

using peptides with scrambled sequences showed little inhibition of binding (data not shown). The results confirm that residues 484–509 in A2 contribute to thrombin interaction.

EDC cross-linking of the 484–509 peptide and thrombin

Nogami *et al* (2004) reported that the 337–372 peptide in the C-terminus of A1 formed a covalent, cross-linked product with FXa (Nogami *et al*, 2004). To investigate the direct interaction between the 484–509 peptide and thrombin, therefore, similar experiments using the zero-length cross-linking reagent EDC were performed in the present study. The 484–509 peptide formed a cross-linked product of approximately 35 kDa that increased in intensity with increasing amounts of the peptide (Fig 5A, upper and lower panels). The mass of the adduct (approximately 35 kDa) was consistent with a 1:1 stoichiometry of 484–509 peptide (approximately 4 kDa) and thrombin (approximately 31 kDa). Control experiments indicated that the 484–509 peptide and FXa did not form a cross-linked product under the same conditions (data not shown). These data suggest that the interaction between 484–509 and thrombin involves salt linkage(s) formed between A2 and the enzyme.

The specificity of the 484–509 peptide–thrombin interaction, as monitored by cross-linking, was examined using unlabeled peptide to block formation of the biotinylated peptide–thrombin adduct. Variable concentrations of unlabeled peptides were combined with fixed concentrations of thrombin (200 nmol/l) and biotinylated 484–509 peptide

(100 $\mu\text{mol/l}$), and the mixtures were reacted with 300 $\mu\text{mol/l}$ EDC. Figure 5B illustrates loss of biotinylated product following titration with the unlabelled 484–509 peptide. Unlabeled 484–509 peptide (100 $\mu\text{mol/l}$) completely inhibited the formation of EDC cross-linking product between the biotinylated 484–509 peptide and thrombin. This observation indicated that the unlabelled peptide possessed a somewhat greater affinity for thrombin than that observed for the biotinylated reagent, suggesting that the biotin label partially inhibited the inter-molecular interaction. A control scrambled peptide showed little inhibitory effect (<10%) on formation of the product (data not shown). These data confirm the specificity of the interaction between the 484–509 region and thrombin.

Binding of recombinant A2 mutants to Ah-thrombin

The above experiments indicated that A2 residues 484–509 contain a thrombin-interactive site that contributes to enzyme docking and facilitates catalysis of cleavage at Arg³⁷² in the heavy chain. A hallmark of this region of the A2 subunit is the high content of basic residues (7/26 residues, either Arg, Lys, or His). Thus, the basic residues in the A2 domain may be critical for interaction with thrombin. To identify the A2 residues that are responsible for interacting with thrombin, a series of recombinant A2 molecules in which alanine was substituted for selected residues was prepared. We focused on the exposed basic residues within or around the 484–509 region, based on the FVIII A domain model (Pemberton *et al*, 1997). The selected residues were converted into alanine, generating a panel of 11 single-point A2 mutants. The secretion levels and conformational stabilities of all A2 mutants and specific activities of FVIIIa reconstituted with the mutated A2 and A1/A3C1C2 dimer were described in a recent report (Sarafanov *et al*, 2006). The interaction between A2 mutants and Ah-thrombin was evaluated using an SPR-based assay. Results are shown in Fig 6 and summarized in Table I. The data could be comparatively well fitted by non-linear regression using a 1:1 Langmuir binding model. The binding affinity of the wt-A2 for Ah-thrombin was 55.9 nmol/l, and the binding energy calculated as $\Delta G = -RT \ln K_d$ was 10.3 kcal/mol. Of note, binding of five A2 mutants (R484A, R489A, R490A, H497A, K499A) to Ah-thrombin showed a two to fivefold lower affinity compared with that of wt-A2. This decreased affinity indicated that the A2 residues, Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, and Lys⁴⁹⁹, contributed relatively moderately to the thrombin binding, as determined by their contribution to the binding energy (5–10% contribution of wt-A2). Nevertheless, the remaining A2 mutants bound to thrombin with affinities similar to that of the wt-A2, and collectively, these results indicate that the A2 residues Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, and Lys⁴⁹⁹ play a part of role in the A2 subunit interaction with thrombin, an interaction that is responsible for thrombin cleavage at Arg³⁷². Furthermore, we prepared the synthetic peptide 484–509 substituted with Ala for residues Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, and Lys⁴⁹⁹ (484/489/490/497/499Ala^{484–509}), and examined the inhibitory effect on the

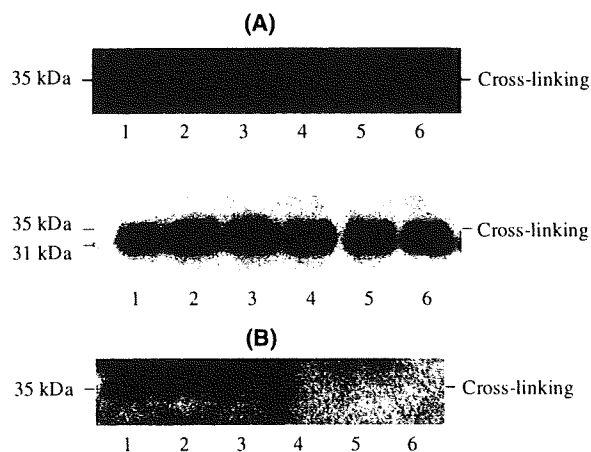


Fig 5. EDC cross-linking of the 484–509 peptide and thrombin – (A) Thrombin (200 nmol/l) was reacted with various concentrations of biotinylated 484–509 peptide (lanes 1–6; 0, 12.5, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/l}$ respectively) in the presence of EDC (300 $\mu\text{mol/l}$) for 45 min, followed by immunoblotting using streptavidin (upper panel) and antithrombin mAb (lower panel). (B) Thrombin (200 nmol/l) and biotinylated 484–509 peptide (100 $\mu\text{mol/l}$) were incubated with EDC (300 $\mu\text{mol/l}$) in the presence of unlabeled 484–509 peptide (lanes 1–6; 0, 25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{mol/l}$ respectively) and immunoblotted.

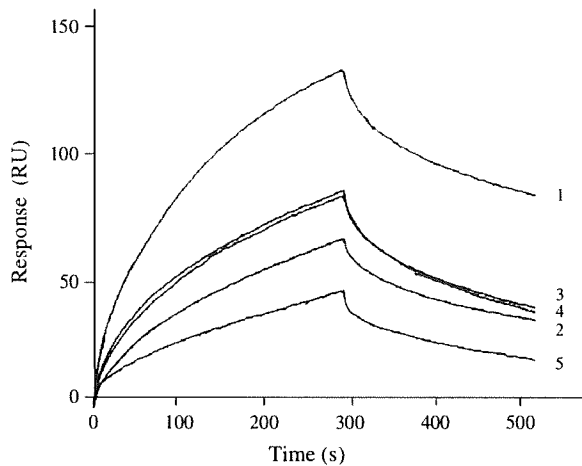


Fig 6. Binding of recombinant A2 mutants to Ah-thrombin in an SPR-based assay – Recombinant wt-A2 or its mutants (100 nmol/l) were incubated with Ah-thrombin immobilized on a sensor chip (6 ng/mm²) for 5 min, followed by a change of running buffer for 4 min. Curves 1–5 show the association/dissociation curves of wt-A2, and its mutants, R484A, R489A, R490A, and K499A respectively.

Table 1. Kinetic parameters of the interaction between recombinant A2 mutants and Ah-thrombin in an SPR-based assay.

