ヒトフィブリノゲンのプラスミンによる
初期分解産物“fragment A”の研究
—単離法, 性状, radioimmunoassay 法
による測定と臨床的意義—

自治医科大学臨床病理学教室 (指導 河合 忠教授)

高木 皇輝

STUDIES ON EARLY PLASMIN DEGRADATION PRODUCT “FRAGMENT A”
OF HUMAN FIBRINOGEN
—ISOLATION, CHARACTERIZATION, RADIOIMMUNOASSAY FOR
FRAGMENT A AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE

Kimiteru TAKAGI, MD

Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, Tochigi

(Director: Prof. Tadashi Kawai)

概要 ヒトフィブリノゲンをプラスミンを用いて分解した時に, 最も初期段階に生じる断片の一つであるペプチド“fragment A”を単離した. fragment Aの分子量は約22,500で, 免疫電気泳動法で β -領域に泳動された. アミノ酸組成はグリシン, セリン, スレオニン, プロリンの含有量が高く, 疎水性アミノ酸の含有量がきわめて低い特徴がみられた. fragment Aは抗フィブリノゲン血清と反応せず, fragment Aの抗血清はフィブリノゲンと反応した. radioimmunoassay法による正常成人血清中のfragment A濃度は $3.57 \pm 1.62 \mu\text{g/ml}$ で, 各種疾患についての測定ではとくに急性白血病, 悪性腫瘍, 脳血管障害, 腎不全, 全身性エリテマトーデス, 敗血症例で高値が認められた. 循環血中のfragment Aをとらえることにより in vivoにおけるfibrinogenolysis, またはfibrinolysisの病態生理を解明するのに役立つものと思われる. さらに線溶能の増減をきたす各種疾患においてその臨床的意義が高いものと思われる.

I. 緒 言

フィブリノゲン, トロンビン, 活性第XIII因子, プラスミンが血栓の形成, 安定化, それに続く線

溶に重要な役割をなしている. したがって循環血中のこれら酵素の作用をとらえることは生体の病態生理を解明する上に有用と思われる. その検索法の一つとして, これら酵素の反応産物を循環血中でとらえる方法がある. その試みとして, トロンビンによりフィブリノゲンから遊離するfibrinopeptide Aのradioimmunoassayによる測定が

〔昭和52年1月20日受稿〕

本論文の要旨は次の学会において発表した. 第27回電気泳動学会 (昭和51年10月29日), 第18回日本臨床血液学会総会 (昭和51年12月10日).

報告されている¹³⁻²⁰⁾。

本論文では、ヒトフィブリノゲンをプラスミンを用いて分解した時に遊離する初期分解産物の一つである“fragment A”の単離法、アミノ酸組成、分子量、抗血清の作製法とその性状について報告し、さらにradioimmunoassay法による循環血中fragment Aの測定法を確立し正常成人および各種疾患患者について測定した成績について報告する。併せてfragment A測定の臨床的意義についても考察を加える。

II. 実験材料と方法

ヒトフィブリノゲンはエタノール分画法⁴⁾によりclottability 97%以上の分画として精製したものとフィブリノゲン(AB, Kabi, Grade L, Stockholm, Sweden)から得たもの—clottability 96%—を使用した。この中にはプラスミンによるfibrinogenolysisをみる上に十分量のプラスミノゲン(約1%)が含まれている。

A. Fragment Aの単離と抗血清の作製

1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるフィブリノゲンのプラスミン分解過程の追跡

プラスミンによるフィブリノゲンの分解過程を追跡し、fragment Aの分離に適切な条件を見出すために、0.15M NaCl-0.05M Tris緩衝液(pH 7.5)に溶解した1%フィブリノゲン溶液にプラスミン(AB, Kabi)をフィブリノゲン1mgに対して0.05CTAU, またはウロキナーゼ(ミドリ十字社製)を10u/mlの割合で加え37°Cにインキュベートした。種々の反応時間(0分, 10分, 20分, 30分, 60分, 120分)を経過した後, 2%SDS(sodium dodecyl sulfate)を含む8M尿素溶液に混合し反応を停止した。また, 還元型の検索には, β -メルカプトエタノールを10 μ l/mlの割合に加えて経時的变化を追跡した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動には5%ゲルを用い, 泳動用緩衝液として, 0.1%SDSを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)を用い, 8mA/gelで通電して泳動を行なった。ゲル中の蛋白帯の染色は0.2%coomassie

brilliant blue染色液を用い60°C, 30分間染色し, 脱色は7%酢酸と5%エタノール液を用い60°Cで行なった。

2) Sephadexカラムクロマトグラフィーによる分画と精製

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で, フィブリノゲンのプラスミン分解過程を確認し, fragment Aの出現する最適時間を求めてから施行した。すなわち, 500~700mgのフィブリノゲン溶液にウロキナーゼを加えて反応を開始し, 求めた最適時間にsoybean trypsin inhibitor—SBTI—(Sigma社製)を0.2mg/ml加え反応を停止した。しかる後, 反応液を90°C, 10分または60°C, 30分加熱処理してから4°C下, 30分, 15,000rpmで遠沈した。上清を集めて凍結乾燥を行なった後, 少量の蒸留水に溶解し, 0.15M重炭酸アンモニウムで平衡化したSephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Ltd.), カラムサイズ 2.5×90cmにかけて3mlずつ集めた。

