

正常妊娠経過中の血漿 von Willebrand 因子 と高ずり応力惹起血小板凝集とに関する研究

奈良県立医科大学第2内科学教室

山本 泰弘

STUDIES ON PLASMA VON WILLEBRAND FACTOR AND HIGH SHEAR STRESS-INDUCED PLATELET AGGREGATION DURING NORMAL PREGNANCY

YASUHIRO YAMAMOTO

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received February 15, 1999

Abstract: Plasma von Willebrand factor (vWF) plays a central role in platelet adhesion and platelet thrombi formation under high shear stress. Thereby, the elevated plasma level of vWF during normal pregnancy has a risk of serious thrombo-embolic complications, but such events rarely happen. To address this issue, I have studied the structural and functional aspects of plasma vWF on 74 different samples from normal non-pregnant women and on 217 samples from 157 normal pregnant women, both after taking informed consent. Biological function of vWF was measured by platelet aggregation activities in the presence of an antibiotic ristocetin (RCof) and a snake venom botrocetin (BCof), and by high shear stress-induced platelet aggregation (H-SIPA), together with the measurements of vWF antigen (vWF: Ag) levels and vWF-multimer analysis.

The increase of RCof was superior to that of BCof and vWF: Ag, regardless of ABO phenotypes. At full term, the respective values ($M \pm SD$) were 370 ± 171 % for RCof, 237 ± 89 % for BCof, and 197 ± 39 % for vWF: Ag. In accord with this result, the ratio of high molecular weight (HMW)-vWF multimers increased.

It is generally accepted that HMW-vWF multimers have higher biological activities than other multimers. However, H-SIPA of normal pregnant women was not enhanced and rather weakened when platelet rich plasmas were tested. This paradoxical result was also confirmed using normal washed platelets mixed with fresh plasmas of normal pregnant women. Interestingly, H-SIPA was remarkably enhanced when normal washed platelets were mixed with plasmas of pregnant women which were frozen at -80°C for 7 days and thawed at 37°C . Such 'freezing-thawing' effect on H-SIPA was not seen in plasmas of normal non-pregnant women. Taking these results together, it was suggested that plasmas of normal pregnant women contain the 'frozen-labile' substance(s) which regulates H-SIPA against the quantitatively elevated and qualitatively HMW-multimer dominant status of plasma vWF. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 127~141, 1999)

Key words: von Willebrand factor, pregnancy, high shear stress, platelet aggregation

緒 言

正常妊娠経過中には止血機構全般に大きな変化がみられるが、特に何種類かの血液凝固因子では非活性型のみならず活性型因子も増加する^{1,2)}。多くは血漿中の対応凝固阻止因子の作用で過凝固状態が制御され、生理的循環が保持され正常妊娠を維持できる。しかし、この均衡が破綻すると血栓傾向に傾き、preeclampsia などの重篤な妊娠合併症の原因になると考えられている^{3,4)}。

von Willebrand 因子(vWF)は第12染色体上の遺伝子支配を受け、血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生され、多くは血中に分泌される巨大分子糖蛋白質で、血漿中では凝固第 VIII 因子と結合して安定化作用を担い、障害血管壁での血小板粘着・血栓形成「分子糊」作用を有する止血因子である。構造上、vWF は2,050 アミノ酸残基からなる分子質量約25万の単一サブユニットの重合体として産生されるが、特異的酵素(vWF-プロテアーゼ)で切断され、血漿中では分子質量50万~2,000万の多重体(マルチマー)型を呈し⁵⁾、vWFの生物学的活性は高分子量のものの方が強い。vWF-プロテアーゼは分子質量(約30万)を除いてはほとんど不明であるが、活性発現にBa²⁺やCa²⁺などの金属イオンの介在を必要とするため、メタロプロテアーゼと考えられている⁶⁾。vWFサブユニット上には12のAsn結合型糖鎖と10のSer/Thr結合型糖鎖とがあり、全分子質量の18.7%を占めているが、その中にはABO血液型糖鎖が含まれ、各個人のABO血液型に合致する糖鎖が各々のvWFに発現している。vWFの持つ血液型糖鎖が機能に及ぼす効果は未だ不明であるが、血液型O型のヒトは他の血液型のヒトに比し、血漿vWFの活性・抗原量はともに約25%減少しているため、産生細胞からの分泌調節に影響を与えていると推測されている⁷⁾。

vWF活性・抗原ともに正常妊娠末期には著増し、高分子量マルチマーの比率が増大するという報告は既に散見される^{8,9)}が、これを妊娠経過に沿って経時的に観察した報告は無い。また、vWFが増加しても、vWF依存性の血栓合併症が引き起こされず、多くの症例では正常な妊娠経過が維持される機序についての報告も皆無である。vWFの「分子糊」機能はvWFのA1ドメインと血小板膜糖蛋白質(glycoprotein: GP)Ibとの結合、それに引き続くvWFのC1ドメインと血小板GPIIb/IIIaとの結合反応で発現されるが、前者の初期血小板結合反応をin vitroで再現するためには抗生物質リストセチン、または蛇毒ポトロセチンの介在が必要で、それぞれ ristocetin cofactor(RCof), botrocetin cofactor(BCof)と

して測定可能である。また最近ではvWF/A1-GPIb軸とvWF/C1-GPIIb/IIIa軸との反応をリストセチンやポトロセチンを添加することなしに、包括的に評価できるcone-plate型すり応力惹起血小板凝集計が開発されている¹⁰⁾。

以上のことから、本研究ではまず健康非妊娠女性と正常妊婦との乏血小板血漿(platelet poor plasma: PPP)を用い、vWF抗原(vWF: Ag), RCofおよびBCof量を妊娠経過に沿って測定し、同時にvWFマルチマー構造解析をおこなった。次いで、正常妊娠末期妊婦の多血小板血漿(platelet rich plasma: PRP)を用いて、高すり応力下での血小板凝集(high shear stress-induced platelet aggregation: H-SIPA)能を測定したところ、vWFと高分子量マルチマーとが増加したが、H-SIPAはむしろ低下しているという逆説的な新知見を得た。これらの結果は正常妊娠経過中のvWFの増加による易血栓形成状態を調節する機構が存在することを示すものと考えられた。

対象および方法

1. 試 薬

抗ヒトvWF家兎抗体(IgG)とperoxidase標識ヒトvWF家兎抗体(IgG)とはDAKO A/S社(Denmark)製を、牛血清アルブミン(BSA)、リストセチン、アガロース(Type VII, low gelling temperature: LGT)はSigma Chem.社(St. Louis, MO)製を、アガロース(high gelling temperature: HGT)はSeaKem社(Rockland, ME)製を、スキムミルクはDifco社(Detroit, MI)製、ルミノール化学発光試薬はNEN Life Science社(Boston, MA)製のRenaissanceキットを用いた。ニトロセルロース(NC)膜はBioRad社(Hercules, CA)製。ポトロセチンは*Bothrops jararaca*粗毒(Butantan Institute, Sao Paulo)から精製した¹¹⁾。ABO血液型判定試薬はOrtho Diagnostics Systems Inc. (Raritan, NJ)を用いた。

2. 対 象

正常妊娠経過中の妊婦の一般検査採血時に本研究の主旨のインフォームド・コンセントをおこない、同意を得られた157例(19歳~44歳、平均年齢28.7歳)から約3~7mlのべ217検体を採取した。抗凝固薬には3.8%クエン酸Naを用い、全血9容に1容加え、4℃で3,000rpm, 15分間遠心してPPPを得て、-80℃で凍結し、血漿vWFの生物活性測定に用いた。vWFのマルチマー構造解析のためには別途全血9容とインヒビターカクテルを含む抗凝固薬(3.8%クエン酸Na, 50mM EDTA・2Na, 60mM N-ethylmaleimide, 2μg/ml leupeptin, 20

mM benzamidine-HCl)1 容を混和し、同様に 4°C, 3,000 rpm, 15 分間遠心分離した PPP を用いた. H-SIPA 測定時には、インヒビターカクテルを含まないクエン酸加全血を 800 rpm, 10 分間遠心して調製した PRP を用いた. さらに、この後、PRP を取り除いた残りの血液からも上記のごとく PPP を分離し、-80°C で凍結保存した. 対照症例は健常非妊娠女性 74 例(20~40 歳, 平均年齢 25.2 歳)から採血し、同様に PRP と PPP とを分離した. 血漿 vWF 生物活性測定は健常人男女各 10 名から得られた PPP をプールして調製し(以下、標準ヒトプール血漿とする)、検量線を作成した.

