

を用いて作成しておく。検体の測定に用いる第VIII因子欠乏血漿も、添付の第VIII因子欠乏血漿950 μ LにpH調整試薬50 μ Lを加えたものを用いる。cで2時間のインキュベーションが終わった17本の検体について残存第VIII因子活性を速やかに各2回測定し、報告書に記載し返却する。

e. 第VIII因子インヒビター値の報告
指定の換算式により算出し、報告書に記載し返却する。

施設間差等の検証

サーベイランス結果から、各施設の標準測定法と研究班指定のTokyo変法を比較し、施設間差などの変動状態を検証する

4. インヒビターの発生要因の分析と発生機序の解明に関する研究(第4研究)

J-HIS1・J-HIS2に登録された患者を対象に遺伝子解析研究「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」を計画し、他施設からの検体の受け入れ体制の構築、国内3施設での共通な解析技術の統一をはかり遺伝子検査体制の基盤を強化した。

研究方法概略については以下の通りである。まず、事務局を通じて他施設の研究参加の意思確認を行い、各研究協力機関における倫理委員会での承認を得る。承認が得られ次第、事務局より各研究機関の責任医師のもとへ必要症例分の検査キットを送付する。研究責任医師は対象となる患者の同意取得と採血を行い、連結匿名化の上、国内3施設の内、決められた検査実施機関へ検体を速やかに送付する。検体を受領した3施設は、それぞれ決められた手順に従ってDNA抽出を行い、目的とする遺伝子の解析を行う。検査結果については、検査実施施設

から事務局を通じて各研究責任医師のもとへ返却し、責任医師より患者への報告説明を行う。

表1 検査実施機関と検査内容

検査実施機関	対象	検査内容
東京医科大学	東日本 全国	血友病A 免疫系遺伝子
奈良県立医科大学	西日本	血友病A
名古屋大学	全国	血友病B

5. 血友病におけるインヒビター発生機序の解明および治療法の確立に関する研究(第5研究)

1) 凝固波形によるin vitroでのバイパス製剤での凝血的効果の評価：最適惹起試薬の検討

血漿フィブリン生成過程の透過率変化から得た凝固波形の最大凝固速度(|Min1|)、最大凝固加速度(|Min2|)、凝固時間(CT)のパラメータを評価した。凝固惹起試薬は、エラグ酸(Elg法)、組織因子(TF法)、混合(Elg/TF法)を用いた。第VIII因子欠乏血漿(FVIII-def血漿)にrFVIIaやaPCCを添加した。モニタリングは、FVIII-def血漿パラメータの健常血漿との差異が明瞭、かつバイパス止血療法の効果判定が健常パラメータに基づいて可能と考え、(1) FVIII-def血漿/健常血漿で各パラメータの対健常血漿比、(2) 臨床的血中濃度のrFVIIa 25 nMとaPCC 1 U/ml添加時の同比を評価した。

2) インヒビター患者へのバイパス製剤投与時での凝血的効果の評価

インヒビター保有患者へのバイパス製剤による止血管理時にて、製剤投与(rFVIIa 90-100 ug/kgまたはaPCC 80-90 U/kg)の血漿検体を、従来の当科のモニタリングROTEMとともに、本法の混合法(TF/Elg)

にて凝固波形解析を行い、両者の比較検討も行った。

② 軽症血友病Aインヒビター解析

1) 患者FVIII (F8) 遺伝子解析

研究機関内の倫理委員会承認のもと同意を取得した患者より全血を採取し、そこから genomic DNA を抽出精製した。long PCR法またはmultiplex PCR法を用いてイントロン22及びイントロン1逆位の存在についてスクリーニングした後、F8の全26エクソン及び隣接領域についてDye terminator法によりダイレクトシーケンシングを施行した。

2) 患者血漿インヒビターIgG精製とエピトープ解析

患者血漿をProtein G Sepharoseによって患者インヒビターIgGを精製した。FVIIIフラグメントでSDS-PAGE/immunoblotによりエピトープを同定した。

3) インヒビターによる正常/患者血漿のFVIII不活化

インヒビターIgGを正常および患者血漿、および変異FVIIIに37°C2時間反応させ、残存FVIII活性を凝固一段法で測定した。

4) インヒビターIgG、変異FVIII蛋白の機能解析

i) すでに確立したmicrotiter well上で固相化von Willebrand因子およびリン脂質とFVIIIとの直接結合実験およびインヒビターIgGの抑制能をELISA法で評価した。

ii) FVIIIにおけるトロンビンおよびFXa活性化反応、およびインヒビターIgGの抑制能を凝固一段法で評価した。

③ ITI中のインヒビターIgG subclassの検討

固相化FVIIIに患者血漿を反応させ、標識各抗IgG subclass抗体にて測定した。

④ FVIIa/FX製剤によるFVIII活性化

新規バイパス製剤(FVIIa/FX: バイクロット)とFVIII/インヒビター共存下でのトロンビン生成能を評価した。微量FVIIa/FX製剤(1nM)のFVIII活性化作用を凝固一段法やトロンビンやFXa生成試験で評価した。さらに、FVIII活性化作用における各種FVIIIインヒビター(各種エピトープ)の影響を凝固一段法にて検討した。

(倫理面への配慮)

第1研究: インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究

1) インヒビター発生患者の実態調査 (J-JIS1)

2) 20歳未満血友病患者のインヒビター発生に関する後方視的調査研究 (J-HIS1/U20)

第2研究: 新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究については、ヘルシンキ宣言、疫学研究に関する倫理指針(平成19年11月1日 文部科学省・厚生労働省)に従って実施する。そのため、同指針に従い、奈良県立医科大学附属病院臨床研究審査委員会(IRB)の審査承認を得た(平成20年4月22日に承認済)。また、各施設での倫理委員会の承認が必要な場合は、各施設にて取得する。

第3研究: インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究については、基礎的研究であり患者由来の検体を用いないため個人情報が必要としない。また、先天性第VIII因子欠乏症患者血漿とインヒビター血漿は市販品を用いたので患者の個人情報は取り扱わなかった。

第4研究: 「第VIII因子、第IX因子、サイトカイン遺伝子異常に関する研究」

では、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従って実施する。そのため、同指針に従い、奈良県立医科大学附属病院 医の倫理審査委員会（IRB）の審査承認を得た（平成22年10月13日に承認済）。また、各施設での倫理委員会の承認が必要な場合は、各施設にて取得する。

第5研究：被験者の血液採取にあたり、informed consent を厳格に行い同意を得て、得られる個人情報については各種法令等遵守し、個人情報等保護に十分配慮し実験を行った。

C. 研究結果

1. インヒビター発生患者の実態ならびにインヒビター発生要因に関する後方視的調査研究（第1研究）

血友病 A 153 例中のインヒビター発生例は 41 例（26.8%）であったが、血漿由来製

剤と遺伝子組換え製剤の間で、インヒビター発生率に差はなかった。本研究結果を日本血栓止血学会誌並びに Hemophilia に投稿し掲載された (Shirahata A, Shima M, et al. Haemophilia An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. Haemophilia. ;17: 771.)。また、第 23 回国際血栓止血学会にて発表した (Shirahata A, Shima M, et al. An analysis of factors affecting the incidence of inhibitor formation in patients with congenital haemophilia in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 京都市 2011 年 7 月

