

総 説

血友病 A の分子病態学における進歩

奈良県立医科大学小児科学教室

嶋 緑 倫

ADVANCES IN THE MOLECULAR PATHOPHYSIOLOGY OF HEMOPHILIA A

MIDORI SHIMA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received April 11, 2003

抄録：血友病 A は第 VIII 因子の量的質的異常に基づく出血性疾患である。第 VIII 因子は血漿中ではフォンヴィレブランド因子と複合体を形成して存在している。第 VIII 因子はトロンビンや活性化型第 X 因子により活性化されて第 X 因子活性化酵素複合体において必須の補因子として機能している。フォンヴィレブランド因子は第 VIII 因子を不活性化する活性化プロテイン C を抑制して第 VIII 因子の凝固活性を保護している。血友病 A の臨床的重症度は第 VIII 因子の活性によく相関する。血友病 A の第 VIII 因子遺伝子異常は逆位、点変異、欠失、挿入など計 629 種類の変異が明らかにされている。さらに血友病 A 変異病型の異常第 VIII 因子の解析も進んでいる。トロンビン開裂異常をきたした F VIII Okayama や F VIII Hiroshima が代表的である。血友病 A の一部に第 VIII 因子製剤の補充療法の結果、抗第 VIII 因子同種抗体(インヒビター)が発生する。インヒビターは第 VIII 因子の活性を低下あるいは消失する。インヒビターの主要結合部位は重鎖 A2 および軽鎖 C2 ドメインである。最近、ペプチドレベルの詳細なエピトープ解析が行われている。さらに、インヒビターの第 VIII 因子抑制機序として、第 VIII 因子とフォンヴィレブランド因子、活性化型第 X 因子、トロンビン、リン脂質などの結合抑制が明らかにされている。

Key words : factor VIII, factor VIII gene, thrombin, inhibitor

はじめに

「第 1 子が割礼で出血死し、第 2 子も同様であれば第 3 子は割礼を行ってほならない—ユダヤ律法 *Talmud*, 2 世紀」。これは血友病と考えられる先天性出血性疾患に関する最初の記載である。「hemophilia: 血友病」の病名は 1854-1855 年に記載されているが、凝固因子の異常が原因であることがわかったのは 1905 年、第 VIII 因子の欠乏症であることがわかったのは 1937 年である。血友病 A と異なる病型(血友病 B)が存在することが判明したのは 1952 年である¹⁾。歴史的には英国ビクトリア王朝の血友病大家系が有名である(図 1)。このように血友病の存在につ

いては古くから知られていたが、血友病の病態が明らかにされたのは比較的最近のことである。1989 年、第 VIII 因子の cDNA 構造^{2,3)}が明らかになってから、第 VIII 因子の分子生物学的研究が急速に進み、現在の治療製剤の主流となっている遺伝子組み換え型第 VIII 因子製剤が開発されることになった。第 VIII 因子製剤の進歩は血友病 A 患者の QOL を飛躍的に向上させた。さらに最近では米国を中心に血友病 A の遺伝子治療に関する臨床研究が開始されている。血友病の医療は第 VIII 因子に関する研究の進歩に密接に関連しており、出血に対する治療から予防へ、さらに治療へと向かっている。本稿では血友病 A の病態に関する最近の研究成果について教室の知見を交えて解説

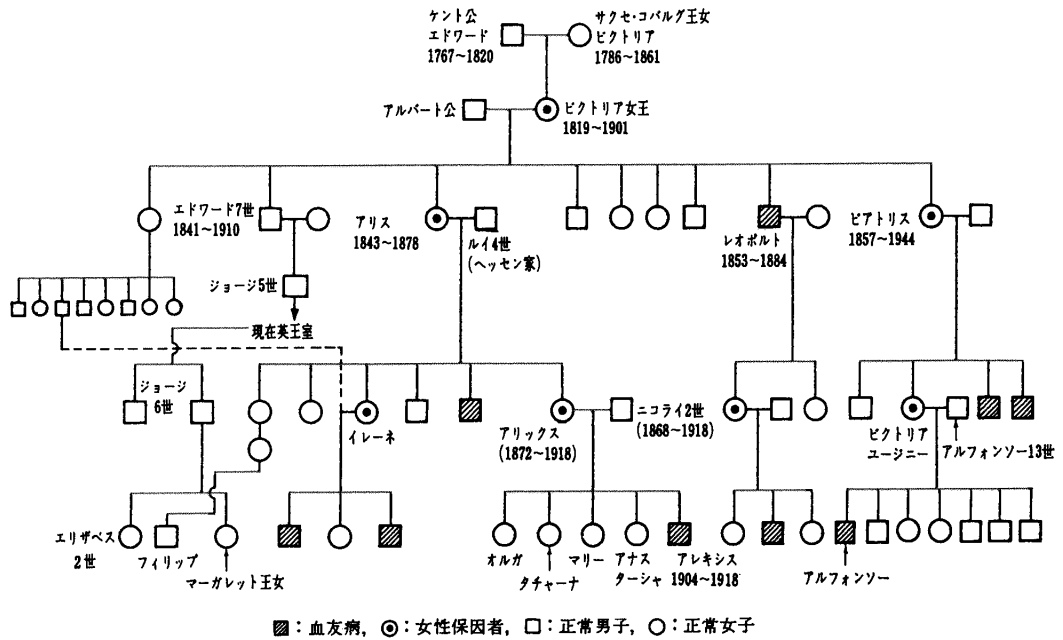


図1. ビクトリア王朝血友病家系¹⁾

する。

I. 血友病 A の概念

血友病 A は幼少期より様々な出血症状をきたす最も頻度の高い先天性血液凝固障害症である。X連鎖劣性遺伝形式によることから患者は通常男性のみである。血友病 A の本態は血液凝固第Ⅷ因子の量的・質的異常による第Ⅷ因子活性の低下である。血友病の出血症状は第Ⅷ因子凝固活性に良く相関する。活性が1%未満を重症型、1～5%を中等症、5%以上の症例を軽症と分類される。約2/3が重症型である。重症型の中には1%未満ではあるが、微量の第Ⅷ因子を有する症例も存在する⁵⁾。2000年度に施行された血液凝固異常症全国調査(聖マリアンナ医科大学 瀧 正志, 立浪 忍)によると、血友病 A の生存患者数は4081人、血友病 B の生存患者数は903人で、日本人男子10万人に対する生存男子患者数は7.2人である⁶⁾。

II. 血友病 A の分子病態

1. 第Ⅷ因子の構造

第Ⅷ因子遺伝子はX染色体長腕末端部のXq28に存在している。第Ⅷ因子遺伝子は186kbにもおよぶ巨大な遺伝子で、26個のエキソンと介在するイントロンから成り立っている。約9kbの第Ⅷ因子cDNAによりコードされた第Ⅷ因子蛋白は2332個のアミノ酸からなる1本鎖糖蛋

白である。アミノ酸組成のホモロジーによりA、BおよびCの3ドメインにわけられ、A1-A2-B-A3-C1-C2の順に配列している²⁻⁵⁾(図2)。循環血漿中に存在する成熟第Ⅷ因子はA1-A2-Bドメインからなる重鎖(90-210kDa)とA3-C1-C2ドメインからなる軽鎖(80kDa)とのヘテロダイマーとして存在している。両鎖はメタルイオンを介して結合している。第Ⅷ因子のAドメインはセルロブラスミンと共通の構造を持っていることから、セルロブラスミンの構造を鋳型として第Ⅷ因子Aドメインの立体構造が推定されている。モデルによると、第Ⅷ因子の3つのAドメインは構型でそれぞれがトライアングル状に結合している(図3)^{7,8)}。最近、軽鎖C2ドメインの結晶構造が明らかにされた。C2ドメインは第Ⅴ因子C2ドメインと同様な構造を有する。すなわち、5本と3本のβシートが重なったβサンドイッチ構造をもち、さらに、3つのヘアピン構造といくつかのループが中心からのびている。特に底面からのびるスパイク様のループは疎水性残基を有しリン脂質膜結合部位と考えられている(図4)⁹⁾。

