◆総説◆

フィブリノゲンの誘導体，とくに可溶性フィブリン (soluble fibrin) と D ダイマー (D dimer) について：その生成と存在様式についての考察

その1. 可溶性フィブリン

松 田 道 生*

The Derivatives of Human Fibrinogen with Special Reference to Soluble Fibrin and the D-dimer. Their Generation and Status in the Circulating Blood.

1. Soluble fibrin

Michio MATSUDA

Key words: fibrinogen, fibrinogen derivatives, soluble fibrin, fibrin monomer, fibrin-fibrinogen complex

はじめに

フィブリノゲン (fibrinogen, 以下 Fbg) は血液凝固系の最終段階で、血液凝固酵素トロンビン (thrombin) による限定分解を受けてフィブリン (fibrin, 以下 Fbn) に転じ、次いで活性化型第 XIII 因子 (activated factor XIII, factor XIIIa) のトランスグルタミナーゼ作用によって分子間架橋 (cross-links) を導入され不溶性の線維状構築を形成して止血 (hemostasis) と組織修復 (tissue repair) に寄与している。一方、Fbn の形成と共に組織型プラスミノゲンアクチベータ (tissue-type plasminogen activator, 以下 t-PA) の吸着を誘発して線溶系の活性化を始動し、生成される線溶酵素プラスミン (plasmin) の基質となって、限定分解を受けた誘導体として血中や組織に存在している。した

がって、Fbg の誘導体は、これら三つの酵素によりどのように修復されたかによって存在の様式を異にしているし、又、その存在様式から、生体内での血液凝固線溶系の動態 (dynamics) や相 (aspects) を類推することが出来る。実際、臨床面ではフィブリン体 (フィブリノゲン/フィブリン) 分解産物 (fibrinogen/fibrin degradation products FgDP/FDP) や可溶性フィブリンモノマー複合体 (soluble fibrin monomer complex, SFMC) など、急激に進展する病態を把握する分子マーカーとしてその存在の証明や定量化の試みが続けられて来た。中でも、前者を代表するものとして D ダイマー (D-dimer)、後者のそれとして可溶性フィブリン (soluble fibrin, SF) が近年脚光を浴び、DIC 症候群や血栓塞栓性疾患などの病態下でのこれらの動態に関する成績が報告されて来ている。しかし、巷

* 自治医科大学血液医学研究部門止血血栓 [〒329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1] : Division of Hemastasis and Thrombosis Research, Institute of Hematology, Jichi Medical School, Tochigi-Ken 329-04

間，この両者についてその名称が必ずしも適切でないこと，また血中での存在様式に多少混乱ないし誤解があるようなので，この総説では2回に分けて，両者の生成に到る道のりとその存在様式に焦点を当てて解説したい。

1. Fbg の構造

Fbg は $A\alpha$, $B\beta$, γ と呼ばれる3種類のサブユニット・ポリペプチド (subunit polypeptides) が互いにジスルフィド結合して形造られる ($A\alpha$ - $B\beta$ - γ) という構造が，さらにそのアミノ (NH_2) 基の近傍でジスルフィド結合して ($A\alpha$ - $B\beta$ - γ)₂ と表現されるダイマー構造をした分子量 3.4×10^5 の巨大糖タンパク質である¹⁾ (図1)。因みに各サブユニットを構成するアミノ酸残基数は $A\alpha$ 鎖 610, $B\beta$ 鎖 461, γ 鎖 411 で， γ 鎖にはカルボキシル基末で 408 位以降に 20 残基 (γ' 408-427) が付加された γ' 鎖が数パーセント ($\sim 3\%$) 存在している。また糖鎖は N 結合型二又アンテナ様 (biantennary) 構造のオリゴ糖が $B\beta$ 鎖の Asn-364 と γ 鎖 Asn-52 に結合しており，その末端のガラクトース残基には一部シアル酸が付加され，陰性荷電を与えている (図2)²⁾。 $A\alpha$ 鎖と $B\beta$ 鎖の NH_2 基末にはそれぞれアミノ酸 16 残基および 14 残基から成るフィブリノペプチド A and B (fibrinopeptides A および B, FPA と FPB) が配置されており，トロンビンの産生と共に切断され，des AA-Fbn あるいは des AABF-Fbn に転換される¹⁾。各サ

