◆原 著◆

B β 1-42 ペプチドの測定による一次線溶の検出

緇 莊 和 子*, 羽 田 雅 夫*
池 松 正 次 郎*, 藤 巻 道 男*

Detection of Fibrinogenolysis by Measurement
of Fibrinopeptide B β 1-42

Kazuko KUROSO, Masao HADA, Shojiro IKEMATSU
and Michio FUJIMAKI

Key words: fibrinogenolysis, fibrinopeptide B β 1-42, fibrinopeptide B β 15-42, DIC,
enzyme immunoassay

We evaluated a method for assessing fibrinogenolysis in which B β 1-42 peptide (B β 1-42) was measured by enzyme immunoassay using a monoclonal antibody against B β 1-42. B β 1-42 obtained from plasminic-digestion of fibrinogen and des A fibrinmonomer *in vitro* specifically reacted in this assay. Smaller peptides from B β 1-42 and subjected to further digestion lost their reactivities. However all peptide fractions obtained by serial plasminic-digestion of crosslinked fibrin showed little crossreactivities. Also no reaction was observed with purified B β 15-42 peptide in this assay. Plasma B β 1-42 levels in 14 normal subjects were below 6 pmol/ml. In randomly selected samples from 58 patients with accelerated fibrinolysis, the B β 1-42 levels widely varied from 2 to 234 pmol/ml, but 27 of them showed considerably high levels. In these samples, B β 1-42 levels showed no correlations with fibrinogen, fibrinopeptide A levels, antithrombin III, plasminogen or α_2 PI activity. However B β 1-42 levels correlated with FDP-E ($r=0.33$, $p<0.025$), plasmin- α_2 PI complex ($r=0.53$, $p<0.025$) and B β 1-42 by radioimmunoassay ($r=0.55$, $p<0.025$). B β 1-42 did not correlate with D dimer levels ($r=0.30$).

In conclusion, B β 1-42 assay reflected only *in vitro* fibrinogenolysis.

はじめに

線溶亢進状態を把握する目的で、従来から線溶系因子およびその阻止因子の抗原あるいは活性が定量測定されて来た。近年になって、線溶系の“分子マーカー”として、FDPのほか

B β 15-42 ペプチド (以下 B β 15-42)、プラスミン- α_2 PI 複合体 (PIC)、組織プラスミノゲンアクチベーター-プラスミノゲンアクチベーターインヒビター複合体など、線溶亢進の結果産生される微量な生成物が検出可能となり、細かな線溶系の変動が追えるようになってきた¹⁾。

* 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: 1989.12.19, 受理: 1990.5.1.

Fig. 1 Serial determinations of $B\beta$ 1-42 values on fibrinogen, des A fibrin-monomer and crosslinked fibrin degradation products (FgDP, des A FDP and FDP) digested by urokinase-activated plasmin.

さらに、安定化フィブリン分解で生じる D dimer 関連物質を検出して二次線溶亢進との関係も調べられてきている。一方、一次線溶を示すフィブリノゲン分解については、これまでこれを特異的に検出する適当な方法が開発されておらず、一次線溶と病態との関連についての説明は遅れていた。一般にフィブリンの方がフィブリノゲンに比べてプラスミンの作用を受け易いと考えられているが、二次線溶のみならず一次線溶が生じることが実際にあるのかどうか、あるいは一次線溶が亢進する症例が存在するのかどうか、などを知るためにも、一次線溶を特異的に検出する測定法の開発が望まれていた。

今回著者らは、フィブリノゲンのプラスミン分解によって生じる $B\beta$ 1-42 ペプチド ($B\beta$ 1-42) を検出する酵素免疫測定法 (ELISA) について、その特異性を中心に検討し、臨床検体にて応用を試み、一次線溶の検出のための検査としての位置づけを考察した。

I. 試材ならびに方法

1. フィブリノゲンおよびフィブリンのプラスミン分解産物の作製

ヒトフィブリノゲン (fbg), des A フィブリンモノマー (des A fn), 安定化フィブリン (fn) を、著者らの方法²⁾ にしたがって、終濃度 4 mM Ca^{2+} 存在下でウロキナーゼ活性化プラスミンにて分解し、経時的にアプロチニンで