3) 分子量の測定

7.5%ゲルを用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定した。標準分子量既知蛋白としてフィブリノゲン, IgG免疫グロブリン, ウシ血清アルブミン(Miles社製), トリプシン(ベーリンガー・マンハイム・山之内社製), チトクロームC(ベーリンガー・マンハイム・山之内社製), ウシヘモグロビン(和光純薬社製)を使用した。

4) アミノ酸分析

6N塩酸で真空下110°C, 20時間, 40時間, 60時間加水分解を行ない, 分析はSpackmanらの方法にしたがつて日本電子の全自動アミノ酸分析機(JLC-6AH)を用いて行なった。

5) ゲル内免疫拡散法による沈降反応

Ouchterlony法にしたがつてgel diffusionは1% agar (Difco社製)を用いて室温で20時間反応させ, 染色は0.5%Amido Black 10Bで10分間行ない5%酢酸液で脱色した。

6) 抗血清の作製

単離したfragment Aを生食に3mg/mlの濃度

に溶き、同量の complete Freund's adjuvant と混和し家兎（6羽）の四肢掌および背部皮下各所に2週毎に連続して8週行ない、booster注射後1週目に採血して得た。ウサギ血清の最終抗体価は5羽が1:64, 1羽が1:16であつた。

B. Fragment A の radioimmunoassay

1) Fragment A のラジオアイソトープによる標識

Hunter and Greenwood法でクロラミンT（和光純薬社製）を用いて¹²⁵Iで標識を行なつた。fragment A 50μgを100μlの0.05Mリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、3 mCiのcarrier free Na ¹²⁵I（New England Nuclear, Boston, Mass.）20μlと混和。1.75mg/mlのクロラミンT溶液50μlを加えよく混和する。60秒間攪拌後16mg/mlのsodium metabisulfate（和光純薬社製）10μlを加え、次いで100μlの2%KI溶液を加えた。溶解はすべて0.05Mリン酸緩衝液を用いた。ヨード化したfragment AをSephadex G-50（Pharmacia Fine chemicals）—カラムサイズ0.85×16cm—にて0.05Mリン酸緩衝液（pH 7.4）でゲル濾過を行ない分離した。

2) Fragment A の radioimmunoassay 法

二抗体法を用いて行なつた。radioimmunoassayに用いた緩衝液（RI-緩衝液）は0.1%ウシ血清アルブミン、3.3%デキストランT40（Pharmacia Fine Chemicals）、0.01M ethylenediamine tetraacetic acid（EDTA）、50KIU/mlトラジロール（Bayer社製）を含む0.05Mリン酸緩衝液（pH 7.5）を使用した。

100μlの¹²⁵I-fragment A（約10,000cpmに調整）にRI-緩衝液100μl、抗血清希釈液100μl、測定用希釈血清または標準fragment A 100μlと正常ウサギ血清希釈液100μlを加えて混和し、室温（22~25℃）で14~15時間インキュベートする。次に、ヤギ抗ウサギγ-グロブリン血清（栄研化学社製）希釈液100μlを加え室温で30分インキュベートした後、4℃下、3,000rpm30分間遠沈し沈殿物をgamma counter（Aloka Auto well gamma system JDC-752）にかけて測定した。

3) 検体の採取と処理

ポリプロピレン注射器にて静脈血9mlを採血し、直ちに13mg ε-アミノカプロン酸（EACA—和光純薬社製—）と500KIUトラジロールを含む溶液1mlの入った容器に移し、37℃、4時間静置後2,500G、20分間遠沈して血清を分離した。分離後、フィブリノゲンおよび大きな分解産物が万が一混入している場合を想定し、これを除くために60℃で30分間加熱処理後15,000G、20分間遠沈し最上清を集めて測定に用いた。熱処理後の検体をOuchterlony法にしたがつて抗フィブリノゲン血清（Behringwerke, AG, Germany）との反応を行ない、沈降線の出現しないことを確かめた。さらに、トラジロール、EACA以外の抗プラスミン試薬として1ml中にSBTI 0.5mg, polybrene（Sigma社製）50μg, benzamidine（Sigma社製）5mgをそれぞれ組み合わせて添加抗プラスミン剤による測定値に与える影響を検討してみたが、これら試薬類の組み合わせによる測定成績への有意な差は認められなかつたことからトラジロールとEACAの二者を用いて実験を行なつた。

