

- 2008.11/20-22 大阪
3. 青木慎也, 柳川芳江, 原田修二, 山本哲也, 坂田洋一, 勝村成雄, 五十嵐靖之: N, N, N トリメチルスフィンゴシン類縁化合物による FVIIa 活性の阻害効果 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 2008.11/20-22 大阪
  4. 大森司, 石渡彰, 柏倉裕志, 窓岩清治, 鈴木英紀, 見供克之, 長谷川護, 三室淳, 坂田洋一: 血小板への活性化型血液凝固第 VII 因子の発現による血友病遺伝子治療 第 70 回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都
  5. 石渡彰, 三室淳, 水上浩明, 小野文子, 柏倉裕志, 大森司, 諏合輝子, 窓岩清治, 保富康宏, 小澤敬也, 坂田洋一: 非ヒト霊長類モデルにおける血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討 第 70 回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都
  6. 水上浩明, 八木洋也, 三室淳, 石渡彰, 窓岩清治, 卜部匡司, 久米晃啓, 坂田洋一, 小澤敬也: AAV ベクターを用いた遺伝子導入法と免疫反応 血友病 B に関する検討を中心に 第 70 回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都
  7. 原陽子, 卜部匡司, 伊藤孝幸, 水上浩明, 三室淳, 坂田洋一, 久米晃啓, 小澤敬也: AAV を利用した第 19 番染色体 AAVS1 領域特異的遺伝子組込み法 導入遺伝子の発現期間に関する検討 第 70 回日本血液学会総会 2008.10/10-12 京都

G. 知的所有権の出願・取得状況

「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506)

状態: 出願中 (未公開) (2005/10/28)

「RNA ウイルスのスパイクタンパク質でシュードタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」

(D4-A0510)

状態: 出願中 (未公開) (2005/10/28)

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書（平成20年度）

AAV ベクターによる血友病遺伝子治療の基礎実験

研究分担者：自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部  
教授 小澤敬也、講師 水上浩明

研究要旨 AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に向けて基礎的検討を行った。AAV ベクターは骨格筋や肝臓などの非分裂細胞への遺伝子導入に有用であるが、より高い効果を得るためにキャプシド及びプロモーターの点から検討を行うとともに、導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して測定系を改良し、遺伝子導入の効果との関係を明らかにした。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた血友病の遺伝子治療法に関する検討を行い、高効率のベクター作製法、遺伝子導入効率改善法、遺伝子発現増強法などの基盤技術開発を図る。また、主に第IX因子の遺伝子を用い、これまでに得られた基礎的検討の成果を応用してマウス及び霊長類モデルに対する投与を行い、治療法の有効性と安全性につき検討する。

B. 研究方法

・AAV ベクターに関する基礎研究：導入遺伝子の発現に大きな影響を与えると考えられる免疫反応に関して、様々なアッセイ系を確立するとともに動物個体レベルでの解析を行った。特にベクターキャプシドに対する中和抗体は低力価であっても大きな影響を与える事が示唆されたことから、検出感度の向上を目指して改良を行った。

・遺伝子導入動物実験：主に霊長類（カニクイザル）において様々な構築の AAV ベクターを骨格筋又は肝臓を標的として投与し、遺伝子発現効率の確認と並行してベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫反応の解析、投与した組織の検討などを行い、有用性を総合的に判定した。

また、ベクターに対する中和抗体が陽性である個体への投与方法として、ベクター投与方法に関する検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えている。マウスを用いた動物実験は自治医大で実施するが、動物倫理面（動物愛護上の配慮など）を含めて自治医大動物実験指針規定に沿って行った。医薬基盤研・霊長類医科学研究センターとの共同研究として実施するサルの実験では、国立感染症研究所「動物実験ガイドライン」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

・AAV ベクターに関する基礎研究：各血清型のキャプシドに対する中和抗体の力価を測定する系につき、検出感度の向上を目指した改良を行った。具体的には、比色定量法および標的細胞に関する検討に加えて培養細胞に対する感染増強法を探索し、培地に糖類を加えることで AAV ベクターの感染効率が飛躍的に増強するこ

とを見出した。この方法を通じて実験条件の最適化を行い、中和抗体の検出感度を高めることができた。この方法を用いて過去のサンプルを再検討するとともに、遺伝子導入実験の対象となるカニクイザルのスクリーニングを行い、真に陰性もしくは弱陽性の個体を選定した。

・遺伝子導入実験：霊長類（カニクイザル）に対して凝固第IX因子遺伝子を搭載したベクターを投与した。その結果、8型のベクターでは、改良法にて中和抗体陰性と判定した個体において治療域に至る血中濃度が認められ、長期的な発現が得られた。また、より実際の投与方法として末梢静脈へのベクター注入によっても効果が得られることを2頭において確認した。更には 中和抗体陽性の個体に対する投与方法として門脈内への急速大量注入法を行ったところ、試みた3頭の全てにおいて治療域に達する効果が長期にわたり得られた。

#### D. 考察

骨格筋・肝臓を標的とした遺伝子導入法に関しては自験例を含めて世界中で様々なノウハウの蓄積が見られ、用いるベクターの血清型及びプロモーターについても概ね結論が得られている。これまでの結果を含めて総括すると、血清型に関しては、骨格筋には1型が最も有効と考えられており、肝臓を標的とした場合には8、9型の有用性が高い。また、プロモーターに関しては、肝臓を標的とした場合には今回用いたhAATプロモーターなどが有力と考えられている。また、ベクターに対する中和抗体が存在すれば遺伝子導入に対する影響が非常に大きいものと考えられることから、ベクター投与に際しては事前に中和抗体のスクリーニングを行う必要があり、これはヒトに対して治療を行う際にも必須の検査であると思われる。なお、9型に対する中和抗体の検出感度に関しては今後更に改良が望

ましい。これは効率よく感染する細胞が見出されていないため、より多くのベクター粒子が必要であることが主な原因である。従って、より好適な細胞を見出す事が重要であり、肝臓・肺由来の細胞株などを幅広く試すと共に、他の施設における情報にも気を配る必要がある。

