第 VII 因子による外因系凝固開始とその調節機構

三上貞昭*

Initiation of extrinsic coagulation by factor VII and its regulation

Sadaaki MIKAMI*

Key words: Factor VII, Tissue factor, Extrinsic coagulation

はじめに

血液凝固機構を理解する上での聖典ともなるべきカスケード論¹⁾²⁾によれば、血液凝固は明らかに異なる2系により開始される。血液をガラス管内に放置すれば10~20分にてフィブリン塊が形成される。内因凝固系と呼ばれ、ガラス管への Hageman 因子(第Ⅻ因子)の反応により開始されると考えられている。一方種々組織抽出物が血液に加われば血液は10~15秒で凝固する。外因凝固系と呼ばれ、第Ⅶ因子が組織中に存在する組織因子と反応することにより開始されることはよく知られているところである。両系は第Ⅹ因子の活性化以後共通となる。この段階までに内因凝固系では多くの因子が関与するが、外因凝固系では組織因子と第Ⅶ因子が関与するのみである。従来より外因凝固系は次のごとく受け入れられている。

(1) 第X因子 $\xrightarrow{\text{組織因子} + \text{第VII因子}}$ 第Xa因子

(2) プロトロンビン $\xrightarrow{\text{Xa} + \text{第 V 因子}}$ トロンビン

(3) フィブリノゲン $\xrightarrow{\text{トロンビン}}$ フィブリン

本稿の目的の一つは(1)の過程を解説することにあるが、組織因子と第Ⅶ因子の反応様式に関しては近年漸くいくつかの検索が試みられるようにはなっているが、まだ数多くの未知の分野が存在する。血液凝固機構を把握する上で最も遅れている部位の一つであろう。一方では組織因子+第Ⅶ因子の第Ⅸ因子に対する活性化作用 (alternative pathway) も明らかにされてきており、また第Ⅶ因子の活性化因子としての第Ⅹa 因子をはじめ、内因凝固系因子である第Ⅸa 因子、第Ⅻa 因子なども報告されており、in vitro においてさえ内因および外因凝固系の相互の絡みは多彩となってきた。

本稿では第Ⅶ因子による外因凝固系の開始機序を検討するために、第Ⅶ因子、組織因子の生化学的特性および両因子の反応様式を解説し、次いで第Ⅹおよび因子に対する活性化作用、更に第Ⅹa およびⅨa 因子による第Ⅶ因子の活性化作用につき述べる。また外因凝固開始相に

* 奈良県立医科大学新生児病室〔〒634 橿原市四条町 840〕, Neonatal Care Unit, Nara Medical College, Nara-ken 634, Japan.

対する調節（抑制）機構についても言及したい。

I. 第 VII 因子と組織因子の相互反応

1. 第 VII 因子

血液凝固第 VII 因子は他の ビタミン K 依存凝固因子同様肝で生成され、 γ -carboxylglutamic acid (Gla) を有する serine protease zymogen であるが、ヒト血漿含有量が約 $0.4 \mu\text{g/ml}$ と微量であること、活性化または失活化を受け易い蛋白であることなどの理由により生化学的解析が遅れている因子である。近年 ウン^{3,4)}に引き続きヒト⁵⁻⁸⁾においても純化法が確立され、非活性型のまま高度純化された蛋白を用いて種々の検討が加えられるようになってきた。最も安定した純化法の一つとして Brose ら⁵⁾⁶⁾の方法の概要を紹介すれば、(1)高濃度の protease inhibitor を添加した 20 l のクエン酸血漿を出発材料とし、(2)従来の ビタミン K 依存凝固因子群の純化法同様、塩化バリウム吸着および溶出、(3) DEAE Sepharose chromatography ($0 \rightarrow 0.5 \text{ M NaCl}$ gradient), (4) QAE Sephadex chromatography ($0 \rightarrow 5 \text{ mM CaCl}_2$ gradient), (5) Sephadex G100 または Ultrogel AcA44 gel filtration の順である。血漿を 1 とした場合の純化倍数は 12 万～16 万倍、回収率は約 30% を示した。即ち血漿 20 l より約 3 mg の蛋白が純化された。筆者も Brose の変法を用いて Ultrogel AcA44 を Ultrogel AcA54 に変えて純化を試みた⁹⁾が、ほぼ同様の成績を得た。

