大釜正希、伊藤葉子、右田麻里子、桜井健司、川添昌之、石神互：サンサンサイト検査・相談室における HIV 即日検査の受検者動向 2010、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

秋田定伯

- 1) Akita S, Yoshimoto H, Akno K, Yamashita S, Hirano A. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. Clin Plast Surg. in press, 2011.

秋葉隆

- 1) Changes in anemia management and hemoglobin levels following revision of a bundling policy to incorporate recombinant human erythropoietin. Hasegawa T. Bragg-Gresham JL. Pisoni RL. Robinson BM. Fukuhara S. Akiba T. Saito A. Kurokawa K. Akizawa T. Kidney International. 79(3):340-6, 2011 Feb. [Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't]

加藤真吾

- 1) 須藤弘二、吉野宗宏、栗原健、白阪琢磨、加藤真吾：LC-MS/MS を用いた毛髪中および血液中の抗 HIV 薬の定量、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 12 月

杉浦 互

- 1) 渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦互、田中靖人：HBV 新規感染における HIV 重感染の影響についての検討、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

横幕能行

- 1) 横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史郎、岩谷靖雅、杉浦互：HIV プロテアーゼ表現型検査法である VLP ELISA 法の実臨床への応用、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

研究課題：血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究

課題番号：H21-エイズ一般-001

研究代表者：坂田 洋一（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 教授）

研究分担者：小澤 敬也（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 教授）、嶋 緑倫（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、稲葉 浩（東京医科大学臨床検査医学講座 講師）、菱川 修司（自治医科大学医学部先端医療技術開発センター医療技術トレーニング部門 准教授）、竹谷 英之（東京大学医科学研究所 講師）、瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 教授）柿沼 章子（社会福祉法人はばたき福祉事業団 事務局長）大橋 一夫（東京女子医科大学先端生命医科学研究所 准教授）

1. 研究目的

血友病は血液凝固因子第 VIII(FVIII), 或いは第 IX(FIX) 遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は出血時に各因子製剤の補充療法が主であるが、不慮の致死の出血予防は困難である。HIV や HCV 感染の原因となった因子製剤は利便性も含めて改善されたが、同種抗体（インヒビター）出現は尚重要な問題である。感染被害後血友病患者に対する社会的偏見が顕著になった。これらを克服し、患者 QOL 改善のために以下の3本柱を立てて研究を進める。

I 遺伝子治療 染色体へ殆ど組み込まれない8型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた血友病遺伝子治療臨床応用を目指した研究を進める。昨年度中国 Vector Gene Technology (VGT) 社に技術的助言・指導を行いながら、GMP レベルベクター AAV8VFIX を作製した。その品質検討と、マウス・サルを用いて、ベクターの体内発現活性と安全性を検討する。抗 AAV 中和抗体測定法改善と、陽性個体への遺伝子導入技術改善を進める。染色体組み込み型改変 SIV ベクターを用いて血友病遺伝子を導入した自己間葉系幹細胞(MSC)移植による遺伝子治療についても検討する。**II. インヒビター(Inh)対策** 後方視的調査解析の総括と、前方視的調査による Inh 発生要因解析と患者データベース構築をリンクさせて進める。また、血友病因子活性や Inh 活性測定法の改善を検討する。さらに、血友病マウスや患者血液を用いた基礎的検討をすすめる。**III. 社会的 QOL 改善** 患者中心二次アンケートの解析を進める。また、聞き取り調査による被害 HIV 感染血友病患者・家族の解析をさらに進めるとともに、問題解決に向けた具体的解決案を策定する。

2. 研究方法

I. 遺伝子治療：サルには血友病は確認されていない。ヒトとサルの血友病因子相同性は 97%以上と高い。AAV ベクターは種差により効率に差がみられる。ヒト応用には、少なくとも、非ヒト霊長類で発現持続と安全性の確認が必要である。サルでの実験では、発現血友病因子とサル産生因子を識別定量することが不可欠である。サルとヒトの FIX を識別可能な世界唯一のモノクロナル抗体を作製した。そこで、血友病 B 遺伝子治療技術確立を先行して進めてきた。GMP レベル AAV8VFIX の品質検討と活性確認、そして、抗 AAV8 中和抗体をもつ個体へのバルーンカテーテルを用いた遺伝子導入技術の改善を試みた。また、遺伝子治療臨床研究に向けたプロトコール作成準備を進めた。染色体組み込み型改変 SIV ベクターは GMP レベル対応製造技術の確立を目指した。このベクターで骨髄由来自己 MSC へ FVIII 遺伝子を導入し、この MSC の血友病 A マウス膝関節内注入による関節出血予防と、ナノシートを作製して臓器貼り付け遺伝子治療可能性について検討した。

II. 後方視的調査解析では、血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤の、Inh 発生率差を中心に検討した。また、Inh 発生要因解析として、血友病因子とサイトカインの遺伝子解析を施行した。さらに Inh 検出・診断標準化のために、検査法改善を検討した。血友病マウスを用いて、プラスミノゲンアクチベーター1(PAI-1)の inh 寛容誘導への関与を検討した。**III. 患者中**

心アンケート二次解析は、患者の訴えを中心に、出血等のエピソードや社会的問題等を解析した。さらに、試験管内凝固活性で分類してきた血友病患者重症度の見直しを大目標として、FVIII の生体内凝固線溶反応の基礎的解析を開始した。血友病被害 HIV 感染被害者家族と、非感染血友病患者家族の面接調査や当事者参加型アクションリサーチを進めた。血友病関連医療従事者や教育関係者への調査や海外支援活動の情報収集等を元に、血友病情報提供ホームページ開設などを計画した。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療は、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法開発と応用を目指したもので、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。動物実験は、厚労省基本指針と各大学動物実験指針規定に沿って行い、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで実施するサルの実験では、基盤研究所のガイドライン、及び実験遂行方針を遵守した。臨床研究は、最新の厚労省倫理指針に従って進める。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する各省庁の倫理指針を遵守し、学内、必要な場合は国の審査を経た上で実施する。疫学調査は疫学研究に関する倫理指針を遵守する。

3. 研究結果

I 遺伝子治療：VGT 社に委託作製した GMP レベルベクターは SDS-PAGE や電子顕微鏡的解析などでは、極めて純度が高いことが確認された。品質の第三者機関による検討は、予算とのバランスで若干手間取ったが、無事契約が整い、現在進行中である。GMP レベルベクターは、マウスでは non-GMP レベルベクターと同等の発現活性を示した。サルでの発現確認は、震災と原子力発電所事故により、霊長類医科学研究センターにおけるサル実験が節電のため実施できず、開始は 12 月にずれ込んだ。抗 AAV 中和抗体測定系は最適化を進め、感度がさらに高まった。サルコロニー190 頭を対象にした検討では、陽性個体が過半数を占めた。健康人と血友病患者でも陽性率はほぼサルと同様であった。陽性サルに我々の確立した技術でベクター投与したサルでも、治療レベル FIX の長期発現持続が確認された。循環負荷軽減のための血液洗浄液量検討や、ベクターと細胞の接触時間延長による導入効率 up と虚血時間が閉臓に与える影響のバランスなどを検討中である。臨床研究プロトコール作成は、パーキンソン病遺伝子治療臨床研究や、海外での血友病 B 遺伝子治療臨床研究などを参考に準備を進めている。SIV ベクターについては産生・精製工程の最適化と品質検査項目を検証し、GMP レベル製造が可能であることを確認した。血友病 A マウス関節内に投与した FVIII 遺伝子を導入した自己 MSC は関節内にとどまり、針穿刺による血友病性関節症発症を抑制した。MSC は組織学的検討で軟骨細胞に分化していることが示唆された。II Inh 対策:155 例の日本人血友病患者解析では血漿由来製剤と遺伝子組み換え製剤との間に Inh 発生率に差は無かった。遺伝子解析は倫理指針に則り進行中である。血友病 A マウスと PAI-1 ノックアウトマウスのダブルノックアウトマウスでは FVIII 抗原投与に対して容易に免疫寛容が誘導され、機序とし

て制御性 T 細胞誘導等が確認された。FVIII 分子の分子生物学的検討も進んだ。III.QOL 向上のための調査研究では、患者判断による出血回数が中等症でも重症に匹敵するくらいの頻度であった。また、薬害 HIV 感染被害者母親には、遺伝問題、感染告知遅れによる子供への心理的負担など数多くの対策課題が明らかになった。遺伝に関する情報不足や、養護教諭のストレスなども明らかになり、支援策として血友病情報提供ホームページの立ち上げやファクトシートを作成した。

