

## Clauss 法の凝固波形が診断に有用であったフィブリノゲン異常症

小西 達矢<sup>1)</sup> 山之内 純<sup>1)2)</sup> 齋藤 玲<sup>1)</sup> 重松 恵嘉<sup>2)</sup> 秋田 誠<sup>2)</sup>  
岡本 康二<sup>2)</sup> 土居 靖和<sup>2)</sup> 谷口 裕美<sup>3)</sup> 高須賀康宜<sup>3)</sup> 竹中 克斗<sup>1)</sup>

フィブリノゲン (Fibrinogen : Fbg) 異常症は、Fbg 抗原量の低下はないが、その機能異常を有する疾患である。一般的な Fbg 測定法である Clauss 法は Fbg の質的異常が存在すると、量的異常がなくても Fbg 低値を呈するが、その凝固波形から質的異常であるかの判断が可能である。症例 1 は蛋白尿が持続する 50 歳代の女性で、腎生検を受ける前に低 Fbg 血症が指摘された。これまでに止血困難の既往はなく、Clauss 法の凝固波形をみると抗原量は保たれており、Fbg 異常症と診断した。その後、補充療法を行うことなく腎生検を実施可能であった。症例 2 は止血困難の既往のない 30 歳代の女性で、第 2 子の出産前の検査で低 Fbg 血症を指摘された。凝固波形はフィブリン生成開始時間の遅延がみられるも、抗原量は保たれており Fbg 異常症と診断した。その後、補充療法を行わずに正常分娩で無事出産した。両症例とも遺伝子解析にて、Fbg  $\gamma$ 鎖のヘテロ接合性変異 ( $\gamma$ Arg301His) を同定した。出血傾向や止血異常がない低 Fbg 血症の患者では、Fbg 異常症の診断と補充療法の必要性について、Clauss 法の凝固波形が参考となる。

キーワード：フィブリノゲン異常症, Clauss 法, 凝固波形

## 緒言

フィブリノゲン (Fibrinogen : Fbg) 異常症は、Fbg 抗原量は保たれているが、その機能に異常を有する疾患である<sup>1)2)</sup>。血中 Fbg 値の測定法として国内のほとんどの医療機関で採用されている Clauss 法 (トロンビン時間法) は、Fbg がフィブリンに転化する時間を用いて Fbg 抗原量を算出する測定法であるが、Fbg 異常症の場合は Fbg の質的異常により反応が遅延し、真の抗原量よりも低値を呈することが知られている<sup>3)4)</sup>。しかし、Clauss 法の凝固波形を確認することで、Fbg 低値が量的異常と質的異常のどちらに起因するのかを鑑別することが可能である<sup>4)5)</sup>。今回、Fbg 低値を呈したが Clauss 法の反応曲線から Fbg 異常症と診断した 2 症例について報告する。

## 症例

症例 1 は 50 歳代、女性。数年前から顕微鏡的血尿と尿蛋白を指摘され、慢性腎炎症候群として腎臓内科で経過観察されていた。X 年 3 月に持続する尿蛋白の原因精査のため、腎生検を施行する目的で入院した。腎生検前の血液検査で Fbg 値が 71mg/dl と低値であり、

腎生検前の新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma, FFP) や Fbg 製剤の使用必要性および低 Fbg 血症の原因精査について血液内科に紹介となった。止血困難や血栓症の既往を有する血縁者はいなかった。血液内科受診時に身体所見に異常はなく、出血傾向はなかった。また過去の抜歯時に止血困難がないことを確認した。血液検査では Fbg 値のみ低値であり、血算に異常はなく、PT および APTT の延長や FDP, D ダイマーの上昇はなかった (表 1)。Fbg 低値の鑑別目的に Clauss 法の凝固波形を確認したところ、健常人検体と比較してフィブリン生成開始時間は数秒遅延していたものの、波形がプラトーに達するか、変化量が対照検体の 2 倍以上に上回るまでの十分な反応時間下では、正常検体よりも測定値 (吸光度) が上昇していた (図 1)。凝固波形の変化から Fbg 異常症による Fbg 低値と考え、補充療法を行わずに腎生検の施行が可能であると判断した。その後、予定通り腎生検が施行され、異常出血なく検査は終了した。後日、患者の末梢血 DNA を用いて、遺伝子変異についてダイレクトシーケンス法で解析したところ、Fbg  $\gamma$ 鎖遺伝子のエクソン 8 にヘテロ接合体のミスセンス変異 (c.902G>A, p. $\gamma$ Arg301His) を同定

