

# 抗第VIII因子活性を有する数種抗第VIII因子モノクローナル抗体を用いた血友病A患者血漿中の第VIII因子抗原量の測定

奈良県立医科大学小児科学教室

中井 寛明

## IMMUNOASSAY FOR PLASMA FACTOR VIII ANTIGEN IN HEMOPHILIA A USING ANTI-FACTOR VIII MONOCLONAL ANTIBODIES WHICH INHIBIT FACTOR VIII ACTIVITY

HIROAKI NAKAI

*Department of Pediatrics, Nara Medical University*

Received November 30, 1991

*Summary:* Six monoclonal antibodies(MoAbs), NMC-VIII/5-10, against factor VIII (F. VIII) were developed and two-site solid phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for factor VIII antigen(F. VIII: Ag) were performed using three anti-F. VIII: Ag monoclonal antibodies, NMC-VIII/5, VIII/10 and C 5(mono-ELISAs). In these ELISAs, polyclonal anti-F. VIII alloantibody(PolyAb) was used as a coating antibody and the peroxidase-conjugated MoAb as the second antibody. MoAbs NMC-VIII/5-10 reacted with 80 kDa light chain and NMC-VIII/5 and 6 reacted with 72 kDa light chain fragment by immunoblotting. The IgG subclass of these MoAbs was all IgG<sub>1</sub>, and anti-F. VIII inhibitory activity ranged from 2 to 160 Bethesda U/mg. C 5 recognized the 54 kDa heavy chain fragment.

The levels of F. VIII: Ag in 20 normal individuals were  $93 \pm 21$  u/dl by VIII-5-ELISA,  $91 \pm 18$  u/dl by VIII-10-ELISA,  $91 \pm 21$  u/dl by C 5-ELISA and  $97 \pm 23$  u/dl by the double polyclonal ELISA(poly-ELISA).

Forty-nine cases with hemophilia A were divided into three groups with F. VIII: Ag level by poly-ELISA; Group 1 (<1 u/dl), Group 2 (1-49 u/dl), Group 3 ( $\geq 50$  u/dl). F. VIII: Ag was not detected by any mono-ELISA in 30 patients of Group 1. These patients were considered to lack F. VIII protein. In 9 cases out of 13 in Group 2, the level of F. VIII: C and F. VIII: Ag correlated well(Group 2-A). The other 4 cases had higher level of F. VIII: Ag than F. VIII: C (Group 2-B). These patients were considered to have abnormal F. VIII protein. Two cases out of 6 patients in Group 3 had extremely lower level of F. VIII: Ag by C 5-ELISA than of levels measured by other mono-ELISAs and poly-ELISA. These patients seem to have a molecular defect at or near the binding region of C 5.

### Index Terms

enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), hemophilia A, factor VIII antigen(F. VIII: Ag), monoclonal antibody, polyclonal antibody

---

## 緒 言

ヒト第VIII因子はX染色体長腕末端部Xq 28上の第VIII因子遺伝子の支配を受け、主として肝細胞内粗面小胞体内で合成される分子量270,000の血漿糖蛋白である<sup>1)2)</sup>。本因子は血液凝固内因系に関与する因子として重要で、その先天的合成障害症は血友病Aと呼ばれている。第VIII因子はヒト血漿中50-100 ng/mlと微量のため、長らく純化が困難であったが、1984年、第VIII因子遺伝子が解明され、その塩基配列と、それよりコードされる第VIII因子蛋白は2,332個のアミノ酸で、ホモロジーより3個のAドメイン、1個のBドメインおよび2個のCドメインより構成されていることが明らかになった<sup>3)4)5)6)7)</sup>。第VIII因子は循環血漿中で種々のプロテアーゼによる分解をうけ、N末端の90-210 kDaのH鎖とC末端由来の80 kDaのL鎖のCa<sup>+</sup>結合体として存在し、トロンビンによりB鎖は遊離し、90 kDaのH鎖となり、L鎖も70 kDaのポリペプチドに転換することが知られるようになった<sup>8)</sup>。第VIII因子の機能は従来、凝血学的方法にもとづいた第VIII因子活性としてとらえられてきた<sup>9)</sup>。血友病A患者の出血症状に対する第VIII因子製剤による補充療法中に発生するインヒビターも1960年代後半は凝血学的方法によるインヒビター中和試験法によっていたが<sup>10)</sup>、インヒビターはポリクローナルな抗体であることが明らかになるにつれ1970年代後半にはインヒビターを用いた固定免疫放射能測定法(solid phase immunoradiometric assay, IRMA)により第VIII因子抗原量の測定が可能となった<sup>11)</sup>。一方、家兎に第VIII因子剤を注射した場合、第VIII因子に対する抗体は作成されず、製剤中に共存するvon Willebrand因子による抗体のみ作成され、異種抗体による第VIII因子抗原の検索は困難であった。

1980年代にはモノクローナル抗体(MoAb)作成技術が凝血学分野にも導入され<sup>12)</sup>、第VIII因子に対するMoAbも作成されるようになった。第VIII因子に対するMoAbとしてはRotblatら(1983)<sup>13)</sup>、Fulcherら(1985)<sup>14)</sup>の報告があり、当教室の嶋ら(1987)<sup>15)</sup>が作製したMoAbのNMC-VIII/1はL鎖80 kDaのみを認識し、抗第VIII因子活性作用(インヒビター作用)をもたなかった。第VIII因子の構造と機能の解析のためには、その活性部位を検索する必要があるが、インヒビター作用を持つ抗体が作製されればその抗体は活性部位もしくはその近傍をエピトープとしている可能性が高く、活性部位の解析のためにその抗体の有用性は高い、と考えられる。著者は第VIII因子の構造と機能の解析を目的に第VIII因子に対するインヒビター作用を持つ数種のMoAbを作製、それらの

免疫学的特性と、また、作成されたMoAbをもちいた数種のELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)系で血友病A患者血漿中の第VIII因子抗原量を測定し、患者血漿中の異常第VIII因子の検出を試みた。

