原 著

第Ⅷ因子とコラーゲンの相互関係

相原 守夫* Cooper, H.A.** , Wagner, R.H.**

Interaction of Factor VIII complex with collagen

Morio AIHARA*, Herbert A. COOPER** and Robert H. WAGNER**

Key words: factor VIII, collagen, von Willebrand's disease, collagen wedge, affinity immunoelectrophoresis

Factor VIII complex bound to both collagen in suspension and collagen coupled Sepharose beads with preferential binding of the forms of FVIII:Ag with the FVIII:RCoF. The FVIII:Ag in the eluate from collagen affinity column showed less anodal migration in crossed immunoelectrophoresis compared to the FVIII:Ag in the breakthrough fractions, suggesting the presence of higher molecular weight forms of FVIII:Ag in the eluate.

The new immunoelectrophoretic methods were described for studying the interaction between collagen and FVIII:Ag. Affinity immunoelectrophoresis with a collagen wedge revealed a different pattern of adsorption between FVIII:Ag in normal plasma and the FVIII:Ag in commercial FVIII preparations or in VWD IIa plasma. By the method of crossed affinity immunoelectrophoresis, most of the FVIII:Ag of normal plasma was adsorbed by the 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagen spacer gel, while no FVIII:Ag of variant VWD IIa plasma bound to the same concentration of collagen. Our methods of affinity immunoelectrophoresis with collagen spacer gel were easy to perform and may be useful for screening variant VWD plasmas. The use of an affinity wedge is a convenient method for finding quickly an optimal concentration of an affinity reagent.

* 弘前大学医学部第一内科〔〒036 弘前市本町 53〕, The First Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan.

** ノースカロライナ大学血栓止血部病理学, The University of North Carolina, Center for Thrombosis and Hemostasis, Department of Pathology, Chapel Hill, N.C., U.S.A.

はじめに

血中第Ⅷ因子は分子量 $1-20 \times 10^6$ の高分子糖蛋白で、ristocetin cofactor (FⅧR : RCoF) は血管内皮下組織への血小板粘着に必要とされる^{1,2)}。われわれは血小板の collagen への粘着能を固定血小板を用いた in vitro の検査として発表した³⁾。さらに、この固定血小板の collagen 粘着能におよぼす第Ⅷ因子の影響について検討し、FⅧR : RCoF を伴う第Ⅷ因子関連抗原 (FⅧR : Ag) の higher multimers が血小板 adhesion rate を促進させ von Willebrand 病 (VWD) I 型血漿中に浮遊した固定血小板の adhesion rate は正常血漿中のその約 20% と低値であることを報告した⁴⁾。第Ⅷ因子と collagen との相互関係については Nyman D. の報告⁵⁾以来いろいろ検討され⁶⁻¹³⁾、最近では FⅧR : Ag の higher multimers の collagen への優位結合が報告されている^{4), 12)}。この第Ⅷ因子の collagen への結合は、血小板の collagen への粘着におよぼす第Ⅷ因子の促進効果とともに in vivo での止血機構を解明する上で非常に重要な反応の 1 つと考えられる。今回、われわれは collagen affinity beads を用いて第Ⅷ因子の collagen への結合を観察し、さらに collagen 中間 gel を用いた affinity immunoelectrophoresis を開発したので報告する。

I. 材料および方法

1. 材料

collagen は牛アキレス腱 collagen (Ethicon) を用いた。collagen の濃度 (16mg/gm) は既述の方法³⁾により、一定量の Ethicon collagen を減圧下で乾燥させ、その重量を測定した。4% agarose beads は Sepharose CL 4 B (Pharmacia) を使用した。検体として、正常血漿, variant VWD (タイプ IIa) 血漿, 市販第Ⅷ因子製剤を用いて collagen との結合を検討した。検体中の FⅧR : Ag 量は、すべて VWD (タイプ I) 血漿により布積して 1 u/ml に調整した。VWD 血漿 : タイプ I (FⅧ : C $< 0.01 \text{ u/ml}$, FⅧR : Ag $< 0.06 \text{ u/ml}$, FⅧR : RCoF $< 0.06 \text{ u/ml}$), タイプ IIa (FⅧ : C 0.5 u/ml , FⅧR :

Ag 2.2 u/ml , FⅧR : RCoF $< 0.06 \text{ u/ml}$), 市販第Ⅷ因子製剤 : Koate (Cutter Labs.), Hemofil (Hyland Div., Travenol Labs.), Profilate (Alpha Therapeutic Corp.)