II. 第Ⅷ因子の機能

1) 第Ⅷ因子活性化機構

第Ⅷ因子は凝固内因系において第Ⅹ因子活性化反応系(tenase複合体)における必須の補因子として機能して

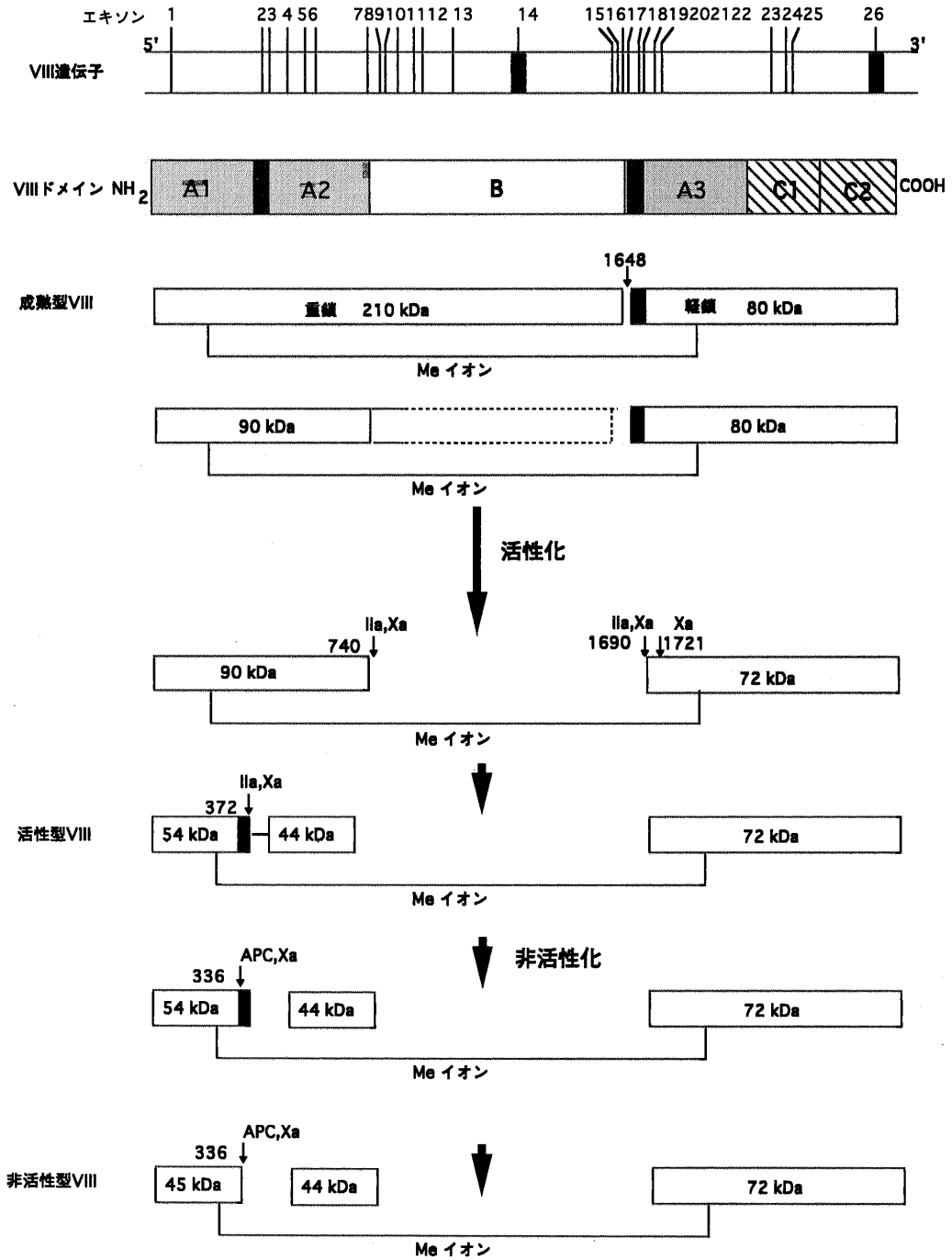


図2. 第Ⅷ因子の構造と活性化および不活性化
 第Ⅷ因子遺伝子は26個のエキソンと介在する25個のイントロンからなる。第Ⅷ因子蛋白はトロンピン(Ⅱa)や活性型第Ⅴ因子(Xa)による限定分解を受けて開裂され、重鎖A1ドメイン(54kDa)、A2ドメイン(44kDa)および軽鎖A3-C1-C2ドメイン(72kDa)からなるヘテロトリマーの活性型第Ⅷ因子に変換される。活性型第Ⅷ因子はさらに活性型プロテインC(APC)やXaにより分解され、A2ドメインが遊離して非活性型の第Ⅷ因子に変換される。

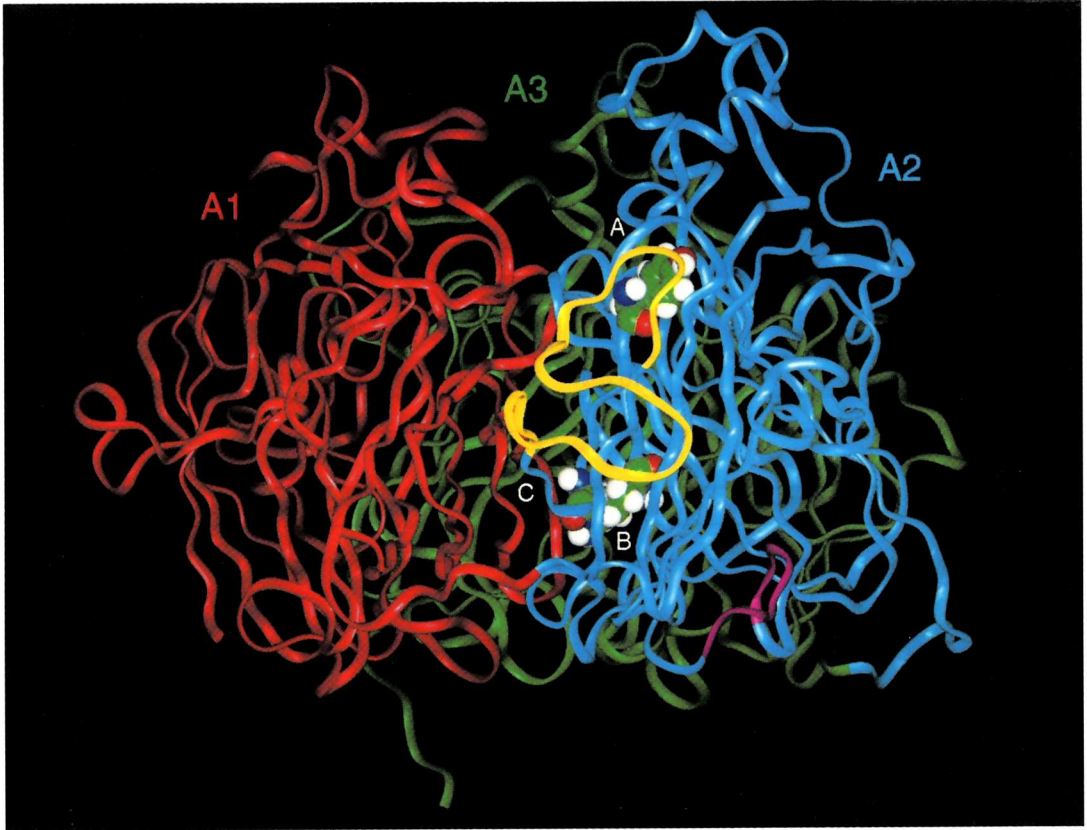


図 3.

図 3. 第Ⅷ因子 A ドメインのモデル

第Ⅷ因子の3つのAドメイン、A1、A2およびA3ドメインは樽型構造でトライアングル状につながっている。赤色の線はA2ドメイン内に同定されている活性化第Ⅷ因子の結合部位である。黄色の線はA2ドメイン内の抗体エピトープ領域を示す。A、B、CはいずれもA2ドメイン内の点変異例である(A: Tyr473Cys, B: Arg531His, C: Gly479Arg)。いずれも抗体エピトープ領域に近接して存在しており、分子表面に存在している。

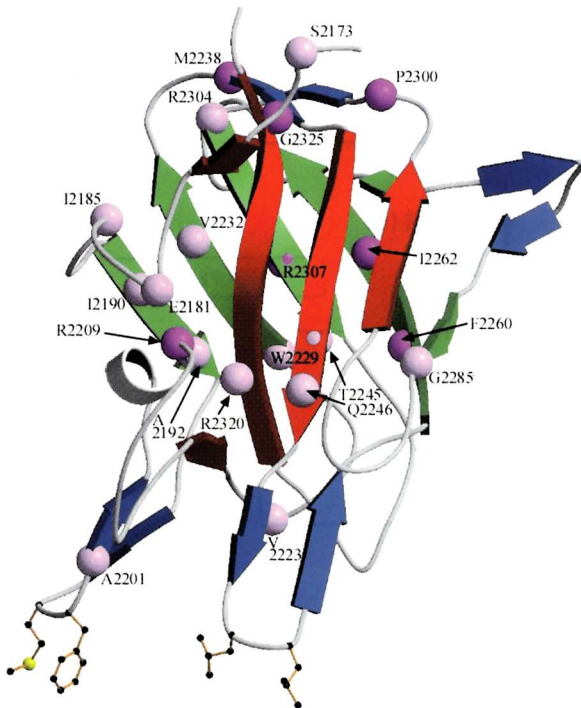


図 4.