ヒト第 VII 因子は SDS PAGE で分子量約 48 K (非還元) を示す 1 本鎖の蛋白で⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾ (図 1), 9～10 個の Gla を含むと考えられている⁷⁾。N 末付近のアミノ酸一次構造はプロトロンビンおよび第 X 因子の軽鎖と著しい相同性を有する⁵⁾が、FDP に対する感受性はウシでは低く¹⁰⁾¹¹⁾、アンチトロンビン III (AT-III) による抑制もヘパリン存在下においてさえ非常に低速度であることが報告されている⁵⁾¹²⁾¹³⁾。

2. 組織因子 (TF)

TF (組織トロンボプラスチン, TPL) は数多くの組織に存在し、蛋白部分と脂質部分を含む因子としてとらえられていた¹⁴⁾が、アポ蛋白

図 1 純化ヒト第 VII 因子の 7.5 % SDS ポリアクリルアミド電気泳動像。A; $5 \mu\text{g}$ 添加, B; $2 \mu\text{g}$ 添加。非還元での分子量は 48 K を示した。

III と呼ばれる一連の蛋白とリン脂質の結合物であることが明らかにされている¹⁵⁾。アポ蛋白 III は全ての組織に存在するものと考えられるが、特に含有量の多い臓器は脳、甲状腺、肺、胎盤である。また単球によっても合成されることが報告されている¹⁶⁾。

アポ蛋白の純化は本蛋白が疎水性であるため処理し難い点もあるが、適当な detergent 下で脱脂、蛋白溶解を行えばかなり高い回収率で蛋白の純化が可能となってきた¹¹⁾¹⁷⁻¹⁹⁾。このうち Bach ら¹¹⁾の行った代表的純化法を要約すれば、(1)脳のアセトン抽出物を、(2)さらにトリトン X-100 で抽出し、(3)デオキシコール酸存在下に Con A Sepharose 吸着および溶出を行い、(4)更に SDS 存在下に preparative PAGE を反復するものである。純化アポ蛋白 III は SDS PAGE にて一本鎖であり、分子量は約 43 K として受け入れられるようになった。

アポ蛋白単独では TF としての活性を有しないので、リン脂質と結合させる必要がある。ウシ脳 TF のリン脂質部分の分析ではフォスファチデルエタノールアミン (PE) 35%, フォスファチデルコリン (PC) 23%, スフィンゴミエリ

ン 21%, フォスファチジルセリン (PS) 15%, フォスファチジルイノシトール 6% の構成比と考えられる¹¹⁾が, Nemerson の検討²⁰⁾によりこのうち PE, PC が陰性荷電の PS 存在下で高活性を発揮することが知られている. 結合に用いられるリン脂質は天然アセトン抽出—クロロホルム抽出物のリン脂質分画が用いられることもある¹¹⁾¹⁹⁾²¹⁾が, 通常純化物の組み合わせ (PC+PS, PE+PS など²²⁻²⁴⁾) で用いられる. いずれも charged lipids としてである. 蛋白部分と脂質部分の結合法には CdCl_2 法¹¹⁾²¹⁾, octylglucoside 法²⁵⁾などがあり, Bach らによれば合成 TF のリン脂質/蛋白比 (W/W) は 450:1 以上である¹¹⁾.

3. 第 VII 因子と TF の反応

外因系凝固は損傷局所において組織表面または組織より漏出した TF と循環第 VII 因子との反応下に開始される. 外因系は損傷血管局所での止血に重要な役割を果たしていると考えられるが, その第 1 段階である第 VII 因子と TF の反応様式に関しては十分な解明がなされていない. 以前には TF の作用にて第 VII 因子が活性化されるのではないかと考えられた時期もあったが, 現在では第 VII 因子が活性化されるためには後述のごとく第 Xa, IXa, XIIa 因子またはトロンビンなどの作用を受けなければならないと考えられている. 外因凝固系の開始において第 VII 因子と TF の相互反応のみでは両者は複合体 (VII-TF) を形成するとの概念が広く受け入れられるようになってきている. しかしながら VII-TF の形成反応を直接検討した報告は意外に少ない. 前述のごとく TF は疎水性蛋白 (アポ蛋白) と脂質より構成され, TF 活性を発揮する水系溶液内では粒子として存在する. このため VII-TF が形成されても PAGE では明確なバンドとしてゲル内に入り難いし, SDS PAGE では detergent である SDS にて TF の蛋白部分, 脂質部分がともに変化を受け, 複合体が再解離する. また蛋白のゲルろ過分析法を用いても TF が疎水性で, かつ VII-TF の検索は粒子のまま行わなければならないことより明確な同定が困難であるところに問題があるのであろう.