ブユニットはその NH_2 基末近傍で複数のジスルフィド結合を介した rigid な 2 価の球状のダイマー構造，いわゆる E 領域 (E domain) を形成する。この部はまたジスルフィド結合に富む結節状構造に因んで N-disulfide knot (N-DSK) とも称せられている³⁾。因みに，Fbg 1 分子中にはシステイン (cysteine, Cys 又は C) 残基が 58 個存在し，それらがすべてジスルフィド結合 (S-S) に関与しているので，サブユニット内およびサブユニット間に合計 29 対のジスルフィド結合が存在していることになる。これら 3 本のサブユニット鎖はカルボキシル (COOH) 基側に向かって互いに捻れ合い乍ら，コイル状のヘリックス構造，いわゆる coiled coil region を形成したあと， $B\beta$ 鎖 (269 残基) と γ 鎖 (277 残基) はそれぞれ独立して球状構造を作る。この時， $B\beta$ 鎖球状塊は近位側， γ 鎖のそれは遠位側に配置され，両者が合体した形で 2 瘤の球状構造を作って 1 つの機能体をなし，D 領域 (D domain) と称せられている。 $A\alpha$ 鎖は一部 (アミノ酸残基数にして 46 残基) 球状構造を作るが，他の 404 残基は大きく反転し，COOH 基近傍で球状となり乍ら対側の $A\alpha$ 鎖 COOH 基のそれと電気的に結合する。COOH 基側の球状部分は αC 領域と称せられ，対をなす αC から成る (αC - αC) 領域は，中央 NH_2 基末 E 領域に電気的に引き寄せられ，穏やかに結合していることが電顕学的分析から明らかにされ，図3のようなモデルが提唱されている⁴⁾。

Fig. 1 Schematic model of human fibrinogen proposed by Doolittle (Doolittle et al.¹⁾).

Fig. 2 The biantennary structure of oligosaccharides linked to Asn residues at $B\beta$ -364 and γ -52 (Townsend et al.²⁾).

Fig. 3 A three-dimensional representation of fibrinogen molecule proposed by Weisel on the basis of electron microscopic observations (Weisel et al.⁴⁾). The carboxy-termini of the six subunit polypeptides are denoted by Greek letters. The carboxy-terminal portions of the B β - and γ -chains fold into individual globular nodules and constitute together a functional two-nodule domain, the D domain. The extensions of the A α -chains bend back to form an additional small globular domain, the α C- α C domain (Weisel et al.⁴⁾).

3. Fbg のトロンビンによる修飾

1) Fbn モノマーの形成

凝固酵素トロンビンは特異性のきわめて高いプロテアーゼで、アルギニン (arginine, Arg 又は一文字表記法で R) 残基の COOH 側のペプチド結合 (R-X) を加水分解する。この時、Fbg では X は常にグリシン (glycine, Gly 又は G) で、A α 鎖では R16-G17 結合、B β 鎖では R14-G15 結合が選択的に水解され、FPA と FPB がそれぞれ切断される。この時、FPA の切断は FPB の切断より著しく早く進むが、FPA の切断に伴って露呈される Fbn の重合反応基の働きで 2 本鎖原線維が形成されると、FPB の切断が加速されることが知られている¹⁾。この辺の事情に関しては後に詳しく述べることにする。最近の Shainoff らの細心な実験から、トロンビンは対をなす A α R16-G17 結合を同時に分解するものではないこと、すなわち、どちらか一方の結合が先ず開裂され、1 個の FPA のみを失った desA-Fbn となり、次いで対側の FPA をも失って desAA-Fbn となることが示された⁵⁾。この事はトロンビンによる Fbg $\rightarrow$ Fbn 転換反応の時相を知る上で臨床的な含蓄の大きいものと考えられ、その意義については

