

# 全血凝固過程中のヒト第IX因子の動態

奈良県立医科大学小児科学教室

山 本 和 邦

## STUDIES ON HUMAN FACTOR IX DURING THE WHOLE BLOOD COAGULATION PROCESS

MASAKUNI YAMAMOTO

*Department of Pediatrics, Nara Medical University*

Received September 28, 1990

*Summary*: Changes of Factor IX activity (F. IX : C) and Factor IX antigen (F. IX : Ag) during the whole blood coagulation process were studied in the presence of saline, Platelin, Simplastin or Thrombin.

When saline, as a control, was added to whole blood, F. IX : C was gradually increased with a peak at 40 min after clotting. When various concentrations of Platelin, Simplastin or Thrombin were added to whole blood, F. IX : C was rapidly and transiently increased with a peak at 1 hr.

With every addition of saline, Platelin, Simplastin or Thrombin, the levels of F. IX : Ag were gradually decreased down to 74~84% 24 hrs after clotting. Therefore, there was discrepancy between the changes of F. IX : C and F. IX : Ag.

In order to investigate the proteolytic activation of F. IX during the clotting process, F. IX was partially purified by BaCl<sub>2</sub> adsorption and elution with sodium citrate, and then analyzed using Western blot technique. When SDS-PAGE was performed in reduced condition, a faint band with M. W. of 50,000 (F. IX  $\alpha\beta$ ) appeared at 1/2~1 min after clotting. The new band, a small portion of whole F. IX, did not change for 24 hrs.

These results suggest the conclusion that the proteolytic activation of F. IX during the whole blood coagulation process starts partially at 1 min after clotting and that, with every addition of Platelin, Simplastin or Thrombin, its activation is accelerated and exaggerated, but the quantity of F. IX  $\alpha\beta$  is a small portion of whole F. IX.

### Index Terms

Factor IX activity, Factor IX antigen, Factor IX  $\alpha\beta$ , western blot

### 緒 言

第IX因子は Aggeler ら<sup>1)</sup>(1952)により Plasma thromboplastin component (PTC) 欠乏症, Biggs ら<sup>2)</sup>(1952)により Christmas 病として報告され, 後に血友病Bと呼称された伴性劣性遺伝性出血性疾患患者に欠乏ないし異常を示す血漿凝固因子である. 本因子はX染色体長腕(Xq27.1)上の遺伝子の支配下に肝で合成される分子量

57,000の糖蛋白で, ヒト血漿中には3~5 $\mu$ g/ml存在している<sup>3)-9)</sup>. 遺伝子工学的技術の進歩に伴い, 1982年には第IX因子のcDNAが単離, 塩基配列が決定され<sup>10)11)</sup>, 1985年には第IX因子の全遺伝子構造が明らかにされるようになった<sup>12)</sup>. 成熟第IX因子は415のアミノ酸残基より成り, N末端よりGlaドメイン, 血管内皮成長因子様ドメイン, 活性化ペプチド, セリン残基を含むcatalyticドメインの各ドメインより構成され, プロトロンビン,

第X因子などとアミノ酸配列上の相同性が高いことも明らかにされている<sup>13)~15)</sup>。

第IX因子の構造と機能について純化系では活性化第XI因子(XIa)とCa<sup>2+</sup>の存在下にならずArg<sup>145</sup>-Ala<sup>146</sup>結合が切断され、s-s架橋で結ばれたheavy chain(H鎖)とlight chain(L鎖)からなるIX $\alpha$ になる。次いでH鎖中のArg<sup>180</sup>-Val<sup>181</sup>結合が切断されると、糖鎖と酸性アミノ酸に富んだ分子量約11,000の活性化ペプチドを遊離しつつIX $\alpha$ に変換され、高い凝固活性を示すようになる<sup>16)</sup>。従ってIX $\alpha$ は分子量約50,000で還元により約30,000のH鎖と20,000のL鎖に切断されることが知られるようになった。

教室では、従来より全血凝固過程中的の各種凝固因子、阻止因子の動態に注目し、大久保ら<sup>17)</sup>により凝固過程中的のプロトロンビン、第X因子、また高瀬<sup>18)</sup>により第VIII因子、市川<sup>19)</sup>によりアンチトロンビンIIIの動態を報告してきた。今回、著者は正常ヒト血液の凝固過程中的第IX因子の動態をF.IX:C、F.IX:Agおよび第IX因子の限定分解の面より追求し、この際、内因性凝固を促進させるリン脂質製剤のPlatelin、外因性凝固系のtriggerの組織因子であるSimplastinおよび全凝固系のキーであるThrombinによる凝固促進時の第IX因子の動態についても検討した。

## 材料および方法

1. 材料: PlatelinとSimplastinはOrganon Teukunika Corporation, NCより入手した。Platelinは、Bell-Alton法<sup>20)</sup>にてウサギ脳より抽出したリン脂質で、Simplastinはウサギ脳のアセトン乾燥末(組織トロンボプラスチン)である。トロンビンはミドリ十字社のヒト $\alpha$ -トロンビン末(500u/vial)を用いた。 $\epsilon$ -amino-n-caproic acid(以下EACAと略す)は東京化成工業、 $p$ -aminophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride(以下 $p$ -APMSFと略す)は和光純薬工業株式会社より入手した。その他使用した各試料はすべて化学分析用の特級、一部一級品(半井化学薬品、片山化学工業)を用いた。

方法:

2. 凝固促進物質添加時の凝固過程中的の血清採取: 予めPlatelin(終濃度 $3.6 \times 10^{-1} \sim 3.6 \times 10^{-3}$ mg/ml) 0.1 ml宛を入れたガラス試験管14本にそれぞれ全血1.9 mlを加え、37℃にて加温し、経時的(0, 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40分, 1, 2, 4, 24時間)に各試験管に10mM EACA 20 $\mu$ l, 4mM  $p$ -APMSF 20 $\mu$ l, 12.5mM sodium citrate 40 $\mu$ l(以下これらの3者の混合液を停止液とい

う)を加え、凝固反応を停止させ4℃, 3,000rpm, 10分間遠心して上清を分離した。上清中のF.IXの動態を検討し、併せて上清の部分純化分画(後述)中のF.IXについてWestern blot(後述)を行った。Simplastin終濃度 $5.6 \times 10^0 \sim 5.6 \times 10^{-2}$ mg/ml, Thrombin終濃度 $5.0 \times 10^0, 5.0 \times 10^{-1}, 5.0 \times 10^{-2}, 5.0 \times 10^{-3}, 5.0 \times 10^{-4}$ U/mlについても同様に検討した。なお対照として生理的食塩水(以下生食と略す)0.1 ml宛を加えたものについても検討した。

3. 第IX因子凝固活性(F.IX:C): 検体中のF.IX:Cをアメリカンデイド社製(Agada, Puerto Rico)第IX因子欠乏血漿(重症血友病B患者の新鮮凍結乾燥血漿)を基質とし、カオリンを活性化剤としたRapaport-Amesの1段法<sup>21)</sup>により測定した。検量線は正常ヒトプール血漿の1/10希釈液を100%として求めた。

