私の Translational research —血友病 B 研究の軌跡—

吉岡 章

公立大学法人奈良県立医科大学 理事長・学長

はじめに

私は昭和 39 年（1964 年）4 月，入学式に欠席した学生の補欠として奈良県立医科大学（奈良医大）に入学を許可されました。当時の奈良医大では，他の公立医大と同様，国立大学 1 期校と 2 期校の谷間に入試が行われていたため，多くの補欠合格者がいましたが，入学式に呼ばれることなく入学した極稀な学生の一人でした。

一方，私は 1 歳の夏に，奈良医大の前身県立医学専門学校の附属病院（実際は町村組合立の協同病院）に「重症消化不良症」で入院し，何日も意識が戻らない危篤状態から奇跡的に一命を取り留めたという病歴がありました。そのことは幼少期から父や母から何度となく聞かされていきました。それが何と，医大 6 年生の夏に，泥の染みついた当時の入院経過表（正式なカルテは出ず）が，私と故 福井 弘教授（当時助教授）によって見つけ出され，25 年を経て私の手元に戻って来たのです。そこには昭和 20 年（1945 年）8 月 15 日の終戦の当日も，前日や翌日と同じように丁寧に熱型と「5% ブリ（ブドウ糖リンゲル液の意）200mL 大皮（大量皮下注射の意）」の文字が記載されていました（図 1）¹⁾。そんなわけで，ごく自然に小児科学教室（故 吉田邦男教授）に入局（昭和 45 年）しましたが，当時は小児科学教室がわが国初の血友病 B を報告し（1956 年）²⁾，その後，von Willebrand 病の初の 2 例も報告していた³⁾ことは全く知りませんでした。まして，その後 40 年余にわたり，私が血友病を中心に先天

性・後天性出血性疾患や血栓止血学の教育・研究・診療に従事することになるとは，ゆめゆめ思いもしませんでした。本稿ではそれらの中から特に，血友病 B と第 IX 因子（FIX）を中心に私の Translational research の軌跡を辿ります。

No.	氏名	月	日	12/8	13/8	14/8	15/8	16/8	17/8	18/8
1	吉岡章	8	15	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0
2	脈	70	160	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
3	血圧	60	140	39.0	39.0	39.0	39.0	39.0	39.0	39.0
4	尿量	50	120	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0
5	尿比重	40	100	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0
6	尿糖	30	80	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0
7	尿蛋白	20	60	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
8	尿潜血	10	40	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0
9	尿胆元	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
10	尿胆素	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
11	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
12	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
13	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
14	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
15	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
16	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
17	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
18	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
19	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
20	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
 
75	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
76	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
77	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
78	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
79	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
80	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
81	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
82	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
83	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
84	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
85	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
86	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
87	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
88	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
89	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
90	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
91	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
92	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
93	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
94	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
95	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
96	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
97	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
98	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
99	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
100	尿胆素原	5	20	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0

図 1 入院経過表（昭和 20 年 8 月 5 日～10 月 13 日入院）
8 月 15 日は太平洋戦争の終戦日である

1. 私の血液凝固学研究の入門 (1970年代前半)

1960年代は全国的に「医局講座制解体」, 「インターン制度廃止」闘争が席捲しており, 奈良医大小児科でも先輩大学院生が一斉に退学し, 研究室では福井助教授, 吉矢助手, 片桐中検助手の3先生のみがこぢんまりと研究をされていました。私は, 学生時代の後半には学生ストライキやデモにもいささか疲れ, 入局(1970年)後は「少しは医学の発展に役立つ研究をしたいなあ」と思っていた矢先, 福井先生から「von Willebrand 因子の特性」に関する研究のお手伝いをするよう命じられました。

先生は自ら cryoprecipitate や Cohn 分画 I から FVIII/VWF を精製し, ポリクローナル抗体(実は抗 VWF 抗体)の作製に成功しておられました。私のテーマはその粗精製 FVIII/VWF 分画に各種活性基の阻害物質や分解酵素などを作用させ, FVIII/VWF の変化から, その生化学的特性を検討するものでした。この成果は, 教室として初めて Br. J. Haematol に掲載され⁴⁾, 吉田, 福井両先生のお喜びようは一入のものがありません。その後, これを契機に教室の多くの研究成果が国際誌に掲載されて行くことになりました。

