

◆トピックス◆

フォンビルブランド因子とフィブリノーゲンの二重欠損マウス

湯口 正人*¹, 水口 純*¹, 円城寺 慶一*²

Combined von Willebrand Factor/Fibrinogen Deficient Mice

Masato YUGUCHI*¹, Jun MIZUGUCHI*¹ and Keiichi ENJOJI*²

Key words : fibrinogen, vWF, platelet, ferric chloride-injured arterioles, adhesion, aggregation, shear stress

はじめに

フォンビルブランドファクター (von Willebrand factor ; vWF) とフィブリノーゲン (fibrinogen ; fbg) は、血管傷害部位での血小板の粘着と凝集反応における主要なリガンドであり、それらの欠失・異常は臨床的にも、*in vitro* でも、血小板機能の異常を示す。また、vWF は血液凝固 VIII 因子のキャリア蛋白質でもあり、その重度欠損・異常は FVIII の欠失を伴い、血友病 A と似た症状を示すフォンビルブランド病として知られている。

vWF は分子量約 25 万のサブユニットが S-S 結合により 2~数十個重合した巨大マルチマー分子で¹⁾、その合成場所は主に血管内皮細胞と骨髄巨核球である。内皮細胞で産生された vWF は血中に分泌されるか、Weibel-Palade body と呼ばれる内皮細胞特有の小器官に貯えられる。一方、巨核球由来の vWF は、血小板の中の α 顆粒に蓄積され、その活性化に伴って血中に放出される。血中濃度は約 10 $\mu\text{g/ml}$ である。

Fbg は $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖それぞれ 2 本ずつ、合計 6 本のポリペプチド鎖が、29 個の S-S 結合で架橋されたホモダイマー構造から成る分子量約 34 万の糖蛋白質で²⁾、肝実質細胞で合成される。血中濃度は約 3 mg/ml である。トロンビンによりフィブリノペプチド A, B が遊離されると、重合し、XIIIa 因子により架橋されフィブリンクロットを形成する。

in vitro における従来の研究から、止血に関わる両者の働きは次のように考えられている。血管傷害部位の内皮下に結合した vWF は、ずり応力 (shear stress) によって構造変化し、血小板の受容体 glycoprotein (GP) Ib-IX に結合する³⁾。この結合は不安定で一時的な粘着であるが、血小板の流速を低下させるとともに、integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) の構造変化を誘導する⁴⁾。活性化した $\alpha\text{IIb}\beta 3$ は、vWF と強く結合し、血小板を完全に粘着させる。この際、vWF の A1 ドメインと C 末端領域に含まれる RGD 配列が、それらの結合に関与する。次に血小板表面の $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 同士が、その多価リガンド

*1 (財) 化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒 869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺]

Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute [Kawabe, Kyokushi, Kikuchi, Kumamoto, 869-1298, Japan.]

*2 国立循環器病センター研究所 病因部臨床病理研究室 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]

Department of Etiology and Pathogenesis, Research Institute, National Cardiovascular Center [5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan.]

Tel 0968-37-4052 Fax 0968-37-3616 E-mail : yuguchi@kaketsuken.or.jp

である vWF または fbg/フィブリン (fbn) を介して相互作用することで、血小板凝集が引き起こされる。Fbg/fbn の場合、 γ 鎖 C 末端領域の QAGDV 配列が主にこれらの相互作用に関与する。

近年, *in vivo* における vWF または fbg の機能を評価するために、それぞれのノックアウトマウスが作出された。それによると vWF 欠失マウス⁹⁾ は、① 正常に出生、生存し、繁殖力も保持する。② 止血に異常を示し、出血時間が極度に延長する。約 10% の新生仔に自発的出血症状があり、一部は死亡する。③ 血漿中の FVIII 活性レベルは、野生型の 20% 程度まで低下する (しかし、ヒトの重症例に比べると高値)。④ *in vivo* 血栓症モデルにおいて、ずり応力下での血栓形成能を欠く、などの性質を示す。これは、ヒトフォンビルブランド病の type 3 (重症欠失型) によく似た症状であるが、表現型自体はヒトより穏やかである。

