

I -(2) フィブリノゲン定量のための日常的標準測定法 (案)

(JCCLS H4-P1(2002))

Definitive Method for the Determination of Plasma Fibrinogen Proposed

異典之 (日本臨床検査医学会標準委員会血液小委員会・委員長)
Chairholder: Noriyuki TATSUMI, MD, PhD
(Standardization Committee, Hematology Subcommittee
Japan Society of Laboratory Medicine Chairholder)

【概要】

本勧告案は臨床検査室における血漿フィブリノゲンの標準的測定法について記述する。

【適用】

本書は臨床検査室におけるフィブリノゲン定量法に対する標準的測定法を勧告するものである。別に定める「フィブリノゲン標準測定法<第1次, 第2次標準品の値付けのための測定法>」と組み合わせ、フィブリノゲン値が正確で有意義なものとして臨床的に利用されることを意図するものである。本書において解説されるフィブリノゲン測定法は、血漿検体にトロンビン試薬を添加し凝固するまでの時間を標準物質と比較して濃度とする「トロンビン時間法」と一般的に呼称されるものである¹⁾。なお、本測定法はすでに国際的に標準的測定法として勧告されている NCCLS²⁾および DIN³⁾の測定法と同等の測定法である。

【検体とその取り扱い】

真空採血管(3.2%または3.8%クエン酸ナトリウムが血液との比率で1:9の割合になるよう入っているもの)⁴⁾を用いて静脈血を採取する⁵⁾。採血後すぐ、静かに3, 4回採血管を転倒混和する。この時、血液凝固が起こっていないことを確認する。わずかでも血液凝固が認められる検体は、測定の対象としな

い。ついで速やかに、1500Gで15分間遠沈し、血漿を分離する。血漿成分は肉眼上で明らかな混濁や溶血がないことを確認し、検査上不適切であると判断された血漿は測定の対象とせず再度血液を採取すること。血液採取から測定するまで2時間以内とし、血漿検体はこの間室温保存とする。

【試薬】

1. バルビタール緩衝液(ペロナール緩衝液)

0.028 mol/L, pH 7.35±0.05, 125 mmol/L NaCl 含有 11.55gのバルビタールナトリウムと14.61gの塩化ナトリウムを精製水約1Lに完全に溶解する。これに、430mLの0.1N希塩酸溶液を加えてpH 7.4(25°C)とする。最終的なpHの微調整は1N塩酸溶液でするとよい。この後、精製水で、全量を2Lとする。

2. トロンビン試薬

単位の明らかなウシトロンビンあるいはヒトトロンビンを、バルビタール緩衝液に溶解して高単位で調製しておき、用時バルビタール緩衝液で希釈して使用する。使用時のトロンビン溶液は50IU/mLのものを用いる。

3. 標準血漿

WHO国際標準98/612が第一次標準物質としてあるが、これから値を伝達しトレーサビリティの確証

されている第二次標準物質が入手可能である。検量線作製用にはこうした第二次標準物質を用いる。

【計測に用いる装置・器具の性能】

多くの場合、様々な検出原理によってフィブリン析出を検出する半自動あるいは全自動の分析装置が用いられる。メーカーの提示する試験方法で精度管理を行い、その保証性能範囲内であることを定期的に確認すること。

また、用手法で実施する場合には、白金線を用いて物理的に検出する方法と、試験管を傾斜して肉眼的に検出する方法があるが、フィブリン析出を検出したとする点を検査室内で標準化しておくこと。

