

# Enzyme-Linked Immunosorbent Assay による第VIII因子 抑制物質中の IgG subclass の検討

奈良県立医科大学小児科学教室

澤本好克

## ANALYSIS OF IgG SUBCLASS IN FACTOR VIII INHIBITOR BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

YOSHIKATSU SAWAMOTO

*Department of Pediatrics, Nara Medical University*

Received September 30, 1992

*Summary*: Semi-quantitative analysis for factor VIII (F. VIII)-specific IgG subclass in the plasma of hemophilia A with F. VIII inhibitor was developed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized recombinant F. VIII. The bound F. VIII-specific IgG subclass was detected by monoclonal anti-IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>4</sub> antibodies followed by peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG. Out of 82 plasma samples from 14 patients with inhibitor, 53 samples from 11 patients were positive for only IgG<sub>4</sub>. There was no sample which was positive for only IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> or IgG<sub>3</sub>. Of the eleven patients with samples which were positive for only IgG<sub>4</sub>, one patient was also positive for only IgG<sub>1</sub> in one sample, four patients were also positive for only IgG<sub>2</sub> in eight samples and one patient was positive for only IgG<sub>3</sub> in three samples on different dates. None of F. VIII-specific IgG subclass was detected in the plasma from 27 samples of hemophilia A without inhibitor. In conclusion, the ELISA system was suitable not only for the detection of F. VIII inhibitor but also for semi-quantitative estimation of changes in the plasma content of F. VIII-specific IgG subclass. Furthermore, it was demonstrated that the dominant subclass among the inhibitors was IgG<sub>4</sub>. However, other IgG subclasses were also detected in some cases.

### Index Terms

hemophilia A, factor VIII (F. VIII), inhibitor, IgG subclass, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 緒 言

血友病 A 患者の出血に対する第VIII因子補充療法中に 8~20%の頻度で第VIII因子に対する抑制物質(factor VIII-inhibitor; F.VIII-inhibitor)が発生し、通常の出血管理は困難になることが認められている<sup>1)</sup>。F.VIII-inhibitorは添加第VIII因子の凝固活性を progressive に不活化するので、その検出には正常血漿と含抑制物質血漿を等量混合し、2時間後に正常血漿中の第VIII因子活性を 50%失活せ

しめる作用を 1 Bethesda 単位と規定した Kasper らの方法<sup>2)</sup>が一般的に用いられている。

F.VIII-inhibitor の理化学的性状については 1960 年代に諸家により、Sephadex-G 200 ゲル濾過第 2 峰 (7 S globulin) に存在すること、また第VIII因子抑制物質中和試験法で IgG 分画に属することが報告され<sup>3)-6)</sup>、その後さらに 1970 年代には中和試験法による IgG L 鎖の検索で、Kappa 鎖、Lambda 鎖、あるいはその両方に存在していること<sup>7)</sup>、また H 鎖の検索では大部分が IgG class で

IgG<sub>4</sub>優位と報告されるようになった<sup>9)</sup>.

1984年、第VIII因子遺伝子が単離され、その塩基配列と、それよりコードされる第VIII因子蛋白は2332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>9)-13)</sup>。また第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末端由来の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ていることが知られるようになった<sup>14)</sup>。Fulcherら<sup>15)</sup>は第VIII因子とF.VIII-inhibitorの反応をImmunoblot法で検討し、血友病A患者に発生したF.VIII-inhibitorのうち第VIII因子L鎖中の72 KDa fragmentのみ、H鎖中の44 KDa fragmentのみ、あるいは72 KDaと44 KDa fragmentの両方に反応する例が存在することを観察した。さらに彼らはImmunoblot法にてF.VIII-inhibitorを構成するIgG subclassを検索し、IgG<sub>1</sub>およびIgG<sub>4</sub>が検出されることを報告した<sup>16)</sup>。しかしImmunoblot法を用いたF.VIII-inhibitor中のIgG subclassの検出については、RIを使用しなければならず、手技が煩雑でかつ定量的解析に困難を有している。そこで著者は新しい検出法として、Bayer/Cutter社より提供を受けたrecombinant factor VIII(r. F. VIII, BAW 6240)を用いて、F.VIII-inhibitor中のIgG subclassをenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)で検索した。

## 対象および方法

1. 対象：F.VIII-inhibitorの発生した血友病A患者14例より、すくなくとも数カ月の期間において経時的に採取した82血漿サンプルとF.VIII-inhibitorを有していない血友病A患者27例よりの27血漿サンプルについて検索した。なお、健康成人20例20血漿サンプルを対照とした。

2. 第VIII因子活性の測定：第VIII因子欠乏血漿を基質とした凝固一段法<sup>17)</sup>によった。

3. F.VIII-inhibitorの力価の測定：Kasperらの方法<sup>2)</sup>に準じて、正常血漿と被検血漿を等量混合し、37°C 2時間加温後、残存第VIII因子活性を測定した。

4. F.VIII-inhibitor中のIgG subclassのELISAによる測定：F.VIII-inhibitor中のIgG subclassについて、下記のstepによるELISAで検討した。

step 1. 第VIII因子の固相化：Bayer/Cutter社より提供を受けたr. F.VIIIを用いた。本剤の表示力価は500 U/バイアルで、添付された注射用蒸留水5 mlで溶解後、0.05 M炭酸緩衝液(PH 9.6)にて0.3 U/mlに希釈し、ポリス

チレンELISAプレート(Nunc, Denmark)のwellにおのおの100 μl(0.03 U/well)ずつ分注し、4°Cで一晩静置し固相化した。次いで、4%ウシ血清アルブミン(BSA)加0.05 M炭酸緩衝液にて37°C 2時間ブロッキング後、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)にて洗浄した。

step 2. r. F.VIIIとF.VIII-inhibitorとの反応：各血漿サンプルの希釈列を添加し、4°Cにて1晩反応結合させた。

step 3. 抗ヒトIgG subclassマウスモノクローナル抗体との反応：特異性の確認された抗ヒトIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>(ICN Immunobiologicals, Inc., Israel)あるいはIgG<sub>4</sub>(Biomakor, Inc., Israel)マウスモノクローナル抗体を1000倍希釈後100 μl添加し、それぞれの上記反応系に4°Cにて1晩反応結合させた。

step 4. ベルオキシダーゼ標識抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub>との反応：1000倍希釈したベルオキシダーゼ標識抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub>(TAGO, Inc., Burlingame, CA, USA)を100 μl添加し、37°Cにて2時間反応後、基質としてオフェニレン・ジアミンを添加、室温で正確に15分間反応後、2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 μlを加えて反応を停止させ、O. D. 492 nmにて吸光度を測定した。すべての測定はduplicateで行った。

5. 血友病A患者血漿中のIgG subclassの定量：ミドリ十字より提供を受けたIgG subclass測定キットを用い、サンドイッチELISA法により測定した。

