

- 9 Kogure K, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Sato Y, Monahan J, Ozawa K. Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int J Hematol.* 2001 Jun;73(4):469-75.
- 10 Xin KQ, Urabe M, Yang J, Nomiyama K, Mizukami H, Hamajima K, Nomiyama H, Saito T, Imai M, Monahan J, Okuda K, Ozawa K, Okuda K. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther.* 2001 Jun 10;12(9):1047-61.
- 11 Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, Okada T, Kume A, Nishino H, Monahan J, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K. Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2001 Feb;8(2):99-106.
- 12 Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Ishibashi, S., Takizawa, T., Monahan, J., Ozawa, K., and Shimada, K.: Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene reduces vasoconstrictive response. *Exp. Clin. Cardiol.* 6: 50-55, 2001.
- 13 Kawada, T., Sakamoto, A., Nakazawa, M., Urabe, M., Masuda, F., Hemmi, C., Wang, Y., Soo Shin, W., Nakatsuru, Y., Sato, H., Ozawa, K., and Toyooka, T.: Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 431-435, 2001.
- 14 Fan D, Shen Y, Kang D, Nakano I, Ozawa K. Adeno-associated virus vector-mediated triple gene transfer of dopamine synthetic enzymes. *Chin Med J (Engl).* 2001 Dec;114(12):1276-9.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

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

血友病の治癒をめざした生体部分肝移植(イヌモデル)
および第3世代レンチウイルスを用いた血友病A遺伝子治療

分担研究者 吉岡 章 奈良県立医科大学

研究要旨;血友病A患者の cure を目指して、イヌモデルを用いた生体部分肝臓移植と第3世代レンチウイルスを用いた遺伝子治療の基礎研究を行った。現時点で肝移植は血友病Aの cure という観点から最も確実な方法と考えられる。そこで、血友病 A イヌモデルを用いて血友病の治癒を目的に、同胞犬から生体部分肝移植を行った。移植後 24 時間から移植肝由来の第Ⅷ因子の産生を認め、移植後流血中に 3-60%の第Ⅷ因子活性の維持を認めたが、著明なるい瘦をきたし、移植後 46 日で死亡した。また、クラゲ GFP/イヌ第Ⅷ因子遺伝子を担った第3世代レンチウイルスを用いて、正常マウスに肝臓をターゲットにした遺伝子導入実験を行った。尾静脈・腹腔内・肝皮膜下ルートでは、いずれにおいても発現を同定できなかったが、部分肝切除を追加した肝皮膜下投与で一定の発現を認め、今回使用した第3世代レンチウイルスベクターの導入に細胞周期の関与が示唆された。今後、導入ルートやウイルスベクターの改変を検討したい。

A. 研究目的

血友病Aは、X染色体に存在する血液凝固第Ⅷ因子遺伝子の異常に起因する先天性凝固障害性の出血性疾患である。現在の治療法は、ヒト血漿由来あるいはリコンビナントの第Ⅷ因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に、不定期あるいは定期的に静脈内投与し、止血を計る、という補充療法を主体とする血友病のcareである。今後さらに進めた血友病のcureをめざすという観点から、イヌモデルを用いた生体部分肝移植と、マウスおよびイヌモデルを用いた遺伝子治療についての可能性を検討する。

近年、C型およびB型慢性肝炎に基づく肝硬変などの重篤な肝疾患を合併した血友病患者に対する肝移植が行われ、肝疾患の治療とともに血友病の治癒可能であることが報告されている。しかし、これらはいずれも肝疾患の rescue が主目的であり、患者の障害された全肝臓を取り出すものである。これをさらに一歩進めて第一義的に血友病の治癒を目指すという観点から、血友病患者に対する生体部分肝移植の可能性と問題点を明らかにすることを目的に、血友病Aイヌモデルを用いた生体部分肝移植を行う。

また、種々のウイルスベクターを用いた血友病

の遺伝子治療研究が行われているが、昨年度に引き続き第3世代レンチウイルスを用いて、培養細胞と正常のマウス肝臓をターゲットにした遺伝子導入について基礎研究を進める。

B. 研究方法

1) イヌ生体部分肝移植

(奈良医大第一外科肝移植グループと共同)

Recipient犬は第Ⅷ因子活性が3%未満の血友病A犬を、donor犬はその同胞で正常雄犬(第Ⅷ因子活性53%)を使用した。Donor犬から切り出した肝左葉を氷冷リンゲル液で灌流後、同じく肝左葉を切り出したrecipient犬にorthotopicに移植した。Graft および recipient 側の門脈および肝動静脈をそれぞれ吻合し、胆管は胆汁量を測定するために外瘻を設けた。

免疫抑制療法として、移植直後より Tacrolimus (FK506) 0.16 mg/kg の筋注を連日行った。胆汁量が減少した際は methylprednisolone 5-10 mg/kg によるパルス療法を適宜追加した。

止血管理はあらかじめ準備したイヌクリオプレシテート(化学及血清療法研究所から供与)を術前に50単位/kg投与し、第Ⅷ因子活性を

100%に上昇させた上で手術に臨んだ。術中および術後は第Ⅷ因子活性をモニターしながらイヌクリオプレシピテートの追加投与を行った。

2) 遺伝子治療

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 GFP (クラゲ由来の蛍光蛋白) または肝細胞特異的プロモーター制御下に Bドメインを欠失させたイヌ第Ⅷ因子遺伝子をそれぞれ組み込んだ組換えウイルス (rCS-CG または rCS-SCP) を作成した。これらの組換えウイルスを種々の培養細胞 (HepG2、COS-1、293T、HeLa) に感染させ、GFP は蛍光顕微鏡で観察し、イヌ第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、イヌ第Ⅷ因子抗原は Asserachrom VIII:Ag kit (Diagnostica Stago) を用いた ELISA 法で、それぞれ定量することによりその発現を評価した。