## 材料および方法

1. 血漿：健康成人20例、および血友病A患者49例より血漿を得た。血漿は全血に3.8%クエン酸ナトリウムを1/10容加えて混和後、3,000回転10分間遠心して得た。
2. 第VIII因子活性(F. VIII : C)の測定：凝血学的方法<sup>16)</sup>およびamidolytic法<sup>17)</sup>によった。Amidolytic法はRosen, S.らの方法に従い発色基質S-2222によるマイクロタイタープレート法をもちいた。
3. 第VIII因子抗原(F. VIII : Ag)の測定：重症血友病A患者に発生した高力価第VIII因子同種ポリクローナル抗体(以下Poly Ab)を一次抗体および過よ素酸化法<sup>18)</sup>に準じたベルオキシダーゼ標識Poly Abを二次抗体にもちいたELISAによった。
4. 第VIII因子インヒビター力価の測定：Kasperら<sup>19)</sup>の方法に準じて測定した。
5. ヒト第VIII因子の純化：嶋ら<sup>19)</sup>の方法によった。加熱第VIII因子濃縮製剤を出発材料とし、得られた約2,700 unit/mgの純化第VIII因子を使用した。
6. 抗第VIII因子MoAbとその作成：純化第VIII因子を免疫原としてKöllerら<sup>20)</sup>の方法により作成した。上述した純化第VIII因子100単位を注射用蒸留水に溶解し同量のFreund's complete adjuvant(Difco Laboratory, USA)に懸濁しBalb/cマウスの皮下に免疫した。さらに2週間ごとに2回追加免疫をおこなった。3回目の免疫終了後、マウス血清中の抗ヒト第VIII因子抗体の存在を確認、ブースターとして同量の純化第VIII因子を静注し、3日後Balb/cマウス脾細胞を採取した。免疫脾細胞 $2.1 \times 10^8$ 個とBalb/c myeloma MOPC-21由来であるX-63-Ag 8-6.5.3の $4.2 \times 10^7$ 個とを43%ポリエチレングリコール(PEG 1540, 和光純薬)15%ジメチルスルホキシド(林純薬)の存在下に2分間反応させ細胞融合をおこなった。その後、順次RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640, ニッスイ)にて希釈をおこない、融合細胞(ハイブリドーマ)を96穴プレート7枚に0.1 ml/wellとなるように(脾細胞として $5 \times 10^5$ /well)分注した。細胞融合後第1日目よりhypoxanthine(Kohjin Co. Ltd.), aminopterin(和光純薬), thymidine(半井化学)を含有するRPMI培養液(HAT培地)に順次交換し、ハイブリドーマを選択培養した。さらに細胞融合後第8日目

より HT 培地に変更し最終的に RPMI 培地にて培養を続けた。次に述べる 2 種類の抗体スクリーニングにて陽性を示した細胞群に対し 2 度のクローニングを行うことにより、目的とするハイブリドーマを得、あらかじめポリスタン(2,6,10,14-tetra-methyl-pentadecane, Aldrich Chemical Company, Inc. USA)処理した 12-15 週齢マウスの腹腔内に  $4-10 \times 10^6$  個/匹を注射し、1-2 週後に腹水を採取、3,000 rpm 10 分遠心後、上清を非働化し飽和硫酸をもちいて抗体を得た。

7. MoAb スクリーニング: ELISA 法および培養上清と正常血漿混合反応後の残存第 VIII 因子活性を amidolytic 法<sup>17)</sup>を用いて測定した。ELISA 法は 0.5-1 単位の純化第 VIII 因子をポリスチレン製 96 穴マイクロタイタープレートに固相化し、順次ハイブリドーマの各 well の上清、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 家兎血清を加え、基質として *o*-フェニレン・ジアミン(O-PD)を添加、発色させ O.D.492 nm にてその吸光度を測定した。Amidolytic 法では、RPMI 培地と正常血漿の混和後の第 VIII 因子活性を 100% として 60% 以下に第 VIII 因子活性を抑制する well を陽性とした。

8. 抗第 VIII 因子モノクローナル抗体の免疫グロブリンサブクラスの決定: モノクローン化した各ハイブリドーマ培養上清について市販の抗マウス IgG<sub>1</sub>, 2, 3, 4, IgA, IgM 抗体(MILES-YEDA LTD, USA)を用いた Ouchterlony にて行った。

9. 純化第 VIII 因子に対する親和性: 種々の濃度の第 VIII 因子を固相化した抗原過剰の条件下にて前述の ELISA をおこない比色最高値の 1/2 の吸光度を示す抗原濃度を mol 表示し、簡易的に解離定数とした。

10. イムノプロテイング法およびオートラジオグラフィによる抗体認識部位の解析: Fulcher ら<sup>20)</sup>の方法に準じた。終濃度 10 u のトロンビン処理およびトロンビン未処理純化第 VIII 因子剤(2,700 u/mg)を非還元下で SDS 処理をした後、acrylamide(Bio-Rad Laboratories, CA.)SDS(sodium dodecyl sulfate, Bio-Rad Laboratories, CA.), BIS(Bio-Rad Laboratories, CA.), TEMED(N, N, N', N'-tetra-methylethylenediamine, Bio-Rad Laboratories, CA.), 過硫酸アンモニウム(和光純薬)よりなる 4-15% poly-acrylamide gradient gel/3% stacking gel に添加、電気泳動した。電気泳動後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写し 5% milk にて blocking 後、第 VIII 因子に対する MoAb およびインヒビター患者血漿より精製した IgG 分画(300 B.U./mg)と反応させた。後者はさらに抗ヒト IgG<sub>4</sub>(TAGO Inc. Burlingame, CA)マウスモノクローナル抗体と反応さ

せ、最後に<sup>125</sup>I 標識抗マウス IgG 抗体(第一化学工業株式会社)と反応後、オートラジオグラフィを行った。

11. 抗第 VIII 因子 MoAb のペルオキシダーゼ標識: HRP(Horse Radish Peroxidase)を過よ素酸化法<sup>18)</sup>に準じて MoAb に標識した。

