

## 異常フィブリノゲン Matsumoto I・IIの 構造異常と機能異常の解析

奥村伸生<sup>1)\*</sup> 寺澤文子<sup>1)</sup> 降旗謙一<sup>2)</sup>

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

2) 信州大学医学部臨床検査医学教室

### Structural and Functional Analysis of Two Dysfibrinogens, Matsumoto I and Matsumoto II

Nobuo OKUMURA<sup>1)</sup>, Fumiko TERASAWA<sup>1)</sup> and Kenichi FURIHATA<sup>2)</sup>

1) Department of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu University

2) Department of Laboratory Medicine, Shinshu University School of Medicine

We recently identified two novel dysfibrinogenemias by direct sequence analysis of each fibrinogen  $\gamma$ -chain gene amplified by polymerase chain reaction, and designated them Matsumoto I (MI) and II (MII). Both MI and MII were heterozygous for a missense mutation and resulted in the amino acid substitution of  $\gamma$ 364Asp by His and that of  $\gamma$ 308Asn by Lys, respectively. We therefore compared the fibrinogen function of MI and MII. Both MI and MII showed impaired fibrin monomer polymerization (FMP), which reflected the dysfunction of the fibrinogen  $\gamma$ -chain. However, the release of fibrinopeptide A and B by thrombin was similar to that of normal control. The dysfunction in FMP of MI was much more prominent than that of MII. Furthermore, in the presence of 5.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , MII showed nearly normal function in the FMP test. In MI and MII, both the abnormality itself and its extent in all tests including thrombin time, prothrombin time, fibrin aggregation, and functionally determined fibrinogen level were attributed to the impaired FMP and its  $\text{Ca}^{2+}$  dependency. Interestingly, two of three affected members of the MII family had an apparent history of ecchymoses and/or hemorrhage, though the functional defect in MII was milder than in MI. *Shinshu Med J* 44: 317-327, 1996

(Received for publication April 16, 1996)

---

**Key words:** dysfibrinogen, coagulation screening tests, thrombin time, fibrin aggregation test, fibrin monomer polymerization

異常フィブリノゲン, 凝固スクリーニング検査, トロンビン時間, フィブリン凝集試験, フィブリンモノマー重合反応

---

#### I はじめに

フィブリノゲン(fibrinogen: Fbg)は、複雑な血液

\* 別刷請求先: 奥村 伸生

〒390 松本市旭3-1-1

信州大学医療技術短大部衛生技術学科

凝固カスケードの最終段階で機能する糖タンパクであり、トロンビンの作用によりフィブリンに変化し、さらにXIII因子により安定化フィブリンとなり血液凝固を完成させる。FbgはA $\alpha$ , B $\beta$ ,  $\gamma$ という3種のポリペプチド鎖が互いにジスルフィド(S-S)結合したものが、さらにアミノ末端近傍でS-S結合した2量体と

して存在し、 $(A\alpha-B\beta-\gamma)_2$ と表される。肝実質細胞で合成・分泌されるFbgの血漿中の濃度は1.5-3.0g/lであり、分子量34万の巨大なタンパクである。Fbgの一次構造は、1979年Doolittleら<sup>1)</sup>により全アミノ酸配列が決定された。この結果、 $A\alpha$ 鎖が610個、 $B\beta$ 鎖が461個、 $\gamma$ 鎖が411個のアミノ酸により構成されており、それぞれの分子量は6.7万、5.6万、4.75万であることが明らかになった。

Fbgはトロンビンの作用により、 $A\alpha$ 鎖から16個のアミノ酸よりなるフィブリノペプチドA (fibrinopeptide A: FPA)が放出され中間体となり、ついで $B\beta$ 鎖の14個のアミノ酸よりなるフィブリノペプチドB (fibrinopeptide B: FPB)が放出されて、フィブリンモノマーと呼ばれる $(\alpha-\beta-\gamma)_2$ の形となる。これらが主として $\gamma$ 鎖で互いに規則的に重合して不安定フィブリンとなり、流動性を失ってゲル化する。これはさらに活性型XIII因子による分子間架橋により安定化フィブリンを形成する。Fbgはこれらの機能に加えて血小板膜糖タンパクII b/III aやプラスミノゲン、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター、フィブロンectinなど種々の物質と結合し、止血や創傷治癒に関与している。

Fbg異常症は1958年ImperatoとDettori<sup>2)</sup>によって、Fbgの低値とフィブリン塊の形成不全が見られた症例として初めて報告された。1992年の時点で全世界で300家系近いFbg異常症が報告されている<sup>3)</sup>。我が国においても1995年末までに23家系が報告されている。近年、PCR(polymerase chain reaction)をはじめとする遺伝子検査法が急速に普及したことにより、DNAの塩基配列の解析からFbgの異常部位の決定を比較的容易に行うことができるようになった。その結果に、従来からのアミノ酸配列の解析によって異常部位が決定されたものを合わせると、全世界で80家系以上<sup>3)</sup>、我が国では19家系でFbgの異常が同定されている。

最近我々は、Fbg $\gamma$ 鎖のアミノ酸置換によりフィブリンモノマー重合反応(fibrin monomer polymerization: FMP)が異常である、異常Fbg Matsumoto I・IIの2家系を報告した<sup>4)</sup>。本論文では、異なる部位のアミノ酸置換による2例の異常Fbgにおける、凝固スクリーニング検査結果、機能異常の程度、臨床症状について比較検討したので報告する。

## II 対象と方法

### A 症例

Fbg Matsumoto I (以下、M I)の発端者は、心疾患を伴ったダウン症候群の1歳男児であった。心臓手術の術前凝固スクリーニング検査において、Fbgの著しい低値を認めた。出血症状・血栓などの臨床症状は認められなかった。発端者と同様な異常が母親および母親の弟に認められたが、父親には異常は認められなかった。今回の機能異常の検討には、母親の新鮮クエン酸血漿を用いた。

