◆ 原 著 ◆

虚血性心疾患における血漿 fibulin-1 の変化

川 田 和 秀^{*1}, 田 中 朝 志^{*1}, 新 井 盛 夫^{*1}W. Scott Argraves^{*2}, 福 武 勝 幸^{*1}

Fibulin-1 は血漿や結合組織に存在する細胞外マトリクス蛋白質である。血漿中での働きは明らかでないが、fibrinogen と結合することや、fibrin への取り込みが認められており、血栓形成への関与が示唆されている。生体内での fibulin-1 の機能を解明する糸口として血漿 fibulin-1 濃度測定系を組み立て、種々の疾患群において検討した。健康成人 16 例、外来通院中の安定狭心症 (s-AP) 32 例、不安定狭心症 (u-AP) 17 例、急性心筋梗塞 (AMI) 14 例、播種性血管内凝固症候群 (DIC) 11 例、PT 延長をみとめる肝疾患 7 例の血漿中 fibulin-1 の濃度を測定した。測定は、fibulin-1 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を用いた。本測定は基礎的検討において、同時再現性は CV 2.5% から 3.1%、日差再現性は CV 6.1% から 7.1% と良好であった。臨床的検討としては、健康成人群の血漿中 Fibulin-1 の濃度 $33.2 \pm 11.4 \mu\text{g/ml}$ (mean $\pm$ SD) に対して、u-AP 群 $19.7 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ 、AMI 群 $16.4 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ と有意に低値であった ($p < 0.01$) が、その他の疾患群で差異はみられなかった。u-AP や AMI のような急性冠症候群の際には粥状硬化領域への血中 fibulin-1 の移行や病変部位での代謝の亢進、fibulin-1 産生細胞の変化などが推定された。今後、fibulin-1 の組織中での動態を含め、動脈硬化の危険因子もつ各種病態の血中 fibulin-1 のさらなる検討が必要である。

Key words: fibulin-1, extracellular matrix, acute coronary syndrome, ELISA, thrombosis

結 言

Fibulin-1 は分子量 79000 で、fibronectin, vitronectin, von Willebrand 因子 (vWF) などと同様に血中にも比較的多く存在する細胞外マトリクス蛋白質である¹⁾²⁾。平滑筋細胞、線維芽細胞、肝細胞などで産生され、ヒトのほとんどの組織中に存在する³⁾。Fibulin-1 の組織中でのリガンドには laminin⁴⁾、nidogen⁴⁾、collagen⁴⁾、fibronectin⁵⁾ などがあり、血中のリガンドには fibrinogen⁶⁾ が挙げられる。In vivo の機能としては心血管系、骨格系、神経系の発生にかかわ

ることが示され^{7)~9)}、in vitro では fibrin monomer の重合を抑制し、fibrin 構築を修飾することなどが示されている⁶⁾。これらの多様な機能の発現は、fibulin-1 の立体構造の変化が柔軟性に富んでいることに密接に関係しているとされている。しかし、fibulin-1 のヒト生体内での機能の詳細は不明であり、今回その糸口を探る目的で fibulin-1 の血中濃度測定系を組み立て、安定狭心症、不安定狭心症、急性心筋梗塞、播種性血管内凝固症候群、PT 延長をみとめる肝疾患などの疾患群と、健康成人群との血漿中 fibulin-1 濃度の比較検討を行った。

^{*1} 東京医科大学臨床病理学教室 [〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1]

Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical University [6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan.]