A2 mutant	k_{ass} ($\times 10^4$ /mol/l/s)	k_{diss} ($\times 10^{-3}$ /s)	K_d (nmol/l)
WT	2.0 \pm 0.03	1.1 \pm 0.01	55.9
R484A	1.0 \pm 0.03	2.0 \pm 0.02	212
Y487A	3.4 \pm 0.06	0.97 \pm 0.03	29.0
S488A	2.8 \pm 0.04	1.5 \pm 0.02	52.6
R489A	1.3 \pm 0.04	2.4 \pm 0.02	183
R490A	1.4 \pm 0.03	2.2 \pm 1.2	163
L491A	2.1 \pm 0.03	1.6 \pm 0.01	77.9
K493A	1.9 \pm 0.05	1.8 \pm 0.02	94.9
K496A	2.2 \pm 0.04	1.6 \pm 0.02	71.3
H497A	1.4 \pm 0.03	1.8 \pm 0.02	123
K499A	1.3 \pm 0.06	3.2 \pm 0.03	255
K510A	1.8 \pm 0.03	1.7 \pm 0.01	88.5

Reactions were performed as described under "Materials and methods". Parameter values were calculated by nonlinear regression analysis using the evaluation software provided by Biacore AB. K_d values were calculated as $k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$. A2 mutants, which had the greatest decrease in affinity for Ah-thrombin, and their K_d values are shown in bold.

A2-thrombin binding in an ELISA. This peptide little affected this binding, supporting the role of these residues for the A2 484–509 region-thrombin interaction (Fig 4B).

Discussion

Our earlier study demonstrated that the A2 as well as C2 domains of FVIII contain thrombin-interactive sites (Nogami *et al*, 2000). The present study showed that one thrombin-interactive site, which is responsible, at least in part, for

proteolytic cleavage at Arg³⁷², is localized within the residues 484–509 of the A2 domain in the heavy chain. This conclusion is based on several original findings. First, a clotting-based assay showed that anti-FVIII alloAbs with A2 epitopes, an anti-A2 mAb413 (recognizing the residues 484–509), and the 484–509 synthetic peptide, inhibited thrombin-catalyzed FVIII activation because of specific inhibition of cleavage at Arg³⁷² (A1–A2 junction), not at Arg⁷⁴⁰ (A2–B junction). Second, competitive inhibition binding assays using ELISA revealed that the mAb413 and the 484–509 synthetic peptide blocked the A2-thrombin interaction. Third, covalent cross-linking was observed between the 484–509 peptide and thrombin following reaction with EDC. Furthermore, a series of single-point A2 mutants used in an SPR-based assay identified the clustered basic residues (Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, Lys⁴⁹⁹) forming one thrombin-interactive site in A2, responsible for thrombin docking and cleavage at Arg³⁷².

We previously demonstrated that an anti-FVIII inhibitor alloAb with a C2 epitope inhibited cleavage at Arg¹⁶⁸⁹ in the light chain by blocking the C2-thrombin interaction (Nogami *et al*, 2000). In the present study, we could describe for the first time an anti-A2 mAb as well as anti-A2 inhibitor alloAbs that inhibited cleavage at Arg³⁷² in the heavy chain by blocking the A2-thrombin interaction. These latest findings support the view that the A2 domain also plays a key role in thrombin-FVIII activation mechanisms. In addition, the A2 domain is known to facilitate cleavage at Arg⁷⁴⁰ (Nogami *et al*, 2005a). Taken together, therefore, thrombin cleavage sites at Arg³⁷² and Arg⁷⁴⁰ in the heavy chain and at Arg¹⁶⁸⁹ in the light chain contribute to pivotal proteolytic events and are probably governed by independent molecular interactions.

The present blotting data showed that the cleavage at Arg⁷⁴⁰ by thrombin was slightly inhibited in the presence of anti-A2 antibodies and A2 peptide. We cannot exclude completely the possibility that the 484–509 region may contain a part of a thrombin-interactive site responsible for cleavage at Arg⁷⁴⁰. However, these competitors inhibited the cleavage at Arg³⁷² more predominantly compared to that at Arg⁷⁴⁰. These inhibitory patterns were different from that of the 373–395 peptide, which strongly inhibited the cleavage at Arg⁷⁴⁰ (Nogami *et al*, 2005a). Furthermore, since the 484–509 region is positioned conformationally closely to the 389–394 region (Fig 7), the possibility of steric hindrance can be considered. Therefore, we suggest that one thrombin-interactive site that is responsible for cleavage at Arg³⁷² contains the residues 484–509 of the A2 domain.

More recently, low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-interactive sites and plasmin-interactive sites in the A2 domain have been localized using recombinant A2 mutants (Nogami *et al*, 2005c; Sarafanov *et al*, 2006). Using the same approach, by assessing the affinity of thrombin binding to the A2 domain, the relative contribution of each residue can be graded in the following order; Lys⁴⁹⁹ > Arg⁴⁸⁴ > Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰ > His⁴⁹⁷. In particular, the K499A mutant showed a marked reduction (approximately fivefold

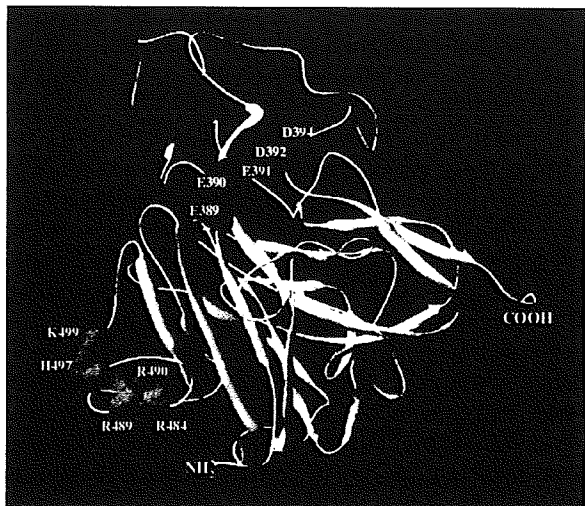


Fig 7. Thrombin-interactive sites within the FVIII A2 domain – FVIII A2 domain is shown in ribbon format with alpha-helix in red and beta-sheets in yellow. The residues Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, and Lys⁴⁹⁹ (light blue), responsible for interaction with thrombin and required for FVIII cleavage at Arg³⁷², together with residues Glu³⁸⁹, Glu³⁹⁰, Glu³⁹¹, Asp³⁹², and Asp³⁹⁴ (magenta), responsible for interaction with thrombin and required for FVIII cleavage at Arg⁷⁴⁰, are shown in space filling format.

of wt-A2) in binding affinity compared with the other A2 mutants. The lack of significant conformational disturbance produced by these five A2 mutations has been confirmed (Sarafanov *et al*, 2006). The role of these residues in thrombin interactions was also supported by the results obtained in a competitive inhibition assay using a 484–509 synthetic peptide, a substituted peptide with Ala, and an anti-A2 mAb recognizing this sequence. The inhibitory effects were incomplete in these experiments; however, (approximately 40%), possibly due to the presence of a previously identified, alternative domain (residues 389–394; Nogami *et al*, 2005a).

On the basis of the known FVIII homology with ceruloplasmin (Pemberton *et al*, 1997), the currently identified five basic residues (Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷ and Lys⁴⁹⁹) appear to be arranged in a spatially adjacent fashion and exposed on the A2 surface (Fig 7). This provides an extended surface for thrombin binding, juxtaposed to the N-terminus of the A2 domain. Nogami *et al* (2005a) demonstrated that the acidic region, comprising residues 389–394 in A2, interacts with thrombin via ABE-II and facilitates cleavage at Arg⁷⁴⁰ during pro-co-factor activation. It is evident, therefore, that the A2 domain appears to contain the two independent thrombin-interactive sites responsible for cleavage at Arg³⁷² and Arg⁷⁴⁰. The domain model shows that the acidic region (residues 389–394) associated with ABE-II is also exposed on the A2 surface, and may be in close proximity to the basic region (residues 484–509). Arg³⁷² (C-terminal end in A1) and Ser³⁷³ (N-terminal end in A2) are not accounted for in this model, however. Comparisons of amino acid sequences among

human, porcine, murine, and canine FVIII molecules (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) indicates that the Lys⁴⁹⁹, a major contributor for thrombin binding, and the other basic residues, except for Arg⁴⁸⁴, are well-conserved, suggesting that these basic regions may be fundamental for interaction with thrombin.

