

# 全血凝固過程中的ヒト第Ⅷ因子/von Willebrand 因子複合体の動態

奈良県立医科大学小児科学教室

藤原利治

## CHANGES OF HUMAN FACTOR VIII/VON WILLEBRAND FACTOR COMPLEX DURING WHOLE BLOOD CLOTTING

TOSHIHARU FUJIWARA

*Department of Pediatrics, Nara Medical University*

Received September 28, 1992

*Summary:* Changes of factor VIII (F VIII), von Willebrand Factor (vWF) and F VIII/vWF complex during whole blood clotting were investigated.

1. Although F VIII activity in normal sera was low ( $13.9 \pm 12.0$  u/dl), F VIII antigen (F VIII : Ag) was nearly normal ( $73.7 \pm 32.7$  u/dl). Levels of vWF antigen (vWF : Ag) in the plasmas or sera assayed by immunoradiometric assay (IRMA) were  $103.7 \pm 35.0$  u/dl and  $51.7 \pm 26.2$  u/dl, respectively. Each value of F VIII/vWF complex in the plasmas or sera was  $101.7 \pm 29.1$  u/dl or  $24.1 \pm 18.1$  u/dl.

2. When platelet-rich plasma from normal individual was clotted with an equal volume of  $1/40$  M  $\text{CaCl}_2$ , F VIII showed a moderate decrease. Incubation of normal plasma with various concentrations of phospholipid (PL) resulted in a dose-dependent loss of F VIII : Ag.

3. In normal subjects, F VIII : C increased 2-folds within 10 min after clot formation, then gradually decreased remaining the level around 10-20 u/dl. F VIII : Ag also increased once, then decreased keeping the level around 50-60 u/dl. vWF : Ag assayed by IRMA increased once, then gradually decreased and stayed around 60-70 u/dl. F VIII/vWF complex decreased rapidly after initiation of clotting, then it stayed at constant level of 10 u/dl at 20 min.

4. Time-course of F VIII proteolysis during whole blood clotting was monitored by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Interval between 30 and 60 min after coagulation, levels of the aminoterminal "acidic" region of F VIII light chain and of the middle "acidic" region of F VIII heavy chain decreased to the same level of F VIII : C. However, the 72 kDa-fragment of F VIII light chain decreased more slowly.

These results indicate that F VIII is immediately dissociated from F VIII/vWF complex after initiation of whole blood clotting, and the F VIII undergoes rapid proteolytic modification in serum.

### Index Terms

Factor VIII activity (F VIII : C), Factor VIII antigen (F VIII : Ag), von Willebrand Factor (vWF), F VIII/vWF complex, whole blood coagulation

---

## 緒言

ヒト血漿凝固第VIII因子は、性染色体長腕末端部(Xq 28 → ter)上の第VIII因子遺伝子の支配下に、主として肝細胞粗面小胞体で合成される分子量 270~310×10<sup>3</sup> kDa の糖蛋白である<sup>1)2)</sup>。本因子は血漿中に約 100 ng/ml と極微量にしか存在しないが、Ca<sup>2+</sup>存在下に活性化第IX因子およびリン脂質と複合体を形成して第X因子活性化反応における Vmax を約 20 万倍増強しうる補助因子として重要で、その先天性合成障害症は血友病 A として知られている。

本因子の純化・精製は、その血漿含有量が微量なことから各種プロテアーゼによる分解を受けやすいこと、および血漿中では von Willebrand 因子と非共有結合していることなどから、極めて困難であった。一方、1984 年、第VIII因子遺伝子は全長 186 kb で 26 個のエクソンと介在する 25 個のイントロンから成り立っていることが解明された<sup>3)</sup>。コード領域の塩基配列より推定される第VIII因子蛋白は、19 残基のシグナルペプチドを含む 2,351 個のアミノ酸から構成される 1 本鎖ポリペプチドで、小胞体内腔でシグナルペプチドを失って 2,332 個の凝固活性を有する成熟第VIII因子になる。本因子はアミノ酸組成のホモロジーに基づき N 末端より A1-A2-B-A3-C1-C2 の各ドメインから構成されていることが明らかとなった<sup>5)6)7)</sup>。

第VIII因子は、循環血漿中では種々のプロテアーゼによる蛋白分解をうけて、N 末端由来の 92~210 kDa の Heavy chain(H 鎖)と C 末端由来の 80 kDa の Light chain(L 鎖)とが 2 価メタルによって結合された heterodimer として存在している。これはトロンビンおよび活性化第X因子によってまず Arg<sup>740</sup>が開裂して B ドメインを遊離し、続いて H 鎖 Arg<sup>372</sup>と L 鎖 Arg<sup>1689</sup>が切断されて、H 鎖は 54 kDa+44 kDa に、L 鎖は 72 kDa に転換することによって活性化(F VIII a)されることが知られるようになった<sup>8)9)</sup>。さらに、活性化第X因子により 54 kDa は 45 kDa に、72 kDa は 67 kDa に分解されることによって第VIII因子活性は急速に消失する<sup>10)</sup>。また、活性化プロテイン C(APC)も H 鎖 Arg<sup>330</sup>を開裂して第VIII因子の不活性化をもたらす<sup>11)</sup>。また、B ドメインは多数のアスパラギンのグリコシルーション部位を含む特異なポリペプチドであるが、活性発現上不要と考えられている<sup>11)12)13)</sup>。

第VIII因子(F VIII)は循環血液の中では von Willebrand 因子(vWF)と複合体(F VIII/vWF)を形成し安定化しているが、一旦凝固反応がおこると第VIII因子は血小板リン脂質上で凝固過程に形成される微量トロンビンによる限

定分解をうけ、また、プラスミンをはじめとする血中の蛋白分解酵素などの影響をうけつつ、漸次失活していくと推定される。しかし、その実態は未だ明らかでない。今回、著者は全血凝固過程中の F VIII と vWF の動態を凝血学的ならびに免疫学的に検討し、さらに、F VIII の構造の変化について、抗第VIII因子モノクローナル抗体を用いた H 鎖または L 鎖フラグメント特異的 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)で検索した。