3. vWF の生物活性測定

1) vWF : Ag 量の測定

Bartlett らの方法¹²⁾ に準じ、サンドウィッチ式酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)でおこなった. その方法は、まず抗ヒト vWF 家兎抗体(IgG)を固相化用緩衝液(0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃, pH 9.6)で 2,000 倍に希釈し、96 穴 ELISA 用プレートの各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、4°C で一昼夜静置後、0.05 % Tween 加 PBS(phosphate-buffered saline, 以下 T-PBS)で各ウェルを 3 回洗浄し、3 % BSA 加 PBS 200 μ l を加え、37°C, 30 分間静置して未反応部位をブロッキングした. さらに T-PBS で各ウェルを 3 回洗浄後、3 % BSA 加 PBS で連続希釈した標準ヒトプール血漿、もしくは希釈被検血漿を 100 μ l ずつ添加し、4°C で一昼夜固相化抗体と反応させた. その後、T-PBS で各ウェルを 3 回洗浄し、3 % BSA 加 PBS で 2,000 倍希釈した二次抗体(peroxidase 標識抗ヒト vWF 家兎 IgG 抗体)をそれぞれ 120 μ l 添加し、さらに 37°C で 2 時間反応させた. T-PBS で各ウェルを再度洗浄し、その後、*o*-フェニレンジアミン(OPD, 0.4 mg/ml)と 30 % H₂O₂(0.4 μ l/ml)加 0.1 M クエン酸緩衝液(pH 5.0)とを各ウェルに 120 μ l 添加し、2~4 分間、黄褐色に発色するのを待って、2 M H₂SO₄ を 120 μ l ずつ添加して反応を停止し、吸光度計(MTP-32, CORONA 社, 茨城)で波長 492 nm で測定した. 標準曲線は標準ヒトプール血漿の希釈列の吸光度をグラフにプロットして求め、各検体の vWF : Ag 量はこれから算定した.

2) RCof と BCof の測定

Macfarlane の方法¹³⁾ で正常ヒト PRP からホルマリン固定血小板(formalin fixed platelets : FFP)を調製した. RCof の測定は 1 % BSA 加 PBS で連続希釈した標準ヒトプール血漿と FFP(終濃度 3 x 10⁸/ml)とを混じ、これにリストセチン(終濃度 1 mg/ml)を添加して、血小板凝集能測定装置(PAT-2 A, メバニクス社, 東京)でそ

の凝集曲線を記録し、初期凝集の傾斜(tan θ)を測定して検量線を作成した. 次に、被検血漿も同様に tan θ を測定し、検量線から RCof 値を求めた. BCof の測定も RCof と略同様で、用いたポトロセチンの終濃度は 2 μ g/ml であった.

3) vWF マルチマー構造解析

Ruggeri & Zimmerman の方法¹⁴⁾ を改変した Budde らの方法¹⁵⁾ で、ルミノール化学発光反応を利用するルミノグラフィーでおこなった. SDS 処理した血漿をまず HGT(分離ゲル)と LGT(濃縮ゲル)とからなるアガロース上で Laemmli¹⁶⁾ の非連続緩衝系を用い、電気泳動で vWF の分子サイズに応じて分離後、Western blot でゲルから分離蛋白質を NC 膜に転写し、この NC 膜をプロット液(5 % スキムミルクを PBS で溶解して調製)に浸し、蛋白非転写部分をブロックした後、peroxidase 標識ヒト抗 vWF 抗体を加え、NC 膜上の vWF と 6 時間以上反応させた. 洗浄操作後、NC 膜を密閉したビニール袋内に入れ、H₂O₂ 加ルミノール化学発光試薬を加え、室温で 1 分間反応させた. 過剰の試薬を小孔から排出後、暗室で Kodak XRP-1 フィルムに 30 秒間感光させ、ルミノグラフィーをおこなった. 生じた vWF マルチマーバンドを FAS-II システム(東洋紡社, 大阪)でスキャンし、画像解析ソフト Quantity One(pdi 社, Huntington Station, NY)で定量的に解析した. 解析時、Brenner ら⁹⁾ に従い、陽極側から最初の 3 本の主バンドを低分子量(low molecular weight : LMW)、4~6 本目のバンドを中等量分子量(intermediate molecular weight : IMW)、それより上端の全てのバンドを高分子量(high molecular weight : HMW)マルチマーと定義した.

4. 精製 vWF の部分的還元・アルキル化処理

PBS(pH 7.3)で充分透析した精製 vWF(約 1 mg/ml に調製)に、終濃度 10⁻⁶~10⁰ mM の種々濃度の還元薬(dithiothreitol : DTT)を加え、37°C で 1 時間静置後、2.7 倍(mol/mol)量の iodoacetamide を加え、室温、暗所で 30 分静置してアルキル化した. 部分的に還元・アルキル化した vWF(partially-reduced/alkylated vWF : PR/A-vWF)は、PBS で透析し、使用時まで -80°C で凍結保存した.

5. H-SIPA

正常ヒト PRP に acid-citrate-dextrose(ACD)液を加え、遠心して血小板を沈澱させ、その後 EDTA 加緩衝液(pH 7.3)で 2 回洗浄し、最終的に 1.8 mM Ca²⁺ 加 Tyrode 緩衝液(pH 7.3)に浮遊させ、血小板数を約 1 x 10⁹/ml に調製して洗浄血小板浮遊液(washed Platelets : WP)とした.

H-SIPA の測定は cone-plate 型 3 力応力惹起血小板凝集測定器(東レ社製)を用い、108 dynes/cm² の一定高 3 力下で 6 分間測定した¹⁰⁾。測定系は、(1)PRP 系: 健康非妊娠女性と正常妊娠末期妊婦とから PRP を得、血小板数を 3×10^8 /ml に調製したもの、(2)WP+PPP 系: 前記と同一検体の凍結前 PPP と -80°C で 7 日間凍結保存した後、37°C で解凍した直後の PPP との二種三とおりである。(2)の測定系では PPP 100 μ l と WP とを混じり総量 400 μ l とし、血小板数を 3×10^8 / μ l に調製した。

この研究での測定値は平均値 \pm SD で示し、統計学検定には t 検定を用い、危険率 0.05 未満を有意と判定した。

結 果

1. 非妊娠期の成人女性の vWF

健康非妊娠女性 74 例(のべ 74 検体)での vWF パラメーター値は、vWF: Ag が $93.2 \pm 15.5\%$ 、RCof が $97.8 \pm 20.4\%$ 、BCof が $99.1 \pm 21.9\%$ であった。これらの値を ABO 血液型別でみると、A 型(23 例)は vWF: Ag $98.7 \pm 12.2\%$ 、RCof $105.6 \pm 15.5\%$ 、BCof $107.6 \pm 19.1\%$ 、B 型(19 例)は vWF: Ag $95.1 \pm 13.5\%$ 、RCof $100.8 \pm 19.7\%$ 、BCof $103.6 \pm 21.5\%$ 、O 型(22 例)は vWF: Ag $80.0 \pm 11.9\%$ 、RCof $81.3 \pm 18.3\%$ 、BCof $82.4 \pm 16.9\%$ 、AB 型(10 例)は vWF: Ag $105.9 \pm 14.3\%$ 、RCof $110.3 \pm 15.0\%$ 、BCof $107.8 \pm 20.4\%$ と、いずれの vWF パラメーターも O 型は A 型、B 型および AB 型に比し、それぞれ有意に低値を示した (Table 1)。

2. 正常妊娠経過中の妊婦の vWF

1) vWF: Ag, RCof および BCof

正常妊娠経過中の妊婦 157 例、のべ 217 検体の血漿サンプルで、vWF: Ag, RCof および BCof (Y 軸)をそれぞれの妊娠日数(X 軸)に対してプロットすると、vWF: Ag の回帰直線は $Y = 0.3682 X + 98.215$ で、相関係数 (r_1)は 0.3125、RCof は $Y = 1.1225 X + 53.043$ 、 r_2 は 0.3317、BCof は $Y = 0.5212 X + 93.853$ 、 r_3 は 0.2958 であった。この結果から、妊娠日数が進むにつれて、vWF: Ag, RCof および BCof がすべて増加することは明らかであったが、特に RCof 値の増加速度が他の 2 つの vWF パラメーターに比し、急峻であった (Fig. 1)。

