正常ヒト血漿および von Willebrand 病亜型例血漿 第Ⅷ因子関連抗原の分子サイズについて

三上 定昭* 高橋 幸博* 西野 正人* 福井 弘*

Molecular size of factor VIII-related antigen in normal plasma and in plasma of von Willebrand's disease variants

Sadaaki MIKAMI*, Yukihiro TAKAHASHI*, Masato NISHINO*
and Hiromu FUKUI*

Key words : von Willebrand's disease, factor VIII-related antigen, SDS PAGE-CIE

Patterns of VIII R : AG in the plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant fractions from normal subject and von Willebrand's disease variants were investigated by SDS 1.5 % polyacrylamide gel electrophoresis-crossed immunoelectrophoresis (SDS PAGE-CIE). Neutralization of SDS after PAGE was performed by inserting an intermediate agarose layer impregnated with Triton X-100. Molecular weight of VIII R : AG in normal plasma ranged from 8×10^5 to 8×10^6 daltons. Normal cryoprecipitate showed several precipitin peaks with a molecular weight range of 8×10^5 — 1×10^6 daltons. Normal cryosupernatant had two low peaks with 8×10^5 — 2×10^6 daltons.

VIII R : AG in the plasma and cryoprecipitate fractions from von Willebrand's disease variants, showing fast anodal mobility in the conventional CIE, gave 2—3 peaks with low molecular weights of 8×10^5 — 3×10^6 daltons. Plasma VIII R : AG in these patients were suggested to stay in low levels of polymerization/aggregation of subunit and not to show VIII R : WF similar to VIII R : AG in normal cryosupernatant.

緒 言

von Willebrand 病 (vWd) は第Ⅷ因子蛋白
の高分子量部 (HMW) すなわち第Ⅷ因子関連

抗原蛋白に欠陥を有する疾患である。教室では
第Ⅷ因子の有する3活性 (von Willebrand 因
子活性; VIII R : WF, 第Ⅷ因子関連抗原; VIII R :
AG, 凝固活性; VIII : C) および交叉免疫電気泳

* 奈良県立医科大学小児科 (〒636 奈良県橿原市四条町840), Department of Pediatrics, Nara Medical College, Nara, Japan.

動像(CIE)を用いて病型分類を行ってきた¹⁾²⁾. 近年正常ヒト第Ⅷ因子蛋白の分子量の不均一性が注目されており, その重ならない凝集度に応じてⅧR:WFが発揮されると考えられている³⁾. 著者もすでに正常ヒトおよびvWd各種病型血漿のクリオプレシピテートおよびその上清を用いたCIEパターン²⁾や, large pore化したポリアクリルアミドゲル電気泳動—CIEを用いて検索してきた⁴⁾. この結果通常のCIEでⅧR:AGが陽極に移行するvWd亜型例では正常ヒト血漿ⅧR:AG成分のうち低分子量部分のみで構成されていることを示唆する成績を得た. 今回さらに正常ヒトおよびvWd亜型例血漿ⅧR:AGの分子量を明確にする目的でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)-CIEを用いて検索した.

I. 対象および試料

教室で観察中のvWdのうちⅧR:WF, ⅧR:AG, Ⅷ:Cともに著減するhomozygous症例(福井の分類¹⁾²⁾によるA-a-1)2例, 3者ともに低下する典型例のうち通常のCIE像が陽極に移行する症例(A-b-4)2例, ⅧR:AGが正常域を示す亜型症例のうちCIE像が正常位置に出現する症例(F-5)2例およびCIE像が陽極に移行する症例(F-6)2例を用いた.

試料は1)0.32%クエン酸ソーダを含む血漿, 2)血漿のクリオ沈渣, 3)クリオ上清を用いた. 2)3)はさらに0~20%飽和硫酸沈殿を行い1/20容量に濃縮し, 56°C3分加熱により脱フィブリノーゲン後透析した.

II. 方法

1. 一次元SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE): 既報⁵⁾のごとく, 6M尿素, 0.7% EDTA, 0.1% SDS, 0.5%アガロース混入1.5% PAGEを行った. 試料は血漿の場合3% SDS, 4M尿素で処理し, クリオ沈渣および上清分画は0.3% SDS, 4M尿素で処理した. 高分子量部の分子量スケールはFurlanら⁶⁾の方法にしたがいIgM純化を重合させ用いた.

2. 二次元交叉免疫電気泳動(CIE): 一次元

Fig. 1 Patterns of factor VIII-related antigen in normal plasma, cryoprecipitate and cryo-supernatant fractions by SDS 1.5 % polyacrylamide gel electrophoresis-crossed immunoelectrophoresis (SDS PAGE-CIE)

のディスクゲルを縦断し, 0.8%自家製抗ヒト第Ⅷ因子家兔血清を含む1%アガロースにてCIEを行った. なお, SDSを中和する目的で中間ゲルとして血漿の場合2.0%, クリオ沈渣および上清分画の場合1.5%トリトンX-100を含むアガロースゲル, 幅1cmを置いた.

III. 成績

1. 正常ヒト血漿, クリオ沈渣および上清分画のSDS PAGE-CIEパターン: 正常ヒト血漿はクマジーブリアントブルーにて蛋白染色像が認められない高分子量部分である分子量80~800万の範囲に渡り, 多少凹凸を有する1本の沈降像を認めた. クリオ沈渣では凹凸はさらに拡大され, 数個のピークを認め, 分子量は80~1,000万近くにおよんだ. またピークは高分子量部の蛋白バンドに一致した. クリオ上清では分子量80~200万前後の部分のみ出現し, 高分子量部分を欠如した(Fig. 1).