12. ポリクローナル抗体(Poly Ab)/ペルオキシダーゼ標識 MoAb ELISA による F. VIII: Ag の測定: 血友病 A に発生した抗第 VIII 因子高力価同種抗体(インヒビター)を *n*-カプリル酸(*n*-caprylic acid, 和光純薬)処理にて IgG 分画を得た。予め純化第 VIII 因子をシアン化プロマイド活性化セファロース 4 B(Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)カラムに固相化し、上記 IgG 分画と反応後洗浄し、0.1 M グリシン塩酸緩衝液(glycine-HCl buffer, pH 2.5)にて溶出、特異的抗第 VIII 因子 IgG 分画(以下、免疫純化 IgG 分画)を得た。免疫純化した IgG 分画を 0.05 M 炭酸緩衝液(bicarbonate buffer, pH 9.6)にて 1 B.U./ml に希釈し 100  $\mu$ l/well をポリスチレン ELISA プレートに添加、4°C にて 1 晩静置し、一次固相化抗体とした。次いで、4% BSA 加 0.05 M 炭酸緩衝液にて 37°C 2 時間にてブロッキング後、0.05% Tween 20 加 0.15 M 塩化ナトリウム加 0.01 M リン酸緩衝液(PBS/Tween)にて洗浄し、各血漿サンプルの倍数希釈列を添加し、4°C にて一晩反応結合させた。抗原は正常ブール血漿を 1:10~1:1,280 まで段階希釈したものをコントロールとし、正常成人サンプルおよび血友病 A 患者サンプルは 1:10 希釈して使用した。次いで、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体を 500 倍希釈後、添加し 4°C にて一晩反応結合させた。その後、基質として *o*-フェニレン・ジアミン(O-PD)を添加、発色させ O.D.492 nm にて吸光度を測定し、第 VIII 因子抗原量値を得た。

## 成 績

### 1. 抗第 VIII 因子 MoAb の免疫学的特性

ヒト第 VIII 因子純化物をマウスに免疫し、マウスミエローマ細胞との細胞融合後、抗体スクリーニングにて抗第 VIII 因子 MoAb を得た。6 種類の抗第 VIII 因子モノクローナル抗体(NMC-VIII/5, 6, 7, 8, 9, 10)および C. Fulcher 博士(Scripps Clinic & Research Foundation, USA)より提供をうけた C5 について免疫的特性を検討した。

1) 免疫グロブリンサブクラス: NMC-VIII/5, 6, 7, 8, 9, 10(以下 VIII-5, 6, 7, 8, 9, 10)および C5 はすべて IgG<sub>1</sub>であった。

2) 抗第 VIII 因子作用(インヒビター力価): VIII-5, 6, 7, 8, 9, 10 のインヒビター力価はそれぞれ 81 B.U./mg,

160 B.U./mg, 0 B.U./mg, 53 B.U./mg, 24 B.U./mg, 2 B.U./mg, で, C5 の力価は 1,488 B.U./mg であった。また, 血友病 A インヒビター患者血漿より免疫純化した IgG 分画 (poly Ab) の力価は 300 B.U./mg であった (Table 1)。

3) 抗第VIII因子モノクローナル抗体の認識部位: 今回の作成した 6 種モノクローナル抗体は L 鎖 80 kDa を認識した。トロンビン処理第VIII因子に対しては, VIII-5, 6 は

いずれも L 鎖 72 kDa に反応したが, 一方 VIII-7, 8, 9, 10 はトロンビン処理第VIII因子には反応しなかった。VIII-7 は VIII-8, 9, 10 に比し反応は弱かった。高分子位にトロンビン未処理, 処理サンプルともバンドがみられるが, 第VIII因子由来ではない非特異的なバンドと思われた。これら VIII-7, 8, 9, 10 の 4 抗体は L 鎖 N 末端部分を認識しているものと考えられた。C5 はトロンビン未処理第VIII因子に対して H 鎖 90 kDa および高分子位に 200 kDa 前後の multimeric なバンドがみられるが, トロンビン処理第VIII因子に対しては高分子位の multimeric なバンドは消失し 90 kDa のバンドが増強し, H 鎖由来の 54 kDa が認められた (Table 1 および Fig.1)。

4) 純化第VIII因子に対する親和性: VIII-5, 6, 7, 8, 9, 10 の親和性はそれぞれ  $2.0 \times 10^{-9}M$ ,  $3.1 \times 10^{-9}M$ ,  $1.0 \times 10^{-9}M$ ,  $8.4 \times 10^{-10}M$ ,  $6.2 \times 10^{-10}M$ ,  $5.6 \times 10^{-10}M$  であった。

5) 抗第VIII因子ポリクローナル抗体の認識部位: インヒビター患者血漿より免疫純化して得た Poly Ab は L 鎖 80 kDa を認識した。トロンビン処理第VIII因子に対し

Table 1. Characterization of seven monoclonal antibodies to F. VIII

Monoclonal antibodies	IgG class	Anti-F. VIII : C (Bethesda U/mg IgG)	Binding fragment
NMC-VIII/5	IgG <sub>1</sub>	81	72kDa
NMC-VIII/6	IgG <sub>1</sub>	160	72kDa
NMC-VIII/7	IgG <sub>1</sub>	0	80kDa
NMC-VIII/8	IgG <sub>1</sub>	53	80kDa
NMC-VIII/9	IgG <sub>1</sub>	24	80kDa
NMC-VIII/10	IgG <sub>1</sub>	2	80kDa
C5	IgG <sub>1</sub>	1488	54kDa

