

血漿 von Willebrand 因子の第VIII因子結合能の検討

奈良県立医科大学小児科学教室

西野正人, 三浦修治, 西久保敏也
山本和邦, 吉岡章, 福井弘

INSERM 研究所 (U 143) FRANCE

JEAN PIERRE GIRMA, DOMINIQUE MEYER

EVALUATION OF FACTOR VIII-BINDING ABILITY OF VON WILLEBRAND FACTOR IN PLASMA

MASATO NISHINO, SHUJI MIURA,
TOSHIYA NISHIKUBO, MASAKUNI YAMAMOTO,
AKIRA YOSHIOKA and HIROMU FUKUI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

JEAN PIERRE GIRMA and DOMINIQUE MEYER

INSERM U 143 FRANCE

Received October 19, 1990

Summary : A new analytical method which characterized the ability of plasma vWF to bind to purified F. VIII in a small amount of plasma was established.

In the assay, plasma vWF was immobilized and immunopurified on a polystyrene well, using an anti-vWF monoclonal antibody. Then, purified F. VIII was incubated in the well and the bound F. VIII was measured with a chromogenic assay. The minimum volume of plasma for the assay was 0.5ml with 0.01U/ml of vWF antigen. The F. VIII binding to vWF processed in about 15 min, and the ability of vWF in citrated and heparinized plasma was identical.

These results indicate that the assay was useful for detecting the binding ability of vWF to F. VIII in plasma samples.

Index Terms

plasma vWF, F. VIII-binding, anti-vWF antibody, chromogenic assay

緒 言

von Willebrand 因子 (以下 vWF) は、血管障害時に血管内皮下組織と血小板との粘着反応を仲介するが、その機能の量的質的異常による先天性止血障害症として von Willebrand 病 (以下 vWD) が知られている(1)。

一方、従来より血漿中で vWF は第VIII因子 (以下 F. VIII) のキャリアー蛋白として働くものとも見なされてき

たが、近年 vWF と複合体を形成した F. VIII はプロテアーゼによる分解を受けにくく、安定化されることが明らかにされ(2) vWF による F. VIII の結合、安定化作用が止血機構の新たな一面として注目されるようになった。つまり vWF の F. VIII 結合機能に異常をきたした場合に血漿中で F. VIII が遊離状態となり容易に異化され、その結果として血漿中の F. VIII 凝固活性が低下するという病態が考えられるわけである。しかし、この血漿 vWF の F. VIII 結合

能を簡便に検索する方法は現在までのところ見あたらない。

そこで、我々は、モノクローナル抗体を用いて少量の血漿サンプル中のvWFを固相化し、純化F.VIIIとの結合能を検討する方法を確立し、さらに、この結合に及ぼす影響因子についても検討を加えたので、ここに報告する。

材料および方法

1) 試薬, 機器

発色合成基質を用いた第VIII因子活性測定キット(Kabi-Vitrum, Sweden; Koatest F.VIII), Microtitration Plate (Becton Dickinson Co. Oxnard), Titertek Multiscan MC/340 (EFLAB, oy, Helsinki, Finland), Sepharose 2B, CL4B (Pharmacia Fine Chem. A. B. Sweden) および実験用高純度試薬を用いた。

2) 血漿サンプル

クエン酸加血漿は全血9容に対し1容の3.6%クエン酸ナトリウムを、またヘパリン加血漿はヘパリン終濃度5 U/mlとなるように採血した。正常ブール血漿は各々20名の血漿サンプルを等量混合したものを用い、陰性コントロールは3%ウシ血清アルブミン(BSA) Michaelis 緩衝液および von Willebrand 病 type III患者血漿を

用いた。

3) モノクローナル抗体

抗vWFモノクローナル抗体(MoAb)はすでにvWFサブユニット上の認識部位の判明した2種を用いた。MoAb No. 9はC末端を、No. 418はN末端を認識し、前者はvWFのF.VIII結合に全く影響を与えず、後者はこれを阻害するものである(3, 4)。抗F.VIII MoAbD4H1はF.VIII活性(F.VIII:C)を抑制し、F.VIII分子のL鎖を認識するも、F.VIIIとvWFとの結合を抑制しない(4)。

