

1997年にカナダの Queen's 大学の Dept. of Pathology(A.Giles 教授、D.Lillicrap 教授)から2匹の血友病A保因者イヌ(メス)の供与を受け、飼育・繁殖してきた。4回の交配にて現在2頭の血友病Aイヌを飼育中である。出血症状は、関節内出血・皮下出血・血尿が多く、出血頻度は一度関節内出血が起こると同部位に頻回に出血を起こす傾向にあり、概ね週1回から月1回程度の出血症状を呈することが判明した。以上2匹の血友病Aイヌモデルは、臨床的にはヒト血友病Aとの差異はほとんどなかった。また、凝血的にはヒト第VIII因子欠乏血漿を基質とした凝固1段法で第VIII因子活性は1%であった。出血時の必要第VIII因子製剤量については、関節内出血の場合20単位/kgで臨床的効果が得られ、第VIII因子活性は約40%まで上昇し、その半減期は約8時間であった。この投与された第VIII因子の生体内動態はヒトの場合とほぼ同様であった。現在イヌ生体部分肝移植時必要となるイヌ第VIII因子クリオ製剤を作成し、蓄積中である。

平成12年7月に血友病A保因者から肝硬変合併血友病A患者に生体部分肝移植が行われ(岐阜県の松波総合病院)、肝は生着し凝血的に良好な経過をたどっているとの報告(私信)があり、現時点では血友病Aのcureという観点から、最も確実な方法と考えられる。

次年度は、血友病Aイヌモデルに同胞犬からの生体部分肝移植を奈良県立医科大学第1外科との協力で行い、基礎データを収集する予定である。

2) 遺伝子治療

ーアデノウイルスベクター

CMVプロモーター制御下にBドメインを欠失したイヌFVIIIcDNAを挿入した組換えアデノウイルスを作製し、*in vitro*でその発現を検討した。HepG2(肝癌細胞由来)、COS1(胎児腎臓由来)、CPAE(肺動脈血管内皮細胞)、HeLa(子宮上皮由来)、MEG-O1(巨核球由来)細胞にMOI:5-10で組換えアデノウイルスを感染させ、1週間のタイムコースで培養液中のイヌ第VIII因子活性と抗原を測定した。第VIII因子活性はヒト第VIII因子欠乏血漿を用いた凝固1段法で、第VIII因子抗原は Asserachrom VIII:Ag kit(Diagnostica Stago)を用いたELISA法で定量した。HepG2においては、第4日に第VIII因子活性が80mU/ml/10⁶cells、第VIII因子抗原が

15mU/ml/10⁶cells、COS1細胞においては、第VIII因子活性が200mU/ml/10⁶cells、第VIII因子抗原が25mU/ml/10⁶cellsと十分量の活性と抗原を検出したが、その他の細胞系においてはbackground程度であった(使用したすべての培養細胞系は、組換えアデノウイルスが感染しうることを、LacZを担った組換えアデノウイルスで予め確認した)。また、発現された第VIII因子の活性の割には抗原量が低く、両者間に乖離を認めた。

カナダ Queen's 大学のグループが第1世代アデノウイルスを用いた血友病Aイヌモデルに対する遺伝子治療を報告(BLOOD 97:107-113,2001)し、第VIII因子の発現の持続は短期的で、肝臓毒性とインヒビターを含む免疫の問題が示唆されている。

現時点の認識では、第1世代アデノウイルスを先天性遺伝性疾患の遺伝子治療用ベクターとして用いることは限界かと考える。アデノウイルス固有の遺伝子をほとんど取り去ったGut-lessなどの改良が必要である。

ーレンチウイルスベクター

Salk研究所のI.Verma教授から供与された第3世代レンチウイルスベクターにCMVプロモーター制御下にクラゲGFP遺伝子を挿入した組換えレンチウイルス(rCS-CG)と、アルブミンプロモーター制御下と肝細胞特異的プロモーター制御下にBドメインを欠失したイヌFVIIIcDNAを挿入した組換えレンチウイルス(rCS-ACP、rCS-SCP)を作成をした。

