

綜 説

フィブリノゲン異常症と欠損症から明らかになった フィブリノゲンの機能異常と産生異常

奥村 伸生^{1)2)*} 寺澤 文子¹⁾²⁾

- 1) 信州大学医学部保健学科検査技術科学専攻病因・病態検査学講座
2) 信州大学大学院医学系研究科保健学専攻医療生命科学分野

Analyses for Dysfunctional Fibrinogenemias and Hypo/Afibrinogenemias : Abnormality of Function and Synthesis of Fibrinogen

Nobuo OKUMURA and Fumiko TERASAWA

- 1) *Department of Biomedical Laboratory Sciences, School of Health Sciences, Shinshu University*
2) *Department of Medical Life Sciences, Shinshu University Graduate School of Medicine*

Key words : fibrinogen, dysfibrinogenemia, afibrinogenemia, hypofibrinogenemia, fibrin polymerization

フィブリノゲン, フィブリノゲン異常症, 無フィブリノゲン血症 (フィブリノゲン欠損症),
低フィブリノゲン血症, フィブリン重合反応

I はじめに

フィブリノゲン (Fibrinogen : Fbg) は, 血液凝固反応の最終段階でトロンビンの作用によりフィブリン (Fibrin : Fbn) に変化し止血に関与する分子量340 kDa の糖タンパクであり, 健康人血漿中には180-350 mg/dl 存在する。Fbg は肝細胞において, A α 鎖 (アミノ酸数610個, 分子量67 kDa), B β 鎖 (461個, 56 kDa), γ 鎖 (411個, 47.5 kDa) の3種のポリペプチドとして合成されたものが, 第1段階としてポリペプチド間 S-S 結合により (A α · B β · γ) 複合体となり, 第2段階としてそれらが N 末端領域の S-S 結合により 2 量体 (A α · B β · γ)₂ に組み立てられ肝細胞から分泌される。これら A α 鎖 · B β 鎖 · γ 鎖をコードする Fbg 遺伝子は第4染色体長腕のそれぞれ 28.2, 28.3, 28.1 に存在している。2 量体である Fbg は 1 分子中に 58 個のシステイン (Cys) を有し, その全てが同一ポリペプチド鎖内 (A α ; 2 個, B β ; 6 個, γ ; 4 個) あるいは各ポリペプチド鎖間 (A α -A α ; 1 個, γ - γ ; 2 個, A α -B β ; 6 個, A α - γ ; 4 個, B β - γ ; 4 個) で計 29 個の S-S 結合を成している。

*別刷請求先: 奥村 伸生 〒390-8621
松本市旭 3-1-1 信州大学医学部保健学科

Fbg 分子の電子顕微鏡による観察では, 3 つの領域 (region) とそれをつなぐ構造 (coiled-coil connectors) が認められ, 中央に存在し 2 量体形成部位である N 末端側は E 領域と呼ばれており, 両側に対称に広がる C 末端側は D 領域と呼ばれている (図 1)¹⁾²⁾。

Fbg 欠損症のモデル動物として Fbg A α 鎖ノックアウトマウスが 1995 年³⁾, Fbg γ 鎖ノックアウトマウスが 2000 年に作成された。A α 鎖ノックアウトマウスでは, マウスは子宮内で死亡することなく出産される。しかし, 新生マウスの約 30 % は出産時から明らかな出血が認められ, 腹腔内出血で死亡することもあり, 長期生存に関しては遺伝的背景による影響が認められた。また, メスは妊娠 10 日目頃子宮出血で死亡してしまう。このようなマウスを使用した種々の実験により, Fbg は凝固線溶系以外に創傷治癒⁴⁾や妊娠継続⁵⁾に重要な働きをするとともに, Fbg のないマウスでは癌の転移が少なくなることが (癌の増殖や血管増生に変化はない)⁶⁾明らかになっている。

このような Fbg は入院時あるいは手術前の凝固スクリーニング検査のひとつとして日常臨床検査として測定される。血漿 Fbg が低下する疾患・病態として, 重症肝障害による産生低下, 巨大血栓症や播種性血管内凝固症候群などによる消費亢進, 蛇毒・L-aspar-