2. 学位論文のテーマ「ヒト第 IX 因子の精製と免疫・生化学的特性」(1970年代後半)

3年間の国立大阪病院小児科(故 吉岡慶一郎 医長)勤務から, 1976年に福井教授(1975年御就任)の最初の人事で帰局したところ, さっそく上記の学位論文のテーマを与えられました。私は研究意欲はあるものの, 学生時代のクラス決議もあって, 学位取得には若干のこだわりを持っていました。福井教授からは, 「何のために大学へ戻たんや? 1年後輩の2人の学位論文はほぼ完成しとるけど, オマエが取るまでは2人は当分オアズケや! 早よ決心せい!」との檄をとばされ, ようやく踏ん切りがついたというところでした。

その頃の小児科学教室の状況は, 同年4月には福井教授の第1期生が何と11人も入局(私はこれを御祝儀入局と呼んでいます)し, 私は教室の

3番手(卒後7年目の筆頭助手)として, 彼らの指導, 医局長, 週2回の外来, 週1回の病棟重症回診, それに加えて自らの学位研究プロジェクトの遂行と, この後の約5年間の超多忙さは, 私の人生の中でも最大, 最悪のものでした。もっともそれ以後今日までのいかに忙しい時でも, いかに困難な時でも, この5年間のことを思えば未だしもと頑張れました。

研究は, 血友病 B 治療製剤(血漿由来のプロトロンビン複合体製剤)を出発材料とし, 主にヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを用いて血漿 FIX の約 3,000 倍まで純化し, ポリクローナル抗体の作製に成功しました⁵⁾。さらに, 各種活性基の阻害剤や分解酵素等との反応による活性と抗原の消長から, FIX の生化学的特性を明らかにしました⁶⁾。この研究には前述の VWF 研究の手法が大いに役立ちました。

研究に際して, 福井教授は, Dr. Kazuo Fujikawa (Univ. Washington, 後年, 教室の若手医師を Research fellow として受け入れていただいた)のウシ FIX 精製に関する論文を示されて, ゲルの活性化からゲルカラムの立て方, アフィニティークロマトの操作法の全てを「1回だけやゾー」と言って, 低温室に何度も出入りしながら懇切丁寧に指導して下さいました。このような1対1の研究直伝手法は, 私が PI になった後も踏襲し, 各種凝固因子のモノクローナル抗体の作製や各々の IRMA や ELISA 測定系の確立をはじめ, 異常 FIX の精製・解析プロジェクトの際にも, 若手研究者に対する指導法として大いに役立ったものと思っています。

研究を開始してからは, 福井先生は「仕事(研究のことを仕事とっておられた)はどこまで行ったか?」, 「論文はまだか?」と, 毎日矢のような催促が入り, 超多忙な平常業務の傍ら, 一歩でも二歩でも前進し, 結果の出たところから論文化するという自転車操業で, 2篇の学位請求論文(教室としては, 初の英文学位論文となった)を約2年間で完成させました。

私の学位論文は, 精緻性ではいささか問題はあったものの, 『血漿から全ての凝固因子や抗凝固因子を純化・精製した上で, 各因子の生化学的特性を検討し, さらに, 抗体を作製して各因子の

抗原量測定系 (ELISA) を確立すること、加えて患者の病型分類を行い、病態解明に繋げる』という、当時の教室の大きな研究方針の一つのプロトタイプとなりました。

ちなみに、福井教授に続いて私が責任者でいた間に、フィブリノゲン、プロトロンビン、第 V, VII, VIII, IX, X, XI, XIII 因子や VWF, AT (III), PC, PS, α_2 -PI, PAI-1 等の純化・精製を教室員が手分けして、本学研究室および留学先ラボで遂行しました。