M I発端者のDNA塩基配列の解析より、エクソンIXに位置する第9380塩基が、グアニンとシトシンのヘテロであることが認められた。この結果 $\gamma$ 鎖364残基がGATでコードされるアスパラギン酸である正常型Fbgの他に、CATでコードされるヒスチジンである変異型Fbgが存在することが明らかになった<sup>4)</sup>。同様なDNA塩基配列の異常が母親および母親の弟において認められたが、父親は正常であった。

Fbg Matsumoto II (以下、M II)の発端者は、パセドウ病の49歳女性で、放射線療法前の凝固スクリーニング検査において、Fbgの低値を認めた。発端者と同様な異常が父親と次男において認められたが、母親、夫、長男、三男においては認められなかった。発端者は分娩後の出血がひどく、第三子の分娩後には輸血を受けていた。また、重い荷物を持ったり、強く拍手をした時などに手のひらに内出血するなどの明らかな出血傾向を有していた。発端者の父親においても同様の出血傾向が認められた。なお、父親と母親は従兄弟の間柄であった。

M II発端者のDNA塩基配列の解析より、エクソンVIIIに位置する第7576塩基が、チミンとグアニンのヘテロであることが認められた。この結果 $\gamma$ 鎖308残基がAATでコードされるアスパラギンである正常型Fbgの他に、AAGでコードされるリジンである変異型Fbgが存在することが明らかになった<sup>5)</sup>。同様なDNA塩基配列の異常が次男において認められたが、夫、長男、三男は正常であった。なお父親と母親の遺伝子検査は実施できなかった。

### B 凝固スクリーニング検査

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびトロンビン時間法によるFbg濃度の3項目を凝固スクリーニング検査として実施した。それぞれ東亜医用電子(株)のシスメックスPT II、シスメックスAPTT II、シスメックスFbg IIとフジレビオの0.025MのCaCl<sub>2</sub>を試薬として用いて、東亜医用電子(株)のCA5000で測定した。

**C フィブリノゲン抗原量およびトロンビン時間測定**

Fbg 抗原量は、すでに報告した方法<sup>9)</sup>でエルビア FDP キットを用いてダイアットロン LPIA 100 で測定した。なお、標準血漿はトロンビン時間法による Fbg 濃度測定用のものを使用した (以下、免疫法)。

トロンビン時間(TT)は Martinez ら<sup>7)</sup>の方法を変更して実施した。すなわち、血漿 0.1ml にオーレンベロナール緩衝液(OVB) 0.1ml と 0.02M CaCl<sub>2</sub> 0.1ml を加え 37°C で予備加温し、これに OVB で 10U/ml としたウシトロンビン 0.1ml を加え、フィブリン塊析出までの時間を測定した。Ca イオンを添加しない場合には CaCl<sub>2</sub> の代わりに OVB を 0.1ml 添加した。

**D SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) とウェスタンブロッティングによる A $\alpha$ , B $\beta$ ,  $\gamma$  鎖の分子量の決定**

血漿を生理食塩水で 100 倍に希釈し、5% SDS と 10.5% 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液と等量に混和し、S-S 結合を切断した。これを試料として 12% polyacrylamide ゲルに添加し電気泳動した。これをニトロセルロース膜に電氣的に転写して、抗ヒト Fbg ウサギ抗体 (医学生物学研究所) と horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (医学生物学研究所) を反応させた。3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と過酸化水素により発色させ、A $\alpha$ , B $\beta$ ,  $\gamma$  鎖の分子量を正常人対照と比較した。

**E フィブリノゲンの精製**

Yoshida ら<sup>8)</sup>の方法に従って、M I においては発端者の母親の血漿、M II においては発端者の血漿から、25% 硫酸塩析により Fbg を精製した。Fbg は 0.3M NaCl に溶解し、同じ溶液に対して透析し硫酸を除去した。

**F フィブリノペプチド放出能**

トロンビンによる FPA および FPB の放出能は Kehl ら<sup>9)</sup>の方法に準じて実施した。まず、精製 Fbg を 0.15M の酢酸アンモニウム溶液 (pH 8.5) に透析し、1.0mg/ml の濃度になるように同じ溶液で希釈した。この Fbg 液に最終濃度 0.2U/ml とするウシトロンビンを添加して、37°C の恒温槽中で反応させた。反応直後から 80 分後までの各反応時間後に、煮沸により反応を停止し、遠心後の上清に含まれるペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。ペプチドの分離に用いたカラムは逆相クロマトグラフィー用の Nacalai tesque の Cosmosil 5C18-P で、A 液: 0.025M 酢酸アンモニウム (pH 6.0) と B 液: アセ

トニトリル・0.05M 酢酸アンモニウム (pH 6.0) 等量混液により、30 分間で B 液が 12-28% になるようにした溶離液で溶出した。流速は 1.0ml/min で、溶出されるペプチドを 210nm の吸光度で検出し、Shimadzu クロマトパック C-R3A を用いてピーク面積により定量を行った。

**G フィブリン凝集試験**

精製した Fbg について、Steinmann ら<sup>10)</sup>の方法に従って、トロンビンによるフィブリン凝集 (fibrin aggregation: FA) 試験を実施した。すなわち、0.1M NaCl を含む 0.05M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH 7.4) で 0.30mg/ml になるように精製 Fbg を希釈し、この 0.16ml に最終濃度が 0.05 から 5.0mM になるように 0.02ml の CaCl<sub>2</sub> 溶液を加え 37°C で予備加温した。この後、最終濃度が 0.5U/ml になるように 0.02ml のウシトロンビンを添加して、37°C の恒温下での濁度の増加を 350nm でモニターした。