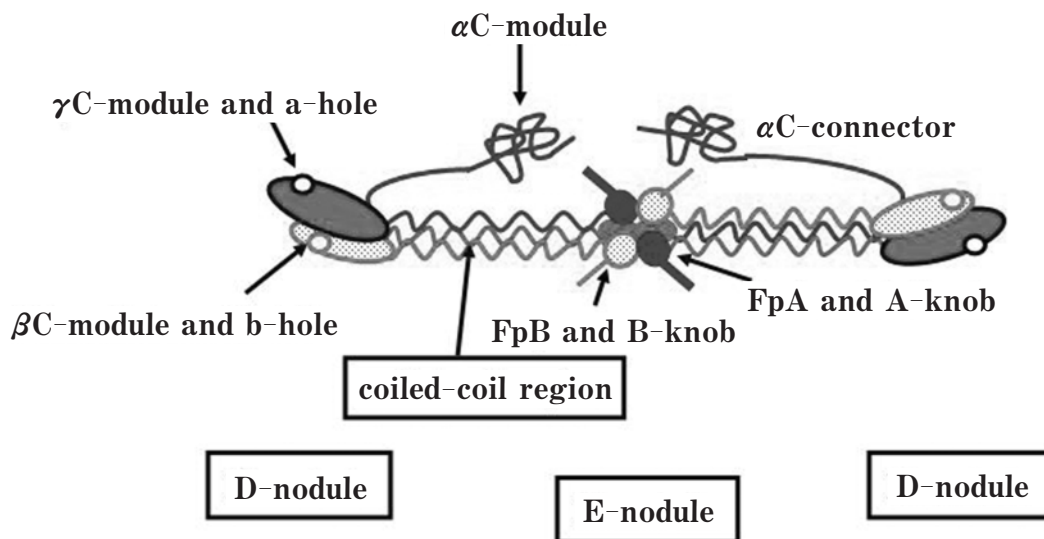


図1 フィブリノゲンの構造

$A\alpha$ 鎖, $B\beta$ 鎖, γ 鎖の N 末端側は Fbg 分子が S-S 結合により 2 量体を形成している部分で E 領域と呼ばれている。E 領域の $A\alpha$ 鎖にはトロンビンにより放出される fibrinopeptide A (FpA) と, FpA 放出後に露出するいわゆる A-knob が存在する。また, E 領域の $B\beta$ 鎖にはトロンビンにより放出される fibrinopeptide B (FpB) と, FpB 放出後に露出するいわゆる B-knob が存在する。E 領域を中心にして両側に対称に広がる C 末端側は D 領域と呼ばれている。D 領域の γ -module には A-knob が結合するいわゆる a-hole が存在する。また, D 領域の β -module には B-knob が結合するいわゆる b-hole が存在する。D 領域と E 領域を結合している部分は $A\alpha$ 鎖, $B\beta$ 鎖, γ 鎖から構成され coiled-coil connectors と呼ばれている。 $A\alpha$ 鎖の C 末端側は αC 領域と呼ばれ, αC -domain と αC -connector から構成されている。

aginase 製剤投与などがある。また先天性な異常として, 血漿中に Fbg が存在しない無 Fbg 血症 (ホモ接合体), 蛋白質は存在するものの機能に異常を有する Fbg (機能) 異常症 (ホモあるいはヘテロ接合体), さらに無 Fbg 血症のヘテロ接合体型である低 Fbg 血症の 3 つの型が存在し, 全世界で合わせて 350 家系以上が報告がされている (<http://www.geht.org/databaseang/fibrinogen/>)。今回は, 我々が経験した Fbg 異常症と Fbg 欠損症の検査結果やリコンビナントタンパクの解析などから学んだことを中心に解説する。なお, 無 Fbg 血症および低 Fbg 血症を呈する症例報告の分子生物学的な分類の詳細については綜説を参照いただきたい⁷⁾。

II フィブリノゲン異常症・欠損症の凝固スクリーニング検査結果

我々は 1992 年以来現在までに, 長野県内および県外の施設から依頼された症例を含めて Fbg 異常症ヘテロ型 15 症例と Fbg 欠損症ヘテロ型 5 症例, 無 Fbg 血症 (Fbg 欠損症ホモ型) 1 症例の遺伝子異常と異常タンパク質の機能解析などを行ってきた。これらの症例のアミノ酸および遺伝子異常部位, PT, APTT,

Fbg 活性値 (トロンビン時間法; 信州大学医学部附属病院の日常検査法), Fbg 抗原量 (免疫学的測定法)⁸⁾, および Fbg 活性値/抗原量比について表 1 に示した (なお, PT 測定値については実測秒のみで表示した)。

これらの症例の検査結果から明らかなのは, Fbg 異常症・欠損症のヘテロ型においては, PT 測定値は基準範囲内であるか軽度延長, APTT 測定値においては全例が基準範囲内であるか軽度短縮であった。一方, 欠損症のホモ型である無 Fbg 血症においては, PT・APTT の測定値がともに高度延長 (測定不能) であった。ほとんどすべての教科書では, 凝固スクリーニング検査において PT・APTT がともに延長した場合, その原因のひとつとして Fbg 異常症と Fbg 欠損症 (無 Fbg 血症) を疑わなくてはならないと記載されている。しかし, 表 1 に示したように Fbg 異常症・欠損症のヘテロ型においては, PT・APTT がともに延長する例はなく, むしろ, ともに基準範囲内であることが大部分である。この現象は凝固系活性化経路を考えると奇異に感じると思われるが, これは測定試薬の違いに由来するためである。すなわち, Fbg が Fbn に転換する速度は NaCl 濃度が低いほど

表1 フィブリノゲン異常症・欠損症とその凝固スクリーニング検査結果

症例	診断	アミノ酸あるいはDNAの変異 (基準範囲)	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fbg (mg/dl) (トロンビン時間法)	Fbg (mg/dl) (免疫学的測定法)	Fbg比	症状
			10.8-13.2	23.0-38.0	180-350	180-350	0.800-1.200	(出血傾向・血栓症など)
Matsumoto I	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 364Asp→His	13.0	29.4	16	340	0.047	
Matsumoto II	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 308Asn→Lys	12.2	31.3	67	246	0.272	出血症状
Matsumoto III	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 275Arg→Cys	12.5	21.1	39	291	0.134	
Matsumoto V	異常症 (ヘテロ接合体)	A α 19Arg→Gly	11.0	28.6	92	471	0.195	
Matsumoto VI	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 308Asn→Lys	12.7	28.8	107	302	0.354	
Sendai	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 275Arg→Cys	13.7	32.5	44	224	0.195	
Kosai	異常症 (ヘテロ接合体)	B β 15Gly→Cys	12.0	29.8	94	287	0.328	閉塞性動脈硬化症
Ogasa	異常症 (ヘテロ接合体)	B β 15Gly→Cys	13.2	31.4	106	272	0.390	
Otsu I	異常症 (ヘテロ接合体)	γ Δ319Asn320Asp	12.6	28.5	27	177	0.153	
Kyoto IV (母)	異常症 (ヘテロ接合体)	B β Δ111Ser	12.8	32.1	*243	318	0.764	
Hamamatsu II	異常症 (ヘテロ接合体)	B β 15Gly→Cys	11.8	31.0	107	254	0.421	延髄梗塞
Otsu II	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 275Arg→His	12.0	27.4	61	205	0.298	
Kyoto V	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 322Phe→Ser	13.0	34.4	101	202	0.500	
Iida	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 275Arg→His	12.8	36.2	54	138	0.389	
Shizuoka	異常症 (ヘテロ接合体)	γ 275Arg→His	13.2	29.4	57	173	0.328	不妊症・体外受精後の流産
Matsumoto IV	欠損症 (ヘテロ接合体)	γ 153Cys→Arg	14.1	36.0	81	87	0.931	
Matsumoto VII	欠損症 (ヘテロ接合体)	γ chain 7651A deletion (frame shift)	13.2	28.7	77	89	0.865	
Matsumoto VIII	欠損症 (ヘテロ接合体)	γ 153Cys→Arg	13.7	29.8	67	71	0.944	
Matsumoto IX	欠損症 (ヘテロ接合体)	B β IVS6Δ-10~-13TTTG γ IVS3-2A>G	11.7	34.2	83	82	1.012	習慣性流産
Matsumoto X	欠損症 (ヘテロ接合体)	解析中	11.6	28.5	111	114	0.974	
Kurashiki II	欠損症 (ホモ接合体)	A α 鎖遺伝子欠損 (1238bp) A α IVS1+3A>C	> 60	> 200	<20	2.8	—	点滴刺入部血腫

