◆原 著◆

von Willebrand 病各種病型における 血漿 von Willebrand 因子の還元フラグメントの検討

野 並 京 子^{*1,*3} 高 橋 幸 博^{*2}, 西 久 保 敏 也^{*3}
森 井 直 之^{*3}, 木 下 清 二^{*3}, 西 田 幸 世^{*4}
西 山 隆 之^{*4}, 藤 村 吉 博^{*4}, 吉 岡 章^{*3}

Reduced Plasma von Willebrand Factor Fragments in Patients with Various Types of von Willebrand Disease

Kyoko NONAMI^{*1,*3}, Yukihiro TAKAHASHI^{*2}, Toshiya NISHIKUBO^{*3}
Naoyuki MORII^{*3}, Seiji KINOSHITA^{*3}, Sachiyo NISHIDA^{*4}
Takayuki NISHIYAMA^{*4}, Yoshihiro FUJIMURA^{*4}, Akira YOSHIOKA^{*3}

Key words: von Willebrand disease, reduced von Willebrand factor fragment

We previously reported a new analytical immunoblotting method to detect reduced plasma von Willebrand factor (vWF) fragments using polyclonal anti-reduced vWF antibody and demonstrated that the reduced normal plasma vWF consists of at least five or six fragments, 240 kDa for the main fragment and 216 (220, 210), 194, 164 and 144 kDa for minor fragments. In this study, we describe the reduced fragments in patients with various types of von Willebrand disease (vWD) (type I : 7 patients, type IIA : 4 patients and type IIB : 3 patients) using this method. Of seven patients with type I vWD, one patient with an equally low level of ristocetin cofactor activity (vWF : RCo) and vWF antigen (vWF : Ag) showed normal relative proportions of each fragment. However, three of four patients with a low level of vWF : RCo compared to vWF : Ag showed a relatively increased proportion of the 164 kDa fragment. The remaining two patients demonstrated a new 200 kDa reduced fragment in addition to those of normal plasma vWF. In type II A vWD, all patients showed a relatively increased proportion of the 164 kDa fragment. In type IIB vWD, two of three patients also showed a relatively increased proportion of the 164 kDa

^{*1} 国立療養所西奈良病院小児科〔〒630 奈良県奈良市七条2丁目789〕: Department of Pediatrics, National Sanatorium Nishi-Nara Hospital, Nara.

^{*2} 奈良県立医科大学付属病院新生児集中治療部〔〒634 奈良県橿原市四条町840〕: Division of Neonatology, Nara Medical University, Kashihara, Nara.

^{*3} 奈良県立医科大学小児科〔〒634 奈良県橿原市四条町840〕: Department of Pediatrics, Nara Medical University, Kashihara, Nara.

^{*4} 奈良県立医科大学付属病院輸血部〔〒634 奈良県橿原市四条町840〕: Department of Blood Transfusion, Nara Medical University, Kashihara, Nara.

受付: 1996. 4. 12, 受理: 1996. 8. 12.

fragment. These results suggest that plasma vWF with a low vWF : RCo compared with the vWF : Ag ratio tends to show an increased proportion of the 164 kDa reduced fragment, even in type I vWD with a normal multimeric structure. Fragment analysis of reduced vWF in patients with vWD is useful to understand the abnormality at the molecular level, especially in type I vWD.

結 言

von Willebrand 病(vWD)は von Willebrand 因子(vWF)の量的・質的異常に基づく常染色体性遺伝性出血性疾患である。その診断および病型分類には主として SDS-アガロースゲル電気泳動法を用いた血漿 vWF のマルチマー解析が行われている¹⁾。vWD はこのマルチマー解析を基に type I (classical type; 典型), type II (variant type; 変異型) および type III (homozygous あるいは severe recessive type; 重症型) に分類されてきた¹⁾。近年になって vWF の構造と機能, およびその遺伝子配列が次第に明らかとなり, 異常症である vWD においても DNA レベルでの異常部位が解明され, 新しい vWD の病型分類も提唱されるようになった²⁾。その結果病型の標示をギリシャ数字の I, II, III からローマ数字の 1, 2, 3 に変更され, 従来の type I 病型のなかで質的異常と考えられる type I のサブタイプ Ib, Ic は type 2 に分類され, type IIA, IIB はそれぞれ type 2A, 2B に改定された。しかし, vWD 各病型での蛋白異常と DNA 異常との関連は十分には明らかではなく, とりわけ, type I 病型では, ほとんど解明されていない。一方, 正常ヒト血漿 vWF のマルチマー構造は上記のアガロースゲル電気泳動法により分子量 500~2,000 kDa におよぶ不連続バンドとして描出される¹⁾。個々のマルチマーバンドは血管内皮細胞および巨核球で生合成された vWF の基本単位である分子量 270 kDa の vWF サブユニットがアミノ末端およびカルボキシ末端で head to head, tail to tail に結合することで構成されている¹⁾。さらに, 高濃度のアガロースゲルを用いることで個々のマルチマーバンドの上下には数本のサテライトバンドが