一方, fbg 欠失マウス⁷⁾ は、① 正常に出生。生後 2 日目から約 30% に腹部、皮下、関節周辺等に出血が見られるが、最終的には止血し、新生仔期を生き延びる。② 成熟期の機械的侵襲により肝皮膜下血腫が発生し易く、この破裂により腹部大出血を起こすことがある。生存率はマウスの系統によって異なる。③ 組織修復の際に、通常認められる血腫内への細胞浸潤は見られない (細胞移動のマトリックスとしての機能を示唆)。④ 妊娠すると、10 日目に致死性の子宮内出血を起こす。⑤ 遺伝子的には α 鎖のみの欠失であるが、新生仔期、成熟期ともに fbg は血中には検出されない、などの性質を示す。

このように各リガンドを欠失させたノックアウトマウスは、ヒトの欠失患者と似た症状を示す。しかし、血小板の粘着と凝集の主要なリガンドとして働く両分子を同時に欠失した症例は、ヒトでは見つかっておらず、血小板の粘着・凝集にかかわる分子の真の役割を明らかにするため、二重欠失マウスの作出が望まれていた。最近, vWF と fbg のノックアウトマウスを作

出したグループは、共同研究により、この両因子の二重欠失マウスを作出した。そして、塩化鉄血管傷害モデルにおける血栓形成について比較、検討したところ、予想に反して、この二重欠失マウスにおいても血小板の凝集が認められた⁹⁾。

vWF/fbg 二重欠失マウスからの情報

二重欠失マウスの作出

Fbg^{-/-} メスマウスは、妊娠中に子宮内出血を起こし死亡するため、Ni らは vWF^{-/-} メスマウスと、fbg^{-/-} オスマウスを交配させ (C57BL/6J/129Sv 系統)、得られた「vWF^{+/-}/fbg^{+/-} F1 世代マウス」を交配して得た、「vWF^{-/-}/fbg^{-/-} オスマウス」と「vWF^{-/-}/fbg^{+/-} メスマウス」を掛け合わせて、二重欠失マウスを作出した⁹⁾。

塩化鉄による血管傷害モデルの検討

次に, Ni らは塩化鉄による血管傷害モデルの作製と、その妥当性について検討した。露呈した腸管膜細動脈を塩化鉄で処理すると、フリーラジカルが細胞組織を傷害するが、この傷害が血管内皮細胞にどのような影響を与えるかを、トランスジェニックマウスを用いて調べた。すなわち、オワンクラゲ由来の蛍光蛋白質である、Green Fluorescent Protein (GFP) をコードする cDNA の上流に、血管内皮細胞特異的に発現している TIE 2 のプロモーター~エンハンサー領域の制御遺伝子を挿入したベクターを構築し、これを用いて内皮細胞特異的に蛍光蛋白質を発現するトランスジェニックマウスを作出した。このマウスの腸管膜細動脈を顕微鏡下で観察すると、内皮細胞だけに蛍光が見られる。そこに塩化鉄処理を行うと、内皮細胞の剥離が蛍光の減少に相関して認められる。具体的には、1~2 分で蛍光の減少が見られ、4~5 分で完全に蛍光がなくなるという (図 1a)。次に、この現象が蛍光特有のクエンチングでないことを確かめるため、野生型マウスの腸管膜細動脈を塩化

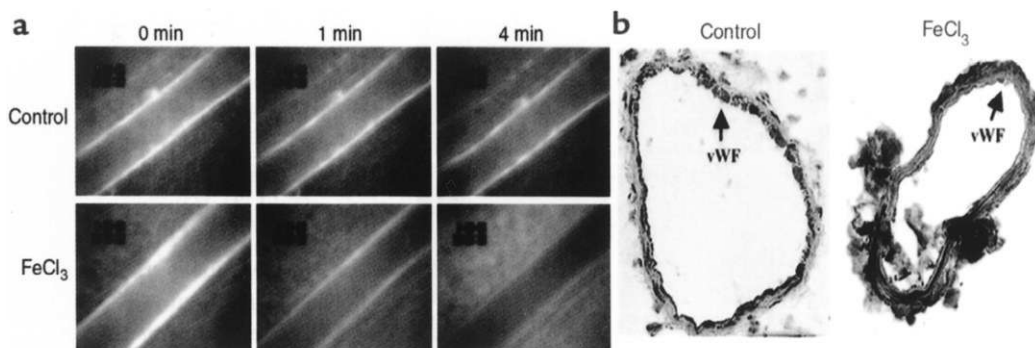


図1 第二塩化鉄 (FeCl₃) により誘導される細動脈傷害と血管内皮細胞の剝離 (転載許可取得)

