◆原 著◆

von Willebrand 因子の形態的研究
—リストセチン添加血小板凝集の強さと関与する
von Willebrand 因子の大きさ—

大 森 啓 造*

Electron Microscopy of von Willebrand Factor
—Relationship Between the Degree of Ristocetin-Induced
Platelet Agglutination and the Size of von Willebrand
Factor Involved in it—

Keizo OHMORI*

Key words: von Willebrand factor, ristocetin, platelet agglutination electrophoresis,
electron microscopy.

The relationship between the degree of ristocetin-induced platelet agglutination and the size of von Willebrand factor (vWF) involved in it was evaluated. Four hundred microliters of formalin-fixed platelet suspension and 50 μ l of purified vWF were placed in a cuvette in the platelet aggregometer. Agglutination curves were recorded by adding 50 μ l of various concentration of ristocetin. vWF molecules in each supernatant were examined by SDS-polyacrylamide-agarose gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electron microscopy. By SDS-PAGE, no differences were seen in size distribution of vWF among each supernatant. By electron microscopy, although vWF in the supernatants after agglutination were somewhat folded, the numbers of nodules in vWF multimers in each supernatant after various degrees of agglutination were not different from that of vWF multimers with no agglutination. We conclude that there was no difference in the size distribution of vWF involved in the ristocetin-induced platelet agglutination.

はじめに

血漿中の糖蛋白である von Willebrand 因子 (vWF) は、血小板が内皮下組織に粘着するのを促進し、またある状況では血小板を凝集させ

ることが知られている¹⁾。vWF は、血管内皮細胞および骨髄巨核球で生成され、循環血中では分子量 250,000 の subunit が、s=s 結合にて多数重合して構成されている²⁾³⁾。

SDS-polyacrylamide-agarose gel 電気泳動

---

* 佐賀医科大学内科〔〒849 佐賀市鍋島5-1-1〕: Department of Internal Medicine Saga Medical School 5-1-1 Nabeshima, Saga 849 Japan. 受付: 1990.10.8, 受理: 1991. 2. 9.

にて分析すると、vWF は分子量が 500,000 – 650,000 ごとに段階的に変化して、500,000 から 12,000,000 に分布している。また、vWF を電子顕微鏡にて観察すると、ところどころに小さな結節を持つ filament 状を示し、長さは 150 nm から 1,080 nm に分布するが、幅は 3 nm でほぼ均一である⁴⁾。近年、黄色ブドウ球菌から抽出された V 8 protease を用いて限定分解することにより、vWF の subunit 構造の形態が明らかにされている⁵⁾⁶⁾。それによると、小さな二連結節としなやかな棒状物が結合して subunit を形成し、subunit がふたつ結合して分子量 550,000 の protomer を構成している。この protomer が重合して vWF の filament を構成している⁵⁾⁶⁾ (Fig. 1)。vWF の活性は、この重合のより高度なもの、すなわち分子量の大きなものに存在すると言われている⁷⁾⁸⁾。しかし、はたしてどの程度の大きさの vWF が、血小板の血管内皮下組織への粘着や、血小板の凝集に関与しているかについては、現在のところ明らかにされていない。

vWF の活性は、*in vitro* ではリストセチン

Fig. 1 vWF multimers and subunits.

Each subunit consists of a flexible rod-like domain and globular domain. Two subunits linked head to head and tail to tail form one protomer. From the size of these domains the mass of the protomer was estimated as 550 kDa.

