 原 著

ヒト血漿 XIII 因子 b サブユニットの研究 (第1報)

Radioimmunoassay の開発

池松正次郎* Richard P. McDonagh** Jan M. McDonagh**

Study for b subunit of human blood coagulation factor XIII (I)

Development of radioimmunoassay

Shojiro IKEMATSU*, Richard P. McDonagh** and Jan M. McDonagh**

Key words: factor XIII, radioimmunoassay, affinity chromatography, slope analysis, b subunit

Factor XIII belongs to a group of calcium dependent glutamine-lysine endo- γ -glutamyl transferase. It circulates as a non-covalently associated tetrameric zymogen consisted of α subunit having enzymatic active center and b subunit regarded as carrier protein in a form of α_2b_2 in normal human plasma, while the platelet, uterus and placenta exhibit only α subunit as a zymogen and normal plasma shows an excess amount of b_2 being uncombined with α subunit. But the role of b subunit which is characteristic to exist only in plasma has not been clarified so much. To investigate the non-catalytic portion of plasma F. XIII, b subunit, a double antibody radioimmunoassay is newly developed for precise quantitation and slope analysis in antigen dilution curve with Rodbard's logit-log conversion method.

Sensitivity of this RIA for b subunit is 7 ng/ml and the recovery of purified b subunit added to normal plasma and buffer control show over than 95 %. Antigen expression of α_2b_2 and free b_2 concerning with b subunit are different on slope analysis of antigen dilution curve, while the 50 % binding point, so called ED50, kept stayed at the same point. Reproducibility is good and CVs show less than 6 % both on intraassay and interassay. Repeat of rapid freezing and thawing of normal plasma over three times shows 20 % decrease of b subunit amount for original plasma. b subunit concentration in plasma of 37 normal adults show $11.98 \pm 2.35 \mu\text{g/ml}$ and twelve cases of congenital F. XIII deficiencies show $5.77 \pm 1.34 \mu\text{g/ml}$, which is $48.2 \pm 11.5 \%$ to normal value.

* 東京医科大学臨床病理 (〒160 東京都新宿区西新宿6-7-1), Dept. of Clin. Pathology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan.

** ノースカロライナ大学病理, Dept. of Pathology, School of Medicine, University of North Carolina, North Carolina, U.S.A.

緒 言

XIII 因子は血漿中では酵素活性を有する a サブユニットと活性を有しない b サブユニットが a_2b_2 の形をとっており、その際つねに b サブユニット過剰で free の b_2 も存在することが知られている。この血漿 XIII 因子に特有な b サブユニットは従来 carrier protein とみなされてきたが、最近 a サブユニットのプラスミン分解を保護しているとするもの、a サブユニットの活性化を regulate あるいは stabilize しているとするものなどの報告がある。この b サブユニットの役割について解明する一連の研究の中で、今回は b サブユニットに対する radio-immunoassay (RIA) を開発し、検討を加えたので報告する。

I. 実験試剤および実験方法

(1) ヒト血漿 XIII 因子 b サブユニットの純化

Kazama & Langdell らの方法に organomercurial agarose によるアフィニティクロマトを組みあわせて行なった。DEAE セルロースカラムクロマトより得られた粗 XIII 因子分画にトロンビンを添加し、pCMB agarose にかけて Ca イオンを含む緩衝液にて溶出し b サブユニットの回収率を上げ、最終的に SDS-PAGE にて単一の分子量 78,800 の b サブユニットを得た。

(2) 血小板 XIII 因子の純化

McDonagh & McDonagh の方法にしたがって血小板から XIII 因子を純化し、SDS-PAGE にて単一の a サブユニットを得た。

(3) 抗ヒト b サブユニットウサギ血清の作製

成熟オスウサギを用いて免疫操作を行ない自家製抗ヒト b サブユニットウサギ血清を作製し、オクタロニー法、免疫電気泳動、2 次元免疫電気泳動などで純化 b サブユニットおよびヒト血漿との間に単一の沈降線形成を確認した。

