

表 6. FDP

症例	FDP (術前)	FDP(po2)	FDP(po4)	FDP(po6)	FDP(po8)
1.	3.4	3.5	2.8	.	.
2.	5.1	4.6	3.4	3.2	0.0
3.	3.4	4.3	2.5	0.0	3.7
4.	6.2	5.7	5.3	6.0	.
5.	2.5	3.1	2.6	.	.
6.	3.0	.	2.7	.	.

表 7. PIC

症例	PIC (術前)	PIC(po2)	PIC(po4)	PIC(po6)	PIC(po8)
1.	1.0	.9	1.0	.	.
2.	1.2	.9	1.0	.6	.8
3.	.8	1.4	.4	.7	1.2
4.	.	1.3	1.1	.9	.
5.	.7	.9	1.0	.	.
6.	.	9.4	6.7	.	.

血液流動性維持機構障害と特発性血栓症

小 嶋 哲 人
(名古屋大学医学部・助手)

特発性血栓症の発症背景にプロテインC (PC) 欠乏症などの血液流動性維持機構障害が存在することがある。今回、PC 欠乏症：PCNagoya において免疫蛍光および電子顕微鏡観察、COOH 末欠失変異体発現解析、さらに分子モデルのコンピューター解析により欠乏症発症の分子病態を解析した。その結果、PCNagoya 分子には合成過程でのER/Golgi 輸送の障害が示唆され、この分泌障害の原因は異常アミノ酸の存在ではなく、立体構造に大きな差異はないものの分泌に必要な COOH 末構造が失われるためであることが判明した。

キーワード：特発性血栓症、血液流動性維持機構、PCNagoya、分子モデル、分泌障害

A. 研究目的

血管内皮細胞上では様々な抗血栓性による血液流動性維持機構が働いており、これらの異常は特発性血栓症の基礎疾患となる。肝臓で産生されるビタミンK依存性凝固制御因子であるプロテインC (PC) は、血管内皮上のトロンボモジュリンと結合したトロンピンにより限定分解を受け活性化する。活性化 PC は、そのコファクターであるプロテインS の存在下において活性化凝固第 V 因子、第 VIII 因子をそれぞれ不活性化して凝固反応を抑制するとともに、PAI-I を不活性化して線溶系を賦活化する。このように PC は血小板や血管内皮上の血液凝固反応を抑制する重要な抗血栓物質で、先天性 PC 欠乏症は四肢の深部静脈血栓症、肺梗塞あるいは脳梗塞を高頻度に発症し、特発性血栓症の基礎疾患の一つとして知られている。今回、我々は当教室で経験された I 型 PC 欠乏症 PCNagoya⁽¹⁾において、その遺伝子異常から蛋白欠乏症に至る分子病態の解明を試みた。

B. 研究方法

当教室で経験された PC 欠乏症の一家系で、発端者は下肢深部静脈血栓ならびに肺塞栓の既往があり PC の活性値と抗原量がともに低下し、同様な PC 活性・抗原量の低下が他の 3 名にもみられ、I 型の先天性 PC 欠乏症家系であることが判明している。ところが、遺伝子解析ではグアニン 1 塩基欠失に伴うフレームシフトにより COOH 末端 39 アミノ酸が 81 異常アミノ酸に置換される延長型異常 PC (PCNagoya) 遺伝子が伝播されており、この異常 PC 分子は血中に分泌され

ないことが推測されていた。そこで、その遺伝子異常から PC 欠乏症に至る分子病態を解明するため、正常ならびに異常 PC 分子の Pulse chase 発現実験、免疫蛍光顕微鏡、電子顕微鏡解析ならびに COOH 末端欠失変異体 PC の発現解析を行なった。さらに、血液凝固第 Xa 因子の結晶構造をもとにしたコンピューター解析による各 PC 分子モデルを作製し、その COOH 末端構造の比較検討を行なった。

C. 研究結果

Pulse chase 発現実験では、正常 PC 分子はすみやかに培養上清中に分泌されるのに対して、PCNagoya 分子は 8 時間後でも分泌されなかった。細胞内と培養上清中 PC 量の総和は、正常 PC 発現ではほぼ保たれていたが、PCNagoya では時間経過とともに減少しこの異常蛋白が細胞内にて分解を受けていることが判明した。すなわち、これが本症例での I 型 PC 欠乏の原因であることが示唆された。

蛍光抗体顕微鏡観察においては、正常 PC 産生細胞で細胞質/核周囲に点状蛍光分布をし、PCNagoya 産生細胞で細胞質全体に網状蛍光分布がみられ、PCNagoya 分子の生合成過程での ER から Golgi への輸送障害が示唆される所見であった。

この PCNagoya 分子の ER/Golgi 輸送障害において、COOH 末端の 81 個の置換異常アミノ酸の存在が問題である可能性を検索するため、この部の削除分子を作製し発現実験を行なった。その結果、PCNagoya 分子の COOH 末端を順次削除した変異体は、異常アミノ酸すべてを削除したのものも含めてすべて分泌されず、

PCNagoya 分子での COOH 末の異常アミノ酸そのものが分泌異常の原因ではなく、分泌には正常 PC の COOH 末端構造が重要であることが示唆された。そこで、正常 PC 分子の COOH 末端を順次削除した変異体での発現実験を行なったところ、10 アミノ酸を削った変異体までは培養上清中に分泌されたが、11 アミノ酸以上削除した変異体では全く分泌されないことが判明した。

また、分泌障害を示す変異体では免疫蛍光顕微鏡観察でも ER/Golgi 輸送障害所見を示すのに対し、分泌型分子では正常所見が観察された。さらに、金コロイド免疫電子顕微鏡観察でも、分泌型分子では ER、Golgi 体領域ともに多数金粒子を観察できるが、分泌障害型では ER 領域には金粒子を認めるが Golgi 体領域には全く認めず、やはり分泌障害型での ER から Golgi への輸送障害を示す所見であった。すなわち、PCNagoya 分子では分泌に必要な COOH 末端構造が失われることが分泌異常の原因であることが明らかとなった。

次に、分泌障害型分子と分泌型分子との立体構造の違いについて、血液凝固 Xa 因子の結晶構造をもとにそれぞれコンピューターを用いて分子モデルを構築し比較検討を行なった。その結果、174Arg, 204His, 250Asp で構成される活性中心、セリンプロテアーゼに共通の COOH 末 α -ヘリックス構造を含め、当初の予想に反して分泌障害型と分泌型とではほとんど立体構造の違いを認めなかった。

D. 考察

今回の COOH 末端欠失変異体解析により、PCNagoya 分子の分泌障害は当初予想された異常アミノ酸の存在によるものではなく、分泌に必要な COOH 末端構造が失われるためであることが明らかとなった。

また、立体構造変化の分子モデル解析では分泌障害型分子と分泌型分子とでほとんど違いを認めなかったが、PCNagoya 分子がシャペロン蛋白 (GRP78、GRP94) と強く会合することが観察されており⁽²⁾、ER に存在する分子シャペロンが分泌障害型分子でのごくわずかな構造上の違いを認識して分泌障害を引き起こすものと推察された。

E. 結論

血栓性素因 PCNagoya の PC 欠乏症を発症する分子病態は、異常 PC 分子での正常 COOH 末構造が失われたための分泌異常によることが示唆された。

F. 参考文献

- (1) Yamamoto K, et al.: Impaired secretion of the elongated mutant of protein C (protein C). J. Clin. Invest. 90: 2439-2446, 1992
- (2) Katsumi A, et al.: Protein C Nagoya, an elongated mutant of protein C, is retained within the endoplasmic reticulum and is associated with GRP78 and GRP94. Blood 87: 4164-4171, 1996

腎疾患の進展におけるトロンビンの関与

北 本 康 則

(熊本大学医学部第三内科・講師)

