 原 著

Laurell 法による第 XII 因子抗原の定量法

高宮 脩* 吉岡慶一郎* 阪田光彦** 吉川 巖**

Immunologic assay Factor XII by Laurell's method

Osamu TAKAMIYA*, Keiichiro YOSHIOKA*,
Mitsuhiko SAKATA** and Iwao YOSHIKAWA**

Key words: factor XII, antigen, Laurell's method,
congenital, factor XII deficiency

By employing Laurell's method, a sensitive and reproducible antigen assay for human Factor XII was carried out with purified Factor XII and monospecific rabbit anti-body.

It was noted that TAIYO-ID-1 agarose was most suitable material in the procedure.

Precise measurements of Factor XII were possible for concentrations as low as 3% of that in normal pooled plasma. A good correlation (correlation coefficient=0.82) existed between the titers of Factor XII measured by clotting activity and antigen assay among 40 normal adults. Factor XII antigens were absent in patients with congenital Factor XII deficiency, but other congenital deficient plasmas, including those of patients with hemophilia A and B, Factor XI or Factor VII deficiency, von Willebrand disease and hereditary angioneurotic edema (C1; inactivator deficiency), contained normal amount of Factor XII antigen. Both clotting activity and antigen of Factor XII were reduced in the plasmas of patients with liver cirrhosis or those of half cases with disseminated intravascular coagulation. They were in normal ranges in those of patients treated with Warfarin. Factor XII antigen was normal in spite of reduced clotting activity in the plasmas of patients suffered from SLE.

はじめに

第XII因子は不活性型として単離することは困難であったが、近年純化が進み、その抗血清を

用い第XII因子抗原(FXII-Ag)の測定法が検討されてきた。

Smink ら¹⁾は Passive hemagglutination inhibition test (HIT), Revak ら²⁾は SRID 法に

* 国立大阪病院 (〒540 大阪市東区法円坂町2-1), National Osaka Hospital, Osaka, Japan.

** 大阪大学医療技術短期大学部, College of Biomedical Technology and Nursing, Osaka University, Osaka, Japan.

より, また Saito ら³⁾ は Radioimmunoassay (RI 法) による測定法を報告している. 先に吉川らは HIT を用い先天性第Ⅻ因子欠乏症の F.Ⅻ-Ag が 3% 以下であることを報告した.

今回, 著者らは一般に凝固因子抗原測定に広く用いられている Laurell 法により F.Ⅻ-Ag 測定を試み, その有用性, 測定条件等について検討した成績を述べる.

I. 対象と方法

1. 対象

止血スクリーニング検査 (BT, PLC, PT, A-PTT, FDP) にて異常の認められなかった成人男子 20 名, 女子 20 名を正常成人対照としこの 40 名の血漿を等量混合したものを標準血漿とし -70°C に分注保存し使用時溶解し用いた.

先天性凝固因子欠乏血漿: 第Ⅻ因子欠乏血漿 (F.Ⅻ def. pl.) 6 例, 第Ⅸ因子欠乏血漿 2 例, 第Ⅷ因子欠乏血漿 4 例, 第Ⅷ因子欠乏血漿, 10 例, 第Ⅶ因子欠乏血漿 1 例, von Willbrand disease 血漿 3 例, 遺伝性血管性神経性浮腫 (HANE) 血漿 10 例を用いた.

各種疾患患者血漿: ワーファリン投与患者血漿 10 例, 肝硬変症血漿 10 例, DIC 血漿 4 例, SLE 血漿 10 例を用いた.

市販欠乏血漿を除く全ての血漿は 3.8% ケン酸加血漿を用い採血器具および試験管は全てプラスチックを用いた.

2. 方法

抗ヒト第Ⅻ因子抗原ウサギ血清 (抗 F.Ⅻ-A 血清): ヒト血漿より DEAE-Sephadex A50→Lysinesephrose→DEAE-Sephadex A50→Sp-Sephadex C50 の 4 段階のカラムクロマトを行い純化したヒト F.Ⅻ-Ag で家兎を免疫し抗 F.Ⅻ-Ag 血清を得た. さらに第Ⅻ欠乏血漿を吸着した CNBr-Sephadex 4B カラムの吸収操作により F.Ⅻ-Ag に対する特異抗血清を得た.

F.Ⅻ-Ag の定量: Laurell 法に準じ, ペロナール緩衝液 pH 8.6 にて加温溶解した 1% agarose を 50±3°C に保温し抗 F.Ⅻ-Ag 血清 (final conc. 5%) を混和しガラス平板上に厚さ 1.5mm になるよう流し込む. 陰極側に ϕ 2.5 mm の well をあけ検体 8 μ l を添加, 1V/cm で 7 時間通電し, 脱タンパク後, Commassie Brilliant Blue R-250 にて染色し, 泳動飛距離 (Distance of migration, Dm) を計測した.

第Ⅻ因子凝固活性 (F.Ⅻ-C) 測定: FⅫ def. pl. (DADE 社製, Warnar 社製) を用い一段法 PTT による補正度より測定した.

Fig. 1 Correlation between the titers of Factor XII measured by clotting activity and antigen assay among 40 normal adults.