4. 第IX因子抗原量(F.IX:Ag): Fujimura et al<sup>22)</sup>の方法により作製した自家製抗ヒト第IX因子ウサギ血清を用いたLaurell法によるロケット免疫電気泳動法<sup>23)</sup>およびAsserachrom IX: AG Kit<sup>®</sup>(STAGO, France)を用いたELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法<sup>24)</sup>によった。

a) Laurell法: アガロース(Sigma Co. MO)を0.075 Mペロナル緩衝液(PH8.6)で1%に懸濁し、ethylene diamine tetraacetic acid disodium(EDTA-Na<sub>2</sub>)を1mMになるように加え、煮沸溶解後、56℃に保温し、自家製抗ヒト第IX因子ウサギ血清を1%に混和し、ガラス板(7.5 $\times$ 7.5 cm)上に散布し、ゲル平板を作成した。アガロースが固まった後この平板の一端より2 cmの部位に直径4 mmの孔を等間隔にあげ、検体(全血凝固過程中的の上清)20 $\mu$ lを各孔に添加し、同上のペロナル緩衝液を用いて0.8mA/cmで18時間泳動した。泳動終了後、生食にて脱蛋白し、脱塩、乾燥固定し、0.5% Coomassie brilliant blue R-250(ナカライテスク株式会社)で染色した。10%酢酸、10%メタノールで脱色後乾燥して得られたロケットの高さ(F.IX:Ag)は、正常人血漿を1:1~1:16に希釈して同様に測定して得られた希釈曲線より%に換算した。

b) ELISA法: 抗ヒト第IX因子ウサギIgG F(ab')<sub>2</sub>(STAGO, France) 100 $\mu$ gを20 mlのコーティング緩衝液(50mM sodium phosphate, PH7.5)に溶解し、ELISA用マイクロプレート(NUNC, Denmark)の各wellにおのおの200 $\mu$ lずつ分注し、室温で一時間静置し抗体を固相化し、次に洗浄液(0.1% Tween20/0.15M NaCl)にてwellを5回洗浄した。検体を希釈緩衝液(150mM sodium phosphate, PH7.5/0.1% Tween 20/0.15M NaCl/0.1% BSA)にて100倍に希釈した。検量線

用として正常人血漿の 50, 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000 倍の希釈列を作成した。各希釈検体 200 $\mu$ l をマイクロプレートに添加し室温で 1 時間静置し反応終了後 5 回洗浄を行った。さらに抗第 IX 因子ペルオキシターゼ標識 IgG (STAGO, France) 150 $\mu$ g を 20 ml の希釈緩衝液に溶解し、その 200 $\mu$ l をマイクロプレートに添加した。室温で 1 時間静置した後 5 回洗浄を行った。これに 200 $\mu$ l の ortho-phenyldiamine (OPD) 基質液を添加し、室温で正確に 3 分反応後、3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 $\mu$ l を加えて反応を停止した。最後に Corona MTP-22 2-wave length microplate photometer (コナ株式会社東京) を用いて 492nm の波長で比色定量した。

5. 全血凝固過程中の第 IX 因子限定分解の Western blot 法による解析：次のステップによった。

a) 第 IX 因子の部分純化：上記全血凝固過程中的各上清 1 ml に 100mM benzamidine-HCl を 0.1 ml 添加し、これに 1M BaCl<sub>2</sub> 溶液 0.1 ml を加え、4 $^{\circ}$ C で 5 分間ガラス棒で十分混和し、F. IX を吸着させた。これを 10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 10 分間遠沈し、沈渣を 0.05M Tris-HCl (PH7.4) / 0.15M NaCl / 5mM benzamidine-HCl 0.5ml で 1 回洗浄後、0.05M Tris-HCl (PH7.4) / 0.2M sodium citrate / 1mM benzamidine-HCl にて F. IX 分画を溶出し、最後に 0.05M Tris-HCl (PH7.4) / 1mM benzamidine-HCl にて 2 時間透析を行い最終容量を 1 ml に調整した。

全血凝固過程中的 F. IX の BaCl<sub>2</sub> による吸着率と溶出後の回収率は、生食、Platelin 終濃度  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml, Simplastin 終濃度  $5.6 \times 10^0$  mg/ml, Thrombin 終濃度  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml のそれぞれの添加系について凝固開始前、凝固開始後 1 時間の F. IX : Ag を Laurell 法 (前述) にて測定した。

b) Immunoblot 法：部分純化した F. IX 分画を 2% SDS および 20% グリセリン (還元処理では 5% 2-mercaptoethanol を加える) を含む 0.0625M Tris-HCl (PH6.8) と等量混合し 90 $^{\circ}$ C 1 ~ 2 分反応させた。この試料 30 $\mu$ l を SDS-7.5% ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に 80mA 6 時間展開した。次にゲルをニトロセルロース膜 (Schleicher & Schull, W. Germany) に合わせ、ゲルメンブラン転写装置 (マリノル産業東京) を用いて 1A, 2 時間電氣的にタンパクをニトロセルロース膜に転写させた。次に、ウシ血清アルブミン (片山化学工業) でブロッキング後自家製抗ヒト第 IX 因子ウサギ血清と一晚反応させた。洗浄後、ペルオキシターゼ標識抗ウサギ IgG 血清 (TAGO, Burlingame, CA) と 2 時間反応させ、4-Cl-1-naphthol (BIO-RAD, Richmond, CA) で発色させ F. IX の開裂状態を観

察した。

6. 凝固促進物質添加による活性化第 X 因子 (Xa) 量の測定：合成発色基質 (S-2222, Kabivitrum AB, Sweden) を用いて、Aurell ら<sup>25)</sup>の方法に従い end point で判定した。Platelin (終濃度  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml), Simplastin (終濃度  $5.6 \times 10^0$  mg/ml), Thrombin (終濃度  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml) および生食のそれぞれの添加系について凝固開始前、凝固開始 3 ~ 5 分, 40 分, 60 分, 2 時間, および 24 時間後の上清 100 $\mu$ l をプラスチック試験管にとり 0.05M Tris-HCl (PH8.3) / 0.15M NaCl 700 $\mu$ l, 1mM S-2222 100 $\mu$ l を加え混和し、37 $^{\circ}$ C で 1 分間反応させた。次に 20% 酢酸 100 $\mu$ l を加え反応を止め、405nm の波長で比色定量した。生成された第 Xa 因子濃度は予め調整された純化 Xa (USA, New Mexico 大学, Dr W. Kisiel より供与) を希釈して得られた検量直線より  $\mu$ g/ml に換算した。

## 成 績

1. 正常ヒト全血凝固過程中的第 IX 因子活性 (F. IX : C) および第 IX 因子抗原 (F. IX : Ag) の推移：

正常ヒト全血凝固過程中的第 IX 因子の動態について検討した。この際数種凝固促進物質の添加時の動態とも対比するため、全血に 1/20 溶の生食を添加した。すなわち生食 0.1 ml ずつを入れたガラス試験管に、採血した全血各々 1.9 ml 宛を加え、37 $^{\circ}$ C にて加温し、経時的に各試験管に停止液を加え、遠心分離して得た血清中の F. IX : C を Rapaport-Ames の 1 段法<sup>21)</sup>にて測定した。正常人 5 名の全血について行ったところ F. IX : C は 1/2 分後から徐々に上昇し、5 分後、 $133 \pm 5.1\%$  (mean  $\pm$  SD), 10 分後  $165 \pm 21\%$  となり 40 分後には  $390 \pm 73\%$  とピークに達した。以後漸減し 24 時間後には  $99 \pm 4.3\%$  まで低下した (Fig. 1. A)。

凝固過程中的 F. IX : Ag は、Laurell 法では 5 分まで 100% を示していたが、その後漸次低下しはじめ、4 時間後  $78 \pm 2.8\%$  となり以後 24 時間までほとんど変動しなかった。ELISA 法で測定した値もほぼ同様の動態を示した (Fig. 1. B)。

2. Platelin, Simplastin, および Thrombin 添加による正常ヒト全血凝固過程中的第 IX 因子活性 (F. IX : C) および第 IX 因子抗原 (F. IX : Ag) の推移：

各種濃度の Platelin 0.1ml ずつ (終濃度  $3.6 \times 10^{-1}$  ~  $3.6 \times 10^{-3}$  mg/ml) が入った試験管に全血 1.9 ml ずつを加え、経時的に血清中の F. IX : C を正常人 3 名について測定した。Platelin 終濃度  $3.6 \times 10^{-1}$  mg/ml の系では、F. IX : C は凝固 2 分後から急速に上昇しはじめ、5 分後 270  $\pm$