4) F.VIIIの純化

市販第VIII因子濃縮製剤(1,000 U)を出発材料としてC. Fulcherらの方法に準じF.VIIIを純化した(5)。この純化F.VIIIはF.VIII:Cとして40 U/mlを有し、vWF:Agは0.1 U/ml以下であった。

5) vWFのF.VIII結合能測定

血漿サンプル中のvWFを固相化後、それに純化F.VIIIを加え反応させ、固相化vWFへの結合量を以下の如く測定した(Fig 1)。

a. 抗vWF MoAb No. 9を含む0.05 M Bicarbonate 緩衝液(MoAb, IgG 20μg/ml, pH 9.6)を各々のwellに100μlずつ添加し37℃一昼夜 coating した。ついで3%

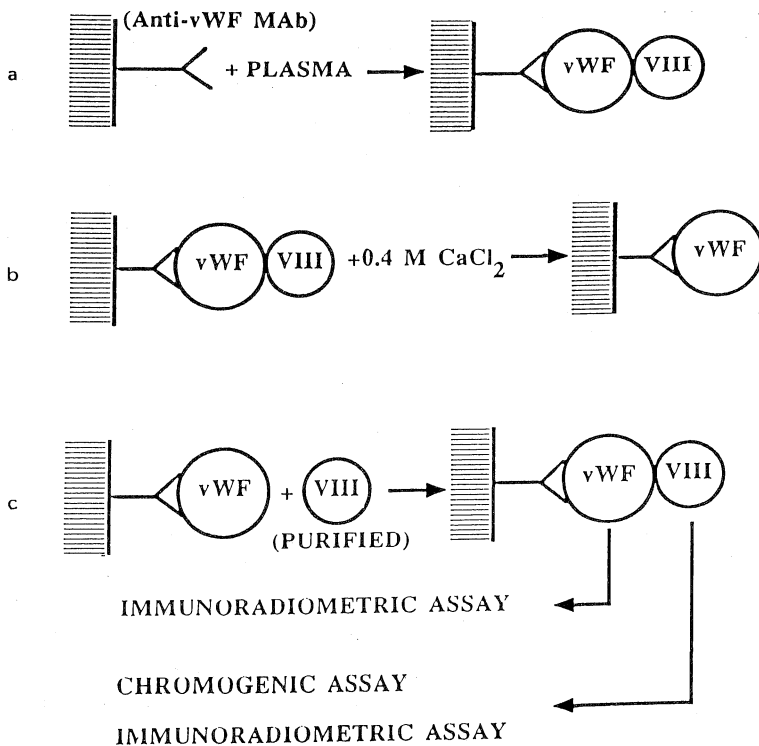


Fig. 1. Scheme of binding of purified Factor VIII to plasma vWF.

BSA を含む Michaelis 緩衝液で 37°C 30 分間ブロッキング操作をおこなった。Michaelis 緩衝液で洗浄後 3% BSA を含む同液で 1/1 より 1/512 までの段階希釈した血漿サンプル 100 μ l を 37°C 一昼夜反応させ、F. VIII/vWF 複合体を well 内に固相化した。

b. 0.4 M CaCl₂ を含む Michaelis 緩衝液 120 μ l を加え血漿サンプル由来で vWF に結合している F. VIII およびその断片を解離せしめ、洗浄、除去した。これにより血漿サンプルより vWF を純化・固相化したことになる。

c. F. VIII : C で 1.0 U/ml の純化 F. VIII を含む Michaelis 緩衝液 (20 mM CaCl₂ 含有) を well に 100 μ l ずつ加え 37°C で 1 時間反応させたのち、Michaelis 緩衝液で数回洗浄し、固相化 vWF に結合した F. VIII 量を以下 Chromogenic Assay (d) および IRMA (e) にて測定した。

d. Chromogenic assay は Kabi Vitrum 社の使用要項に準じ、若干の変更を加えた。各々の well に 75 μ l の F. IXa, F. X, リン脂質、緩衝液の混合液を 37°C 5 分間、ついで 25 μ l CaCl₂ 溶液を加えたのち正確に 5 分間反応後 50 μ l の合成発色基質 (S-2222) を加えて、さらに 5 分間インキュベートを行い発色させた。25 μ l の 50% 酢酸にて反応を停止したのち 405nm における吸光度を測定した。