後に一項を設けて考察してみたい。

トロンビンが基質 Fbg に対して十分量生成されると、FPB の切断も進展し、desAA-Fbn は des AABF-Fbn に転じて、完成した形の Fbn モノマーが形成される。先に述べたように、この反応は Fbn 原線維の形成によって促進されることから、単独の des AABF-Fbn モノマー分子が液相に存在する可能性はきわめて小さい。これに対し、des A-Fbn や des AA-Fbn は 2 本鎖原線維の形成に先立って出現するので、単独して存在することが考えられるが、実際には、次項で述べる Fbn モノマーの重合反応を介して、反応環境に多量存在する Fbg と会合するので、これも亦、単独の分子として血中に存在する可能性はほとんど無いと考えられる。この Fbn モノマーと Fbg との会合体こそが可溶性 Fbn (soluble fibrin, 略して SF) であり、Fbg $\rightarrow$ Fbn 転換反応の中間産物として臨床的含蓄が大きい。トロンビンによって FPA と FPB がそれぞれ切断されると、A α 鎖は α 鎖に、B β 鎖は β 鎖に転換され、それぞれ新しい NH₂ 基末断片が露呈される。

2) Fbn モノマーの重合反応 (polymerization)

FPA の放出に伴って des A-Fbn あるいは des AA-Fbn の α 鎖の NH₂ 基末に A α (17-19) ペプチドに相当する Gly-Pro-Arg (GPR) peptide が露呈される。このペプチド断片は Fbn モノマーの重合反応には必須のペプチド断片で、'A' 反応基と称せられる^{6)~8)}。すなわち、NH₂ 基末 Gly 残基のもつ α -アミノ基と、第 3 位の Arg 残基のもつグアニジニウム基 (guanidinium) は共に液相にあっては陽性に荷電しており、両者はおそらく一定の方向に配置され、恰も二又ソケット様の構造を形成しているものと考えられている¹⁾。また、両者の中間に位置する proline (Pro) 残基はこれらの二又構造をしっかりと固定する役をしていると考えられる (図 4)。実際、この GPR ペプチドの中のいずれのアミノ酸に置換があっても、'A' 重合反応基の機能が障害されることが先天性変異分子での観察から明らかにされている。たとえば、Fbg Detroit では A α Arg 19 の serine (Ser)

Fig. 4 Two-pronged socket model of the 'A' polymerization site.

The α -amino group of the amino-terminal Gly and the guanidinium group of Arg at position 3(A α -19) serve as positively charged prongs, and plug into negatively charged holes in the 'a' site residing in the carboxy-terminal region of the γ -chain.

への置換のため⁹⁾，強い陽性荷電をもつグアニジウム基を欠き，二又ソケットが形成されなくなっている。この変異をもつホモ接合体の発端者（発見当時19歳の黒人女性）では，重篤な月経過多とこれによる強度の貧血が観察されている¹⁰⁾。同じ部位では他に Asn 残基への置換をもつ Fbg Munich¹¹⁾ と Gly 残基への置換をもつ Fbgs Aarhus¹²⁾，Mannheim I¹³⁾，Kumamoto¹⁴⁾ が知られているが，いずれにおいても Fbn モノマーの重合障害が観察されている。また NH₂ 基末 Gly の valine (Val) への置換，Fbg Bremen¹⁵⁾ では，Val 残基によって α -アミノ基が提供されてはいるが，Gly 残基には無い isopropyl 基 (CH₃)₂・CH- が存在する為にこれが空間的に偏位し，弱い乍ら Fbn 重合障害が観察されている（図5）。また，2つの陽電荷側鎖を固定している中央の Pro 残基の leucine (Leu) への変異体，Fbgs Kyoto II¹⁶⁾ や Kanazawa¹⁷⁾ でも，2本の側鎖を保有し乍ら，その固定が不十分なために，やはり Fbn モノマーの重合が障害されている。

一方，'A' 反応基に相補的に結合する部位は 'a' 反応基と仮称され，D 領域に含まれる γ 鎖上に存在し，特に活性化される必要なしに機能することが知られている⁶⁾⁷⁾¹⁸⁾。'A' 反応基の陽性荷電をもつ2本の側鎖に対応して，この相補的の反応基は陰性荷電をもつアミノ酸，すなわちアスパラギン酸 (aspartic acid, Asn または D) やグルタミン酸 (glutamic acid, Glu または E) が

Fig. 5 Polymerization profiles of fibrin monomer derived from fibrinogen Bremen.

