

血液凝固第IX因子の分離

Separation of the blood coagulation factor IX

鈴木基之*・宮川浩一*

Motoyuki SUZUKI and Koichi MIYAGAWA

1. はじめに

・血しょうタンパクと血液分画製剤

血液の液体成分である血しょう中には約7%のタンパク質が存在し、その種類は100を越える。これらのタンパク質には凝固、線溶、免疫、補体、物質の運搬、生体の向上など数多くの機能を有し、それぞれが生命を維持する上で極めて重要な役割を担っている。病気やケガなどの原因でこれらの質や量に異常や不足が生じた場合、健康な献血者より得た血しょうを物理化学的手法で分離した血しょう分画製剤の補充が必要となる。

近年の医療技術の進歩と成分輸血療法の実現に伴い、血しょう分画製剤の必要性はますます高くなっている。しかし、現在、日本では、欧米諸国と比較して過剰に血しょう分画製剤が使用され、そのほとんどを外国からの輸入に依存していることから、より安全な製剤を安定して自給することが望まれている¹⁾。

・血液凝固第IX因子

血液凝固因子は、血液の凝固反応に関与する因子で主なもので13種類あり I～XIIIまで番号がつけられている。

第IX因子は血液凝固内因系の因子で、セリンプロテアーゼ前駆体であり、血しょう中に3～5 mg/l含まれている。その欠損症は血友病Bと呼ばれ、血液凝固異常の中では第VIII因子関連の異常症(血友病Aおよびフォン・ビルブラント病)について多く発生している。日本国内での患者数は、血友病Aが4000人、血友病Bが2000人程度と言われている。

血液凝固因子の中で第II, VII, IX, X因子は体内で合成される際にビタミンKが必要とされるため、ビタミンK依存性凝固因子と呼ばれる。これらの因子は分子量、等電点などの物性値がほぼ等しいため分離することが困難である。そのため、第II, VII, IX, X因子の混合物(第IX因子複合体(PPSB))が血友病B患者に対して用いている。しかし、このPPSBは併発症として血栓症やDIC(汎発性血液凝固症候群)を引き起こすことがある。血友病Bの治療に必要な第IX因子以外に、体内での半減期が比較的長いプロトロンビン(第II因子)や第X因子を加えてしまうために起こるチモージェン(酵素前駆体)・オーバーロードが原因であると考えられている。これを防ぐためには、PPSBからプロトロンビン、第X因子を取り除いた製剤を精製する必要がある^{2)~4)}。

表1 主な凝固因子の性質

因子	血しょう中含量 [mg/dl]	分子量 [kd]	等電点	糖含量 [%]
I	200~400	340	5.5	1.5~2
II	15~20	72	4.2	11
III		50		
IV				
V	1~2.5	300	4.65	11.9
VII	0.004	54	4.95	9~13
VIII	0.02~0.1	330	5.8	5.8
IX	0.34	55.4	5.5	26
X	0.75	55	5.3	10
XI	0.5	160	8.5	11.1
XII	2.5	78	6.5	13.5
XIII	1~2	330		7.8

*東京大学生産技術研究所 第4部

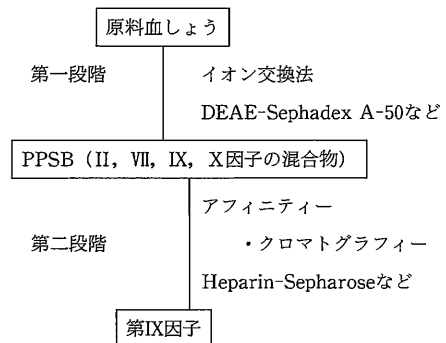


図1 第IX因子の一般的な分離法

研 究 速 報

・本研究の目的

血しょうタンパク質、特に血液凝固因子は血しょう中での濃度が非常に低いため、その分離精製が困難である場合が多い。また、その分離、精製も経験的な手法に頼っているのが現状である。そのため、回収率、純度などは低い段階に留まっている。

本研究は、血液凝固第IX因子を取り上げ、従来、経験的な手法に頼ってきた分離法を、工学的に検討し、高回収率、高純度の第IX因子を得るための手法を確立することを目的としている。現在は、分離の一段目としてイオン交換体DEAE-Sephadex A-50によるイオン交換クロマトグラフィーに関して、検討を行っている。

2. 実 験

血しょう中には第IX因子以外にも多種類のタンパク質が存在している。また、純粋な血液凝固因子は入手することが困難である。したがって、本実験では吸着平衡などの測定は実際の分離条件にそくしてすべて混合系で行っている。