e. IRMA は ¹²⁵I 標識抗 F. VIII MoAb (D4H1) を含む Michaelis 緩衝液 100 μ l (30000 cpm) を各々の well に加え、37°C で 4 時間インキュベートしたのち、洗浄後、各々の well の radioactivity (cpm) を測定した。

f. ステップ d での chromogenic assay 終了後 ¹²⁵I で標識抗 vWF MoAb (No. 9, No. 418) を用いて、IRMA を行い固相化 vWF 量を測定した。

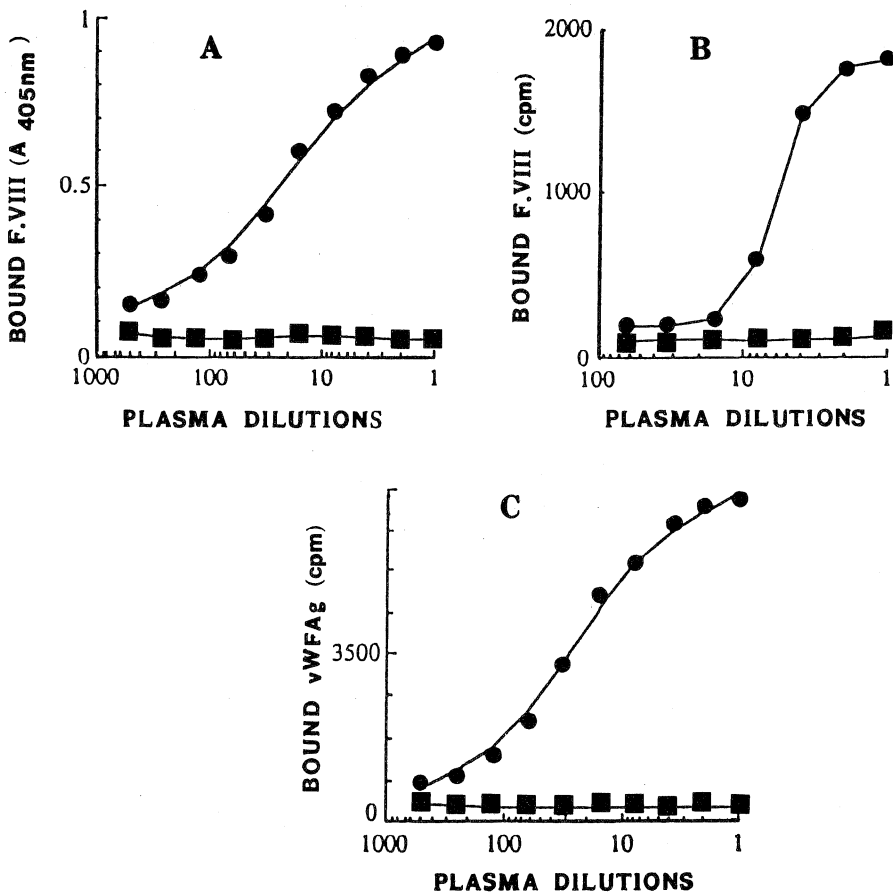


Fig. 2. Dose-response curve of purified Factor VIII to immobilized vWF from serial dilutions of pool plasma (A,B) and plasma vWF to fixed anti-vWF monoclonal antibody (C).
Pool plasma; ● Plasma from type III vWD; ■

結 果

1) 固相化 vWF 量

先ず、固相化 vWF 量を概測する目的で Type III vWD 患者血漿 (vWF: Ag < 0.01U/ml) に ¹²⁵I で標識した純化 vWF を終濃度 6μg/ml (1U/ml) となるように添加した血漿の検討を行った。この血漿の 1/1 - 1/2 希釈で最大 3-4x10⁻³U/Well の vWF が固相化されること、又サンプルの希釈に伴い固相化 vWF が漸減することを確認した。IRMA では Fig. 2-C に示す如く正常血漿の段階希釈に呼応して固相化 vWF 量は漸減しコントロールの Type III vWD 患者血漿サンプルに比し 1/512 希釈まで有意な値を得ることができた。尚、MoAb No 9, 418 ともに同様の固相化量が確認された。