VII-TF の同定法の一つとして超遠心分離法

図 2 VII-TF, VIIa-TF の競合性

種々濃度の第 VII 因子, TF (▲ 0.1 mM, ■ 1 mM), CaCl_2 (5 mM) 混合物に ^3H -第 IX 因子 (200 nM), 第 VIIa 因子 (0.2 nM) を添加し, ^3H -IX の活性化を測定した. TF 0.1 nM では第 VII 因子の濃度増加に従い VIIa-TF $\rightarrow$ VII-TF となり ^3H -IX の活性化能は低下するが, TF 1 nM の高濃度では過剰 TF が VII-TF を形成する間は ^3H -IX 活性化能が上昇した (Zur ら²⁷⁾).

が応用される. これは VIII-リン脂質複合体の証明法としても用いられている²⁶⁾が, TF とラジオアイソトープで標識した第 VII 因子を 20% sucrose で超遠心 (95,000 rpm) すれば複合体を形成した第 VII 因子は TF 分画に移行することにより証明される²⁴⁾. 今一つの方法は間接的証明法であるが, Zur ら²⁷⁾は VII(a)-TF の ^3H -IX に対する活性化ペプチド遊離能で検索した. 即ち VII-TF の有する弱い第 IXa 因子形成能と VIIa-TF の有する強度の形成能を基礎にしたもので, 一定量の第 VIIa 因子と微量の TF の反応

液中に種々濃度の第VII因子を添加すれば、第VII因子濃度が増加するに従い、第IXa因子形成能は競合的に低下することを観察した(図2)。このことから彼らはVII-TF, VIIa-TF 複合体形成系を以下のごとく想定した。

次に VII(a)-TF の形成に関して第 VII(a) 因子あるいは TF のいずれの部位が複合体形成に関与するのかが問題となる。現在のところ明確な解答は出ていない。第VII因子はGla蛋白であり、一方 TF のリン脂質部分は charged lipids であるので、他のビタミンK依存凝固因子におけるリン脂質との反応同様カルシウム依存性に結合することが第一に想定され、また概念的にはそのように受け入れられている²⁴⁾。一方反論もあり Ogston は²⁸⁾第VII因子は蛋白部分と、第X因子は基質としてリン脂質部分と結合するとの仮説を提唱している。この仮説を支持するものとして Carson ら²⁴⁾はウシ TF を免疫して作成したモノクローナル抗体は分子量約 43K のアポ蛋白ポリペプチドとよく反応し、TF 活性を抑制するのみならず、第VIIa因子の結合も抑制することを報告した。これらの論争に対して筆者が行った検討をつけ加えておく(図3)。まず純化を微量の detergent 存在下で出来る限り粒子構造を保ったまま activated CH-Sepharose に固相化させた。次いで純化第VII因子をカルシウム存在下に反応させれば、すみやかにVII-TF が形成され上清に残存する第VII因子は減少することを認めた。この反応系で第VII因子とともに TF, アポ蛋白またはリン脂質部分を各々共存せしめると、TF 共存では固相 TF と強度の競合が出現するため上清残存第VII因子は増加した。この競合性はリン脂質では中等度、アポ蛋白では軽度となった。この成績は VII-TF 形成時の TF 側の反応部位はリン脂質が関与することを示唆するものであった。しかしながら第VII因子とリン脂質あるいはアポ蛋白のみでは第X因子の活性化作用は観察されない。VII(a)-TF として活性を発揮するためには TF は両

図3 VII-TF に対する TF, リン脂質, アポ蛋白の競合性

Activated CH-Sepharose に固相化した TF に第VII因子 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CaCl_2 (5 mM) を混入し、更に TF (TPL), リン脂質 (PL), またはアポ蛋白 (APO) を混入し、上清残存の第VII因子を radioimmunoassay にて測定した。横軸の濃度は TF およびアポ蛋白の場合 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, リン脂質ではスタンダード溶液を1とした場合の希釈度を示す。