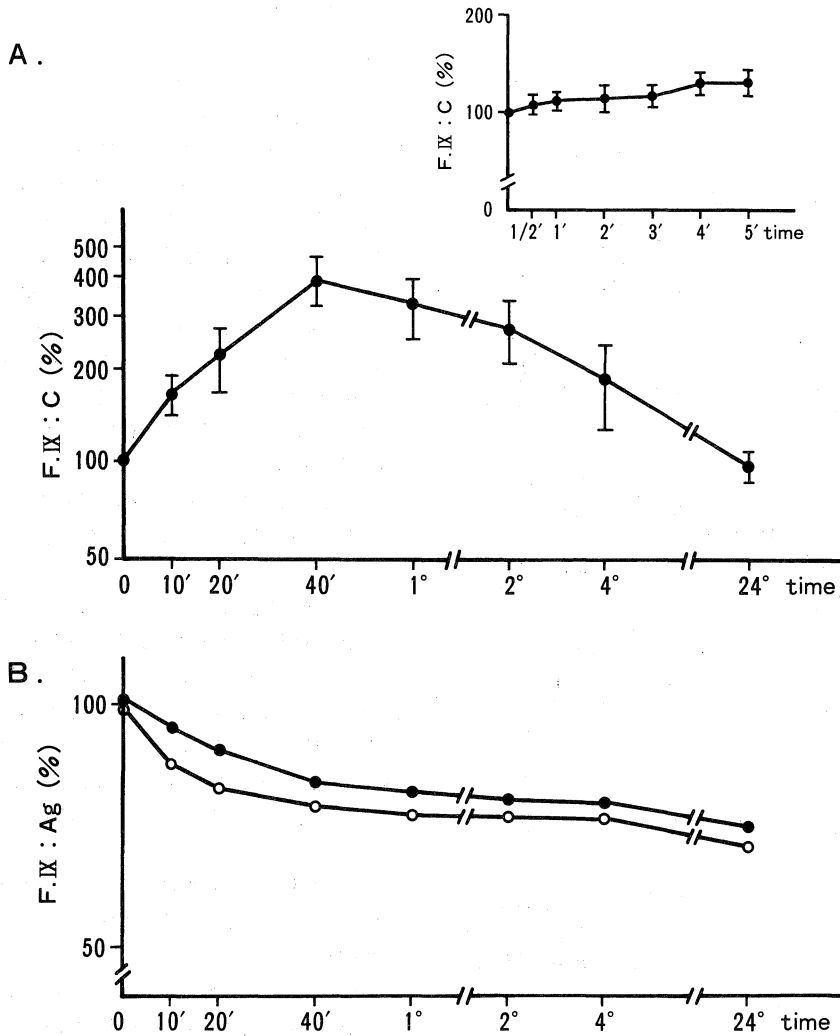


Fig. 1. F.IX activity (A) and F.IX antigen (B) during of normal whole blood with addition of saline. ○ : F. IX : Ag by laurell's method, ● : F. IX : Ag by ELISA.

62%, 10分後  $310 \pm 21\%$  とさらに上昇し1時間後  $700 \pm 73\%$  とピークに達した。以後漸減し24時間後には  $64 \pm 13\%$  まで低下した。終濃度  $3.6 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ ,  $3.6 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$  の系でも, F. IX : C はほぼ同様の傾向を示したが5分後から上昇し, 1時間後各々  $1,250 \pm 43\%$ ,  $490 \pm 8.2\%$  とピークに達した。以後漸減し, 24時間後には各々  $250 \pm 21.2\%$ ,  $56 \pm 2.9\%$  まで低下した (Fig. 2. A)。各種濃度の Simplastin (終濃度  $5.6 \times 10^0 \sim 5.6 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ ) につき同様の方法で検討した場合, F. IX : C は  $5.6 \times 10^0 \text{mg/ml}$  では凝固開始1/2分で約200%にまで上昇し, 他の濃度も Platelin 添加時と同様に1~5分後から急上昇し, 1時間後各々  $2,900 \pm 82\%$ ,  $1,800 \pm 81\%$ ,  $400 \pm 8.2$

%とピークに達し濃度依存性であった。3者とも以後漸減し, 24時間後には各々  $150 \pm 23.1\%$ ,  $140 \pm 20.5\%$ ,  $105 \pm 4.1\%$  まで低下した (Fig. 2. B)。

各種濃度の Thrombin (終濃度  $5.0 \times 10^0$ ,  $5.0 \times 10^{-1}$ ,  $5.0 \times 10^{-2}$ ,  $5.0 \times 10^{-3}$ ,  $5.0 \times 10^{-4} \text{U/ml}$ ) 添加の場合 F. IX : C はいずれも一過性に急速に上昇し, 1時間後にはそれぞれ  $1,350 \pm 72\%$ ,  $2,100 \pm 60\%$ ,  $420 \pm 16\%$ ,  $342 \pm 6.2\%$  とピークに達し, 以後漸減し24時間後には各々  $260 \pm 10.2\%$ ,  $340 \pm 20.2\%$ ,  $132 \pm 8.5\%$ ,  $112 \pm 6.2\%$  まで低下した (Fig. 2. C)。

Laurell 法と ELISA 法による F. IX : Ag 値はよく相関していたので, 各種凝固促進物質添加時の F. IX : Ag

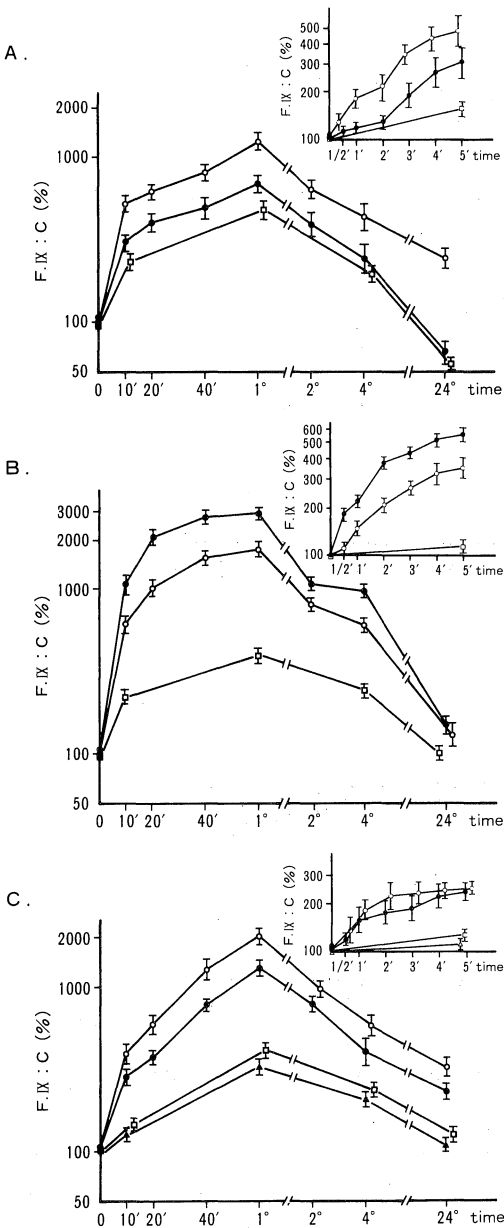


Fig. 2. F. IX activity during clotting of normal whole blood with addition of various concentrations of A) Platelin  $3.6 \times 10^{-1}$  mg/ml (●),  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml (○),  $3.6 \times 10^{-3}$  mg/ml (□), B) Simplastin  $5.6 \times 10^0$  mg/ml (●),  $5.6 \times 10^{-1}$  mg/ml (○),  $5.6 \times 10^{-2}$  mg/ml (□) and C) Thrombin  $5.0 \times 10^0$  U/ml (●),  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml (○),  $5.0 \times 10^{-3}$  U/ml (□),  $5.0 \times 10^{-4}$  U/ml (△). Data are presented as mean values  $\pm$  1SD (n=3).

