

## ヒト, ウサギおよびウシ臓器由来の組織因子 を用いた第VII因子アミダーゼ活性の比較

高宮 脩, 加藤亮二

Comparison of 3 kinds of tissue factors from human brain,  
rabbit brain/lung and ox brain for factor VII amidolytic activity assay

A comparison was made among factor VII amidolytic activities on a chromogenic substrate assay using tissue factors from human brain (HB-TF), rabbit brain/lung (RB/L-TF) and bovine brain (BB-TF). Factor VII amidolytic activities using HB-TF showed linearity between absorbance ( $A_{405nm}$ ) and diluent concentration of normal pooled-plasma on log-log paper, but not RB/L-TF and BB-TF. In normal individuals, factor VII amidolytic activities using three tissue factors were given close agreement ( $p > 0.05$ ). In patients receiving stabilized oral anticoagulation, factor VII amidolytic activities using RB/L-TF ( $r = 0.828$ ) and BB-TF ( $r = 0.742$ ) correlated well with that using HB-TF, respectively. Factor VII amidolytic activities using RB/L-TF ( $62.7 \pm 23.8\%$ ) were somewhat higher than those from HB-TF ( $56.1 \pm 22.5\%$ ) and BB-TF ( $56.1 \pm 22.7\%$ ). In all kinds of disease containing liver disease, factor VII amidolytic activities using RB/L-TF ( $r = 0.771$ ) and BB-TF ( $r = 0.769$ ) correlated well with that using HB-TF, although factor VII amidolytic activities using BB-TF ( $108.8 \pm 34.7\%$ ) were somewhat higher than those from HB-TF ( $92.8 \pm 35.2\%$ ) and RB/L-TF ( $95.0 \pm 31.7\%$ ). In eleven factor VII deficiencies with CRM<sup>-</sup>, factor VII amidolytic activities using RB/L-TF ( $3.9 \pm 3.0\%$ ) was somewhat higher than those using remaining two tissue factors, HB-TF ( $2.1 \pm 1.8\%$ ) and BB-TF ( $2.4 \pm 1.4\%$ ).

### Key Words :

factor VII (第VII因子), amidolytic activity (アミダーゼ活性), chromogenic substrate (合成基質), tissue factor (組織因子)

第VII因子 (FVII) は外因系凝固機構の開始反応に關与するセリンプロテアーゼ前駆体で、活性型第X因子、活性型第IX因子、活性型第XIII因子やトロンビンなどによって活性化されるが、凝固能の発現には、補助因子である組織因子 (TF) とカルシウムの複合体形成が必要となる<sup>1)</sup>。現在、FVII 凝固活性 (FVII : c) の測定に用いられる TF はウサギ、ウシ、サル、ヒトなどの動物組織からの抽出物や遺伝子組み換え型 TF が使用されている<sup>2)</sup>。異種動物由来の TF はヒト凝固因子に対して同種のものとはやや異なった反応性を示すことが報告されている<sup>3)</sup>。また、抽出源となる臓器によっても感度差のあることが述べられている<sup>4)</sup>。われわれも抽出源の異なる TF を用いて、FVII : c に差異のあることを報告してきた<sup>2,5-7)</sup>。

今回は合成基質を用いた第VII因子アミダーゼ活性 (FVII : am) について検討し、若干の知見をえたので報告する。

## 対象と方法

### 1. 被検血漿

長期ワーファリン服用患者20例 (トロンボテスト値 : 18~45%)、肝疾患を含む各種疾患々者20例、先天性第FVII 欠乏/低下症8家系11名および対照として健常人男女30名を測定した。被検血漿は血液9容に3.8%クエン酸ナトリウム液1容を混和し、3,000 rpm, 10分間遠心後分離した。正常参照血漿は健常人101名 (男性 : 50, 女性 : 51) よりえた血漿を等量混和したのを用いて、1 ml 中のFVII : am を100%とした。

### 2. TF 試薬

TF 試薬はQuickの方法<sup>8)</sup>に準じて自家調製したヒト脳抽出TF (HB-TF) とウシ脳抽出TF (BB-TF) およびウサギ脳/肺組織由

