

蛇毒 Botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性 に関する研究

II. von Willebrand 病各病型における Botrocetin cofactor 活性測定の検討

奈良県立医科大学小児科学教室

西尾健治

STUDIES ON VON WILLEBRAND FACTOR ACTIVITY INDUCED BY SNAKE VENOM BOTROCETIN

II. SEVERAL TYPES OF VON WILLEBRAND DISEASE

KENJI NISHIO

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received January 9, 1990

Summary: Recently I have established an assay for the snake venom coagulin activity of platelets (botrocetin cofactor: Bcof) that is specifically dependent on the amount of plasma von Willebrand factor (vWF), and suggested that this assay can be used as an alternative diagnostic method for von Willebrand disease (vWD). In this study, I have measured Bcof in a total of 50 plasmas from patients with hemophilia A and 45 plasmas from those with vWD. Next, vWF in patient plasmas with vWD was indirectly radiolabeled by [¹²⁵I] anti-vWF monoclonal antibody designated as 2.2.9 to evaluate botrocetin-mediated binding ability to platelet glycoprotein Ib (GPIb). The result of this assay was compared with that of the previous assay using antibiotic ristocetin, which also mediates the interaction between vWF and GPIb.

In hemophilia A, Bcof was significantly higher ($152.5 \pm 108\%$) than normal and showed a good correlation to vWF antigen (vWF:Ag) or ristocetin cofactor (Rcof) (vWF:Ag/Bcof $r=0.93$, Rcof/Bcof $r=0.92$). In vWD patients, the levels of Bcof were significantly lower than normal, usually less than 47%. In 23 cases of Type I vWD, Bcof ranged from below 5% to 47%. In vWD patients with Type IIA (8 cases), IIC (3 cases) and IIF (1 case), Bcof levels were moderately decreased, ranging from below 5% to 30% but higher than Rcof. In Type IIB (3 cases), IID (2 cases) and IIE (2 cases), Bcof showed a parallel decrease (24%-40%) with Rcof. Indirectly radiolabeled vWF in all patient plasmas except for Type IIB showed more decreased binding than normal, in good accord with Bcof. In Type IIB, both the ristocetin and botrocetin mediated vWF binding ability were enhanced (120-140%). In Types IIA, IIC and IIF, botrocetin-mediated binding ability was distributed from 30% to 60%, whereas ristocetin-mediated binding abilities stayed within 5%-10%.

Index Terms

botrocetin cofactor (Bcof), ristocetin cofactor (Rcof), von Willebrand disease (vWD)

緒 言

von Willebrand¹⁾ (1926) により“Hereditär pseudohemofili”として報告された出血時間の延長を特徴とする上染色体遺伝性疾患は、今日遺伝形式、臨床像、検査所見などの基礎病態において、かなり heterogenous な group よりなるも、ヒト染色体 No.12 上の von Willebrand 因子 (vWF) 遺伝子の欠陥により、vWF 蛋白の量的ないし質的合成障害との観点から、von Willebrand 病 (vWD) として把握されている²⁾³⁾。本症の診断には臨床像にくわえて、i.出血時間、ii.血小板粘着能、iii.第Ⅷ因子活性 (Ⅷ: C)、iv. vWF 抗原 (vWF: Ag)、v. リストセチン惹起血小板凝集 (ristocetin induced platelet aggregation, RIPA)、vi. 患者血漿中のリストセチン・コファクター活性 (ristocetin cofactor activity, Rcof) などの測定が必要である。さらに、本症の各種病型の済定には、i) 低濃度のリストセチンによる血小板凝集 ii) vWF: Ag の二次元交叉電泳泳動法 iii) agarose 電泳泳動法による vWF: Ag の multimeric analysis などが重要と考えられている。血漿 sample を agarose 電泳泳動後、¹²⁵I 標識抗ヒト vWF 家兎 IgG で免疫固定し、次いで autoradiography を行なうと、正常血漿中の vWF は $1.0 \sim 20 \times 10^6$ dalton におよぶ十数本の multimer band の series として観察される。この所見は vWD の病型分類上の基本項目としてとりあげられ、現在、vWD は、1. vWF: Ag (vWF 蛋白量) は低下するも multimer の各 series は正常と同様に存在する Type I、2. vWF: Ag 量は必ずしも低下しないが multimer 構造に異常が見られる Type II、3. vWF: Ag が欠如しすべての multimer を欠く Type III に大別されている。Type I は血漿 vWF 蛋白の量的合成障害症と考えられているが、Ia, Ib, Ic, I New York などの subtype の存在が報告されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。Type II は血漿 vWF の量的ならびに質的異常が存在するもので、IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH および Type B と呼ばれる subtype が報告されている。Multimer 分析では Type B⁷⁾ が正常とされている他は、少なくとも large multimer が欠如しており、又 IIC-IIH の各 subtype では multimer band の配列異常が観察されている。Type III は血漿 vWF の量的欠陥症で、常染色体劣性に出現する病型である。

vWF は障害血管壁への血小板の結合に必須の血漿粘着蛋白で、循環血漿中では第Ⅷ因子と結合してその安定化に不可欠の要素として働き、又障害血管内皮下組織に血小板が粘着するのを促進する止血因子であるが、in

vitro では抗生剤の一種の ristocetin の存在下に血小板膜上レセプターの糖蛋白 (glycoprotein) Ib (GPIb) に結合すること、又 ADP, トロンピンにより刺激された血小板膜の GP II b/III a レセプターに結合することが知られている⁸⁾⁹⁾。このうち、ristocetin 存在下の血漿 vWF と血小板の結合反応は通常、血小板多血漿を用いて観察され、RIPA と呼ばれ、この反応に関与する血漿因子は Rcof と呼ばれているが、RIPA あるいは Rcof は vWD の診断の有用なスクリーニング試験として用いられている¹⁰⁾。一方、Read ら¹¹⁾ により Bothrops jararaca 種の蛇毒より精製された botrocetin が ristocetin と同様ヒト血小板多血漿を凝集することが見いだされた。Brinkhous & Read ら¹²⁾ はホルマリン固定血小板を用いて肉眼的凝集時間でヒト血漿中の botrocetin cofactor (Bcof) 活性を測定する方法を開発し、vWD の診断に有用としているが、一般化していなかった。著者は¹³⁾ ホルマリン固定正常ヒト血小板と血小板凝集計を用いて客観性のある Bcof 活性測定系を確立し、測定系に関与する因子は ristocetin 存在下の場合と同じく、血漿側は vWF でその機能 domain は vWF-subunit 組成中の N 末アミノ酸残基より 449-728 番アミノ酸残基で構成される 52/48kDa fragment にあり、一方、血小板側の receptor は GPIb であることを第 1 報で報告した。引き続き今回、Bcof 活性測定の vWD 診断上の有用性の有無について、各病型患者血漿および血友病 A 患者血漿の Bcof 活性を測定し、Rcof 活性と比較検討した。又、ristocetin 及び蛇毒 botrocetin によって惹起される血小板凝集は血漿中の vWF の GPIb への結合で開始されると考えられるので、ristocetin あるいは botrocetin 存在下にこれら患者血漿の血小板 GPIb への結合能についても検索した。