4. 考察

I 遺伝子治療：世界最高感度の抗 AAV8 抗体測定系を確立した。陽性サルにベクターを投与する技術もほぼ確立し、我々がサル遺伝子治療では世界最先端にあると考えている。我々の一本鎖 AAV8 ベクターの効果発現最低量は 2×10^{12} vg/kg 程度であった。2011 年 12 月に英国グループから報告された二本鎖 AAV8 ベクターによる血友病 B 遺伝子治療臨床研究において効果の見られた用量と同等の投与量であり、ヒトとサルで効果発現量にあまり差の無いことが示唆された。陽性サルにベクター投与可能であることは、数年後に効果が減弱したときに、微量の抗 AAV 抗体が存在しても同じベクターで再度遺伝子治療可能であることも意味し、その技術確立は極めて重要であると考えている。ヒト利用可能な GMP レベルベクターも臨床研究開始に必要な量が確保できた。助言・指導などの形で関与することで、ベクターに対する多くのノウハウも獲得でき、VGT 社との信頼関係も確立できた。本年度は災害のためサル実験が遅れたが、次年度には品質検査も含めた全てのデータがそろそろ。成人では血友病性関節症の効果的な治療法は無い。MSC の抗炎症作用を期待して、変形性膝関節症に対する臨床試験はすでに行われている。血友病遺伝子を導入した MSC の関節腔内投与は、MSC の軟骨・骨細胞への分化も考慮すると、血友病関節症に対する優れた治療法と考えられる。II 前方視的遺伝子解析などによる要因解析は、Inh 発症予防につながる可能性がある。また患者データベース構築は日本における血友病のすべての調査解析の基盤になる。Inh 寛容誘導の基礎的検討も、複数視点からその本体への切り込みが行われており、Inh 治療のブレイクスルーが期待される。III 調査研究から、重症度分類が、臨床的には問題のあることが示唆された。患者判断であり、回収アンケート数、重症度に応じた活動レベルの違いなど考慮しなければならない点も多いが、単純な試験管内凝固検査による便宜的分類に問題のある可能性は高い。軽症でも出血頻度の高い血友病患者の存在することから、以前より当班でも血友病患者遺伝子解析を進めてきた。結果はミスセンス変異、逆位、欠失、挿入など多彩である。FVIII は酵素活性を持たない。巨大分子でその機能部位で多くの因子と特異的結合し、複数分子の立体的配置調節により凝固反応を調節している。分子異常により、構造変化が惹起され、わずかに漏れ出てきた異常因子の、ある条件下の凝固活性値で便宜的に分類することを見直す時期にきていると考える。面接による調査研究で、薬害 HIV 感染被害血友病患者家族の持つ多くの問題が明らかになった。血友病患者全体の抱える遺伝問題相談を含めた、ホームページなどの立ち上げは、情報共有による効果的解決に向けた第一歩と考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

我々は、非ヒト霊長類で十分な基礎検討を進めて、ヒト臨床研究へ歩を進めるというストラテジーで、安全性重視で血友病遺伝子治療研究を進めてきている。サルでの AAV8VFLX を用いた血友病 B 遺伝子治療技術は、世界最先端にある。二本鎖 AAV8 ベクターを用いて、抗 AAV8 抗体陰性患者で血友病 B 遺伝子治

療成功例が英国より報告されているが、発現効率是我々と大差なく、また中和抗体陽性例ではうまくいっていない。我々は、抗体陽性例にも治療量発現可能な基本技術をサルで確立している。GMP レベルの AAV8VFLX も委託作製し得た。サル実験の本年度の遅れは、原発事故に伴う外的要因による。また品質検査契約に時間を要したが、予算不足によるもので、此方も年度内契約にこぎ着けた。ヒト臨床研究開始に向けた基礎的準備はほぼ整ったと考える。Inh 前方視的解析にリンクさせた患者データベース構築も順調に進みつつある。Inh 寛容誘導などの基礎検討は、マウスレベルでは、世界に注目される業績を発表しつつある。患者中心アンケート調査は、医師サイドからは把握できない問題を提起し得た。また HIV 感染被害血友病家族や、医療従事者、学校関係者などの面接による問題提起とその解析は、母親と父親の遺伝問題など問題を明らかにし、ホームページやファクトシート作成など、その具体的対策が稼働し始めている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

抗 AAV 中和抗体測定技術、および、抗体を含む血液を回避して遺伝子投与を可能にした我々の技術は、世界に冠たるものと考えている。遺伝子治療成功は患者・患者家族、及び、保因者の社会的 QOL を著しく高める。製剤使用量も減り、経済的にも資するところ大なりと考える。FVIII 遺伝子導入 MSC を利用した血友病関節症治療技術は独創的なものであり、関節内出血に対する画期的治療になり得る。世界での Inh 調査研究において、前方視的調査解析は、我が国独自のものである。発生要因が明らかになれば、発生抑制が期待できる。さらに、免疫寛容誘導技術が確立出来れば、インヒビター患者一人数億円のかかる治療に資することが期待できる。患者視点アンケートや、個人情報保護には配慮が必要であるが直接面接による調査解析は、世界でも珍しく、患者視点の具体的対策の確立に有効な手段である。

3) 今後の展望について

AAV8 ベクターを利用した血友病 B 遺伝子治療は、サルを用いてさらなる効率改善と安全性を高める技術の確立をはかる。また、臨床研究に向けて、プロトコール作成と学内倫理委員会承認、そして厚労省承認に必要な事務的手続きを効率よく進める。患者数の多い血友病 A 遺伝子治療については、残された技術的課題を解決するための基礎検討を加速度的に進めたい。Inh 対策としての調査解析は、データベース構築とリンクしながら息の長い研究を継続させる必要がある。QOL を高めるための調査解析は、具体的支援策を実行し、フィードバックしながらより効果的な対策に結びつけたい。

6. 結論

我々の AAV8 ベクターを用いた非ヒト霊長類での血友病 B 遺伝子治療技術は世界最先端にある。GMP レベルベクターも調達し、ヒト臨床研究へ歩を進めるレベルに達した。Inh 対策も調査解析、基礎検討ともに極めて順調に研究が進みつつある。QOL 調査解析で、血友病重症度の見直しが患者視点から指摘されたことは驚きでも有り、世界への発信につながることを期待したい。患者・家族などとの直接面接による問題把握とその解析は極めて独創的で有用である。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

「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）審査請求済み
「血友病 A モデルプタの作出」出願番号：特願 2010-102569 出願済み。

研究発表

研究代表者

坂田 洋一

- 1) Ohmori, T., Yano, Y., Sakata, A., Ikemoto, T., Shimpo, M., Madoiwa, S., Katsuki, T., Mimuro, J., Shimada, K., Kario, K., Sakata, Y. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res*, in press.
- 2) Ohmori, T., Yano, Y., Sakata, A., Ikemoto, T., Shimpo, M., Madoiwa, S., Katsuki, T., Mimuro, J., Shimada, K., Kario, K., Sakata, Y. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res*. 2011 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 3) Madoiwa, S., Kobayashi, E., Kashiwakura, Y., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia*. 2011 Nov 2. [Epub ahead of print]
- 4) Watanabe, H., Madoiwa, S., Sekiya, H., Nagahama, Y., Matsuura, S., Kariya, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Hoshino, Y., Hayasaka, S., Sakata, Y.: Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement. *Thromb Res*. 128(6):e137-43. 2011.
- 5) Mimuro J, Sakata Y.: Gene and cell therapy for hemophilia: recent advances. *Rinsho Ketsueki*. Jun;52(6):361-7. Review. 2011.
- 6) Dokai, M., Madoiwa, S., Yasumoto, A., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Sakata, A., Makino, N., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous α 1-antitrypsin in lipopolysaccharide primed hematological cells. *Thromb Res*. 128:283-292. 2011.
- 7) Madoiwa, S., Tanaka, H., Nagahama, Y., Dokai, M., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Sakata, A., Yasumoto, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 127: 349-355. 2011.

口頭発表

- 1) Sakata, Y., Takahashi, H., Tsuji, H., Mimuro, J., Eguchi, Y., Kitajima, H., Matsusits, H., Kuroda, T.: Post marketing surveillance of the safety and effectiveness of thrombomodulin alfa in Japanese patients with DIC. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011. 7/23-28.
- 2) Madoiwa, S., Tanaka, H., Nagahama, Y., Yasumoto, A., Sakata, A., Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Leukocyte elastase as an alternative pathway for fibrinolysis. 57th Annual SSC Meeting. 2011. 7/23-28.
- 3) Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Yasumoto, A., Ishiwata, A., Sakata, A., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Watanabe, N., Tatsumi, K., Ohashi, K., Okano, K., Sakata, Y.: Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011. 7/23-28.

