

## Thrombin-catalyzed fibrin polymerization

### 試験によるフィブリノゲン機能解析

#### —至適条件の検討と3例の異常フィブリノゲンの比較—

寺澤文子, 小穴こず枝, 亀子文子, 奥村伸生

#### **Thrombin-catalyzed fibrin polymerization test for functional analysis of fibrinogen**

#### **— Studies on the optimal condition and analysis of three dysfibrinogen —**

We studied the functional deviation of three dysfibrinogens (A, B and C) from the normal with thrombin-catalyzed fibrin polymerization (TCFP).

The test condition of the TCFP, however, has not yet been standardized in spite of its striking dependency on pH, ionic strength and concentrations of Ca ion and of fibrinogen. This led us to establish the optimal condition, using purified normal plasma fibrinogen. The result obtained was as follows: 0.05 M triethanolamine-HCl buffer of pH 7.4 with 0.1 M NaCl and without Ca ion at the beginning. The test was best appreciable at 0.25 mg/ml of fibrinogen, since the 'velocity' and 'amplitude' showed a proportional linearity to the concentration, unless beyond the point.

On the condition described above, the A and C dysfibrinogens demonstrated remarkable elongation of lag time and significant decrease in velocity and amplitude in comparison with normal control. The B, on the other hand, revealed much smaller deviation, which improved to almost normal by addition of Ca ion (5 mM) of the system. Interestingly, the abnormal amino acids are situated near the Ca binding site of gamma chain in B dysfibrinogen, while they are far from it in the A and C.

#### **Key Words :**

Fibrinogen (フィブリノゲン), Thrombin-catalyzed fibrin polymerization test (TCFP 試験), Functional analysis of dysfibrinogen (異常フィブリノゲン機能検査)

## はじめに

フィブリノゲン (Fbg) は、血液凝固の最終段階でトロンビンの作用でフィブリンに変化することにより、止血機構において重要な機能を有する分子量34万の巨大糖タンパクである。血液凝固第I因子とも呼ばれ、A $\alpha$ , B $\beta$ ,  $\gamma$ の3種類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、さらにアミノ基末端近くでS-S結合し2量体として血漿中に存在しており、(A $\alpha$ -B $\beta$ - $\gamma$ )<sub>2</sub>という形で表現される<sup>1)</sup>。このようなFbgの構造と、複雑な機能との関連は十分に解明されておらず、いまだ不明な点が多い。

最近、我々は凝固スクリーニング検査の結果から、Fbg異常症を疑う3例を見出し、遺伝子解析を行った。そして3例ともにDNAの1塩基置換による1アミノ酸変異が、Fbg分子内に存在することにより引き起こされたFbg異常症であることを明らかにした<sup>2,3)</sup>。このような異常Fbgについて機能解析を行うことは、Fbgの構造と機能との関連を明らかにするために重要な意義を持つ。そのFbg機能検査のひとつとしてThrombin-catalyzed fibrin polymerization試験 (TCFP試験)がある。しかし、TCFP試験は反応液のpH、イオン強度 (塩濃度)、Fbg濃度、Caイオン濃度などにより大きな影響を受けるとされている<sup>4)</sup>。そこで、まず正常血漿から精製したFbgを用いてそれらの諸条件の検討を行い、その結果から正常および異常Fbgの相違が明らかになるようなTCFP試験の条件を設定した。その条件を用いて、3例の異常FbgのTCFP試験を行い、得られた結果から異常部位とその機能との関連を考察した。

## 材料および方法

## 1. 試料

正常Fbgは、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)、Fbg活性量および抗原量の検査結果に異常のない血漿 (normal control, NCとする) から精製した。異常Fbgの3例 (FbgA, B, Cとする)のうち、FbgAの発端者は1才男児であり、遺伝子解析の結果、 $\gamma$ 鎖364残基がアスパラギン酸とヒスチジンとのヘテロ接合体であった<sup>2)</sup>。今回の検討に用いたFbgAは発端者と同様の結果を示した母親の血漿から精製した。FbgBは $\gamma$ 鎖308残基がアスパラギンとリジンのヘテロ接合体である49才女性<sup>3)</sup>の血漿から、FbgCは $\gamma$ 鎖275残基がアルギニンとシステインとのヘテロ接合体である60才女性の血漿から精製した。