検出される³⁾。1986 年に Zimmerman ら⁴⁾は, 従来のマルチマー解析とは異なり, 抗 vWF モノクローナル抗体を用いたアフィニティークラムで血漿 vWF を部分純化し, 還元処理後に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行うことで血漿 vWF のサブユニットを解析した。その結果, 正常ヒト血漿 vWF は分子量 225, 189, 176 および 140 kDa の 4 本のバンドから構成されていることが明らかにされた。また, SDS-アガロースゲル電気泳動後に還元処理を行い, 2 次元展開することでサブユニットバンドを解析する試みも行われた⁵⁾。しかし, 彼らの方法では部分純化に際し, 多量に血漿を要する上, 蛋白分解を受けやすいことが懸念された。そこで, 我々は還元処理純化ヒト vWF を家兎に免疫し, 得られた抗ヒト還元 vWF 抗体を用いることで還元処理した微量の血漿 vWF を直接還元 vWF フラグメントとして観察する方法を開発した⁶⁾。今回本法を用いて vWF の量的, 質的異常症である vWD の各種病型患者血漿中の還元 vWF フラグメントを観察した。

対象および方法

1. 対象

健康成人 50 名および各種 vWD 患者 {マルチマー解析による旧分類により type I: 6 家系 7 名 (type Ia 1 名, type Ib 6 名), type IIA: 4 家系 4 名, type IIB: 1 家系 3 名, type III: 1 家系 1 名} について検討した。各 vWD のマルチマー解析は Ruggeri, Zimmerman らの方法⁴⁾に準拠し, SDS-アガロースゲル電気泳動後に, ¹²⁵I-抗 vWF 抗体 (自家製) を用いたオートラジオグラフあるいは SDS-アガロースゲル電気泳動後に western blot 後, ペルオキシダーゼ標識抗

vWF 抗体(Dako, Japan)を用いた免疫蛍光法により解析を行った。

2. vWF 抗原(vWF:Ag)および ristocetin cofactor 活性(vWF:RCo)の測定

vWF:Ag は抗ヒト vWF ポリクローナル抗体(Dako, Japan)を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で, vWF:RCo は RIPA-test kit(Hoechst, Japan)を用いて測定した⁷⁾。

3. 血漿採取

予め 1/10 容の 3.8%クエン酸ナトリウムを加えたプラスチック試験管に肘静脈より採血した 9/10 容の全血を加え混和後, 1,000 g, 10 分間遠心し, 上清より血漿を得た。また同時に採血後の蛋白分解を抑制するため Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF; 和光純薬, Japan), EDTA および N-ethylmaleimide(NEM; 和光純薬, Japan)などのプロテアーゼ・インヒビターを採血と同時に混和し, プロテアーゼ・インヒビター添加血漿についても同時に検討した。プール血漿は健康成人 10 名(男性 5 名, 女性 5 名)より各々同様に採取した血漿を等量ずつ混合し作製した。これらの血漿は分注し, 解析するまで -80°C で凍結保存した。

4. vWF の純化

vWF の純化は既報のごとく Thorell and Blombäck の方法⁸⁾に準じ, 中間型第 VIII 因子濃縮製剤(RCG-5⁹⁾; 日本赤十字社より供与)より純化した。

5. 還元 vWF に対するポリクローナル抗体の作製

既報¹⁰⁾のごとく純化 vWF を還元アルキル化後, 家兎に免疫して抗体を作製した。

6. 血漿 vWF の還元試料の作製

正常ヒト血漿あるいは各種 vWD 患者血漿 30 μl に 90 μl の試料緩衝液 (10% β -mercaptoethanol, 2.5% SDS, 6 M 尿素加里ン酸緩衝液, pH 7.4)を加え, 75°C で 15 分間加温して SDS-PAGE 用試料とした。