*詳細は文献参照 (Okumura N, et al. Clinica Chimica Acta 365 : 160-167, 2006)

早く、これを裏付けるように測定時の NaCl 濃度は Fbg ; 204, PT ; 64, APTT ; 33 mM の順に低下している⁹⁾。教科書などの記載はあくまでも、欠損症のホモ型である無 Fbg 血症と Fbg 異常症のホモ型の場合にのみ当てはまるといえるので、注意が必要である。

III 測定試薬によりフィブリノゲン活性測定値に乖離を認めたフィブリノゲン Kyoto IV 症例

表 1 に示した異常 Fbg Kyoto IV (B β 鎖111Ser 欠損) のトロンビン時間法による Fbg 活性測定値において大変奇妙な現象に遭遇した (Kyoto IV 発端者は PT・APTT の測定が実施できなかったために、表 1 では同じ変異を有する母の測定値を示している)¹⁰⁾。すなわち、京都大学病院検査部におけるトロンビン時間法による Fbg 活性測定値 (試薬: トロンボチェック Fib-L, 装置: Coagrex-800) では 89 mg/dl であったにもかかわらず、信州大学病院臨床検査部におけるトロンビン時間法による Fbg 活性測定値 (2004 年当時の試薬: MDA フィブリクイック, 装置: MDA II) では 156 mg/dl と基準範囲よりわずかに低い程度であった。このため、信州大学病院臨床検査部のバックアップ測定試薬 (Dade トロンビン試薬, 装置: Coagrex-800) により測定した結果、Fbg 活性測定値は 106 mg/dl であり、他の 2 試薬による値の中間的値であった。Fbg の抗原量は 240 mg/dl であったので、活性測定値との比の値はそれぞれ 0.37, 0.65, 0.44 であった。

試薬の違いによりトロンビン時間法による Fbg 活性測定値が大きく異なることが推定されたので、測定時の試薬成分濃度と発端者 Fbg 活性測定値について検討した。この結果、測定時の NaCl 濃度はトロンボチェック Fib-L ; 204, Dade トロンビン試薬 ; 128, MDA フィブリクイック ; 126 mM の順に低くなった。また、血漿 Fbg 濃度を 100 mg/dl と仮定したとき、測定時の Fbg 濃度はトロンボチェック Fib-L ; 6.7, Dade トロンビン試薬 ; 6.7, MDA フィブリクイック ; 13.3 mg/dl の順に高くなった。したがって、前述のような大きな乖離が生じたものと推測した。これらを証明するために健常人から精製した Fbg について、NaCl 濃度を変化させて Fbn 重合反応を実施、図 2 A に示すような 3 つのパラメータ (Lag period, Vmax, Δ Abs) を比較した。この結果いずれのパラメータも図 2 B, C, D に示すように、NaCl 濃度の増加に伴って延長または低下することが確認された¹⁰⁾。

現在ほとんどの施設における日常の Fbg 測定は、

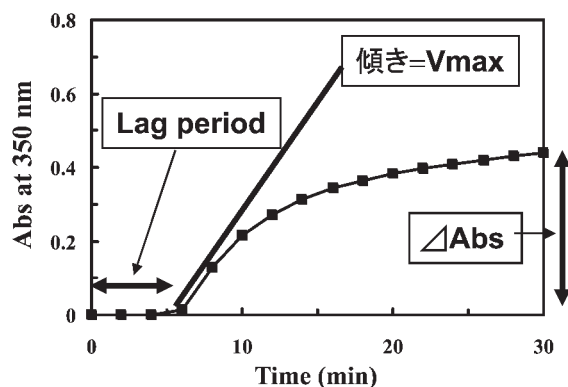
1957 年に Clauss VA によって報告されたトロンビン時間法¹¹⁾に基づく試薬と自動化装置を用いて実施されている。また、2001 年に日本臨床検査医学会標準委員会血液小委員会から委員会報告として「フィブリノゲン定量のための日常標準測定法 (案)」¹²⁾が提出されている。しかし、今回の症例とその検討結果から明らかになったことは、多くの Fbg 測定試薬が Clauss の方法に基づく試薬であると表現しているにもかかわらず、実際の試薬組成にはかなりの相違があることである。このように生物製剤による活性測定においては、学会などの公的団体による日常標準測定法の早期決定と標準物質の作成が重要であるが、なかなか進展が見られないのが現状である。

IV リコンビナントフィブリノゲンの作成とその機能検査 (Matsumoto I 変異を例として)