成分が結合していることが必要である。

II. 第VII因子の活性化

第VII因子は serine protease zymogen であり、数多くの因子の作用により活性化を受ける。このうち最も強力なものは第Xa因子による positive feedback である。ウシおよびヒト第VII因子はカルシウムイオン、リン脂質存在下で第VII因子により容易に活性化されることが報告されている⁵⁾¹⁰⁾²⁹⁾³⁰⁾。本活性系はリン脂質が存在しないと速度は著しく低下し、1/400となる²⁹⁾³⁰⁾。ヒトの場合第VII因子は分子量 48K の単鎖蛋白であるが、活性化過程で限定分解を受け、2鎖蛋白 (重鎖約35K + 軽鎖約21K, 第VIIa因子) に変化する⁵⁾⁷⁾ (図4)。純系で第VII因子 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 第Xa因子 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CaCl_2 (10 mM) およびリン脂質 (30 μM) を 37°C で反応させれば第VII因子の活性化は約 10 分で完了する⁷⁾

(図5)。さらに第Xa因子は第VII因子の活性化に引き続き、経時的に第VIIa因子の不活化をもきたすことが知られている²⁹⁾。この際第VIIa因子重鎖の arg-gly 結合を分解すること

図 4 第 Xa 因子による第 VII 因子の活性化

により C 末端より分子量約 12K のペプチド (セリンを含む) を遊離し, 小分子量化する¹⁰⁾.

第 Xa 因子以外に第 VII 因子の活性化作用を有するものには第 IXa 因子がある³⁰⁻³²⁾. 本因子もリン脂質, カルシウム存在下の純系³⁰⁾で第 Xa 因子と同一分解部位にて第 VII 因子の活性化をもたらすが, その効果は第 Xa 因子より弱く約 1/800 であると考えられる³⁰⁾.

Rao ら³³⁾も高濃度の第 IXa 因子, 低濃度の第 Xa 因子の ¹²⁵I-VII に対する活性化作用を検討し, in vitro での血漿混入系においても両因子は生理的濃度において第 VII 因子の著しいアクチベータとなることを認めている. しかしながら in vivo での止血反応においては第 VII 因子の活性化率は非常に低いものであろうと予想される. 数字上の対比はできないかも知れないが, 約 5% の第 VII 因子レベルがあれば正常止血機能が維持出来ることはよく知られているところである.

第 XIIa 因子⁵⁾³²⁾³⁴⁾ およびそのフラグメント (分子量約 30K および 70K³¹⁾³⁵⁾) による第 VII 因子の活性化もウシ, ヒト純系により証明されている. 本系ではリン脂質などの補因子を必要としない. またカリクレインによる第 VII 因子の活性化も示唆されている³¹⁾³⁶⁾³⁷⁾が, 第 XII 因子の活性化を介したものであるとする見解もある³⁷⁾. 上記の第 IXa, XIIa 因子は内因系凝固因子であるので, 後述する alternative pathway とともに内因系と外因系凝固の相互関連が認められる経路である.

Positive feedback としてトロンビンも第 VII 因

図 5 第 Xa 因子, リン脂質, カルシウムによる第 VII 因子の活性化

第 VII 因子 (50 μg/ml), 第 Xa 因子 (1 μg/ml), リン脂質 (30 μM), CaCl₂ (10 mM) 反応系の第 VII 因子を凝固法 (●), amidolytic assay (○) にて測定した (Pajaj ら⁷⁾).

子の活性化作用を有する²⁹⁾が, リン脂質の有無によっても活性化率には変化が認められない.

III. VII-TF, VIIa-TF の凝固活性

VII-TF および VIIa-TF の凝固活性は第 X 因子の活性化および alternative pathway としての第 IX 因子の活性化を観察することにより検討されている. 通常の 1 段法で測定した第 VII 因子凝固活性は第 VIIa 因子を用いれば非活性型第 VII 因子の 20~30 倍の見かけ上の凝固活性の増加をもたらすが⁵⁾⁷⁾³⁰⁾³⁵⁾, 外因系凝固の開始時には第 VII 因子は未だ活性化されておらず, したがって第 VIIa 因子は存在しないと仮定すれば, VII-TF が何らかの凝固活性を発揮しなければ

ならないことになる。

正常血漿におけるプロトロンビン時間 (PT) 測定で第VII因子とTFの濃度を観察すれば、第VII因子血漿濃度が $0.4 \mu\text{g/ml}$ 前後であるのに対し、TFは純化物を用いた場合においてさえ $150\sim 200 \mu\text{g/ml}$ と著しく高濃度である。TFを希釈すれば直ちにPTが延長するからである。事実純系で第VIIa因子を一定にした場合ウシTF剤の濃度を25倍にすれば、Km(第IX因子)は87から243 nMへ、Km(第X因子)は88から433 nMへと上昇することが知られている³⁹⁾。しかしながらVII(a)-TF形成のみを考えれば理論上これだけ高濃度のTFは必要でないため、VII(a)-TF活性の検討の多くは等モル付近にて行われている。