次に、マウスに肝臓をターゲットにして、尾静脈または、腹腔内、肝皮膜下ルートで、正常マウス (C57BL/6) に、組換えウイルス rCS-CG または rCS-SCP を導入した。それぞれ1週間後に解剖し、GFP の発現と眼窩静脈叢より採血した。血中第Ⅷ因子抗原を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果・考察・結論

1) イヌ生体部分肝移植

血友病A犬に対し正常同胞犬から生体部分肝移植を行い、46日間の生存期間を得た。移植後、約24時間たった頃から移植肝由来の第Ⅷ因子産生を認めた。イヌクリオプレシピテートの投与が不要になった24時間目以降、第Ⅷ因子活性の最高値は60% (移植後2日目)、最低値は3% (移植後15日目)、死亡前は32% (移植後44日目) であった。観察期間中に明らかな出血症状はなかった。血液生化学検査でもビリルビン値や AST、ALT などは正常範囲を推移した。

死因は明らかではないが、死亡2週間前からいそうが著明であり、Tacrolimus の腸管への副作用が一因ではないかと疑われた。剖検では左側に肺炎所見を認めたものの、移植肝自体は intact であり、肝組織所見でもほぼ正常組織所見であった。

以上から、血友病の生体部分肝移植は技術的には手術手技および止血管理の面からも充分可能であることが明らかとなった。今後、recipient に負担を負わさない免疫抑制療法の改善などさらに検討が必要と思われた。

この方法は recipient 側は部分肝 (左葉) のみ取り出し、自己肝の大部分は残存するため、recipient に対する侵襲が比較的少なくて済むほ

か、移植が不成功に終わっても recipient は生存可能であることなど、が大きな利点であると考えられる。

2) 第3世代レンチウイルスを用いた遺伝子治療
<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 遺伝子を導入した組換えウイルス rCS-CG を用いた実験系>

In vitro

3.0×10^7 TU の組換えウイルスを、約 10^6 個の4種類の培養細胞 (HepG2、COS-1、293T、HeLa) に感染させ4日後に蛍光顕微鏡で観察した。293T 細胞で蛍光陽性細胞が最も多く、HepG2 と HeLa は同じレベルで、COS1 細胞はやや低い傾であった。(定量はしていない。) 個々の培養細胞中の陽性細胞の比率は感染させたウイルス量に依存していた。効率に差はあるもののいずれの細胞にも感染し、導入した GFP 蛋白の発現が確認できた。また、導入した HepG2 細胞と 293T 細胞を3か月以上継代培養したが、いずれも同程度の蛋白の発現を持続していた。

In vivo

7 週齢の C57bl/6 マウス2尾ずつに、約 1.0×10^8 TU の rCS-CG を尾静脈または腹腔内、肝皮膜下内に投与し、それぞれ7日後に解剖し肝臓を蛍光顕微鏡で観察した。いづれの投与方法においても、肝臓で GFP 陽性細胞を認めることができなかった。(昨年度、腹腔内投与したマウスにおいて、肝臓に GFP の発現を認めたと報告したが、再検においては否定的であった。) 部分肝切除を施した後、同量の組換えウイルスを肝皮膜下に投与した場合は肝実質細胞を一部含む GFP 陽性細胞を少数ながら認めた。しかし、導入効率としては極めて低いものであった。

<第3世代レンチウイルスベクターに肝細胞特異的プロモーター制御下に Bドメイン欠失イヌ第Ⅷ因子遺伝子を導入した組換えウイルス rCS-SCP を用いた実験系>

In vitro

3.0×10^7 TU の組換えウイルスを、約 10^6 個の4種類の培養細胞 (HepG2、COS-1、293T、HeLa) に感染させ、第1、4、7日後の培養上清中の第Ⅷ因子活性と抗原を測定した。293T 細胞と HeLa 細胞では共に background レベルだったが、HepG2 細胞では、第7日目に第Ⅷ因子活性で 150mU/ml、抗原で 90mU/ml の発現を認めた。COS1 細胞では、第Ⅷ因子活性・抗原はそれぞれ 40mU/ml と 30mU/ml であった。組織特異的な発現が得られたものと考えられた。

In vivo

7 週齢の C57bl/6 マウス3尾ずつに、約 $3.0 \times$

10⁸TU の rCS-SCP を尾静脈または腹腔内、肝皮膜下、部分肝切除を伴う肝皮膜下に投与した。それぞれ 7 日後に眼窩静脈叢より採血し、第Ⅷ因子抗原を ELISA 法で測定した。ノックアウトマウスではないので、元々存在するマウス第Ⅷ因子のため活性は測定できなかった。測定に用いた ELISA キットは、マウス第Ⅷ因子抗原には反応しないことを予め検討している。ELISA の感度の問題もあるが、一部 20-30mU/ml 程度を認めたサンプルもあったが、いずれも background レベルに近く、残念ながら、明らかな第Ⅷ因子抗原を検出することはできなかった。

以上、*in vitro* 実験系では GFP/イヌ第Ⅷ因子遺伝子を担った組換えレンチウイルスはいずれも十分な成績が得られたが、*in vivo* 実験系においては十分な成績を得ることができなかった。そこで、組換えレンチウイルスの導入ルートと現在使用している第3世代レンチウイルス自体の導入効率の問題が考えられる。肝細胞に遺伝子導入を図る場合、考えられるルートは、門脈、脾臓を介する、肝動脈、肝皮膜下、腹腔内および表在静脈などがあげられる。最も一般的に行われている門脈ルートを試みたが、技術的にうまくいかなかったため、尾静脈、腹腔内および肝皮膜下の3ルートについて検討した。また、肝皮膜下ルートに部分肝切除を加えた場合 GFP 陽性細胞を認めることができ、部分肝切除により遺伝子導入効率が上昇した。これより現在用いているウイルスベクターが細胞周期に依存している可能性が示唆された。これらのことをふまえると、組換えレンチウイルスを用いて肝臓に遺伝子導入を図る場合、門脈ルートをはじめとしてみっと効率的なルートを検討する必要があると共に、ウイルスベクター自体に導入効率を上げるための改変 (cPPT や MAR などの cis-element 挿入) を検討したい。また、本年度は実験に供することができなかったが、現在第Ⅷ因子ノックアウトマウスを導入し、現在交配中である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) A. Yoshioka, M. Shima, K. Fukutake, J. Takamatsu, A. Shirahata and the KOGENATE FS study group: Safety and efficacy of a new recombinant FVIII formulated with sucrose (rFVIII-FS) in patients with haemophilia A: a long-term, multicentre clinical study in Japan. *Haemophilia* 7:242-249, 2001.