## 材料および方法

1. 材料: Platelin は Organon Teknika Corporation, NC より購入した。本剤は Bell-Alton 法<sup>14)</sup>にてウサギ脳より抽出したリン脂質である。Phospholipase-C は Sigma Chemical Company, MO より購入。Bacillus cereus からの Type V で、400~600 単位/mg 蛋白の力価であった。ε-amino-n-capric acid(以下 EACA)は東京化成工業、p-aminophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride(以下 p-APMSF)は和光純薬製を使用した。peroxidase 標識抗マウス F(ab')<sub>2</sub>抗体(ヤギ由来)は、TAGO(Burlingame, CA)製を使用した。

2. 抗ヒト第VIII因子同種抗体: 当科で管理中の重症血友病 A 患者(M. T.)に発生した高力価同種抗体(インヒビター)の力価は約 3,000 Bethesda<sup>15)</sup>単位/ml で、患者血漿 5 ml から Steinbuch & Audran らの方法<sup>16)</sup>に準じてカプリック酸を用いて IgG 分画を採取した。純化第VIII因子を固相化した Sepharose カラムに上記 IgG 分画を添加して免疫純化を行ない、第VIII因子特異的 IgG 分画を得た<sup>17)</sup>。

3. 抗第VIII因子モノクローナル抗体: 加熱処理第VIII因子濃縮製剤を出発材料として得られた純化ヒト第VIII因子(約 2,700 単位/mg)<sup>18)</sup>を免疫原として、Köller & Milstein<sup>19)</sup>の方法に準じて中井<sup>20)</sup>が作製したものを使用した。今回の ELISA 測定に用いたのは C. Fulcher 博士(Scripps Clinic & Research Foundation, CA)より供与された C5(H 鎖 54 kDa を認識)、自家製の NMC-VIII/10(L 鎖 80 kDa を認識するも 72 kDa とは反応しない)および NMC-VIII/5(L 鎖 72 kDa を認識)であった。

4. 血漿: 遠沈操作の異なる 2 種の血漿を得た。

①乏血小板血漿: 3.8%クエン酸ソーダ 1 容を含むプラスチック遠心管に経静脈的に採血した全血 9 容を加え、混和後 3,000 r. p. m. 10 分間 4℃にて遠心し、乏血小板血漿を分離した。②多血小板血漿: 上記と同様に採血後、800 r. p. m. 15 分間 4℃にて遠心し、上清を分離した。

5. 血清および全血凝固過程中の血液上清: 5 人の健康成人男性ボランティア(予めインフォームドコンセ

ントを口頭にて得た)の肘静脈よりディスポーザブルのプラスチック注射筒に採血した全血を、予め200単位/mlのアプロチニン®(バイエル薬品)を添加したガラス小試験管( $\phi$  10 mm)に移し、37°Cで2時間放置した後4°Cにて3,000 r. p. m. 10分間遠心して上清を分離した。測定まで-80°Cにて凍結保存した。なお、全血凝固過程中的F VIII/vWFを検討する目的の場合は、全血2mlずつ11本の小試験管に分注し、37°Cで加温しつつ経時的(前, 30秒, 1, 3, 5, 10, 20, 30分, 1時間, 2時間, 24時間後)に反応停止液(最終濃度は各々, 12.5 mMクエン酸Na, 10 mM EACA, 5 mM *p*-APMSF)を20  $\mu$ l添加し、直ちに4°Cにて3,000 r. p. m. 10分間遠心してその上清を分離し、測定まで一旦-80°Cにて凍結保存した。

6. 血小板融解物: 全血50 mlより調整した多血小板血漿を遠心して得た血小板ペレットをバルビタール緩衝液(pH 8.6)にて3回洗浄後血小板数を $5 \sim 10 \times 10^9$ 個/mlに調節し、3回凍結融解をくり返して調製した。

7. 第VIII因子凝固活性(F VIII:C)測定: 重症血友病A患者血漿を基質とした活性化部分トロンボプラスチン時間に基づくHardisty一段法によった<sup>21)</sup>。

8. 第VIII因子抗原(F VIII:Ag)測定: Peakeら<sup>22)</sup>の方法を改良した嶋・吉岡のtwo-site solid-phase immunoradiometric assay(IRMA)によった<sup>23)</sup>。1)ポリスチレンチューブ(シオノギ)に非標識抗ヒト第VIII因子同種抗体IgG分画を0.05 M重炭酸緩衝液(pH 9.6)で1,000倍に希釈して0.5 ml/tubeずつ添加し、4°Cで一晩静置してコーティングした。2)0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)加0.05 Mバルビタール緩衝液(pH 7.9), 次いで蒸留水で洗浄後、4% BSA加バルビタール緩衝液で倍数希釈した正常ブルー血漿または、被検血漿または、血清を0.2 mlずつ添加し、37°Cで18時間反応させた。3)バルビタール緩衝液で洗浄後、<sup>125</sup>I-標識抗ヒト第VIII因子特異的同種抗体(F VIII固相化カラムを用いた免疫純化IgG分画)を約3,000 cpm/tube添加反応させた(37°C, 27時間さらに4°C, 24時間)。洗浄後 $\gamma$ -カウンターで放射活性を測定し、この値を1 tube当たりの総放射活性で除して%結合放射活性を求め、片対数グラフ上にプロットした。測定はduplicateで行ない平均値をとった。

9. von Willebrand因子抗原(vWF:Ag)測定: 下記の2方法を行なった。

1) Laurell法: 自家製抗ヒトvWF家兎血清を用いてFukui et al<sup>24)</sup>の方法に準じた。

2) IRMA: 自家製抗ヒトvWF家兎血清IgG分画を一次および二次抗体に用いたサンドイッチIRMAによっ

た。本法はPeake & Bloom<sup>25)</sup>によって開発されたものを一部改良したものである<sup>26)</sup>。その測定手技は、F VIII:AgのIRMA測定法に準じて行なった。

10. F VIII/vWF複合体測定: 一次抗体に抗ヒト第VIII因子同種抗体、標識二次抗体には抗vWF家兎血清IgGを用いたIRMAによった。測定の実際はF VIII:AgのIRMA測定法に準じて行なった。なお、これとは逆の一次抗体に抗vWF家兎血清IgG、標識二次抗体に抗第VIII因子同種抗体を用いたIRMAでは測定系を確立し得なかった。