Direct binding between the basic region 484–509 and thrombin in the fluid phase was confirmed by visualization of a peptide-thrombin adduct following zero-length cross-linking with EDC. EDC initially reacts with an acidic residue to form an unstable *O*-acylisourea compound and subsequently reacts with a closely associated nucleophilic side chain, thereby covalently preserving the original salt bridge (Carraway & Triplett, 1970). This approach had been already utilized to identify the FX(a)-interactive site in the A1 domain (Fay & Lapan, 1997; Nogami *et al*, 2004). The present data suggest, therefore, that salt bridges link residues in the A2 subunit and acidic residues in thrombin. Furthermore, the results obtained with the A2 mutations indicate that residues Arg⁴⁸⁴, Arg⁴⁸⁹, Arg⁴⁹⁰, His⁴⁹⁷, and Lys⁴⁹⁹ may help to stabilize these bridges.

Several mechanisms by which anti-FVIII inhibitor alloAbs inactivate FVIII activity have been described (Shima, 2006). In particular, Fay & Scandella (1999) reported that A2 inhibitors of this nature blocked the interaction between the FVIII A2 domain and FIXa on the tenase complex. The present study has demonstrated a new inhibitory mechanism where the anti-A2 alloAbs inhibited thrombin-catalyzed FVIII activation by blocking cleavage at Arg³⁷². Anti-A2 mAb413, which recognizes the same epitope as the anti-A2 inhibitors, similarly blocked Arg³⁷² cleavage and FVIII activation by thrombin, but not completely. This inhibitory mechanism reflects the modest contribution of residues 484–509 in heavy chain cleavage at Arg³⁷² by thrombin. Cleavage at Arg³⁷² is governed through thrombin docking to interactive sites within the A1 and/or A2 domain, however, and alternative thrombin-interactive sites responsible for cleavage at Arg³⁷² remain to be fully investigated.

The A2 484–509 region is also involved in interactions with FIXa, plasmin, and LRP. The heavy chain cleavage by thrombin is essential to expose the FIXa-interactive sites that are required to modulate protease activity (Fay *et al*, 2001). Binding of plasmin to A2, in which Arg⁴⁸⁴ plays a key role, rapidly induces FVIII inactivation by cleavage at Arg³³⁶ (Nogami *et al*, 2005a,b). Furthermore, FVIII binding to LRP, which shares an A2 site with thrombin, leads to FVIII clearance from the circulation (Sarafanov *et al*, 2006). These diverse studies show that residues 484–509 in A2 play a vital role in FVIII metabolism *in vivo*.

Acknowledgement

This work was supported by grants for MEXT KAKENHI 17390304 and 17591110, and by grants for AIDS Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- Binnie, C.G. & Lord, S.T. (1993) The fibrinogen sequences that interact with thrombin. *Blood*, **81**, 3186–3192.
- Carraway, K.L. & Triplett, R.B. (1970) Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups. *Biochimica Biophysica Acta*, **200**, 564–566.
- Eaton, D., Rodriguez, H. & Vehar, G.A. (1986) Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, **25**, 505–512.
- Fay, P.J. (2004) Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Reviews*, **18**, 1–15.
- Fay, P.J. & Lapan, K.A. (1997) Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 2082–2088.
- Fay, P.J. & Scandella, D. (1999) Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 29826–29830.
- Fay, P.J., Mastri, M., Koszelak, M.E. & Wakabayashi, H. (2001) Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of a2 subunit with factor IXa. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 12434–12439.
- Healey, J.F., Lubin, I., Nakai, H., Saenko, E.L., Hoyer, L.W., Scandella, D. & Lollar, P. (1995) Residues 484–508 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the A2 domain of human factor VIII. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14505–14509.
- Lollar, P., Hill-Eubanks, D.C. & Parker, C.G. (1988) Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 10451–10455.
- Mann, K.G., Nesheim, M.E., Church, W.R., Haley, P. & Krishnaswamy, S. (1990) Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*, **76**, 1–16.
- Myles, T., Yun, T.H. & Leung, L.L. (2002) Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin. *Blood*, **100**, 2820–2826.
- Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Suzuki, T., Koide, T., Saenko, E.L., Scandella, D., Shibata, M., Kamisue, S., Tanaka, I. & Yoshioka, A. (1999) Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 31000–31007.
- Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Nagata, M., Koide, T., Saenko, E.L., Tanaka, I., Shibata, M. & Yoshioka, A. (2000) Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25774–25780.
- Nogami, K., Lapan, K.A., Zhou, Q., Wakabayashi, H. & Fay, P.J. (2004) Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337–372 of the factor VIII heavy chain. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 15763–15771.
- Nogami, K., Zhou, Q., Myles, T., Leung, L.L., Wakabayashi, H. & Fay, P.J. (2005a) Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 18476–18487.
- Nogami, K., Zhou, Q., Wakabayashi, H. & Fay, P.J. (2005b) Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood*, **105**, 4362–4368.
- Nogami, K., Shima, M., Nishiya, K., Saenko, E., Takeyama, M., Tatum, K., Tanaka, I. & Yoshioka, A. (2005c) Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Blood*, **106**, 298a.
- Pemberton, S., Lindley, P., Zaitsev, V., Card, G., Tuddenham, E.G. & Kembal-Cook, G. (1997) A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood*, **89**, 2413–2421.
- Regan, L.M. & Fay, P.J. (1995) Cleavage of factor VIII light chain is required for maximal generation of factor VIIIa activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 8546–8552.
- Sarafanov, A.G., Makogonenko, E.M., Pechik, I.V., Radtke, K.P., Khrenov, A.V., Ananyeva, N.M., Strickland, D.K. & Saenko, E.L. (2006) Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Biochemistry*, **45**, 1829–1840.
- Sheehan, J.P. & Sadler, J.E. (1994) Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 18–22.
- Shima, M. (2006) Characterization of factor VIII inhibitors. *International Journal of Hematology*, **83**, 109–118.
- Stone, S.R., Braun, P.J. & Hofsteenge, J. (1987) Identification of regions of alpha-thrombin involved in its interaction with hirudin. *Biochemistry*, **26**, 4617–4624.
- 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. & Capon, D.J. (1984) Structure of human factor VIII. *Nature*, **312**, 337–342.
- 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.D.G., Vehar, G.A. & Lawn, R.M. (1984) Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*, **312**, 330–337.

I. 基礎

1. 血友病の歴史

はじめに

血友病 (hemophilia) は、幼少時から種々の出血症状を繰り返す先天性凝固障害症である。X染色体連鎖劣性遺伝形式をとり、主として男子のみに発症する。本症は先天性凝固障害症のなかでは最も頻度が高く、人類誕生後の早期から存在していたことは想像に難くない。ここでは古代から中世、近世にかけての血友病の観察の歴史を振り返るとともに、その診断および治療の変遷について述べる。

1. 血友病の観察史

血友病はその出血症状および家族歴によって疑われ、第Ⅷ(Ⅸ)因子活性の欠乏を証明することによって診断される。しかし、凝血学的診断が可能になったのは、わずか50年ほど前からにすぎず、それまではもっぱら出血症状の観察および家系調査が主体であった。

1 ユダヤ教の聖典タルムード (Talmud)

現存する最古の出血性素因に関する記述は、ユダヤ教の聖典バビロニア・タルムードに記載されたものといわれている。タルムードはもともと、2世紀末頃にパレスチナのユダヤ人共同体の長であった Rabbi Judah haNasi (135-220) (Rabbi はユダヤ教の宗教的指導者かつ学者の敬称)の指示のもと、ユダヤ教の口伝律法を体系的に編纂したもので、5世紀頃には Rabbi Ashi (352-427)によって完成され現在の形になったといわれている¹⁾。そのなかでも7編構成で書かれた Nashim (結婚と離婚、誓約に対する作法に関する記述)のうち Yebamoth の一節に、「もし、最初の男の子が割礼により出血し、第2子も同様であれば第3子の割礼は行ってはならない」との記述がみられる^{1, 2)}。また、Rabban Simeon ben Gamliel がガリラヤ地方セフォリス

の4姉妹について、姉3人の息子がいずれも割礼で出血死した際に、4人目の末妹の男の子には割礼を禁じたとされる¹⁾。これらの記述は家族性に現れる男子の出血性素因についての認識を示すものと考えられる。