図 4. 第Ⅷ因子 C2 ドメインの結晶構造

計 19 の β 構造から成り立ち、8 本の β 中心構造と上下面の構造を有する。数字は C2 ドメイン内の血友病 A 点変異の変異残基番号を示す。紫は重症型、桃は中等～軽症を示す。

いる。実際、第Ⅷ因子の存在により第Ⅹ因子活性化反応のVmaxは20万倍に増幅される¹⁰⁾。第Ⅷ因子はトロンビンや活性型第Ⅹ因子により限定分解をうけて活性型の第Ⅷ因子に変換される(図2)^{11, 12)}。凝固過程で産生されたトロンビンや活性型第Ⅹ因子がpositive feedback機構により第Ⅷ因子を介してさらに増幅されることになる。したがって、第Ⅷ因子の低下は重大な出血傾向をもたらすことになる。

トロンビンは重鎖Arg³⁷², Arg⁷⁴⁰, 軽鎖Arg¹⁶⁸⁹を開裂して、重鎖A1ドメイン由来54kD, A2ドメイン由来44kDa, 軽鎖由来72kDaを産生する。活性型第Ⅷ因子は54kDa, 44kDaおよび72kDaの3ドメインがメタルイオンで結合されたヘテロトリマーである。活性型第Ⅹ因子は、トロンビンと同様にArg³⁷², Arg⁷⁴⁰, およびArg¹⁶⁸⁹を開裂するが、トロンビンとは異なり、さらにArg1721を開裂して活性型第Ⅷ因子に変換する。Arg372およびArg¹⁶⁸⁹の開裂は第Ⅷ因子活性化に必須である^{13, 14)}。両者の開裂パターンはほぼ同じであるが、トロンビン活性化はフォン・ヴィレブランド因子(vWF)やカルシウムイオンに非依存性であるのに対して活性型第Ⅹ因子による活性化はvWFの存在で抑制され、さらに、カルシウムやリン脂質の存在で左右されるなど、相違点があり、異なる意義が考えられている。

トロンビンと活性型第Ⅹ因子はいずれもセリンプロテアーゼで基質である第Ⅷ因子と結合すると分解してしまうために両者と第Ⅷ因子との結合様式は長らく不明であった。最近、両者の活性中心のセリン残基をアンヒドロ化して不活化誘導体を作成することができるようになった¹⁵⁾。アンヒドロ化トロンビンおよび活性型第Ⅹ因子で第Ⅷ因子の各フラグメントに対する結合実験を行うと、トロンビンは重鎖A2および軽鎖C2ドメインに¹⁶⁾、活性型第Ⅹ因子はC2ドメインのみに¹⁷⁾結合することがわかった。トロンビンおよび活性型第Ⅹ因子はほぼ同じ場所を開裂するが第Ⅷ因子に対する結合においては互いに拮抗しない。また、C2ドメイン認識抗第Ⅷ因子同種抗体が軽鎖Arg¹⁶⁸⁹の開裂のみ抑制したことから、トロンビンはA2ドメインに結合してArg³⁷²を開裂し、C2ドメインに結合してArg¹⁶⁸⁹を開裂するが、活性型第Ⅹ因子はC2ドメインに結合して重鎖Arg³⁷²および軽鎖Arg¹⁶⁸⁹の両者を開裂することが判明した。活性型第Ⅹ因子のC2ドメイン内結合部位については、最近ペプチドレベ(Thr²²⁵³-Gln²²⁷⁰)まで明らかにされた¹⁸⁾。本ペプチド存在下で凝固が抑制されることから、活性型第Ⅹ因子による独立した第Ⅷ因子活性化機構の重要性が示唆される。

2) vWFの第Ⅷ因子制御機構

循環血漿中では第Ⅷ因子はvWFと複合体を形成して存在している¹⁹⁾。vWFは第Ⅷ因子の産生、活性、クリアランス機構を制御している。実際、vWFの欠乏症であるフォン・ヴィレブランド病では第Ⅷ因子活性が低下している。また、vWFの質的異常症であるタイプ2NはvWF側の第Ⅷ因子結合能異常症であるが²⁰⁾、本タイプも第Ⅷ因子活性が低下し、しばしば軽症の血友病Aの症状を呈する。VWFの第Ⅷ因子結合部位についてはすべて明らかにされていないが、軽鎖A3ドメインN末端部²¹⁾とC2ドメインが主要な結合部位と考えられている^{22, 23)}。C2ドメインはvWF³⁾のほかに、リン脂質^{23, 24)}や、すでに述べたようにトロンビンや活性型第Ⅹ因子の結合部位も有する。

vWFとリン脂質はC2ドメインにおいて互いに拮抗する。したがって、vWFと複合体を形成する第Ⅷ因子はそのままではリン脂質膜上に結合できず、tenaseにおける第Ⅷ因子機能を発揮できない。血液中に微量なトロンビンが生成されると第Ⅷ因子は限定分解をうけ、vWFから遊離してリン脂質膜上に取り込まれて凝固内因系の第Ⅹ因子生成反応は進むことになる。

活性化プロテインC(APC)は第Ⅷ因子および第Ⅴ因子を分解して不活化する抗凝固因子である。APCはトロンビンや活性型第Ⅹ因子と同じセリンプロテアーゼに属する。第Ⅷ因子のA1ドメインArg³⁹⁶を限定分解して第Ⅷ因子を不活性化させる²⁵⁾。活性型Ⅸ因子や活性型第Ⅹ因子も同様に開裂して第Ⅷ因子を不活性化する。vWFはAPC、活性型Ⅸ因子や活性型第Ⅹ因子による第Ⅷ因子不活性化を抑制することにより第Ⅷ因子活性を保護する作用も有する^{26, 27)}。従来、vWFのAPC保護作用はvWFが第Ⅷ因子/リン脂質結合を抑制するためリン脂質依存性のAPCの作用が障害されるためと考えられてきた。最近、APCと第Ⅷ因子の結合実験により、APCの結合部位がA3ドメイン内残基2009-2018に存在し、また、vWFがAPCの第Ⅷ因子への結合を抑制することから、vWFの新たな結合部位が第Ⅷ因子の軽鎖A3ドメイン内のAPC結合部位近傍に存在していることが明らかになった^{28, 29)}。

3) 第Ⅷ因子のクリアランス

low-density lipoprotein (LDL) 受容体ファミリーに属するlow-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)が凝固線溶因子蛋白の細胞内取り込み分解機構に関与することがわかってきた³⁰⁾。最近、第Ⅷ因子もLRPを介して細胞内分解が行われていることが明らかにされた。第Ⅷ因子のLRP結合部位はA2ドメイン内残基558-56531)とC2ドメイン内³²⁾に同定されている。

Ⅲ. 第Ⅷ因子遺伝子異常の種類

血友病 A は第Ⅷ因子遺伝子異常にもとづく。血友病 A の遺伝子解析は、第Ⅷ因子の cDNA の発見以来、報告されるようになったが、第Ⅷ因子遺伝子が 200 kb 以上と大きく、また、cDNA も約 9 kb あり遺伝子解析はきわめて困難であった。PCR や SSCP などの遺伝子解析法の進歩により解析率が大きく向上した。ただし、臨床的に最も重要な重症型患者の約半数が第Ⅷ因子構造遺伝子を PCR/SSCP などて網羅しても遺伝子異常が検出されず、血友病 A の遺伝子解析の進歩が再び停滞することになった。ところが、Gianelli らが、患者リンパ球から抽出した第Ⅷ因子 mRNA の解析過程でエクソン 22 と 23 をまたいで遺伝子増幅ができないことが明らかになった³⁰⁾。この発見がきっかけとなり、Gitschier らがイントロン 22 内で出現する遺伝子逆位を発見した。これは第Ⅷ因子の検出されない血友病重症型の約 40% にみられる異常で、イントロン 22 内の遺伝子(int22h-1)と第Ⅷ因子遺伝子の 500kb 以上離れた遺伝子(int22h-2, int22h-3)との間に組み替えが起こって、生じたものである(図 5)³⁰⁾。遠位側の int22h-3 との組み替えによる遠位型と、近位側の

int22h-2 との組み替えによる近位型の 2 タイプがある。圧倒的に遠位型が多い。逆位以外の遺伝子異常では欠失やナンセンス点変異、ミスセンス変異が検出されている。点変異例は PCR/SSCP 解析ではほぼ 90% 以上が解析可能と言われている³⁰⁾。したがって、重症血友病 A 患者ではまず遺伝子逆位を解析し、逆位が検出されなかった場合に PCR/SSCP にて遺伝子解析を進めるのが一般的である。第Ⅷ因子が低下はするものの検出される中等～軽症ではほとんどの症例がミスセンス変異である。血友病 A の遺伝子異常はデータベース化されている。ホームページからのアクセスが可能である(<http://europium.csc.mrc.ac.uk/>)。2000 年 10 月での集計では計 629 種類の第Ⅷ因子遺伝子異常が登録されており、そのなかで点変異が 431 種類、欠失が大小あわせて 169 種類ある(表 1)。