A. Under a favorable condition for fibrin polymerization, the Bremen fibrin monomer polymerized nearly normally, manifesting only a slightly prolonged lag phase.

B. Under an unfavorable condition for fibrin polymerization, abnormality in the polymerization profile became evident with a much longer lag phase and a reduced amplitude (Wada et al.¹⁵⁾).

適当な間隔で配置されたペプチド断片内にあるものと考えられ，その候補として γ (291-298) 断片 (D G F D F G D D) および γ (316-323) 断片 (D N D N D K F E) が挙げられている¹⁾。'A' 反応基と同様，'a' 反応基と目されるこれらのペプチド断片内やその近傍にアミノ酸置換をもつ遺伝性変異分子でも，Fbn モノマーの重合不全が共通した特徴的所見としてあげられる。本稿ではその詳細に立ち入る余裕が無いので，この辺の情報については最近の拙著総説¹⁹⁾を参照して頂きたい。

3) 可溶性 Fbn (soluble fibrin, SF) の形成

話を元に戻して，血管内でトロンビンが形成され，Fbn 血栓が形成される病態を想定してみよう。

損傷ないし変性した血管内皮細胞表面では，新たに露呈されたリン脂質二重層 (phospholipid bilayer) 上で，活性型第 IX 因子 (IXa)

Fig. 6. Two-molecule complexes of des A-fibrin and fibrinogen (A) and des A-fibrin · des A-fibrin (B). The thrombin-activated (FPA-removed) E domain of des A-fibrin is denoted by a little letter 'e' to differentiate from the nascent E domain of fibrinogen. The latter complex is formed by reciprocal GPR interaction, which may be, however, sterically hindered, as suggested by weak aggregation of des A-fibrin (α -profibrin)⁵⁾.

による第 X 因子の活性化, 次いで, 生じた活性型第 X 因子(Xa) によるプロトロンビンの活性化が進展する。この時, 反応の中心部では血流が停滞しているため, 周辺に存在するほとんどの Fbg 分子は des AA-Fbn に転換され, 互いに重合し始める。重合が進んで 2 本鎖原線維が形成されるに伴って FPB も切断され, Fbg は des AABF-Fbn に転換されると同時に, Fbn 血栓が形成されて行く。

一方, トロンビン形成反応の中心部から離れた部分では, 血流の停滞は中心部に障害されることなく, Fbg 分子は新たに供結される状況にあると考えられるし, また反応中心から放出されてこの部に到達するトロンビンの量は限られたものにすぎない。このような環境下では, トロンビン量に対して Fbg の量は十分過剰な状態となっているために, トロンビンが Fbg を攻撃して des A-Fbn あるいは des AA-Fbn までは転換し得ても, これらの Fbn モノマー分子が相互に結合する (重合する) だけの濃度に到達し得ない。むしろ, 生じた des A-Fbn あるいは des AA-Fbn は 'A' 反応基を介して, 近くに多量に存在する Fbg の D 領域内の 'a' 反応基と結合し, (des A-Fbn · Fbg) (図 6 A) あるいは (des AA-Fbn · Fbg₂) (図 7) といった複合体を形成してしまう。ここで D 領域の 'a' 反応基の機能は Fbn と Fbg 間で相違がないことを想い起こして貰えば, 上の事情を理解して頂けるであろう。このようにして生じた (des A-Fbn ·

Fig. 7. Three-molecule complex composed of one molecule of des AA-fibrin and two molecules of fibrinogen. Since both 'A' sites in the thrombin-activated E domain denoted by a little letter 'e' are bound with their complementary sites in the D domains of fibrinogen, no more inter-molecular interactions are expected to occur. This complex exists as a soluble complex, and may serve as a better substrate than fibrinogen for thrombin.