2. 方法

1) 第Ⅷ因子活性測定法

第Ⅷ因子凝固活性 (FⅧ : C) は重症血友病 A 患者血漿を用いた Kaolin 活性化 PTT 一段法で測定した¹⁴⁾。FⅧR : Ag は 1% agarose (0.1% 抗第Ⅷ因子抗血清) を使用し Laurell 法で測定した¹⁵⁾。FⅧR : RCoF は固定血小板の ristocetin (0.6-1.2 mg/ml) 凝集を PAYTON 凝集計を用いておこなった¹⁶⁾。おのおのの第Ⅷ因子活性は正常血漿 1 ml 中のそれを 1 unit として表わした。

2) Crossed immunoelectrophoresis (CIE)

FⅧR : Ag の CIE は既報に準じて Gelman 泳動槽を用いておこなった¹⁵⁾。また一部の実験では 1.75% acrylamide-0.5% agarose gel (C=5%) を用いて CIE をおこなった後、Silver Stain¹⁷⁾ にて沈降線を検出した。

3) Collagen

collagen 浮遊液は 0.15 M NaCl 中に既報の方法に準じて作製した⁴⁾。Ethicon collagen を蒸留水に加えて、 4°C にて数時間攪拌し浮遊させた。この collagen 液を等量の 0.3 M NaCl 液で布積し、使用時まで 4°C に静置した。collagen beads は 100 gm の Sepharose CL 4 B を CNBr で活性化 (pH 11.2) し、0.01 M PBS 洗浄後、8 gm の collagen と 4°C で一昼夜反応させた。beads を洗浄後、0.02 M 酢酸液中で保存 (4°C) し、0.05 M TBS (pH 7.3) にて洗浄して使用した。

denatured collagen は collagen 液あるいは collagen beads を 10-15 分間 boiling water 中で加熱処理して用いた。また一部の実験では Cytodex [®]3 beads (Pharmacia) を使用した⁴⁾。

4) 純化第Ⅷ因子

正常血漿, あるいは、第Ⅷ因子製剤より得た PEG 分画を 4% agarose で gel filtration をおこなった。void volume に相当する第Ⅷ因子をプールして再度 30% PEG により沈殿させ 0.05 M TBS に浮遊させた後 -70°C に保存し

Fig. 1 Binding of FVIII related activities of normal plasma to collagen at different concentrations. Equal volumes of normal human plasma and collagen were mixed at 1000 rpm for 5-10 min at 37°C. Activities remaining in the supernatant were determined after collagen was removed.

た¹⁵⁾.

5) 第Ⅷ因子—collagen 結合実験

(1) バッチ法：被検血漿あるいは純化第Ⅷ因子を collagen と等量混合し、37°C にて 5～10 分間、1000 rpm で攪拌した。3000 rpm、1—2 分遠心後、上清中の残存第Ⅷ因子活性を測定し、対照 (0.15 M NaCl と等量混合) と比較した。

(2) Affinity chromatography

collagen beads にて作製した collagen affinity column (0.9×15 cm bed height) に正常血漿あるいは純化第Ⅷ因子を 10 ml/hr の一定流速で添加し、0.05 M TBS でカラム洗浄後、collagen に結合した第Ⅷ因子を種々の緩衝液で溶出した。各フラクション (1～2 ml) の蛋白濃度は 280 nm 吸光度で判定し、第Ⅷ因子活性を前述の方法により測定した。

(3) Affinity immunoelectrophoresis (AIE)

collagen wedge-AIE を 1% agarose を用いておこなった。検体注入用の well (0.2×3 cm) の上部に wedge 型 (2×0.8 cm) の collagen 含有中間 gel を図 4 のように作製し、さらにその中間 gel の上部に抗第Ⅷ因子抗体含有 gel を

作った。中間 gel は 1% agarose 中に collagen 浮遊液を 200—400 μg/ml に含むように作製した。検体は全て FVIII:Ag 量を 1 u/ml に調整して泳動をおこなった。8 mA の定電流で 24 時間泳動後、PBS (pH 7.4) で洗浄し、0.5% Coomassie Blue R 250 (Sigma) で染色した。

(4) Crossed affinity immunoelectrophoresis crossed AIE は Concanavalin A を用いた原法¹⁸⁾に従っておこなった。検体を一次元方向に 16mA、3 時間泳動後、一定濃度 (100, 200, 400 μg/ml) に collagen を含んだ中間 gel (1% agarose) を作り、一次元と直角方向に 8 mA、24 時間泳動して 0.1% 抗第Ⅷ因子抗体と反応させた。Coomassie Blue で染色後、泳動パターンを collagen を含まない対照 gel のものと比較することにより FVIII:Ag multimers の collagen への結合を検索した。

II. 結 果

正常血漿中の第Ⅷ因子は、FVIII:C, FVIII:Ag, FVIII:RCOF いずれも collagen に濃度依存性に結合した (図 1)。第Ⅷ因子の collagen への親和性は、図 1 からわかるように FVIII:

Fig. 2 Binding of FVIII R:RCoF of purified FVIII complex to collagen beads or collagen in suspension. Various concentrations of purified FVIII were incubated with equal amount of collagen at 1000 rpm for 5-10 min at 37°C.