- 2) 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* 97:669-677, 2001.
- 3) A. Shirahata, T. Kamiya, J. Takamatsu, T. Kojima, K. Fukutake, M. Arai, H. Hanabusa, H. Tagami, A. Yoshioka, M. Shima, H. Naka, S. Fujita, Y. Minamoto, J. Kamizono and H. Saito: Clinical trial to investigate the pharmacodynamics, safety, and efficacy of recombinant factor VIIa in Japanese patients with hemophilia with inhibitor. *Int J hematol* 73:517-525, 2001.
- 4) S. Kinoshita, A. Yoshioka, Y. D. Park, H. Ishizashi, M. Kommo, M. Funato, T. Matsui, K. Titani, H. Yagi, M. Matsumoto, Y. Fujimura: Upshaw-Schulman syndrome revisited: A concept of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J hematol* 74:101-108, 2001.
- 5) H. Takatsuka, Y. Sakurai, A. Yoshioka, T. Kokubo, Y. Usami, M. Suzuki, T. Matsui, H. Yagi, M. Matsumoto, Y. Fujimura: Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544:267-277, 2001.
- 6) H. Mastui, Y. Takahashi, T. Matsunaga, T. Tanaka, H. Minowa, M. Sugimoto, R. Tsukino, Y. Mii, J. Giddings, A. Yoshioka: Successful arthroscopic treatment of pigmented villonodular synovitis of the knee in a patient with congenital deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 and recurrent haemarthrosis. *Haemostasis* 31:106-112, 2001.
- 7) H. Yagi, N. Narita, M. Matsumoto, Y. Sakurai, H. Ikari, A. Yoshioka, E. Kita, Y. Ikeda, K. Titani, Y. Fujimura: Enhanced low shear induced platelet aggregation by Shiga-like toxin 1 purified from *Escherichia coli* O157. *American J hematol* 66:105-115, 2001.
- 8) 田中一郎, 吉岡 章; 血友病の生活管理 小児内科 33(11):1555-1558, 2001.
- 9) 嶋 緑倫; 血友病 A 血液フロンティア 11(9):21-32, 2001.

2. 学会発表

国内学会 21 題

国際学会 12 題

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Aの遺伝子治療用にヒト第八因子を搭載した SIV ベクター作製を行った。また、治療に適したプロモーターを選択する目的で、サイトメガロウィルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1 α (EF1 α)プロモーター、ヒトフォスフォグリセレートキナーゼ(PGK)プロモーターを内部プロモーターとしたベクターを作製した。その結果、いずれも 10⁶以上の高い粒子力価で産生されることが分かった。また、SIV ベクターのエンベロープタンパク質として広く用いられているヒト水疱性口内炎ウィルス G タンパク質(VSV-G)に換えて感染性の向上、細胞毒性の軽減を目的としてセンダイウィルスの F、HN タンパク質あるいはインフルエンザウィルス HA タンパク質をエンベロープとした新型シュードタイプ化に成功した。

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、従来のマウス白血病ウィルスをベースとした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。血友病の遺伝子治療の標的と目される造血系組織、血管内皮細胞、肝臓実質細胞も同様であり、静止期の細胞にも高率で遺伝子導入の可能なレンチウイルスベクターに対する期待が高い。本年度は我々が開発に成功したサル免疫不全ウィルス(SIV agmTYO-1 株)を基本とした SIV ベクターに治療遺伝子であるヒト第八因子の遺伝子(Bドメイン欠失型)をサイトメガロウィルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1 α (EF1 α)プロモーター、ヒトフォスフォグリセレートキナーゼ(PGK)プロモーターと共に搭載し、基礎研究、あるいは実際の臨床応用可能

となるレベルの力価でベクター産生可能かどうかを調べた。

また現在、レンチウイルスベクターでエンベロープタンパク質として広く用いられているヒト水疱性口内炎ウィルス G タンパク質(VSV-G)を別のウィルスタンパク質に換えることで感染細胞種の拡大と、VSV-G に由来する細胞毒性の軽減を図る。

B. 研究方法

これまで開発してきた LTR の一部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に Bドメインを欠失させた形のヒト第八因子遺伝子を搭載し、そのプロモーターとしては PGK プロモーター(520bp)、CMV プロモーター(約 600bp)、EF1 α プロモーター(イントロン有:1.2kbp、イントロン無:250bp)をそれぞれ搭載した。これらをパッケージングに必要な SIV の gag、pol、

tat, rev 等を発現させるパッケージングベクター、と VSV-G 発現ベクターと共に 15cm シャーレに培養した 293T 細胞にトランスフェクションし、翌日培地交換をし、トランスフェクション 48 時間後にベクターを回収した。ベクターの力価はベクター上清から、RNA を抽出し、ナイロンメンブレンに吸着させ、ジゴキシンゲン標識したジーントランスファーベクター検出用プローブを用いたドットプロット法により検出を行った。

また、第八因子の解析用には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、0.45 μm 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、含まれるウイルスベクターを沈降させ、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。

センダイウイルスの F、HN タンパク質、インフルエンザウイルス HA タンパク質をエンベロープとして発現させるために CAG プロモーター下流にそれぞれの遺伝子を挿入した発現ベクターを構築した (pCAG-F、pCAG-HN、pCAG-HA)。また、ベクター産生を高めるために、F タンパク質の C 末の一部を削除し、細胞質内領域に 4、14、27 アミノ酸残基を残した pCAG-Fct4、pCAG-Fct14、pCAG-Fct27、HN の細胞質領域に SIV のエンベロープタンパク質の細胞質領域 SIVct を置換、あるいは付加した pCAG-SIVct/HN、pCAG-SIVct+HN を作出した。センダイウイルスの F、HN シュードタイプは F、HN の発現ベクター両者、パッケージングベクター、CMV-GFP 搭載のジーントランスファーベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、ベクターの産出を試みた。また、