まず最初にVIIa-TFの第X因子活性化につき述べれば、純系で第VIIa因子 $6.86 \mu\text{g}$ に対して $4 \mu\text{g}$ のTFで $^3\text{H-X}$ より十分な活性化ペプチドが遊離される。反面結合のないリン脂質+アポ蛋白では活性化は非常に弱い²¹⁾。

VII-TFの第X因子活性化作用はVIIa-TFに比較し非常に弱いが存在することが認められている¹³⁾。本稿では筆者の成績を中心に述べる(図6)。第VII因子($0.5 \mu\text{g/ml}$)、TF($0.5 \mu\text{g/ml}$)および CaCl_2 (5 mM)で弱いながらも第X因子の活性化(S 2222の発色およびSDS PAGEでの第Xa因子の存在)が観察された。本系内において形成された第Xa因子はpositive feedback的に第VII因子を活性化し、さらに第X因子の急激な活性化へ進むことが想定されるが、本系に用いた低濃度のTFでは上記現象は観察されず、さらに高濃度のリン脂質を添加した場合にのみ反応後60分で著しい第Xa因子の形成が認められた。一方第VII因子の代りに第VIIa因子を用いれば、15分後ですでに急激なS 2222の発色が認められ、以後第Xa因子の不活性化も相まって第Xa因子形成能は低下した。

Alternative pathwayを介する第IX因子の活

図6 第VII(a)因子の第X因子活性化

第VII(a)因子($1 \mu\text{g/ml}$)、第X因子($6 \mu\text{g/ml}$)、 CaCl_2 (5 mM)存在下にTF($1 \mu\text{g/ml}$)、アポ蛋白($1 \mu\text{g/ml}$)またはリン脂質(15% vol/vol)を反応させた後の第X因子活性化能をS 2222にて観察した。TPL; TF, PL; リン脂質。APO; アポ蛋白III

性化作用に関してはØsterudらの報告³⁹⁾をはじめ詳細に検索されつつある⁴⁰⁾⁴¹⁾が、Zurら²⁷⁾の報告のごとく純系でのVII(a)-TFの $^3\text{H-IX}$ 活性化能は第X因子の場合と同様VIIa-TFの方が著しく強力である。

次にVII(a)-TFの第X因子または第IX因子活性化機構に対して問題となるのは、第X因子の活性化に共存する第IX(a)因子、第IX因子の活性化時に共存する第X(a)因子の役割である。Jestyら⁴¹⁾はフィブリノゲン、第V、VIII、IXおよびX因子を全て取り除いた血漿を用いて $^3\text{H-X}$ の活性化能を第IX因子の添加時および非添加時に、 $^3\text{H-IX}$ の活性化能を第X因子の添加時および非添加時に観察したところ、第X因子の活性化速度は第IX因子の有無にかかわらず変化が認められなかったが、第IX因子の活性化速度は第X因子、または微量の第Xa因子が存在すると著しく上昇した。この第Xa因子の持つ活性化促進作用は第Xa因子の濃度が $0\sim 50 \text{ ng/ml}$ 間で濃度依存性であり⁴²⁾(図7)、Morrison-Silverbergらは第IX因子の活性化物質としてTF-VII-Xaなる複合体を考えた⁴²⁾。さらに最近Nemersonら²³⁾は純系で第VII因子(6 nM)、TF($0.6\sim 6 \text{ nM}$)、フォスファチジルコリン(1.2 nM)反応物における第VIIa因子形成能はTFの濃度依存性であることを付け加え、

図 7 VII-TF 活性に及ぼす第 Xa 因子の効果

フィブリノゲン, 第 IX, X 因子を除去したウシ血漿に TF (1/5 容), CaCl_2 (5 mM), ^3H -第 IX 因子 (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し, 更に第 Xa 因子 (図には ng/ml として記載) を混和後に ^3H -IX の活性化能を観察した. 0~50 ng/ml 間では濃度依存性であった (Morrison-Silverberg ら⁴²⁾).

TF の役割の重要性を指摘するとともに彼らの仮説を以下のごとく発展させた.