^{*2} Cell Biology and Anatomy Department, Medical University of South Carolina [171 Ashley Ave, Charleston, SC 29425-2204, USA]

TEL 03-3342-6111 内線 5086 FAX 03-3340-5448 E-mail kawata@tokyo-med.ac.jp

受付: 2000. 11. 15, 受理: 2001. 2. 13

対 象

健康成人男性 8 例, 女性 8 例計 16 例, 安定狭心症 (s-AP) 32 例, 不安定狭心症 (u-AP) 17 例, 急性心筋梗塞 (AMI) 14 例, 固形癌, 敗血症, 妊娠中毒症を基礎疾患とし, 厚生省の診断基準でスコア 7 点以上の播種性血管内凝固症候群 (DIC) 11 例, 基準値の 1.5 倍以上の PT 延長を認める肝硬変 7 例を対象とした。なお, 安定狭心症症例は発作時に心電図上有意な ST 変化を認め, 発作回数, 持続時間, 胸痛の程度が安定していたもの, 不安定狭心症症例は狭心症症状が重症化し, 軽い労作での胸痛出現や持続時間の 15 分以上への延長などを認めて入院したものの, 急性心筋梗塞は胸痛発作があり, 心電図にて Q 波が出現し, CPK 等の心筋逸脱酵素の上昇を認めたものとした。

材料および方法

検体は 3.2% クエン酸ナトリウム入り試験管にて採血した静脈血を 4°C, 3,000 rpm で 20 分間遠心分離して得られた血漿を -80°C で凍結保存し, 測定時に解凍して用いた。

Fibulin-1 に対する抗体はモノクローナル抗体 (3A11) およびポリクローナル抗体 (rb2954) を使用した。まず 3A11 を 30 mM Na_2CO_3 , 70 mM NaHCO_3 , pH 9.5 にて 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し, 96 穴マイクロタイタープレートに 100 μl づつ加え, 4°C, 18 時間静置して固相化した。各ウェルをブロックエース (大日本製薬, 東京) でブロッキング後, 患者血漿を 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 1% BSA, pH 7.4 (TBS-T) で 500 倍希釈し, 100 μl をウェルに添加後室温で 2 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後, 二次抗体として抗 fibulin-1 ポリクローナル抗体 (rb2954) を TBS-T にて 500 倍希釈し, 100 μl づつ添加後室温で 1 時間反応させた。TBS-T

で 3 回洗浄後, TBS-T にて 3,000 倍希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Tago 社, CA, USA) を 100 μl づつ添加後室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後, TBS-T にて 5,000 倍希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ (Life Technologies 社, MD, USA) を添加後室温で 30 分反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後 2,2'-azino-bis-ethylbenz-thiazoline sulfonic acid を基質として発色させた。10 分後, 2 N 硫酸にて反応を停止し, 405 nm の吸光度を測定した。標準物質として用いた fibulin-1 はヒト胎盤より免疫吸着クロマトグラフィーを用いて純化精製し⁵⁾, 色素結合法によりニワトリオボアルブミン換算にして濃度を求めた。

成 績

1. Fibulin-1 測定法の検討

精製 fibulin-1 の希釈列を作りそれぞれ 10 回同時測定したところ, 濃度依存性の検量曲線が得られた。2 SD の幅で区別可能な値としての測定範囲は 3.0~120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった (Fig. 1)。低, 中, 高濃度の検体をそれぞれ 10 回同時測定して, fibulin-1 濃度の平均値 (mean), 標準偏差 (standard deviation: SD), 変動係数 (coefficient of variation: CV) を求めた。同時再現性は, CV 2.5% から 3.1% であった (Table 1)。日差再現性については 10 日間, 低, 中, 高濃度の検体をおのおの 10 回同時測定したところ CV は 6.1% から 7.1% であった (Table 2)。

2. 臨床的検討

Fibulin-1 の血漿中濃度は, 健康成人群 $33.2 \pm 11.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Mean $\pm$ SD), 男女別では男性 $32.1 \pm 14.9 \mu\text{g}/\text{ml}$, 女性 $34.3 \pm 7.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で, 男女間に有意差は認めなかった。各疾患においては, s-AP 群 $31.0 \pm 8.7 \mu\text{g}/\text{ml}$, u-AP 群 $19.7 \pm 5.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, AMI 群 $16.4 \pm 4.9 \mu\text{g}/\text{ml}$, DIC 群 $30.5 \pm 11.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, 肝疾患群 $26.7 \pm 6.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。健康群と比べ u-AP 群および AMI 群では有意な低値を示した

Fig. 1 Dose response curve of fibulin-1

Purified fibulin-1 of a series of diluted TBS-T was measured. Each point and bar represents mean $\pm$ 2 SD of 6 measurements. Dose-response curve appeared sigmoid in which the range of the assay was 3.0~120 μ g/ml.