インフルエンザウイルス HA シュードタイプは HA 発現ベクターとパッケージングベクター、ジーントランスファーベクターの三者をトランスフェクションすることにより、ベクター産出を試みた。また、F、HN タイプはトリプシンにより F タンパク質の活性化を、HA タイプはノイラミニダーゼにより粒子形成とトリプシンによる HA の活性化を行った。作出したベクターの機能力価は 293T 細胞に感染させ、3 日後の GFP 陽性細胞数により産出した。

C. 研究結果

第八因子遺伝子搭載ベクター：三種類のプロモーター (PGK、CMV、EF1 α -1.2k) を用いた結果、それぞれ 108vg:virus genome/ml、107vg/ml、106vg/ml という高い効率でベクターが作出できた。またこれらを濃縮したベクターを用い、発現させた第八因子の機能を調べた結果、生理活性が認められた。また、EF1 α -250bp ではベクターは検出限度以下であった。

新型シュードタイプ SIV: センダイウイルスの F、HN、インフルエンザウイルス HA によるシュードタイプ SIV は両者共に、ベクター粒子形成能、細胞感染能を有し、新型シュードタイプベクターとして機能することが確認された。これらのタイターは F、HN の野生型では機能力価は検出感度以下であったが、F、HN に変異を加えることにより Fct4、SIVct+HN の組合せにより、機能力価は 6.6×10^4 にまで上昇した。HA 型シュードタイプベクターは 1.1×10^5 という高力価を示した。また、いずれのシュードタイプベクターも高速遠心により容易に沈殿、濃縮が可能であった。

D. 考察

これまで、レンチウイルスベクターによる標的

細胞への高率での遺伝子導入が期待されてきたが、治療遺伝子の搭載により、その治療効果の評価が可能となった。また力価でも、マーカー遺伝子搭載ベクターと遜色ない力価を示しており、今後の治療への応用研究に期待が膨らんだ。また幾つかのプロモーターを搭載することで、プロモーターの選定に向けた検討も開始することができるようになった。

これまで VSV-G はレンチウイルスベクターのエンベロープとして広く用いられてきたが、一部の細胞で導入効率が低かったり、細胞毒性が見られるなど、標的疾患によっては適切なエンベロープでない場合もあった。ベクターの選択肢を増やす意味でも新型シュードタイプベクターの作出は意義深いと思われた。今回作出した、センダイウイルスの F、HN 型、インフルエンザウイルス HA 型のシュードタイプはどちらも VSV-G と異なる受容体を認識することから、標的細胞の指向性が異なることが期待される。また細胞毒性の軽減にもつながる可能性がある。

E. 結論

搭載遺伝子等により、生産されるウイルスベクターの力価は変動することが予想されたが第八因子を搭載しても高力価で生産されたことから、実用レベルまでのベクターの調製が可能であることが分かった。また、VSV-G に代わるエンベロープを有したベクターの作出に成功し、今後の検討により、より安全で効果的なベクター選定のための選択肢を広げることが可能となった。

F. 健康危険情報

本ベクターの基本骨格となっている SIVagm TYO-1 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イルスのパッケージに必要な遺伝子群と治療遺伝子、エンベロープ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イルスの生ずる可能性はほとんどないと思われる。

また、HIV ウイルスの遺伝子との相同性も 30-60%と低いため HIV ベクターと異なり HIV の保因者へ感染による組み換えウイルス出現の可能性も低いと思われる。

G. 研究発表

1. 学会発表

Kobayashi M. Hasegawa M. 他 Pseu-dotyping of SIVagm-based lentiviral vectors with envelope proteins from paramyxovirus. 第7回日本遺伝子治療学会 (東京) 2001. 7. 7

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イルスベクター

出願番号 特願 2000-169090

出願済み

厚生学研究費補助金（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特異的 B 細胞検出に関する研究
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測定系の構築を試みた。純化第 VIII 因子を抗原として、インヒビター患者の末梢血有核細胞中の第 VIII 因子特異的 B リンパ球の検出（ELISPOT 法）を行った。健常者検体を対照として 240 BU のインヒビター保有血友病 A 患者と 160 BU のインヒビター保有血友病 A 患者の血液を用いて検討したが、培養後に第 VIII 因子特異的な患者 B リンパ球を示す発色スポットは得られなかった。

A. 研究目的

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、第 VIII 因子抗原を利用した免疫沈降法は特異性や測定感度に優れているが、第 VIII 因子の純化や手技が煩雑なためにルーチン検査としては用いられない。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。

B. 研究方法

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 因子にトロンビンを反応させ、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、2000 年度中に確立した精製条件を用いて操作を反復し、以後の検討に十分量の第 VIII 因子あるいは第 VIII 因子由来蛋白フラグメントを精製した。
2. 第 VIII 因子抗体産生 B 細胞の検出 (ELISPOT 法) (臨床病理 48(suppl.): 106, 2000) :

- ① 第 VIII 因子蛋白の固相化：96 ウェルメンブレン付きプレートに第 VIII 因子精製蛋白を 25~100 μ g/well 添加し、4 $^{\circ}$ C, 12 時間静置して固定化した。
- ② 第 VIII 因子インヒビター保有患者のヘパリン加静脈血を 20ml 採取し、Ficoll-Paque を用いて PBMC 分画を得た。それを PBS で 3 回洗浄し、リンパ球数を測定した。
- ③ 1.0×10^6 /ml のリンパ球を第 VIII 因子固相化ウェルに 50 μ l ずつ添加した。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ にて 4 時間培養後、3 回洗浄した。続いて酵素標識抗ヒト免疫グロブリンを添加し、室温で 2 時間反応させた。さらに洗浄後、発色性基質を添加し、20 分後に顕微鏡にて発色スポットを観察した。