7. SDS-PAGE およびイムノブロッティング

還元処理後の希釈血漿試料 100 μl を SDS-5%PAGE 後, polyvinylidene difluoride

(PVDF) 膜 (Clear Blot Membrane-P; アトー株式会社, Japan)に転写(0.5 A, 16 時間; 0.1 M tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol 緩衝液)した。

8. 抗原検出

PVDF 膜に転写後, 5%脱脂粉乳 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF; 和光純薬, Japan) 添加リン酸緩衝液(以下 BLOTT と略)で PVDF 膜の非特異的結合部位をブロックし, 次に BLOTT 中で抗還元 vWF 抗体(終濃度 5.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と反応させた。その後 BLOTT にて 3 回洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG 抗体 (TAGO Inc., USA; 終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と反応させ, 洗浄後, REN-AISSANCE™ (DuPont NEN, USA) を用いた蛍光抗体法により X-ray film (Kodak, Japan) に暴露することで vWF 還元バンドを検出した。次に各 vWF 還元フラグメントの抗原量は X-ray film に描出されるバンドの強度を digital densitometry DMU-33 C(アドバンテクトーヨー, Japan)を用い, 吸光度 565 nm で測定した。健康成人 50 名および各種 vWD 患者の各 vWF 還元フラグメントの抗原量の割合はすべてプロテアーゼ・インヒビター添加血漿より得た。また, 各測定値は少なくとも 3 回の測定の平均値により算出した。

結 果

1. 正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメント

健康人 50 名について検討したところ, 正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメントは, 主フラグメントである 240 kDa の他に 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa にバンドが認められた。このうち 216 kDa のバンドは泳動条件によりさらに 220 kDa および 210 kDa の 2 本のバンドに分かれ, 血漿 vWF の還元フラグメントは 5 ないし 6 本から構成されていた。各還元フラグメントの構成については vWF のアミノ酸残基 1~1365 (SPIII) および 1366~2050 (SPII) に対するポリクローナル抗体および還元 vWF を認識しエピトープの明らかなモノクローナル抗体を用いた検討から, 164 kDa は Zimmerman らの報告した 176 kDa に相当し,

144 kDa は 140 kDa に相当することが推定された。この詳細については既に報告した⁹⁾。また、デンストメーターを用いた各還元フラグメント量の検討では、240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa の各フラグメントの全還元フラグメント量に占める割合は、それぞれ、 $69.2 \pm 6.3\%$ (最高値 75.5 ~ 最低値 62.9; 以下同様), $17.3 \pm 3.6\%$ (20.9 ~ 13.7), $6.5 \pm 1.3\%$ (7.8 ~ 5.2), $3.7 \pm 1.1\%$ (4.8 ~ 2.6) および $2.9 \pm 1.4\%$ (4.3 ~ 1.5) であった。

2. 各種 vWD 患者血漿 vWF の還元フラグメント

1) type I vWD 患者血漿

type I 患者 7 名のうち 5 名では、正常ヒト血漿 vWF と同様に 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa にフラグメントがみられた。残る 2 名 (Y.D. と T.O.) では正常ヒト血漿 vWF の 5 本のフラグメントに加えて、新たに 200 kDa の位置に異常フラグメントが認められた (Fig. 1)。各フラグメントの全 vWF 還元フラグメントに占める割合をデンストメーターを用いて検討すると、正常ヒト血漿と同様に 5 本のフラグメントを示した 5 例のうち血漿 vWF: Ag と vWF: RCo とがほぼ同程度量存在する Y.T. 例では 194 kDa および 164 kDa の割合がやや低いものの、おおむね正常ヒト血漿と同様の各還元フラグメントの割合を示した

Fig. 1 Reduced vWF fragments detected with polyclonal anti-reduced vWF
1. reduced normal plasma
2. reduced vWD type III (M.N.) plasma
3. reduced vWD type I (Y.D.) plasma