2) F. VIII 結合量

純化 F. VIII 結合量を F. VIII: C と F. VIII 抗原量 (F. VIII: Ag) の両面で測定した (Fig. 2A, B)。F. VIII 結合量は正常ヒト血漿の段階希釈 (1/1 - 1/512) に呼応して、つまり固相化された vWF 量に比例して chromogenic assay では OD 1.0 から 0.15 と、IRMA では 1850cpm から 190cpm と漸減した。vWF 抗原の欠如した Type III vWD 患者血漿では vWF は固相化されず、よって純化 F. VIII 結合量は OD で 0.03 ~ 0.06, IRMA で 80 ~ 110

cpm と有意な値を示さず、これら F. VIII 結合が vWF 特異的であることが確認された。

F. VIII 結合の検出感度は chromogenic assay の場合は正常ヒト血漿の 1/256 倍希釈まで (OD においてコントロール値の 2 倍) IRMA の場合では 1/10 希釈が限度であった。F. VIII 結合量の飽和曲線を見ると、添加 F. VIII 濃度の上昇に伴い結合量は漸増し、F. VIII 1.0U/ml 以上ではほぼプラトーに達した (Fig. 3)。vWD Type III 患者血漿では chromogenic assay, IRMA とも有意な F. VIII 結合が認められなかった。ところで、添加 F. VIII 溶液中の CaCl₂ の濃度は 10-40mM が適当で 20mM が最適であった。

3) F. VIII/vWF 結合比

上記の方法で得られた固相化 vWF 量と結合 F. VIII 量を U/ml に換算を試みた。F. VIII 結合量は同様の chromogenic assay 系を用いた純化 F. VIII 希釈液よりの測定曲線を使用し、又固相化 vWF 量は前述の如く ¹²⁵I 標識の純化 vWF を vWD Type III 患者血漿に添加したものをもちいて計算した。Fig. 4 の如く固相化 vWF に対する F. VIII 最大結合比はほぼ 1 : 1 となった。

4) 評価方法

vWF の F. VIII 結合能を Well 内の固相化 vWF 量に対する F. VIII 結合量で評価した (Fig. 5)。

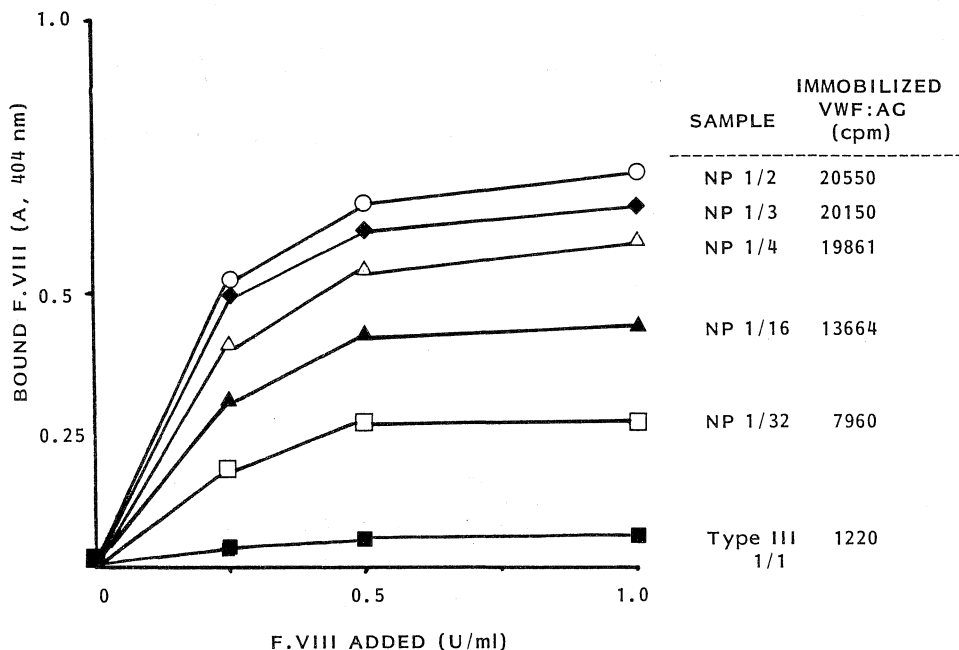


Fig. 3. Saturation curve of purified Factor VIII to immobilized vWF from several dilutions of pool plasma.