(a) 塩化鉄により誘導される傷害. Green Fluorescent Protein (GFP) を血管内皮特異的に発現させたトランスジェニックマウスの腸管膜細動脈 (n=14/グループ) を顕微鏡下で観察し, 血管内皮の蛍光強度を「0~5段階」にランク付けする事により, 塩化鉄処理細動脈 (FeCl₃) と未処理細動脈 (Control) とを比較した. 有意差 (*P* 値) は, Mann-Whitney *U* test で求めた. 塩化鉄処理前 (0分) では, 全ての細動脈でほぼ同じ蛍光強度の値 (=5) を示した. 塩化鉄暴露の1分後から明らかな変化が見られ (*P*=0.0006), 2分後 (写真なし), コントロールの血管の蛍光強度は平均=4.1とほんのわずかに減少しただけだったが, 塩化鉄処理の血管の蛍光強度は平均=1.4と著しく減少した (*P*=0.0001). 4分後, コントロール群の蛍光強度は平均=3.4であるが, 塩化鉄処理群ではほぼ検出限界以下 (平均=0.4, *P*<0.0001) となった. 写真は, 各群の代表例.

(b) 塩化鉄による血管内皮細胞の剝離. 野生型マウスの腸管膜細動脈を塩化鉄処理した切片 (直径~100 μm) と, コントロールとして未処理の切片 (直径~130 μm) について, 抗 vWF 抗体 (マウスの vWF と交差反応するウサギ由来の抗ヒト vWF ポリクローナル抗体) を用いて免疫染色をおこなったものを示した. コントロール細動脈血管の内皮細胞は強く染色されたが, 塩化鉄処理5分後の切片は, ごく一部分 (矢印) が染色されただけである.

鉄で処理し, 抗 PECAM-1 抗体と抗 vWF 抗体による免疫染色を行った (図 1b). その結果, 内皮細胞の血管壁からの剝離が認められ, このモデルの妥当性が確かめられた.

各欠失マウスにおける血管傷害モデルを用いた血栓形成

前項で述べた如く, 塩化鉄処理で内皮細胞の剝離が確認できたので, この系を各ノックアウトマウスと野生型マウスに用い, 傷害部位における血小板血栓の形成過程を観察した. すなわち, 同じ遺伝子型のマウス由来の血小板を蛍光で標識したものを準備し, あらかじめマウスに静注し (今回は血小板が光る), 塩化鉄処理により内皮細胞が剝離した後の血小板血栓の生成と成長を蛍光観察した. その結果, 野生型の場合, 遅くとも数分後には血小板の粘着が確認され, 血小板の集積・凝集が進んで血栓が成長し, 約15分で完全閉塞に至った (図 2).

vWF^{-/-}マウスの場合: 野生型に比べ, ①血小板の粘着・凝集ともに野生型の2倍以上の時間を要した. さらに, 3~5分後の血小板の集積量も1/5まで減少した (表 1, 図 2). このように, vWF は血管壁と血小板の初期粘着反応に関与するだけでなく, 血小板血栓形成の全過程で重要な役割を果している. これは, vWF が GPIb-IX との結合を介して初期の粘着に関与するだけでなく, αIIbβ3 との結合による血小板の活性化 (シグナリング) と血小板同士の粘着の仲介に関与するためと, Niらは考察している. しかし, ②vWFの欠損にもかかわらず, 生じる血栓自体は安定で傷害部位から動かない. そして, ③vWF^{-/-}マウスの場合に特徴的なことは, 血栓の成長がしばしば止まり, 直ちに完全な閉塞には至らず, 血流路 (open channel) が残り続けることである.