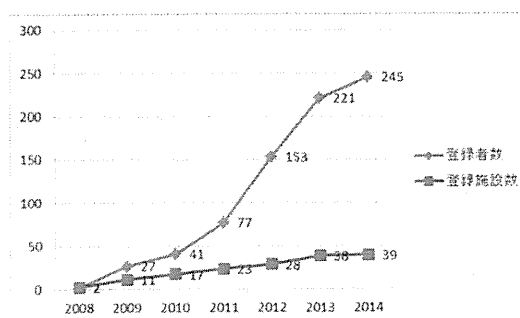
27 日)。

なお、J-HIS1 より得られた血液型とインヒビターの消長との関係について再調査を行いデータ数を増やしたところ、血液型の影響は消失した。

2. 新規血友病患者のデータベース構築によるコホート研究（第2研究）

平成 23 年度からは、5 月に新規血友病患者数を J-HIS 参加施設で調査し、症例登録予定数を確認するとともに、追跡調査を 1 年に 1 回に変更し、各施設での負担が少ない方法に変更した。

平成 24 年度からは、遺伝子解析研究が全国的にスタートした影響もあり、飛躍的に症例数が増加した。



また、平成 25 年度には、実施計画書を改訂し、インヒビター発生後に施設を受診し登録に至った症例か否かの把握、兄弟例の把握ができるように変更した。

平成 26 年 10 月 10 日現在の登録状況並びに平成 26 年 7 月末までの追跡結果は以下のとおりである。

登録症例数：245 名

登録施設数：39 施設

表 2【登録・追跡状況】

病型	血友病 A	213 (86.9%)
	血友病 B	32 (13.1%)
インヒビター発生	血友病 A 内、Inh 発生後に受診した症例を除く	38
	血友病 B	2 (6.2%)

	内、Inh 発症後に受診した症例を除く 2
最終追跡年	2014年 201 (82.0%) 2013年 19 (7.8%) 2012年 12 (4.9%) 2011年 1 (0.4%) 2010年 2 (0.8%) 追跡未実施 10 (4.1%)
通院状況	通院中 227 (96.6%) 転院 7 (3.0%) 中止 1 (0.4%) 中止理由：治験参加のため

表 3【患者背景】中央値[最小値-最大値]

性別	男 243 (99.2%) 女 2 (0.82%)
診断時年齢	0歳7ヶ月 [0歳0ヶ月-75歳9ヶ月]
診断年	2007年 22 (9.0%) 2008年 39 (15.9%) 2009年 20 (8.2%) 2010年 33 (13.5%) 2011年 48 (19.6%) 2012年 57 (23.3%) 2013年 19 (7.8%) 2014年 7 (2.9%)
重症度	重症 172 (70.2%) 中等症 41 (16.7%) 軽症 32 (13.1%)
診断の契機	家族歴 70 (28.6%) 出血 169 (68.9%) その他 4 (1.6%) 未記入 2 (0.8%)
家族歴	なし 133 (54.3%) あり 104 (42.4%) →内 8名にインヒビターの家族歴あり 不明 8 (3.3%)
兄弟例	16組 内双胎 3例

表 4【治療状況】

治療法*	未治療 13 (5.6%) 定期補充 144 (61.8%) 出血時のみ 76 (32.6%)
カテーテルの挿入*	なし 216 (91.9%) あり 19 (8.1%)
在宅注射の実施	なし 119 (50.6%) あり 116 (49.4%)

*インヒビター発症例については、インヒビター発生前の事象

表 5【濃厚治療】

DangerEvent*	なし 160 (68.1%) あり 75 (31.9%)
重篤出血*	なし 185 (78.7%) あり 50 (21.3%)
頭蓋内出血*	なし 210 (89.4%)

	あり 25 (10.6%)
上記以外の重篤出血*	なし 197 (83.8%) あり 38 (16.2%)
手術・観血的処置*	なし 222 (94.5%) あり 13 (5.5%)

*インヒビター発症例については、インヒビター発生前の事象

表 6【初回投与について】中央値[最小値-最大値] / 0内はパーセント

初回投与年齢	0歳10か月 [0歳0ヶ月-78歳5ヶ月]
初回投与量	250 [90-2500]
体重当りの初回投与量	34.5 [10-192]
初回使用製剤	アドベイト 120 (55.3%) コージネットFS ^バ イセット 63 (29.0%) クロスエイトM 2 (0.9%) コンファクトF 6 (2.8%) ノバクトM 9 (4.1%) ベネフィクス 14 (6.5%) クリスマシンM 1 (0.5%)

表 7【初回投与の目的】

初回投与の目的	合計(%)
予備的補充	11(5.1)
定期補充	17(7.8)
手術・観血的処置出血	8(3.7)
All_その他	181(83.4)
Ope	7(4.0)
けが(すり傷、切り傷)	1(0.6)
口の中(歯肉以外)	26(14.7)
右かかと	1(0.6)
右大腿(前)	2(1.1)
右肘	1(0.6)
右肩	1(0.6)
右腕	1(0.6)
右膝	8(4.5)
右臀部	2(1.1)
右足首	5(2.8)
大腿(前)	1(0.6)
左下腿	3(1.7)
左大腿(前)	3(1.7)
左肘	1(0.6)
左肩	2(1.1)
左腕	3(1.7)
左膝	12(6.8)
指関節	1(0.6)
採血部位	15(8.5)
歯肉	2(1.1)
消化管出血	6(3.4)
皮下血腫(それ以外)	22(12.4)
皮下血腫(首から上)	3(1.7)

筋肉内出血_その他	1(0.6)
関節内出血_その他	2(1.1)
頭蓋内出血	17(9.6)
頭血腫	3(1.7)
頭部の皮下血腫	20(11.3)
鼻血	3(1.7)

合計	177(100.0)

表 8 【インヒビター】中央値[最小値-最大値] / () 内はパーセント

発生年齢	1歳2ヶ月	[0歳5ヶ月-4歳2ヶ月]
総投与日数	13	[4-48]
総投与量	4550	[1000-25400]
診断時インヒビター値	2.46	[0※-47]
最大値	5.6	[0※-1000]
タイプ	High	26 (54.2%)
	Low	22 (45.8%)
出血時治療	出血なし	4 (10.0%)
	バイパス製剤	21 (52.5%)
	中和療法	10 (25.0%)
	中和+バイパス	5 (12.5%)
インヒビター治療	ITI 実施	34 (70.8%)
	未治療	14 (29.2%)
消失状況	消失	28 (58.3%)
	未消失	20 (41.7%)
消失理由	ITI の成功	18 (64.3%)
	自然消失	8 (28.6%)
	その他	1 (3.6%)

※診断時インヒビター値、最大値 0 の症例は、その他臨床症状等からインヒビター発生と診断されたため

今回、解析対象を 25ED 到達あるいはインヒビターが発生した重症血友病 A 患者に限定し、現時点で解析可能な 110 例を抽出して、(1) 患者側の因子、(2) 血友病治療に関する因子に分けてインヒビター発生のリスク要因を予備的に検討した。結果は以下のとおりである。

