原 著

家兎第Ⅷ因子に関する研究

木村 信彦* 吉村 早苗* 小坂 博昭*
垣下 栄三* 永井 清保*

Studies on rabbit factor Ⅷ

Nobuhiko KIMURA*, Sanae YOSHIMURA*, Hiroaki KOSAKA*,
Eizo KAKISHITA* and Kiyoyasu NAGAI*

Key words : HMW FⅧ, LMW FⅧ, 0.25M CaCl₂, agarose
gel chromatography, Al(OH)₃

It was reported that there were two forms of factor VIII procoagulant activity in rabbit plasma. In this work we studied the properties of these two forms, high molecular weight factor VIII (HMW FVIII) and low molecular weight factor VIII (LMW FVIII). The results were as follows.

- 1) Rabbit plasma was chromatographed on 6% agarose at physiologic ionic strength. In agreement with previous reports, the factor VIII activity eluted in the void volume and in early fractions of the third protein peak.
- 2) At -5°C, ice-cold 53.3% ethanol was added to rabbit plasma to a final concentration of 3%. The resulting cryoethanol precipitate was dissolved in barbital-saline buffer, then chromatographed on 6% agarose. The factor VIII activity was detected only in the void volume, suggesting that rabbit HMW FVIII was concentrated in the cryoethanol precipitate but LMWF VIII was not.
- 3) Chromatography of rabbit plasma adsorbed with Al(OH)₃ showed no activity of LMW FVIII, indicating that LMW FVIII was removed from plasma by Al(OH)₃.
- 4) Chromatography of rabbit HMW FVIII in the presence of 0.25 M Ca²⁺ demonstrated that factor VIII activity was separated from the void volume and eluted later. From the elution position the molecular weight of Ca²⁺-dissociated LMW FVIII subcomponent seemed to be somewhat higher than that of native LMW FVIII in rabbit plasma. After the removal of Ca²⁺, the late-eluting fractions having factor VIII activity were mixed with void volume fractions and the mixture was rechromatographed at physiologic ionic strength. The FVIII activity was found in the void volume, which indicated that LMW FVIII subcomponent was recombined with void volume protein. These results were similar to those reported for human factor VIII.
- 5) When rabbit serum was chromatographed on 6% agarose, the factor VIII activity was not found in the void volume but found in the same elution position in which rabbit plasma LMW FVIII was detected by chromatography

* 兵庫医科大学第二内科教室 (〒663 西宮市武庫川町1-1), Department of Internal Medicine Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan.

using the same column. This indicated following three possibilities :

- a) During blood coagulation HMW FVIII was consumed but LMW FVIII was not.
- b) LMW FVIII was produced from HMW FVIII and remained in serum.
- c) Procoagulant activity of later fractions was due to procoagulant active substance, which might be factor Xa or thrombin, other than LMW FVIII.

はじめに

人第Ⅷ因子を agarose gel column に 0.25 Mol CaCl_2 のとき高イオン強度下にゲル濾過すると、生理的イオン強度下にゲル濾過した場合に void volume (V_o) にみられた第Ⅷ因子活性は小分子量測へ移動してみられることが知られている^{1)~4)}。一方家兎血漿を生理的イオン強度下にゲル濾過すると、 V_o および小分子量側の二か所に第Ⅷ因子活性がみられることが報告されている⁵⁾⁶⁾。そこでわれわれはこの家兎の二つの第Ⅷ因子活性物質 (HMW FⅧ, LMW FⅧ) の性質、意義およびこれらと人の AHF, AHF の low molecular weight subcomponent との関連性を追求すべく若干の検討を行った。

I. 方 法

家兎血漿は3.8%クエン酸 Na 1 容、血液 9 容の割で採血し 3,000rpm 15 分間遠沈分離した。血清はスピッツグラスに採血後 37℃ 4 時間放置後 3,000rpm 15 分間遠沈分離した。第Ⅷ因子活性測定は Dade 社製人第Ⅷ因子欠乏血漿を使用して一段法にて行い、正常人血漿 1 ml 中に含まれる第Ⅷ因子量を 1 unit として units/ml として表わした。第Ⅷ因子の精製は Newman 等の方法⁷⁾ により施行した。