3. 異常第 IX 因子の解析 —アミノ酸レベルから遺伝子レベルへ— (1980 年代, 1990 年代)

私は 1981~82 年の 1 年 3 か月間、文部省の長期在外研究員として英国 Wales 大学 (当時の正式名称は、Welsh National School of Medicine, その後、University of Wales College of Medicine, そして、現 Cardiff University) の血液学教室、Prof. Arthur L. Bloom の下へ留学する機会を得ました。

ここでは 2 つのプロジェクト (The interaction between FVIII CAg and phospholipids⁷⁾ と, Immunoassays of FIX : Ag using monoclonal antibodies⁸⁾) に励み、幸い 2 論文とも Br. J. Haematol に筆頭著者として掲載されました。

FIX 関係は、Dr. John C. Giddings の指導の下、私の学位論文の手法で FIX を純化し、自らモノクローナル抗体を作製し、このうち 3A6 抗体を用いて FIX 抗原 (FIX : Ag) の ELISA 測定系を確立しました。FIX : Ag を正常量保有する血友病 B⁺家系を日本人で 8 家系、英国人で 3 家系同定しました。一方、FIX : C < 1% の重症型の血友病 B の中から FIX : Ag < 1% の真の血友病 B⁻症例の診断が可能になり、女性血友病 B⁻の報告にも繋がりました⁹⁾。

3A6 抗体の作製では、ちょっとしたエピソードがあります。1982 年の夏、帰国を前にして、良質な抗体の作製に至っておらず、少し焦っていました。折から、Budapest で国際血液学会が開催され、気晴らしを兼ねて Bloom 先生のお供をしました。日本から故 安部英先生や風間睦美先生、桜川信男先生らもお見えで、学術集会もさること

ながら、先生方と宮殿見学やハンガリー料理、音楽など楽しいひとときを過ごしました。

この間、ラボでのハイブリドーマの維持と抗体スクリーニングについては、研究協力者の Eryl (PhD 学生) に私のプロトコルを示し、依頼しておきました。ラボに戻ったところ、「Aki, ちょっと良さそうなのがあったので、捨てずに凍らせておいたよ」とのコメントに、あまり期待もせずチェックしたところ、これがずばり大当たり。その後 30 年余に渡って、私たちの FIX 研究の最重要ツールとなり、さらには、治療用 FIX 製剤 (後述) の作製に繋がりました。

帰国後、この 3A6 モノクローナル抗体カラムを用いて血友病 B⁺の異常 FIX を次々と純化し、FXIa や FVII/TF による FIX 分子開裂様式を SDS-PAGE で解析しました (正常開裂の FIX Niigata, α 位のみ開裂の FIX Kashiwara, 全く開裂しない FIX Nagoya)¹⁰⁾。

ある日、福井教授から「いつまで吸血鬼のように患者さんから 50mL も 100mL も採血させてもらってんねん。少量でやれることをなんとか考えてみんかい!」との強い御達し。そこで、血漿 3mL から出発し、BaSO₄ 吸着・溶出した部分純化サンプルを用いた Western blot 法を開発し、さらに多くの異常 FIX の開裂様式を解析しました (FIX Kawachinagano, FIX Tokyo, FIX Amagasaki, FIX Kiryu, FIX Takatsuki)¹¹⁾。

このころ、異常フィブリノゲンを次々と解析しておられた自治医大の松田道生教授からは、お目にかかる度に「吉岡先生、もっともっと解析数を増やして下さい。私は千代ノ山の優勝回数に迫るつもりです」との激励を受けたものでした。

全国から血友病 B の血漿サンプルを供与いただき、ELISA で FIX : Ag の正常な血友病 B⁺を拾い出し、これらの分子開裂様式を検討したところで、「それではこの患者の FIX 分子のどこがどのように異常なのか」を知りたくなりました。そこで再び大量の患者血漿を供与いただき、3A6 モノクローナル抗体カラムを用いて異常 FIX を純化し、そのアミノ酸分析とアミノ酸シーケンスを九州大学理学部生物学科 岩永貞昭教授と宮田敏行助手 (現国立循環器病研究センター部長) の御指導の下で実施しました。各純化サンプルを

