

で、高値群で臓器症状の出現頻度は高かった。Global Test の成績では、低値群の PT 比(全例)は 2.0 ± 5.0 と高値群に比べて有意に高値を示した($P < 0.05$)。FDP 値(全例)も、低値群($58.8 \pm 73.7 \mu\text{g/ml}$)は高値群に比べて有意に高値を示した($p < 0.05$)。血小板数(非造血管腫瘍群)では、高値群($5.4 \times 10^4/\mu\text{l}$)は他の 2 群に比べ有意に低下した($p < 0.01$)。DIC スコア(非造血管腫瘍群)でも、低値群(9.2 ± 1.7)は中等度群(8.2 ± 1.2)や高値群(7.8 ± 1.0)に比べ有意に高値を示した。止血系分子マーカーの検討では、フィブリノゲン値により SF や D-dimer は有意な変化を示さなかったが、フィブリノゲンの低下に伴い TAT ならびに PPIC は有意に増加した。フィブリノゲン高値群は他の 2 群に比べ、有意に PAI-I 値は高値を示し、tPA-PAI-I complex は低値を示した。また、フィブリノゲンの増加に伴い血中 thrombomodulin は増加した。AT や PC 活性には有意な変動を見なかったが、antiplasmin 活性はフィブリノゲン値が低下するに従って有意な減少を示した。血中サイトカイン値では、IL-1 は 3 群間に有意な差を見なかったが、IL-6 はフィブリノゲン高値群で有意に高値を示した(表 3)。

D. 考 察

一般にフィブリノゲン低下の DIC は非代償性 DIC に入れられ、予後が悪いと考えられていた。我々の検討では、造血管腫瘍の高フィブリノゲン群は逆に予後が悪く、非造血管腫瘍においても 3 群間に予後の違いは見られず、フィブリノゲンが低下すると予後が悪くなることは認められなかった。その原因として臨床症状を検討すると、出血症状の出現頻度は造血管腫瘍群でフィブリノゲン低値群でより高頻度であり、予後とは逆の関係を示した。臓器症状の出現頻度は、両群とも高フィブリノゲン群でより多かった。以上、高フィブリノゲン群では臓器症状の出現頻度が高く、臓器症状の出現が予後不良の原因と考えられた。Global Test の検討では、フィブリノゲン低値群でより PT 比は大きくなり、FDP 値も高くなり、DIC スコアも有意に高値を示し、DIC

スコア上はフィブリノゲン低値群の方がより進行した DIC と考えられた。また、フィブリノゲンの低下に伴い TAT、PPIC ならびに tPA-PAI-I complex は有意に増加し、フィブリノゲン高値群では、有意に PAI-I は高値を示した。以上の成績ならびに antiplasmin 活性がフィブリノゲン低値群で減少することなどから、フィブリノゲン低値群は過線溶状態で、フィブリノゲン高値群は低線溶状態であることが推察できる。フィブリノゲン高値群が低線溶状態である原因としては、血中 IL-6 が有意に高値であることから、高サイトカイン血症が PAI-I の産生を亢進させたことが考えられる。以上、フィブリノゲン高値の DIC 症例では、見かけ上は DIC の検査所見が著明でなくても、高サイトカイン血症による低線溶状態を来し、臓器症状を高頻度に伴い、予後不良になる可能性が示唆された。このことならびに DIC 診断における感度の低さから、DIC の診断基準からはフィブリノゲンを削除するのが適当であると考えられた。また、フィブリノゲン高値の状態から積極的に DIC の治療をすることが重要と示唆された。

E. 結 論

フィブリノゲン高値の DIC 症例は、見かけ上 DIC の検査所見が著明でなくても、高サイトカイン血症による低線溶状態を来し、臓器症状を高頻度に伴うことから、予後不良になる可能性が示唆された。DIC 診断における感度の低さからも、DIC の診断基準からはフィブリノゲンを削除するのが適当であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

和田英夫他：DIC 診断における Global Test の評価、日本血栓止血学会誌 (投稿中)

2. 学会発表

和田英夫他：フィブリノゲン高値の DIC 症例、第 63 回日本血液学会総会、ポスターセッション

G. 知的所有検の取得状況

特になし

表 1. 対象症例

フィブリノゲン値(mg/dl)	>200	200-100	100>	計
造血器腫瘍群	104	81	69	254
急性骨髄芽球性白血病	49	48	40	137
急性リンパ性白血病	11	13	6	30
非ホジキンリンパ腫	27	11	12	50
その他	17	9	11	37
非造血器腫瘍群	157	82	67	306
固形癌	59	43	25	127
感染症	77	18	16	111
その他	21	21	26	68
合計	261	163	136	560

表 2. 4 週後の予後とフィブリノゲン値

	フィブリノゲン	計	改善	悪化	不変
造血器腫瘍群	高値群	104	51 (49%)	52 (48%)	1 (3%)
	中等値群	81	59 (73%)	22 (27%)	0 (0%)
	低値群	69	50 (72%)	19 (28%)	0 (0%)
非造血器腫瘍群	高値群	157	76 (48%)	79 (50%)	2 (2%)
	中等値群	83	28 (34%)	50 (60%)	5 (6%)
	低値群	67	30 (45%)	34 (51%)	3 (4%)

改善：DIC からの離脱あるいは止血異常ならびに臨床症状の改善を示すもの

悪化：死亡例ならびに、臨床症状あるいは検査値の悪化を示すもの

不変：改善、悪化以外の症例

表 3 止血系マーカーの比較 (全例での解析)

フィブリノゲン値(mg/dl)	>200	200-100	100>
TAT (ng/ml)	30.8±24.5 ^{a**,b**}	41.5±27. ^{9c**}	56.8±32.2
PPIC (μg/ml)	2.9±3.0 ^{a**,b**}	4.8±3.4 ^{c**}	6.1±3.6
D-dimer (μg/ml)	19.0±49.4	16.9±13.2	16.7±11.6
SF (μg/ml)	339±185	336±154	339±209
Antiplasmin (%)	80.8±21.2 ^{a**,b**}	71.7±20.0 ^{c**}	56.0±22.1
Antithrombin (%)	71.2±24.9	75.2±30.3	75.9±28.6
Protein C (%)	61.8±31.8	73.7±27.0	59.0±20.3
PAI-I (ng/ml)	102±61.5 ^{a**,b**}	56.9±29.2	50.0±21.5
TPA-PAI-I complex (ng/ml)	27.0±17.4 ^{a**,b**}	42.1±19.8	47.8±24.5
Thrombomodulin (ng/ml)	35.2±13.1 ^{a**,b**}	25.8±15.7 ^{c**}	18.6±7.5
IL-1 (ng/ml)	31.9±30.1	35.1±28.8	38.3±29.6
IL-6 (ng/ml)	120±83.2 ^{a**,b**}	37.6±35.0 ^{c**}	22.9±19.8

a は高値群と中等値群、b は高値群と低値群の比較、c は中等値群と低値群の比較を示し、**は p<0.01 を、*は p<0.05 を示す。

**血管内皮細胞における血栓制御系に及ぼす
HMG-CoA reductase 阻害薬の影響に関する研究
(分担) 研究者：中川雅夫
京都府立医科大学 第2内科**

研究要旨

高脂血症は特発性血栓症の危険因子の一つと考えられている。HMG CoA reductase inhibitor (statin) が虚血性心疾患や脳血栓症などの特発性血栓症の予防に有効であると報告されるが、その機序には高脂血症の是正以外のメカニズムが推察される。そこで、血管内皮細胞において産生される凝固・線溶系調節因子の発現に及ぼす statin の影響をレニン-アンジオテンシン系との関連において検討した。培養ラット血管内皮細胞において angiotensin II により誘導される TF や PAI-1 の発現亢進は、mRNA ならびに蛋白レベルにおいて、statin の添加濃度に依存して抑制された。一方、statin 単独では TFPI, tPA mRNA の発現に影響を与えなかった。以上より、statin は血管内皮細胞を抗血栓性に誘導する作用を有していると考えられた。さらに、statin は GGPP の産生抑制を介して Rho の prenylation 並びに活性化を阻害し、angiotensin II による TF, PAI-1 の発現を抑制していると推察された。

