◆原 著◆

第 VIII 因子製剤中の遊離型第 VIII 因子抗原 (free FVIII : Ag) の検討

渡 辺 潤* 新 井 盛 夫* 香 川 和 彦*
天 野 景 裕* 福 武 勝 幸*

Analysis of Free Factor VIII Antigen in Commercial Factor VIII Concentrates

Jun WATANABE*, Morio ARAI*, Kazuhiko KAGAWA*
Kagehiro AMANO*, Katsuyuki FUKUTAKE*

Key words : free factor VIII, von Willebrand factor, factor VIII-von Willebrand factor complex, factor VIII concentrates, ELISA

The association of factor VIII with von Willebrand factor (vWF) is important for protection of factor VIII against proteolytic degradation in plasma. Recently developed factor VIII preparations, namely monoclonal antibody-purified factor VIII (M-factor VIII) and recombinant factor VIII, contain free form of factor VIII that is expected to form complexes with endogenous vWF after venous injection in the patients with hemophilia A. To clarify the difference of free factor VIII and factor VIII-vWF complex in the commercial factor VIII concentrates, we developed a quantitative assay for free factor VIII in which the sample was added to the wells of vWF-coated microtiter plates. Bound factor VIII was detected by monoclonal antibody against factor VIII, followed by incubation with peroxidase conjugated anti-mouse IgG, then the substrate ABTS for measuring absorbance at 405 nm. When the amount of free factor VIII antigen in one unit factor VIII activity of recombinant factor VIII was defined as one arbitrary unit, the ELISA detected free factor VIII as low as 0.016 unit/ml. Factor VIII was incubated with vWF or plasma from a patient with severe Hemophilia A for various concentrations, prior to the free factor VIII assay. At saturation, the stoichiometry was one factor VIII molecule per 50 vWF monomers. Of the products of factor VIII-vWF complex concentrate, no free factor VIII was detected. While a M-factor VIII concentrate contained free factor VIII comprising 24% of total factor VIII activity. In a gel filtration experiment of M-factor VIII, 15% of the total factor VIII was eluted as free factor VIII and 77% of that was co-eluted with vWF in the void volume. The free factor VIII and the complex form of factor VIII were immunoisolat-

---

* 東京医科大学臨床病理学教室 [〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1] : Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan.
受付: 1996. 11. 5, 受理: 1997. 1. 22.

ed and were analyzed after SDS-PAGE by immunoblotting. The factor VIII molecular structure and the susceptibility of thrombin cleavage were indistinguishable between the two forms of factor VIII. These results suggested that free factor VIII present in the M-factor VIII concentrate forms complexes with vWF in hemophilic plasma and is involved in physiologic hemostasis.

緒 言

血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) は内因系凝固過程において、活性型第 IX 因子、リン脂質、 Ca^{2+} と共に第 X 因子活性化複合体を形成し、第 X 因子活性化の速度を飛躍的に高める補因子として重要な機能を担っている¹⁾。血漿中の FVIII 濃度は $100\sim 200\text{ ng/ml}$ (約 1 nmol/L) と凝固因子の中でも最も微量であるが²⁾、von Willebrand 因子 (vWF) が結合し、FVIII-vWF 複合体を形成して FVIII 蛋白の活性を保護し、止血局所に効率的に運搬、濃縮する担体としての役割を果たす³⁾。vWF の血漿中濃度は $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ と FVIII に比較して高く、分子量 270 kDa の単量体 (モノマー) が重合し、2 量体 (ダイマー) から約 $20,000\text{ kDa}$ までの各種の大きさの多量体 (マルチマー) を形成している⁴⁾。血漿中の FVIII と vWF の濃度の比率からは、FVIII-vWF 複合体は 50 分子の vWF モノマーに対し、FVIII 1 分子の割合で結合している。すなわち血漿中の FVIII はすべて複合体として存在するが⁵⁾、vWF モノマーの FVIII 結合部位⁶⁾ の 98% はフリーの状態にある。一方、臨床上、正常血漿 1 ml 中の活性や抗原量を 1 単位 (U) と表現する場合、正常血漿中の FVIII と vWF の比率は $1(\text{U/ml})/1(\text{U/ml})=1$ となる。血友病 A 患者の補充療法に用いられる血漿由来第 VIII 因子製剤は、生化学的技術の進歩により、近年、高度に濃縮精製された製品が開発されてきた。現在、本邦では vWF を含有する、FVIII-vWF 複合体製剤⁷⁾ と抗 FVIII モノクローナル抗体カラムによるアフィニティー精製過程を経た製剤 (M-FVIII 製剤)⁸⁾ が使われている。さらに遺伝子組み換え型 FVIII 製剤 (R-FVIII 製剤) も普及し始めている。M-FVIII 製