C. 正常成人血清および各種疾患における fragment A の測定

正常健康成人20例（20~30才台、男性15、女性5）と各種疾患250例（10~70才台、男性183、女性67）における血清は前記の方法にしたがつて分離し測定した。疾患の内容は急性白血病（AL）40例—急性骨髄性白血病（AML）17例、急性前骨髄性白血病（APL）4例、急性単球性白血病（AMoL）5例、急性リンパ性白血病（ALL）4例、急性骨髄性白血病緩解期例10例—、慢性骨髄性白血病（CML）8例、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）5例、悪性リンパ腫12例、脳血管障害18例—脳出血12例、脳血栓塞栓症6例—、心筋硬塞7例、悪性腫瘍116例—肺癌17例、胃癌41例（進行癌36例、早期癌Ⅱc5例）、食道癌4例、大腸癌9例、脾臓癌4例、肝臓癌12例、脳腫瘍5例、甲状腺癌2例、上顎癌2例、腎腫瘍5例、膀胱癌3例、前立腺癌5例、子宮・卵巣癌7例—、敗血症3例、腎

不全6例, 全身性エリテマトーデス (SLE) 5例, 肝硬変症21例, 胃潰瘍6例, 子宮筋腫3例の合計250例である。

III. 実験成績

1) フィブリノゲンのプラスミン分解過程

プラスミンによるフィブリノゲンの分解過程を各時間毎に追ってみるとFig. 1のようになる。この条件下では20~30分の間にfragment Xおよびfragment Aが現われ, さらに時間が経過するにつれfragment Y, D, Eが出現する。還元型でみるとfragment X, Aの出現の時期にA α 鎖が分解されて小さくなっていくのが明らかである。この実験成績からfragment Aを得るためには30~60分の間のプラスミン消化でよいことがわかる。すなわち, 非還元下でfragment Yがわずかに見ら

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the plasmin digests of human fibrinogen. Gel column indicate the digests treated for 0, 10, 20, 30, 60, 120 minutes, respectively. (F; fibrinogen, X; fragment X, Y; fragment Y, D; fragment D, E; fragment E, A; fragment A, α ; β , γ , α - β - γ -chains).

れ, 熱に安定性のfragment Eの出現がない時期で, しかも還元型でみるとA α 鎖に相当する蛋白帯が消失または消失しかかり, B β 鎖, γ 鎖に余り変化のない時期を最適時間とした。以下大量のフィブリノゲンを用いてプラスミン分解を行なう時には, この条件を用いたがフィブリノゲンのLoTが新しくなるごとにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で検討し上記の条件に合うところを使用した。このようにして500mgのフィブリノゲンを用いて同様の条件下でプラスミン分解を行ない, 所定の時間後SBTIを加えて反応を停止し, 反応液を前記のごとく加熱処理後, 遠沈し変性した蛋白質を除き上清を凍結乾燥し, これをSephadex G-200にて展開した (Fig. 2)。Fig. 2で示すように, 最初の分画に熱未変性の成分がみられ次の分画にfragment Aが溶出され, さらに第3番目の分画に小さなペプチドが溶出される。fragment Aを含む第2分画 (tube No. 85~115) をプールして凍結乾燥を行なった。プールした分画をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法でみると還元型 (r), 非還元型 (nr) とともにfragment A

Fig. 2. Gel filtration pattern of the heat-denatured supernatant. Gel filtration on Sephadex G-200 was done for the plasmin digests (30min) of human fibrinogen (500mg). Fraction size is 3ml; flow rate, 24ml/h; temperature 4°C. Fractions labelled 85-115 were pooled. The insert shows SDS gel electrophoretic patterns of the pooled fragment A in its non-reduced (nr) and reduced (r) form.

は単一の成分として確認された (Fig. 2 右上写真). この方法により fragment A はフィブリノゲン 500mg から 71mg 収量された.

なお, フィブリノゲンの分解は実験に用いたフィブリノゲン中には十分量のプラスミノゲンが含まれているのでウロキナーゼを用いてこれを活性化して分解しても, またプラスミンを用いて分解しても本実験の fragment A 単離という面から差はみられなかつた.

2) Fragment A の分子量

Fig. 3 で示すように SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定するとおよそ 22,500 であつた.

3) Fragment A のアミノ酸組成

Table 1 のようにセリン, グリシン, スレオニン, プロリンの含有量が多く (全体の 51%), hydrophobic なアミノ酸の含有量がきわめて少ないことが特徴であつた. トリプトファンの分析は行なわなかつた.

4) Fragment A と抗フィブリノゲン血清との反応

Fragment A は免疫抗体と単一に反応することが証明されたが, fragment A ($0.3\mu\text{mol/l}$) と抗フィブリノゲン血清との反応では両者の間に

Table 1. Amino acid composition of fragment A^a.