**H フィブリンモノマー重合反応**

1mg/ml の精製 Fbg に最終濃度 0.2U/ml のウシトロンビンを添加し、37°C で 3 時間反応後、さらに 4°C に一晚放置し、フィブリンを析出させた。このフィブリンをリン酸緩衝食塩水でよく洗浄し、水分を完全に除いた後、適当量の 0.02M 酢酸を加えて溶解し、フィブリンモノマー液とした。FMP 試験は、Gralnick ら<sup>11)</sup>の方法を変更して実施した。すなわち、15 $\mu$ l (0.11mg) のフィブリンモノマー液に 0.05M NaCl 添加 0.067M イミダゾール緩衝液 (pH 6.8) 285 $\mu$ l を加え、室温 (22-23°C) 下での濁度の増加を 350nm でモニターした。

**III 結 果****A 凝固検査**

M I の凝固検査の結果を表 1 に、同じく M II の結果を表 2 に示した。凝固スクリーニング検査では、M I の発端者および母親、母親の弟において PT が正常範囲よりも延長していた。一方 M II の家族においては、発端者、父親および次男において PT が延長していたが、その程度は M I の家族の結果と比較すると軽度であった。

M I の家族における APTT はいずれも正常範囲内であった。また M II の家族では、夫、長男、三男において APTT のわずかな延長を認めたが、その他の家族は正常範囲内であった。

高濃度のトロンビンを加えることにより Fbg が F

表1 Fibrinogen Matsumoto Iとその家族における凝固検査結果

検査項目	発端者	父	母	母方叔父	正常範囲
PT(秒)	13.0	10.1	14.1	13.8	10.0 -12.0
APTT(秒)	29.4	26.6	33.2	33.4	24.0 -37.0
フィブリノゲン					
トロンビン時間法(g/l)	0.16	3.26	0.21	0.36	1.50- 3.00
免疫法(g/l)	3.40	4.20	2.24	2.05	1.50- 3.00
TT/IM <sup>1)</sup> ×100(%)	4.7	77.6	9.4	17.6	
トロンビン時間					
Ca イオン非添加(秒)	45.2	15.2	42.8	54.2	14.0 -20.0
Ca イオン添加(秒)	19.9	9.8	19.6	24.7	9.0 -12.0
Ca(+)/Ca(-) <sup>2)</sup> ×100(%)	44.0	64.5	37.4	45.8	

PT：プロトロンビン時間

APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間

1) トロンビン時間法/免疫法

2) Ca イオン添加/ Ca イオン非添加

表2 Fibrinogen Matsumoto IIとその家族における凝固検査結果

検査項目	発端者	父	母	夫	長男	次男	三男	正常範囲
PT(秒)	12.2	13.1	11.1	12.0	11.8	13.3	11.6	10.0 -12.0
APTT(秒)	31.3	32.8	34.4	38.6	40.4	34.6	38.1	24.0 -37.0
フィブリノゲン								
トロンビン時間法(g/l)	0.67	0.57	2.45	3.10	1.91	0.52	1.98	1.50- 3.00
免疫法(g/l)	2.46	1.90	2.96	3.34	2.00	1.68	2.26	1.50- 3.00
TT/IM <sup>1)</sup> ×100(%)	27.2	30.0	82.8	92.8	95.5	31.0	87.6	
トロンビン時間								
Ca イオン非添加(秒)	60.4	55.4	14.8	16.1	15.7	71.2	16.2	14.0 -20.0
Ca イオン添加(秒)	17.0	17.6	10.5	11.2	11.1	17.7	11.4	9.0 -12.0
Ca(+)/Ca(-) <sup>2)</sup> ×100(%)	28.1	31.8	70.9	69.6	70.7	24.9	70.4	

PT：プロトロンビン時間

APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間

1) トロンビン時間法/免疫法

2) Ca イオン添加/ Ca イオン非添加

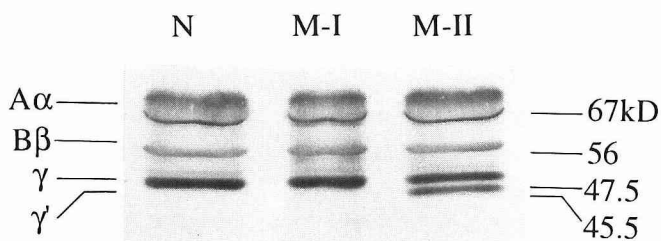


図1 Fibrinogen Matsumoto I と Matsumoto II の SDS-PAGE と ウェスタンブロッティングによる分子量解析

N : normal control, M I : Matsumoto I, M II : Matsumoto II

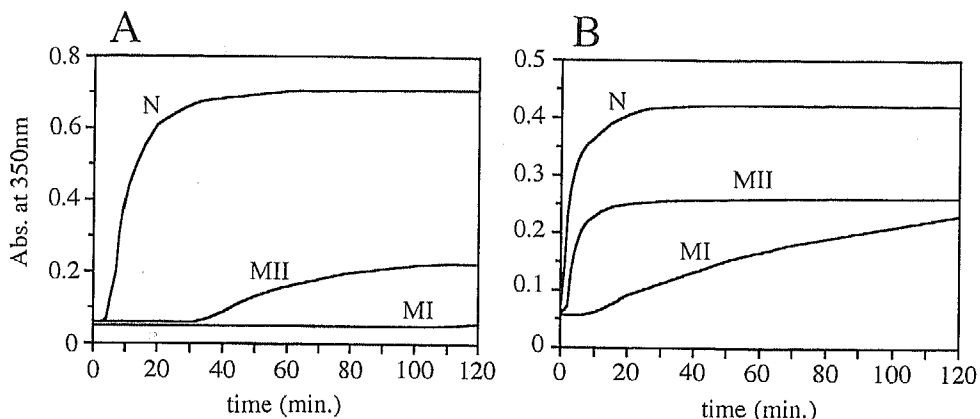


図2 Fibrinogen Matsumoto IとMatsumoto IIのトロンビンによるフィブリン凝集試験  
 A: Ca<sup>2+</sup> 0mM, B: Ca<sup>2+</sup> 5.0mM  
 N: normal control, M I: Matsumoto I, M II: Matsumoto II