RCoF が FVIII : C, FVIII R : Ag に比べ大であった。すなわち collagen 終濃度 200 µg/ml では FVIII : C, FVIII R : Ag の約 50% が結合しているのに対し FVIII R : RCoF の全てが結合していた。このような FVIII R : Ag の collagen への結合親和性の違いは、正常血漿と variant VWD IIa 血漿中の FVIII R : Ag でもみられ variant VWD の FVIII R : Ag は正常血漿中のそれに比べ collagen への結合は低かった⁴⁾。denatured collagen への正常血漿中の第VIII因子の親和性を加熱処理 collagen あるいは Cytodex [®]3 beads を用いて検討したが、第VIII因子活性の結合は全くみられなかった。

Collagen affinity beads を用いた実験でも同様の第VIII因子活性の結合がみられ、純化第VIII因子 (4-6u FVIII R : RCoF/ml) を用いた成績では、FVIII R : RCoF の collagen beads への結合は 10-13 units/ml beads であった (図 2)。

正常血漿 5 ml を collagen affinity column に添加して非吸着分画と、溶出分画 (この実験では 10% ethylene glycol buffer) を得た。非吸着分画は FVIII R : RCoF を伴わない FVIII R : Ag (0.15 u/ml) を含み、溶出分画は FVIII

Fig. 3 Crossed immunoelectrophoresis of FVIII R: Ag in unbound and bound fraction. FVIII R: Ag 0.15 u/ml in breakthrough (UPPER), 0.26 u/ml in eluate (LOWER).

R : RCoF と FVIII : C の両活性を有する FVIII R : Ag (0.26 u/ml) を含んでいた。PEG により濃縮後、この両分画を 1.75% acrylamide-0.5% agarose による CIE により比較した。非吸着分画の FVIII R : Ag の泳動パターンは溶出分画のそれより陽極へ泳動されるものに富んでいた (図 3)。

FVIII R : Ag の collagen への結合は collagen 中間 gel を用いた電気泳動でも観察され、われわれは AIE の 1 つとして collagen wedge gel を利用した方法を開発した。図 4 に示すように中間 gel 中の collagen 濃度の高い部分、すなわち collagen gel の右側部分で免疫沈降線の高さが低くなり FVIII R : Ag が中間 gel 中の collagen に結合したことを示唆している。加熱処理による denatured collagen を含んだ中間 gel には FVIII R : Ag の結合は全くみられずパッチ法と同様の結果であった。collagen wedge を用いた本法により、正常血漿、variant VWD IIa 血漿、市販第VIII因子製剤中の FVIII R : Ag を 1 u/ml に濃度調整して collagen への affinity をみた。正常血漿中の FVIII R : Ag は 200 µg/ml collagen wedge の約半分の部分で吸着されてい

たのに対し VWD IIa 血漿中の FVIII:Ag は $200 \mu\text{g/ml}$ の濃度の部分でも完全には吸着されていなかった. 市販第 VIII 因子製剤中の FVIII:Ag も図 4 に示すように VWD IIa と同じように collagen への結合は低かった. 市販第 VIII 因子製剤の多くは, F VIII R:Ag の低分子部分に富んでいることが指摘され¹⁹⁾, 今回われわれが使用したのも, FVIII:RCoF/FVIII:Ag 比をみると 0.16, 0.23, 0.25 といずれも低値であった. また 3% agarose による CIE では既報の成績¹⁵⁾と同様に FVIII:Ag の低分子部分が多いことを示唆していた (図 5). $400 \mu\text{g/ml}$ collagen wedge でも (この場合, 正常 FVIII:Ag は中間 gel の約 1/4 の濃度の部分で完全に吸着されていた) VWD IIa の血漿, 市販第 VIII 因子製剤の FVIII:Ag の低親和性が観察された (図 4).

collagen wedge を用いた AIE の結果より一定濃度 ($100 \mu\text{g/ml}$) の collagen 中間 gel を作製して, crossed AIE をおこなった. 正常 FVIII:Ag のほとんどが collagen に吸着されているのに対し, VWD IIa 血漿中の FVIII:Ag は collagen への結合が全くみられず対照 gel の泳動パターンと同一であった (図 6).

