特集・第 XIII 因子

フィブリン体分解過程における 第 XIII 因子の作用

風 間 睦 美** 飛田野エミ子** 田 原 千枝子**
水 野 好 枝** 安 部 英**

Key words : factor XIII, FSF, FDP, gel chromatography.

緒 言

フィブリノゲンはトロンビン, F. XIII あるいはプラスミンの直接作用によって, 諸種の生化学的変化をうけるが, 生体内で発現するフィブリノゲン誘導体(以下フィブリン体)の量的のみならず質的側面を分析することにより, これら凝固線溶酵素の作用機転にひいては生体内における凝固線溶系の状態が推察されると考えられる. われわれはフィブリノゲンの線溶分解過程に対する F. XIII の作用につき 2, 3 の検討した.

I. 材料および方法

1. フィブリノゲン

Cohn Fraction I (ミドリ十字) を β -アラニンで分画したものは F. XIII, プラスミノゲンを少量含むが, 凝固蛋白は 92 ~ 95 % になった. F. XIII 除去フィブリノゲンは Shanberge-井下法により, DEAE セルロースクロマトグラフィーにより, またプラスミノゲン除去にはリジンセファロースカラムを用いた Affinity chromatography を用いた.

2. プラスミノゲン

ヒト正常血漿をリジンセファロースによるカラムクロマトグラフィーを 2 回行ったものを用いた. このものは SDS-ディスク電気泳動像で

単一なことが認められた.

3. F. XIII 測定法

抗 F. XIII 血清を用いた中和法あるいは F. XIII 除去フィブリノゲンを基質としたフィブリン塊溶解時間法を用いた. またモノダンシルカタペリン (MDC) とり込み法は Lorand-Urayama 法によったが, この際 α -casein の代りに精製フィブリノゲンを用いて, フィブリノゲンおよび FDP の MDC とり込みを検討した

II. 成 績

1. ゲル濾過法による FDP の判別

精製したヒトフィブリノゲン, プラスミノゲン, トロンビンおよび UK を用いフィブリノゲン非安定化あるいは安定化フィブリンのプラスミン分解を経時的に追求すると, フィブリノゲン, 安定化フィブリンの X, Y, D, および E の形成の早さや FDP の分子量などにはほぼ等しい成績が得られた. また検体を DTT 処理後同様のディスク電気泳動法によっても, α , β , γ 各 subunit の分解の態度も両者類似した成績であった. しかるに F. XIII の作用をうけた安定化フィブリンの FDP 生成過程では, 80 分後 macromolecular FDP の形成, 次いで Y および D は dimer が形成されて, またその subunit 構造では γ - γ dimer の形成が認められて, 前

* Effect of Factor XIII on the fibrinogen and its degradation products. Differentiation of the origin of FDP by gel chromatography. (The 3rd Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis).

** 帝京大学医学部第一内科 [〒 173 東京都板橋区加賀 2-11-1] Mutsuyoshi KAZAMA, Emiko HIDANO, Chieko TAHARA, Yoshie MIZUNO and Takeshi ABE : 1st Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Fig. 1 Difference of elution volume between Fbg DP-D and Fb DP-D chromatographed on Sephadex G 200 column.

二者と異なる成績であった。

すなわち安定化フィブリンのプラスミン分解により形成される FDP-D は dimer であり、他のフィブリン体よりの FDP-D の 2 倍の分子量をもつことから、われわれは両者の弁別をゲル濾過法で行うことを試みた。

F. XIII 除去フィブリノゲン、プラスミノゲンおよび UK の混液を 37°C 18 時間保ったものを、26×450 mm の Sephadex G 200 カラムでゲル濾過すると、**Fig. 1** に示す如き溶出曲線を得た。すなわち実線は蛋白、他の 2 つのピークは二次元免疫拡散法で測定した FDP-D および E の抗原性であって、D の溶出液量（以下 V_e ）は 128 ml、E の V_e は 141 ml であった。また **Fig. 1** の下に示す如く、フィブリノゲン、プラスミノゲン、および UK の混液に F. XIII およびトロンビン、カルシウムを加えた安定化フィブリンの分解産物について同様に測定すると、D の V_e は 98 ml、E の V_e は 140 ml であり、D monomer と D dimer の V_e の差は 30 ml と算定された。

すなわち FDP を含む未知検体をプラスミン

Fig. 2 Distribution of urinary FDP in a case of renal failure (Y. K. 34y.), as monitored by gel chromatography, Column size (26×450 mm).