C. 研究結果

1. 第 VIII 因子は約 1 mg、活性型第 VIII 因子の 3 種のフラグメント (A1; 54 kDa, A2; 44 kDa, A3-C1-C2; 72 kDa) は各々約 200 μ g 精製した。精製率は約 95%であった。
2. ELISPOT は、健常者検体を対照として 240 BU のインヒビター保有血友病 A 患者と 160 BU のインヒビター保有血友病 A 患者の血液を用いて検討したが、培養後に第 VIII 因子特異的な患者 B リンパ球を示す発色スポットは得られなかった。

D. 考察

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。

さらにトロンビ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。2000 年度中に精製条件を確立し、2001 年度にはある程度の精製物を備蓄することができた。ELISPOT も含めて今後は各種の基礎研究に用いることが可能である。

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。

今回、インヒビター患者 2 名の検体を用いた ELISPOT の検討では、現在までのところ陽性所見が得られていない。理由としては、第 VIII 因子抗体の B 細胞クローンの絶対量が ITP におけるそれに比較が少ないことや第 VIII 因子抗原の固相化量が少ないことなどが考えられる。今後は、これらの点の改善に加えてさらに高力価のインヒビター患者の検体を用いての検討や、血友病 B に発生する第 IX 因子インヒビターの検体を用いることなども課題として検討する必要がある。

E. 研究発表

著書・単行本

1. 新井盛夫：血友病のインヒビター—最

近の進歩. Annual Review 血液 2002.
高久 史麿 溝口 秀昭 小宮山 淳
坂田 洋一 金倉 譲 (編)、中外医学
社、東京 2002 年、pp. 215-228.

原著

1. 永泉圭子、稲葉浩、伊藤武善、山中晃、鈴木隆史、西田恭治、萩原剛、天野景裕、香川和彦、新井盛夫、福武勝幸：先天性第 VII 因子欠乏症 3 家系のミスセンス変異. 血栓止血誌 12:133-143, 2001
2. 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
3. 佐藤晋、森康治、梅津清明、青木達哉、小柳泰久、萩原剛、守谷研二、新井盛夫、福武勝幸：血漿交換により S 状直腸癌周術期の止血管理に成功した先天性第 XI 因子欠損症の一例. 日本臨床外科 62:2627, 2001

総説・解説

1. 新井盛夫：免疫学的凝固異常（抗リン脂質抗体症候群以外）. 臨床病理 49:1000-1004, 2001
2. 福江英尚、新井盛夫：X I I I 因子 A サブユニット欠損症. 血栓止血誌 12:66-73, 2001
3. 新井盛夫、小野織江、嶋緑倫、白幡聡、三間屋純一：インヒビターを保有する血友病患者におけるノボセブンの使用経験；第 1 報 関節内出血. 血栓止血誌 12:348-355, 2001
4. 新井盛夫、小野織江、嶋緑倫、白幡聡、

三間屋純一：インヒビターを保有する血友病患者におけるノボセブンの使用経験；第 2 報 手術症例・消化管出血症例血栓止血誌 12:527-532, 2001

学会発表（国内：一般演題）

1. 須永和代、高橋陽子、早川瑞穂、久野浩史、中津川庸子、市川喜美子、新井盛夫、福武勝幸：輸血の 24 時間体制—その現状と今後の課題. 輸血学会誌 47:252, 2001
2. 高橋陽子、須永和代、市川喜美子、中津川庸子、久野浩史、早川瑞穂、新井盛夫、福武勝幸：血液製剤の病院内廃棄を減らすための試み. 輸血学会誌 47:294, 2001
3. 新井盛夫：血漿（FFP）の適応. 輸血学会誌 47:252, 2001
4. 周明志、佐々木昭二、天野景裕、萩原剛、西田恭治、新井盛夫、福武勝幸：脳幹部出血を発症した血友病 B の一例. 臨床血液 42:960, 2001
5. 新井盛夫、松波英寿、清水保延、萩原剛、福武勝幸：肝硬変症を合併した血友病 A 患者に対する確定保因者からの生体部分肝移植. 血栓止血誌 12:377, 2001
6. 今井正、高橋敬、新井盛夫、永泉圭子、稲葉浩、中村伸、福武勝幸、池尾一穂、五條堀孝：活性型第 VII 因子（VIIa）はクリングルドメインに結合する. 血栓止血誌 12:399, 2001
7. 高橋敬、新井盛夫、今井正、永泉圭子、稲葉浩、中村伸、福武勝幸：活性型第 VII 因子（VIIa）はウロキナーゼ（uPA）活性を促進する. 血栓止血誌 12:399, 2001

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

種々の血友病治療モデルにおける技術開発

分担研究者 小林 英司 自治医科大学

研究要旨

〔目的〕 本研究班では、有効で新しい血友病の治療法を開発するため、種々の動物モデルで検討が進められている。小林の分担目標は他の分担者が速やかにそれぞれの分担研究を遂行するために開発中の動物モデルにおいて技術的分野、特に小動物での *In vivo* での技術開発を中心に分担研究を行うこととした。

〔方法〕 ①第Ⅷ因子ノックアウト (KO) マウスに対する第Ⅷ因子補充療法を行うにあたり *neonatal tolerance* 誘導実験を行うための基礎的技術開発を行った (分担者坂田の報告参照)。新生仔 KO マウスに吸入麻酔 (酸素 + 笑気) を用いてヒト第Ⅷ因子を顕微鏡下で上大静脈に注入した。さらに②マウス及びラットにおける臓器特異的遺伝子導入法の基礎実験を行った。まず、肝に目的遺伝子発現効率を検討するために遺伝子銃を用いて *In vivo* で肝にマーカー遺伝子の導入を検討した。さらに AAV ベクターを用いて肝ならびに腎に臓器特異的遺伝子導入法を開発した (分担者小澤の報告参照)。さらに③血友病に対するモデル犬での補助的肝移植を遂行する分担研究 (分担者吉岡の報告参照) への基礎データとして、ラット補助肝移植モデルを用いて移植グラフトサイズや血流の問題を検討した。