(Table 1)。しかし、vWF: Ag に比して vWF: RCo の低下する残る 4 名のうち 3 名で 164 kDa が正常ヒト血漿に比して増加する傾向がみられ、特に M.K. 例は明らかであった。一方、200 kDa の異常フラグメントの出現した 2 例では vWF: Ag は共に著しく低下し、また、vWF: RCo も vWF: Ag に比しさらに低下していた。この vWF: RCo の低下している 6 名のマルチマー解析では正常と同様に large multimer まで存在するが正常対象に比し large multimer が相対的に低下しており旧分類では type Ib であり、新分類では type 2 A に相当すると考えられた。

2) type IIA (新分類の 2A に相当) vWD 患者血漿

検索した type IIA vWD 患者 4 名のすべてで正常ヒト血漿 vWF と同様に 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa のフラグメントが認められた (Fig. 2)。デンストメーターを用いた各還元フラグメント量の検討では、4 名とも 164 kDa のフラグメントの増量が認められた (Table 1)。また、144 kDa のフラグメント量についても M.K. 例以外の 3 例では増加傾向が認められた。

Fig. 2 Reduced vWF fragments detected with polyclonal anti-reduced vWF
1. reduced normal plasma
2. reduced vWD type III (M.N.) plasma
3. reduced vWD type IIA (T.S.) plasma

Table 1 vWF:Ag-vWF:RCo ratio and the relative proportions of each vWF fragment

1) Patients with type I vWD

Patients	vWF:Ag/RCo (%)	240 kDa	216 kDa (220+210 kDa)	200 kDa	194 kDa	164 kDa	144 kDa
Y.T.	33.5/32	70.3	23.2	(-)	2.8	1.4	2.3
M.S.	44/10	70.2	16.1	(-)	5.5	4.4	3.8
T.K.	25/16	68.7	13.0	(-)	7.3	6.5	4.5
M.K. ¹⁾	15/4.8	61.7	15.5	(-)	9.2	9.0	4.5
N.K. ¹⁾	25/12.8	60.9	21.4	(-)	7.5	6.2	3.8
Y.D.	5/2	59.7	9.1	17.7	6.4	5.4	1.6
T.O.	6/<3	62.1	7.9	12.1	9.0	4.5	4.3
normal individuals		69.2±6.3*	17.3±3.6*	(-)	6.5±1.3*	3.7±1.1*	2.9±1.4*

2) Patients with type II A vWD

Patients	vWF:Ag/RCo (%)	240 kDa	216 kDa (220+210 kDa)	200 kDa	194 kDa	164 kDa	144 kDa
M.K.	90/<3	73.0	13.7	(-)	2.6	7.9	2.7
E.S.	160/6.3	63.3	16.4	(-)	3.1	11.6	5.6
H.U.	110/15	69.0	13.2	(-)	2.0	9.0	6.4
T.S.	5/<3	57.4	17.5	(-)	8.7	9.0	7.4
normal individuals		69.2±6.3*	17.3±3.6*	(-)	6.5±1.3*	3.7±1.1*	2.9±1.4*

3) Patients with type II B vWD

Patients	vWF:Ag/RCo (%)	240 kDa	216 kDa (220+210 kDa)	200 kDa	194 kDa	164 kDa	144 kDa
N.Y.	30/24	69.2	15.8	(-)	6.3	4.6	4.1
T.Y.	50/48	70.2	15.9	(-)	4.6	5.3	3.9
H.Y.	36/24	69.0	16.0	(-)	4.9	5.1	4.8
normal individuals		69.2±6.3*	17.3±3.6*	(-)	6.5±1.3*	3.7±1.1*	2.9±1.4*

normal individuals; n=50

* mean±SD

1) M.K.: father N.K.: son

3) type IIB(新分類の2Bに相当) vWD 患者血漿

type IIB vWD 患者3名についても正常ヒト血漿 vWF と同様, 240 kDa, 216 kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa のフラグメントが認められ (Fig. 略), デンシトメーターを用いた検索ではうち2名 (T.Y. と H.Y.) で type IIA より増加の程度は軽度であるが, 164 kDa のフラグメント量の増加がみられた (Table 1). また残る1名についても正常範囲内にはあるものの 164 kDa のフラグメント量の増加傾向が認められた. また, 144 kDa のフラグメント量については明らかな増加は認められなかった.