A. 研究目的

血管内皮細胞は、種々の生理的変化に際して生理活性物質を産生するとともに、血管内における血栓形成の調節に重要な役割を果たしている。一方、高脂血症による内皮細胞機能の低下が、血管壁での血小板凝集並びに血栓形成能の亢進を誘導し、虚血性心疾患や脳血栓症などの特発性血栓症の原因となっているものと考えられる。

HMG CoA reductase inhibitors (statins) によるコレステロール低下療法は、内皮機能を改善することで、臓器障害を軽減し、虚血性心疾患や脳血栓症などに対する予防効果を有することが多くの大規模臨床研究によって証明されている。その作用機序として、cholesterol 低下作用のみでは説明がつかないことが報告されており、statin の持つ cholesterol 低下作用以外を pleiotropic effects beyond cholesterol lowering と呼び、最近注目を集めている。

今回我々は、statin の抗血栓作用に注目し、血管内皮細胞における血栓形成調節因子の産生に及ぼす、脂溶性 statin である simvastatin の影響を renin-angiotensin 系の関連において検討した。

B. 研究方法

実験には培養ラット胸部大動脈血管内皮細胞(RAECs)を用いた。200~250g の雄生 SD 系ラットより胸部大動脈を切離した後、explant 法にて血管内皮細胞を分離、培養し、4 世代の細胞を実験に用いた。1% BSA を含んだ DMEM にて 24 時間 pre condition を行った後、培養上清中に simvastatin 0~3 μ g/ml, 0~48 時間前処置後、angiotensin II (Ang II) を添加し内皮細胞を 3 時間刺激した。また、farnesyl pyrophosphate (FPP), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), Rho の特異的阻害薬である C3 exoenzyme を用いてそれぞれの関与を検討した。RAECs より RNeasy total RNA Kit (Qiagen GmbH, Hiden, Germany) を用いて total RNA を抽出し、TF, TFPI, PAI-1 および TPA の各 mRNA 発現量を northern blotting 法にて検討した。さらに、細胞表面上に発現する TF の活性値を S-2765 を用いた合成発色基質法にて測定すると共に、培養上清中の PAI-1 レベルは ELISA 法を用いて測定した。各々の実験は n=3 で行い、ANOVA 法で統計学的処理を行った。

実験は京都府立医科大学実験動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

図1に、Ang IIによるTF, PAI-1 mRNAの発現に及ぼす statin の影響を示す。Ang II 10nM, 3 時間刺激により TF, PAI-1 mRNA の発現は有意に誘導されたが、simvastatin 0~3 μ g/ml (48 時間) はこれを有意に抑制した。さらに培養細胞表面のTF活性値と培養上清中のPAI-1の蛋白レベルも、simvastatinの前処置によって有意に抑制された。一方、TFPI, tPA mRNAの発現には、simvastatin 0~3 μ g/ml (48 時間) は有意な影響を及ぼさなかった

Mevalonic acid および GGPP (それぞれ 2 μ M, 1 時間)の添加にて simvastatin による TF, PAI-1 に対する抑制効果は、有意に消失した。この結果より、statin による TF, PAI-1 抑制作用には、GGPP を介した Rho の関与が推察された。

TF, PAI-1 の発現機序における Rho の関与を検討する目的で、Rho の特異的阻害薬である C3 exoenzyme (C3) を用いた検

討を行った結果を図2に示す。Simvastatin は、Ang II により誘導される TF, PAI-1 mRNA に対して抑制効果を示し、これは GGPP (1 時間) の添加にて有意に消失した。さらに、C3 (1 μ g/ml) を simvastatin と同時に添加しておく、GGPP の simvastatin に対する拮抗効果は消失した。また、C3 単独の前処置によっても、Ang II により誘導される TF, PAI-1 mRNA の発現は抑制されることが示された。これらの結果から、Ang II による TF, PAI-1 の発現亢進並びにこの亢進に対する statin の抑制機序に、Rho が関与していることが推察された。

D. 考 察

Statin は、HMG CoA からの mevalonic acid の合成を阻害するため、その代謝の下流に存在するすべての代謝産物 (mevalonate metabolites) の産生を抑制する。その結果 Ras および Rho の活性化を抑制

図 1

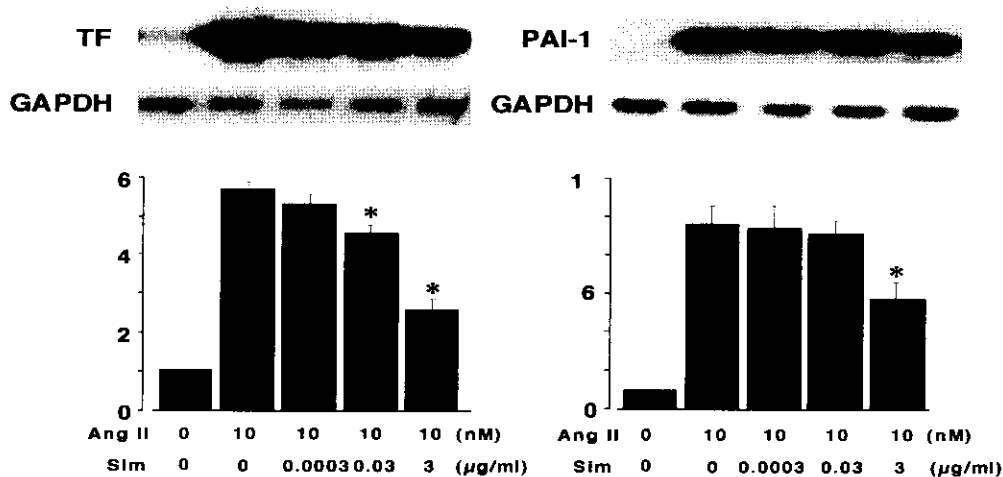
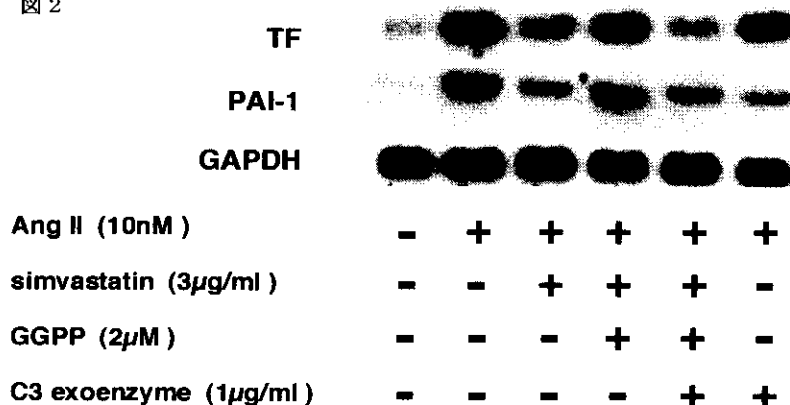


図 2



し、Ras/Rho が関与するシグナル伝達に影響を与えることが推測される。

今回の検討において、statin は Ang II により誘導される TF や PAI-1 の発現亢進を Rho 活性化阻害を介して抑制することが明らかとなった。このことから、statin は血管内皮細胞の血栓調節機序において抗血栓性の作用を有しているものと推察された。急性冠動脈症候群などをはじめとする特発性血栓症の発症・進展には TF, PAI-1 の発現亢進の関与があるものと考えられるが、statin のこの作用はその発症予防に今後有用になるものと推察される。

特発性血栓症は複数の疾患群を包括的に捉えた疾患概念である。今後、特発性血栓症のうち、いずれの疾患に対して statin がその発症予防に有効であるか、検討を重ねる必要があると考えられる。

E. 結 論

血管内皮細胞において、statin は Ang II による TF, PAI-1 の発現亢進を抑制し、血栓形成の調節に関与している可能性が示唆された。またその機序に Rho の prenylation の抑制が関与しているものと推察された。この作用は、statin による血栓症予防の機序の一つと推察された。