遺伝子異常と血友病 A フェノタイプとの関係については、逆位、欠失、ナンセンス点変異例では重症を呈する。実際、教室で明らかにされた逆位 25 例の第Ⅷ因子を測定感度 0.2% に上げて測定を行うと、全例検出感度以下であった。しかしながら、ミスセンス点変異例では重症

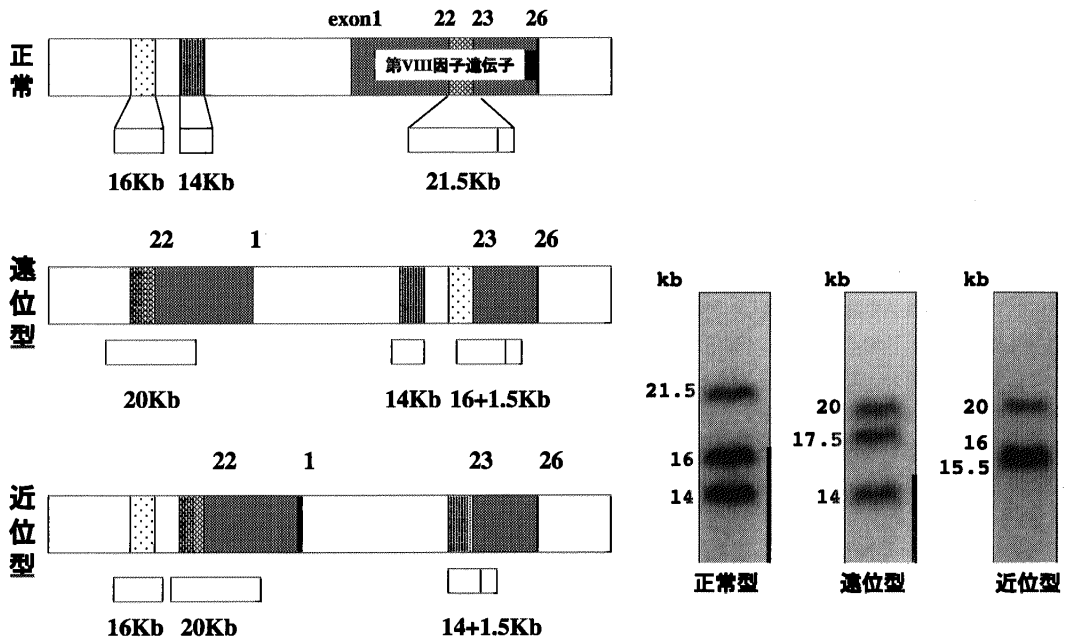


図 5. 血友病 A 遺伝子逆位のメカニズム

第Ⅷ因子イントロン 22 内に存在する遺伝子 Int22h-1 と同様の遺伝子が第Ⅷ因子遺伝子上流部位に 2 コピー存在する。これらのいずれかの遺伝子との組み替えにより第Ⅷ因子遺伝子がイントロン 22 内で分断されて逆転して異常第Ⅷ因子遺伝子になる。逆位の解析は Bcl1 でゲノム DNA を処理後、Int22h-1 のプローブを用いたサザンブロットで検出する。Bcl 1 フラグメントにはちょうど Int22h-1 を含むサイズの異なるバンド、すなわち、イントロン 22 内に 21.5kb、遠位側に 16kb、proximal 側に 14kb あり逆位の同定が可能になる。

表2. 血友病A変異の種類

exon	point mutations			deletions		insertions
	missense	nonsense	splicing	small	large	
1	10	1	2	1		
2	2	1	3	3		2
3	17	0	1	3		
4	18	4	2	1		
5	9	1	5	2		
6	3	0	3	1		
7	26	2		6		
8	16	3		6		1
9	12	2	1	3		
10	9	1		1		
11	21	1	2			1
12	15	4	2			1
13	16	2	1	2		1
14	28	15	1	26		15
15	10	1	2			
16	15	5	2	3		
17	15	1		2		2
18	15	3	1	1		3
19	9	1	3	1		
20	4	1				
21	2	2				
22	13	3		1		
23	18	1	3	5		
24	7	3	1	2		2
25	8	2	1	1		1
26	13	2		1		
Total	333	62	36	73	96	29

2000年10月18日集計 (<http://europium.csc.mrc.ac.uk/>)

型でも微量に第Ⅷ因子を有する可能性もあり、今後、血友病Aの病態を明らかにするためにも、それぞれの症例の臨床的重症度、正確な第Ⅷ因子測定および遺伝子解析の情報が必要である。

3. 異常第Ⅷ因子の解析による血友病A病態解析

通常、血友病Aは第Ⅷ因子活性により分類されるが、第Ⅷ因子抗原を測定することにより活性は低下するものの第Ⅷ因子抗原を有する分子異常症を検出することが可能である³⁶⁾。血友病の病態解明のアプローチとして異常第Ⅷ因子の解析は重要である。異常症の検索対象としてはまず、第Ⅷ因子抗原が全く正常量存在するCross reacting material positive (CRM⁺)症例や第Ⅷ因子が低下するものの有意に存在するCross reacting material reduced (CRM^R)症例がターゲットとなる。Factor VIII

Okayamaは教室で初めて明らかにされた異常第Ⅷ因子である¹³⁾。本症例は第Ⅷ因子活性2%の中等症の血友病A患者であるが、第Ⅷ因子抗原は80%と全く正常である。本患者の血漿に微量のトロンビンを添加すると第Ⅷ因子活性は通常5-10倍に上昇するが、本症例では上昇はきわめて軽微であった。そこで、トロンビン活性化障害を疑い、患者血漿から異常第Ⅷ因子を部分純化してトロンビン開裂パターンを観察した。正常第Ⅷ因子ではトロンビン添加により90-210kDaの重鎖および80kDaの軽鎖が分解され重鎖は54kDaと44kDaのバンドへ、軽鎖は72kDaバンドへと分解される。しかしながら患者の第Ⅷ因子では軽鎖の分解は正常第Ⅷ因子と同様であったが、重鎖は90kDaのバンドでとどまり、重鎖由来のトロンビン分解フラグメントの出現はみられなかった(図6)。し

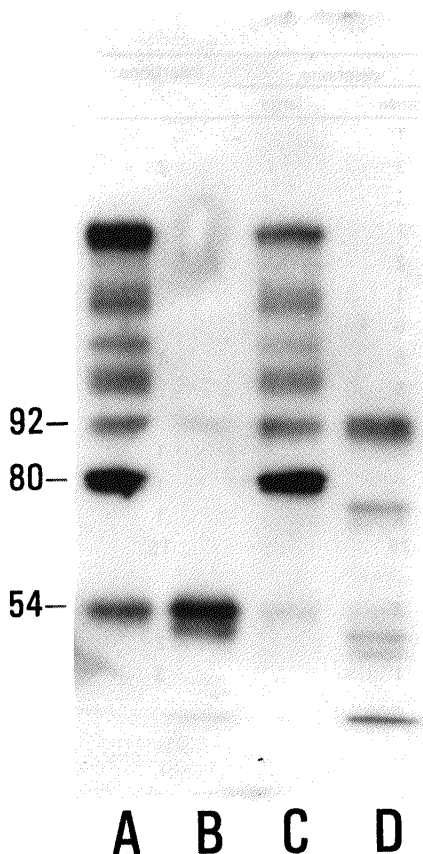


図 6. F VIII Okuyama のトロンビン開裂パターン
 純化第Ⅷ因子を7.5% SDS-PAGEで電気泳動後、重鎖A1ドメイン認識抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体と軽鎖80kDa認識モノクローナル抗体を用いたイムノブロット解析を行った。レーンA：正常血漿から純化した第Ⅷ因子で92～210kDaにわたる重鎖と80kDaの軽鎖に反応している。レーンB：正常第Ⅷ因子にトロンビンを添加したもので、90kDa以上の重鎖バンドが消失し、重鎖由来A1ドメインのバンドがみられる。レーンC：患者血漿から純化した異常第Ⅷ因子(F VIII Okuyama)で正常第Ⅷ因子と同様のパターンを示す。レーンD：F VIII Okuyamaにトロンビン添加した場合、重鎖は92kDaより高分子量のバンドおよび軽鎖80kDaのバンドは消失しているが、重鎖由来A1ドメイン54kDaバンドはみられない。