試材および方法

1 対象: vWD 患者 45 例および血友病 A 患者 50 例について検索した。vWD の病型は Type I 23 例、Type II 19 例および Type III 3 例であった。このうち vWF の質的障害症で large multimer 欠乏を特徴とする Type II はさらに数種の亜型に分類されるが、IIA 8 例、IIB 3 例、IIC 3 例の自験例の他、IID 2 例 (米国 Scripps 研究所 Zimmerman 博士より提供を受けた)、IIE 2 例 (1 例は慶応大学池田博士、1 例は Zimmerman 博士より提供を受けた)、IIF 1 例 (Zimmerman 博士提供) であった。これら亜型の特徴的所見については成績ならびに考案で記載する。

2 方法:

1) 正常ホルマリン固定血小板の作成: 方法の詳細は第1報で述べたので省略する¹³⁾。

2) Botrocetin の部分純化: 方法の詳細は第1報で述べた。

3) マウスモノクロナール抗体: 教室で作成した ristocetin 惹起血小板凝集及び botrocetin 惹起血小板凝集を完全に抑制する抗 vWF モノクロナール抗体 (NMC-4)¹⁴⁾, 及び Dr. Zimmerman より提供を受けた抗 vWF モノクロナール抗体 2.2.9 (この抗体は vWF の SP-V8 fragment II すなわち vWF subunit の C 末端側を認識する抗体で ristocetin 惹起血小板凝集, botrocetin 惹起血小板凝集, collagen binding, 血小板 II b/III a への binding 及び F.VIII binding 等の vWF 機能に全く影響を与えない抗体) を用いた。

4) Rcof 活性の測定: 第1報で述べた著者の方法によった。

5) Bcof 活性の測定: 第1報で述べた著者の方法によった。

6) Ristocetin 惹起血小板結合の測定: 正常ホルマリン固定血小板と¹²⁵I でラベルした抗 vWF モノクロナール抗体 2.2.9 を用い Lopez-Fernandez et al.¹⁵⁾ の方法に準拠して行なった。

a. 抗 vWF モノクロナール抗体 2.2.9 の¹²⁵I ラベル: Iodogen method に準拠して行なった¹⁵⁾。遮光したガラス容器内で Iodogen 5mg (Pierce Chemical Co.) を 5ml のメチレンクロライド (和光純薬工業) で溶解しその溶液 0.5ml を ϕ 1cm の遮光したガラス容器に入れた。次に液体窒素より得られた低温の気体をガラスの細管でこの溶液に吹き付け、メチレンクロライドを気化させガラス容器内に Iodogen のみを付着させた。続いて 0.02% NaN₃ 加 0.05M トリス 0.15M 食塩緩衝液 (pH7.4) (以降 TBS) 0.5ml で 1 回洗浄しその中に 2.2.9 を 0.5ml (2mg/ml) と Carrier-free Na [¹²⁵I] (Amersham Corp.) 1mCi を加えゆっくりまぜ 2 分間室温放置した。さらにその混合液を TBS で平衡化した 10ml ピペットを利用した自家製 Sephadex G-25 (Pharmacia fine Chem.) カラム (k 1x7cm) に添加した。その void volume を 0.5ml ずつ 20 本の試験管に採取し、それぞれの放射活性を測定してその peak 部分を 3-4 本集め [¹²⁵I] ラベル 2.2.9 とした。蛋白定量は 280nm における吸光度より IgG の extinction coefficient $E_{280}^{1\%} = 14.3$ を用いて測定した。得られた [¹²⁵I] ラベル 2.2.9 の比活性は 1.5×10^9 cpm/mg で用いるまで 4°C にて保存した。

b. インタヒビターカクテルの作成: 血漿中の種々の

プロテアーゼを抑制するために作成した。10mM EDTA-2Na, 10u/ml ヒルジジン (sigma Chemical Co.), 20mM 塩酸ペンザミジン (Sigma Chemical Co.) 及び 10mM ロイペプチン (Peptide Institute) を混合し、pH を 7.3 に調整し 4°C にて保存した。

c. Ristocetin 存在下血漿中 vWF の血小板結合能測定: 被検血漿 70 μ l, インヒビターカクテル 5 μ l, ホルマリン固定血小板 20 μ l (終濃度 $100 \times 10^3 / \mu$ l), TBS 5.0 μ l, [¹²⁵I] 2.2.9 を 12.5 μ l (終濃度 21 μ g/ml) をエッペンドルフチューブ内で混合し 37°C 2 時間インキュベートし血漿中 vWF を [¹²⁵I] 2.2.9 で間接的にラベルした。次いで ristocetin を終濃度 0.25, 0.5, 0.75, 1.0mg/ml となるように 12.5 μ l 加え混合し 30 分間室温放置した。溶液を 2 分して、1% BSA 加 20% Sucrose を 300 μ l づつ入れたサルステッドチューブに 50 μ l づつ重層し、さらに 12000 回転/分 5 分間遠心した。これにより血小板と結合した vWF は沈渣部分に存在する事になるので沈渣部分をベンチでカットしガンマカウンターにて放射活性を測定しそれより非特異的血小板結合能を差引、その血漿中 vWF の血小板結合能とした (Fig. 1) そして ristocetin 濃度 1.0mg のときの正常血漿中 vWF 血小板結合能を 100% として表わし、その濃度における結合能を比較した。非特異的血小板結合能は、被検血漿に Type III vWD 患者血漿を用いたときまたは、NMC-4 を測定系に添加したときの放射活性とした。

d. Botrocetin 存在下血漿中 vWF の血小板結合能の測定: 前述の ristocetin 存在下血漿中 vWF の血小板結合能測定と同様の系によった。被検血漿 70 μ l, インヒビターカクテル 5 μ l, ホルマリン固定血小板 20 μ l (終濃度 $100 \times 10^3 / \mu$ l), TBS 5 μ l, 種々濃度の [¹²⁵I] 2.2.9 を 12.5 μ l それぞれエッペンドルフチューブ内で混合し、37°C 2 時間インキュベートした。次に botrocetin を終濃度 5, 10, 30, 50 μ g/ml となるように 12.5 μ l 加え 30 分間室温放置した。溶液を 2 分して 20% Sucrose を 300 μ l 入れたサルステッドチューブに 50 μ l づつ重層しさらに 12000 回転/分 5 分間遠心した。沈渣部分をベンチでカットし、ガンマカウンターにて放射活性を測定しそれより非特異的血小板結合能を示す放射活性を差引、その血漿中 vWF の botrocetin 惹起血小板結合能とした。この血小板結合能は、botrocetin 濃度 50 μ g/ml のときの正常結合量を 100% として表わしその濃度における結合能を比較した。