の推移はより微量で、希釈度の高いELISA法で検討した。

Platelin 終濃度  $3.6 \times 10^{-1}$  mg/ml を添加した場合、F. IX : Ag は添加 1/2 分より低下しはじめ、5 分後  $92 \pm 5.3\%$ 、10 分後  $90 \pm 3.7\%$ 、1 時間後  $87 \pm 2.5\%$  となったが以後ほとんど変動せず 24 時間後は  $84 \pm 6.3\%$  であった。終濃度  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml,  $3.6 \times 10^{-3}$  mg/ml の添加系でも F. IX : Ag は同様軽度低下傾向を示し、24 時間後各々  $80 \pm 4.7\%$ 、 $78 \pm 2.4\%$  を示した (Fig. 3A)。

Simplastin 終濃度  $5.6 \times 10^0$  mg/ml を添加した場合、F. IX : Ag は添加 1/2 分より低下しはじめ 5 分後  $91 \pm 2.2\%$ 、10 分後  $82 \pm 1.2\%$ 、1 時間後  $74 \pm 4.5\%$  となり 2 時間以後はほとんど変動せず、24 時間後は  $60 \pm 4.4\%$  であった。終濃度  $5.6 \times 10^{-1}$  mg/ml,  $5.6 \times 10^{-2}$  mg/ml の添加系でも、F. IX : Ag は同様凝固開始後漸次低下傾向を示し、24 時間後各々  $72 \pm 4.2\%$ 、 $70 \pm 4.1\%$  を示した (Fig. 3B)。

Thrombin 終濃度  $5.0 \times 10^0$  U/ml を添加した場合 F. IX : Ag は添加 1/2 分より低下しはじめ、5 分後  $90 \pm 6.2\%$ 、10 分後  $87 \pm 5.3\%$ 、1 時間後  $82 \pm 3.2\%$  となり、24 時間後  $68 \pm 5.2\%$  まで低下した。終濃度  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml,  $5.0 \times 10^{-3}$  U/ml,  $5.0 \times 10^{-4}$  U/ml の添加系でも、F. IX : Ag は同様凝固開始後漸次低下傾向を示し、24 時間後各々  $74 \pm 5.2\%$ 、 $73 \pm 1.2\%$ 、 $67 \pm 2.4\%$  を示した (Fig. 3C)。

3. 凝固促進物質添加による部分トロンボプラスチン時間 (PTT) および活性化第 X 因子 (F. X a) 生成に及ぼす影響:

上述のごとく、各種濃度の Platelin, Simplastin および Thrombin をそれぞれ 1/20 溶添加した際の全血の凝固過程中的 F. IX : C は生食添加のそれに比して著しく増加した。これは凝固促進物質による F. IX : C 測定系への影響、F. IX の activation, 凝固過程に生成される F. X a の影響などによると推察される。

F. IX : C の測定は第 IX 因子欠乏血漿を基質とした PTT 測定系によっている。従って、正常ヒト血漿に 1/10 容量の各種濃度の凝固促進物質を添加し、PTT に及ぼす影響を検討した。

終濃度  $3.6 \times 10^{-5}$  ~  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml の Platelin 添加の PTT は生食添加時の PTT とほとんど差異を認めなかった。これは PTT 測定系では  $7.2 \times 10^{-1}$  mg/ml の Platelin を部分トロンボプラスチン試剤として用いていることによるものと考えられた。終濃度  $5.6 \times 10^{-3}$  ~  $5.6 \times 10^0$  mg/ml の Simplastin の添加による PTT は生食添加の PTT 45 秒より 5 ~ 25 秒短縮した。  $5.0 \times 10^{-4}$  ~  $5.0$

$\times 10^{-1}$ U/mlのThrombin添加でもPTTは2~22秒短縮した。従ってこれらの各種濃度の凝固促進物質の添加はF. IX: Cの測定系に影響を与えることが観察された。

凝固促進物質添加時の凝固過程に生成されるF. Xaについて発色合成基質を用いたAurell法<sup>25)</sup>で測定した。生食添加時の凝固過程ではF. Xa生成量は40分後0.11 $\mu$ g/mlであったが、終濃度 $3.6 \times 10^{-2}$ mg/mlのPletelin

添加時では1時間後F. Xaは0.32 $\mu$ g/mlと約3倍生成された。終濃度 $5.6 \times 10^0$ mg/mlのSimplastin添加時の1時間後のF. Xa生成量は、1.7 $\mu$ g/mlと約15倍増加し、終濃度 $5.0 \times 10^{-1}$ U/mlのThrombin添加時のF. Xa生成量は1時間後4.1 $\mu$ g/mlと生食添加時より約40倍増加していた (Fig. 4)。

#### 4. 全血凝固過程中の第IX因子 (F. IX) 限定分解の

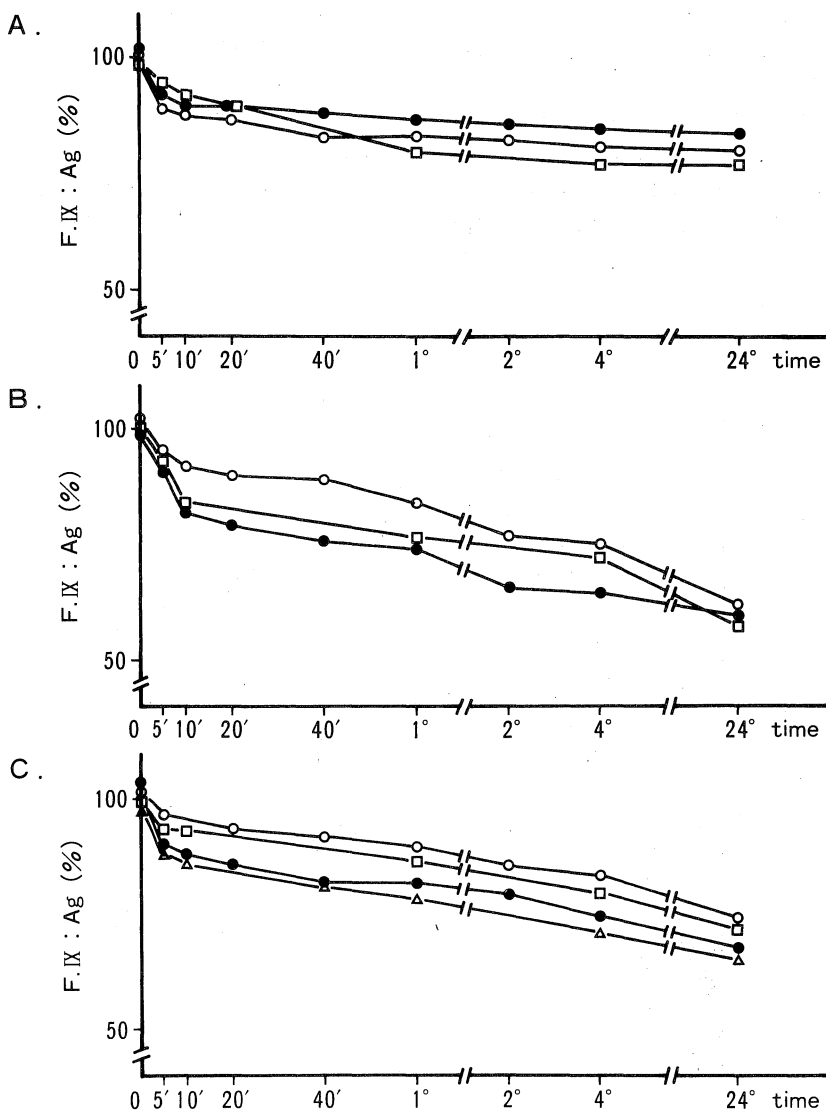


Fig. 3. F.IX antigen during clotting of normal whole blood with addition of various concentrations of A) Pletelin  $3.6 \times 10^{-1}$ mg/ml (●),  $3.6 \times 10^{-2}$ mg/ml (○),  $3.6 \times 10^{-3}$ mg/ml (□), B) Simplastin  $5.6 \times 10^0$ mg/ml (●),  $5.6 \times 10^{-1}$ mg/ml (○),  $5.6 \times 10^{-2}$ mg/ml (□) and C) Thrombin  $5.0 \times 10^0$ U/ml (●),  $5.0 \times 10^{-1}$ U/ml (○),  $5.0 \times 10^{-3}$ U/ml (□),  $5.0 \times 10^{-4}$ U/ml (△). Data are presented as mean values (n=3). (by ELISA)