F. 研究発表

論文発表

学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特権
なし
3. その他
なし

急性深部静脈血栓症の実践的診断法 (分担) 研究者 川崎 富夫 大阪大学医学部 病態制御外科学

研究要旨

下肢腫脹を来す代表的な疾患として、未治療の急性深部静脈血栓症 (DVT) 14例とリンパ浮腫3例の患者を対象に、初診時のD-Dimer、および下肢単純CT画像上で患側の断面積を健側の断面積で割った値 (大腿筋束断面積比: FMR) を比較した。その結果、D-Dimerは 9.2 ± 13.3 ug/mlと 2.8 ± 2.6 ug/ml ($P=0.4$) で有意差は無いが、FMRは 1.3 ± 0.2 と 1.1 ± 0.1 ($p=0.04$) で有意差を認めた。D-DimerとFMRでDVTの診断能力を比較したところ、DVT患者では、D-Dimerが異常値 (>1.0 ug/ml) を示した症例は79% (11/14)にとどまったのに対して、FMRが1.1以上の症例は93% (13/14)を占めた。この結果から、D-DimerよりもFMRの方がDVTの診断能力は高いと結論した。また、画像をコンピューター処理して得られたFMR値を、患側および健側の大腿部筋束の断面積の差を視覚にて認識可能かどうかという点から検討した結果、FMR値1.1から判定可能でありこの時の周径差は約2cmであった。これらの結果から、左右の大腿周径差を測定して2cm以上あれば1スライスの単純CTを撮影する。その大腿筋束断面積に視覚的に左右差があればFMRは1.1以上であることを意味しており、DVTと診断できる。DVTの治療を開始した後に基幹病院に紹介することが肝要と考えられる。

A. 研究目的

未治療の下肢中枢型の急性深部静脈血栓症 (DVT) は、肺塞栓を引き起こして、重篤になりやすい。急性DVTを早期に診断し治療することは、引き続いて起こる肺塞栓症を予防し生命予後を改善するのみでなく、医療経済面においても合理的である。DVT患者は基幹病院に紹介された時点ですでに重症化しているのが実状であることから、一般医療施設 (中小規模病院) の段階で施行できる信頼性の高いDVT迅速診断法が求められていた。現在、DVTに対する一般医療施設の啓蒙状況を考慮すると、DVT診断目的で新しい機器の購入と診断トレーニングのために投資する余力がある一般医療施設は少ないと考えられる。私たちは、我が国の現状と保健医療の特殊性を考慮して、一般医療施設が現状で受け入れやすく、精度が高く、安全で、簡便かつ迅速に施行できる方法として、CTscanの単純撮影を使用した実践的な方法を考案した。一般医療施設がDVTの実践的診断法を持つこと自体が、DVTの診断に対す

る自信につながり、一般医療施設に対するDVTについての最も効果的な啓蒙手段であると考えられる。さらに、日常診療における患者との対話において説明が行き届き、その結果、一般住民のDVTに対する興味が高まると予想される。実はこの一般住民に対する啓蒙が、DVT患者が軽い症状のうちに受診することにつながり、結果として真の意味でのDVTの早期診断と早期治療につながると考えている。以上の目的から、単純CTを使用した急性DVTの実践的な診断法の確立を進めた。

B. 研究方法

平成10年4月から平成12年12月までに、片側性の急性下肢腫脹 (下腿に局限した腫脹を除く) を呈した患者47名のうち、発症後14日以内で未治療であった17名を対象とした。平均年齢は 65 ± 15 歳、男性4名、女性13名であった。急性DVTは14例、リンパ浮腫は3例であった。発症から受診までの期間は 5.2 ± 3.4 日であった。DVTの確定診断は、

duplex scan、静脈造影、R I 静脈造影にて行った。未治療の患者を対象に、初診時にD-Dimerを測定した。造影剤を使用しない単純CTにて、大腿中央部（最大周径部）を1枚（1スライス）撮影した。CT画像の処理は、画像をCTスキャン自体のコンピューターを使用するか、あるいはCT画像をパーソナルコンピューターに取り込んで大腿部筋束の断面積を計算し、患側の断面積を健側の断面積で割った値（大腿筋束断面積比：FMR）を求めた。また、患側および健側の大腿部筋束の断面積の差を、視覚によりCT画像から判別可能かどうかについて検討し、コンピューターによる解析結果と比較した。

C. 研究結果

急性DVT患者とリンパ浮腫患者で、初診時のD-DimerおよびFMR値を比較すると、D-Dimerは 9.2 ± 13.3 ug/mlと 2.8 ± 2.6 ug/ml（ $P=0.4$ ）で有意差は無いが、FMRは 1.3 ± 0.2 と 1.1 ± 0.1 （ $p=0.04$ ）で有意差を認めた（表1）。D-DimerとFMRでDVTの診断能力を比較したところ、DVT患者では、D-Dimerが異常値（ >1.0 ug/ml）を示した症例は79%（11/14）にとどまったのに対して、FMRが1.1以上の症例は93%（13/14）を占めた。DVT患者では、FMRが1.1以下かつD-Dimerが1.0 ug/ml以下の症例は無く（0/14）、FMRが1.1以上またはD-Dimerが1.0 ug/ml以上の症例は100%（14/14）であった（表2、図1）。

CT画像をコンピューター処理にて求めたFMR値と、患側および健側の大腿部筋束の断面積の差を視覚にて認識可能かどうかという点から検討した結果、FMR値1.1から判定可能でありこの時の周径差は約2cmであった（図2）。

D. 考察

DVTの診断に関して、以下の要望を一般医療施設からいただくことが多い。

（1）専門病院や基幹病院に紹介したいが、

歩行させれば肺塞栓の発症が心配であり、かといって救急車で搬送するにはその前に診断をつける必要がある。（2）病歴、視診、触診からDVTを診断した経験がない。（3）止血マーカーだけでDVTと診断できない。（4）血管専門病院のように、特殊な検査機器がない。また、検査機器として超音波診断装置はあっても検査に適したDVT専用のプローブは高価で購入していない。あるいは、超音波診断装置もプローブもあるがDVTの診断法は特殊でその方法が分からない。以上のようなことから、急性DVTの簡単な診断法を教えて欲しいという依頼が多いが、現在のところ、この期待に応えられる良い方法が無い。一般医療施設では、D-Dimerなどの止血マーカーの測定は、検査会社に委託されている。そのため、検査結果が得られるまで日数がかかり（2-3日）、治療開始が遅れる原因となっている。また、D-Dimerが高値であるからといって、DVTであるわけではない。

急性DVTによる下肢腫脹の本態は、静脈うっ滞による筋肉腫脹であり、急性DVTに合併する肺塞栓は、筋肉収縮時の急激な静脈圧上昇が引き金となる。単純CTを用いた我々の方法は、筋肉の腫脹に注目して、他覚的にかつDVTの専門でない医師にもDVTの診断が容易に行える。さらに、造影剤を使用しないので造影剤の副作用の心配が無い。1スライスのみでCTで診断できることにより被爆量を1枚の胸部単純撮影と同程度に抑えることができた。DVTが放置された場合には、10-20%の頻度で異時性に両側となる場合があるが、早期から同時に両側性に起こる場合は少ない。FMRは静脈環流の障害による筋束拡大を左右で比較した値であるので、急性DVTの診断には特に有用である。

今回のCTを用いた迅速診断法は、一般医療施設で緊急に施行可能な方法であるとともに信頼性も高く、DVTの早期治療開始に結びつくことから、真の意味で実践的であると信じる。

E. 結 論

片側性の急性下肢腫脹を呈する患者では1スライスの下肢単純CTからFMRを求め、FMRが1.1以上であればリンパ浮腫よりも中枢型DVTを強く疑う。FMRが1.1未満でD-Dimerが正常であれば、中枢型DVTの可能性は低い。具体的には、左右の大腿周径差を測定して2cm以上あれば1スライス of 単純CTを撮影する。その大腿筋束断面積に視覚的に左右差があればFMRは1.1以上であることを意味しており、リンパ浮腫であることは否定的であり、DVTと診断できる。DVTの治療を開始した後に基幹病院に紹介することが肝要と考えられる。

F. 研究発表

論文発表

静脈学11(4), 283-288, 2000.