成 績

1. 血友病 A 患者 50 例の Bcof 活性は 51~300% に分

布し、その平均 $\pm 2SD$ は $152.6 \pm 108\%$ で、健康成人50名の $102.0 \pm 57.2\%$ に比し高値であった。Rcof活性は $163.1 \pm 111.9\%$ 、vWF:Agは $153 \pm 101.8\%$ でいずれも健康成人50名のRcof: 97.1 ± 46.0 、vWF:Ag: 94.2 ± 48.6 よりも高値を呈していた。Bcof活性、Rcof活性およびvWF:Agのそれぞれの相関はvWF:Ag/Bcof $r=0.93$ 、Rcof/Bcof $r=0.92$ 、vWF:Ag/Rcof $r=0.92$ で互いによく相関していた (Fig. 2)。

2. vWD患者のBcof, RcofおよびvWF:Ag量: vWDのType I 23例, Type II 19例, 内IIA 8例, IIB

3例, IIC 3例, IID 2例, IIE 2例およびIIF 1例, Type III 3例の計45例についてBcof活性を測定し、Rcof活性およびvWF:Ag量と対比検討した。

vWF蛋白の欠如症であるType IIIの3例では、Bcof活性、Rcof活性、およびvWF:Ag量ともいずれも5%以下であった。vWF:Ag量が5%以下から49%と低下するも multimer 構成は正常であるType I 23例では、Bcof活性は5%以下~47%で、Rcof活性は5%以下~30%でBcof活性より低下する傾向が認められた (Fig. 3)。

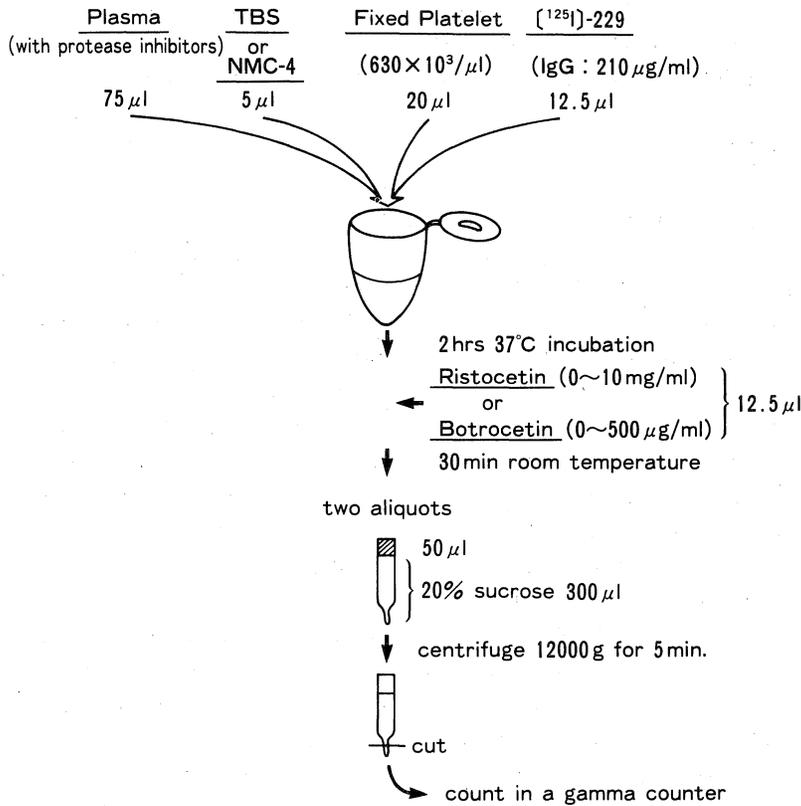


Fig. 1. Ristocetin or botrocetin-induced vWF binding assay using [125 I] labeled anti-vWF monoclonal antibody 2.2.9 in plasma milieu. Seventy μ l of plasma, 5 μ l of inhibitor cocktail, 5 μ l of TBS or NMC-4, 20 μ l of formalin-fixed platelets (f.c. $1 \times 10^5/\mu$ l) and 12.5 μ l of [125 I]-2.2.9 (f.c. 21 μ g/ml; 1.5×10^8 cpm/mg) were incubated at 37°C for two hours in the presence (f.c. 100 μ g/ml) or absence of NMC-4. Then a 12.5 μ l of ristocetin or botrocetin was added to give a final concentration of 0~1 mg/ml or 0~50 μ g/ml respectively. After 30 min incubation at room temperature, two 50 μ l aliquots of the mixture were layered over 20% sucrose cushion (300 μ l) in 500 μ l Sarstedt microfuge tubes, and bound ligand was separated from free ligand by a 5 min centrifugation at 12,000g. The tube tips containing bound ligand were amputated and counted in a gamma counter.

