原 著

SDS-アガロースゲルを用いた二次元免疫電気泳動法による FgDP と FDP の鑑別について

緇 和子* 加藤 正俊* 池松正次郎*
藤巻 道男* 福武 勝博*

Differentiation of FgDP and FDP by two dimensional immunoelectrophoresis using SDS-agarose gel and anti FDP-D serum

Kazuko KUROSO*, Masatoshi KATO*, Shojiro IKEMATSU*,
Michio FUJIMAKI* and Katsuhiro FUKUTAKE*

Key words : FgDP, FDP, D-dimer, DIC, two dimensional
immunoelectrophoresis

One of the major differences between fibrinogen degradation products (FgDP) and fibrin degradation products (FDP) exists in the fact that D-dimer can be produced in the process of late FDP as a result of crosslinkage of γ - γ chains of fibrin and only D-monomer is in late FgDP. Therefore, a new method for detection of D-monomer representing FgDP and D-dimer indicating FDP was described in this paper, and the two dimensional immunoelectrophoresis using SDS-agarose gel in the first dimension step and agarose gel containing anti-D or E serum in the second dimension step was applied for this new method.

D-monomer of late FgDP and D-dimer of late FDP were prepared and studied on our method with anti-D serum, showing characteristic electrophoretic-movilities of those two human materials. Also, from the plasma containing D-monomer or D-dimer the derivatives of FgDP and FDP could be differentiated by our method with anti-D serum.

On the other hand, the fibrinolytic lysates of a clot from a patient with factor XIII deficiency did not demonstrate D-dimer by the use of our method, but presented D-monomer. After the factor XIII concentrates were added into the patient plasma in the 10 % final concentration of factor XIII, D-dimer was detectable in the fibrinolytic lysates. Furthermore, when this method was applied for a patient suffering from APL with DIC, no D-dimer was detected in the patient serum. Therefore, it might be suggested that the impairment on the formation of stabilized fibrin in a case of APL with DIC might play an important role as a cause of bleeding tendencies.

* 東京医科大学臨床病理学教室 [〒160 東京都新宿区西新宿6-7-1], Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan. (受付 1982. 3. 5, 受理 1982. 7. 5)

緒 言

血中からプラスミンによるフィブリノゲン-フィブリン分解産物を検出することは、生体内で線溶現象の起こっている証拠となるが、さらにそれがフィブリノゲン分解産物 (FgDP) であるかフィブリン分解産物 (FDP) であるかを知ることが、線溶動態を把握するうえで重要な意味を持っている。両者の鑑別が可能になれば、生体内で生じている線溶が一次線溶か二次線溶かを直接的に鑑別することができ、DICなどの病態が的確につかめるだけでなく、血栓溶解や線溶療法の適否、効果判定にも役立つものと考えられる。

FgDP と FDP の主な相違は、トロンビン、 Ca^{2+} によって活性化された第 XIII 因子がフィブリンの γ 鎖間に crosslinkage を生ずることにより、FDP には late 分画に D dimer が生じるが、FgDP には late 分画に D monomer のみがみられることである。

われわれは、従来高分子量蛋白の分子量測定に使われている SDS-アガロースゲルを支持体として用いた二次元免疫電気泳動法を考案し、比較的低分子量である分子量 83,000 の D monomer と 166,000 の D dimer の分子量の差より FgDP と FDP の定性的な鑑別を試みた。

I. 方 法

1. 精製系における late 分画の作製

ヒトフィブリノゲン (Kabi) 4mg/ml 溶液 0.6ml に、トロンビン (持田製薬) 50 NIHU/ml 生理食塩水 0.1ml と、0.05M $\text{CaCl}_2 \cdot 0.1$ ml を加えて 37°C で 1 時間反応させて安定化フィブリンを作製した。次に、これにウロキナーゼ (持田製薬) 2,000U/ml 生理食塩水とプラスミノゲン (Kabi) 12.5cu/ml 生理食塩水を等量混和して 37°C であらかじめ 20 分間インキュベートしたものを 0.1ml 加えて分解した。分解開始より、2, 4, 18 時間後に同量のウロキナーゼ-プラスミノゲン溶液を加えて 24 時間反応させた。反応停止はソイビートトリプシンインヒビター (Sigma) 2mg/ml 生理食塩水を 0.1ml 加え、リジンセファロース (第一化学薬品) 1ml を加えて攪はんした後濾過してプラスミンを除去し、late FDP とした。late FgDP は、フィブリノゲン 4mg/ml 溶液 0.6ml に生理食塩水 0.2ml を加え、ウロキナーゼ-プラスミノゲン溶液で 18 時間分解を行った。