測定は、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で実施すること。

【測定条件】

検査室温度： $23 \pm 2^\circ\text{C}$

測定は、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で実施する。

環境：振動のない空調の風が直接当たらない場所とする。

【測定手順】

1) クエン酸加血を速やかに血漿分離して、血漿1容に対し緩衝液9容を加え均質になるよう混和し、血漿検体を10倍に希釈する。

2) 希釈した検体を正確に0.2mL試験管に取り、 37°C 恒温槽で5分間予備加温する。

3) 50IU/mLのトロンビン溶液を正確に0.2mL取り、検体の入った試験管に添加し、ストップウォッチを起動するとともに試験管内容物を穏やかに攪拌する。

4) 1秒に2回の割合で、フィブリンの析出を確認する。

5) フィブリンの検出と同時にストップウォッチを停止しこの時の時間を測定時間とする。

【検量線の作製】

第二次標準物質を室温に戻し、正確に希釈する。希釈は、1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40などとし、少なくとも5点以上を使用する。希釈した、標準液は検体と同様 37°C 恒温槽で5分間予備加温後、トロンビンを添加して、「測定手順」の記載にしたがってフィブリンの検出までの時間を測定する。選択したすべての濃度について二重測定し、それぞれの測定値が2つの測定値の平均から3%以上乖離する場合には、再度二重測定をやり直す。得られた測定値のすべてを対数変換した値をy軸にとり、x軸にはそれぞれに対応する標準物質の濃度を対数

変換したものをとって、多点検量線とする。検体の測定結果に対して検量線を適応するときは、検量線内にある濃度に限り、これを外れる測定値が得られた検体については、最初の希釈倍数を代え再測定を試みること。

【フィブリノゲン濃度の報告】

フィブリノゲンは、g/Lで表記する。

これは従来、mg/dLで表現していたものに対して、係数0.01をかけることになる。

例：200mg/dL = 2.0g/L

また、フィブリノゲン mg/dLを $\mu\text{mol/L}$ に換算するには、0.0294118を係数として用いるが、現在この表記が用いられることは極めてまれである。

【注意】

- ・トロンビンを希釈した試薬は小分けして、 -70°C に保存すれば便利である。しかし、一度使用のために融解したものは、力価が低下するので再利用を目的として再び凍結させて保存してはならない。
- ・ヘパリン加血は低値になるので検体には不適。

【日本臨床検査医学会標準委員会血液小委員会】

委員長 巽 典之

委員 池本 卓, 土屋 達行, 福武 勝幸

松原 高賢, 山口 延男, 鈴木 是光

新谷 和夫, 松野 一彦, 渡辺 清明

協力研究者 中 恵一

文 献

- 1) Clauss vA : Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haemat 17 : 237~246, 1957
- 2) NCCLS H30-A2 : Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; approved guideline-second edition, Pennsylvania 2001
- 3) DIN58906 : Bestimmung der Fibrinogenkonzentration, 1994
- 4) NCCLS Document H1-A4 : Evacuated tubes and additives for blood specimen collection 4th Ed ; Approved standard. Pennsylvania, USA 1996
- 5) NCCLS Document H21-A3 : Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays; Approved Guideline 3rd Ed. Pennsylvania, USA 1998

解 説

【はじめに】

本報告では臨床検査として血漿フィブリノゲンの標準的な測定方法を記述する。ここで報告する測定方法は、フィブリノゲンを凝固性タンパクとして測定するもので、日常検査法として用いることを意図するものであり、フィブリノゲン単位を規定するために用いるものではない。

【概要と歴史的背景】

閉塞性黄疸の症例で血液中に逆流したタンパク分解酵素類が血漿プロトロンビンに影響をおよぼすことに興味を持っていたスウェーデン・ルンドのBorgstromは、プロトロンビンの測定をLehmannが微量化したQuick法¹⁾を利用した²⁾。彼の興味は血液中的プロトロンビン量にあったが、それに関連してフィブリノゲン量の変化にもおよび、これを定量するためクエン酸ナトリウムを添加して得た血漿にトロンビン溶液を添加して凝固するまでの時間を測定することを思いついた。彼はフィブリノゲン量を絶対量として計量するのではなく、健常者の血漿が凝固するまでの時間を対象としてこれを100とする指数で表現し、フィブリノゲン量が減少するにしたがって指数が減少するように比例を用いていた³⁾。