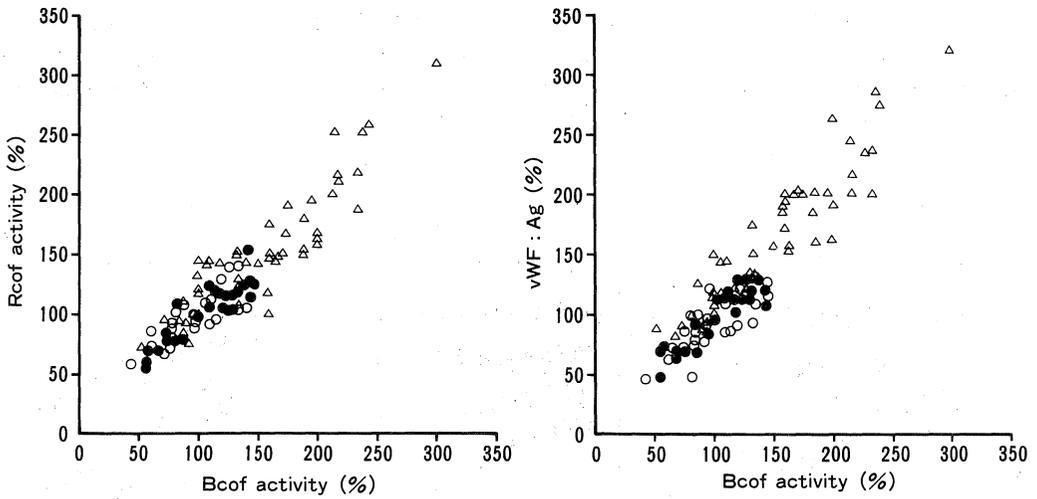


Fig. 2. Relationships between Bcof and Rcof (left), Bcof and vWF : Ag (right) in healthy adults and patients with haemophilia A. Normal female are indicated as closed circles (●), normal male as open circles (○) and patients with haemophilia A as open triangles (△).

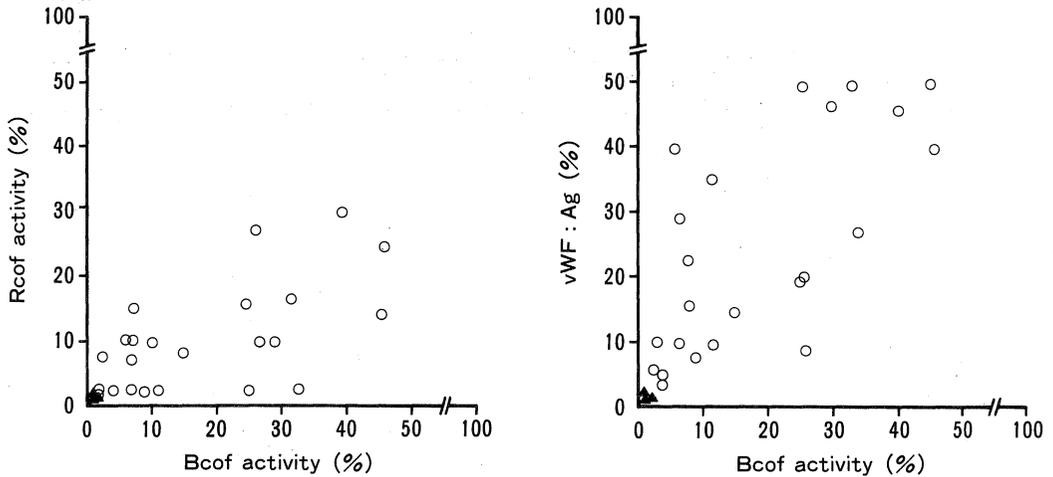


Fig. 3. Relationships between Bcof and Rcof (left), Bcof and vWF : Ag (right) in patients with type I vWD and type III vWD. Patients with type I are indicated as open circles (○) and patients with type III as closed triangles (▲).

vWF 蛋白の質的異常の病型は Type II と総称される。そのうち large および intermediate multimer が欠乏し且つ ristocetin 凝集能 (RIPA) が著しく低下する II A の 8 例では、vWF : Ag 量は 42~72% と軽度低下するのみであったが、Bcof 活性は 5~30% と中等度に低下していた。Rcof 活性は 7% の 1 例以外すべて 5% 以下であった。Type IIB は large multimer は欠乏するが低濃度の Ristocetin で血小板凝集が惹起される病型である¹⁷⁾¹⁸⁾。Botrocetin で惹起される場合の血小板凝集を観

察するため、Bcof 活性測定系の botrocetin 濃度を約 2~16 倍希釈して添加しその凝集を観察した。正常血漿では 2.3 μ g/ml 以下の濃度では、凝集が惹起されなかったが、IIB 患者血漿では 1.8~2.3 μ g/ml の低濃度でも凝集が惹起され、ristocetin の場合と同様凝集の enhance が観察された。又、同様に IIA 患者血漿についても調べたが凝集には 14.4 μ g/ml 以上の濃度が必要であった (Fig. 4)。また本病型では 30 μ g/ml の botrocetin 濃度で測定した患者血漿の Bcof 活想は 24~40% と中等度に低下

し、Rcof 活性とはほぼ同様で、vWF:Ag は 50~60% であった。Type IIC は multimer 構成で single band を反復し smallest multimer が増加する特徴を有する¹⁹⁾。本症の 2 症例では、vWF:Ag 量は、6~7% と著しく低下し、Rcof 活性はいずれも 5% 以下であったが、Bcof 活性は

5% 以下~9% であった。Type IID は 3% agarose gel 上正常の 5 band pattern と異なり 4 band pattern を示すことが特徴とされるが²⁰⁾、2 症例の血漿(Dr Zimmerman より提供) vWF:Ag 値は 70% 以上と正常であった。Bcof 活性は 28% および 30% と明らかに低下し、Rcof 活

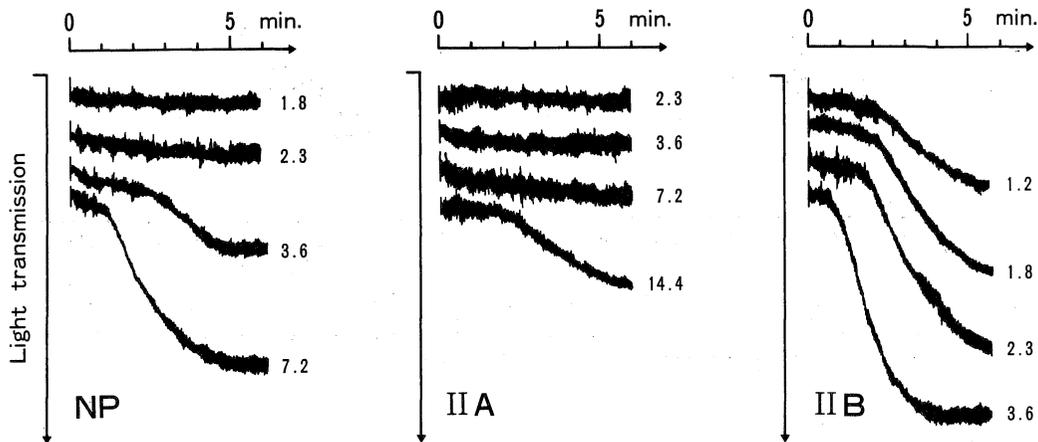


Fig. 4. Enhanced botrocetin-induced platelet agglutination in a patient with type IIB vWD using formalin-fixed platelets. A total of 250 μ l mixture of formalin-fixed platelets ($300 \times 10^3/\mu$ l), tested plasma (1/5vol.) and TBS buffer pH 7.3 was incubated for 2min at 37°C, then 20 μ l of botrocetin was added to give a final concentration (μ g/ml) as indicated.