教室の若手研究者（阪井利幸 現国保中央病院副院長，杉本充彦 現奈良医大血栓制御学講座教授）と共に，福岡へ送りました．その結果，8種の異常FIXが同定されました^{12) - 17)}．それぞれアミノ酸置換が判明し，それぞれの異常FIX分子の立体構造異常や活性機能発現上の障害を分子モデルを用いて色々と推定してみることは楽しい作業でした．

しかし，いつまでも大量の患者血漿に依存した研究を続けることにも問題がありました．ちょうどその頃，S. Yoshitake, K. Kurachi 先生（後に若手研究者1名を受入れていただいた）らのグループによってFIXのDNAシーケンスが解明されました（1985年）．そこで，教室でも血友病B患者の白血球DNAを用いてFIX遺伝子解析を開始しました．まず行った前述の血友病B⁺の遺伝子解析の結果¹⁸⁾は，すでに判明していたアミノ酸置換結果と見事に一致しており，岩永研のアミノ酸解析力の素晴らしさに改めて感服いたしました．

これらの成果は，その後，ISTH/SSC (FVIII, IX 小委員会)による国際的な血友病Bデータベースの構築へと結びつきました¹⁹⁾．私もアジアの責任者として参加し，すでに1000種以上のユニーク変異の存在が知られています．

責任研究者はProf. George Brownlee (Oxford 大学)で，彼はその後，教室の若手研究者2名を受入れてくれました．

4. モノクローナル抗体精製第IX因子製剤の開発と市販（1990年代）

従来血友病Bの止血療法剤は，プール血漿から主としてDEAE-セファデックス，または，DEAE-セファロースによる吸着・溶出操作によって作製され，FIXの他，同程度量のプロトロンビン，FVII，FXとPCやPSなどを含有している複合体製剤でした．

そこで，当時の（株）ミドリ十字（伊賀博士）と共同で，前述の3A6抗FIXモノクローナル抗体を用いてFIX単独製剤を開発し，治験²⁰⁾を経て1993年に「クリスマシンM[®]」（現（社）日本血液製剤機構）として市販され，現在も血友病B

患者の止血管理に広く用いられています．これまで幾多の手術時止血管理にも定期補充療法にも安全かつ効果的に使用されて来ています．

5. 血友病B診療上の課題とその克服

1) 遺伝カウンセリング，保因者診断，出生前診断（1980年代，1990年代）

血友病はX連鎖劣性遺伝病であるが故に，診断が確立し，治療方針が確定した後も，本人はもとより両親や血縁者が「遺伝」について考え，悩むことも多い．私は遺伝カウンセリングの重要性を見通した上で，1979年に日本人類遺伝学会が行った第1回遺伝相談研修会を受講しました．その後，故大倉興司先生（東京医科歯科大学 人類遺伝研）の指導の下に，当時の仲間達と共に日本臨床遺伝学会（現 遺伝カウンセリング学会）の設立に参画し，学会認定の遺伝相談認定医，臨床遺伝専門医，遺伝カウンセラーの資格を取得し，日常の小児科診療の傍ら遺伝相談（現在は奈良医大遺伝カウンセリング室として運営されている）を開始しました．

多くの相談の中で最も要望の多いのが保因者診断でした．初期はFIX:C（活性）とFIX:Ag（抗原）（3A6モノクローナル抗体を用いたELISAが有用であった）を複数回測定することにより，保因者診断を行いましたが，後に遺伝子診断を導入することでその精度は飛躍的に向上しました．