<rCS-CG>

In vitro COS1、HepG2細胞にMOI:30でrCS-CGを感染させ、4日後蛍光顕微鏡でGFPの発現を観察した。いずれの細胞系においても、50%以上の細胞にGFP発現を確認した。

In vivo 7週齢のC57bl/6マウス2尾ずつに、7.8 x 10⁷ TUのrCS-CGを尾静脈内投与し、一方1.1 x 10⁸ TUのrCS-CGを腹腔内投与し、それぞれ10日後に解剖し各組織を取り出し蛍光顕微鏡で観察した。静脈内投与したマウスはいずれの組織においてもGFP発現を認めなかったが、腹腔内投与したマウスにおいては、いずれも肝臓にのみGFPの発現を認めた。現在、腹腔内投与による肝臓への導入について再検を行うとともに、長期発現について検討している。レンチウイルスを導入したマウスはいずれも、導入後外見上目立った変化はなかった。

<rCS-ACP・rCS-SCP>

In vitro HepG2 細胞に MOI:40 で rCS-ACP と rCS-SCP を感染させ、経時的に培養液中の第 VIII 因子活性を測定した。第 VIII 因子活性は、rCS-ACP と rCS-SCP も両方の組換えレンチウイルスにおいても検出可能であったが、rCS-SCP の方が 80mU/ml/10⁶cells (8 日目) と rCS-ACP に比して高かった。

In vivo 7 週齢の C57bl/6 マウス 2 尾に、*in vitro* の結果を踏まえて、8.0 x 10⁷TU の rCS-SCP を腹腔内投与し、1, 2, 3, 4 および 6 週後に眼窩から採血し、第 VIII 因子を測定した。第 VIII 因子活性はマウス自身の持つマウス第 VIII 因子のため測定不可能であったが、第 VIII 因子抗原は Asserachrom VIII:Ag kit(Diagnostica Stago)を用いて測定した場合、マウス第 VIII 因子とは交叉反応がないため、イヌ第 VIII 因子が発現していれば測定可能であることが予備実験で判明していた。測定した第 VIII 因子抗原は、一部 20-30mU/ml 程度を認めるサンプルもあったが、いずれもバックグラウンドレベルであった。

血友病 A の遺伝子治療について第 VIII 因子遺伝子をいかにして肝臓細胞へ導入するかが、焦点のひとつになっている。レンチウイルスは神経細胞など終末分化細胞など非分裂細胞にも導入可能で、肝細胞にも導入可能と考えられる(一部では細胞周期の問題が報告されている)。次に、導入方法としては門脈内投与が一般的であるが、血友病患者への応用を考えた場合観血的な手術を必要とする方法は困難が予想される。すでに、腹腔内投与で肝細胞への導入の可能性について、GFP を担ったレンチウイルスで検討したところ、その可能性が示唆されたことから現在その確認作業を行っている。また、通常のマウスモデルでは第 VIII 因子活性のモニターリングは不可能で、マウスの第 VIII 因子と反応しない第 VIII 因子抗原の測定でおこなったが、10-30mU/ml あたりの低濃度の検出は困難であった。したがって、活性と抗原がともにモニターできる第 VIII 因子ノックアウトマウスが必須であり、次年度ノックアウトマウスの導入を行う予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉岡 章; 血友病の新しい治療戦略臨床血液 臨床血液 41(5);365-369,2000
- 2) 箕輪秀樹、高橋幸博、中 宏之、吉岡 章; 先天性 PAI Ⅲ 欠乏症 血栓止血