原料には全血からクリオプレシペートを取り除いた乏クリオ血しょうを用いた。

凝固活性の測定は凝固一段法により行った。第IX因子についてはAPTT (活性化部分トロンボプラスチン時間)、またII, VII, X因子についてはPT (プロトロンビン時間) を測定して各凝固因子の活性を求めた。

・血しょう中での第II, VII, IX, X因子の吸着速度、吸着平衡

0.07[mol/l]クエン酸3ナトリウム、pH6.0で平衡化したDEAE-Sephadex A-50を、4°Cで溶解し固形物をろ過して取り除いた血しょう中に投入し、4°Cで、十分かくはんしながら吸着を行った。適当時間ごとにサンプリングし、3000rpm、4°C、5minで遠心分離し、その上清の凝固活性を測定し、経時変化を求めた。平衡になった時点のデータから吸着平衡を求めた。

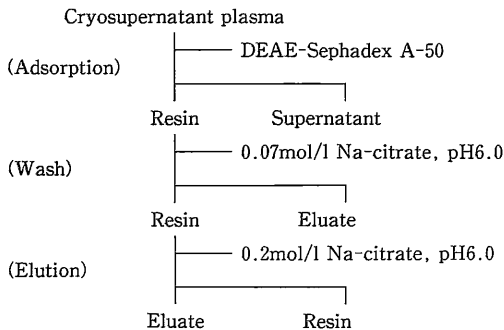


図2 PPSB精製スキーム

吸着量は次式から求めた。

$$Nf = \frac{(Cf_0 - Cf) \cdot Vp}{W} \quad (1)$$

・クエン酸3ナトリウム溶液中での第IX因子の脱着平衡
液相中の活性を変化させて吸着を行うことは困難であるので、吸着量を変化させた吸着剤から脱着を行うことで平衡を求めた。吸着量は、吸着時に血しょう量と吸着剤量の比を変えて変化させた。血しょう中で第IX因子の吸着を行ったDEAE-Sephadex A-50を用いて、0.10~0.30[mol/l]のクエン酸3ナトリウム、pH6.0でバッチ脱着を行い、各濃度のクエン酸3ナトリウム溶液中での平衡を求めた。

・カラム脱着 (段階溶出)

吸着平衡測定の場合と同様にしてバッチ法で吸着を行った後、DEAE-Sephadex A-50をカラムに充填した。まず、0.07[mol/l] Na₃-citrate, pH6.0をUVの吸光度がほぼ0になるまで通液する。この操作でゲル中に残存している共存タンパクの多くが取り除かれる。次にNa₃-citrate, pH6.0の濃度を0.20[mol/l]に上げ、第II, IX, X因子などの脱着を行った。

カラムは、内径0.75[cm]、長さ5.0[cm]のポリスチレン製のものを用いた。

・カラム脱着 (直線濃度勾配溶出)

II, IX, X因子の分離度を上げるため直線濃度勾配溶出を試みた。操作は段階溶出の場合とほぼ同じで、脱着液のクエン酸3ナトリウム、pH6.0溶液に直線濃度勾配をかけて脱着を行った。

・脱着曲線のシミュレーション

第IX因子に関して、簡単なモデルを用いて溶出曲線の計算を行った。モデルの概念図を図4に示す。クエン酸3ナトリウムはバルクから細孔内に拡散する。細孔内のクエン酸3ナトリウム濃度の上昇により、第IX因子の吸着平衡が変化し、DEAE-Sephadex A-50から脱着する。脱着した第IX因子は細孔内からバルクへ拡散する。なお、このモデルでは、クエン酸3ナトリウムの吸着は無視している。

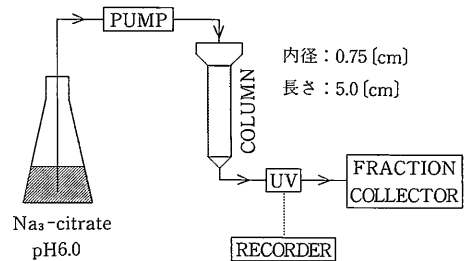


図3 脱着装置

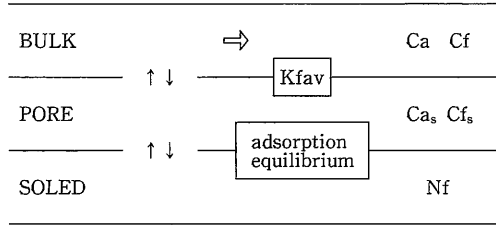


図4 モデルの概念図

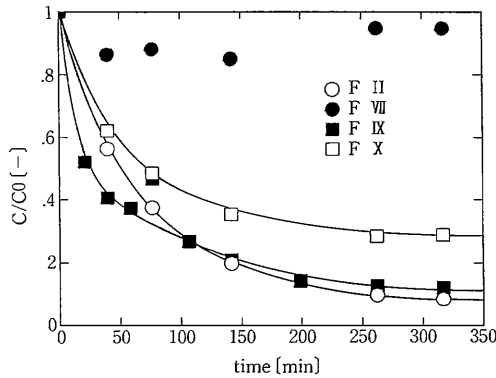


図5 吸着経時変化 (血しょう中)

