第Ⅷ因子 complex の thrombin および Xa による修飾態度

上野 利通* 武内 令子* 長野 正* 留奥 誠*
 和田 英夫* 村嶋 正幸* 久藤 真* 出口 克巳*
 白川 茂*

Modification of factor VIII by thrombin and factor Xa

Toshimichi UENO*, Reiko TAKEUCHI*, Tadashi NAGANO*,
 Makoto TOMEOKU*, Hideo WADA* Seiko MURASHIMA*
 Makoto KUTO*, Katsumi DEGUCHI* and Shigeru SHIRAKAWA*

Key words : factor VIII, thrombin, factor Xa, crossed
 immuno-affinity electrophoresis, disseminated
 intravascular coagulation

This report will deal with the evidence of the interaction in vivo as well as in vitro between thrombin and factor VIII, and with its clinical application. Formation of intrinsic factor X activator activity with thrombin (Xa)-activated factor VIII have also been studied. To elucidate the influence of thrombin (Xa) on the analytical procedures, thrombin (Xa) employed was coupled to Sepharose. The insolubilized thrombin (Xa) complex was readily eliminated from the test samples by filtration prior to their analysis. Thrombin caused an increase in factor VIII coagulant activity (VIII : C), which was followed by a decay of VIII : C to below baseline levels. Factor VIII was also activated by Xa especially in the presence of calcium and phospholipid. With a constant level of factor IXa, factor X activation was directly proportional to the phase of the activation and inactivation of VIII : C by thrombin (Xa). Sequential activation of factor VIII by thrombin and Xa showed that after peak activation, no further enhancement of factor VIII activity occurred, whether thrombin was the initial activation followed by Xa or vice versa. Crossed immuno-affinity electrophoresis demonstrated that plasmas with normal and thrombin-activated factor VIII had identical electrophoretic patterns. VIII : C in the DIC plasma, after incubating in vitro with thrombin, was lower compared with that in normal plasma, thus indicating a low activation in vitro in DIC. The rabbit DIC plasma also showed no further activation resembling to the human DIC plasma.

* 三重大学医学部第二内科〔〒514 津市江戸橋 2-174〕, The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mie University, Mie, Japan.

目 的

第Ⅷ因子 complex の thrombin および Xa による修飾態度および、それらの第Ⅹ因子活性化に対する効果について比較検討するとともに DIC の診断に thrombin 活性化Ⅷ:C を応用せんと試みた。

I. 方 法

1) thrombin-Sepharose (S), Xa-S: human thrombin (SIGMA, T-6759), bovine Xa (SIGMA, AF 10-RV) をそれぞれ CNBr-activated S-4B に固定化した¹⁾。2) thrombin (Xa) 修飾Ⅷ: 純化Ⅷ¹⁾ (正常血漿, 造血器腫瘍性疾患の DIC 血漿, 実験家兎 DIC 血漿) に thrombin(Xa)-S を加え 37°C に加温振盪し, 経時的に一定量を取り nylon filter (Parmacia) 濾過

を行った。これにより thrombin (Xa)-S を除去し thrombin (Xa)-S 修飾Ⅷを得た。3) Laurell 法, crossed immuno-affinity electrophoresis (CIAE): thrombin (Xa)-S を中間 agarose に混和する Krauss らの方法により行った。4) X activator activity (XAA): bovine X (1u/ml, SIGMA F-4003) 100 μ l, IXa (1u/ml, ϕ sterud ら³⁾の方法で精製) 100 μ l, 50mM CaCl₂ 200 μ l, phospholipid (Platelin) 100 μ l の incubation mixture (1 M) に諸種Ⅷ 100 μ l を加え, 合成発色基質 S-2222 (1.2mg/ml) 250 μ l による吸光度の変化を測定した。

II. 成績・総括

1) thrombin, Xa のⅧ:C に対する影響。
純化Ⅷに thrombin-S or Xa-S を添加すると、前者のⅧ:C は添加後 10 分で最大となり以後

VIII: Purified factor VIII

P: Plasma

—: Sepharose-thrombin (Fc 0.1 u/ml)

.....: Thrombin (Fc P:0.05 u/ml, VIII:0.01 u/ml)

(1-a)