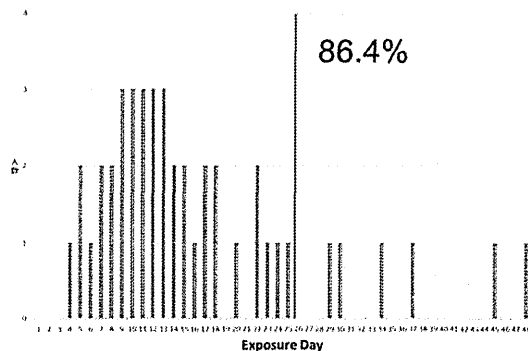


表 9 【発生要因解析-患者背景①】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P値
血液型	A	27	13	0.73
	B	7	3	
	O	16	11	
	AB	4	4	
診断の契機	家族歴	23	11	0.98
	出血	61	32	
	その他	2	1	
診断時の年齢 (日)		217.7	209.1	0.85
血友病の家族歴	なし	57	22	0.11
	あり	29	22	
インヒビターの家族歴	なし	73	36	0.37
	あり	3	4	
分娩様式	経膣	60	34	0.62
	帝王切	24	10	
F8遺伝子型	High Risk*	33	23	0.83
	Low Risk**	21	12	
	未解析	32	10	

*: large deletions, non-sense mutations, intron 1 and 22 inversions

** : small deletions and insertions, missense mutations, and splice-site mutations

表 10 【発生要因解析-患者背景②】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P値
在胎週数	(週)	38.43	38.33	0.79
重篤疾患の合併*	なし	80	38	0.25
	あり	5	6	
栄養法	母乳	37	20	0.81
	人工乳	6	4	
	混合	40	18	
家族のアレルギー	なし	60	30	0.91
	あり	19	9	
患者のアレルギー	なし	67	38	0.51
	あり	19	7	

表 11 【発生要因解析-患者背景③】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P値	
Danger event	なし	56	28	0.89	
	あり	30	17		
重篤出血	なし	67	32	0.52	
	あり	19	13		
	頭蓋内出血	なし	76	36	0.30
		あり	10	9	
上記以外の重篤出血	なし	76	41	0.85	
	あり	10	4		
手術・処置*	なし	67	38	0.51	
	あり	19	7		

表 12 【発生要因解析-患者背景④】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P値
感染症発生の有無 ¹⁾	なし	72	42	0.20
	あり	14	3	
25EDまでに感染症発生日と輸注日が同日 ¹⁾	なし	80	44	0.46
	あり	6	1	
感染症発生日と輸注日が同日	なし	77	43	0.40
	あり	9	2	
ワクチン接種の有無 ¹⁾²⁾	なし	14	12	0.17
	あり	67	28	
25EDまでにワクチンと輸注を同日実施 ¹⁾²⁾	なし	53	33	0.08
	あり	28	7	
ワクチンと輸注を同日実施 ²⁾	なし	38	32	<0.01
	あり	43	8	

表 13 【発生要因解析-治療に関する因子①】

		未発生 (n=86)	発生 (n=45)	P値
初回投与時の日齢	(日)	333	312	0.63
初回投与日の投与量	(U/kg)	43.5	46.0	0.68
初回投与の目的	定期補充	9	4	0.54
	出血	73	35	
	手術・観血的処置	2	2	
	予備的補充	2	3	
濃厚な治療*	なし	63	30	0.56
	あり	23	15	
治療法**	出血時・予備的定期補充	1	26	<0.001
	定期補充	84	19	
カテーテル挿入	なし	71	43	0.07
	あり	15	2	
カテーテル取り出し	なし	81	45	0.24
	あり	5	0	

*: 5 日以上治療を連続する場合を濃厚な治療とした。

** : 定期補充を開始した場合は定期補充とし、それ以外は出血時・予備的とした。

最近、血友病治療は出血時のオンデマンド治療から定期補充療法へと大きな変化がみられている。今回、最近の本邦における新規血友病患者の診断後早期の実態を明らかにする。平成 20 年度開始の新規に診断された血友病患者に関する前方視的患者登録システム (J-HIS2) に登録され、診断後 1 年以上の血友病 A (HA) 202 例 (重症 : S 149、中等症 : Mo 32、軽症 : M 21)、血友病 B (HB) 30 例 (S 16、Mo 9、M 5) を対象に、診断後早期の血友病患者の実態を解析した。

表 14 【診断後早期の実態-診断年齢】

		mild		moderate		severe			
n	26	41		165					
Positive family history	12	0.38	(0.08-2.42)	20	0.54	(0.08-1.1)	68	0.17	(0.0-0.65)
Negative family history	12	4.46	(2.12-7.23)	21	0.75	(0.56-1.92)	92	0.58	(0.42-0.92)
Un-known	2	23.85	(12.17-33.52)				5	0.58	(0.50-1.00)

Median (25-75percentiles)

表 15 【診断後早期の実態-凝固因子製剤の投与を要した初回出血年齢および初回関節出血年齢】

		mild		moderate		severe			
n	26	41		165					
Age at first bleed needed to treat	14	3.11	(2.31-7.68)	36	1.09	(0.68-2.25)	146	0.85	(0.6-1.2)
Age at first joint bleed	7	3.55	(3.13-6.38)	20	1.81	(0.73-2.96)	76	1.42	(1.02-2.07)

Median (25-75percentiles)

表 16 【診断後早期の実態-初回の出血部位】

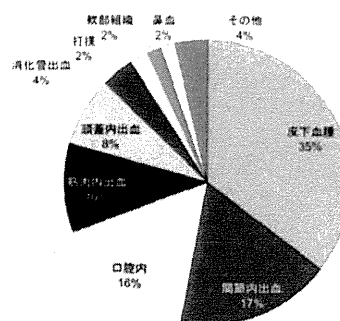


表 17 【診断後早期の実態・初回関節出血の部位】

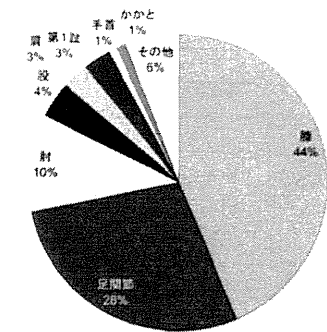


表 18 【診断後早期の実態・診断後 1 年間の出来事】

	全体(223)		重症(160)		中等症(40)		軽症(23)	
凝固因子製剤の投与	184	82.5%	145	90.6%	31	77.5%	8	34.8%
定期補充の開始	82	36.8%	75	46.9%	6	15.0%	1	4.3%
家庭治療の開始	26	11.7%	25	15.6%	1	2.5%	0	0%
CVAD挿入	29	12.9%	29	17.9%	0	0%	0	0%
頭蓋内出血	21	9.4%	20	12.5%	1	2.5%	0	0%
重篤出血	17	7.6%	11	6.9%	5	12.5%	1	4.3%
インヒビター発生	34	15.3%	33	20.6%	1	2.5%	0	0%

表 19 【診断後早期の実態・診断後 1 年間の出血回数】

血友病 A

	N	総出血回数	関節内出血	筋肉内出血	頭蓋内出血	それ以外
全体	193	3.1±3.6	0.6	0.2	0.1	2.1
重症	144	3.4±3.5	0.6	0.3	0.1	2.3
中等症	31	2.8±4.0	0.7	0.2	0.0	1.9
軽症	18	0.6±1.0	0.2	0.0	0.0	0.4