以上の結果を定量化するために、妊娠週齢を first term(11 週 6 日まで、34 例)、second term(12 週 0 日から 23 週 6 日まで、45 例)、third term(24 週 0 日から 35 週 6 日まで、97 例)および full term(36 週 0 日以降、41 例)の四期間に分けた。vWF: Ag, RCof および BCof のそれぞれの値は full term には RCof/vWF: Ag 比は

Table 1. Levels of von Willebrand factor antigen (vWF: Ag), ristocetin cofactor (RCof) and botrocetin cofactor (BCof) of non-pregnant women versus ABO blood group phenotype

| Blood type | Number (n=74) | vWF: Ag (%) | RCof (%) | BCof (%) |
|------------|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| A | 23 | 98.7 \pm 12.2* ¹ | 105.6 \pm 15.5* ⁴ | 107.6 \pm 19.1* ⁷ |
| B | 19 | 95.1 \pm 13.5* ² | 100.8 \pm 19.7* ⁵ | 103.6 \pm 21.5* ⁸ |
| O | 22 | 80.0 \pm 11.9 | 81.3 \pm 18.3 | 82.4 \pm 16.9 |
| AB | 10 | 105.9 \pm 14.3* ³ | 110.3 \pm 15.0* ⁶ | 107.8 \pm 20.4* ⁹ |

Pooled normal plasma was used as a reference plasma.

*1: p<0.0001 (A to O) *2: p<0.01 (B to O) *3: p<0.01 (AB to O)

*4: p<0.0001 (A to O) *5: p<0.001 (B to O) *6: p<0.01 (AB to O)

*7: p<0.0001 (A to O) *8: p<0.01 (B to O) *9: p<0.01 (AB to O)

Table 2. Levels of von Willebrand factor antigen (vWF: Ag), ristocetin cofactor (RCof) and botrocetin cofactor (BCof) during normal pregnancy

| Pregnancy term | Number (n=217) | vWF: Ag (%) | RCof (%) | BCof (%) | Ratio: RCof/vWF: Ag | Ratio: BCof/vWF: Ag |
|---------------------------------|----------------|------------------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| First term (0-11W. 6d.) | 34 | 120.2 \pm 35.9 | 146.2 \pm 42.2 | 133.3 \pm 37.5 | 1.22 | 1.11 |
| Second term (12W. 0d.-23W. 6d.) | 45 | 148.2 \pm 39.2 | 178.4 \pm 56.3 | 153.3 \pm 42.8 | 1.20 | 1.03 |
| Third term (24W. 0d.-35W. 6d.) | 97 | 171.0 \pm 38.5 | 271.8 \pm 114.6 | 197.9 \pm 48.3 | 1.59 | 1.16 |
| Full term (after 36W. 0d.) | 41 | 197.0 \pm 39.4 | 369.9 \pm 170.9 | 236.8 \pm 89.4 | 1.88 | 1.20 |

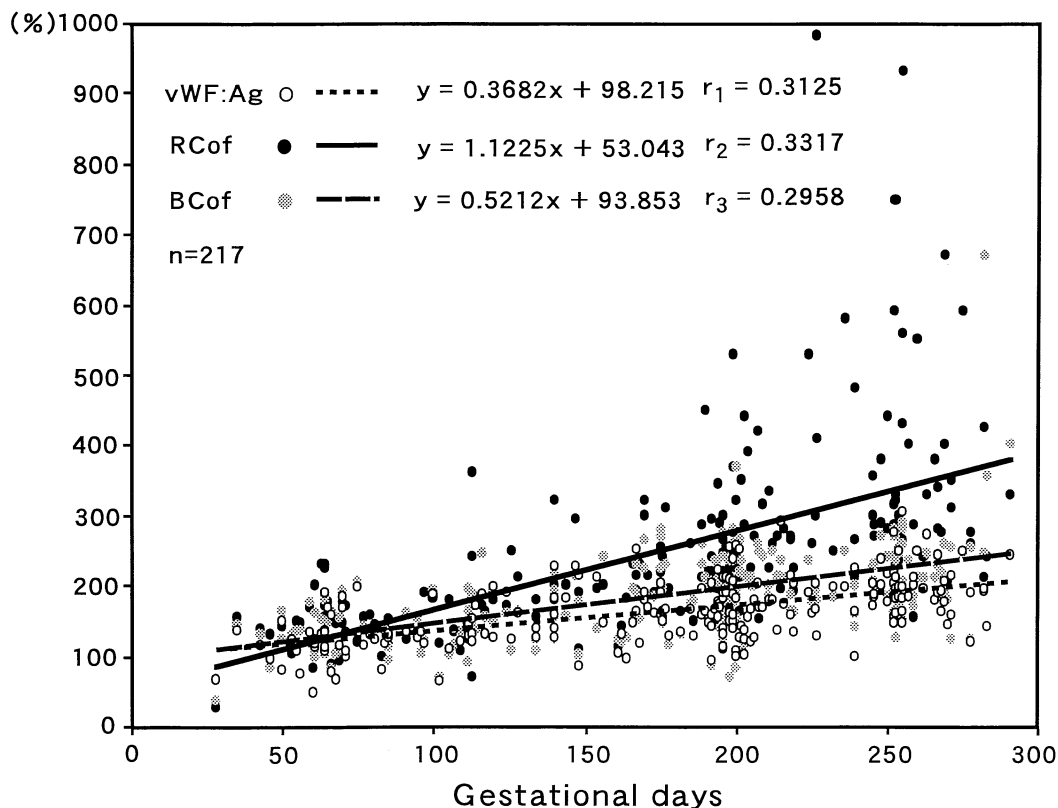


Fig. 1. Increase of plasma levels of von Willebrand factor antigen (vWF: Ag), ristocetin cofactor (RCof) and botrocetin cofactor (BCof) during normal pregnancy. Plasma levels of vWF: Ag (○), RCoF (●) and BCoF (⊗) were measured in 217 samples obtained from 157 normal pregnant women, and were plotted against gestational days. Each regression line was shown in the top of the figure, together with correlation coefficient (r^2).

1.88, BCoF/vWF: Ag 比は 1.20 と RCoF の著増を認めた (Table 2).

次に、妊娠の各期間と ABO 血液型別にこれらの vWF パラメーターを定量化すると、全妊娠期間を通じて O 型の vWF パラメーターが低いのは明らかであるが、full term 期に RCoF/vWF: Ag 比が A 型で 1.96, B 型で 1.86, O 型で 1.45, AB 型で 2.05 と、O 型での比率値が低かった (Table 3).

2) 正常妊娠経過中の妊婦血漿 vWF マルチマー解析まず、非妊娠女性と妊娠 38 週の妊婦とから得られた血

漿 vWF マルチマー像の典型例とそのデンシトメーター解析結果とをみると、非妊娠女性の個々のバンドは番号をつけた主バンドと前後各一本のサテライトバンドからなる triplet 構造と、それぞれの切れ込み像が鮮明であった。しかし、38 週の妊婦では基本的には triplet 構造がみられるが、主バンドはやや鈍角で、それぞれの切れ込みは不鮮明、さらに HMW の比率は高かった (Fig. 2)。

次に、非妊娠女性と妊婦とから得られた血漿サンプル計 62 検体の vWF マルチマーを定量解析した結果を X 軸は妊娠日数、そして Y 軸は LMW, IMW および HMW