遺伝相談の中で，一部出生前診断を強く希望するクライアントがあり，私は日本人類遺伝学会などのガイドラインに則って，産婦人科専門医（カウンセラー）が採取した胎児血や胎盤絨毛を資料とし，FIX測定やDNA診断を行いました²¹⁾．この中で，わが国初の血友病Bの出生前診断も経験しました²²⁾．ある時，これらがある新聞社によってセンセーショナルに報道され，当時は大いに迷惑を被りましたが，血友病の保因者診断と出生前診断は，今日なお世界的な重要課題として世界血友病連合（WFH）や国際血栓止血学会（ISTH）学術集会でも発表・議論され，次々と新しい技術開発や実践の成果が成書にも記載され，原著論文としても報告されています．

2) FIX インhibiterの発生とその対応策の確立 (1990 年代)

血友病 B 患者に FIX 補充療法を行っていますと、患者の 1.5~3% 程度に抗 FIX 同種抗体 (インhibiter) が発生し、FIX の止血効果が消失~減弱して、治療が難渋することがあります。加えて、インhibiter 患者では FIX 製剤や輸血によって、しばしばアナフィラキシーやアレルギー反応を引き起こすことが知られています。わが国のインhibiter 保有 6 症例の臨床的検討に加えて、本インhibiter の免疫学的解析を行い、本抗体は主として IgG4 であること²³⁾、及び、FIX 分子上の結合ドメインは複数あることを同定しました²⁴⁾。

アナフィラキシー様反応を呈した 6 症例のうち、3 例 (うち 1 例はネフローゼ症候群を惹起) に対して FIX の少量皮下投与から始まる減感作療法のプロトコルを開発し、実施したところ、3 例ともアナフィラキシーは消失し、再び通常の FIX 製剤による止血管理が可能となりました²⁵⁾。

3) 新しい治療法の開発 —肝細胞移植法と肝ティッシュエンジニアリング— (2000 年代, 2010 年代)

1985 年まで使用されていた血漿由来非加熱凝固因子製剤による、わが国の血友病患者の C 型肝炎 (HCV) 感染率は約 70% と高率です。一方、FIX と FVIII は共に肝臓で産生されていることから、血友病 A と B は、共に肝臓移植の成功によって肝がんや肝硬変といった基礎疾患はもとより、血友病そのものが治癒することが 1980 年代から知られています。

私達は、この肝移植に代わって肝細胞移植を行うか、あるいは小さな肝組織を生体内のどこかに作製することによって、血友病を治癒させることが可能であろうと考えています。

①肝細胞移植

我々は、奈良医大第 1 外科の大橋 一夫博士 (現東京女子医大) と共同で、血友病 B モデルマウスを用いて野生型同系マウスの肝細胞移植による FIX 産生効果を検討し、1 回移植で約 1%, 2 回移植で 1.8% の FIX : C を得ることが出来ま

図2 東京女子医科大学大橋一夫らによる肝ティッシュエンジニアリングの開発構想

した²⁶⁾。さらに Tatsumi (元 奈良医大小児科大学院生, 現東京女子医大) と Ohashi は広島大学 Prof. Yoshizato らと共同で、肝細胞の大量確保法を開発しました。uPA/SCID (ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータのトランスジェニック重症複合免疫不全) マウスに、少数のヒト肝細胞を移植して、8~10 週後には当該マウスの肝細胞の大部分がヒト肝細胞に置換し、正常ヒト FIX : C を発現することに成功しました²⁷⁾。

また、Ohashi らは、マウスの腎被膜下に正常肝細胞を移植し、当該マウスの部分肝切除によって腎被膜下の肝細胞が著明に増殖することを見出しています²⁸⁾。

②肝ティッシュエンジニアリング

肝ティッシュエンジニアリングとは、肝臓外の異所的部位に機能的肝組織を構築するアプローチであり、血友病の次世代治療として期待されています。Ohashi らは、培養下に肝細胞をシート状に組織化し、予め血管ネットワークを構築した皮下空間内に移植することで、肝細胞と血管内皮の3次元層状化組織の作製に成功しました²⁹⁾。さらに進んで、大橋は我々と連携して、細胞生物学、遺伝子治療学、組織工学、医用工学等の集学的アプローチにより、血友病自己肝細胞を用いた新しい治療展開を計画・実施しています (図2)³⁰⁾。