8型、9型などに由来するベクターは動物実験の結果からは非常に有望であるが、一方で中和抗体陽性率に関しては未知である。遺伝子治療の対象者をできるだけ多くするため、このような陽性例に対しても何らかの方策がある事が望ましい。そこで、肝臓を標的とした門脈内への注入に際して検討を行った。すなわちベクター溶液注入の前後に生理食塩水を急速かつ大量に注入することで、ベクターが標的組織に分布する前に血液中の抗体と反応して不活化されるのを防ぐことにある。このような研究はこれまでなされておらず、注入量の決定は困難であったが、肝臓・門脈内の血管床を十分に満たし、かつ循環器系をはじめとする各器官への悪影響を生じないこと、の2点から検討した。総注入量を体重の2%とした個体では、一過性に心不全が認められたことから、更に少ない量で検討を重ねた結果、1%程度でも安全に効果が得られることが判明した。今回の検討では用いたサルの大きさの関係もあり、開腹下に門脈を直接穿刺する操作を取り入れたが、ヒトに対しては既存のカテーテルによって同様の操作が可能であり、より低い侵襲で実施可能であると考えている。

血友病Bに対する遺伝子治療は米国でスタートしたものの、骨格筋を標的として2型AAVを用いた方法では発現効率が不十分であり、肝臓を標的とする投与方法についても長期的な効果は認められなかったと報告されている。最近8型のベクターを用いた臨床研究が認可されたが、まだ開始には至っていないようである。更には、より患者数の多い血友病Aの場

合には技術的な課題が数多く残されており、臨床研究への移行にはしばらく時間がかかるものと思われる。したがって、世界的に見ても血友病の遺伝子治療法開発はまだ初期の段階にあり、本研究グループが貢献できる部分は大きいものと思われる。今後更に霊長類モデルなどにおいて検討を重ねていくことで、より良い治療法に結びつく成果を挙げていきたい。

#### E. 結論

AAV を用いた血友病に対する遺伝子治療法につき、導入・発現効率に影響すると思われる因子を解析し、肝臓及び骨格筋の各々において *in vivo* における最適な条件を見出した。以上の技術的な進歩が血友病の治療に真に役立つ遺伝子治療法の開発に通じることが期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表（原著論文）

Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Gene Ther (in press)**

Takei, Y., Saga, Y., Mizukami, H.,

Takayama, T., Ohwada, M., Ozawa, K., Suzuki, M.: Overexpression of PTEN in ovarian cancer cells suppresses i.p. dissemination and extends survival in mice. **Mol Cancer Ther** 7: 704-11, 2008.

Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpō, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. **J Gene Med** 10: 368-74, 2008.

Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholeslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S.I., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., Ozawa, K.: Protection Against Aminoglycoside-induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-mediated GDNF Gene Transfer Into the Cochlea. **Mol Ther** 16: 474-80, 2008.

#### H. 知的財産権の出願・取得状況

該当なし

血友病（マウスおよびイヌモデル）の遺伝子治療および  
成熟肝細胞・ES 細胞を用いた細胞治療

研究分担者 嶋 緑倫 奈良県立医科大学

研究要旨；血友病患者が血液製剤による補充療法に依存するのではなく、自らの生体内で一定の第 VIII 因子あるいは第 IX 因子を産生し、出血症状の改善を図ることを目的とする。

これまでに我々はマウスを用いた実験において、肝細胞移植が血友病 A に対しても有効な治療手段となることを明らかとしてきた。今回、血友病 B における肝細胞移植の治療効果をマウスモデルを用いて検討した。C57BL/6 野生型のマウスから肝細胞を分離・精製し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの腎皮膜下に移植した。移植群では 0.5-2%の活性の上昇がえられ、移植後 8 週まで維持されるのを確認した。成熟肝細胞を用いた移植治療は、血友病 B に対しても有用な治療法となりえることを示した。

血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた遺伝子治療に関する基礎的検討を行った。EPC は患者末梢血から容易に採取でき、in vitro で大量に増殖可能であるという点で ex vivo 遺伝子治療における理想的な vehicle であるといえる。マウス血液から血管内皮前駆細胞の分離培養法を確立した。細胞は CD34、VEGFR2、vWF などの表面および核内抗原を有し、血管内皮細胞の特徴を有していた。これらの細胞にレンチウイルスベクターを用いて、第 VIII 因子遺伝子を導入した。導入後も、細胞は増殖を続け、培養上清に 10-50U/dl の第 VIII 因子活性を検出した。10 回の継代後も第 VIII 因子活性は低下しなかった。EPC を用いた遺伝子治療の有用性が示唆された。

また、これまで、われわれはヒト第 VIII 因子遺伝子導入 ES 細胞 (Ainv18) を用いた遺伝子治療を試みてきた。第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を脾臓経由で SCID マウスの肝へ移植したところ、ヒト第 VIII 因子抗原をマウス血中に検出したが、脾臓にはテラトーマが形成されていた。次に免疫不全のない血友病 A マウスへの移植を試みた。四塩化炭素の前処置により肝再生刺激を加えた血友病 A マウスに第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を移植した。血中に第 VIII 因子活性は検出されなかったが、免疫組織染色でヒト第 VIII 因子を検出し、移植細胞の肝臓への生着を確認した。ES 細胞が血友病 A を標的とした細胞移植治療への有効な細胞源となりうるものと考えられた。

## 1. 研究目的と背景

血友病 A および B は、重篤な出血症状を呈する疾患である。これまでの治療は、第 VIII 因子あるいは第 IX 因子濃縮製剤を出血時あるいは予防的に静脈内投与する補充療法が主体であったが、自らの生体内で一定の第 VIII (IX) 因子を産生し、必要な止血レベルを維持することにより、出血症状を回避する新たな治療法が期待される。以上の事を達成するための基礎研究として、イヌとマウスモデルを用いて、以下の方法で取り組む。

## 2. 研究方法

## 1) 血友病 B マウスに対する肝ティッシュエンジニアリングの有用性

我々はこれまで、野生型マウスから分離した肝細胞を血友病 B マウスの肝臓に脾臓経由で移植するとレシビ

エントマウスの血中第 IX 因子活性値が増加することから、血友病 B に対して肝細胞移植治療が有効であることを報告してきた。

今回我々は、移植細胞を肝臓以外の部位に移植することにより生体第 2 の肝組織を作成する「肝ティッシュエンジニアリング」が、肝細胞移植同様、血友病 B に対して有効であるか検討を行った。

C57BL/6 野生型のマウスからコラゲナーゼ灌流法にて肝細胞を分離・精製し、細胞外マトリクス成分としてのマトリゲルに混和した上で、同種同系の FIX ノックアウトマウスの両側腎被膜下に移植した。移植後経時的に血中第 IX 因子活性を測定した。また、腎被膜下に作成された肝組織の形態学的評価を HE 染色および PAS 染色で行い、さらに凍結組織切片から Laser Capture Microdissection により採取した腎被膜下肝組織から得られた RNA を用いてマウス第 IX 因子 mRNA の