来TF (RB/L-TF ; シンプラスチン, Teknika, USA) を用いた。シンプラスチンは添付された能書に準じて調整した。

### 3. FVII : am の測定

FVII : am はMargaritella とDeutshの方法<sup>9)</sup>に準拠した。0.15 M NaCl加0.05 M トリス塩酸緩衝液 (TBS ; pH 7.4) で希釈した被検血漿 (100倍) 200  $\mu$ l にPT 試薬として調製したTF100  $\mu$ l を加えて、37°Cで1分間加温した。混液に5 u/ml の精製ウシ第X因子 (Sigma, USA) 100  $\mu$ l を加えて、37°Cで3分間加温した後、0.3 M EDTA2Na 50  $\mu$ l を加えてFVII/FVIIa-TF 反応の進行を停止した。この混液100  $\mu$ l にTBS 600  $\mu$ l とS-2222 (2.5 mg/ml ; Kabi, Sweden) 100  $\mu$ l を加えて、37°Cで4分間加温した。これに50% 酢酸100  $\mu$ l を加えて反応を停止した後、405 nm で比色測定した。標準曲線はTBSで75~6,400倍した正常参照血漿を用いて同様に操作した。

## 成績

### A. FVII : am の検量線

正常参照血漿の75倍 (150%) から6,400倍 (1.56%) の希釈液を作成して、3種のTF 試薬を用いてFVII : am を測定した。いずれのTF も正常参照血漿の希釈倍数が増加するとともに吸光度の低下が見られた。3種のTF 試薬のうちHB-TF によるFVII : am 測定が他に比べて最も高感度であった。HB-TF は両対数グラフ上では血漿の希釈倍数 (150倍~6,400倍) と吸光度の間ではほぼ直線関係にあったが、RB-TF とBB/L-TF は両対数グラフ上では希釈倍数の増加と吸光度との間で曲線状の検量線となった (図1)。

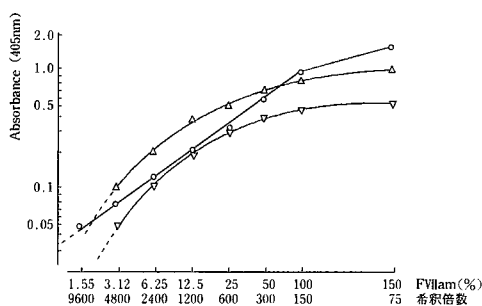


図1

### B. 健常成人, ワーファリン服用患者および肝疾患を含む各種疾患々者のFVII:am

3種のTFを用いて健常成人30名のFVII:amを測定した。HB-TFによるFVII:amは $95.2 \pm 17.5\%$ , RB/L-TFは $94.5 \pm 13.9\%$ , BB-TFでは $106.1 \pm 27.0\%$ となり, 測定に用いた3種のTF間で有意差( $P > 0.05$ )は見られなかった。

ワーファリン服用患者のFVII:amはRB/L-TF( $62.7 \pm 23.8\%$ )がやや高い傾向にあったが, HB-TF( $56.1 \pm 22.5\%$ )との間で有意な相関関係( $r = 0.828$ ,  $y = 0.78x + 6.90$ )が見られた。また, HB-TFとBB-TF( $56.1 \pm 22.7\%$ )も互換性ならびに相関関係( $r = 0.742$ ,  $y = 0.74x + 14.8$ )とも良好であった(図2)。

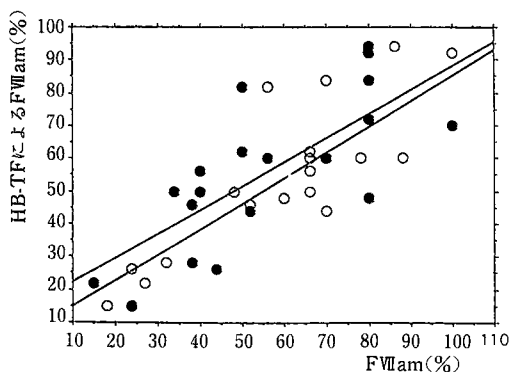


図2

肝疾患を含む各種疾患々者ではHB-TF( $92.8 \pm 35.2\%$ )とRB-TF( $95.0 \pm 31.7\%$ )によるFVII:amとの間で良好な相関関係( $r = 0.771$ )が見られた。HB-TFとBB-TF( $108.8 \pm 34.7\%$ )も良好な相関関係( $r = 0.769$ )にあったが, FVII:amが高値の症例はBB-TFではやや高くなる傾向が見られた。HB-TFに対する2種の異種動物由来TF, RB-TF( $y = 0.56x + 11.5$ )とBB-TF( $y = 0.78x + 7.98$ )はほぼ同様な回帰直線を呈した(図3)。