たがって、本症の第Ⅷ因子は重鎖のトロンビン開裂が障害されていることがわかり、遺伝子解析により重鎖トロンビン開裂部位のArg372がCysに置換していることが明らかになった¹³⁾。さらに、教室で作成した2種類の軽鎖認識モノクローナル抗体によるEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により、血友病ACRM⁺例をスクリーニングして1例に軽鎖トロンビン開裂異常

を検出した。本症例は軽鎖開裂部位であるArg¹⁶⁸⁹がCysに置換しており、factor VIII Hiroshimaと命名された¹⁴⁾。いずれもトロンビン開裂異常をきたしたために第Ⅷ因子の活性化が障害されている。これらの異常症の解析によりArg³⁷²およびArg¹⁶⁸⁹におけるトロンビン開裂は第Ⅷ因子活性化上必須であることが明らかにされた。

F VII IseはC1/C2ドメイン境界域の点変異によりC2ドメインの抗原性が低下し第Ⅷ因子活性は残存するものの第Ⅷ因子抗原が検出されなくなったきわめてユニークな血友病A変異病型である。本症例に中等～軽症患者の止血治療に用いられる酢酸デスマプレッシンを投与すると第Ⅷ因子抗原は低地のままであるが、第Ⅷ因子活性は50%にまで上昇した³⁷⁾。

近年、前述のように第Ⅷ因子の構造モデルが明らかにされてきており、異常第Ⅷ因子の3次元的評価が可能になりつつある。例えば、図2はAドメインモデルに教室で遺伝子異常を明らかにしたAドメイン内の点変異3例の変異部位の異常部位を示したものである⁹⁾。また、図3はC2ドメインの結晶構造をもとに報告されているC2ドメインにおける血友病A変異部位を示したものである。第Ⅷ因子の結晶化されたのはC2ドメインのみであり、異常第Ⅷ因子の解析にはまだまだ第Ⅷ因子の構造機能に関する情報が必要である。

IV. インヒビター

1. インヒビターの本態

血友病Aに発生するインヒビターの本態は、血友病A治療製剤である第Ⅷ因子製剤の反復投与により発生する抗第Ⅷ因子同種抗体である。インヒビターが出現すると第Ⅷ因子製剤の止血効果は極端に低下するか消失する。したがって、インヒビターの発生は、治療製剤の向上やウイルス不活化行程の進歩により新たなウイルス感染の危惧がほぼなくなった今日の血友病の医療において最も重要な問題になりつつある。インヒビターは先天性の通常の血友病のみならず、後天的に発生して血友病と同様の重篤な出血症状を呈することがある。かかる病態を後天性血友病と呼ばれる。近年、診断の向上とともに報告例が増加している。後天性インヒビターの本態は、自己の第Ⅷ因子に対して自己免疫的に出現する抗第Ⅷ因子自己抗体である。したがって、後天性血友病はきわめて単一な自己免疫性疾患とも考えられる。

2. インヒビターの凝血学的特性

血友病Aインヒビターでは、定期的な検査で偶然発見されることもあるが、一般的には出血時の第Ⅷ因子製剤による補充療法の止血効果が悪くなることで発見される場合が多い。かかる場合には、製剤投与後の第Ⅷ因子回

収率をまず検査する。インヒビターが存在する場合は、回収率がきわめて低下するかまたは全く回収できなくなる。さらに、回収率が正常であっても低力価の場合には、投与後の第Ⅷ因子の半減期が短縮することでインヒビターの存在が強く疑われる。インヒビターの測定において最も一般的な方法はBethesda法である³⁸⁾。血友病Aインヒビターでは被検血漿と正常プール血漿を等量混合して37℃にて2時間加温し、残存第Ⅷ因子活性を測定する。正常血漿1mlに存在する第Ⅷ因子を50%低下させるインヒビターを1Bethesda単位/ml(以下BU)と定義する。Bethesda法に基づくインヒビターの測定限界は施設によるが、通常は0.5BU以上を陽性と判断する。インヒビター力価により10BU以上をhigh responder, 10BU未満をlow responderと分類される。しかしながら、最近の国際血栓止血学会標準委員会(Scientific Standardization Subcommittee, SSC)は5BUを判定基準にすることを推奨している³⁹⁾。

インヒビター力価は経過により変動する。一般に、high responderタイプのインヒビターは第Ⅷ因子製剤や第Ⅸ因子製剤を投与すると5-7日後にインヒビター力価が急上昇する。かかる現象をanamnestic responseと呼ばれる。low responderタイプではanamnestic responseは軽度である。また、low responderのなかでは一旦、インヒビターが出現しても経過により消失する一過性のインヒビターもある。

3. インヒビターの免疫学的特性

Bethesda法によるインヒビター測定は感度も高く、日常診療上重要な検査であるが、本方法では抑制作用を有する中和抗体しか検出できない。インヒビターの免疫学的な評価のためには非中和抗体も含めた総合的な評価が望ましい。教室では純化第Ⅷ因子あるいは第Ⅸ因子をポリスチレン性のELISA用プレートに固相化させ、希釈した被検血漿を添加し、抗ヒトIgGおよびIgGサブクラス抗体にて検出している⁵⁰⁾。本方法は凝固阻止物質の存在下でも影響を受けず、また、血清検体でも測定できる。さらに、抗体の各IgGサブクラス別の解析が可能である。通常、インヒビターはIgG抗体で主要サブクラスはIgG₄であるが、症例によりIgG₁およびIgG₂も検出される。通常、インヒビターの出現後、やや遅れてIgG₄抗体が出現上昇している。インヒビター力価が低下していてもIgG₄抗体が残存していることがある。したがって、本測定はインヒビターの経過のモニタリングとして重要である。また、後天性血友病の治療効果のモニタリングにも有用である⁴⁰⁾。

4. インヒビターの免疫生化学

1) 結合部位

血友病Aインヒビターの主要な結合部位は第Ⅷ因子軽鎖72kDa、および、重鎖44kDaである(図7)。第Ⅷ因子の構造や免疫生化学的進歩により、詳細なインヒビターのエピトープ解析が行われている。軽鎖72kDa認識タイプの主要エピトープは第Ⅷ因子C末端部位のC2ドメイン内アミノ酸残基2248-2312に存在することがすでに明らかにされている⁴¹⁾。最近、合成ペプチドを用いた実験により、C2ドメインN末領域のCys2326およびGlu2327がC2エピトープに必須であること⁴²⁾、さらに、C2は3次元的なエピトープを形成していることも明らかにされている⁴³⁾。C2ドメイン認識タイプのインヒビターはブタ第Ⅷ因子にも高い交差反応性を示すことから、C2ドメインの抗原構造は進化上共通の構造を有することが予測される⁴⁴⁾。

第2の主要結合部位は重鎖A2ドメインであるが、ヒト第Ⅷ因子とブタ第Ⅷ因子とのハイブリッド変異第Ⅷ因子を用いた結合実験によりA2ドメイン内のインヒビターエピトープはアミノ酸残基484-508に存在することが明らかにされている⁴⁵⁾。これらの主要結合領域のほかにもA1ドメインの54kDa^{46, 47)}やA3-C1ドメイン⁴⁸⁾にも反応するインヒビターも報告されている。

2) 血友病Aインヒビターの抑制機序

血友病Aインヒビターは抗第Ⅷ因子同種抗体が製剤中の第Ⅷ因子に結合して、第Ⅷ因子の構造、機能およびクリアランスに影響をあたえることにより抑制作用を発揮する。これまでに明らかにされている抑制メカニズムについて以下にまとめる。

(1) 第Ⅷ因子/vWF結合抑制

第Ⅷ因子/vWF結合が抑制されると第Ⅷ因子は不安定になり活性は低下する²⁰⁾。第Ⅷ因子軽鎖C2ドメインはvWF結合部位が存在する¹⁹⁾。軽鎖認識インヒビターのほとんどがC2ドメイン認識タイプであり、vWFとの結合を抑制する^{22, 49)}。

(2) 第Ⅷ因子/リン脂質結合抑制

第Ⅷ因子は血小板膜上のリン脂質表面を反応の場に発現される活性型第Ⅸ因子による第Ⅹ因子活性化反応における複合体の必須の凝固因子として機能する。したがって、第Ⅷ因子の凝固活性はトロンビンや活性型Ⅹ因子により活性化された活性型第Ⅷ因子はフォン・ウィレブランド因子から遊離してリン脂質に結合してはじめて発現される。第Ⅷ因子のリン脂質結合部位であるC2ドメイン認識タイプのインヒビターでは本結合が抑制されるために第Ⅷ因子凝固活性が抑制される^{22, 24)}。