この系によれば第 Xa 因子は VII-TF+X にて形成され, 形成された第 Xa 因子により VII-TF-Xa が形成され feedback 的に第 VIIa 因子は VIIa-TF-X として著しい第 X 因子活性化作用を有するのみならず第 IX 因子の活性化を介した内因系凝固を通じて形成されることになる. 以上のごとく (VII-TF)+X により外因系凝固が開始されると考えられるが, 問題点は VII+TF の凝固活性が弱く, 第 Xa 因子の形成にある程度の lag time を要することである. 内因系凝固因子である第 XIIa 因子の第 VII 因子活性化能が外因凝固系の開始に果たす役割も考慮されなければならないであろう.

最後に第 VIIa 因子の第 X および IX 因子の活性化速度を正常血漿環境下において算出した成績を述べれば, 第 X 因子は 168 $\text{pmol}/\text{min}/\text{unit}$ TF であり, 第 IX 因子は 25 $\text{pmol}/\text{min}/\text{unit}$ TF と 1/6.7 である⁴¹⁾.

図 8 第 VII(a) 因子と他の凝固因子との相互反応

IV. VIIa-TF 活性に対する抑制機構

よく知られているところであるが, アンチトロンビン III (AT-III) はヘパリン存在下にビタミン K 依存凝固因子の多くを強力に阻害する. しかしながら第 VIIa 因子に対する抑制効果は非常に弱いと考えられている. 第 VIIa 因子および第 VII 因子はヘパリン非存在下では AT-III 阻害を受けないこと¹²⁾¹³⁾, またヘパリン存在下でも阻害反応速度はそれ程強力ではないように思われる⁵⁾.

Dahl ら⁴³⁾は血漿中に存在する第 VIIa 因子の阻害物質を検系し, 純系での VIIa-TF の第 X 因子活性化作用 (S 2222 の発色) は硫酸バリウ

図9 VII(a)-TF 活性に及ぼす第X因子の効果

第X因子乏乏血漿にTF (24% vol/vol), ^3H -第IX因子 ($8.5 \mu\text{g/ml}$), CaCl_2 (10 mM) を添加し, 更に第X因子 ($0.04, 0.8 \mu\text{g/ml}$) を混和後に ^3H -IX の活性化を観察した (Sanders ら⁴⁵⁾).

μ吸着上清の脱フィブリノゲンおよび脱AT-IIIを行った血漿を添加することにより抑制されることを報告した. 前述のごとく Jesty, Nemerson ら New York 大学グループの報告^{41, 42)}として微量第Xa因子はVII(a)-TFの第IX因子活性化能を促進せしめることを述べてきたが, 同報告のなかで彼らは第Xa因子濃度を1 nM から5 nM ($0.2 \mu\text{g/ml}$ 相当)に増量することによりVII-TFの ^3H -IX活性化能は低下していくことを改めて報告した⁴⁴⁾. この現象は添加第Xa因子のVII-TFに対する第IX因子との競合, 添加第Xa因子の第VIIa因子に対する不活性化なども考慮されるが, 血漿環境下において認められる点は注目される必要がある. 一方 Sanders ら⁴⁵⁾もVIIa-TFの ^3H -IX活性化に対する血漿因子の阻害効果に関して検討を続けており, 正常血漿の有する阻害効果が抗第X因子抗体で吸着した第X因子欠乏血漿では消失すること, 本血漿に $0.4 \mu\text{g/ml} \sim 0.8 \mu\text{g/ml}$ の第X因子を添加することにより再出現することを報告した(図9). この阻害作用はVIIa-TF, 第IXおよびX因子のみの純系では認められず, 硫酸バリウム吸着上清血漿の添加で出現するので, 第IX因子と血漿因子の両方が必要であると結論づけている. 阻害機序として彼らはVIIa-TFのTF部分の活性低下を考えた. 同

門の Rao ら⁴⁶⁾により第X因子は第Xa因子と置きかえられているが, 阻害作用はTF剤の濃度を20%から40%の高濃度にするにより消失する. 血漿プロトロンビン時間を測定する際, 第VII因子量に比較的高濃度のTFを添加する必要性を解釈する上での一つの理由となるのかも知れない. 数多くの血液凝固因子において抑制物質(natural inhibitor)が知られているが, 第VII因子に特異的なものは今のところない. 上記血漿因子が分離, 同定されれば外因系凝固機序の解明に大きな発展をもたらすであろう.

むすび

外因凝固開始相における第VII因子, TFの役割とその調節機構につき述べた. この部位は止血機構の解析においても非常に遅れている部位である. VII(a)-TF複合体の形成機構 in vivoでの第VII因子の活性化様式, 抑制系およびその因子構成などまだまだ未知の点が多い. これらの点が一つ一つ解析されることにより, 血友病BMにおけるウシ脳プロトロンビン時間の延長, 先天性第VII因子欠乏症(因子活性1%以下)における出血症状の多彩性, 先天性第VII因子異常症にみられるTFの種による反応性の差異(Padua)なども解決されてゆくであろう.