〔結果〕 ①新生仔 KO マウス 60 匹に対し、吸入麻酔 (酸素 : 笑気 = 3 : 7) で麻酔を行い全例安全に行い、ヒト第Ⅷ因子を注入した。②遺伝子銃による肝への遺伝子導入は極めて簡便で、特に分泌系タンパク (血液凝固因子等) は、肝への遺伝子導入で極めて有効に誘導されることが示された。さらに AAV ベクターの門脈注入による肝特異的遺伝子発現に成功し、全身投与に比し少ないベクター量で凝固因子を十分補えることを証明した (分担者坂田の報告参照)。さらにマウス、ラットで腎臓への遺伝子導入を検討し、大腿動脈からカテーテルを用いた導入法 (セルジンガー変法) を開発し、AAV のウイルスタイプ (1 ~ 5) を検討した。筋肉、肝ではすべての型において有効であったが、特に 1 および 5 型が適していた。一方、腎では 2 型のみ有効であった。③種々のラット補助肝モデルを検討し、代謝能を一部補うだけであれば、肝動脈のみを *inflow* とするモデルで十分凝固因子等を補えることを証明した。

〔考察〕 今後本研究班では血友病治療におけるメカニズム解析は KO マウスなどの小動物で、前臨床のためには大動物モデルで検討される。各分担の中で目的が速やかに遂行されるために技術的基盤のサポートを行うことで、有機的に目的が達成可能と考えられた。

A. 研究目的

本研究班では血友病の動物モデルとして第Ⅷ因子 KO マウス及び、血友病犬モデルが用いられている。小林の分担研究ではこれらの動物モデルを用いた治療実験を遂行

する為の技術的問題を解決することを中心
に担当した。まず、1) ヒト第Ⅷ因子補充療法を繰り返し行う際、体内での第Ⅷ因子に対する抗体産生が問題となる。これを克服する為には *neonatal tolerance* を応用し

て、新生仔期に第Ⅷ因子を注入する方法が考えられている (Blood 15:3311, 2001)。しかし、KO 新生仔マウスは体サイズの問題のみならず第Ⅷ因子が欠損しており、静脈内投与が極めて困難である。したがって、まず新生仔 KO マウスに対する安全な第Ⅷ因子注入法開発を目的とした。

次に、2) 第Ⅷ因子欠損を AAV ベクターを用いた遺伝子治療で克服する際、投与ルートを検討が必要である。したがって、成熟マウスでの肝、及び腎をターゲットとした臓器特異的ベクター注入法を検討した。

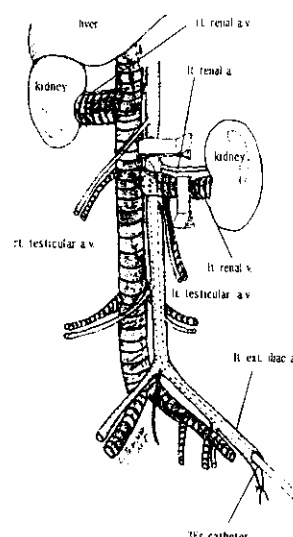
さらに、3) 血友病治療法の一つに生体肝移植が考えられており、第Ⅷ因子が術後どのくらいで発現するか、また移植後にインヒビターが発生するかが検討されている (平成 12 年度吉岡報告書)。今後は、移植グラフトサイズや安全な術式を検討が必要である。そこで、ラット補助肝移植モデルを用いて種々のグラフトサイズ、及び術式を検討することとした。

B.研究方法

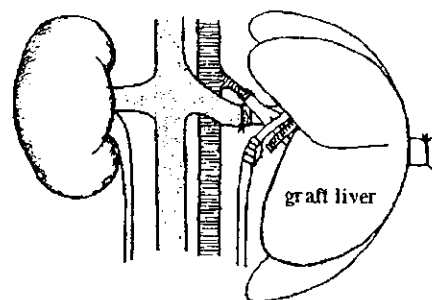
1) KO マウスの新生仔 (生後 2 日以内) を吸入麻酔で導入後、実体顕微鏡下 (×15) 鎖骨下静脈へ 30G の注射針にて約 0.1cc のヒト第Ⅷ因子を投与した。吸入麻酔は通常マウスで用いられる酸素とイソフロレンの混合で行うものと、酸素と笑気を混合する 2 通りの麻酔法を検討した。

2) 肝での種々の遺伝子発現を簡便にスクリーニングするためにまず、*In vivo* で肝臓に遺伝子銃を用いて、マーカー遺伝子を射入した。遺伝子銃としては、手持ち式で簡便な Helios™ Gene Gun System (Bio-Rad, Laboratories, CA) と射入による組織障害を軽減するためのストッパーの改良が行わ

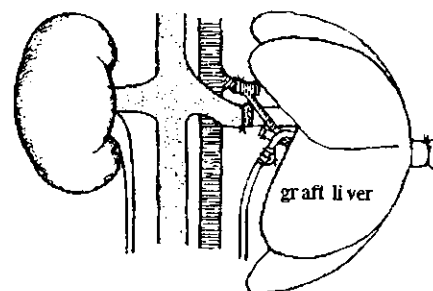
れたハンマー弾方式 PIGG-7 (日本医科機器製作所、大阪) を検討した。マーカー遺伝子はルシフェラーゼ、及び GFP を使用した。さらに、AAV ベクターを用いて、肝及び腎特異的遺伝子発現実験をマウス、及びラットを用いて行った。肝へのアプローチとして、麻酔 (ネンブタール 50mg/kg 腹腔内投与) 下、回盲部静脈より注入した。腎へは、同様の麻酔下、セルジンガー変法を用いて左腎臓特異的に AAV ベクターを注入した (図 1)。



マウス及びラットにおける左腎選択的ベクター注入法 (図 1)