Western blot 法による解析：

全血凝固過程中の F. IX の開裂状態について Western blot 法で観察した。この際各血清サンプルを  $\text{BaCl}_2$ -クエン酸液で吸着・溶出し、F. IX 分画を溶出せしめた。この部分純化 F. IX の回収率を Laurell 法で検討したところ、84~92%であった。F. IX 分画サンプルを非還元および還元系にて SDS-PAGE で泳動後、Immunoblot 法でニトロセルロース膜に転写し、抗ヒト第 IX 因子のウサギ血清と反応後、ペルオキシターゼ標識抗ウサギ IgG 血清と反応させた。最後に 4-Cl-1-naphthol で発色させて F. IX の開裂状態を観察した。

生食添加時の全血凝固過程中的 Western blot 法による F. IX のバンドは血漿検体(凝固開始 0 分, Fig. 5 Lane 2) では分子量約 60,000 dalton の位置に薄いバンドとその直下に太いバンドが出現した。血友病 B (F. IX : Ag <

1%) の血漿 (Fig. 5 Lane 1) では薄いバンドは認められたが太いバンドは出現しなかった。また、還元系・非還元系でも太いバンドは不変であったことよりこのバンドは native F. IX で上部の薄いバンドは非特異的のバンドと考えられた。凝固過程 5 分後 native F. IX バンドの他に分子量約 50,000 dalton の位置に新しいバンド (Lane 3) が出現し、以後両バンドは量的にほとんど変化なく 24 時間後も残存していた。

5 分後すでに分子量 50,000 dalton に相当する薄い新しいバンドが出現していることから 0, 1/2, 1, 2, 3, 4, 5 分までの経過について観察したところ、50,000 dalton のバンドは 1 分後すでに出現し、時間経過とともに徐々に濃くなっていくことが認められた (Fig. 6A)。5 分までの検体を 2-mercaptoethanol にて還元して観察すると、1 分後から heavy 鎖に相当する約 30,000 dalton の

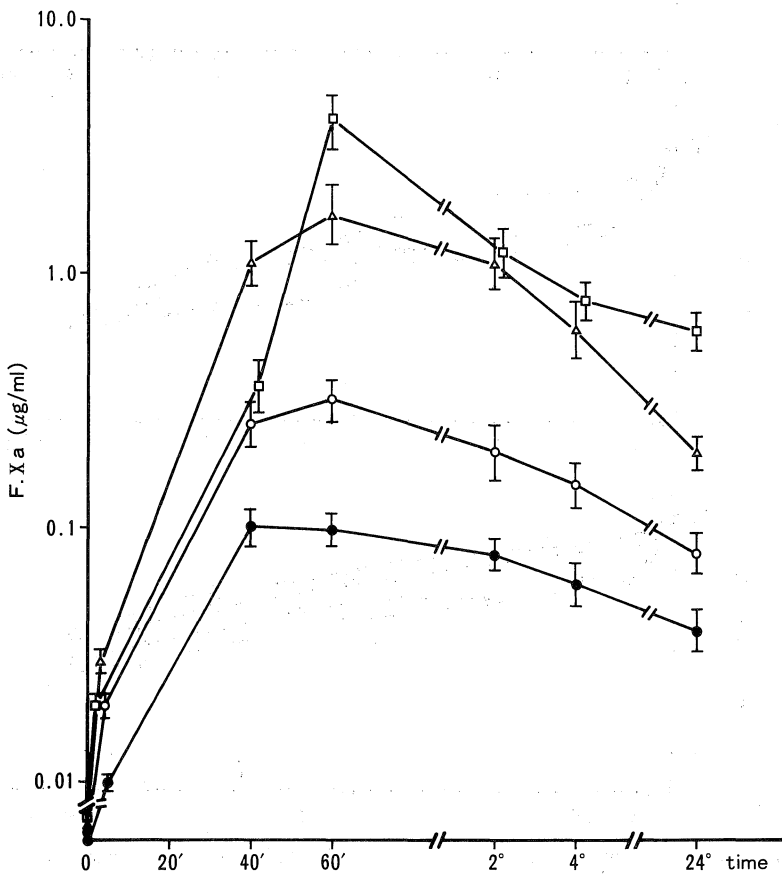


Fig. 4. The generation of F.Xa during clotting of normal whole blood with addition of saline (●), Platelin  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml (○), Simplastin  $5.6 \times 10^0$  mg/ml (△) and Thrombin  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml (□). Data are presented as mean values  $\pm$  1SD (n=3).

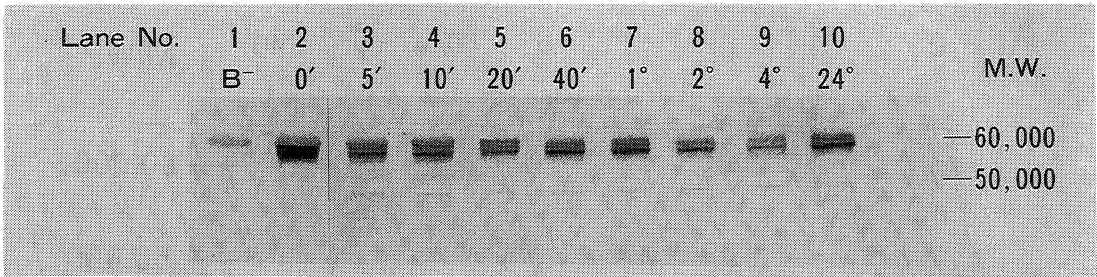


Fig. 5. The cleavages of F.IX during clotting of normal whole blood with addition of saline. Partially purified F.IX was subjected to SDS-7.5% PAGE. Following western blotting of the F.IX, the nitrocellulose membrane was reacted with polyclonal anti-F.IX antibody and subsequently with goat anti-rabbit IgG peroxidase.

B<sup>-</sup>: hemophilia B<sup>-</sup>.

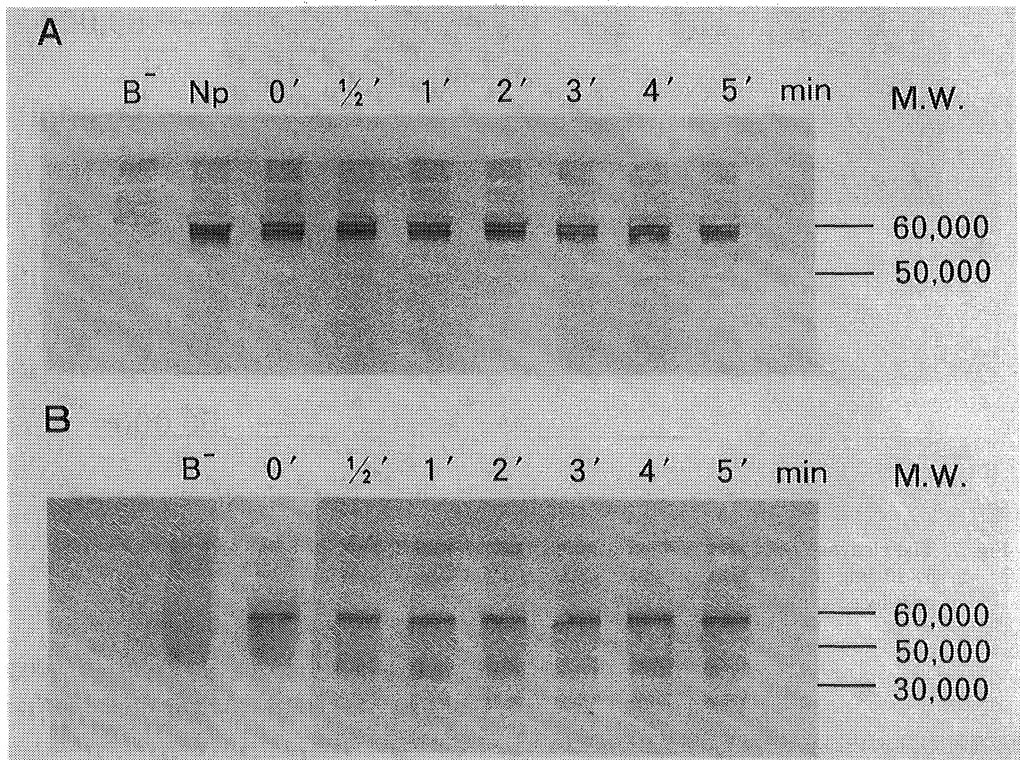


Fig. 6. The cleavages of F.IX during clotting of normal whole blood with addition of saline.