## 成 績

1. F.VIII-inhibitorを構成するIgG subclassのELISAによる検量線

Kasper法によるF.VIII-inhibitor力価(Bethesda単位)が比較的高い数例の血友病A患者血漿サンプルをそれぞれ10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>あるいは10<sup>5</sup>倍に希釈し各濃度についてIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>あるいはIgG<sub>4</sub>のそれぞれに対するELISAを行い、O. D. 492 nmにおける吸光度を測定した。

Bethesda単位1370を示したSample 39(後述Table 1参照)ではIgG<sub>1</sub>-ELISA測定時のO. D.は10<sup>2</sup>希釈時1.14、10<sup>3</sup>希釈時0.77、10<sup>4</sup>希釈時0.30、10<sup>5</sup>希釈時0.01とほぼ直線関係を示した(Fig. 1-a)。対照として正常人20血漿サンプルのIgG<sub>1</sub>-ELISA系の平均O. D.±2 S. D.は10<sup>2</sup>希釈時0.03±0.07、10<sup>3</sup>希釈時0.01±0.03、10<sup>4</sup>希釈時0.00±0.02、10<sup>5</sup>希釈時0.00±0.02であった。正常人血漿によるO. D.+2 S. D.以上を呈する被検血漿をELISA陽性とし、ELISA陽性を示す最大希釈倍数にそのO. D.値を乗じたものをELISA係数(ELISA Index)

Table 1. Inhibitor titers and ELISA indexes in 82 plasma samples from 14 hemophilia A with inhibitor

Case No.	Sample No.	Inhibitor titer (Bethesda units/ml)	ELISA index for F. VIII-inhibitor IgG subclass				Case No.	Sample No.	Inhibitor titer (Bethesda units/ml)	ELISA index for F. VIII-inhibitor IgG subclass			
			IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>				IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>
1.M. B.	1	24.4	<10	<9	<8	38	11.H. A.	47	1.4	<10	<9	<8	57
	2	17.1	<10	<9	<8	35		48	5.8	<10	<9	<8	203
	3	9.6	<10	<9	<8	31		49	79	<10	<9	<8	778
2.M. E.	4	2.7	<10	<9	<8	62	50	236	<10	<9	<8	1020	
	5	1.6	<10	<9	<8	52	51	512	<10	<9	<8	1520	
	6	1.1	<10	<9	<8	37	52	417	<10	<9	25	2030	
	7	1.5	<10	<9	<8	34	53	292	<10	<9	48	2420	
3.Y. T.	8	32	<10	<9	<8	57	54	159	<10	<9	31	4510	
	9	12	<10	<9	<8	43	55	121	<10	<9	<8	4190	
	10	7.8	<10	<9	<8	72	56	71	<10	<9	<8	2610	
	11	7.1	<10	<9	<8	74	57	37	<10	<9	<8	66	
4.N. K.	12	7.0	<10	<9	<8	70	12.M. O.	58	3.1	<10	<9	<8	229
	13	350	<10	<9	<8	700		59	0.5	<10	<9	<8	37
	14	216	<10	<9	<8	560		60	4.0	<10	<9	<8	58
	15	38	<10	<9	<8	540		61	12.8	<10	<9	<8	481
	16	34	<10	<9	<8	550		62	510	<10	<9	<8	1520
	17	30	<10	<9	<8	340		63	1570	<10	<9	<8	5820
	18	26	<10	<9	<8	350		64	1200	<10	<9	<8	11500
	19	13.6	<10	<9	<8	300		65	1070	<10	<9	<8	22000
5.J. H.	20	8.8	<10	<9	<8	480	66	960	<10	<9	<8	7620	
	21	7.5	<10	<9	<8	85	67	728	<10	<9	<8	5310	
	22	7.0	<10	<9	<8	96	68	532	<10	<9	<8	3840	
	23	5.2	<10	<9	<8	72	13.M. N.	69	2.0	22	<9	<8	215
	24	4.7	<10	<9	<8	76		70	8.5	40	<9	<8	269
	25	3.8	<10	<9	<8	74		71	48	150	<9	25	1500
26	2.0	<10	<9	<8	47	72		850	1100	<9	35	8110	
6.K. I.	27	71	<10	60	<8	550		73	1490	1250	<9	150	9230
	28	60	<10	<9	<8	720		74	1760	2110	<9	210	10230
	29	22	<10	<9	<8	330	75	1060	495	<9	30	10350	
7.K. Y.	30	21	<10	<9	<8	105	76	600	298	<9	24	1022	
	31	780	<10	360	<8	2600	77	280	125	<9	20	825	
	32	200	<10	122	<8	116	78	160	58	<9	<8	619	
	33	100	<10	<9	<8	94	79	121	36	<9	<8	436	
8.M. N.	34	42.5	<10	<9	<8	33	14.Y. O.	80	1.1	<10	<9	<8	<25
	35	15.8	<10	<9	<8	330		81	0.9	<10	<9	<8	<25
	36	254	36	<9	<8	1380		82	0.7	<10	<9	<8	<25
9.F. H.	37	225.3	<10	68	<8	300							
	38	151	<10	<9	<8	300							
	39	1370	3000	54	<8	3000							
10.M.T.	40	1800	3800	<9	<8	3900							
	41	9900	<10	35	16	7800							
	42	3600	<10	30	<8	2600							
	43	85	<10	70	<8	820							
	44	80	<10	64	<8	78							
	45	57	<10	45	<8	53							
	46	43	<10	<9	<8	82							

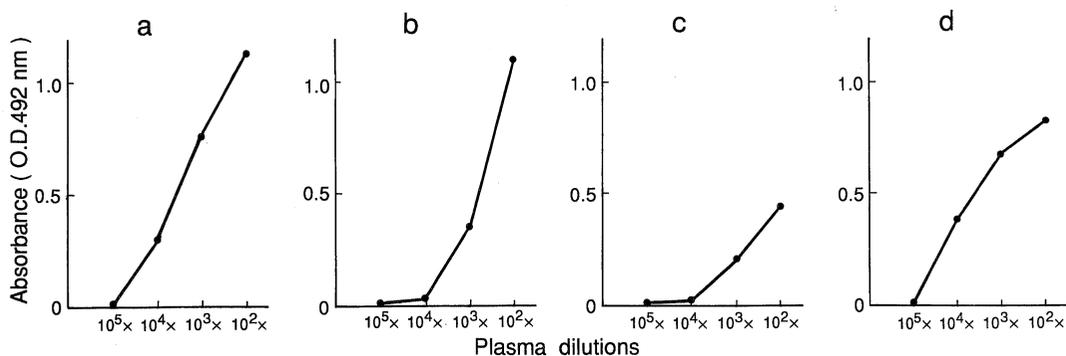


Fig. 1. Typical dose-response curves for the concentration of F.VIII-specific IgG subclass measured by ELISA.  
 a : IgG<sub>1</sub> response curve using sample 39.    b : IgG<sub>2</sub> response curve using sample 31.  
 c : IgG<sub>3</sub> response curve using sample 74.    d : IgG<sub>4</sub> response curve using sample 40.