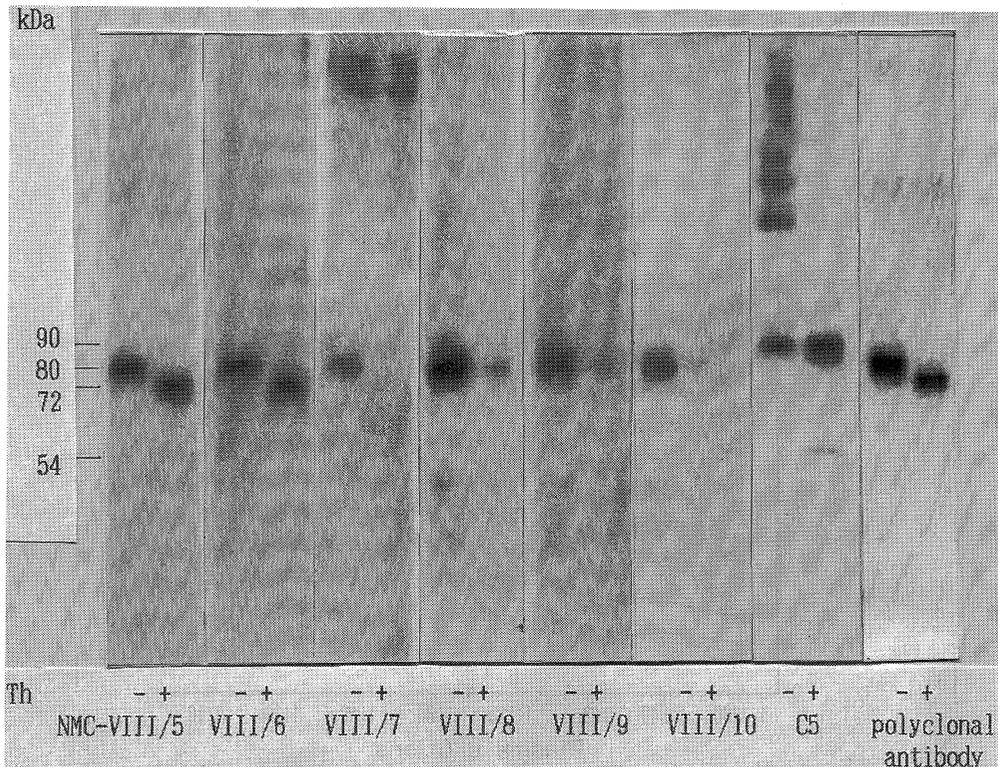


Fig. 1. Immunoblot and autoradiography analysis of purified factor VIII preparation without thrombin (Th-) or thrombin-treated (Th +, final concentration 10u/ml) using seven monoclonal antibodies and polyclonal alloantibody.

ては、L鎖 72 kDa に反応した。

2. ペルオキシダーゼ標識 MoAb を用いた ELISA 法による正常ヒト血漿および血友病 A 患者血漿中の第 VIII 因子抗原の測定

一次抗体として血友病 A に発生した抗第 VIII 因子高力価同種抗体を、二次抗体として比較的抗体力価が高く第 VIII 因子に対して親和性の強かった MoAb(VIII-5, 10 および C5) をペルオキシダーゼで標識し、ELISA 法で血漿中の第 VIII 因子抗原を測定した。検体は 1:10~1:1,280 の範囲において希釈を行い、いずれの MoAb をもちいた ELISA においても、測定限界はいずれも 1.0 u/dl であった。また一次抗体および二次抗体に Poly Ab をもちいた ELISA 法でもほぼ同様の検量線が得られた(Fig. 2.)。

健康成人 20 例について、一次抗体として Poly Ab を、二次抗体として VIII-5 をもちいた ELISA (VIII-5-ELISA) による F.VIII:Ag は 93±21 u/dl, VIII-10-ELISA では 91±18 u/dl, C5-ELISA では 91±21 u/dl であった。一次抗体、二次抗体とも抗第 VIII 因子同種抗体(インヒビター) をもちいた Poly-ELISA では 97±23 u/dl であった。Poly-ELISA による F.VIII:Ag 量と VIII-5, 10 および C5-ELISA による F.VIII:Ag 量との相関はそれぞれ r =

Table 2. Levels of F. VIII: C and F. VIII: Ag in the plasma of normal subjects

Case No.	F.VIII:C (u/dl)	F. VIII: Ag (u/dl)			
		polyclonal ELISA	monoclonal ELISAs		
			NMC-VIII/5	NMC-VIII/10	C5
1.	65	60	57	58	54
2.	62	70	70	76	69
3.	75	70	65	73	68
4.	86	72	68	70	65
5.	82	74	67	65	62
6.	80	76	75	80	72
7.	72	81	85	74	77
8.	90	82	76	78	74
9.	88	91	100	92	98
10.	85	92	87	90	89
11.	100	104	86	88	86
12.	95	106	118	114	112
13.	118	114	106	112	110
14.	120	110	116	102	114
15.	122	118	116	110	108
16.	106	120	110	100	116
17.	128	122	98	112	97
18.	138	122	120	108	118
19.	114	124	112	108	114
20.	122	132	118	112	116

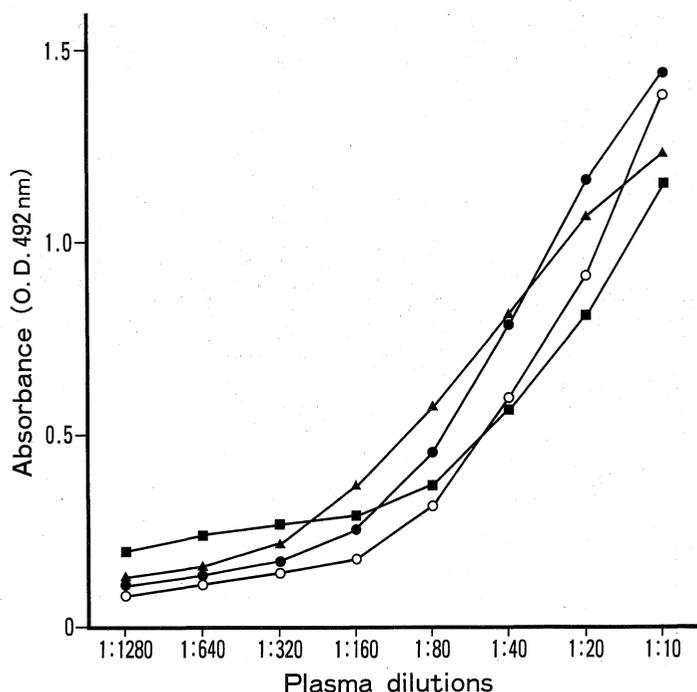


Fig. 2. A dose-response curve for plasma F. VIII: Ag measured by mono-ELISA and poly-ELISA. NMC-VIII/5-ELISA: (○-○), NMC-VIII/10-ELISA: (▲-▲), C5-ELISA: (■-■), poly-ELISA: (●-●)

0.92,  $r=0.93$ ,  $r=0.93$ であった(Table 2およびFig. 3).

血友病A患者49例(F.VIII:Cが1%以下の重症型36例, 1-4%の中等症6例, 5%以上の軽症型7例)についてF.VIII:Ag量をPoly-ELISA, および3種のMoAb-ELISAの系で比較検討した. Poly-ELISAでF.VIII:Ag量が1u/dl以下であったのは重症型36例中30例であった(症例1-30). これらの例は3種のMoAb-ELISAの系でもF.VIII:Ag量は検出感度以下で, また第Ⅷ因子活性も<1%であった. Poly-ELISAでF.VIII:Ag量が1u/dl-<50u/dlと低下していたのは13例でⅧ-5-ELISA値は