(3) 活性型第Ⅸ因子結合抑制

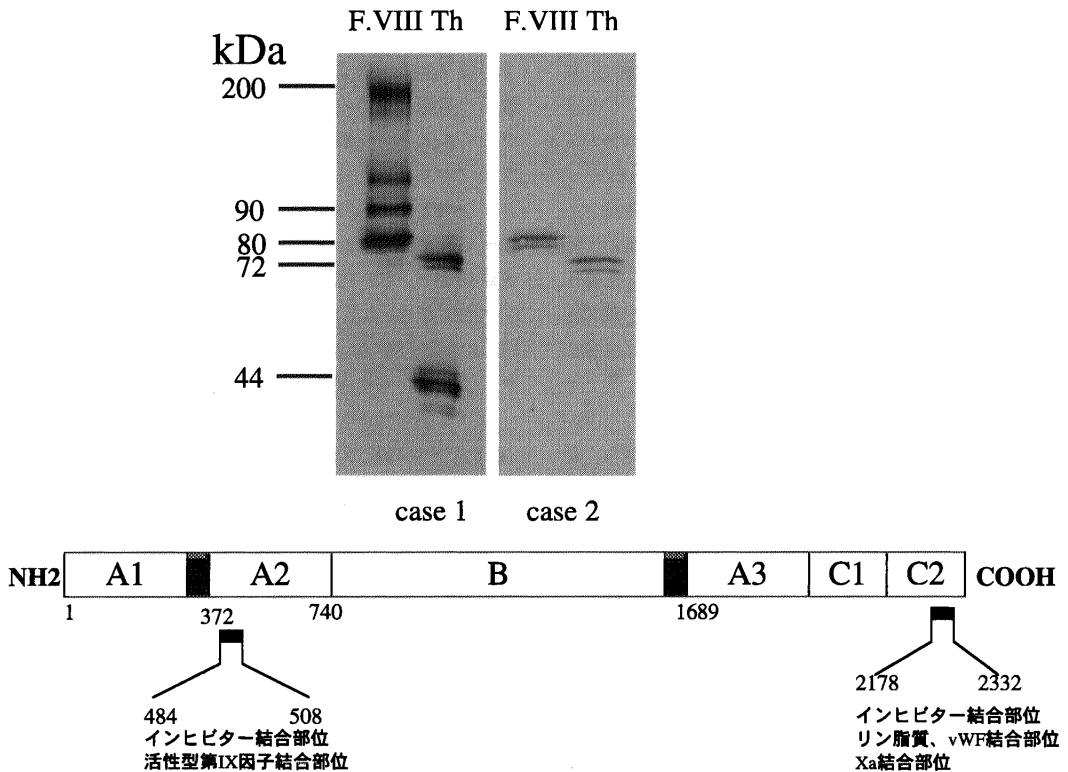


図7. インヒビターの結合部位

上段は純化第Ⅷ因子およびトロンビン処理第Ⅷ因子に対するインヒビターの結合性をイムノブロットで検討したものである。Case1は第Ⅷ因子重鎖A2ドメインと軽鎖72kDaに結合している。Case2は軽鎖72kDaのみに結合している。下段はインヒビターの結合部位とインヒビターが抑制するリガンド結合部位を表示した。

活性型第Ⅸ因子の第Ⅹ因子活性化反応において第Ⅷ因子は活性型第Ⅸ因子に結合することにより補因子活性を発現する。第Ⅷ因子の第Ⅸ因子結合部位はA2ドメイン内アミノ酸残基558-565)⁵⁰⁾とA3ドメインのアミノ酸残基1811-1818⁴⁸⁾に報告されている。重鎖認識インヒビターエピトープは活性型第Ⅸ因子結合領域の近傍に存在しており、さらに、A3ドメイン軽鎖認識インヒビターが活性型第Ⅸ因子の第Ⅷ因子結合を抑制することが報告されている⁴⁸⁾。

(4) トロンビンおよび活性型第Ⅹ因子の結合抑制

第Ⅷ因子の凝固活性はトロンビンや活性型第Ⅹ因子により限定分解を受けて活性型第Ⅷ因子に変換され凝固活性を発現する(図2)。トロンビンの第Ⅷ因子結合部位は重鎖A2ドメインおよび軽鎖C2ドメインに¹⁷⁾、活性型Ⅹ因子の結合部位は軽鎖C2ドメイン内アミノ酸残基2253-2270に同定されている¹⁶⁾。最近、C2認識血友病Aインヒビターの1例が軽鎖Arg¹⁶⁸⁹におけるトロンビン開裂を抑制したこと¹⁷⁾、さらに、C2認識インヒビターは活

性型第Ⅹ因子の第Ⅷ因子結合および開裂を完全に抑制することが明らかにされている⁵¹⁾。

4. 発生頻度

従来、血友病Aのインヒビター発生率は5-15%と考えられてきた。しかしながら、この発生率はレトロスペクティブな調査に基づくものであった。近年、モノクローナル抗体精製剤や遺伝子組み換え型製剤などの高純度製剤の臨床試験や市販後調査により、過去に治療歴のない患者(previously untreated patients; PUPs)や治療歴のある患者(previously treated patients; PTPs)を対象にインヒビター発生率に関するプロスペクティブな調査研究が相次いで行われた。PUPsに関する調査報告によると、インヒビター発生率は20~30%と、従来の報告より高いことが判明した。これには、レトロスペクティブな調査研究では検出しえなかった一過性インヒビター症例や、凝固因子製剤が有効なlow responder症例が含まれているからと考えられている。

5. 血友病Aインヒビターの発生メカニズム

インヒビターの発生機序はまだまだ不明であるが、発生要因についていくつか挙げる事ができる。大別すると、患者サイドと、製剤サイドの要因とに分けられる。患者サイドの要因としては、まず患者の重症度、血漿第Ⅷ因子の欠損の有無があげられる。インヒビターは製剤中の第Ⅷ因子を非自己抗原と認識して発生することから、原則的に血漿第Ⅷ因子の検出されない重症型(cross reacting material negative ; CRM⁻)患者に多い。

(1) 第Ⅷ因子遺伝子異常

第Ⅷ因子 CRM⁻の遺伝子異常である、大きな欠失、イントロン 22 の逆位、ナンセンス点変異を原因とする患者のインヒビター発生率は高い。血友病 A における遺伝子異常とインヒビター発生率に関する報告によると、逆位が 35～40%、200bp 以上の大きな欠失で 32%、ナンセンス点変異で 33% である。200bp 以下の欠失ではインヒビターの発生率は 6% と減少する⁵⁰⁾。通常、遺伝子の欠失があると欠失サイズにかかわらず、通常フレームシフトをきたすために、第Ⅷ因子蛋白が発現される可能性はきわめて低い。しかしながら、1bp の欠失を有するにもかかわらず、中等症の血友病 A 症例の報告⁵¹⁾やエキソン 4～7 にわたる大欠失があるインヒビター例で短縮した第Ⅷ因子 mRNA と第Ⅷ因子抗原が検出された報告例もある⁴⁷⁾。

(2) 中等症 / 軽症例のインヒビター発生

中等症や軽症血友病 A では自身が産生している一定量の第Ⅷ因子の存在によりインヒビター発生については耐性になっているものと考えられる。したがって、中等症や軽症ではインヒビターの出現リスクは一般に低い。Hay らの報告によると、中等 / 軽症血友病 A に発生した計 26 例中、インヒビター出現の中央値は 33 歳と高く、ほとんどが大量の補充療法施行後に出現している⁵¹⁾。インヒビター出現後、第Ⅷ因子活性は 1～8% へと低下し、出血症状は重篤化し、2 例が出血により死亡している。しかしながら、インヒビターが長期にわたって存在する例は少なく、多くが自然にまたは免疫寛容療法により 9 か月以内(中央値)に消失している。インヒビターが発生した中等 / 軽症血友病 A の遺伝子異常は重鎖 A2 ドメイン(特に Arg593Cys)と軽鎖 C2/C1 ドメイン境界領域(特に Trp2229Cys)の点変異が多い。A2 および C2 ドメインは前述したようにインヒビターの主要認識部位である。したがって、点変異により両ドメインの構造が変化したために製剤中の野生型第Ⅷ因子が非自己蛋白として認識されやすくなってインヒビターが発生したものと考えられる。実際、C1/C2 ドメイン境界域の点変異例(Arg2150His)で発生したインヒビターと自己異常第Ⅷ

因子あるいは野生型第Ⅷ因子との反応性を比較するとインヒビターは野生型第Ⅷ因子のみと反応することも報告されている⁵⁰⁾。

(3) HLA

同じゲノタイプでもインヒビターが出現したり、しなかったりする症例もあり、遺伝子異常や第Ⅷ因子の存在様式以外の発生要因が示唆される。たとえば、HLA タイプとインヒビター発生との関連性について従来より注目されいくつかの報告がある^{55, 56)}。しかしながら、インヒビター発生と HLA タイプの関連性についてはいまだに議論の余地がある。