11. 抗第VIII因子モノクローナル抗体を用いたELISA: 一次抗体に抗ヒト第VIII因子同種抗体、二次抗体には抗第VIII因子モノクローナル抗体、ついでperoxidase標識抗マウスIgG抗体を用いたShima et al<sup>9)</sup>の方法によった。その概略は下記の如くで、96穴マイクロタイタープレート(Nunc, デンマーク)の各ウェルに、免疫純化した抗第VIII因子同種抗体IgG分画を0.05 M重炭酸緩衝液(pH 9.6)にて希釈し(1 Bethesda単位/ml)コーティングした。4% BSAにてブロッキング後、各サンプルを添加し、4°Cで一昼夜反応させた。洗浄後、二次抗体として各モノクローナル抗体IgG分画(C5, NMC-VIII/10およびNMC-VIII/5各5  $\mu$ g/ml)を添加反応させた。洗浄後ペルオキシターゼ標識抗マウスF(ab')<sub>2</sub>(1:1000)を添加、37°Cにて60分間反応させた。再び洗浄し、*o*-phenylenediamin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加、発色させてO. D. 492 nmにて吸光度を測定し、F VIII:Ag値を測定した。

## 成 績

1. 正常血漿および血清中のF VIII, vWFおよびF VIII/vWF複合体

正常人25名より得た血漿および血清中のF VIII:Cはそれぞれ $94.0 \pm 33.3$  u/dl,  $13.9 \pm 12.0$  u/dlであった。血漿および血清中のF VIII:Agは $101.3 \pm 29.0$  u/dl,  $73.7 \pm 32.7$  u/dlであった。血清F VIII:CおよびF VIII:Agはそれぞれ0.1%および1%の危険率で血漿より有意に低下していた。また、血漿および血清中のLaurell法によるvWF:Agはそれぞれ $105.6 \pm 20.9$  u/dl,  $95.5 \pm 18.9$  u/dlで有意差はなかった。一方、IRMAによる血漿および血清vWF:Agはそれぞれ $103.7 \pm 35.0$  u/dl,  $51.7 \pm 26.2$  u/dlで血清vWF:Agは0.5%の危険率で有意に低下した。血漿および血清中のF VIII/vWF複合体量はそれぞれ $101.7 \pm 29.1$  u/dlおよび $24.1 \pm 18.1$  u/dl( $p < 0.01$ )であった。血清化によってF VIII/vWF複合体は著減した(Table 1)。

2. 乏血小板血漿および多血小板血漿のCa<sup>2+</sup>再加後

の F VIII : Ag

正常人 25 名より採取した新鮮乏血小板血漿および多血小板血漿に同量の 1/40 M 塩化カルシウム加バルビタール緩衝液 (pH 8.6) を添加し, 37°C 2 時間反応後のそれぞれの F VIII : Ag を測定した. 乏血小板血漿+バルビタール添加系と乏血小板+塩化カルシウム添加系ではそれぞれ 50.2±13.9 u/dl, 47.7±16.4 u/dl と差異はなかったが, 多血小板血漿+バルビタール添加系と多血小板血漿+塩化カルシウム添加系ではそれぞれ 48.7±12.8 u/dl, 33.7±12.4 u/dl と, 多血小板血漿に Ca<sup>2+</sup>再加した場合 F VIII : Ag は有意に低下 (p<0.01) した (Table 2).

3. 血漿 F VIII : Ag に対するリン脂質の影響

上記の成績から全血凝固により F VIII : Ag および F VIII/vWF 複合体が低下し, その減少に血小板の関与することが示唆されたので正常血漿中の F VIII : Ag に対する血小板融解物およびウサギ脳由来のリン脂質の影響を検討した.

1) 血漿 F VIII : Ag に対する血小板融解物の影響: 正常血漿 9 容に対し, 種々の濃度の血小板融解物 (原液, 2~1,000 倍希釈) 1 容を添加し, 37°C 2 時間反応後の F VIII : Ag を測定した (Fig. 1). 血漿中の F VIII : Ag は添加血小板融解物の濃度依存性に低下した.

2) 血漿 F VIII : Ag に対するリン脂質の影響: 正常血漿

漿 9 容に対し Platelín を Ca<sup>2+</sup>フリーのバルビタール緩衝液 (pH 8.6) 中に懸濁, 希釈し, その 1 容を加えて 37°C 2 時間反応後の F VIII : Ag を測定した. 血漿 F VIII : Ag は Platelín 終濃度 0.72 mg/ml ~ 0.72 × 10<sup>-3</sup> mg/ml の範囲内で濃度依存性に低下した. この低下傾向は血小板融解物より著明であった (Fig. 2).

4. 血漿および血清中の F VIII : Ag に対する phospholipase-C (PL-C) の影響

血漿に添加したリン脂質が血漿 F VIII : Ag を低下させたことより, その F VIII : Ag-リン脂質反応に対する PL-C の影響を検討した. 正常血漿 9 容に各種濃度の血小板融解物 1 容または Platelín 5 mg/ml 1 容を添加, 37°C 2 時間反応後, 終濃度 5 u/ml の PL-C を 0.001 M 塩化カルシウム存在下に再び 37°C 2 時間反応させた. 原血漿中の F VIII : Ag を 100% とした時, 血小板融解物添加により F VIII : Ag は一旦平均 48.0% に低下し, この系に PL-C を添加すると 115.3% に上昇回復した. 血小板融解物の代わりに Platelín を用いた場合も, 25.1% に低下

Table 1. Levels of FVIII : Ag, vWF : Ag and FVIII/vWF complex in the plasmas and sera for 25 normal subjects

	Plasma	Serum
FVIII : C (u/dl)	94.0±33.3	13.9±12.0***
FVIII : Ag (u/dl)	101.3±29.0	73.7±32.7*
vWF : Ag (u/dl)		
assayed by Laurell	105.6±20.9	95.5±18.9
assayed by IRMA	103.7±35.0	51.7±26.2**
FVIII/vWF complex (u/dl)	101.7±29.1	24.1±18.1***

\* p<0.01  
\*\* p<0.005  
\*\*\* p<0.001

Table 2. Levels of FVIII : Ag in the supernatant of platelet-poor plasma (PPP) or platelet-rich plasma (PRP) clotted with an equal volume of 1/40 M CaCl<sub>2</sub> (n=25)