血友病 B

	N	総出血回数	関節内出血	筋肉内出血	頭蓋内出血	それ以外
全体	30	2.5±3.9	0.4	0.2	0.0	1.6
重症	16	3.6±4.8	0.7	0.3	0.1	2.4
中等症	9	2.1±2.3	0.2	0	0	1.1
軽症	5	0	0	0	0	0

3. インヒビターの検出・診断の標準化に関する研究 (第3研究)

(1) Tokyo 変法の血漿 pH への影響

1/20 量の pH7.4 の 2N イミダゾール緩衝液または精製水を NPP に添加し、混合後、37℃2 時間後の両者の pH は、精製水では pH8.0 以上を示したが、緩衝液では pH の維持が可能であった。(図 4)

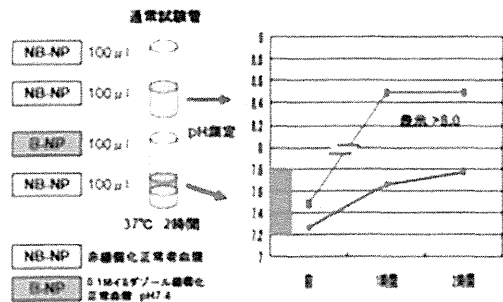


図 4 37℃2 時間加温後の pH の変化

(2) Tokyo 変法の第 VIII 因子活性への影響

同様の方法により、第 VIII 因子活性の保存状態を検討したところ、精製水では 37℃2 時間の加温により、残存活性が約 80% となり、ベセスダ単位にして約 0.31BU 相当の偽陽性反応を示した。一方、1/20 量の pH7.4 の 2N イミダゾール緩衝液添加では、残存活性がおおむね 100% 保たれていた。

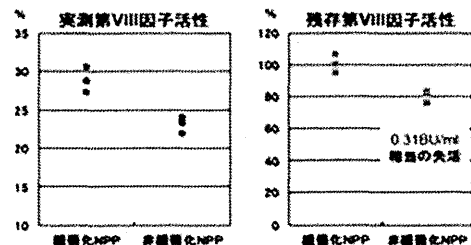


図 5 37℃2 時間加温後の第 VIII 因子活性の変化

(3) インヒビター力価への希釈液の影響

3 種類を 2 次希釈液として、インヒビターの希釈の影響を検討したところ、第 VIII 因子欠乏血書により希釈した場合の

直線性が最も優れていた。これはナイメーゲン変法による推奨法と一致した結果となった。

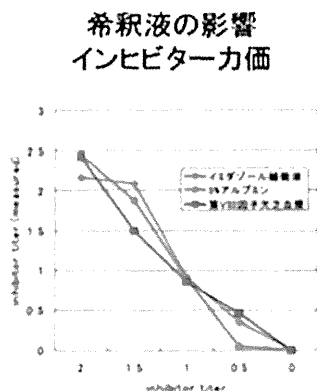


図6 インヒビター力価への希釈液の影響

(4)Tokyo 変法を用いた再現性の検討

第VIII因子欠乏血漿で希釈した4濃度の標準血漿を用いて、インヒビター力価(BU)としての同時再現性を検討した。各濃度の同時再現性はCV%として6.5~24.9%を示し、1.5BU付近の再現性が最も良い結果を示した。

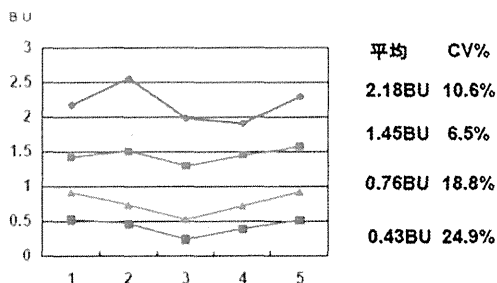


図7 同時再現性

同時再現性と同様に第VIII因子欠乏血漿で希釈した4濃度の標準血漿を用いて、インヒビター力価(BU)としての日差再現性を検討した。各濃度の再現性は、CV%として7.0%~48.7%を示し、1.5BU付近では7.0%を得たが、0.5BU付近の低値域では48.7%を示しており、良好な信頼性を保つことが難しいことが確認できた。日差再現性においても1.5BU付近の

再現性が最も良い結果を示した。

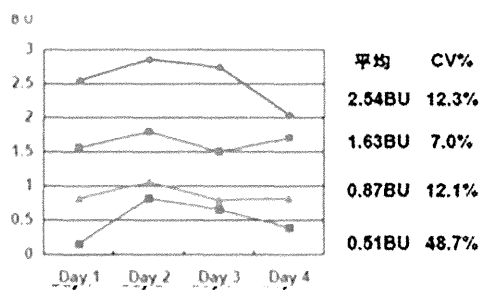


図8 日差再現性

(5)第VIII因子活性とインヒビター力価のサーベイランス

測定手順マニュアル(詳細な規定と手順書)を作成し、検査室における実用性の検討を加えた。検体配布と調査は来年度に実施を予定している。

4. インヒビターの発生要因の分析と発生機序の解明に関する研究(第4研究)

61施設 351例の研究対象の内、遺伝子検査を実施したのは222例(血友病A193例、血友病B29例)であった(表9 - 表12)。

血友病Aに関しては、過去に一度でもインヒビターの発生がみられたJHIS-1対象群では、いわゆるnull変異とされるintron22逆位、欠失、ナンセンス変異の占める割合が、その他の変異よりも高率(84%)との結果であった。一方、前方視的研究であるJHIS-2の対象群については、治療期間が25EDに満たない症例を含んでいること、症例絶対数が少ないことの影響は除外されないものの、現在のところ、null変異の有症例においてインヒビター発生率が高いという結果であった。血友病Bに関しては、表11、12に示す通りであった。なお、サイトカイン遺伝子についてはさらに症例が集積した後で一期的に実施する予定である。

表 9 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation	%	
Inversion	21	41.2
Large deletion	7	13.7
Small deletion	10	19.6
Nonsense mutation	4	7.8
Splicing variants	1	2.0
Missense mutation	7	13.7
Unknown	1	2.0
Total	51	100

表 10 血友病 A 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation	Inh+(%)	
Inversion	52*	20 (39)
Large deletion	1	1 (100)
Small deletion/insertion	20	6 (30)
Nonsense mutation	17	6 (35)
Splicing variants	9	4 (44)
Missense mutation	42*	2 (5)
Total	141	39

(*25ED に満たない症例を含む)

表 11 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-1)

Mutation	%	
Nonsense mutation	4	57
Large deletion	1	14
Small deletion	2	29
Total	7	100

表 12 血友病 B 遺伝子解析結果(JHIS-2)

Mutation	Inh+	
Large deletion	2	1
Splicing variants	8	
Insertion	1	1
Missense mutation	9	
Promotor mutation	2	
Total	22	2

(*25ED に満たない症例を含む)

「サイトカイン遺伝子異常に関する研究」は、表に示した TNF α 、IL-10、CTLA-4 のサイトカイン遺伝子の 10 SNPs について、J-HIS1 の 40 名と J-HIS2 の 126 名の計 166 名を解析した。