誌 11 (3); 289-295, 2000

- 3) 田中一郎、中 宏之、嶋 緑倫; 血友病インヒビター 血栓止血誌 11 (6); 559-571, 2000
- 4) 白幡 聡、福武勝幸、瀧 正志、立浪 忍、三間屋純一、上田良弘、吉岡 章、高田昇; 血液凝固因子製剤による HIV 感染者の健康調査、和解手続きに関する全国調査成績 日本エイズ学誌 2 (2); 96-102, 2000
- 5) K.Nogami, M.Shima, K.Hosokawa, M.Nagata, T.Koide, E.L.Saenko, I.Tanaka, M.Shibata and A.Yoshioka : Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at arg1689. J.Biol.Chem 275(33):25774-25780, 2000
- 6) M.Shibata, M.Shima, S.Morichika, J.McVey, E.G.D.Tuddenham, I. Tanaka, H.Suzuki, K.Nogami, Y.Minamoto, T.Hato, E.L.Saenko, D.Scandella, and A.Yoshioka : An alloantibody recognizing the FVIII A1 domain in a patient with CRM Reduced Haemophilia A due to deletion of a large portion of the A1 domain DNA sequence. Thromb Haemost 84:442-448,2000
- 7) K.Nogami, M.Shima, J.C.Giddings, K.Hosokawa, M.Nagata, S.Kamisue, H.Suzuki, M.Shibata, E.L.Saenko, I.Tanaka and A.Yoshioka : Circulating factor VIII immune complexes in patients with type 2 acquired hemophilia A and protection from activated protein C-mediated proteolysis. Blood 97(3):669-677, 2001

2. 学会発表

- 1) H.Naka, S.Kamisue, A.Yoshioka et al.: Adenovirus mediated gene transfer induced high level and functional factor VIII expression on the various kinds of cell lines. The 24th International congress of the WFH Montreal July 16, 2000

- 2) K.Nogami, M.Shima, K.Hosokawa,
M.Nagata, E.L.Saenko, I.Tanaka and
A. Yoshioka :Factor VIII C2 domain
contains the thrombin-binding site
responsible for thrombin-catalyzed
cleavage at arg1689. The 42nd annual
meeting of the American Society of
Hematology San Francisco
December 4, 2000

厚生科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

治療に適した SIV ベクターのデザインならびに治療用遺伝子搭載ベクターの作成と
応用に関する研究

分担研究者 長谷川 護 株式会社ディナベック研究所

研究要旨 血友病遺伝子治療に適した SIV ベクターのデザインおよび治療用遺伝子搭載ベクターの作製を行っている。それに先駆け、小動物実験をまかなうベクター調製方法の検討を行った。その結果、超遠心によらず高速遠心によって、1000 倍の濃縮が可能であり、タイターも安定して 10^9 の高いレベルのベクター液を得ることに成功した。

A. 研究目的

遺伝子治療の標的となる多くの体細胞は静止期にあるため、従来のレトロウィルスベクター等により遺伝子導入を図った場合その効率の低さにより効果を発揮できない場合が多い。これまでに我々が開発に成功したサル免疫不全ウィルス(SIV agm 株)を基本とした SIV ベクターは、静止期にある細胞にも高率で遺伝子導入することから、血友病の治療にも期待が大きい。我々はこの SIV ベクターを血友病治療に利用するための最適化を目的とする。即ち、プロモータの選択、発現に適した内部配列の改変、生産方法の向上、搭載治療遺伝子の最適化をおこなう。

B. 研究方法

パッケージングに必要な SIV agm 株の gag、pol、vif、vpr、tat、rev を発現させるパッケージングベクター、と LTR とパッケージングシグナルを含む配列に目的遺伝子を搭載したジーントランスファーベクター、それに外被タンパク質となるヒト水疱性口内炎ウィルス G タンパク質を発現させる VSV-G ベクターの3種類を一枚あ

たり 2.5×10^6 の 293T 細胞を培養した 15cm シャーレ 25 枚にトランスフェクションし、翌日培地交換をした。トランスフェクション 48 時間後と 72 時間後の2回にわたってベクターを含む培地を回収した。回収した培地は $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターにて濾過後、高速遠心機を用いた 42500G の遠心によって、含まれるウィルスベクターを沈降させる。これを少量のバッファーにて回収することによってベクターの濃縮を行った。ベクターの力価は一定数の 293T 細胞に感染させ、マーカー遺伝子の発現によってその機能的なベクター粒子力価を測定した。