Table 1 Intra-assay reproducibility of plasma fibulin-1 concentration (n=10)

	sample		
	low	moderate	high
mean (μ g/ml)	15.39	30.38	70.60
SD	0.39	0.93	2.20
CV%	2.50	3.05	3.12

Table 2 Inter-assay reproducibility of plasma fibulin-1 concentration

assay	Fibulin-1 (μ g/ml)		
	low	moderate	high
day 1	14.55	31.14	75.56
day 2	15.88	27.90	71.75
day 3	14.55	30.59	84.67
day 4	13.88	33.26	85.14
day 5	15.06	30.77	80.91
day 6	14.85	27.45	70.70
day 7	17.71	30.25	75.30
day 8	16.32	33.07	75.88
day 9	15.03	31.01	75.88
day 10	15.39	30.38	70.60
mean (μ g/ml)	15.32	30.58	76.64
SD	1.09	1.86	5.32
CV%	7.11	6.07	6.94

($p < 0.01$). u-AP 群と AMI 群の間に有意差はみられなかった。s-AP 群, DIC 群, 肝疾患群では, 健常群に比べて有意な変化はみられなかった (Fig. 2)。また DIC 群において, plasminogen, fibrinogen, antithrombin, FDP, thrombin-antithrombin complex (TAT), plasmin-plasmin inhibitor complex (PIC), thrombomodulin (TM) といったほかの凝固, 線溶系因子との関連を調べたところ有意な相関を示すものはみられなかった。

考 案

Fibronectin などのマトリクス蛋白質を抗原として測定する場合, 温度などの溶液の条件の違いにより立体構造が変化し, 抗原性に差異の出ることが指摘されている¹⁰⁾¹¹⁾。しかし本測定の基礎的検討において同時再現性, 日差再現性は良好であり, 測定中の fibulin-1 の抗原性は安定していると考えられた。各疾患群と健常成人群との血中濃度平均値の差異について検討したところ, u-AP 群と AMI 群では有意な低値を示

Fig. 2 Plasma fibulin-1 values in various diseases

The subjects were 16 healthy adults, 11 patients with disseminated intravascular coagulation (DIC), 17 with unstable angina pectoris (u-AP), 32 with stable angina pectoris (s-AP), 14 with acute myocardial infarction (AMI), and 7 with liver diseases (LD).

The plasma level of fibulin-1 was $33.2 \pm 11.4 \mu\text{g/ml}$ (Mean $\pm$ SD) in the group of healthy adults, $30.5 \pm 11.2 \mu\text{g/ml}$ in the DIC group, $19.7 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ in the u-AP group, $31.0 \pm 8.7 \mu\text{g/ml}$ in the s-AP group, $16.4 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ in the AMI group and $26.7 \pm 6.0 \mu\text{g/ml}$ in the LD group. The values in the u-AP and AMI groups were significantly lower compared to the group of healthy adults ($p < 0.01$), but no significant difference was observed in the case of other disease groups.

したが、s-AP 群、DIC 群、肝疾患群では有意差はみられなかった。AMI や u-AP などのいわゆる急性冠症候群 (acute coronary syndrome)¹²⁾¹³⁾ は、粥状硬化巣 (プラーク) の破綻とそれに続く血栓形成を基に発生するとされる^{14)~17)}。血栓形成とそれに伴う冠動脈内腔閉塞の程度により、病態は u-AP にも AMI にもなりうる。破綻を起こしやすい不安定なプラークはマクロファージを主とする炎症細胞に富み、菲薄な線維性被膜を有する lipid-rich plaque である。Fibulin-1 は粥状動脈硬化巣に付随して存在する新鮮な血栓中に強い沈着像を認めており、*in vivo* の血栓形成に関与することが示唆されている⁶⁾。これは fibulin-1 と fibrinogen、血小板との相互作用に基くものと考えられている。*In vitro* で線維芽細胞を培養して形成されたマ

