SDS-ゲル電気泳動法による血中 fibrinogen derivatives の観察

吉岡加寿夫* 山本 隆* 村田 了悟* 宮田 曠*

Characterization of fibrinogen derivatives in sera from normal children and from patients with coagulopathy

Kazuo YOSHIOKA*, Takashi YAMAMOTO*, Ryogo MURATA*
and Hiroshi MIYATA*

Key words: fibrinogen derivatives, D-dimer, disseminated intravascular coagulation

Fibrinogen derivatives (FD) in sera from normal children and from patients with coagulopathy were characterized using a method of immunoabsorption followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoretic bands with antigenic capacity against anti-fibrinogen serum were identified by their molecular weights, and classified as follows: high molecular weight fibrinogen complexes (HMWFC), fragments X, Y, D, E, D-dimer and others. Their concentrations and proportions to total serum FD in normal children (N=20) were shown in Table 2. D-dimer, derived from crosslinked fibrin, and HMWFC were markedly elevated in patients with disseminated intravascular coagulation (DIC). Proportions of D-dimer and HMWFC were raised in Henoch-Schönlein purpura and in rapidly progressive glomerulonephritis, and concentrations of D-dimer and HMWFC were increased in nephrotic syndrome. Using this technique, it may be possible to discriminate between DIC and primary fibrinolysis, and to detect changes in the blood coagulation and fibrinolysis systems in patients with various forms of coagulopathy.

緒 言

循環血中の FDP (fibrin/fibrinogen degradation products) がフィブリノゲン由来である

か、それともフィブリン由来であるかを鑑別して、生体内での線溶が一次線溶によるものか、あるいは二次線溶によるものかを知ることが DIC (disseminated intravascular coagulation)

* 近畿大学医学部小児科 [〒589 大阪府南河内郡狭山町西山380], Department of Pediatrics, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan.

の病態の把握やその治療法の決定にきわめて重要なことである。今回著者らは、健康小児と出血性・血栓性疾患患者を対象として、Laneら¹⁾の方法にしたがって FDP の分画と high molecular weight fibrinogen complexes (HMWFC) を測定した。

I. 対象および方法

対象は、表 2 に示した計19例の小児であり、また年齢が 1 歳から15歳の健康小児計20名を正常対照とした。

被験血清は、採血後ただちに 終濃度 として 500 KIEU/ml のアプロチニンと 10 NIHU/ml のトロンビンを加えて得た。

血清中の全 FD の測定はラテックス凝集法(帝国臓器, FDPL テスト)によった。

血清中の FD 分画の測定は Lane ら¹⁾の方法に準じて行なった。すなわち、精製した抗フィブリノゲン血清 5mg を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) 1g の割合で固定化し、免疫吸着体とした。この免疫吸着体0.4ml に 30μg の FD を含む被験血清を加えた。8M urea-2% SDS 溶液0.2mlを加えて FD を遊離させ、この上澄 50μl を 5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、0.5% アミドブラックにて染色し、脱色ののちデンストメト

Table 1 Binding capacity of immunoabsorbent and recovery of FD after immunoabsorption

Sample	Binding capacity (μg/ml)	Recovery (%)
Fibrinogen	85	75
Fibrinogen digest		
Fragment X	75	73
Fragment Y	75	82
Fragment D	25	38
Fragment E	7.5	15
Fibrin digest		
Fragment D-dimer	75	64

リーして FD 分画の比率を求めた。

II. 成 績

1. 免疫吸着体の FD 吸着能と、免疫吸着—SDS-ゲル電気泳動後のFDの回収率の検討

フィブリノゲンと FD 分画 (X, Y, D, E, D-dimer) を検体として、免疫吸着の前後でその濃度をラテックス凝集法にて測定し吸着能をみた結果が表 1 である。次に、吸着能の範囲内の濃度のフィブリノゲンと FD 分画を検体として、本法における FD の回収率を検討した (表 1)。

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of FD immunoabsorbed from serum. A: (a) FD marker, (b) normal chid, (c) patient with DIC B: (a) FD marker, (b) patient with DIC

Table 2 A Fibrinogen derivatives in sera from normal children and patients

	No.	Age (yr)	Sex (M/F)	Total Serum FD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		FD							
						HMWFC	X	Y	D	E	D-dimer	others	
Normal children	20	8.0	10/10	3.5 ± 4.1	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.13	0.13	1.4	0.74	0.66	0.23	0.25	
						± 0.04	± 0.06	± 0.18	± 0.14	± 0.13	± 0.07	± 0.06	
						Percentage of total serum FD	3.8 ± 1.7	3.7 ± 2.3	39 ± 6.6	21 ± 4.9	19 ± 4.6	6.7 ± 2.6	7.2 ± 2.1
Henoch-Schönlein purpura	5	8.6	3/2	14 ± 4.2	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.96	0.62	4.2	3.1	2.0	1.9	1.2	
						± 0.38	± 0.58	± 2.6	± 1.5	± 1.5	± 0.58	± 0.47	
Rapidly progressive glomerulonephritis	4	10	4/0	20 ± 3.7		2.5	1.3	3.5	2.3	4.8	4.1	1.7	
						± 2.9	± 1.1	± 1.9	± 1.1	± 4.0	± 2.9	± 0.81	
Nephrotic syndrome	6	7.0	5/1	10 ± 2.7		1.9	0.57	1.7	1.9	1.8	1.2	0.83	
						± 1.1	± 0.29	± 2.0	± 1.9	± 1.9	± 0.94	± 0.29	