A shows the unreduced samples and B shows the reduced samples.

B<sup>-</sup>: hemophilia B<sup>-</sup>, NP: normal plasma.

新しいバンドが出現した (Fig. 6B). 還元にて分子量 30,000 dalton の heavy 鎖が出現したことより 50,000 dalton のバンドは F. IX  $\alpha\beta$  と考えられた.

Platelin 終濃度  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/ml, simplastin 終濃度  $5.6 \times 10^0$  mg/ml, Thrombin 終濃度  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml の添加では、非還元でそれぞれ 1/2 分後に 50,000 dalton のバ

ンドが観察され、以後量的にはほとんど変化なく 24 時間後も存在していた (Fig. 7A, B, C). なお還元系では生食添加と同様分子量約 30,000 dalton の位置にバンドが出現していた (図省略).



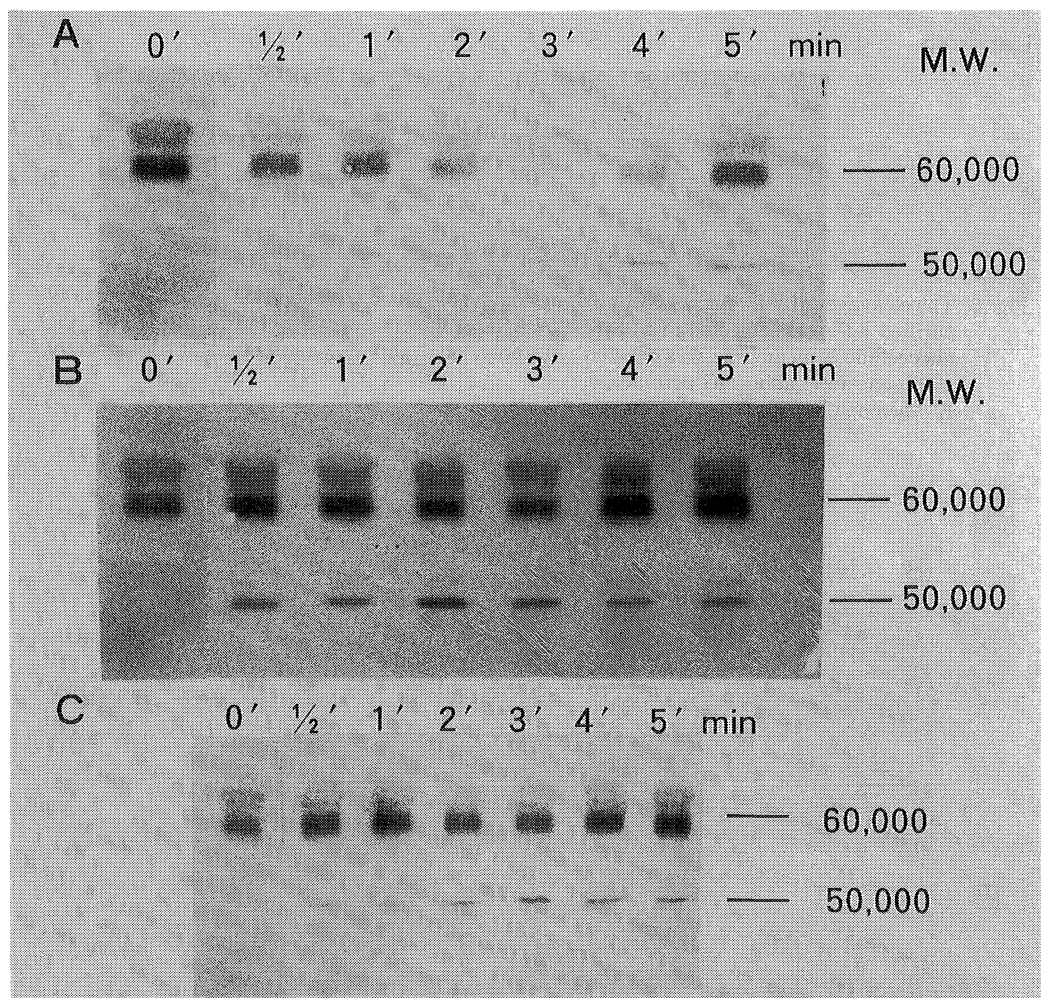


Fig. 7. The cleavages of F.IX during clotting of normal whole blood with addition of A) Platelin 3.  $6 \times 10^{-2}$  mg/ml, B) Simplastin  $5.6 \times 10^0$  mg/ml and C) Thrombin  $5.0 \times 10^{-1}$  U/ml. All show the unreduced samples.

## 考 案

血液凝固反応には内因系と外因系があり、それぞれ一応独立に開始するが F. X の活性化以後は共通系を介して進行する。しかし、組織因子 (TF) を trigger とする外因系の F. VII a/TF/Ca<sup>2+</sup> は内因系の F. IX をも活性化させること<sup>26)</sup>、生成された微量のトロンビンは F. VIII, F. V のみならず F. VII をも活性化させること<sup>27)</sup> が知られ F. IX の活性化の時点で内外両系がすでに関係しており、全血凝固過程中的 F. IX の動態は複雑である。緒言で述べたごとく、近年 F. IX は純化され分子レベルでの研究が進み、その構造、活性化機構が明らかとなったが、全血凝固過程中的 F. IX の動態の詳細な検討成績はない。著者

は全血凝固過程中的第 IX 因子活性 (F. IX : C)、第 IX 因子抗原 (F. IX : Ag) の推移と第 IX 因子活性化の状態について検討した。

後述のごとく、数種凝固促進物質添加時の第 IX 因子動態と比較するため、正常ヒト全血に 1/20 容の生食を添加 (対照) して、絶対的に F. IX : C の推移を観察したところ、添加時 1/2 分から 100% 以上と徐々に上昇し、40 分後  $309 \pm 73\%$  と約 4 倍に上昇し、以後漸次減少し、24 時間後前値に復した。一方、F. IX : Ag は 100% より凝固開始後漸次低下し、4 時間後  $78 \pm 2.8\%$  (Laurell 法)、 $80 \pm 5.4\%$  (ELISA 法) となったが、以後 24 時間後までほとんど不変であった。

この様に、正常ヒト全血の凝固過程中、F. IX : C は 40

分までに約4倍に上昇するも、F. IX: Agは逆に約10%減少し、両者の推移は明らかに解離した。この現象は1) F. IXの活性化2)凝固過程に生成されるF. Xa, トロンビンなどの活性化凝固因子の影響によるなどが推察された。凝固過程では内因系ではF. IX, 外因系ではF. VIIの活性化にひきつづいて、F. Xが活性化されF. Xaになり、続いてトロンビンが形成される。従って、凝固過程に生成されるF. Xa量を発色合成基質を用いた方法で測定したところ、F. Xa生成量は40分後0.11 $\mu$ g/mlであった。凝固40分後に測定されるF. IX: Cはそれ自体の活性化に加えて、F. Xaによる活性をも加味した短縮した凝固時間を反映しているものと考えられた。この様にF. IX: Cの一過性の増加が測定系へのF. Xaの影響があるにしても、F. IX: Agの漸減していることは、F. IXの活性化すなわちF. IXの限定分解によるF. IXaへの進行を示唆するものである。従って、著者は凝固開始後のF. IXの限定分解について、凝固過程での分離上清(血清)より第IX因子分画を部分純化し、この分画についてWestern blot法で検討した。