トロンビンを添加し凝固までの時間を測定する、Borgstromの着想した方法は、Claussによって血漿フィブリノゲンの定量法として標準化された⁴⁾。彼は、バルビタール緩衝液で10倍希釈したシュウ酸加血漿に50IU/mLのトロンビン溶液を添加し凝固までの時間を測定する方法を確立すると同時に、Kjeldahl法で窒素定量をしてフィブリノゲンのタンパク量を得た血漿で検量線を作製する方法を組み合わせ、検体中のフィブリノゲン濃度を求める方法とした。彼の考案した検量線は、フィブリノゲン濃度と計測された時間の双方とも対数を取ってプロットするもので、これらのほとんどは現在も継承されている。後に一次元免疫拡散法との比較をする上で、このClauss法が検証された結果⁵⁾、バルビタール緩衝液がトリス塩酸緩衝液(0.05 M, pH 7.3, 0.1 M NaCl含有)と置き換えることができるという成果が見られるだけで、原法は完成された方法であることが確認されたに留まっている。

CAP(College of American Pathologists)のサーベ

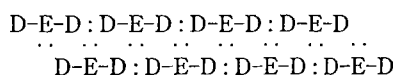
イによれば⁶⁾、1971年には全体のCV値が39.2%と計算されたのが、1975年には17.7%、1980年には10.9%になっていて、1975年の時点で大きな改良が見られるが、これは1972年にトロンビン時間法による試薬が発売され、この年度にすでに市場の半分をこの製品が席卷し、1975年度には8割をこの製品が独占した結果である⁷⁾。その後もこの会社のキットが市場をリードし続けてきているが、1991年の同調査でも11.7%~16.4%とこれ以上の精度の改善は見られず、基本的に標準物質の必要性が訴えられてきていたものが、CAP標準物質として1990年に開発された⁸⁾。また、同様の動きは英国を中心にも同時期にあって⁹⁾、ISTH(International Society on Thrombosis and Haemostasis)とNIBSC(National Insutitute for Biological Standards and Control)の共同作業でWHO 89/644が開発製造された。現在はCAP標準物質は製造中止となり、WHO標準物質でClauss法の世界的な標準化が推進されている。現在、こうした標準物質が準備されていて、トロンビン時間法がほぼ統一的に臨床検査室で利用されているにも関わらず、上述のように検査結果には施設間にも施設内においてもばらつきが見られる。一つは、検体の希釈倍数と試薬濃度に違いの見られることが原因とも考えられ、ここに委員会報告として標準的な測定法を準備することとした。

【トロンビンによる反応】

「トロンビン時間法」は、フィブリン糸形成反応をその完結まで見る方法ではなく、フィブリンが検出されるいわば限界点を越えたごく初期の反応でとらえるものである。一方、検体にはカルシウムキレート剤が凝固阻止のために添加された状態にある。反応で添加されるトロンビンはフィブリノゲン分子のA α 16-17位のArg-Gly結合を切断する。これによってフィブリノペプチドA(FPA)が遊離し、2つのFPAを失ったフィブリノゲン分子は、フィブリン(Fbn)モノマーとしてdes-AA-Fbnとなる。

FPAの遊離でフィブリノゲンEドメインには反応基'A'とよばれる「Gly-Pro-Arg」のアミノ酸配列が露呈する。反応基'A'は、別のFbnモノマーのDドメインの γ 鎖に存在する相補的結合部位'a'と結合し、二本鎖のフィブリンプロトフィブリン(フィブリン

原繊維)を形成する。このE-D結合は、Fbnモノマーが半分子長ずれて重なり合うことにより、二本鎖繊維を形成し、Fbnモノマー分子間には緩やかなD-D結合が生じる。この時の結合様式は次のようである。



このD-D結合の形成に当たっては、 γ 鎖275位のArgが重要な役割を果たしていると考えられている^{10,11)}。

フィブリノゲンのdes-AA-Fbnへの進行と平行して、生理的条件下ではトロンビンによって血清中に存在する第XIII因子の活性化が起こる。第XIII因子はサブユニットa鎖の二量体とサブユニットb鎖の同じく二量体が会合した四量体であり、トロンビンによってサブユニットa鎖の一部が遊離し、a'鎖となる。しかし、さらにb鎖が遊離され、活性化された第XIII因子、XIIIaとなるにはCaイオンの存在が必要で、フィブリン検出を「トロンビン時間法」で測定している試験管内反応(in vitro)においては、これは期待できない。