フィブリンになる反応を利用した機能的Fbg濃度測定法であるトロンビン時間法では、PTに異常を認めたM I, M IIの6症例において、いずれも0.70g/l以下と異常低値を示した。一方、免疫法によるFbg抗原量はいずれも1.50g/l以上であり正常範囲内であった。トロンビン時間法と免疫法によるFbgの濃度比を%で表すと、M I家系における3症例においては4.7-17.6%であり、M II家系の3症例における27.2-31.0%に比較すると低値であった。

TTは、血漿に比較的低濃度のトロンビンを加えることによりFbgがフィブリンになるまでの時間を測定する検査法である。M I, M II家系の6症例においては、5.0mMのCaイオンを添加した場合と添加しない場合のいずれにおいても、TTの著しい延長が認められた。しかし、Caイオンを添加したTTにおいては、M I, M IIの6症例ともに正常範囲にはならないものの、明らかな時間の短縮を認めた。M I家系の3症例ではCaイオン添加時の値はCaイオン非添加時の44.0-45.8%であった。一方M II家系の3症例では、24.9-28.3%であり、M I家系に比較してTTに対するCaイオン添加効果が著明であった。

**B SDS-PAGEとウェスタンブロットティングによるAα, Bβ, γ鎖の分子量の決定**

M I FbgのSDS-PAGEとウェスタンブロットティングによる解析では、Aα, Bβ, γ鎖の3本のバンドとともに、分子量、濃度ともに正常人対照との間に差異は認められなかった(図1)。一方M II Fbgにおい

ては、正常人対照と同じ分子量の3本のバンドの他に、正常γ鎖より分子量が約2,000低い4本目のバンド(異常γ鎖)の存在を認めた(図1)。また、M IIの正常分子量γ鎖濃度は正常人対照よりも明らかに減少していたが、異常γ鎖濃度よりは若干高濃度であった。

**C フィブリノペプチド放出能**

HPLCを用いてトロンビンによるフィブリノペプチドの放出能を検討した。この結果、M I, M II Fbgともに、FPA, FPBの放出能においては正常人対照と差異を認めなかった(data not shown)。

**D フィブリン凝集試験**

FA試験の結果を図2に示した。最終濃度1mMのEDTAを添加してCaを完全に除去した系におけるFA試験では、図2Aに示すようにM I, M IIともに正常人対照に比較して著しい低下を認めた。とりわけM Iでは約110分後に凝集の開始が認められた。一方、5.0mMのCaイオン添加条件におけるFA試験では、M IIにおいて正常人対照と比較して若干のlag timeを認め、120分後の吸光度は正常人対照の約60%程度であった。一方M Iにおいては、lag timeにより著しい延長を認め、120分後の吸光度は正常人対照の約45%程度であった(図2B)。

**E フィブリンモノマー重合反応**

FMP試験の結果を図3に示した。Caイオン非添加条件におけるM Iは、正常人対照に比較して、lag timeが著しく延長し、重合速度も非常に低下していた。さらに、30分後の吸光度は対照の約40%であった。

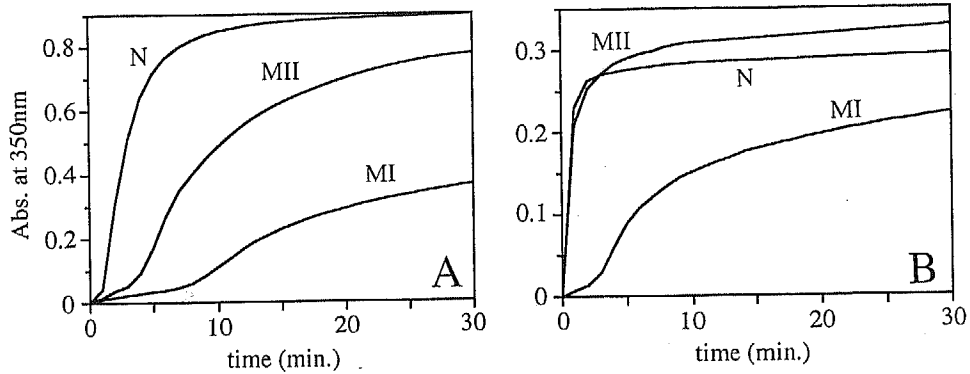


図3 Fibrinogen Matsumoto I と Matsumoto II のフィブリンモノマー重合反応  
 A: Ca<sup>2+</sup> 0mM, B: Ca<sup>2+</sup> 5.0mM  
 N: normal control, M I : Matsumoto I, M II : Matsumoto II

一方 M II においても FMP が異常であったが、lag time, 重合速度, 30分後の吸光度のいずれも M I に比べると軽度の異常であった (図3 A)。

5.0mM の Ca イオン添加条件における M I の FMP では、重合速度, 30分後の吸光度ともに Ca イオン非添加条件よりも改善した。しかし、M I の FMP は正常人対照と比較すると、なお著しく低下しており、正常人対照には認められない lag time も存在した。一方、M II においては対照と比較して重合速度が若干低かったが、30分後の吸光度は対照とほとんど同じであり、Ca イオン添加によりほぼ正常と同じ FMP を示した (図3 B)。

#### IV 考 察

PCR をはじめとする遺伝子解析法の急速な普及にともない、遺伝子の一塩基置換に起因するアミノ酸変異による異常タンパクの存在と、これを原因とする遺伝性の疾患が数多く証明・報告されている。我々は約半年の間に、松本に在住する2例の異常 Fbg を疑う症例を経験し、Fbg の機能検査から  $\gamma$  鎖の異常を推定し、その遺伝子解析により Fbg  $\gamma$  鎖の異常部位を決定し、慣例に従いそれぞれ Fbrinogen Matsumoto I :  $\gamma$ 364 Asp $\rightarrow$ His<sup>4)</sup>, Fbrinogen Matsumoto II  $\gamma$ 308 Asn $\rightarrow$ Lys<sup>5)</sup> と命名した。 $\gamma$ 364Asp はフィブリンモノマーの初期の重合反応に最も重要であるとされている  $\gamma$ 363 Tyr<sup>12)</sup> に隣接していた。この部位の変異による異常症の報告は最初である。一方、 $\gamma$ 308Asn