C. 研究結果

濃縮前後の力価測定によって、濃縮倍率とほぼ同じ程度にベクターが濃縮されていることがわかった。実際には GFP あるいは lacZ などのマーカー遺伝子を含む SIV ベクターの場合、濃縮前に 10^6 の力価を示し濃縮後は 10^9 まで力価を上げることができた。また、トランスフェクション 48 時間後と 72 時間後のベクター回収ではほぼ同程度の量のベクター回収に成功した。

現在、治療遺伝子としてヒト第Ⅷ因子遺伝子を SIV ジェントランスファーベクターに搭載中である。

D. 考察

体内へのベクター投与の際、ベクターの力価が導入効率に影響するため、常に高力価のウィルスベクターの調製が必要となるが、今回の濃縮方法により失活させることなく短時間に高い率で濃縮が可能であることを示した。レンチウィルスベクターではベクターの大量調製が課題となっているが、同じ細胞から2回収する方法により従来法の約2倍のベクターが回収されることが明らかになったことは、経費、手間の面からも有用と思われる。

E. 結論

搭載遺伝子等により、生産されるウィルスベクターの力価は変動することが予想される。その点でウィルスベクターの課題である調製法と濃縮法の改善により、実用レベルまでのベクターの調製が可能になった。

F. 健康危険情報

本ベクターの基本骨格となっている SIVagm 株は自然宿主であるアフリカミドリザルに対しても病原性はなくヒトに対しても病原性が知られていない。さらに我々のベクターデザインではウィルスのパッケージングに必要な遺伝子群と治療遺伝子、外被タンパク質遺伝子を別々のプラスミドに搭載しており、さらにパッケージングプラスミドからは LTR、パッケージングシグナルを除いている。従ってベクター感染した細胞からウィルスの生ずる可能性はほとんどないと思われる。

現在さらに安全を期すためにベクター間の低頻度での組換えにより生ずるウィルスの高感度の検出系を構築している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakajima T, Nakamaru K, Ido E, Terao K, Hayami M, Hasegawa M. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. Hum Gene Ther. 2000 Sep 1;11(13):1863-74.

2. 学会発表

Ueda Y, Hasegawa M. 他 Transduction of human hematopoietic stem cells by an advanced type of self-inactivating lentivirus vector based on SIVagm. 第3回米国遺伝子治療学会 (Denver) 2000. 6. 1

Nakajima T, Hasegawa M. 他 An advanced self-inactivating lentiviral vector based on SIVagm carrying a novel dual gene expression system. 第3回米国遺伝子治療学会 (Denver) 2000. 6. 3

Kobayashi M, Hasegawa M. 他 An advanced self-inactivating lentiviral vector designed from SIVagm equipped with a novel dual gene expression system. 第6回日本遺伝子治療学会 (東京) 2000. 7. 28

Ueda Y, Hasegawa M. 他 Transduction of human hematopoietic stem cells by an advanced type of self-inactivating lentivirus vector based on SIVagm. 第6回日本遺伝子治療学会 (東京) 2000. 7. 28

H. 知的財産権の出願 登録状況

1. 特許取得

出願日 1999.6.22

特許の名称 2遺伝子を発現するベクター (SIV)

出願番号 特願平 11-175646

審査請求中

出願日 2000.6.1

特許の名称 ヘマグルチニン活性を有するシ
ュードタイプレトロウィルスベクター

出願番号 特願 2000-169090

出願済み

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

第 VIII 因子インヒビターの高感度検出と免疫寛容導入に関する研究

分担研究者 新井 盛夫 東京医科大学

研究要旨

第 VIII 因子インヒビターの臨床的検出法として第 VIII 因子抗体産生 B 細胞を捉える高感度検出の開発に着手した。まず測定系の抗原として第 VIII 因子とそのトロンビンによるフラグメントの精製を行った (1)。一方、第 VIII 因子インヒビター産生に対する免疫寛容を導入する可能性のある物質を評価するためにマウスを用いた動物実験を計画した。動物モデルとして第 VIII 因子ノックアウトマウスのコロニー継代を行った (2)。