添加血小板凝集能で評価する⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。著者は、リストセチン添加血小板凝集の際に消費される vWF の大きさを観察することにより、凝集ひいては粘着に関与する vWF の大きさを推定することを目的として、この実験を行った。

I. 材料と方法

1. vWF の精製

健康人血漿 40 ml を -3°C に保ち、かくはんしながら 53.3% エタノールを滴下して終濃度を 3% とした。沈殿を 0.02% Imidazole buffer 20 ml に溶解、Bentonite 200 mg を加えて fibrinogen を吸着除去し、ポリエチレングリコール沈殿、エタノール洗浄の後、Sephacose CL-4 B カラムでゲル濾過し、void volume 部分に得られる第 VIII 因子活性分画を、Amicon PM-30 さらに $25 \times 10^4 \text{ g}$ の超遠心にて濃縮して vWF を精製した。精製 vWF の蛋白濃度は 0.45 mg/ml 、凝固比活性は 2.1 U/mg 、vWF の比活性は 93 U/mg であった。精製した vWF は、 -70°C にて保存した。

2. ホルマリン固定血小板の作製

健康人より 18 G 針を用いてディスポーザブル注射器で採血した静脈血 9 容に対し、3.8% クエン酸ナトリウム 1 容を静かに混和し、1,000 rpm で 10 分間遠心して多血小板血漿を分離した。多血小板血漿を等量の 2% ホルマリンと混合し、48 時間後、生理的食塩水にて 4 回洗浄し、ホルマリン固定血小板浮遊液を得た。

3. リストセチン添加血小板凝集

血小板凝集計のガラスキューベットに 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) に浮遊したホルマリン固定血小板 ($12 \times 10^4/\mu\text{l}$) $400 \mu\text{l}$ と $300 \mu\text{g/ml}$ の vWF $50 \mu\text{l}$ をいれて混合し、透光度が安定した後、さまざまな濃度のリストセチンを $50 \mu\text{l}$ 添加して、血小板凝集曲線を記録した。リストセチンの終濃度は 1.5 mg/ml , 1.0 mg/ml , 0.75 mg/ml , 0.5 mg/ml , 0.25 mg/ml , 0 mg/ml の 6 種類とした。

血小板凝集曲線を記録した後、凝集液を 5,000 rpm で 10 分間遠沈して上清を採取し、以下の観察を行った。

4. 上清中の vWF 抗原量の測定

凝集後上清に含まれる vWF 抗原量をプールした標準血清を対照とした Laurell 免疫電気泳動にて測定した。

5. 上清中の vWF の電気泳動による観察

凝集後上清について 0.1% SDS-2.5% polyacrylamide-1% agarose gel 電気泳動を行い、vWF の分子量分布を観察した。

6. 上清中の vWF の電顕による観察

凝集後上清に同量のグリセロールを加えて混和し、その 20 μ l を、新しく剥がした雲母片上に噴霧した。雲母片は、直ちに真空蒸着装置（日本電子社製 JFD-7000）の回転台に固定され、室温下 $2 \sim 4 \times 10^{-5}$ Pa の高真空にて 60~120 分間乾燥した。白金・カーボン同時蒸着による回転シャドウイングを 5 度の角度からおこなったのち、真上よりカーボン蒸着を行い補強した。次に白金・カーボン膜を蒸留水に浮かべ、200 メッシュの銅製グリッドにてすくい取り、透過型電顕（日本電子社製 JEM-4000 FX）にて観察した¹²⁾ (Fig. 2)。

各凝集後上清の電顕写真より 100 個の von Willebrand 因子を選び、各 filament に存在する結節の数を求めた。つぎに subunit 1 個が結節 1 個に相当するものと仮定して、その分子量を算出し、分布状態を比較した⁵⁾⁶⁾。

II. 成 績

1. リストセチン添加血小板凝集曲線

加えたリストセチンの濃度に応じて、さまざまな強さの血小板凝集が観察された (Fig. 3)。リストセチン終濃度 1.5 mg/ml では初期速度 1.12/分の強い血小板凝集、1.0 mg/ml では 0.86/分、0.75 mg/ml では 0.68/分の中等度の凝集、0.5 mg/ml では 0.22/分の弱い凝集が観察され、0.25 mg/ml, 0 mg/ml では凝集は認められなかった。

2. 凝集後上清の vWF 抗原量

凝集後上清の vWF 抗原量を Laurell 免疫電気泳動法にて測定すると、リストセチン終濃度 0 mg/ml, 0.25 mg/ml では標準血清の 120%, 0.5 mg/ml では 50%, 0.75 mg/ml では 25%, 1.0 mg/ml では 36%, 1.5 mg/ml では

Fig. 2 Methods of rotary shadowing.