剤は vWF の含有量が低く、vWF と複合体を形成していない遊離型 FVIII (free FVIII) の存在が示唆されている⁹⁾。本研究では free FVIII 抗原 (free FVIII : Ag) を定量する ELISA を構築し、M-FVIII 製剤を含めた各種 FVIII 製剤中の free FVIII : Ag を評価した。さらに M-FVIII 製剤中の free FVIII について、vWF と複合体を形成している複合体形成型 FVIII と比較してその生化学的性状の検討を行った。

材料及び方法

1. 材 料

以下の製剤を各社の供与により使用した。FVIII-vWF 複合体製剤として Haemate P® (Behringwerke, Marburg, Germany; 表示活性 500 U/vial , 250 U/vial) および Confact F® (化学及血清療法研究所, 熊本; 表示活性 500 U/vial)。FVIII 製剤として Hemofil M® (Baxter Healthcare Corporation, Hyland, CA, USA; 表示活性 500 U/vial) および Crosseight M® (日本赤十字社, 東京; 表示活性 500 U/vial)。R-FVIII 製剤として Kogenate® (Miles Inc., West Haven, CT, USA; 表示活性 $1,000\text{ U/vial}$) および Recombinate® (Baxter Healthcare Corporation; 表示活性 $1,000\text{ U/vial}$)。正常プール血漿 (NPP) は、健康成人 20 名 (年齢 $23\sim 39$ 歳の男性 10 名, 女性 10 名) の静脈血 9 容をシリコン処理されたガラス試験管中の 3.2% クエン酸ナトリウム 1 容に採取、混和し、 4°C 、 $1,200\text{ G}$ で 20 分間遠心し作成した乏血小板血漿 (PPP) を -80°C で凍結保存したものを使用した。

2. FVIII および vWF の測定

FVIII 活性 (FVIII : C) の測定; 遠心方式自動血液凝固線溶測定装置 (ACL-300R; IL,

Milan, Italy) を使用して凝固一段法¹⁰⁾ で測定した。検量線の作成には正常プール血漿(NPP)を, FVIII 欠乏血漿は市販血漿 (George King Bio-Medical; Overland Park, KS, USA) を, 試薬は APTT reagent (IL; Lexington, MA, USA) を用いた。検体の希釈には 0.1% (w/v) ヒト血清アルブミン (Buminate, Baxter Healthcare Corporation) を含む 0.05 M imidazol-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4 を用いた。

FVIII 抗原 (FVIII: Ag) の測定; FVIII: Ag の測定は, FIII C2 ドメインにエピトープを持つインヒビターの患者血漿から精製した IgG と FVIII 軽鎖 (LC) にエピトープを持つ抗 FVIII モノクローナル抗体, F8A171 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) とのサンドイッチ ELISA¹¹⁾ で行った。検量線の作成には NPP の倍数希釈列 (1:2~1:256) を用いた。

vWF 抗原 (vWF: Ag) の測定; vWF: Ag の測定は抗 vWF ポリクローナル抗体 R-40 (L. W. Hoyer; American Red Cross, Rockville, MD, USA) とビオチン標識した R-40 とのサンドイッチ ELISA で行った¹²⁾。検量線の作成には NPP の倍数希釈列 (1:50~1:6400) を用いた。

3. vWF の精製

Amano らの方法¹²⁾ に準じて精製した。概略は, FVIII-vWF 製剤 Haemate P (Table 1) を 0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.4 M CaCl₂, pH 7.4 で平衡化した Sephacryl S400HR (Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Swe-

den) 充填カラムでゲルろ過した。得られた void volume をプールし, FVIII インヒビター患者血漿から精製した IgG を固相化した Sepharose CL-2B (Pharmacia Fine Chemicals) を用い, 残存する FVIII を免疫吸着除去した。vWF 最終産物の各因子の測定結果は, vWF: Ag 106 U/ml, FVIII: C 0.19 U/ml, FVIII: Ag 0.07 U/ml であった。