文 献

- 1) MacFarlane, R.G.: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, **202**; 498~499, 1964.
- 2) Davie, E.W. and Ratnoff, O.D.: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, **145**; 1310~1312, 1964.
- 3) Jesty, J. and Nemerson, Y.: Purification of factor VII from bovine plasma. Reaction with tissue factor and activation of factor X. *J. Biol. Chem.*, **249**; 509~515, 1974.
- 4) Kisiel, W. and Davie, E.W.: Isolation and characterization of bovine factor VII. *Biochemistry*, **14**; 4928~4934, 1975.
- 5) Broze, G.J., Jr. and Majerus, P.W.: Purification and properties of human coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.*, **255**; 1242~1247, 1980.
- 6) Broze, G.J. Jr. and Majerus, P.W.: Human factor VII. *Methods Enzymol.*, **80**; 228~237, 1981.
- 7) Bajaj, S.P., Rapaport, S.I. and Browm, S.F.: Isolation and characterization of factor VII. Activation of factor VII by factor Xa. *J. Biol. Chem.*, **256**; 253~259, 1981.
- 8) Rao, L.V.M. and Bajaj, S.P.: Purification of human factor VII utilizing o-(diethylaminoethyl)-Sephadex and sulfopropyl-Sephadex chromatography. *Analyt. Biochem.*, **136**; 357~361, 1984.
- 9) 三上貞昭: 血液凝固第 VII 因子の純化. *奈医誌*, **35**; 566~570, 1984.
- 10) Radcliffe, R. and Nemerson, Y.: Mechanism of activation of bovine factor VII. Products of cleavage by factor Xa. *J. Biol. Chem.*, **251**; 4797~4802, 1976.
- 11) Bach, R., Nemerson, Y. and Konigsberg : Purification and characterization of bovine tissue factor. *J. Biol. Chem.*, **256**; 8324~8331, 1981.
- 12) Jesty, J.: The inhibition of activated bovine coagulation factor X and VII by antithrombin III. *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**; 165~173, 1978.
- 13) Zur, M. and Nemerson, Y.: The esterase activity of coagulation factor VII. Evidence for intrinsic activity of the zymogen. *J. Biol. Chem.*, **253**; 2203~2209, 1978.
- 14) Chargaff, E., Bendich, A. and Cohen, S.S.: The thromboplastic protein: structure, properties, disintegration. *J. Biol. Chem.*, **156**; 161~178, 1944.
- 15) Nemerson, Y. and Pitlick, F.A.: Purification and characterization of the protein component of tissue factor. *Biochemistry*, **9**; 5100~5155, 1970.
- 16) Broze, G.J., Jr.: Binding of human factor VII and VIIa to monocytes. *J. Clin. Invest.*, **70**; 526~535, 1982.
- 17) Liu, D.T.H. and McCoy, L.E.: Tissue extract thromboplastin: Quantitation, fractionation and characterization of protein components. *Thromb. Res.*, **7**; 199~211, 1975.
- 18) Bjorklid, E. and Storm, E.: Purification and some properties of the protein component of tissue thromboplastin from human brain. *Biochem. J.*, **165**; 89~96, 1977.
- 19) Pitlick, F.A. and Nemerson, Y.: Purification and characterization of tissue factor apoprotein. *Methods Enzymol.*, **45**; 37~48, 1976.
- 20) Nemerson, Y.: Characteristics and lipid requirements of coagulant proteins extracted from lung and brain: The specificity of the protein component of tissue factor. *J. Clin. Invest.*, **48**; 322~331, 1969.
- 21) Carson, S.D. and Konigsberg, W.H.: Cadmium increases tissue factor (coagulation factor III) activity facilitating its reassociation with lipids. *Science*, **208**; 307~309, 1980.
- 22) Pitlick, F.A. and Nemerson, Y.: Binding of the protein component of tissue factor to phospholipids. *Biochemistry*, **9**; 5105~5113, 1970.
- 23) Nemerson, Y. and Repke, D.: Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: The role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb. Res.*, **40**; 351~358, 1985.
- 24) Carson, S.D., Bach, R. and Carson, S.M.: Monoclonal antibodies against bovine tissue factor, which block interaction with factor VIIa. *Blood*, **66**; 152~156, 1985.
- 25) Mimms, L.T., Zampighi, G., Nozaki, Y., Tanford, C. and Reynolds, J.A.: Phospholi-