## 2. Fbgの精製

Fbgの精製はYoshidaらの方法<sup>5)</sup>に従って行った。まず3.2%クエン酸ナトリウム加血漿3 mlに2 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 10 IU/ml アプロチニンを含む50 mM トリス—塩酸緩衝液 (pH 7.4) を12 ml加えた。この溶液に終濃度が25%飽和になるように硫酸アンモニウム2.16 gを加え、泡立てないように30分間混和した。15,000 rpmで30分間遠心し、上清を捨てた後、沈殿に25%硫酸アンモニウム溶液を加えて攪拌し、再び15,000 rpmで30分間遠心した。この操作を2回行って洗浄したFbgを0.3 M NaCl 1 mlに溶かし、0.3 M NaClに対して4℃で透析して硫酸アンモニウムを除去した。透析後15,000 rpmで10分間遠心し沈殿物を除去した後、上清を新たに0.05 M トリエタノールアミン—塩酸緩衝液 (Triethanolamine-HCl buffer,

TEB) pH 7.4で透析した。透析後15,000 rpmで10分間遠心して沈殿物を除去し、得られたFbg溶液をTCFP試験に用いた。Fbg濃度は抗Fbg抗体を用いたLPIA法 (Latex photometric immunoassay法, ダイアマトロンLPIA-100)で測定した。なお、この精製方法のFbgの回収率は約40%であった。

### 3. TCFP試験

TCFP試験は、Steimannらの方法<sup>6)</sup>に準じて行った。TEB 194  $\mu$ lに、それぞれ2 mg/mlとなるよう濃度を調整したFbg液31  $\mu$ l (終濃度0.25 mg/ml)と、EDTA溶液またはCaCl<sub>2</sub>溶液を12.5  $\mu$ l加えてよく混和し、37°Cで10分間予備加温した後、10 U/mlウシトロンビン (東亜医用電子)を12.5  $\mu$ l (終濃度0.5 U/ml)加えて攪拌し、ただちに波長350 nmにおける吸光度の変化をHitachi U-3200で経時的に測定した。Fbg濃度の検討には、最終容量が250  $\mu$ lとなるように、TEBとFbg溶液の量を変化させた。トロンビンを加えてから測定までの時間、混和回数は同じ条件になるようにした。TCFP試験の凝集反応は、凝集開始までの時間をlag time、凝集開始後の急峻な立上りの傾き ( $\Delta$  Abs/min)を凝集速度、最大吸光度を凝集度とした。

#### 1) TCFP試験の諸条件の検討

緩衝液のpHと濃度、NaCl濃度、Fbg濃度、Caイオン濃度を以下のように変化させてTCFP試験を行った。

pHの影響：TEB (0.05 M)のpHを、6.8、7.4、7.8の3種に調整して用いた。

緩衝液濃度の影響：TEB (pH 7.4)の濃度を0.01、0.05、0.075、0.1 Mに変化させて用いた。

NaCl濃度の影響：TEB (0.05 M, pH 7.4)

にNaClを終濃度で0、0.05、0.1、0.15 Mとなるよう添加して用いた。

Fbg濃度の影響：TEB (0.05 M, pH 7.4)を用いて、Fbgの終濃度がそれぞれ0.1、0.25、0.50、0.75 mg/mlとなるようにした。

Caイオン濃度の影響：TEBにCa終濃度が0、0.05、0.25、5.0 mMとなるようにCaCl<sub>2</sub>溶液の添加量を変化させた。なお、0濃度ではCaCl<sub>2</sub>の代わりに20 mM EDTA (終濃度1 mM)を加えた。

#### 2) 正常および異常FbgのTCFP試験の比較

TCFP試験の諸条件の検討結果から、明瞭なlag timeがあり、凝集速度および凝集度ができるだけ大きくなるpH、イオン強度 (塩濃度)、さらにFbg濃度ができるだけ低い条件を至適条件として設定した。この条件において、正常対照および3例の異常FbgのTCFP試験を行った。さらに、この反応系にCaイオン濃度を5 mMになるように添加し、得られた結果を比較した。

## 結果

#### 1) TCFP試験の諸条件

pHの影響：pH 7.4ではlag timeは約3分、凝集速度0.09 Abs/min、凝集度1.10 Absであった。pH 7.8においてもpH 7.4の時に比較して大きな差は認められなかった。しかしpH 6.8ではlag timeが6分と延長し、凝集速度および凝集度が低下した (Fig. 1)。