4. free FVIII: Ag 測定系の検討

free FVIII: Ag ELISA の構築; 精製 vWF を 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 で 0.3 U/ml (vWF: Ag) に希釈し, マイクロタイタープレート (EIA flat plate II; 三光純薬, 東京) に 100 μ l ずつ添加, 4°C で 16 時間静置した。0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.4 (以下 TBS-T) で 5 回洗浄後, 3 倍に希釈した Block Ace (雪印乳業, 札幌) で 37°C, 2 時間ブロッキングし, TBS-T で 5 回洗浄して固相化 vWF プレートを作成した。0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1% (w/v) ウシ血清アルブミン (生化学工業, 東京), (以下 TBS-A) で希釈調整した試料 100 μ l を固相化 vWF プレートの各ウェルに添加し, 37°C で 2 時間反応後, TBS-T で 5 回洗浄した。次に FVIII A2 ドメインの N 末端側 (373~606) にエピトープを持つ抗 FVIII モノクローナル抗体 Mab413 (L. W. Hoyer; American Red Cross, Rockville, MD, USA)⁴⁾ を TBS-A で 2 μ g/ml に希釈して, 100 μ l ずつ各ウェルに添加し, 37°C で 1.5 時間反応後, TBS-T で 5 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗マ

Table 1 Measurements of factor VIII-von Willebrand factor complex in factor VIII concentrates, normal pooled plasma and purified von Willebrand factor

		FVIII: C(U/ml)	vWF: Ag(U/ml)	vWF: Ag/FVIII: C	free FVIII: Ag(U/ml)
FVIII-vWF	Confact F	1.00	1.76	2.19	n.d.
	Haemate P	1.00	2.07	2.89	n.d.
M-FVIII*	Hemofil M	1.00	0.0061	0.006	0.24
	Crosseight M	1.00	0.0054	0.005	0.24
R-FVIII	Recombinate	1.00	1.1×10^{-5}	1×10^{-5}	1.05
	Kogenate	1.00	n.d.		1.00
NPP		1.12	1.00	0.893	n.d.
vWF		0.0019	1.06	558	n.d.

n.d.: not detected, Parameters of factor VIII concentrates were compared when FVIII: C were adjusted to 1.00 U/ml.

*: Hemofil M and Crosseight M are produced by the identical procedure including an affinity chromatography.

ウス IgG (5 mg/ml) (TAGO Inc., Burlingame, CA, USA) を TBS-A で 3,000 倍に希釈し, 37°C で 1.5 時間反応させ, TBS-T で 5 回洗浄後, ABTS peroxidase substrate (Kirkgaard and Perry laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を添加し, 30 分後の吸光度 (405 nm) を吸光度計 (Titertek Multiskan MCC/340; Labsystems, Helsinki, Finland) で測定した。検量線の作成には, Kogenate の希釈列を使用した。

精製 vWF または FVIII 欠乏血漿と Kogenate の混和試験; Kogenate 1 U/ml (FVIII: C) に TBS-A で希釈した精製 vWF 1~0.008 U/ml (vWF: Ag) の倍数希釈列を 200 μ l ずつ等量混和し, 37°C で 20 分間反応後, 前述の ELISA で free FVIII: Ag を測定した。また Kogenate 1 U/ml (FVIII: C) と, TBS-A で 1~1,024 倍に希釈した FVIII 欠乏血漿の倍数希釈列を 200 μ l ずつ等量混和し, 37°C で 20 分間反応後, 前述の ELISA で free FVIII: Ag を測定した。

5. Hemofil M に存在する free FVIII の解析

ゲルろ過分析; Hemofil M (表示活性 500 U/vial) を 5 ml の添付蒸留水で溶解して不溶物を除去後, 0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4 で平衡化した Sephacryl S400HR 充填カラム (16 $\times$ 850 mm) に 4.9 ml を添加した。ゲルろ過は 4°C 下, 同緩衝液により流速 0.5 ml/min で行い, 溶出液を 5 ml ずつポリプロピレンチューブに分離採取した。各分画の FVIII: C を確認したところ, 後述するように void volume とゲルろ過分画内の 2 カ所に FVIII: C のピークが得られた。これらのピークをそれぞれプールし, プール#1, プール#2 とした。またプール#2 と精製 vWF を TBS-A でそれぞれ 1 U/ml (FVIII: C, vWF: Ag) に希釈後, 200 μ l ずつ等量混和し, 37°C で 20 分間反応後, 前述の ELISA で free FVIII: Ag を測定した。