2. 正常者血漿より late 分画の作製

正常者血漿 (フィブリノゲン 210 mg/dl, 血清総 FDP 量はラテックス凝集法 (帝国臓器) により 10 μ g/ml 以下) 0.6ml を用いて精製系と同様に安定化フィブリンを作製し、これにプラスミン (ミドリ十字) 31.25cu/ml を 0.1ml 加え、さらに分解開始より、2, 4 時間後に同量を、18 時間後に 62.5cu/ml を 0.1ml 加えて 24 時間分解を行った。反応停止以下は精製系と同様にを行い、late FDP を得た。late FgDP は正

Fig. 1 Two dimensional immunoelectrophoresis using SDS-agarose gel and antiserum-agarose gel

Fig. 2 Calibration line for molecular weight determination by SDS-agarose gel electrophoresis

Fig. 3 Two dimensional immunoelectrophoretic patterns of fibrinogen, late FgDP and late FDP using anti-D serum or anti-E serum

常者血漿を用いて同様に行った。

3. 先天性第 XIII 因子欠乏症患者の血漿より late 分画の作製

同患者血漿 (Laurell 法により第 XIII 因子抗原量 Aなし, S 130%) を, 正常者血漿と同様に処理し, late FDP を作製した。

Fig. 4 Two dimensional immunoelectrophoretic patterns of fibrinogen, late FgDP and late FDP prepared from fibrinogen

Fig. 5 Two dimensional immunoelectrophoretic patterns of normal plasma, late FgDP and late FDP prepared from normal plasma

また, 同患者血漿に第 XIII 因子製剤 (ヘキスト) を終濃度 1, 10, 100% となるように加えた後に同様に処理し, late FDP を作製した。

4. SDS-アガロースゲル電気泳動法¹⁾

松田ら²⁾の方法に準じ, 0.1% SDS を含む 3%アガロースゲルを作製した。分子量測定には分子量マーカー H (MW 56,000~280,000, BDH) を使用した。泳動は 0.1% SDS-リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2 を用いて, Coomassie brilliant blue R-250 (CBB) を色素マーカーとして 8mA/tube で 2 時間行った。染色には 0.5% CBB を用いた。

Fig. 6 Two dimensional immunoelectrophoretic patterns of late FDP prepared from the plasma of F. XIII deficiency

5. SDS-アガロースゲル二次元免疫電気泳動法

方法は図1に示した. 一次元泳動に SDS を含むアガロースゲルを支持体として用い分子量によるふるいわけを行い, 二次元泳動で抗D分画血清あるいは抗E分画血清(ヘキスト)と反応させた. 検体に加える SDS 濃度は検体中の蛋白質量により変えたが, 血漿系 late 分画ならびに血清を用いる場合には終濃度10%を用いた.

II. 成績

1. SDS-アガロースゲル電気泳動法

SDS-アガロースゲル電気泳動法は高分子量蛋白質の分子量測定に使われているが, 色素マーカーに比較的易動度の速い CBB を用いて泳動を行った(図2). 検量線は Rf 値と分子量の対数との間に直線関係が得られた.

2. 精製系 late 分画の SDS-アガロースゲル二次元免疫電気泳動

精製系で作製した late 分画ならびにフィブリノゲンを本法で泳動した(図3). 抗D分画血清を用いた場合には, フィブリノゲン, FgDP のD分画, FDP のD分画は, おのおの異った易動度を示した. また, 三者を混合して泳動したところ(図4), 三者は異った易動度を示し別々のピークとして得られ, 精製系においてD monomer と D dimer の鑑別が可能であった.

一方, 抗E分画血清を用いた場合には, FgDP

のE分画と FDP のE分画はほぼ同じ易動度を示した. また, 三者を混合した場合には, FgDP のE分画と FDP のE分画は一つのピークとして得られ, 両者のE分画による鑑別はできなかった.

3. 血漿系 late 分画の SDS-アガロースゲル二次元免疫電気泳動

正常者血漿より作製した late 分画ならびに正常者血漿を本法で泳動した(図5). 抗D分画血清を用いた場合には, 正常者のフィブリノゲン, FgDP のD分画, FDP のD分画は異った易動度を示した. また, このlate分画を混合して泳動したところ(図6下段), 両者は異った易動度を示し別々のピークとして検出され, 血漿系においても D monomer と D dimer の鑑別が可能であった.