緩衝液濃度の影響：緩衝液濃度が0.05 Mではlag timeが約3分、凝集速度0.09 Abs/min、凝集度1.10 Absであったが、0.01 Mではlag timeはみられず、逆に0.075、0.15 Mと濃度があがるにつれてlag timeが延長

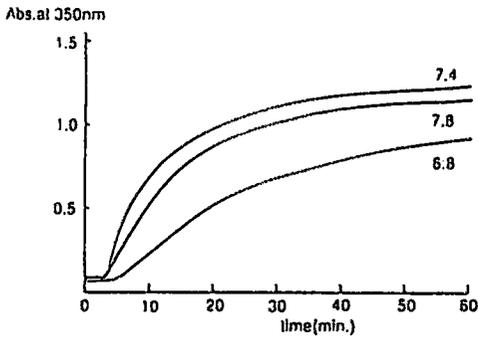


Fig.1. Effects of pH for thrombin-catalyzed fibrin polymerization(TCFP)

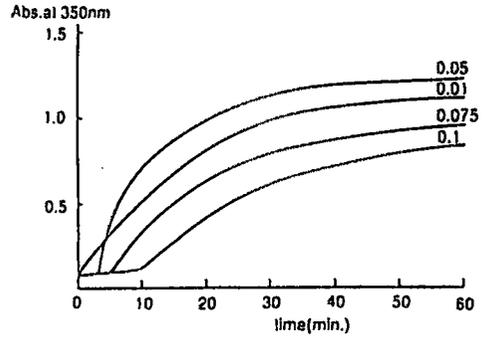


Fig.2 Effects of triethanolamine-HCl buffer concentration for TCFP

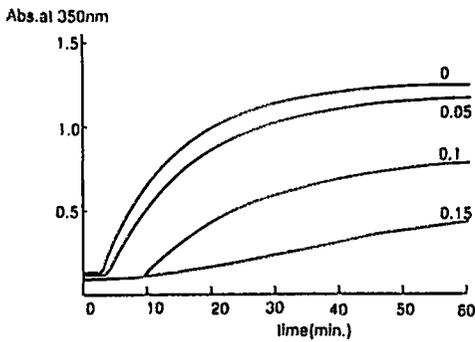


Fig.3 Effects of NaCl concentration(M) for TCFP

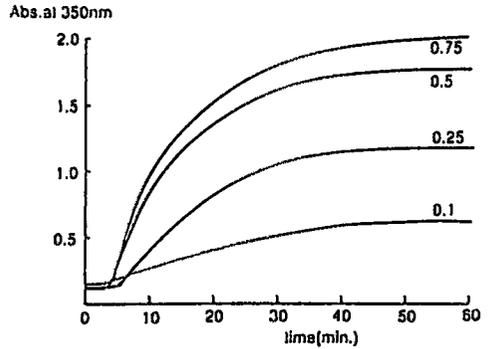


Fig.4 Effects of fibrinogen concentration(mg/ml)

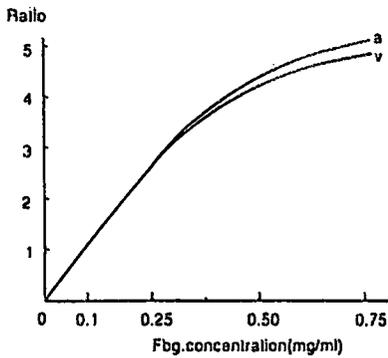


Fig.5 Correlation between fibrinogen concentration and TCFP  
a: amplitude(Abs. at 60min.), v: velocity(Abs./min.)