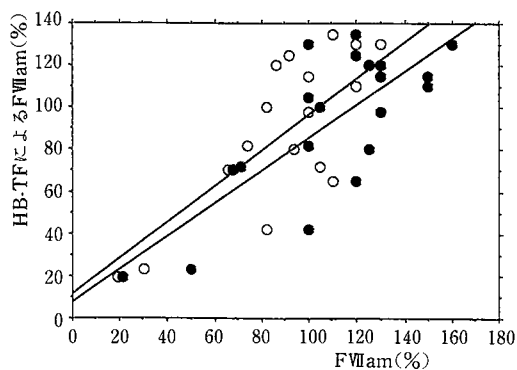


図3

### C. 先天性FVII欠乏/異常症のFVII:am

先天性FVII欠乏/低下症6例のFVII:amを表2に示す。HB-TF( $2.1 \pm 1.8\%$ )は3種のTFの内最も低値となった。BB-TF( $2.4 \pm 1.4\%$ )はHB-TFより平均値で約1%の高値となったが, RB/L-TF( $3.9 \pm 3.0\%$ )は約2倍の成績を示した(図4)。

### 考察

凝固因子活性の測定は従来からの当該因子の欠乏血漿を用いた自然基質によるプロトロンビン時間法に加えて, 発色性合成基質による比色法が用いられている。現在までに発色性合成基質は数多く開発されてきたが, 血漿

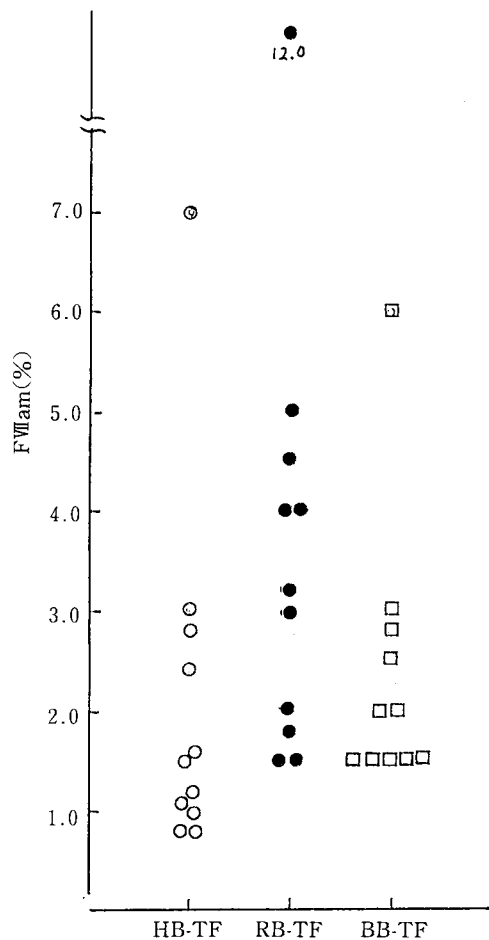


図 4

中の FVII : am を直接的に測定することの出来る合成基質はない<sup>10)</sup>。血漿中 FVII : am は FVIIa-Ca-TF によって活性化した第 X 因子の合成基質分解能をもって測定される<sup>11,12)</sup>。FVII : am は FVII : c よりも良好な再現性であることが知られている<sup>11)</sup>。

FVII : c の測定に用いられる TF は抽出源や製造過程/方法によって成績に差異のみられることはよく知られている<sup>3,4)</sup>。FVII : c では検量線はヒト TF が異種動物臓器由来の TF に比して高感度となり、凝固時間は FVII : c の消長を良く反映する<sup>5,13)</sup>。FVII :

am では HB-TF によるの検量線は両対数グラフ上で正常血漿の希釈倍数と吸光度の間でほぼ直線関にあったが、RB-TF と BB/L-TF はほぼ並行して、希釈倍数の増加と吸光度との間で曲線となり、FVII : am 測定系での FVII と TF との異種動物間による反応性の差が示唆された。

健康成人の FVII : c は BB-TF がヒト胎盤由来 TF や RB-TF に比べて、高値の傾向を示すことを報告したが<sup>15)</sup>、FVII : am も有意差は見られないものの BB-TF がやや高値の傾向となった。

経口抗凝血薬治療下にある患者の FVII : am は FVII : c より高値になることが報告された<sup>11)</sup>。今回の検討対象となった経口抗凝血薬服用患者の FVII : c は測定していないが、トロンボテスト値 (18~45%) からみると FVII : am は高値であるものと考えられた。Seligsohn らはこの差を測定系の違いによって生じるものと説明した<sup>11)</sup>。著者は遺伝子組み換え型 TF を用いたワーファリン服用患者の FVII : c は RB-TF に比べて高値例で高くなる傾向にあると報告した<sup>2)</sup>。3 種の TF を用いたワーファリン服用患者の FVII : am は互いに良好な相関関係を示し、HB-TF と BB-TF とはほぼ互換性が見られるも、RB-TF による FVII : am は残りの 2 TF に比べて高値となる傾向が見られた。また、肝疾患を含む各種疾患々者は BB-TF が他の 2 TF に比べて、高くなる傾向となった。BB-TF は非活性型 FVII に比して活性型 FVII (FVIIa) が感度よく反応することは知られている<sup>15,16)</sup>が、血漿中 FVII : am は FVII : c とは異なり、FVIIa の影響を受けることなく Total FVII として測定される<sup>11)</sup>。3 TF とも同じ標準血漿を用いたにもかかわらず、TF の種類によってワーファリン服用