(4) 凝固因子製剤

インヒビターは過去に治療歴のない患者(Previously untreated patients : PUPs)において製剤投与開始後 50 投与日数(exposure days)をこえて発生することはきわめてまれである⁵⁷⁾。しかし、製剤の製法変更によっては過去に治療歴のある患者(Previously treated patients ; PTPs)でもインヒビターの発生する可能性がある。1990 年、ベルギーやオランダで使用されたシリカ吸着処理後加熱処理をした第Ⅷ因子濃縮製剤が導入されたが、109 例のインヒビターのない PTPs において本製剤に変更後 5 例にインヒビターが検出された⁵⁸⁾。さらに、ウイルス不活化法が界面活性剤(SD)処理のみの血漿由来製剤で A 型肝炎の発生がみられたために、ベルギーでは 1995 年、イオン交換クロマトグラフィーによる純化後、加熱処理および SD 処理を行ったいわゆる 2 重ウイルス不活化処理製剤(Bisinact)に変更されたが、変更 4 か月後に PTPs 140 例中 8 例にインヒビターが新たに出現した⁵⁹⁾。

これらの新たに発生したインヒビターの認識部位はいずれも第Ⅷ因子軽鎖 C2 ドメインであった^{60, 61)}。これは、製法によっては製剤中の第Ⅷ因子軽鎖 C2 ドメインの構造変化が生じて新たな抗原性が出現する可能性があることを示している。

おわりに

血友病 A の病態に関する研究は第Ⅷ因子蛋白や遺伝子の分子生物学的解析成果により飛躍的に進歩した。また、これらの知見は現在、血友病 A の治療製剤のみならず血友病 A の治癒をめざした肝臓移植や遺伝子治療などの研究にも密接に関連している。しかしながら、第Ⅷ因子の構造・機能についてはまだまだ不明な点も多く、今後の研究成果が期待される。

文 献

- 1) 吉田 邦男: 日本血液学会全書 12 出血性素因・臨床

- 丸善, 血友病とその周辺 II 血友病の歴史 161-164, 1977.
- 2) Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P. H., Smith, D. H., Hollingshead, P., Wion, K. L., Delwart, E., Tuddenham, E. G. D., Vehar, G. A. and Lawn, R. M. : Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* **312** : 330-337, 1984.
 - 3) Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N. and Hewick, R. M. : Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312** : 342-347, 1984.
 - 4) Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M. and Capon, D. J. : Structure of human factor VIII *Nature* **312** : 337-342, 1984.
 - 5) Shima, M., Matsumoto, T., Fukuda, K., Kubota, Y., Tanaka, I., Nishiyama, K., Giles, A. R. and Yoshioka, A. : The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of Haemophilia A patients with very low levels of Factor VIII activity (F VIII : C). *Thrombosis and Haemostasis* **87** : 436-441, 2002.
 - 6) 瀧 正志, 立浪 忍 : 血液凝固異常症 全国調査 2000 年度(平成 12 年度)報告書, 2001.
 - 7) Pemberton, S., Lindley, P., Zaitsev, V., Card, G., Tuddenham, E. G. and Kembell-Cook, G. A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89** : 2413-2421, 1997
 - 8) Morichika, S., Shima, M., Kamisue, S., Tanaka, I., Imanaka, Y., Suzuki, H., Shibata, H., Pemberton, S., K. Gale, J. McVey, E. G. D. and Tuddenham, Yoshioka, A. : Factor VIII gene analysis in Japanese CRM-positive and CRM-reduced haemophilia A patients by single-strand conformation polymorphism. *British Journal of Haematology* **98** : 901-906, 1997.
 - 9) Pratt, K.P., Shen, B.W., Takeshima, K., Davie, E.W., Fujikawa, K. and Stoddard, B. L. : Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5Å resolution. *Nature*. **402** : 439-442, 1999.
 - 10) van Dieijen, G., Tans, G., Rosing, J. and Hemker, H. C. : Assembly of the intrinsic factor X activating complex--interactions between factor IXa, factor VIIIa and phospholipid. *J. Biol. Chem.* **256** : 3433-3442, 1981.
 - 11) Lollar, P., Knutson, G. J. and Fass, D. N. : Activation of porcine factor VIII : C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry* **24** : 8056-8064, 1985.
 - 12) Eaton, D., Rodriguez, H. and Vehar, G. A. : *Biochemistry* **25** : 505-512, 1986.
 - 13) Shima, M., Ware, J., Yoshioka, A., Fukui, H. and Fulcher, C. A. : An arginine to cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional factor VIII molecule. *Blood* **74** : 1612-1617, 1989.
 - 14) Kamisue, S., Shima, M., Nishimura, T., Tanaka, I., Nakai, H., Morichika, S., Takata, N., Kuramoto, A. and Yoshioka, A. : *Br. J. Haematol.* **86** : 106-111, 1984.
 - 15) Hosokawa, K., Ohnishi, T., Nagata, M., Shima, M. and Koide, T. : Preparation of anhydrothrombin and characterization of its interaction with natural thrombin substrates. *Biochemical Journal* **354** : 309-313, 2001.
 - 16) Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Suzuki, T., Koide, T., Saenko, E.L., Scandella, D., Shibata, M., Kamisue, S., Tanaka, I. and Yoshioka, A. : Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *Journal of Biological Chemistry* **274** : 31000-31007, 1999.
 - 17) Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Nagata, M., Koide, T., Saenko, E.L., Tanaka, I., Shibata, M. and Yoshioka, A. : The Factor VIII C2 domain contains the thrombin binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689. *Journal of Biological Chemistry* **275** : 25774-25780, 2000.
 - 18) Nogami, K., Shima, M., Nishiyama, K., Hosokawa, K., Saenko, E. L., Giddings, J. C., Tanaka, I.

- and Yoshioka, A. : Anticoagulant effects of a synthetic peptide containing residues Thr2253-Gln2270 within factor VIII C2 domain that selectively inhibits factor Xa-catalyzed factor VIII activation. *Br. J. Haematol.* **116** : 868-74, 2002.
- 19) Hoyer, L.W. : The factor VIII complex: structure and function. *Blood* **58** : 1-13, 1981.
- 20) Nishino, M., Girma, J-P and Meyer, D. : New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* **74** : 1591-1599, 1989.
- 21) Shima, M., Yoshioka, A., Nakai, H., Tanaka, I., Sawamoto, Y., Kamisue, S., Terada, S. and Fukui, H. : Epitope localization of monoclonal antibodies against factor VIII light chain which inhibit complex formation by factor VIII with von Willebrand factor. *Int. J. Hematol.* **54** : 515-522, 1991.
- 22) Shima, M., Scandella, D., Yoshioka, A., Nakai, H., Tanaka, I., Kamisue, S., Terada, S. and Fukui, H. : A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb. Haemost.* **69** : 240-246, 1993.
- 23) Saenko, E. L., Shima, M., Rajalakshmi, K. J. and Scandella, D. : A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **269** : 11601-11605, 1994.
- 24) Arai, M., Scandella, D. and Hoyer, L. W. : Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J. Clin. Invest.* **83** : 1978, 1989.
- 25) Fulcher, C. A., Gardiner, J. E., Griffin, J. H. and Zimmerman, T. S. : Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* **63** : 486-9, 1984.
- 26) Fay, P. J., Coumans, J. V. and Walker, F. J. : von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *J. Biol. Chem.* **266** : 2172-2177, 1991.
- 27) O'Brien, D. P., Johnson, D., Byfield, P. and Tuddenham, E. G. D. : Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry.* **31** : 2805-2812, 1992.
- 28) Nogami, K., Shima, M., Giddings, J. C., et al. : 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.
- 29) Nogami, K., Shima, M., Nishiya, K., Hosokawa, K., Saenko, E. L., Sakurai, Y., Shibata, M., Suzuki, H., Tanaka, I. and Yoshioka, A. : A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood* **99** : 3993-3998, 2002.
- 30) Ananyeva, N. M., Kouivaskaia, D. V., Shima, M., and Saenko, E. L. : Catabolism of the coagulation factor VIII. *Trends Cardiovasc Med.* **11** : 251-257, 2001.
- 31) Sarafanov, A. G., Ananyeva, N. M., Shima, M. and Saenko, E. L. : Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **276** : 11970-11979, 2001.
- 32) Lenting, P., Neels, J. G. and van den Berg, B. M. : The light chain of factor VIII comprises a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **274** : 23734-23739, 1999.
- 33) Naylor, J. A., Green, P. M., Rizza, C. R. and Giannelli, F. : Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. *Lancet* **340** : 1066-7, 1992.
- 34) Lakich, D., Kazazian, H. H. Jr, Antonarakis, S. E. and Gitschier, J. : Inversions disrupting the factor IX gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet.* **5** : 236-241, 1993.
- 35) Higuchi, M., Antonarakis, S. E., Kasch, L., Oldenburg, J., Economou-Petersen, E., Olek, K., Arai, M., Inaba, H. and Kazazian, H. H. Jr. : Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 8307-11, 1991.