研究分担者

小澤 敬也

- 1) Rahim, A., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., Ozawa, K.: Reduction of MBS85 gene expression after the targeted integration of a transgene into the AAVS1 site using adeno-associated virus integration machinery. *Int J Genet Gene Ther*, in press.
- 2) Yagi, H., Sanechika, S., Ichinose, H., Sumi-Ichinose, C., Mizukami, H., Urabe, M., Ozawa, K., Kume, A.: Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy. *Neuroreport*, in press.
- 3) Kikuchi, Y., Kume, A., Urabe, M., Mizukami, H., Suzuki, T., Ozaki, K., Nagai, T., Ozawa, K.: Reciprocal upregulation of Notch signaling molecules in hematopoietic progenitor and mesenchymal stromal cells. *J Stem Cell Regen Med*, in press.
- 4) Takahashi, K., Saga, Y., Mizukami, H., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Suzuki, M., Ozawa, K.: Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci*, in press.
- 5) Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K., Kume, A.: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J Gene Med* 13:114-22, 2011.
- 6) Kaneda, K., Kakahara, H., Matsui, R., Katoh, T., Mizukami, H., Ozawa, K., Watanabe, D., Isa, T.: Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin. *PLoS One* 6:e18452, 2011.

嶋 緑倫

- 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 [Epub ahead of print]
- 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* 22:106(5), 2011
- 3) 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]
- 4) Ogiwara K, Nogami K, Shima M. Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue

- factor-independent mechanisms. *Thromb Haemost* 106(4):665-674, 2011
- 5) Shirahata A, Fukutake K, Higasa S, Mimaya J, 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* 17(5):771-776, 2011
 - 6) 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. *Thromb Haemost* 6:105(6):989-998, 2011

長谷川 護

- 1) Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Murakami Y, Yoshida N, Tabata T, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. Pigment epithelium-derived factor gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models. *Hum Gene Ther*. 22(5):559-565, 2011.

稲葉 浩

- 1) Inaba H, Shinozawa K, Suzuki T, Otaki M, Seita I, Ogata K, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, Hagiwara T, Yamamoto Y, Amano K, and Fukutake K, MUTATION ANALYSIS OF HEMOPHILIA A IN THE JAPANESE POPULATION: INCREASED PREVALENCE OF TYR473CYS CAUSED BY FOUNDER EFFECT Vol.9, Issue Supplement s2, p216, 2011
- 2) Hagiwara T, Shinozawa K, Amano K, Inaba H, Yamamoto Y, Suzuki T, Ogata K, Otaki M, Seita I, Yotsumoto M, Muramatsu T, Chikasawa Y, and Fukutake K, FEmale hemophilia B with homozygous missense mutation p.Ala337Val in the factor IX gene. *臨床血液* 52(9): 1180, 2011.

瀧 正志

- 1) A Shirahata, K Fukutake, S Higasa, J Mimaya, T Oka, M Shima, J Takamatsu, M Taki, M Taneichi, A Yoshioka and 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(5):771-776, 2011.9
- 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.

口頭発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

柿沼 章子

- 1) 関由起子、柿沼 章子、久地井 寿哉、大平 勝美、普通学級における病気をもつ子どもの受け入れ上の課題 -養護教諭と血友病の子どもを持つ母親の視点から-、第37回日本保健医療社会学会大会、2011
- 2) 柿沼 章子、久地井 寿哉、大平 勝美、薬害HIV感染被害者・家族の現状からみた、血友病に係わる今後の課題及び課題克服への支援研究(第二報) ~支援課題の明確化、第37回日本保健医療社会学会大会、2011
- 3) 三浦 萌海、柿沼章子、他、慢性疾患(慢性疾患(血友病)の子ども)の学校生活上・教育上の課題、第70回日本公衆衛生学会総会、2011
- 4) 久地井寿哉、柿沼章子 他、近年における薬害 HIV 感染被害者の生存人口動態および粗死亡率の分析、第70回日本公衆衛生学会総会、2011

大橋 一夫

- 1) Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocyte propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplantation*, 2012, in press.
- 2) Tatsumi K, Ohashi K, Mukobata S, Kubo A, Koyama F, Nakajima Y, Shima M, Okano T. Hepatocyte is a sole cell type responsible for the production of coagulation factor IX in vivo. *Cell Medicine*, 2012, in press.
- 3) Ohashi K, Matsubara Y, Tatsumi K, Kohori A, Utoh R, Kakidachi H, Horii A, Tsutsumi M, Okano T. Cell therapy using adipose-derived stem cells for chronic liver injury in mice. *Cell Medicine*, 2012, in press.

研究課題：HIV・HCV 重複感染血友病患者の長期療養に関する患者参加型研究

課題番号：H23-エイズ-指定-009

研究代表者：山下俊一（福島県立医科大学副学長・長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原研医療教授）

研究分担者：白阪琢磨（独立行政法人国立病院機構大阪医療センター臨床研究センターエイズ先端医療研究部長）、宮崎泰司（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原研内科教授）、中尾一彦（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科消化器病態制御学教授）、八橋 弘（国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター治療研究部長）、兼松隆之（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科移植・消化器外科名誉教授）、秋田定伯（長崎大学病院形成外科学講師）、澄川耕二（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科麻酔科教授）、大津留 晶（福島県立医科大学放射線健康管理学講座教授）、田中純子（広島大学大学院医歯薬学総合研究科疫学疾病制御学教授）、柿沼章子（社会福祉法人はばたき福祉事業団事務局長）、中根秀之（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科精神保健学教授）、照屋勝治（国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター病棟医長）

1. 研究目的

HIV・HCV 重複感染血友病患者における長期療養課題について患者参加型研究で明らかにし、課題解決法を提言する。薬害エイズ患者のQOL向上に資する為に、医療機関から在宅ケアに至る異なる医療福祉環境の中で、人権に配慮した個人への包括的なケア体制構築と精神的かつ身体的負担が少ない治療法の開発を目指す。

本研究は長崎大学病院で先行している細胞移植や肝移植の高度先端医療の治療対象エイズ患者と表裏一体に位置づけられる。『非移植対象薬害エイズ血友病患者であり、高齢化以外にターミナルステージへと進行増悪リスク』を有する全国の対象患者に対して、その患者実態調査（臨床医学的・精神心理的）と患者背景調査（生活背景・包括的健康状況）を並行して行うものである。さらにウィルス肝炎の新規臨床治験導入に向けての開発研究も模索する。

2. 研究方法

エイズ拠点病院やエイズ治療拠点病院との連携を元に、薬害エイズ血友病患者については『はばたき福祉事業団』を患者側窓口とし、長崎大学病院では先行する秋田班・兼松班と連携し、入院患者への対応と情報収集を行う。短期入院患者に対する臨床データの収集管理以外に、聞き取り面談調査時などに健康情報モニタリングを行い、24時間連続記録健康基礎データを収集解析する。

血友病合併症の重要疾患としてのHCV感染およびHIV感染の薬物治療の効果・副作用対策を整備するために、エイズ単独患者以外に、血液疾患、肝疾患、肝不全、肝移植対象、細胞移植対象の各患者に対する個別調査を、各研究分担者のチームが行ない総合的な比較検証を行う。更に本研究班においてACCとのデータベースの統合化を図る。

データ収集、解析、成果公表時などにおけるサンプリングの対象は全国のHIV・HCV重複感染血友病患者であり、場合によっては家族である。性、年齢、発病契機、罹病期

間、病状の程度、検査所見（時系列）、合併症の有無と程度、交絡因子、予後余命予測など無作為抽出による他の比較対照疾患と対比し諸問題を解決する。

患者参加型の協力体制の下で、HIV・HCV 重複感染血友病患者データベース登録対象者を明らかにし、リサーチレジデントらと共に、アンケート及び個別面談調査を実施する。双方向性の情報シェアの必要性を相互理解し、患者参加が可能なネットワーク構築を目指す。実際の面談による聞き取り調査は、単回ではなく、最初の基本的聞き取りから段階的に発展し、次に半構造化面接手法から更に問題中心の詳細面接手法へと展開する。