と定義すると、Sample 39のELISA係数は3000と算定された。本例のIgG<sub>2</sub>-ELISA, IgG<sub>3</sub>-ELISAおよびIgG<sub>4</sub>-ELISAによるELISA係数はそれぞれ54, < 8, 3000であった。

Sample 31(780 Bethesda 単位)の血漿希釈 $10^2 \sim 10^5$ 時のIgG<sub>2</sub>-ELISA系のO.D.は1.11, 0.36, 0.04, 0.00で濃度依存性に吸光度は増加した(Fig. 1-b)。正常人血漿20サンプルの $10^2 \sim 10^5$ 希釈時のIgG<sub>2</sub>-ELISA系のO.D.±2 S.D.はそれぞれ $0.03 \pm 0.06$ ,  $0.02 \pm 0.04$ ,  $0.02 \pm 0.03$ ,  $0.01 \pm 0.03$ であった。したがってSample 31のELISA係数は360と算定された。本例のIgG<sub>1</sub>-ELISA, IgG<sub>3</sub>-ELISAおよびIgG<sub>4</sub>-ELISAによるELISA係数はそれぞれ<10, < 8, 2600であった。

Sample 74(1760 Bethesda 単位)の血漿希釈 $10^2 \sim 10^5$ 時のIgG<sub>3</sub>-ELISA系のO.D.は0.45, 0.21, 0.03, 0.00で他のIgG subclass-ELISA系に比し、各希釈時における吸光度は低値であったものの、濃度依存性に明らかに増加していた(Fig. 1-c)。正常人血漿20サンプルの $10^2 \sim 10^5$ 希釈時のIgG<sub>3</sub>-ELISA系のO.D.±2 S.D.はそれぞれ $0.04 \pm 0.04$ ,  $0.03 \pm 0.04$ ,  $0.01 \pm 0.03$ ,  $0.01 \pm 0.03$ であった。したがってSample 74のELISA係数は210と算定された。本例のIgG<sub>1</sub>-ELISA, IgG<sub>2</sub>-ELISAおよびIgG<sub>4</sub>-ELISAによるELISA係数はそれぞれ2110, < 9, 10230であった。

Sample 40(1800 Bethesda 単位)の血漿希釈 $10^2 \sim 10^5$ 時のIgG<sub>4</sub>-ELISA系のO.D.は0.83, 0.68, 0.39, 0.00で濃度依存性に吸光度は増加していた(Fig. 1-d)。正常人血漿20サンプルの $10^2 \sim 10^5$ 希釈時のIgG<sub>4</sub>-ELISA系のO.D.はそれぞれ $0.13 \pm 0.12$ ,  $0.08 \pm 0.05$ ,  $0.02 \pm 0.03$ ,  $0.00 \pm 0.03$ であった。したがってSample 40のELISA係数は3900と算定された。本例のIgG<sub>1</sub>-ELISA,

IgG<sub>2</sub>-ELISAおよびIgG<sub>3</sub>-ELISAにおけるELISA係数はそれぞれ3800, < 9, < 8であった。

2. 血友病A患者血漿中のF.VIII-inhibitorを構成するIgG subclassのELISAによる検討

教室で観察中のF.VIII-inhibitorの検出された血友病A患者およびF.VIII-inhibitorの検出されていない血友病A患者の各血漿サンプルについて、r.F.VIIIに対する特異的IgG subclassの性状をELISAで検索した。

i) F.VIII-inhibitorの検出された血友病A患者血漿中のF.VIII-inhibitor IgG subclassの検討

Kasper法でF.VIII-inhibitorの検出された血友病A 14例について経時的にELISAでF.VIII-inhibitor IgG subclassの動態を検討した。

IgG<sub>1</sub>-ELISA系でIgG<sub>1</sub>の検出されたのは3症例14血漿サンプルで、IgG<sub>1</sub>-ELISA係数は22~3800に及んでいた。

IgG<sub>2</sub>-ELISA系でIgG<sub>2</sub>の検出されたのは5症例10血漿サンプルでIgG<sub>2</sub>-ELISA係数は30~360に及んでいた。

IgG<sub>3</sub>-ELISA系でIgG<sub>3</sub>の検出されたのは3症例11血漿サンプルでIgG<sub>3</sub>-ELISA係数は16~210に及んでいた。

IgG<sub>4</sub>-ELISA系でIgG<sub>4</sub>の検出されたのは13症例79血漿サンプルでIgG<sub>4</sub>-ELISA係数は31~22000に及んでいた。なおKasper法によるF.VIII-inhibitor力価(Bethesda 単位)の対数とIgG<sub>4</sub>-ELISA係数の対数は $r=0.84$  回帰直線 $\log y=0.76 \log x+1.24$ と良好な相関を示していた(Fig. 2)。

各サンプルごとにもみるとIgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>ならびにIgG<sub>3</sub>それぞれの単独陽性サンプルは存在しなかったが、IgG<sub>4</sub>単独陽性は53サンプルであった。IgG<sub>1</sub>およびIgG<sub>4</sub>陽性が

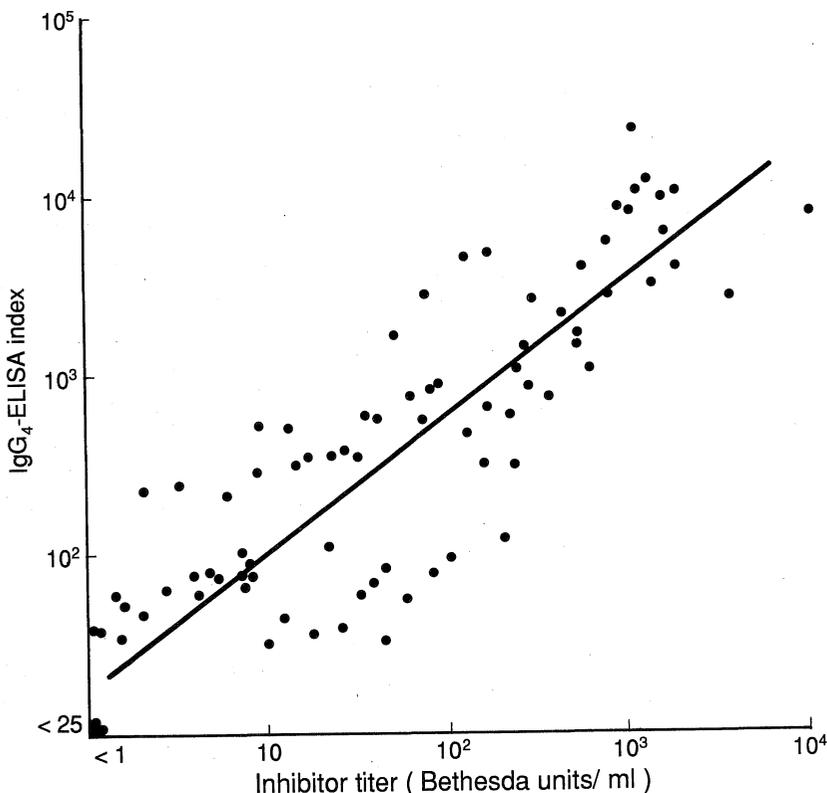


Fig. 2. Correlation between inhibitor titer and IgG<sub>4</sub>-ELISA index.  
The regression line relating Inhibitor titer to IgG<sub>4</sub>-ELISA index is  $\log y = 0.76 \log x + 1.24$  ( $r = 0.84$ ).