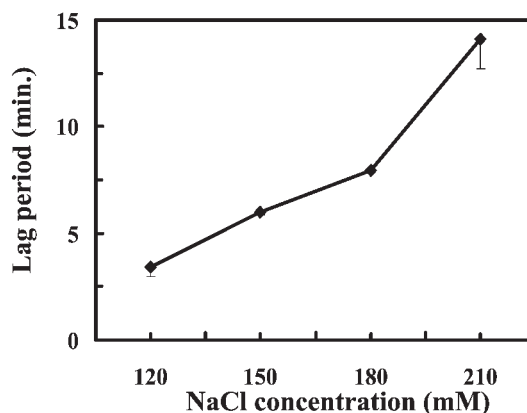
トロンビンによる Fbn 重合反応に関与する重要なアミノ酸は、A 鎖 16Arg と 17Gly (トロンビンによる切断部位と切断後のいわゆる“A” knob : 17Gly), B β 鎖 14Arg と 15Gly (トロンビンによる切断部位と切断後のいわゆる“B” knob : 15Gly), γ 鎖 329Gln, 330Asp, 340His, 364Asp (“A” knob の結合部, いわゆる“a” hole), B β 鎖 397Glu, 398Asp, 408His, 432Asp (“B” knob の結合部, いわゆる“b” hole), γ 鎖 275Arg (“D-D” 結合部位) である (図 1)。我々は幸運にも 1993 年“A” 反応基の結合部でも最も重要な残基である γ 鎖 364Asp の His 変異症例 (Matsumoto I) を経験し解析することが出来た。患者血漿中の Fbg を精製してトロンビンによる Fbn 重合反応を実施したところ、予想通り著しい低下が認められた¹³⁾。しかし、症例はヘテロ接合体であり、その血漿中 Fbg には正常-正常, 正常-異常, 異常-異常の 3 種類の二量体分子が存在しており、異常二量体分子の機能低下がどの程度であるかを明らかにすることは困難であった。このため、遺伝子工学によるリコンビナント Fbg の作成を開始した。

リコンビナント異常 Fbg は、正常 A α 鎖 cDNA と正常 B β 鎖 cDNA を有するプラスミドを安定化導入し細胞内で正常 A α 鎖と B β 鎖を産生するが細胞外へは分泌されない Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に、さらに γ 鎖 364His cDNA を有するプラスミドを安定化導入し、大量培養して産生させた。この γ 鎖 364His Fbg は驚くことに、予想に反して非常にゆっくりではあるがトロンビンにより重合反応をするこ

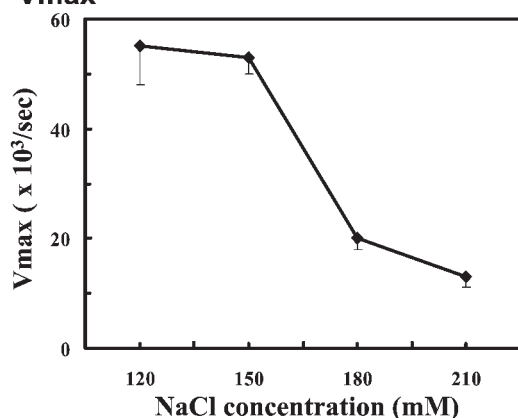
A: フィブリン重合反応曲線の解析項目



B: Lag period



C: Vmax



D: ΔAbs

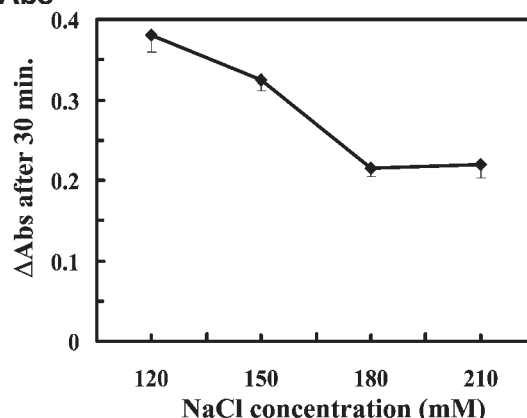


図2 正常人血漿フィブリノゲンのフィブリン重合反応における NaCl 濃度の影響

A: フィブリン重合反応曲線の解析と3つのパラメータ

B: Lag period C: Vmax D: 30分後のΔAbs

測定条件は、緩衝液: 0.02 M N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) (pH7.4), Ca: 1.0 mM, fibrinogen: 0.18 mg/ml, human thrombin: 0.05 U/ml, NaCl: 120-210 mM

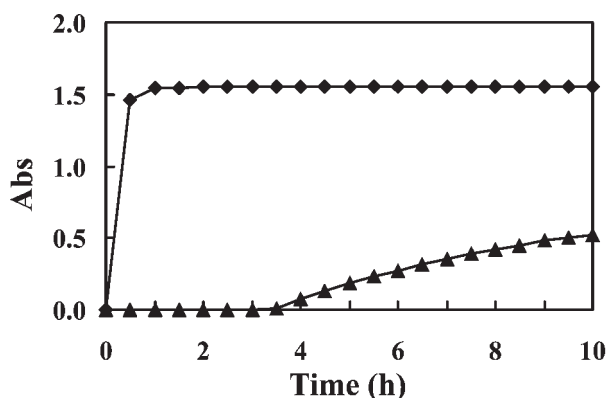
とが明らかになった (図3 A)。一方、トロンビンと異なり“A” knobだけを露出させる蛇毒レプテラーゼによる重合反応は、 γ 鎖364His Fbgにおいては長時間待っても起こらなかった (図3 B)¹⁴。そこで、“A” holeに異常を有するこのFbgはどのような結合によりFbnになるのかを明らかにするために、“A” knobアナログであるGly-Pro-Arg-Proと“B” knobアナログであるGly-His-Arg-Proの合成ペプチドによる抑制反応で解析した。この結果、正常Fbgでは1 mMのGly-His-Arg-Proで抑制されない反応が、 γ 鎖364His Fbgでは完全に抑制され、しかも濃度依存性であった (図4)¹⁴。このことから、 γ 鎖364Hisでは“A-a”結合の代替として“B-b”結合によりFbnが生じるものという結論に達した。このFbn網は走査型電子顕微鏡で観察すると正常のものに比較して約2倍の太さの直径を持つ線維であった。