Sample solution was mixed with equal volume of glycerol and was sprayed on a freshly cleaved mica strip. The sprayed mica was dried and rotary shadowed with platinum-carbon at an angle of 5 degrees and a carbon film was deposited from directly above. The replicas were floated off onto distilled water and were picked up with grid from below.

36% であった。

3. 上清中の vWF の電気泳動による観察

さまざまな濃度のリストセチン添加による血小板凝集後の上清に含まれる vWF を、SDS-polyacrylamide agarose gel 電気泳動を用いて観察した。高濃度のリストセチンが添加されたものでは上清中の vWF の減少がみられたが、vWF の分子量分布には各上清間で明らかな差はみられなかった (Fig. 4)。

4. 凝集後上清の vWF の電顕像 (Fig. 5)

凝集後上清に残存する vWF に白金・カーボンによる回転シャドウイングを施し、電顕にて観察すると、リストセチン終濃度 0 mg/ml では、vWF は、ところどころ小さな結節を持つ、さまざまな長さの filament 状を示した。リストセチン終濃度 0.25 mg/ml では、vWF の形

Fig. 3 Platelet agglutination curves which were recorded by adding vWF at the final concentration of $30 \mu\text{g/ml}$ and various concentration of ristocetin (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 mg/ml at the final concentration).

Fig. 4 SDS-polyacrylamide-agarose gel electrophoresis.

When vWF in the supernatants after platelet agglutination were analyzed by 0.1% SDS-2.5% polyacrylamide-1% agarose gel electrophoresis, the size distribution of vWF molecule was not different among each supernatants.

態は 0 mg/ml のものと差がみられなかったが、リストセチン終濃度 0.5 mg/ml では、vWF の filament が、やや短く縮んだ状態になっているのが観察された。この傾向はリストセ

チンの濃度が大きくなるにつれて顕著であった。

凝集後上清の vWF の電顕写真より、それぞれ 100 個の filament を選び、各 filament に存

Fig. 5 Electron micrographs of vWF in the supernatants after platelet agglutination with various concentration of ristocetin.

Although the vWF molecules were folded at high concentration of ristocetin, mean number of nodules per one molecule seemed to be not different with each other.

在する結節の数を求めた。リストセチン終濃度 0 mg/ml の場合には、vWF の filament 1 個あたりの結節数は 21.2 ± 9.9 (平均 $\pm$ 標準偏差) であり、0.25 mg/ml の場合には 22.7 ± 12.2 、0.5 mg/ml の場合には 20.8 ± 10.9 、0.75 mg/ml の場合には 21.6 ± 12.0 、1.0 mg/ml の場合には 22.3 ± 13.0 、1.5 mg/ml の場合には 20.7 ± 10.6 とそれぞれの間に有意の差を認めなかった (Fig. 6)。

つぎに分子量 250,000 の subunit が結節 1 個に相当するものとして凝集後上清に残存する vWF の分子量分布を求めた。リストセチン終濃度 0 mg/ml の場合には vWF の分子量は $2,180,000 \pm 520,000$ (平均 $\pm$ 標準偏差) であり、0.25 mg/ml の場合には $2,230,000 \pm 480,000$ 、0.5 mg/ml の場合には $2,150,000 \pm$