III. 考 案

正常血漿中の第 VIII 因子活性として, FVIII:C, FVIII:Ag, FVIII:RCoF は collagen 浮遊液に結合し, FVIII:RCoF の優位結合とともに Santoro の報告⁸⁾¹²⁾と一致した. これは第 VIII 因子の higher multimers の collagen への親和性が高いことを示唆するもので, VWD IIa 血漿中の FVIII:Ag の collagen への反応成績もこれを支持するものと考えられる. また collagen affinity column を用いて正常血漿から得た非吸着分画の FVIII:Ag が溶出分画よりも CIE にて陽極へ泳動されるものに富んでいたこと (図 3) も FVIII:RCoF を伴わない FVIII:Ag の

Fig. 4 Affinity immunoelectrophoresis with collagen wedge gel. UPPER: Collagen concentration in spacer gel, $200 \mu\text{g/ml}$. LOWER: collagen $400 \mu\text{g/ml}$. Samples, commercial FVIII (left), normal plasma (middle), VWD IIa plasma (right). The amount of FVIII:Ag in test samples was adjusted to 1 u/ml .

Fig. 5 Crossed immunoelectrophoresis of FVIII:Ag in commercial FVIII preparation using 3% agarose gel. The gel was stained with 0.5% Coomassie Blue.

collagen への低親和性を示しているものである. また, 種々の溶出条件の検討より, この FVIII:RCoF と collagen との結合様式は electrostatic binding と hydrophobic binding の両者が関与しているものと思われ (未発表), Santoro の報告¹⁰⁾とは異なっていた.

FVIII:Ag の collagen への結合は電気泳動下でも観察され, われわれは 2 つの collagen 中間 gel を用いた AIE を開発した. 1 つは, collagen wedge を使用した AIE で, 正常血漿中の FVIII:Ag はこの中間 gel 中の collagen 濃度の高い部分, 約 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上で完全に結合していた. higher multimers の欠如あるいは低下していると考えられる VWD IIa 血漿中の FVIII:Ag は $200 \mu\text{g/ml}$ の濃度の部分でも完全には結合しなかった. 市販第 VIII 因子製剤も FVIII

Fig. 6 Crossed affinity immunoelectrophoresis. Collagen concentration in left spacer gels, 100 µg/ml. Right spacer gels are 1% agarose without collagen. Sample, normal plasma (UPPER) or VWD IIa plasma (LOWER). Anti-F VIII R: Ag concentration, 0.1%.

R: Ag の低分子部分に富んでおり, FVIII R: RCoF/FVIII R: Ag 比は 0.16—0.25 と低値を示したが, これらの FVIII R: Ag はいずれも VWD IIa の FVIII R: Ag と同様に低親和性がみられた (図 4). 第 2 の crossed AIE では正常 FVIII R: Ag のほとんどが 100 µg/ml collagen 中間 gel に結合していたが, VWD IIa の FVIII R: Ag は全く結合がみられず, collagen wedge AIE での結果と一致していた. Schossler らは FVIII R: Ag を collagen Sepharose beads を含んだ gel (1 mg/ml) 中で一次元泳動後, 二次元で抗血清と反応させ, collagen と結合した FVIII R: Ag 量を報告しているが, その電気的泳動度は collagen を含まない対照 gel のそれに比べ小さかったとしている¹¹⁾. これは collagen beads に結合した FVIII R: Ag の可逆的な解離によるものかも知れないが, われわれの検討では電気泳動による collagen beads からの結合 FVIII R: Ag の解離はみられなかった.

最近, 三上らはレクチン (RCA-120) を用い

た crossed AIE により VWD IIa の FVIII R: Ag は RCA-120 に対する親和性がほとんどなく FVIII R: Ag 中の糖, 特に galactose residues の欠乏を報告している²⁰⁾. VWD IIa 血漿中の FVIII R: Ag の collagen に対する低親和性も, 分子サイズの異常に加え第 VIII 因子の糖鎖異常の関与も否定できない.

collagen 中間 gel を用いた AIE は手技が簡単であり, また第 VIII 因子の分子異常, 特に, variant VWD のスクリーニングに有用と思われた. さらに, affinity wedge を用いた本法は affinity reagents の至適濃度を迅速に決定する上で簡便なものと考えられる.