スペインのコルドバ生まれの Rabbi であり、医師、哲学者の Moses Maimonides(1135-1204) はユダヤ法に関する膨大な資料を体系的に分類し、The Mishneh Torah として法典化した。この割礼に関する法律のなかで、「初めての息子が割礼で死亡し、2人目の子も同様であれば、3人目の子の父親がはじめの夫であれ、二番目の夫であれ、割礼をしてはならない」と述べている^{1,3)}。これは明らかに女性を通じて、出血性素因が伝わることを示したものと考えられる。Mendel が遺伝の法則を発表したのが1866年であるが、それより遙か以前のユダヤ教社会のなかで、割礼という儀式を通じて、男性に現れる出血性素因についての認識が脈々と受け継がれていたことがうかがわれる。

2 中世から近世にかけての症例記述

アラビア人のスペイン宮廷医師である Albucasis (Abul Qasim Al-Zahravi) (936-1013) は彼の著書『Al-Tasrif』で、些細なけがで出血死したアンダルシア地方の男性について述べている^{2, 3)}。17世紀初めにはアウグスブルグの医師 Höchstetter は、出生時に臍出血を起こし、その後鼻出血や血便、皮下出血を繰り返す少年について述べている²⁾。また1743年に Banyer は、鼻出血や消化管出血、血尿を繰り返し、33歳で些細な足のけががもとで出血死した英国の庭師を報告している²⁾。これらの報告はいずれも孤発例であるが、家族歴を有する症例としては、1791年のマサチューセッツ、セーラムの死亡記事に記載された Isaac Zoll の家系がある^{2, 3)}。彼自身は斧で足を切った後、19歳で死亡したと記載されているが、彼の5人の兄弟も些細なけがで出血死したという。1793年ドイツ人の Consbruch は、ある男性とその姉妹の息子たちの出血傾向に関する記述^{3, 4)}を、1796年には Rave が彼本人とその3人の兄弟の出血傾向についての記述³⁾を残している。

1803年、フィラデルフィアの医師 John Conrad Otto はその著書『An account of a hemorrhagic disposition existing in certain families』で、1720年頃にニューハンプシャー州のプリマウス近くに住み着いた Smith 家系を報告した^{2~4)}。彼はこのなかで、男性のみが出血傾向をもち、女性を通じてその息子の一部に出血性素因が伝わることを示し、後の研究に大きな影響を与えた。同様の家系調査研究としては、1813年に Hay が報告したマサチューセッツ、イプスウィッチの Appleton-Swain 家系がある^{2, 4)}。彼はこの家系を遡って、1639年からの6世代、172年間での20人の男性患者を調査した。ここで、出血者の息子はその素因を受け継がず、娘の息子に発症することを示した。その後、この家系は Osler(1885)や Pratt(1908), McKusick & Rapaport (1962) によって現在まで追跡されている。

I. 基礎

また、ヨーロッパでは1837年に、ThormannがスイスのTenna家系について1650年まで遡って調査を行った^{3,4)}。その後、この家系はVieli(1846)やGrandidier(1855), Hoessli(1885), Bullock & Fildes (1911), Hoessly (1930), Koller (1954)によって追跡調査された。この頃から過去の症例の集積作業が行われるようになり、1820年Nasseは過去の症例のレビューを行い、本症は男子のみに発症し、非罹患女性によって伝わることを明確に表し、Nasse's lawと呼ばれた^{2~4)}。また、1855年にGrandidierは過去の異常出血をきたした452人の男性と32人の女性を収集し報告した^{2,3)}。1872年、英国のLeggは『Treatise on Hemophilia』を著し、その遺伝や出血にまつわる種々の問題、死因、最新の治療などについての詳細な記載を行った^{2,3)}。1886年、Trevesはいとこ婚による真の女性血友病を報告^{2,3)}し、その後、この家系はHandley & Nussbrecher(1935), Merskey(1951), Valberg(1959), Gilchrist(1961), Kernoff & Rizza (1973)により再研究された。1890年Königは、それまで結核やリウマチと混同されていた血友病の関節障害についての詳細な記載を行った³⁾。1911年にはBullock & Fildesが多数の患者家系の遺伝について系統的に分析し、その症状や遺伝形式から血友病の概念をあらためて整理し定着させた^{2~4)}。

一方、わが国では1889年、弘田が初めて血友病の疑いのある男児を報告し、1902年には山下がわが国初の血友病家系を報告した⁵⁾。

3 血友病とヨーロッパ王室(図1)

歴史上、最も有名な血友病家系は英国Victoria女王(1819-1901)の家系であろう。彼女が保因者となり、その子供たちを通してプロイセン王国やロシアのロマノフ王朝、スペイン王朝などに出血性素因が伝わった。このため、血友病はRoyal diseaseとも呼ばれるようになった^{2,3)}。

Victoria女王の四男オールバニ公Leopold(1853-1884)は幼い頃から出血症状を繰り返し、その様子は1868年のBritish Medical Journal誌に報告された。彼は静養先のカンヌのヨットクラブで転倒し、その翌朝、31歳の若さで急死した。彼の出血性素因は娘Aliceに伝わり、その結果、Aliceの長男Rupert(1907-1928)は幼い頃から出血傾向を有した。彼は21歳の時にフランスで交通事故に遭い、頭蓋内出血で死亡した^{2,3)}。

一方、Victoria女王の次女Aliceはヘッセン大公国のLudwig IV世と結婚し、2男5女をもうけたが、Aliceを通じて次男Friedrich(1870-1873)に出血性素因が伝わった。彼は3歳の時に、母親の寝室の窓から転落し、頭蓋内出血で死亡した。Aliceの三女Ireneはいとこにあたるプロイセン王国のHeinrich王子と結婚し、3男をもうけたが、このうち、長男と三男は出血症状を有した。長男のWaldemar(1889-1945)は南ドイツで輸血治療ができずに死亡し、三男Heinrich(1900-1904)は転倒し、頭部を打撲して4歳で死亡した。Aliceの四女Alix(Alexandra)はロシア皇帝Nicholas II世と結婚し、1男4女をもうけたが、長男Alexei(1904-1918)が血友

I. 基礎

病患者であった。Alexei の出血に対する痛みを和らげ、皇帝と皇后の信頼を得たとされるのが Rasputin である。1918 年, Alexei はロシア革命で家族とともに銃殺されたといわれている^{2, 3)}。

Victoria 女王の五女 Beatrice も保因者であり, その次男と三男が血友病であった。次男 Leopold (1889-1922) は膝関節の手術中に死亡したとされ, 三男 Maurice (1891-1914) は第一次世界大戦中に戦死した。Beatrice の長女 Eugenie はスペインの Alfonso XIII 世と結婚して 5 男 2 女をもうけたが, このうち, 長男と五男が血友病であった。長男 Alfonso (1907-1938) はマイアミで電話ボックスに衝突後, 死亡し, 五男 Gonzalo (1914-1934) はオーストリアでドライブ中に自転車を避けようとして壁に激突し, 腹部の出血で死亡した。ちなみに, 四男 Juan の長男 Juan Carlos I 世は現在のスペイン国王である^{2, 3)}。

幸い, Victoria 女王の長男 Edward VII 世は出血性素因を受け継がず, 英国王室には伝搬しなかったが, Victoria 女王の息子, 孫, ひ孫の代まで合わせて 10 名の血友病患者が発生した。しかし, それ以降の世代のヨーロッパ王室には血友病患者は現れていない。

4 “hemophilia” の名前の由来

“hemophilia” という名前の由来については, Brinkhous の著書に詳しく書かれている⁴⁾。もともとはギリシャ語の “haima” (blood) と “philein” (to love) に由来する言葉で, いつの頃からか一般に使われていたようであるが, その起源は明らかでない。ウィーン・アートミュージアムにある Paolo Veronese (1570) 作の出血している婦人像のタイトルは “La Guérison de l'hémophilique” と呼ばれ, すでに 1800 年以前に名付けられたものだといわれている⁴⁾。しかし医学史上, 最初に “hemophilia” という言葉を用いたのは, ドイツ人医師でチューリッヒ大学の教授であった Johann Lukas Schönlein (1793-1864) といわれている⁴⁾。彼は 1823 年当時, 男女にかかわらず, 出血者全般に対して, “hemophilia” と呼んでいたようであるが, 1828 年頃にかけて次第に出血性素因のある男性に対して使うようになったという。