Table 3. Levels of von Willebrand factor antigen (vWF: Ag), ristocetin cofactor (RCof) and botrocetin cofactor (BCof) versus ABO blood group phenotype during normal pregnancy

| Pregnancy term | Blood type | Number (n=217) | vWF: Ag (%) | RCof (%) | BCof (%) | Ratio: RCof/vWF: Ag | Ratio: BCof/vWF: Ag |
|---------------------------------|------------|----------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|---------------------|
| First term (0-11W. 6d.) | A | 16 | 129.1±30.6 | 155.1±33.0 | 142.1±34.8 | 1.20 | 1.10 |
| | B | 6 | 135.8±51.3 | 151.0±45.8 | 140.5±46.8 | 1.11 | 1.03 |
| | O | 9 | 92.0±25.6 | 117.3±44.7 | 110.8±37.0 | 1.28 | 1.20 |
| | AB | 3 | 126.0±8.7 | 175.3±48.4 | 139.3±11.0 | 1.39 | 1.11 |
| Second term (12W. 0d.-23W. 6d.) | A | 16 | 143.9±23.7 | 195.5±55.1 | 151.4±41.4 | 1.36 | 1.05 |
| | B | 10 | 169.8±42.7 | 195.9±66.2 | 182.8±40.7 | 1.15 | 1.08 |
| | O | 13 | 118.1±25.0 | 141.2±46.2 | 128.2±32.4 | 1.20 | 1.09 |
| | AB | 6 | 188.5±41.9 | 183.2±26.7 | 164.0±44.3 | 0.97 | 0.87 |
| Third term (24W. 0d.-35W. 6d.) | A | 48 | 178.0±35.7 | 272.0±133.5 | 205.4±49.3 | 1.53 | 1.15 |
| | B | 20 | 169.2±45.8 | 277.1±105.2 | 200.4±47.0 | 1.64 | 1.18 |
| | O | 19 | 160.5±41.3 | 266.9±97.6 | 181.4±50.6 | 1.66 | 1.13 |
| | AB | 10 | 161.3±26.7 | 269.0±67.7 | 188.6±37.2 | 1.67 | 1.17 |
| Full term (after 36W. 0d.) | A | 15 | 202.7±38.6 | 397.0±213.0 | 230.3±62.2 | 1.96 | 1.14 |
| | B | 10 | 204.4±27.3 | 380.5±138.9 | 251.0±23.9 | 1.86 | 1.23 |
| | O | 7 | 174.3±52.9 | 253.4±64.3 | 230.3±78.3 | 1.45 | 1.32 |
| | AB | 9 | 197.0±40.6 | 403.3±164.9 | 236.8±166.1 | 2.05 | 1.20 |

を%で表しプロットして示すと, LMWの回帰直線は $Y = -0.0502X + 40.871$ で, r_1 は0.4044, IMWは, $Y = -0.0284X + 37.395$, r_2 は0.2401, HMWは $Y = 0.0785X + 21.727$, r_3 は0.6380であった. この結果から, 妊娠日数が進むにつれてLMWとIMWとの比率が低下し, HMWの比率が増加し, 三者がほぼ同比率で出現するのは妊娠150日頃であることが明らかとなった(Fig. 3).

3. vWF マルチマー構造とH-SIPA

1) 種々vWFマルチマー構造を持つ純化vWFがSIPAに及ぼす影響

種々の濃度のDTTで還元後, iodoacetoamideでアルキル化して調製したPR/A-vWFがH-SIPAに及ぼす影響をみると, vWFはDTT濃度が 10^{-5} と 10^{-4} mMとの濃度間で極端にそのマルチマー構造が欠損し, さらにH-SIPA惹起能も著明に減弱した. またDTT濃度が $0 \sim 10^{-5}$ mM間でHMWマルチマー構造が減弱するとH-SIPA惹起能も著しく低下した(Fig. 4). このことからHMWマルチマー比率の高い妊婦血漿では非妊婦血漿に比し, より高いH-SIPA能があると想定された.

2) 正常妊娠末期妊婦のPRPを用いたH-SIPA

健常非妊婦女性35例と正常妊娠36週0日以降の妊婦

30例とのPRPを用いたH-SIPAの凝集曲線の典型例各5例を示した. H-SIPAの最大凝集率は前者では $48.7 \pm 13.4\%$, 後者では $33.0 \pm 9.5\%$ と, 妊婦のH-SIPAは非妊婦女性に比し有意に低下していた($p < 0.005$)(Fig. 5).

NMC-4は抗vWFモノクローナル抗体であるNMC-4(IgG)の終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 存在下でのH-SIPA(血小板の非特異凝集)を示す,

3) 正常WPと正常妊娠末期妊婦とのPPPを用いたH-SIPA

健常非妊婦女性30例と正常妊娠36週0日以降の妊婦27例について, 正常ヒトWPに対するH-SIPA補正効果をPPPの凍結前と凍結融解後とで比較し, 凝集曲線の典型例各5例を示した. 凍結前のPPPを用いたH-SIPAの測定値は健常非妊婦女性は $35.3 \pm 10.8\%$, 妊婦は $29.6 \pm 8.8\%$ と, 妊婦に低下傾向がみられた(Fig. 6).

凍結融解後のPPPを用いたH-SIPAの測定値は健常非妊婦女性は $37.3 \pm 11.5\%$ と, 凍結前とほとんど差異はなかった. しかし, 妊婦では $62.8 \pm 20.2\%$ と, 凍結前値の $29.6 \pm 8.8\%$ に比し著増し, 有意に健常非妊婦女性の値を上回っていた($p < 0.005$)(Fig. 7).

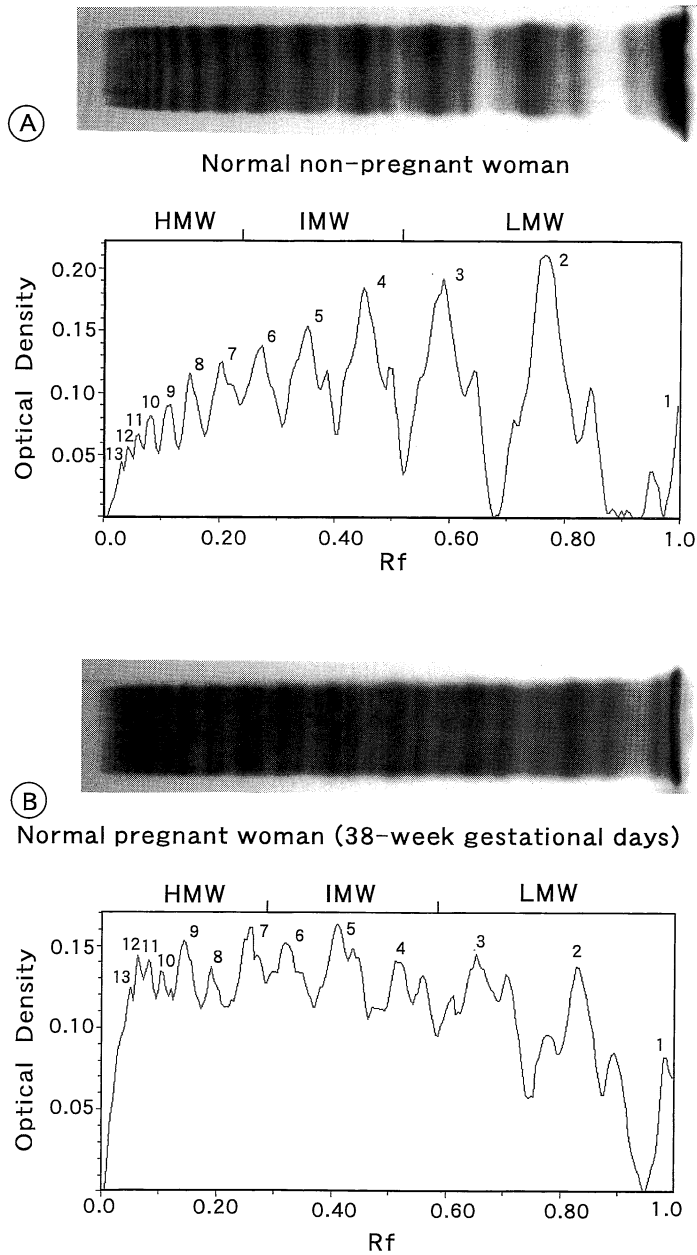


Fig. 2. Plasma vWF multimers and their densitometric analyses.

Panel A and B respectively showed one of the typical instances of plasma vWF multimers obtained from non-pregnant women and pregnant women. The numbering was initiated from the anodal to the cathodal end on electrophoretic separation. In both instances, vWF multimer bands were clearly detectable up to 13th, of which the first 1-7 bands showed a clear triplet structure, but the following 8-13 bands lacked such structure. As described in Materials and Methods, the bands 1-3, 4-6 and 7-13 were categorized as low, intermediate and high molecular weight multimers (LMW, IMW and HMW), respectively. It was noteworthy that the ratio of HMW-vWF multimers was obviously high in normal pregnant woman (38-week gestational days).