発現を評価した。

## 2) 血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた血友病 A の遺伝子治療

ex vivo の遺伝子治療はウイルスベクターの全身投与に伴う合併症、発癌および生殖細胞への移行の危険が少なく、安全面から有意義な方法であるが、移植細胞の viability や発現量の問題から有効な成果が得られていない。EPC は患者末梢血から容易に採取でき、in vitro で大量に増殖可能であるという点で理想的な vehicle であるといえる。第 VIII 因子の産生責任細胞として血管内皮細胞が重要な役割を果たしている可能性があり、これを用いた第 VIII 因子の遺伝子治療の有効性が期待される。これまで我々は末梢血から分離したイヌ EPC にレンチウイルスベクターを用いて第 VIII 因子遺伝子を導入した後、細胞外マトリックスと共に NOD/SCID マウスの皮下に移植したところ、細胞の生着と血中へのイヌ第 VIII 因子の分泌を確認した。

本年度は、まず血友病 A マウスの末梢血から EPC を分離し、安定的培養条件を確立する。ヒトおよびイヌからの EPC の分離・培養法は確立したもののマウスの分離・培養は未だ確立されていない。種々の分離条件、培養条件を試みた。得られたマウス EPC の表面抗原、細胞内抗原について検討した。次にレンチウイルスベクターを用いてマウス EPC をヒト第 VIII 因子発現細胞に改変し、第 VIII 因子分泌能を評価した。

## 3) マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植による血友病 A の細胞療法

われわれは tetracycline 誘導により遺伝子の過剰発現が可能なマウス ES 細胞 (Ainv18) を用いてヒト第 VIII 因子遺伝子を導入した後、内胚葉条件で分化誘導したところ、培養上清に第 VIII 因子活性および抗原を検出した。本年度はセルソーターによる細胞選択培養により、より効率的な第 VIII 因子産生細胞の選択を行い、血友病 A マウスへの細胞移植をおこなった。

## 3. 研究結果・考察・今後の展望

### 1) 血友病 B マウスに対する肝ティッシュエンジニアリングの有用性

C57BL/6 野生型のマウスから分離・精製した肝細胞を、マトリゲルに混和し、同種同系の FIX ノックアウトマウスの両側腎被膜下に移植した。移植後、レシピエント血中に 0.5-2.0% の第 IX 活性の増加が認められ、それが移植後 8 週まで維持されるのを確認した。作成された肝組織は形態学的に正常な肝組織構造を形成しており、また、第 IX 因子 mRNA の発現が認められた。以上から、成熟肝細胞を用いた肝ティッシュエンジニアリングの手法は、肝細胞移植と同様、血友病 B に対する有用な治療法であると考えられた。

### 2) 血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた血友病の遺伝子治療

rhG-CSF を前投与した 20 匹の C57BL/6 マウスから血液を採取し、比重遠心法にて単核球分画を分離し、コラゲンをコーティングしたプレート上で VEGF を含む培地

を用いて培養した。約 4 週間後に数石様細胞のコロニーを確認した。細胞集団の表面抗原あるいは核内抗原をフローサイトメトリーで測定したところ、細胞は CD34、VEGFR2、vWF などの血管内皮細胞の特徴を有していた。細胞はさかんに増殖を続け、20 代以上継代を重ねても細胞の形態と増殖力は保持されており、マウス末梢血由来の血管内皮前駆細胞の分離培養に成功した。これらの細胞にレンチウイルスベクターを用いて、第 VIII 因子遺伝子を導入した。導入後も、細胞は増殖を続け、培養上清に 10-50U/dl の第 VIII 因子活性を検出した。10 回の継代後も第 VIII 因子活性は低下しなかった。今後は、この細胞を免疫不全のない第 VIII 因子 KO マウスに移植し、治療効果やインヒビター産生の有無について検討する予定である。

### 3) マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植による血友病 A の細胞療法

第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を脾臓経由で SCID マウスの肝へ移植した。ヒト第 VIII 因子抗原をマウス血中に検出し、ES 細胞からの第 VIII 因子の分泌が確認されたが、脾臓にはテラトーマが形成されていた。次に免疫不全のない血友病 A マウスへの移植を試みた。四塩化炭素の前処置により肝再生刺激を加えた血友病 A マウスに第 VIII 因子産生 Ainv18 ES 細胞を移植した。血中に第 VIII 因子活性は検出されなかったが、肝組織からヒト第 VIII 因子 mRNA が検出され、免疫組織染色でもヒト第 VIII 因子を検出し、移植細胞の肝臓への生着を確認した。現在、テラトーマの発生の有無について観察中である。ES 細胞が血友病 A を標的とした細胞移植治療への有効な細胞源となりうるものと考えられた。

## 4. 研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：

柴田 優、田中一郎、野上恵嗣、櫻井嘉彦、辰巳公平、西屋克己、荻原建一、矢田弘史、粕田承吾、織順一  
奈良県立医科大学消化器・総合外科学教室：

高 濟峯、中島洋介

奈良県立医科大学循環器腎臓代謝内科：久保篤史

東京女子医科大学先端生命医学研究所：大橋一夫

## 5. 研究発表

### 原著論文

1. Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. J Biol Chem. 2008 Dec 1. [Epub ahead of print]
2. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits

- interactions with factor IXa. *Br J Haematol.* 143: 409-20, 2008
3. Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Sakurai Y, Matsumoto T, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M. Selective factor VIII and V inactivation by iminodiacetate ion exchange resin through metal ion adsorption. *Br J Haematol.* 142: 962-70, 2008
  4. Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation.* 86: 167-70, 2008.
  5. Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 106-10, 2008.
  6. Kasuda S, Kubo A, Sakurai Y, Irion S, Ohashi K, Tatsumi K, Nakajima Y, Saito Y, Hatake K, Pipe SW, Shima M, Yoshioka A. Establishment of embryonic stem cells secreting human factor VIII for cell-based treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 6: 1352-9, 2008.
  7. Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, Shima M, Hisanaga M, Kanehiro H, Okano T, Yoshizato K, Nakajima Y, Yoshioka A. Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost.* 99: 883-91, 2008.
  8. Uchida Y, Sakurai Y, Ogiwara K, Chiyonobu T, Higuchi B, Tanaka I, Shima M, Yoshioka A. Successful management of Mallory-Weiss syndrome in a haemophilia A patient with inhibitor by recombinant activated factor VII. *Haemophilia.* 14: 841-3, 2008.
  9. Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M. Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Biochim Biophys Acta.* 1784: 753-63, 2008.
  10. Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Giddings JC, Yoshioka A, Shima M. Identification of a thrombin-interactive site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *Br J Haematol.* 140: 433-43, 2008.
  11. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫. わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する3年間の継続調査 予後因子に関する検討. *日本血栓止血学会誌* 19: 140-153, 2008.
  12. 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生,