この現象は, 90%以上のvWF^{-/-}マウスで,

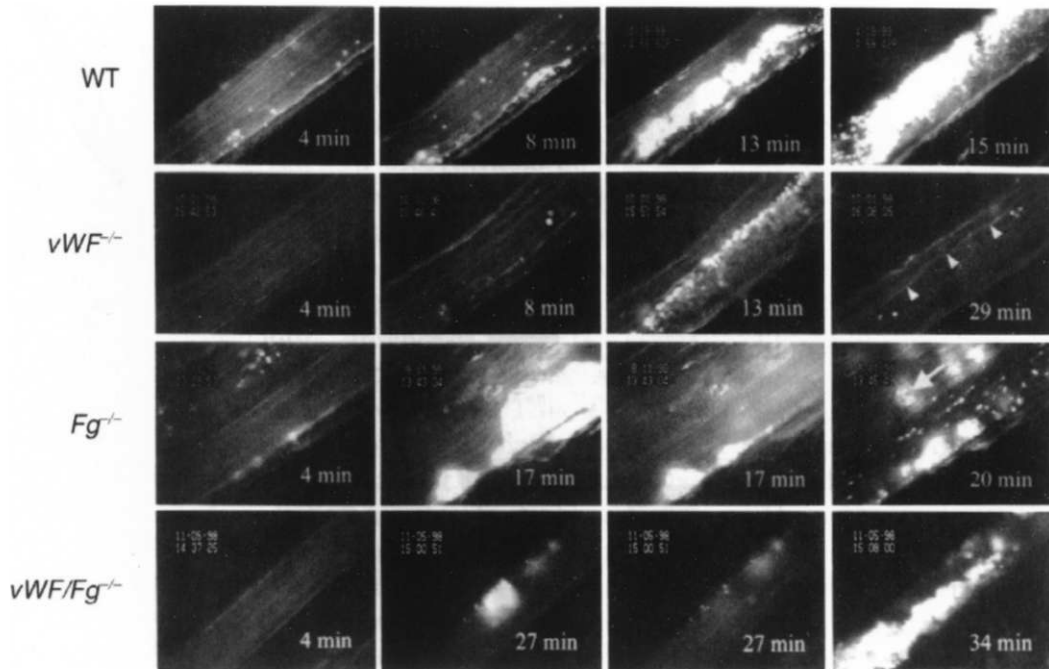


図 2 塩化鉄による血管傷害モデルと各ノックアウトマウスの血栓形成パターン (転載許可取得)

各写真の右下の数値は、塩化鉄誘導傷害後の時間を示す(分)。野生型マウス: 傷害部位に大量の蛍光標識血小板の粘着が観察され(4分), 血栓は急速に成長し, 傷害部位で血管閉塞を引き起こす(8~13~15分)。vWF^{-/-}マウス: 傷害早期には血小板の粘着はほとんど見られない(4~8分)が, 時間とともに血栓が形成される(13分)。血栓は時間が経つと成長しなくなり, 非常に高いずり応力を伴った細い流路 (small channel) が残る (29分の矢印)。この時点では, 新たな血小板の集積はなく, 血栓中の血小板の蛍光は長時間の UV 照射のため退色している。Fbg^{-/-}マウス: 早期の血小板の集積は, 野生型マウスと似ている(4分)。その後, 血栓は効率的に成長するが, 安定でない。血流によってしばしば血管壁から剝離し (17分の連続写真), 最終的に下流で閉塞塞栓となる。Fbg^{-/-}マウスの写真 (20分) の矢印は, 近傍の静脈で確認された塞栓を示す。二重欠失 (vWF^{-/-}/fbg^{-/-}) マウス: 傷害早期には血小板の粘着はほとんど見られないが (4分), 遅延した血栓形成が起き, 大きく成長せずには剝離する (27分の連続写真)。二重欠失マウスの大部分の血管は, 突然閉塞する。

5分以上持続する small channel (血栓部位で観察される細い流路) として観察された。生じた血栓の蛍光は, 観察に用いる UV ライトに長時間照射され続けるために退色し, 閉塞できなかった channel 部分のみに血小板の蛍光が見られる (図 2)。また, 半数の細動脈では完全は閉塞せず (表 2), その結果, 平均閉塞時間が大幅に延長した (図 3a)。それ故, ずり応力下で血栓が成長し, 血管が完全に閉塞するような場合には, vWF の役割が非常に重要であるという。