A. 研究目的

1. 重症血友病患者に補充療法を開始すると、約 31%に第 VIII 因子に対する同種抗体（インヒビター）が発生する。日常診療では、凝固因子製剤投与時の臨床効果の評価や定期的な血液検査を行って、インヒビター発生をモニターする。*in vitro* の検査法としては、汎用性に優れた Bethesda 法が一般的に行われている。本法は比較的簡便であるが、免疫反応と凝固時間の組み合わせで行うために、測定誤差が大きく、初期診断のための測定感度も不十分である。通常 0.6 Bethesda Unit (BU)以上を陽性とするが、0.6 BU から 1.0 BU の間は特に擬陽性率が高い。したがって、その間の値が得られた際には、再検査あるいは *in vivo* で第 VIII 因子製剤投与後に第 VIII 因子活性の血中回収率や生体内半減期を測定する必要がある。一方、固相化第 VIII 因子抗原を利用した酵素免疫測定法(ELISA)は高い測定感度を得られるが、擬陽性が多く、第 VIII 因子の純化が煩雑なために普及していない。そこで

本研究では、抗第 VIII 因子抗体を産生する B 細胞に着目し、それらを検出する手法の開発を目標とした。

2. インヒビター産生の免疫学的なメカニズムはほとんどわかっていない。最近、Qian らは、血友病モデルマウスに対するヒト第 VIII 因子の反応性を検討した (Blood 2000;95:1324-1329)。第 VIII 因子ノックアウトマウスに 0.2 μg の第 VIII 因子を投与すると、大半のマウスは 2 回目以降に第 VIII 因子インヒビターを獲得するが、1 回目の投与の 3 日後には第 VIII 因子特異的 T 細胞の増殖を認めた。これらより、第 VIII 因子ノックアウトマウスが、ヒト第 VIII 因子インヒビター獲得初期段階における T 細胞免疫反応モデルとして有用であることが示された。一方、生体肝臓移植後の免疫寛容の導入に関与する新しい蛋白因子 (MAY-1) が最近報告された。そこで、第 VIII 因子ノックアウトマウスを用いてインヒビターモデルを構築し、MAY-1 による免疫寛容導入効果を検討することを計画した。

B. 研究方法

1. 2000年度：①第VIII因子および第VIII因子フラグメントの精製：第VIII因子は遺伝子組換え第VIII因子製剤から、抗第VIII因子モノクローナル抗体カラムクロマトグラフィーにより、アルブミンを除去し精製・濃縮した。さらに、第VIII因子にトロンピンを反応させ、活性型第VIII因子を作製した。そこにEDTAを添加して金属イオンをキレートし、3種のフラグメント(A1, A2, A3-C1-C2)をMono QおよびMono Sカラムを用いて精製・濃縮した。本年度は、以上の精製過程の条件を確立し、蛋白質の評価を行った。また、今後の検討に必要な分量の蛋白を貯蔵するために操作の反復を行っている。2001年度：これらの精製蛋白を用いて、抗第VIII因子抗体を産生するB細胞の検出系を確立することを目標とする。測定系の基本は、桑名らが開発した抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞の検出法(ELISPOT法)(臨床病理48(suppl.):106, 2000)を応用する。すなわち、インヒビター保有血友病A患者から比重遠心法で分離した末梢血単核球を用い、精製ヒト第VIII因子(およびそのフラグメント)を固相化した96ウェルメンブレンプレート上で数時間培養し、洗浄後に酵素標識抗ヒトIgG抗体と反応させ、発色性基質の反応により特異的B細胞を検出する。患者検体の採取の際には、研究目的の十分な説明の上で同意を得、同意書に署名を得る。その際には他の目的に使用しない旨や同意しない場合にも患者への不利益が発生しない点を明示する。