は Fbg に2カ所存在する高親和性 Ca 結合部位のひとつである  $\gamma$ 311-336<sup>13)</sup> に非常に近い部位である。この部位の異常症は M II と同じ置換である Kyoto I<sup>14)</sup>, Bicetre II<sup>15)</sup>, Asn $\rightarrow$ Ile 置換である Baltimore III<sup>16)</sup> の3例が既に報告されている。

M II を含め  $\gamma$ 308 に置換を有するすべての異常 Fbg<sup>14)-16)</sup> において、SDS-PAGE によって分子量を決定すると、いずれも正常の  $\gamma$  鎖よりも1,500から2,000分子量が低下していることが報告されている。これは正常アミノ酸が、より塩基性あるいは疎水性の強いアミノ酸に置換した場合に SDS-PAGE における電氣的易動度が速くなる現象であり、Fbg においては Nagoya ( $\gamma$ 329Gln $\rightarrow$ Arg)<sup>17)</sup> においても同様の報告がなされている。また、 $\gamma$ 275Arg $\rightarrow$ Cys である Osaka II<sup>18)</sup>, Tochigi<sup>19)</sup> では、正常の塩基性アミノ酸が中性アミノ酸に置換したことにより SDS-PAGE における電氣的易動度が遅くなり、分子量増加の結果を示した。このような現象は、SDS とアミノ酸側鎖の結合力の相違によって生ずることが知られており<sup>20)</sup>, Fbg 以外でも  $\alpha$ -crystallin A<sup>21)</sup> と *Salmonella typhimurium* の histidine-binding protein J<sup>22)</sup> においても報告されている。しかし、図1に示したように酸性アミノ酸の Asp が塩基性アミノ酸の His に置換した M I においては、M II と同様な現象は認められなかった。したがって、SDS-PAGE による変異タンパク質の分子量決定において、実際の分子量と大きく異なる電氣的易動度を呈するのは、特定の組合せのアミ

異常フィブリノゲン Matsumoto I・IIの解析

表3 フィブリノゲン $\gamma$ 鎖異常症の報告例

一次構造の 異 常	遺伝子 変 異	名 前 <sup>1)</sup>	対立 形質 <sup>2)</sup>	臨床 症状 <sup>3)</sup>	文献番号
275Arg-->His		Bergamo III	He	T(A)	23
		Essen	He	A	23
		Haifa	He	T	24
		* Osaka III	He	A	25
		Perugia	He	A	23
		* Saga	He	A	26
275Arg-->Cys		Baltimore IV	He	A	27
		* Morioka	He	A	28
		CGC-->TGC	He	A	14,18
		* Osaka II	He	A	19
		* Tochihi	He	A	29
275Arg-->Ser	CGC-->AGC	* Kamogawa	He	A	30
		Baltimore I	He	B+T	31
292Gly-->Val	GGC-->GTC	Bicetre II	He	T(A)	15
308Asn-->Lys	AAT-->AAG	* Kyoto I	He	A	14,32,33
		* Matsumoto II	He	B(A)	5
308Asn-->Ile		Baltimore III	He	B	16,34
310Met-->Thr <sup>4)</sup>	ATG-->ACG	* Asahi	He	B	14,35
		Frankfurt VII	He	B	36
318Asp-->Gly	GAC-->GGC	Giessen IV			
319Asn,320Asp deleted	AAT GAT deleted	Vlissingen	He	T(A)	37
		* Nagoya	He	A	17
329Gln-->Arg		Milano I	He	A	38
330Asp-->Val		* Kyoto III	He	A	14,39
337Asn-->Tyr	GAT-->TAT	Bern I	He	A	40
337Asn-->Lys	AAC-->AAA	Frankfurt I	He	B(A)	41
357Ala-->Lys	GCA-->ACA	Milano VII	He	A	10
358Ser-->Cys <sup>5)</sup>	TCT-->TGT				
350Gln-insert	15aa-351Gly 6588A-->G within intron 8 and insertion of 45 bp between exon 8 and 9	Paris I	He	A	42
		* Matsumoto I	He	A	4
364Asp-->His	GAT-->CAT	* Osaka V	He	A	43
375Arg-->Gly	CGG-->GGG				

- 1) \* : 日本人例
- 2) He : ヘテロ接合体
- 3) A : 無症候例, B : 出血傾向, T : 血栓傾向  
( ) 内は発端者と異なる症状を有する家族例
- 4) 308Asn に糖鎖が結合
- 5) 358Cys にアルブミンが結合

ノ酸置換の場合に限られると考えられる。  
FbgM I, M IIはともにFbg $\gamma$ 鎖のC末端側にアミノ酸置換を有する症例であったので、凝固スクリーニング検査、Fbg機能検査における相違を検討した。この結果、M IIに比較してM IではFA試験およびFMP試験において著しい低下を認めた。さらに、これらの反応系にCaイオンを添加した場合には、M I

に比較してM IIではより効果的に改善することが観察された。特にM IIにおけるFMP試験は、Caイオンの添加により完全な正常化を認めた。同様の結果がBaltimore III<sup>10)</sup>において報告されている。FMP試験におけるM IとM IIのCaイオン依存性の違いは、M IIの $\gamma$ 308Asnが高親和性Ca結合部位である $\gamma$ 311-336<sup>13)</sup>に非常に近い部位であることと、M Iの $\gamma$ 364