(4) RIA の設定

純化 b サブユニットのラベリングはクロラミン T 法によって行ない得られた ^{125}I -b サブユニットの specific activity は $19\sim 25\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ b サブユニット、つまり $0.8\sim 1.0$ 原子の ^{125}I が 1 分

$$\text{logit } y = \ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0}$$

$$\text{regression line } \text{logit } y = a + b \log_{10} x$$

$$\text{ED}_{50} = 50\% \text{ binding point (logit } y = 0)$$

$$\text{calculated dose} = 10^{\left(\frac{\text{logit } y - a}{b}\right)}$$

$$\text{difference} = \frac{\text{actual} - \text{calculated dose}}{\text{actual dose}} \times 100\%$$

$$B = \bar{B} - \text{NSB}$$

$$B_0 = \bar{B}_0 - \text{NSB}$$

Fig. 1 Logit-log conversion (Rodbard)

子の b サブユニットに結合する条件を選んだ。

RIA は 2 抗体法を用い、2 次抗体には抗ウサギ IgG ヒツジ血清を使用した。すべての測定点は triplicate で行ない、それぞれの希釈には希釈用緩衝液 (0.05M tris-HCl, 0.15M NaCl, 3mM NaN_3 , 10mM benzamidine, 1% bovine serum albumin, pH 7.5) を用い、 ^{125}I -b サブユニット $100\mu\text{l}$ の total count が 18,000~22,000 cpm, non specific binding 5% 以下、抗体希釈曲線から $B_0 = 75\%$ となる条件を求めると、抗 b サブユニットウサギ血清が 20,000~40,000 倍希釈、non immunized rabbit serum が 640 倍希釈であった。

II. 実験結果

(1) 標準曲線

通常の片対数グラフ上で b サブユニット濃度 $1\sim 1,000\text{ng/ml}$ の間において S 字曲線関係が成立したが、直線回帰と slope analysis を行うために Rodbard らの logit-log 変換 (図 1) を行なった。すべての測定点を logit に直したあと回帰直線を出し、 ED_{50} (50% binding point) つまり $\text{logit } y = 0$ を求める。標準曲線を本法を用いて解析すると b サブユニット濃度 $7\sim 700\text{ng/ml}$ の間で直線関係が成立し、difference が 10% を超える点を本法の測定感度とすれば、そ

Fig. 2 Reproducibility of factor XIII b subunit radioimmunoassay

れは 7 ng/ml であった。測定日の異なった 20 回の標準回帰直線の平均は (図 2), $slope = -2.857 \pm 0.097$, $ED_{50} = 74.95 \pm 6.47$ ng/ml で、測定検体の定量は point assay ではなく、すべて抗原希釈曲線を作り標準回帰直線と同じように logit-log 変換から回帰直線を求め ED_{50} を計算して、その日の標準回帰直線の ED_{50} から換算して b サブユニット濃度を求めた。

(2) free b_2 と a_2b_2 の抗原性の相異について a_2b_2 と free b_2 の間に本法においてどのような差が出るかを調べるために一定量の純化 b サブユニット溶液に種々濃度の純化血小板 a サブユニットを添加し Ca イオンを含まない系で再結合を促してこれらを測定し、slope analysis を行なったところ (図 3), slope は a サブユニット対 b サブユニットの比が大きくなるにつれて浅くなったが ED_{50} は全く変化しなかった。

(3) 再現性および添加回収試験

Intraassay ($n=10$) の $CV=4.79\%$, Inter-assay ($n=6$) の $CV=5.03\%$ ときわめて良好であった。また種々濃度の純化 b サブユニットを緩衝液、血漿に添加してその回収率を測定したところ、すべてにおいて 94.7% 以上の回収率を挙げた。