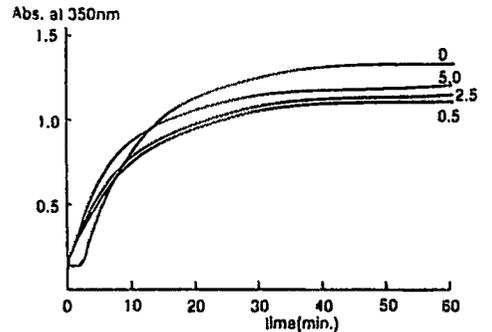


Fig.6 Effects of Ca ions(mM) for TCFP

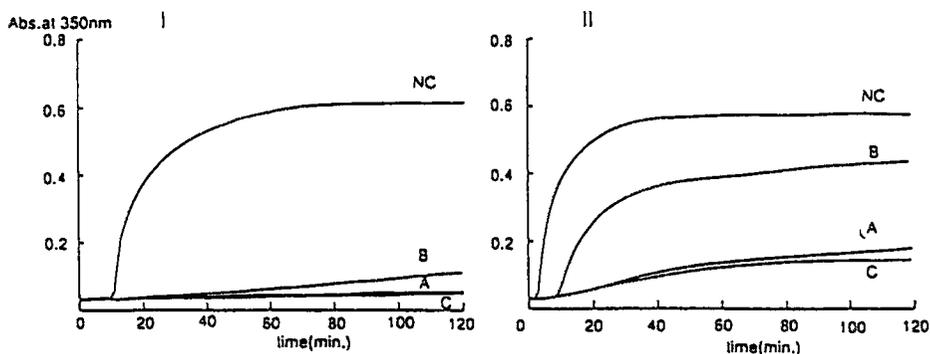


Fig.7 TCFP of Fbg. A, B and C  
 I: Ca ions 0mM II: Ca ions 5mM  
 NC: normal control A: Fbg A B: Fbg B C: Fbg C

した。凝集速度、凝集度はともに0.05 Mの場合が最も大きかった (Fig. 2)。

NaCl 濃度の影響：0 と0.05 M では凝集反応の経過に大きな差は認められなかったが、0.1 M では lag time が10分に延長し、凝集速度0.05 Abs/min, 凝集度0.55 Absと低下した。0.15 M 添加した場合には凝集反応は著しく低下した (Fig. 3)。

Fbg 濃度の影響：4 濃度での lag time は3～5分とほとんど差がなかったが、凝集速度、凝集度はそれぞれ0.1 mg/ml で0.028 Abs/min, 0.4 Abs, 0.25 mg/ml で0.076 Abs/min, 1.1 Abs, 0.50 mg/ml で0.112 Abs/min, 1.7 Abs, 0.75 mg/ml で0.128 Abs/min, 1.95 Absであった (Fig. 4)。

0.1 mg/ml の場合の凝集速度、凝集度をそれぞれ1としたときの比をとってみると、0.25 mg/ml を越えると傾斜は緩やかとなり、0.50 mg/ml では直線性はなかった (Fig. 5)。

Ca イオン濃度の影響：Ca イオンは終濃度0.5 mM の場合でも lag time は見られなくなった。どの濃度でも凝集速度には大きな差は認められなかったが、凝集度は Ca イオン添加により10～20%程度低下した (Fig. 6)。

## 2) 異常 Fbg の TCFP 試験

これらの結果から、TCFP 試験の基本的条件は TEB (0.05 M, pH 7.4), NaCl 濃度0.1 M, Fbg 濃度は0.25 mg/ml とした。この条件を用いて正常および異常 Fbg A, B, C の TCFP 試験を行った。まず、Ca イオン 0 mM では、正常 Fbg の lag time は10分、重合速度は0.04 Abs/min, 重合度は0.55 Absであった。これに対して、Fbg B では120分後に重合度が0.05 Absとなりわずかに凝集反応が認められたが、Fbg A, C の場合では120分までほとんどみられなかった。Ca イオン 5 mM の添加では、正常 Fbg の lag time 3分、重合速度0.068 Abs/min, 重合度0.50 Absに対して、B では lag time 8分、重合速度0.032 Abs/min, 重合度0.35 Absとかなり改善された。しかし A, C ではなお著しい低下を示した (Fig. 7)。

## 考 察

Fbg の機能検査には、TCFP 試験<sup>6,7)</sup>あるいはフィブリンモノマー重合 (fibrin monomer polymerization, FMP) 試験<sup>8,9)</sup>が用いられるのが一般的である。今回われわれは、3例の異常 Fbg について TCFP 試験を行っ

た。本研究の理解には、血液凝固系における Fbg の機能と、その検査方法について述べる必要があると考えられる。そこでまず、Fbg の働きから述べたい。

血液凝固の最終段階で、Fbg はトロンビンの作用により、 $A\alpha$  鎖から fibrinopeptide A (FPA) を放出して desA fibrin に転じ、互いに規則正しく重合しはじめる。これに続いて  $B\beta$  鎖から Fibrinopeptide B (FPB) が放出されるとフィブリンは  $(\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma)_2$  となり、プロトフィブリルを生成し、さらにこれらが互いに凝集しフィブリン線維を形成してゲル化する。最終的には凝固 XIII 因子の作用により分子間架橋をうけ、安定化フィブリンとなっていく<sup>10)</sup>。Fbg がゲル化するまでの段階を 350 nm における吸光度として経時的に観察するのが TCFP 試験であり、フィブリン凝集試験ともよばれている。