XIIIaはSH基をもつトランスグルタミナーゼの一種で、 γ -グルタミン- ϵ -リジン(ϵ -(γ Glu)-Lys)のペプチド架橋を形成する。こうして強固なD-D結合が形成されればフィブリン糸の伸長と重合が可能である。生理的条件下では凝固反応が開始してフィブリン糸の形成が確認されるまでおよそ5分と報告されている¹²⁾。

また、フィブリノゲン二量体のそれぞれの α 鎖カルボキシル末端の α Cドメイン球状構造は¹³⁾、des-AA-Fbnモノマーの状態で自由度を高め、周辺に存在するフィブリンモノマーと接触して、それぞれの α Cドメイン同士が結合する¹⁴⁾。しかし、この α Cドメインの架橋も同様にXIIIaによるものと考えられている。さらに、組織トランスグルタミナーゼ(EC2.3.2.13)は、XIIIaと同様(ϵ -(γ Glu)-Lys)のペプチド架橋を形成することが知られているが¹⁵⁾、この反応もCaイオンの存在が必要である。したがって、二本鎖のフィブリンプロトフィブリル同士の側々結合(lateral association)の形成はこの検査法における反応ではおこらず、フィブリン繊維束(Fbn bundles)としての3次元構造や、さらにこうした重合を経た巨大なネット形成はみられない。

したがって「トロンビン時間法」は、FPAがトロンビンにより遊離する反応を観察するのを方法原理としていると考えてよく、このトロンビンによる分解反応は、フィブリノゲンとトロンビンの双方の濃度に依存する一次反応であることが確認されており¹⁶⁾、これをふまえてフィブリノゲン定量に応用される。

こうした反応の初期で観察されるフィブリン形成を検出する場合には、フィブリノゲン分子の分子多様性が問題になる。すなわち、フィブリノゲンには、A α 鎖、B β 鎖、 γ 鎖いずれにも遺伝子の多様性に基づく分子多様性があるが¹⁷⁾、通常検体でもA α 鎖のカルボキシル末端が途中で切れて長さが異なっているものが共存していることが知られていて、元々のA α 鎖を持つものを高分子量(HMW:340K)フィブリノゲンとよぶことにすれば、305Kと270Kの二つの低分子化されたフィブリノゲンとよばれる亜分画が存在し、それぞれLMWとLMW'とよばれる¹⁸⁾。HMW, LMW, LMW'の平均的な血漿中の割合は、それぞれ70%, 26%, および4%といわれていて、凝固反応の早さは分子量が小さくなるにしたがって遅延し、LMWとLMW'は、HMWに対してそれぞれ、+43%, +79%凝固時間が長くなるといわれる。このことは、EIAとClauss法の測定値に差を生じることで明らかで¹⁹⁾、同じ凝固性タンパクを測定するJacobsson法とClauss法においても凝固反応を長時間かけて完結させないことに起因する差が報告されている²⁰⁾。

さらに、フィブリノゲンA α 鎖のFPA内にあるSer-3と、その中央部のSer-345は、フィブリノゲン分子が合成された時点でリン酸化を受けている²¹⁾。ところがこれらは循環血流中で脱リン酸化され、およそその20%が残っているにすぎない。しかし、フィブリノゲンが消費され合成が活発化される病的条件下では70%がリン酸化されていることが報告されており²²⁾、このリン酸化されている割合がFPAのトロンビンによる切断の受け易さには関係がないというものの、HMW, LMW, LMW'の各分画が生成する度合いにも同様のことが推測されるため、「トロンビン時間法」では、観察されるフィブリン形成までの時間に患者の病理的・生理的な状態が真のフィブリン濃度と異なった次元で影響を及ぼすものと考えられる。したがって、本法の測定手順で検体を10倍に希釈するようにしているが、多くの病理学的検体を用いた検討なしに装置や試薬の都合で希釈倍数を変更するのは、こうした分子多様性が招く測定結