(4) 凍結融解の b サブユニットへおよぼす影響

血漿の急速凍結急速融解の b サブユニットへの影響を調べたところ、採血直後の b サブユニット濃度を 100% とすれば、1 回の凍結融解で

Fig. 3 Effects of a subunit on slope analysis of F. XIII b RIA

は 90.3% と約 10% の減少を示し、3 回で 77% と約 20% の減少を示したものの 4 回以上の回数の凍結融解ではそれ以上の減少を示さなかった。

(5) 正常値

本法を用いて正常者血漿 37 例について測定したところ b サブユニット濃度は 11.983 ± 2.354 $\mu\text{g/ml}$ 、一方先天性 XIII 因子欠乏症 11 家系 12 症例では 5.772 ± 1.340 $\mu\text{g/ml}$ とこれは正常者平均値に対して $48.16 \pm 11.50\%$ と著明な低下を示した。

III. 考案および結論

今回、一連の XIII 因子 b サブユニットに対する研究を始めるにあたり、まず b サブユニットに対する RIA を開発した。抗原希釈曲線を logit-log 変換することによって slope analysis を行ない ED_{50} を求めた上で定量し、 a_2b_2 および free b_2 の 2 つの形で血漿中に存在する b サブユニットを等価に測定することが可能になった。逆に、 a_2b_2 と free b_2 の slope の違いは b サブユニットが a サブユニットと結合することで抗原基の数あるいは質に変化が生じることが判明した。また定量法としても感度、精度、再現性に優れており添加回収実験でも充分回収されることが解った。b サブユニット抗原性に凍結融解が若干の影響を与える結果を得たので測定検体はすべて 1 回の凍結融解を受けることで実験条件を一定化した。先天性 XIII 因子欠乏症での b サブユニット濃度の著明な低下については、保因者の成績も含めて次回報告する。

文 献

- 1) Folk, J.E. and Finlayson, J.S.: The ϵ -(γ -glutamyl) lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. Adv. Prot. Chem., 31; 1~133, 1977.
- 2) Kazama, M., et al.: Purification and immunological characterization of human plasma F. XIII. Haemostasis, 5; 329~340, 1976.
- 3) McDonagh, J., et al.: Affinity chromatography of human plasma and platelet factor XIII on organomercurial agarose. Biochem. Biophys. Acta, 446; 345~357, 1976.
- 4) Rodbard, D. and Hutt, D.M.: Statistical analysis of radioimmunoassay and immunoradiometric (labelled antibody) assays. Int. Atomic Energy Agency, Vienna, Unipub, N.Y., 1974, pp. 165~192.

● 周産(生)期感染症の臨床指針書!

妊婦・胎児・新生児の感染症

編集 日本周産(生)期医学研究会 専門医91氏分担執筆

B5判 289頁 図102 表175 定価9,800円(千240円)

本書は周産(生)期医学の立場に立って問題の多い妊婦、胎児、新生児の感染症を再検討し、ウィルス、マイコプラズマ、原虫、細菌を含めて、新しく見出された疾患、従来より知られた感染症を現代の進歩したウィルス学、細菌学および免疫学より洗い直し、産婦人科医、小児科医の実地診療上必要な感染症の臨床指針書である。

●内容: [妊婦の感染症] 1.妊婦感染症, 2.化学療法, 3.産褥感染症, 4.妊婦慢性腎盂腎炎, [胎児の感染症] 1.胎児感染症の化学療法, 2.先天性トキソプラズマ症, 3.サイトロメガロウィルス感染症, 4.HBs抗原と垂直感染, 5.B型肝炎ウィルスの垂直感染, 6.B型肝炎ウィルスの母児間伝播, 7.前期破水, 分娩遷延と未熟児感染症, 8.感染の母児相関, 9.新生児肺炎と産科的異常, 10.妊婦予防接種の胎児への影響, [新生児の感染症] 1.新生児感染症, 2.新生児と抗生物質, 3.新生児感染症の診断と治療, 4.先天性免疫不全症と新生児敗血症, 5.予後不良であった新生児細菌感染症, 6.未熟児室における感染症の集団発生, 7.新生児室内感染, 8.細菌培養と感受性検査, [周産期感染症と免疫] 1.妊婦の感染と免疫, 2.胎児感染と免疫, 3.新生児感染症と免疫, 4.初乳の免疫に関する役割。