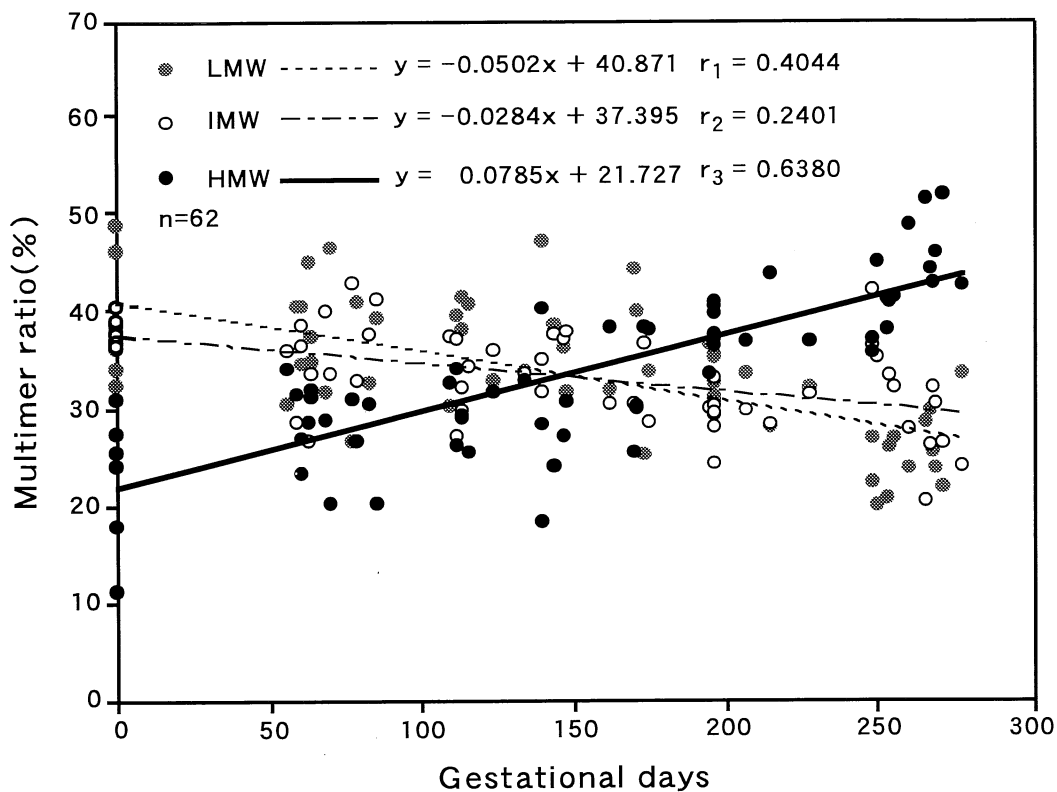


Fig. 3. Ratios of low, intermediate and high molecular weight (LMW-, IMW- and HMW-) multimers during normal pregnancy. Ratios (%) of LMW (●)-, IMW(○)- and HMW (●)- multimers that were calculated in 62 plasma samples obtained from normal non-pregnant (n=7) and pregnant (n=55) women were presented. The percentages were plotted against gestational days, and each regression line with correlation coefficient (r^2) was also shown in the figure.

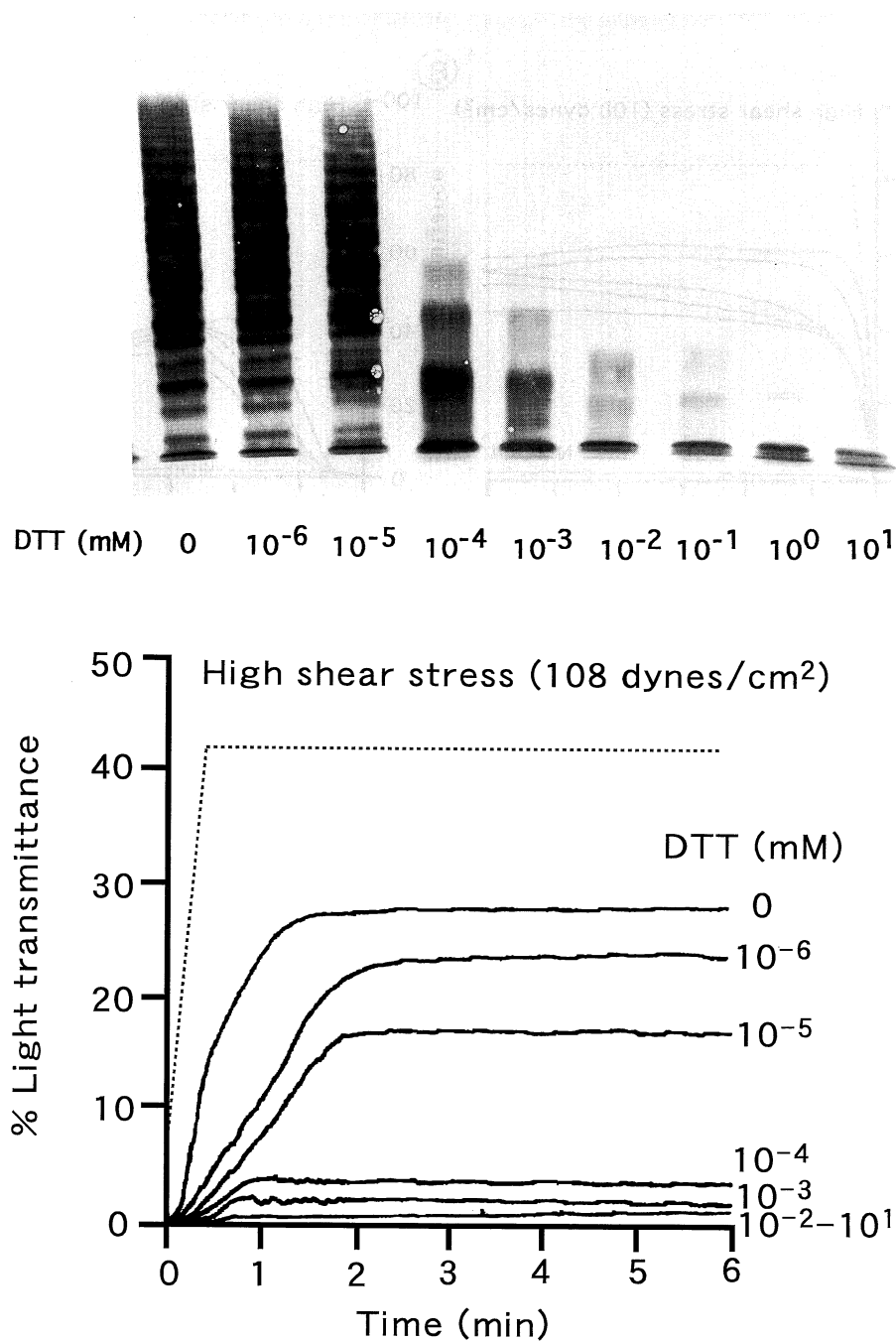


Fig. 4. Effect of vWF multimer sizes on high shear stress-induced platelet aggregation (H-SIPA).

The purified vWF was partially reduced and alkylated (PR/A) as described in Materials and Methods, and then the effects of these PR/A-vWFs on H-SIPA were determined using normal washed platelets (see "Materials and Methods" for detail). The PR/A-vWF prepared in the presence of 10¹~10⁻⁴ mM dithiothreitol (DTT) totally lacked H-SIPA, and those with 0~10⁻⁵ mM DTT reduced the activity on H-SIPA in accord with disappearance of HMW-multimers.