$550,000$ 、0.75 mg/ml の場合には $2,420,000 \pm 470,000$ 、1.0 mg/ml の場合には $2,300,000 \pm 430,000$ 、1.5 mg/ml の場合には $2,280,000 \pm 520,000$ と計算された。上清に残存する vWF の分子量分布に差がないことより、さまざまな濃度のリストセチン添加による血小板凝集の際に消費される vWF の分子量分布には、差がないと考えられた。

III. 考 察

生理的な止血過程にも、病的な血栓形成にも、血管ならびに血小板とともに、血液凝固因子が重要な働きを演じている。なかでも vWF は、血管が障害を受けた際に、障害部位に血小板が粘着するのを助ける働きをしており、止血、血栓形成の初期過程に大きな関与をしてい

Fig. 6 Size distribution of vWF in the supernatants.

Size distribution of vWF in the supernatants after platelet agglutination was not different among the various concentrations of ristocetin and various degrees of agglutination.

る。

前述のように、vWFの活性は *in vitro* では、リストセチン添加血小板凝集能にて評価される。リストセチンは、1950年代に臨床導入された抗生物質であるが、ほどなく副作用として血小板減少をひきおこすことが判明し、臨床の場では使用されなくなった。その後、リストセチンは正常人の血小板を凝集させるが、von Willebrand 病患者の血小板は凝集させないことが発見された⁹⁾¹⁰⁾。正常人の血小板を洗浄して血漿 vWF を取り除くと、その血小板はリストセチンを加えても凝集しないが、正常人血漿あるいは vWF を加えると、再び凝集するようになる。これを利用して、vWF の活性が測定されるようになった。さらに、ホルマリンで固定した血小板でもリストセチンと正常人血漿を

加えると凝集することが判明した¹¹⁾。このように、リストセチンは、ほかの血小板凝集惹起物質である ADP、エピネフリン、コラーゲン、トロンビンとは異なり、通常血小板エネルギー代謝なしに血小板凝集を引き起こす。その意味では、aggregation よりも agglutination と呼ぶほうが適切と思われる。agglutination の際には、エネルギー代謝の面からは、血小板は受動的役割を果すのではあるが、vWF が結合するための、リストセチン依存性の受容体が血小板に存在することが必要である¹³⁾¹⁴⁾。この受容体は、種々のプロテアーゼにより容易に作用を失う。また、先天性の血液凝固異常症である Bernard-Soulier 症候群ではこの受容体が欠損している。同症候群患者の血小板は、血漿中の vWF が正常であるにもかかわらず、リ

ストセチンによる凝集がみられず、血管内皮下組織への血小板の粘着がおこらない。血小板がリストセチンにて刺激を受けた時 vWF が結合する、Bernard-Soulier 症候群患者の血小板には欠損している受容体は、glycoprotein Ib (GPIb) と呼ばれている¹⁵⁾。

リストセチン添加血小板凝集の分子機構については、現在ふたつの機序が考えられている。ひとつは、陽性荷電を有するリストセチンが血小板の表面に結合し、表面荷電を減少させ、vWF が受容体 GPIb に結合するのを促進するためとするものである¹⁶⁾。もうひとつは、リストセチンが vWF に結合し、あるいは vWF 周辺に配置することにより、vWF になんらかの物理化学的变化をおこし、血小板への結合を促すとするものである¹⁷⁾。

今回の実験で、vWF にさまざまな濃度のリストセチンを加えた際、vWF の filament が縮んだ状態になっており、この傾向はリストセチンの濃度が大きくなるほど顕著であることが観察された。ホルマリン固定血小板非存在下で vWF にリストセチンを加えた場合にも同様の減少が観察されることにより、vWF に対するリストセチンの直接作用による形態変化と考えられた。この現象は、リストセチンが vWF に作用して変化をもたらし血小板を凝集させるという説を支持するものであるが、それを証明するには、血小板にリストセチンを加えた際の血小板の微細構造の変化についても検討する必要がある。