果の乖離を増幅するものと考えてよく推奨できない。

【検体とその取り扱い】

血漿検体は測定まで室温に保存し、採血から測定の完了まで2時間以内とする。ただし、何らかの目的によって検体を保存する場合には、2週間以内ならば -20°C 、これを越えて6ヶ月以内の保存には急速冷凍によって -70°C とすること。

【試薬】

1. バルビタール緩衝液(ペロナール緩衝液)

オーレンの緩衝液(Owren's Buffer)と通称される。原著では0.1mol/Lバルビタールナトリウム溶液570mLに0.1N塩酸溶液を430mLを加え、5.67gの塩化ナトリウム溶解し、さらにこれを同じ容量の0.9%塩化ナトリウム溶液で希釈するとしているが、この原法通りであれば、バルビタールナトリウムと塩化ナトリウムはそれぞれ、終濃度として28.5mmol/L、125.5mmol/Lと計算される²³⁾。濃度上この原法に忠実な製法として、一般的にはバルビタールナトリウム 11.75gと塩化ナトリウム 14.67gを精製水 1570mLに溶解後、0.1N塩酸溶液を430mL添加すれば2Lの調製で、pH 7.35に仕上がるとしている。しかしながらこれに忠実に調製される場合とそうではない場合があり、テキストにより若干の違いが見られる²⁴⁾。また今日では、各検査室で緩衝液の調製がなされることはまずなく、一般に市販のキット試薬が利用されるのが現状のようである。したがって試薬の標準化のためにはモル濃度で明確に標記する方が好ましいと考えられ、本文ではバルビタールナトリウム(sodium 5,5-diethylbarbiturate: MW 206.18)を28mmol/L、塩化ナトリウム(MW 58.443)を125mmol/Lと規定した。

バルビタールナトリウムは、購入に当たって「向精神薬試験研究施設設置者登録証」等の許認可証が必要となり、保管管理にも一定の法規基準を満足しなければならない。したがって、場合によってはバルビタール緩衝液に代わる緩衝液の検討が必要である。この目的のためには、トリス塩酸緩衝液(0.05mol/L, pH 7.3, 0.1mol/L NaCl含有)が有効であることが報告されている⁵⁾。こうした必要がある場合には、自施設において第2次標準物質と精度管理用試料で検討の上、このトリス塩酸緩衝液を利用することが好ましい。

2. トロンビン溶液

トロンビン標準物質については、国立医薬品食品

衛生研究所からトロンビン標準品が供給されている²⁵⁾。また、国際標準品としてWHO89/588がある。これらはいずれも国際単位(IU)で表示される。一方米国には別にNIH単位があり、現在、1NIH単位=1.15IUに換算される²⁶⁾。調製されたトロンビン溶液の力価検定については、フィブリノゲン溶液を基質として数段階で希釈したトロンビン溶液を添加し、本法と同様のトロンビン時間法で測定する。これを同様に上記の標準品で実施し、比較の上検量する。

測定の反応に使用するトロンビン量についてClaussの原法では、25NIH/mL以上であることが好ましいという表現であるが、その後の様々な検討では反応液終濃度で50NIH/mLが好ましいとするものが多い⁵⁾。先述したように、NIH単位はIUとほぼ等価であるので、これをIUと読み変えれば50IU/mLを適切な使用量と考えればよい。

実際の手技上で、希釈検体とトロンビン試薬とともに0.2mLとするならば、保存用トロンビン溶液をバルビタール緩衝液で50IU/mLに希釈して、その0.2mLを利用する。一般的な市販のトロンビン試薬を利用する場合は、100IU/mLのものが多いので、その0.1mLを使用すればよい²⁷⁾。なお、自家調製の際には保存用トロンビン溶液は1,000IU/mL以上として、シリコン処理をした容器に小分けし -70°C で保存、使用に際して一定量のバルビタール緩衝液で希釈すればよいようにしておくのが便利である。また、溶解した保存用トロンビン溶液は再凍結しないこと²⁴⁾。