で処理したのち、人工的に形成される FDP を 26×450 mm の Sephadex G 200 カラムでゲル濾過した場合、FDP-D の V_e が 141 ml であれば Fbg または非安定化フィブリン由来のものであり、また 98 ml であれば安定化フィブリン由来のものと判定される。

慢性腎不全患者の尿および血液中の FDP についてこの方法で検討した。FDP 10 γ /ml と測定された本患者尿を PEG で 20 倍に濃縮し、これを Biogel A-5 m カラムでゲル濾過すると、**Fig. 2** の上に示すように Fbg 抗原は一つのピークとして溶出された。この V_e は矢印に示す Fbg のそれよりも僅かに大きくて、その部位から X, Y などの早期 FDP と判定された。別にこの濃縮尿に PLg, UK を加えて 18 時間保温後ゲル濾過すると下の図の如き成績となった。

すなわち蛋白は実線の如く溶出され、また D および E の抗原性の V_e は 128 ml および 147 ml と測定されたので、本患者の FDP は Fbg または非安定化フィブリン由来のものと考えられた。

2. F. XIII と FDP または Fibrinogen との相関

Fig. 3 Correlation between FDP and F. XIII activity in plasma of various disorders.

DIC の機転すなわち血流中で一次性の凝固が発現する場合には、トロンビン作用によるフィブリン形成と同時に F. XIII の活性化と消費を来すと考えられる。

Fig. 3 は諸疾患患者の血液につき F. XIII 活性を抗血清による中和法で、また FDP 量を帝国臓器より供与された抗 Fbg-latex 凝集法で測定し、その相関をみたものである。×印は臨床的所見および凝血学的検査から DIC と診断された症例、●印はその他の諸疾患患者であるが、両疾患群とも F. XIII と FDP の間には相関が認められなかった。

一方 **Fig. 4** に示す如く血中フィブリノゲン量と F. XIII 活性の相関をみると丸印の諸疾患においては両者の相関は認められなかったのに、×印の DIC 疾患については例数は少ないが両者間に正の相関が認められて、本疾患においては Fbg と F. XIII の消費が併行することを示唆した。

3. ゲル濾過法による FDP 判別法の問題点

ゲル濾過法による FDP の鑑別の場合問題となることは、① Fbg または非安定化フィブリン由来の FDP がトロンビンと F. XIII の作用をうけてクロスリンクし、本法の検索で D dimer すなわち stabilized Fb 由来と判定される可能

Fig. 4 Correlation between Fbg and F.XIII activity in plasmas of various disorders.

性であり、その②は F. XIII そのものが線溶作用によりうける変化である。

第一の問題について検討するため、純化した Fbg と PLg および UK の混液を 37°C 中に保ち、10, 20, 30, 45 および 60 分の各時点で一部とり出してこれを各時点での検体とした。これにトロンビンカルシウムと F. XIII を加えて脱フィブリンしたのち各時点一対の検体を SDS ディスクおよび DTT 処理後の SDS-ディスク電気泳動にかけ、FDP のポリマー形成およびその subunit ことに γ 鎖の dimer 形成の可能性を比較した。

この成績によれば、FDP-X はトロンビンと F. XIII の作用をうけてポリマー形成および γ -dimer を形成することが認められた。しかし検体中にフィブリノゲンが共存している場合、そのほとんどは脱フィブリン操作によって除去されることも認められた。

MDC は F. XIII の作用により Fbg にとり込まれるが、Fbg 分解産物および安定化フィブリンの分解産物に対する MDC のとり込み量を比較した (**Fig. 5**)。

すなわちヒト Fbg の MDC とり込みは **Fig. 5** の最左端に示す如くであり、これに SK 200 u/ml を加えて Fbg 分解を行うと 30 分後の Fbg DP の MDC とり込み量は明らかに低下したが、対照の Fb-DP に比して尚若干のとり込みを示し、Fbg-DP の初期のものは尚 F. XIII

Fig. 5 MDC incorporation into Fbg DP and Fb DP in the process of fibrinogen/fibrin digestion.