1) 愛媛大学大学院医学系研究科血液・免疫・感染症内科学

2) 愛媛大学医学部附属病院輸血・細胞治療部

3) 愛媛大学医学部附属病院臨床検査部

〔受付日：2023 年 8 月 22 日, 受理日：2023 年 9 月 14 日〕

した (図2)。

症例2は30歳代、女性。Y-3年に正常分娩で第1子を出産している。Y年10月に第2子の出産目的で他院の産婦人科に入院した。入院時の血液検査で低Fbg血症を指摘され、他院血液内科を介して当院に相談があった (表1)。血縁者に止血困難や血栓症の既往を有する者はいなかった。Clauss法の凝固波形では、抗原量は保たれており、フィブリノゲン異常症と考えられた。これまでの止血困難や血栓症状がないことを確認し、FFPやFbg製剤の補充療法を行わずに正常分娩で第2子を無事出産した。その後、Fbg異常症の診断確定を目的として当院に紹介となりY年12月に受診した。当院受診時の血中Fbg値は79mg/dlと低値であった。当院で改めてClauss法の凝固波形を確認したところ、フィブリン生成開始時間が通常よりやや遅延していたものの、変化量は正常検体よりも上昇しておりFbg異常症と診断した (図1)。後日、遺伝子変異について解析したところ、症例1と同じFbg  $\gamma$ 鎖のヘテロ接合体の変異 (c.902G>A, p. $\gamma$ Arg301His) を同定した。

## 考 察

異常Fbg血症は、抗原量が低下する無Fbg血症や低Fbg血症と、抗原量は正常であるが活性量が低下する

Fbg異常症に分けられ、これまでに全世界で合わせて400家系以上が報告されている<sup>6)</sup>。無Fbg血症の有病率は100万人に1人程度とされ、低Fbg血症およびFbg異常症は、より有病率が高いと考えられているが、多くが無症候性であることから、その正確な推定は困難である<sup>7)</sup>。また、無Fbg血症では一般的に出血症状を呈するが、Fbg異常症では、機能異常により出血症状および血栓症状を呈することがある。出血傾向はFbgとトロンビンの結合の異常によるフィブリンモノマーの形成効率の低下もしくは重合不全などに起因し、血栓傾向はプラスミンによるフィブリン分解効率の低下に起因する機序が知られている<sup>2)</sup>。Fbg異常症患者において、出血症状と血栓症状がみられるのはそれぞれ25%、20%であり、残りの55%は無症状で偶発的に診断されている<sup>8)</sup>。無症候の潜在的な患者数を考慮すると、症候性のFbg異常症患者の割合はさらに低くなることが予想される。本2症例においても無症状で偶発的に指摘されたFbg低値を契機として診断に至った。

低Fbg血症を呈した無症候性の本症例では、Clauss法の凝固波形からFbg異常症と診断し、必要のない補充療法を回避することが可能であった。Clauss法はFbgがトロンビン試薬によりフィブリンへ転化する時間を測定し、Fbg標準液を用いて得た検量線と対比させてFbg濃度を算出する測定法である<sup>3)</sup>。Fbg測定法にはClauss法の他に、PT同時測定法や免疫学的測定法が存在するが、Clauss法は原理が単純で、簡易かつ迅速に自動分析が可能であることから国際的な標準法として広く普及しており、本邦では95%以上の医療機関で採用されている<sup>9)</sup>。Clauss法を用いてFbg抗原量を測定する場合には、Fbgの機能に異常がないことが前提条件であり、Fbg抗原量に対する機能量や、質的異常がある場合の抗原量の正確な評価が出来ないことに注意が必要である。しかし、本症例のようにFbg異常症が疑われる場合は、Clauss法の凝固波形を確認することが、Fbgの量的異常か質的異常かを鑑別する一助となる。実際にFbg抗原量が低下している場合では、Clauss

表1 初診時血液検査

	Case 1	Case 2
WBC	4,900 / $\mu$ l	6,950 / $\mu$ l
RBC	$455 \times 10^4$ / $\mu$ l	$441 \times 10^4$ / $\mu$ l
Hb	11.8 g/dl	12.6 g/dl
Ht	37.0 %	38.5 %
MCV	81.3 fl	87.3 fl
Plt	$22.9 \times 10^4$ / $\mu$ l	$26.4 \times 10^4$ / $\mu$ l
PT	103.4 %	88.8 %
PT-INR	0.90	0.95
APTT	28.5 秒	29.3 秒
Fibrinogen	71 mg/dl	79 mg/dl
FDP	4.7 $\mu$ g/ml	<2.5 $\mu$ g/ml
FDP D-dimer	<0.4 $\mu$ g/ml	0.6 $\mu$ g/ml