Fbg^{-/-}マウスの場合: Fbg は α IIb β 3 との相互作用を介して, 血小板同士の凝集を行うほ

かに, トロンピンと XIIIa 因子により不溶性フィブリンクロットを形成, 凝集した血小板の周囲にフィブリン繊維のマトリックスをつくり, 血栓を物理的に安定にする。したがって, fbg は血栓の本体であるとも考えられている。しかし, fbg^{-/-}マウスでは, ① 初期の血小板の集積量も, 血栓形成にかかる時間も, 野生型とほとんど差がなかった (表 1)。Fbg^{-/-}マウスの場合に特徴的なことは, ② 生じた血栓が脆いため, ずり応力に耐えられず, ある程度の大きさになると血管壁から剝離し, 下流で詰まることである (図 2, 図 3c)。閉塞時間の比較では, 野生型と

表 1 血小板と血管壁間の初期反応と血栓形成における vWF と fbg 欠失の影響 (転載許可取得)

遺伝子型	血小板の集積速度* ¹ (個/分)	血栓形成までの時間* ² (分)
wild-type	159.6±18.9	4.3±0.9
vWF ^{-/-}	32.2±19.0	9.4±1.6
fbg ^{-/-}	138.4±19.2	5.5±0.9
vWF ^{-/-} /fbg ^{-/-}	50.0±21.3	13.2±2.9

*1: 塩化鉄による傷害後, 初期反応 (3~5 分間) にて, 血管壁に集積する蛍光標識血小板の個数を数えたもの。血管 410 μm (長さ) あたりに集積する速度 (個数/分) を測定。野生型と vWF^{-/-} マウス ($P=0.0001$), および野生型と vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウス ($P=0.0009$) の間には有意差があるが, 野生型と fbg^{-/-} マウス ($P=0.45$) あるいは vWF^{-/-} マウスと vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウス ($P=0.54$) の間には有意差はなかった。

*2: 傷害後, 最初の血栓 (サイズ > 20 μm) が現れるまでに要する時間を測定したもの。野生型と vWF^{-/-} マウス ($P=0.0008$) および, 野生型と vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウス ($P=0.0006$) の間には有意差あり。野生型と fbg^{-/-} マウス ($P=0.33$) および vWF^{-/-} マウスと vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウス ($P=0.28$) の間には有意差無し。n=10~17。

表 2 塩化鉄傷害による細動脈の閉塞率と閉塞部位 (転載許可取得)

	wild-type	vWF ^{-/-}	fbg ^{-/-}	vWF ^{-/-} /fbg ^{-/-}
血管閉塞率	100	50	100	72.7
傷害部位での血管閉塞率*	100	50	0	27.3

*野生型と vWF^{-/-} マウスは血管障害部位で閉塞したが, fbg^{-/-} マウスでは, 傷害部位には塞栓を作らなかった (野生型と比較すると $\chi^2=28.99$, $P<0.05$)。vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウスのいくつかの血管は, 血管障害部位で閉塞したため, fbg^{-/-} マウスと vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウス ($\chi^2=5.19$, $P<0.05$) の間にも, 有意差があった。

ほぼ同じであるが (表 1, 図 3b), 傷害部位では閉塞しない (表 2)。血栓が血管壁から剝離する際にもっとも壊れやすいのは, 血小板と内皮下の境界部分である。これは, fbg が血小板と血管壁との間の結合に強く関与していることを示唆し, 無フィブリノーゲン血症患者に見られる致死的な肺塞栓の発生と一致するという。

vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウスの場合: 新生仔の 23% が離乳前に死亡するものの, それ以降は生き延びる。貧血はなく, 血小板数も正常である。そして, ① vWF と fbg が存在しないにもかかわらず, 時間はかかるが, 血小板の粘着と凝集が観察された (図 2)。② 血栓は, fbg^{-/-} マウスの場合よりもさらに脆く, 大きく成長する前に剝離するためサイズが小さい (図 3c)。③ 剝離した細かい塞栓 (emboli) が集積し, 突然閉塞し, 閉塞までの時間は, むしろ vWF^{-/-} マウス

より短くなっている (図 3b)。こうした現象は, vWF^{-/-} マウスと fbg^{-/-} マウスそれぞれにも見られた特色でもある。vWF^{-/-}/fbg^{-/-} マウスの場合に, 血小板の粘着凝集を起こすリガンドは何なのか興味を持たれる。