CT scanを利用した簡易法による未治療深部静脈血栓症(DVT)の診断

渋谷 卓、有吉秀男、川崎富夫

学会発表

なし

知的所有権の取得

なし

先天性凝固制御因子欠乏症と血栓症

分担研究者 宮田 敏行

国立循環器病センター研究所

研究要旨

特発性血栓症をおこす静脈血栓症は、凝固制御因子の先天性欠乏症がその一因であることは多くの研究から明らかである。欧米では凝固制御因子であるプロテインC (PC) やアンチトロンビン (AT) の欠乏症の一般人口における頻度が求められており、静脈血栓症発症の基礎資料となっている。しかし、日本ではそのような頻度は求められていない。本研究は大規模な日本人一般人口を用いて、PC、AT、プラスミノゲン (PLG) の各欠乏症の頻度を求めることを目的とした。約 4500 人の活性を測定することにより、各欠乏症 (それぞれ 9 名, 8 名, 189 名) を同定した。したがって、一般人口における各欠乏症の頻度は、0.20%, 0.18%, 4.18%であった。PLGは活性と抗原の比をとることにより、欠乏症 16 名 (0.35%) と異常症 173 名 (3.83%) に分類した。以上の結果から、PC欠乏症とAT欠乏症は日本人の約 500 人に 1 人みられ、PLG欠乏症は約 25 人に 1 人であると結論された。

A. 研究目的

血栓形成を抑制するプロテインC (PC) やアンチトロンビン (AT) の先天性欠乏症は、静脈血栓症の遺伝的素因である。また、プラスミノゲン (PLG) 欠乏症は線溶能の低下を招き血栓症の素因となると考えられる。これらの因子の欠乏症の頻度は日本人集団では求められておらず、日本人でどれほどの人数が遺伝的素因を有しているかが不明である。本研究は、大規模な日本人の一般人口を対象として、これらの欠乏症の頻度を求めることを目的として行った。

B. 研究方法

PCアミド活性の測定は、蛇毒由来PC活性化酵素 (プロタック) とペプチド性合成基質を用いた。AT活性は、検体血漿にヘパリンを添加後、トロンビン阻害を測定した。PLG活性は、検体にストレプトキナーゼを添加後、ペプチド性合成基質を用いた。検体血漿はヘパリン加血漿を用いた。対象集団は、1998年8月より2000年7月まで、国立循環器病センター集団検診部で行った検診者である。集団は男性 2083 名、女性 2422 名、計 4505 名であり、年齢域は 30-80 歳台で、60 歳台が最も多い構成であった。また、PC欠乏症およびA

T欠乏症を判定するため、遺伝子レベルで欠乏症と判定されている血漿も用いた。

(倫理面への配慮) 本研究は血漿成分の測定を行うものである。測定値は対象者に通知している。

C. 研究結果

PC欠乏症: PC活性の測定値を用いて欠乏症を判定するため、遺伝子レベルで欠乏症と判定されている血漿と遺伝子レベルで正常と判定されている血漿 (欠乏症患者の家系構成員で正常アレルのホモ体) を用いて、①PC活性値、②AT/PC比を比較検討した。その結果、AT/PC比を用いる方が欠乏症と正常群の重なりが少ないことが判明した。比をとることによりPCやATの産生臓器である肝の機能を補正できるものと考えた。AT/PC比の 1.57 以上を欠乏症と判定することとした。

4505名のAT/PC比をとったところ、9名が1.57以上を示し、PC欠乏症と判定された。このうち8名は活性と抗原量とともに低下を示す欠乏症であり、1名は両者が乖離を示す異常症であった。この9名は44-78才で、いずれも血栓症の履歴はみられなかった。54才と69才 (ともに欠乏症) の2名はPC欠乏症に加えてPLG欠乏症でもあったが、血栓症を発症してい

なかった。このことは、PC欠乏症の静脈血栓症発症への寄与は高くないものと考えられた。

AT欠乏症：ヘパリン依存性のAT活性の測定値を用いて欠乏症を判定するため、遺伝子レベルで欠乏症と判定されている血漿と正常と判定されている血漿（欠乏症患者の家系構成員で正常アレルのホモ体）を用いて、①AT活性値、②PC/AT比を比較検討した。その結果、PC/AT比を用いる方が欠乏症と正常群の重なりが少ないことが判明した。PC/AT比の1.67以上を欠乏症と判定することとした。

4505名のAT活性およびPC/AT比を調べ、AT活性が75%以下に低下しており、かつPC/AT比が1.67以上を示した8名が、AT欠乏症と判定された。このうち3名は活性と抗原量がともに低下を示す欠乏症であり、5名は両者が乖離を示す異常症であった。この8名は55-81才で、いずれも血栓症の履歴はみられなかった。70才と75才（ともに異常症）の2名は、AT欠乏症に加えてPLG欠乏症でもあったが、血栓症を発症していなかった。このことは、AT欠乏症の静脈血栓症発症への寄与は高くないものと考えられた。

PLG欠乏症：PLC活性を求めたところ、50%近くに小さな山をもつ分布を得た。このことから、PLG欠乏症はかなりの数にのぼると推定された。PLG/PC比もしくはPLG/AT比をとったところ、0.65を境に欠乏症と考えられる部分は正常群とかなりはっきり区別できることが判明した。PLG欠乏症は、次の①もしくは②を満たすものとした。①PLG活性が70%以下のものは、PLG/PC比もしくはPLG/AT比のいずれか一方が0.65以下を示す。②PLG活性が70-80%の場合、PLG/PC比とPLG/AT比がともに0.65以下を示す。これにしたがうと、4517名中189名がPLG欠乏症と判定された。このうち16名は活性と抗原量がともに低下を示す欠乏症であり、173名は両者が乖離を示す異常症であった。これらはいずれもヘテロ接合体と考えられ、PLG欠乏症ホモ体は見い出せなかった。

D. 考 察

日本人の一般人口と考えられる集団を対象に、PC活性、AT活性、PLG活性を測定し、それぞれ9名、8名、189名の欠乏症を同定した。その結果、それぞれの欠乏症の頻度は、0.20%、0.18%、4.18%と算出された。PLG欠乏症189名のうち173名(91.5%)は異常症であった。日本人総人口を1億2,000万人とすると、それぞれの欠乏症は24万人、22万人、502万人と推定された。

我々はこれまで、国立循環器病センター患者約26,800人のPC活性を測定し、約500人に1人が欠乏症であると報告したが、今回一般人口を対象として得られた頻度は、当センター患者でこれまでに得られた値と極めてよく似ていた。また英国スコットランドでは、住民9,648人を対象にPC欠乏症の頻度が求められ、その頻度は0.15%であると報告されている。我々の日本人での頻度は、この英国での頻度に極めて近い値であった。一方、AT欠乏症の頻度は本邦での報告はなく、今回の値はこの点で極めて重要なものである。英国スコットランドでは9,669人中16人が欠乏症を示したので、その頻度は0.17%と算出されている。PLC欠乏症は1978年に青木らにより世界に先がけて本邦で発見された経緯から、その頻度に関しては国内でこれまで4つの報告がある。いずれも小・中規模(600人以下)の研究であり、頻度は2.2-4.4%と報告している。PLG欠乏症では、異常症がそのほとんどを占め(本研究では91.5%)、PLG異常症はAla601Thr変異をもつことが示されている。これまでの4つの研究は、このPLG異常症の頻度を報告しているものであり、欠乏症に関する頻度はない。今回我々は日本人の一般人口におけるPLG欠乏症の頻度は4.18%であり、内訳は異常症が3.83%、欠乏症が0.35%であることを示した。異常症のほとんどは前述のAla601Thr変異と考えられる。この変異は日本の先祖にこの変異が生じて広まったFounder effectと考えられる。一方、PC欠乏症とAT欠乏症の頻度は、それぞれ0.20%、0.18%であった。

れぞれ 0.20%, 0.18%であった。この値をPLG欠乏症の頻度(0.35%)と比べると少し低い。これらの欠乏症の原因は遺伝子のいろいろな部位に変異(ランダム変異)が入ったためと考えられる。PLG遺伝子は、PCやATの遺伝子より大きいので、ランダム変異が生じる頻度が少し高いのではないかと考えた。

E. 結論

日本人一般人口約 4500 人のPC活性、AT活性、PLG活性を測定することにより、それぞれ欠乏症 9 名、8 名、189 名を同定した。これより、各欠乏症の頻度は 0.20%、0.18%、4.18%と算出された。本研究から、日本人の静脈血栓症の遺伝的素因の頻度が明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

1. T. Sakata, K. Kario, Y. Katayama, T. Matsuyama, H. Kato, and T. Miyata (2000): "Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis and relevance to the onset of arterial occlusive diseases." *Semin. Thromb. Hemost.*, 26, 11-16.
2. 宮田敏行、加藤久雄、阪田敏幸、片山善章、馬場俊六、万波俊文、緒方 絢「先天性血栓性素因、特にプロテインC欠乏症を中心に」臨床病理、第 48 巻、第 4 号、285-292 頁 (2000)