トロンピンは血液凝固の他に、そのレセプターを介した種々の作用を持つ。本研究では、特異的な基質とインヒビターを併用した測定法によりトロンピンの尿中活性を測定し、その腎炎への関与を調べた。活性はメサンギウム増殖性腎炎の尿中にありワーファリン投与で低下したが、微小変化群ではみられなかった。以上からトロンピンは腎炎の増殖性変化に関与すると考えられた。

キーワード：尿、トロンピン活性、糸球体腎炎

A. 研究目的

糸球体腎炎では凝固の活性化がその進展に関わるとされ抗凝固療法が広く行われているが、凝固の活性化を直接示す指標がないために、治療法の適応や薬剤投与量の決定が困難となっている。本研究では尿中トロンピン活性を測定し、糸球体での凝固活性化の指標としての可能性を検討した。

B. 研究方法

活動度の高いメサンギウム増殖性腎炎9名、非増殖性腎炎10名、健常人11名を対象として新鮮尿を採取し、トロンピン活性を測定した。特異的合成基質を用いて水解活性を測定した後に、ヒルジンを加え再度活性を測定し、その差をトロンピン活性とした。

C. 研究結果

メサンギウム増殖性腎炎では尿にトロンピン活性が検出されたが(8.26+6.59u/g creatinine)健常人では検出されず、非増殖性腎炎でも殆どなかった(0.24+0.77u/g creatinine)。この活性は血尿の程度と相関しなかった。また活性はワーファリンの投与により低下した。

D. 考察

尿中トロンピンは全身性の凝固亢進や出血によってではなく、腎炎により糸球体で産生されると考えられ、メサンギウム増殖性腎炎では、その病態にトロンピンが関与することが示唆された。トロンピンの産生は、糸球体病巣で活性化された単球やメサンギウム細胞に発現した組織因子による凝固系活性化の結果と考えられた。

E. 結論

尿中トロンピン活性を初めて明らかにし、トロンピンがメサンギウム増殖性腎炎の病態に関与することを示した。この活性は糸球体病巣でのトロンピン産生を反映し、抗凝固療法の適応や治療効果を判定する指標としての応用が期待される。

F. 参考文献

1) Kitamoto, Y, Imamura, T, Fukui H., Tomita, K: The role of thrombin in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 54, 1767-1768, 1998

虚血部脳組織における血管新生・分化の分子機構

池田 栄二

(慶應義塾大学医学部病理学教室・助手)

血栓による脳血管の閉塞は脳組織に虚血を生じるが、虚血部脳組織においては代償機構として脳血管の新生が惹起され脳組織への血流を確保するとともに、新生血管が脳組織特異的血管、即ち血液脳関門形成血管へと分化し脳組織の微小環境を維持する。この脳血管の新生・分化過程は、ウィリス動脈輪閉塞症等の血栓性閉塞性血管疾患の病態に深く関与するが、その分子機構についてはいまだ不明な多く、特に新生血管が血液脳関門形成に至る機序はほとんど解明されていない。我々はこれまでに、脳血管新生・分化過程を分子レベルで解明するために有用な *in vivo* モデルを確立した。今回、その *in vivo* モデルを機能的側面から解析し胎児脳細胞が血液脳関門誘導能を有することを明らかにした。さらにその胎児脳細胞の解析を通じ、脳血管新生過程のみならず血液脳関門形成血管への分化過程にも vascular endothelial growth factor (VEGF) が関与する可能性を示唆する所見を得た。

A. 研究目的

成人の脳組織では生理的条件下では血管新生はみられないが、種々の病的状態において脳組織が虚血に陥った際には脳血管の新生が起こり虚血部脳組織への血流を確保する。ウィリス動脈輪閉塞症等の血栓性閉塞性血管疾患において、脳血管新生はその病態に関与する重要な因子となる。しかしながら血管新生のみでは脳組織の微小環境は維持できず、新生した脳血管が脳組織特異的血管、即ち血液脳関門 (blood-brain barrier、以下 BBB) 形成血管へと分化することが必須である。BBB の存在により脳組織の微小環境が維持され、神経細胞が正常に機能できる。従って、脳血管の新生・分化機構の解明は血栓が原因となる虚血性脳疾患の病態解明、さらには新たな予防法・治療法開発にもつながる意義ある研究と考えられる。

我々はこれまでに、血管新生・BBB 形成血管への分化過程をよく反映した *in vivo* モデルを quail (マガリ) chick (ニトリ) 間異種移植系を用い確立し、BBB 形成血管内皮細胞マーカーの検索を通じ、胎児脳細胞が BBB 誘導能を有すること示唆する知見をえた¹⁾。今回我々は、胎児脳細胞が BBB 誘導能を有することを機能的側面から解析するとともに、胎児脳における血管透過性制御因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の

発現を検索し、BBB 誘導過程における VEGF の関与の可能性につき検討を加えた。

B. 研究方法

Incubation of fertile eggs of quail and chick

Quail および chick 有精卵を 37°C にてインキュベーションし、胎児を得た。胎児の成長評価は胎齢とともに、Hamburger and Hamilton の staging²⁾により行った。

Xenograft transplantation

Quail-chick 間異種移植手技は、基本的に Stewart PA, Wiley MJ らの方法³⁾に従った。Stage 9-12 (胎齢約 2 日) の quail 胎児より移植脳組織片を採取した。この時期、神経管組織はその周囲を血管網を含む未熟中胚葉組織により囲まれているが、神経管自体は無血管組織である。顕微鏡下に神経管周囲中胚葉組織を剥離し、胎児脳組織 (prosencephalon, mesencephalon) 断片を得た。一方、chick 有精卵の卵殻に開窓を加え stage 17-20 (胎齢約 3 日) の chick 胎児にアプローチしその体腔壁を切開、体腔内に quail 胎児脳組織片を挿入した。開窓部をセロハンテープにて塞ぎさらに 14 日間インキュベーションした後、体腔内移植脳組織を含めた種々の組織について、組織学的・免疫組織学的・分子生物学的検索を行った。

Dye injection

血管の透過性 (barrier 機能評価) のため、chick 発育卵漿尿膜より 2% Evans blue (in phosphate buffered saline) を血管内投与し、5分後、胎児組織および chick 体腔内に移植した quail 胎児脳組織における色素漏出の有無を観察した。

RNA extraction

Quail 発育卵より経時的に採取した脳・肺・腎組織、および chick 胎児体腔内に移植した quail 脳組織片より、ISOGEN (ニッポンジーン) を用い total RNA を抽出した。組織片を 1 ml の ISOGEN 溶液にてホモジェナイズした後、200 μ l の chloroform を加え vortex した。遠心 (12000g, 4 $^{\circ}$ C, 15分) にて水相と有機相を分離後、水相を採取した。さらに、RNA の純度を高めるため、600 μ l の acid phenol (pH4.0), 210 μ l の chloroform を加え vortex 後、再び遠心にて水相と有機相に分離した。水相を採取し等量の isopropanol を加え total RNA を沈殿させた後、15 μ l の DEPC H₂O (diethyl pyrocarbonate treated H₂O) に融解した。

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA より、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech) を用い RNA:cDNA heteroduplex を合成した。即ち、total RNA 2 μ g に対して、random hexadeoxynucleotides primer と Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase を用い、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベーションし逆転写反応を行った。続いて PCR により quail vascular endothelial growth factor (VEGF) および β -actin cDNA の増幅を行った。PCR には逆転写反応産物の 1/15 量を用い、プライマーの配列は、

quail VEGF; 5'-TGTCGGCTTGTCGGATCGCGG-3'

(forward), 5'-CTTTTCCGCTGCTCACCGTCTC-3'

(reverse); β -actin; 5'-GACTGACCGCGTTACTCCCAC-

3' (forward), 5'-GAGCCTCTGTGAGCAGCACAG-3'