結 論

正常血漿中の FVIII: C, FVIII R: Ag, FVIII R: RCoF は collagen に濃度依存性に結合した. FVIII R: RCoF の結合が優位であり, また collagen affinity column よりの非吸着分画中の FVIII R: Ag は溶出分画中のそれより陽極へ泳動されるものに富んでいた. collagen 中間 gel を用いた AIE により正常血漿中 FVIII R: Ag と VWD IIa, 市販第 VIII 因子製剤中の FVIII R: Ag の collagen への親和性の違いを観察することができた.

文 献

- 1) Hoyer, L.W.: The factor VIII complex: Structure and function. *Blood*, **58**:1~13, 1981.
- 2) Cooper, H.A.: CRC Handbook Series in clinical Laboratory Science, Section 1, West Palm Beach, FL, 1980, p.61~83.
- 3) Aihara, M., Cooper, H.A., Wagner, R.H.: A quantitative method for studying platelet adhesion to collagen. *J. Lab. Clin. Med.*, in press.
- 4) Aihara, M., Cooper, H.A., Wagner, R.H.: Platelet-collagen interactions: Increase in rate of adhesion of fixed washed platelets by factor VIII-related antigen. *Blood*, **63**;

- 495~501, 1984.
- 5) Nyman, D.: Interaction of collagen with the factor VIII antigen-activity-von Willebrand factor complex. *Thromb Res.*, **11**; 433~438, 1977.
 - 6) Legrand, Y.J., Rodriguez-Zeballos, A., Kartalis, G., Fauvael, F., Caen, J.P.: Adsorption of factor VIII antigen-activity complex by collagen. *Thromb. Res.*, **13**; 909~911, 1978.
 - 7) Nyman, D.: von Willebrand factor dependent platelet aggregation and adsorption of factor VIII related antigen by collagen. *Thromb. Res.*, **17**; 209~214, 1980.
 - 8) Santoro, S.A.: Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. *Thromb. Res.*, **21**; 689~693, 1981.
 - 9) Scott, D.M., Griffin, B., Pepper, D.S., Barnes, M.J.: The binding of purified factor VIII/von Willebrand factor to collagens of differing type and form. *Thromb. Res.*, **24**; 467~472, 1981.
 - 10) Santoro, S.A., Cowan, J.F.: Adsorption of von Willebrand factor by fibrillar collagen—implications concerning the adhesion of platelets to collagen. *Collagen Rel. Res.*, **2**; 31~43, 1982.
 - 11) Schossler, W., Dittrich, C.H.R.: Crossed immuno-affinity electrophoresis—A method for analysing the interactions of factor VIII related antigen with vessel wall proteins. *Thromb. Res.*, **28**; 677~680, 1982.
 - 12) Santoro, S.A.: Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, **756**; 123~126, 1983.
 - 13) Morton, L.F., Griffin, B., Pepper, D.S., Barnes, M.J.: The interaction between collagens and factor VIII/von Willebrand factor: Investigation of the structural requirements for interaction *Thromb. Res.*, **32**; 545~556, 1983.
 - 14) Langdell, R.O., Wagner, R.H., Brinkhous, K.M.: Effect of antihemophilic factor on one stage clotting tests. A presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J. Lab. Clin. Med.*, **41**; 637~647, 1953.
 - 15) Lamb, M.A., Reisner, H.M., Cooper, H.A., Wagner, R.H.: The multimeric distribution of factor VIII related antigen studied by an improved crossed immuno electrophoresis technique. *J. Lab. Clin. Med.*, **98**; 751~763, 1981.
 - 16) Sarji, K.E., Stratton R.D., Wagner, R.H., Brinkhous, K.M.: Nature of von Willebrand factor: A new assay and a specific inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**; 2937~2941, 1974.
 - 17) Oakley, B.R., Kirsh, D.R., Morris, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105**; 361~363, 1980.
 - 18) Bøg-Hansen, T.C.: Crossed immuno-affinity electrophoresis: An analytical method to predict the result of affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, **56**; 480~488, 1973.
 - 19) 三上定昭, 西野正人, 高橋幸博, 吉岡 章, 植原善彦, 中川 治, 中尾昌史, 仲西郁雄: 第VIII因子濃縮製剤中の第VIII因子/von Willebrand因子の不均一性について. 第1報: 第VIII因子凝固活性, von Willebrand 因子活性及び第VIII因子関連抗原量と交叉免疫電気泳動像. *奈医誌*, **32**; 1~6, 1981.
 - 20) Mikami, S., Ueda, M., Yasui, M., Takahashi, Y., Nishino, M., Fukui, H.: Heterogeneity of sugar composition of factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease: Analysis by crossed affinity immunoelectrophoresis using lectin (*Ricinus communis* agglutinin-120). *Thromb. Haemostas.*, **49**; 87~90, 1983.