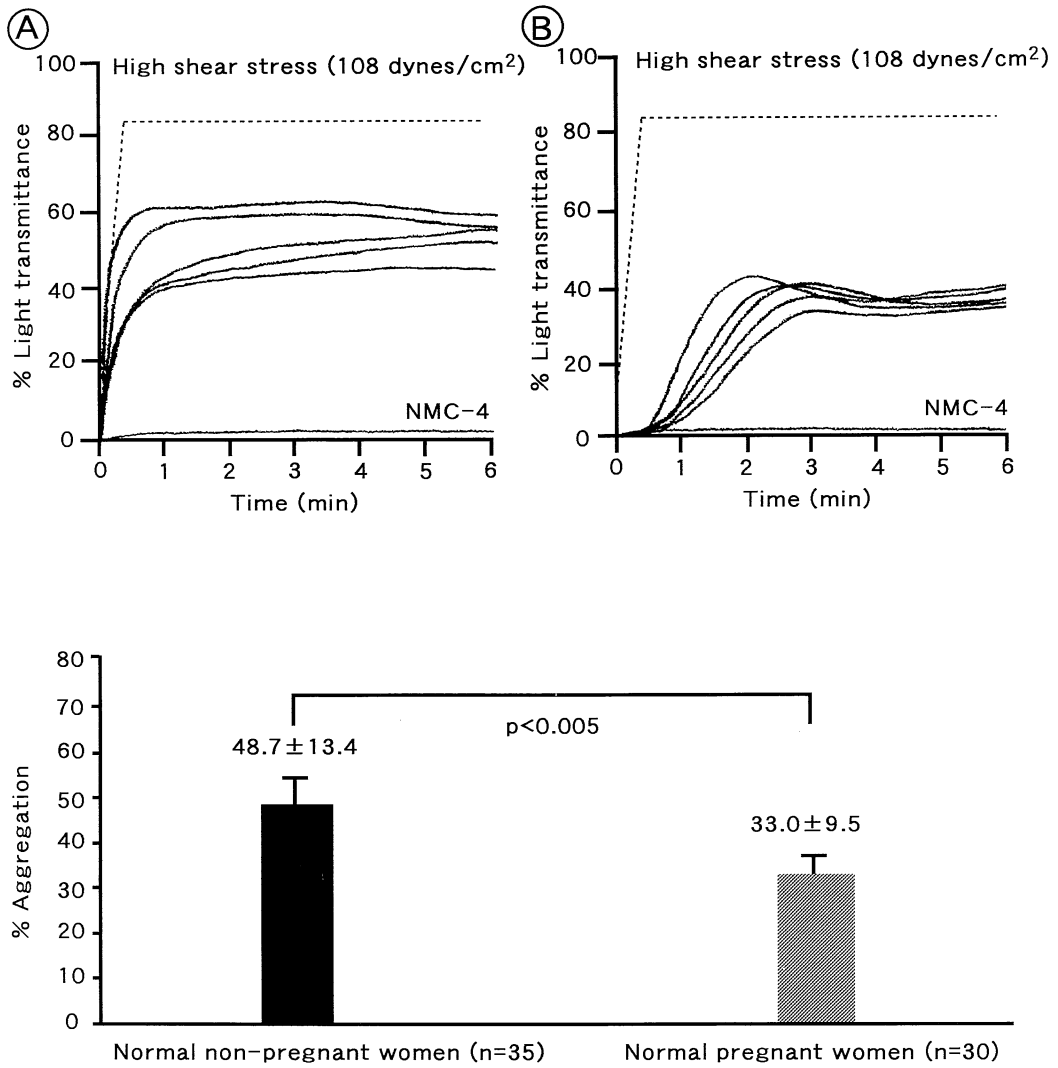


Fig. 5. High shear stress-induced platelet aggregation (H-SIPA) of normal non-pregnant and pregnant women at full term in platelet rich plasma (PRP) system. Panel A (top left) showed 5 representative H-SIPA profiles of PRP from normal non-pregnant women, and panel B (top right) from normal pregnant women at full term. It should be noted that the % light transmittance of the latter was decreased than that of the former with a "dip" of aggregation at 2-3 min after generation of high shear (108 dynes/cm²). The lower panel indicated the mean ± SD in both instances, where 35 normal non-pregnant women and 30 normal pregnant women at full term were analyzed.

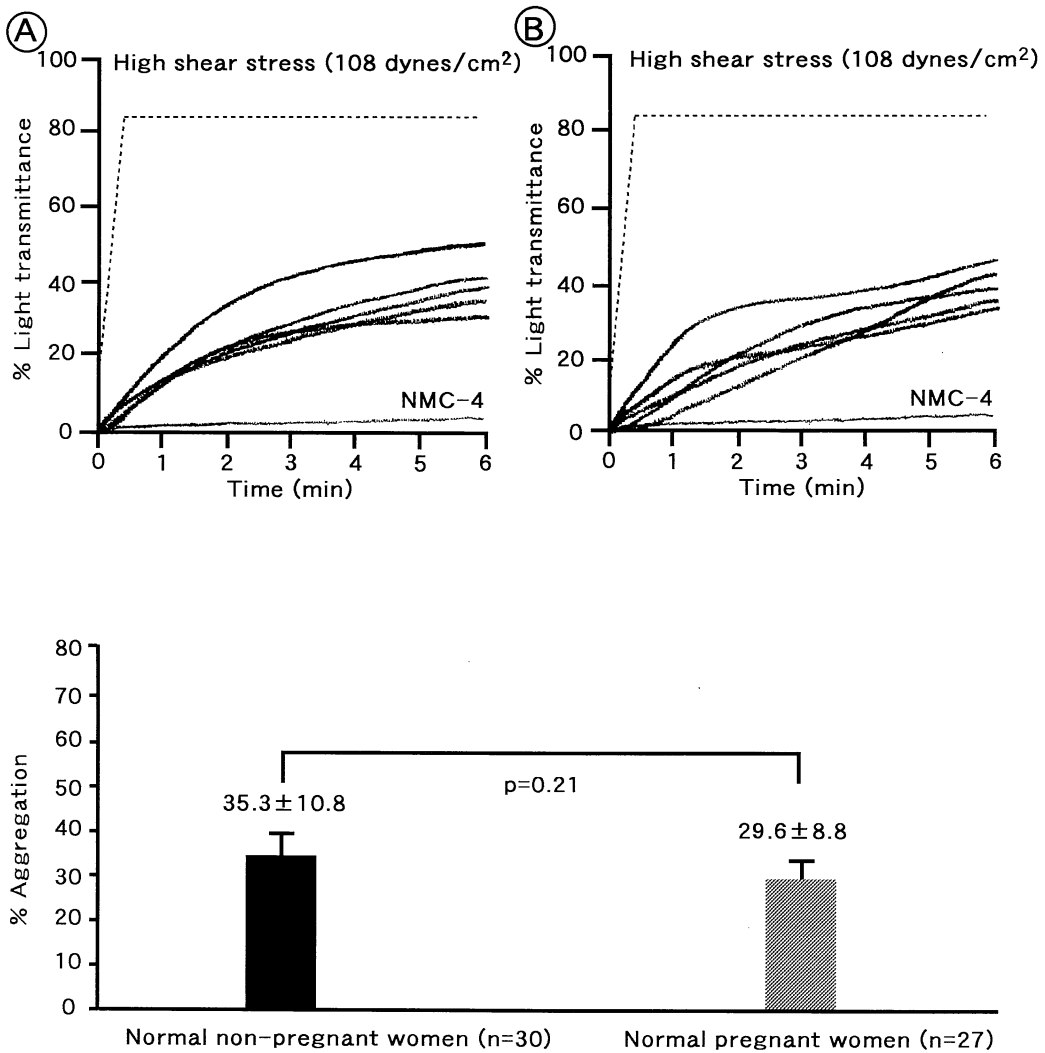


Fig. 6. High shear stress-induced platelet aggregation (H-SIPA) of normal washed platelets (WP) incubated with "fresh" platelet poor plasma (PPP) from normal non-pregnant and pregnant women at full term. Normal WP was incubated with 100 μ l of fresh PPP to give a final volume of 400 μ l. After incubation of the mixture at 37°C for 5 min, H-SIPA was determined. Panel A (top left) showed 5 representative H-SIPA profiles from normal non-pregnant women, and panel B (top right) from normal pregnant women at full term. The lower panel indicated the mean \pm SD in both instances, where 30 normal non-pregnant women and 27 normal pregnant women at full term were analyzed. Note that no significant statistical difference was seen between them.