2. 2000年度：ペンシルバニア大学のKazazian博士より、第VIII因子ノックアウトマウスの供与を受けた。第VIII因子欠損キャリアーのメスと正常C57BL/6マウスのオスを交配し、生まれたマウスを4週間後に部分切除した尾部検体のgenomic DNAから、PCR解析により当該遺伝子欠損の有無を確認した。また第VIII因子欠損キャリアーのメスと第VIII因子欠損遺伝子保有オスの交配より、ホモ接合体の第VIII因子欠損マウスのメスも得られた。2001年度：ノックアウトマウスの尾静脈よりヒト第VIII因子を繰り返し投与し、定期的に眼静脈叢から採血する。純化第VIII因子抗原を固相化したELISA法で血清中の抗ヒト第VIII因子抗体を確認する。インヒビター獲得モデルマウスの条件をもとにMAY-1を第VIII因子と並行して投与し、免疫寛容導入効果を検討する。

C. 研究結果

1. 活性型第VIII因子の3種のフラグメント(A1, A2, A3-C1-C2)を精製した。それぞれの分子量は54 kDa, 44kDa, 72 kDaで精製率は約95%であった。

2. 血友病モデル動物の第VIII因子ノックアウトマウスのコロニー継代維持を達成した。

D. 考察

1. 第VIII因子は血中濃度が約0.7 nMと凝固因子の中で最も低く、その生化学的な不安定性故に効率の高い精製は困難である。さらにトロンピンにより生成したフラグメントの単離は、世界でも限られた施設からの報告しかない。本年度

中に達成した必要蛋白質の精製の条件設定は本研究の基幹となるもので、今後の測定系確立への大きなステップとなる。桑名らは、ELISPOT法を用いてITP患者の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞を検出している。その結果、本検出法の ITP における感度は 96%、特異性は 97% となり、ITP の診断に極めて有用であることを示した。抗第 VIII 因子抗体産生 B 細胞の検出に関しても同様の測定感度や特異性が得られた際には、インヒビターの精密定量法として臨床利用が可能であり、正確な初期診断に有用性が期待される。さらに、本法が確立した際には、抗原として第 VIII 因子の各フラグメントを用いることで、B 細胞レベルのエピトープ解析が可能になる。

2. Qian らは、CTLA4-Ig が第 VIII 因子投与によるノックアウトマウスのインヒビター獲得を抑制することを見出し、CTLA4-Ig が T 細胞の B7 (CD80, CD86) に結合して、B7-CD28 経路の T 細胞活性化を抑制することを示した。この成果は、CTLA4-Ig によって第 VIII 因子インヒビター獲得の初期段階を制御できる可能性を示唆している。我々の用いる予定の MAY-1 は免疫寛容導入に関わる可能性があるため、CTLA4-Ig とは異なる機作を示すことが期待され、さらにインヒビター発生のメカニズムと治療へのアプローチになろう。

各種のリガンドの解説：

- CD28 は T 細胞上のリガンドで、B7 (CD80 or 86) と結合すると、協同的に抗原提示細胞上に発現した抗原・MHC 複合体と反応し、T 細胞の活性化 (サイトカイン産生、T 細胞の増殖) を促進さ

せる。

- CTLA4 は、マウス T 細胞受容体 B7 に高親和性に結合して、T 細胞活性化を抑制することが知られている。
- CTLA4-Ig は、CTLA4 の細胞外ドメインとマウス IgG1 の重鎖 (CH2-CH3) の融合蛋白

E. 研究発表

著書・単行本

1. Arai M: Lipid-protein interactions In: Real-time analysis of biomolecular interactions, K. Nagata, H. Handa (Eds.), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 163-172, 2000
2. 新井盛夫：凝固抑制因子 (VIII インヒビター、IX インヒビター)：臨床検査診断マニュアル、古澤新平、金山正明、橋本博史 (編集)、永井書店、大阪、pp 256-257, 2001