反応を止めた (おのおのの分解産物を FgDP, des A FDP, FDP と略す)。これらを Centricon 30 (日本ミリポアリミテッド, 東京) にて 1,500 G で 40 分間遠心し、膜フィルターを通過した分画を検体とした。

2. 被検検体

被検検体の採取は、抗凝固剤としてヘパリン 100 u/ml-アプロチニン 100 KIE/ml 血液を用いて行い、4°C にて血漿を得た。この血漿 1 ml を同様に Centricon 30 にて遠心し、フィルターを通過した分画を使用した。

3. $B\beta$ 1-42 ならびに $B\beta$ 15-42 の測定 (New York Blood Center)³⁾⁴⁾

$B\beta$ 1-42 の測定は、 $B\beta$ 1-42 に対するモノクローナル抗体を用いた、マイクロタイタープレートでの酵素免疫測定法で測定した。また $B\beta$ 15-42 の測定は、 $B\beta$ 15-42 に対するモノクローナル抗体を用いて同様に行った。

4. 他の各種凝固・線溶系パラメーターの測定

被検検体について、トロンビン時間法による fbg 量、フィブリンペプチド A (FPA, STAGO), RIA 法による $B\beta$ 15-42 (IMCO), ATIII, プラスミノゲン, α_2 PI アミターゼ活性 (KABI), FDP-E (ダイアヤトロン), D dimer (STAGO), PIC (帝人) を測定した。

Fig. 2 Serial determinations of B β 15-42 values on fibrinogen, des A fibrin monomer and crosslinked fibrin degradation products (FgDP, des A FDP and FDP) digested by urokinase-activated plasmin.

II. 成 績

1. B β 1-42 測定法における FgDP, des A FDP, FDP の反応性変化

fbg, des A fn, fn の経時的なプラスミン分解で生じたペプチドを B β 1-42 測定法で測定した。

Fig. 1に示すように, FDP では分解全過程を通じて B β 1-42 はほとんど検出されなかった。一方, FgDP においては値は一過性に上昇し, 15 分後に最大値を示した後に低下し, 4 時間後にほとんど検出されなくなった。des A FDP では FgDP に遅れて 1 時間後に最高値を示した後に値は低下し, 19 時間後にはほとんど検出されなくなった。

2. B β 15-42 測定法における FgDP, des A FDP, FDP の反応性変化

同様に, fbg, des A fn, fn をプラスミンで分解し, 生じたペプチドを経時的に B β 15-42 測定法で測定した。

Fig. 2 に示すように, FDP ではプラスミン分解が進行するにしたがって B β 15-42 値は上昇し, 4 時間後にはプラトーに達した。一方, FgDP と des A FDP においても B β 15-42 値はプラスミン分解の進行とともに上昇し, 4 時間後には最大値を示した。

3. RIA 法による B β 15-42 測定での FgDP と FDP の反応性変化

FgDP と FDP を, RIA 法による B β 15-42 測定法で経時的に測定した。FgDP, FDP ともに, プラスミン分解の進行にしたがって B β 15-42 値は上昇し, FgDP では 1 時間後に, FDP では 19 時間後に最大値を示した (Fig. 3)。

4. B β 1-42 ならびに B β 15-42 測定法における精製 B β ペプチドの反応性

添付の検量線用 B β 1-42 は, B β 1-42 測定法においては 36.5 picomoles/ml を示すが, B β 15-42 測定法では検出限界値である 5 picomoles/ml 以下を示した。また添付の B β 15-42 は B β 15-42 測定法では 80 picomoles/ml を示すが, これは B β 1-42 測定法では同様に検出限界値 2 picomoles/ml 以下を示し, これらのペプチドはおのほかのペプチド測定法に対し交差反応を示さなかった。

5. B β 1-42 測定法における血漿正常値

健康成人男女各 7 名, 計 14 名における血漿 B β 1-42 値は, 検出限界値 2 picomoles/ml 以下から 6.7 picomoles/ml にわたり, 正常値を 6 picomoles/ml 以下として扱った (Fig. 4)。

6. B β 1-42 値とほかの凝固・線溶系パラメーターとの比較

FDP-E 値あるいは PIC 値が正常値を越えたさまざまな疾患の線溶亢進症例を対象として, B β 1-42 値とほかの凝固・線溶系パラメーター値とを比較した。線溶亢進症例では B β 1-42

Fig. 3 Serial determinations of B β 15-42 peptide values (RIA) on fibrinogen and crosslinked fibrin degradation products (FgDP and FDP) digested by urokinase-activated plasmin.