このようなFbn形成における“B-b”結合は、正常なFbn形成においては“A-a”結合が初期反応で形成されるために必ずしも必要でないものと考えられる。

V フィブリノゲン組み立て・分泌における γ 鎖387Ileの重要性

1999年に我々は γ 鎖153Cys (C)がArg (R)に変化したヘテロ接合性変異である低Fbg血症、Fbg Matsumoto IV (M・IV)を報告した¹⁵。これは1塩基置換により1アミノ酸変異を生じることに起因する欠損症ヘテロ症例であり、欠損原因を分子生物学的に解明した世界初の報告であった。症例の血中Fbg濃度は活性量0.81 g/l、タンパク量0.87 g/l (基準範囲; 1.80-3.50 g/l)であった。低Fbg値を示す原因を明らかにするために、異常 γ 鎖cDNAを組み込んだプラスミドを正常A α 鎖とB β 鎖を発現しているCHO細胞

A: Thrombin



B: Reptilase

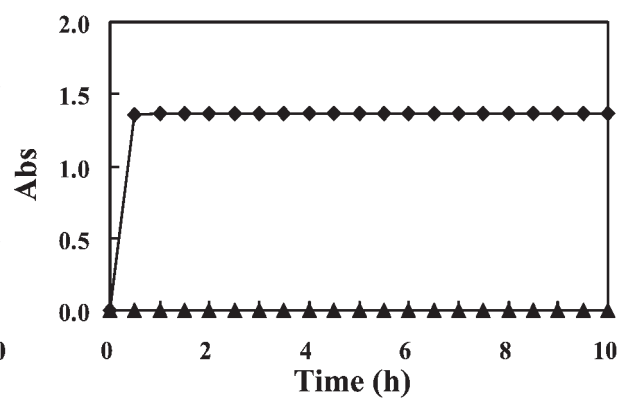
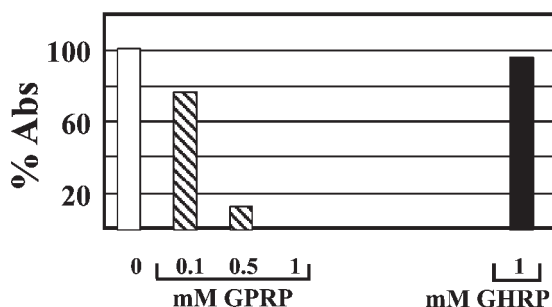


図3 リコンビナントフィブリノゲンのトロンビンとレプチラーゼによるフィブリン重合反応
 反応時の試薬最終濃度はフィブリノゲン濃度；0.45 mg/ml (normal：◆， γ 364His：▲)，トロンビン；0.05 U/ml (A)，レプチラーゼ；0.05 U/ml (B) である。

A: normal fibrinogen



B: γ 364H fibrinogen

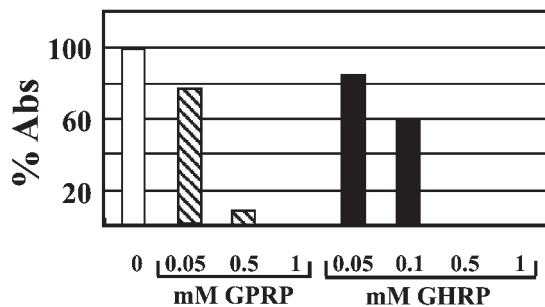


図4 合成ペプチド添加によるリコンビナントフィブリノゲンのフィブリン重合反応の抑制
 反応時の試薬最終濃度はフィブリノゲン濃度；0.45 mg/ml，トロンビン；0.05 U/ml である。
 合成ペプチド GPRP：Gly-Pro-Arg-Pro，合成ペプチド GHRP：Gly-His-Arg-Pro

胞へ安定化導入した。この細胞を用いて Fbg の組み立てと分泌を解析した結果， γ 鎖153R では異常 Fbg およびその中間複合体は細胞内にも培養上清にもまったく認められなかった¹⁵⁾。したがって， γ 鎖153C-182C による S-S 結合が破綻すると，D 領域の立体構造に大きな変化が生じ Fbg の組み立てが行われなことが明らかになった。

タンパク質の C 末端の構造が細胞外への分泌に重要であるという異常 Protein C の報告¹⁶⁾を参考に，我々は2002年に Fbg 分泌にとって γ 鎖のどこまでの長さが必要であるのかを検討し報告した¹⁷⁾。 γ 鎖411個のアミノ酸を C 末端側から徐々に短くして379個から406個までの9種類の長さの Fbg を生成するような変異プラスミド (pMLP- γ 406, 401, 395, 390, 387, 386, 385, 384, 379) を作製し，上述のように CHO

細胞へ導入し，細胞内での Fbg の生成量と培養液中への分泌量を測定した。その結果，387以上の長さの γ 鎖からなる Fbg は，ほぼ長さに依存した量が細胞内に生成され分泌されていたが，386以下の短い γ 鎖からなる Fbg は細胞内では極めて少量であり，分泌量は検出限界以下であった (図5)。これらの細胞内の Fbg 合成と組み立て状況をウェスタンブロッティング法により観察したところ，386以下の短い γ 鎖はいずれも細胞内では合成されているものの，Fbg 分子に組み立てられないことが明らかになった。したがって，386以下の短い γ 鎖は細胞内で Fbg に組み立てられないために細胞外に分泌できないことから， γ 387Ile は Fbg の組み立てに極めて重要であることが示唆された¹⁷⁾。 γ 鎖387Ile は構造的には D 領域中に存在する anti-parallel β シート (β 1- β 5) の β 4