Aspartic acid	8.01
Threonine ^b	11.05
Serine ^b	16.65
Glutamic acid ^c	10.18
Proline	7.47
Glycine	16.76
Alanine	3.97
Half-cystine	0.21
Valine	3.33
Methionine	1.01
Isoleucine	1.42
Leucine	2.78
Tyrosine	1.16
Phenylalanine	3.38
Histidine	2.33
Lysine	5.11
Arginine	5.36

^a Values are given as molar ratios. Determined from average values obtained from 20-, 40-, and 60-hr hydrolyses.

^b Values obtained from 20-hr hydrolysis.

^c Extrapolated value obtained from 20-, 40-, and 60-hr hydrolyses.

沈降線は認められなかつた. しかし, fragment A の抗血清はフィブリノゲン (1g/l) との間には明らかな沈降線が認められた (Fig. 4). また fragment A (A) とフィブリノゲン (F), 抗 fragment A (A-A), 抗ヒト全血清 (AWHS), それにヒトフィブリノゲンを 4 時間 プラスミン分解した産物 (F-P) との間の免疫電気泳動では fragment A は β -領域に泳動された (Fig. 5). なお, 家兎に抗原として用いた fragment A はフィブリノゲンをプラスミンまたはウロキナーゼで分解して得たものを用いたが, 抗血清作製の面から両者における差はみられず共に最終抗体価 1:64 が得られた.

5) Fragment A のラジオアイソトープによる標識

Fig. 3. Estimation of the molecular weight of fragment A by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% gel). The black dott indicates the fragment A.

Fig. 4. Immunodiffusion pattern of the fragment A. A: fragment A ($0.3\mu\text{mol/l}$), A-A: anti-fragment A rabbit serum (undiluted), A-F: antifibrinogen, F: fibrinogen (1g/l).

Fig. 5. Immunoelectrophoretic pattern of the fragment A (A) with fibrinogen (F), antiserum against fragment A (A-A), anti-whole human serum (AWHS), and plasmin digests (4hr) of human fibrinogen (F-P).

Table 2で示すようにラジオアイソトープによる標識を行なった後の溶出パターンはFig. 6のような結果が得られた。すなわちSephadex G-50を用いたカラムクロマトグラフィーで、fraction全体をキュリーメーターで測定したものをradioactivity (●—●)で示し、① 各fractionから10μlずつ分取し0.1分間カウントしたもの、②①の各tubeに0.25Mリン酸緩衝液(0.1%ウシ血清アルブミンを含む)0.5mlを加える。次いで0.5mlのデキストラン炭末液(0.05%デキストランT-70, 0.5%炭末(Norit A), 0.9%NaCl, 0.2%ウシ血清

Table 2. Radioiodination of fragment A (Chloramine-T method).

3 mCi Na ¹²⁵ I -----	20 μl
0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 -----	100 μl
Fragment A* -----	50 μg
Chloramine T (1.75 mg/ml)* -----	50 μl
↓ 60 sec	
Sodium metabisulfate (16 mg/ml)* -----	10 μl
2% KI* -----	100 μl
↓	
Sephadex G-50 (0.85 x 16 cm)	

* dissolved in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4

Radioiodination of fragment A

Fig. 6. Gel filtration of labeled fragment A. Fragment A was filtered over 0.85x16cm Sephadex G-50 columns with 0.05M phosphate buffer (pH 7.4) as elutant.

アルブミン)を加えて攪拌した後室温で15分放置。3,000rpmで10分間遠心し上清を吸引除去した後の沈殿をカウントしたもの、③

$$\left(1 - \frac{\text{②のカウント値}}{\text{①のカウント値}}\right) \times 100$$

を图中damage (Δ---Δ)として示した。fraction No. 13, 14, 15のピークはNa¹²⁵I未反応のヨードと思われる。radioactivityの59.3%が回収され、これを標識抗原として使用した。比放射能は約43μCi/μgであつた。

6) Fragment Aのradioimmunoassay法

Table 3で示すように行なつたが、標識fragment Aは約10,000cpmに調整し、抗fragment Aウサギ血清はFig. 7で示すように500倍希釈を用いた(200倍希釈でも可能)。正常ウサギ血清とヤギ抗ウサギγ-グロブリン血清は、ともに40倍希釈を用い検体は25倍希釈して測定した。

7) Fragment Aの標準曲線

Fig. 8で示すような結果が得られた。

8) 正常成人血清中のfragment A濃度

健康正常成人20例の測定結果は $3.57 \pm 1.62 \mu\text{g/ml}$ を示した。

Table 3. Radioimmunoassay of fragment A (two antibody method).