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

カニクイザル肝臓に対する経門脈的遺伝子導入方法の確立

研究分担者：小林英司 自治医科大学 教授

（研究協力者：菱川 修司 自治医科大学 講師）

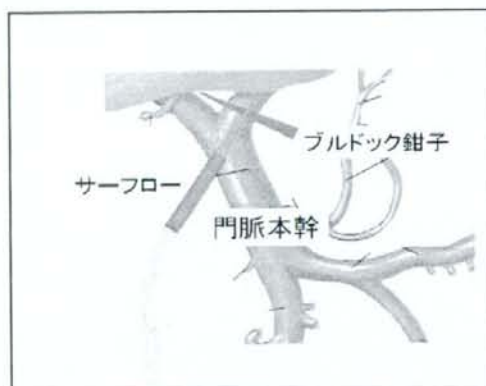
研究要旨：本計画の前臨床モデル確立のためカニクイザル肝臓に対する経門脈的遺伝子導入手法を完成させた。生体カニクイザルを使い「門脈本幹直接穿刺法」にて AVV ベクターによる肝臓への遺伝子導入手術を実施した。3例全例共に出血や門脈狭窄等の術後合併症は認められなかった。

#### A.研究目的

血友病の遺伝子治療として、欠損凝固因子を遺伝子導入によって補う試みがこれまでなされてきており、我々も種々のウィルスベクターや非ウィルス法を駆使して、遺伝子導入実験を行ってきた。今年度は、現在までマウス実験において導入が確認されている AVV ベクターによる肝臓への遺伝子導入に関し、前臨床として生体カニクイザルを対象とした手術手技を開発・確立することを目的とした。

AVV ベクターの門脈注入による肝臓における遺伝子発現は、マウスを対象にした実験では確認されているが、現在までのところ前臨床となるサルを使ったそれでは成功していない。原因として「対象とするカニクイザル血液中に AVV ベクターに対する中和抗体が存在し、注入後ベクターが肝臓に到達する前に抗体により中和されてしまう」という理由が推測されていた。そこでまず手技の確立のため他の実験で犠牲死したサルを用いてカテーテル留置等の条件設

定を行った。さらにベクター注入開始前に門脈血流を遮断し、生理食塩水等で門脈内を flash out させた後に AVV ベクターを注入する方法（門脈本幹直接穿刺法）を行った（図1）。



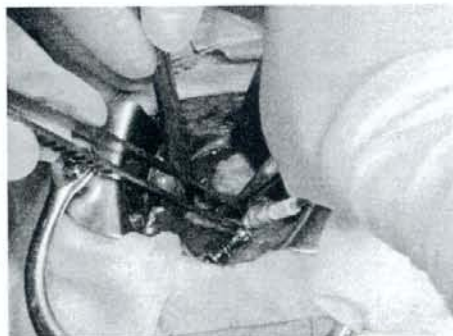
（図1：門脈本幹直接穿刺法スキーマ）



## B. 研究方法

医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターにて2007年12月から2008年7月までにカニクイザルを対象に計3回(3頭)の本実験を行った。

全身麻酔下に、右季肋下に皮膚を切開(約10cm)し肝門部を明らかにした。門脈本幹ならびに門脈左右枝を露出した後に、門脈本幹より血管留置針(サーフロー・20G:テルモ㈱)を挿入した。次に血管留置針先端を門脈左枝に誘導し、門脈左枝をブルドック鉗子にてクランプした後に、同留置針を通じて生理食塩水(flash out)→AAVベクター溶液→生理食塩水を順に門脈に直接注入した。門脈注入終了後、血管留置針を抜去し、血管壁穿孔部を8-0ナイロンにて縫合閉鎖した。止血確認後、腹壁を4層にて閉鎖し手術を終了した(図2)。



(図2: 肝門部処置図)

## C. 研究結果

実験に使用したカニクイザルの体重は、其々5.5, 5.1, 5.8 ( $5.5 \pm 0.4$ ; Mean  $\pm$  SD) kgであった。総手術時間は1時間53分 $\pm$ 5分で、術中の出血量はいずれも微量であった。肝門部を露出後、門脈本幹ならびに門脈左

枝の外径を測定したところ、それぞれ  $6 \pm 0.8$ ,  $4 \pm 0.8$  mm であった。血液 flash out 用の生理食塩水量は3回共 40ml で注入時間は  $56 \pm 11$  秒、ベクター溶液量はそれぞれ 10.8, 10ml で注入時間は共に 10 秒、ベクター注入後の生理食塩水量は  $15 \pm 5$  ml、注入時間は  $18 \pm 1$  秒であった。門脈左枝遮断から遮断解除までの門脈左枝阻血時間は  $8 \pm 3.5$  分であった。血管留置針抜去後の門脈穿刺部閉鎖処置もスムーズに行われ、同処置による門脈狭窄等は認められなかった。

## D. 考察・結論

生体のカニクイザル対し開腹下に「門脈本幹直接穿刺法」によるウィルスベクターの門脈注入実験を行い全例とも成功した。全ケースにおいて総手術時間が2時間以内かつ門脈阻血時間も8分程度で処置を完遂でき、出血や門脈狭窄等の術後合併症も認められなかった。

同システムは前臨床実験としてはほぼ完成されたモデルと考えられる。今後は同システムを基盤とした、実際の臨床治療時における遺伝子導入方法を検討する予定である(図3)。



(図3: 手術風景)

F. 研究発表

論文発表

1. Madoiwa, S., Yamauchi, T., Kobayashi, E., Hakamata, Y., Dokai, M., Makino, N., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Ohmori, T., Mimuro, J., Sakata, Y.: Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A. *J Thromb Haemost.* Feb 13, 2009 (Epub ahead of print)