過去の全国アンケート調査を踏襲し、薬害エイズ患者の実態解明を更に詳しく行う。主観的聞き取り調査のピットフォールに陥らないための会話（叙述）のやり取りでの重層する情報収集方法に従い2年は得られた情報を共分散構造分析法により解析する。

長期療養課題の抽出と同時に予後を左右する因子の早期検出に繋がる患者データベースの構築と医師-患者間の双方向性情報シェアのプロトタイプモデルの確立にむけて円滑な運用を企画立案する。

3. 研究結果

全国のHIV・HCV重複感染血友病患者に対するアンケート調査に加えて、はばたき福祉事業団を調整窓口として直接面談方式による聞き取り調査を行い、平成23年1月末までに400通のアンケートを送付し、136名（回収率34%）より回答をうけた。また87名の個別面談調査を終了した。内容の詳細は現在検討中であり、10年前と比較しHIVに対する治療法が進歩・確立した現在でも体調が悪化している患者が多く、今後の不安を抱える者が42%を占めた。体調悪化の理由は、AIDS関連は15%のみでそれ以外の理由が85%を占めた。その中でも、肝疾患18%、薬の副作用15%、血友病関節症11%であった。GHQ-12による心の健

康状態では、4点以上の高得点群が48%に認められた。さらに2次面接調査を68例に実施し、GHQ-28解析の結果精神医学的問題の存在が明らかとなり、心身面からの適切なサポートの重要性が判明した。従来のがん患者の緩和ケアと比較し、非がん疾患である薬害エイズ患者の包括的なケアに関する検討を継続中であり、現行の医療枠組みの中での限界についても検証と提言を図る予定である。

エイズ一般患者、血友病単独患者と他の肝疾患患者などを対象とした長期療養課題抽出における包括的比較調査研究を行い、重複患者における肝機能評価と薬剤副作用について検討した。その結果、HCV単独感染者における肝線維症の評価に有用な検査項目が明らかとなり、本指標を用いた重複患者の肝機能及び形態の再評価の必要性が示唆された。更に血友病長期生存例として高齢化に伴う運動器障害合併症が日常生活で解決されるべき課題であった。精神機能障害がその生活背景からも大きい事が示唆された。死因の半数が肝不全、肝癌であり、薬剤副作用問題を兼松班と共有し、今後の研究事業推進に生かすこととした。

全国エイズ診療拠点との連携を深めるべく厚労省と患者団体の意向による木村哲先生調整による協議会を催し、今後の協力連携体制構築が合意された。その結果、包括的調査研究事項の確立とACCを中心としたデータ収集と統合的な解析に関する基盤を整備し、今後の全国調査と患者実態把握へ発展させることとした。

4. 考察

指定研究としての山下班が、患者本位の薬害エイズ原状回復医療を目指し初年度に引き続き2年目も活動を開始したが、東北大震災に伴う福島原発事故対応で、急遽研究代表者が途中辞退を余儀なくされた。重複感染血友病患者が全国に800名近く存命中であり、その長期療養課題の抽出と優先的な治療方針については個人情報秘匿性に注意しながらも患者背景データと医療データの集約化が、医師-患者双方向性の信頼関係の中での情報共有として不可欠である。その為に現行の薬害エイズ診療体制の諸課題明らかにし、個別の課題解決法の確立が目指されている。過去の実態調査を参考に、対象患者へのアンケート調査結果から最大の合併症であるHCV感染症による肝障害に焦点を絞り、長期療養課題の包括的理解の第一歩を踏み出した。その取組と結果の一部を研究成果としたが、個別の症例に対するセカンドオピニオンの取組みの必要性和死因の半分以上が肝不全・肝癌である実態から、HIVだけでなくHCV感染に対する治療の成否が生命予後に影響す

ると考えられた。HIV・HCV重複感染の重篤性・複雑性については、類似研究の調査解析に加えて、他の疾患との比較検証も進行中である。しかし、高齢化と慢性疾患進行に伴う訪問看護や緩和ケアなどの個別調査と積極的な受入施設などの開拓は継続課題として残る。

今後15年以内に現行の薬害エイズ患者数は半減すると予想され、早急に長期療養対処法を提言し、同時に各種課題に対する診療ガイドライン作成や医療制度の活用、患者支援ネットワークの構築が必要である。

5. 自己評価

1) 達成度について

全国薬害エイズ患者の実態掌握調査を開始し、長期療養課題の抽出という予備的成果を挙げ、患者との信頼関係の構築に向けた努力の必要性に加えて、医療供給側の問題点も明らかとなった。しかし、山下班2年間の成果がまとまらず、指定研究の成果を具体的に生かす政策提言までには至らず継続した調査研究の必要性を確認した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV・HCV重複感染血友病患者の救済モデル事業が具体的に立ち上がることで、合併症の対策と解決に向けて患者本位の医療が展開可能である。薬害HIV・HCV診療の学問体系の確立と実践に寄与し、「温もり医療と福祉」に向けた新たな医療文化の醸成が期待される。

3) 今後の展望について

長期療養における個別患者対応という困難な課題の対処方法について、さらに症例を蓄積し、検討を行うことが今後の課題である。また、HIVやHCV感染、その他の合併症に関しても、より効果的な治療法を早急に開発・提言していくことが重要である。

6. 結論

急遽山下班2年間終了に伴う肝移植対象外の薬害エイズ患者における患者参加型研究は、次年度以降木村班としての継続が内定し、個別に挙げられた質的問題、すなわち運動器障害、精神状態、生活環境状態、さらに看取りケアなどの諸課題解決に向けた取組みと、参加者数増加によるアンケート解析が予定されている。指定研究班継続における課題解決に向けた迅速な対応が求められる。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当無し

研究発表

研究代表者

山下俊一

- 1) Suzuki K, Yamauchi M, Oka Y, Suzuki M, Yamashita S: Creating localized DNA double-strand breaks with microirradiation. *Nat Protoc* 6(2): 134-139, 2011
- 2) Suzuki K, Yamauchi M, Yamashita S: ATM-dependent cellular response to DNA double strand breaks plays a pivotal role in the maintenance of the integrity of the genome. *Radiat Prot Dosimetry* 143(2-4): 279-283, 2011
- 3) Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Suzuki M, Matsuse M, Ohtsuru A, Kumagai A, Uga T, Yano H, Nagayama Y, Yamashita S: Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. *PLoS One* 6(4): e19354, 2011
- 4) Kobashigawa S, Suzuki K, Yamashita S: Ionizing radiation accelerates Drp 1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* in press

研究分担者

白阪琢磨

- 1) Shirasaka T, Tadokoro T, Yamamoto Y, Fukutake K, Kato Y, Odawara T, Nakamura T, Ajisawa A., Negishi M. Investigation of emtricitabine-associated skin pigmentation and safety in HIV-1-infected Japanese patients. *Journal of Infection and Chemotherapy* (2011)17:602-608, 2011
- 2) Fujisaki S., Yokomaku Y., Shiino T., Koibuchi T., Hattori J., Ibe S., Iwatani Y., Iwamoto A., Shirasaka T., Hamaguchi M., Sugiura W. Outbreak of Infections by Hepatitis B Virus Genotype A and Transmission of Genetic Drug Resistance in Patients Coinfected with HIV-1 in Japan. *JOURNAL of CLINICAL MICROBIOLOGY* Vol.49 No.3:1017-1024, 2011

宮崎泰司

- 1) Mizuta S, Matsuo K, Yagasaki F, Yujiri T, Hatta Y, Kimura Y, Ueda Y, Kanamori H, Usui N, Akiyama H, Miyazaki Y, Ohtake S, Atsuta Y, Sakamaki H, Kawa K, Morishima Y, Ohnishi K, Naoe T, Ohno R : Pre-transplant imatinib-based therapy improves the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. : *Leukemia*,25(1):41-47,2011
- 2) Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, Amenomori A, Yamamura M, Yoshida Y, Koba T, Miyazaki Y, Matsuo T, Preston DL, Suyama A, Kodama K, Tomonaga M.: Risk of Myelodysplastic Syndromes in People Exposed to Ionizing Radiation: a Retrospective Cohort Study of Nagasaki Atomic Bomb Survivors. *J Clin Oncol*, 29(4):428-434,2011