Dilution buffer*	-----	100 μ l
Sample or Standard serum	-----	100 μ l
Fragment A-1-125, cd. 10,000cpm	-----	100 μ l
Rabbit anti-Fragment A serum	-----	100 μ l
Normal rabbit serum	-----	100 μ l
room temp. 14hr		
Goat anti-rabbit γ -globulin serum	-----	100 μ l
room temp. 30 min		
Centrifugation, 3,000 rpm, 30 min		
Count precipitates		

* 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5 containing 0.1% bovine serum albumin, 3.3% Dextran-T 40, 0.01 M ethylenediamine tetraacetic acid and 50 IU/ml trasylol.

Fig. 7

9) 各種疾患患者におけるfragment A測定値

Fig. 9, Table 4 で示すように急性白血病, 脳血管障害, 心筋硬塞, 悪性腫瘍で高値を示した。また症例は少ないが, 敗血症, SLE, 腎不全ではきわめて高値がみられた。測定した急性白血病のうちではAPLにおいて著しい高値が得られた。しかし, 緩解期のAMLではほぼ正常に近い値を示した。またCMLは急性白血病中でも比較的低値を示したALLよりもやや高値を示した。脳血管障害

Fig. 8. Standard curve of fragment A with radioimmunoassay.

では, 脳出血よりも脳血栓症において高値を示す傾向がみられた。悪性腫瘍は全体でみても正常より高値を示しておりとくに胃進行癌, 肺癌, 脾・肝臓癌, 腎・前立腺癌では高値がみられた。悪性腫瘍中乳癌例については症例が得られず本研究では検討できなかった。その他の疾患では肝硬変症がやや高値を示したが, ITP, 悪性リンパ腫, 上記以外の悪性腫瘍例, 胃潰瘍, 子宮筋腫では測定値の分布をみると高値を示す例もあるが全体的にはほぼ正常に近い値が得られた。

IV. 考 案

フィブリノゲンの物理的, 化学的諸性質は広く研究されている⁵⁾⁻⁹⁾。フィブリノゲンは分子量約340,000の巨大な分子で, 3本のポリペプチド鎖が1対ずつ計6本鎖 ((A) α_2 , (B) β_2 , γ_2) から構成されており, いずれもS-S橋で連結している。S-S結合を切断すれば各鎖をそれぞれ分別できる¹⁰⁾。各鎖の分子量はA α =68,000, B β =56,000, γ =47,500と報告されている⁸⁾。フィブリノゲンをプラスミンにより分解するとまずfragment X (分子量約240,000) が出現し, 次いでfragment Y (分子量約160,000), そしてfragment D (分子量83,000~100,000) とfragment E (分子量約60,000) が出現する⁸⁾⁷⁾¹¹⁾。これらfragmentsは物質的に必ずしも均一でなく各fragmentの出現する段階に小さな, またはやや大きなペプチド

* See the text in details about abbreviations.

Fig. 9. Serum concentration of fragment A in various diseases.

Table 4. Serum concentration of fragment A in various diseases.

Disease	No. Patients (Total 250)	Fragment A (mean $\pm$ SD) $\mu\text{g/ml}$
Acute Leukemia	40	6.87 $\pm$ 5.66
Acute Leukemia except for AML in Remission	30	7.64 $\pm$ 6.33
AML	17	6.83 $\pm$ 5.46
APL	4	13.50 $\pm$ 11.86
AMoL	5	7.52 $\pm$ 4.17
ALL	4	5.40 $\pm$ 2.86
AML in Remission	10	4.55 $\pm$ 2.41
CML	8	6.25 $\pm$ 2.32
ITP	5	4.10 $\pm$ 0.93
Malignant Lymphoma	12	5.36 $\pm$ 2.75
Cerebrovascular Disorders	18	7.13 $\pm$ 4.94
Cerebral Haemorrhage	12	6.55 $\pm$ 4.29
Cerebral Thromboembolism	6	8.28 $\pm$ 6.35
Myocardial Infarction	7	8.44 $\pm$ 6.47
Malignant Neoplasms	116	6.84 $\pm$ 4.82
Carcinoma of Lung	17	8.42 $\pm$ 5.75
Stomach	41	7.72 $\pm$ 5.15
Advanced	36	8.30 $\pm$ 5.25
Early (IIc)	5	3.58 $\pm$ 1.47
Esophagus	4	3.92 $\pm$ 1.29
Colon	9	3.81 $\pm$ 1.92
Pancreas	4	6.20 $\pm$ 1.81
Liver	12	7.22 $\pm$ 2.30
Brain	5	4.02 $\pm$ 1.59
Thyroid Gland*	2	
Upper Jaw**	2	
Kidney	5	7.84 $\pm$ 5.97
Bladder	3	3.90 $\pm$ 1.57
Prostate	5	9.56 $\pm$ 9.54
Uterus & Ovary	7	4.68 $\pm$ 3.27
Sepsis	3	19.10 $\pm$ 9.51
Renal Failure	6	29.05 $\pm$ 24.35
SLE	5	14.54 $\pm$ 11.82
Liver Cirrhosis	21	5.40 $\pm$ 2.76
Gastric Ulcer	6	4.23 $\pm$ 1.53
Myoma Uteri	3	3.53 $\pm$ 1.20

* Serum concentration of fragment A in 2 cases; 2.6, 9.6 $\mu\text{g/ml}$.** 6.5, 8.1 $\mu\text{g/ml}$.