X軸に固相化vWF量としてIRMAでのradioactivity (cpm)を、Y軸にはF.VIII結合量としてchromogenic assayでのODをとり、それぞれWellごとの両者のデータをプロットし、そのregression lineの”傾き”を正常ヒト・プール血漿vWFよりの”傾き”と比較することによりサンプル中のvWFのF.VIII結合能を評価した。プール血漿サンプルでは $Y = -0.17 + 11.14 \times 10^{-5}$ でR値は0.99と有意で、その傾きは 11.14×10^{-5} であった。又、10名の血漿サンプルの”傾き”は平均11.19 (8.81

$-11.27) \times 10^{-5}$ であった。一方F.VIII結合能の低下するnew variant vWD症例(6)のregression lineの”傾き”は4回の異なる時期で $1.96 - 2.42 \times 10^{-5}$ と正常・プール血漿サンプルの 10.54×10^{-5} に比して著しく低下を示した。

5) 影響因子の検討

我々の系におけるF.VIIIとvWFの結合に及ぼす影響因子について若干の検討を行った。

a. 反応時間

F.VIII添加後、約15分でvWFへのF.VIII最大結合が、その後やや低下傾向が認められた。この低下は、結合F.VIIIの緩やかな自然失活によるものと考えられた。又、固相化vWF量を 4×10^{-3} U/wellより 5×10^{-4} Uまで変化させても同様の結果が得られた(Fig. 6)。

b. ヘパリン

終濃度5 U/mlのヘパリン加血漿サンプルでもvWFのF.VIII結合能はクエン酸加血漿の場合と同様であった(Fig. 7)。又、純化F.VIIIにヘパリンを混和した場合、純化F.VIII添加前に固相化vWFをヘパリン溶液で処理した場合、さらに純化F.VIIIが固相化vWFと結合後にヘパリンを加えた場合のそれぞれで、最高2.0 mg (50,000 U/ml)のヘパリン濃度でもF.VIII結合能には変化が認められなかった。

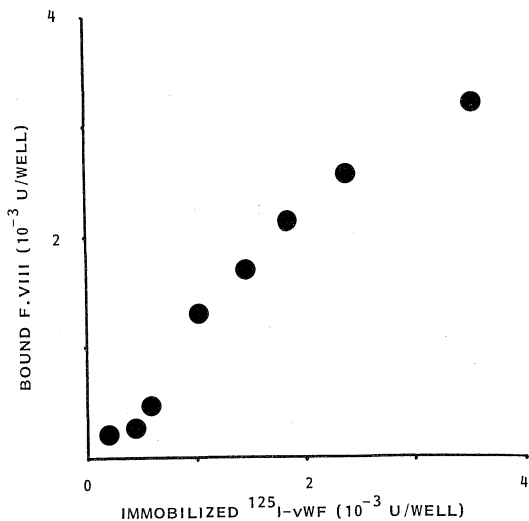


Fig. 4. Binding of purified Factor VIII to immobilized vWF from pool plasma.