学会発表

1. Okamoto, T. Sakata, Y. Katayama, T. Mannami, T. Baba, J. Ogata, H. Matsuo, T. Miyata, and H. Kato. Congenital plasminogen deficiency in Japanese. Prevalence and relevance to cardiovascular diseases. XVth Symposium. International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu 2000. June 25-29, 2000.
2. 阪田敏幸、松尾 汎、岡本 章、片山善章、万波俊文、馬場俊六、緒方 絢、加藤久雄、宮田敏行：プロテインCおよびアンチトロンビン欠乏症の頻度ならびに静脈血栓症への関与、第 23 回日本血栓止血学会学術集会、2000 年 11

月 21-22 日、名古屋。

3. 岡本 章、阪田敏幸、松尾 汎、片山善章、万波俊文、馬場俊六、緒方 絢、加藤久雄、宮田敏行：プラスミノゲン欠乏症と心血管系疾患、第 23 回日本血栓止血学会学術集会、2000 年 11 月 21-22 日、名古屋。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特権
なし
3. その他
なし

軽症型凝固第 X 因子欠損症の病態解析 (分担) 研究者 岡村 孝 九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学

研究要旨

軽症型血液凝固 X 因子欠損症の病態解析をおこなった。本例は、43 歳男性で右膝関節内出血を主訴に来院され、APTT と PT が延長し、X 因子活性が 18% および抗原量 49% であり凝固 X 因子欠損症と診断した。患者 X 因子遺伝子の各エクソンを PCR で増幅し、ダイレクトシーケンスおよび pCRII ベクターにクローニング後塩基配列決定を施行した。すべてのクローンにおいてエクソン 8 の 306Arg(CGT)が Cys(TGT)に置換するミスセンス変異が同定された。患者および正常者白血球 DNA のサザンブロットを行ったところ患者は正常コントロールと同じ長さのバンドがみられることからこのエクソン 8 には大きな欠失や挿入はないと思われた。以上より本変異は、ホモ接合体であることが推察された。本変異は Factor X Nagoya 1 として報告されているが、血漿中の活性値や抗原量にこの 2 例間に相違がみられることから発現系を用いた検討が本変異の病態を解析するため必要である。

A. 研究目的

軽症型血液凝固 X 因子欠損症における分子病態を検討し、その成因を明かにする。

B. 研究方法

患者血液は同意のもとに 3.8% クエン酸ナトリウムを 1/10 量含むように採血し、血漿および白血球 DNA を採取した。凝固 X 因子遺伝子の各エクソンおよびイントロンとの境界部を含むようにプライマーを設定し、PCR 法で DNA 断片を増幅した。ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、一部は PCR 産物を pCRII ベクターに組み込んだ後に、クローニングし、塩基配列を決めた。サザンブロッティングは、各種制限酵素で切断したのち白血球 DNA を 0.8% アガロースゲル電気泳動後メンブランにブロットし、³²P でラベルしたエクソン 8 の PCR 産物をプローブとしてハイブリダイズした。

C. 研究結果および症例提示

症例は 43 才、男性。出血傾向の原因検索のため来院した。

現病歴としては約 11 年前に抜歯後出血が止まらず、近医受診したが特に異常を指摘されなかった。平成 11 年 12 月右膝上部を打撲、その後右膝腫脹、運動時痛が出現した。近医外科にて右膝関節穿刺し、血性

の間接液 40ml 吸引された。その後も連日間接穿刺を必要とすることから、出血性素因の有無の精査目的で平成 12 年 1 月浜の町病院紹介受診した。

既往歴としては、20 才頃虫垂切除後の腹膜炎の既往があるが、詳細は不明。生活歴に特記事項無く、家族歴なし、検索範囲内に血族結婚はない。

検査結果は別表 1 に示すとおり。血小板数、fibrinogen, FDP, AT-III は正常で DIC は否定的で、PT, APTT 両方の延長を認めるため、II, V, X 因子についてその活性を計測したところ、第 X 因子活性が 18%、抗原量が 49% と低値であったため凝固 X 因

表 1

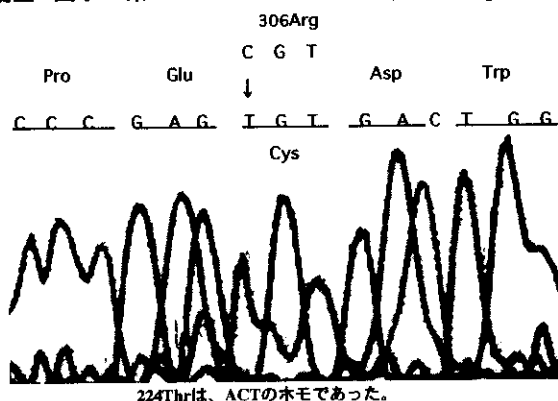
WBC	6,000/ml
Hb	12.4 g/dl
Plt	351X10 ³ /ml
APTT	45.1 sec (31.2)
PT	18.2 sec (11.0)
Fbg	276.7 mg/dl
FDP	4 mg/ml
ATIII	104.1 %
Factor II activity	112 %
Factor V activity	115 %
Factor X activity	18 %
Factor X antigen	49%

子欠損症と考え遺伝子解析を行うこととした。

第 X 因子は 13 番染色体の長腕の 34 から telomea にかけて約 2kbp にわたり存在し、8 つの exon と 7 つの intron にわかれる。各 exon ごとに primer を設定し、PCR により増幅し、それぞれを direct sequence した。第 8 exon 上 306 番の Arg を code する CGT の配列が TGT の Cys に置き換わる missense mutation が存在した (図 1)。Cloning vector に ligate し 3 clone について sequence 行ったがいずれも同じ mutation であった。Direct sequence の pattern からは homo 結合体であると考えられた。患者及び正常人 DNA を抽出し、Hind III, Bgl II, Hind III+Bgl II, EcoR I, BamH I により切断したものをアガロースゲルに泳動し、membrane に transfer し、exon 8 の PCR product を hybridize し southern blotting を行ったが、患者 DNA において正常人と異なる泳動度を示す band の出現や濃淡の異なる band の出現はなく、患者凝固 X 因子の exon 8 において、大きな欠失や挿入はないものと考えられた。以上より、306Arg->Cys のホモ接合体と考えられた。

図 1

凝固 X 因子 第 8 エクソン塩基配列 (direct sequence)

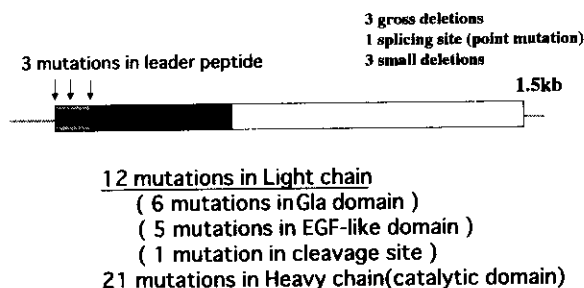


D. 考察

凝固因子は血漿中の蛋白発現量が少なく、半減期も短いことから遺伝子異常データの蓄積によりその蛋白の構造、機能についての知見が深まってきている。凝固第 X 因子に関しては、36 個の missense mutation を含む、44 の mutation の報告がなされ、病態機能の解析がなされている。nonsense mutation の報告は見られない (図 2)。

図 2

凝固第 X 因子欠損症 36 missense mutations



今回我々は、306Arg->Cys のミスセンス変異の一例を経験した。正確には家系調査を必要とするが、サザンプロットングではホモ接合体が示唆された。この変異は、factor X Nagoya 1 としてすでに報告されて (Miyata T, et al, *Thromb Haematol* 79: 486-490, 1998) いるが、本症例とは表現系が異なり、活性、抗原量とも 5% 未満の重症型第 X 因子欠損症として報告されている。しかしながらこの報告例の 306Arg->Cys はヘテロであり、片方のアレルの未知の遺伝子異常の存在が推定されている。306Arg->Cys 遺伝子異常のホモ接合体では、表現系として軽症型欠損を示す可能性があることが今回の症例で示された。Mutation の部位は catalytic domain の α -helix の基部に当たり、三次構造の変化により、細胞内分解代謝の変化、細胞外分泌の阻害、細胞外での活性の低下などが起こることが考えられ、血漿中抗原量の低下をきたし、また、活性基の機能にも影響がおよび活性の低下をきたしたものと考えられる。そこで、肝細胞より RT-PCR により凝固 X の cDNA を作成し、site directed mutagenesis により mutant cDNA を作成し、哺乳類の細胞に強制発現させその細胞内、細胞外における蛋白発現量、活性を western blotting, ELISA などにより解析を行い、この変異による分子病態を明らかにする必要がある。