トロンビンには、ウシもしくはヒトの由来のものが比較的容易に入手される。これらのいずれを用いても、活性単位を標準化するならば、データには差がないことを確認している。

【測定操作】

「トロンビン時間法」は、今日一般に自動測定装置によってフィブリン析出までの時間が測定され、キャリブレーター希釈系列で作製された検量線から、血液中の濃度に換算される。フィブリンの析出を検知する方式には、光透過型、光散乱型いずれかの光学方式、あるいはこれに磁性粒子を用いた物理的方式と光学的方式を組み合わせたもの、もしくはスチールボールと磁気センサーを利用した物理的方式、この他に、電気抵抗を利用した物理的方式のものなどがある²⁸⁾。人がそれを見る場合にも、白金線を利用する方式と²⁹⁾、試験管を傾斜して肉眼的に見る方

法がある。いずれの方式であっても、終点(フィブリン検出点)を明確しておかなければならない。

【検量線の作製】

第二次標準物質を室温に戻し、正確に希釈する。希釈は、1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40などとし、少なくとも5点以上を使用する。希釈した、標準液は検体と同様 37°C恒温槽で5分間予備加温後、トロンビンを添加して、「測定手順」の記載にしたがってフィブリンの検出までの時間を測定する。選択したすべての濃度について二重測定し、それぞれの測定値が2つの測定値の平均から3%以上乖離する場合には、再度二重測定をやり直す。得られた測定値のすべてを対数変換した値をy軸にとり、x軸にはそれぞれに対応する標準物質の濃度を対数変換したものをとって、多点検量線とする。検体の測定結果に対して検量線を適応するときは、検量線内にある濃度に限り、これを外れる測定値が得られた検体については、最初の希釈倍数を換え再測定を試みる。臨床検体の希釈直線性については、<トロンビンによる反応>で述べた通り、別途検討されなければ保証されないことを留意しておく必要がある。

トロンビンによるフィブリン析出をみる測定法では、フィブリノゲン濃度と凝固時間の関係を見る際、フィブリノゲン濃度の逆数が凝固時間と一次関数の関係にあることが知られており、これを利用すれば検量線は比較的容易に作成される³⁰⁾。しかしながら、現行のすべての自動分析装置が双方を対数変換して検量線作製し、未知検体の測定秒数から補間法を用いてフィブリノゲン濃度に換算しているの、本勧告もその慣例に従い現場の混乱を避けることにした。

【フィブリノゲン濃度の報告】

フィブリノゲンはSI単位にしたがって、g/Lで表記する。

これは従来、mg/dLで表現していたものに対して、係数0.01をかけることになる(例:200mg/dL=2.0g/L)。

また、フィブリノゲンmg/dLをμmol/Lに換算するには、0.0294118を係数として用いるが、現在この表記が用いられることは極めてまれである。

文 献

1) Lehmann J : Eine Modifikation der Prothrombinbestimmungsmethode nach Quick Mikro- und Makro-