生食添加時、凝固開始0分(血漿)のF. IXバンドは還元系、非還元系いずれも60,000 daltonの位置に出現したが、1分後非還元系ではnative F. IXバンドのほか分子重量50,000 daltonの位置に薄く新しいバンドが出現し時間経過とともに徐々に濃くなっていくことが観察された。還元系では1分後、60,000 daltonの主バンドのほか30,000 daltonの薄いバンドが出現した。この30,000 daltonのバンドはF. IXのheavy鎖に相当するもので、分子重量50,000 daltonのバンドはF. IX  $\alpha$ Bと考えられた。従って、F. IXは凝固開始1分後すでにその一部が開裂活性化されF. IX  $\alpha$ Bが出現したが、凝固後24時間まで主バンドは60,000 daltonであった。

上記の観察所見は採血後、ガラス試験管内での凝固過程の経時的F. IXの推移であるが、生体内では血管損傷部位で凝固反応が進行する。損傷局所に露出したTFに血漿中のF. VIIが分子複合体を形成することにより外因凝固系は開始され<sup>28)29)</sup>、F. X, F. IXの両者を活性化し内因系と合流する。損傷血管局所では血小板の粘着、凝集により膜上のリン脂質が凝固反応の場を提供するとともに、F. XII, F. XI, F. IXが順次活性化し内因凝固系も進行する。このようにTFおよび血小板リン脂質は凝固反応のTriggerとして重要であり、種々の病的状態でTF, リン脂質が血管内に大量に流入すれば播種性血管内凝固(DIC)を惹起することはよく知られているところである。これらのことを念頭に、著者は凝固促進物質添加時の凝固過程でのF. IXの動態について検討した。その際、

リン脂質剤として市販のPlatelinを、TFとしてSimplastinを、また凝固過程で形成されるThrombinを用いた。Platelinの添加は終濃度 $3.6 \times 10^{-1}$ mg/ml,  $3.6 \times 10^{-2}$ mg/ml及び $3.6 \times 10^{-3}$ mg/mlの系で行ったが、F. IX: Cはそれぞれ1時間後 $700 \pm 73\%$ ,  $1,250 \pm 43\%$ ,  $490 \pm 8.2\%$ と上昇し、以後漸減した。すなわち、 $3.6 \times 10^{-2}$ mg/ml添加系ではF. IX: Cの1時間後の上昇は生食添加系のピーク値の約3倍になっていた。一方、F. IX: Agは100%より凝固開始後漸次低下し、24時間後それぞれ $84 \pm 6.3\%$ ,  $80 \pm 4.7\%$ ,  $78 \pm 2.4\%$ の値を示した。

Simplastinの添加は、終濃度 $5.6 \times 10^0$ U/ml,  $5.6 \times 10^{-1}$ U/ml及び $5.6 \times 10^{-2}$ U/mlの系で行ったが、F. IX: Cはそれぞれ1時間後 $2,900 \pm 82\%$ ,  $1,800 \pm 81\%$ ,  $400 \pm 8.2\%$ と上昇し、以後漸減した。 $5.6 \times 10^0$ U/ml添加系ではF. IX: Cの1時間後の上昇は生食添加系のピーク値の約7倍になっていた。F. IX: Agは100%より凝固開始後漸次低下し24時間後それぞれ $60 \pm 4.4\%$ ,  $72 \pm 4.2\%$ ,  $70 \pm 4.1\%$ を示した。

Thrombinの添加は、終濃度 $5.0 \times 10^0$ U/ml,  $5.0 \times 10^{-1}$ U/ml,  $5.0 \times 10^{-2}$ U/mlおよび $5.0 \times 10^{-4}$ U/mlの系で行ったが、F. IX: Cは1時間後にはそれぞれ $1,350 \pm 72\%$ ,  $2,100 \pm 60\%$ ,  $420 \pm 16\%$ ,  $342 \pm 6.2\%$ とピークに達し、以後漸減した。 $5.0 \times 10^{-1}$ U/ml添加系ではF. IX: Cの1時間後の上昇は生食添加系のピーク値の約5倍になっていた。F. IX: Agは100%より凝固開始後漸次低下し、24時間後それぞれ $82 \pm 3.2\%$ ,  $74 \pm 5.2\%$ ,  $73 \pm 1.2\%$ ,  $67 \pm 2.4\%$ を示した。以上のごとく凝固促進物質を添加した凝固過程でのF. IX: Cは生食添加時より著しく増加し、一方F. IX: Agは、凝固促進物質の添加時、生食添加時と同様に経時的に漸減し、両者の動態は解離した。凝固開始1時間までのF. IX: Cの上昇については、先に述べたF. IXの活性化の他に凝固促進物質のF. IX: Cの測定系への影響、凝固過程に生成されるF. Xa, トロンビンなど活性化凝固因子の影響などが想定された。

F. IX: Cの測定系は第IX因子欠乏血漿を基質とし、プラテリンを用いた部分トロンボプラスチン時間法(PTT)に基いているので、凝固促進物質の血漿のPTTに及ぼす影響を検討した。終濃度 $3.6 \times 10^{-2} \sim 3.6 \times 10^{-5}$ mg/mlのPlatelin添加のPTTは生食添加のPTTとほとんど差異を認めなかった。添加Platelin濃度はPTT測定系の試剤としてのPlatelin濃度の $7.2 \times 10^{-1}$ mg/mlに比して少ないためと考えられた。一方、SimplastinあるいはThrombin添加の場合のPTTはそれぞれ最高25秒、22秒短縮した。従って、SimplastinおよびThrombinはそれらの添加濃度に応じF. IX: Cの測定系に直接影響

を与えるものと考えられた。

凝固過程中の F. Xa 生成については、生食添加時、40 分後  $0.11\mu\text{g/ml}$  であったことを前述したが、終濃度  $3.6 \times 10^{-2}\text{mg/ml}$  の Platelin 添加時では 1 時間後  $0.32\mu\text{g/ml}$  と約 3 倍に、終濃度  $5.6 \times 10^0\text{mg/ml}$  の Simplastin 添加時は  $1.7\mu\text{g/ml}$  と約 16 倍、終濃度  $5.0 \times 10^{-1}\text{U/ml}$  の Thrombin 添加時の F. Xa 生成量は 1 時間後、 $4.1\mu\text{g/ml}$  と対照の約 40 倍に達していた。前述のごとく、Platelin 添加時の F. IX : C の上昇は対照の約 2 倍で、F. Xa 生成が約 3 倍であったことはこの F. Xa 生成は主として Platelin 存在下の内因凝固系の活性化経路を介しているものと考えられた。組織因子である Simplastin 添加時の F. IX : C の上昇は生食添加時の約 7 倍で、F. Xa 生成量は約 6 倍であったことは内因系による F. IX の活性化の他に、外因系による F. IX の活性化が生じること、また、F. Xa の生成は外因および内因系相互の interaction によるものと推察される。Thrombin 添加時の凝固過程中的 F. IX : C の上昇は生食添加時の約 5 倍であったが、F. Xa 生成量は約 40 倍であった。Thrombin は内因及び外因系を介して F. Xa の生成にひきつづいて生じるが、一旦、微量に生じた Thrombin は F. VII を活性化させ F. VII は F. IX にも作用するが、F. X にはよる強力に反応するため F. Xa 生成が著しく増加したものである。

生食添加時の凝固過程中的 F. IX の開裂については前述したが、終濃度  $3.6 \times 10^{-2}\text{mg/ml}$  の Platelin,  $5.6 \times 10^0\text{mg/ml}$  の Simplastin,  $5.0 \times 10^{-1}\text{U/ml}$  の Thrombin 添加系では凝固開始後量的にはほとんど変化なく、24 時間後までの main バンドは 60,000 dalton であった。このように凝固促進物質添加系では、第 IX 因子の活性速度の増加が認められたが、第 IX 因子の限定分解の程度にはほとんど影響を与えなかった。すなわち全血凝固過程では、凝固促進物質添加時でも F. IX すべてが活性化されるのではなく、その一部であることが確かめられた。