考 案

われわれは各種 vWD 患者血漿の vWF を直接還元処理し, SDS-PAGE 後の western blot

法により還元 vWF フラグメントを観察した. type I vWD 病型7例の中に新たに 200 kDa の異常フラグメントを有するものが2例存在することを発見した. また, デンシトメーターを用いた各還元フラグメントの全体に占める割合を検索した成績から異常フラグメントの存在しない type I vWD 5例中3例に, type II では IIA (2A) の全例および IIB (2B) の3例中2例で 164 kDa のフラグメント量が増加していることを見いだした. また, 144 kDa のフラグメント量については type IIA の3例で増加を認めたが, IIB については明らかな増加傾向は認められなかった.

type I vWD は vWD の中で一番多い病型であり, 常染色体優性遺伝性に出現する. vWD マルチマー構造解析では正常対象と同様に small multimer から large multimer まで存在するこ

とから vWF の量的異常症と考えられてきた。しかし、この type I vWD は vWF の small から large multimer までの量的分布の違いから、さらに3つのサブタイプ(Ia, Ib, Ic)に細分類され、その中に質的異常の存在することが推定されてきた¹¹⁾。特に新分類では type Ib, Ic は質的異常が存在することが推定され type 2 に分類されている。

しかし、vWD の遺伝子解析が急速に進歩してきたにもかかわらず、type I vWD の大部分では遺伝子異常が明らかでなく、唯一 vWF: Ag に比し vWF: RCo の低下した type I vWD で Phe606 が Ile に置換した1例が報告されているにすぎず¹²⁾、むしろ、血液型 O 型の正常成人で vWF: Ag の低下することが報告され¹³⁾¹⁴⁾、type I vWD との異同が注目されている。したがって、type Ib, Ic の質的異常は、マルチマー解析で正常対象と同様に large multimer まで存在するが Ib は large multimer の相対的低下、Ic は aberrant band の存在が質的異常の根拠となっている。今回われわれは large multimer を有する type I vWD 7 例中5例で正常血漿還元 vWF フラグメントと同様の構成をみたが、そのうち3例では 164 kDa の増加が認められた。また、この3例では vWF: Ag に比し vWF: RCo の低下がみられ、これらはマルチマー解析では Ib に相当し、今回の成績からこれらの例では還元フラグメント構成に異常がみられたことから、血漿 vWF の質的異常の存在が強く示唆された。一方、7 例中2例においては、正常血漿の還元 vWF フラグメントには認めない新たな異常 200 kDa フラグメントを観察した。また、同2症例も vWF: Ag に比し vWF: RCo の低下がみられ、vWF の何らかの共通した質的異常すなわち分子異常の存在が示唆された。最近、Battle ら¹⁵⁾が Zimmerman らの方法を用い、部分純化した type IIA vWD 患者血漿 vWF 中にわれわれと同様に 200 kDa の異常フラグメントの存在を報告した。しかし彼らの報告した vWD の血漿 vWF のマルチマー構成は large~intermediate multimer を欠き旧分類の type IIA に分類されている。一方、同症例の血小板 vWF は正常と同様のマルチマー

構成であり血漿および血小板で discrepancy がみられている。われわれの症例のマルチマー構成は large multimer まで存在することから、vWD のマルチマー解析による旧分類では type I に相当するが、還元 vWF フラグメントに Battle らの type IIA と同様の異常のみられることからマルチマー解析のみからの質的異常解析には限界があることが示唆される。この共通した異常 vWF フラグメントの存在に関しては今後 vWF の遺伝子解析が進めばより明確になると考えられる。

また、type II に関しては既に Zimmerman らが数 ml の血漿よりモノクローナル抗体を用いて type IIA (新分類の 2A) vWD 患者5名および type IIB (新分類の 2B) vWD 患者5名の血漿 vWF の還元フラグメントにおいて、正常ヒト血漿 vWF の還元フラグメントと比較して 176 kDa と 140 kDa のフラグメント量が明らかに増加していることを示した⁴⁾。今回のわれわれの方法においても彼らと同様に type IIA vWD 患者4名および type IIB vWD 患者2名において 164 kDa フラグメント量の増加が認められた。これらの vWD では血漿 vWF がその構造上の異常から *in vivo* において容易に蛋白分解を受け得るものと考えられた。各還元フラグメントの vWF サブユニット上での局在については比較すると Zimmerman らの方法では正常ヒト血漿 vWF は主たる 225 kDa フラグメントの他に、189 kDa, 176 kDa および 140 kDa の3本のサブフラグメントが存在する⁴⁾。一方、われわれの方法では第1報⁹⁾にて報告したごとく、正常ヒト血漿 vWF は 240 kDa, 216(220, 210) kDa, 194 kDa, 164 kDa および 144 kDa から構成され、vWF のアミノ末端側(SPIII) およびカルボキシ末端側(SPII) のそれぞれを認識するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を用いた解析から第1報に報告したように Zimmerman らの 176 kDa はわれわれの 164 kDa に相当し、140 kDa がわれわれの 144 kDa に相当するものと考えられた。また、われわれの成績で 164 kDa の増加がみられたが、144 kDa に関しては type IIA の一部で増加を認めたのみであり、はっきりと断定はでき