トリクス表面への fibrinogen 存在下での血小板粘着は、fibulin-1 に対する抗体で約 30% 抑制されることが示されており、プラークの破綻などにより内皮下のマトリクス蛋白が露出するような状況では、血栓形成の初期段階から fibulin-1 が関与する可能性がある¹⁸⁾。さらに fibulin-1 はメタロプロテアーゼ、トロンビン、プラスミン等の蛋白分解酵素に対して影響を受けにくい、血栓を形成する過程で強固な足場を作るには好都合と思われる。

急性冠症候群における凝固線溶系因子の変動は、tissue factor¹⁹⁾、factor VIII、fibrinogen²⁰⁾²¹⁾、von Willebrand factor^{22)~24)} が増加する一方で、凝固制御系の antithrombin、protein C、 α_2 -macroglobulin には有意な変化はみられない²⁰⁾²⁵⁾。また線溶系では tissue-type

plasminogen activator (tPA), PIC, D-dimer, α_2 plasmin inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は増加することが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。このように凝固・線溶系は亢進状態にあることが示唆され、増加する因子が多いが、血小板数の変化については一定した見解がない^{20)28)~30)}。

細胞外マトリクス蛋白は一般的に細胞接着・移動、胚発生、創傷治癒、血栓形成、血管新生など多くの役割を担うが、互いに重複する点が多く、それぞれの協調的・相補的作用により、全体としての機能が営まれると想定されている。この想定は各種のノックアウトマウスより得られた知見からも支持される。例えば、vitronectin³¹⁾や PAI-1³²⁾³³⁾のノックアウトマウスでは発生・成長段階で異常を認めず、出血傾向もみられなかったため、ほかの因子がこれらの機能を代償していることが示唆された。また、tPA と urokinase-type plasminogen activator のノックアウトマウスでは、どちらか一方のみの欠損では軽度の血栓形成傾向を示すのみだが、両者を欠損したダブルノックアウトマウスでは重篤な特発性血栓症を認めることが報告されている³⁴⁾。一方、fibronectin の欠損マウスは主に心臓および血管の発達不全により胎生期中に全て死亡しており³⁵⁾、機能の根幹を司るマトリクス蛋白は必要不可欠なものもある。Fibulin-1 も胎生期には心内膜に存在し fibronectin と共同で心血管系の発生に関わると考えられており、マトリクス中の蛋白質としても重要な機能を担っているようである。

本研究では、AMI, u-AP において血漿 fibulin-1 濃度の低下がみられたが、これが冠動脈内の血栓形成に積極的に参画することによる消費を反映したものであるかは不明である。また、ほかの凝固・線溶系因子で血中濃度が低下するものはみられず、全身性に微小血栓が多発する DIC では、fibulin-1 の有意な低下はみられなかったため、血栓形成による消費以外の機構が関与していたと考えられる。すなわち、

fibulin-1 の産生低下、血中分布の変化や代謝の亢進等が大きく影響していた可能性がある。自験例では免疫組織染色においてヒト冠動脈の粥状硬化領域に fibulin-1 の強い沈着を示す部位があり、この部位での組織の再構築に関わる所見が得られている(未発表データ)。従って、急性冠症候群の際には粥状硬化領域への血中 fibulin-1 の移行や組織中での代謝の亢進、fibulin-1 産生細胞の変化などが推定できる。なお、fibulin-1 産生細胞には肝細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞が挙げられるが、肝での蛋白合成能の低下した肝疾患群において血中 fibulin-1 濃度の低下はみられず、血中 fibulin-1 の主要産生細胞は肝細胞以外が想定される。今後は fibulin-1 の組織中での動態を含めて、動脈硬化の危険因子である各種の病態の血中 fibulin-1 の検討が必要であろう。