医学文献上, 初めて “hemophilia” という言葉が使用されたのは, Schönlein の弟子である Friedrich Hopff の 1828 年の論文『Ueber die Haemophilie oder die erbliche Anlage zu tödtlichen Blutungen』のなかである⁴⁾。その後しばらくの間, “hemorrhaphilia” と併用して使われる時代が続き, 1854 年の Virchow の著書でも同意語として扱われていたが, 次第に “hemorrhaphilia” という言葉は使われなくなったという⁴⁾。

2. 血友病の診断学

1 凝血学的進歩

患者の血液に凝固欠損があるという最初の報告を行ったのは Ward (1819) である^{2, 3)}。その

後 1839 年, Liston が患者のけがから出血した血液がゆっくり固まることを観察^{2, 4)}し, 1893 年 Wright は, 毛細管内で患者血液が固まるのが遅いことを観察した^{2~4)}。しかし, 血友病の本態に迫る凝血学的なアプローチは 20 世紀まで待たなければならなかった。

1905 年 Sahli は, 患者の血液は組織トロンボプラスチンによって正常に凝固が加速されることを観察した^{3, 4)}。1911 年には Addis は, 患者のプロトロンビンは正常であるが, トロンビンへの転換が遅れることを示した。さらに, 患者の血液に正常血漿からの酸性沈殿物を加えると凝固障害が補正されることを観察した^{2~4)}。1937 年, Patek & Taylor はこの血漿酸性沈殿物を“globulin substance”と呼び, Berkefeld フィルターで除去されない(細胞成分を含まない)ことを示した。そして, その静注により, 血友病患者の凝固時間が短縮することを示した^{2~4)}。後に, この沈殿物は抗血友病グロブリン(AHG: anti-hemophilic globulin)と呼ばれるようになった。1939 年 Brinkhous も, 血友病患者ではこのグロブリンが欠損していることを示し, 後に抗血友病因子(AHF: anti-hemophilic factor)と呼んだ⁴⁾。

2 血友病 A と血友病 B の鑑別

1924 年, Feissly は血友病患者の血液を別の患者に輸血すると凝固時間の延長がいくらか改善することを観察していた⁴⁾。1944 年, ブエノスアイレスの Pavlovsky は患者間の血液を混合し, 相互補正が認められることを報告^{2, 3)}。1950 年, Koller らも Tenna 家系と Möena 家系の患者血漿は相互に補正されることを報告した²⁾。これによって, これまで血友病と考えられていた症例は単一ではないことが明らかとなった。

1952 年サンフランシスコの Aggeler らは, AHG とは異なる血漿因子の欠乏による出血性素因を plasma thromboplastin component (PTC: 血漿トロンボプラスチン成分) 欠乏症と呼び, 新しい疾患として報告した^{2, 3)}。ニューヨークの Schulman & Smith は Aggeler らと同様の内容の症例を数日遅れで Blood 誌に投稿した^{2, 3)}。同じく 1952 年, 英国オックスフォードの Biggs らは同様の出血性素因 7 例を観察し, 第 1 例の患者 Stephen Christmas にちなんで Christmas 因子欠乏症(Christmas 病)とし, British Medical Journal 誌のクリスマス号に報告した^{2, 3)}。

1953 年 Cramer らによって, 古典的血友病は血友病 A, PTC 欠乏症(Christmas 病)は血友病 B と呼ばれるようになった⁵⁾。1962 年, 血液凝固因子命名のための国際委員会が開かれ, AHF は第Ⅷ因子, PTC は第Ⅸ因子と呼ばれることが決められた。一方, わが国初の血友病 B は 1956 年, 吉田らにより報告された⁵⁾。

3 血友病の免疫・生化学的進歩

1968 年, Roberts らは血友病 B 患者の 10% にインヒビター中和能を有する CRM (cross-reacting material: 交叉反応物質) が存在すると報告した⁵⁾。同年, Hoyer らは血友病 A 患者の

I. 基礎

なかで、インヒビターに対する中和能を有するものを CRM-positive、中和能のないものを CRM-negative と呼んだ⁵⁾。1978年、Peakeらは高力価同種抗体を用いた免疫放射定量測定法 (IRMA: immunoradiometric assay) による第Ⅷ因子抗原 (FⅧ:CAg (factor Ⅷ coagulant antigen)) 測定法を考案した⁵⁾。1982年、Fulcherらは抗 VWF (von Willebrand factor:フォンヴィレブランド因子) モノクローナル抗体カラムで、第Ⅷ因子を高度に純化することに成功し⁵⁾、この方法は現在市販されているモノクローナル抗体製剤の開発に発展した。

一方、第Ⅸ因子も1975年頃から陰イオン交換ゲルやヘパリンセファロスクロマトグラフィーで高度純化物が得られるようになり、それを基にした異種抗体の作製が可能となり、Laurell (ローレル) 法や ELISA (酵素結合免疫吸着測定) 法による第Ⅸ因子抗原の検索が行われるようになった⁵⁾。さらに、1980年頃から抗第Ⅸ因子モノクローナル抗体を用いて、少量の患者血漿からの純化が可能になり、異常第Ⅸ因子蛋白の生化学的解析が可能になった⁵⁾。

4 血友病の分子生物学の進歩

1982年、Kurachiら、Chooらのグループはそれぞれ、第Ⅸ因子遺伝子のクローニングに成功し、1984年には米国の Genentech Inc と Genetics Institute の研究グループにより、それぞれ第Ⅷ因子遺伝子のクローニングが行われた⁶⁾。これらにより、第Ⅷ因子、第Ⅸ因子遺伝子それぞれの全塩基配列が決定され、アミノ酸配列による蛋白一次構造が決定された。この結果、血友病 A ならびに B 患者家系の遺伝学的解析が次第に行われるようになった。

cDNA (相補的デオキシリボ核酸) あるいは遺伝子内断片をプローブとし、制限酵素で切断した DNA (デオキシリボ核酸) 断片の長さをサザンブロット法で観察する制限酵素断片長多型 (RFLP: restriction fragment length polymorphism) によって、血友病患者家族の保因者診断や出生前診断が可能になった⁵⁾。さらに、患者 DNA の特定の遺伝子部位を PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) で増幅させ、シーケンス解析を行って、遺伝子の欠失や点変異、逆位、フレームシフトなどの遺伝子異常が次々に明らかにされた^{5) 6)}。このうち、第Ⅷ因子遺伝子のイントロン 22 の逆位は、1993年に Lakichらによって報告され、その後、重症血友病 A 患者遺伝子異常の約 40% を占めることが明らかとなった⁶⁾。

3. 血友病治療の進歩

1 古典的治療法

最も古い治療法として前述の Albucasis (936-1013) の著書のなかには、止血困難な男性の最善の治療法として焼灼術 (cautery) についての記載がある。現実的な治療法として、1934年、MacFarlane はラッセル蛇毒が血友病患者の血液凝固を促進する作用があることを観察し、後

に局所薬として市販化された³⁾。このほか、1936年には卵白の臭化抽出物の有効性が“The Lancet”に報告されたり、ピーナッツ粉末の有効性が1960年代の“Nature”や“The Lancet”に掲載されるなど、血友病の本質的な治療である補充療法が確立するまでの間は様々な治療法が試みられていた³⁾。

2 輸血治療から補充療法へ

1832年のSchönleinの講義ノートにはすでに輸血の有用性についての記載⁴⁾があるが、血友病患者に対する最初の輸血成功例は1840年、英国の外科医であるSamuel Armstrong Laneにより報告された^{2~4)}。彼は、斜視の手術後に6日間出血が続いた11歳の少年に12オンスの新鮮血を輸血し、止血に成功した。しかし、この当時の輸血は供血者から受血者への直接的輸血が必要であったことや、血液型不適合など致死的な副作用が高率にみられたために、一般に広まることはなかった。その後1900年、Landsteinerによる血液型の発見で輸血の安全性が向上し、さらに1915年、Lewisohnによって抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムが使用され、保存血による輸血が可能になった。これらの発見によってその後の輸血治療は大きく前進することとなった⁷⁾。さらに、1923年にはローザンヌのFeisslyによって、クエン酸ナトリウム加血漿の輸注が血友病治療に導入された^{2, 7)}。