	Measurable FVIII : Ag (u/dl)
PPP+Buffer	50.2±13.9
PPP+CaCl <sub>2</sub>	47.7±16.4
PRP+Buffer	48.7±12.8
PRP+CaCl <sub>2</sub>	33.7±12.4

Buffer : Barbitol buffer pH 8.6

\* p<0.01

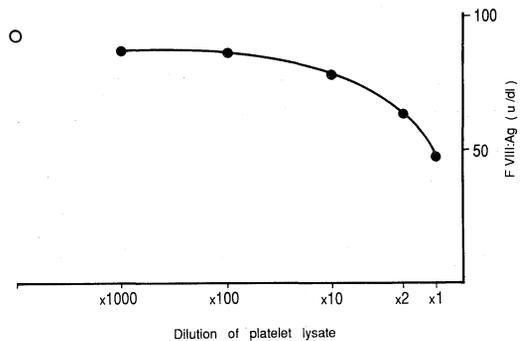


Fig. 1. Dose-dependent interaction between FVIII : Ag and phospholipid (Platelet lysate). o : negative control (Barbitol buffer pH 8.6)

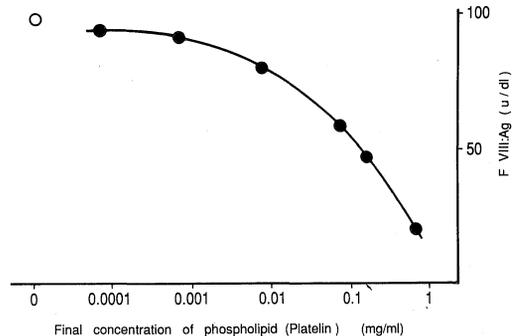


Fig. 2. Dose-dependent interaction between FVIII : Ag and phospholipid (Platelín®). o : negative control (Barbitol buffer pH 8.6)

し、これにPL-Cを添加すると80.3%に上昇した(Table 3)。血漿にPL-Cを直接作用せしめた場合FVIII:Agは約20%上昇した。また、正常人25名の血漿および血清へのPL-Cの直接作用ではFVIII:Agの上昇率はそれぞれ13.9%(101.3±29.0→115.4±25.8 u/dl), 28.2%(73.7±32.7→94.5±25.0 u/dl)で、血清での上昇率の方が高かった。

#### 5. 全血凝固過程中のFVIII, vWF およびFVIII/vWF複合体の経時的変化

正常人5名より採血し、全血凝固過程中的の経時的なF

VIII:C, FVIII:Ag, vWF:Ag およびFVIII/vWF複合体の変動を検索した。成績はすべて平均値で表わした。

1) FVIII:C: 一段法にて測定したFVIII:Cは凝固開始5~20分後に一旦約2倍(200 u/dl)に上昇し、その後漸減し、20分後からは一定となったが、2時間後もなお10~15 u/dlを維持していた(Fig. 3-A)。

2) FVIII:Ag: IRMAにて測定したFVIII:Agは凝固開始30秒~3分後に一旦上昇(150~200 u/dl)した後、徐々に減少し、30分以後は一定(50~60 u/dl)となった。2時間後もなお50~60 u/dlに留まっていた(Fig. 3-B)。

3) vWF:Ag: Laurell法で測定したvWF:Agは凝固過程中でもほとんど変動しなかった。しかし、IRMA法で測定したvWF:Agは凝固開始1~3分後に一旦上昇傾向を示した(150 u/dl)後漸減し、20~30分後に約60 u/dlに達したが、以後24時間後まではほぼ不変であった(Fig. 3-C)。

4) FVIII/vWF複合体: 一次抗体として抗ヒト第VIII因子同種抗体、標識二次抗体として抗ヒトvWF家兎抗体を用いたIRMAで測定した凝固過程中的のFVIII/vWF複合体は開始直後より急激に低下し、20~30分後には約10 u/dlとなり以後不変であった(Fig. 3-D)。

#### 6. 全血凝固過程中的のFVIIIポリペプチドの変化

正常人2名より採血し、凝固過程中的のFVIII:Ag H鎖およびFVIII:Ag L鎖の変動を抗第VIII因子モノクローナル抗体を用いたELISA法にて検索した。データはそれぞれの平均値を用いた。

Table 3. Action of phospholipase-C(PL-C) on FVIII:Ag-phospholipid complex

	Measurable FVIII:Ag (%)
Np+Buffer	100
Np+Platelet lysate <sup>1)</sup>	48.0
(Np+Platelet lysate) <sup>2)</sup> +PL-C <sup>3)</sup>	115.3
Np+PL-C	127.7
-----	
Np+Buffer	100
Np+Platelin <sup>4)</sup>	25.1
(Np+Platelin) <sup>2)</sup> +PL-C	80.3
Np+PL-C	120.6

Np: Normal plasma

Buffer: Barbitol buffer pH 8.6

<sup>1)</sup> Platelet lysate originated from  $5\sim 10 \times 10^9$ /ml platelet suspension.

<sup>2)</sup> Preincubation of normal plasma with phospholipid followed by incubation with PL-C

<sup>3)</sup> PL-C: final concentration of 5 u/ml

<sup>4)</sup> Platelin: final concentration of 0.5 mg/ml

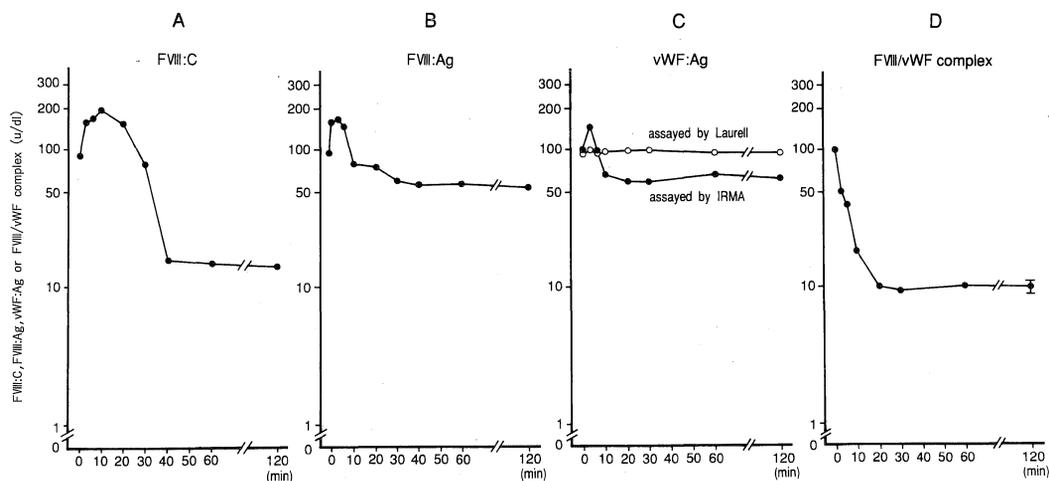


Fig. 3. Time-course of levels of Factor VIII activity (FVIII:C), Factor VIII antigen(FVIII:Ag), von Willebrand Factor antigen (vWF:Ag) and Factor VIII/von Willebrand Factor (FVIII/vWF) complex in 5 normal subjects during whole blood clotting. At the indicated time-points, the supernatant was separated and used for determination of each activity, as described in Materials and Methods.