B Fibrinogen derivatives in sera from patients with DIC

Patient No.	Age (yr)	Sex	Diagnosis	Plasma fibrinogen ($\text{mg}/100\text{mL}$)	Total Serum FD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	FD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
						HMWFC	X	Y	D	E	D-dimer	others	
1	1	M	Neuroblastoma	150	40	6.0	1.2	11.6	3.2	4.4	8.8	4.8	
2	11	F	Septicemia (Salmonella)	200	20	2.0	0.8	5.2	4.0	1.8	3.4	2.8	
3	10	F	ALL	370	30	3.6	1.8	1.2	6.6	4.2	8.7	3.9	
4 (June 28)	2	M	ALL, Septicemia	125	320	41	7.0	67	54	77	42	32	
(July 11)				555	20	11	0.8	1.0	1.4	1.2	2.4	2.2	

2. 正常小児における血清中の FD 分画の測定

血清中の FD を HMWFC, X, Y, D, E, D-dimer, その他の計 7 分画に分けて, おおのの濃度と比率を正常小児でみたものが表 2-A である. フィブリノゲンよりも分子量の大きい蛋白を HMWFC と総称した (図 1).

3. 出血性・血栓性疾患における血清中 FD 分画の観察

DIC の 4 例では, 各分画の濃度はいずれも著明に増加しており, 比率で見ると, とくに HMWFC と D-dimer の上昇が認められた (表 2-B). 図 1-A(c) は 神経芽細胞腫に合併した DIC の 1 歳, 男児例であり, 図 1-B(b) は 急性リンパ芽球性白血病に合併した DIC の 10 歳, 女児例である.

Henoch-Schönlein 紫斑病 と 急速進行性腎炎

では, 全 FD 分画の絶対量の増加と, D-dimer, HMWFC の比率の上昇が認められ, ネフローゼ症候群では HMWFC と D-dimer が増加していた (表 2-A).

III. 考 察

著者らは Lane ら¹⁾の方法にしたがって, 血清中の D-dimer をはじめとする FD の分画の測定を試みた. 本法では, D, E 分画の吸着, 回収率がともに劣っていたが, D-dimer は比較的良好な吸着と回収性を示し, D-dimer の検出法として本法は妥当なものであると考えられた.

血中の FD を測定するにあたって, 血清を検体とすることには clottable X が除かれることや, FD の一部が凝血塊中に吸着されることなどの欠点があり, 血漿を用いる方が望ましいか

も知れない。しかし、血漿中にはFDに比較してはるかに大量のフィブリノゲンが存在するので、抗フィブリノゲン抗体との結合に際しての両者の競合から、血漿を検体とした場合にはSDS-ゲル電気泳動に apply されるFD量が減少する。この理由から、著者らはトロンビンとアプロチニンを添加して採血した血清を検体としてFD分画を測定し、正常小児と二、三の疾患患児と比較した。FD分画を、HMW FC, X, Y, D, E, D-dimer, “その他”の計7分画に分類したが、X, Y, D, E分画は分子量から同定し、HMWFCはフィブリノゲンよりも分子量の大きい蛋白を総称した。“その他”にはX, Y, D, E以外の分画や、非特異的に吸着された血清成分や遊離した若干の抗フィブリノゲン血清が含まれていると推測されるが、それらは正常小児では10%以下の割合であった。

池松ら²⁾の、抗D、抗E血清を用いての検討によれば、正常人血清中にはX+Yが6.7%、Dが75%、Eが18%であり、著者らの検討ではY分画が最も多かった。この差異は主として使用した抗血清の違いによるものであろう。

著者らは正常小児の血中にD-dimerをわずかながら認め、これはVilaら³⁾の成績と一致した。最近、Merskeyら⁴⁾は血漿を用いた im-

munoaffinity 法による成績から、正常人でのD-dimerの存在を否定している。この差異については、さらに今後の検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) Lane, D.A., Robbins, P.A., Rampling, M. W. and Kakkar, V. V.: SDS polyacrylamide gel characterization of serum FDP produced in response to ancrod and streptokinase/plasminogen infusion in man. Br. J. Haematol., **36**; 137~148, 1977.
- 2) 池松正次郎, 竹内 泉, 細川 孝, 藤巻道男, 福武勝博: FDP 分画の免疫学的定量法について. J. Med. Enzymol., **1**; 30~38, 1975.
- 3) Vila, V., Reganon, E. and Aznar, J.: Isolation of fibrin (ogen) degradation products from normal plasma by affinity chromatographic study. Clin. Chim. Acta, **87**; 245~252, 1978.
- 4) Merskey, C., Johnson, A. J., Harris, J.U., Wang, M. T. and Swain, S.: Isolation of fibrinogen-fibrin related antigen from human plasma by immuno-affinity chromatography: its characterization in normal subjects and in defibrinating patients with abruptio placentae and disseminated cancer. Br. J. Haematol., **44**; 655~670, 1980.

●日常診療の落とし穴と安全性を示す!

小児の医療事故と救急処置

編集 日本大学小児科教授 馬場一雄 専門医50氏分担執筆
B5判 337頁 図52 表120 定価9,800円(〒240円)

101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768