A. 門脈動脈化モデル



B. 動脈再建モデル (図 2)

AAV ベクターは、本班分担研究者小澤らのグループにより供給され、ベクタータイプとして1から5までの型が検討された。

3) 同系間ラットで、2種類の補助肝移植が検討された。すなわち、移植肝の門脈血を動脈血で inflow する場合と肝動脈の再建のみを行うモデルを検討した (図2)。

さらに、後者のモデルでは 30%移植肝とし、移植後の代謝機能等を評価した。

C.結果

1) 第Ⅷ因子 KO 新生仔マウスへのヒト第Ⅷ因子の注入

通常マウスの吸入麻酔は、酸素とイソフロレンが用いられるが、同上新生仔はこれでは不十分であった。そこで、酸素と笑気を3:7で混合し吸入麻酔を行ったところ、体動なく安全に鎖骨下静脈までの皮膚切開が可能であった。新生仔 KO マウスの血管に対する注射針等穿刺は、第Ⅷ因子が注入されれば、穿刺部からの後出血で問題となることはなかった。上記方法で 60 匹施行されたが、全例生存した。

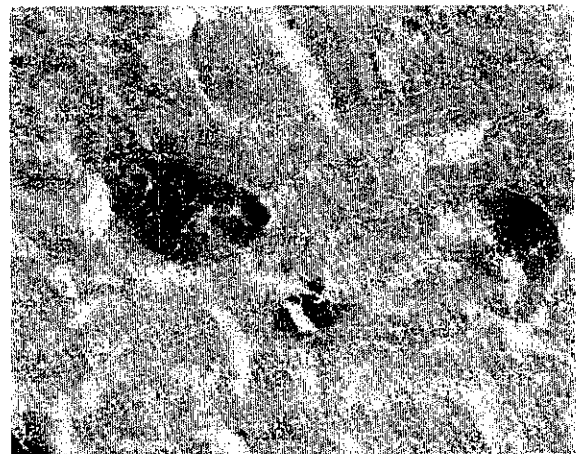
2)–1 遺伝子銃による肝への *In vivo* 遺伝子導入

第Ⅷ因子の産生のメジャーソースとして肝があり、今後肝への遺伝子導入が検討されることから、遺伝子銃を用いて簡便に遺伝子発現のスクリーニングを行った。マーカー遺伝子はルシフェラーゼ及び GFP を使用したが両者とも極めて発現が高かった。また、遺伝子銃の場合射入速度と組織挫滅とが一部相反するところがあるので、肝での至適射入速度を検討した。Helios™ Gene Gun System は約 250psi、PIGG-7 ではその最大気圧 (20kgf: 290psi) で GFP の良好な発現が得られた。ただし PIGG-7 は、さらなる

加速を必要とし改良が必要であった。

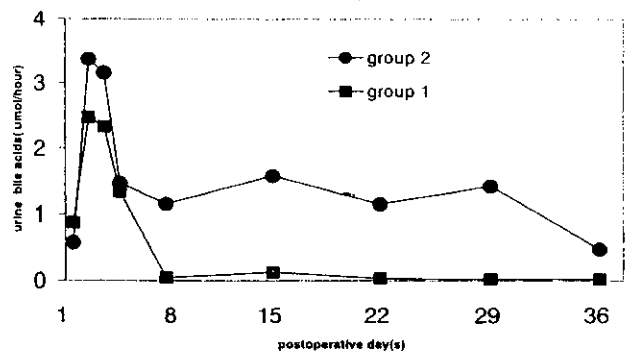
2)–2 AAV ベクターを用いた臓器特異的遺伝子発現

門脈ルートでは、極めて有効に第Ⅷ因子を補うことが可能であった (分担研究坂田及び小澤報告)。一方、腎への選択的血管造影技術は、マウス及びラットで可能であった。しかし AAV ベクターの内 2 型のみで腎での発現が見られた (図3)。



left kidney ×40

AAV-2型による腎での LacZ 発現 (図3)



(図4)

3) ラット補助肝移植モデル

血友病犬での生体肝移植は、自己肝温存式補助肝移植が検討されている。そこで、補助肝移植におけるさらなる安全なグラフトの血流アクセスを考えるためグラフト門脈フローのみを再建し、グラフト肝の胆汁産生を経時的におった。グラフト肝の門脈血が動脈化されるとグラフトは短期間にその機能が低下したが、動脈再建のみでも十分代謝機能を長期に維持することが判明した (図4)。

D. 考察

本研究班では、1) 第Ⅷ因子補充療法におけるインヒビター対策 2) 遺伝子治療 (AAV ベクター) による長期第Ⅷ因子発現 3) 血友病に対する生体部分肝移植の基礎的検討がそれぞれ動物モデルを用いて検討されている。小林の分担とにこれら各分担者の技術的基盤をサポートし、班全体を有機的に進めることとした。

1) 成熟個体では、外来からタンパク等投与された場合にそれに対する抗体産生が生じるが、新生児期にその目的抗原に暴露されることにより免疫寛容が生じる現象 (neonatal tolerance) がある。血友病はその遺伝形式も明らかなどころから、出生前診断が可能である。したがって、前述の neonatal tolerance をインヒビター産生防止法として使用できる可能性がある。本研究モデルとして KO マウスが考えられたが、新生仔期の静脈内投与は体サイズ及び注射針による易出血性の問題が生じていた。そこで分担研究では、この新生仔 KO マウスに安全にヒト第Ⅷ因子を注入する技術開発を第一目標とした。吸入麻酔の種類を検討と、顕鏡下手術により新生仔 KO マウスにおける neonatal tolerance の誘導実験が可能となっ

た。新生仔期に第Ⅷ因子投与によるインヒビター産生抑制の結果は分担者坂田の報告参照。

2) 遺伝子治療による第Ⅷ因子長期産生のために AAV ベクターの肝への注入が行われた。肝へのベクター注入ルートとしては、小開腹による回盲部静脈より注入する方法をとった。全身投与に比し、少ない量のベクターで高用量の目的タンパク産生が可能と考えられた。また、付随して腎への選択的遺伝子導入法の検討、さらに AAV の serotype の検討など極めて短期間に種々の問題を検討できたが、小動物を用いて組織的に検討するメリットがあった。