免疫吸着法とイムノブロットティングによる FVIII 蛋白の解析; FVIII 蛋白の解析は免疫吸着を利用した Arai らの方法¹³⁾ に準じた。本実

験系では, FVIII A2 ドメインと C2 ドメインにそれぞれにエピトープを持つインヒビター患者血漿から精製した IgG を固相化した Sepharose CL-4B (Pharmacia) ゲルを混和して, 免疫吸着体とした。概略は, 抗体固相化ゲル 40 μ l に 10 U (FVIII: C) に相当する前述のゲルろ過プール検体#1, #2 をそれぞれ添加後, 25°C で 4.5 時間, 反応させた。ゲルを洗浄後, 一部はトロンビンを反応させ, 残りはそのまま SDS にて溶出後, 4~20% SDS-PAGE で蛋白を展開した。PVDF 膜 (Immobilon; Millipore corp., Bedford, MA, USA) に転写後, FVIII の C2 ドメインを認識する J16D-9 (C. A. Fulcher; Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA, USA) および A2 ドメインを認識する C8 (J. R. Scientific; Woodland, CA, USA) の 2 種類のモノクローナル抗体によりイムノブロットティングを行い FVIII のフラグメントを検出した。

結 果

1. 各製剤の FVIII: C および vWF: Ag

添付蒸留水で溶解した各製剤の FVIII: C, vWF: Ag および vWF: Ag/FVIII: C 比は FVIII-vWF 製剤では, Haemate P が 66.2 U/ml, 136.7 U/ml および 2.89, Confact F が 65.0 U/ml, 114.6 U/ml および 2.19, M-FVIII 製剤では, Hemofil M が 54 U/ml, 0.33 U/ml および 0.006, Crosseight M が 60.0 U/ml, 0.32 U/ml および 0.005, R-FVIII 製剤では, Kogenate が 125 U/ml, 検出感度以下 (1.6%) および測定不能, Recombinate が 110 U/ml, 0.0012 U/ml および 10^{-5} であった。Table 1 には各製剤の比較のため FVIII: C を 1.0 U/ml に換算して表記した。

2. free FVIII: Ag 測定系

測定系の検討; Fig. 1 に Kogenate の倍数希釈列から得られた free FVIII: Ag の検量線を示した。Kogenate 中には vWF が存在しないことから (Table 1), 1 U/ml (FVIII: C) の Kogenate を 100% free FVIII: Ag 1 U/ml とし, 各希釈ポイントの吸光度 (mean $\pm$ 2SD (n=7)) から標準曲線を作製したところ, 対照 (緩

Fig. 1 Calibration curve of ELISA measurement for free factor VIII:Ag. Recombinant factor VIII concentrate, Kogenate diluted to one unit/ml was defined as one unit of free factor VIII. The mean $\pm$ 2 SD are indicated (n=7)

Fig. 2 Residual free factor VIII:Ag in the mixture of Kogenate and vWF at various mixing ratio.

衝液)の吸光度と重ならない最小濃度は0.016 U/mlであり、これを測定限界とした。1 U/ml (FVIII:C)に希釈した各製剤のfree FVIII:Agを測定した結果、Confact FおよびHaemate Pは検出感度以下、Hemofil MとCrosseight Mは0.24 U/ml、KogenateとRecombinateはそれぞれ1.0 U/ml、1.05 U/mlとなった (Table 1)。

精製vWFまたはFVIII欠乏血漿とKogenateの混和試験;一定量 (1 U/ml FVIII:C)のKogenateと精製vWFの希釈列との混和反応後の残存free FVIII:Agの測定結果をFig. 2に示す。添加されたvWFの濃度依存性にfree FVIII:Agは低下を示した。すなわち

vWF:Ag/FVIII:C (U/U)比が0.008以下の低濃度のvWFの存在下では添加されたKogenateの94%以上がfree FVIII:Agとして検出されたが、同比が0.016で45%に急激に低下し、0.5以上ではfree FVIII:Agは検出されなかった。また精製vWFの代わりにFVIII欠乏血漿の各希釈列をKogenateと混和した場合も同様に、添加されたvWFの濃度依存性にfree FVIII:Agは低下した (Fig. 3)。ここではvWF:Ag/FVIII:C (U/U)比が0.016までのvWF低濃度下では、98%以上がfree FVIII:Agとして検出され、同比が0.5までvWF濃度依存性にfree FVIII:Agは減少し、1.0においては検出されなかった。

Fig. 3 Residual free factor VIII: Ag in the mixture of Kogenate and plasma from a patient with severe Hemophilia A at various mixing ratio.

Fig. 4 Profile of gel filtration of Hemofil M. 617 U of Hemofil M was applied onto Sephacryl S 400 HR column (16×850 mm). The first steep peak of FVIII:C in the void volume (fx # 15~20) and the following fractions (fx # 24~31) containing small amount of FVIII:C were pooled as pool # 1 and pool # 2, respectively.