1) F VIII:C: 凝固開始 10 分後に F VIII:C は一旦 200 u/dl に上昇し、その後漸減した。30 分後には 65 u/dl、45 分後には 7.5 u/dl に低下したが、2 時間後にもなお 6.5 u/dl を維持していた。この動態は前述の 5. における F VIII:C の変化とほぼ同様であった。

2) F VIII:Ag: C5 を用いた ELISA にて測定した F VIII:Ag 値(C5-Ag; H 鎖 54 kDa ポリペプチド)は、凝固開始 3 分後に一過性に 180 u/dl まで上昇した後漸減し、1 時間後には 1 u/dl 以下と検出不能となった。NMC-VIII/10 を用いた ELISA にて測定した F VIII:Ag 値(NMC/10-Ag; L 鎖 80 kDa ポリペプチド)は、凝固開始 3 分後に一過性に 185 u/dl まで上昇し、以後漸減した。30 分後には 5 u/dl 以下となった。NMC-VIII/5 を用

いた ELISA にて測定した F VIII:Ag 値(NMC/5-Ag; L 鎖 72 kDa ポリペプチド)は凝固開始 3 分後に一過性に 200 u/dl まで上昇した後、軽度減少傾向を示したが、2 時間後に 75 u/dl、12 時間後にもなお 70 u/dl を維持していた(Fig. 4)。

## 考 案

第 VIII 因子はその活性が正常血漿中には存在するが血清中には認められないことから凝固過程に消費されるものと考えられてきた。教室の高瀬<sup>27)</sup>(1978)は正常人の凝固過程の第 VIII 因子活性(VIII:C)、第 VIII 因子関連抗原(VIII R:AG)および von Willebrand 因子活性(VIII R:vWF)の消長を追求し、凝固時点前後で VIII:C は一過性に上昇

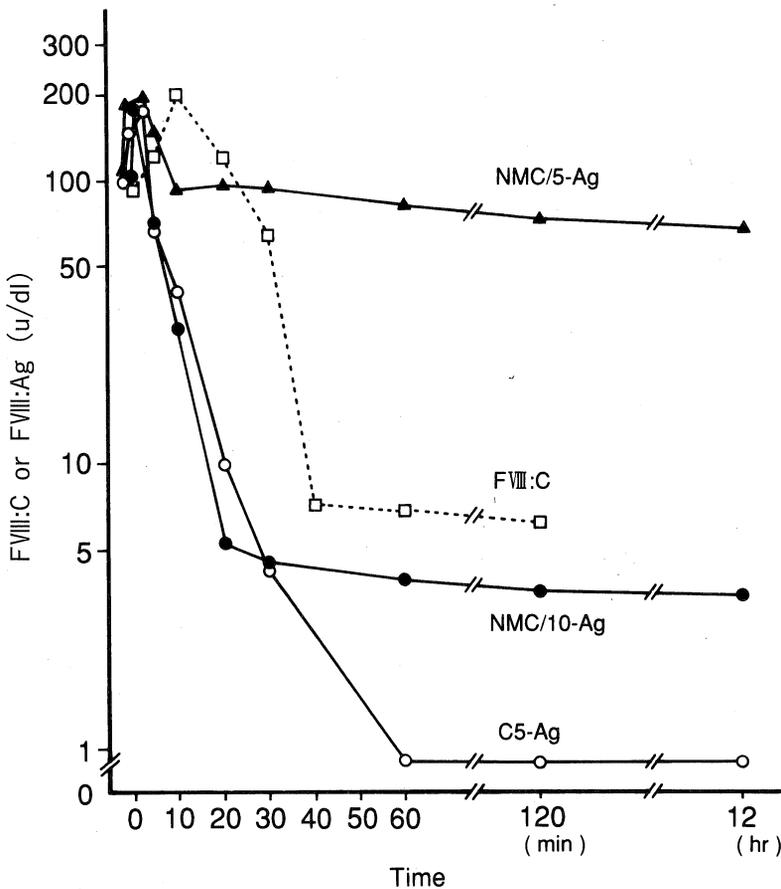


Fig. 4. Time course of FVIII:C and FVIII:Ag in normal subjects during whole blood clotting. At the indicated time-points, the supernatant was separated and used for determination of FVIII:C and FVIII:Ag, as described in Materials and Methods. FVIII:C was assayed by a one-stage method( $\square$ ), FVIII:Ag was assayed by ELISA, using C5( $\circ$ ), NMC-VIII/10( $\bullet$ ), or NMC-VIII/5( $\blacktriangle$ )

するが2時間後には消失すること、VIII R:AG およびVIII R:vWF は経時的に軽度低下するのみであることを観察した。VIII R:AG はヒト第VIII因子分画を家兎に免疫して得られた異種抗体に反応する抗原性で、第VIII因子分画に共存しているが第VIII因子(F VIII)とは異なる von Willebrand 因子(vWF)の抗原性であることがその後明らかになった<sup>28)</sup>。

Peake<sup>22)</sup>ら(1979)は抗ヒト第VIII因子同種抗体を用いたIRMAによりF VIIIの抗原(F VIII:Ag)は血清中にも検出されることを報告した。Yoshioka<sup>29)</sup>ら(1983)はこの現象にリン脂質が深く関与していることを報告した。1980年代になり、F VIIIの純化が進歩するとともにF VIIIに対するモノクローナル抗体の作成や第VIII因子遺伝子の単離などによりF VIIIの構造と機能が分子レベルで解析されるようになった<sup>1)-6)</sup>。