Asp は低親和性 Ca 結合部位であることによると考えられる。γ364などの低親和性 Ca 結合部位の機能は生理的 Ca イオン濃度では完全に改善することが出来ない。また、FPA、FPB の放出能が正常である M I と M II では、FA 試験の結果は FMP 試験の結果を反映する。今回の検討では使用した緩衝液、pH、NaCl 濃度、反応温度等が異なっているので、両試験の結果を直接比較することは困難であったが、M II に比べて M I の機能がより低下していることは、両試験で一致していた。

また、PT およびトロンビン時間法を応用した機能的 Fbg 濃度測定法の結果も、FA 試験あるいは FMP 試験の結果を反映して、M II に比較して M I において異常の程度が大きかった。一方 Ca イオンを添加しない状態の TT は、M I より M II でより延長していたが、Ca イオンを添加した条件では、FA 試験あるいは FMP 試験で観察されたように、M II において M I より効果的に改善された。

アミノ酸解析あるいは遺伝子解析により異常部位が決定されている異常 Fbg は、われわれの報告 2 例を含めて全世界で 83 例である。このうち Aα 鎖、Bβ 鎖、γ 鎖の異常例はそれぞれ 44 例、9 例、30 例であった。Aα 鎖に異常が存在する症例中 39 例は FPA の放出が欠如するか、遅延する機能異常を有する。また、Bβ 鎖に異常が存在する症例中 5 例は FPB の放出が欠如するか、遅延する機能異常を有する。Aα 鎖と Bβ 鎖に異常が存在するその他の症例と、γ 鎖に異常が存在する全症例においては、FPA および FPB の放出能は正常で、FMP 試験の低下が認められる。しかも、γ 鎖に異常を有する症例の異常部位はアミノ酸 275-375 残基に限定されている (表 3)<sup>23)-43)</sup>。

γ 鎖に異常を有する症例の報告結果を表 3 に示した。30 例のうち無症状の症例が大部分を占めるが、出血傾向を呈した症例が 5 例、血栓症を呈した症例 4 例、両方の症状を有した症例が 1 例認められた。このように明らかに機能異常がある異常 Fbg を有しているながら、多くの症例で出血傾向が認められないことは、全例がヘテロ接合体であることと、ほとんどの症例において生理的 Ca イオン濃度に相当する 0.5-5.0mM の Ca イオン存在下で、TT や FMP がかなり補正されるためと考えられる。

すでに述べたように、M I の Fbg は M II の Fbg に比較して著しい機能低下を示しているにも関わらず、M I 家系の異常 Fbg を有する 3 例においては何ら臨

床症状もなく、むしろ M II の家系において異常 Fbg を有する 3 例中 2 例において明らかな出血傾向を認めた。しかし、同じアミノ酸置換であった Kyoto I<sup>32)33)</sup> においては、何の臨床症状も認められていない。一方、Bicetre II<sup>15)</sup> においては、発端者だけに血栓症を認めた。また、同じ部位の異なった置換であった Baltimore III<sup>16)34)</sup> においては、中程度の出産後の出血を認めたが、その他の症状はなかった。このような同じアミノ酸置換を有する症例の Fbg 機能、特に FMP 機能を比較することは非常に興味あることであるが、それぞれの報告者によって機能試験の実施条件が異なっているために、単純に比較することは困難であった。

この他に出血傾向を呈した γ 鎖異常症例は、310 Met → Thr の Asahi<sup>35)</sup> と Frankfurt VII<sup>36)</sup> の 2 例と、292 Gly → Val の Baltimore I<sup>31)</sup>、357 Ala → Thr<sup>41)</sup> の Frankfurt I の計 4 例が報告されている。このうち前 2 例は 308 Asn に糖鎖が結合している症例である。以上のように出血傾向を示した γ 鎖異常症 6 例のうち、何らかの形で 308 Asn に変異を有する症例が 4 例を占めることになる。このことは Fbg の機能において γ 鎖 308 Asn が非常に重要な役割を担っていることを示唆しているのかもしれない。ただし、出血に対する生体の止血反応は、血液中の各種凝固因子だけでなく、血管内皮細胞や血小板をはじめとする数多くの因子の共同作用によって成立している。したがって異常 Fbg 症においては、Fbg 以外の何らかの因子の機能が低下するかあるいは異常であった場合に、より出血症状を呈し易いと考えられるので、Fbg 以外の因子の異常についても考慮する必要がある。なお、M II の発端者は出血時間、血小板凝集能検査においては、正常範囲内の結果であった。しかし、各種凝固因子の定量を含むその他の検査は実施しなかった。

一方、血栓症を呈した γ 鎖異常症例 5 例は、いずれも発端者ひとりの検討結果であったり、異常 Fbg を有する者のうち発端者だけが血栓症であった症例であった。また、これらの症例では異常 Fbg 以外の糖尿病、喫煙、肥満などが血栓症の原因であった可能性が報告されており、γ 鎖の異常 Fbg と血栓症の関係は明らかではない。

## V 結 語

Fbg γ 鎖のアミノ酸置換によりフィブリンモノマー重合反応が異常であった、異常 Fbg Matsumoto I・II における凝固スクリーニング検査結果、機能異常の



程度、臨床症状について比較し報告した。このように異常 Fbg の機能を詳細に解析することにより、Fbg の正常な機能とくにフィブリンモノマーの重合機序を明らかにすることができると思われる。