Agarose gel chromatography には 6% agarose として Biogel A5m を使用し、buffer は pH 6.8 の barbital-saline buffer を使用した。column size は、1.5×60cm, 1.5×48cm, 0.9×30cm のものを使用し、内径 1.5cm の column では 3 ml の試料を添加し上行法にて流速 12 ml/hr で各 3 ml の fraction を得た。内径 0.9cm の column では 1 ml の試料を添加し下行法にて流速 1 ml/hr で各 1 ml の fraction を得た。溶出液の蛋白濃度は 280nm における O.D. より測

定した。各第Ⅷ因子活性は可及的速やかに、少なくとも 4 時間以内に測定した。

II. 成 績

家兎血漿を 6% agarose でゲル濾過したところ、図 1 に示すごとく第Ⅷ因子活性は V_o の蛋白部および蛋白の三番目の peak の初めあたりの二か所にみられた。一方人血漿を同様にゲル濾過すると V_o のみに活性がみられ、小分子量側には明らかな活性は検出し得なかった。この家兎にみられる二つの第Ⅷ因子が、その精製過程においてどのような動きをとるか調べた。家兎血漿より 53.3% ethanol を使用して -5℃ 終濃度 3% で cryoethanol precipitate を作製し、buffer に溶解後ゲル濾過を行い各 fraction の第Ⅷ因子活性を測定したところ V_o に著明な第Ⅷ因子活性がみられた。しかし小分子量側には活性はみられなかった。従って cryoethanol precipitate 中には HMW FⅧ のみ回収され LMW FⅧ は回収されないことがわかった。この cryoethanol precipitate をさらに精製濃縮した Newman 等による⁷⁾ high purity FⅧ 中には、やはり HMW FⅧ のみしか濃縮されていなかった。次に Newman 等の方法により得た家兎 high purity FⅧ をさらにゲル濾過して精製し、第Ⅷ因子活性の存在する V_o の fraction を集めて濃縮した後 0.25Mol CaCl_2 存在下にゲル濾過を行ったところ、人精製第Ⅷ因子を 0.25Mol CaCl_2 存在下にゲル濾過した時と同様、第Ⅷ因子活性は V_o の蛋白の peak より分離して小分子量側に移動した。この 0.25Mol CaCl_2 存在下に V_o の蛋白より分離した LMW FⅧ subcomponent はその溶出部位より考えると、家兎血漿中に初めから存在した LMW FⅧ よりやや分子量大いと思われる。人第Ⅷ因子では 0.25Mol CaCl_2 存在下に V_o の蛋白よ

り分離した low molecular weight subcomponent は CaCl_2 を除去すると Vo の蛋白と再結合する³⁾⁴⁾ことが報告されているが、同様のことを家兎 HMW FVIII を使用して検討した。すなわち精製家兎 HMW FVIII を 0.25Mol CaCl_2 存在下にゲル濾過した場合の Vo の蛋白の分画および LMW FVIII subcomponent の存在する分画にそれぞれ polyethylene glycol 4,000 (30%) を加えた後 4°C $12,000\text{g}$ 20分遠沈後、沈積物を buffer に溶解して CaCl_2 除去および濃縮を行い、その後両者を混合しゲル濾過を施行したところ、第VIII因子活性は Vo の蛋白の peak に一致してみられ小分子量側にはみられなかった。これは CaCl_2 除去により 0.25Mol CaCl_2 存在下に分離した Vo の蛋白と LMW FVIII subcomponent が結合して HMW FVIII となることを示し、人の第VIII因子で得られた³⁾と同様の所見である。次に血清での第VIII因子の状態をみるため、家兎血清をゲル濾過した。

図2に示すごとく Vo の活性は消失し、小分子量部にのみ活性がみられた。この活性の発生源として、①血漿中にあったものが残存している、②凝固の過程で HMW FVIII より生じた、③第VIII因子以外の凝固活性物質による、などの可能性が考えられる。特に血清中には Thrombin, Factor Xa 等の凝固活性物質の存在が考えられ、それらの影響である可能性が高い。そこで血清を 10% $\text{Al}(\text{OH})_3$ で吸着後ゲル濾過したところ、小分子量部の活性は著明に減少した。一方家兎 LMW FVIII の $\text{Al}(\text{OH})_3$ に対する吸着性をみるため、家兎血漿を 10% $\text{Al}(\text{OH})_3$ で吸着処理後同様にゲル濾過を行ったところ、図3のごとく Vo の活性は存在

Fig. 1 Agarose gel filtration pattern of rabbit plasma. The factor VIII activity eluted in the void volume and in early fractions of third protein peak.