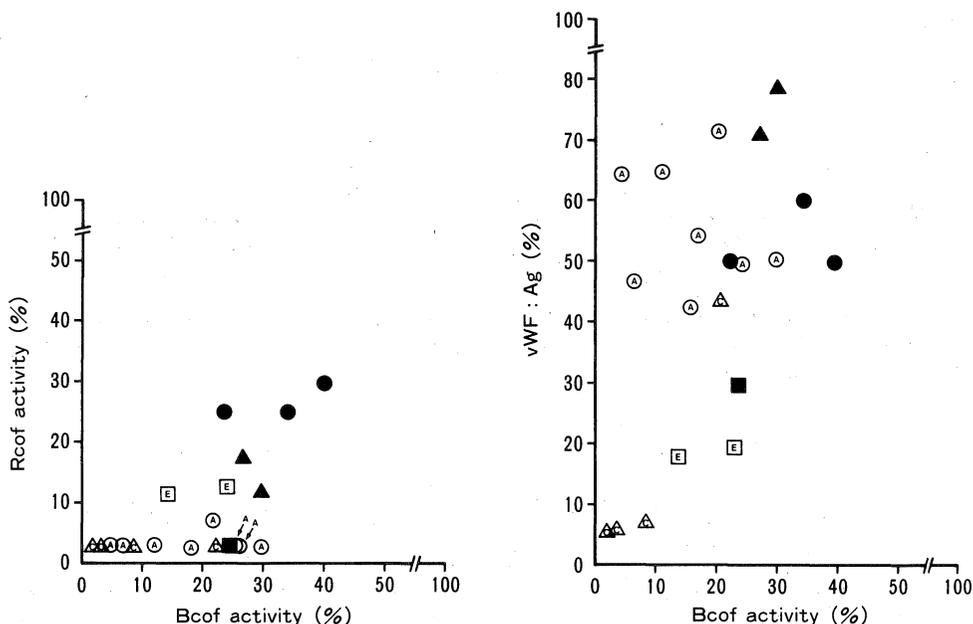


Fig. 5. Relationships between Bcof and Rcof (left), Bcof and vWF:Ag (right) in patients with type II vWD. Patients with type IIA vWD are indicated as open circles (○), type IIB as closed circles (●), type IIC as open triangles (△), type IID as closed triangles (▲), type IIE as open squares (◻) and type IIF as closed squares (■).

性も同様低下していた。Type IIE は single band の multimer を反復するが²¹⁾、本症の 2 症例の血漿 vWF: Ag は 18%, 20% で Bcof 活性は 16%, 25%, Rcof 活性は 11%, 12% とほぼ同じレベルで低下していた。Type IIF は血漿中 vWF の 3% agarose gel 上の 5 band pattern の移動度が異なり血小板中 vWF は、large multimer をもっていることが特徴とされるが²²⁾、本症の 1 例は vWF: Ag は 30%, Bcof 活性は 26% と同様に低下していたが、Rcof 活性は 5% 以下と著しく低下していた (Fig. 5)。

3. vWD 患者血漿中 vWF の正常血小板への結合能: Botrocetin あるいは ristocetin で惹起される血漿中の vWF の正常血小板への結合能は、ホルマリン固定正常血小板と vWF-subunit の C 末端側を認識して血小板機能には影響を与えない抗モノクローナル抗体 2.2.9 を用いた。すなわち、被験血漿をホルマリン固定血小板 (終濃度 $100 \times 10^3 / \mu\text{l}$)、¹²⁵I 標識 MoAb 2.2.9 と混合し、血漿

中 vWF を間接的にラベル後、botrocetin あるいは ristocetin を添加して凝集を惹起せしめ、血小板と結合した ¹²⁵I-vWF を γ -カウンターで測定し ¹²⁵I 結合を求めた。

Botrocetin 存在下の被験血漿の血小板結合能測定系では、血小板結合能測定に最適な ¹²⁵I MoAb 2.2.9 の濃度は $21 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。又、添加する botrocetin 濃度は 5, 10, 30, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ と変化させて結合能を測定した。

測定系に botrocetin ならびに ristocetin 惹起血小板凝集を完全に抑制する NMC-4 を終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた場合と、被験血漿に vWF を欠如する Type III vWD 血漿を用いてそれぞれ結合能を測定した。Botrocetin 濃度を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ にしても放射活性 (血小板結合) の上昇は認められなかったが、この際の放射活性は非特異的血小板結合として、各サンプル測定時の放射活性より差し引いた。Ristocetin 存在下の被験血漿の血小板結合能も同様の方法で測定した。