4. Hemofil M に存在する free FVIII の解析

ゲルろ過分析; Hemofil M のゲルろ過パターンを Fig. 4 に示す。各分画の FVIII:C および vWF: Ag を測定したところ、このカラムの void volume に一致する FVIII:C の鋭いピーク #1 (フラクション 15~20, 70~100 ml 溶出点) と、ゲルろ過分画内の FVIII:C の緩やかなピーク #2 (フラクション 24~31, 115~155 ml

溶出点) が確認された。添加した Hemofil M およびゲルろ過後のプール検体 (プール #1, #2) の FVIII:C, vWF: Ag, free FVIII: Ag 各々の総単位数 (U), および vWF: Ag/FVIII: C 比の計算結果を Table 2 にまとめた。free FVIII: Ag はプール #2 にのみ検出され、その中の FVIII: C は全体の 15% を示した。また、プール #2 と精製 vWF を混和すると、free FVIII: Ag は、検出されなくなった。

Table 2 Measurements of factor VIII-von Willebrand factor complex in Hemofil M and its fractions

	F VIII: C (total U)	vWF: Ag (total U)	vWF: Ag/F VIII: C	free F VIII: Ag (total U)
Hemofil M	345	4.9	0.014	82.8
pool # 1	264	4.0	0.015	n.d.
pool # 2	51.2	0.1	0.002	49.5
# 2+vWF	—	—	—	n.d.

n.d.: not detected

Fig. 5 Immunoabsorbed normal pooled plasma, monoclonally-purified factor VIII concentrate, and its fractions. Each sample was subjected by 4~20% SDS-PAGE and the factor VIII fragments were detected using a mixture of two monoclonal antibodies, J 16 D-9 and C 8.

免疫吸着法とイムノブロッティングによる FVIII 蛋白の解析; Fig. 5 に FVIII 蛋白の解析結果を示した。FVIII 蛋白のコントロールとして Hemofil M を直接添加し (lane 1, 2), lane 3-10 は免疫吸着, 溶出された FVIII を展開したもので, それぞれトロンビン反応後の FVIII も

同時に検討した。Hemofil M (lane 1, 2) とその免疫吸着後のサンプル (lane 5, 6) を比較すると FVIII フラグメント構成は基本的に同等で, 免疫吸着や溶出過程における蛋白分解は認められず, トロンビンに対する反応性も保持されていた。またゲルろ過によって得られたプー

ル#1とプール#2のFVIIIフラグメント構成にも相違は見られなかった。すなわち90 kDから200 kDまでの重鎖の構成に差はなく、軽鎖に関しても80 kDフラグメントのみで、72 kDフラグメントは検出されなかった。トロンビンに対する反応性も両者は同等であり、90 kD以上の重鎖の開裂により45 kDフラグメントが検出され、軽鎖は72 kDフラグメントに変化した。

考 察

FVIII : Agの測定は、抗FVIII抗体保有患者のIgGを用いたimmuno-radiometric assay (IRMA)¹⁴⁾¹⁵⁾やenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)¹¹⁾が行われているが、いずれの方法もFVIII-vWF複合体とfree FVIIIの区別はできない。本研究で構築したELISAではfree FVIII : Agを特異的に0.016 U/mlの感度で測定することができた。

FVIIIとvWFの結合に関してはvWFを直接あるいはモノクローナル抗体を介して固相化した系¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、ゲルろ過法²⁰⁾²¹⁾超遠心法⁶⁾を用いた各種の報告がなされている。固相化vWFの系ではFVIIIとの親和性は解離定数Kd=0.1~0.2 nmol/Lで、分子結合比 (stoichiometry) は、正常血漿中と同様にvWFモノマー50~100個当たり、FVIII1分子の割合であることが示されている。VlotらはvWFを抗vWFモノクローナル抗体を介してSephacroseに結合させた系²²⁾、直接金粒子に結合させた系²³⁾、さらにゲルろ過法²³⁾による検討により、vWFモノマー当たり、FVIIIはそれぞれ1.3分子、0.5分子、0.5分子の比率で結合するとした。この結合比は、vWFモノマー毎にFVIII結合部位が存在するというLollarとParkerのブタのFVIIIとvWFを用いた超遠心法での結果に近似する⁶⁾。Vlotらはこれら反応系による分子結合比の相違の理由として、プラスチックに直接あるいは抗体を介して固相化したvWFはその構造変化から98~99%のFVIII結合部位が機能的に損なわれることを推測している。我々の構築したfree FVIII測定ELISAでは、固相化したvWFと液相中のFVIII-vWF複合