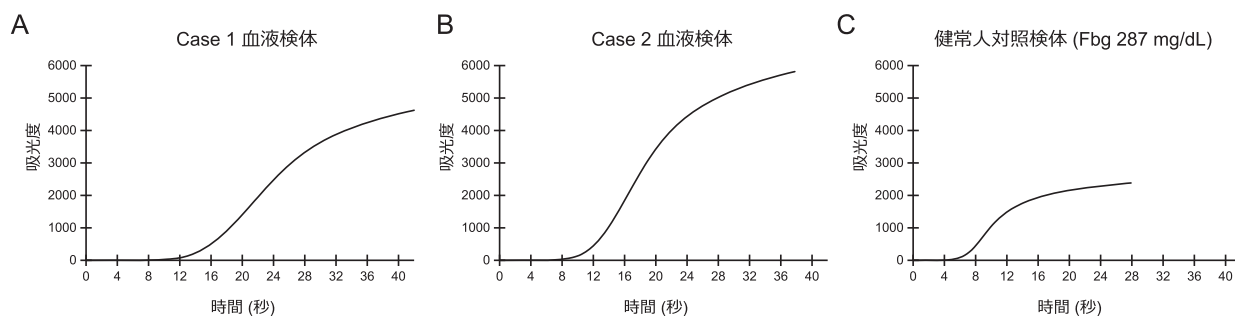


図1 Clauss法による凝固波形

(A) Case 1の血液検体、(B) Case 2の血液検体、(C) 正常対照検体 (Fbg 287mg/dl) のClauss法による凝固波形。

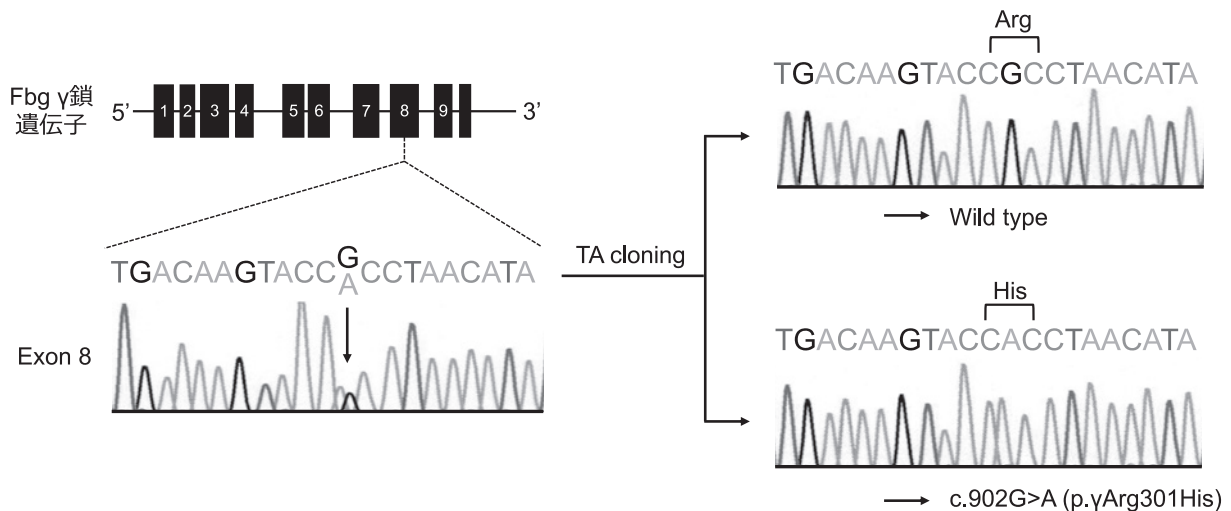


図2 Case 1の遺伝子解析

Fbg $\gamma$ 鎖 Exon 8 前後の Intron 領域におけるプライマーを用いて遺伝子変異 (c.902G>A,  $\gamma$ Arg301His) を検出した. TA cloning を行いヘテロ接合体の変異であることを確認した.