2. 学会発表

該当なし

3. 著書・総説

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究対策研究事業）

分担研究報告書

遺伝子治療用サル免疫不全ウイルス(SIV)；SIVベクターの基本性能・生産性データの取得

研究分担者：ディナベック株式会社

代表取締役社長 長谷川 護

#### 研究要旨

レンチウイルスベクターは、分化した非分裂細胞への遺伝子導入効率が高く、導入遺伝子が宿主染色体に組み込まれ長期にわたって発現が持続する。また、シュードタイプ化による広範な細胞や組織への遺伝子導入能を有していることから、血友病に対する遺伝子導入用のベクターとして期待されている。我々が開発したサル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターは、有効性、安全性試験の実施あるいは製造法の構築が進められており、開発が進んでいるレンチウイルスベクターのひとつである。このSIVベクターを使用した血友病遺伝子治療を実現するため、ベクターの基本性能および生産性データを取得した。本年度の分担研究として検討した課題は、(1)SIVベクターの生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討 (2)SIVベクターの安定性試験についての2点である。(1)のSIVベクター生産条件については、ベクター生産に使用する細胞として293細胞、293T細胞および293T/17細胞について、それぞれのベクター生産性の比較検討を行い、(2)では、4℃および液体窒素ドライシッパー中における安定性の検討を行った。

#### A. 研究目的

サル免疫不全ウイルス(SIV)ベクターを含むレンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターの欠点を克服するために開発されたベクターで、非分裂細胞に効率よく遺伝子導入でき、シュードタイプ化による広範な細胞や組織への遺伝子導入能を有している。また、遺伝子発現が長期間持続することから、血友病に対する遺伝子治療適応のポテンシャルを有するベクターとして期待される。本研究では、SIVベクターの基本性能および生産性データの取得を

目的とし、SIVベクターの生産に用いる細胞種と生産性の比較検討およびSIVベクターの安定性試験を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) SIVベクターの生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討

SIVベクターは、リン酸カルシウム法により一過性に作製した。293細胞、293T細胞または293T/17細胞に4種類のプラスミド(pGTV-EGFP:EGFP搭載ジーントランスファーベクター、PV 3rd:第3世代パッケージ

ングベクター、pVSVG: VSVG エンベロープ蛋白質発現プラスミド、pCI-rev: Rev 発現プラスミド) をトランスフェクションし、2日後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過した後、それぞれの RNA titer (viral genomes/ml) および functional titer (TU/ml) を測定し、生産性の比較検討を行った。RNA titer の測定は、回収した SIV ベクターから RNA ゲノムの抽出を行い、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法を用い分析した。functional titer (TU/ml) の測定は、回収した SIV ベクターを 293T/17 細胞に感染させ、2 日後、EGFP 発現細胞をカウントし、行った。

#### (2) SIV ベクター安定性試験

高速遠心 (40,000g x 2h) により濃縮した SIV ベクターを 4°C または輸送用液体窒素容器 (ドライシッパー) 内での安定性試験に使用し、functional titer の測定を行った。 $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫で凍結保存してある濃縮ベクターを 37°C ウォーターバスで融解後、4°C に移し放置した。2 時間、5 時間、10 時間後にそれぞれの functional titer の測定を行い、安定性の比較検討を行った。また  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫で凍結保存してある濃縮 SIV ベクターを、液体窒素を充填したドライシッパー内に移し放置した。3 日後、7 日後に functional titer の測定を行い、安定性の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用している SIV ベクターは、アフリカミドリザルから単離した免疫不全

ウイルス (SIVagm TY0-1 株) を基本骨格とし開発されたベクターである。SIVagm TY0-1 株は、サル免疫不全ウイルスの一種であるが、サルやヒトに対する病原性の報告はない。この点で HIV ベクターに比べて安全性が高く、環境に与える影響は少ない。さらに安全性を高めるために SIV で複製に関与する可能性のある遺伝子領域を欠失させている。レンチウイルスベクターの取り扱いには P2 レベルでの取り扱いが認可されており、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従って、「組換え DNA 実験指針」(平成 4 年 1 月 31 日付け文部科学省告示第 5 号) を遵守した実験操作法を行った。

#### C. 研究結果

##### (1) SIV ベクターの生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討

293、293T、293T/17 それぞれの細胞で生産した SIV ベクターの functional titer の測定を行った。その結果、293 細胞を用い生産した SIV ベクターの functional titer は  $1.2 \times 10^5$  TU/ml, 293T 細胞は  $3.5 \times 10^7$  TU/ml, 293T/17 細胞は  $4.3 \times 10^7$  TU/ml であった。同様に RNA titer の測定を行った結果、293 細胞を用い生産した SIV ベクターの RNA titer は  $3.8 \times 10^7$  viral genomes/ml, 293T 細胞は  $3.5 \times 10^9$  viral genomes/ml, 293T/17 細胞は  $5.2 \times 10^9$  viral genomes/ml であった。

##### (2) SIV ベクターの安定性試験

$-80^{\circ}\text{C}$  保存サンプルを 37°C ウォーターバスで融解後、4°C で保存した SIV ベクターのそれぞれの functional titer は、0 時間 (control) ;  $6.5 \times 10^9$  TU/ml, 2 時間後 ;  $5.9 \times 10^9$  TU/ml, 5 時間後 ;  $5.4 \times 10^9$  TU/ml, 10 時間後 ;  $5.1 \times 10^9$  TU/ml であっ

た。-80°C保存してある SIV ベクターをドライシッパー内に移し保存した場合、それぞれの functional titer は、0 日 (control) ;  $3.6 \times 10^{-9}$  TU/ml, 3 日後 ;  $4.8 \times 10^{-9}$  TU/ml, 7 日後,  $3.8 \times 10^{-9}$  TU/ml であった。

#### D. 考察

① SIV ベクターの生産に使用する細胞の比較検討を行った結果、293T 細胞と 293T/17 細胞の間に大きな違いは認められなかった。しかしながら、293 細胞を用いたベクターの生産性は、293T 細胞および 293T/17 細胞を用いた場合に比べてかなり低い効率であった。RNA titer で約 100 倍、functional titer で約 300 倍低い値を示した。293T 細胞は 293 細胞に Simian Virus 40 (SV40) のラージ T 抗原を組み込んで作製された細胞株であり、293T/17 細胞は 293T 細胞のクローン派生株である。293T 細胞および 293T/17 細胞は、SV40 のラージ T 抗原を持ち、SV40 の複製開始点を持つプラスミドの複製を増強するためベクターの生産性が向上した。一方で、SV40 ラージ T 抗原は、癌原性遺伝子であるので、293T または 293T/17 細胞を用い生産した SIV ベクターでは、その安全性に問題が生じる可能性が考えられる。しかしながら、これまでレンチウイルスベクターの投与による腫瘍誘発の報告はなく、ベクター精製過程においてベンゾナーゼ処理等により細胞ゲノム由来の残存 DNA を WHO が示した基準値以下にすることが可能であることから、必ずしも懸念する必要はないと思われる。② SIV ベクターの安定性試験は、実際の臨床試験を想定して行った。GMP に準拠したベクター製造施設で製造された遺伝子治療用ベクターを輸送する場合には、一般的に輸送用の液体窒素容器 (ドライシッパー) を用いる。ベクター製造は海外で実施されることも想