Fig. 1 Effect of thrombin (1-a) and Xa (1-b, 1-c) on factor VIII

急速に不活化したが (図 1-a), 後者の活性化—不活化の変動は緩徐であり (図 1-b), この時相変化は Ca^{++} , phospholipid 存在下で急峻—安定を示した (図 1-c). thrombin (Xa)-S による VIII:C 不活性化時相に Xa (thrombin)

-S を加えても VIII:C 活性化は認められなかった. 2) thrombin・Xa 修飾VIIIの内因性 X 活性化に対する効果. thrombin-S (0.1u/ml), Xa-S (0.1u/ml) 添加VIIIにおける経時的活性化—不活化時相に従って得た thrombin-S 修飾 VIII,

Fig. 2 Effect of thrombin-Sepharose (left) and Xa-Sepharose (right) treated factor VIII on the time course of factor X activation

Xa-S 修飾VIIをそれぞれ IM に加え, XAA を測定すると, その O. D. 変化は thrombin-S・Xa-S 修飾 VII:C 値に依存した (図 2). これらの系で thrombin-S・Xa-S 添加VIIにおける反応時間を10分に一定すると, XAA の O. D. は, thrombin-S・Xa-S 濃度に平行して変化した. 3) thrombin 活性化VII:C の DIC 診断への応用. DIC 血漿の thrombin-S (0.1u/ml) in vitro 添加10分による VII:C 増加率は正常血漿と比較して低値傾向を示した. endotoxin を静注して DIC を惹起せしめた家兎の血漿では, thrombin-S 添加後の VII:C 値は増加せず, かえって減少する例も認められた. このVII:C thrombin activation は in vitro, in vivo ともにすでに thrombin の作用せる血漿においては起こらぬか, 起っても極めて軽微であり, DIC の時相診断にも有用な指標となりうると考えられた. 4) thrombin の VII R:AG に対する影響. thrombin-S による Laurell 法, CIAE では, 正常血漿, 正常血清, DIC 血漿のいずれの場合でもそれぞれ control としての S-4B による pattern と一致し, VII R:AG と thrombin-S との affinity は認められなかった (図 3).

Fig. 3 Crossed immuno-affinity electrophoresis

1) Normal Plasma 2) DIC Plasma
2) Normal Serum

III. 結 論

VII:C は thrombin および Xa により活性化—不活化の時相変化を来し, XAA もこれに相応し変化した. DIC 血漿においては VII:C

に対する thrombin 活性化の低下傾向が認められた。

文 献

- 1) Urata, T.: Studies on the thrombin-modified factor VIII: its evidence and clinical application. *Mie Med. J.*, **32**; 37~51, 1982.
- 3) Krauss, J. S. and Sheard, M. H.: Crossed

affinity electrophoresis of factor VIII related antigen. *Br. J. Haematol.*, **48**; 665~666, 1981.

- 3) Østerud, B., Rapaport, S. I., Schiffman, S. and Øhong, M. M. Y.: Formation of intrinsic factor-X-activator activity, with special reference to the role of thrombin. *Br. J. Haematol.*, **21**; 643~660, 1971.

●治療指針と問題点を解説する！

急性白血病の化学療法—基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人ほか 専門医33氏分担執筆
A 5判 268頁 図106 表65 定価6,800円(〒200円)

最近の急性白血病化学療法の進歩は著しいものがあり、新しい薬剤の開発と作用機序の解明、量、種類、使い方など、臨床のための数々の基礎的研究が全世界的にわたって集積された。本書はそれらの研究を整理して、ルーチン化できるものは治療指針として設立し、しかも現在の問題点を浮き彫りにして解説し、今後の研究に資した。

●内容：〔急性白血病化学療法の基礎〕第1章 白血病細胞の分化と化学療法、第2章 抗白血病剤の作用機序と臨床効果、第3章 造血器腫瘍細胞培養株の薬剤感受性度、第4章 細胞回転と化学療法、第5章 急性白血病における新しい治療法の試み、第6章 染色体分析からみた急性非リンパ性白血病化学療法の二、三の問題点、〔急性白血病化学療法の臨床〕第1章 成人急性白血病の化学療法、第2章 小児の急性リンパ性白血病の治療、第3章 血球成分の輸血療法、第4章 出血症状とその治療、第5章 感染症の治療、第6章 無菌病室による急性白血病治療、第7章 無菌室治療における腸管内無菌化処置、第8章 白血病の顆粒球機能異常と感染症化学療法、総括。