ヒトでは, vWF と fbg の同時欠失はこれまで報告されておらず, 出生不可能なのではないかと考えられる。

Integrin $\beta 3$ 欠失マウス¹⁰⁾ についても, この系を用いて試してみると, 血小板の初期の粘着は見られるものの, その後は凝集せず, 血栓を形成しない。したがって, 塩化鉄処理によって血小板が artifact に変質し, 凝集するようになったのではなく, $\alpha IIb\beta 3$ を介した凝集が起こっている事は間違いないという。 $\alpha IIb\beta 3$ の vWF, および fbg 以外のリガンドとして, vitronectin (VN) や thrombospondin-1

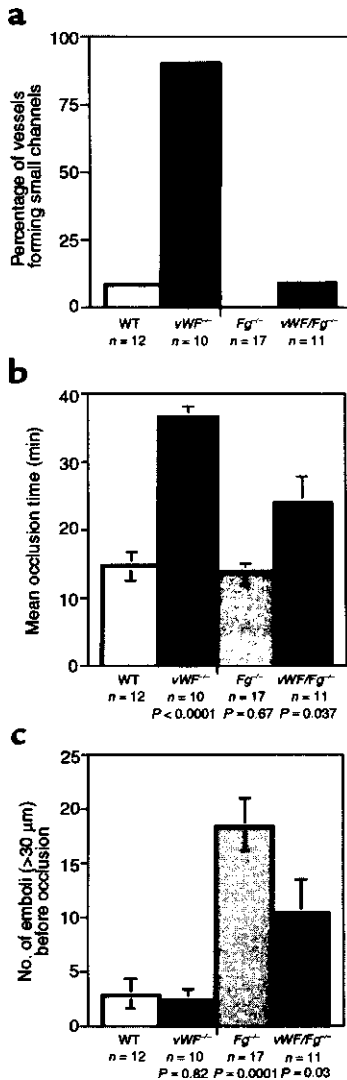


図3 野生型とノックアウトマウスの細動脈における血栓形成の定量解析 (転載許可取得)

(a) vWF^{-/-}マウスの細動脈血栓によって形成される small channel (細流路) の生じやすさ, 5分以上持続する細流路の存在頻度を各遺伝子型ごとに評価した. vWF^{-/-}マウスの場合, 血栓を生じた10個の血管のうち, 9個は後期に細流路が形成された. その頻度は明らかに野生型 (1/12) ($\chi^2 = 14.66$, $P < 0.005$), あるいはほかの遺伝子型を上回っている.

(b) vWF^{-/-}または fbg^{-/-}マウスの血管閉塞時間. それぞれの血管において, 血流が完全に停止するまでの時間を測定した. 40分の観察時間間に血流が止まらなかったときは, 40分を閉塞時間とした. 意外にも, fbg^{-/-}マウスの細動脈の血流が停止するのに要する時間は, 野生型とほとんど同じだった. vWF^{-/-}マウスの血管閉塞時間は, vWF^{-/-}/fbg^{-/-}マウスのそれよりも長かった ($P < 0.01$).

(c) 血栓剝離における vWF と fbg の働き. 血管閉塞前に血栓剝離 (thrombus embolization) により生じた直径 30 μm 以上の塞栓 (emboli) の数を測定した. 形成された塞栓の数は, fbg^{-/-}マウスにおいてもっとも多かった. しかし, fbg^{-/-}マウスと vWF^{-/-}/fbg^{-/-}マウスの間 ($P = 0.07$) 統計的有意差はなかった. 図で示した *P* 値は野生型マウスの細動脈との比較で算出した.

(TSP-1), fibronectin (FN) があげられるが, それぞれの生合成および血中濃度は, ノックアウトマウスの遺伝子型による差は見られない. しかし, fbg^{-/-}マウス, および vWF^{-/-}/fbg^{-/-}マウスの場合, 血小板 α 顆粒中の FN の濃度のみが約 3 倍上昇するという (図 4). Ni らは, 血漿中の FN が血小板の $\alpha\text{IIb}\beta 3$ に結合するとエンドサイトーシスによって取り込まれるが, fbg^{-/-}の遺伝子型を持つマウスでは, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 上で競合する fbg が存在しないために, α 顆粒内への FN の蓄積量が増加するのではないかと

と推察している. 事実, 抗 fibronectin 抗体を用いた免疫蛍光染色によって α 顆粒内への蓄積が確認されるという. しかし, FN が血小板の粘着および凝集を促進するという証拠はまだ確定しておらず, また, FN 欠失は初期胚段階で致死性であるため, ノックアウトマウス作出により血栓形成に及ぼす影響を見ることも現時点ではできない¹¹⁾¹²⁾.