が遊離してくる⁸⁾¹⁸⁾。プラスミンによるフィブリノゲンの分解過程はFig. 1で示したように、分子量の小さなペプチドが経時的にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で蛋白帯としてとらえられる。本実験の条件下では、fragment Aはフィブリノゲンをプラスミンで分解すると20分後からわずかに出現し、時間の経過につれて明らかに認められる。一般には10分から12時間までほとんど変化なく認められる。また純化したfragment AをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で見ると、 β -メルカプトエタノールを加えた還元型(r)においても、その位置に変化はみられず、単一のペプチドであることがわかる (Fig. 2中右上写真)。fragment Aの分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で約22,500として測定された (Fig. 3)。fragment Aはfibrinogenolysisの初期に遊離してくる比較的安定したペプチド

であり、耐熱性を有することからフィブリノゲンをプラスミン分解した後、加熱処理を行なうことによりfragment X, Yなどの高分子ペプチドを除くことができる (Fig. 2)。fragment Aについてきわめて特徴的なことはアミノ酸構成であり、セリン、グリシン、スレオニン、プロリンの含有量が多く (全体の51%)、hydrophobicなアミノ酸が非常に少ないことである (Table 1)。このことはhydrophilic peptideはフィブリノゲン分子の比較的表面に位置している¹²⁾ため、容易にプラスミンのattackを受けるのではないと思われる。プラスミンによるフィブリノゲンの分解はC末端から始まり、fragment XやYはC末端がプラスミンにより切断されたものであるらしいことも明らかにされており⁸⁾¹⁸⁾、C末端はcross-linking regionの崩壊、消失とからんで注目されている¹⁴⁾。また、プラスミンは最初 $\alpha\alpha$ 鎖の中央部をattackし、この際

いくつかの小さなペプチドとプラスミンに比較抵抗性をもつ大きなfragmentを遊離するとされ⁸⁾¹⁸⁾¹⁵⁾, fragment AはA α 鎖のC末端よりプラスミンにより切断されて生じたものとされている¹⁸⁾¹⁵⁾. フィブリノゲンの免疫学的考察では¹⁶⁾¹⁷⁾, fragment X, Y, D, Eは抗フィブリノゲン血清との間にOuchterlony法, 免疫電気泳動法で沈降反応が認められる. 一方, fragment Aは両法を用いても抗フィブリノゲン血清との間に沈降線は認められなかつた (Fig. 4). また抗fragment A血清はフィブリノゲンとの間に沈降反応を認めるが (Fig. 4), fragment D, Eとの間には沈降反応を認めなかつた. fragment Aは免疫電気泳動法でみると β -領域に泳動された (Fig. 5). なお, fragment Aのfunctionalな性状は, 今回検討を行なっていないため今後の課題の一つとしたい.

トロンビン, 活性第XIII因子, プラスミンの3酵素が血栓の形成, 安定化, それにつづく溶解に重要な役割をなしていることから, 循環血中のこれら酵素の反応産物を何らかの方法でとらえることは, 生体内の凝固線溶における病態生理を解明する手助けになるものと思われる. トロンビンによりフィブリノゲンのA α 鎖N末端から遊離してくる16個のアミノ酸から成るfibrinopeptide Aについての単離, およびradioimmunoassay法による測定はすでに報告されており^{1)~8)}, 血漿中のfibrinopeptide Aは血管内凝固症候群, 血栓塞栓症, 悪性腫瘍, 火傷, 骨折で上昇するという. 著者はfragment Aはプラスミンがフィブリノゲンに作用した時に, 一番初期にA α 鎖のC末端より遊離することからプラスミンの初期分解状態をとらえるのに有用と思われradioimmunoassay法でfragment Aの測定を行なつた. fragment Aの抗血清の作製, radiolabelingおよびradioimmunoassay法などについてはFig. 4, 6, 8, Table 2, 3に示した通り満足すべき条件を確定し得た. 正常成人20例の血清中fragment A濃度は $3.57 \pm 1.62 \mu\text{g/ml}$ を示したが, 測定した血清中にかなりの量のfragment Aが含まれていることにかんして