中尾一彦

- 1) Nanashima A, Tobinaga S, Abo T, Kunizaki M, Takeshita H, Hidaka S, Taura N, Ichikawa T, Sawai T, Nakao K, Nagayasu T: Usefulness of sonazoid-ultrasonography during hepatectomy in patients with liver tumors: A preliminary study. *J Surg Oncol* 103 (2): 152-157, 2011 (IF:2.502) *2月
- 2) Nanashima A, Abo T, Nonaka T, Fukuoka H, Hidaka S, Takeshita H, Ichikawa T, Sawai T, Yasutake T, Nakao K, Nagayasu T: Prognosis of patients with hepatocellular carcinoma after hepatic resection: are elderly patients suitable for surgery? *J Surg Oncol* 104 (3): 284-291, 2011 (IF:) *9月

八橋 弘

- 1) Fujino T, Nakamuta M, Aoyagi Y, Kohjima M, Satoh T, Fukuda M, Ishibashi H, Yatsushashi H, Enjoji M. Early dynamics of viremia in patients with genotype 1b chronic hepatitis C: Peg-IFNalpha2a shows earlier viral decline than peg-IFNalpha2b in combination therapy with ribavirin. *Med Sci Monit.* 2011 Dec 1;17(12):CR687-691.
- 2) Miyaaki H, Ichikawa T, Yatsushashi H, Taura N, Miura S, Usui T, Mori S, Kamihira S, Tanaka Y, Mizokami M, Nakao K. Suppressor of cytokine signal 3 and IL28 genetic variation predict the viral response to peginterferon and ribavirin. *Hepatol Res.* 2011 Dec;41(12):1216-1222.
- 3) Kawaguchi T, Kakuma T, Yatsushashi H, Watanabe H, Saitsu H, Nakao K, Taketomi A, Ohta S, Tabaru A, Takenaka K, Mizuta T, Nagata K, Komorizono Y, Fukuizumi K, Seike M, Matsumoto S, Maeshiro T, Tsubouchi H, Muro T, Inoue O, Akahoshi M, Sata M. Data mining reveals complex interactions of risk factors and clinical feature profiling associated with the staging of non-hepatitis B virus/non-hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2011 Jun;41(6):564-571.

兼松隆之

- 1) Eguchi S, Kanematsu T, Arii S, Omata M, Kudo M, Sakamoto M, Takayasu K, Makuuchi M, Matsuyama Y, Monden

M ; for the Liver Cancer Study Group of Japan. Recurrence-free survival more than 10 years after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* 98 (4):552-7, 2011.

- 2) Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Muraoka I, Tomonaga T, Shimokawa I, Kanematsu T. Lack of Grafted Liver Rejuvenation in Adult-to-Pediatric Liver Transplantation. *Dig Dis Sci* 56(5):1542-1547, 2011.

秋田定伯

- 1) Akita S, Yoshimoto H, Akno K, Yamashita S, Hirano A.
Early experiences with stem cells in treating chronic wounds.
Clin Plast Surg. in press, 2011.
- 2) Kinoshita N, Tsuda M, Hamuy R, Nakashima M, Nakamura-Kurashige T, Matsuu-Matsuyama M, Hirano A, Akita S.
The usefulness of basic fibroblast growth factor fro radiation-exposed tissue.
Wound Repair Regen, in press, 2011.

澄川耕二

- 1) Murata H, Sakai A, Sumikawa K: A venous structure anterior to the brachial plexus in the supraclavicular region. *Reg Anesth Pain Med* 36(4):412-413, 2011
- 2) Murata H, Sakai A, Sumikawa K: Atypical “corner pocket” for ultrasound-guided supraclavicular block. *Reg Anesth Pain Med* 36(4):415-416, 2011

大津留晶

- 1) K. Matsushima, H. Isomoto, N. Yamaguchi, N. Inoue, H. Machida, T. Nakayama, T. Hayashi, M. Kunizaki, S. Hidaka, T. Nagayasu, M. Nakashima, K. Ujifuku, N. Mitsutake, A. Ohtsuru, S. Yamashita, M. Korpak, Y. Kang, PA. Gregory, G.J. Goodall, S. Kohno, K. Nakao, MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells, *J Transl Med*, 9(1), 30, 2011.
- 2) R. Koshimoto, H. Nakane, H. Kim, H. Kinoshita, DS. Moon, A. Ohtsuru, G. Bahn, Y. Shibata, H. Ozawa, S. Yamashita, Mental health conditions in Korean atomic bomb survivors: a survey in Seoul, *Acta Medica Nagasakiensia*, in press 2011.
- 3) N. Inoue, H. Isomoto, K. Matsushima, T. hayashi, M. Kunizaki, S. Hidaka, H. Machida, N. Mitsutake, A. Nanashima, F. Takeshima, T. Nakayama, A. Ohtsuru, M. Nakashima, T Nagayasu, S. Yamashita, K. Nakao, S. Kohno, Down-regulation of microRNA 10a expression in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Oncology Lett*, 1, 527-531, 2010.

中根秀之

- 1)Yoshimasu K,Kawakami N, World Mental Health Japan 2002-2006 Survey Group.:Epidemiological aspects of intermittent explosive disorder in Japan; prevalence and psychosocial comorbidity :Findings from the World Mental Health Japan Survey 2002-2006. *Psychiatry Res.* Apr 30;186(2-3):384-9.2011
- 2)Koshimoto, R., Nakane, H., Kim, H., Kinoshita, H., Moon, D.S., Ohtsuru, A., Bahn, G., Shibata, Y., Ozawa, H., Yamashita, S.: Mental health conditions in Korean atomic bomb survivors: a survey in Seoul. *Acta Medica Nagasakiensia* 56(2), 53-58, 2011

田中純子

- 1) Tanaka J, Koyama T, Mizui M, Katayama K, Matsuo J, Akita T, Nakashima A, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Total Numbers of Undiagnosed Carriers of Hepatitis C and B Viruses in Japan Estimated by Age- and Area-specific Prevalence on the National Scale. *Intervirolgy.* 54(4): 185-195, 2011.
- 2) Tomoguri T, Katayama K, Tanaka J, Yugi H , Mizui M, Miyakawa Y, Yoshizawa H,. Interferon Alone or Combined with Ribavirin for Acute Prolonged Infection with Hepatitis C Virus in Chimpanzees. *Intervirolgy.* 54(4): 229-232, 2011.
- 3) Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamoti A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 46(4): 536-544, 2011.

照屋勝治

- 1)照屋勝治、なくならないいきなりエイズ、HIV 感染者の早期発見と社会復帰のポイント、岡慎一編、医薬ジャーナル社、大阪、53-59、2010.
- 2)照屋勝治、HIV 感染患者透析医療ガイドライン、日本透析医会、日本透析学会、HIV 感染患者透析医療ガイドライン策定グループ、2010

研究課題：血液製剤によるHIV/HCV重複感染患者に対する肝移植のための組織構築

課題番号：H21-エイズ一般-004

研究代表者：兼松 隆之（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）

研究分担者：有吉 紅也（長崎大学 熱帯医学研究所 教授）、江口 晋（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）、上平 憲（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）、酒井 英樹（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）、白阪 琢磨（大阪医療センター 臨床研究センター エイズ先端医療研究部長）、澄川 耕二（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）、中尾 一彦（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）、安岡 彰（長崎大学病院 感染制御教育センター 教授）、八橋 弘（長崎医療センター 臨床研究センター 治療研究部長）、山下 俊一（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 教授）、國土 典宏（東京大学医学部大学院医学系研究科 教授）、市田 隆文（順天堂大学医学部附属静岡病院 副院長）

1. 研究目的

本研究の目的は、HIV/HCV 重複感染者（以下重複感染）で末期肝硬変に至った症例に対する肝移植治療の確立である。重複感染者が肝不全に陥った場合、肝移植が有効である可能性があるが、同病態に対する肝移植の有効性に関しては散発的な報告のみで、不明な点が多い。特に血液製剤を介しての重複感染が社会問題となっている本邦においては、その治療の確立は社会からの要請であり、患者救済のため急務である。重複感染患者に対する肝移植の①適応、②周術期管理、③術後フォローアップ、の体制を確立・標準化してガイドラインを作成することが本研究の目的である。なお、本研究班では肝移植のみならず、HIV 患者に対する他の臓器移植（腎移植、肺移植、角膜、皮膚移植など）の体制作りに努めることも目的とする。

2. 研究方法

1) 肝移植候補者の受け入れと HIV/HCV 重複感染者の肝機能<評価のための検診の実施> 重複感染者のうち、自ら希望し同意の得られた患者に対して全国からの患者を受け入れ、主に肝機能を中心とした全身検査を長崎大学病院で行う。移植適応の判断が困難な場合も、相談窓口を設置し、状況によりフォローされている病院に出向き主治医や患者への面接・説明を行う。