体、free FVIIIとの相互反応を検出するものである。したがって本法では固相化vWFと液相のvWFのFVIII親和性が同等であることが重要であり、両相での分子結合比の相違は測定上の問題にはならないと考えられる。今回の検討で純化vWFあるいは血友病A患者血漿とFVIIIの混和によりvWF : Ag/FVIII : C(U/U)比でそれぞれ0.5、1.0以上でfree FVIIIが検出されなくなった。このポイントは上記の分子結合様式としてはFVIII 1分子当たりvWFモノマー25~50個に相当し、液相中でもvWFモノマーの50~98%がFVIII不飽和の状態にあることを示唆している。Vlotらの示している液相中でのFVIII-vWFの分子結合比(FVIII : vWFモノマー=1 : 1)とは異なる理由としては、液相中でのFVIIIとvWFの親和性はkd=0.32 nmol/L²²⁾、0.46 nmol/L²¹⁾と固相系の0.1~0.2 nmol/L¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾より僅かに低い。ため、本ELISAの2時間の反応時間中に、液相中のFVIII-vWF複合体のFVIIIが固相化vWFへ移行、結合し、みかけ上Fig. 2, 3の検量線が右側にシフトしている可能性がある。しかし後述するように、M-FVIII製剤中のfree FVIIIの検討ではELISAとゲルろ過の結果に大きな差はなく、free FVIII測定ELISAは液相系の分子結合様式を反映していると考えられる。

各種FVIII製剤中のfree FVIII : Agの測定結果では、2社のFVIII-vWF複合体製剤のvWF : Ag/FVIII : C比は、いずれも2.0以上でfree FVIII : Agは検出されなかったが、M-FVIII製剤のvWF : Ag/FVIII : C比は、0.005~0.006と低値にもかかわらず、free FVIII : Agは0.24 U/mlを示した (Table 1)。これを精製vWFまたはFVIII欠乏血漿とfree FVIII (Kogenate)の混和試験の結果に照らし合わせると、vWF : Ag/FVIII : C比が0.005では95%以上がfree FVIIIであることより (Fig. 2, 3)、M-FVIII製剤中のvWFとFVIIIの親和性が高い可能性が考えられた。

M-FVIII製剤中に認められたfree FVIII : Agについて別の角度から解析するために、Hemofil Mをゲルろ過した結果、void volume

(プール#1)に回収された77% (264 U/345 U×100)のFVIII:CはFVIII-vWF複合体によるものと考えられる。一方、フラクション24から37に至るまで、広い範囲でFVIII:Cが検出されているのは、重鎖が90~200 kDの多様性のあるfree FVIIIが溶出していることを示唆している。プール#2 (フラクション24~31)のFVIII:Cは51.2 Uと全体の15%だが、より広い範囲のフラクション中のfree FVIIIを考慮に入れば、より高い数値を示すことが考えられる (Table 2)。

ゲルろ過後のフラクションの免疫吸着による解析では、free FVIIIはvoid volumeに溶出されたFVIII-vWF複合体のFVIIIに比べ、分子構成やトロンビンによる開裂パターンに差を認めなかった (Fig. 5)。さらに精製vWFとの混和後にfree FVIIIは検出されなくなったことより、vWFとの結合能を維持していることが示された (Table 2)。free FVIIIを精製vWFと混和後、TSK4000SWXL (東ソー、東京) カラムを用いてHPLC分析した結果でも、カラム分画内に出現していたfree FVIIIによるFVIII:Cのピークは、完全にvoid volumeに移動し、vWFと複合体を形成することが裏付けられた (データ未掲載)。以上の結果より、M-FVIII製剤中に存在するfree FVIIIと、FVIII-vWF複合体中のFVIIIは生化学的に差を認めなかった。したがって、M-FVIII製剤中の残存vWFの量に比べfree FVIIIが少ない理由としては、vWF側のFVIII親和性が高いか、あるいは潜在的なFVIII結合部位が露呈していることが考えられる。その要因としては製造行程におけるvWFの構造変化の可能性などが考慮される。

Recombinateには 1.1×10^{-3} U/mlと極微量のvWFが検出され、vWF:Ag/FVIII:C比は 1.0×10^{-5} となった。これはチャイニーズハムスター卵巣細胞にvWFのcDNAも導入してFVIIIを安定して発現させる手法をとっている²⁴⁾ため、続くFVIII精製過程でも微量のvWFが残存しているものと解釈される。しかしRecombinateのfree FVIII:Agは実測値105%であり (Table 1)、FVIIIのほとんどが

free FVIIIとして存在すると考えられ、Fig. 2に示したvWF:Ag/FVIII:C比と残存free FVIII:Agの相関結果と同様の結果であった。また、NPP中にfree FVIII:Agは検出されず (Table 2) これは正常血漿中ではvWF:Ag/FVIII:C比1でvWFと複合体を形成しているためであり、従来のゲルろ過法による解析結果²⁾に矛盾しない結果となった。