1944年、Cohnは低温下エタノール処理による血漿の分画化に成功^{3, 4, 7)}し、このうちCohn分画-Iが抗血友病活性を示すことを見出した。しかし、この分画の抗血友病活性が不安定なため、患者への効果は限られていた。1955年には、米国のLangdellらは血友病治療として初めて第Ⅷ因子を含む血漿分画を使用した³⁾。1958年スウェーデンのBlombäckらは、Cohn分画のうち比較的安定なI-O小分画を取り出すことに成功し、Nilssonはこの小分画を使って重症患者の少年に初めて予防投与を行った⁷⁾。また同年、血友病B患者に対する製剤として、第Ⅸ因子を含むプロトロンビン複合体製剤(PCC: prothrombin complex concentrates)が初めて使用可能となった⁷⁾。

一方、この頃には輸血血液の供給量の問題点を解決する方法として動物血の輸血も試みられた。1952年にはBrinkhousがブタ血漿を、1953年にはSpaet & Kinsellがウシ血漿を、1955年にはBidwellがウシやブタ血漿をそれぞれ輸注した⁴⁾。しかし、これら動物血漿は一過性には有効であったが、アレルギーや血小板減少など重篤な副作用があるため、その使用には限界があった。

1964年、スタンフォード大学のJudith Poolは血漿を凍結後、低温でゆるやかに融解した際に生じる沈殿物(クリオプレシピテート)に第Ⅷ因子が多く含まれることを見出し、その後、クリオ製剤として市販化された^{3, 4, 7)}。これまでの血漿分画と比べて、より多くの第Ⅷ因子を含み、比較的容易に製造することが可能であったため、血友病治療に画期的な進歩をもたらした

I. 基礎

た。さらに、1960年代後半には凍結乾燥した濃縮第Ⅷ因子製剤および第Ⅸ因子製剤が使用可能になり、血友病患者の重度出血や手術に対する対応が現実的に可能となった。わが国でも1967年、Cohn-I分画製剤が、1970年にはクリオプレシピテート製剤が使用可能となり、1972年には濃縮第Ⅸ因子製剤が、1978年には濃縮第Ⅷ因子製剤が市販された。

このように輸血治療が進歩し、プール血漿を原材料とした濃縮製剤が使用されるようになると、血液を介して伝搬する感染症が大きな問題となった。1982年には米国CDC(疾病予防管理センター)によって血友病患者における初のAIDS(acquired immunodeficiency syndrome: 後天性免疫不全症候群〔エイズ〕)患者が報告され、それを受けて加熱処理や有機溶媒/界面活性剤(S/D)処理、ナノフィルトレーションによるウイルス不活化・除去製剤が開発されるようになった。さらに、初の遺伝子組換え型製剤として、1992年に第Ⅷ因子製剤が、1997年には第Ⅸ因子製剤が市販された。

3 デスモプレシンの有効性の発見

1974年、Cashらは合成バソプレシンである酢酸デスモプレシン(DDAVP: desmopressin acetate hydrate)が第Ⅷ因子およびVWFを増加させる作用があることを観察した⁷⁾。1977年イタリアのMannucciは、中等症～軽症血友病Aおよびvon Willebrand病患者の治療に有効であることを示し、現在でもこれらの患者の治療にとって重要な選択肢の一つとなっている。

4 インヒビター保有患者に対する治療

1941年、Lawrenceは血友病患者に生じた循環抗凝血素の存在を初めて報告し、1947年Cradock & Lawrenceは、この抗凝血素は外因性のAHFに対する同種抗体であると推測した⁷⁾。インヒビター保有患者に対するバイパス止血療法は、1969年Breen & Tullisにより初めて報告された。彼らはそれまで血友病B患者に使用されていたPCCが、血友病Aインヒビター患者に有効であることを示した。

1972年Feketeら、1974年にはKurczynskiらが自然活性化PCCによる治療例を報告し、1976年Elsingerは、意図的に活性化した活性型PCC(aPCC: activated PCC)を開発し、インヒビター保有患者に対する、より効果的な止血治療を可能にした⁸⁾。その後、1996年にはバイパス製剤として初の遺伝子組換え型製剤である活性型第Ⅷ因子製剤が使用可能となった。しかし、インヒビター治療は現在でも血友病診療上、残された課題の一つであり、今後の治療の進展が期待される。

おわりに

血友病の診断と治療は20世紀に入って加速度的に進歩したが、その礎として先人たちの努力と試行錯誤の積み重ねがあったことを忘れてはならない。その知恵と発想力は21世紀のわれわれをも驚嘆させるものである。しかし、その歴史のなかで、偉大な業績としての光のあたる部分だけでなく、HIV (human immunodeficiency virus: ヒト免疫不全ウイルス) 感染など影の部分が存在したことも事実である。今後、血友病治療は遺伝子治療や細胞移植など新たな治療の段階に入ろうとしているが、過去の歴史からその業績を知るとともに、教訓とすることも忘れてはならないであろう。

(田中 一郎・吉岡 章)

文献

- 1) Rosner F : Hemophilia in classic rabbinic texts. *J Hist Med Allied Sci* 49 : 240-250, 1994
- 2) Forbes CD: The early history of hemophilia. *Hemophilia*(Forbes CD, et al ed.), Chapman & Hall, London, 1997, p3-6
- 3) Ingram GIC : The history of haemophilia. *J Clin Pathol* 29 : 469-479, 1976
- 4) Brinkhous KM : A short history of hemophilia, with some comments on the word "Hemophilia". *Handbook of Hemophilia, part 1, Excerpta Media*, Amsterdam, 1975, p3-20
- 5) 福井 弘 : 血友病の歴史. 血友病の診療 (藤巻道男, 長尾大 編). 財団法人血液製剤調査機構, 宇宙堂八木書店, 東京, 1993, p1-5
- 6) 中 宏之, 吉岡 章 : 遺伝子診断. *血液・腫瘍科* 38 : 251-258, 1999
- 7) Scharrer I, Becker T : Products used to treat hemophilia : evolution of treatment for hemophilia A and B. *Textbook of Hemophilia*(Lee CA, et al ed.), Blackwell Publishing, Massachusetts, 2005, p131-135
- 8) Negrier C, Gomperts ED, Oldenburg J : The history of FEIBA : a lifetime of success in the treatment of haemophilia complicated by an inhibitor. *Haemophilia* 12 : 4-13, 2006

I. 基礎

3. 血友病の病態

1) 止血機構

はじめに

血友病はX染色体連鎖劣性遺伝を示す出血性疾患として古くから広く知られている。血友病にみられる出血傾向の本態は、血液凝固反応の異常によるフィブリンの形成障害によって起こる。その原因としては、血友病Aは血液凝固第Ⅷ因子、血友病Bは血液凝固第Ⅸ因子の欠乏や異常により発生することが知られている。したがって、血友病は2つの全く異なる蛋白質の異常により発生する2つの病気が含まれているが、遺伝形式や臨床症状が酷似していることから血友病と共通した名前が使われている。これらの凝固因子はともにX染色体上に遺伝子を持ち、X染色体連鎖劣性遺伝を示す。また、詳細は後に述べるが、血液凝固機序のなかでともに内因性凝固因子として、血液凝固反応のなかで共同して働く重要な役割を担っている。

歴史的には、止血機構は基本的な凝固検査の結果から導き出されてきたが、旧来の凝固機序の考え方では、実際の生体内での出来事と一致しないいくつかの問題点を解消することができなかった。近年、微量の活性化された第Ⅷ因子により惹起され、血小板リン脂質膜の表面で効率的な反応を繰り広げる血液凝固反応の全貌が明らかとなりつつある。ここでは、検査室診断における凝固反応と近年の止血機構の考え方を比較しながら、血友病の止血異常について解説する。