## 謝 辞

2 家系についてインフォームドコンセントを得ていた  
だき、採血について御協力いただきました、信州大学  
医学部小児科小宮山 淳教授、岩崎 康先生、同老年  
科重松 理先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Doolittle RF, Watt KWK, Cottrell BA, Strong DD, Riley M: The amino acid sequence of the  $\alpha$ -chain of human fibrinogen. *Nature* 288: 464-468, 1979
- 2) Imperato C, Dettori A: Ipoibrinogenemia congenita con fibrinoastenia. *Helv Paediath Acta* 13: 380-399, 1958
- 3) Galanakis DK: Fibrinogen anomalies and disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 6: 1171-1187, 1992
- 4) Okumura N, Furihata K, Terasawa F, Nakagoshi R, Ueno I, Katsuyama T: Fibrinogen Matsumoto I: A  $\gamma$ 364Asp $\rightarrow$ His (GAT $\rightarrow$ CAT) substitution associated with defective fibrin polymerization. *Thromb Haemost* 75: 887-891, 1996
- 5) Okumura N, Furihata K, Terasawa F, Ishikawa S, Ueno I, Katsuyama T: Fibrinogen Matsumoto II: A  $\gamma$ 308Asn $\rightarrow$ Lys (AAT $\rightarrow$ AAG) mutation associated with bleeding tendency. *Br J Haematol* 94: 1996 (In press)
- 6) 奥村伸生, 横山和恵, 中越りつこ, 新井美和子, 勝山 努, 金井正光: ラテックス近赤外比濁法を利用したフィブリノゲン抗原量測定法の検討. *医学と薬学* 25: 111-116, 1991
- 7) Martinez J, Holburn RR, Shapiro SS, Erslev AJ: Fibrinogen Philadelphia. A hereditary hypodysfibrinogenemia characterized by fibrinogen hypercatabolism. *J Clin Invest* 53: 600-611, 1974
- 8) Yoshida N, Okuma M, Morii M, Matsuda M: A lower molecular weight  $\gamma$ -chain variant in a congenital abnormal fibrinogen (Kyoto). *Blood* 68: 703-707, 1986
- 9) Kehl M, Lottspeich F, Henschen A: Analysis of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362: 1661-1664, 1981
- 10) Steimann C, Bogli C, Jungo M, Lammle B, Heinemann G, Wermuth B, Redaelli R, Baudo F, Furlan M: A new substitution,  $\gamma$ 358 Ser $\rightarrow$ Cys, in fibrinogen Milano VII causes defective fibrin monomer polymerization. *Blood* 84: 1874-1880, 1994
- 11) Gralnick HR, Givelber HM, Shainoff JR, Finlayson JS: Fibrinogen Bethesda: A congenital dysfibrinogenemia with delayed fibrinopeptide release. *J Clin Invest* 50: 1819-1830, 1971
- 12) Yamazumi K, Doolittle RF: Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: Localization of the label  $\gamma$ -chain Tyr-363. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2893-2896, 1992
- 13) Dang CV, Ebert RF, Bell WB: Localization of a fibrinogen calcium binding site between  $\gamma$ -subunit positions 311 and 336 by terbium fluorescence. *J Biol Chem* 260: 9713-9719, 1985
- 14) Mimuro J, Muramatsu S, Maekawa H, Sakata Y, Kaneko M, Yoshitake S, Okuma M, Ito Y, Takeda Y, Matsuda M: Gene analysis of abnormal fibrinogens with a mutation in the  $\gamma$  chain. *Int J Hematol* 56: 129-134, 1992
- 15) Grailhe P, Boyer-Neumann C, Haverkate F, Grimbergen J, Larrieu MJ, Angles-Cano E: The mutation in fibrinogen Bicetre II ( $\gamma$ Asn308 $\rightarrow$ Lys) does not affect the binding of t-PA and plasminogen to fibrin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 4: 679-687, 1993
- 16) Bantia S, Bell WR, Dang CV: Polymerization defect of fibrinogen Baltimore III Due to a  $\gamma$ Asn308 $\rightarrow$ Ile mutation. *Blood* 75: 1659-1663, 1990