2) 肝移植の適応 重複感染患者の肝移植に関するコンサルトを受け付けると共に、肝移植候補者に対しては、入院の上、評価を行い、適応例にはこれを実施する。また前述の如く本疾患患者での肝機能評価のための検診を行い、そのデータベースを構築する。この検診のためには長崎大学病院は優先的に個室利用が可能となる体制をとる。上記検診データをもとに、HCV 単独感染患者に対する肝移植適応をそのまま適用可能か否かも考察し、必要であれば新たな適応基準を提案・確立する。

3) 移植手術と周術期管理に関する研究 肝移植適応患者に対しては、長崎大学病院において既に確立済みの手法により肝移植手術を行う。血友病症例に対しては、術中の

出血予防として凝固因子を持続的に補充し、活性値を維持する。周術期の医療従事者の HIV 暴露対策としては、院内ですでに確立されている対策マニュアルに従い必要に応じて内容の修正を追加する。周術期の免疫抑制療法、HCV/HCV それぞれに対する治療は過去の経験や報告、さらに最新の知見を参考に、当面症例ごとに検討する。

4) 退院後のフォロー 当院へ通院可能な患者は1~2ヶ月に1回程度の外来受診とする。遠方の患者は、各地に拠点病院を設置して密に連携しながら同様にフォローしていくが、この際、情報を共有しやすいようにチェック項目を付した用紙を各病院に配布する。定期受診以外でも、24時間体制で対応できる窓口を各病院に設置する。

5) 米国先行施設（マイアミ大学）との連携 HIV 陽性患者に対する肝移植の経験が豊富なマイアミ大学と連携し、特に周術期の免疫抑制療法に関して情報交換する。

（倫理面への配慮）

①症例評価、登録、実施、臨床データ取得・解析までの計画を長崎大学倫理委員会に提出し承認を得た後に、個々の症例よりインフォームドコンセントによる同意を書面で得る。②肝移植の適応および実施に関しては肝移植専門小委員会から倫理委員会提出という実施がすでに承認されており、また、個々の症例の検体・標本を医学研究の用いられることも承認されている。③得られたデータは全て匿名化し、情報は長崎大学 移植・消化器外科内の管理された特定部署内で管理するとともに個々のデータの秘匿性を保持する。上記のデータは個人が特定されないように十分に配慮された状況で患者団体や厚生労働省および関連学会の介入のもと透明性の高い研究とし報告する。

3. 研究結果

肝移植適応検討のための肝機能検査 現在までに30名の2泊3日入院検査を施行した。検査では肝機能採血、CT検査、エコー検査などの画像検査、さらには骨密度、アシアロ肝シンチなどの特殊検査も施行し、HIV/HCV 重複感染者の現在の肝機能、肝予備能および肝移植適応の有無を精

査した。結果は、27例(90%)が肝硬変の程度の指標であるChild分類Aであり、黄疸や腹水を認めることなく肝機能良好であると判断された。しかし、CT検査では21例(70%)が肝炎もしくは肝硬変の所見であり、17例(57%)が脾腫を認めた。また、内視鏡検査で8例(26%)に食道静脈瘤を認め、総合的に「みかけの肝機能は良好であるが、潜在的に門脈圧亢進症の程度が強い肝障害が多くみられる」という結果であった。この結果を受けてエイズ診療拠点病院である国立国際医療研究センター(ACC)、横浜市立市民病院、国立病院機構大阪医療センター、国立病院機構九州医療センターの4施設のChild分類Aの症例146例の予後を調査したところ、門脈圧亢進症の間接的指標である血小板数 $15\text{万}/\mu\text{L}$ 以下の症例は有意に予後不良であった。

肝移植を施行した重複感染患者の肝組織所見 重複感染から肝不全に陥り、東京大学で生体肝移植を施行した6例の摘出肝を病理学的に観察した。組織学的にはHCV単独による肝硬変の所見と変わらないが、肝は萎縮することなくむしろ腫大し、標準肝容積より大きい症例を2例に認め、全体でもHCV単独による肝硬変よりも有意に重量が大きい、という結果であった。やはり通常のC型肝炎とは病態が異なり、門脈圧亢進症がより強いことと関連がある可能性が示唆された。

本研究における重複感染患者の転帰 研究期間中、肝機能検査を施行した患者と肝移植適応に関して紹介された患者のうち3例を失った。1例は脳死肝移植登録中にJCウイルスによる進行性多巣性白質脳症で、1例はChild分類Aにも関わらず熱中症を契機に肝不全となり死亡、もう1例は肝細胞癌で死亡した。3例を脳死肝移植へ登録したが、前述の1例が待機中に死亡し、現在2例を登録中である。生体肝移植に関しては適切なドナーが不在であり施行されていない。

周術期のHIV・HCVに対する治療 HIVに対しては、免疫抑制剤との相互作用が軽微な新規薬剤であるラルテグラビルの導入も検討することとした。HCVに対してはIL28B遺伝子多型(SNP)が現在の標準治療であるインターフェロン治療の奏効率に影響することが長崎大学の生体肝移植症例でも明らかとなったため、これを参考として治療方針を決定することとした。

肝移植後の免疫抑制療法 マイアミ大学のデータから、HAARTとの相互作用により、術直後の免疫抑制剤血中濃度が大きく変動するため、週1回投与とするなどの工夫が必要ことがわかった。

4. 考察

血液製剤による重複感染患者に対する肝移植のため、手

術器具の選別、凝固因子測定系の確立、院内医療従事者マニュアルの作成を行い、肝移植のための準備態勢が整っているが、肝移植施行には到っていない。主に過去の経験・報告や最新の知見をもとに、HIV、HCV、血友病、肝移植、それぞれの分野を専門とする共同研究者に肝移植の①適応、②周術期管理、③術後フォローアップ、に関してガイドラインを作成しているところである。重複感染患者に対する肝機能検査や移植時摘出肝の所見から、HCV単独感染に対する肝移植症例よりも肝硬変の程度はむしろ強いが、門脈圧亢進症による肝障害が主であり、特に適応に関して従来の基準では正確な判断ができない可能性が示唆された。今後、肝移植適応評価委員会とも議論を重ね、適応を再考する必要がある。

5. 自己評価

1) 達成度について

肝移植候補者2名の受け入れを行なったが、生体肝移植の対象とならず、現在、脳死肝移植待機の状態である。

しかし、HIV・HCV感染および血友病に対する対策は、認識・知識は向上し、肝移植のための組織は構築されたと考える。また、肝機能良好にも関わらず門脈圧亢進症の所見が強い症例が意外に多いことが明らかとなったことは、今後重複感染患者に対する肝移植適応を再考するきっかけとなり、重要な知見が得られたと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIVはもはや長期的治療疾患ととらえられ、肝不全患者の救命によりHIV患者の社会への参画がより積極的になることが期待され、HIV疾患への理解が深まり、同時に多くの研究者の本分野への参加が期待される。また、肝移植以外の移植医療に関しても社会の関心や理解がより深まるものと期待される。重複感染者に対する肝移植治療の標準化は世界的にもなされておらず、国際的にも意義深い研究となる。

3) 今後の展望について

重複感染患者に対する肝移植の診療ガイドラインが完成すれば、全国どこでも治療が受けられ、施設間の連携も潤滑に行われることが期待される。

6. 結論

重複感染患者に対する肝移植の組織構築は達成され、ガイドラインをもとに今後実際に治療を展開する基盤が作られた。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

兼松 隆之

- 1) Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Muraoka I, Tomonaga T, Shimokawa I, Kanematsu T. Lack of Grafted Liver Rejuvenation in Adult-to-Pediatric Liver Transplantation. *Dig Dis Sci* 56(5):1542-1547, 2011.
- 2) 江口 晋、高槻光寿、曾山明彦、村岡いづみ、原 貴信、兼松隆之：後天性免疫不全症候群(AIDS), 南江堂, 73(12) 別冊, 2011

研究分担者

有吉 紅也

- 1) Mori M, Sriwanthana B, Wichukchinda N, Boonthimat C, Tsuchiya N, Miura T, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Unique CRF01_AE Gag CTL Epitopes Associated with Lower HIV-Viral Load and Delayed Disease Progression in a Cohort of HIV-Infected Thais. *PLoS One*. 2011;6(8): e22680, 2011.
- 2) Rojanawiwat A, Tsuchiya N, Pathipvanich P, Pumpradit W, Schmidt WP, Honda S, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Ariyoshi A. Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health*. 3(2): 101-107, 2011.