法の凝固波形は早期にプラトーとなり、反応時間を延長してもフィブリン生成量の上昇はみられない。一方で、Fbg 抗原量は保たれているが質的異常が存在するためにトロンビン試薬との反応速度が低下している場合は、フィブリン生成開始時間の遅延や時間あたりの生成変化量の低下はみられるものの、十分な反応時間下では変化量は保たれる。このような特性を応用して、近年では凝固波形解析による包括的な凝固能評価の有用性が確立されつつあり<sup>5)</sup>、Clauss 法においても、凝固波形の最大速度を用いた抗原推定量と Fbg 機能量の比を用いた質的異常の検出が試みられ、実際に優れた精度が報告されている<sup>10)11)</sup>。これらの特徴に基づいて、本症例では凝固波形を用いて、フィブリン生成変化量が十分な反応時間下で上昇することを確認し、質的異常による Fbg 低値と判断した。新井らの報告では、本症例と同じ遺伝子異常を有する Fbg 異常症の凝固波形は、いずれの症例も十分な反応時間下で健常人検体の変化量より大きく上昇しており、本症例の凝固波形でも同様の傾向が確認された<sup>9)10)</sup>。また、症例間でみられた変化量の差は、抗原量の違いを反映しているものと考えられるが、同じ遺伝子変異を有する症例間においても Fbg 活性量に多少の差があるため、必ずしも変化量が大きいと抗原量が多いとは限らない。しかしながら、健常人検体よりも変化量が増加する場合は、少なくとも抗原量が健常人検体を下回ることはなく、おおよその抗原量を推測することは可能である。ただし、一部の Fbg 異常症では出血や血栓症状をきたすことから、過去の抜歯や手術、出産時などの止血困難や血栓性イベントの有無の確認、および家族歴を確認することは必須である。本 2 症例では既往歴と家族歴を確認し、

さらに凝固波形を考慮した上で、補充療法を行わずに観血的処置が可能であると判断した。また、十分な反応時間下で変化量が増加するのであれば、数秒～数十秒程度のフィブリン生成速度の低下があっても臨床上的凝固反応に大きな影響はないと推察された。

異常 Fbg 血症は Fbg を構成する分子の遺伝子変異に基づいて発症し、無 Fbg 血症ではホモ接合体または複合ヘテロ接合体であり、低 Fbg 血症と Fbg 異常症ではヘテロ接合体の遺伝子異常を有する。これまでに 1,200 を超える遺伝子異常が同定されているが、ホットスポット変異として Fbg $\alpha$ 鎖 (FGA p.Arg35) と、本症例でも同定した  $\gamma$ 鎖 (FGG p.Arg301) の変異が知られている<sup>6)12)13)</sup>。これら 2 つの変異は出血症状や血栓症状を呈さないことが多い<sup>6)14)</sup>。本 2 症例では、これらの変異を検出するために Fbg $\alpha$ 鎖のエクソン 2 領域と Fbg $\gamma$ 鎖のエクソン 8 領域においてシークエンスを行い、 $\gamma$ 鎖にヘテロ接合体の遺伝子異常 (c.902G>A,  $\gamma$ Arg301His) を同定した。この遺伝子異常は  $\gamma$ 鎖の D 領域に位置しているため、フィブリンの重合遅延だけでなく、D-D 結合の異常を生じることが知られている<sup>15)</sup>。症例 2 では FDP 値自体が測定感度未満であり評価困難であったが、症例 1 においては血中 D ダイマー値が測定感度未満であり、FDP 値と比較して乖離がみられており (表 1)、本遺伝子変異に伴う D-D 結合の異常を反映していたものと考えられた。

## 結 語

Clauss 法の反応曲線を用いて Fbg の質的異常と判断した Fbg 異常症の 2 症例を経験した。出血傾向や止血異常がない Fbg 低値の症例では、Fbg の機能異常であ

るかの判断や補充療法の必要性について、Clauss法の反応曲線が参考となる可能性がある。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