Fbg) 複合体や (des AA-Fbn · Fbg₂) 複合体では, 'A' 反応基は 'a' 反応基と結合した状態にあり, 新たに他の 'a' 反応基に働きかける能力はない。すなわち, 血中では (des A-Fbn · Fbg) の形をとる 2 者複合体, あるいは (des AA-Fbn · Fbg₂) の形をとる 3 者複合体内の反応基が結合し合った形の可溶性分画として存在している。しかし実際には, des A-Fbn はトロンビンによって容易に des AA-Fbn に転換される一過性の中間体と考えられ, 血中での含量も低いので, 実地臨床検体, とくに患者血漿検体中でその存在を証明することは極めて困難である。一方, (des AA-Fbn · Fbg₂) の形をとる 3

Fig. 8 Aggregation assay on plasma spiked with various concentrations of des AABF-fibrin by using latex beads coated with the $F(ab')_2$ fragment of a monoclonal antibody, IF-43. The rate of aggregate formation was assessed by reading absorbance at 950 nm at 15-second intervals for 10 minutes on an autoanalyzer based on the latex photometric immunoassay (LPIA) with near infra-red turbidity. The results are expressed as ΔA_{950} as a function of the concentration of each antigen. Only soluble fibrin monomer (FM) spiked to plasma gave a dose-dependent curve, which served as a titration curve in the range up to 200 $\mu\text{g/ml}$. X, Y and E represent plasmic fragments X, Y and E, respectively, and XDP represents plasmic fragments derived from highly cross-linked fibrin (Soe et al.²⁰).

者複合体は実地臨床検体中でもSFとして十分に定量されるだけ存在している。

4) 臨床検体でのSFの証明

SFは理論的には1分子のdes AA-Fbnと2分子のFbgとの3分子会合体(triad)であると述べたが、臨床血液検体中で果たしてこのような存在様式をとっているであろうか。

著者らは最近、Fbnモノマー(fibrin monomer, FM)ではエピトープが埋もれていながら、FMモノマーがFbgと会合するとFMモノマー分子上にエピトープが発現するユニークなモノクロナル抗体を作製した²⁰。IF-43と名付けたこの抗体の $F(ab')_2$ 分画をラテック

Fig. 9 Levels of soluble FM and the D-dimer in plasmas derived from patients with or without thrombosis and bleeding. The soluble FM was measured by the latex aggregation assay as described in Fig. 8, and the D-dimer was measured by a latex aggregation assay utilizing an antibody that recognizes the NH_2 -terminal conformation of the plasmic fragment D species (Soe et al.²⁰).

スピーズに固相化し、酢酸で溶解したFbnモノマー(acid FM)の量を振って正常血漿に加えて、ラテックス凝集反応の進展の度合いをlatex photometric immunoassay (LPIA)によって測定した処、 $\sim 200 \mu\text{g/ml}$ のFM相当量まで直線的な検量線が得られた(図8)。この方法により種々の血栓塞栓性疾患を含む臨床検体(血漿)でSFを定量し、Dダイマーの量との相関関係を観察した。図9に示すように、両者の間に有意の相関はなく($r = 0.276$)、SFとDダイマーとは異なる病態を反映していることが判明した。これら71検体を血栓性疾患と出血性素因の有無で四群に分け、各群についてSFとDダイマーをそれぞれ検討したものが表1である。これから明らかなように、血栓性疾患が存在する時にはSFの値は高く(I, III群)、出血性素因のある時にはDダイマーが高値である(I, III群)。

これらの中、SF値の高い血漿検体をSephacryl S-300 HRを用いてゲル濾過すると、void volumeに引き続く、分子量 10^6 に相当する位置に、IF-43に反応する分画が認められた(図10)。

Table 1 Concentrations of soluble fibrin and the D-Dimer in patients with thrombotic disease and/or bleeding tendencies

Group*	No. of Patients	Soluble fibrin ($\mu\text{g/ml}$)	D-Dimer ($\mu\text{g/ml}$)
I	11	67.60 ± 28.38	40.01 ± 17.04
II	15	67.30 ± 59.10	10.90 ± 5.00
III	15	9.67 ± 8.71	34.54 ± 24.37
IV	30	2.41 ± 3.49	4.51 ± 3.31

*Patients were classified according to the presence or the absence of ischemic diseases and bleeding. Group I, both ischemic diseases and bleeding were present; group II, only ischemic diseases were present; group III, only bleeding was present; group IV, neither ischemic diseases nor bleeding was present (Soe et al.²⁰⁾).