江口 晋

- 1) Eguchi S, Soyama A, Mergental H, van den Berg AP, Scheenstra R, Porte RJ, Slooff MJH. Honoring the contract with our patients: outcome after repeated re-transplantation of the liver. *Clin Transplant*. 25(2): E211-8, 2011.

上平 憲

- 1) 上平 憲：V感染症検査 抗HTLV-1抗体／抗HIV抗体、中原一彦、総合医学社、556-557、2011
- 2) 上平 憲：V感染症検査 HIV定性・定量遺伝子検査／JIVシ^ェノタイプ^グ 薬剤耐性検査、558-559、2011

酒井 英樹

- 1) Matsuo T, Miyata Y, Watanabe S, Ohba K, Hayashi T, Kanda S, Sakai H: Pathologic significance and prognostic value of phosphorylated cortactin expression in patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *Urology* 78(2): 476.e9-15, 2011.

白阪 琢磨

- 1) Yoshino M, Yagura H, Kushida H, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Taniguchi T, Watanabe D, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T. Assessing recovery of renal function after tenofovir disoproxil fumarate discontinuation *Journal of Infection and Chemotherapy*, Online First™, 2011.
- 2) Shirasaka T, Tadokoro T, Yamamoto Y, Fukutake K, Kato Y, Odawara T, Nakamura T, Ajisawa A, Negishi M. Investigation of emtricitabine-associated skin pigmentation and safety in HIV-1-infected Japanese patients *Journal of Infection and Chemotherapy* (2011)17:602-608, 2011.

澄川 耕二

- 1) Ando Y, Hojo M, Kanaide M, Takada M, Sudo Y, Shiraishi S, Sumikawa K, Uezono Y. S(+)-ketamine suppresses desensitization of γ -aminobutyric acid type B receptor-mediated signaling by inhibition of the interaction of γ -aminobutyric acid type B receptors with G protein-coupled receptor kinase 4 or 5.
- 2) Tosaka S, Tosaka R, Matsumoto S, Maekawa T, Cho S, Sumikawa K. Roles of cyclooxygenase 2 in sevoflurane-

and olprinone-induced early phase of preconditioning and postconditioning against myocardial infarction in rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 16(1):72-8, 2011.

中尾 一彦

- 1) Miyaaki H, Ichikawa T, Yatsushashi H, Taura N, Miura S, Usui T, Mori S, Kamihira S, Tanaka Y, Mizokami M, Nakao K. Suppressor of cytokine signal 3 and IL28 genetic variation predict the viral response to peginterferon and ribavirin. *Hepatol Res.* 41(12):1216-1222, 2011.
- 2) Ozawa E, Abiru S, Nagaoka S, Yano K, Komori A, Migita K, Yatsushashi H, Taura N, Ichikawa T, Ishibashi H, Nakao K. erritin/alanine aminotransferase ratio as a possible marker for predicting the prognosis of acute liver injury. *J Gastroenterol Hepatol.* 26(8):1326-32, 2011.

安岡 彰

- 1) 安岡 彰 医療従事者職業感染対策の現状と問題点 *PharmaMedica* 2011. 29(12) : 45-49.
- 2) Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol.* 2011 49:581-7.

八橋 弘

- 1) Fujino T, Nakamura M, Aoyagi Y, Kohjima M, Satoh T, Fukuda M, Ishibashi H, Yatsushashi H, Enjoji M. Early dynamics of viremia in patients with genotype 1b chronic hepatitis C: Peg-IFNalpha2a shows earlier viral decline than peg-IFNalpha2b in combination therapy with ribavirin. *Med Sci Monit.* 2011 Dec 1;17(12):CR687-691.
- 2) Tateyama M, Yatsushashi H, Taura N, Motoyoshi Y, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Yano K, Komori A, Migita K, Nakamura M, Nagahama H, Sasaki Y, Miyakawa Y, Ishibashi H. Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2011 Jan;46(1):92-100.

山下 俊一

- 1) Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Suzuki M, Matsuse M, Ohtsuru A, Kumagai A, Uga T, Yano H, Nagayama Y, Yamashita S. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. *PLoS One* 6(4): e19354, 2011.
- 2) A.Bychkov, S.Yamashita, A.Dorosevich. Pathology of HIV/AIDS: Lessons from Autopsy series. *HIV and AIDS: From Laboratory to Patients(AIDS/Book1)* 1-20, 2011.

國土 典宏

- 1) Mise Y, Hasegawa K, Satou S, Aoki T, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Venous reconstruction based on virtual liver resection to avoid congestion in the liver remnant. *Br J Surg.* 2011 Dec;98(12):1742-51.
- 2) Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N. Should we promote "increasing donor body weight to prevent small-for-size syndrome in living donor liver transplantation"? *World J Surg.* 2011 Oct;35(10):2356-7; author reply 2358-9.

市田 隆文

- 1) Egawa H, Ueda U, Ichida T, Teramukai S, Nakanuma Y, Ohnishi S, Tsubouchio H: Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation in Japanese registry. *Ame J Transplant* 2011; 11(3): 518-527.
- 2) Fujita N, Yoshikawa T, Kaito, Ichida T: Identification of Treatment Efficacy Related Host Factors in Chronic Hepatitis C by ProteinChip Serum Analysis. *MoMed-2011: 17(1-2): 70-78.*

研究課題：HLA発現ヒト免疫構築マウスにおけるHIV-1特異的CTLの誘導とその機能解析

課題番号：H23-エイズ-若手-002

研究代表者：斎藤 益満（熊本大学エイズ学研究センター 特任講師）

研究分担者：佐藤 義則（熊本大学エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト）

1. 研究目的

長期にわたる HIV-1 増殖抑制には、HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による HIV-1 感染細胞の除去が非常に重要である。しかしながら、HIV-1 は感染細胞上の HLA クラス I 分子に提示されるウィルス蛋白質の一部(エピトープ)を変異させ、CTL に発現するヒト T 細胞受容体 (TCR) の認識から逃れる。最近、本研究室ではエイズ発症遅延と相関する HLA-B*51 に提示される TAFTIPSI (逆転写酵素の 128~135 番残基) エピトープの 135 番目のアミノ酸の変異が CTL からの逃避変異であることを明らかにした。またこの逃避変異の出現が生体内におけるウィルス量を増加させるとともに HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL を減少させることを報告した (Kawashima, Y, et al, Nature, 2009, Kawashima, Y, et al, The Journal of Virology, 2010)。

これらの現象を *in vivo* で詳細に解析するために、われわれはこれまで HLA-B*5101 遺伝子を発現する高度免疫不全マウス (NOK/B51Tg マウス) の作製と複数の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者由来の CTL クローンから HIV-1 TAFTIPSI エピトープを認識する TCR 遺伝子の同定を行ってきた。

2. 研究方法

ヒト生体内における免疫反応を我々が作製した NOK/B51Tg マウスにおいて解析を行うためには、ヒト造血幹細胞に発現する HLA と NOK/B51Tg マウスに発現する HLA を一致させる必要がある。しかしながら、我々が使用するほとんどのヒト造血幹細胞は、HLA-B*5101 陰性であるために HLA-B*51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法の検討を行った。まずリン酸カルシウム法を用いて、HLA-B*5101 遺伝子発現レンチウイルスベクターとパッケージングベクターを同時に 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養液の回収を行った。その後、超遠心機を用いて培養液中のレンチウイルスの濃縮を行った。濃縮されたレンチウイルスと HLA-B*5101 陰性ヒト造血幹細胞を混和し、一晚培養することによってレンチウイルスを感染させ、HLA-B51 陽性ヒト造血系幹細胞の樹立を行った。レンチウイルスを感染させた HLA-B*51 陰性ヒト造血幹細胞における HLA-B51 の発現の有無をフローサイトメトリーを用いて確認した後、この HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞を NOK/B51Tg マウスに移植した。

10 週間後に HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞を移植した NOK/B51Tg マウスより末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いてヒト T 細胞の割合と細胞数の解析を行い、ヒト T 細胞の再構築を確認した。ヒト T 細胞の再構築が確認できたマウスにおいて、HLA-B51 を発現するヒト T 細胞の存在をレンチウイルスベクターにコードされている蛍光タンパク質をマーカーとして用いて検討を行った。