E. 結論

凝固 X 因子 306Arg->cys は、軽症型欠損症をきたす変異である。この変異は日本において 2 例目である。Catalytic domain 部に

における α -helix 構造の変化が細胞内分解や分泌機構に影響を与えることが本症の発症に関与していると推定される。

F. 研究発表

1. Takeshita M, Yamamoto M, Kikuchi M, Kimura N, Nakayama J, Uike N, Daimaru H, Sawada H, Okamura T. Angiodestruction and tissue necrosis of skin-involving CD56+NK/T-cell lymphoma are influenced by expression of cell adhesion molecules and cytotoxic granule and apoptosis-related proteins. *Am J Clin Pathol* 1123: 201-211, 2000
2. Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, Yamashita M, Numata A, Takase K, Kobayashi S, Shibata S, Asano Y, Gondo H, Sekiguchi K, Nakayama K, Nakayama T, Okamura T, Okamura S, Niho Y, Nakayama K. Tyk2 plays a restricted role in IFN α signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* 13: 561-571, 2000
3. Shimoda K, Sugio Y, Miyahara M, Watanabe K, Tokunaga Y, Asano Y, Gondo H, Okamura T, Niho Y. *MLL* gene rearrangement in t(9;11) acute myelogenous leukemia with minimal myeloid differentiation (FAB subtype M0) *Int J Hematology* 71: 245-248, 2000
4. 三宅勝久 上村智彦 権藤久司 岡村孝 仁保喜之. Tacrolimus の投与が可能であった同種骨髄移植後の cyclosporine 脳症. *臨床血液* 41 : 585-589, 2000
5. Mizuno S, Okamura T, Iwasaki H, Ohno Y, Akashi K, Inaba S, Niho Y. Hypercoagulable state following transfusions of granulocytes obtained from granulocyte colony-stimulating factor-stimulated donors. *Int J Hematology* 72: 115-117, 2000
6. Gondo H, Okamura C, Osaki K, Shimoda K, Asano Y, Okamura T. Acquired Pelger-Huet anomaly in association with concomitant tacrolimus and fluconazole therapy following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 26: 1255-1257, 2000
7. 岡村孝 徳永康信 仁保喜之. 原発性骨髓繊維症の病態と予後. *Annual Review 血液* 2000 p103-111、中外医学社 2000
8. Tokunaga Y, Miyamoto T, Gondo H, Okamura T, Niho Y. Effect of thrombopoietin on acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia and Lymphoma* 37: 27-37, 2000
9. 岡村孝. 「血液疾患診療マニュアル」原発性骨髓線維症生涯教育シリーズ 54 「日本医師会雑誌」特別号 p s206-s207, 2000
10. 岡村孝. 骨髓線維症に伴う貧血 (特集: 貧血—臨床の必須から先端医療まで) *カレントセラピー* 18 : 79-83, 2000
11. 岡村孝 浅野嘉延 仁保喜之. 診断: 末梢血の検査チャート [特集: 血液の悪性疾患] *総合臨床* 49: 2567-2571, 2000
12. Kunishima S, Kojima T, Matsushita T, Tanaka T, Tsurusawa M, Furukawa Y, Nakamura Y, Okamura T, Amemiya N, Nakayama T, Kamiya T, Saito H. Mutations in the *NMMHC-A* gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly / Sebastian syndrome). *Blood* 97: 1147-1149, 2001
13. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases *DNMT1*, *3A*, and *3B* in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 97: 1172-1179, 2001
14. Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, Mizoguchi H. Primary chronic myelofibrosis: Clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients. *Int J Hematol* (in press) 2001
15. 岡村孝. 骨髓増殖性疾患 (CML を除く) 推薦処方とその解説. 今月の治療 (総合医学社) 9 (3): 86-88, 2001

プラスミン非依存性血栓溶解 (分担) 研究者：坂田洋一 自治医科大学分子病態研究部

研究要旨

プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系は血栓溶解の主軸を担っている。プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系が抑制される感染症などの病態では、血栓溶解を補てんする機構が存在する可能性が我々の昨年度の研究結果などから想定される。本研究では、プラスミン非依存性血栓溶解機構を検討するため、1) 白血球エラスターゼとプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系のクロストークの基礎的解析と、2) プラスミンを介さない一次線溶能亢進により後天性に重篤な出血傾向を来した臨床例の病態解析を展開した。

まず、単球系培養細胞株および血管内皮細胞を用いて、白血球エラスターゼがプラスミノゲンの細胞表面への結合に与える影響をリガンドブロッティング法により解析した。白血球エラスターゼは、時間依存性にプラスミノゲンに対する結合能を有する複数の蛋白を細胞表面上に発現させることが明らかとなった。このことにより、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系が阻害されたときに、白血球エラスターゼが細胞表面上で効率よくプラスミンを介する線溶反応が起こるように補助している可能性が示唆された。次に臨床例の解析から、患者の循環血液中にはプラスミン分解によって生じるフィブリノゲン・フィブリン分解物とは異なる複数の分画が存在していること、ならびにフィブリノゲンを特異的に分解する因子がプラスミンとは異なる分子量 35 - 40 kDa を有することが明らかとなり、この因子を同定中である。

A. 研究目的

止血栓の主たる構成要素であるフィブリンを溶解する反応系が線溶系であり、生理的にはプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系がその主機構を担っている。敗血症に伴う播種性血管内凝固症候群では、プラスミノゲンアクチベータインヒビタ-1の産生亢進を伴い、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系が抑制され、虚血性の多臓器不全が引き起こされる。しかしながらこのような病態においても患者血中に多量のフィブリン分解物が証明されることがあるが、我々はこれまでにその大部分が白血球エラスターゼによるフィブリノゲン分解物である可能性を示してきた。

また、I型先天性プラスミノゲン欠乏症(欠損症)患者でみられる白血球エラスターゼの血中レベルの上昇がプラスミノゲン投与により是正されることや、血栓症の罹患頻度がII型欠乏症(異常症)に比して著しく少ないことなどから、白血球エラスターゼとプラスミノゲンの間にはクロストークの存在する可能性が示唆される。さらに、

我々は、エラスターゼ産生単球系培養細胞を用いた研究からプラスミノゲン派生物がエラスターゼ mRNA の発現量を制御している可能性を見いだした。

本研究は、プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系とのクロストークを詳細に明らかにすることを主たる目的とする。本年度は、具体的に次の2つのことを研究目的とした。1) 組織線溶におけるプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との連関を明らかにするために、細胞膜上へのプラスミノゲンの結合活性に対する白血球エラスターゼの果たす役割を解析する。2) プラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系を介さない顕著な一次線溶亢進の結果、重篤な出血症状をきたした臨床例の解析をとおして、プラスミン非依存性の血栓溶解機構の亢進が実際の生体に致死的な病態をもたらすこと、その機序ならびに原因因子を明らかにすること。

B. 研究方法

1) 白血球エラスターゼがプラスミンを介する組織線溶に与える影響を単球系細胞株 U-937 細胞、THP-1 細胞およびヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて解析した。これらの細胞を精製ヒト白血球由来エラスターゼで刺激した後に細胞膜分画を抽出し、膜分画へのプラスミノゲンの結合能を ^{125}I iodine 標識プラスミノゲンを用いたリガンドブロッティング法により解析した。

2) 対象症例は出血傾向の既往歴および家族歴のない 49 歳男性で、1ヶ月前より両側足背部と下腿に紫斑と腫脹が出現、その後無痛性の血尿や歯肉出血とともに右股関節部の疼痛を訴え来院した。凝血学的検査成績：血小板数 $21.2 \times 10^4 /\text{mm}^3$ 、プロトロンビン時間 >150 秒、活性化部分トロンボプラスチン時間 81.3 秒、フィブリノゲン 40 mg/dl 未満、アンチトロンビン III 活性 91.5%、プラスミノゲン活性 71.9%、 $\alpha 2$ -プラスミンインヒビタ活性 44.7%、プロテイン C 活性 53.7%、フィブリノゲン・フィブリン分解物 (FDP) 246.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、D-ダイマー 45.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (TAT) 33.9 ng/ml、プラスミン・ $\alpha 2$ -プラスミンインヒビタ複合体 (PIC) 9.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。腹部 CT 検査にて、腸腰筋内に直径約 10 cm 大の血腫が認められた。