表 13 解析対象とした 3 サイトカイン遺伝子の 10SNPs

TNF α	G>A -308	rs1800629
	G>A -238	rs361525
	C>T -827	rs1799724
	A>G 670	rs3093662
IL-10	C>T -819	rs1800871
	C>A -592	rs1800872
	A>G -	rs1800896
	1082	
CTLA-4	G>A 49	rs231775
	C>T -318	rs5742909
	A>G CT60	rs3087243

インヒビターと非インヒビター群は、①インヒビター群が J-HIS1 の 40 名、J-HIS2 で 25ED に満たずにインヒビター発生が認められた 21 名の計 61 名 (内訳 High responder 40 名、Low responder 20 名、力価不明 1 名)、②非インヒビター群は J-HIS2 の 25ED までにインヒビターを発生しなかった 105 名の、2 つのグループに分類し、TaqMan[®] SNP Genotyping を実施した。

これまでの解析から、TNF α の -308 の A allele とインヒビター発生が関連する可能性が見出された。それ以外の 9 SNPs とインヒビター関連性については、解析結果からは不明であった。

表 14 インヒビター群と非インヒビター群の TNF α G>A-308 遺伝子頻度

TNF α	Inhibitor		Non-Inhibitor		P	O R
G>A-308	n	frequency	n	frequency		
G / G	58	0.95	104	0.99	0.10820	0.1859
G / A	3	0.05	1	0.01	0.10820	5.3793
A / A	0	0	0	0	-	-
Allele frequency						
G	119	0.97	209	0.99	0.11037	0.1898
A	3	0.02	1	0.01	0.11037	5.2689

5. 血友病におけるインヒビター発生機序の解明および治療法の確立に関する研究 (第5研究)

① インヒビター患者のバイパス製剤の止血モニタリング

1) 凝固波形による in vitro でのバイパス製剤での凝血的効果の評価：最適惹起試薬の検討：Elg 法は CT 比 3.4、|Min1| 比 0.16、|Min2| 比 0.13 で健常との差異が明瞭。TF 法は CT 比 1.38、|Min1| 比 1.01、|Min2| 比 1.47 と健常との差異に乏しく、Elg/TF 法は CT 比 1.45、|Min1| 比 0.45、|Min2| 比 0.33 と、Elg 法と TF 法の間を示した。rFVIIa 添加にて Elg、TF、Elg/TF 法で CT 比は 2.46、0.78、0.99、|Min1| 比 0.21、1.97、0.75、|Min2| 比 0.19、3.92、0.75 であり、Elg/TF 法で比は 1.0 に極めて近かった。aPCC 添加では CT 比 1.11、0.53、0.68、|Min1| 比 0.28、2.48、0.95、|Min2|

比 0.34、5.53、1.13 であった。aPCC 2 U/ml 添加では過凝固状態を示した。対健常の明瞭な差異は Elg 法と Elg/TF 法で得られた。以上から凝固波形解析によるバイパス止血モニタリングは Elg/TF 法が極めて有用であった。

2) インヒビター患者へのバイパス製剤投与時での凝血的効果の評価：バイパス製剤投与後の Elg/TF 法による凝固波形解析は、ROTEM の効果と乖離した 1 例を除き、正常血漿に類似したパラメータを示した。一方、临床上止血不良であるも、ROTEM で効果ありとみなされた 1 例は、Elg/TF 法では、製剤投与でのパラメータ改善は乏しかったことから、ROTEM より正確なモニタリングが可能であった。2 症例を周術期のバイパス製剤での止血モニタリングを Elg/TF 法による本法で行い、凝固波形パラメータは正常血漿類似する範囲内で推移し、临床上効果を反映することができた。

② 軽症血友病 A インヒビター解析

1) 患者インヒビター IgG は FVIII 不活化は type 2 パターンを示した。P1809L インヒビターは正常 FVIII には濃度依存的に不活化反応を示したが、患者 FVIII には不活化を示さなかった。本インヒビターは変異部位と離れた C2 エピトープを認識していた。

2) P1809L インヒビターは FVIII における von Willebrand 因子やリン脂質結合に全く影響なかったが、トロンビンや FXa による FVIII 活性化を濃度依存的に抑制した。一方、P1809L 変異蛋白は C2 ドメインに結合部位を有する von Willebrand 因子やリン脂質への結合能は著明に低下していた。また C2 モノクローナル抗体への結合能も低下していた。以上、この変異 FVIII は C2 ドメインの抗原性 (構造変異) 変化を来たし、C2 エピトープ同種抗体を出現させた。

③ ITI 中のインヒビター-IgG subclass の検討

ITI 成功 3 例、不成功 1 例、再燃 1 例を検討したところ、ITI 初期は IgG1 が上昇し、その後著明に低下を示した。しかし、インヒビターの変動に伴い IgG4 が推移した。また、再燃時は IgG4 が上昇した。IgG1 と IgG4 の推移が ITI の効果を反映している可能性が考えられた。

④ FVIIa/FX による FVIII 活性化

FVIIa/FX (バイクロット) はインヒビター血漿でのトロンビン生成を FVIII 存在下で相加的に増加させた。これは本製剤の FVIII 活性化が機序として示唆された。FVIII (10 nM) は FVIIa/FX 製剤 (1nM)/TF(1nM) 添加 1 分以内に FVIII 活性は約 10 倍に上昇し、約 10 分まで頂値 50% まで低下するもその後活性化は持続した。FVIIa 阻害ペプチド(E76)は FVIIa/FX/TF の FVIII 活性化を抑制したことから、上述の活性化持続は FXa による活性化が推測された。以上から、FVIIa/FX の FVIIa が FVIII を活性化させ、引き続き FX 活性化で止血効果を増強させることがわかった。本製剤惹起 FVIII 活性化によるインヒビター影響について、FVIII インヒビターを FVIII と反応させ、TF 存在下での FVIII 活性化を評価した。インヒビターエピトープに関係なく、前述と同様に反応 1 分以内に FVIII 活性は上昇した。

D. 考察

1. インヒビター発生患者の実体とインヒビター発生要因

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

くされておらず今後データを整理して投稿する予定である。

2. 新規血友病患者のデータベース構築

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

3. インヒビターの検出・診断の標準化

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

のイミダゾールを加えて0.1Nとし1NのHClでpHを7.4に整える手法を求めている。しかし、一般の検査室で少量の正常プール血漿を取り扱う場合にはNijmegen変法では操作が難しいことから、Nijmegen変法の普及はなかなか進まないのが現状であると考えられる。そこで、固形イミダゾールの代わりに、2Nの緩衝化イミダゾール液を用いて、Tokyo変法として緩衝化NPPの作成の簡便化を図った。本法では1995年にB. Verbruggenらが提唱したナイメーゲン変法の報告ほど反応液のpHを安定化できなかったが、同論文の示す第VIII因子活性が安定なpH範囲を維持できた。したがって、本法によってもpHを概ね予定した範囲に保つことができたことにより、Nijmegen変法と同等の第VIII因子活性維持効果が得られることを確認できた。