- 36) 嶋 緑倫. 血友病 A の第Ⅷ因子凝固抗原 (Ⅷ CAg) に関する研究. 1. 血友病 A 血中の第Ⅷ因子凝固抗原 (Ⅷ CAg) およびⅧ CAg にもとづく血友病 A の分類. 奈医誌 **35** : 801-812, 1984.
- 37) Suzuki, H., Shima, M., Arai, M., Kagawa, K., Fukutake, K., Kamisue, S., Nakai, H., Morichika, S., Tanaka, I., Inoue, M., Gale, K., Tuddenham, E. G. D. and Yoshioka, A. : Factor Ⅷ Ise (R2159C) in a patient with mild hemophilia A, an abnormal factor Ⅷ with retention of function but modification of C2 epitopes. *Thromb Haemost.* **77** : 862-867, 1997.
- 38) White, G. C., Rosendaal, F., Aledort, L.M., Lusher, J. M., Rothschild, C. and Ingerslev, J. : Factor Ⅷ and Factor IX Subcommittee. Definitions in Hemophilia Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor Ⅷ and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* **85** : 560, 2001.
- 39) 澤本 好克. Enzyme-linked immunosorbent assay による第Ⅷ因子抑制物質中の IgG subclass の検討. 奈医誌, **43** : 511-521, 1992.
- 40) Matsumoto, T., Shima, M., Fukuda, K., Nogami, K., Giddings, J. C., Murakami, T., Tanaka, I. and Yoshioka, A. : Immunological Characterization of Factor Ⅷ Autoantibodies in Patients with Acquired Hemophilia A in the Presence or Absence of Underlying Disease. *Thrombosis Research* **104** : 381-388, 2001.
- 41) Scandella, D., Gilber,t G. E., Shima, M. et al. : Some factor Ⅷ inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids residues 2248-2312 which overlap a phospholipid binding site. *Blood* **86** : 1811-1819, 1995.
- 42) Nogami, K., Shima, M., Nakai, H., Tanaka, I., Suzuki, H., Morichika, S., Shibata, M., Saenko, E. L., Scandella, D., Giddings, J. C. and Yoshioka, A. : Identification of a factor Ⅷ peptide, residues 2315-2330, which neutralises human factor Ⅷ C2 inhibitor alloantibodies: requirement of Cys2326 and Glu2327 for maximum effect. *British Journal of Haematology* **107** : 196-203, 1999
- 43) Kuwabara, I., Maruyama, H., Kamisue, S., Shima, M., Yoshioka, A. and Maruyama, I. N. : Mapping of the minimal domain encoding a conformational epitope by γ phage surface display : factor VIII inhibitor antibodies from haemophilia A patients. *J of Immunological Methods* **224** : 89-99, 1999.
- 44) Sawamoto, Y., Shima, M., Tanaka, I., Nakai, H., Kamisue, S., Scandella, D. and Yoshioka, A. : Anti-factor Ⅷ inhibitor alloantibodies recognizing the A2 domain in the human factor Ⅷ heavy chain poorly bind to porcine factor Ⅷ. *International Journal of Hematology* **65** : 151-158, 1997.
- 45) Healey, J. F., Lubin, I.M, Nakai, H., Saenko, E. L., Hoyer, L. W., Scandella, D. and Lollar, P. : Residues 484-508 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the A2 domain of human factor Ⅷ. *J. Biol. Chem.* **270** : 4505-4509, 1995.
- 46) Foster, P. A., Fulcher, C. A., Houghte, R. A., de Graaf Mahoney, S. and Zimmerman, T. S. : Localization of the binding regions of a murine monoclonal anti-factor Ⅷ antibody and a human anti-factor Ⅷ alloantibody. *J. Clin. Invest.* **82** : 123-128, 1988.
- 47) Shibata, M., Shima, M., Morichika, S., McVey, J., Tuddenham, E. G. D., Tanakak II, Suzukik, HI., Nogamik, KI., Minamotok, YI., Hatok, TI., Saenkok, EII, Scandellak DI and Yoshiokak, A. : An alloantibody recognizing the F Ⅷ 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.
- 48) Zhong, D, Saenko, E. L., Shima, M., Felch, M. and Scandella, D. : Some human inhibitor antibodies interfere with factor Ⅷ binding to factor IX. *Blood* **92** : 136-42, 1998.
- 49) Shima, M., Nakai, H., Scandella, D., Tanaka, I., Sawamoto, Y., Kamisue, S., Morichika, S., Murakami, T. and Yoshioka, A. : Common inhibitory effects of human anti-C2 domain inhibitor alloantibodies on factor Ⅷ binding to von Willebrand factor. *Br. J. Haematol.* **91** : 714-

- 21, 1995.
- 50) **Fay, P. J., Beattie, T. and Huggins, C. F.** : Factor VIII a A2 subunit residues 558-565 represent a factor IX a interactive site. *J. Biol. Chem.* **269** : 20522-20527, 1994.
- 51) **Nogami, K., Shima, M., Nishiya, K., Sakurai, Y., Tanaka, I., Giddings, J. C., Saenko, E. L. and Yoshioka, A.** : Human factor VIII inhibitor alloantibodies with a C2 epitope inhibit factor x-catalyzed factor VIII activation : A new anti-factor VIII inhibitory mechanism. *Thromb. Haemost.* **87** : 459-65, 2002.
- 52) **Tuddenham, E. G. D. and Mcvey, J. H.** : The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia* **4** : 543-545, 1998.
- 53) **Hay, C. R., Ludlam, C. A., Colvin, B. T., Hill, F. G., Preston, F. E., Wasseem, N., Bagnall, R., Peake, I. R., Berntorp, E., Mauser Bunschoten, E. P., Fijnvandraat, K., Kasper, C. K., White, G. and Santagostino, E.** : Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Thromb. Haemost.* **79** : 762-766, 1998.
- 54) **Peerlinck, K., Jacquemin, M. G., Arnout, J., Hoylaerts, M. F., Gilles, J. G., Lavend'homme, R., Johnson, K. M., Freson, K., Scandella, D., Saint-Remy, J. M. and Vermynen, J.** : Antifactor VIII antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII in patients with mild hemophilia A. *Blood* **93** : 2267-2273, 1999.
- 55) **Oldenburg, J., Picard, J. K., Schwaab, R., Brackmann, H. H., Tuddenham, E. G. and Simpson, E.** : HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb. and Haemost.* **77** : 238-242, 1997.
- 56) **Hay, C. R., Ollier, W., Pepper, L., Cumming, A., Keeney, S., Goodeve, A. C., Colvin, B. T., Hill, F. G., Preston, F. E. and Peake, I. R.** : HLA class II profile : A weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. *Thromb. and Haemost.* **77** : 234-237, 1997
- 57) **McMillan, C. W., Shapiro, S. S., Whitehurst, D., Hoyer, L. W., Rao, A. V. and Lazerson, J.** : The natural history of factor VIII : C inhibitors in patients with haemophilia A : a national cooperative study. II . Observations on the initial development of factor VIII : C inhibitors. *Blood* **71** : 344-348, 1988.
- 58) **Peerlinck, K., Arnout, J., Di Giambattista, M., Gilles, J. G., Laub, R., Jacquemin, M., Saint-Remy, J. M. and Vermynen, J.** : Factor VIII inhibitors in previously treated hemophilia A patients with a double virus-inactivated plasma derived factor VIII concentrate. *Thromb. Haemost.* **77** : 80-86, 1997.
- 59) **Gilles, J. G., Peerlinck, K., Arnout, J., Vermynen, J. and Saint-Remy, J. M.** : Restricted epitope specificity of anti F VIII antibodies that appeared during a recent outbreak of inhibitors. *Thromb. Haemost.* **77** : 938-943, 1997.
- 60) **Sawamoto, Y., Prescott, R., Zhong, D., Saenko, E.L., Mauser-Bunschoten, E., Peerlinck, K., van den Berg, M. and Scandella, D.** : Dominant C2 domain epitope specificity of inhibitor antibodies elicited by a heat pasteurized product, factor VIII CPS-P, in previously treated hemophilia A patients without inhibitors. *Thromb. Haemost.* **79** : 62-68, 1998.