原著

1. 西田恭治、守谷研二、永泉圭子、稲葉浩、天野景裕、福江英尚、山元泰之、新井盛夫、福武勝幸：高感度 Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA 定量の定点調査結果、臨床病理 48:282-283, 2000
2. 山中 晃、新井盛夫、鈴木隆史、永泉圭子、大石毅、川田和秀、佐々木昭仁、井坂恵一、福武勝幸：先天性第 VII 因子欠損症の巨大卵巣嚢腫切除術における止血管理、血栓止血誌 11:193-200, 2000
3. 西田恭治、守谷研二、北野喜良、間宮繁夫、永泉圭子、稲葉浩、天野景裕、福江英尚、山元泰之、新井盛夫、福武勝幸：Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA 定量における現行法 (アンプリコア HIV-1 モニター Ver

1.0) とアド・イン・プライマー法の解離に関する検討、日本エイズ学会誌 2:85-88, 2000

4. 渡辺 潤、天野景裕、新井盛夫、守谷研二、藤田 進、西田恭治、福武勝幸：遺伝子組換え活性型第 VII 因子製剤の持続輸注が奏功した血友病 A インヒビターの下顎咽頭軟部組織出血、血栓止血誌 12:39-46, 2001

総説・解説

1. 高橋 敬、新井盛夫、高 昌星：共焦点レーザー走査顕微鏡による反応解析・目で見る凝固線溶研究のアプローチ、血液腫瘍科 40(Suppl. 3):245-258, 2000
2. 新井盛夫：遺伝子組み換え活性型第 VII 因子製剤「ノボセブン」の臨床的有効性、メディカル朝日、2000 年 7 月号:26-28, 2000
3. 新井盛夫：赤血球沈降速度、検査と技術 28:722-725, 2000
4. 腰原公人、新井盛夫：抗凝固療法中の患者の検査値の動き、検査と技術 29:75-79, 2000
5. 天野景裕、新井盛夫：血友病 A の分子病態、血液腫瘍科 41:168-180, 2000
6. 福江英尚、新井盛夫：XIII 因子 A サブユニット欠損症、血栓止血誌 12:66-73, 2001
7. 新井盛夫：血液凝固機構における因子の意義について、老年病診療 Q & A 35: 562-563, 2001

学会発表（国内：一般演題）

1. 清井映男、富山佳昭、本田繁則、田所誠司、新井盛夫、柏木浩和、小杉智、倉田義之、松沢佑次：リガンド結合能

異常を示す血小板無力症の α IIb ミセンス変異、第 62 回日本血液学会総会、Int J Hematol 71(suppl. 1):51, 2000

2. 永泉圭子、新井盛夫、山中晃、天野景裕、稲葉浩、福武勝幸：FVII G283S：先天性第 VII 因子欠乏症の遺伝子解析、第 62 回日本血液学会総会、Int J Hematol 71(suppl. 1):234
3. 守谷研二、新井盛夫、佐々木昭仁、川田和秀、藤田進、福武勝幸：頭部 CT 画像上診断が困難であったインヒビター保有血友病 A 患者の小脳出血、第 42 回日本臨床血液学会総会、臨床血液 41 (10) (suppl.) :1103, 2000
4. 萩原剛、守谷研二、西田恭治、天野景裕、新井盛夫、福武勝幸：小腸壁内血腫によりイレウスをきたした血友病 A 症例、第 42 回日本臨床血液学会総会、臨床血液 41 (10) (suppl.) :1103, 2000
5. 永泉圭子、稲葉浩、天野景裕、新井盛夫、福武勝幸：先天性アンチトロンビン欠乏症における新しい変異の検出 (L409P)、第 47 回日本臨床病理学会総会、臨床病理 48 (suppl.) :176
6. 稲葉浩、永泉圭子、新井盛夫、福武勝幸：NIRCA を用いた血友病 A の遺伝子診断、第 47 回日本臨床病理学会総会、臨床病理 48 (suppl.) :177, 2000
7. 国分正恵、佐藤和典、斎藤光正、斎藤富蔵、田中京子、今福祐司、長井俊彦、吉田浩、新井盛夫：著明な APTT の延長を示した IgG4 骨髄腫の一例、第 47 回日本臨床病理学会総会、臨床病理 48 (suppl.) :244, 2000