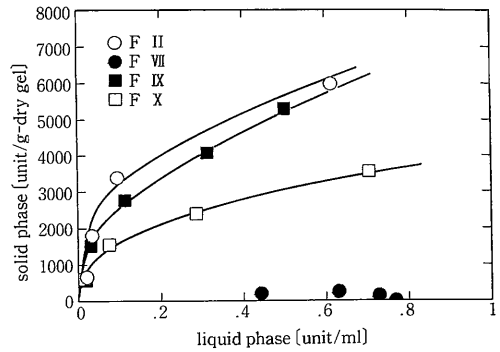


図6 吸着平衡 (血しょう中)

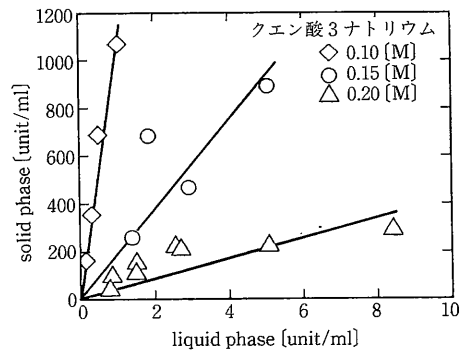


図7 吸着平衡 (脱着液中)

基礎式

①クエン酸ナトリウムの物質収支

(軸方向)

$$\epsilon \frac{\partial C_a}{\partial t} = -u \frac{\partial C_a}{\partial z} - (Kfav)_a (C_a - C_{a_s}) \quad (2)$$

(粒子内)

$$(1 - \epsilon) \epsilon_p \frac{\partial C_{a_s}}{\partial t} = (Kfav)_a (C_a - C_{a_s}) \quad (3)$$

②第IX因子の物質収支

(軸方向)

$$\epsilon \frac{\partial C_f}{\partial t} = -u \frac{\partial C_f}{\partial z} - (Kfav)_f (C_f - C_{f_s}) \quad (4)$$

(粒子内)

$$(1 - \epsilon) \epsilon_p \frac{\partial C_{f_s}}{\partial t} + (1 - \epsilon) \rho_s \frac{\partial N_f}{\partial t} = (Kfav)_f (C_f - C_{f_s}) \quad (5)$$

③吸着平衡

$$N_f = k \cdot C_{f_s} \quad (6)$$

$$k - k_{\infty} = A \cdot C_{a_s}^2 \quad (7)$$

④初期条件・境界条件

$$t = 0, 0 \leq z \leq Z; C_a = C_{a_0}, C_{a_{init}}, N_f = N_{f_{init}} \quad (8)$$

$$t > 0, z = 0; C_a = C_{a_0}, C_f = 0 \quad (9)$$

3. 結 果

・血しょう中での吸着速度と吸着平衡

血しょう中での第II, VII, IX, X因子の吸着速度を図5に示す。第IX因子に関して粒子内拡散係数を理論曲線とのカーブフィッティングにより求めたところ、 $2.5 \times 10^{-8} [\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}]$ であった。この値は第IX因子の分子量から推算した分子拡散係数 $3.3 \times 10^{-7} [\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}]$ より一桁小さい値である。血しょう中での第II, VII, IX, X因子の吸着平衡を図6に示す。第II, IX, X因子の吸着量はかなり高いが、第VII因子はほとんど吸着しない。したがって、血しょう中で吸着を行う時点で第VII因子は他の因子から分離することができる。

・第IX因子の脱着平衡

クエン酸3ナトリウム溶液中での第IX因子の脱着平衡を図7に示す。クエン酸3ナトリウムの濃度をあげることにより、第IX因子の脱着が可能であることがわかる。

・カラム脱着 (段階溶出)

段階溶出の一例を図8に示す。ここで横軸のB.V.はクエン酸3ナトリウム濃度を $0.20 [\text{mol/l}]$ に切り替えた時点をもととしている。この結果によれば、脱着にカラムを用いることにより、バッチ法で脱着を行った場合より