定されるため、本実験においては 7 日後までのドライシッパー内における安定性の検討を行った。その結果、ドライシッパー内に SIV ベクターを 3 日-7 日間保存した場合においても安定であることが分かった。また 4°C 保存においても比較的安定であることが分かった。

#### E. 結論

① SIV ベクター生産に用いる細胞種とベクター生産性の比較検討 ; SIV ベクターの生産に用いる細胞種の検討を行った結果、293 細胞よりも 293T 細胞、293T/17 細胞を用いて生産した方がより高い効率で生産できることが確認できた。② SIV ベクター安定性試験 ; 実際の臨床試験を想定した 4°C または輸送用液体窒素容器 (ドライシッパー) 中における安定性試験を行い、SIV ベクターが安定であることが確認できた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miyazaki M., Ikeda Y., Yonemitsu Y., Goto Y., Kohno R.I., Murakami Y., Inoue M., Ueda Y., Hasegawa M., Tobimatsu S., Sueishi K. and Ishibashi T. Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent models of retinitis pigmentosa. *J. Gene Med.* 10(12): 1273-1281, 2008

Ohmori T., Ishiwata A., Kashiwakura Y., Madoiwa S., Mitomo K., Suzuki H., Hasegawa M., Mimuro J. and Sakata Y.

Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol. Ther.* 16(8): 1359-1365, 2008.

Murakami Y., Ikeda Y., Yonemitsu Y., Onimaru M., Nakagawa K., Kohno R., Miyazaki M., Hisatomi T., Nakamura M., Yabe T., Hasegawa M., Ishibashi T. and Sueishi K. Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am. J. Pathol.* 173(5): 1326-1338, 2008.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 「血液凝固異常の治療方法」 (D4-A0506)

状態：出願済み (国際公開済：国際公開番号 W02007/049749)

(2) 「RNA ウイルスのスパイクタンパク質でシールドタイプ化したレンチウイルスベクターを用いた気道上皮幹細胞への遺伝子導入」 (D4-A0510)

状態：出願済み (国際公開済：国際公開番号 W02007/049752)

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
平成 20 年度 分担研究報告書

長期頻回の第Ⅷ因子製剤投与歴にもかかわらず、手術を契機としてインヒビターを発生した血友病 A 症例の解析

研究分担者 天野 景裕 東京医科大学  
研究協力者 清田 育男、篠澤 圭子 東京医科大学

研究要旨:

血友病 A の重大な合併症としてインヒビターの発生がある。インヒビターの発生要因は様々であり、患者側因子として血友病 A の遺伝子変異に加え、免疫反応修飾物質の影響が報告されている。そして、治療側因子として凝固因子製剤の投与方法や環境などがあげられている。頻回の第Ⅷ因子 (FVIII) 製剤投与歴(Previously Treated Patients: PTPs)があるにもかかわらず人工股関節置換術を持続輸注下で施行後インヒビターが出現した血友病 A 症例を経験したので解析を行った。本症例におけるインヒビターの発生要因は以下のようにまとめられる。

●患者側因子 □低リスク因子:①TNF $\alpha$ とIL-10Gのポリモルフィズムはインヒビター発生高頻度型ではないこと。②第Ⅷ因子遺伝子変異がミスセンス変異であること。□高リスク因子:①血友病 A 重症型 (CRM-)であること。②CTLA-4 遺伝子プロモーター領域がインヒビター発生高頻度型であること。

●治療側因子 □低リスク因子:①PTPsであること。②定期補充療法歴があり、総投与日数 200 日以上であること。□高リスク因子:①初めての大手術であったこと。②持続輸注で止血管理したこと。

インヒビター発生には、第Ⅷ因子遺伝子異常の種類や免疫反応修飾物質などの影響に加えて、手術、感染、投与方法など様々な契機となる要因が考えられる。これら要因を多面的に評価・整理していくことは、重要なことである。今後、第Ⅷ因子遺伝子異常のみならず、日本人における免疫反応修飾物質のポリモルフィズムの特徴を明らかにしていくことが、今後、有用な情報となると考えられる。

A. 研究目的

本邦での血友病遺伝子治療の臨床応用に向け、対象となる患者の遺伝子型の把握は重要な情報となる。血友病患者の個々の症例において、遺伝子型を把握することは、ナンセンス変異、欠失、挿入などに起因する重症例における高率なインヒビター出現を考慮し、遺伝子治療の適切な対象者を選択していくために有用な情報となる。

インヒビターの発生要因は様々であり、

患者側因子として血友病 A の遺伝子変異に加え、免疫反応修飾物質の影響が報告されている。そして、治療側因子として凝固因子製剤の投与方法や環境などがあげられている。

頻回の第Ⅷ因子 (FVIII) 製剤投与歴 (Previously Treated Patients: PTPs)があるにもかかわらず人工股関節置換術 (total hip arthroplasty: THA) を持続輸注下で施行後インヒビターが出現した血友病 A 症例

を経験したので解析を行った。

## B. 研究方法

### ① 凝固学的検査

#### A) 第Ⅷ因子活性 (凝固一段法)

第Ⅷ因子活性 (FVIII:C) は第Ⅷ因子欠乏血漿と APTT 試薬を用い、自動血液凝固測定装置 ACL9000 を用いて測定した。

#### B) 第Ⅷ因子抗原量 (FVIII:Ag)

アセラクロム VILIC:Ag キットを用いて行なった。

### ② DNA 解析

#### A) DNA 抽出

末梢血白血球から抽出した。

#### B) 第Ⅷ因子遺伝子 (*F8*) の解析

*F8* の 5' 非翻訳領域 (プロモーター領域)、各エクソンとそのイントロンとの境界領域、3' 非翻訳領域は、合計 34 分割して PCR にて増幅した。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて分離・精製し、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。また、逆位の解析は Long PCR 法を用いて行った。