verfahren. Monatschr Kinderh 86 : 44~48, 1948
 2) Borgstrom S : Prothrombin index after operation. Acta Chir Scand 89 : 68~74, 1943
 3) Borgstrom S : On the prothrombin index in acute affections of Pancreas. Acta Chir Scand 90 : 419~430, 1944
 4) Clauss vA : Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haemat 17 : 237~246, 1957
 5) Jespersen J, Sidelmann J : A study of the conditions and accuracy of the thrombin time assay of plasma fibrinogen. Acta Haemat 67 : 2~7, 1982
 6) Elevitch FR, Voce PS Ed : DATA ReCAP 1970~1980. A compilation of data from the College of American Pathologists' clinical laboratory improvement programs. p227~229 College of American Pathologists Skokie, Illinois, 1981
 7) Koepke JA, Gilmer Jr PR, Filip DJ, Eckstein JD, Sibley CA : Studies of fibrinogen measurement in the CAP survey program. Am J Clin Pathol 63 : 984~989, 1975
 8) Bovill EG, McDonagh J, Triplett DA, Arkin CF, Brandt JT, Hayes TE, Kaczmarek E, Long T, Rock WA : Performance characteristics of fibrinogen assays : Results of the College of American Pathologists proficiency testing program 1988~1991. Arch Pathol Lab Med 117 : 58~66, 1993
 9) Furlan M, Felix R, Escher N, Lammle B : How high is the true fibrinogen content of fibrinogen standards? Thromb Res 56 : 583~592, 1989
 10) 諏合輝子 : フィブリノゲンの立体構造からみた異常フィブリノゲン. 血栓止血誌 10 : 100~105, 1999
 11) Fowler WE, Hantgan RR, Hermans J, Erickson HP : Structure of the fibrin protofibril. Proc Natl Acad Sci USA 78 : 4872~4876, 1981
 12) Brunmel KE, Butenas S, Mann KG : An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. J Biol Chem 274 : 22862~22870, 1999
 13) Ugarova T, Agbanyo FR, Plow EF : Conformational changes in adhesive proteins mediate their adhesive function. Throm Haemost 74 : 253~257, 1995
 14) Veklich YI, Gorkun OV, Medved' LV, Nieuwenhuizen W, Weisel JW : Carboxyl-terminal portions of the α chains of fibrinogen and fibrin. J Biol Chem 268 : 13577~13585, 1993
 15) Murthy SN, Lorand L : Cross-linked Aα-γ chain hybrids serve as unique markers for fibrinogen polymerized by tissue transglutaminase. Proc Natl

- Acad Sci USA 87 : 9676~9682, 1990
- 16) Higgins DL, Lewis SD, Shafer JA : Steady state kinetic parameters for the thrombin-catalyzed conversion of human fibrinogen to fibrin. J Biol Chem 258 : 9276~9282, 1983
 - 17) Mosesson MW : Fibrinogen heterogeneity. Ann N Y Acad Sci 408 : 97~113, 1983
 - 18) Holm B, Nilsen DW, Kierulf P, Godal HC : Purification and characterization of 3 fibrinogens with different molecular weights obtained from normal human plasma. Thromb Res 37 : 165~176, 1985
 - 19) Hoegge-de Nobel E, Voskuilen M, Briet E, Brommer EJP, Niewenhuizen W : A monoclonal antibody-based quantitative enzyme immunoassay for the determination of plasma fibrinogen concentrations. Thromb Haemost 60 : 415~418, 1988
 - 20) Jensen T, Halvoresen S, Godal H, Sandset PM, Skjonsberg OH : Discrepancy between fibrinogen concentrations determined by clotting rate and clotability assays during the acute-phase reaction. Thromb Res 100 : 397~403, 2000
 - 21) Henschen AH : Human fibrinogen-Structural variants and functional sites. Thromb Haemost 70 : 42~47, 1993
 - 22) Seydewitz HH, Witt I : Increased phosphorylation of human fibrinopeptide A under acute phase conditions. Thromb Res 40 : 29~39, 1985
 - 23) Owren PA : A quantitative one-stage method for the assay of prothrombin. Scand J Clin Lab Invest 1 : 81~83, 1949
 - 24) NCCLS H30-A2 : Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; approved guideline-second edition, pp3, Wayne, Pennsylvania 2001
 - 25) 北島 文, 岩田美保, 前川京子, 齋藤博幸, 谷本 剛, 岡田敏史 : 国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品(Control 961). 国立医薬品食品衛生研究所報告 116 : 166~167, 1998
 - 26) Gaffney PJ, Edgell TA : The International and "NIH" units for thrombin -How do they compare? Thromb Haemost 74 : 900~903, 1995
 - 27) 桜井典子 : フィブリノゲン. 検査と技術 19 : 221~224, 1991
 - 28) 桜井典子 : フィブリノゲン. 検査と技術 27 : 794~796, 1999
 - 29) DIN58906 : Bestimmung der Fibrinogenkonzentration, 1994
 - 30) Fenton II JW, Wideman CS, Evatt BL : Thrombin clotting activity measurement and standardization with lyophilized plasma. Clin Chem 32 : 320~324, 1986