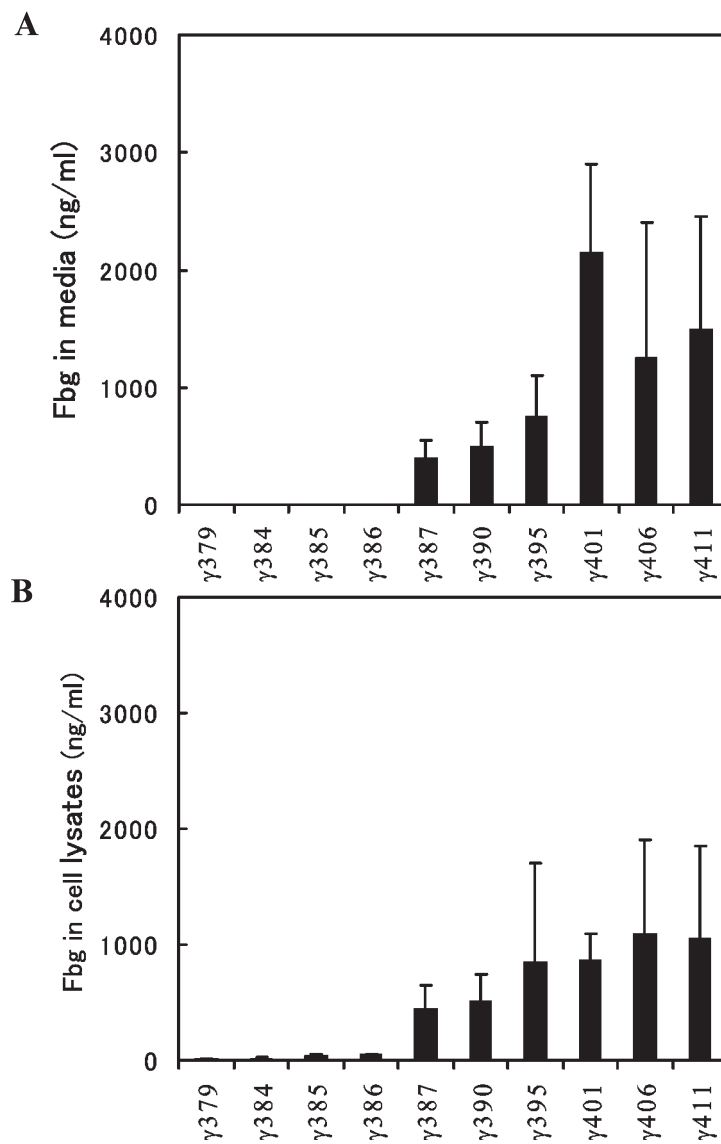


図5 C末端を短くしたγ鎖による変異Fbgの産生能

野生型γ鎖の411アミノ酸から406, 401, 395, 390, 387, 386, 385, 384, 379アミノ酸の長さまで短くしたγ鎖をChinese Hamster Ovary細胞に発現させ、培養液(A)と細胞内(B)のFbg濃度をELISAにより測定した。387残基以上の長さγ鎖を発現させた細胞では細胞内、培養液ともにFbgの存在が観察されたが、379から386アミノ酸までの長さγ鎖を発現させた細胞では細胞内にごくわずかに生成されていたが、培養液中には認められなかった。

ストランドの終了部分に位置していることが、X線構造解析により明らかになっている¹⁸⁾。

そこで、次に我々はγ鎖387アミノ酸側鎖の違いによるFbgの組み立て・分泌の相違について検討を行った。ヒトFbgγ鎖387アミノ酸を他の動物と比較してみると、ウシ、ラット、ニワトリはヒトと同じIle (I)であるが、ヤツメウナギではLeu (L)、カエルではMet (M)である。一方、ヒトのFbgBβ鎖はγ鎖と共通の祖先から分岐しホモロジーが高いが、γ鎖

387に相当するBβ鎖455アミノ酸はArg (R)である。以上より、IをR (+荷電), L, M, Ala (A; 対照), Asp (D) (対照, -荷電)の5種類に変化させたベクターを上述のように正常Aα鎖, Bβ鎖を発現しているCHO細胞へ安定化導入した¹⁹⁾。培養上清中および細胞溶解液のFbg濃度をELISA法により測定した結果を図6に示した。培養上清および細胞内ともに、γ387R, γ387L, γ387M, γ387Aの4種の変異Fbg濃度は、γ387I (wild type)と同等量か、またはそれ