#### C) インヒビターに関連する免疫反応修飾物質の遺伝子多型解析

血友病 A とインヒビターの発生に関して Astermark が報告している免疫修飾物質である TNF $\alpha$ 、CTLA4、IL-10G の 3 種類のポリモルフィズムについてそれぞれプライマーを設計し、PCR・ダイレクトシーケンシングを行い、患者のアリルを確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析、およびタンパク質解析については、東京医科大学倫理委員会にて承認された研究計画に基づき、対象者にはインフォームド・コンセントのうえで施行された。特に遺伝子解析結果は重要な個人情報であるため、保護には十分に留意したうえで解析を行った。

## C. 研究結果

### ① 症例

20 歳代 男性、体重 70kg。血友病 A 重症型で 5 歳から各種 FVIII 製剤 (非加熱濃

縮製剤、加熱濃縮製剤、モノクローナル抗体製剤、遺伝子組み換え製剤) の投与を行い、19 歳時硬膜下血腫の際に持続輸注歴 (計 44000 単位) がある。また、定期補充療法歴もあるが、インヒビターを認めたことはなかった。HIV 陽性であるがウィルス量が低く、CD4 も保たれているため内服治療は行っていない。HCV に対しては、インターフェロン治療は、まだ施行されていない。血友病性関節症増悪のため右 THA を rFVIII 製剤 4000 単位投与後、4 単位/kg/h の持続輸注下で施行した。術中出血は少量で、術後も持続輸注を継続し術後 15 日目より連日 2000 単位のボラス投与に変更した。経過中に感染は認めなかった。入院中 rFVIII 製剤を 42 日間計 147,000 単位を使用した。

抜歯後の止血困難に対し、術後 52 日目に回収率を確認したところ 38% と低下、半減期は 1 時間と短縮し、インヒビター 2.1BU/ml を確認した。週 3 回 rFVIII 製剤 2000 単位の定期輸注を継続し低用量免疫寛容導入療法 (immune tolerance induction therapy: ITI) を行ったところ、インヒビター値は最高 90.6BU/ml まで上昇したが、徐々に低下し、1 年後にはインヒビターは消失し回収率 118%、半減期 8 時間と回復した。その後、左 THA を FVIII 製剤ボラス投与下で施行した際にはインヒビターは発生しなかった。

### ② FVIII:C および FVIII:Ag の測定

FVIII:C、FVIII:Ag ともに 1% 未満であり、患者は血友病 A 重症型で FVIII タンパクが血漿中に認められない Cross-Reacting Material-negative (CRM-) であった。

### ③ 第Ⅷ因子遺伝子 (*F8*) の解析

第Ⅷ因子 B ドメインをコードする Exon14 の Glu1038Lys のミスセンス変異を同定した。イントロン 22 の逆位は検出されなかった。

### ④ インヒビターに関連する免疫反応修飾物質の遺伝子多型解析

1) TNF $\alpha$  遺伝子プロモーター領域の -308(G/A)

インヒビター発生率が高頻度でない



-308G/Gであった。

2)CTLA-4 遺伝子プロモーター領域-318(C/T)

インヒビター発生率が高頻度の-318C/Cであった。

3)IL-10G 遺伝子プロモーター領域のCAリピート

IL-10G 遺伝子のCAリピート数は22回である。Astermarkの論文においてインヒビターの発生率の高い134bpアリルはCAリピート数19回に対応すると考えられるが、患者のCAリピート数は20回と21回のヘテロ接合体であり、非134bpアリルに属することを確認した。

#### D. 考察

本症例におけるインヒビターの発生要因は以下のようにまとめられる。

##### ●患者側因子

□低リスク因子：①TNF $\alpha$ とIL-10Gのポリモルフィズムはインヒビター発生高頻度型ではないこと。②第Ⅷ因子遺伝子変異がミスセンス変異であること。

□高リスク因子：①血友病A重症型(CRM-)であること。②CTLA-4遺伝子プロモーター領域がインヒビター発生高頻度型であること。

##### ●治療側因子

□低リスク因子：①PTPsであること。②定期補充療法歴があり、総投与日数200日以上であること。

□高リスク因子：①初めての大手術であったこと。②持続輸注で止血管理したこと。

左THAをボラス投与で施行した際や、硬膜下血腫の治療として持続輸注を行った時にはインヒビターは発生しておらず、それぞれ単独の因子のみでインヒビターの発生を説明することは困難である。インヒビター発生には、第Ⅷ因子遺伝子異常の種類や免疫反応修飾物質などの影響に加えて、手術、感染、投与方法など様々な契機となる要因が考えられる。

#### E. 結論

血友病の遺伝子治療を行っていく上で、インヒビター発生は常に注意しなければならない合併症である。インヒビター発生にかかわる要因を多面的に評価・整理していくことは、重要なことである。

第Ⅷ因子遺伝子異常のみならず、インヒビター発生に関して、日本人における免疫反応修飾物質のポリモルフィズムの特徴を明らかにしていくことが、今後、有用な情報となると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 篠澤圭子、天野景裕、福武勝幸：血友病。染色体遺伝子検査の分かりやすい説明ガイドラインⅡ、日本染色体遺伝子検査学会、東京、2008年
- 2) 照屋勝治、岡慎一、福武勝幸、天野景裕、古谷茂之、林邦彦、真崎夕美子、木村哲：リアルタイムPCR法によるHIV-1 RNA定量キットコバスタqMan HIV-1「オート」の検討。感染症学会雑誌82(1):20-25、2008
- 3) 田中一郎、天野景裕、瀧正志、岡敏明、酒井道生、白幡聡、高田昇、高松純樹、竹谷英之、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、松下正、三間屋純一、吉岡章、嶋緑倫：わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する3年間の継続調査—予後因子に関する検討—。日本血栓止血学会誌19(1):140-153、2008
- 4) 天野景裕：抗HIV療法ガイドライン。治療学42(5):501-505、2008
- 5) 天野景裕：HIV検査関連項目 新臨床検査項辞典、監修：櫻林郁之介、熊坂一成、医歯薬出版、東京、2008年
- 6) 白幡聡、嶋緑倫、岡敏明、天野景裕、花房秀次、瀧正志、三間屋純一、松下