(reverse) とした。VEGF に関しては、PCR 反応産物のサイズにより発現している isoform の特定が可能となるようプライマーを設定した。PCR 反応条件は 94 $^{\circ}$ C 5分間の後、94 $^{\circ}$ C 1分間 \rightarrow 70 $^{\circ}$ C (VEGF) \cdot 63 $^{\circ}$ C (β -actin) 2分間 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 3分間を 30 サイクル行い、その後 72 $^{\circ}$ C 3分間のインキュベーションとした。

Electron microscopy

Quail 胎児脳組織片および chick 体腔内に移植・生着した quail 胎児脳組織片を 2.5% glutaraldehyde にて浸透固定 (室温、overnight)、さらに 1% osmium に

て固定 (室温、2 時間) 後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、クエン酸鉛・酢酸ウランにて二重染色後、電子顕微鏡 (JEM1200EX) にて観察した。

Cloning of quail VEGF₁₂₂ cDNA

胎齢 15 日の quail 胎児脳組織から抽出した RNA より RT-PCR にて open reading frame 全長を含む VEGF₁₂₂ cDNA 断片を増幅し、アガロース電気泳動にて分離・抽出後、pBluescript II KS vector (STRATAGENE) に挿入した。挿入された cDNA 断片の塩基配列は sequencing にて確認した。

Sequencing analysis

蛍光 primer を用いた dideoxy 法にて DNA 断片の塩基配列を解析した。解析には、Pharmacia LKB A.L.F. DNA Sequencer II (Pharmacia Biotech) を用いた。

In situ hybridization

Quail 胎児脳組織における VEGF 発現細胞を同定するため、in situ hybridization を行った。胎児脳組織を 4% paraformaldehyde にて浸透固定 (4 $^{\circ}$ C、overnight) 後、パラフィン包埋し組織切片 (5 μ m 厚) を作製した。切片を proteinase K (10 μ g/ml) 処理後 (37 $^{\circ}$ C、30分間)、4% paraformaldehyde にて後固定 (室温、10分間) した。0.2 M HCl 処理 (室温、10分間)、0.25% acetic anhydride 処理 (室温、10分間) 後、エタノールにて脱水、乾燥し、RNA probe との hybridization を行った。

Digoxigenin 標識 RNA probe (antisense および sense) は、pBluescript II KS vector に挿入された quail VEGF₁₂₂ cDNA 断片を鋳型とし、in vitro transcription により作製した。In vitro transcription には DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) を用い、polymerase は T3 および T7 RNA polymerase を使用した。

Hybridization は 50% formamide 存在下、50 $^{\circ}$ C 16 時間行った。50% formamide \cdot 2x SSC にて洗浄後、RNase A (10 μ g/ml) と反応させた (37 $^{\circ}$ C、30分間)。2x SSC および 0.2x SSC にて洗浄した後、切片を抗 digoxigenin 抗体 (alkaline phosphatase-conjugated Fab fragment from sheep anti-digoxigenin antibody, Boehringer Mannheim) と室温 \cdot 60分間反応させ、nitro blue tetrazolium chloride (NBT, Boehringer Mannheim) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate, Boehringer Mannheim) にて発色反応を行った。切片の核染色には Kernechtrot を用いた。

C. 研究結果

無血管組織である発生初期 quail 胎児脳組織片 (stage 9-12) を chick (stage 17-20) 胎児体腔内に移植し

たところ、移植片は chick 体腔内血管よりの血管新生を伴い chick 体腔内に生着した。血管透過性を評価する目的で host chick の血管内に色素を投与したが、腸管をはじめとする体腔内臓器において血管外への色素漏出が見られたのに対し、quail 胎児脳移植片では host chick の脳組織と同様に血管外への色素漏出は認められず (Figure 1a)、機能的にも移植片内血管に barrier が誘導されることが証明された。

脳血管の新生過程において中心的役割を演ずることが知られている血管新生因子 VEGF は血管新生作用と同時に血管透過性を亢進する作用を有する。従って、血管透過性が変化する BBB 形成過程において、脳組織における VEGF の発現に変化が見られる可能性が考えられた。そこで我々は、組織内血管に barrier 機能を誘導した移植 quail 脳組織における VEGF 発現を RT-PCR にて検索した。その結果、chick 体腔内に生着した quail 脳組織片では VEGF の発現が認められ、4種類の isoform が検出された (Figure 1b)。各々の増幅 DNA 断片の塩基配列を解析したところ、移植 quail 脳において発現している isoform は VEGF₁₂₂, VEGF₁₄₆, VEGF₁₆₆, VEGF₁₉₀ であることが判明した。

次に、quail 個体発生過程の脳組織においても同様の発現パターンが見られるかにつき検索を行った。興味深いことに、胎齢 11 日から胎齢 13 日にかけて VEGF isoform 発現パターンに変化が認められ、胎齢 13 日以降の発現パターンが移植 quail 脳組織におけるものと一致していた。即ち、胎齢 11 日までは VEGF₁₂₂, VEGF₁₆₆ のみの発現が見られるが、胎齢 13 日頃以降ではさらに VEGF₁₄₆, VEGF₁₉₀ の発現が加わり計 4 種類の isoform の発現が認められた (Figure 2a)。脳血管系における BBB 形成は、形態学的には血管内皮細胞間における junctional complex の発達、特に密な tight junction 網の形成を特徴とする。そこで、VEGF isoform 発現パターンが変化する前後の quail 脳血管について超微形態学的観察を行った。その結果、isoform 発現パターン変化後では脳血管内皮細胞間には primitive junctional complex (arrowheads in Figure 2c) や tight junction 様構造 (arrow in Figure 2c) が認められ BBB 形成への分化傾向がみられるのに対し、変化前では内皮細胞間には junctional complex の形成は観察されず BBB 形成への分化は認められなかった (Figure 2b)。即ち、quail 胎児脳においては、脳血管が BBB 形成血管へ分化を開始する時期に一致して VEGF isoform 発現に変化が起きていることが明らかにな

った。

BBB 誘導に VEGF isoform 発現変化が関与する可能性につきさらに検討を加えるため、上記の VEGF isoform 発現変化が胎児脳組織特異的であるか否かについて検索を行った。Quail 胎児より脳組織とともに腎および肺組織を経時的に採取し、発現する VEGF isoform の検索を行った。胎児腎組織および肺組織において発現する isoform は、VEGF₁₉₀ の弱い発現も伴うが、主として VEGF₁₂₂ と VEGF₁₆₆ であった (Figure 3)。BBB 誘導に相当する時期でもこれらの発現パターンに変化はみられず、また VEGF₁₄₆ に関しては、その発現は腎・肺組織では認められなかった。これらの結果は、BBB 誘導時期の脳組織において認められる VEGF isoform 発現変化、特に VEGF₁₄₆ の発現誘導が脳組織に特異的な変化であることを示す。また、in situ hybridization にて、胎児脳組織における VEGF 発現細胞が胎児脳細胞であることが示された (data not shown)。

D. 考察

血栓による脳血管の閉塞に起因する虚血部脳組織においては、脳血管の新生が惹起され脳組織への血流を確保するとともに、新生血管は脳組織特異的血管へと分化し BBB を形成、脳組織の微小環境を維持する。我々は、quail-chick 間異種移植系に基づく in vivo BBB 誘導モデルを用い、本来 barrier 機能のない血管に分化する体腔内血管が、移植脳組織片内に侵入することにより BBB 形成血管内皮細胞マーカーである HT7 および glucose transporter 1 (GLUT1) を発現するに至ることを示した¹⁾。今回我々は、移植脳組織内に侵入した体腔由来血管に BBB 形成血管としての性質が誘導されることを、色素注入試験により機能的側面から証明した。これらの結果は、胎児脳細胞 (我々の実験系では quail 胎児脳細胞) が胎児血管を BBB 形成血管へと分化させる誘導能を有していることを明確に示すものと考えられる。