1. 止血の仕組み

血液は血管内を通り人の体内を絶え間なく循環して、重要な物質を輸送することにより生体の恒常性の維持に重要な役割を演じている。血液自身は、健康な状態では血管内で凝固することなく円滑に循環する。しかし、万一の血管の損傷に際しては出血を最小限に抑えて恒常性を保とうとする自己制御機構ともいえる止血機構を有している。

止血機構は血管壁・血管内皮細胞，血小板，凝固因子，線溶因子が組み合わさって形成されている。血友病では凝固因子以外には異常がないため，日常活動による軽微な出血には血管壁や血小板の働きと，弱いながら存在する凝固機能により止血が達成されている。しかし，ときに出血が高度になった場合，外傷や手術に際しては凝固因子の十分な働きがないと止血は達成できなくなる。これは凝固因子の活性化が少ないために局所におけるトロンビンの生成が不十分となり，産生されたフィブリン塊の強度が十分なものにならないために起こる。また，線溶の影響も受けやすいと予想され，いったん止血したとしても再出血の危険が高いと考えられる。

このような状況により血友病患者は，日常生活のなかでは健常者と同様の生活が可能であるが，何らかの事情で出血が高度になると自らの力では止血が困難となり，出血症状が現れる。小血管における止血機構の想像図を示すと図1のようになる。

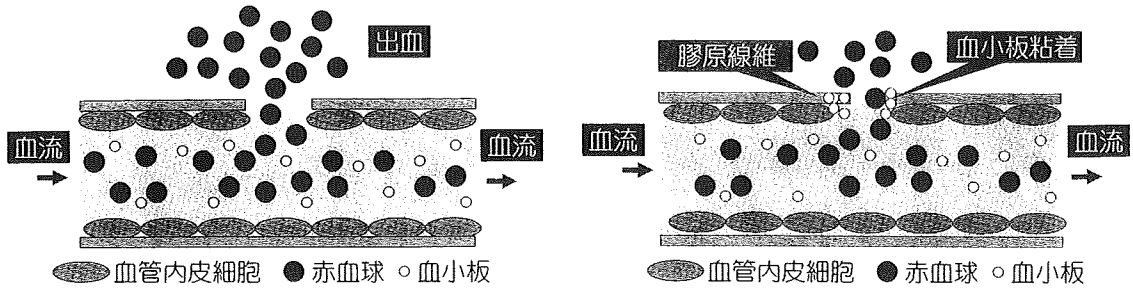
2. 血液凝固検査からみる凝固機構

血液凝固機構は，従来，基本的な臨床検査である活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)とプロトロンビン時間(PT)を巧みに組み合わせ，既知の患者血漿と混合した結果などの組み合わせ関係から解明されてきた。内因系凝固過程，外因系凝固過程そして共通系凝固過程の仕組みは，このような試験管内の実験から説明されてきたものである。後述するように，これらだけでは生体内での実際の出来事を反映できていないことが，近年，明らかとなっているが，これらの基本的な考え方は凝固機構の根幹として現在でも重要である(図2)。

血液が固まるために働く血液凝固因子は蛋白質で，循環血液中には第Ⅶ因子を除いて酵素前駆体または補酵素として存在し，古くからローマ数字(I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, ……)の番号で呼ばれている(表1)。わが国では血友病Aの原因因子を第Ⅶ因子，血友病Bの原因因子を第Ⅸ因子と記載している。これらの凝固因子は，それぞれ活性化作用を受けて活性型へ変換される。活性型凝固因子はローマ数字に「a」をつけて，例えば活性型第Ⅶ因子は「第Ⅶa因子」と記載することになっている。

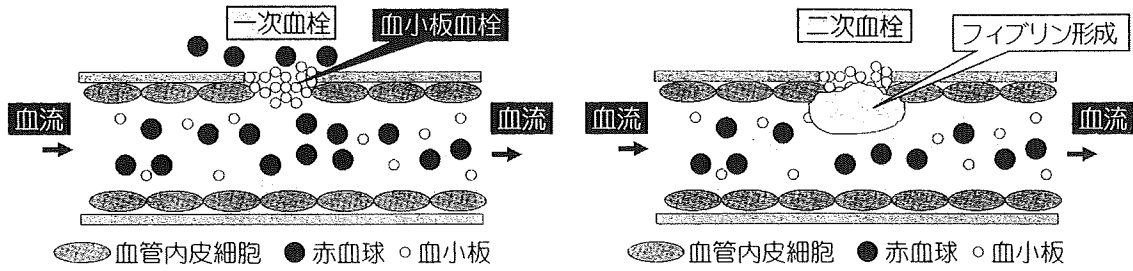
血液をガラス製の試験管に放置するとやがて凝固するが，シリコン処理した試験管では凝固するまでに長い時間を要することが知られていた。この現象から接触因子として，第Ⅻ因子という血液凝固因子が血漿中に発見された。APTTという検査は，この第Ⅻ因子を活性化するためにシリカ，カオリンあるいはエラジン酸などの活性化物質を含む試薬を用いて，第Ⅻ因子を活性化して血液凝固反応を促進している。ガラスのような陰性荷電表面への接触反応により活性化が始まる血液凝固反応は，血漿中の凝固因子のみで血液を凝固させるという意味から内因性凝固機構と呼ばれている。第Ⅻ因子は，血管損傷や内皮細胞の傷害により露出した血管内皮

I. 基礎



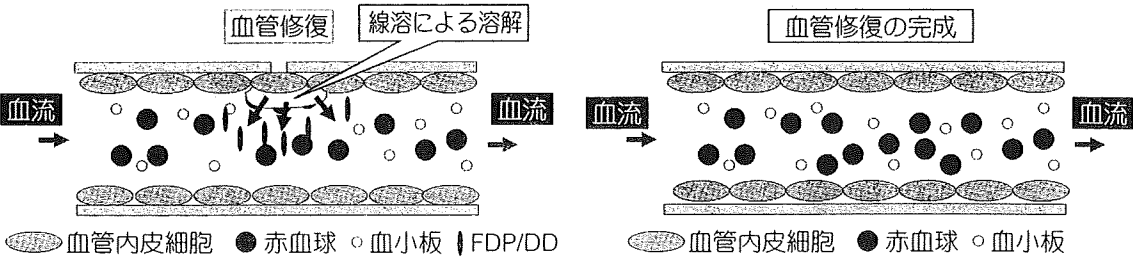
① 小血管の傷害による出血

② 血管内皮下組織に血小板の粘着



③ 凝固系の活性化と血小板凝集による一次血栓の形成

④ フィブリン形成による二次血栓の形成



⑤ 線溶現象によるフィブリン溶解

⑥ 血管壁の修復

図1 小血管における止血の想像模式図

血友病の患者でも③までは健常者と変わらないが、④のフィブリン形成に必要な十分量のトロンビンの産生が行えないために、フィブリン塊が少量で脆弱なものになるために止血が不十分であったり、線溶による再出血が起きやすくなる。FDP/DDはフィブリン・フィブリノゲン分解生成物/Dダイマー。