6 サンプル, IgG<sub>2</sub>およびIgG<sub>4</sub>陽性が8 サンプル, IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>陽性が3 サンプル, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>およびIgG<sub>4</sub>陽性が1 サンプル, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>陽性が7 サンプル, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>陽性が1 サンプルであり, すべてのIgG subclassが陽性を呈するサンプルはなかった。また Inhibitor の検出されていた症例で, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>のすべてが検出されなかったのは1 例3 サンプルであったが, これらのF.VIII-inhibitor 力価(Bethesda 単位)はいずれも低値であった(Table 1)。

ii) Kasper 法でF.VIII-inhibitor の検出されていない血友病 A 患者血漿中のF.VIII-inhibitor IgG subclass の検討

Kasper 法でF.VIII-inhibitor の検出されていない血友病 A 27 例 27 血漿サンプルについて ELISA で検討した。すべてのサンプルのIgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>は陰性であった(Table 2)。

3. 外科手術を施行したF.VIII-inhibitor を有する血友病 A 患者の術後のF.VIII-inhibitor 中のIgG subclass の

推移

過去にF.VIII-inhibitor が発生し, 経過を観察していた重症血友病 A 3 症例の外科手術時に, 第VIII因子製剤による止血管理を行い, その際, F.VIII-inhibitor およびF.VIII-inhibitor 中のIgG subclass の推移を追求した。

症例 H. A. 5 才男児, 虫垂切除術, (Table 1 Case 11 Sample 47-57) 10 ヶ月時奈良医大小児科で重症血友病 A と診断, 3 才時左足関節内出血の際, F.VIII-inhibitor を検出した。平成元年12月5日夕刻(5 才時)より右下腹部痛出現し, 急性虫垂炎と診断。翌日, 第VIII因子製剤補充下に奈良医大第一外科で虫垂切除術を施行された。

第VIII因子製剤は4 日間で計9 回にわたって総量9000 単位を投与された。

Kasper 法によるF.VIII-inhibitor 力価は, 術前の第VIII因子製剤投与開始前は1.4 B. U./ml であったが, 投与開始後5 日目より上昇しはじめ, 10 日目には512 B. U./ml とピークに達した。その後漸次低下し, 120 日目には37

Table 2. Inhibitor titers and ELISA indexes in 27 plasma samples from 27 hemophilia A without inhibitor

Case No.	Sample No.	Inhibitor titer (Bethesda units/ml)	ELISA index for F.VIII-inhibitor IgG subclass			
			IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>
15.K.A	83	<0.3	<10	<9	<8	<25
16.K.N	84	<0.3	<10	<9	<8	<25
17.M.N	85	<0.3	<10	<9	<8	<25
18.K.K	86	<0.3	<10	<9	<8	<25
19.I.U	87	<0.3	<10	<9	<8	<25
20.T.F	88	<0.3	<10	<9	<8	<25
21.S.Y	89	<0.3	<10	<9	<8	<25
22.K.M	90	<0.3	<10	<9	<8	<25
23.Y.M	91	<0.3	<10	<9	<8	<25
24.K.S	92	<0.3	<10	<9	<8	<25
25.H.M	93	<0.3	<10	<9	<8	<25
26.M.H	94	<0.3	<10	<9	<8	<25
27.Y.K	95	<0.3	<10	<9	<8	<25
28.N.K	96	<0.3	<10	<9	<8	<25
29.S.K	97	<0.3	<10	<9	<8	<25
30.K.T	98	<0.3	<10	<9	<8	<25
31.T.S	99	<0.3	<10	<9	<8	<25
32.S.H	100	<0.3	<10	<9	<8	<25
33.S.H	101	<0.3	<10	<9	<8	<25
34.Y.I	102	<0.3	<10	<9	<8	<25
35.I.N	103	<0.3	<10	<9	<8	<25
36.Y.I	104	<0.3	<10	<9	<8	<25
37.A.K	105	<0.3	<10	<9	<8	<25
38.Y.N	106	<0.3	<10	<9	<8	<25
39.K.N	107	<0.3	<10	<9	<8	<25
40.M.I	108	<0.3	<10	<9	<8	<25
41.H.K	109	<0.3	<10	<9	<8	<25

B. U./ml となった。

ELISA による F.VIII-inhibitor 中の IgG subclass の検索では、IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は術前 57 であったが、投与開始後 5 日目 203、7 日目 778 と漸次上昇し、19 日目には 4510 とピークに達し、その後漸減し、120 日目には 66 となった。IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>2</sub> は経過中検出されなかった。IgG<sub>3</sub> は術前 < 8 であったが、投与開始後 12 日目 25、14 日目 48 と上昇しピークに達した。その後 19 日目 31 と低下し、42 日目には < 8 となり、以後陰性であった (Fig. 3)。血漿中の IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub> は経過中それぞれ 652~791、295~351、25~38 および 6.1~12.1 mg/dl の範囲におよんでおり、F.VIII-inhibitor 中の IgG subclass の変動とは有意の相関を示さなかった。

症例 M. O. 49 才男性、左耳下腺腫瘍摘出術 (Table 1 Case 12 Sample 58-68)

20 才時長崎大学原研内科で血友病 A と診断。40 才時左大腿部血腫出現に際し、F.VIII-inhibitor を検出した。昭和 61 年 3 月頃 (46 才時) より左耳下部に 2.5×3.0 cm 大

の腫瘍に気付くも放置、腫瘍はその後徐々に増大し、平成 2 年 2 月には 6.5×6.5 cm 大にまで達した。生検もかねて平成 2 年 2 月 6 日第 VIII 因子製剤補充下に奈良医大耳鼻咽喉科で左耳下腺腫瘍摘出術を施行された。第 VIII 因子製剤は 6 日間で計 13 回にわたって、総量 78000 単位投与された。

Kasper 法による F.VIII-inhibitor 力価は術前の第 VIII 因子製剤投与開始前は 3.1 B. U./ml であり、第 VIII 因子補充療法により中和され低下したが、投与開始後 5 日目より 4.0 B. U./ml と上昇しはじめ 10 日目には 1570 B. U./ml とピークに達し、その後、漸次低下し 18 日目には 1070 B. U./ml、104 日目には 532 B. U./ml となった。

IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は術前 229 で、第 VIII 因子補充療法によりいったん低下したものの再び上昇、5 日目には 58、8 日目には 1520、10 日目には 5820 と漸次上昇し、18 日目には 22000 とピークに達した。その後漸次低下し 34 日目に 7620、76 日目に 5310、104 日目には 3840 となった。

IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>3</sub> はそれぞれ < 10、< 9、< 8 と経過中つねに陰性であった (Fig. 4)。

血漿中の IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub> は経過中それぞれ 659~805、205~311、16~22 および 12.1~23.5 mg/dl の範囲におよんでおり、F.VIII-inhibitor 中の IgG subclass の変動とは有意の相関を示さなかった。

症例 M. N. 21 才男性、左大腿骨骨折観血的整復術 (Table 1 Case 13 Sample 69-79)

8 才時奈良医大で血友病 A と診断。14 才時肉眼的血尿出現に際し、F.VIII-inhibitor を検出した。平成元年 10 月 31 日夕刻 (21 才時)、単車に乗っていて横転、左大腿骨頰上骨折を受傷、翌 11 月 1 日奈良医大整形外科にて第 VIII 因子製剤補充下に左大腿骨骨折観血的整復術を施行された。第 VIII 因子製剤は 7 日間で計 12 回にわたって総量 57000 単位を投与された。

Kasper 法による F.VIII-inhibitor 力価は術前の第 VIII 因子製剤投与開始前は 2.0 B. U./ml であったが、投与開始後 6 日目より上昇しはじめ、16 日目には 1760 B. U./ml とピークに達し、その後漸次低下し、283 日目には 121 B. U./ml となった。

IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は術前 215 であったが、第 VIII 因子製剤投与開始後 6 日目 269、9 日目 8110 と漸次上昇、34 日目には 10350 とピークに達し、その後漸減し 283 日目には 436 となった。IgG<sub>1</sub> は術前 22 であったが、6 日目 40、9 日目 1100 と漸次上昇、16 日目には 2110 とピークに達しその後漸減、283 日目には 36 となった。IgG<sub>3</sub> は術前 < 8 と陰性であったが 7 日目 25、16 日目に 210 とピ

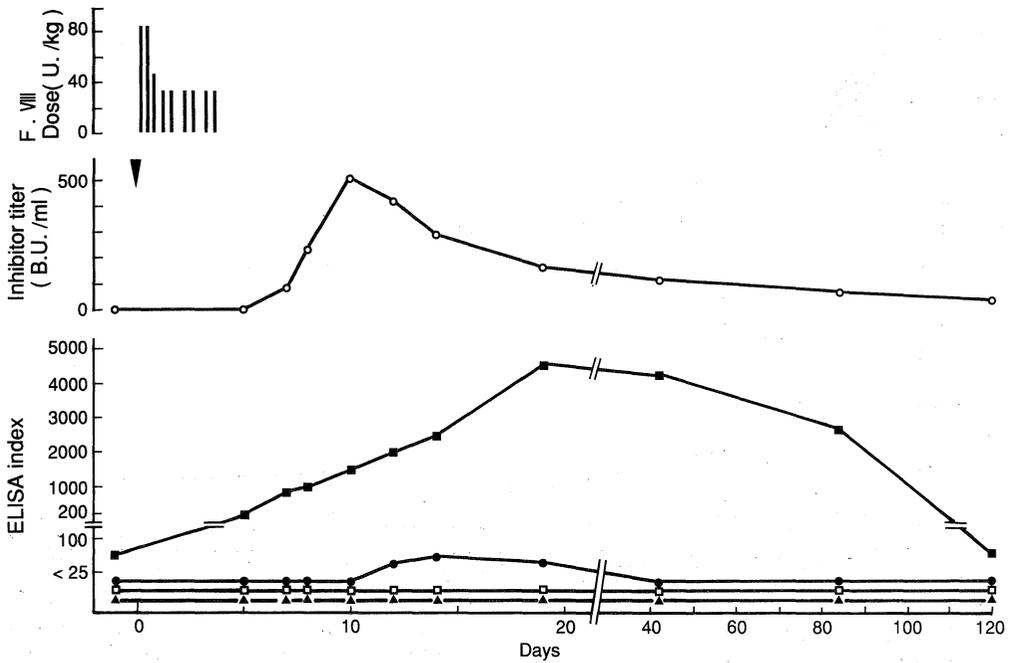


Fig. 3. Changes in Inhibitor titer and ELISA index of Case 11 after treatment with factor VIII concentrates. ▼ : Appendectomy, (○—○) : Inhibitor titer, (□—□) : IgG<sub>1</sub>-ELISA index, (▲—▲) : IgG<sub>2</sub>-ELISA index, (●—●) : IgG<sub>3</sub>-ELISA index, (■—■) : IgG<sub>4</sub>-ELISA index

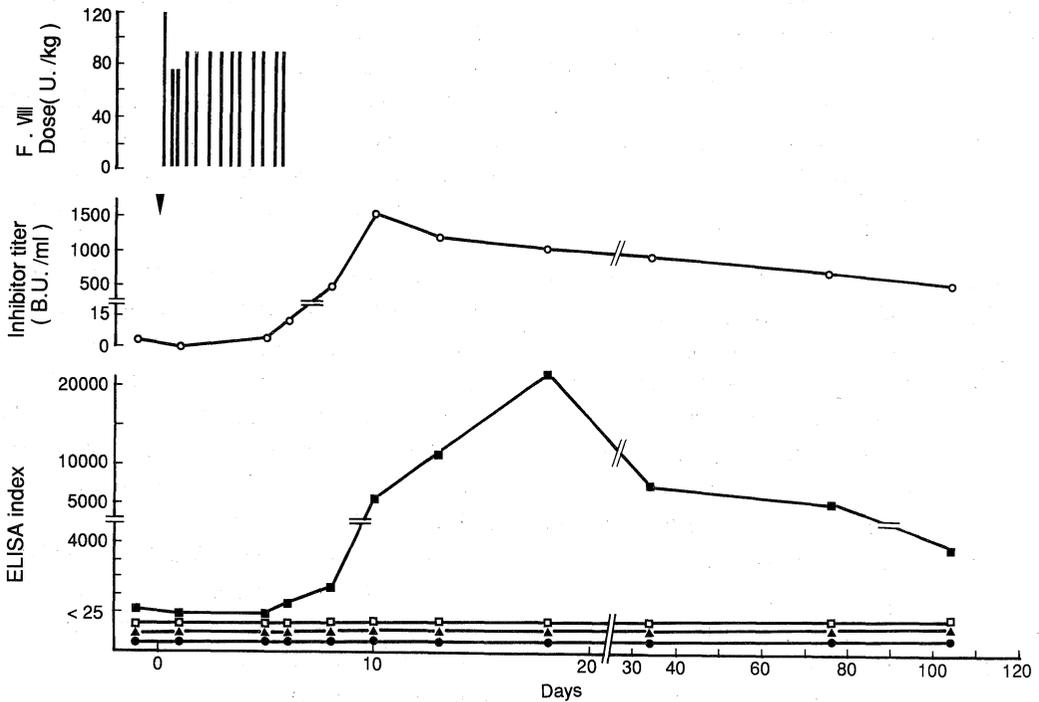


Fig. 4. Changes in Inhibitor titer and ELISA index of Case 12 after treatment with factor VIII concentrates. ▼ : Left parotid gland tumor resection, (○—○) : Inhibitor titer, (□—□) : IgG<sub>1</sub>-ELISA index, (▲—▲) : IgG<sub>2</sub>-ELISA index, (●—●) : IgG<sub>3</sub>-ELISA index, (■—■) : IgG<sub>4</sub>-ELISA index