単一 T 細胞からの TCR 遺伝子同定法を用いて、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者由来の CTL クローンから HIV-1 TAFTIPSI エピトープを認識する TCR 遺伝子の同定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト由来の検体の使用と遺伝子解析については、すべてインフォームドコンセントをとり、本人の承諾なく実験に使用・遺伝子解析を行わない。本研究における遺伝子解析の実施の許可については、当大学のヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会にて承認済みである。また、検体提供者の個人情報はネットワークに接続されていない個人情報管理専用のパソコンで厳重に管理され、そのパソコンは研究室内でも限られた者しか利用できないようパスワードで使用が制限されている。臍帯血単核球は理研化学研究所 (理研) から購入し、この臍帯血単核球は理研がすでに提供者に対してインフォームドコンセントを行い、さらに匿名化されているため、本研究によって提供者に危険を及ぼすことは無い。動物実験についてはすでに当大学の動物実験・倫理審査委員会にて承認済みである。

3. 研究結果

NOK/B51Tg マウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒト T 細胞の再構築を確認後、HIV-1 感染によってエフェクタータイプのヒト CD8⁺ T 細胞が誘導されたことを確認した。さらに実際に引き起こされるヒト生体内の免疫反応に近い免疫反応を NOK/B51Tg マウスにおいて検出するために、レンチウイルスを用いて HLA-B*5101 陽性ヒト造血幹細胞を作製した結果、約 5% の HLA-B*51 陰性ヒト造血幹細胞において、HLA-B*51 の発現を検出した。しかしながら、これらの HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞を移植した 4 匹の NOK/B51Tg マウスにおいて、ヒト T 細胞の再構築を確認することが出来たものの、HLA-B51 陽性ヒト T 細胞の存在を

検出することは出来なかった。

NOK/B51Tg マウスにおける HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL の誘導を目的に、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL クローンを樹立し、その CTL クローンに発現する TCR 遺伝子の解析を行った。その結果、感染者間で高い類似性を示す TCR が発現していることを明らかとした。さらにこれらの TCR 発現レンチウイルスベクターを作製し、その発現を TCR 欠損細胞株表面上において検出した。

4. 考察

ヒト生体内における免疫反応に近い免疫反応を NOK/B51Tg マウスにおいて構築するために、レンチウイルスを用いた HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立とその移植を試みたものの、ヒト造血幹細胞におけるレンチウイルスの感染効率が低いために NOK/B51Tg マウスにおいて HLA-B51 陽性 T 細胞を検出することが出来なかった。そのため、レンチウイルスの感染効率を向上させるために、より高濃度のレンチウイルスの感染あるいはサイトカイン等によるヒト造血幹細胞の刺激が必要であると考えられる。これらの条件・検討は、HIV-1 TAFTIPSI 特異的 CTL クローンにおいて見出された TCR を HLA-B51 陽性 T 細胞に発現させる際に、非常に役立つと考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

NOK/B51Tg マウスにおいて、エフェクタータイプのヒト CD8⁺ T 細胞の誘導が HIV-1 感染後に確認されたこと、さらに複数の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者由来の CTL クローンから HIV-1 TAFTIPSI エピトープを認識する TCR 遺伝子を明らかにしたものの、HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立までに至らなかったため、その後の研究計画をスムーズに行うことが出来なかった。そのため、今年度の研究計画の達成度はあまり良いとは言えない。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HLA を発現しない NOK マウスでは誘導できなかったエフェクタータイプのヒト CD8⁺ T 細胞が、HLA を発現する NOK/B51Tg マウスにおいて HIV-1 感染後に誘導されたことを明らかにしたことは学術的に重要であり、HIV-1 などのヒトにしか感染しないウイルスによって引き起こされる感染症の研究に非常に有用なモデルマウスになると考えられる。

エイズ発症遅延と関連する HLA-B*51 に提示される TAFTIPSI エピトープを認識する CTL に発現する TCR 遺伝

子は、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から樹立された CTL クローン間において、非常に高い類似性を示すことを明らかにしたことは、国際的にも重要な発見であることが考えられる。この本研究成果より、世界 9 カ所のコホートで共通に見出された TAFTIPSI エピトープの変異誘導は、HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者由来 CTL クローンから見出された高い類似性を示す TCR 発現に参与していることを示唆している。

3) 今後の展望について

HIV-1 感染モデルマウスにおいて、ヒト免疫反応を解析するためには、使用される免疫不全マウスにおける HLA とそのマウスに移植する造血幹細胞に発現する HLA をマッチングさせることが必須である。そこで今年度の本研究計画では、HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞を樹立し、それを移植した NOK/B51Tg マウスにおける HIV-1 特異的 CTL の誘導を目的とした。しかしながら、ヒト造血幹細胞に対するレンチウイルスの感染効率が低かったために、その後の研究計画を遂行することが出来なかった。そこで今後の展望としては、まず HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法を再検討し、NOK/B51Tg マウスにおける HLA-B51 陽性 T 細胞の再構築と HIV-1 特異的 CTL の誘導を行う。さらに NOK/B51Tg マウスにおける逃避変異型 HIV-1 の誘導とその蓄積による慢性感染機序の解析を行う。これらの研究成果から、これまで解析が困難であった HIV-1 に対する生体内免疫反応を解明し、新規エイズ治療法の開発に貢献する。

6. 結論

HIV-1 に対するヒト免疫反応をモデルマウスにおいて解析するために、HLA をマッチングさせた NOK/B51Tg マウスの作製と HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立を行った。しかしながら、HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法が不十分であったために、HIV-1 に対するヒト免疫反応を解析することが出来なかった。再度、HLA-B51 陽性ヒト造血幹細胞の樹立法の検討が必要である。

エイズ発症遅延と関連する HLA-B*51 に提示される TAFTIPSI エピトープを認識する CTL に発現する TCR 遺伝子は、6 人の HLA-B*5101 陽性 HIV-1 感染者から樹立された CTL クローン間において、非常に高い類似性を示すことを明らかにした。この研究成果は、ヒト免疫構築マウスにおいて逃避変異型 HIV-1 の誘導に非常に有用であると考えられる。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究発表

研究代表者

齋藤益満

- 1) YongHong Zhang, YanChun Peng, HuiPing Yan, Keyi Xu, **Masumichi Saito**, Hao Wu, XinYue Chen, Srinika Ranasinghe, Nozomi Kuse, Tim Powell, Yan Zhao, WeiHua Li, Xin Zhang, Xia Feng, Ning Li, Aleksandra Leligdowicz, XiaoNing Xu, Mina John, Masafumi Takiguchi, Andrew McMichael, Sarah Rowland-Jones, and Tao Dong: Multilayered Defense in HLA-B51-Associated HIV Viral Control, *Journal of Immunology*, 187(2), 684-691, 2011.
- 2) Jimmy D. Dikeakos, Katelyn M. Atkins, Laurel Thomas, Lori Emert-Sedlak, In-Ja L. Byeon, Jinwon Jung, Jinwoo Ahn, Matthew D. Wortmann, Ben Kukull, **Masumichi Saito**, Hirokazu Koizumi, Danielle M. Williamson, Masateru Hiyoshi, Eric Barklis, Masafumi Takiguchi, Shinya Suzu, Angela M. Gronenborn, Thomas E. Smithgall, and Gary Thomas. Small Molecule Inhibition of HIV-1-Induced MHC-I Downregulation Identifies a Temporally Regulated Switch in Nef Action, *Molecular Biology of the cell*, 21(9), p3279-3292, 2010.

研究分担者

佐藤義則

- 1) **Sato Y.**, Takata H., Kobayashi N., Nagata S., Nakagata N., Ueno T., Takiguchi M. Failure of effector function of human CD8⁺ T cells in NOD/SCID/JAK3^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells. *PLoS ONE*, 5; e13109, 2010.

学会発表

研究代表者

齋藤益満

なし

研究分担者

佐藤義則

- 1) Phenotypic analysis of reconstituted human T cells in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice.
SATO Yoshinori, TAKIGUCHI Masafumi
第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月 (口頭発表)
- 2) Elicitation of human effector CD8⁺ T cells in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice.
SATO Yoshinori, NAGATA Sayaka, TAKIGUCHI Masafumi
12th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto) 2011年10月 (ポスター発表)
- 3) Selection of HIV-1 mutants in HIV-1-infected HLA-B*51:01 transgenic humanized mice.
SATO Yoshinori, NAGATA Sayaka, TAKIGUCHI Masafumi
IUMS 2011-XV International Congress of Virology (Sapporo) 2011年9月 (ポスター発表)