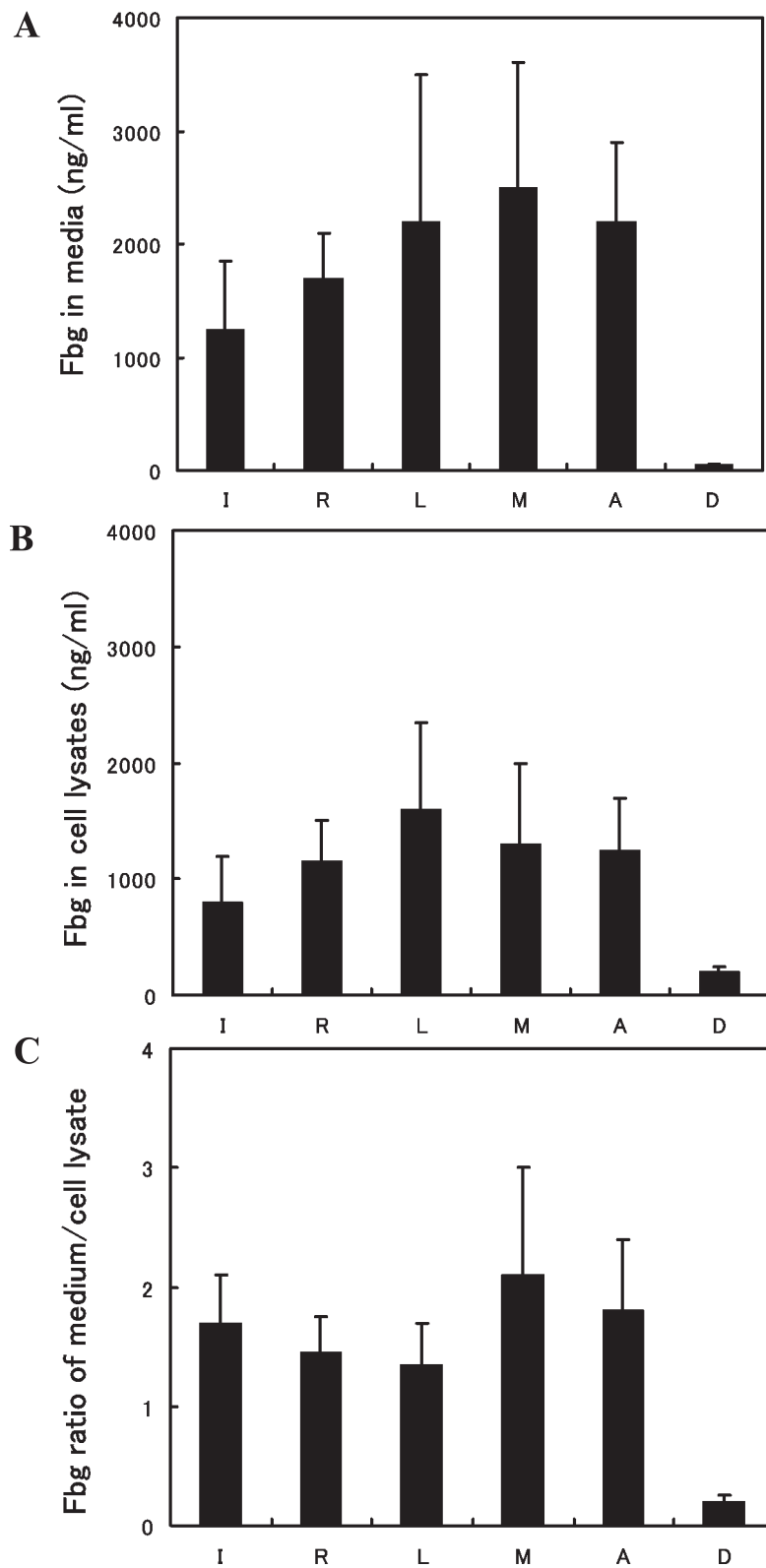


図6 387アミノ酸を変異させた γ 鎖によるFbgの産生能

野生型 γ 鎖の387IをR, L, M, A, Dに変異させ、培養液(A)と細胞内(B)のFbg濃度をELISAにより測定した。R, L, M, AではIの場合と同量かそれ以上に産生、分泌されていたが、Dでは極めて少量であった。細胞内Fbg濃度に対する培養液Fbg濃度の比を(C)に示した。

以上であった。ところが γ 387D は、 γ 387I の場合に比べて培養上清中では3.3%と極めて低く、細胞溶解液中では約30%程度であった。さらに、ウェスタンブロッティング法による細胞内の解析では、 γ 387D の変異 γ 鎖は細胞内で合成されているが、Fbg へと組み立てられる量が少ないために分泌量が少ないことが明らかになった。以上の結果は、Fbg の組み立てには387個のアミノ酸数が必須であるだけでなく、 γ 387残基(側鎖)の性質によって組み立て速度(あるいは量)が大きく異なることが示された¹⁹⁾。

VI フィブリノゲン異常症・欠損症患者の 治療と留意点

我々の経験では、Fbg 濃度が50-100 mg/dl あれば日常生活上で重大な出血症状を呈することはないと考えている。しかし、大手術や事故に備えて Fbg 異常症・欠損症の有無を精査しておくことは、健康管理上重要であると考えている。すなわち、大手術の時などには緊急の補充ができる状態にしておくことが肝要である。緊急の出血や手術に対しては血漿 Fbg 量が150~200 mg/dl であることが望ましい²⁰⁾。成人の場合には1 g の Fbg の輸注で血漿 Fbg 量は20 mg/dl 増加する。我々の症例中 Matsumoto II (表1) には出血症状が認められたが (Fbg 異常を有する家族3名中2名において)、これは Fbg 異常以外に他の凝固因子・線溶因子・血小板・血管などの要因によるものと考えている。

無 Fbg 血症の患者による報告では、Fbg は妊娠・着床には必要ではないが、妊娠の維持には必要で、補充療法を行わないと妊娠5週より出血が開始し、妊娠6~8週で自然流産となる。流産を防ぐためには血漿 Fbg 量は60 mg/dl 以上できれば100 mg/dl 以上に維持することが重要である。また、その他の時期の妊娠管理と出産管理については文献を参照いただきたい

い²⁰⁾。我々の Shizuoka 症例(異常症)と Matsumoto VIII 症例(欠損症)(表1)は繰り返す流産の原因ではないかと疑われて紹介されたものである。