Fig. 4 Plasma B β 1-42 values in normal individuals and patients accelerated fibrinolysis.

値は2以下から234 picomoles/mlと幅広く分布し、58例中27例で異常値が認められた (Fig. 4). ATIIIとB β 1-42の間には有意な相関は認められず ($r=0.035$), また fbg 量 ($r=0.228$), FPA ($r=-0.020$) の間にも有意な相関は認められなかった. 線溶系パラメーターでは、プラスミノゲン ($r=0.083$) や α_2 PI ($r=-0.092$) と有意な相関は認められなかった. しかしながら、線溶系分子マーカーのうち、FDP-E ($r=0.325$, $p<0.025$), PIC ($r=$

Fig. 5 Comparison of plasmin- α_2 PI complex (PIC) and B β 1-42 values.

0.530, $p<0.025$, Fig. 5), RIA 法による B β 15-42 ($r=0.554$, $p<0.025$, Fig. 6) との間には正の相関が認められた. しかし D dimer との間には $r=0.300$ と有意な相関は認められなかった (Fig. 7).

III. 考 察

fbg は、トロンビンの作用によって A α 鎖より FPA を遊離して des A fn となる. さらにこれは B β 鎖よりフィブリノペプチド B (FPB, B β 1-14) を遊離し、活性型 XIII 因子による架橋結合を受けて強固なフィブリン塊

Fig. 6 Comparison of B β 15-42 (RIA) and B β 1-42 values.

(fn) を形成する。

一方, これらはプラスミンの作用により分解されるが, この際 fbg と des A fn の B β 鎖 N 末端からは 1-42 が, また fn の B β 鎖 N 末端からは 15-42 が遊離してくる。

従来から行われている RIA 法による B β 15-42 の測定においては, Fig. 3 に示すように, *in vitro* では FgDP ならびに FDP の両方の由来のペプチドが反応性を示していた。したがって, この方法は線溶亢進の指標となるものの, 一次線溶と二次線溶の鑑別という目的には適していなかった。

今回著者が検討した EIA 法による B β ペプチド測定のうち, B β 15-42 測定法では RIA 法と同様に FgDP と FDP のどちらの B β ペプチドも反応を示した, しかし, B β 1-42 測定においては, *in vitro* の成績では FgDP と des A FDP のみが検出可能であった。さらに精製ペプチドを用いた検討において, B β 1-42 測定法では B β 15-42 は交差反応を示さず, FPB も反応を示さない³⁾ ことから, B β 1-42 を特異的に測定することが明らかであった。

経時的に FgDP と des A FDP の反応性を調べると, B β 1-42 測定においては, Fig. 1 に示すように一過性に反応を示した後に値は低下した。逆に B β 15-42 測定法ではプラスミン消化時間経過にしたがって値は上昇した。これは, *in vitro* では B β 1-42 がさらにプラスミンによりその内部 ²¹Lys-²²Lys 間または ²²

Fig. 7 Comparison of D dimer and B β 1-42 values.

Lys-²³Arg 間で切断されて⁵⁾, B β 1-42 測定法に対する反応性を失い B β 15-42 測定法に対する反応性が高まるためと考えられた。しかし実際に *in vivo* でこの反応が起こっているか否かについては不明である。Weitz ら⁶⁾ によると, *in vitro* における成績では B β 1-42 の B β 21-22 間のプラスミンによる切断は, fbg からの B β 42-43 間の切断と比較して 140 倍弱いと考えられる。したがって, *in vivo* においては, B β 1-42 がさらにプラスミンによって分解される可能性は少ないものと考えられ, B β 1-42 測定法は fbg と des A fn の分解を特異的に測定できることが示唆された。さらに, トロンピンは fbg より FPA に引き続いて速やかに FPB を遊離することから, B β 1-42 測定法は臨床検体においては主に FgDP を検出していると考えられた。それに対し, RIA 法および EIA 法による B β 15-42 の測定では, 臨床検体においては FDP を中心として検出していると考えられた。