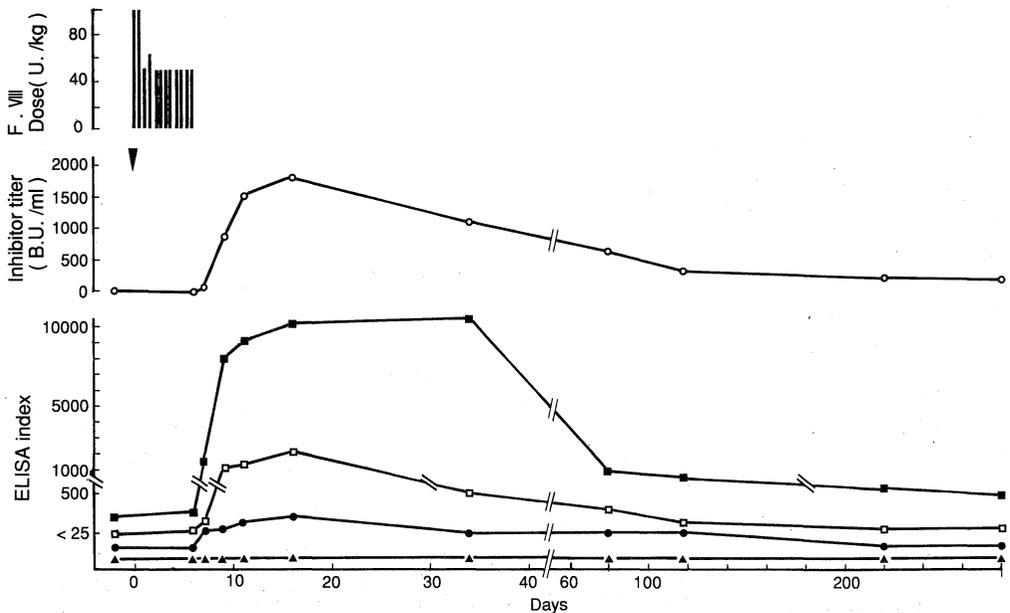


Fig. 5. Changes in Inhibitor titer and ELISA index of Case 13 after treatment with factor VIII concentrates. ▼: Open reduction of left femoral fracture, (○—○): Inhibitor titer, (□—□): IgG<sub>1</sub>-ELISA index, (▲—▲): IgG<sub>2</sub>-ELISA index, (●—●): IgG<sub>3</sub>-ELISA index, (■—■): IgG<sub>4</sub>-ELISA index

ークとなりその後漸減, 220日目には<8と陰性化した。なおIgG<sub>2</sub>は経過中<9であり陰性であった(Fig. 5)。

血漿中のIgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>は経過中それぞれ567~816, 211~289, 29~45および23.5~31.2 mg/dlの範囲におよんでおり, F.VIII-inhibitor中のIgG subclassの変動とは有意の相関を示さなかった。

## 考 案

血液凝固因子の測定に免疫学的手法が導入されLaur-ell法(rocket immunoelectrophoresis), radioimmunoassay(RIA)あるいはenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)などが用いられるようになったのは, 1970年代以後である。ポリスチレン製マイクロプレート上に抗体を固相化し, 検体, 酵素標識抗体および酵素基質を反応せしめて吸光度を測定するELISA系はRadioisotopeを用いることなく, 微量の検体を感度良く, 多数同時に測定しうる利点がある。教室でも第VIII因子<sup>18)</sup>, 第IX因子<sup>19)</sup>, 第X因子<sup>20)21)</sup>, von Willebrand因子<sup>22)</sup>, Protein C<sup>23)</sup>, Protein S<sup>24)25)</sup>などの微量測定に利用してきた。

緒言で述べたごとく, 血友病A患者の第VIII因子補充療法中に発生するF.VIII-inhibitorは第VIII因子活性をprogressiveに失活せしめるが, この作用がIgGに対する抗

体で中和されることから, IgGに属する同種抗体であると認識されるようになった。

Hoyerら(1984)<sup>8)</sup>は凝血学的方法にもとづいたF.VIII-inhibitor中和試験法により, F.VIII-inhibitor中のIgG subclassはIgG<sub>4</sub>が優位であることを報告している。しかしF.VIII-inhibitor中和試験法ではF.VIII-inhibitor力価が低値の場合はIgG subclassを同定しがたい欠点があった。

Sánchez-Cuencaら(1990)<sup>26)</sup>はF.VIII-inhibitorの免疫学的特性をELISA系で検索し, F.VIII-inhibitor力価が0.156 B. U./mlと低値の場合も測定可能であることを報告した。彼らはマイクロプレート上で抗vWF IgGを固相化し, 市販第VIII因子製剤(Haemate, Behring, Inc., West Germany)と反応後, F.VIII-inhibitor患者血漿サンプルを添加せしめ, ベルオキシダーゼ標識抗H鎖あるいは抗L鎖抗血清, あるいはアルカリフォスファターゼ標識抗IgG subclass(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>あるいはIgG<sub>4</sub>)モノクローナル抗体とそれぞれ反応せしめたELISAの系を樹立した。その測定系で血友病A inhibitor患者より得た8血漿サンプルを測定し, 8サンプルすべてのF.VIII-inhibitor中のIgG subclassはIgG<sub>4</sub>を含み, うち1サンプルはIgAとIgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>およびIgG<sub>3</sub>も含むこと, また, SLE患者に発生したF.VIII-inhibitorはすべてのIgG

subclass を含むことを観察している。

著者は彼らの報告とはまったく independent に、ポリスチレン製マイクロプレートの小孔に r. F.VIII 製剤を固相化(step 1), F.VIII-inhibitor 患者血漿の添加(step 2), 抗ヒト IgG subclass マウスモノクローナル抗体(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>あるいは IgG<sub>4</sub>)と反応(step 3)後, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG F(ab')<sub>2</sub>との反応(step 4)を行い, 最後に基質の o-フェニレン・ジアミン添加後, O. D. 492 nm で吸光度を測定する ELISA 系を考案した。