3) 欠損酸素等のファクターを補充する方法として、欧米では肝移植が行われている。しかし、その侵襲度は多大であり、さらなる改良が必要である。また代謝や酵素の補充を目的とした場合、自己肝の温存、グラフトサイズの縮小など検討すべきことが多い。本テーマに関しては、すでに我々のラボで確立しているラット補助肝移植モデルを用いて急ぎ検討した。酵素補充の場合、グラフトとなる肝は肝動脈の inflow のみで十分対応が可能であり、グラフトサイズも 30%前後まで下げることができる。さらに興味深いことは、長期生存したレシピエントより、移植肝を摘出しても代謝機能を補う能力がレシピエントに残存することが判明した (Unpublished data)。これは、移植肝内の幹細胞がレシピエント中に migration し、そこで分化成熟している可能性があった。

E. 結論

小動物を用いた血友病治療モデルにおいて種々のプロトコール遂行のための技術基盤を確立した。

- 1) 新生仔 KO マウスに安全に第Ⅷ因子を注入する技法を確立した。
- 2) 成熟 KO マウスに対し肝特異的に AAV ベクターの注入法を確立した。
- 3) ラット補助肝移植モデルを用いて移植グラフトの血流再建及びそのサイズ決定を行った。

irradiated melanoma vaccine in a hamster model: Successful treatment of oral melanoma and distant skin lesion. *Cancer Gene Ther* 8:705-712, 2001

5. Xiu, D.R., Hishikawa, S., Sato, M., Nagai, H., Uchida, H. and Kobayashi, E.: Rat auxiliary liver transplantation without portal vein reconstruction Comparison with the portal vein-arterialized model. *Microsurgery* 21:189-195, 2001

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 村上 孝、小林英司. 移植医療への遺伝子銃の応用. *今日の移植* 15:21-26, 2002
2. Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y. and Kubota, K.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method. *Transplant Immunol* (in press)
3. Hakamata, Y., Tahara, K., Uchida, H., Sakuma, Y., Nakamura, M., Kume, A., Murakami, T., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N. and Kobayashi, E.: Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *BBRC* 286:779-785, 2001.
4. Wang, J., Murakami, T., Hakamata, Y., Ajiki, T., Jinbu, Y., Akasaka, Y., Ohtsuki, M., Nakagawa, H. and Kobayashi, E.: Gene-gun-mediated oral mucosal transfer of interleukin 12 cDNA coupled with an

2. 学会発表

国内	28	件
海外	3	件

G. 特許獲得なし

研究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, M. and Sugo, T.	Hereditary Disorders of Fibrinogen	Ann. New York Acad Sci	936, 65-88	2001
Madoiwa, S., Nakamura, Y., Mimuro, J., Furusawa, S., Koyama, T., Sugo, T., Matsuda, M., Sakata, Y.	Autoantibody against Prothrombin aberrantly alters the Proenzyme to facilitate Formation of a Complex with its Physiological Inhibitor Antithrombin III without Thrombin Conversion	Blood	97, 3783-3789	2001
Mimuro, J., Muramatsu, S., Hakamada, Y., Mori, K., Urabe, M., Madoiwa, S., Hirose, S., Ozawa, K., Sakata, Y.	Recombinant Adeno-Associated Virus Vector-Transduced Vascular Endothelial Cells Express The Thrombomodulin Transgene Under The Regulation of Enhanced Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter	Gene Therapy	8, 1690-1697	2001
三室淳：高久史麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋二、金倉謙	血友病の遺伝子治療	ANNUAL REVIEW 血液	207-214	2002
Okada, T., Shimazaki, K., Nomoto, T., Mizukami, H., Monahan, J., Ozawa, K., and Kawai, N.	AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death	Method. Enzymol	346: 378-393	2002
Okada T, Mizukami H, Urabe M, Nomoto T, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, Ozawa K.	Development and characterization of an antisense-mediated prepackaging cell line for adeno-associated virus vector production	Biochem Biophys Res Commun	Oct 19;288(1):62-8.	2001
Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, Okada T, Kume A, Nishino H, Monahan J, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K.	Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells	Cancer Gene Ther	Feb;8(2):99-106	2001
A.Yoshioka, M.Shima, K.Fukutake, J.Takamatsu, A.Shirahata and the KOGENATE FS study group.	Safety and efficacy of a new recombinant FVIII formulated with sucrose(rFVIII-FS) in patients with haemophilia A: a long-term, multicentre clinical study in Japan	Haemophilia	7:242-249	2001
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	97:669-677	2001
A.Shirahata, T.Kamiya, J.Takamatsu, T.Kojima, K.Fukutake, M.Arai, H.Hanabusa, H.Tagami, A.Yoshioka, M.Shima, H.Naka, S.Fujita, Y.Minamoto, J.Kamizono and H.Saito.	Clinical trial to investigate the pharmacodynamics, safety, and efficacy of recombinant factor VIIa in Japanese patients with hemophilia with inhibitor	Int J hematol	73:517-525	2001
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

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号ページ	出版年
新井盛夫、小野織江、嶋緑倫、白幡聡、三間屋純一	インヒビターを保有する血友病患者におけるノボセブンの使用経験；第1報 関節内出血	血栓止血誌	12:348-355	2001
新井盛夫、小野織江、嶋緑倫、白幡聡、三間屋純一	インヒビターを保有する血友病患者におけるノボセブンの使用経験；第2報 手術症例・消化管出血症例	血栓止血誌	12:527-532	2001
Hakamata, Y., Tahara, K., Uchida, H., Sakuma, Y., Nakamura, M., Kume, A., Murakami, T., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N. and Kobayashi, E.	Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research	BBRC	286:779-785	2001
Xiu, D.R., Hishikawa, S., Sato, M., Nagai, H., Uchida, H. and Kobayashi, E.	Rat auxiliary liver transplantation without portal vein reconstruction – Comparison with the portal vein-arterialized model	Microsurgery	21:189-195	2001

研究成果の刊行物・別刷

20010736

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