近年開発され、臨床応用されているM-FVIII製剤やR-FVIII製剤はvWFを含まないか、あるいは極微量であるため、血友病患者に輸注された後は血中のvWFと複合体を形成し、活性化プロテインC²⁰⁾、活性型第IX因子²⁵⁾、リン脂質²⁶⁾²⁷⁾などとの相互反応が制御され、安定化していると考えられている。実際、それらの製剤の第VIII因子血中半減期はFVIII-vWF複合体製剤と同等である²⁸⁾²⁹⁾。VlotらはFVIIIとvWFの結合動態解析から、理論上、血友病患者に輸注されたfree FVIIIは約2秒で50%、12秒間で95%以上が血漿中のvWFと複合体を形成することを計算している²¹⁾。この結合速度はfree FVIIIのvWF欠乏血中の半減期2~2.5時間³⁰⁾³¹⁾に比べ格段に迅速である。我々の成績からもM-FVIII中のfree FVIIIは、血友病A患者に輸注された後は、血漿中で内因性のvWFと複合体を形成し、生理的な止血機構に参画することが推察される。

結 語

1. vWFと複合体を形成していない遊離型FVIII抗原 (free FVIII:Ag) を定量する新しいELISAを開発した。
2. このELISAで各種FVIII製剤中のfree FVIII:Agを測定した結果、M-FVIII製剤にはFVIII:Cの1 U/mlにつき0.24 U/ml相当のfree FVIII:Agが存在することが確認された。
3. M-FVIII製剤中のfree FVIII:Agは、vWFと結合しているFVIIIと比較して、分子構成、トロンビンによる分解およびvWFとの結合能に差は認められなかった。

謝 辞: 本稿を終えるにあたり、試薬を提供して戴いたDr. C.A. Fulcher, Dr. L.W. Hoyer

に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Van Dieijen G, Tans G, Rosing J, and Hemker HC : The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* **256** : 3433-3442, 1981.
- 2) Fulcher CA, and Zimmerman TS : Characterization of the human Factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc Natl acad sci USA* **79** : 1648-1652, 1982.
- 3) Weiss HJ, Sussman II, and Hoyer LW : Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. *J Clin Invest* **60** : 390-404, 1977.
- 4) Sadler JE : von Willebrand factor. *J Biol Chem* **266** : 22777-22780, 1991.
- 5) Hoyer LW : Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). IV. Radioimmunoassay of AHF antigen. *J Lab Clin Med* **80** : 822-833, 1972.
- 6) Lollar P, Parker ET, Curtis JE, Helgersson SL, Hoyer LW, Scott ME, and Scandella D : Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. *J Clin Invest* **93** : 2497-2504, 1994.
- 7) 高橋芳右, 帯刀 亘, 長山礼三, 花野政晴, 滝沢慎一郎, 田村 真, 山口利夫, 和田 研, 柴田 昭 : 加熱第 VIII 因子製剤による von Willebrand 病および類縁疾患の治療, 血小板型 von Willebrand 病での検討. *臨床血液* **28** : 2117-2124, 1987.
- 8) 福井 弘, 松本脩三, 森 和夫, 木下忠俊, 池松正次郎, 稲垣 稔, 長尾 大, 三間屋純一, 斉藤英彦, 高松秀樹, 吉岡 章, 田中一郎, 吉岡慶一郎, 垣下榮三, 西田恭治, 白幡 聡 : 抗第 VIII 因子モノクローナル抗体を用いて高度に純化した第 VIII 因子濃縮製剤 (BTL-150) の臨床試験成績. *基礎と臨床* **23** : 2363-2382, 1989.
- 9) 福武勝幸, 松本顕治, 新井盛夫, 依藤 寿, 羽田雅夫, 池松正次郎, 藤巻道男 : 抗 VIII 因子モノクローナル抗体による免疫吸着法で精製された VIII 因子製剤 (ヘモフィル M®) の性状の検討. *Immunohaematology* **10** : 350-355, 1988.
- 10) Breckenridge RT, and Ratnoff OD : Studies on the circulating anticoagulant directed against antihemophilic factor : with notes on an assay for antihemophilic factor. *Blood* **20** : 137-149, 1962.
- 11) 依藤 寿 : Monoclonal 抗体を用いた ELISA による第 VIII 因子凝固抗原 (VIII : Ag) 測定法の開発と凝血過程における VIII 因子/vWF 因子複合体の構造変化についての研究. *東医大誌* **44** : 707-716, 1986.
- 12) Amano K, Arai M, Koshihara K, Suzuki T, Kagawa K, Nishida Y, and Fukutake K : Autoantibody to factor VIII that has less reactivity to factor VIII/von Willebrand factor complex. *Am J Hematol* **49** : 310-317, 1995.
- 13) Arai M, Inaba H, Higuchi M, Antonarakis SE, Kazazian HHJr, Fujimaki M, and Hoyer LW : Direct characterization of factor VIII in plasma : Detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372 → histidine). *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 4277-4281, 1989.
- 14) Peake IR, Bloom AL, Giddings JC, and Ludlam CA : An immunoradiometric assay for procoagulant factor VIII antigen : Results in Haemophilia, von Willebrand disease and fetal plasma and serum. *Br J Haematol* **42** : 269-281, 1979.
- 15) Holmberg L, Borge L, Ljung R, Nilsson IM : Measurement of antihaemophilic factor A antigen (VIII : CAg) with a solid phase immunoradiometric method based on homologous non-haemophilic antibodies. *Scand J Haematol* **23** : 17-24, 1979.
- 16) Ganz PR, Atkins JS, Palmer DS, Dudani AK, Hashemi S, and Luison F : Definition of the affinity of binding between human von Willebrand factor and coagulation factor VIII. *Biochem Biophys Res commun* **180** : 231-237, 1991.
- 17) Layet S, Girma JP, Obert B, Peynaud-Debayle E, Bihoreau N, and Meyer D : Evidence that a secondary binding and protecting site for factor VIII on von Willebrand factor is highly unlikely. *Biochem J* **282** : 129-137, 1992.
- 18) Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, and Mertens K : The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem*