第VIII因子に特異的に反応する IgG subclass の定量には F.VIII-inhibitor の純化にひきついてそれぞれの IgG subclass の純化物が必要と考えられるが, 少量の患者血漿よりの作製は現実的には困難である。したがって著者は, Kasper 法による F.VIII-inhibitor 力価が比較的高い数例の inhibitor 患者血漿サンプルを 10<sup>2</sup>~10<sup>6</sup>倍に希釈し, 各濃度について F.VIII-inhibitor を構成する IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>および IgG<sub>4</sub>を ELISA 系で測定し, 正常血漿サンプルの ELISA による O. D. 値 + 2 S. D. を cut off 値とし, それ以上を示した O. D. 値に希釈倍数を乗じ, ELISA 係数を算定することにした。

教室で F.VIII-inhibitor を検出し, 観察中の血友病 A 14 症例の 82 血漿サンプルについて F.VIII-inhibitor 中の IgG subclass を ELISA で測定したところ, IgG<sub>4</sub> 単独検出例は 11 例(53 サンプル)であったが, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> それぞれの単独検出例は存在しなかった。IgG<sub>4</sub> を単独に検出した 11 例のうち 1 サンプルは経過中に IgG<sub>1</sub> のみ, 4 例(8 サンプル)は IgG<sub>2</sub> のみ, また 1 例(3 サンプル)は IgG<sub>3</sub> のみが IgG<sub>4</sub> と同時に検出された。

また IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>4</sub> の同時検出例が 1 サンプル, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub> の同時検出例が 1 サンプル, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub> の同時検出例が 1 例(7 サンプル)存在していた。IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub> のいずれも検出しえなかったのは 1 例(3 サンプル)であったが, その F.VIII-inhibitor 力価はいずれも低値であった。

以上のごとく F.VIII-inhibitor を有する血友病 A 患者血漿中の F.VIII に特異的な IgG subclass は大部分が IgG<sub>4</sub> であったが, 一部の症例では経過中に IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> あるいは IgG<sub>3</sub> も出現していた。

なお 82 血漿サンプル中, IgG<sub>1</sub> の ELISA 係数は 22~3800, IgG<sub>2</sub> の係数は 30~360, IgG<sub>3</sub> の係数は 16~210, IgG<sub>4</sub> の係数は 31~22000 におよんでいた。

また Kasper 法による F.VIII-inhibitor 力価(Bethesda 単位)の対数を X 軸, IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数の対数を Y 軸にとると, 両者は相関係数  $r=0.84$  回帰直線  $\log y = 0.76 \log x + 1.24$  と良好な相関を示していた (Fig. 2)。

なお F.VIII-inhibitor 力価と他の IgG subclass の ELISA 係数との相関は認められなかった。

次に第VIII因子の抗原刺激により F.VIII-inhibitor 中の第VIII因子特異的 IgG subclass がどのように推移するかを, 第VIII因子製剤補充下に外科的手術を施行した F.VIII-inhibitor 患者 3 例より経時的に血漿サンプルを採取し, ELISA で検討した。

急性虫垂炎の診断で虫垂切除術を施行した 5 才男児では, 術前の F.VIII-inhibitor 力価は 1.4 B. U./ml で IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は 57 であったが, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>3</sub> は検出しなかった。F.VIII-inhibitor 力価は手術日よりの第VIII因子製剤投与開始後, 5 日目より上昇しはじめ 10 日目 512 B. U./ml となりピークに達した。IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は投与開始後漸増し, 19 日目 4510 となりピークに達した。IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>2</sub> は経過中, 常に陰性であった。また IgG<sub>3</sub> は 12 日目より陽性化, 14 日目 48 となりピークに達し, 42 日目に陰性化した (Fig. 3)。

左耳下腺腫瘍摘出術を行った 49 才男性の術前の F.VIII-inhibitor 力価は 3.1 B. U./ml, IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は 229 であり, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>3</sub> は検出しなかった。F.VIII-inhibitor 力価は手術日よりの第VIII因子製剤投与開始後, 中和療法によりいったん低下したものの 5 日目より上昇しはじめ, 10 日目には 1570 B. U./ml となりピークに達した。IgG<sub>4</sub> は投与開始後漸増し, 18 日目 22000 となりピークに達した。なお IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>3</sub> は経過中常に陰性であった (Fig. 4)。

左大腿骨骨折観血的整復術を行った 21 才男性の術前の F.VIII-inhibitor 力価は 2.0 B. U./ml で IgG<sub>1</sub> の ELISA 係数は 22, IgG<sub>4</sub> は 215 であり, IgG<sub>2</sub> および IgG<sub>3</sub> は検出しなかった。F.VIII-inhibitor 力価は手術日よりの第VIII因子製剤投与開始後 6 日目より上昇しはじめ, 16 日目 1760 B. U./ml となりピークに達した。IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>3</sub> は投与開始後漸増し, 16 日目に前者は 2110, 後者は 210 となりピークに達した。IgG<sub>4</sub> は, IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>3</sub> のピークに遅れて, 34 日目に 10350 となりピークに達した。経過中 IgG<sub>2</sub> は検出しなかった (Fig. 5)。

3 症例とも術後の anamnestic response により F.VIII-inhibitor 力価および IgG<sub>4</sub> の ELISA 係数は著しく上昇したが, 前者のピークは後者のピークに先行して推移していた。3 例中 1 例は IgG<sub>3</sub> が一過性にかつ軽度上昇し, また 1 例は IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>3</sub> が一過性上昇した。したがって IgG subclass の動態は 3 例ともやや異なっていた。3 症例に対して投与した第VIII因子製剤は同一製剤であり, おのおのの症例において IgG subclass の動態が異なったことは個体差に起因するものと推察された。

なお F.VIII-inhibitor の検出されていない血友病 A 27 例では第 VIII 因子特異的 IgG subclass はいずれも検出されなかった。

緒言で述べたごとく、F.VIII-inhibitor の発生頻度は血友病 A の 8~20% とされている。この数値が患者血漿中の第 VIII 因子蛋白の欠如に基づくとすれば、血友病 A 患者の大部分は何らかの第 VIII 因子構造を有しているのではないかと長らく推察されてきた。しかし、第 VIII 因子活性は欠如するも第 VIII 因子抗原を有すると考えられる症例は血友病 A の約 10% にすぎず、第 VIII 因子活性、抗原とも欠如する例が大部分である。このようなことから F.VIII-inhibitor の発生を予知することは困難であった。1984 年、第 VIII 因子遺伝子が単離され、その塩基配列と第 VIII 因子蛋白のアミノ酸配列が明らかになってきたが、血友病 A の遺伝的異常についても、点変異、欠失、挿入、重複などがあり、かつそれらの部位、程度も諸種であることが知られるようになった。これらの遺伝子異常のなかで欠失およびナンセンス点変異例は inhibitor 発生との関連で注目されている。今回、著者は F.VIII-inhibitor を有する血友病 A 症例について、F.VIII-inhibitor 中の IgG subclass の動態を検討したが、今後これらの症例についての遺伝子異常との関連性について検討が必要と思われる。