患者と肝疾患を含む各種疾患々に差が生じた原因は明らかには出来なかった。

先天性 FVII 異常症のなかには TF の種によって FVII : c に明らかな差のある症例のあることは既に報告した<sup>17)</sup>。本検討では先天性 FVII 欠乏/低下症 (CRM<sup>-</sup>) を用いたが, RB-TF による FVII : am が他の TF に比べてやや高値となった。これは TF の種の違いと言うよりも, 用いた市販 TF 試薬の抽出/製造法によることも考えなければならない。

以上の成績より, FVII : am は FVII : c と測定系は異なるが, 測定に用いる TF の種の違いによって, 測定値に差のあることが明らかとなった。

## 文献

- 1) 三上貞昭: 第VII因子による外因系凝固開始とその調節機構, 血液と脈管, 17: 99-108, 1986.
- 2) 高宮 脩, 百瀬正信, 横瀬和哉: 遺伝子組換え型の組織因子と臓器抽出物の組織因子を用いた第VII因子活性の比較, 医学と新薬, 33: 229-237, 1995.
- 3) Janson TL, Stormorken H, Prydz H: Species Specificity of tissue thromboplastin. Haemostasis, 14: 440-444, 1984.
- 4) Schroll A: MeBmethoden in der Gerinnungsgasanalytik: Vergleich von Thromboplastinpreparaten. diagnostik, 10: 202-210, 1977.
- 5) 高宮 脩, ほか: ヒト胎盤由来 PT 試薬 Thromborel S の検討, 臨床検査機器・試薬, 9: 357-363, 1986.
- 6) 高宮 脩, ほか: PT 試薬「トロンボラスチンカルシウム」の検討, 新薬と臨床, 36: 1285-1292, 1987.
- 7) 高宮 脩, ほか: 外因系凝固因子に対する市販プロトロンビン試薬の比較, 臨床検査機器・試薬, 11: 923-928, 1988.
- 8) Denson KWE: The preparation of general reagents and coagulation factors. Human blood coagulation, Haemostasis and Thrombosis (Biggs R., ed), London: Blackwell, 1976. p 663-664.
- 9) Margaritella P, Deutsch, E: Clinical use of a method for the determination of factor VII by a chromogenic substrate, Thromb Res, 21: 585-591, 1981.
- 10) 鈴木節子: 合成基質による凝固線溶因子の測定, 検査と技術, 13: 511-517, 1985.
- 11) Seligsohn U, Osterud N, Rapaport SI: Coupled amidolytic assay for factor VII: Its use with a clotting assay to determine the activity state of factor VII, Blood, 52: 978-988, 1978.
- 12) Avvisati G, ten Cate JW, van Wijk EM, Kahle LH, Mariani G: Evaluation of a new chromogenic assay for factor VII and its application in patients on oral anticoagulant treatment, Br J Haematol, 45: 343-352, 1980.
- 13) 高宮 脩: 遺伝子組換え型の組織因子を用いたプロトロンビン試薬「オーソリコビプラスチン 1.0」の評価—ヒトおよびウサギ臓器由来のプロトロンビン試薬との比較検討—, 機器・試薬, 17: 1079-1085, 1993.
- 14) 高宮 脩, 奥村伸生: 凝固亢進状態の分子マーカーとしての第VII因子, 臨床病理41: 83-87, 1993.
- 15) 高宮 脩: 凝固亢進状態におけるウシおよびヒト組織トロンボプラスチンによる第VII因子活性比の測定意義, 日本血栓止血学会誌, 4: 15-22, 1993.
- 16) Katori K, Matsuo T, Asada R, Sakata T, Kato H, Miyata T: The strong positive correlation between factor VII clotting activity using bovin thromboplastin and the activated factor VII level Thromb Haemosta, 73: 429-439, 1995.
- 17) Takamiya O, Abe S, Yoshioka A, Nakajima K, McVey JH, Tuddenham EGD: Factor VII shinjo: A dysfunctiona factor VII variant homozygous for the substitution Gln for Arg at

position 79, Haemostasis 25, 89-97, 1995.

受付日：1995年10月13日

受理日：1995年11月21日