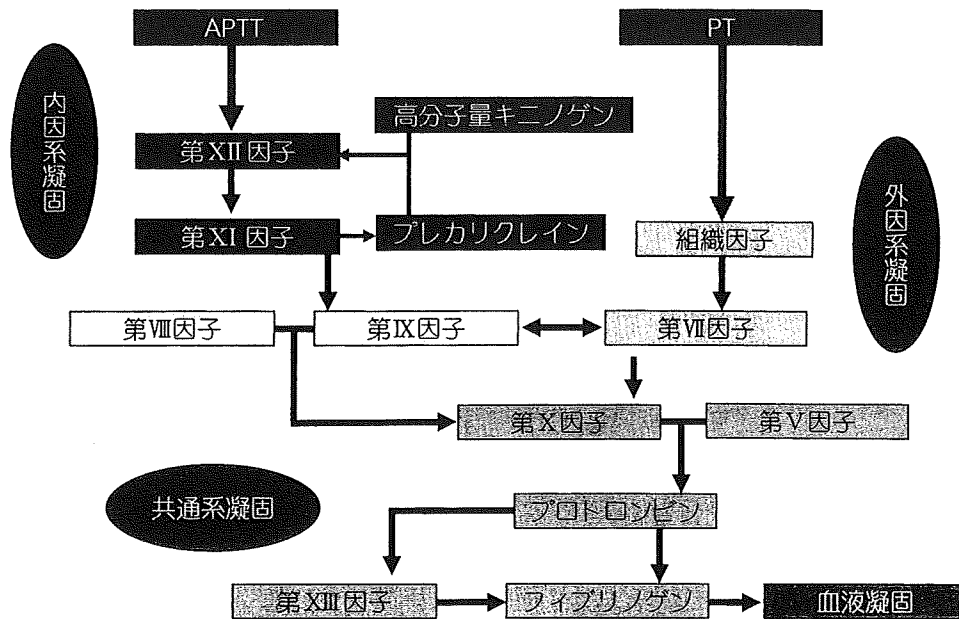


図2 血液凝固検査から見た凝固機構

APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間，PT：プロトロンビン時間

APTTとPTにより交叉補正試験などを行い，血液凝固検査からみた古典的凝固機構が解明された。内因系凝固機構，外因系凝固機構，共通系凝固機構により構成されている。各凝固因子は非活性型の名称で記載した。

下組織との接触により活性化され，局所の止血に重要な貢献をされると考えられたが，先天性第XII因子欠乏症の患者は出血症状を示さないことから，生体内では止血に対して重要な役割は担当していないと考えられるに至った。また第XII因子は，第XI因子の活性化を介して，プレカリクレインや高分子キニノゲンとともに活性化の促進経路を構成しているが，この活性化経路の因子も出血症状とは関係しないとされている。ただし，第XI因子欠乏症には出血症状を示す例と示さない例が報告されており，今後の解明が必要な領域となっている。活性型第XI因子は血友病Bの原因となる第IX因子を活性化する。そして活性型第IX因子は，血友病Aの原因となる第VIII因子を補酵素として共同し第X因子の活性化を起こし，共通系凝固過程に至る。このように，第IX因子と第VIII因子は酵素と補酵素として表裏一体の働きをするために血友病Aと血友病Bの症状が酷似していると考えられている。

内因系凝固過程とは別に，血管外からの組織因子の侵入により活性化され，急速に凝固反応を展開し第X因子を活性化する反応を外因系凝固過程と呼んでいる。この反応系はPTにより検出されるもので，第VII因子と組織因子により構成される。内因系凝固過程あるいは外因系凝固過程に続いて第X因子が活性化され，プロトロンビンからトロンビンを生成し，フィブリノゲンをフィブリンへと限定分解して血漿は凝固する。最後にトロンビンにより活性化された第

I. 基礎

XIII因子がフィブリン分子間に架橋を形成し、安定化フィブリンを形成して凝固を完成させる。これらは共通系凝固過程と呼ばれている。APTTとPTの2つの検査から診断を進める場合、先天性の血液凝固異常症は1つの凝固因子の異常であることがほとんどであり、APTTとPTの組み合わせから図3に示す経路から明らかのように、表2のように診断される¹⁾。

表1 血液凝固因子

蛋白質	分子量 (d)	濃度 (pg/mL)	血漿半減期 (日)	遺伝子 (位置)	エクソン (数)	mRNA (kb)	
第XIII因子	8,000	40	2~3	5q33-qter	12	14	2.4
プレカリクレイン	85/88,000	42	—	4q34-35	30	15	2.4
高分子キニノゲン	120,000	80	—	3q26-qter	27	11	3.5
第XI因子	160,000	30	2.5~3.3	4q35	23	15	2.1
組織因子(TF)	44,000	—	—	1p21-22	12.4	6	2.3
第VII因子	50,000	0.5	0.25	13q34-qter	12.8	9	2.5
第X因子	59,000	10	1.5	13q34-qter	27	8	1.5
第IX因子	55,000	5	1	Xq26.3-q27.1	33	8	2.8
第V因子	330,000	6.6	0.5	1q21-q25	80	25	6.8
第VIII因子	280,000	0.2	0.3~0.5	Xq28	186	26	9
VWFモノマー	255,000	10	—	12p-12pter	178	52	8.8
プロトロンビン	72,000	100	2.5	11p11-q12	21	14	2
フィブリノゲン	340,000	2,500	3~5	4q23-q32	50	24	5.7
第XIII因子Aサブユニット	320,000	30	9~10	6p24-p25	160	15	3.8
因子Bサブユニット				1q31-q32.1	28	12	2.3

mRNA：メッセンジャーリボ核酸，VWF：フォンヴィレブランド因子

(Wintrobe's Clinical Hematology, 2003より引用改変)

表2 出血傾向患者のPT, APTTと異常の内容

PT	APTT	異常の内容
延長	正常	外因性凝固因子
正常	延長	内因性凝固因子
延長	延長	共通性凝固因子(または複合異常)
正常	正常	第XIII因子, 線溶亢進

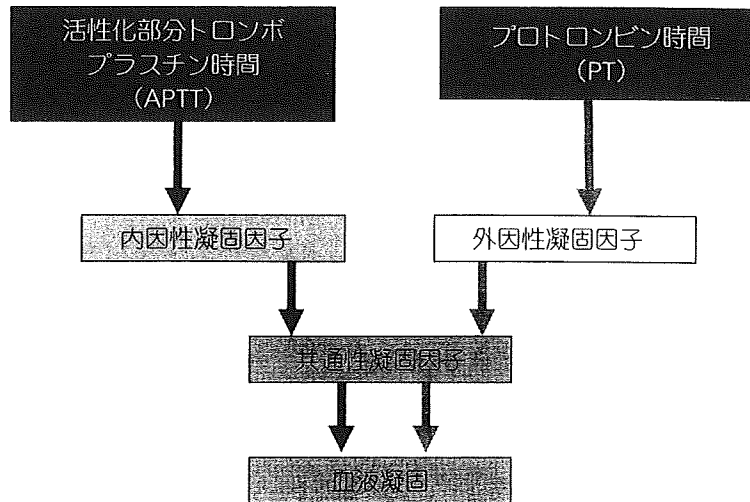


図3 血液凝固検査と凝固機構の関係

先天性凝固異常症を疑う場合は、単一の凝固因子の異常と考えられるので APTT と PT の測定値の組み合わせから異常因子の範囲を判定する。後天性異常では複数の凝固因子に異常が発生し、APTT と PT の両方に異常がみられることがある。

3. 生体内における血液凝固

先にも述べたように、血液凝固検査から推定されてきた凝固機構には、第Ⅻ因子の欠乏は出血症状をもたらさないこと、活性型第Ⅶ因子がインヒビター(抗凝固因子抗体)を有する血友病患者に止血効果を示すことなど説明の難しい問題があり、生体内での凝固反応には別の形態の反応系が働いていると考えられた。すなわち、生体内での血液凝固の始まりは、血漿中に微量に存在する活性型第Ⅶ因子が局所で組織因子とカルシウムイオンと結合して、第Ⅹ因子や第Ⅸ因子を活性化することにより起こる。そして、産生された活性型第Ⅸ因子は第Ⅷ因子やカルシウムイオンとともに第Ⅹ因子を活性化し、その活性型第Ⅹ因子は第Ⅴ因子とカルシウムイオンとともにプロトロンビンをトロンビンに活性化する。このトロンビンにより第Ⅶ因子、第Ⅷ因子や第Ⅴ因子がさらに活性化されて、凝固反応自身が反応促進回路として機能し、激しい凝固反応が展開されると考えられるようになった。第Ⅹ因子とプロトロンビンの活性化反応は、常にリン脂質膜の上で結合蛋白とカルシウムイオンの介在により行われる。この際に血小板や傷害された血管内皮細胞の膜がリン脂質表面として重要な役割を果たす。

近年、生体内での凝固反応は次のように整理されている²⁾。まず、2系統の凝固反応系として、プライマリー経路とアクセサリ経路があり、前者は微量の活性型第Ⅶ因子と組織因子の結合により始まる外因性第Ⅹ因子活性化複合体(第Ⅶ因子、組織因子、リン脂質膜、カルシウムイ