VII おわりに

奥村が1993年春信州大学医学部附属病院中央検査部(現臨床検査部)から信州大学医療技術短期大学(現医学部保健学科)に赴任する直前に、後に異常 Fbg Matsumoto II として報告した症例の凝固スクリーニング検査を日常検査として測定したのが発端で、フィブリノゲン異常症の研究を開始した。しかし、その後経験した症例がいずれもヘテロ接合体であったため、異常 Fbg の真の機能を検討するためには遺伝子工学によるリコンビナント異常 Fbg の作成が不可欠であると考えて研究を進展させた。その間に、Fbg 低下症(無 Fbg 血症のヘテロ接合体)を経験し、分子生物学的に Fbg 欠損機序の解析も開始した。その後長野県内にとどまらず全国から症例の紹介をいただき、多様なアミノ酸異常や遺伝子異常を経験した。このような症例の解析を通じて遺伝子疾患の発生機序の多様性に驚くとともに、アミノ酸置換例をマッピングすることにより1,482個(モノマーとして)のアミノ酸からなる Fbg の機能の役割を解明している。Fbg の機能異常の解析を進展させることにより、新たな機序による凝固抑制薬の開発に通じるものと期待し、さらに Fbg 産生機序の解明は、他の3本のペプチドからなる血小板 GP II b/III a ($\alpha_{IIb}\beta_3$) や GP I b/IX などのヘテロトリマーやヘテロヘキサマー分子の欠損症の発生原因の解明に繋がるであろうと信じて研究を続けている。

最後に、貴重な症例をご紹介いただきました主治医の先生方および研究にご協力いただいた患者様・ご家族の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Doolittle RF, Bouma IH, Cottrell BA, Strong D, Watt KWK: The covalent structure of human fibrinogen. In: Bing DH (ed), The chemistry and physiology of the human plasma protein. pp 77-95, Pergamon Press, New York, 1979
- 2) Doolittle RF: Fibrinogen and fibrin. Sci Am 245: 92-101, 1981
- 3) Suh TT, Holmback K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, Potter SS, Degen JL: Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. Genes Dev 9: 2020-2033, 1995
- 4) Drew AF, Liu H, Davidson JM, Daugherty CC, Degen JL: Would-healing defects in mice lacking fibrinogen. Blood 97: 3691-3698, 2001
- 5) Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Paiva M, Kobayashi T, Ploplis VA, Castellino FJ: Fibrinogen stabilized placental-maternal attachment during embryonic development in the mice. Am J Pathol 160: 1021-1034, 2002

- 6) Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL: Spontaneous hematogeneous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res* 62: 6966-6972, 2002
- 7) Asselta R, Duga S, Tenchini ML: The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. *J Thromb Haemost* 4: 2115-2129, 2006
- 8) 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
- 9) 奥村伸生, 寺澤文字, 廣田雅子, 藤原祝子: フィブリノゲン. *検査と技術* 36: 707-715, 2008
- 10) Okumura N, Terasawa F, Hirota-Kawadobora M, Yamauchi K, Nakanishi K, Shiga S, Ichiyama S, Saito M, Kawai M, Nakahata T: A novel variant fibrinogen, deletion of B β 111Ser in coiled-coil region, affecting fibrin lateral aggregation. *Clin Chim Acta* 365: 160-167, 2006
- 11) Clauss VA: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 17: 237-246, 1957
- 12) 巽 典之: フィブリノゲン定量のための日常的標準測定法 (案) (解説). フィブリノゲン基準測定法 (案) 第1次, 第2次標準品の値付けのための測定法 (解説). *臨床病理* 49: 1273-1286, 2001
- 13) Okumura N, Furihata K, Terasawa F, Nakagoshi R, Ueno I, Katsuyama T: Fibrinogen Matsumoto I: a γ 364Asp \rightarrow His(GAT \rightarrow CAT) substitution associated with defective fibrin polymerization. *Thromb Haemost* 75: 887-891, 1996
- 14) Okumura N, Terasawa F, Haneishi A, Fujihara N, Hirota-Kawadobora M, Yamauchi K, Ota H, Lord ST: B: b interactions are essential for polymerization of variant fibrinogens with impaired holes 'a'. *J Thromb Haemost* 5: 2352-2359, 2007
- 15) Terasawa F, Okumura N, Kitano K, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M, Lord ST: Hypofibrinogenemia associated with a heterozygous missense mutation γ 153Cys to Arg (Matsumoto IV): In vitro expression demonstrates defective secretion of the variant fibrinogen. *Blood* 94: 4122-4131, 1999
- 16) Katsumi A, Senda T, Yamashita Y, Yamazaki T, Hamaguchi M, Kojima T, Kobayashi S, Saito H: Protein C Nagoya, an elongated mutant of protein C, is retained within the endoplasmic reticulum and is associated with GRP78 and GRP94. *Blood* 87: 4164-4175, 1996
- 17) Okumura N, Terasawa F, Tanaka H, Hirota M, Ota H, Kitano K, Kiyosawa K, Lord ST: Analysis of fibrinogen γ -chain truncations shows the C-terminus, particularly γ Ile387, is essential for assembly and secretion of this multichain protein. *Blood* 99: 3654-3660, 2002
- 18) Pratt KP, Cote HCF, Chung DW, Stenkamp RE, Davie EW: The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal fragment complexed with peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7176-7181, 1997
- 19) Kani S, Terasawa F, Yamauchi K, Tozuka M, Okumura N: Analysis of fibrinogen variants at γ 387Ile shows that the side chain of γ 387 and the tertiary structure of the γ C-terminal tail are important not only for assembly and secretion of fibrinogen but also for lateral aggregation of protofibrils and XIII-catalyzed γ - γ dimer formation. *Blood* 108: 1887-1894, 2006
- 20) 小林隆夫: 先天性凝固異常と妊娠・分娩 無 (低および異常) フィブリノゲン血症. 小林隆夫, 水上尚典, 白幡 聡 (編), 周産期の出血と血栓症, その基礎と臨床, pp 117-121, 金原出版, 東京, 2004

(H 21. 5. 15 受稿)