1u/dl-39u/dl, Ⅷ-10-ELISA値は, 1u/dl-34u/dl, C5-ELISA値は1-16u/dlであった(症例31-43). そのうち9例(症例31-39)は3種のMoAb-ELISAの系でもほぼ同程度に低下していた. 他の4例(症例40-43)はF.VIII:CがF.VIII:Ag値に比し明らかに低下しており, Ⅷ-5-ELISA値は24u/dl-39u/dl, Ⅷ-10-ELISA値25u/dl-34u/dl, C5-ELISA値9.0-16u/dlで, 各MoAb間のF.VIII:Ag値に一部discrepancyが認められ, 特にC5-ELISA値がやや低下していた. また, Poly-ELISAでF.VIII:Agが50u/dl以上認められたのは6症例(症例44-49)であった. 各MoAb間のF.VIII:Ag値に一部dis-

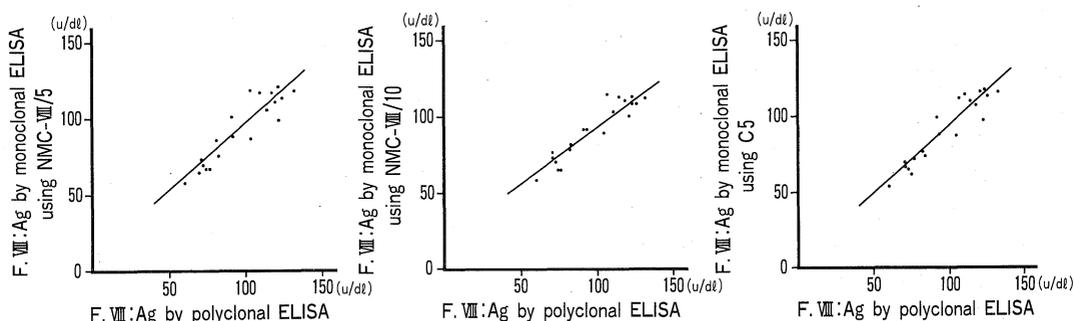


Fig. 3. Correlation between F. VIII : Ag levels by polyclonal ELISA (Poly-ELISA) and by several monoclonal ELISAs using NMC-VIII/5,6 and C5 (NMC-VIII/5-ELISA, NMC-VIII/10-ELISA, C5-ELISA) in the plasma of 20 normal individuals.

The regression line relating F. VIII : Ag by Poly-ELISA to NMC-VIII/5-ELISA is  $y=0.87x+8.62$  ( $r=0.92$ )(the left figure).

The regression line relating F. VIII : Ag by Poly-ELISA to NMC-VIII/10-ELISA is  $y=0.74x+18.83$ ( $r=0.93$ )(the middle figure).

The regression line relating F. VIII : Ag by Poly-ELISA to C5-ELISA is  $y=0.89x+4.18$  ( $r=0.93$ )(the right figure).

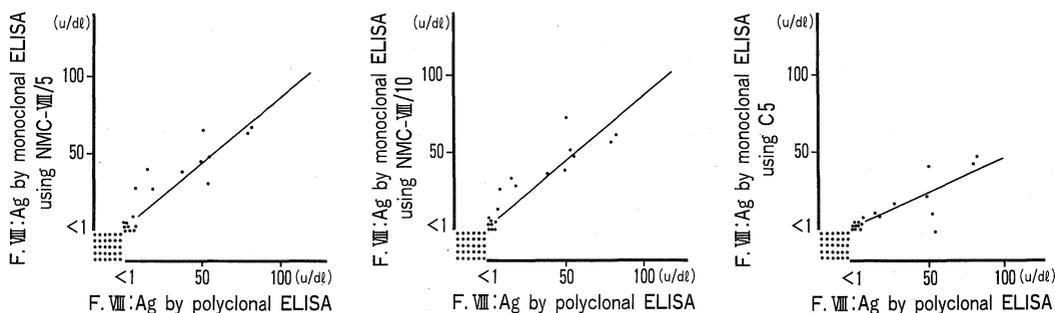


Fig. 4. Correlation between F. VIII : Ag levels by polyclonal ELISA (Poly-ELISA) and by several monoclonal ELISAs using NMC-VIII/5,6 and C5 (NMC-VIII/5-ELISA, NMC-VIII/10-ELISA, C5-ELISA) in the plasma of 49 patients with hemophilia A.

The regression line relating F. VIII : Ag by Poly-ELISA to NMC-VIII/5-ELISA is  $y=0.84x+0.82$  ( $r=0.94$ )(the left figure).

The regression line relating F. VIII : Ag by Poly-ELISA to NMC-VIII/10-ELISA is  $y=0.84x+1.20$  ( $r=0.93$ )(the middle figure).

The regression line relating F. VIII : Ag by Poly-ELISA to C5-ELISA is  $y=0.44x+0.26$  ( $r=0.87$ )(the right figure).

crepancy が認められ C5-ELISA 値は他の 2 者に比し低下の傾向を示した。特に症例 47 では C5-ELISA 値は他の 2 種の MoAb 値に比し <1 u/dl と著しく低下し、症例 46 も C5-ELISA 値が低下していた。症例 48, 49 は第 VIII 因子活性はそれぞれ 3 u/dl であったが、VIII-5-ELISA 値はそれぞれ 62 u/dl, 65 u/dl, VIII-10-ELISA 値は 56 u/dl, 60 u/dl と正常値を示し、C5-ELISA 値は 42 u/dl, 45 u/dl とやや低値を示したが、明らかな第 VIII 因子異常症と考えられた (Table 3 および Fig. 4)。

考 察

近年、凝固第 VIII 因子蛋白の一次構造は DNA レベルおよびアミノ酸レベルで明らかにされたが<sup>3)4)5)</sup>、第 VIII 因子蛋白の構造と機能を知る上で、モノクローナル抗体 (MoAb) は有力な分析方法として利用されるようになった。教室では嶋ら (1987)<sup>19)</sup> が抗第 VIII 因子活性を有しない MoAb の VIII-1 を作成したが、今回、著者は抗第 VIII 因子活性を有する MoAb の作成を意図し、得られた MoAb の免疫学的特性と、MoAb をもちいた数種の ELISA 系で血友病 A 患者血漿中の抗原量を比較検討した。

6 種の MoAb (VIII-5, 6, 7, 8, 9, 10) はいずれも IgG<sub>1</sub> に属し、VIII-7 を除いて、いずれも抗第 VIII 因子活性を示す MoAb であった。これら 6 種の MoAb の第 VIII 因子蛋白認識部位を純化第 VIII 因子剤の SDS-PAGE 泳動後に、MoAb を添加し、イムノプロット法で検討したところ、いずれも第 VIII 因子蛋白の C 末端 L 鎖 80 kDa (Glu<sup>1649</sup>-Tyr<sup>2332</sup>) 部位を認識する抗体であった。