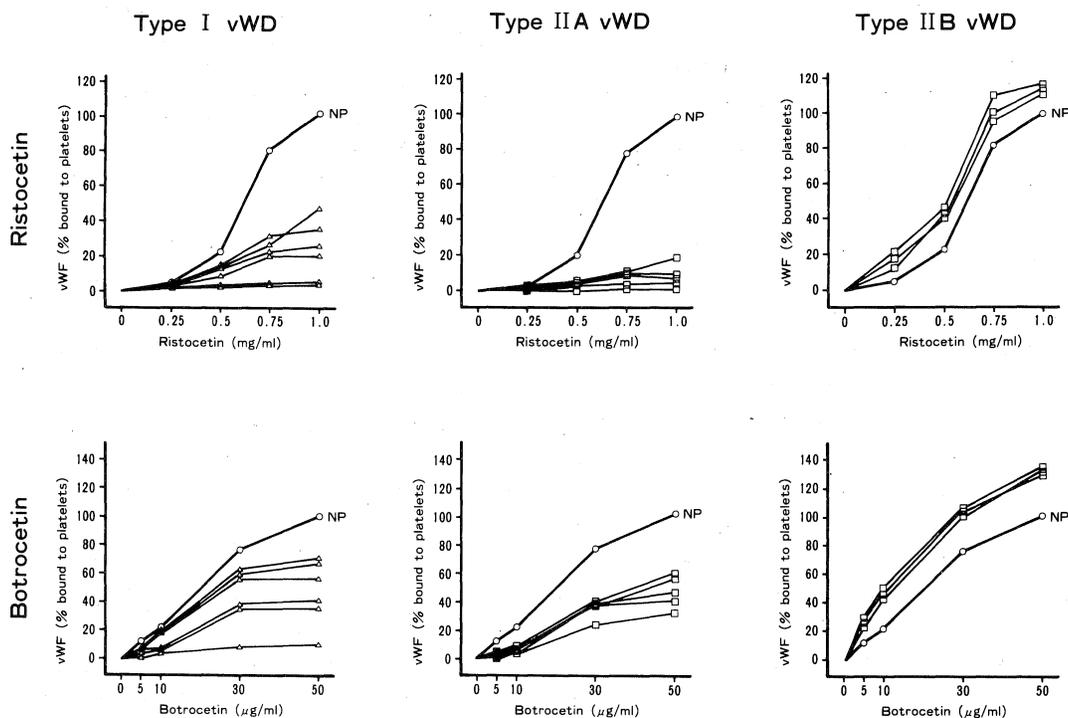


Fig. 6. Ristocetin or botrocetin-induced binding of [¹²⁵I]-2.2.9-labeled vWF in type I, type IIA and type IIB vWD plasmas. A $12.5 \mu\text{l}$ of [¹²⁵I]-2.2.9 ($21 \mu\text{g}/\text{ml}$; $1.5 \times 10^9 \text{ cpm}/\text{mg}$), $20 \mu\text{l}$ of formalin-fixed platelets, $5 \mu\text{l}$ of inhibitor cocktail and $70 \mu\text{l}$ of plasma were incubated at 37°C for two hours and then a $12.5 \mu\text{l}$ of ristocetin or botrocetin was added at the final concentration of $0-1.0 \text{ mg}/\text{ml}$ and $0-50 \mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. After additional 30min incubation at room temperature, the bound radioactivity was measured and expressed as the amount of [¹²⁵I]-2.2.9 bound to platelets.

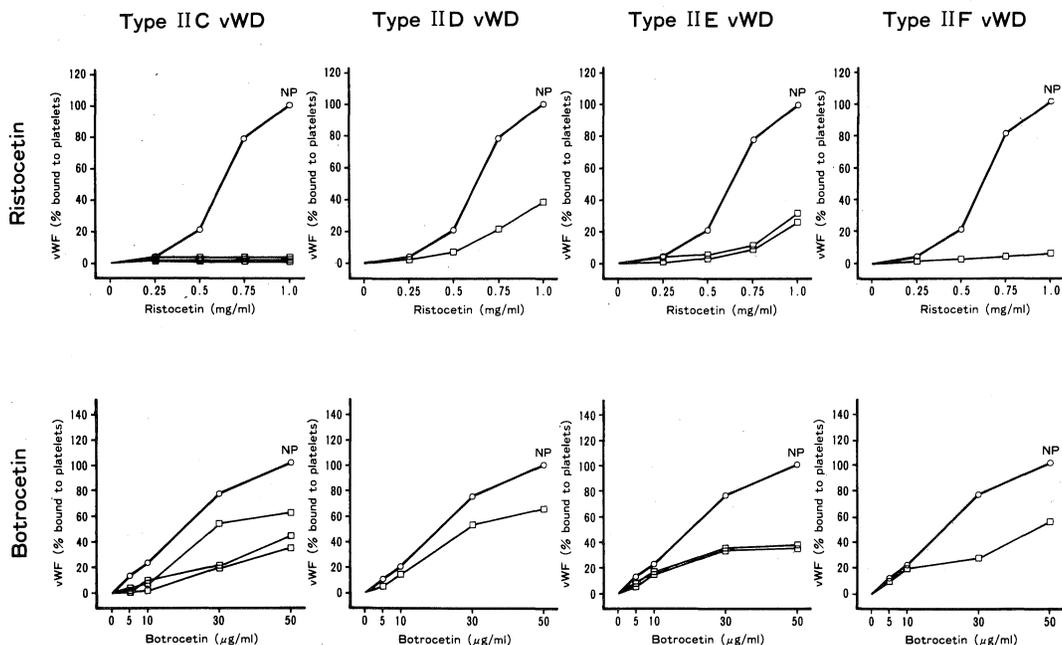


Fig. 7. Ristocetin or botrocetin-induced binding of [¹²⁵I]-2.2.9-labeled vWF in type IIC, IID, IIE and IIF vWD plasmas. A 12.5μl of [¹²⁵I]-2.2.9 (21μg/ml; 1.5×10⁹ cpm/mg), 20μl of formalin-fixed platelets, 5μl of inhibitor cocktail and 70μl of plasma were incubated at 37°C for two hours and then a 12.5μl of ristocetin or botrocetin was added at the final concentration of 0-1.0mg/ml and 0-50μg/ml respectively. After additional 30min incubation at room temperature, the bound radioactivity was measured and expressed as the amount of [¹²⁵I]-2.2.9 bound to platelets.

vWD各病型の血漿中のbotrocetinあるいはristocetin存在下の血小板結合能はFig. 6およびFig. 7の如くであった。Botrocetin濃度50μg/mlの点で比較すると、Type I vWDではbotrocetin存在下血小板結合能は0~70%の間にはばらつきを示し、またristocetin存在下血小板結合能よりも全体的に高値を示した。Type IIA, Type II C及びType II Fではristocetin存在下血小板結合能は著明に低下するもbotrocetin存在下血小板結合能は中程度低下にとどまった。Type IIBではbotrocetin存在下血小板結合能、ristocetin存在下血小板結合能ともに正常に比し120-140%の亢進を示した。Type IID, Type IIFではbotrocetin存在下血小板結合能はristocetin存在下血小板結合能よりやや高値を示すも、両者とも中程度低下していた。

考 案

Readら¹³⁾(1987)により蛇毒Bothrops jararacaより分離されたヒト血小板凝集惹起作用を有するbotrocetinはその作用発現にristocetinの場合と同様に

血漿中のvWFを必要とすることがBrinkhouseら¹²⁾, Howardら¹⁰⁾, Fujimuraら⁹⁾によって観察されてきた。著者はホルマリン固定正常ヒト血小板と血小板凝集計を用いてbotrocetin存在下の血漿中のvWF活性即ちbotrocetin cofactorの測定系を確立し、この測定系に関する因子は、血漿側はristocetin cofactorの場合と同様vWF subunit組成中の52/48 kDa fragmentであり一方、血小板側のreceptorはGPIbであることを報告した。52/48 kDa fragmentの一次構造はvWF subunitを構成する2050のアミノ酸のうち、N末端より449番のvaline残基から728番のLysine残基より成ることが明らかにされているが⁹⁾, ristocetinおよびbotrocetinにより惹起されるGPIbへの結合、凝集関与部位の異同の詳細については解明されていない。最近、教室の高橋ら²³⁾は抗vWFモノクローナル抗体322 (FranceのDr Meyer博士より提供)がristocetin凝集は完全に抑制するもbotrocetin凝集は抑制しないことを観察した。また、新家ら²⁴⁾は教室で作成した抗vWFモノクローナル抗体のNMC-4はristocetinおよびbotrocetin存在下に