結 語

1) ELISA 法による血漿中の fibulin-1 測定法を確立した。

2) 疾患別における血漿 fibulin-1 濃度は、u-AP 群と AMI 群において有意に低値であり、急性冠症候群における fibulin-1 の関与が推測された。

3) 肝疾患群、DIC 群における有意な変化はみられなかった。また DIC 群におけるほかの凝固線溶系マーカー (fibrinogen, plasminogen, antithrombin, FDP, TAT, PIC) との相関は認めなかった。

文 献

- 1) Argraves WS, Dickerson K, Burgess WH, Ruoslahti E: Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor β subunit cytoplasmic domain. *Cell* 58: 623-629, 1989.
- 2) Argraves WS, Tran H, Burgess WH, Dickerson K: Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J Cell Biol* 111: 3155-3164, 1990.
- 3) Roark EF, Keene DR, Haudenschild CC, Goddyna S,

- Little CD, Argraves WS: The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J Hist Cytochem* **43**: 401-411, 1995.
- 4) Pan TC, Kluge M, Zhanag RZ, Mayer U, Timpl R, Chu ML: Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *Eur J Biochem* **215**: 733-740, 1993.
 - 5) Balbona K, Tran H, Godyna S, Ingham KC, Strickland DK, Argraves WS: Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J Biol Chem* **267**: 20120-20125, 1992.
 - 6) Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschild CC, Argraves WS: The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* **270**: 19458-19464, 1995.
 - 7) Spence SG, Argraves WS, Walters L, Hungerford JE, Little CD: Fibulin is localized at sites of epithelial-mesenchymal transitions in the early avian embryo. *Develop Biol* **151**: 473-484, 1992.
 - 8) Zhang HY, Chu ML, Pan TC, Sasaki T, Timpl R, Ekblom P: Extracellular matrix protein fibulin-2 is expressed in the embryonic endocardial cushion tissue and is a prominent component of valves in adult heart. *Develop Biol* **167**: 18-26, 1995.
 - 9) Miosge N, Götz W, Sasaki T, Chu ML, Timpl R, Herken R: The extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 in the early human embryo. *Histochem J* **28**: 109-116, 1996.
 - 10) Brubaker DB, Blick KE, Romine M: Four immunoassay methods and standards compared for measuring fibronectin. *Clin Chem* **33**: 126-129, 1987.
 - 11) Katayama M, Hino F, Kamihagi K, Sekiguchi K, Titani K, Kato I: Urinary fibronectin fragments (a potential tumor marker) measured by immunoenzymometric assay with domain-specific monoclonal antibodies. *Clin Chem* **37**: 466-471, 1991.
 - 12) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* **326**: 242-250, 1992.
 - 13) Edwards WD: Atherosclerotic plaques: Natural and unnatural history. *Cardiovascular Pathology*, in Schoen FJ, Gimborne MA (eds), *Clinicopathologic Correlations and Pathogenetic Mechanisms*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1995, 12-46.
 - 14) Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T, Kurita A, Nakamura H, Ambrose JA: Angioscopic evaluation of coronary artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* **326**: 287-291, 1992.
 - 15) van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Tigges AJ, Das PK: Fibrous and lipid-rich atherosclerotic plaques are part of interchangeable morphologies related to inflammation: a concept. *Coron Artery Dis* **5**: 463-469, 1994.
 - 16) Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* **53**: 363-373, 1985.
 - 17) Falk F: Unstable angina with fatal outcome—dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death—autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* **71**: 699-708, 1985.
 - 18) Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS: Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. *Blood* **88**: 2569-2577, 1996.
 - 19) Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K: Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* **99**: 2908-2913, 1999.
 - 20) Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE: Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* **96**: 1102-1108, 1997.
 - 21) Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG: Hemostatic function and ischemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* **2**: 533-537, 1986.
 - 22) Cortellaro M, Boschetti C, Cofrancesco E, Zanussi C, Catalano M, de Gaetano G, Gabrielli L, Lombardi B, Specchia G, Tavazzi L. The PLAT Study: hemostatic function in relation to atherothrombotic ischemic events in vascular disease patients: principal results. *Arterioscler Thromb* **12**: 1063-1070, 1992.
 - 23) Jansson J-H, Nilsson TK, Johnson O: von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J* **66**: 351-355, 1991.
 - 24) Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JC: Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* **332**: 635-641, 1995.
 - 25) Rennie JAN, Crawford GPM, Ogston D: Changes in protease inhibitors after acute myocardial infarction. *J Clin Pathol* **29**: 639-641, 1976.
 - 26) Bayés-Genís A, Guindo J, Oliver A, Badimon L, Fiol M, Mateo J, Souto JC, Dominguez JM, Fontcuberta J, de Luna AB: Elevated levels of plasmin- α 2 antiplasmin complexes in unstable angina. *Thromb Haemost* **81**: 865-868, 1999.
 - 27) Thøgersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G: High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: Evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* **98**: 2241-2247, 1998.
 - 28) Cameron HA, Phillips R, Ibbotson RM, Carson PHM: Platelet size in myocardial infarction. *Br Med J* **287**: 449-451, 1983.
 - 29) Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB: Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: the Framingham Study. *JAMA* **258**: 1183-1186, 1987.
 - 30) Meade TW, North WRS, Chakrabarti R, Stirling Y, Haines AP, Thompson SG, Brozovic M: Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet* **1**: 1050-1054, 1980.
 - 31) Zheng X, Saunders TL, Camper SA, Samuelson LC, Ginsburg D: Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc Natl*