この試験において、lag time はフィブリン凝集（フィブリン線維形成）に必要な長さのプロトフィブリルが生成されるまでの時間、重合速度はプロトフィブリルからフィブリン線維が形成される速度、重合度はフィブリン線維中のプロトフィブリルの数を表すと考えられている<sup>11)</sup>。

生成されたフィブリン線維（ゲル）は、低濃度の酢酸酸性溶液に溶解する（フィブリンモノマーという）が、中性に戻すと再び重合し白濁する。この過程を TCFP 試験と同様に 350 nm で経時的に観察するのが FMP 試験である。Fbg 分子に異常が存在する Fbg 異常症においては、このゲル化に至る過程に障害を示すものが最も多い。これらの異常部位の検索を行う場合、二法のうち FMP 試験はフィブリンモノマーの重合異常だけを観察することが可能である。しかし、機能異常が著しい Fbg ではトロンビンを作用させても

フィブリンの生成が低下しており、生成されたフィブリンも脆弱なため回収したり洗浄するなどの段階で損失が大きく、したがって必要なサンプル量が多くなるなどの短所がある。

一方、TCFP 試験はフィブリンモノマーの重合異常だけでなく、フィブリンペプチドの放出に異常がある症例においても重合障害の観察が可能であるので、この試験だけでは両者の鑑別ができない欠点を有する。さらに試験に用いるトロンビンの濃度に大きく左右されることも欠点である。しかし FMP 試験に比較して必要なサンプル量が少なくすむ利点を有している。

いずれの機能試験においても、フィブリンの重合反応は FPA を放出した後の  $\alpha$  鎖の N 末端（いわゆる“A”部位）と  $\gamma$  鎖の polymerization pocket（いわゆる“a”部位）のアミノ酸の荷電状態が重要とされており<sup>11)</sup>、pH、イオン強度などに大きく影響されるものと考えられる。また Ca イオンの存在は重合反応を促進するが、詳細な機序は明らかになっていない<sup>12)</sup>。これらのことから異常 Fbg の機能を正常対照と比較評価するためには、長すぎない lag time が存在すること、重合速度が速く、さらに重合度が大きい条件が必要である。

今回の実験結果から TCFP 試験の至適条件として 0.05 M の TEB (pH 7.4)、NaCl 0.1 M が適当と考えた。Fbg 濃度については、0.1~0.25 mg/ml の範囲で重合速度、重合度と高い相関がみられたものの、lag time とは相関がなかった。したがって正常対照との比較には常に同一濃度での検討が必要であった。

FMP 試験の基本的な条件としては 0.067 M リン酸緩衝液、pH 6.8、NaCl 0 M を用

いている<sup>13)</sup>。TCFP 試験の条件と比較すると、pHに0.6の違いが認められた。これはTCFP 試験ではトロンビンの作用が反応開始に重要であるために、トロンビンの至適pHである7.2~7.5がTCFP 試験の至適pHとなっていると考えられる。またNaCl濃度は、正常Fbgの明瞭なlag timeを得るためにはFMP 試験では0 M、TCFP 試験では0.1 Mが適当であった。

これらの条件を用いて、3例の異常FbgA、B、CのTCFP 試験を実施した。3例は凝固スクリーニング検査においてPT（プロトロンビン時間）の軽度延長、APTT（活性化部分トロンビン時間）正常、Fbg活性量と抗原量との乖離、により見出だされたものである。遺伝子解析の結果、それぞれに1塩基置換に起因したアミノ酸変異が認められた。このような異なる変異部位と、それにより生ずるFbg機能障害との関連をみる必要があるとなりTCFP 試験を実施したところ、3例ともにlag timeの延長と凝集速度・凝集度の低下がみられた。また、5 mMのCa添加でもFbgAとCではなお著しい凝集障害が認められたが、FbgBではかなり改善された。これらのことから、Fbgの $\gamma$ 鎖308残基の機能は364、275残基よりもCaイオンの存在による影響を受け易い部位であることが示唆された。これは $\gamma$ 鎖308がCa結合部位とされる $\gamma$ 311-336<sup>14)</sup>に近いことによるものと考えられる。