Fig. 10 Gel filtration profile of plasma derived from a patient with DIC.

Vo: void volume. The relative molecular masses for the eluted fractions are indicated at the top. Inset: lane 1, fibrinogen as reference; lane 2, fraction 76, which represents the SF-enriched fractions; lane 3, des AABF-fibrin as reference. Note that the β -chain components of the proteins in fraction 76 in lane 2 were solely the B β -chain still retaining FPB. The same finding was obtained on another two patient's plasma samples. Thus, the soluble fibrin in plasma appears to be predominantly des AA-fibrin still retaining both FPBs (Soe et al.²⁰⁾).

この分画を還元下に抗 Fbg 抗体を用いて免疫ブロット法で分析したところ, inset の lane 2 に示すように, この分画の主成分はすべて FPB を保全していることが判明した。また, 混在する A α 鎖と α 鎖の比率, および分子量が 10^6 に相当することを考慮すると, IF-43 に反応するこの分画は 1 分子の des AA-FM と 2 分子の Fbg から成るものと結論づけられた。トロンビ

ンによって修飾を受けた Fbg 分子は FPA を失い乍ら FPB を保全していることが実地臨床検体において確かめられた訳で, SF としての分子種を把握する上で重要な情報と考えられる。

5) 血中 SF の臨床的意義

血中に SF (des AA-FM 1 分子と Fbg 2 分子の会合体) が存在することは, 血中にトロンビンが生成された事の直接的な証明になること

は言うまでもない。図7のモデルから容易に理解されるように，このような3分子会合体はそれ自身，2本鎖構造の最小単位をなして可溶性分画として血中に存在している。この時，更にトロンビンが生成されると，この3者複合体はトロンビンに対してきわめて親和性の高い基質となるものと考えられる。すなわち，Fbgよりも一層トロンビンに親和性が強いために，2本鎖構造内の des AA-FM からは逸速く FPB が切断されて des AABF-Fbn が形成され，さらに会合体の Fbg 分子から FPA と FPB が切断されて des AABF-Fbn 分子から成る真の Fbn 血栓へと進んで行くものと考えられる。この意味で，SF は Fbg に比べるとトロンビンの基質として Fbn 血栓へと変換され易い状態にあると考えるべきであり，単にトロンビン生成の分子マーカーとしてだけでなく，native な Fbg よりもより強い向血栓性の潜在能力（potential）を具有した可溶性分画と理解すべきであろう。