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

性に換算するため、同時再現性のCV%で6.5～24.9%、日差再現性のCV%で7.0～48.7%を示した。

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

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

各検査室の測定手順には細部に差違があり、詳細な手順の統一が必要であることから、施設間差の低減にはより詳細な手順書の作成が必要と考えられた。

表15 ベセスダ単位への変換に伴う誤差の変化例(残存第VIII因子の10分の1の変動が生む意味の違い)

BU	Res FVIII 10% 差	Log	BU	BU 差	BU差 %
2.0	27.5%	1.439	1.862	0.14	6.9
	25.0%	1.398	2.000		
1.5	35.0%	1.544	1.515	0.15	10.0

	31.5%	1.498	1.667		
1.0	50.0%	1.699	1.000	0.15	15.2
	45.0%	1.653	1.152		
0.5	75.0%	1.875	0.415	0.15	36.6
	67.5%	1.829	0.567		

4. インヒビター発生要因と遺伝子学的検査

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

5. 血友病におけるインヒビター発生機序の解明および治療法の確立に関する研究

① インヒビター患者のバイパス製剤の止血モニタリング

血友病Aインヒビターの止血管理に難渋することが多い。これは、本製剤の止血効果の不安定性や使用時の止血モニタリング法が確立されていないことが挙げられる。今回、フィブリン形成過程をモニタリングする凝固波形解析による確立を試み、E1g/TFをtriggerとした本法により汎用性かつ簡便な止血モニタリングを初めて確立した。安全に周術期での止血管理を可能としたことは、今後のインヒビター患者の止血管理を容易に施行させることが期待される。

② 軽症血友病Aインヒビター解析

新規FVIII遺伝子変異(Pro1809Leu)を有したインヒビター発現の軽症血友病Aは、そのインヒビターは変異部位(A3ドメイン)とは離れたC2ドメインを認識して自己FVIIIと非自己FVIIIを区別する抗体であることがわかった。この変異Pro1809LのFVIIIはC2ドメインの抗原性(構造変異)変化を生じることが、C2エピトープ同種抗体を出現させていることがわかった。軽症インヒビターの報告は散見されるが、その機序について解析された報告はない。興味あることに、軽症インヒビターは本症例のように自己FVIIIと非自己FVIIIを区別するものもあれば、自己FVIIIと非自己FVIIIを区別しないインヒビターも存在するとされる。その機序の違いは未だ不明である。

③ ITI中のインヒビターIgG subclassの検討

血友病インヒビターを消失させる治療としてITI療法が普及してきており、~70%の成功例が言われているが、ITIの成否に関連する免疫制御機序は不明である。今回の我々の検討では、ITI時のIgG subclassは以下の特徴的な推移を示した。ITI初期はIgG1が上昇し、その後著明に低下を示した。しかし、インヒビターの変動に伴いIgG4が推移した。また、再燃時はIgG4が上昇した。IgG1とIgG4の推移がITIの効果を反映している可能性が考えられた。このようにIgG subclassを評価する事は、ITIの成功予測、また継続や中断の判断の項目として指標になるかもしれない。

④ FVIIa/FX製剤によるFVIII活性化

我々はFVIIIを中心とした代替凝固機序の新たな概念を提唱してきた。特にFVIII活性化が外因系凝固機序(FVIIa)により凝固初期相で駆動している事を報告してきた。

今回、さらに FVIIa は FVIII を極初期に活性化し、それに続き FVIIa により活性化された FXa が FVIII の活性化をさらに持続させ促進させることが明らかになった。この機序はインヒビター存在下でもまたエピソードに関係なく、FVIII を活性化させる事は、FVIIa/FX と FVIII 併用という血友病 A インヒビターの新たな止血療法として有用であろう。

E. 結論

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

今回、インヒビター患者のバイパス製剤の止血モニタリングとして、E1g/TF を trigger とした凝固波形解析により汎用性かつ簡便のある assay を確立した。このことは、今後のインヒビター患者の止血管理を容易に施行させることが多いに期待される。血友病 A インヒビターの発症機序は未だ不明な点が多い。今回、Pro1809Leu 変異を有する軽症血友病 A 患者のインヒビター出現機序を解明し、

FVIII 構造を考えていく点で極めて重要であった。インヒビター消失目的の ITI 機序はよく理解されていないが、今回、ITI 中の免疫学的側面から検討し、ITI の成功、不成功の評価・予測について、IgG subclass の変動が指標になりうる可能性を示した。バイパス製剤 (FVIIa/FX 製剤) の作用機序の解明や FVIII 併用という血友病 A インヒビターの新たな止血療法として新たな観点から治療戦略を組み立てていく事が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Okuda M, Shima M. Optimization of the automated, CS-2000i™ method for measuring low levels of von Willebrand factor ristocetin cofactor activity (VWF:RCo). *Int J Hematol*. 2014 [Epub ahead of print]
- 2) Chitlur M, Rivard GE, Lillicrap D, Mann K, Shima M, Young G; Factor VIII, Factor IX, and Rare Coagulation Disorders Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendations for performing thromboelastography/thromboelastometry in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(1); 103-6
- 3) Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica*; 2014;99(10):e211-3
- 4) Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S,

- Sugimoto M, Hotta A. Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PLoS One*; 9(8): e104957
- 5) Shima M, Hermans C, de Moerloose P. Novel products for haemostasis. *Haemophilia*; 20(4): 29-35
- 6) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. The anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents spontaneous joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 2014; 124(20):3165-3171
- 7) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y, Haraya K, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost*. 2014; 12(2): 206-213.
- 8) Yada K, Nogami K, Kawamura T, Minami H, Shima M. The first case of int1h-related inversion in Japanese haemophilia A patients. *Haemophilia*. 2014; Aug 25. doi: 10.1111/hae.12509.
- 9) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(9): 1503-1512.
- 10) Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (aPCC) moderates the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. *International Journal of Hematology*. 2014; 99(5): 577-587.
- 11) Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood*. 2014; 123(15): 2420-2428.
- 12) Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Optimal monitoring of bypass therapy in hemophilia A patients with inhibitors by the use of clot waveform analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014; 12(3): 355-362
- 15) Tatsumi K, Sugimoto M, Lillicrap D, Shima M, Ohashi K, Okano T, Matsui H. A Novel Cell-Sheet Technology That Achieves Durable Factor VIII Delivery in a Mouse Model of Hemophilia A. *PLoS One*. 2013 8(12):e83280.
- 16) Haku J, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Optimal monitoring of bypass-therapy in hemophilia A patients with inhibitor using clot waveform analysis. *J Thromb Haemost*. 2013; 12(3):355-62
- 17) Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol*. 2013; 86(11): 1990-7
- 18) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the

- interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2013 110(4):761-8.
- 19) Shima M. [Hemophilia world] *Rinsho Ketsueki.* 2013 54(8):736-43.
- 20) Yada K, Nogami K, Shima M. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 2013 163(1):104-11.
- 21) Sakurai Y, Kasuda S, Tatsumi K, Takeda T, Kato J, Kubo A, Shima M. Repression of Factor VIII Inhibitor Development with Apoptotic Factor VIII-expressing Embryonic Stem Cells. *Hematol Rep.* 2013 5(2):30-3.
- 22) Kajiwara M, Shima M., Yoshioka A. Two haemophilia patients with inhibitors who became ambulatory after physiotherapy under haemostatic cover with bypassing agents. *Haemophilia.* 2013 19(5):e301-4.
- 23) Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost.* 2013 11(7):1417-20.
- 24) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. *Thromb Haemost.* 2013 110(2):316-22.
- 25) Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M., Asada Y. Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. *Thromb Haemost.* 2013 110(1):62-75.
- 26) Oh J, Lim Y, Jang MJ, Huh JY, Shima M., Oh D. Characterization of anti-factor VIII antibody in a patient with acquired hemophilia A. *Blood Res.* 2013 48(1):58-62.
- 27) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness. *J Thromb Haemost.* 2013 11(5):902-10.
- 28) Shima M. [Hemophilia]. *Rinsho Ketsueki.* 2013 54(2):189-97.
- 29) Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, Shima M. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. *Thromb Haemost.* 2013 109(6):1007-15.
- 30) Shima M. Overview of current treatment for hemophilia: needs of tailor-made treatment. *Rinsho Ketsueki.* 53(10):1737-44. 2012
- 31) Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Kawabe Y, Shima M., Yoshioka A, Hattori K. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 18(10):1570-4. 2012

32) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Results of clot waveform analysis and thrombin generation test for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase I trial: 2nd report. *Haemophilia*. 19(2): 330-7. 2012

33) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia*. 4:81-8.2012

34) de Paula EV, Kavakli K, Mahlangu J, Ayob Y, Lentz SR, Morfini M, Nemes L, Šalek SZ, Shima M, Windyga J, Ehrenforth S, Chuansumrit A; 1804 (adept(TM)1) Investigators. Recombinant factor VIIa analog (vatreptacog alfa [activated]) for treatment of joint bleeds in hemophilia patients with inhibitors: a randomized controlled trial. *J Thromb Haemost*.10(1):81-9. 2012

35) Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T. Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a haemophilia A patient with high-titre inhibitor. *Haemophilia*. 18(3):e75-7. 2012

36) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb Haemost*.107(2):288-301. 2012

2. 学会発表

(2014年)

- 1) Shima M. Bi-specific antibodies as FVIII mimetics in Hemophilia. 60th Annual Meeting of the SSC; Milwaukee, USA 2014年6月23日
- 2) 嶋 緑倫. 小児における定期補充療法の進歩. 第8回岡山ヘモフィリア懇談会. 岡山市 2014年2月16日
- 3) 武藤 厚, 吉橋 一隆, 武田美奈子, 北沢 剛久, 添田 哲弘, 井川 智之, 三瓶全次郎, 倉持 太一, 坂本 昭久, 原谷 健太, 足立 建児, 川邊 良樹, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫, 服部 有宏 第VIII因子機能を代替する bispecific 抗体 ACE910 の血友病Aモデルにおける関節内出血の予防効果 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日
- 4) 嶋 緑倫, 内田 直樹, 三邊 武彦, 米山 洸一郎, 三輪 浩子, 深沢 直規, 河西 武彦, 小林 真一 第VIII因子補因子機能を代替する bispecific 抗体 ACE910 の健康成人での薬物動態及び薬力学的反応 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日
- 5) 矢田 弘史, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 MC710 はインヒビター存在下で第VIII因子を直接活性化し rFVIIa に比し相乗的に凝固機能を改善する 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日
- 6) 武山 雅博, 野上 恵嗣, 田口 真輝, 松本 智子, 嶋 緑倫 FXa による FVIII 活性化を阻害する抗第VIII因子 A2 ドメイン 単独認識自己抗体 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日
- 7) 武山 雅博, 田口 真輝, 松本 智子, 岡橋 望, 天野 逸人, 木村 弘, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 包括的凝固機能解析法を用いて凝固機能を評価し止血管理を行った後天性血友病Aの1例 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日
- 8) 西山 敦子, 野上 恵嗣, 松本 智子,

荻原 建一, 嶋 緑倫 著明な線溶亢進と線維素自然析出を呈した後天性プラスミン血症の1例 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日

9) 石原 卓, 竹下 泰史, 松本 智子, 矢田 弘史, 志田 泰明, 古川 晶子, 南博明, 武山 雅博, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫 小児がんにおける Thrombin / Plasmin generation と造血幹細胞移植の合併症との関連性について第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月30日

10) 志田 泰明, David Lillicrap, 嶋 緑倫 フォンヴィルブランド因子および GPVI のコラーゲン結合反応が止血に及ぼす影響の包括的解析 第36回日本血栓止血学会 大阪市 2014年5月31日

11) 嶋 緑倫. 血友病インヒビター治療の最前線. 第9回東北ヘモフィリアセミナー. 仙台市 2014年6月7日

12) 嶋 緑倫. 妊娠・分娩期の後天性血友病 A. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会. 横浜 2014年6月13日

13) 嶋 緑倫. 血友病の診療における最近のトピック. ノボエイトアドバイザーボード. 那覇市 2014年8月2日

14) 嶋 緑倫. 血友病治療剤の最新の動向について. 第20回北海道血友病研究会. 札幌市 2014年8月23日

15) 嶋 緑倫. 小児の出血性疾患に関するアプローチ. 第10回日本小児科医会障害研修セミナーin奈良. 奈良市 2014年10月5日

16) Shima M. New concepts in hemophilia therapy (bi-specific antibody mimicking VIII). The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis. Hanoi, Vietnam 2014年10月11日

17) 嶋 緑倫. New hemophilia treatment by bispecific antibody to factors IXa and X. 第76回日本血液学会. 大阪市 2014

年11月1日

18) Shida Y, Nogami K, Minami H, Yada K, Takeyama M, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. The impact of total-thrombus analysis system in the management of VWD with severe anemia. 第76回日本血液学会. 大阪市 2014年11月1日

19) Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Shida Y, Yada K, Kitazawa T, Hattori K, Shima M. Anti-factor IXa/X bispecific antibody improves the coagulation activities in acquired hemophilia. 第76回日本血液学会. 大阪市 2014年11月1日

20) 越智 聡史, 矢田 弘史, 志田 泰明, 武山 雅博, 野上 恵嗣, 松本 智子, 嶋 緑倫, 富和 清訓, 田中 康仁. 高用量中和療法による止血管理下で関節鏡視下滑膜切除術を施行し、免疫寛容療法に移行したインヒビター陽性重症血友病A患者の1例. 第102回近畿血液学地方会. 大阪市 2014年11月8日

21) 嶋 緑倫. 血友病定期補充療法の現状と課題. 関西血友病治療研究会. 大阪市 2014年11月15日

22) 嶋 緑倫. これからの血友病診療. 長野血友病フォーラム. 松本市 2014年11月15日

23) 嶋 緑倫. 血友病 B 治療の課題と展望 - 免疫応答とインヒビターに焦点をあてて -. 第56回日本小児血液・がん学会. 岡山市 2014年11月28日

24) Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, Fukuzawa N, Maisawa S, Yoneyama K, Nogami K. Safety and Prophylactic Efficacy Profiles of ACE910, a Humanized Bispecific Antibody Mimicking the FVIII Cofactor Function, in Japanese Hemophilia A Patients Both without and with FVIII Inhibitors:

First-in-Patient Phase 1 Study. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月8日

25) Minami H, Nogami K, Kitazawa T, Hattori K, Shima M. FVIII Heavy Chain Enhances Tenase Activity Induced By FVIIIa Mimicking Bispecific Antibody, ACE910. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月6日