緒言で述べた純化系でのF VIIIの構造と機能に関する知見をもとに著者は全血凝固過程中的F VIIIおよびvWFの動態について、高瀬<sup>27)</sup>の成績をふまえてIRMAあるいはELISAなどの免疫学的測定法を加えて再検討した。組織液の混入を避けてガラス試験管内に採取した血液はガラス面と接触しつつ、第XII、第XI、高分子キヌゲン、プレカリクレインなどの接触因子の活性化にひきつづき血小板リン脂質上で、第VIII因子は活性化第IX因子(F IX a)、第X因子と反応し、活性化第X因子(F Xa)は第V因子とともにプロトロンビンをトロンビンに転化しつつ凝固が進行し血清化する。この過程でF VIIIの動態はF IX a、F Xa、トロンビン、プラスミノゲン-プラスミン系その他血漿中の未知のプロテアーゼの影響をうけることが考えられる。著者は血漿と血清中のF VIIIおよびvWFの動態を検討するにあたり、全血に少量の抗プラスミン剤を添加して得た血清を使用した。

25名の正常人よりの血清サンプル中のF VIII:Cは血漿サンプルの測定値に比し低下し、約15%であったが、F VIII:Agは血漿値の70~75%と残存していた。高瀬<sup>27)</sup>の成績では血清中のF VIII:Cは1%以下と著しく低下して、著者の値と異なるが、抗プラスミン剤添加の有無によるものと考えられる。血漿と血清中のvWF:AgはLaurell法では高瀬の報告と同様に差異を認めなかったが、IRMA法では血清値は血漿値の約1/2に低下していた。血漿中のvWF:Agは分子量 $0.5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ の種々の重合体のマルチマーを形成して存在しているが、血清中では低分子化していることが知られている<sup>30)31)</sup>。重合度の少ない低分子化したvWF:Agの場合、抗原基の数は少なくなり、IRMA法では低値を示すことになる。一方、Laurell法は抗原抗体沈降反応を電気泳動法で

観察するもので、出現したロケット高は抗原量に比例するものと仮定して測定しているが、分子量および分子の荷電性が関与する。このようなことからLaurell法値とIRMA値の差異が生じたものと推察される。一次抗体として抗ヒト第VIII因子同種抗体を用い、二次標識抗体に抗ヒトvWF家兎抗体を用いたIRMAで測定した血清中のF VIII/vWF複合体は血漿値の約1/4と著減していた。凝固過程でF VIIIとvWFは解離して低下することによると考えられた。

血小板は血液凝固促進に関与する重要な因子である。前述の如く、血清中のF VIII:Cは著しく低下しているが、F VIII:Agは約70%残存していた。著者は凝固過程中的F VIIIの変化に血小板が関与しているかを検討する目的で、多血小板血漿および乏血小板血漿に $Ca^{2+}$ を再加して血清中のF VIII:Ag量を測定した。多血小板血漿より得た血清中のF VIII:Ag量は乏血小板血漿よりの血清値より有意に低下していた。血漿に血小板浮遊液( $5 \sim 10 \times 10^9$ 個/ml)より作成した血小板融解物を9:1の割合で添加し、2時間加温後のF VIII:Ag量を測定したところ、濃度依存性に低下した。血小板リン脂質製剤のPlatelinを添加しても同様の成績を得た。この系にリン脂質を特異的に分解するホスホリパーゼC(PL-C)を添加したところ、低下していたF VIII:Ag値は前値の80%まで回復した。これらの成績よりF VIIIと血小板中に存在するリン脂質はF VIII-リン脂質複合体を形成し、steric hindranceによりF VIII:Agが低下するものと推定された。

以上の正常人血漿ならびに採取2時間後の血清中のF VIII:C、F VIII:Ag、vWF:Ag、F VIII/vWF複合体量の比較成績をふまえて、5例の正常人について全血凝固過程中的F VIIIおよびvWFの動態を経時的に検討した。F VIII:Cは凝固開始10分後200 u/dlと2倍に上昇し以後漸減し、40分後15 u/dl、1時間後14 u/dlと低下したが、2時間後も前述した血清値と同様の値を維持していた。抗ヒト第VIII因子同種抗体を用いてサンドイッチIRMAで測定したF VIII:Agは凝固開始後一旦上昇したが10分以後漸減し、2時間後もなお50 u/dl以上を維持していた。vWF:AgはLaurell法で測定した場合はほとんど低下を認めなかったが、IRMAでは凝固開始3分で一旦上昇した後漸減し、30分後60 u/dlと中等度低下し以後プラトーであった。F VIII/vWF複合体は凝固開始後急激に低下し30分で約10 u/dlとプラトーに達した。全血凝固過程で、F VIII:Cが初期に一過性に上昇することについては、純化第VIII因子に微量のトロンビンを作用せしめた場合にF VIII:Cが一過性に上昇し、以後低下することが既に知られていることから、凝固過程に生じた

トロンビンによるものと思われる。血中で複合体を形成している F VIII/vWF が直後より急速に低下することは、F VIII と vWF が互いに解離することを示すが、F VIII の vWF 結合部位は F VIII 分子内 L 鎖上 N 末端部で、vWF 側では vWF-subunit のアミノ酸残基 1-172 の部位とされている。トロンビンは F VIII L 鎖の N 末端を切断することが知られているので、F VIII/vWF の解離はこの部位から進行するものと推察される。凝固開始早期における F VIII:Ag と vWF:Ag の一過性の上昇は F VIII および vWF の複合体解離によるそれぞれの蛋白の conformation の変化により、用いた抗体との親和性が一時的に増強することによるものと推定された。