本研究は、愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承諾および患者の同意を得て実施した。

本論文の症例1は第67回日本輸血・細胞治療学会中国四国支部例会において報告した。

## 文 献

- 1) Asselta R, Duga S, Tenchini ML: The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. *J Thromb Haemost*, 4: 2115—2129, 2006.
- 2) Casini A, de Moerloose P: How I treat dysfibrinogenemia. *Blood*, 138: 2021—2030, 2021.
- 3) Clauss A: Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol*, 17: 237—246, 1957.
- 4) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, et al: Clot waveform analysis in Clauss fibrinogen assay contributes to classification of fibrinogen disorders. *Thromb Res*, 174: 98—103, 2019.
- 5) 徳永 尚：凝固波形解析の進歩. *日本血栓止血学会誌*, 34 : 4—11, 2023.
- 6) Hanss M, Biot F: A database for human fibrinogen variants. *Ann N Y Acad Sci*, 936: 89—90, 2001.
- 7) de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M: Congenital fibrinogen disorders: an update. *Semin Thromb Hemost*, 39: 585—595, 2013.
- 8) Haverkate F, Samama M: Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. *Thromb Haemost*, 73: 151—161, 1995.
- 9) Arai S, Kamijo T, Hayashi F, et al: Screening method for congenital dysfibrinogenemia using clot waveform analysis with the Clauss method. *Int J Lab Hematol*, 43: 281—289, 2021.
- 10) 新井慎平, 奥村伸生：凝固波形解析によるフィブリノゲン異常の検査診断. *日本血栓止血学会誌*, 34 : 22—28, 2023.
- 11) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, et al: Development and validation of a novel qualitative test for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis. *Sci Rep*, 12: 434, 2022.
- 12) Borrell M, Garí M, Coll I, et al: Abnormal polymerization and normal binding of plasminogen and t-PA in three new dysfibrinogenemias: Barcelona III and IV (gamma Arg 275-->His) and Villajoyosa (gamma Arg 275-->Cys). *Blood Coagul Fibrinolysis*, 6: 198—206, 1995.
- 13) Reber P, Furlan M, Henschen A, et al: Three abnormal fibrinogen variants with the same amino acid substitution (gamma 275 Arg—His): fibrinogens Bergamo II, Essen and Perugia. *Thromb Haemost*, 56: 401—406, 1986.
- 14) Casini A, Blondon M, Lebreton A, et al: Natural history of patients with congenital dysfibrinogenemia. *Blood*, 125: 5553—5561, 2015.
- 15) Marchi R, Neerman-Arbez M, Gay V, et al: Comparison of different activators of coagulation by turbidity analysis of hereditary dysfibrinogenemia and controls. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 32: 108—114, 2021.

## DYSFIBRINOGENEMIA DIAGNOSED BASED ON THE CLAUSS FIBRINOGEN ASSAY

Tatsuya Konishi<sup>1)</sup>, Jun Yamanouchi<sup>1)2)</sup>, Rei Saito<sup>1)</sup>, Keika Shigematsu<sup>2)</sup>, Makoto Akita<sup>2)</sup>, Koji Okamoto<sup>2)</sup>, Yasukazu Doi<sup>2)</sup>, Yumi Taniguchi<sup>3)</sup>, Yasunori Takasuka<sup>3)</sup> and Katsuto Takenaka<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Hematology, Clinical Immunology and Infectious Diseases, Ehime University Graduate School of Medicine

<sup>2)</sup>Division of Blood Transfusion and Cell Therapy, Ehime University Hospital

<sup>3)</sup>Clinical Laboratory Department, Ehime University Hospital

### **Abstract:**

Dysfibrinogenemia is characterized by the presence of functional abnormalities despite the maintenance of normal levels of fibrinogen antigen. Plasma fibrinogen level is commonly measured by Clauss fibrinogen assay (CFA). Although CFA may underestimate the true antigen level in patients with dysfibrinogenemia, the clot waveform helps distinguish between true low fibrinogen values and those caused by qualitative abnormalities. Case 1 was a woman in her 50s with persistent proteinuria and no history of bleeding disorders who showed a low fibrinogen level before renal biopsy. Based on the CFA clot waveform, dysfibrinogenemia was diagnosed. The renal biopsy was performed without significant bleeding complications, and replacement therapy was not required. Case 2 was a pregnant woman in her 30s with no history of bleeding disorders who showed a low fibrinogen level prior to her second childbirth. The CFA clot waveform indicated a preserved antigen level, leading to a diagnosis of dysfibrinogenemia. She had a successful delivery without any replacement therapy. In both cases, the presence of a heterozygous missense mutation in the fibrinogen  $\gamma$  chain ( $\gamma$ Arg301His) was confirmed. The CFA clot waveform is useful in diagnosing dysfibrinogenemia and determining treatment strategies in patients with low levels of fibrinogen without bleeding symptoms.

### **Keywords:**

Dysfibrinogenemia, Clauss fibrinogen assay, Clot waveform