- 17) Miyata T, Furukawa K, Iwanaga S, Takamatsu J, Saito H: Fibrinogen Nagoya, a replacement of glutamine-329 by arginine in the  $\gamma$ -chain that impairs the polymerization of fibrin monomer. *J Biochem* 105: 10-14, 1989
- 18) Terukina S, Matsuda M, Hirata H, Takeda Y, Miyata T, Takao T, Shimonishi Y: Substitution of  $\gamma$ Arg-275 by Cys in an abnormal fibrinogen, "fibrinogen Osaka II" evidence for a unique solitary cystine structure at the mutation site. *J Biol Chem* 263: 13579-13587, 1988
- 19) Yoshida N, Ota K, Moroi M, Matsuda M: An apparently higher molecular weight  $\gamma$ -chain variant in a new congenital abnormal fibrinogen Tochigi characterized by the replacement of  $\gamma$  arginine-275 by cysteine. *Blood* 71: 480-487, 1988
- 20) Maley F, Guarino DU: Differential binding of sodium dodecyl sulfate to amino acids as evidenced by elution from Sephadex. *Biochem Biophys Res Commun* 77: 1425-1430, 1977
- 21) De Jong WW, Zweers A, Cohen LH: Influence of single amino acid substitutions on electrophoretic mobility of sodium dodecyl sulfate-protein complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 88: 532-539, 1978
- 22) Noel D, Nikaido K, Ames GFL: A single amino acid substitution in a histidine-transport protein drastically alters its mobility in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 18: 4159-4165, 1979
- 23) Reber P, Furlan M, Henschen A, Kaudewitz H, Barbui T, Hilgard P, Nenci GG, Berrettini M, Beck EA: Three abnormal fibrinogen variants with the same amino acid substitution ( $\gamma$ 275Arg $\rightarrow$ His: Fibrinogens Bergamo II, Essen and Perugia. *Thromb Haemost* 56: 401-406, 1986
- 24) Siebenlist KR, Mosesson MW, Di Orto JP, Tavori S, Tatarsky I, Rimon A: The polymerization of fibrin prepared from fibrinogen Haifa ( $\gamma$ 275Arg $\rightarrow$ His). *Thromb Haemost* 62: 875-879, 1989
- 25) Yoshida N, Imaoka S, Hirata H, Matsuda M, Asakura S: Heterozygous abnormal fibrinogen Osaka III with the replacement of  $\gamma$  arginine-275 by histidine has an apparently higher molecular weight  $\gamma$ -chain variant. *Thromb Haemost* 68: 534-538, 1992
- 26) Yamazumi K, Terukina S, Onohara S, Matsuda M: Normal plasmic cleavage of the  $\gamma$ -chain variant of "fibrinogen Saga" with an Arg-275 to His substitution. *Thromb Haemost* 60: 476-480, 1988
- 27) Schmelzer C, Ebert RF, Bell WR: Fibrinogen Baltimore IV: Congenital dysfibrinogenemia with a  $\gamma$ 275 (ARG $\rightarrow$ CYS) substitution. *Thromb Res* 56: 307-316, 1989
- 28) Terukina S, Matsuda M, Yoshida N, Yamazumi K, Takeda Y, Takano T: Two abnormal designated as Osaka II and Morioka with a hitherto unidentified amino acid substitution:  $\gamma$ ARG-275 by CYS. *Thromb Haemost* 58 (Abstract): 514, 1987
- 29) Matsuda M, Baba M, Morimoto K, Nakamikawa C: "Fibrinogen Tokyo II". An abnormal fibrinogen with an impaired polymerization sites on the aligned DD domain of fibrin molecules. *J Clin Invest* 72: 1034-1041, 1983
- 30) Niwa K, Kawata Y, Madoiwa S, Takebe M, Minuro J, Sugo T, Matsuda M, Sugimoto T, Nose K: Fibrinogen Kamogawa: A new type of  $\gamma$ Arg-275 to Ser substitution characterized by delayed fibrin gel formation. *Thromb Haemost* 73 (Abstract): 1228, 1995
- 31) Bantia S, Mane SM, Bell WR, Dang CV: Fibrinogen Baltimore I: Polymerization defect associated with a  $\gamma$ 292Gly $\rightarrow$ Val (GGC $\rightarrow$ GTC) mutation. *Blood* 76: 2279-2283, 1990
- 32) Yoshida N, Okuma M, Moroi M, Matsuda M: A lower molecular weight  $\gamma$ -chain variant in a congenital abnormal fibrinogen (Kyoto). *Blood* 68: 703-707, 1986
- 33) Yoshida N, Terukina S, Okuma M, Moroi M, Aoki N, Matsuda M: Characterization of an apparently lower molecular weight  $\gamma$ -chain variant in fibrinogen Kyoto I. The replacement of  $\gamma$ -asparagine 308 by lysine which causes accelerated cleavage of fragment D<sub>1</sub> by plasmin and the generation of a new plasmin

- cleavage site. J Biol Chem 263 : 13848-13856, 1988
- 34) Ebert RF, Bell WR : Fibrinogen Baltimore III : Congenital dysfibrinogenemia with a shorted  $\gamma$ -subunit. Thromb Res 51 : 251-258, 1988
  - 35) Yamazumi K, Shimura K, Terukina S, Takahashi N, Matsuda M : A  $\gamma$  methionine-310 to threonine substitution and consequent N-glycosylation at  $\gamma$  asparagine-308 identified in a congenital dysfibrinogenemia associated with posttraumatic bleeding, fibrinogen Asahi. J Clin Invest 83 : 1590-1597, 1989
  - 36) Galanakis DK, Spitzer SG, Scharrer I, Peerschke EI : Impaired platelet aggregation support by two dysfibrinogens : A  $\gamma$ 319-320 deletion and a  $\gamma$ 310Met $\rightarrow$ Thr substitution. Thromb Haemost 69 (Abstract) : 1261, 1993
  - 37) Koopman J, Haverkate F, Briet E, Lord ST : A congenitally abnormal fibrinogen (Vlissingen) with a 6 -base deletion in the  $\gamma$ -chain gene, causing defective calcium binding and impaired fibrin polymerization. J Biol Chem 266 : 13456-13461, 1991
  - 38) Reber P, Furlan M, Rupp C, Kehl M, Henschen A, Mannucci PM, Beck EA : Characterization of fibrinogen Milano I : Amino acid exchange  $\gamma$ 330 Asp  $\rightarrow$ Val impaires fibrin polymerization. Blood 67 : 1751-1756, 1986
  - 39) Terukina S, Yamazumi K, Okamoto K, Yamashita H, Ito Y, Matsuda M : Fibrinogen Kyoto III : A congenital dysfibrinogen with a  $\gamma$  aspartic-330 to tyrosine substitution manifesting impaired fibrin monomer polymerization. Blood 74 : 2681-2686, 1989
  - 40) Steinmann C, Reber P, Jungo M, Lammle B, Heinemann G, Wermuth B, Furlan M : Fibrinogen Bern I : Substitution  $\gamma$  337 Asn $\rightarrow$ Lys is responsible for defective fibrin monomer polymerization. Blood 82 : 2104-2108, 1993
  - 41) Galanakis DK, Peerschke EI, Spitzer S, Scharrer I : Fibrinogen Frankfurt I, a  $\gamma$ 357 Ala $\rightarrow$  Thr substitution associated with impaired fibrin polymerization and decreased platelet aggregation support. Blood 86 (Suppl 1) : 76a, 1995
  - 42) Rosenberg JB, Newman PJ, Mosesson MW, Guillin M-C, Amrani DL : Paris I dysfibrinogenemia : A point mutation in intron 8 results in insertion of a 15 amino acid sequence in the fibrinogen  $\gamma$ -chain. Thromb Haemost 69 : 217-220, 1993
  - 43) Yoshida N, Hirata H, Morigami Y, Imaoka S, Matsuda M, Yamazumi K, Asakura S : Characterization of an abnormal fibrinogen Osaka V with the replacement of  $\gamma$ -arginine 375 by glycine. The lack of high affinity calcium binding to D-domains and the lack of protective effect of calcium on fibrinolysis. J Biol Chem 267 : 2753-2759, 1992

---

(8. 4. 16 受稿)