原 著

Factor XIII (F. XIII) の定量に関する検討と
2, 3 病態における変動について*

吉 峯 徳** 葛 谷 文 男** 森 邦 雄**

Key words: factor XIII, partigen method, subunit A,
subunit S.

緒 言

Sub-A 部分および Sub-S 部分からなる Factor XIII (F. XIII) は acid soluble fibrin → insoluble fibrin の機構に関与し、血中にも正常者で約 2mg/kg 程度の濃度でみられ、F. XIII 欠乏症も報告されている。一方、動脈硬化との関連において、動脈壁での F. XIII の代謝を考えるとときにもその動きは興味深く、血中の F. XIII の動きと組織中(特に大動脈壁)のその動きから動脈硬化進展への関与についての報告がみられる。動脈硬化と大動脈壁 F. XIII との関連については著者らもすでに報告したが、血中の F. XIII の動きが大いに関与している可能性があり、血中の F. XIII を測定することも重要と考えられる。F. XIII の定量を行うさいには操作が簡単で、かつ、経済的に多数の検体を処理できれば臨床上にも有用と考えられる。今回われわれはヒト plasma 中の F. XIII を測定するため single radial immunodiffusion 法(パルチゲン法と略)を用いて測定すれば、割合簡単に操作でき、しかも経済的に多数検体を処理しうることを見出したが、一方パルチゲン法の測定条件の設定いかんによっては反応輪が不明瞭となり、測定できなくなることをしばしば経験したので、パルチゲン法による至適測定条件の設定を目的とし、さらにヒト plasma 中の F. XIII を正常および疾患で検討し、その血中の

変動を観察した。

I. 実験材料および実験方法

クエン酸加ヒト血漿(plasma)を早朝空腹時に肘静脈より採血した。plasma は測定まで -20℃ で保存した。標準として Behring-werke 社の Standard human plasma を用いた。

a) パルチゲン法の条件設定

パルチゲン平板の作製および測定過程ならびに変化させる条件を図 1 に示した。従来は Agarose 1.5g を用い、Anti-serum 2% として、30 ~ 45 μ l のサンプルを注入する方法を用いた。今回は Anti-serum および plasma 注入量を変化させると共に plasma 希釈度も 2 倍、4 倍および 8 倍に変化させて、これらの組合せについておのおの反応輪の明瞭性と直径について比較検討した。用いた平板は厚さ 1 mm、孔径 3 mm とした。

b) plasma 中の F. XIII の変化を Sub-A、Sub-S の両者間での相関をみると共に、おのおの疾患時の F. XIII 濃度についても standard human plasma を 100 として比較検討し、さらに 1 例の F. XIII 欠乏症の plasma 中の F. XIII についても測定した。

II. 結 果

1. Sub-S の至適条件

従来の Anti-S serum 2 vol% を用いる方法

* Factor XIII (F. XIII) in human plasma; Determination of the optimal condition using Partigen method, and changes of plasma F. XIII levels in several diseases. (The Fifth Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 19, 1976.)

** 名古屋大学医学部第三内科〔〒466 名古屋市昭和区鶴舞町〕, Noboru YOSHIMINE, Fumio KUZUYA, Kunio MORI: The 3rd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Nagoya University, Nagoya, Japan.

A) Partigen-Plate preparation

1) 1% agarose solution

Agarose	1.0 g
NaN ₃	0.1 g
Veronal Buff.	50 ml
(pH 8.6)	
A-Solution	50 ml

2) A-Solution

NaCl	0.8 g
Sod. Citrate	0.8 g
NaN ₃	0.1 g
Aq. dist.	100 ml

Anti-Serum X* vol% in Agarose Sol.
at 52°—55°C: Hole Diameter 3 mm.

X*=2%, 1%, 0.5% and 0.36%.

B) Measurement of F. XIII by Partigen Plate

Sample or Standard plasma A* μ l
↓ 48 hrs at room temp.
×5000 Haemosol for overnight
↓ wash with saline
Saline for 30—40 hrs
↓ wash with water
0.5% Tannic acid for 24 hrs

A*=15, 30 and 60 μ l in each hole with
dilution of ×2, ×4 and ×8.

Standard plasma

Behringwerke Standard-Human plasma

Fig. 1 Partigen Method

Fig. 2 Effect of dilution and injected volume; from upper left to lower right, ×8, ×4, ×2, dilution and 15 μ l of st. plasma, ×8, ×4, ×2, dilution and 30 μ l of st. plasma, ×8, ×4, ×2, dilution and 15 μ l of sample plasma, ×8, ×4, ×2, dilution and 30 μ l of sample plasma. Each holes had the clear rings, above all ×2 dilution plasmas had the moderate diameter and the clear-cut rings.