の基質となり得ると考えられた。

すなわち初期 FDP の存在により、本法での測定成績は影響をうける可能性があるが、たとえば血清中では FDP-X の残存率が少ないこと、クロスリンクされる程度も低いことを考えれば、実際上の影響は少ないと考えられた。

次に線溶作用の F. XIII 活性に及ぼす影響につき検討する為、ヒト血漿に UK を 50 あるいは 100 u/ml となるように加えて 37°C に保ち、経時的に F. XIII 活性をフィブリン塊溶解法で測定すると、線溶の作用によりその活性は変化しないことが認められた。

一方血漿の線溶活性によってうける F. XIII の抗原性の変化については、F. XIII の subunit A あるいは S に対する抗血清を用いた Laurell 法で検討した。正常未処置血漿、胎盤性 F. XIII、および血漿に UK を 50 から 400 u/ml 加え 30 分保温した。抗 Subunit A 抗体を含むプレートで正常血漿に対し短い沈降線が、胎盤性 F. XIII には長い沈降線が認められたが UK 処理血漿では沈降線を殆んど形成しなかった。Subunit S プレートでは、未処置血漿に対し長い二重の沈降線が認められたが、胎盤性 F. XIII および UK 処理血漿では何れにも沈降線が認められ

なかった。このことからプラスミンによって F. XIII の活性は変化をうけることはないが、A および S subunit とも抗原性には何等かの変化を来すと考えられた。

結 語

FDP を含む検体をプラスミン処理後、Sephadex G 200 カラムでゲル濾過し、FDP-D の溶出量を求めることによって、最初の FDP がトロンビンと F. XIII の作用をうけた安定化フィブリン由来のものか、フィブリノゲンあるいは非安定化フィブリン由来のものを判別する方法を述べ、本法の成績に影響すると思われる要因につき検討した。

<Abstract>

Effect of F. XIII on the fibrinogen and its degradation products. Differentiation of the origin of FDP by gel chromatography by

Mutsuyoshi KAZAMA, Emiko HIDANO, Chieko TAHARA, Yoshie MIZUNO and Takeshi ABE

from

Ist Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

A method was described in which the origin of FDP could be differentiated by gel chromatography. In the preliminary experiment the stabilized fibrin was digested overnight at 37°C. The resulting fibrin DP was chromatographed on Sephadex G 200 column (26 x 450mm) and the elution volume (V_e) of fibrin DP as well as E was measured by the use of single radial immunodiffusion or antibody-coated latex aggregation test. The V_e of fibrin DP-D was calculated as 98 ml and that of E was 141 ml. Fibrinogen (Fbg) was digested with plasmin and resulting Fbg DP was chromatographed on the same gel column. The V_e of Fbg DP-D was 128 ml and that of E was 140 ml. The difference of V_e between both FDPD was explained as the dimer composition of fibrin

DP-D of stabilized fibrin whereas the monomer form of fibrinogen DP.

The urine containing 10 γ /ml of FDP of a case of renal failure was concentrated 20 folds and chromatographed on Biogel A-5 m column, which showed that the most of the FDP was early one, as the V_e was slightly larger than that of fibrinogen. The concentrated urine was digested with plasmin and applied on Sephadex G 200 column. The chromatography revealed that the resulted FDP-D was monomer, which indicated the FDP in the urine was not originated from stabilized fibrin, but from fibrinogen or non-stabilized fibrin.

The factor was examined which interfering the result of this differentiation method. Monodansylcadaverine (MDC) incorporation with F. XIII at various digestive stages of Fbg or fibrin DP was examined basing on the method by Lorand and Urayama. It was found that

the early Fbg DP had a slight capability of MDC incorporation while none of fibrin DP. This indicated that the possible crosslinkage of early Fbg DP with F. XIII and if this occurred, the resulting FDP-D could be interpreted as originated from already stabilized-fibrin by the differentiation method.

A mixture of purified fibrinogen, plasminogen and urokinase was kept at 37°C and aliquots were taken at different incubation time, then thrombin-calcium was added to each aliquot. SDS-disc electrophoresis after the reduction with DTT of each aliquot revealed that, although Fbg DP-X could be crosslinked with F. XIII and formed subunit-gamma dimer, but most of it, at the presence of fibrinogen, could be incorporated into fibrin by the defibrination procedure. With these result, the interference on the differentiation method by the crosslinkage of Fbg DP was regarded as minimal.