生体内では、主として fibrinogen が血小板の凝集を引き起こす。血小板膜上には fibrinogen に対する受容体である glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) が分布しており、ADP あるいは thrombin により血小板が活性化されると、fibrinogen と GPIIb/IIIa の結合が起こり、血小板は凝集する。最初 vWF が血小板膜の GPIb に結合するにはリストセチンが必要であるが、vWF から陰性荷電部分の sialic acid を除いた asialo-vWF は、agonist による血小板の活性化なしに血小板凝集を引き起こす¹⁸⁾。この場合まず、asialo-vWF が GPIb と結合することにより GPIIb/IIIa が血小板の表面に表

れ、つぎに fibrinogen がこれに結合して血小板凝集を引き起こす。血漿中の vWF のうちごくわずかのものが asialo-vWF に変化しただけで、強い血小板凝集が引き起こされる。しかしながら、asialo-vWF が実際に循環血液中に存在するかどうか、あるいは血管障害部位で生成されるかどうかは、まだ明らかにされていない。

一方 Moake らは、血小板凝集の引き金として、異常高分子 vWF の存在と、ずり速度の影響を重視している¹⁾。生成された vWF は血管内皮細胞の Weibel-Palade bodies に貯蔵されており、内皮細胞障害などの刺激により血液中に放出される。放出された vWF は非常に高分子であるが、血漿中の蛋白分解酵素的作用により、通常血漿中にみられる vWF となる。内皮細胞が、ひどい障害を受けた際には、この異常高分子 vWF が多量に放出されて、蛋白分解酵素による処理が追いつかず、局所的に高濃度となった異常高分子 vWF が血小板に結合する。また動脈硬化や血管攣縮によって狭窄した動脈では、ずり速度がきわめて大きくなり、血小板表面の構造を変化させる。この時、vWF は、血小板表面に露出した GPIb や GPIIb/IIIa に結合し、血小板凝集が起こる。この際、血管内皮細胞から放出された異常高分子の vWF は、より効果的に凝集を引き起こす。このような、ずり速度によってもたらされる vWF による血小板凝集は、リストセチンや asialo-vWF のような、化学的な修飾を受けた vWF を必要としない¹⁾。

このように、vWF による血小板凝集の仕組みが次第に明らかとなり、従来 vWF 活性は分子量のより大きな物が持っているといわれてきたことも、再検討が必要と思われた。より大きな vWF が、より強い血小板凝集を引き起こすことは、血小板膜上の受容体である GPIb や GPIIb/IIIa との結合に有利であることから、十分うなずけることである。では、比較的小さな vWF は、いったいどんな役割を果たしているのだろうか。それらは、何の役にも立たない切れ端なのだろうか。

血小板が血管内皮下に粘着する際には、高分

子の vWF が、両者の橋渡しをするのに都合がよいといわれている¹⁹⁾²⁰⁾。この場合、どの程度の分子量が必要であるかについては、現在のところまだわかっていない。それでは、いったん血小板の血管内皮下への粘着や、血小板どうしの凝集が始まった場合には、どの程度の大きさの vWF がそれに参加するのだろうか。また、それは凝集の大きさによって異なるのであろうか。当初著者は、血小板凝集が弱いときには分子量の大きな vWF のみが参加し、血小板凝集が強くなるにしたがって、分子量の小さな vWF も参加するようになるのではないかと考えた。しかし、ホルマリン固定血小板を用いての実験では、リストセチンの濃度を変化させて血小板凝集の強さを変えても、それに参加する vWF の大きさの分布には差がみられなかった。もちろん、血小板凝集が弱いときには消費された vWF は少なく、血小板凝集が強いときには消費された vWF は多かった。これまでの報告および今回の実験の結果から考えると、最初の血小板凝集開始には、高分子の vWF が必要かつ有効であるが、いったん凝集が起り始めれば、それ以外のより小さい vWF も血小板に結合して凝集に参加するものと考えられた。そして、強い凝集では沢山の vWF が消費され、弱い凝集では少しの vWF が消費されるのは当然のことであるが、消費され vWF の大きさの分布は、凝集の強弱にはよらずもとの vWF の大きさの分布と等しいことが確認された。