著者は凝固過程中的 F VIII 分子の変化を知る目的で一次抗体に抗第 VIII 因子高力価同種抗体(ポリクローナル抗体)を用いて血中の第 VIII 因子を捕捉し、二次抗体に F VIII フラグメントに対する認識部分の明らかな 3 種類のモノクローナル抗体(MoAb)を用いた ELISA で全血凝固過程中的 F VIII:Ag 量の推移を検討した。F VIII の H 鎖中の 54 kDa フラグメントの C 末端部(Thr<sup>351</sup>-Asp<sup>362</sup>)を認識する C5 MoAb を用いた ELISA 系で F VIII:Ag 測定値は凝固開始直後より 3 分まで一過性に上昇したが、以後急速に低下し 60 分後には 1 u/dl 以下となった。F VIII の L 鎖 80 kDa フラグメントの N 末端部(Glu<sup>1675</sup>-Glu<sup>1684</sup>)を認識する NMC-VIII/10 MoAb を用いた ELISA 系では F VIII:Ag 値は凝固開始 30 分までは C 5 値とほぼ同じ態度を示し 5 u/dl まで急速に低下したが、その後、12 時間までは不変であった。F VIII の L 鎖 72 kDa フラグメントの C 末端部(Ser<sup>2173</sup>-Tyr<sup>2332</sup>)を認識する NMC-VIII 5 MoAb を用いた ELISA 系では F VIII:Ag 値は凝固開始より 3 分まで一過性に上昇したが 10 分で 100 u/dl 前後になり以後 12 時間まで 75 u/dl を維持した。C 5 の認識領域は F VIII H 鎖中の Thr<sup>351</sup>-Ser<sup>365</sup>であることが明らかにされている。この領域は凝固過程に生ずるトロンビンによる Arg<sup>372</sup>-Ser<sup>373</sup>の開裂で F VIII が活性化される部位、あるいは活性化プロテイン C(APC)、活性化第 X 因子(FXa)およびトロンビンによる Arg<sup>336</sup>-Met<sup>337</sup>の開裂で不活性化される部位に近く<sup>9)10)</sup>、これらの部位における F VIII H 鎖開裂の結果 C 5 で認識されるフラグメントの第 VIII 因子抗原(C5-Ag)は急速に低下するものと考えられた。NMC-VIII/10 の認識領域は F VIII L 鎖中の Glu<sup>1675</sup>-Glu<sup>1684</sup>で<sup>9)10)</sup>、トロンビンおよび FXa で切断(Arg<sup>1689</sup>-Ser<sup>1690</sup>)を受け、開離する L 鎖 N 末の acidic region と呼ばれる領域内である。従って凝固過程中的 NMC-VIII/10 で認識されるフラグメントの第 VIII 因子抗原(NMC/10-Ag)は C 5 の場合と同様急速に低下する

ものと思われた。NMC-VIII/5 の認識領域は Shima et al<sup>32)</sup>によって F VIII L 鎖 C 2 ドメインの Asp<sup>2170</sup>-Glu<sup>2327</sup>であることが明らかにされたが、C 2 ドメインはリン脂質との結合部位であることが知られている<sup>33)34)</sup>。NMC-VIII/5 で認識される NMC/5-Ag 値は凝固開始早期に一過性に上昇のあとの低下傾向は軽度で、12 時間後まで 70 u/dl 前後を維持していた。前述の如く、抗第 VIII 因子同種抗体による IRMA で測定した凝固過程中的 F VIII:Ag は凝固 2 時間後 50 u/dl 以上であったが、この所見と NMC/5-Ag の動態は近似していた。また、F VIII と血小板に存在するリン脂質との反応により F VIII:Ag 量が 20% 前後低下する成績を得ているが、これらの所見は F VIII L 鎖 C 2 ドメインにおける血小板リン脂質との結合によるものと推察される。また、同時に C 2 ドメインは血小板リン脂質と結合することにより、トロンビン、FXa などによる開裂をうけ難く、F VIII の著しい変化より保護されていることも想定された。

## 結 語

正常ヒト全血凝固過程中的 F VIII, vWF および F VIII/vWF 複合体の動態について検討した。

1. 正常人 25 例の血漿中の F VIII:C は  $94.0 \pm 33.3$  u/dl, F VIII:Ag 量  $101.3 \pm 29.0$  u/dl, vWF:Ag 量  $103.7 \pm 35.0$  u/dl, F VIII/vWF 複合体は、 $101.7 \pm 29.1$  u/dl であった。一方、抗プラスミン剤を添加して得た採血 2 時間後の血清ではそれぞれ  $13.9 \pm 12.0$  u/dl,  $73.7 \pm 32.7$  u/dl,  $51.7 \pm 26.2$  u/dl および  $24.1 \pm 18.1$  u/dl と低下していた。

2. 乏血小板血漿に等量の  $Ca^{2+}$  を再加、2 時間後の血清中の F VIII:Ag 量は  $47.7 \pm 16.4$  u/dl であったが、多血小板血漿の場合は  $33.7 \pm 12.4$  u/dl で有意に低下した。乏血小板血漿に血小板融解物またはリン脂質製剤の Platelin を添加した場合の F VIII:Ag 量はこれらリン脂質の濃度に依存して低下した。これらの系に phospholipase-C を加えると低下していた F VIII:Ag 量は上昇、回復した。F VIII とリン脂質は複合体を形成し、F VIII の抗原性を低下させるものと考えられた。

3. 全血凝固過程中的 F VIII, vWF の経時的変化を検索し下記の成績を得た。

F VIII:C は凝固開始 10 分後に一旦 200 u/dl に上昇し、以後漸減し 40 分後からは 10~15 u/dl に低下した。F VIII:Ag は凝固開始 30 秒~3 分後に一旦上昇 (150~200 u/dl) した後、徐々に減少し 30 分以後は一定 (50~60 u/dl) となった。IRMA で測定した vWF:Ag 量は凝固開始 3 分後に一旦上昇 (150 u/dl) し、以後漸減して 20

分後には約 60 u/dl に達した。FⅧ/vWF 複合体は凝固開始直後より急激に低下し 20 分後には約 10 u/dl となった。凝固開始後 FⅧ/vWF 複合体は早期に解離したが、リン脂質との反応によるものと推察された。

4. 全血凝固過程中的 FⅧポリペプチドフラグメントの変化を三種の抗第Ⅷ因子モノクローナル抗体を用いて検討したところ、H鎖 54 kDa の C 末端の acidic region を認識する C 5 抗体を用いた ELISA 値は凝固開始 1~3 分後に一過性に 150~200 u/dl まで上昇して以後漸減し、1 時間後には 1 u/dl 以下となった。L鎖 N 末端の acidic region を認識する NMC-VIII/10 抗体を用いた ELISA 値は凝固開始 1~3 分後に一過性に 150~200 u/dl まで上昇して以後漸減し、30 分後には 5 u/dl 以下となった。L鎖 C 末端側(C 2 ドメイン)を認識する NMC-VIII/5 抗体を用いた ELISA 値はやはり凝固開始 1~3 分後に一過性に約 200 u/dl まで上昇した後軽度減少傾向を示したが、2 時間後にも 75 u/dl を維持していた。