なかった。

しかしながら, 従来の非還元血漿 vWF マルチマー分析では指摘しえなかった vWF サブユニットレベルでの分子異常が, われわれの方法では比較的簡単に検索することが可能であり, 今後これらの方法に血漿の酵素処理や vWF サブユニットの各エпитープに対するモノクローナル抗体を用いての検討等を加えることで vWD の血漿 vWF の蛋白レベルでの異常を明らかに出来るものと考えられる。

(本研究は平成7年度文部省科学研究一般(C) 06670820 の助成により遂行した。)

文 献

- 1) Montgomery RR, Collier BS: Von Willebrand disease, in Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds): *Haemostasis and Thrombosis, Basic principles and clinical practice*, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1994, 134-168.
- 2) Sadler JE: A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemostas* **71**: 520-525, 1994.
- 3) Kinoshita S, Harrison J, Lazerson J, Abildgaard CF: A new variant of dominant type II vWD with aberrant multimeric pattern of Factor VIII-related antigen (type IID). *Blood* **63**: 1369-1371, 1984.
- 4) Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH: Subunit composition of plasma von Willebrand factor; Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (type IIC, IID, and IIE). *J Clin Invest* **77**: 947-951, 1986.
- 5) Dent JA, Galbusera M, Ruggeri ZM: Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest* **88**: 774-782, 1991.
- 6) 野並京子, 高橋幸博, 西久保敏也, 森井直之, 吉岡章: 血漿 von Willebrand 因子の還元フラグメントの検討. *血栓止血誌* **6**: 279-286, 1995.
- 7) 高橋幸博: 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査; von Willebrand 因子 (vWF): *日本臨床* **53**: 100-104, 1995.
- 8) Thorell L, Blombäck B: Purification of the factor VIII complex. *Thromb Res* **35**: 431-450, 1984.
- 9) 吉岡章, 西野正人, 嶋緑倫, 吉川昇, 安居資司, 福井弘: 新しい中間型第 VIII 因子製剤「乾燥低フィブリノゲン抗血友病人グロブリン, RCG-5 日赤」中の第 VIII 因子/von Willebrand 因子. *日本輸血学会雑誌* **31**: 296-300, 1985.
- 10) Takahashi Y, Kalafatis J, Girma JP, Meyer D: Abnormality of the N-terminal portion of von Willebrand factor in type IIA and IIC von Willebrand disease. *Thromb Haemostas* **60**: 498-505, 1988.
- 11) Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, Vianello L, Federici AB, Solinas S, Mazzucconi MG, Mariani G: Heterogeneity of type I von Willebrand disease: Evidence for a subgroup with an abnormal von Willebrand factor. *Blood* **66**: 796-802, 1985.
- 12) Mancuso DJ, Montgomery RR, Adam P: The identification of a candidate mutation in the von Willebrand factor gene of patients with a variant form of type I von Willebrand disease. *Blood* **78** (Suppl 1): 67a (Abstract), 1991.
- 13) Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR: The effect of ABO blood group on the diagnosis von Willebrand disease. *Blood* **69**: 1691-1695, 1987.
- 14) Shima M, Fujimura Y, Nishiyama T, Tsujiuchi T, Narita N, Matsui T, Titani K, Katayama M, Yamamoto F, Yoshioka A: ABO blood group genotype and plasma von Willebrand factor in normal individuals. *Vox Sang* **68**: 236-240, 1995.
- 15) Battle J, Lasierri J, Villamor AF, Navarro JL, Pardo A, Campos M, Justica B, Lopez Fernandez MF: Proteolytic processing of von Willebrand factor subunit: Heterogeneity in type IIA von Willebrand disease. *Ann Hematol* **68**: 111-115, 1994.