考 案

生体において血液凝固系に関与する第VIII因子と血小板一血管内皮系に働く von Willebrand 因子は複合体を形

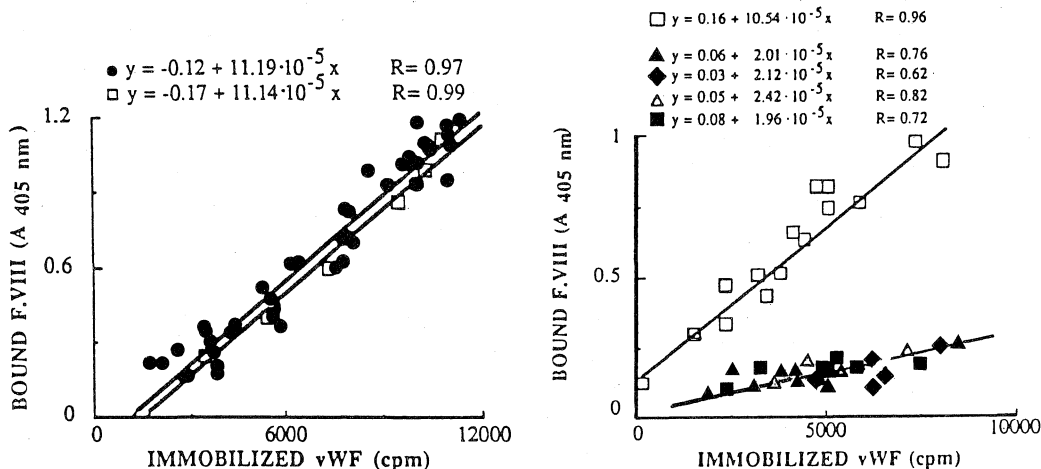


Fig. 5. Binding of purified Factor VIII to vWF from several subjects.

Pool plasma; \square Normal individuals; \bullet
 Plasma from a patient at different times; \blacktriangle \blacklozenge \triangle \blacksquare

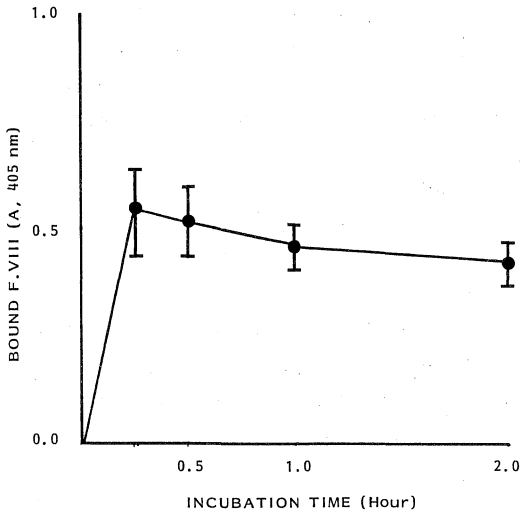


Fig. 6. Binding of purified Factor VIII to vWF from pool plasma at various periods during incubation time.

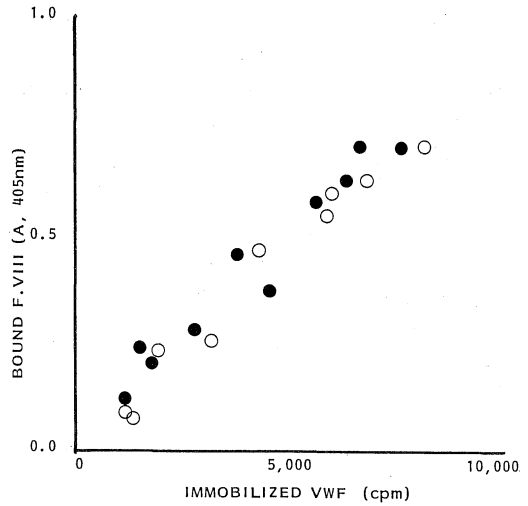


Fig. 7. Binding of purified Factor VIII to vWF from citrated and heparinized normal plasma. Citrated plasma (●) Heparinized plasma (○)

成することによりそれぞれの持つ機能が、より有効に作動すると考えられるが、我々は、第VIII因子が von Willebrand 因子と結合すると安定化されることに注目し、血漿第VIII因子の低下するあの種の出血症の病態でこの von Willebrand 因子の第VIII因子結合能の障害が存在し得ると想定した。そこで、少量の血漿サンプルで測定可能な vWF の第VIII因子結合能の検索法を考案し検討した。この方法は血漿サンプル中の vWF を MoAb を用いて固相化させ、純化 F. VIII との結合量を比較検討するものであるが chromogenic assay を用いた場合、血漿サンプル 0.5 ml で十分な検索が可能であり、血漿中 vWF 濃度が 0.01 U/ml 程度まで低下した血漿サンプルでも有用と考えている。