以上の成績から、全血凝固の開始早期においては、FⅧ/vWF 複合体は FⅧ L 鎖 acidic region からの vWF の解離が始まり free となった FⅧはその抗原性および conformation の変化を生じ一時的ながら用いた各モノクローナル抗体との親和性が増強され、各 FⅧ: Ag 値が一過性に上昇したものと推定された。その後の全血凝固の進行すなわち、FⅧと vWF の解離の進行とトロンビンや FXa の生成の増大に伴ない L 鎖、H 鎖の acidic region はさらに開裂、分解して両 FⅧ: Ag 値が低下した。しかし、L 鎖 C 末端側は、リン脂質との結合によってそのまま保存されているものと考えられた。

本論文は第 46 回近畿血液学地方会および、第 48 回近畿血液学地方会において発表した。

## 文 献

- 1) Andersson, L. O., Forsman, N., Huang, K., Larson, K., Lundin, A., Parlu, B., Sandberg, H., Sewerin, K. and Smart, J. : Isolation and characterization of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 2979-2983, 1986.
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) Gitschier, 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.
- 6) Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburb, 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Eaton, D., Rodriguez, H. and Vehar, G. A. : 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, 1986.

- 11) Eaton, D. L., Wood, W. I., Eaton, D., Hass, P. E., Hollingshead, P., Wion, K., Mather, J., Lawn, R., Vehar, G. A. and Gorman, C. : Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry* **25** : 8343-8347, 1986.
- 12) Nordfang, O. and Ezban, M. : Generation of active coagulation factor VIII from isolated subunits. *J. Biol. Chem.* **263** : 1115-1118, 1988.
- 13) Toole, J. J., Pittman, D. D., Orr, E. C., Murtha, P., Wasley, L. C. and Kaufman, R. J. : A large region (~95 kDa) of human factor VIII is dispensable for *in vitro* procoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 5939-5942, 1986.
- 14) Bell, W. N. and Alton, H. G. : A brain extract as a substitute for platelet suspension in the thromboplastin generation test. *Nature* **174** : 880-881, 1954.
- 15) Kasper, C. K., Aledort, N. 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.
- 16) Steinbuch, M. and Audran, R. : The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **134** : 279-284, 1969.
- 17) 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.
- 18) 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 potent protease inhibitors. *Acta Haematol. Jpn.* **50** : 1239-1245, 1987.
- 19) Köhler, G. and Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256** : 495-497, 1975.
- 20) 中井寛明 : 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. *奈医誌.* **42** : 614-624, 1991.
- 21) 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.
- 22) Peake, I. R., Bloom, A. L., Giddings, J. C. and Ludlam, C. A. : An immunoradiometric assay for procoagulant factor VIII antigen: results in haemophilia, von Willebrand's disease and fetal plasma and serum. *Br. J. Haematol.* **42** : 269-281, 1979.
- 23) 嶋 緑倫, 吉岡 章 : 高力価抗第VIII因子同種抗体を用いた第VIII因子凝固蛋白抗原(VIII: CAg)測定系の確立. *Immunohaematology* **6** : 270-273, 1984.
- 24) Fukui, H., Mikami, S., Okuda, T., Murashima, N., Takase, T. and Yoshioka, A. : Studies of von Willebrand factor: Effects of different kinds of carbohydrate oxidases, SH-inhibitors and some other chemical reagents. *Br. J. Haematol.* **36** : 259-270, 1977.
- 25) Peake, I. R. and Bloom, A. L. : The use of an immunoradiometric assay for factor VIII related antigen in the study of atypical von Willebrand's disease. *Thromb. Res.* **10** : 27-32, 1977.
- 26) 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. *奈医誌.* **37** : 627-679, 1986.
- 27) 高瀬俊夫 : 凝固過程中の第VIII因子に関する研究 : 1. 正常小児, 血友病A及び von Willebrand 病患者血漿及び血清中の第VIII因子凝固活性, 第VIII因子関連抗原並びに von Willebrand 因子活性. *奈医誌.* **29** : 61-68, 1978.
- 28) Marder, V. J., Mannucci, P. M., Firkin, B. G., Hoyer, L. W. and Meyer, D. : Standard nomenclature for factor VIII and von Willebrand factor: A recommendation by the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombos. Haemostas.* **54** : 871-872, 1985.
- 29) Yoshioka, A., Peake, I. R., Furlong, B. L., Furlong, R. A., Giddings, J. C. and Bloom, A.

- L. : The interaction between factor VIII clotting antigen(VIII CAg)and phospholipid. Br. J. Haematol. **55**: 27-36, 1983.
- 30) 高瀬俊夫：凝固過程中的の第VIII因子に関する研究：2. 脳組織トロンボプラスチン，脳組織クロロホルム抽出液，赤血球溶血液及びトロンビン添加による凝固過程中的の第VIII因子凝固活性，第VIII因子関連抗原並びに von Willebrand 因子活性. 奈医誌. **29**: 69-81, 1978.
- 31) 高瀬俊夫：凝固過程中的の第VIII因子に関する研究：3. 脳組織トロンボプラスチン，脳組織クロロホルム抽出液，赤血球溶血液及びトロンビン添加による血液凝固後の血清中第VIII因子関連抗原のポリアクリルアミドゲル二次元交叉免疫電気泳動像. 奈医誌. **30**: 213-218, 1979.
- 32) 嶋 緑倫，吉岡 章，田中一郎，藤原利治，寺田茂 樹，中井寛明，澤本好克，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. 日血会誌 **54**: 281, 1991.
- 33) **Kemball-Cook, G., Edwards, S. J., Sewerin, K., Andersson, L. O. and Barrowcliffe, T. W.** : Factor VIII procoagulant protein interacts with phospholipid vesicles via its 80 kDa light chain. *Thrombos. Haemostas.* **60**: 442-446, 1988.
- 34) **Foster, P. A., Fulcher, C. A., Houghten, R. A. and Zimmerman, T. S.** : Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* **75**: 1999-2004, 1990.