においても、Sub-S に関しては割合明瞭な反応輪を表現したが、今回の検討においても plate 中の Anti-S serum 1~2 vol% とし、2 倍希釈の sample plasma 15~30 μ l で充分検量しうることを確認した。一方 0.36~0.5 vol% の Anti-S serum では反応輪がうすく、しかも大きくなりすぎるために、倍数希釈して検定するさいに直線性がなくなり使用しにくいと判断した (図 3 参照)。

2. Sub-A の至適条件

Fig. 3 Relation between plasma dilution and injected volume (0.5% of Sub-A)

Sub-A の測定はパルチゲン法でも非常に測定が困難である。それは反応輪の周囲に cloudy な部分が多く出現し、この cloudy な部分を取除くと、反応輪の直径が小さくなりすぎるという問題があり、1~2 vol% の Anti-serum を用いる場合には cloudy な部分が強すぎて測定不能となる。しかしながら、2 倍希釈の sample plasma を用いて 0.36~0.5 vol% の Anti-A serum 濃度の plate に 30~60 μ l を注入したさいには適度の直径を有する明瞭な反応輪が得られた (図 2)。Sub-S の場合と同様に sample

Fig. 4 Correlation of between F. XIII Sub-A and Sub-S

plasma の2倍、4倍および8倍希釈のいずれも使用しうが、至適希釈度は2倍で最も良好な結果がえられた。図3は Anti-A serum 0.36~0.5 vol% の場合の希釈のさいに直線性がみられることを示したが、同様の直線性は Sub-S の場合には1~2 vol%のさいにみられた。Sub-A, Sub-S 間の相関性は図4にみられるように $r=0.381$ ($p<0.05$) で、特に F. XIII 欠乏の plasma (後出) でない限り、相関して変動すると考えてよい。

3. 各種疾患における plasma F. XIII の変動 (図5)

図5にみられる疾患での plasma F. XIII を測定したが、高血圧症、糖尿病、高脂血症、膠原病等で高値を示した。肝疾患 (主に肝硬変) では正常に比して低値を示したが、いずれも $p>0.05$ であり有意性はみられなかった。Sub-A での変動も肝疾患で低値を示していた。なお1例の F. XIII 欠乏症の出血発作時の plasma を第一内科血液研究班より提供をうけ測定したが、Sub-S は正常の場合とほとんど同様の反応輪を示したが、Sub-A は測定不能であった。

III. 考 案

F. XIII は他の凝固因子とはやや異なり、Fibrin に作用する。plasma 中での F. XIII が

Fig. 5 Distribution of F. XIII (Sub-S) in diseases

動脈壁ないしは組織中へ流入したさいに何らかの組織損傷があれば F. XIII が活性化されることは充分考えられるが、なかでも、動脈壁の如き部位での過剰反応(?)は動脈硬化の引き金となる可能性は大である。人において直接組織中の F. XIII を測定することは不可能であるが、血中の F. XIII を測定し、比較することで何らかの関連性を見出しうるかも知れない。今回著者らは主に plasma F. XIII の測定を簡単でかつ経済的なパルチゲン法を用いて行う場合の条件設定を試みたが、Sub-S と Sub-A では用いる Anti-serum の濃度も、注入する sample 量も変えることが必要であり、このことは分子量および血中含有量の相異に起因しているとも考えられる。Sub-S と Sub-A とは比較的良好に相関して変動することを確認した。しかし、特殊な状態 (たとえば F. XIII 欠乏症) では Sub-S は血中に見出しうるが、Sub-A はほとんど見出し得ないということがあり、やはり両者共に測定して比較する必要がある。ただ肝疾患、高血圧症等、今回著者らが検索したような状態ではほとんど同様の変動を示していた。今後の問題は活性部分である Sub-A の動きを各疾患の種々の状態で追求することが必要と考える。

結 語

1) Plasma F. XIII の測定においてパルチゲン法の場合には以下の如き条件がよい。

a) Sub-S 部分の測定は Anti-S serum 1~2 vol% を有する plate に2倍希釈の sample plasma 15~30 μ l を注入する。

b) Sub-A 部分の測定は Anti-A serum 0.36 ~ 0.5 vol% を有する plate に 2 倍希釈の sample plasma 30~60 μ l 注入する。