26) Shida Y, Nogami K, Minami H, Yaoi H, Matsumoto T, Kitazawa T, Hattori K, Shima M. Distinct Localization of Coagulation Factor VIII, Von Willebrand Factor and Factor VIIIa-Mimetic Bispecific Antibody Contributing to Thrombus Formation Under Whole Blood Flow Conditions. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月6日

27) Kasuda S, Matsui H, Ono S, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Hatake K, Sugimoto M. Von Willebrand Factor-Dependent Inflammatory Responses in Mouse Septic Model By Cecal Ligation and Puncture. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月7日

28) Kamiya N, Yada K, Shima M, Nogami K. The Hemostatic Impairment in Mild Hemophilia A Possessing Arg593Cys Mutation Is Caused By the Attenuated Binding to Phospholipid. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月7日

29) Yada K, Nogami K, Matsumoto T,

Kitazawa T, Hattori K, Shima M. Activated Protein C-Catalyzed Factor Va Inactivation Predominantly Contributes to the Downregulation of Coagulation Rather Than Factor VIIIa Inactivation. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月8日

30) Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Factor VIII A2 Domain Contains a Binding Site for Factor X. 56th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition. San Francisco, 2014年12月8日

(2013年)

1) 松本 智子, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫
新規 Thrombin/plasmin generation assay
による凝固線溶能の評価 第4回 関西凝
固線溶研究会 京都市 2013年1月26日

2) 竹田 洋子, 金 一, 川口 千晴,
富和 清隆, 嶋 緑倫 Aicardi 症候群
の1例 第110回 日本小児科学会奈良地
方会 奈良市 2013年2月16日

3) 中川 智子, 榊原 崇文, 野上 恵嗣,
嶋 緑倫 てんかん発作が疑われる異常
感覚発作の1例 第29回 奈良小児てん
かん研究会 橿原市 2013年2月21日

4) 嶋 緑倫 血友病診療の実践と展望
第31回 青森小児血液・腫瘍研究会 弘
前市 2013年3月2日

5) 嶋 緑倫 血友病インヒビターマネ
ジメントの実践～免疫寛容療法導入療法
(ITI)と止血管理～ 第1回 Baxter Web
橿原市 2013年3月19日

6) 嶋 緑倫 児童虐待防止委員会につ
いて 第3回 奈良県臓器バンクセミナー
橿原市 2013年3月22日

7) 大塚 敬太, 山田 佳世, 竹下 泰史,
嶋 緑倫, 岡本 英之, 西 智, 武
田麻衣子, 榎本 泰典, 笠井 孝彦, 野々

村昭孝 副鼻腔原発 Burkitt lymphoma の 2 例 第 26 回 近畿小児科学会 大阪市 2013 年 3 月 24 日

8) 中川 智子, 榊原 崇文, 田村健太郎, 高野 将人, 笠井 孝彦, 田岡 俊昭, 吉岡誠一郎, 大林 千穂, 中瀬 裕之, 嶋 緑倫 器質性病変を伴った小児難治性てんかんの 2 例 第 26 回 近畿小児科学会 大阪市 2013 年 3 月 24 日

9) 中川 智子, 石川 智朗, 嶋 緑倫 Diamino-Diphenyl Sulfone(DDS)が有効であった難治性 Henoch-Schönlein 紫斑病の一例 第 26 回 近畿小児科学会 大阪市 2013 年 3 月 24 日

10) 嶋 緑倫 血友病治療の動向 第 2 回 WEB SEMINAR in Kansai 奈良市 2013 年 3 月 28 日

11) 嶋 緑倫 血友病治療製剤の最新情報 万葉友の会 特定非営利活動法人ネットワークと人権 樞原市 2013 年 3 月 30 日

12) 嶋 緑倫 病態解析の進歩と展望 コーネイト発売 20 周年記念 WEB カンファレンス 1 大阪市 2013 年 4 月 4 日

13) 嶋 緑倫 先天性凝固異常症の病態解析の進歩 第 116 回 日本小児科学会 広島市 2013 年 4 月 19 日

14) 嶋 緑倫 知っておきたい血友病診療のポイント 第 116 回 日本小児科学会 広島市 2013 年 4 月 19 日

15) 竹下 泰史, 山田 佳世, 南 博明, 森尾 友宏, 嶋 緑倫 自己応答性 T 細胞クローンと母親由来 T 細胞が同時に存在した Omenn 症候群の 1 例 広島市 2013 年 4 月 19 日

16) 中川 智子, 西屋 克己, 嶋 緑倫 肺結核との鑑別を要したマイコプラズマ肺炎合併潜在性結核症の 1 例 第 116 回 日本小児科学会 広島市 2013 年 4 月 21 日

17) 矢田 弘史, 石川 智朗, 高川 健, 阪井 利幸, 吉田 瑤子, 藤村 吉博, 嶋 緑倫 先行する消火器症状を認めず、原因

が特定し得なかった重症溶血性尿毒症症候群の 1 例 第 116 回 日本小児科学会 広島市 2013 年 4 月 21 日

18) 西屋 克己, 鈴木 康之, 嶋 緑倫 医学部学生が考える小児科医像からみた卒前小児科教育アウトカムの検討 第 116 回 日本小児科学会 2013 年 4 月 21 日

19) 西山 敦子, 萩原 健一, 榊原 崇文, 大野 耕策, 成田 綾, 難波 栄二, 足立 香織, 濱田 匡章, 金廣 裕道, 田中 一郎, 嶋 緑倫. 生後早期から肺病変を合併した Niemann-Pick 病 C1 型(NPC1)の 1 例. ニーマン・ピック病 C 型シンポジウム-診断と治療-. 大阪市 2013 年 5 月 18 日

20) 嶋 緑倫 後天性血友病の診断と治療 お茶の水後天性血友病セミナー 東京都 2013 年 5 月 22 日

21) 高谷 恒範, 山本さよみ, 吉田 秀子, 内池 敬男, 水野 麗子, 山崎 正晴, 文 省太, 榊原 崇文, 嶋 緑倫, 高橋 幸博 脳波周波数スペクトル解析における聴覚、言語機能の局在性解析について-赤ちゃんへの非侵襲的検査法の検討- 第 13 回 日本赤ちゃん学会 福岡市 2013 年 5 月 26 日

22) 榊原 崇文, 大塚 敬太, 河野 安宣, 高橋 幸利, 田中 恵子, 川口 昌彦, 嶋 緑倫 Levetiracetam の併用が有効であった抗 NMDAR 抗体陽性難治頻回部分発作重積型急性脳炎(AERRPS)の 1 例 第 55 回 日本小児神経学会 大分市 2013 年 5 月 31 日

23) 松本 智子, 野上 恵嗣, 宮座 静香, 矢田 弘史, 萩原 建一, 南 博明, 古川 晶子, 嶋 緑倫 凝固波形解析を用いた血液凝固過程における各凝固因子の役割 第 35 回 日本血栓止血学会 山形市 2013 年 5 月 31 日

24) 萩原 建一, 野上 恵嗣, 松本 智子, 矢田 弘史, 古川 晶子, 南 博明, 白潤夏, 北澤 剛久, 服部 有宏, 嶋 緑倫