臨床経過を通して得られた患者血清を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) にて分画し、抗ヒトフィブリノゲンポリクローナル抗体あるいはエラスターゼによるフィブリノゲン・フィブリン分解物 (E-FDP) を特異的に認識するモノクローナル抗体 (IF-123) によるイムノブロッティングを行ない、患者循環血液中に存在する FDP を解析した。さらに病態増悪期と緩解期の患者血清を、それぞれ抗フィブリノゲンポリクローナル抗体で免疫沈降後、抗フィブリノゲンポリクローナル抗体、IF-123 でイムノブロッティングを行った。プラスミノゲン共存下、非共存下でフィブリンアガロースゲルを作製し、SDS-PAGE にて分画した患者血漿によるフィブリンオートグラフィーを行った。

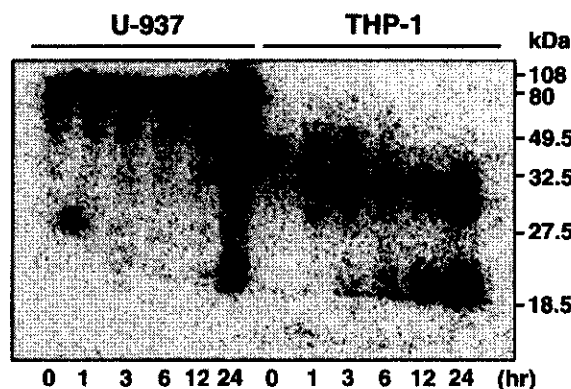
オートグラフィーを行った。

(倫理面への配慮) 臨床研究を実施する上でヘルシンキ宣言の基本原則を遵守し、被験者の人権に充分配慮しかつ不利益性及危険性を排除するとともに、インフォームドコンセントを取得した。

C. 研究結果

1) 単球系細胞及び血管内皮細胞のプラスミノゲン結合活性に及ぼす白血球エラスターゼの影響

プラスミノゲンは、白血球細胞表面上に結合し局所の血栓溶解や炎症反応の制御に深く関与していることが知られている。細胞表面上におけるプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系と白血球エラスターゼ系との連関を明らかにするために、単球系細胞株である U-937, THP-1 細胞および HUVECs を白血球エラスターゼで刺激後、これらの細胞表面上へのプラスミノゲン結合能の変化を ^{125}I iodine 標識プラスミノゲンを用いた U-937 および THP-1 細胞膜分画のリガンドブロッティング



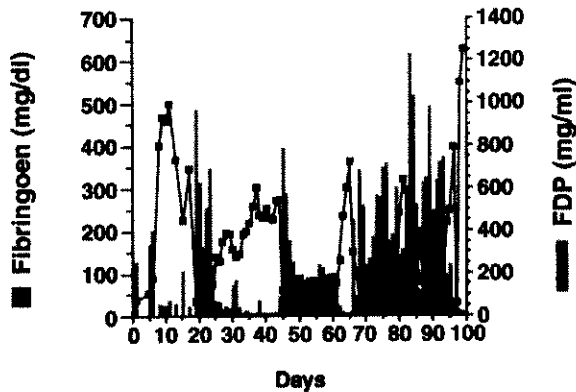
合能の変化を ^{125}I iodine 標識プラスミノゲンを用いたリガンドブロッティング法により解析した。その結果、U-937 および THP-1 細胞膜分画には、エラスターゼ刺激によってプラスミノゲンに対する結合能を有する複数の膜蛋白が時間依存性に発現すること明らかとなった (図 1)。

2) プラスミン非依存性線溶能の亢進をきたした臨床例の病態解析

本例でみられた重篤な出血傾向は、血小板数が正常にも関わらずフィブリノゲンが著減していることや TAT および D-ダイマ

一値の変動と明らかに乖離する FDP 値の著増がみられることなどから、一次線溶能が高度に亢進した病態と考えられた。また本例の凝血学検査値の経過は極めて特異であり、プロテアーゼインヒビタの投与やフィブリノゲン製剤の投与を恒常的に行っているにも関わらず、1週間から2週間の周期で緩解と増悪とを反復していた(図2)。

図2. フィブリノゲン値とフィブリノゲン・フィブリン分解物(FDP)の臨床経過



そこで経時的に得られた患者血清を SDS-PAGE で展開後、抗ヒトフィブリノゲン抗体でイムノブロッティングを行なうと、臨床的に FDP が著増している時期に一致してフィブリノゲン・フィブリンに由来する分画がみられたが、プラスミンによる分解物とは明らかに異なる複数の分画が存在していた(図3)。患者血漿を SDS-PAGE で展開後フィブリンオートグラフィーを行なった結果、フィブリノゲンを特異的に分解する未知因子の分子量は約 35-40KDa と推定された(図4)。

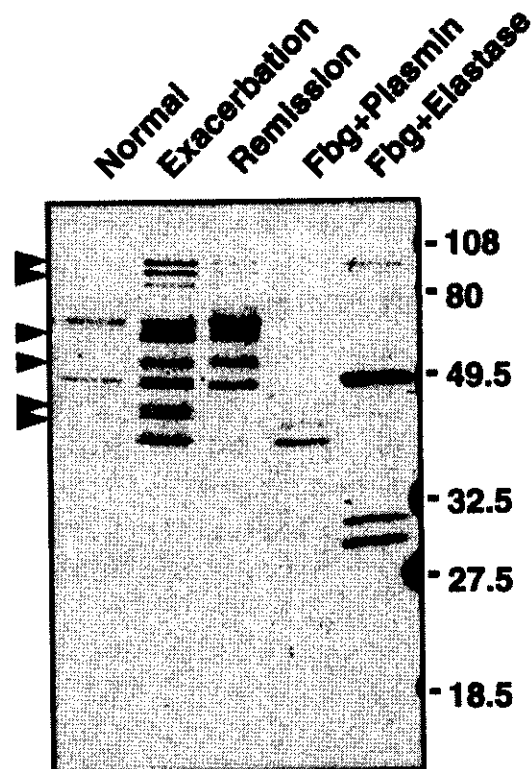
D. 考察

単球系培養細胞に対してリポポリサッカライドやホルボールエステル刺激を行なうと、プラスミノゲンの細胞表面への結合が増加することが報告されている。Plow EFらは、プラスミノゲン受容体として知られているアネキシン II や α エノラーゼのみならず核蛋白であるヒストン H2B が細胞膜表面上でプラスミノゲンの結合に関与している可能性をみいだしている。我々は本研究において、U-937 および THP-1 細胞表面

上にエラスターゼ刺激によりプラスミノゲンの結合能を有する複数の膜蛋白が時間依存性に発現すること明らかにした。このことは組織線溶反応の開始段階が白血球エラスターゼにより調節されている可能性を示唆するものである。我々がこれまでに明らかにしたプラスミノゲン派生物による白血球エラスターゼの発現調節を考え併せると、両者のクロストークはかなり複雑に制御されていることが示唆された。

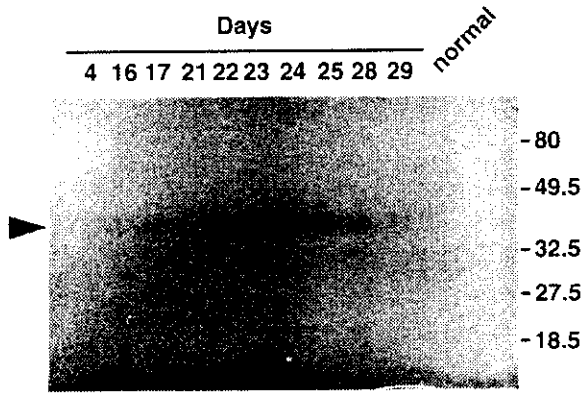
図3. 患者血清由来 FDP のイムノブロッティング

矢頭は、患者血清由来 FDP にのみ特異的に存在する分画を示す。



今後、白血球エラスターゼによる制御を受ける新規プラスミノゲン受容体を同定するとともに、エラスターゼ産生制御における転写調節機構を明らかにし、両反応機構の連関をさらに詳細に解析する必要があると考えられる。