## 結 論

正常ヒト血液凝固過程中的第 IX 因子の動態について検討した。

1. 全血に 1/20 容の生理的食塩水添加時の凝固過程では、添加後 1/2 分から漸次上昇し、40 分後  $390 \pm 73\%$  と約 4 倍に上昇し、以後漸次減少し、24 時間後前値に復した。一方、F. IX : Ag は 100% より凝固開始後漸次低下し、4 時間後 ELISA 法で  $80 \pm 5.4\%$  となったが、以後 24 時間後まではほとんど不変であった。
2. Platelin の添加は終濃度  $3.6 \times 10^{-2}\text{mg/ml}$  の添加時、F. IX : C は 1 時間後  $1,250 \pm 43\%$  と上昇し以後漸減した。

一方、F. IX : Ag は漸次低下し、24 時間  $80 \pm 4.7\%$  の値を示した。

Simplastin 終濃度  $5.6 \times 10^0\text{mg/ml}$  の添加時、F. IX : C は 1 時間後  $2,900 \pm 82\%$  と上昇し、以後漸減した。F. IX : Ag は漸次低下し、24 時間後  $60 \pm 4.4\%$  値を呈した。

Thrombin 終濃度  $5.0 \times 10^{-1}\text{U/ml}$  の添加時、F. IX : C は 1 時間後  $2,100 \pm 60\%$  とピークに達し、以後漸減した。F. IX : Ag は漸次低下し、24 時間後  $74 \pm 5.2\%$  となった。

3. 生食添加時の F. IX の開裂については凝固開始後 1 分より、Platelin, Simplastin, Thrombin 添加系では凝固開始後 30 秒より F. IX  $\alpha\beta$  が出現し、以後 24 時間も量的にはほとんど不変であった。

以上より、全血の凝固過程で、第 IX 因子は一過性に上昇するも第 IX 因子抗原は漸次軽度減少し、第 IX 因子の限定分解による活性化が惹起されていることを認めたが、第 IX 因子の活性化は全血中のごく一部で進行していることを確かめた。また、凝固促進物質の添加は第 IX 因子活性の増加をもたらすが、第 IX 因子の限定分解の程度にはほとんど影響を与えなかった。

尚、本研究は平成元年度文部省科学研究費重点領域研究「血栓性素因」の助成を受けた。

本論文の要旨は、第 31 回日本臨床血液学会総会(平成元年 11 月 9 日、名古屋市)において発表した。

## 文 献

- 1) Aggeler, P. M. : Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency. A new disease resembling hemophilia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **79** : 692~694, 1952.
- 2) Biggs, R., Douglas, A. S., Macfarlane, R. G., Dacie, J. V., Pitney, W. R., Merskey, C. and O'Brien, J. R. : Christmas disease, a condition previously mistaken for hemophilia. Brit. Med. J., **2** : 1378~1382, 1952.
- 3) Andersson, L-O., Borg, H. and Miller-Anderson, M. : Purification and characterization of human factor IX. Thromb. Res. **7** : 451~459, 1975.
- 4) Østerud, B. and Flengsrud, R. : Purification and some characteristics of coagulation factor IX from human plasma. Biochem. J. **145** : 469~475, 1975.
- 5) Sulomela, H. : Human coagulation factor IX (isolation and characterization). Eur. J. Biochem. **71** : 145~154, 1976.

- 6) **Eryklund, L., Borg, H. and Andersson, L.-O.** : Aminoterminal sequence of  $\gamma$ -carboxyl glutamic acid residues. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **65**: 187~189, 1976.
- 7) **Discipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G. and Davie, E. W.** : A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **16**: 698~706, 1977.
- 8) **Yoshioka, A.** : Studies of human coagulation factor IX. I. Purification and immunological characterization of factor IX. *J. Nara Med. Ass.* **29**: 129~140, 1987.
- 9) **Discipio, R. G., Kurachi, K. and Davie, E. W.** : Activation of human factor IX (Christmas factor). *J. Clin. Invest.* **62**: 1528~1538, 1978.
- 10) **Kurachi, K. and Davie, E. W.** : Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 6461~6464, 1982.
- 11) **Choo, K. H., Gould, K. G., Rees, D. J. G. and Brownlee, G. G.** : Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature* **299**: 178~180, 1982.
- 12) **Yoshitake, S., Schach, B. G., Foster, D. C., Davie, E. W. and Kurachi, K.** : Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (Anti hemophilic factor B). *Biochemistry* **24**: 3736~3750, 1985.
- 13) **Stenflo, J. and Suttie, J. W.** : Vitamin K dependent formation of  $\gamma$ -carboxylglutamic acid. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 157~172, 1977.
- 14) **Suttie, J. W.** : Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins. University Park Press, Baltimore, 1980.
- 15) **Furie, B. and Furic, B.** : The molecular basis of Blood coagulation. *Cell* **53**: 505~518, 1988.
- 16) **Byrne, R., Link, R. P. and Castellino, F. J.** : A kinetic evaluation of activated bovine blood coagulation factor IX toward synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* **255**: 5336~5341, 1980.
- 17) 大久保芳明, 藤村吉博, 嶋 裕子, 松山郁子, 杉本充彦, 高瀬俊夫 : 凝固過程中的プロトロンビンおよび第X因子抗原の推移. *Immunohaematology* **5**: 497~502, 1983.
- 18) 高瀬俊夫 : 凝固過程中的第VIII因子に関する研究 2. 脳組織トロンボプラスチン, 脳組織クロロホルム抽出液, 赤血球溶血液及びトロンビン添加による凝固過程中的第VIII因子凝固活性, 第VIII因子関連抗原並びに von Willebrand 因子活性. *奈医誌.* **29**: 69~81, 1978.
- 19) 市川正裕 : 凝固過程中的 Antithrombin III に関する研究 2. 数種凝固促進物質添加による凝固過程中的 progressive antithrombin 活性, antithrombin III 活性並びに antithrombin III 抗原量. *奈医誌.* **31**: 433~442, 1980.
- 20) **Bell, W. N. and Alton, H. G.** : A brain extract as a substitute for platelet suspension in the thromboplastin generation test. *Nature* **174**: 880, 1954.
- 21) **Rapport, S. I., Schiffman, S., Patch, M. J. and Ames, S. B.** : The importance of activation of antihemophilic globulin and proaccelin by traces of thrombin in the generation of intrinsic prothrombinase activity. *Blood* **21**: 221~236, 1963.
- 22) **Fujimura, Y., Sakai, T., Matsuyama, I., Mikami, S., Yoshioka, A. and Fukui, H.** : A simultaneous purification of human prothrombin and factor IX. *Blood and Vessel* **13**: 63~71, 1982.
- 23) **Laurell, C. B.** : Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.* **15**: 45~52, 1966.
- 24) **Parquet, G. A., Mazurier, C., Amiral, J. and Hartimoli, J. L.** : Assay of factor IX antigen using an enzyme. *Immuno Thromb. Res.* **35**: 703~712, 1984.
- 25) **Aurell, L., Friberger, P., Karlsson, G. and Claesson, G.** : A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for X a. *Thromb. Res.* **11**: 595~609, 1977.
- 26) **Φsterud, B. and Rapaport, S. I.** : Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and Factor VII : Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5260~5264, 1977.
- 27) **Kisiel, W. and Davie, E. W.** : Isolation and characterization of bovine factor VII. *Biochemistry* **14**: 4982~4934, 1975.
- 28) **Φsterud, B.** : Activation of the coagulation system in normal haemostasis. *Scand. J.*

Haematol. 32: 337~345, 1984.

Blood 71: 1~8, 1988.

29) **Nemerson, Y.**: Tissue factor and hemostasis.