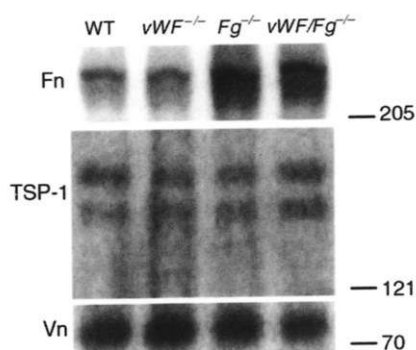


図4 Fbg欠失マウスと二重欠失マウスの血小板中の fibronectin の増加量
(転載許可取得)

各遺伝子型ごとにマウス6匹分の血小板をプールし、ゲル濾過後、 2×10^7 個をウェスタンブロットで解析した。右側の数値は分子量マーカー。全サンプルで血小板中の vitronectin と thrombospondin-1 (TSP-1) の量は同じレベルであったが、 $\text{fbg}^{-/-}$ マウスと $\text{vWF}^{-/-}/\text{fbg}^{-/-}$ マウスの血小板中の fibronectin 量は、野生型マウスと $\text{vWF}^{-/-}$ マウスより3倍多かった。抗 TSP-1 で見られる doublet は、TSP-1 の分解物。

おわりに

以上を要約すると、①ヒトでは出生不可能と考えられる vWF と fbg の二重欠失マウスは正常に出生する。生後から離乳前までに約23%が死亡するが、それ以降は生き延び、貧血はなく、血小板数も正常である。②主要なリガンドである vWF と fbg が存在しないにもかかわらず、血小板の粘着と凝集は起きる。③その症状は、 vWF 欠失マウスと fbg 欠失マウスの両方の特徴を併せ持つ。すなわち、血小板の粘着・凝集の遅延および、傷害血管壁からの血栓の剥離・塞栓化 (embolization) である。④ $\text{vWF}^{-/-}/\text{fbg}^{-/-}$ マウスにおける血小板の粘着および凝集は、 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ を介していると考えられるが、リガンドは何なのか不明である。⑤ Fbg を欠失したマウスの血小板内の α 顆粒内には、通常の3倍濃度の FN が蓄積している。

この fbg 非存在下における、FN の $\alpha\text{IIb}\beta 3$

に対する (代償的な?) リガンド作用については未だ明らかでない。また、 vWF と fbg の存在下、血小板の粘着と凝集に FN がどの程度関与しているのか興味深いところである。

謝辞: 御校閲を戴きました諸井将明先生 (久留米大学 分子生命科学研究所 高分子化学研究部門教授), 岩永貞昭先生 (藤田保健衛生大学・客員教授) に深謝いたします。

文献

- 1) Ruggeri ZM: Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* **82**: 576-584, 1999.
- 2) Blombäck B: Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* **83**: 1-75, 1996.
- 3) Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong J, López JA, and Barndt MC: The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost* **82**: 357-364, 1999.
- 4) Shattil SJ: Signaling through platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$: Inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost* **82**: 318-325, 1999.
- 5) Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Culleré M, Hynes RO, Wagner DD: A mouse model of severe von Willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9524-9529, 1998.
- 6) 矢野 寿, 友清和彦, 水口 純: フォンビルブランド因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **10**: 212-218, 1999.
- 7) Suh TT, Holmbäck K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, Potter SS, Degen JL: Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes & Development* **9**: 2020-2033, 1995.
- 8) 水口 純, 中垣智弘, 岩永貞昭: フィブリノーゲンの欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 156-158, 1997.
- 9) Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD: Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest* **106**: 385-392, 2000.
- 10) Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Culleré M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S and Hynes RO: $\beta 3$ -integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* **103**: 229-238, 1999.
- 11) Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD & Weiler H: Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 850-854, 1995.
- 12) 亀井慎太郎, 水口 純, 岩永貞昭: トロンボモジュリンの欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 218-221, 1997.