最近 $\gamma$ 鎖364アスパラギン酸は“A”siteのanalogueである合成ペプチド（グリシン-プロリン-アルギニン-プロリン）のグリシンとの結合部位であることが明らかとなった<sup>15)</sup>。また、著しい凝集障害を示した $\gamma$ 鎖275アルギニンがシステイン（Cys）に置換した例では、置換Cysは他の遊離Cys分子とS

-S結合していることが確認されている<sup>16)</sup>。このような解析とTCFP 試験をはじめとする機能検査を組み合わせて検討することにより、巨大なFbg分子の部位と機能との関連、あるいはいまだ不明な点の多い凝集・重合機序を解明していくことができるものと考えている。

## 結 語

3例の異常FbgについてTCFP 試験を行った。それに先立って、正常、異常の相違を明らかにしやすいTCFP 試験の至適条件を検討した結果、0.05 Mトリエタノーアミン-塩酸緩衝液、pH7.4、NaCl0.1 M、Fbg濃度0.25 mg/mlを基本的条件として設定した。この条件により3例の異常FbgのTCFP 試験を実施したところ、3例ともに正常Fbgの場合に比較して、lag timeの延長と凝集速度、凝集度の低下が認められた。また5 mM Caイオンを添加した実験では、FbgBはlag time、重合速度、重合度ともにかなり改善されたものの、FbgA、Cではなお著しい低下が認められた。したがってFbgBのもつアミノ酸変異部位は、A、CのそれらよりCaイオンの影響を受けやすい部位であるといえた。

## 文 献

- 1) 松田道生：血液凝固—止血と血栓・下3. 凝固第3相（A）線維素原、福武勝博編、宇宙堂八木書店（東京）1983
- 2) Okumura N, et al: Fibrinogen Matsu-moto I: A  $\gamma$ 364 Asp $\rightarrow$ His (GAT $\rightarrow$ CAT) substitution associated with defective fibrin polymerization. *Thromb. Haemost* 76: 889-891, 1996
- 3) Okumura N, et al: Fibrinogen Matsu-moto II: A  $\gamma$ 308 Asn $\rightarrow$ Lys (AAT $\rightarrow$ AAG)

- mutation associated with bleeding tendency. *Br J Haematol* 94 : 526-528, 1996
- 4) Belitser V A, et al: Fibrinogen-Fibrin Interaction. *Biochim Biophys Acta* 154 : 367-375, 1968
- 5) Yoshida N, et al: A lower molecular  $\gamma$  chain variant in a congenital abnormal fibrinogen (Kyoto). *Blood* 68 : 703-707, 1986
- 6) Steimann C et al: A new substitution  $\gamma$  358 Ser $\rightarrow$ Cys, in Fibrinogen Milano VII causes defective fibrin polymerization. *Blood* 84 : 1874-1880, 1994
- 7) Koopman J et al: 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
- 8) 松田道生: フィブリノゲンの分子異常. *臨床病理*. 70 : 148-159, 1987
- 9) Gralnick HR et al: Fibrinogen Bethesda. A congenital dysfibrinogenemia with delayed fibrinopeptide release. *J Clin Invest.* 50 : 1819-1830, 1971
- 10) 松田道生, 他: フィブリンの重合機序について. *凝固・線溶・血小板研究 基礎と研究*, 風間睦美, 他編, 宇宙堂八木書店 (東京) 1983
- 11) Weisel JW et al: Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J* 63 : 111-128, 1992
- 12) Laudano AP, Doolittle RF: Influence of calcium ions on the binding of fibrin amino acid terminal peptide to fibrinogen. *Science* 212 : 457-459, 1981
- 13) Dang CV et al: Localization of a fibrinogen calcium binding site between  $\gamma$ -subunit positions 311 and 336 by terbium fluorescence. *J Bio Chem* 260 : 9713-9719, 1985
- 14) 寺澤文子, 他: 異常フィブリノゲン解析のためのフィブリンモノマー重合試験の至適条件. *生物試料分析* 19 : 180-187, 1996
- 15) Pratt K P et al: The primary fibrin polymerization pocket: Three-dimensional structure of 30-kDa C-terminal  $\gamma$  chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 : 7176-7180, 1997
- 16) Terukina S et al: Substitution of  $\gamma$  Arg-275 by Cys in an abnormal fibrinogen, "Fibrinogen Osaka II". *J Bio Chem* 263 : 13579-13587, 1988

受付日: 1997年9月29日

受理日: 1997年11月20日