ところで F. VIII 結合ドメインは vWF サブユニット上 アミノ酸残基 1Ser-272Arg の N 末端のフラグメントに存在するとされているが (4,7)、この部位には第二のヘパリン結合ドメインも存在すると報告されている (8) (ヘパリン結合ドメイン; 449Val-728Lys (9) の他)。そこで、ヘパリンの vWF の F. VIII 結合におよぼす影響を検討したが、ヘパリン加血漿 (5 U/ml) とクエン酸加血漿では vWF の F. VIII 結合能には差がなく、また最高 50,000 U/ml までのヘパリン溶液中でも、vWF の F. VIII 結合能に変化は認められなかった。これらより vWF への F. VIII とヘパリンとの結合は相互に影響しないと推察できた。

F. VIII と vWF の結合比を見ると Koedam (1988) (2), Zucker (1984) ら (10) の検討では、カラム溶出法を用いる

と、vWF 1U は 5-12 U の F. VIII を結合し得ると推測している。一方、Leyte (1989) (11) らは固相化された vWF での検討で vWF 1U につき F. VIII 結合は約 1U であるとしている。我々の Assay 系では、ほぼ F. VIII: vWF=1:1 となり Leyte らの報告と一致する。さらに Koedam ら (1988) は (2) Protein C に対する vWF の F. VIII 安定化作用の限度は vWF 1U につき、F. VIII 1U 程度と見なしており、また、正常ヒトや古典的 vWD 病において一般に血漿中 F. VIII:C は vWF 量に並行して変化することからも、我々は生理的 F. VIII/vWF 結合比を約 1:1 と考えている。ところで、結合に要する時間は、我々の系では 15 分以内でほぼ完了したことより、産生された F. VIII はすみやかに vWF と結合し安定化されるものと考えている。

最後に、我々は、すでに、この方法を用いて、第VIII因子結合能の低下する異常 vWF をもつ新しい type の von Willebrand 病を発見し報告しているが (6) 今後、さらに種々の病態での vWF の F. VIII 結合能の検索を行いたい。

尚、この論文の要旨は第 31 回日本臨床血液学会にて発表した。

文 献

- 1) Ruggeri, Z. M. and Zimmermann, T. S.: Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 70: 895-904, 1987.
- 2) Koedam, J. A., Meijers, J. C. M., Sixma, J. J.

- and **Bouma, B. N.** : Inactivation of human factor VIII by activated protein C; Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* **82**: 1236-1243, 1988.
- 3) **Girma, J. P., Kalafatis, M., Pietu, G., Lavergne, J. M., Chopek, M. W., Edgington, T. S. and Meyer, D.** : Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GPIb and GPIIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibody. *Blood* **67**: 1356-1366, 1986.
- 4) **Takahashi, Y., Kalafatis, M., Girma, J. P., Sewerin, K., Andersson, L. and Meyer, D.** : Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* **70**: 1679-1682, 1987.
- 5) **Fulcher, C. A. and Zimmerman, T. S.** : Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterogenous precipitating antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1648-1652, 1982.
- 6) **Nishino, M., Girma, J. P., Rothchild, C., Fressinaud, E. and Meyer, D.** : New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* **74**: 1591-1599, 1989.
- 7) **Foster, P. A., Fulcher, C. A., Marti, T., Titani, K. and Zimmerman, T. S.** : A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **262**: 8443-8446, 1987.
- 8) **Kalafatis, M., Girma, J. P., Dupin, S., Takahashi, Y. and Meyer, D.** : The N-terminal monomeric 34kDa fragment (residues 1-298) of human von Willebrand factor contains two distinct binding domains, one for F. VIII and one for heparin. *Thromb. Haemost.* **19**: 217 (Abstract), 1989.
- 9) **Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S., Robert, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.** : A heparin binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val 449 to Lys 728. *J. Biol. Chem.* **262**: 1734-1739, 1987.
- 10) **Zucker, M. B., Soberano, M. E., Jhonson, A. J., Fulton, A. J., Kowalski, S. and Adler, M.** : The in vitro association of antihemophilic factor and von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* **49**: 37-41, 1983.
- 11) **Leyte, A., Verbeet, M. P., Brodniewiczproba, T., Van Mourik, J. A. and Mertens, K.** : The interaction between human blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor. *Biochem. J.* **257**: 679-683, 1989.