Table 1 A Factor XII antigen assay in congenitally deficient plasmas
Congenitally deficient plasmas

conditions	case No.	F.XII antigen %	F.XII activity %
normal male	20	99.9±31.7	92.3±37.8
normal female	20	104.9±44.3	94.8±56.8
F.XII deficiency	6	<3(0)	<1
F.XI deficiency	2	108.0	95.0
F.IX deficiency	4	98.2±27.0	96.0±18.2
F.VIII deficiency	10	98.1±22.2	93.1±17.1
F.VII deficiency	1	98.0	95.0
VWD	3	95.0±25.0	92.0±21.0
HANE	10	94.9±24.6	103.0± 9.8

B Factor XII antigen assay in various clinical conditions
Various conditions clinical

conditions	case No.	F.XII antigen %	F.XII activity %
normal male	20	99.9±31.7	92.3±37.8
normal female	20	104.9±44.3	94.8±56.8
warfarin therapy	10	99.0±29.6	85.7±38.1
liver cirrhosis	10	61.0±30.4	61.7±19.3
DIC	4	145.0±80.0	153.8±40.7
SLE	10	108.3±58.7	51.3±21.7

II. 成 績

1. 各種各種アガロースの検討

免疫電気泳動用アガロース5種（ベーリング社製ヘキストアガロース，半井化学薬品社製アガロースA-37，コーケン社製タイヨウID-1アガロース，SIGMA社製アガロース，KALLE-STAD社製アガロース）を用い上記の条件にて泳動を行ったがタイヨウアガロースID-1にのみロケット状の沈降線を形成したが他のアガロースでは沈降線は原点—sample well からはほとんど移動することなく Dm を定量的に計測できなかった。

2. 抗体の特異性と測定感度

オクターロニ法にてF.XII-A血清と純化F.XII-Aの間に生じた沈降線は正常人血漿との間に生じた単一沈降線とヒューズするが抗F.XII-A血清と先天性第XII因子欠乏血漿との間には沈降線は生じなかった。この抗F.XII-A血清はF.XII-Aに特異性をもつことを確認した。

標準血漿を生理食塩水にて2倍希釈したもの

Fig. 2 Immunoelectrophoresis by Laurell's method

を100%とし各種濃度の Dm を片対数グラフ上にプロットしたところ直線性を示し，これを検量線とした。

3. 再現性

標準血漿の原液，2倍，4倍したものを用い10回測定したが，CV＝5%，5%，7%と良好な再現性を得た。

4. 血漿と血清の F.XII-A

同一正常人についてプラスチック容器を用い

て分離した3.8% クエン酸加血漿とガラス容器にて採血後5時間で分離した血清を同一平板上で泳動したがF.XII-Aの量にほとんど差はみられなかった。さらに2次元免疫泳動を行ったところ沈降線アーキのピークの高さおよび原点よりの移動度ともに差はなかった。

5. F.XII-Ag と F.XII-C

正常成人男女40名の血漿を同時に測定したが、性差はほとんどなかった。また、F.XII-AgとF.XII-Cは $r=0.82$, $y=0.98x+12.3$ と良い相関を得た(図1)。

先天性第XII因子欠乏症6例は全例ともF.XII-Ag 3%以下、F.XII-C 1%以下を示した。また、その他の先天性凝固因子欠乏症、ワーファリン投与患者では表1のごとく正常値内にあった。肝硬変症ではF.XII-Ag、F.XII-Cともに低下したが、DICでは2例が低下を示し他2例は増加していた。SLEではF.XII-Cは平均約50%と低下したが、F.XII-Agはほぼ正常値量あった(図2, 表1)。

6. 各種吸着剤による影響

各種吸着剤を用い室温にて15分間正常人血漿を吸着後、上清血漿中のF.XII-Agを測定したが、 BaSO_4 300mg/ml, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 0.1ml/mlではほとんど吸着されず約80%が残存した。Bentnite 50mg/ml, Filter cell 50mg/ml, Kaolin 100mg/mlでは上清のF.XII-Aは検出できず、silica acid 100mg/mlで50%が残存した。また、Euglobulin 分画中には5% F.XII-Agの存在がみられた。

III. 考 察

F.XII-Agは分子量約80,000の糖タンパク質で β -globulin位に位置する。一般の市販免疫泳動用アガロースでは原点付近に泳動されるため、

ロケット状沈降線を形成しないが著者らは検討の結果、E.XII-Agが原点よりfast anodeに泳動されるアガロースを用いLaurell法により再現性よく定量的に測定できる方法を開発した。

Saitoら³⁾はRI法により正常F.XII-A量の0.1%までの測定を可能にしているが、著者らの方法は比較的簡便に測定でき正常量の約3%まで測定することができ、臨床的に十分有用であると思われる。

本方法を用いた正常成人のF.XII-AgはF.XII-Cと比較的よく相関し、また、先天性第XII因子欠乏症では6症例全例、F.XII-Ag、F.XII-Cともにほとんど欠如し、重症血友病A患者血漿にみられる凝固性タンパク質量と活性量の解離はみられなかった。他の先天性凝固因子欠乏症ではF.XII-Ag、F.XII-Cとも正常量を示し、ワーファリン投与により影響されないことを確認した。肝硬変症ではともに低下したが、DIC例では増加例、低下例相半ばして一定した傾向はみられなかった。

文 献

- 1) Smink, M. M., Daniel, T. M., Ratnoff, O. D., et al.: Immunologic demonstration of a deficiency of Hageman factor-like material in Hageman trait. J. Lab. Clin. Med., **69**; 819~832, 1965.
- 2) Revak, S.D., Cochrane, C.G., Johnston, A. R., et al.: Structural changes accompanying enzymatic activation of human Hageman factor. J. Clin. Invest., **54**; 619~627, 1974.
- 3) Saito, H., Ratnoff, O. D. and Pensky, J.: Radioimmunoassay of human Hageman factor (factor XII). J. Lab. Clin. Med., **88**; 506~515, 1976.