純下 vWF の血小板 GPIb への結合を抑制することを観察し、この際、ristocetin 依存性 GPIb への vWF 結合 domain はアミノ酸残基 474-488 と 694-708 の不連続な 2 つの部位が関与し、一方 botrocetin 依存性の vWF 結合 domain および NMC-4 の epitope の形成はその中央部分が重要と推察されることを報告した。臨床的には Howard ら⁷⁾ は Rcof 活性は欠如するが、Bcof 活性は正常である vWD の亜型例を Type B と呼び、botrocetin で誘導される vWF の反応部位は ristocetin のそれとは異なることを示唆していた。

上記の事実をふまえて、著者は今回、vWD の各病型患者血漿について Bcof 活性を測定し、通常 vWD の routine test として行なわれている Rcof 活性測定との相違の有無について検討した。この際 vWD の検索に平行して、血友病 A 患者血漿 50 サンプルについて Bcof 活性、Rcof 活性および vWF:Ag を測定したところ、いずれも正常人血漿の値より高値を呈していたが vWF:Ag と Bcof は $r=0.93$ 、Rcof と Bcof は $r=0.92$ 、vWF:Ag と Rcof は $r=0.92$ と互によく相関していた。

vWF 蛋白の欠如する Type III の 3 例では Bcof 活性、Rcof 活性、vWF:Ag 量はいずれも 5% 以下であった。

vWF:Ag 量が低下するも multimer 構成は正常な Type I の 23 例では Bcof 活性も低下していたが、Rcof 活性の低下度と比してやや軽度であった。

vWF:Ag 量に比し Rcof 活性が著しく低下し large および intermediate multimer の欠乏を特徴とする Type II A の 8 例では Bcof 活性は 5%-30% で Rcof 活性に比し低下度は軽度であった。Large multimer を欠くが RIPA の亢進を特徴とする Type II B の 3 例では Bcof 活性は中等度に低下していた。しかしこれらの 3 例では正常血漿では凝集を惹起しない低濃度の botrocetin 濃度でも凝集が惹起された。この現象は ristocetin の場合と同様で本病型の特徴と考えられた。正常血漿中 vWF は 5-sub band が反復する multimer 構造をとるのに対して、single sub band が反復し、且つ smallest band の増強を特徴とする Type IIC の 2 例では Rcof 活性が 5% 以下と低下していたが Bcof 活性は 5% 以下と 9% であった。Type IID および IIE の各 2 例では Bcof 活性は Rcof 活性とほぼ平行していたが、Type IIF1 例では Bcof 活性は Rcof 活性より高値であった。

以上の如く、Bcof 活性は vWD 各病型で Rcof 活性と同様低下していたが、病型によりその低下度に差異が認められた。Type IIA, IIC, および IIF では Rcof 活性が著減していたが Bcof 活性はある程度出現していた。

Bcof 活性あるいは Rcof 活性は botrocetin あるいは ristocetin 存在下に血漿中の vWF が血小板を凝集せしめる作用を測定するものである。両凝集惹起物質による血小板凝集は vWF の血小板膜 GPIb への結合により開始されると考えられるので、患者血漿中の vWF の正常血小板への結合能について検索した。従来血漿中の vWF のみを特異的に標識することは不能であったが、著者は血小板凝集を抑制しない抗 vWF モノクローナル抗体 MoAb 2.2.9 を ¹²⁵I で標識して血漿と反応させ血漿中 vWF を間接的にラベルし、botrocetin あるいは ristocetin 存在下にホルマリン固定正常血小板と反応後、血小板に結合した vWF を γ -カウンターで計測する方法を考案した。Type I vWD では botrocetin 惹起血小板結合能は ristocetin 惹起血小板結合能よりやや高値であったが平行していた。Type II A, II C および II F では Bcof 活性と Rcof 活性の関係と同様に、ristocetin 惹起血小板結合能は著しく低下していたのに対し、botrocetin 惹起血小板結合能は中等度低下にとどまっていた。Type IID および IIE では両凝集素惹起血小板結合能は中等度低下していたが、Type I の場合と同様の傾向が認められた。これに対し、Type IIB では botrocetin 惹起血小板結合能および ristocetin 惹起血小板結合能はともに正常血漿のそれよりも高値を呈していた。前に述べた botrocetin あるいは ristocetin 存在下の血小板凝集が亢進する所見と併せて、Type IIB の vWF は凝集惹起物質に増強反応を示す構造異常蛋白であろうと推察される。Type IIB の所見を除いて vWD の各病型では Bcof 活性は Rcof 活性よりも高値を呈していた理由については充分明かでない。Large および intermediate multimer を欠く Type IIA では RIPA が欠如し、Rcof 活性も著して低下しているにもかかわらず Bcof 活性はある程度存在し、Type IIC, IIF も同様の傾向であったことは botrocetin 存在下では smallest を含めた各 multimer とも血小板結合に反応しうるが、ristocetin 存在下では large multimer ほどより血小板結合反応を惹起しやすいことによると推定しているが今後の検討に待ちたい。

結 語

正常人より得たホルマリン固定血小板を用い血小板凝集計にて、血友病 A および vWD 患者血漿中の Bcof 活性を測定し、更に、ristocetin および botrocetin 存在下にこれら患者血漿の血小板 GPIb への結合能を検索した。

1. 血友病 A 患者の Bcof 活性は、 $152.6 \pm 108\%$ で、Rcof 活性及び vWF:Ag 値と各々相関係数 $r_1=0.92$, r_2

0.93 とよく相関した。

2. vWD 患者の Bcof 活性値は、Type I 23 例で<5% -47%、IIA 8 例は 5%~30%、IIB 3 例は 24~40%、IIC 3 例は<5%及び 9%、IID 2 例は 28%及び 30%、IIE 2 例は 16%及び 25%、IIF 1 例は 26%、Type III 3 例は<5% であった。