胎児脳細胞において産生される VEGF は、脳血管新生、特に個体発生初期の脳血管新生過程において中心的な役割を演ずることが知られているが、今回我々は BBB 誘導時期に一致して胎児脳細胞における VEGF isoform 発現様式が変化することを見出した。さらに、その isoform 発現様式の変化は脳組織に特異的な現象であることも示された。近年、VEGF isoform 間での作用の相異が注目されており、BBB 誘導期の脳組織において血管透過性制御因子である VEGF の

isoform 発現様式に変化にみられることは注目すべき現象と考えられる。BBB 誘導期より発現が見られる VEGF₁₄₆・VEGF₁₉₀ は、各々 VEGF₁₂₂・VEGF₁₆₆ に同一の 24 アミノ酸配列が挿入された分子であるが、この配列は極めて塩基性アミノ酸に富んでおり、VEGF₁₄₆・VEGF₁₉₀ に VEGF₁₂₂・VEGF₁₆₆ が有していない生化学的・生物学的特性を付与すると考えられる。これまでの研究により明らかにされた胎児脳細胞のもつ BBB 誘導能と VEGF isoform 発現様式の変化とに何らかの関連が存在する可能性が示唆される。虚血部脳組織あるいは発生期脳組織では、いまだ BBB 機能のない新生期の血管と BBB 形成血管が混在して存在すると考えられる。従って、新生期にある血管周囲の脳細胞と BBB 形成血管周囲の脳細胞では BBB 誘導因子の発現に相異がみられることが予想される。今後は、同一脳組織内における VEGF isoform 発現様式に heterogeneity がみられるか否かにつき isoform 特異的プローブを用いた in situ hybridization 等により検索するとともに、上記の VEGF isoform 発現変化の機能的意義につき解析する予定である。

E. 結論

虚血脳組織における脳血管新生および新生血管の血液脳関門形成血管への分化過程は、ウィリス動脈輪閉塞症等の血栓性閉塞性疾患の病態に深く関与する。我々は、分子レベルでの解析に有用な in vivo モデルを確立し、そのモデルおよび胎児脳組織の解析を通じ、脳血管新生と血液脳関門形成血管への分化過程に VEGF isoform 発現変化が関与する可能性を示唆する知見を得た。

F. 参考文献

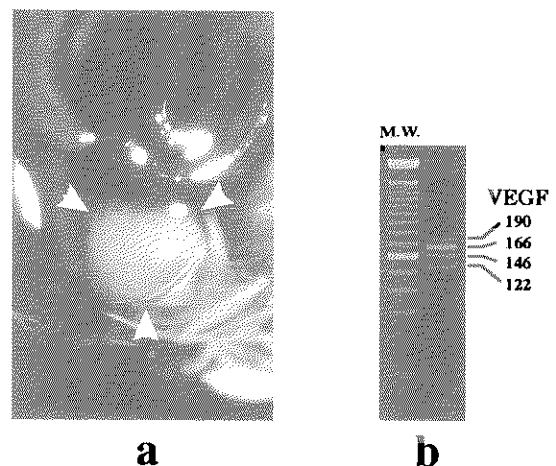
- 1) Ikeda E, Flamme I, Risau W: Developing brain cells produce factors capable of inducing the HT7 antigen, a blood-brain barrier-specific molecule, in chick endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 209: 149-152, 1996
- 2) Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92, 1951
- 3) Stewart PA, Wiley MJ: Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84: 183-192, 1981

図表)

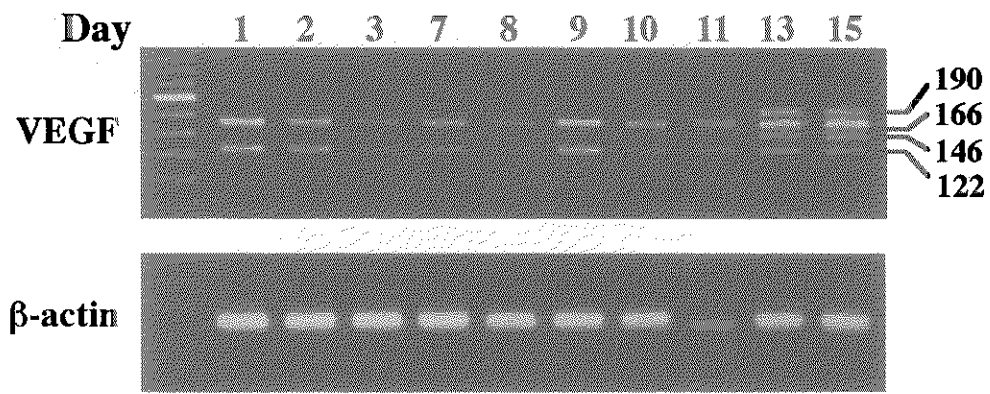
Figure 1: Chick 体腔内に生着した quail 胎児脳組織 (Evans blue 血管内投与後)。a, 腸管等の chick 体腔内組織には色素の血管外漏出が見られるのに対し、移植 quail 脳組織片 (arrowheads) では色素の漏出は認められない。b, 移植 quail 脳組織における VEGF isoform の発現検索結果。RT-PCR により VEGF₁₂₂, VEGF₁₄₆, VEGF₁₆₆, VEGF₁₉₀ の発現が確認された。

Figure 2: a, Quail 胎児脳における VEGF isoform の発現様式。胎齢 11 日~13 日にかけて VEGF isoform の発現様式に変化が見られる。b および c, VEGF isoform 発現変化前 (b) および 変化後 (c) の脳血管内皮細胞の超微形態学的検索。Isoform 発現変化後では変化前と比較して、脳血管内皮細胞間に junctional complex (arrowheads and arrows in c) の形成がみられ、BBB 形成血管への分化傾向が認められる。

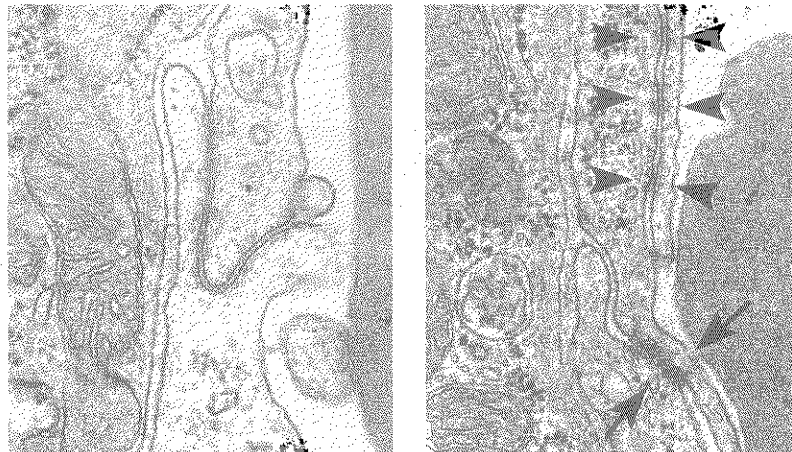
Figure 3: 胎児脳組織 (a)・肺組織 (b)・腎組織 (c) における VEGF isoform 発現様式の比較。BBB 誘導時期における isoform 発現様式の変化、特に VEGF₁₄₆ の発現は脳組織特異的である。



(Figure 1)



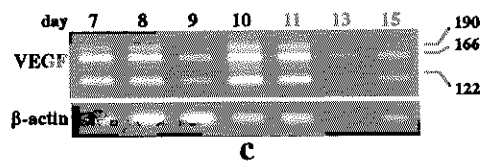
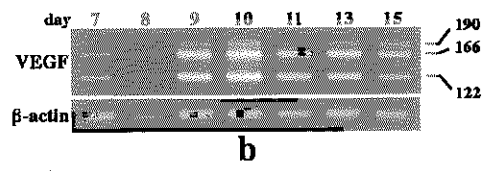
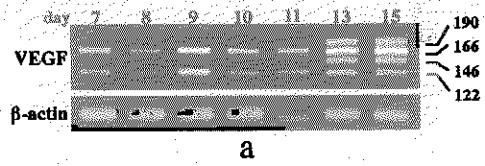
a



b

c

(Figure 2)