## 結 語

F.VIII-inhibitor を有する血友病 A 患者血漿中の第 VIII 因子特異的 IgG subclass の動態を r. F.VIII 製剤を用いた ELISA 系で検討した。

1. F.VIII-inhibitor 力価(Bethesda 単位)の比較的高い数例の血友病 A 患者血漿サンプルを  $10^2 \sim 10^5$  倍に希釈し、各濃度についての IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>あるいは IgG<sub>4</sub>のそれぞれに対する ELISA 系の検量線を作成した。さらに ELISA における O. D. 値より ELISA 係数を求めた。

2. F.VIII-inhibitor の検出されている血友病 A 14 症例の 82 血漿サンプルでは IgG<sub>4</sub> 単独検出症例は 11 症例(53 サンプル)であった。IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> それぞれの単独検出例は存在しなかった。IgG<sub>4</sub> を単独に検出した 11 例のうち 1 サンプルは経過中に IgG<sub>1</sub> のみ、4 例(8 サンプル)は IgG<sub>2</sub> のみ、また 1 例(3 サンプル)は IgG<sub>3</sub> のみが IgG<sub>4</sub> と同時に検出された。なお 82 血漿サンプル中 IgG<sub>1</sub> の ELISA 係数は 22~3800、IgG<sub>2</sub> の係数は 30~360、IgG<sub>3</sub> の係数は 16~210、IgG<sub>4</sub> の係数は 31~22000 の範囲におよんでいた。IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> および IgG<sub>4</sub> のいずれも検出しえなかったのは 1 例(3 サンプル)であったが、その F.VIII-inhibitor 力価はいずれも低値であった。

3. F.VIII-inhibitor の検出されていない血友病 A 27 症

例では第 VIII 因子特異的 IgG subclass はいずれも検出されなかった。

4. r. F.VIII 製剤を用いた ELISA 法による IgG subclass の検出法は、RI を使用することなく比較的簡便な方法と考えられる。

本論文の要旨は第 51 回日本血液学会総会および第 32 回日本臨床血液学会で発表した。

## 文 献

- 1) Kasper, C. K. : Progress in Hematology : Management of inhibitors to factor VIII (Brown, E. B., ed.). Vol. 12, Grune and Stratton, Orlando, F. L., p 143, 1981.
- 2) 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. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 34 : 869-872, 1975.
- 3) Bidwell, E., Denson, K. W. E., Dike, G. W. R., Augustin, R. and Lloyd, G. M. : Antibody nature of the inhibitor to antihaemophilic globulin (factor VIII). *Nature* 210 : 746-747, 1966.
- 4) Shapiro, S. S. : The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globulin (factor VIII) and the kinetics of their interaction with factor VIII. *J. clin. Invest.* 46 : 147-156, 1967.
- 5) Lusher, J. M., Shuster, J., Evans, R. K. and Poulik, M. D. : Antibody nature of an AHG (factor VIII) inhibitor. *J. Pediat.* 72 : 325-331, 1968.
- 6) Andersen, B. R. and Terry, W. D. : Gamma G 4-globulin antibody causing inhibition of clotting factor VIII. *Nature* 217 : 174-175, 1968.
- 7) Robboy, S. J., Lewis, E. J., Schur, P. H. and Colman, R. W. : Circulating anticoagulants to factor VIII. *Immunochemical studies and clinical response to factor VIII concentrates.* *Am. J. Med.* 49 : 742-752, 1970.
- 8) Hoyer, L. W., Gawryl, M. S. and de la Fuente, B. : Immunochemical characterization of factor VIII inhibitors : Factor VIII inhibitors (Hoyer, L. W., ed.). Alan R. Liss, Inc., New York, p 73, 1984.

- 9) Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Vehar, G. A., Capon, D. J. and Lawn, R. M. : Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312** : 326-330, 1984.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Kaufman, R. J., Wasley, L. C. and Dorner, A. J. : Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **263** : 6352-6362, 1988.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Fulcher, C. A., de Graaf Mahoney, S., Roberts, J. R., Kasper, C. K. and Zimmerman, T. S. : Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82** : 7728-7732, 1985.
- 16) Fulcher, C. A., de Graaf Mahoney, S. and Zimmerman, T. S. : FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood* **69** : 1475-1480, 1987.
- 17) 吉岡 章, 福井 弘 : 第VIII, IX因子定量法. *Medical Technology* **5** : 463-467, 1977.
- 18) 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** : 48-59, 1987.
- 19) Yoshioka, A., Ohkubo, Y., Sakai, T., Fukui, H., Kamiya, T., Koresawa, M., Matsui, A. and Matsuda, T. : Prenatal diagnosis of hemophilia BM. *Jpn. J. Human Genet.* **33** : 395-400, 1988.
- 20) 金広昭美 : ヒト第X因子の測定 I. 抗第X因子モノクローナル抗体を用いた固相上での第X因子活性と抗原量の同時測定法. *奈医誌.* **38** : 744-752, 1987.
- 21) 金広昭美 : ヒト第X因子の測定 II. 新生児期における第X因子活性および第X因子抗原量について. *奈医誌.* **40** : 435-442, 1989.
- 22) Shima, M., Yoshioka, A., Yoshikawa, N., Tanaka, I., Imai, S., Tsubura, Y. and Fukui, H. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for von Willebrand factor antigen (vWF : Ag) using monoclonal antibodies to von Willebrand factor. *J. Nara Med. Ass.* **37** : 672-679, 1986.
- 23) 高宮 脩, 平峰 繁, 船橋修之, 阪井利幸, 吉岡慶一郎, 藤村吉博, 高瀬俊夫 : Protein C の酵素免疫測定法(ELISA)の開発と臨床的応用. *臨床病理.* **33** : 1045-1050, 1985.
- 24) Sugimoto, M., Mikami, S., Hashimoto, K., Kanehiro, T., Oku, K., Imanaka, Y., Imai, S., Tsubura, Y. and Fukui, H. : Enzyme-linked immunosorbent assays for total protein S antigen and for protein S antigen complexed with C4b-binding protein. *奈医誌.* **38** : 593-599, 1987.
- 25) 奥 香世 : ヒト protein S に対するモノクローナル抗体 NMC-PS/1 および NMC-PS/2 の免疫学的特性. *奈医誌.* **42** : 52-61, 1991.
- 26) Sánchez-Cuenca, J. M., Carmona, E., Villanueva, M. J. and Aznar, J. A. : Immunological characterization of factor VIII inhibitors by a sensitive micro-ELISA method. *Thrombos. Research.* **57** : 897-908, 1990.