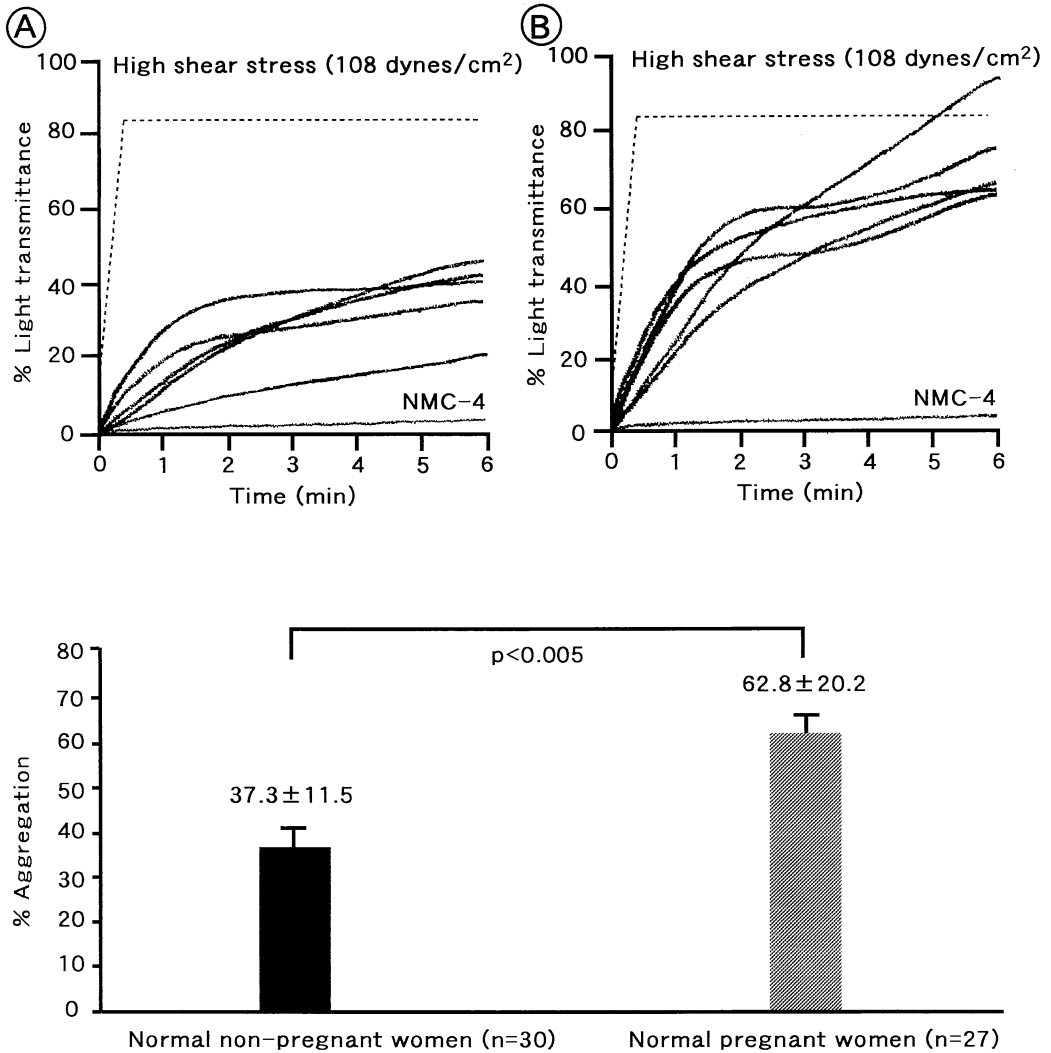


Fig. 7. High shear stress-induced platelet aggregation (H-SIPA) of normal washed platelets (WP) incubated with "frozen-thawed" platelet poor plasma (PPP) from normal non-pregnant and pregnant women at full term. Normal WP was incubated with 100 μ l of "frozen-thawed" PPP to give a final volume of 400 μ l. After incubation of the mixture for 5 min at 37°C, H-SIPA was determined. Panel A (top left) showed 5 representative H-SIPA profiles from normal non-pregnant women, and panel B (top right) from normal pregnant women at full term. A markedly enhanced H-SIPA was noticed in normal pregnant women at full term, whereas such effect was not seen in normal non-pregnant women. The lower panel indicated the mean \pm SD in both instances, where 30 normal non-pregnant women and 27 normal pregnant women at full term were analyzed.

考 察

血液型 O 型のヒト血漿 vWF : Ag, RCof および BCof 値はすべて, A, B および AB 型のヒトより約 25 % 低値を示すと報告されている⁷⁾が, 本研究ではまず正常妊娠の全期間でこの所見が維持されることを示した. 次に, この三つの vWF パラメーターの中で, RCof の増加は vWF : Ag や BCof に比し著しく, BCof の増加は vWF : Ag の増加率をやや上回るか, ほぼ同程度であった. これはリストセチン依存性血小板凝集は HMW マルチマー vWF の A 1-GPIb 軸反応をより強く反映するもので, ボトロセチン依存性血小板凝集はリストセチンの場合より vWF マルチマーの影響を受けないとする従来¹⁷⁾の知見とも一致した. その典型は full term にみられ, 血漿 vWF : Ag と BCof 値とはそれぞれ 197.0 ± 39.4 % と 236.8 ± 89.4 % で, RCof 値は 369.9 ± 170.9 % と著増していた. 正常妊娠末期の vWF マルチマー解析の結果も以上の結果を裏付け, 妊婦血漿の vWF 各バンドの triplet 構造は非妊婦同様保たれていたが, HMW の増加比率が顕著であった. また, HMW, IMW および LMW の比がほぼ均等になるのは妊娠 150 日頃であることも本研究で明らかにした.

vWF/A 1-GPIb と vWF/C 1-GPIIb/IIIa 軸との反応を総合して反映するとされている H-SIPA の最大凝集率は HMW-vWF マルチマーの存在の有無に大きく影響を受けることは, 従来これを先天的に欠く出血性素因である von Willebrand 病の特殊病型 (type 2 A) で示されていた¹⁸⁾. しかし, 本病型のほとんどの症例が A 1-A 2 ドメイン領域にアミノ酸の点変異があるため, vWF/A 1-GPIb 軸反応の減弱と, HMW および IMW の減少との双方の効果を観察しているに留まっていた. 今回, 精製した正常 vWF を種々の濃度の DTT で部分的に還元・アルキル化し, 異なった分子量の PR/A-vWF を調製し, 純化系で H-SIPA に及ぼす vWF マルチマーの効果を観察し得た. この結果, マルチマーの遠位末端から第 7 番目以上のマルチマー (HMW) を欠く PR/A-vWF では H-SIPA 惹起能はほぼ完全に消失する事が明らかになり, また HMW 部の第 10-13 番バンドの減少を示す PR/A-vWF は H-SIPA 惹起能はあるが, その最大凝集率は著しく減少することを示した.

以上の結果から, vWF : Ag 量のみならず HMW マルチマー比率の増加する正常妊娠末期には当然 H-SIPA の亢進が想定された. しかし, これら妊婦の PRP を用いた H-SIPA 像は, まず, 高ずり応力負荷を開始した初期相で凝集開始速度が正常よりやや遅く, ほぼ 2 分後に最

大凝集がみられ, 引き続いて凝集率の低下する dip 相があり, 5~6 分時に再び回復するという特徴的な凝集像を認めた. また, 6 分時の最大凝集率は健常非妊婦女性で 48.7 ± 13.4 %, 妊婦で 33.0 ± 9.5 % と, 妊婦において有意に低下していた. 正常 WP と凍結前妊婦 PPP とを用いた H-SIPA 測定系でも非妊婦女性に妊婦よりやや高い最大凝集率を示す傾向がみられたが, 妊婦 PRP でみられた dip 相は明瞭ではなかった. しかし, 最も興味あることに, これら PPP を -80°C で一週間凍結保存した後, 37°C で解凍した PPP を用いた H-SIPA の最大凝集率は非妊婦女性では 37.3 ± 11.5 % と, 凍結前とほとんど差異がみられなかったが, 妊婦では 62.8 ± 20.2 % と凍結前値 29.6 ± 8.8 % と比し著増していた. これらの結果は妊娠末期妊婦の血漿 vWF は質・量ともに亢進状態にあるため, 逆に vWF 依存性 H-SIPA 惹起能を阻害する物質があり, この物質は凍結・融解に極めて脆弱であることを示した. 凍結・融解に対して極めて脆弱であるという性状から考えて, この物質はある種の蛋白質であることが考えられ, 言い換えると酵素様物質が存在することが示唆された. この H-SIPA 調節作用は妊婦に特有の所見, すなわち胎盤の存在有無により大きく影響を受けていると考えられるので, 胎盤由来物質の直接的, 間接的作用が想定される. 既に, 胎盤由来の抗血栓物質として thrombomodulin^{19,20,21)} や annexin family^{22,23)} などが知られているが, 最近には胎盤絨毛膜から精製された ecto-ATP diphosphohydrolase に H-SIPA の後期凝集再解離作用があることが報告された²⁴⁾. この酵素は膜結合型糖蛋白質で不溶性であるが, 何種類かの isozyme の存在が明らかになりつつある^{25,26)} ので, この中には可溶性のものもあると想定される. H-SIPA 調節作用を持つ物質の同定は重篤な妊娠合併症の一つである血栓症の病態解明に寄与するものと考えられる.