は, 次の二つの可能性が考えられる. 一つは, 本実験の成績 (Fig. 4) で示すように, 抗fragment A血清がフィブリノゲンと反応することによる可能性である. すなわち, 測定した血清中に微量のフィブリノゲンが含まれている可能性である. これを除く目的で分離血清にはさらに熱処理を行ない, 遠沈後の最上清を測定に使用した, 最上清は抗フィブリノゲン血清とOuchterlony法で反応を行なつてみたが, 沈降線は認められなかつた. しかし, Ouchterlony法の感度は, $50 \mu\text{g/ml}$ 以下の蛋白は感知し難いことから考えるときわめて微量のフィブリノゲンが含まれている可能性を否定し得ない. もう一つはAstrupのいうhemostatic balance¹⁹⁾が生体内で生じており, トロンビンやプラスミンが絶えず作られ, フィブリノゲンやフィブリンに作用しているものと考えられる. すなわち, 生理状態においても凝固系は活動し, 微量のトロンビンが作られ, できたフィブリンは血管内膜を保護する作用をしていると推定される. したがって凝固系の活動に対比するように線溶系も活動し, プラスミンが活性化されておりフィブリノゲンがプラスミンにより部分的に分解を受けていることが推定される. その結果循環血中にもプラスミンのattackを受け, C末端を遊離したnativeでないフィブリノゲンがかなり含まれていると思われる. Cottrellら¹⁹⁾はフィブリノゲンをcarboxymethyl cellulose columnで分けてみると γ , β 鎖と異なり α 鎖は2峰性の α_1 と α_2 に分けられ, これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法でみると, α_1 はC末端が存在するnativeなフィブリノゲンだが, α_2 はすでにC末端が見出されないと報告している. このことから生理的状态においても, プラスミンの作用によりフィブリノゲンのC末端から生じるfragment Aがかなり循環血中に存在するものと思われる. またA α 鎖は構造上表面に位置しており, プラスミンにattackされやすいことも一因となり得よう. これらのことから後者の可能性がきわめて強いと考えられる.

諸疾患における血清中のfragment AはFig. 9,

Table 4 で示すように急性白血病—とくにAPL—, 脳血管障害, 悪性腫瘍で高値がみられた. また症例が少ないが敗血症, SLE, 腎不全ではきわめて高値がみられた. 一般にフィブリノゲンの減少を伴う血液疾患でfragment Aが高値を示したことは血管内凝固により凝血異常がおこり, 二次的に線溶亢進が加わつたものと考えられる. また通常フィブリノゲンが著しく増加していると考えられる重症感染症(本論文では敗血症), 進行癌などでは症例数が少なくまた成績にばらつきがみられるが, 高値を示した. 悪性腫瘍のうちでは肺癌, 前立腺癌, 胃進行癌, 腎の悪性腫瘍で高値の傾向がみられた. 癌患者にみられる出血傾向の多くは血液凝固および線溶系の異常と考えられるが, 最近各種疾患に伴う全身の臓器, 組織に血栓と出血が存在する症候群—disseminated intravascular coagulation (DIC)—についての報告がみられるようになり, 基礎となる原因疾患は感染症, 悪性腫瘍, 重症肝障害, 血液疾患など多岐にわたっている. DICはびまん性の血管内血栓をもつた凝固系の亢進であり, これが凝固因子の消費をもたらし出血傾向を招くと考えられる. 正常状態ではフィブリンの過剰生産があるとfibrinolytic mechanismにより破壊除去されるが, DICではフィブリン形成はfibrinolytic capacityを越えていると考えられる. 必然的にプラスミンの活性も大となりフィブリノゲン, フィブリンへのattackも活発に行なわれるものと推定される. さらに癌患者の血液凝固系については諸家の報告にもみられるように, 血漿フィブリノゲン値が高く, 線溶能が低下し凝固亢進状態にあるものと思われる. しかしこのような状態下においても生体の機構として, プラスミンによるフィブリノゲンの分解は正常以上に働いているものと思われる. また凝血因子の生物学的半減期の測定ではフィブリノゲンは4~7日である. このことは凝血因子の代謝回転がかなり速いことを示しているが, DICを伴う疾患ではフィブリノゲンの代謝が速いことからプラスミンの作用もより活発に行なわれていると推定される. このよう

なことから, DICでは凝固・線溶両系を活性化させる作用が働いているものと思われる. 従つて測定した諸疾患中, きわめて高値を示した例はいずれもこのような状態にあつたのではないかと推定される. 悪性腫瘍におけるDICの報告例の中でも, Straub²⁰⁾はDIC 20例中12例が進行癌であり, このうち7例は前立腺癌であつたと報告している. 測定した悪性腫瘍例中, 肺, 胃, 前立腺, 腎の腫瘍でfragment Aが高値を示したことは前記したが, これら症例においてDICの有無, また存在したとしてもその程度については不明である. DICの診断に必要な検査の一つにFDP (Fibrin (ogen) degradation product) の測定がある. fragment Aと従来からいわれているFDP (fragment X, Y, D, E) の測定値との関係および両者間の測定値の信頼度の差については検討を行なっていないが, fragment Aはearly FDP (fragment X, Y) よりも初期にプラスミンの作用を受けてフィブリノゲンC末端より遊離してくる最も初期段階の分解産物であることから, これを測定することにより臨床的に早期の段階で生体内に生じた線溶状態異常をとらえることができるとと思われる. さらにfragment Aの測定はfibrinolytic activityの増減をきたす各種疾患の臨床経過把握の上で有用と思われる他に, 生体における線溶現象の病態生理を解明する情報を与えるものと思われる.