(Figure 3)

慢性肺高血圧における微小血栓の関与について

坂 卷 文 雄

(国立循環器病センター内科・医師)

原発性肺高血圧(PPH)に代表される慢性肺高血圧における微小血栓の関与を検討するために血管内皮細胞障害と血小板活性化および凝固線溶異常の指標となる血漿中の諸因子を測定した。von Willebrand 因子(vWF)の異常は2次性前毛細管性肺高血圧(Pre/SPH)、後毛細管性肺高血圧(Post/SPH)、PPHのいずれにおいても認められた。PPHおよびPre/SPH患者では血漿中のトロンボモジュリン(TM)の低下、可溶性P-selectinの上昇を認めた。PPH群のTMはPre/SPH群よりさらに低下していた。PPH群においてTMの低下と可溶性P-selectinの上昇は肺血管抵抗の悪化と相関した。以上より慢性肺高血圧においては微小血栓形成傾向が病態の悪化因子として考えられ、これらは臨床症例においてvWF, TM, 可溶性P-selectinの異常に反映されると考えた。

キーワード：肺高血圧、原発性肺高血圧症、微小血栓、血管内皮障害、血漿マーカー

A. 研究目的

原発性肺高血圧症(Primary pulmonary hypertension: 以下 PPH)に代表される重症の肺高血圧 (Pulmonary hypertension: 以下 PH) の成因として肺血管内皮障害による肺血管収縮および血管平滑筋の増殖が重要とされているが、凝固線溶異常による微小血栓も何らかの役割を果たすと考えられる¹⁾。しかし臨床症例においてこれらの微小血栓の存在を鋭敏にとらえることは一般的に行われている血液凝固系の検査では困難である。本研究では肺血管内皮障害による血栓形成傾向をPPHを初めとするPH症例において評価することを目的とし、以下の血液中の諸指標を測定した。血漿中の von Willebrand 因子(von Willebrand factor: 以下 vWF)を血管内皮細胞障害、血小板粘着および凝固第 VIII 因子異常の指標として測定した²⁾。血漿中可溶性 P-selectin (soluble P-selectin: 以下 sPS) を血管内皮障害および血小板活性化による微小血栓形成を評価するために測定した³⁾。また血漿トロンボモジュリン(Thrombomodulin: 以下 TM)濃度を血管内皮障害とそれに伴う血管内皮細胞の抗血栓作用を評価するために測定した⁴⁾。これらの指標が PH 症例において正常人と比べ異常値をとるか、また PH の原因により差異があるかを検討するとともに肺血行動態により表される臨床的重症度と比較した。

B. 研究方法

1996年5月から1998年12月までに国立循環器病センターに入院したPHを有した患者80例を対象とした。PHの定義は右心カテーテル検査にて平均肺動脈圧20mmHg以上とした。対象症例はその原因によりPPH群30例(男10例、女22例;39+15歳)、先天性心疾患に伴う前毛細管性2次性肺高血圧 (Precapillary secondary pulmonary hypertension: 以下 Pre/SPH) 群18例(男4例、女14例;46+13歳)、肺静脈圧の上昇を伴う左心系心疾患にともなう後毛細管性2次性肺高血圧 (Postcapillary secondary pulmonary hypertension: 以下 Post/SPH) 群30例(男16例、女14例;59+11歳)の3群に分類された。臨床上明かな循環器および呼吸器疾患を有さない17例(男13例、女4例;46+13歳)を対照群とした。検体採取および右心カテーテル検査に際しては患者本人および家族に本研究の意義を説明し同意を得た。

対象としたPH患者群には糖尿病、膠原病、血清クレアチニン値1.6mg/dl以上の腎機能障害、活動性の感染症を認めなかった。また4群の間に末梢血液中の血小板数、血清コレステロール、中性脂肪値に有意差を認めなかった。PH患者群の中で抗凝固療法としてワーファリンがすでに投与されていた患者がPPH群で14例、Pre/SPH群で6例、Post/SPH群で12例いたが、これらの患者については検体採取の3日前より同薬剤の

内服を中止し、International Normalized Ratio(INR)が1.5未満となった時点で検体採取を行った。

急性心不全の状態を認めない安定期に肘静脈を穿刺しゆっくりと陰圧吸引を行い、3.13%クエン酸入り試験管に血液検体を2mLづつ2本以上採取した。穿刺刺激に伴う血小板活性化を避けるため2本目以降の採取検体を測定に用いた。検体採取後速やかに3,000回転で6分間遠心分離を行い、上清を血漿検体として用いた。対照群(CTL)の17例からも同様に血漿検体を採取した。

血漿中の von Willebrand 因子抗原 (以下 vWF-Ag)を STAGO 社 (仏) 製の vWF 測定用試薬を用い、酵素免疫測定法 (Enzyme immunoassay: 以下 EIA 法)にて定量測定した 5)。von Willebrand 因子活性 (リストセチンコファクター: 以下 vWF-cofactor)を DADE BEHRING 社製の von Willebrand Reagent を用い、安定化血小板凝集法にて測定した。血漿 TM 濃度を帝人 (株) 社製血中 TM 測定キットを用い EIA 法にて測定した 6)。血漿 sPS 濃度を宝酒造社製キット (GMP-140(P-selectin) EIA Kit) を用い、EIA 法にて測定した 7)。

以上より求められた血漿中の諸因子濃度を対照群、Post/SPH 群、Pre/SPH 群、PPH 群の 4 群間で比較した。また Post/SPH、Pre/SPH、PPH の 3 群においては右心カテーテルから平均肺動脈圧 (mean pulmonary arterial pressure: mPAP)、肺動脈楔入圧、心拍出量を測定し、全肺血管抵抗 (Total pulmonary resistance: TPR)、肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance: PVR)を求めた。

すべての結果は平均値±標準偏差で表した。分散分析 (ANOVA)を行い、Fisher の有意差検定により各群間の比較を行った。p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。Pre/SPH、PPH の各群において血漿中の上記諸因子と mPAP および PVR の関係を単回帰分析にて解析し、p 値が 0.05 未満の場合に有意な相関ありとし、相関係数(r value)を記した。

C. 研究結果

表 1 に対象とした 4 群の男女差および年齢を記し、Post/SPH、Pre/SPH、PPH 各群においては mPAP、TPR、PVR を示した。Pre/SPH 群および PPH 群に属する症例は Post/SPH 群に比べ mPAP、TPR、PVR とも高値を示していた。

図 1 に 4 群の vWF-Ag(%)および vWF-Ag に対する vWF-cofactor の比 (Ratio of ristocetin cofactor to vW antigen)を示した。vWF-Ag は対照群 (108.2±35.3%)に比べ、Post/SPH (208.1±79.5)、Pre/SPH (181.5±79.7)、

PPH (166.4±71.0)の 3 群ではいずれも有意に高値であった (p<0.05)。Ratio of ristocetin cofactor to vW antigen は対照群 (1.26±0.69)に比べ、Post/SPH (0.91±0.42)、Pre/SPH (0.86±0.20)、PPH (0.80±0.29)の 3 群ではいずれも有意に低値であった (p<0.05)。

図 2 に 4 群の血漿中 TM 濃度の比較を示した。対照群と Post/SPH 群の間には TM 濃度に有意差を認めなかった (対照群: 4.0±0.6 Units/mL; Post/SPH 群: 3.5±1.2)。Pre/SPH 群の TM 濃度 (3.1±1.7) は対照群に比べ低値であった (p<0.05)。PPH 群の TM 濃度 (2.0±0.7) は他の 3 群に比べ有意に低値であった (p<0.01)。