2) Sub-S と Sub-A は $r=0.381$ ($p<0.05$) で相関する。

3) F. XIII 欠乏症出血発作時の plasma 中では Sub-S は正常者と同様に測定されたが、Sub-A は反応輪がみられず測定不能であった。肝疾患は正常に比し低値を示し、高血圧症、高脂血症、膠原病、糖尿病ではやや高値を示したが、いずれも Sub-S, Sub-A 共に同じような変動パターンを示した。

文 献

- 1) Laki, K., et al.: Clot stabilization and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 205; 235, 1972.
- 2) Haust, M. D., et al.: Electronmicroscopy of fibrin in human atherosclerotic lesions. Immunohistochemical and morphologic identification. *Exp. Molec. Path.*, 4; 205, 1965.
- 3) Duckert, F.: The fibrin stabilizing factor. Factor XIII. *Blut*, 26; 176, 1973.
- 4) Bleyl, U.: Fibrin stabilisierender Faktor in der menschlichen Aorten. *Virchows Arch. Path. Anat.*, 342; 199, 1967.
- 5) 葛谷文男, 吉峯 徳: 人動脈壁の第 XIII 因子および Transglutaminase 活性について。血液と脈管, 7; 41, 1976.
- 6) 浦山 功: 血液凝固機構。第 XIII 因子。日本臨床, 32; 25, 1974.
- 7) 風間睦美: 血栓形成における凝固因子の意義。第 XIII 因子。興和医報, 1; 33, 1975.

<ABSTRACT>

Factor XIII (F. XIII) in human plasma; Determination of the optimal condition using Partigen method, and the changes of plasma F. XIII levels in several diseases.

by

Noboru YOSHIMINE, Fumio KUZUYA, and Kunio MORI

from

The 3rd Department of Internal Medicine,

School of Medicine, Nagoya University

Authors reported the changes of F. XIII in human aortas with and/or without arteriosclerosis, in which we described some relation between arteriosclerosis and F. XIII. However, the measurement of F. XIII with Laurell method or radioisotope method is very troublesome and expensive. On the contrary, the single radial immunodiffusion method (Partigen method) is used easily and economically. The most troublesome problems which we encountered in Partigen method were the cloudy rings and/or too small rings caused by incorrect calculation. This study is to determine the optimal condition of F. XIII measurement using the Partigen method.

Methods and Materials

- 1) The fasting human plasmas were sampled from the antecubital vein. All samples were frozen at -20°C until use. Standard human plasma (from "Behringwerke") was used as standard. In the Partigen plate, which had 1mm of thickness and 3mm of hole diameter, the amounts of anti-serum and/or the volume and concentration of sample plasma examined were altered. Namely, four different plates, in which 2.0%, 1.0%, 0.5% and 0.36% of anti-serum were included as the final concentrations. Preparing three different dilutions (two-fold, four-fold, and eight-fold) of plasma, 15 μ l, 30 μ l, 45 μ l, and 60 μ l, of each of the samples were injected into each of the holes. After 48 hrs at room temperature, each of the plates were stained with tannic acid overnight. The diameter of the rings which appeared around the holes were calculated.
- 2) The levels of F. XIII in several diseases were detected by the modified method mentioned above.

Results

- a) Measurement of Sub-S

2.0% to 1.0% of anti-serum and 15 μ l to 30 μ l of sample with two-fold dilution were the most appropriate condition for the mea-

surement of Sub-S.

b) Measurement of Sub-A

0.5% to 0.36% of anti-serum and 30 μ l to 60 μ l of sample with two-fold dilution were the most appropriate.

c) Correlation between Sub-A and Sub-S

The correlation of plasma F. XIII between Sub-A and Sub-S was $r=0.381$ ($p<0.05$). In one F. XIII deficient plasma, however, Sub-S was in the normal level, whereas Sub-A was not detected in this method.

d) The levels of F. XIII in several diseases

Normal range of our plasmas was in the 80% (standard as 100%). In the chronic liver disease, the level of F. XIII was lower,

while the higher levels of F. XIII were obtained in hypertention, hyperlipidemia, diabetes mellitus, and collagen disease.

Conclusion

The optimal conditions for the measurement of plasma F. XIII were different in Sub-A and Sub-S. In our modified method, the reaction ring with the moderate diameter were obtained clearly. There was a clear correlation between Sub-A and Sub-S. In F. XIII deficient plasma, the fraction of Sub-A seemed to be damaged. The levels of plasma F. XIII in diseases should be continued to be studied to detect its variability and pathogenecity.