結 語

健常非妊婦女性 74 例と正常妊婦 157 例 (のべ 217 検体) との血漿 vWF : Ag, RCof および BCof を指標として測定して vWF の生物活性を検討した.

- 1) 非妊婦女性では, いずれの vWF パラメーターも, A 型, B 型および AB 型に比し, O 型は有意に低下していた.
- 2) 妊婦では, 妊娠経過とともにいずれの vWF パラメーターも増加したが, RCof の増加は他の 2 つよりも著明であった. いずれの vWF パラメーターも, O 型は他の血液型に比して低い傾向が全妊娠期間を通じて認められた.

3) vWF マルチマー構造の解析では、妊娠経過とともに LMW と IMW との比率は減少し、HMW の比率が増加した。

4) H-SIPA は、HMW マルチマー構造の欠損にもなって著しく低下することが明らかとなった。したがって、vWF : Ag 量のみならず HMW の比率が増加する妊娠末期妊婦では、H-SIPA の亢進が予想された。しかし、PRP を用いた H-SIPA は妊娠末期妊婦では、非妊娠女性に比して有意に低下していた。

正常 WP と PPP とを用いた H-SIPA 測定系では、新鮮 PPP は非妊娠女性と妊娠末期妊婦との間には有意差を認めなかったが、これらの PPP を -80°C で 7 日間凍結保存後、 37°C で解凍して H-SIPA を測定したところ、非妊娠女性では凍結前とほぼ同じ凝集率であったが、妊娠末期妊婦では凍結前に比して著しく亢進した。

以上から、妊娠末期には易血栓形成状態となるが、それを調節する物質があり、凍結・融解に極めて脆弱であることを示した。このような物質の同定は妊娠合併症の一つである血栓症の病態解明に寄与すると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学内科学第二講座成田巨啓教授ならびに本研究遂行に直接終始御指導を賜りました輸血部藤村吉博教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、御校閲を賜りました小児科学講座吉岡 章教授、産婦人科学講座森川肇教授に深謝申し上げます。さらに御協力いただきました奈良県立医科大学輸血部諸兄姉に深謝いたします。

文 献

- 1) Stirling, Y., Woolf, L., North, W. R. S., Seghatchian, M. J. and Meade, T. W. : Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb. Haemost.* **52** : 176-182, 1984.
- 2) Davis, R. B., Leuschen, M. P., Boyd, D. and Goodlin, R. C. : Evaluation of platelet function in pregnancy comparative studies in non-smokers and smokers. *Thromb. Res.* **46** : 175-186, 1987.
- 3) de Boer, K., Lecander, I., ten Cate, J. W., Borm, J. J. J. and Treffers, P. E. : Placental-type plasminogen activator inhibitor in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158** : 518-522, 1988.
- 4) Crosby, E. T. : Obstetrical anaesthesia for patients with the syndrome of haemolysis, ele-

vated liver enzymes and low platelets. *Can J Anaesth.* **38** : 227-233, 1991.

- 5) Fujimura, Y. and Titani, K. : Structure and function of von Willebrand factor in Haemostasis and Thrombosis (Bloom, A. L., Forbes, C. D., Thomas, D. P. and Tuddenham, E. G. D., eds.). 3rd ed., Churchill Livingstone, London, pp. 379-395, 1993.
- 6) Furlan, M., Robles, R. and Laemmle, B. : Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* **87** : 4223-4234, 1996.
- 7) Matsui, T., Fujimura, Y., Nishida, S. and Titani, K. : Human plasma alpha 2-macroglobulin and von Willebrand factor possess covalently-linked ABO (H) blood group antigens in subjects with corresponding ABO phenotype. *Blood* **82** : 663-668, 1993.
- 8) Lusher, J. M. : Screening and diagnosis of coagulation disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175** : 778-783, 1996.
- 9) Brenner, B., Zwang, E., Bronshtein, M. and Seligsohn, U. : von Willebrand factor multimer patterns in pregnancy-induced hypertension. *Thromb. Haemost.* **62** : 715-717, 1989.
- 10) Ikeda, Y., Handa, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Anbo, H., Kawai, Y., Watanabe, K., Itagaki, I., Sakai, K. and Ruggeri Z. M. : The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J. Clin. Invest.* **87** : 1234-1240, 1991.
- 11) Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozeki, Y., Nishio, K., Fukui, H. and Titani, K. : Primary structure of two-chain botrocetin; a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 928-932, 1993.
- 12) Bartlett, A., Dormandy, K. M., Hawky, C. M., Stableforth, P. and Voller, A. : Factor-VIII-related antigen: measurement by enzyme immunoassay. *Br. Med. J.* **24** : 994-996, 1976.
- 13) Macfarlane, D. E., Stibbe, J., Kirby, E. P., Zucker, M. B., Grant, R. A. and McPherson,

- J. : A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb. Diath. Haemorrh.* **34** : 306-308, 1975.
- 14) **Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.** : Variant von Willebrand's disease : characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J. Clin. Invest.* **65** : 1318-1325, 1980.
- 15) **Budde, U., Schneppenheim, R., Plendl, H., Dent, J., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.** : Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes. *Thromb. Haemost.* **63** : 312-315, 1990.
- 16) **Laemli, U. K.** : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227** : 680-685, 1970.
- 17) **Brinkhous, K. M., Read, M. S., Fricke, W. A. and Wagner, R. H.** : Botrocetin (venom coagglutinin) : reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 1463-1466, 1983.
- 18) **Fressinaud, E., Veyradier, A., Truchaud, F., Martin, I., Boyer-Neumann, C., Trossaert, M. and Meyer, D.** : Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress : a study of 60 cases. *Blood* **91** : 1325-1331, 1998.
- 19) **Salem, H. H., Maruyama, I., Ishii, H. and Majerus, P. W.** : Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta. *J. Biol. Chem.* **259** : 12246-12251, 1984.
- 20) **Freyssinet, J. M., Brami, B., Gauchy, J. and Cazenave, J. P.** : Coextraction of thrombomodulin and tissue factor from human placenta : effects of concanavalin A and phospholipid environment on activity. *Thromb. Haemost.* **55** : 112-118, 1986.
- 21) **Maruyama, I., Bell, C. E. and Majerus, P. W.** : Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J. Cell Biol.* **101** : 363-371, 1985.
- 22) **Kristoffersen, E. K.** : Human placental Fc gamma-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG. *APMIS Suppl.* **64** : 5-36, 1996.
- 23) **Nakao, H., Watanabe, M. and Maki, M.** : A new function of calphobindin I (annexin V). Promotion of both migration and urokinase-type plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. *Eur. J. Biochem.* **223** : 901-908, 1994.
- 24) **Makita, K., Shimoyama, T., Sakurai, Y., Yagi, H., Matsumoto, M., Narita, N., Sakamoto, Y., Saito, S., Ikeda, Y., Suzuki, M., Titani, K. and Fujimura, Y.** : Placental ecto-ATP diphosphohydrolase : its structural feature distinct from CD39, localization and inhibition on shear-induced platelet aggregation. *Int. J. Haematol.* **68** : 297-310, 1998.
- 25) **Kaczmarek, E., Koziak, K., Sevigny, J., Siegel, J. B., Anrather, J., Beaudoin, A. R., Bach, F. H. and Robson, S. C.** : Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271** : 33116-33122, 1996.
- 26) **Smith, M. T. and Kirley T. L.** : Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1386** : 65-78, 1998.