図 3 に血漿 sPS 濃度の比較を図示した。血漿 sPS 濃度は対照群 (99.1±30.0ng/mL) と Post/SPH 群 (147.0±73.9) の間には有意差を認めなかった。Pre/SPH 群および PPH 群の sPS 濃度とも対照群、Post/SPH 群に比べ高値 (p<0.01) であった (Pre/SPH: 277.4±190.8; PPH: 255.0±166.3)。PPH 群と Pre/SPH 群の間では sPS 濃度の有意差は無かった。

Post/SPH および Pre/SPH 群においては血漿中の vWF、TM、sPS 濃度と mPAP、TPR、PVR、で表される肺血行動態の間に有意な相関関係は認められなかった。PPH 群においては血漿中の TM 濃度が低値の症例ほど mPAP、TPR、PVR が増加し重症化する傾向があった。図 4 に PPH 群の血漿 TM 濃度と PVR の関係を示した。また PPH 群においては血漿中の sPS 濃度が高値の症例において mPAP、TPR、PVR が増加し重症化する傾向があった。図 5 に PPH 群の血漿 sPS 濃度と PVR の関係を示した。なお vWF は vWF-Ag、Ratio of ristocetin cofactor to vW antigen とも肺血行動態と有意な相関は認められなかった。

D. 考察

原発性肺高血圧症 (PPH)は原因不明の肺血管抵抗の上昇から右心不全にいたる予後不良の疾患で、その病態の解明と有効な治療法の開発が待たれる難病の一つである 1)8)。また先天性心疾患や膠原病に伴う 2 次性肺高血圧症においても肺血管抵抗の著しい増大をきたし、病理学的にも PPH と同様の plexogenic arteriopathy の所見を呈することがある 8)。これらの難治性肺高血圧 (PH)の病態形成には種々の原因による肺血管内皮細胞障害に起因する肺血管攣縮、肺血管のリモデリングが重要視されるが、剖検例による検討 8)や抗凝固療法の有効性の報告 9)から肺動脈内の微小血栓形成 (thrombosis in situ)も何らかの役割を果たすと推定されている。しかし一般的に行われる凝固止血検査では

PPHなどの難治性 PH 患者の微小血栓形成を反映させるのは臨床上明かな肺動脈血栓塞栓による PH を除き困難である。

血管内皮細胞は単に血管の内腔を被うのみでなく、様々な抗血栓性因子および血栓形成性因子を発現し局所での止血および病的血栓形成阻止に重要な役割を果たしているため、内皮細胞の障害は血管の透過性亢進や病的収縮のみならず血栓形成傾向の原因となる¹⁰⁾。PPHの微小血栓形成には血管攣縮やリモデリング同様、肺血管内皮細胞障害が関与することが推定される。また PH の悪化により血管壁の抵抗が増し血液の層流を障害するいわゆる shear stress の機序も微小血栓形成にかかわる増悪因子と思われる。近年血管内皮で産生される様々な抗血栓性因子または血栓形成あるいは血小板凝集を促進または抑制する因子が明らかにされ、その血液中に可溶性分画として存在する因子の測定も可能になってきた。本研究ではこれらの中で、血漿中の von Willebrand 因子(vWF)を血管内皮細胞障害、血小板粘着および凝固第 VIII 因子異常の指標として測定した。血漿中可溶性 P-selectin (sPS) を血管内皮障害および血小板活性化による微小血栓形成を評価するために測定した。また血漿トロンボモジュリン(TM)濃度を血管内皮障害とそれに伴う血管内皮細胞の抗血栓作用を評価するために測定した。

vWF 抗原は血管内皮細胞および骨髄巨核球で産生され血小板の粘着と凝固第 VIII 因子の担体としての役割を果たす。vWF-Ag の上昇は成人呼吸促迫症候群など急性の肺血管内皮細胞障害の指標となることが報告されている¹¹⁾。前毛細管性肺高血圧においては vWF のリストセチンコファクター活性の上昇を伴わない vWF-Ag の上昇が報告されている¹²⁾。一方 PPH においては vWF-Ag に比べリストセチンコファクター活性の上昇の方が顕著であったとする報告¹³⁾もあり PH における vWF の異常については一定の評価は定まっていない。

本研究での検討では PH を伴った群では PPH あるいは 2 次性前毛細管性肺高血圧(Pre/SPH)のみならず左心疾患に伴う 2 次性後毛細管性肺高血圧(Post/SPH)でもリストセチンコファクター活性の上昇を伴わない vWF-Ag の上昇が認められた。また vWF と肺血行動態との相関はいずれの群でも認められなかった。vWF-Ag の上昇は血管内皮細胞障害を反映するがリストセチンコファクターの上昇が認められなかったことは PH における vWF の異常は血栓形成に寄与すると言うより

も、むしろ血栓形成に対する生体の抑制的な反応を反映している可能性が考えられた。また Post/SPH 群でも異常が見られたということは PH での vWF の異常は肺血管内皮細胞障害に起因する肺動脈血管抵抗の増大を反映するのではなく、肺動脈圧上昇にともなう血管壁への圧負荷や shear stress の増加など 2 次的原因による血管内皮障害を反映することが推定された。

P-selectin (sPS)は血管内皮細胞の Weibel-palade 体、および血小板の α 顆粒に存在する膜糖蛋白で、セレクチンファミリーに属する接着因子としての役割をもつ¹⁴⁾。種々の刺激による活性化により細胞表面に発現し、好中球と血管内皮細胞の接着の初期段階(rolling)、および血小板同士の粘着に関与すると考えられる。循環血液中に存在する sPS がどのようにして産生もしくは放出されるかについては完全に解明されていない。しかし血栓性血小板減少性紫斑病¹⁵⁾や急性呼吸促迫症候群¹⁶⁾などの急性炎症性疾患および虚血性心疾患で上昇することが報告され、血管内皮細胞障害および血小板の活性化をきたす病態での関与が推定されるとともにこれらの疾患の重症度を示す血漿中マーカーとして期待されている。

今回の検討では血漿中の sPS 濃度は対照群と Post/SPH 群の間には有意差を認めなかったのに対し Pre/SPH 群および PPH 群では高値であった。この結果は血漿 sPS の上昇は PPH に代表される前毛細管性肺高血圧における肺血管内皮細胞障害あるいは血小板活性化による微小血栓形成促進を反映する可能性があると考えた。PPH 群においては血漿中の sPS 濃度が mPAP、TPR、PVR と相関する傾向があったのに対し、Pre/SPH 群では sPS 濃度と肺血行動態との相関が見られなかった。この原因は不明であるが Pre/SPH では肺動脈圧の上昇には肺血管内皮障害あるいは微小血栓による肺細小動脈抵抗の増大だけでなく、心内シャントによる肺血流量の増加あるいは低酸素血症が大きく寄与するため sPS と肺血行動態に有意な相関がでなかったと考察した。

トロンボモジュリン(TM)は血管内皮細胞表面に存在するプロテオグリカンで血液中のトロンビンと結合し不活化させるとともにプロテイン C の活性化を通じて血管内皮細胞の抗血栓性因子として重要な役割を果たす¹⁷⁾。血漿中の可溶性 TM は腎機能および肝機能障害が存在しなければ血管内皮障害を反映すると考えられ、実際に播種性血管内血液凝固、急性呼吸促迫症候群、膠原病などで上昇することが報告されている。ま

た PPH あるいは種々の原因による 2 次性前毛細管性肺高血圧において可溶性 TM の低下が近年報告されている 18)19)が、血行動態との相関を含めた臨床上的意義は確立されていない。