学会発表（国内：シンポジウム）

1. 新井盛夫：免疫学的凝固異常（抗リン

脂質抗体以外)、第 47 回日本臨床病理
学会総会、臨床病理 48 (suppl.) :108,
2000

学会発表 (国外：一般演題)

1. Amano K, Arai M, Kawata K, Suzuki
T, Fukutake K: Intracranial
haemorrhage in haemophilic adults
and adolescents: a report of 18 cases
In 14 years. XXIV international
Congress of the World Federation of
Hemophilia, Haemophilia 6:199,
2000
2. Hagiwara T, Arai M, Amano K,
Suzuki T, Fujita S, Yamanaka K,
Takahashi I, Fukutake K:
Continuous infusion of clotting factor
concentrates for haemophilia
patients with high-responding
inhibitors. XXIV international
Congress of the World Federation of
Hemophilia, Haemophilia 6:305,
2000

以上

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

研究の成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号ページ	出版年
Matsuda, K.M., Madoiwa, S., Hasumi, Y., Kanazawa, T., Saga, Y., Kume, A., Mano, H., Ozawa, K., and <u>Matsuda, M.</u>	A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: Generation of angiostatin endogenous plasminogen by protease gene transfer.	Cancer Gene Ther.	7: 589-596,	2000
Kimura, H., <u>Sakata, Y.</u> , Hamada, H., Yoshida, Y., Sato, O., Deguchi, J., Sugawara, Y., Makuuchi, M., Miyata, T.	In vivo retention of endothelial cells adenovirally transduced with tissue-type plasminogen activator and seeded onto expanded polytetrafluoroethylene.	J. Vasc. Surg.	32:353-63	2000
Urabe, M., Shimazaki, K., Saga, Y., Okada, T., Kume, A., Tobita, K., and <u>Ozawa, K.</u>	Self-amplification system for recombinant adeno-associated virus production.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	276: 559-563	2000
Urabe, M., Kume, A., Tobita, K., and <u>Ozawa, K.</u>	DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transduction efficiency.	Anal. Biochem.	278: 91-92	2000
吉岡 章	血友病の新しい治療戦略	臨床血液	41 (5) ; 365-369	2000
田中一郎、中宏之、嶋緑倫	血友病 インヒビター	血栓止血誌	11 (6) ; 559-571	2000
K.Nogami, M.Shima, K.Hosokawa, M.Nagata, E.L.Saenko, I.Tanaka and <u>A.Yoshioka</u>	Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at arg1689.	J.Biol.Chem	275(33):25774-25780	2000
M.Shibata, M.Shima, S.Morichika, J.McVey, E.G.D.Tuddenham, Tanaka, H.Suzuki, K.Nogami, Y.Minamoto,T.Hato, E.L.Saenko, D.Scandella, and <u>A.Yoshioka</u>	An alloantibody recognizing the FVIII A1 domain in a patient with CRM Reduced Haemophilia A due to deletion of a large portion of the A1 domain DNA sequence.	Thromb Haemost	84:442-448	2000
Nakajima T, Nakamaru K, Ido E, Terao K, Hayami M, <u>Hasegawa M.</u>	Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system.	Hum Gene Ther.	11(13): 1863-74	2000
渡辺 潤、天野景裕、新井盛夫、守谷研二、藤田 進、西田恭治、福武勝幸	遺伝子組換え活性型第 VII 因子製剤の持続輸注が奏功した血友病 A インヒビターの下顎咽頭軟部組織出血	血栓止血誌	12:39-46	2001

研究成果の刊行物・別刷

20000552

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P.30の「研究の成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。