文 献

- 1) Doolittle RF, Bouma III BA, Strong D, Watt KWK: The covalent structure of human fibrinogen, in Bing DH (ed): The Chemistry and Physiology of the Human Plasma Proteins, New York, Pergamon Press, 1989, 77-95.
- 2) Townsend RR, Hilliker E, Li Y-T, Laine RA, Bell WR, Lee YC: Carbohydrate structure of human fibrinogen. *J Biol Chem* **257**: 9704-9710, 1982.
- 3) Blombäck B, Hessel B, Iwanaga S, Reuterby J, Blombäck M: Primary structure of human fibrinogen and fibrin. I. Cleavage of fibrinogen with cyanogen bromide. Isolation and characterization of NH₂-terminal fragments of the α ("A") chain. *J Biol Chem* **247**: 1496-1512, 1972.
- 4) Weisel JW, Stanfacher CV, Bullitt E, Cohen C: A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* **230**: 1388-1391, 1985.
- 5) Shainoff JR, Smejkal GB, DiBello PM, Mitkevich OV, Levy PJ, Dempfle CE, Lill H: Isolation and characterization of the fibrin intermediate arising from cleavage of one fibrinopeptide A from fibrinogen. *J Biol Chem* **271**: 24129-24137, 1996.
- 6) Kudryk JB, Collen D, Woods KR, Blombäck B: Evidence for localization of polymerization sites in fibrinogen. *J Biol Chem* **249**: 3322-3325, 1974.
- 7) Olexa SA, Budzynski AZ: Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1374-1378, 1980.
- 8) Laudano AP, Doolittle RF: Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, number of binding sites, and species differences. *Biochemistry* **19**: 1013-1019, 1980.
- 9) Blombäck M, Blombäck B, Mammen EF, Prasad AS: Fibrinogen 'Detroit': a molecular defect in the N-terminal disulphide knot of human fibrinogen? *Nature* **218**: 134-137, 1968.
- 10) Mammen EF, Prasad AS, Barnhart MI, Au CC: Congenital dysfibrinogenemia fibrinogen Detroit. *J Clin Invest* **48**: 235-249, 1969.
- 11) Southan C, Henschen A, Lottspeich F: The search for molecular defects in abnormal fibrinogens, in Henschen A, Graeff H, Lottspeich F (eds) Fibrinogen. Recent Biochemical and Medical Aspects, Berlin, Walter de Gruyter, 1982, 153-166.
- 12) Blombäck B, Hessel B, Fields R, Procyk R: Fibrinogen Aarhus: An abnormal fibrinogen with A α 19 Arg $\rightarrow$ Gly substitution, in Mosesson MW, Amrani DL, Siebenlist KR, KiOrio JP (eds) Fibrinogen 3. Biochemistry, Biological Functions, Gene Regulation and Expression. Amsterdam, Elsevier, 1989, 263-267.
- 13) Dempfle CE, Henschen A: Fibrinogen Mannheim I-Identification of an A α 19 Arg $\rightarrow$ Gly substitution in dysfibrinogenemia associated with bleeding tendency, in Matsuda M, Iwanaga S, Takada A, Henschen A (eds), Fibrinogen 4. Current Basic and Clinical Aspects. Amsterdam, Elsevier, 1990, 159-166.
- 14) Yamaguchi S, Sugo T, Hashimoto Y, Kimura K, Okajima K, Matsuda M: Fibrinogen Kumamoto with an A α Arg-19 to Gly substitution associated with thrombosis. The XIVth International Fibrinogen Workshop, Canberra, Australia, 1996,

(Abstr).

- 15) Wada Y, Niwa K, Maekawa H, Asakura S, Sugo T, Nakanishi M, Auerswald G, Popp M, Matsuda M: A new type of congenital dysfibrinogen, fibrinogen Bremen, with an A α Gly-17 to Val substitution associated with hemorrhagic diathesis and delayed wound healing. *Thromb Haemostas* **70**: 397-403, 1993.
 - 16) Yoshida N, Okuma M, Hirata H, Matsuda M, Yamazumi K, Asakura S: Fibrinogen Kyoto II: a new congenitally abnormal molecule, characterized by the replacement of A α proline-18 by leucine. *Blood* **78**: 149-153, 1991.
 - 17) Uotani C, Miyata T, Kumabashiri I, Asakura H, Saito M, Matsuda T, Kajiyama S, Iwanaga S: Fibrinogen Kanazawa: a congenital dysfibrinogenemia with delayed polymerization having a replacement of proline-18 by leucine in the A α -chain. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **2**: 413-417, 1991.
 - 18) Yamazumi K, Doolittle RF: Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: localization of the label to γ -chain Tyr-363. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2893-2896, 1992.
 - 19) Matsuda M: The structure-function relationship of hereditary dysfibrinogens. *Intern J Haematol* **64**: 167-179, 1996.
 - 20) Soe G, Kohno I, Inuzuka K, Itoh Y, Matsuda M: A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen and its derivatives: its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. *Blood* **88**: 2109-2117, 1996.
 - 21) Matsuda M, Terukina S, Yamazumi K, Maekawa H, Soe G: A monoclonal antibody that recognizes the NH₂-terminal conformation of fragment D. in Matsuda M, Iwanaga S, Takada A, Henschen A (eds) *Fibrinogen 4. Current Basic and Clinical Aspects*. Amsterdam. Elsevier 1990, 43-48.
-