本研究での結果では PPH において血中可溶性 TM 濃度の低下が認められた。Cacoub らの報告 18)では 2 次性前毛細管性肺高血圧でも TM が低下していたが我々の検討では Pre/SPH 群よりも PPH 群ではさらに TM 濃度が低かった。これは Cacoub らは Pre/SPH 群として右左シャントによる低酸素血症の著しい Eisenmenger 症候群を採用していたのに対し、我々の群では肺高血圧はあるがまだ左右シャント有意で低酸素血症が顕著でない患者により Pre/SPH 群が構成されていたためと思われる。いずれにしても TM 濃度の低下は PPH あるいは Pre/SPH に特徴的であり、血管内皮細胞表面における TM 発現の低下および血管内皮の抗血栓作用の低下を反映するものと考えられる。また PPH 群においては血漿中の TM 濃度が肺血管抵抗など肺高血圧の重症度と相関する傾向があったのに対し、Pre/SPH 群では相関が見られなかった。この理由は sPS の場合と同様に、Pre/SPH では肺動脈圧の上昇には肺血管内皮障害あるいは微小血栓による肺血管抵抗の増大だけでなく、心内シャントによる肺血流量の増加あるいは低酸素血症が関与するため肺血行動態に有意な相関がでなかったものと考えられた。

PPH あるいは重症の 2 次性肺高血圧における有用かつ非侵襲的な経過観察の指標は少ない 8)。今回報告した血漿中 vWF、sPS、TM の測定は肺高血圧における微小血栓形成を反映する可能性があるとともに特に PPH においては肺高血圧の非侵襲的な重症度判定、経過観察および治療効果の評価法として有用な指標に成り得ることが示唆された。

E. 結論

PPH に代表される慢性 PH 症例における微小血栓の関与を検討するために血管内皮細胞障害と血小板活性化および凝固線溶異常の指標となる血漿中 vWF、sPS、TM を測定し以下の結果を得た。

- (1) 血漿中 vWF は PPH、Post/SPH、Pre/SPH いずれの PH 症例においても vWF-Ag の上昇と ristocetin cofactor /vW antigen 比の低下を認めた。
- (2) 血漿中 sPS 濃度は PPH、Pre/SPH の 2 群において高値を示した。PPH 群においては sPS 濃度は肺血行動態の重症度と正の相関を示した。
- (3) 血漿中 TM 濃度は PPH、Pre/SPH の 2 群において低

値を示したが、PPH 群の TM 濃度は Pre/SPH 群よりもさらに低値であった。PPH 群においては TM 濃度は肺血行動態の重症度と負の相関を示した。

以上より慢性高度肺高血圧においては肺血管内皮細胞障害に関連した血小板凝集および凝固線溶異常が病態の悪化因子として考えられ、これらは臨床症例において vWF、sPS、TM の異常に反映されると考えた。特に PPH においては sPS、TM が肺高血圧の非侵襲的な重症度判定、経過観察および治療効果の評価法として有用な指標に成り得ることが示唆された。

F. 参考文献

1. Rubin LJ: Current Concepts; Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 336 (2): 111-117, 1997.
2. Weiss HJ, Hoyer LW, Rickles FR, Varma A, Roger J. Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation: relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. *J Clin Invest* 52: 2708-2716, 1973.
3. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favalaro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, Gamble JR, Vadas MA, Berndt MC: Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med* 175: 1147-1150, 1992
4. Ishii H, Majerus PW: Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 76: 2178-2184, 1985.
5. Zimmerman TS, Hoyer LW, Dickson L, Edgington TS: determination of the von Willebrand's disease antigen (factor VIII-related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis. *J Lab Clin Med* 86: 152-159, 1975.
6. Kodama S, Uchijima M, Nagai K, Mikawatani K, Hayashi T, Suzuki K: One-step sandwich immunoassay for soluble human thrombomodulin using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 192: 191-200, 1990.
7. Katayama M, Handa M, Ambo Y, Araki Y, Hirai S, Kato Y, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y: A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for human GMP-140/P-selectin. *J Immunol Methods* 153: 41-48, 1992.
8. Rubin LJ et al: ACCP Consensus Statement; Primary Pulmonary Hypertension. *CHEST* 104: 236-250, 1993.
9. Rich S, Kaufmann E, Levy PS: The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327: 76-81, 1992.
10. 丸山征郎: 血管機能とその検査. *日内会誌* 80:

839-843, 1991.

11. Rubin DB, Wiener-Kronish JP, Murray JF, Green DR, Turner J, Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Matthay MA: Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *Clin Invest* 86: 474-480, 1990.

12. Ravinovitch M, Andrew M, Thom H, Trusler GA, Williams WG, Rowe RD, et al: Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects. *Circulation* 76: 1043-1052, 1987.

13. Geggel RL, Carvalho CA, Hoyer LW, Reid LM: von Willebrand factor abnormalities in primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* 135: 294-299, 1987.

14. Stenberg PE, Moeveer RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 11: 880-886, 1985.

15. Katayama M, Handa M, Araki Y, Ambo Y, Kawai K, Watanabe K, Ikeda Y: Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Br J haematol* 84: 702-710, 1993.

16. Sakamaki F, Ishizaka A, Handa M, Urano T, Sayama K, Nakamura H, Fujishima S, Kanazawa M, Katayama M, Ikeda Y: Plasma P-selectin is elevated in acute lung injury. *Am J Resp Crit Care Med* 151:1821-1826, 1995.

17. Dittman WA, Majerus PW: Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* 75: 329-336, 1990.

18. Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R, Nataf P, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I, Boffa MC: Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension. *Am J Med* 101: 160-164, 1996.

19. Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, Kressin DC, Marler RA: Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *CHEST* 110: 710-717, 1996.

表1：対象患者群のプロフィールと肺血行動態

	n (男, 女)	年齢 (歳)	mPAP	TPR	PVR
CTL	17 (13, 4)	46±13	(-)	(-)	(-)
Post /SPH	30 (16, 14)	59±11	33±12	10± 8	5± 4
Pre /SPH	18 (4, 14)	46±13	51±20	16±10	14±10
PPH	32 (10, 22)	40±15	58±15	21± 9	18± 9

CTL: 肺高血圧を伴わない対照群 (Control)

Post /SPH: 左心系疾患にともなう後毛細管性肺高血圧

Pre /SPH: 先天性心疾患に伴う2次性前毛細管性肺高血圧

PPH: 原発性肺高血圧症

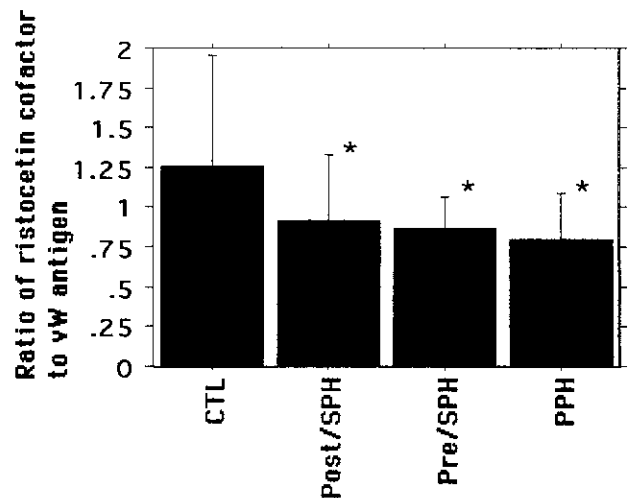
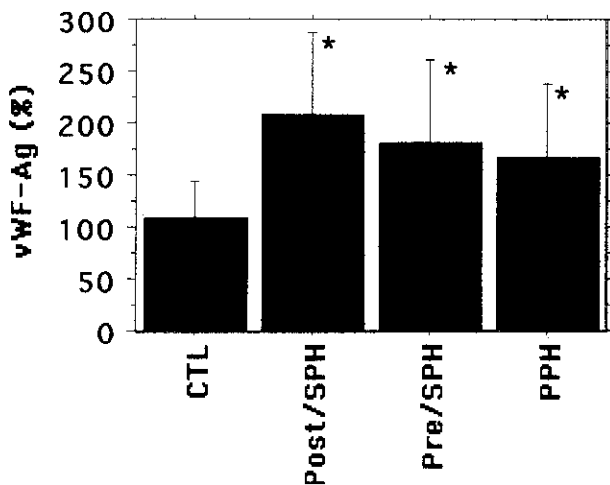
Mean±Standard deviation (SD)

mPAP: 平均肺動脈圧 (mmHg)