おわりに

この一連の血友病 B と FIX の研究は、まさに、

Translational research そのものであり、幅広い教室内外、学内外、国内外の研究協力者の御指導と御支援・御協力によるところが大きく、また、多くの患者さんのボランティアな御協力の賜物であり、ここに深く感謝の意を表します。

文 献

- 吉岡章：私はなぜ小児科を選んだか。日本医事新報「ジュニア版」，第243号，1985。
- 吉田邦男，梅垣健三，福井弘，中島清治：Plasma thromboplastin component (PTC) 欠乏による出血性素質。日血会誌 **19**：551-518, 1956。
- 福井弘，馬島保，田川徳治：出血時間延長を伴う AHF 欠乏症の女児2症例。日血会誌 **21**，608-615, 1958。
- Fukui H, Mikami S, Okuda T, Murashima N, Takase T, Yoshioka A：Studies of von Willebrand factor：effects of different kinds of carbohydrate oxidases, SH-inhibitors and some other chemical reagents. Br J Haematol **36**：259-270, 1977。
- Yoshioka A：Studies of human coagulation factor IX. I. Purification and immunological characterization of factor IX. J Nara Med Ass **29**：129-140, 1978。
- Yoshioka A：Studies of human coagulation factor IX. II. Effects of different kinds of carbohydrate oxidases, SH-inhibitors, SH-protectors and some other biochemical reagents on factor IX. J Nara Med Ass **29**：141-147, 1978。
- Yoshioka A, Peake IR, Furlong BL, Furlong RA, Giddings JC, Bloom AL：The interaction between factor VIII clotting antigen (VIICAg) and phospholipid. Br J Haematol **55**：27-36, 1983。
- Yoshioka A, Giddings JC, Thomas JE, Fujimura Y, Bloom AL：Immunoassays of factor IX antigen using monoclonal antibodies. Br J Haematol **59**：265-275, 1985。
- Yoshioka A, Mikami S, Fujimura Y, Sakai T, Fukui H：Haemophilia B⁻ in a girl. Clin Lab Haematol **4**：405-410, 1982。
- Yoshioka A, Okubo Y, Nishimura T, Tanaka I, Fukui H, Ogata K, Kamiya T, Takahashi H：Heterogeneity of factor IX B₂₀. Difference of cleavage sites by factor XIa and Ca²⁺ in factor IX Kashi-hara, factor IX Nagoya and factor IX Niigata. Thromb Res **42**：595-604, 1986。
- Yoshioka A, Sakai T, Yamamoto K, Ohkubo Y, Fukui H：A simple method for analyzing factor IX activation in patients with hemophilia B variants. Thromb Haemost **58**：705-708, 1987。
- Sugimoto M, Miyata T, Kawabata S, Yoshioka A, Fukui H, Takahashi H, Iwanaga S：Blood clotting factor IX Niigata：Substitution of Alanine-390 by Valine in the catalytic domain. J Biochem **104**：878-880, 1988。
- Sakai T, Yoshioka A, Yamamoto K, Niinomi K, Fujimura Y, Fukui H, Miyata T, Iwanaga S：Blood clotting factor IX Kashi-hara：Amino acid substitution of Valine-182 by Phenylalanine. J Biochem **105**：756-759, 1989。
- Sugimoto M, Miyata T, Kawabata S, Yoshioka A, Fukui H, Iwanaga S：Factor IX Kawachinagano：impaired function of the Gla-domain caused by attached propeptide region due to substitution of arginine by glutamine at position-4. Br J Haematol **72**：216-221, 1989。
- Miyata T, Sakai T, Sugimoto M, Naka H, Yamamoto K, Yoshioka A, Fukui H, Mitsui K, Kamiya K, Umeyama H：Factor IX Amagasaki：a new mutation in the catalytic domain resulting in the loss of both coagulant and esterase activities. Biochem **30**：11286-11291, 1991。