Fig. 2 Agarose gel filtration pattern of rabbit serum. The factor VIII activity was not found in the void volume. It eluted only in later fractions.

Fig. 3 Agarose gel filtration pattern of rabbit plasma adsorbed with $\text{Al}(\text{OH})_3$. The factor VIII activity was detected in the void volume. No peak of factor VIII activity was found in later fractions.

するが小分子量部の活性は消失した。従って家兎 LMW FVIII も $\text{Al}(\text{OH})_3$ に吸着されることがわかった。

III. 考 案

家兎血漿中には high molecular weight, low molecular weight の二つの第VIII因子活性物質があり、血清にすると HMW の活性は消失したが、LMW 部に凝固活性が残存した。しかしこの血清の LMW の活性物質については、その溶出部位は血漿中の LMW FVIII とほぼ同一部であったが LMW FVIII であることは確認できなかった。すなわちこの血清中 LMW の活性物質は $\text{Al}(\text{OH})_3$ 吸着操作で著減し、Factor Xa である可能性もあるが、血漿中 LMW FVIII も $\text{Al}(\text{OH})_3$ 吸着操作で除去された。しかも血漿中 LMW の活性物質が第VIII因子の性格をもつことは Rick, Hoyer 等により確認されている⁶⁾。したがって血漿中 LMW FVIII と同部位に溶出する血清中第VIII因子活性物質中に LMW FVIII が存在可能性は否定できない。一方血漿中 LMW FVIII は cryoethanol precipitate 中には濃縮されず、したがってさらに $\text{Al}(\text{OH})_3$ 吸着操作も加わる Newman 等の方法で約製した high purity FVIII には HMW FVIII のみしか濃縮されなかった。家兎 HMW FVIII を 0.25Mol CaCl_2 存在下にゲル透過する人の第VIII因子においてみられた³⁾と同様その活性は Vo の蛋白より分離して低分子量側に移動してみられ、 CaCl_2 除去により Vo の蛋白と再結合した。しかし高イオン強度下に Vo の蛋白より分離した家兎 LMW FVIII subcomponent はその溶出部位より血漿中に最初から存在した LMW FVIII とは同一物ではないと思われた。最初から存在する LMW FVIII は可逆性に分離してきたものでなくそれ自体単独につくられたものか、あるいは特別な条件で分離してきたものかについては今後さらに検討を要する。さらに人血漿中にも LMW 部に微量の第VIII因子活性物質が存在する可能性が推定され今後検討したい。

結 語

家兎 LMW FVIII は cryoethanol precipitate

中には回収されず、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ に吸着される性質をもっていた。家兎 HMW FVIII は人 AHF 同様 0.25Mol CaCl_2 存在下で LMW FVIII subcomponent を分離し、 CaCl_2 除去により Vo の蛋白と再結合した。この家兎 LMW FVIII subcomponent ははじめから血漿中にあった LMW FVIII とは同一物ではないと思われた。家兎血清中には HMW FVIII は存在せず LMW FVIII の存在が示唆された。

文 献

- 1) Owen, W. G. and Wagner, R.H.: Antihemophilic Factor: separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **27**; 502, 1972.
- 2) Rick, M.E. and Hoyer, L.W.: Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, Factor VIII). V. Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation. *Blood*, **42**; 737, 1973.
- 3) Cooper, H. A. and Wagner, R. H.: The defect in hemophilic and von Willebrand's disease plasmas studies by a recombination technique. *J. Clin. Invest.*, **54**; 1093, 1974.
- 4) Cooper, H.A., Thomas, R.G. and Wagner, R. H.: Factor VIII recombination after dissociation by CaCl_2 . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**; 2326, 1973.
- 5) Tangen, O., Lestrup, E.B. and Berman, H. J.: Characterization of clotting factors associated with blood platelets after gel filtration. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **30**; 289, 1973.
- 6) Rick, M.E., Wampler, D.E. and Hoyer, L. W.: Rabbit factor VIII: Identification of size heterogeneity. *Blood*, **49**; 209, 1977.
- 7) Newman, J., Johnson, A. J., Karpatkin, M. H. and Puszkun, S.: Methods for the production of clinically effective intermediate and high-purity factor VIII concentrates. *Br. J. Haematol.*, **21**; 1, 1971.