V. 結 論

ヒトフィブリノゲンのプラスミンによる初期分解産物“fragment A”を単離し, その性状を検討するとともにradioimmunoassay法により正常成人, 諸疾患における血清中のfragment A濃度を測定して次の結果を得た.

1) 本論文におけるfragment Aの単離法はきわめて簡単で, かつ収量がよいことを確認した.

2) Fragment Aの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で測定した結果, 約22,500であり, アミノ酸組成ではhydrophilicなアミノ酸の含有量が多く, hydrophobicなアミノ酸の含有量はきわめて少ないという特徴がみられた.

3) Fragment Aは抗フィブリノゲン血清と反応せず、またfragment Aの抗血清はフィブリノゲンと反応した。免疫電気泳動法ではfragment Aは β -領域に泳動された。

4) 正常成人血清中のfragment A濃度は $3.57 \pm 1.62 \mu\text{g/ml}$ であつた。各種疾患中、急性白血病、脳血管障害、悪性腫瘍、敗血症、腎不全、SLEで高値が認められた。

5) 検体(血清)中にもきわめて微量のフィブリノゲンが存在することも推定されたが、むしろ生理的状态においてもプラスミンのattackを受けたnativeでないフィブリノゲンがかなりの量として循環血中に存在するものと思われた。

6) Fragment Aはin vivoにおけるfibrinogenolysisまたはfibrinolysisの病態生理解明に役立つものと思われる。さらに臨床的にも凝固線溶異常を示す諸疾患において、fragment Aの測定は意義あるものと思われる。とくに急性前骨髄性白血病、敗血症、腎不全において臨床的にfragment Aの測定は意義あるものと思われる。

文 献

- 1) Nossel, HL, et al: Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A. *Proc Nat Acad Sci USA* 68: 2350, 1971. —2) Nossel, HL: Measurement of fibrinopeptide A in human blood. *J clin Invest* 54: 43, 1974. —3) Kockum, C: Radioimmunoassay of fibrinopeptide A—Clinical applications. *Thrombos. Res* 8: 225, 1976. —4) Doolittle, RF et al: Amino acid studies on artiodactyl fibrinopeptides. *Arch Biochem Biophys* 118: 456, 1967. —5) Nussenzweig, V, et al: Les produit de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. *Ann Inst Pasteur Paris* 100: 377, 1961. —6) Marder, VJ and Schulman, NR: High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. *J Biol Chem* 244: 2111, 1969. —7) Marder, VJ and Schulman, NR: High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. *J Biol Chem* 244: 2120, 1969. —8) Pizzo, SV et al: The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. *J Biol Chem* 247: 636, 1972. —9) Furlan, M and Beck, EA: Plasmic degradation of human fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 263: 631 1972. —10) Gollwitzer, R, et al: Chemical and immunological properties of reduced and alkylated polypeptide chains of bovine fibrinogen. *Eur J Biochem* 28: 497, 1972. —11) Edgington, TS and Plow, EF: Conformational and structural modulation of the NH_2 -terminal regions of fibrinogen and fibrin associated with plasmin cleavage. *J Biol Chem* 250: 3393, 1975. —12) 岩永貞昭, 中村 伸: フィブリノーゲン及びその誘導体について. *臨床科学* 9: 605, 1973. —13) Takagi, T and Doolittle, RF: Amino acid sequence studies on the α chain of human fibrinogen. Location of four plasmin attack points and a covalent cross-linking site. *Biochemistry* 14: 5149, 1975. —14) Chen, R and Doolittle, RF: Isolation, characterization, and location of a donor-acceptor unit from cross-linked fibrin. *Proc Nat Acad Sci USA* 66: 472, 1970. —15) Harfenist, EJ and Canfield, RE: Degradation of fibrinogen by plasmin. Isolation of an early cleavage product. *Biochemistry* 14: 4110, 1975. —16) Plow, E and Edgington, TS: Immunology of fibrinogen. *J Clin Invest* 52: 273, 1973. —17) Blombäck, B and Blombäck, M: The molecular structure of fibrinogen. *Ann NY Acad Sci* 202: 77, 1972. —18) Astrup, T: The hemostatic balance. *Thromb Diath Haemorrh* 2: 374, 1959. —19) Cottrell, BA and Doolittle, RF: The amino acid sequence of A 27-residue peptide released from the α -chain carboxy-terminus during the plasmic digestion of human fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 754, 1976. —20) Straub, PW: Chronic intravascular coagulation. *Acta Med Scand Suppl* 526: 1, 1971.