研究速報

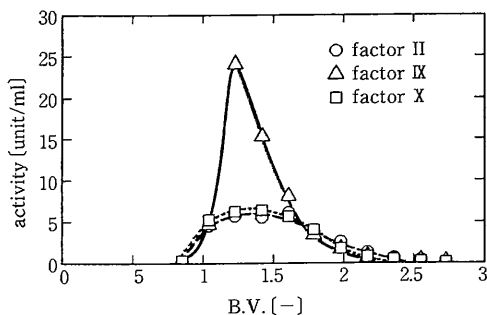


図8 段階溶出曲線

も高濃度の第IX因子を得ることが可能であることがわかる。また、ピークの第IX因子比活性は原料血しょうの約150倍、脱着率は約80%であった。第II, X因子も第IX因子とほとんど同じ位置で脱着をするため、段階溶出ではII, IX, X因子の分離は困難である。これらの因子を分離するためには、分子構造上の差異を利用するアフィニティークロマトグラフィーを行う必要があると考えられる。

・カラム脱着(直線濃度勾配溶出)

直線濃度勾配溶出の一例を図9に示す。II, IX, X因子のピーク位置のずれは段階用出の場合よりもわずかに大きい分離するには至っていない。

・脱着曲線のシミュレーション

eq.(2)-(9)を使って、第IX因子に関して、直線濃度勾配の場合の脱着曲線のシミュレーションを行った。吸着平衡のデータは実験から得られたものを用いた。ここでeq.(2)-(5)のKfavは実測値を得ていないので、まず、段階溶出曲線の実験データとフィッティングを行うことによりKfavを決定した。吸着平衡のデータには実測値を用いた。計算結果を図10に示す。粒子内の濃度分布などを考慮しない簡単なモデルで脱着曲線をよくシミュレートできることがわかる。

4. ま と め

イオン交換体DEAE-Sephadex A-50を使用したイオン交換クロマトグラフィーにより、血液凝固第IX因子の分離を行った。バッチ法の場合よりも純度、回収率ともに良好な結果が得られたが、II, IX, X因子をそれぞれに分離することはできなかった。また、実験から求めた吸着平衡などのデータを使用して、簡単なモデルでも脱着曲線を計算することができた。

謝 辞

本実験を行うに当たり、原料、試薬の提供や、貴重な

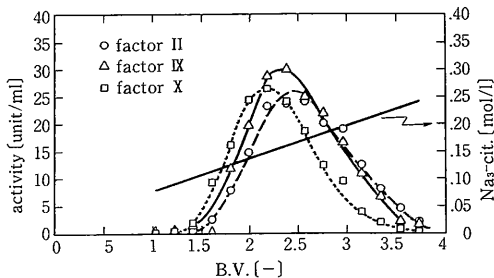


図9 直線濃度勾配溶出曲線

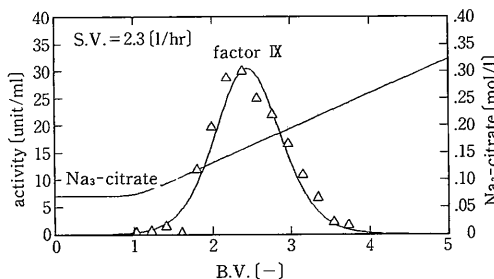


図10 シミュレーション結果

助言など、全面的に協力して頂いた日赤血漿分画センターの池田博之、沢田英子、伴野丞計、各氏に深謝します。

(1988年12月16日受理)

nomenclature

- Nf : 吸着量 [unit/g]
- Cf₀ : 初期活性 [unit/ml]
- Cf : 活性 [unit/ml]
- Vp : 血しょうの体積 [ml]
- W : DEAE-Sephadex A-50の重量 [g]
- Kfav: 総括容量係数 [hr⁻¹]
- ε : 空隙率 [-]
- u : 線速度 [cm·hr⁻¹]
- μ : 粘度 [cP]
- ρ : 密度 [g·cm³]
- Ca : クエン酸3ナトリウム濃度 [mol·l⁻¹]
- t : 脱着液に切り替えてからの時間 [hr]
- z : カラム長さ [cm]
- k : 平衡定数 [ml·g⁻¹]
- s : solid phase

参 考 文 献

- 1) 池田博之ら: 化学工学, 50, 33 (1986)
- 2) Heystek, J et al.: Vox Sang., 25, 113 (1973)
- 3) Menanche, D. et al.: Blood, 64, 1220 (1984)
- 4) 続生化学実験講座8 血液 下