- pid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry*, **20**; 833~840, 1981.
- 26) Anderson, L.-O. and Brown, J.E.: Interaction of factor VIII-von Willebrand factor with phospholipid vesicles. *Biochem. J.*, **200**; 161~167, 1981.
 - 27) Zur, M., Radcliffe, R.D., Oberdick, J. and Nemerson, Y.: The dual role of factor VII in blood coagulation. Initiation and inhibition of a proteolytic system by a zymogen. *J. Biol. Chem.*, **257**; 5623~5631, 1981.
 - 28) Ogston, D.: Factor VII in The physiology of hemostasis. 75~78, Croom Helm, London, 1983.
 - 29) Radcliffe, R. and Nemerson, Y.: Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin. *J. Biol. Chem.*, **250**; 338~395, 1975.
 - 30) Masys, D.R., Bajaj, S.P. and Rapaport, S.I.: Activation of human factor VII by activated factors IX and X. *Blood*, **60**; 1143~1150, 1982.
 - 31) Laake, K. and Østerud, B.: Activation of purified plasma VII by human plasmin, plasma kallikrein, and activated components of the human intrinsic blood coagulation system. *Thromb. Res.*, **5**; 759~772, 1974.
 - 32) Seligsohn, U., Østerud, B., Brown, S.F., Griffin, J.H. and Rapaport, S.I.: Activation of human factor VII in plasma and its purified system. Roles of activated factor IX, Kallikrein, and activated factor XII. *J. Clin. Invest.*, **64**; 1056~1065, 1979.
 - 33) Rao, L.V.M., Bajaj, S.P. and Rapaport, S.I.: Activation of human factor VII during clotting in vitro. *Blood*, **65**; 218~226, 1985.
 - 34) Kisiel, W., Fujikawa, K. and Davie, E.W.: Activation of bovine factor VII (proconvertin) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry*, **16**; 4189~4194, 1977.
 - 35) Radcliffe, R., Bagdasarian, A., Colman, R. and Nemerson, Y.: Activation of bovine factor VII by Hageman factor fragments. *Blood*, **50**; 611~617, 1977.
 - 36) Gjønnæss, H.: Cold promoted factor VII. I. Evidence for the existence of an activator. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **28**; 155~168, 1972.
 - 37) Saito, H. and Ratnoff, O.D.: Alteration of factor VII activity by activated Fletcher factor (a plasma kallikrein): A potential link between the intrinsic and extrinsic blood-clotting systems. *J. Lab. Clin. Med.*, **85**; 405~415, 1975.
 - 38) Zur, M. and Nemerson, Y.: Kinetics of factor IX activation via the extrinsic pathway. *J. Biol. Chem.*, **255**; 5703~5707, 1980.
 - 39) Østerud, B. and Rapaport, S.I.: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**; 5260~5264, 1977.
 - 40) Zur, M., Shastri, K. and Nemerson, Y.: Kinetics of the tissue factor pathway of coagulation: Activation of factor IX. *Blood*, **52** [suppl. 1]; 198, 1978.
 - 41) Jesty, J. and Silverberg, S.A.: Kinetics of the tissue factor-dependent factor IX and X in a bovine plasma system. *J. Biol. Chem.*, **254**; 12337~12345, 1979.
 - 42) Morrison-Silverberg, S.A. and Jesty, J.: The role of activated factor X in the control of bovine coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.*, **256**; 1625~1630, 1981.
 - 43) Dahl, P.E., Abildgaard, U., Larsen, M.L. and Tjensvoll, L.: Inhibition of activated coagulation factor VII by normal human plasma. *Thromb. Haemostas.*, **48**; 253~256, 1982.
 - 44) Morrison, S.A. and Jesty, J.: Tissue factor-dependent activation of tritium-labeled factor IX and factor X in human plasma. *Blood*, **63**; 1338~1347, 1984.
 - 45) Sanders, N.L., Bajaj, S.P., Zivelin, A. and Rapaport, S.I.: Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component. *Blood*, **66**; 204~212, 1985.
 - 46) Rao, L.V.M., Zivelin, A. and Rapaport, S.I.: Studies on the mechanism of inactivation of FVII/tissue factor (TF) in plasma (abstr.). *Thromb. Haemostas.*, **54**; 215, 1985.