IV. 結 論

リストセチン添加血小板凝集の際、凝集に関与する vWF の大きさは、凝集の強さには影響されなかった。すなわち、強い凝集の場合にも、弱い凝集の場合にも、さまざまな大きさの vWF が、その数量に違いはあっても、同じ割合で参加することが判明した。

文 献

- 1) Moak JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LA, Hellums JD: Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* **78**: 1456~1461, 1986.
- 2) Counts RB, Paskell SL, Elgee SK: Disulfide bonds and the quarternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. *J Clin Invest* **62**: 702~709, 1978.
- 3) Chopek MW, Girma JP, Fujikawa K, Davie EW, Titani K: Human von Willebrand Factor: A multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* **25**: 3146~3155, 1986.
- 4) Ohmori K, Fretto LJ, Harrison RL, Swizer MEP, Erickson HP, McKee PA: Electron microscopy of human factor VIII/von Willebrand glycoprotein: Effect of reducing reagents on structure and function. *J Cell Biol* **95**: 632~640, 1982.
- 5) Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA: Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest* **76**: 1491~1500, 1985.
- 6) Fretto LJ, Fowler WE, McCaslin DR, Erickson HP, McKee PA: Substructure of human von Willebrand factor: Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J Biol Chem* **261**: 15679~15689, 1986.
- 7) Hoyer LW: The factor VIII complex: Structure and function. *Blood* **58**: 1~13, 1981.
- 8) McKee PA: Observation on structure-function relationships of human antihemophilic/von Willebrand factor protein. *Ann NY Acad Sci* **370**: 210~226, 1981.
- 9) Howard MA, Sawers RL, Firkin BG: Ristocetin: A means of differentiating von Willebrand's disease into two groups. *Blood* **41**: 687~690, 1971.
- 10) Weiss HJ, Rogers J, Brand H: Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by FVIII. *J Clin Invest* **52**: 2697~2707, 1973.
- 11) Allain JP, Cooper HA, Wagner RH, Brinkhous KM: Platelets fixed with paraformaldehyde: A new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. *J Lab Clin Med* **85**: 318~328, 1975.
- 12) Tyler J, Branton D: Rotary shadowing of

- extended molecules dried from glycerol. *J Ultrastruct Res* **71** : 95~102, 1980.
- 13) Zucker MB, Kim SJ, McPherson J, Grant RA : Binding of factor VIII to platelets in the presence of ristocetin. *Br J Haematol* **35** : 535~549, 1977.
- 14) Kao KJ, Pizzo SV, McKee PA : Demonstration and characterization of specific binding sites for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J Clin Invest* **63** : 656~664, 1979.
- 15) George JN, Nurden AT, Phillips DR : Molecular defects in interaction of platelets with the vessel wall. *N Engl J Med* **311** : 1084~1098, 1984.
- 16) Kirby EP : Factor VIII-associated platelet aggregation. *Thromb Haemostas* **38** : 1054~1072, 1977.
- 17) Schneider-Trip MD, Jenkins CSP, Kahle LH, Stunk A, ten Cate JW : Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation : binding of factor VIII to platelets. *Brit J Haematol* **43** : 99~112, 1979.
- 18) DeMarco L, Grolami A, Russell S, Ruggeri ZM : Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J Clin Invest* **75** : 1198~1203, 1985.
- 19) Sixma JJ, Sakariassen KS, Beeser-Visser NH, Ottenhof-Rovers M, Bolhuis PA : Adhesion of platelets to human artery subendothelium : Effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood* **63** : 128~139, 1984.
- 20) Collier BS : von Willebrand disease. In "Hemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice, 2nd ed", ed. by Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, Lippincott, Philadelphia, 1987, pp60~96..
-