- Acad Sci USA **92**: 12426-12430, 1995.
- 32) Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, ReamB, Nuffelen AV, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest* **92**: 2746-2755, 1993.
- 33) Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, ReamB, van den Oord JJ, De Mol M, Mulligan RC, Collen D: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice II. Effect on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest* **92**: 2756-2760, 1993.
- 34) Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, ReamB, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC: Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**: 419-424, 1994.
- 35) George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO: Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119**: 1079-1091, 1993.

Alteration of Plasma Fibulin-1 Concentrations in Ischemic Heart Diseases

Kazuhide KAWATA*¹, Asashi TANAKA*¹, Morio ARAI*¹, W. Scott ARGRAVES*²
and Katsuyuki FUKUTAKE*¹

Key words: fibulin-1, extracellular matrix, acute coronary syndrome, ELISA, thrombosis

Fibulin-1 is a protein existing in extracellular matrices and plasma. Although its role is still undefined, binding to fibrinogen and incorporation into fibrin clots seem to suggest its participation in the thrombus formation and its propagation. In this study, we established a sandwich ELISA utilizing a monoclonal and a polyclonal antibody against fibulin-1 as the capture and the second antibody, respectively, and measured fibulin-1 in plasma of patients with various diseases. They include 32 outpatients with stable angina pectoris (s-AP), 17 inpatients with unstable angina pectoris (u-AP), 14 with acute myocardial infarction (AMI), 11 with the disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC), and 7 with a liver disease characterized by marked prolongation of the prothrombin time. As control, 16 normal healthy volunteers were enlisted. The sandwich ELISA was shown to have satisfactory coefficients of variation, the within-run and the between-run being 2.5~3.1% and 6.1~7.1%, respectively. As compared with the plasma fibulin-1 level in the control group: $33.2 \pm 11.4 \mu\text{g/ml}$ (mean + SD), the fibulin-1 level in plasma was significantly decreased in u-AP: $19.7 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ and AMI: $16.4 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ (both $p < 0.01$), whereas no significant decrease was noted in other diseases. In acute coronary diseases such as u-AP and AMI, plasma fibulin-1 may be transferred to and consumed in or around the atherosclerotic lesions, and may also deteriorate the fibulin-1 producing cells. Thus, it seems worthwhile to see the behaviors of this protein in plasma and tissues in various disease conditions for the better understanding of the role of this protein under physiological and pathological conditions, in particular, associated with a higher risk factor for arteriosclerotic diseases.