TPR: 総肺血管抵抗 (Wood units)

PVR: 肺動脈血管抵抗 (Wood units)

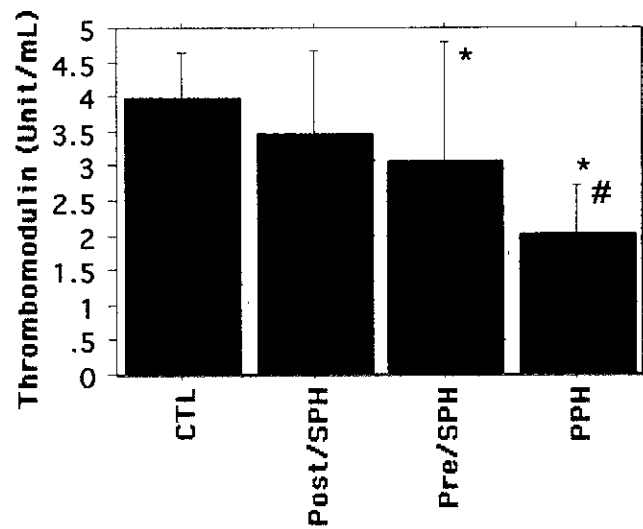
図1：von Willebrand 因子の比較



Mean±Standard deviation (SD)

* p<0.05 versus CTL

図2 : Thrombomodulin (TM)の比較

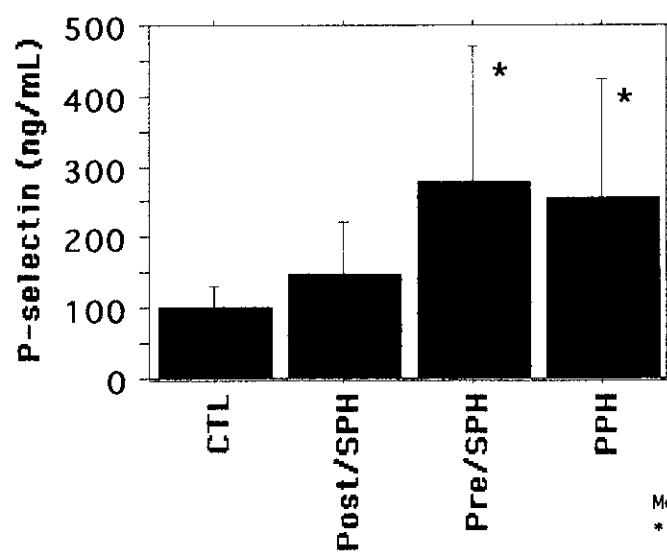


Mean±Standard deviation (SD)

* $p < 0.05$ versus CTL

$p < 0.05$ versus Pre/SPH

図3 : 可溶性P-selectin(sPS)の比較



Mean±Standard deviation (SD)

* $p < 0.05$ versus CTL and Post/SPH

図4： PPH群におけるThrombomodulin(TM)と肺血管抵抗(PVR)との相関

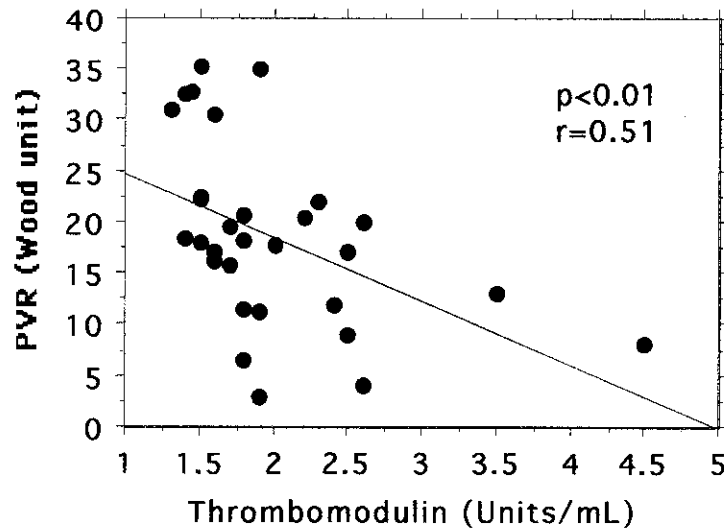
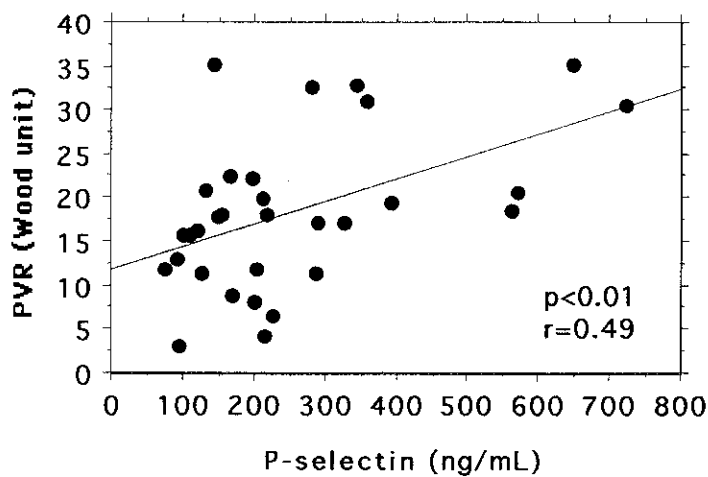


図5： PPH群における可溶性P-selectin(sPS)と肺血管抵抗(PVR)との相関



研究成果の刊行に関する一覧表

＝平成10年度 研究成果の刊行に関する一覧＝
特定疾患調査研究事業班（重点研究）

1.N.Maeno.,S.Takei.,K.Masuda.,H.Akaike.,K.Matsuo.,I.Kitajima.,**I.Maruyama.**, and K.Miyata. Increased Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Kawasaki Disease.Pediatric Research 1998;44(4):596-599.

2.Y.Motomiya.,N.Oyama.,H.Iwamono.,T.Uchimura.,and **I.Maruyama.**, N^ε-(carboxymethyl) lysine in blood from maintenance hemodialysis patients may contribute to dialysis-related amyloidosis. Kidney International 1998;54: 1357-1366.

3.H.Shin.,I.Kitajima.,T.Nakajima.,Q.Shao.,T.Tokioka.,I.Takasaki.,N.Hanyu.,T.Kubo.,**I.Maruyama.** Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts.Annals of the Rheumatic Diseases 1999;58(1):55-60.

4.O.Watanabe.,**I.Maruyama.**,K.Arimura.,I.Kitajima.,H.Arimura.,M.Hanatani.,K.Matsuo.,T.Arisato.,and M.Osame. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is causative in Crow-Fukase(POEMS) syndrome. Muscle Nerve 1998;21:1390-97

5.M.Nakata.,T.Yada.,N.Soejima.,and **I.Maruyama.** Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. Diabetes 1999; 48:426-29

6.M.Ieko.,T.Yasukouchi.,K.Sawada.,and **T.Koike.** The Influence of β 2-Glycoprotein I on Tissue Factor Activity. Seminars In Thrombosis and Hemostasis 1998;24(3):211-215.

7.T Atsumi,M.A.Khamasyata,O Amengual,S Donohoe,I Mackie,K Ichikawa, **T Koike**,& G.R.V.Hughes. Binding of anticardiotin antibodies to protein C via β 2-glycoprotein I (β 2-GPI): a possible mechanism in the inhibitory effect of antiphospholipid antibodies on the protein C system.Clin Exp Immunol 1998; 112:325-333.

8.M.Ieko.,K.Ichikawa.,D.A.Triplett.,E.Matsuura.,T.Atsumi.,K.Sawada.,and **T.Koike.** β 2-Glycoprotein I is necessary to Inhibit Protein C activity by