

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

周産期領域の栓友病診断と治療管理ガイドラインの作成に関する研究

研究分担者 嶋 緑倫 奈良県立医科大学 小児科 教授

**研究要旨**

出血性素因や血栓性素因の凝血的評価は診断のみならず治療管理にもきわめて重要である。従来は、凝固因子、抗凝固因子、線溶因子や抗線溶因子などを個々に評価されてきたが、*in vivo* を反映していない。本研究では、トロンビン生成とプラスミン生成を同時に評価できる測定法を確立した。さらに、両反応系におけるそれぞれの因子の関与について検討した結果、プロトロンビナーゼ複合体必須因子である第Ⅴ因子および第Ⅹ因子が最も大きく関与していた。さらにフィブリノゲンおよびプラスミノゲンはプラスミン生成に大きく関与した。トロンビン生成・プラスミン生成同時測定法は出血性素因のみならず血栓性素因の包括的評価にきわめて有用であると考えられた。

**A. 研究目的**

栓友病は先天性の遺伝性血栓症で、プロテインC (PC)、プロテインS (PS)、アンチトロンビン (AT) の欠乏が主な病因である。これらの疾患の診断はそれぞれの抗凝固因子の測定や遺伝子解析による。しかしながら、それぞれの測定値は臨床的重症度を必ずしも反映しない。したがって、栓友病の治療管理上、血栓傾向を評価する凝固機能測定法の確立が望まれる。トロンビン生成測定法は代表的な包括的凝固機能測定法であるが、*in vivo* では凝固系と線溶系が連動していることから、これら両反応系を評価できることが望ましい。そこで、本年度の分担研究では、栓友病の凝固機能を包括的に評価するためにトロンビンおよびプラスミンを同時に定量的に評価できる測定系を確立することを目的とした。

**B. 研究方法**

試薬：組織因子 (TF; Innovin®, Dade), 合成リン脂質 (PL; ホスファチジルセリン: ホスファチジルコリン: ホスファチジルエタノールアミン = 1:6:3), 組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA; American Diagnostica Inc.) をトリガー試薬とし、血漿に塩化カルシウムを添加することで生成されるトロンビンおよびプラス

ミンが同時に測定する。トリガー試薬 (TF, PL, tPA) を 20mM HEPES, pH 7.2, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20 と混合した。血漿中の最終濃度は TF: 1pM, PL: 4uM, tPA 3.3nM に調整した。生成されたトロンビンおよびプラスミンの測定のために2種類の蛍光発色基質 (トロンビン基質: Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem, Switzerland; プラスミン基質: Boc-Glu-Lys-Lys-MCA, Peptide Institute Inc.) を用いた。血漿検体 (80ul) を 96 穴ポリスチレンプレートに添加し、20ul のトリガー試薬 (TF/PL/tPA) を添加した。プレートを蛍光発色測定器におき、37 10 分加温後蛍光発色基質を添加した。次に、CaCl<sub>2</sub> を添加して蛍光シグナルを2時間、45 秒間隔で 390nm および 460nm で測定した。生成トロンビンおよびプラスミン測定のために段階希釈した純化 トロンビンおよびプラスミンを用いて標準曲線を作成した。データ解析には excel のソフトウェアを用いた。

**C. 研究結果**

まず、正常血漿についてトロンビン生成およびプラスミン生成反応における蛍光シグナルを測定した (図 1-A)。さらに、これらの raw data の1次微分からトロンビンおよびプラスミ