3. Botrocetin 存在下血小板結合能は Type I vWD では 0-50%の間にばらつき、ristocetin 存在下血小板結合能よりも高い値であった。Type IIA, IIC, IIF では、botrocetin 存在下血小板結合能は中等度低下し、一方、ristocetin 存在下血小板結合能は著明に低下した。Type IIB では、両者ともに 120-140%と亢進した。Type IID, IIE では両者とも中等度に低下していた。

以上より Bcof 測定は Rof 測定と同じく vWD の迅速な確定診断に有用であり、さらに従来の Rcof 及び vWF:Ag 測定に加えることにより vWD 変異病型をより容易に示唆しうるものと考えられた

本論文の要旨は、第 50 回日本血液学会総会及び第 92 回日本小児科学会総会において発表した。なお、本研究は昭和 63 年度及び平成元年度文部省科研重点領域研究「血栓性素因の分子生物学的解析とその臨床応用」の助成を得た。

文 献

- 1) von willebrand E.A. : Hereditar pseudoheomofili. *Finska Lakaresallskapets Handlinger* **67**: 87-112, 1926.
- 2) Ginsburg, D., Handin, R.I., Bonthron, D.T., Donlon, T.A., Bruns, G.A.P., Latt, S.A. and Orkin, S.H. : Human von Willebrand factor (vWF) : Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal location. *Science* **228**: 1401-1406 1985.
- 3) Ruggeri, Z.M. and Zimmerman T.S. : von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* **70**: 895-904, 1987.
- 4) Hoyer, L.W., Rizza, C.R., Tuddenham, E.G.D., Carta, C.A., Armtage, H. and Rotblat, F. : von Willebrand factor multimer patterns in von Willebrand's disease. *Br.J.Haematol.* **55**: 493-507, 1983.
- 5) Ciavarella, G., Ciavarella, N., Antoncechi, S., Mattia, D.D., Rnieri, P., Dent, J., Zimmerman, T.S. and Ruggeri, Z.M. : High-resolution analysis of von Willebrand factor multimeric composition defines a new variant of type I von Willebrand disease with aberrant structure but presence of all size multimers (type IC). *Blood* **66**: 1423-1429, 1985.
- 6) Wiess H.J. and Sussman I.I. : A new von Willebrand variant (Type I New York) : Increased ristocetin-induced platelet aggregation and plasma von Willebrand factor containing the full range of multimers. *Blood* **68**: 149-156, 1986.
- 7) Howard, M.A., Salem, H.H., Thomas, K.B., Har, L., Perkin, J., Coghlan, M. and Firkin, B. G. : Variant von willebrand's disease type B revisited. *Blood* **60**: 1420-1428, 1982.
- 8) Fujimura, Y., Titani, k., Holland, L.Z., Russell, S.C., Roberts, J.R., Elder, J.H., Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S. : von Willebrand factor, a reduced and alkylated 52/48 KDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J.Biol. Chem.* **261**: 381-385, 1986.
- 9) Titani, k. and Walsh, k.A. : Human von Willebrand factor: the molecular glue of platelet plugs. *TIBS* **13**: 94-97, 1988.
- 10) Howard, M.A. and Firkin, B.G. : Ristocetin-a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **26**: 362-362, 1979.
- 11) Read, M.S., Shermer, R.W. and Brinkhous, K. M. : Venom coagglutinin: An activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Scad. USA* **75**: 4514-4518, 1978.
- 12) Brinkhous, K.M. and Read, M.S. : Use of venom coagglutinin and lyophilized platelets in testing for platelet-aggregating on von Willebrand factor. *Blood* **55**: 517-520, 1980.
- 13) 西尾健治 : 蛇毒 botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究 I. Botrocetin cofactor 活性測定の検討. *奈医誌.* **39**: 673-682, 1988.
- 14) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡 章, 福井 弘 : von Willebrand 因子 (vWF) に対するモノクロナール抗体の作成とその免疫学的特性. *奈医誌.* **36**: 662-669, 1985.

- 15) **Lopez-Fernandez, M.F., Lopez-Berges, C., Martin-Bernal, J.A., Sanchez, R., Villaron, L. G., Diez-Jarilla, J. and Batle, J. :** Type IIB von Willebrand's disease associated with a complex thrombocytopenic thrombocytopathy. *Am.J. Haematol.* **27** : 291-298, 1988.
- 16) **Fraker, D.J. and Speck, J.C. :** Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80** : 849-857, 1978.
- 17) **Ruggeri, Z.M., Pareti, F.I., Mannucci, P.M., Ciavarella, N. and Zimmerman, T.S. :** Height-end interaction between platelet and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *New.Engl.J.Med.* **302** : 1047-1051, 1980.
- 18) **Fukui, H., Yasui, M., Takahashi, Y., Niinomi, K., Takase, T. and Yoshioka, A. :** Type IIB von Willebrand's disease: Report on the first case in Japan. *Acta Paediatr.Jpn.* **26** : 544-553, 1984.
- 19) **Batle, J., Lopez-Fernandez, M.F., Lasiera, J., Fernandez-Villamor, A., Lopez-Berges, C., Lopez-Borrascas, A., Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S. :** von Willebrand disease type IIC with different abnormalities of von Willebrand factor in the same sibship. *Am.J.Hematol.* **21** : 177-188, 1986.
- 20) **Kinoshita, S., Harrison, J., Lazerson, J. and Abildgaard, F. :** A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric pattern of factor VIII-related antigen (type IID). *Blood* **63** : 1369-1371, 1984.
- 21) **Zimmerman, T.S., Dent, J.A., Ruggeri, Z.M. and Nannini, L.H. :** 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 (types IIC, IID, and IIE). *J.Clin.Invest.* **77** : 947-951, 1986.
- 22) **Mannucci, P.M., Lombardi, R., Federici, A.B., Dent, J.A., Zimmerman, T.S. and Ruggeri, Z. M. :** A new variant of type II von Willebrand disease with aberrant multimeric structure of plasma but not platelet von Willebrand factor (type IIF). *Blood* **68** : 269-274, 1986.
- 23) **Takahasi, Y., Girma J.P., Kalafatis M., Diaz, J. and Meyer, D. :** Ristocetin and botrocetin involve two distinct domains of von Willebrand factor for binding to platelet membrane glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* **62** : 218, 1989 (Abst, 672).
- 24) **新家 興 :** 抗 von Willebrand 因子 (vWF) モノクローナル抗体 NMC-4 による血小板膜糖蛋白 (GP) Ib 結合ドメインの解析. *奈医誌.* **40** : 780-790, 1989.