抗E分画血清を用いた場合には, FgDP のE分画と FDP のE分画はほぼ同じ易動度を示し, また, 両者の混合物は一つのピークとして得られ, 両者のE分画による鑑別はできなかった.

4. 先天性第 XIII 因子欠乏症患者的血漿より作製した late 分画の SDS-アガロースゲル二次元免疫電気泳動

血漿系 late 分画をコントロールとして, 同患者血漿より作製した late FDP を本法を用いて泳動した(図6). 第 XIII 因子欠乏症では安定化フィブリンが作られないため, プラスミン分解で生じた FDP は D monomer であり, 血

Fig. 7 Two dimensional immunoelectrophoretic patterns of late FDP prepared from the plasma of F. XIII deficiency mixed with F. XIII concentrates

漿系の FgDP の D 分画と同じ易動度を示した。

また、同患者血漿に第 XIII 因子製剤を終濃度 1, 10, 100% 加えた後に作製した late 分画

を、抗 D 分画血清を用いて泳動した(図 7)。第 XIII 因子が 1% では D monomer と若干の D dimer が検出されたが、10% 以上では D dimer のみがみられた。

5. SDS-アガロースゲル 二次元免疫電気泳動法による DIC 患者血清例

本法の臨床例への応用として、典型的な DIC を誘発した APL の 1 例の血清について観察した。患者血清の総 FDP 量は、 $160\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上 $320\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。血漿系 late 分画をコントロールとして本法を用いたところ(図 8)、抗 D 分画血清を用いた場合には検体は D monomer のピークがみられ、さらに高分子量の小さなピークがいくつかみられた。一方、抗 E 分画血清を用いた場合には、検体にはわずかに沈降線がみられたがピークとしては明らかにみられなかった。また、この患者の第 XIII 因子抗原量は Laurell 法により、A 8%, S 23% であった。

III. 考 按

FgDP と FDP の鑑別については従来より種々な方法が試みられている。D dimer を検出する方法としては、Laneら³⁴⁾の免疫吸着と SDS-PAGE とを組合せた方法や、フィブリンモノマー・セファロース affinity chromatography を用いて分解した D 分画を SDS-PAGE にて検出

Fig. 8 Two dimensional immunoelectrophoretic patterns of the serum of a patient suffering from APL with DIC

する方法⁵⁾, ゲルろ過と免疫的定量法を組合せて検出する方法⁶⁾, immunoprecipitation による方法⁷⁾, 抗フィブリノゲン抗体を結合させた Sepharose 4 B カラムを用いる方法⁸⁾ などがある. また, D dimer の neoantigen に対する抗血清を用いた radioimmunoassay 法⁹⁾ も試みられている. また, フィブリノゲンとフィブリンの本質的な差は, 後者ではトロンビンによってフィブリノゲンからフィブリノペプチド A, B (fpA, B) が遊離された状態にあるので, この fp と分解産物中の fp の有無により分解産物の由来を検索することが試みられている¹⁰⁾. 一方, paracoagulation を利用した鑑別法¹¹⁾ も考案されている. しかし, これらの鑑別法は検体量や測定迅速性において一長一短がある.

われわれは, 臨床検査への応用が可能な簡便な D dimer 検出法を確立する目的で, 定性的な手法であるが, 一次元泳動に SDS-アガロースゲルを, 二次元泳動に抗 D 分画血清あるいは抗 E 分画血清を含むアガロースゲルを支持体として用いた二次元免疫電気泳動法を考案し, その条件を設定した. 本法により FgDP と FDP の鑑別を試みたところ, 精製系ならびに血漿系のそれぞれにおいて, FgDP の D monomer と FDP の D dimer の定性的な鑑別が可能であった.

一方, 先天性第 XIII 因子欠乏症患者の血漿より作製した late FDP を本法で泳動した場合, 抗 D 分画血清を用いた場合, 血漿系の FgDP の D 分画と同じ易動度を示す D monomer が検出された. すなわち本法を利用した二次線溶の判別は, 活性 XIII 因子の関与によって, 少なくともフィブリン分子内の γ 鎖間で crosslinkage が充分に行われているフィブリンの分解産物に対してのみ可能であった. FDP の D dimer を検出するところに本法の特徴があるため, 凝固過程で第 XIII 因子が十分に働いているか否かは, この判別上重要である. 特に凝固が著しく亢進している状態では, 血中の第 XIII 因子の消費も亢進している可能性もあるが, 本実験では第 XIII 因子濃度が 10% 以上残存すれば, フィブリン分子内の γ 鎖間 crosslinkage が充分に行われることが示唆された.