- 正、高松純樹、日笠聡、小阪嘉之、須賀健一、酒井道生、梶原真清恵、高田昇、吉岡章：国内のインヒビター保有血友病患者における遺伝子組み換え活性化型凝固第Ⅷ因子製剤（注射用ノボセブン®）の高用量単回投与に関する臨床研究。日本血栓止血学会誌 19(2):244-256、2008
- 7) 大瀧学、稲葉浩、篠沢圭子、藤田進、天野景裕、福武勝幸：第XⅢ因子遺伝子の Large deletion を病因とする先天性第XⅢ因子欠損症の解析。臨床病理 56(3):187-194、2008
- 8) 松下正、天野景裕、瀧正志、岡敏明、酒井道生、白幡聡、高田昇、高松純樹、竹谷英之、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、田中一郎、三間屋純一、吉岡章、嶋緑倫：インヒビターのない血友病患者の急性出血、処置・手術における凝固因子補充療法のガイドライン。日本血栓止血学会誌 19(4):510-519、2008
- 9) 田中一郎、天野景裕、瀧正志、岡敏明、酒井道生、白幡聡、高田昇、高松純樹、竹谷英之、花房秀次、日笠聡、福武勝幸、藤井輝久、松下正、三間屋純一、吉岡章、嶋緑倫：インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン。日本血栓止血学会誌 19(4):520-539、2008
- 10) 稲葉浩、矢富裕、篠澤圭子、鈴木隆史、天野景裕、福武勝幸：軽症血友病Aから検出される第Ⅷ因子 R531H 変異の第Ⅷ因子活性とその特徴。日本血栓止血学会誌 19(6):788-795、2008
- 11) 天野景裕：Ⅱ. 診断 2. 検査所見. みんなに役立つ血友病の基礎と臨床、編：白幡聡、医薬ジャーナル、東京、2009年. p117-126
- 12) 天野景裕：C. 血栓・止血 2. 凝固異常の臨床。臨床病理レビュー特集第 142号「臨床検査 Yearbook 2009 血液検査編」。臨床病理刊行会、東京、2009年 p99-105.
- 学会発表
- 1) Amano K., Katoh H, Ogata K, Seita I, Nishida Y, Fukutake K: Matrix metalloproteinase(MMP)-3 is not effective for evaluating hemophilic arthropathy. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
- 2) Shinozawa K, Hanabusa H, Kinai E, Suzuki T, Amano K., Fukutake K: Severe factor VII deficiency caused by compound heterozygous mutation (Tyr68Cys and newly 1-bp deletion). XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
- 3) Suzuki T, Yamamoto Y, Koh A, Otaki M, Seita I, Tamura A, Fujita S, Amano K., Kagawa K, Nishida Y, Fukutake K: Idiopathic alveolar hemorrhage in a patient with hemophilia B. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
- 4) Otaki M, Amano K., Seita I, Kamamoto H, Moriyasu F, Fukutake K: Management of intra-arterial embolization therapy for a severe haemophilia A patient with inhibitor. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
- 5) Takedani H, Amano K.: Establishment of the conventional NovoSeven pulse infusion system.

- XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
- 6) Shirahata A, Shima M, Oka T, **Amano K**, Hanabusa H, Taki M, Mimaya J, Matsushita T, Takamatsu J, Higasa S, Kosaka Y, Suga K, Sakai M, Kajiwara M, Takata N, Yoshioka A: Results of clinical study for single/high dose treatment by recombinant activated factor VII in Japan. XXVIth International Congress of the World Federation of Haemophilia, 2008, Istanbul, Turkey.
  - 7) 高橋陽子、鈴木隆史、**天野景裕**、高橋友美、高橋かおり、久野浩史、市川喜美子、須永和代、福武勝幸: 当院における輸血関連インシデント報告について. 第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会、2008 年、福岡
  - 8) **天野景裕**、福武勝幸: 初期研修医の輸血教育を救命救急センター研修開始時に施行する試み. 第 40 回日本医学教育学会大会、2008 年、東京
  - 9) 川原千香子、**天野景裕**、佐々木博一、本間宙、太田祥一、行岡哲男、宮城学: 院内 AED 使用の現状と検証結果の検討—院内蘇生教育効果から—. 第 36 回日本救急医学会総会学術集会、2008 年、札幌
  - 10) 篠沢圭子、**天野景裕**、今西大介、宮崎泰司、朝長万左男、松本智子、稲葉浩、嶋緑倫、福武勝幸: FVPro1618Arg と IVS7+5G>C: 先天性第 V 因子欠乏症の新しい複合ヘテロ接合体変異. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年、大阪
  - 11) 篠沢圭子、稲葉浩、鈴木隆史、**天野景裕**、福武勝幸: 血友病の分子病態の進歩と臨床応用の展望. 血友病の遺伝子解析の現状と今後の課題. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年、大阪
  - 12) 篠沢圭子、**天野景裕**、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、稲葉浩、福武勝幸: 遺伝子解析による血友病 B の保因者診断で生じた問題の検証と課題. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会、2008 年、名古屋
  - 13) 四本美保子、**天野景裕**、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、西田恭治、香川和彦、山元泰之、福武勝幸: HIV 陽性者における慢性腎臓病の有病率とその背景. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪
  - 14) 関根祐介、横張敦子、辻真理子、宍戸紀与、佐藤由利子、金子亜希子、中村薫、明石貴雄、鈴木隆史、**天野景裕**、西田恭治、山元泰之、福武勝幸: 抗 HIV 薬における簡易懸濁法の検討. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪
  - 15) 四本美保子、山元泰之、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、西田恭治、**天野景裕**、香川和彦、福武勝幸: HIV-1RNA 測定法のリアルタイム PCR 法への変更に伴う問題点. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪
  - 16) 稲葉浩、篠沢圭子、清田育男、大瀧学、藤田進、鈴木隆史、**天野景裕**、福武勝幸: 日本人軽症血友病 A の原因となるミスセンス変異では Tyr473Cys が高頻度に検出される. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年、京都
  - 17) 篠沢圭子、鈴木隆史、**天野景裕**、稲葉浩、福武勝幸: シグナルペプチドに検出した先天性第 VII 因子欠乏症のミスセンス変異 (L48P). 第 70 回日本血液学会総会、2008 年、京都
  - 18) 清田育男、**天野景裕**、篠沢圭子、稲葉浩、大瀧学、鈴木隆史、福武勝幸: 頻回の第

Ⅷ因子製剤投与歴にもかかわらず術後にインヒビターが発生した血友病 A の 1 成人例. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特に無し。