健康成人と線溶亢進症例の B β 1-42 値の分布を比較すると, 線溶亢進症例では半数以上の症例で異常値が観察され, これらの症例では一次線溶が存在することが示唆された。しかし測定値は幅広く分布し, 病態によって一次線溶の亢進状態は大きく異なるものと考えられた。

線溶亢進症例において B β 1-42 とほかの凝固・線溶系パラメーターとを比較すると, 一次線溶・二次線溶の両者を検出する線溶系分子マ

ーカーである FDP-E, RIA 法による B β 15-42, PIC との間には弱いながらも有意な正の相関が認められ, B β 1-42 も線溶亢進を示す分子マーカーのひとつであると考えられた。

一方, 生体内において線溶の中心は二次線溶であると考えられており, 線溶亢進症例では一般的に D dimer が高値を示すことが知られている⁷⁾⁸⁾。Fig. 7 に示すように, 線溶亢進症例では D dimer はほとんどの症例で異常値を示しており, 二次線溶亢進が観察された。しかしながら, D dimer と B β 1-42 との間には有意な相関は認められず, 24 例中 14 例で B β 1-42 の異常値が認められたのみであった。

以上のことから, 臨床例に認められた線溶亢進は, 二次線溶の亢進を反映したものであるが, 安定化フィブリンの分解のみならず, これに付随して一次線溶を示すフィブリノゲン分解が生じている症例が多く存在することが示唆された。さらに, 生じた一次線溶の程度は, 原疾患や治療法の選択, 病態, 採血時期などによって大きく異なることが予想された。したがって, B β 1-42 と D dimer はともに線溶系分子マーカーであるが, 両者の変動は必ずしも平行したものではなく, 両者は異なる挙動を示す分子マーカーであると考えられた。

一次線溶亢進の有無については明らかとなっていなかったが, Bick らは FPA が正常であるにもかかわらず, RIA 法による B β 15-42 が上昇している際には一次線溶が生じている可能性があると述べている⁹⁾。さらに彼らは, 一次線溶亢進では B β 1-118 ペプチドも上昇すると述べている。Weitz らは, モノクローナル抗体を用いた RIA 法による B β 1-42 の測定を行い, 高濃度の組織プラスミノゲンアクチベーター投与による血栓溶解時に, 血栓溶解に加えて B β 1-42 の上昇が認められることを示唆している⁶⁾。著者らによる成績では, B β 1-42 測定法は FgDP を特異的に検出することが可能であり, かつ多くの線溶亢進症例で異常値が

認められることから, 二次線溶に加えて一次線溶が生じる症例が存在することが証明された。

結 語

B β 1-42 の測定は fbg および des A fn のプラスミン分解を特異的に検出し, 臨床症例において一次線溶亢進を検出することが可能であった。したがって, ほかの線溶系分子マーカーとともに B β 1-42 を測定することにより, 線溶亢進を解析していくうえで新しい視点が加わるものと考えられた。

文 献

- 1) 血栓・止血の精密検査 (1) 血液凝固編: 臨床病理特集第70号, 1987.
- 2) 緋田和子, ほか: 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. 血液と脈管, **13**: 183~187, 1982.
- 3) Kudryk, B. et al.: A monoclonal antibody with ability to distinguish between NH₂-terminal fragments derived from fibrinogen and fibrin. Mol. Immunology, **20**: 1191~1200, 1983.
- 4) Kudryk, B. et al.: Specificity of a monoclonal antibody for NH₂-terminal region of fibrin. Mol. Immunology, **21**: 89~91, 1984.
- 5) Plow, E. F. et al.: Surface markers of fibrinogen and its physiologic derivatives revealed by antibody probes. Semin. Thromb. Hemostas., **8**: 36~56, 1982.
- 6) Weitz, J.I. et al.: Development of a radioimmunoassay for the fibrinogen-derived peptide B β 1-42. Blood, **67**: 1014~1022, 1986.
- 7) 緋田和子: FDP. (福武勝博ほか編: 血液凝固検査ハンドブック), 宇宙堂八木書店, 東京, 1987, 192~205.
- 8) 新井盛夫, ほか: D dimer に対するモノクローナル抗体を用いた FDP の分画定量法の検討. 臨床病理 **34**: 157~161, 1986.
- 9) Bick, R.L.: Disseminated intravascular coagulation and related syndromes. Semin. Thromb. Haemostas., **14**: 299~338, 1988.