第 VIII 因子の L 鎖はトロンピンにより Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup> が切断され 72 kDa (Ser<sup>1690</sup>-Tyr<sup>2332</sup>) に転換する。トロンピン処理した第 VIII 因子製剤に対しては VIII-5 および 6 は 72 kDa のバンドと反応したが、VIII-7, 8, 9, 10 では 72 kDa のバンドの出現は認められなかった。従って VIII-7, 8, 9, 10 は第 VIII 因子 L 鎖の N 末端の酸性領域 (Glu<sup>1649</sup>-Arg<sup>1689</sup>) を認識しているものと考えられた。

最近、著者は嶋らとともに抗第 VIII 因子活性を示す VIII-8, 9 および 10 の認識部位について、L 鎖 N 末端付近のシークエンスにもとづいた 15 アミノ酸残基からなる合成ペプチドによる競合試験およびリコンビナントフラグメントをもちいたイムノプロット法で、これら 3 MoAb の第 VIII 因子結合部位 (エピトープ) は Glu<sup>1675</sup>-Glu<sup>1684</sup> である成績を得た<sup>21)</sup>。第 VIII 因子 L 鎖の N 末端の酸性領域はリガンド結合に適した第 VIII 因子の表面構成を形成していると考えられる。また、血液中では第 VIII 因子は von Willebrand 因子 (vWF) と複合体を形成して循環しているが、vWF との結合部位は第 VIII 因子 L 鎖 N 末端部であるこ

Table 3. Levels of F. VIII : C and F. VIII : Ag in the plasma of 49 patients with hemophilia A

Case No.	F. VIII : C (u/dl)	F. VIII : Ag (u/dl)			
		polyclonal ELISA	monoclonal ELISAs		
			NMC-VIII/5	NMC-VIII/10	C5
1.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
2.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
3.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
4.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
5.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
6.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
7.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
8.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
9.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
10.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
11.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
12.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
13.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
14.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
15.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
16.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
17.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
18.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
19.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
20.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
21.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
22.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
23.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
24.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
25.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
26.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
27.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
28.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
29.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
30.	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
31.	<1.0	1.3	1.0	3.0	2.9
32.	<1.0	2.0	2.0	4.7	1.0
33.	<1.0	2.7	1.0	1.0	2.2
34.	<1.0	3.6	1.0	1.0	2.3
35.	<1.0	7.8	1.7	5.6	1.0
36.	1.6	1.9	1.7	4.0	1.0
37.	1.8	2.4	1.2	1.0	3.0
38.	2.8	2.5	4.5	7.0	4.6
39.	5.0	7.4	9.0	13	4.2
40.	5.2	8.4	27	25	9.4
41.	5.0	15	39	32	9.9
42.	8.0	19	24	28	9.0
43.	6.0	38	38	34	16
44.	10	50	44	38	21
45.	14	51	64	72	40
46.	1.7	54	30	51	9.0
47.	<1.0	55	48	47	<1.0
48.	3.0	80	62	56	42
49.	3.0	82	65	60	45

とが嶋ら<sup>21)</sup>, Fosterら<sup>22)</sup>, Leyteら<sup>23)</sup>により観察されている。従って、この部位を認識するVIII-8, 9, 10はF.VIII/vWFの結合および第VIII因子活性の安定などの機能およびその異常状態の検索に有用な抗体と考えられる。

一方, VIII-5および6はトロンビン添加第VIII因子のL鎖分解産物である72 kDaに反応した。血友病A患者に発生する第VIII因子抑制物質(インヒビター)の認識部位は第VIII因子のH鎖54 kDa,あるいは44 kDaとL鎖72 kDaのそれぞれ単独または両者のものが存在することが知られている<sup>20)</sup>。このうちL鎖認識インヒビターはL鎖C末端のC<sub>2</sub>ドメインに主要なエピトープが存在すると報告されている<sup>24)</sup>。また, 嶋らはDr. D. Scandellaより供与されたリコンビナントフラグメントをもちいた結合試験にてVIII-5および6認識部位はC2ドメインに, また, もちいたPoly AbもC2ドメインのVIII-5および6より広い範囲を認識することを報告している<sup>25)</sup>。今回, 著者の作成した第VIII因子に対する6種のMoAbは第VIII因子蛋白L鎖N端を認識するもの4種(VIII-7, 8, 9および10)とL鎖C末端のC<sub>2</sub>ドメインを認識するもの2種(VIII-5および6)であり, H鎖上のエピトープを認識するMoAbは得られなかった。

著者はこれらのMoAbをもちいてELISAで第VIII因子抗原の測定を試みた。この際, 一次抗体として血友病A患者に発生した高力価インヒビターIgG分画より得たPoly Abをもちいて被検血漿中の第VIII因子を捕捉し, 二次抗体として反応ドメインの明らかなMoAbをもちいれればドメイン内の構造あるいは機能を反映したF.VIII:Ag量を測定し得ると考えた。L鎖N末端を認識する4種のMoAbのうち親和性の高いVIII-10を, L鎖C末端C2ドメインを認識するものとしてVIII-5を, またH鎖を認識するMoAbとしてScripps Clinic & Research FoundationのC. Fulcher博士よりH鎖54 kDa中のThr<sup>351</sup>-Ser<sup>365</sup>にエピトープを有するC5の提供をうけ使用した<sup>26)</sup>。また, これらMoAbによるVIII-5-ELISA, VIII-10-ELISA, C5-ELISAの対照として二次抗体に一次抗体と同じPoly AbをもちいたPoly-ELISAをおこなった。VIII-5-ELISA, VIII-10-ELISA, C5-ELISAおよびPoly-ELISAの測定限界はいずれも1.0 u/dlであった。

正常人20例の血漿中F.VIII:Ag量はPoly-ELISAで60-132 u/dl, VIII-5-ELISAで57-120 u/dl, VIII-10-ELISAで58-114 u/dl, C5-ELISAで54-118 u/dl, Poly-ELISA値とそれぞれのMoAb-ELISAとの相関係数は $r=0.92$ ,  $r=0.93$ および $r=0.93$ とよく相関した。

血友病A 49症例の血漿中のF.VIII:Ag量はPoly-ELISAによる値で3群に大別した。Group 1はF.VIII:

Ag量1 u/dl以下の症例で, 50例中30例が(症例1-30)がこれに属していた。いずれも第VIII因子活性(F.VIII:C)も1%以下の重症型であった。Group 2はF.VIII:Ag量1-49 u/dlの低下例で, 13例(症例31-43)がこれに属していた。F.VIII:CとF.VIII:Ag量がほぼ一致して低下していた例(Group 2-A)は9例(症例31-39)で, またF.VIII:CがF.VIII:Ag量に比し明らかに低下した例(Group 2-B)は4例(症例40-43)であった。Group 3はF.VIII:Ag量50 u/dl以上の正常例で6例(症例44-49)存在したがF.VIII:Cは15%以下に低下していた。

Group 1の30例は第VIII因子蛋白のL鎖C末を認識するMoAb VIII-5, L鎖N末を認識するVIII-10およびH鎖54 kDaを認識するMoAb C5のいずれをもちいたELISAでも1 u/dl以下で, 従ってこのGroupは第VIII因子蛋白欠如症と考えられた。Group 2の13例ではVIII-5-ELISA値は1-39 u/dl, VIII-10-ELISA値は1-34 u/dl, C5-ELISA値は1-16 u/dlであった。F.VIII:CとPoly-ELISAによるF.VIII:Ag値のほぼ一致したGroup-2-A 9例は, VIII-5-ELISAでは1-9.0 u/dl, VIII-10-ELISAでは1-13 u/dl, C5-ELISAでは1-4.6 u/dl認められた。これら9症例は第VIII因子活性中和能の有無で分類したcross reacting material reduced(CRM<sup>R</sup>)例である。F.VIII:CがF.VIII:Ag値に比し明らかに低下していたGroup-2-B 4例はVIII-5-ELISAでは24-39 u/dl, VIII-10-ELISAでは25-34 u/dl, C5-ELISAでは9.0-16 u/dl認められ各MoAb間にも不一致例が存在するが, いずれも第VIII因子蛋白異常症と推察される。

Group 3はF.VIII:Ag量が正常なCRM<sup>+</sup>(A<sup>+</sup>)病型であり6例存在した。そのうち, VIII-5およびVIII-10-ELISA値がそれぞれ48, 47 u/dlにかかわらずC5-ELISA値が1 u/dl以下と著しく低下していた症例47は, C5の認識エピトープ(Thr<sup>351</sup>-Ser<sup>365</sup>)およびその近傍の異常症と推察された。症例46もC5-ELISAにてF.VIII:Agは検出されたが, VIII-5およびVIII-10-ELISA値に比し著しく低下しており, 同様の異常症と推察された。また症例48, 49はVIII-5-ELISAでは62 u/dl, 65 u/dl, VIII-10-ELISAでは56 u/dl, 60 u/dl, C5-ELISAでは42 u/dl, 45 u/dlであった。

以上のごとく血友病A 49例のうち, 30例はPoly-ELISA, L鎖C端, L鎖N端, およびH鎖54 kDa領域と反応するMoAbをもちいたELISA系のいずれの方法でも第VIII因子抗原量は<1 u/dlで, 第VIII因子欠如症と診断しえた。9例は第VIII因子活性値がいずれの方法による第VIII因子抗原量とほぼ同程度低下したCRM<sup>R</sup>病型であった。10例は第VIII因子活性は低下するもPoly-ELISA

により第Ⅷ因子抗原量は明らかに高値であった。このうち4例は50 u/dl以下でCRM<sup>R</sup>, 6例は50 u/dl以上でCRM<sup>+</sup>(A<sup>+</sup>)病型であったが、活性：抗原比からみて第Ⅷ因子の構造異常症と考えられる。

CRM<sup>+</sup>(A<sup>+</sup>)病型6例ではⅧ-5およびⅧ-10-ELISA系による第Ⅷ因子抗原量はPoly-ELISA値とほぼ相関したが、C5-ELISAでは著しく低下する例が2例(症例46, 47)存在した。C5はH鎖Thr<sup>351</sup>-Ser<sup>365</sup>間のエピトープを認識するMoAbであり、症例46, 47はこの領域の構造異常症と推察されるが、今後、第Ⅷ因子の立体構造の解明、また遺伝子的手法をもちいることによるアミノ酸レベルの解明が待たれる。また症例48, 49は兄弟例で、Poly-ELISA値、Ⅷ-5-ELISA値、Ⅷ-10-ELISA値およびC5-ELISA値は正常であったが、当教室の嶋らによりH鎖トロンビン開裂部位の異常を認め、Arg<sup>372</sup>のCysへの置換およびトロンビン開裂異常が明らかにされた<sup>27)</sup>。本症例は第Ⅷ因子抗原の基本的分子構造および抗原量は保たれているが、トロンビンによる開裂が障害されているために第Ⅷ因子活性の発現が弱いと考えられた。

以上、症例46, 47, 48, 49を除く第Ⅷ因子の構造異常症と考えられる6症例では、Poly-ELISAでの測定値に比しL鎖C末およびL鎖N末を認識する抗体での明かな低下は認められず、またH鎖N末を認識するC5にてもF.VIII:Agが認められており、これらのMoAbの認識する部位以外の異常が推定される。

## 結 語

第Ⅷ因子に対するインヒビター作用を持つ作成した6種のMoAbの免疫学的特性とこれらMoAbをもちいた3種のELISA系で血友病A患者血漿中の第Ⅷ因子抗原量を検討した。

1. 6種のMoAb(Ⅷ-5, 6, 7, 8, 9, 10)はすべてIgG<sub>1</sub>に属した。これらMoAbのインヒビター力価はそれぞれ81 B.U/mg, 160 B.U/mg, 0 B.U/mg, 53 B.U/mg, 24 B.U/mg, 2.0 B.U/mgであった。Ⅷ-5, 6はL鎖C末をⅧ-7, 8, 9, 10はL鎖N末を認識していた。

2. 一次抗体としてPoly Ab, 二次抗体としてMoAbをもちいたELISA系で正常人20例の第Ⅷ因子抗原量を測定した。Ⅷ-5-ELISAでは93±21 u/dl, Ⅷ-10-ELISAでは91±18 u/dl, C5-ELISAでは91±21 u/dlで、また二次抗体もPoly AbをもちいたELISAでは97±23 u/dlであった。

3. 血友病A症例49例をPoly-ELISAにて3群に分類した。第Ⅷ因子抗原が検出されない30例(Group 1)では、いずれのMoAb-ELISA測定系においても第Ⅷ因