本法を用いて典型的な DIC を示した APL の患者 1 例について観察した. 患者の第 XIII 因子抗原量は XIII A 8% にまで低下しており, この検体の抗 D 分画血清による泳動パターンでは, 主に D monomer と思われるピークが検出され, 明らかな D dimer は検出されなかった. このことは第 XIII 因子の消費により, 十分に crosslink が行われずに non crosslinked fibrin がプラスミンによって分解された可能性があるし, 可溶性フィブリンモノマー複合体(SFMC)がプラスミン分解を受けていることも考えられる. または, 単に一次線溶の状態でフィブリノゲンが直接にプラスミンによって分解された可能性も考えられた. すなわち, DIC の病態において D dimer を検出できなかったことは, DIC の出血傾向の一因としてフィブリン安定化が不十分であることを示唆している. すなわち DIC においては, フィブリノゲン, SFMC の状態でプラスミンによる処理を受けていることが, フィブリン安定化をさまたげて止血機構の障害となっている可能性と, プラスミン処理が安定化フィブリンには及んでいない可能性が考えられる.

また, 一次線溶, 二次線溶がともに起こっている場合には, 血中に FDP の D dimer (MW 166,000) と FgDP の Y 分画 (MW 150,000) が存在する可能性があるが, 両者は分子量の差が小さいので本法においてはほぼ同じ易動度を持ち, 抗 D 分画血清を用いた場合には両者は鑑別できない可能性がある. しかし, 抗 E 分画血清を用いた場合には Y 分画のみが検出されるので, 同一検体について抗 D 分画血清と抗 E 分画血清のおのおのを用いた泳動を行うことによって, D dimer と Y 分画をおおよそ鑑別できると思われる. しかし, 本法は定性的な手法であり, 両者の量的な関係は判別できないので, これは今後残された問題である.

結 語

SDS-アガロースゲルを支持体として用いた二次元免疫電気泳動法を考案し, 本法により精製系ならびに血漿系において FgDP の D monomer と FDP の D dimer の定性的な鑑別が

可能であった。また、本法による患者血清への臨床応用が可能であった。

DIC の 1 例において、本法では D dimer が検出されないことから、おそらく DIC においてはフィブリン安定化に障害が起こっていることが出血傾向の一因となっているものと思われた。

文 献

- 1) 絹莊和子, 他: SDS-アガロースゲル電気泳動法による FgDP, FDP の鑑別について. 日血会誌, **44**; 529, 1981.
- 2) 松田道生, 他: SDS 電気泳動法の凝血検査への応用. 臨床病理(臨時増刊), **37**; 258~267, 1976.
- 3) Lane, D.A., et al.: A method for characterising serum fibrinogen and fibrin degradation products. Thromb. Res., **9**; 191~200, 1976.
- 4) Lane, D.A., et al.: SDS polyacrylamide gel characterization for serum FDP produced in response to anocrod and streptokinase/plasminogen infusion in man. Br. J. Haematol., **36**; 137~148, 1977.
- 5) 松田道生, 他: フィブリン・セファローズ・アフィニティ・クロマトグラフィーによる FgD 単離の試み. 第14回プラスミン研究会報告集, 1974, p. 290.
- 6) 風間睦美, 他: ゲル透過法による FgDP と FDP の鑑別. J. Med. Enzymol., **1**; 679~685, 1975.
- 7) Gaffney, P.J.: Distinction between fibrinogen and fibrin degradation products in plasma. Clin. Chim. Acta, **65**; 109~115, 1975.
- 8) Merskey, C., et al.: Isolation of fibrinogen-fibrin related antigen from human plasma by immunoaffinity chromatography. its characterization in normal subjects and in defibrinating patients with abruptio placentae and disseminated cancer. Br. J. Haematol., **44**; 655~670, 1980.
- 9) Lee-Own, V., et al.: The detection of neoantigenic sites on the D-dimer peptide isolated from plasmin digested cross linked fibrin. Thromb. Res., **14**; 77~84, 1979.
- 10) 松原泰久: フィブリノペプチドAの2抗体測定法の開発とその臨床的評価. 東医大誌, **38**; 21~36, 1980.
- 11) 福武勝博, 他: FgDP と FDP の鑑別のための臨床検査. J. Med. Enzymol., **1**; 670~678, 1975.

●ビタミンB₁₂研究の完全なる集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5 判 367頁 図157 表73 定価7,800円(〒200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