図4. 患者血漿によるフィブリノゲンオートグラフィ



後天性の一次線溶能亢進によりフィブリノゲンの顕著な分解の結果、重篤な出血傾向を来した臨床例の凝血学的病態を解析したところ、患者循環血液中にはプラスミンによるフィブリノゲン・フィブリン分解物とは明らかに異なる複数の分画が存在していた。これらの分画を個々に単離しアミノ酸配列を決定することにより、その切断様式から起因子（酵素）を絞り込むことが可能である。さらにフィブリノゲンを特異的に分解する因子が、フィブリノゲンオートグラフィにより分子量 35 - 40 kDa であることが推定されることから、組織型プラスミノゲンアクチベータやウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータなどの既知のプラスミノゲンアクチベータやプラスミンとも分子量的に異なることが明らかとなった。今後さらなる解析により本病態をもたらした未知因子を特定する予定である。

E. 結論

白血球エラスターゼ系とプラスミノゲンアクチベータ・プラスミン系とのクロストークを、単球系培養細胞および血管内皮細胞を用いて解析し、白血球エラスターゼにより細胞表面上にプラスミノゲン結合活性を有する複数の受容体が新規に発現する可能性を示した。一次線溶能の亢進により重篤な出血傾向を来した臨床例の凝血学的病態を解析し、患者循環血液中にプラスミンによるものとは異なるフィブリノゲン・フィブリン分画が存在すること、分子量 35-40kDa の未知因子がプラスミン非依存性に

フィブリノゲンを特異的に分解していることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

1. Kimura H, Sakata Y, Hamada H, Yoshida Y, Sato O, Deguchi J, Sugawara Y, Makuuchi M, Miyata T: In vivo retention of endothelial cells adenovirally transduced with tissue-type plasminogen activator and seeded onto expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg*, 32: 353-63, 2000.
2. Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Sakata Y, Takizawa T, Okada K, Saito T, Shimada K: Matrix metalloproteinase-1 expression by interaction between monocytes and vascular endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1459-1468, 2000.
3. Miyata M, Sakata Y, Shibukawa G, Shishido H, Munakata O, Kazuta Y, Shio K, Sasajima T, Sato Y, Kasuwa R: Primary antiphospholipid syndrome presenting with cerebral ischemia, thrombocytopenia anemia and proteinuria successfully treated with warfarin potassium. *Internal Medicine* 39: 748-753, 2000.
4. Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Obara H, Wada T, Onagawa T, Sato I: Effect of heparin on activated partial thromboplastin time in patients undergoing gynecologic or obstetric surgery. *Gynecol Obstet Invest*, in press.
5. Mimuro J, Muramatsu S, Hakamada Y, Mori K, Urabe M, Madoiwa S, Hirokawa S, Matsuda M, Ozawa K, Sakata Y: Recombinant Adeno-associated virus vector-transduced vascular endothelial cells express the thrombomodulin transgene under the regulation of enhanced plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *Gene Therapy*, in press.
6. Madoiwa S, Nakamura Y, Mimuro J, Furusawa S, Koyama T, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y: An autoantibody against prothrombin aberrantly alters the proenzyme to facilitate formation of a complex with its physiological inhibitor antithrombin III without thrombin conversion. *Blood*, in press.
7. 坂田洋一、目黒輝雄: 慢性透析患者に見られる高ホモシステイン血症の治療, 日本透析会誌, in press.

学会発表

1. 窓岩清治、三室 淳、諏合輝子、松田道生、坂田洋一：アンジオスタチンの血管内皮細胞に対する増殖抑制機序の検討，第62回日本血液学会総会，福岡，平成12年3月16日。
2. 窓岩清治、河野 功、三室 淳、諏合輝子、松田道生、坂田洋一：白血球エラスターゼによる線溶機構の解析，第23回日本血栓止血学会学術集会，名古屋，平成12年11月22日。
3. Madoiwa S, Mumuro J, Matsuda M, Sakata Y: Analysis of angiostatin inhibitory effects on endothelial cell proliferation. XVth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu, June 25, 2000.
4. Ono T, Ogura M, Furusaki F, Watanabe S, Sakata Y: The ratio of plasmin-alpha2-plasmin inhibitor complex to plasminogen activator inhibitor-1 reflects the fibrinolytic potential in plasma. XVth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu, June 25, 2000.
5. Watanabe R, Ninakami H, Obara H, Wada T, Onagawa T, Sakata Y, Sato J: Perioperative changes in plasma antithrombin III activity and platelet count in patients who underwent gynecologic operation. XVth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu, June 25, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

変異プラスミンインヒビターの分解 (分担) 研究者 広沢 信作 東京医科歯科大学学生体応答調節学

研究要旨

プラスミンインヒビター欠乏症を引き起こす遺伝子変異の結果細胞内で産生される変異蛋白は分泌されず、細胞内で分解される。このメカニズムはほとんど解明されていない。蛋白が粗面小胞体で翻訳される時、ハイマンノース型の糖鎖が数ヶ所に付く。ハイマンノース型の糖鎖は、3個のグルコース(glucose)、9個のマンノース(mannose)、2個のN-アセチルグルコサミン(N-acetyl-glucosamine) (Glc3Man9GlcNAc2) から成っている。今回、これらの糖鎖のトリミングが変異蛋白の分解に重要であることを初めて明らかにすることができた。糖鎖のトリミングはまず、3つのグルコースが順にはずれた後に、1つのマンノースがトリミングされて除かれることが分解開始のシグナルとなることを明らかにした。そして、分解がプロテアソームによっておこることも明らかにすることができた。その他、プロテアソームによる分解にはユビキチン化はおこなわれないうちでおこることが判明した。グルコースのトリミングが阻害されると分解が促進し、グルコースのトリミングが阻害された変異蛋白の分解が同様にプロテアソームによっておこった。グルコースが1つ付いた蛋白は粗面小胞体内ではカルネキシンと結合するが、変異蛋白は正常の蛋白と比べて、カルネキシンと結合している比率と時間が多いことが判明した。これらの結果は2種類の変異蛋白でみられたことから、欠乏症を引き起こす、多くの凝固・線溶系因子の欠乏症でも普遍的に起こっている現象と考えられる。これらのメカニズムをさらに詳細に解明することは欠乏症の治療に還元される可能性が大きいものである。欠乏症を引き起こす変異蛋白は、その多くにものが機能的には正常と何ら変わらない蛋白であるからである。

A. 研究目的

プラスミンインヒビター((plasma) plasmin inhibitor 以下、PI と略す。α2-プラスミンインヒビター、α2-plasmin inhibitor (α2-PI) あるいはα2-antiplasminとも呼ばれている)はプラスミンによる線維素溶解(線溶)系の最も重要な生理的阻止因子である。PIは、線溶を制御する重要な役割を果たしており、その主な作用は、1) プラスミンの即時的阻害 2) プラスミンのフィブリンへの結合の阻害 3) フィブリンの安定化 である。

本因子の欠乏症では、出血傾向をきたす。我々は、これまでに3家系の遺伝子解析を行い、それぞれの遺伝子レベルでの異常を報告してきている。遺伝子異常の結果、余分なアミノ酸残基の付加、1アミノ酸の欠失、スプライス異常を来すことが明らかになった。これらのうち、前2者(PI-Nara、PI-Okinawa)の変異蛋白についてこれま

で研究してきている。変異蛋白は細胞内で合成され、粗面小胞体に留まることまでがこれまで明らかにされている。これまで何らかの、未知のプロテアーゼなどの関与も推測されていたが、留まった変異蛋白が、結果的には分解されるメカニズムについては、ほとんど解明されていないのが現状である。今回、変異蛋白に分解について、糖鎖のトリミングが重要であるか、分解が何によって起こるのかについて検討を加えた。

B. 研究方法

発現ベクター (PCI) に、正常及び2種類の変異 PI (PI-Nara、PI-Okinawa) をコードするcDNAを挿入した。正常及び変異PI発現ベクターをCHO細胞に導入して、コンスタントに蛋白を発現する stable cell line を得た。³⁵S-メチオニンでラベルして、パルスチェイス実験を行った。メチオニン