子抗原量は測定限界以下であり、第Ⅷ因子欠如症と考えられた。第Ⅷ因子抗原低下13例(Group 2)のうちF.VIII:CとPoly-ELISAによるF.VIII:Ag値のほぼ一致した9例(Group 2-A)は、CRM<sup>R</sup>例であった。F.VIII:CがF.VIII:Ag値に比し明らかに低下していた4例(Group 2-B)は第Ⅷ因子蛋白異常症と推察された。第Ⅷ因子活性が15%以下にもかかわらず第Ⅷ因子抗原正常例6例(Group 3)が存在した。この中にはC5-ELISA値が他のMoAb-ELISA値およびPoly-ELISA値に比し著しく低下した症例があり、C5認識部位の異常が示唆された。

本論文要旨は第91回日本小児科学会総会にて発表した。

## 文 献

- 1) Hellman, L., Smedsrod, B., Sandberg, H. and Petterson, U.: Secretion of coagulant factor VIII activity and antigen by in vitro cultured rat liver sinusoidal endothelial cells. *Br. J. Haematol.* **73**: 348-355, 1989.
- 2) Shima, M., Yoshioka, A., Nakai, H., Tanaka, I., Terada, S., Imai, S. and Fukui, H.: Factor VIII polypeptide specificity of monoclonal anti-factor VIII antibodies. *Br. J. Haematol.* **70**: 63-69, 1988.
- 3) Gitshier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Vehar, G. A. and Lawn, R. M.: Characterization of human factor VIII gene. *Nature* **312**: 326-330, 1984.
- 4) Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitshier, 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.
- 5) Tool, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Sheomaker, 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 anti-haemophilic factor. *Nature* **312**: 342-347, 1984.
- 6) Kaufman, R. J., Wasley, L. C. and Dorner, A. J.: Synthesis, processing and secretion of recom-

- binant human factor VIII. Expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **263** : 6352-6362, 1988.
- 7) **Vahar, 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.
  - 8) **Fulcher, C. A. and Zimmerman, T. S.** : Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** : 1648-1652, 1982.
  - 9) **Hardisty, R. M. and MacPherson, J. C.** : A one-stage factor VIII(anti-haemophilic globulin) assay and its use on venous and capillary plasma. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* **7** : 215-229, 1962.
  - 10) **Kasper, C. K., Aledort, L. M., Counts, R. B., Edson, J. R., Fratantoni, J., Green, D., Hampton, J. W., Hilgartner, M. W., Lazerson, J., Levine, P. H., McMillan, C. W., Pool, J. G., Shapiro, S. S., Shulman, N. R. and van Eys, J.** : A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* **34** : 869-872, 1975.
  - 11) **Peake, I. R. and Bloom, A. L.** : Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen in plasma and serum and its reduction in hemophilia. Preliminary studies on adult and fetal blood. *Lancet* **i** : 473-475, 1978.
  - 12) **Köhler, G. and Milstein, C.** : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256** : 495-497, 1975.
  - 13) **Rotblat, F., Goodal, A. H., O'Brien, D. P., Rawlings, E., Middleton, S. and Tuddenham, E. G. B.** : Monoclonal antibodies to human procoagulant factor VIII. *J. Lab. & Clin. Med.* **101** : 736-745, 1983.
  - 14) **Fulcher, C. A., Roberts, J. R., Holland L. Z. and Zimmerman, T. S.** : Human factor VIII procoagulant protein. Monoclonal antibodies define precursor-product relationships and functional epitopes. *J. Clin. Invest.* **76** : 117-124, 1985.
  - 15) **Shima, M., Yoshioka, A., Tanaka, I., Fujiwara, T., Imai, S., Tsubura, Y. and Fukui, H.** : Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) of factor VIII antigen using a monoclonal antibody devoid of factor VIII inhibitor activity. *Blood and Vessel* **18** : 48-89, 1987.
  - 16) **吉岡 章, 福井 弘** : 第Ⅷ, IX因子定量法. *Medical Technology* **5** : 463-467, 1977.
  - 17) **Rosen, S.** : Assay of factor VIII : C with a chromogenic substrate. *Scand. J. Haematol. - Suppl* **40 33** : 139-145, 1984.
  - 18) **Wilson, M. B. and Nakane, P.** : Immunofluorescence and related staining techniques(Knap, W. W., Holubar, H. and Wick, G. eds.). Elsevier/North holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 215-224, 1978.
  - 19) **Shima, M., Yoshioka, A., Tanaka, I., Fujiwara, T., Nakai, H., Tsubura, Y. and Fukui, H.** : Purification of human factor VIII from a heat-treated factor VIII concentrate in the presence of protein protease inhibitors. *Acta Haematol. Japon.* **50** : 1739-1245, 1987.
  - 20) **Fulcher, C. A., de Graaf Mahoney, S., Roberts, J. R., Kasper, C. and Zimmerman, T. S.** : Localization of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 7728-7732, 1985.
  - 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. *Internatl. J. Hematol.*, in press.
  - 22) **Foster, P. A., Fulcher, C. A., Houghten, R. H. and Zimmermn, T. S.** : An immunogenic region within residues Val 1670-Glu 1684 of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **263** : 5230-5234, 1988.
  - 23) **Leyte, A., Verbeet, M. P., Brodniewicz-Proba, T., Van Mourik, J. A. and Mertens, K.** : The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. *Biochem. J.* **257** : 679-683, 1989.
  - 24) **Scandella, D., Mattingly, M., de Graaf, S. and**

- Fulcher, C. A.** : Localization of epitope for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood* 74 : 1618-1626, 1989.
- 25) 嶋 緑倫, 吉岡 章, 田中一郎, 藤原利治, 寺田茂樹, 中井寛明, 澤本如克, 神末政樹, 村上智彦, 福井 弘 : インヒビター(抗第VIII因子同種抗体)と競合するL鎖認識抗第VIII因子モノクローナル抗体(NMC-VIII/5.6)のエピトープ解析. *Internatl. J. Hematol.* 54 : 281, 1991.
- 26) **Foster, P. A., Fulcher, C. A., Houghten, R. H., de Graaf Mahoney, S. and Zimmermn, T. S.** : Localization of the binding region of a murine monoclonal anti-factor VIII antibody and a human anti-factor VIII alloantibody, both of which inhibit factor VIII procoagulant activity, to amino acid residues Threonine<sup>351</sup>-Serine<sup>365</sup> of the factor VIII heavy chain. *J. Clin. Invest.* 82 : 123-128, 1988.
- 27) **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.