- J **257** : 679-683, 1989.
- 19) Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, and Meyer D: New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* **74** : 1591-1599, 1989.
- 20) Koedam JA, Meijers JCM, Sixma JJ, and Bouma BN: Inactivation of human factor VIII by activated protein C. *J Clin Invest* **82** : 1236-1243, 1988.
- 21) Zucker MB, Soberano ME, Johnson AJ, Fulton AJ, Kowalski S, and Adler M: The *in vitro* association of antihemophilic factor and von Willebrand factor. *Thromb Haemost* **49** : 37-41, 1983.
- 22) Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JCM, Damas C, Van den Berg HM, Bouma BN, and Sixma JJ, Willems GM: Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood* **87** : 1809-1816, 1996.
- 23) Vlot AJ, Koppelman SJ, Van den Berg HM, Bouma BN, and Sixma JJ: The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood* **85** : 3150-3157, 1995.
- 24) Adamson R: Design and operation of a recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII. *Ann Haematol* **68** : S9-S14, 1994.
- 25) Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, and Mertens K: Identification of a binding site for blood coagulation factor IX on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem* **269** : 7150-7155, 1994.
- 26) Fay PJ, Coumand JV, and Walker FJ: von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *J Biol Chem* **266** : 2172-2177, 1991.
- 27) Lajmanovich A, Hudry-Clergeon G, Freyssinet JM, and Marguerie G: Human Factor VIII procoagulant activity and phospholipid interaction. *Biochim Biophys Acta* **678** : 132-136, 1981.
- 28) Kasper CK, Kim HC, Gomperts ED, Smith KJ, Salzman PM, Tipping D, Miller R, and Montgomery RM: *In vivo* recovery and survival of monoclonal-antibody-purified factor VIII concentrates. *Thromb Haemost* **66** : 730-733, 1991.
- 29) Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Scjwartz RS, and the Kogenate previously untreated patients study group: Recombinant Factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. *N Engl J Med* **328** : 453-459, 1993.
- 30) Nishino M, Nishino S, Sugimoto M, Shibata M, Tsuji S, and Yoshioka A: Changes in factor VIII binding capacity of von Willebrand factor and factor VIII coagulant activity in two patients with type 2N von Willebrand disease after hemostatic treatment and during pregnancy. *Int J Hematol* **64** : 127-134, 1996.
- 31) Tuddenham EGD, Lane RS, Rotblat F, Johnson AJ, Snape TJ, Middleton S, and Kernoff PBA: Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br J Haematol* **52** : 259-267, 1982.
-