2. vWd亜型例血漿のSDS PAGE-CIEパターン: ⅧR:AGを欠如するA-a-1)症例では沈降線を認めなかった. 通常のCIE像が血漿で陽極に移行するA-b-4)では分子量80~200万前後, F-6)では80~300万前後の2~3個の低

Fig. 2 Patterns of factor VIII-related antigen in plasma, cryoprecipitate and cryo-supernatant fractions from normal subject and von Willebrand's disease variants obtained by SDS PAGE-CIE

い凹凸を有する沈降像を認めた。F-5 症例はほぼ正常同様の分子量 80~700 万前後に渡る沈降線を認めた (**Fig. 2**)。

3. vWd 亜型例クリオ沈渣分画の SDS PAGE-CIE パターン: A-a-1 症例では沈降線を認めず、A-b-4, F-6 症例では 2~3 個の沈降ピークを有する分子量幅 80~300 万前後のパターンを示した。F-5 症例では正常クリオ沈渣同様の数個のピークを有する分子量 80~1,000 万に渡る沈降線を認めた (**Fig. 2**)。

4. vWd 亜型例クリオ上清分画の SDS PAGE-CIE パターン: A-a-1 症例では沈降線を認めず、また A-b-4 症例でも血中含有量が少ないため沈降線が出現しなかった。F 型のうち通常の血漿 CIE 像が陽極側に移行する F-6 症例および正常位置に出現する F-5 症例ともに正常クリオ上清同様 2 個の沈降ピークを有する分子量 80~200 万前後の低い沈降線を認めた (**Fig. 2**)。

IV. 考 按

第 VIII 因子蛋白の関連抗原部分はその生物学的活性として VIII R : WF を発揮する。近年の諸家の検索により正常ヒト第 VIII 因子蛋白は種々の分子量のものが存在し、重合 (凝集) により巨大分子化してきたものであろうと考えられている

る⁷⁻⁹⁾。一方 VIII R : WF はその重合度に応じて活性が強まるものと考えられている。今回著者は SDS PAGE-CIE を用いて正常ヒト血漿、クリオ沈渣および上清 VIII R : AG の分子量を免疫学的沈降線として観察したが、クリオ沈渣では明らかに数個のピークを認め分子量は 80~1,000 万近くを示した。この傾向は比較的処理の少ないクエン酸血漿を用いても同じ成績であった。一方クリオ上清は VIII R : WF を有さないことが確認されているが、分子量幅も 80~200 万前後の部分しか認められなかった。この成績は正常ヒト血漿 VIII R : AG が種々の分子量のものを含み、重合 (凝集) を増すにしたがい VIII R : WF を発揮するようになるとの考えを支持するものであった。しかし in vivo でこれだけの高分子量の VIII R : AG が存在するののかに関しては今後の検索に待たなければならない。また分子量 80 万以下の蛋白の有無に関しても抗原性が欠如している可能性があり方法を変えて検討しなければならないと考える。

vWd 亜型例で通常の血漿 CIE 像が陽極側に移行する症例は血漿およびクリオ沈渣ともに分子量幅 80~300 万前後までで、ピークも 2~3 個認めたに過ぎなかった。この所見は VIII R : WF が低下していることもふまえて正常ヒトク

リオ上清に類似するものであり、これらの症例はⅧR: AGの重合過程の欠陥によりⅧR: WFを発揮できるまでの巨大分子化するに至らず、低重合のまま停止した状態であると考えられた。一方通常の血漿 CIE 像が正常位置に出現する F-5 症例では今回の分子量的検索でも正常同様の巨大分子量部分が出現し、ⅧR: WF の低下は重合の点からは説明できなかった。本症例ではⅧR: WF 活性基自体の欠陥が想定され、今後さらに検討を加えたい。

文 献

- 1) 福井 弘: von Willebrand 病. 日児誌, **83**; 95~100, 1979.
- 2) 西野正人: ヒト第Ⅷ因子高分子量分画の不均一性に関する研究, 第2報. 奈医誌, **30**; 279~287, 1979.
- 3) Bloom, A.L.: Factor Ⅷ: New clinical and genetic aspects. Schweiz. Med. Wschr., **109**; 1357~1361, 1979.
- 4) Fukui, H., Mikami, S., Takase, T., Fujimura, Y. and Nishino, M.: Patterns of factor Ⅷ-related antigen on crossed immunoelectrophoresis and large pore polyacrylamide gel-crossed immunoelectrophoresis in von Willebrand's disease. Proc. 1st Int. Symp. H.T., 99~106, 1979.
- 5) 三上定昭, 高橋幸博: 先天性血小板機能異常症血小板と凝固因子, とくに第Ⅷ因子の免疫学的検索. 臨床病理, **29**; 372~376, 1981.
- 6) Furlan, M. and Beck, E.A.: Cross-linking of human fibrinogen with glutaraldehyde and tetranitromethane. Thrombos. Res., **7**; 827~838, 1975.
- 7) van Mourik, J.A. and Bolhuis, P.A.: Dispersion of human factor Ⅷ-von Willebrand factor. Thrombos. Res., **13**; 15~24, 1978.
- 8) Weinstein, M. and Deykin, D.: Comparison of factor Ⅷ-related von Willebrand factor proteins prepared from human cryoprecipitate and factor Ⅷ concentrate. Blood, **53**; 1095~1105, 1979.
- 9) Perret, B.A., Furlan, M. and Beck, E.A.: Studies of factor Ⅷ-related protein. II. Estimation of molecular size differences between factor Ⅷ oligomers. Biochim. Biophys. Acta, **578**; 164~174, 1979.

●内科と眼科の統合による成果!

糖尿病性網膜症

編集 東北大学内科教授 後藤由夫

琉球大学眼科教授 福田雅俊 専門医37氏分担執筆

A 5 判 355頁 図92 表86 原色10 定価7,800円(〒200円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768