- Maekawa H, Sugo T, Yamashita N, Kamiya K, Umeyama H, Miura N, Naka H, Nishimura T, Yoshioka A, Matsuda M：Molecular defect in factor IX Tokyo：substitution of valine-182 by alanine at position P2' in the second cleavage site by factor XIa resulting in impaired activation. Biochem **32** (24)：6146-6151, 1993。
- Miyata T, Kuze K, Matsusue T, Komooka H, Kamiya K, Umeyama H, Matsui A, Kato H, Yoshioka A：Factor IX Bm Kiryu：a Val-313-to-Asp substitution in the catalytic domain results in loss of function due to a conformational change of the surface loop：evidence obtained by chimaeric modelling. Br J Haematol **88** (1)：156-165, 1994。
- Nishimura T, Naka H, Kuze K, Morimoto H, Sugimoto M, Sakai T, Mikami S, Yoshioka A, Fukui H, Tsujimoto A, Hashimoto-Gotoh T：Missense mutations in factor IX Kashi-hara and factor IX Niigata. Acta Haematol Jpn **53**：1030-1035, 1990。
- Giannelli F, Green PM, High KA, Loxier JN, Lillicrap DP, Ludwig M, Olek K, Reistma PH, Goossens M, Yoshioka A, Sommer S, Brownlee GG：Haemophilia B：database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acid Res **18**：4053-4059, 1990。
- 福井弘，吉田豊，遠藤安行，森和夫，小林紀夫，松田重三，藤巻道男，稲垣稔，山田兼雄，本多康次郎，柴田昭，高橋芳右，櫻川信男，貝沼知男，野村稔一，河崎則之，三間屋純一，吉岡章，白川茂，出口克巳，吉岡慶一郎，碓久雄，垣下栄三，高田昇，白幡聡，岸田邦雄：モノクローナル抗体により高度精製したヒト血液凝固第IX因子製剤 (G-1013) の多施設共同臨床研究。血栓止血誌 **2**，302-310, 1991。
- 田中一郎，吉岡章：血友病の出生前診断。小児科診療 **58**：2065-2070, 1995。
- Yoshioka A, Ohkubo Y, Sakai T, Fukui H, Kamiya T, Koresawa M, Matsui A, Matsuda T：Prenatal diagnosis of haemophilia BM. Jpn J Human Genet **33**：395-400, 1988。
- Sawamoto Y, Shima M, Yamamoto M, Kamisue S, Nakai H, Tanaka I, Hayashi K, Giddings JC, Yoshioka A：Measurement of anti-factor IX IgG subclasses in haemophilia B patients who developed inhibitors with episodes of allergic reactions to factor IX concentrates. Thromb Res **83** (4)：279-286, 1996。
- Yamamoto M, Kamisue S, Sawamoto Y, Nakai H, Tanaka I, Shima M, Takamatsu J, Oguni T, Kinoshita S, Giddings JC, Yoshioka A：Factor IX inhibition and epitope localization of factor IX inhibitor antibodies in haemophilia B patients with anaphylactoid reactions. Haemophilia **3** (3)：189-193, 1997。
- Shibata M, Shima M, Misu H, Okimoto Y, Giddings JC, Yoshioka A：Management of haemophilia B inhibitor patients with anaphylactic reactions to FIX concentrates. Haemophilia **9** (3)：269-271, 2003。
- Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A：Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. Transplantation **86** (1)：167-170, 2008。
- 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. Tromb Haemost **99**：883-891, 2008。
- Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, Yokoyama T, Kuge H, Nakajima Y, Yamanouchi M, Naka H, Yoshioka A, Kay MA：Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. Hepatology **41** (1)：132-140, 2005。
- Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, Amanuma T, Iwata H, Yang J, Okano T, Nakajima Y：Engineering functional two- and three-dimensional liver systems *in vivo* using hepatic tissue sheets. Nat Med **13**：880-885, 2007。
- 大橋一夫：今後の展望，4) 肝細胞移植と肝ティッシュエンジニアリング，みんなに役立つ血友病の基礎と臨床 改訂版。大阪，医薬ジャーナル社，2012，pp329-338。