トロンビン生成では第 II, V, VIII, IX, X, XIII, フィブリノゲン欠乏血漿で低下した。プラスミン生成では第 V, X 因子、フィブリノゲン、プラスミノゲン欠乏で著明に低下した。 $_2$ PI 欠乏症で peak は亢進した。以上よりフィブリン形成はプラスミン生成を惹起する上できわめて重要であることが確認された。さらに、共通経路の凝固因子である第 V, 第 X 因子もプラスミン生成に影響することが判明した。これらの因子の重要性を確認するために、様々な濃度の純化 FV, FX, プラスミノゲン、フィブリノゲンをそれぞれの欠乏血漿に添加したところ、いずれの欠乏血漿においても濃度依存性にトロンビン生成さらに、およびプラスミン生成を改善した(図4)。さらにプラスミン生成には微量のフィブリノゲンでも惹起されやすいことも判明した。

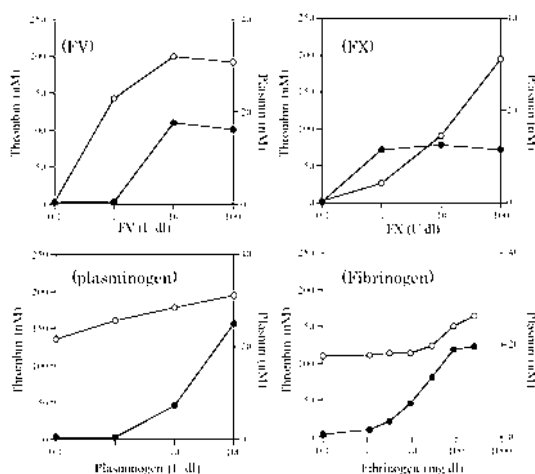


図4. 各種欠乏血漿に純化凝固因子を添加したTTP-Gの効果

## D. 考察

本研究では、凝固系と線溶系の協働作用を評価する目的でトロンビン/プラスミン生成測定系を確立した。従来の凝血的評価は凝固反応系、線溶反応系を別々に評価していたが、実際の *in vivo* ではこれら両反応系は協働して進行している。したがって、本測定系は、出血性素因のみならず血栓性素因を包括的に評価する上にきわめて有用な評価法を考えられた。さらに本研究において、1)トロンビン生成はプラスミン生成の開始にきわめて重要であり、たとえ微量なトロンビン

生成量でもプラスミン生成反応を惹起する、2)プラスミン生成はフィブリノゲン濃度に大きく依存している、3)プロトロンビナーゼ複合体の必須因子であるFVとFXはトロンビン生成のみならずプラスミン生成にも必須であること、4)抗線溶因子である $_2$ PIはプラスミン生成を増強するがトロンビン生成には影響をあたえないこと、などが判明した。

## E. 結論

*In vivo* での出血や血栓症は凝固反応系と線溶反応系とのきわめて繊細なバランスを基盤に発症する。したがって、出血性疾患や血栓性疾患の診断や治療管理において、両反応系を同時に測定する必要がある。本研究では凝固反応系をトロンビン生成、線溶反応系をプラスミン生成にて両者を同時に評価する測定法を確立した。本測定法は出血性素因のみならず血栓性素因の包括的評価にきわめて有用であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2013 110(4):761-8.
- 2) Shima M. [Hemophilia world] *Rinsho Ketsueki.* 2013 54(8):736-43.
- 3) Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost.* 2013 11(7):1417-20.
- 4) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. *Thromb Haemost.* 2013 110(2):316-22.
- 5) Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y. Elevated

plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. Thromb Haemost. 2013 110(1):62-75.

6) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T; Japan Childhood Thrombophilia Study Group. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. Pediatr Int. 2013 55(3):267-71.

7) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness. J Thromb Haemost. 2013 11(5):902-10.

8) Shima M. [Hemophilia]. Rinsho Ketsueki. 2013 54(2):189-97.

## 2. 学会発表

1) Matsumoto T, Nogami K, Shima M:  
Usefulness of thrombin generation assay (TGA) for diagnosis of prolonged aPTT with positive LA. 第75回日本血液学会 札幌市 2013.10.12

2) 松本智子、野上恵嗣、嶋緑倫  
Thrombin /Plasmin 生成同時測定による  
新規包括的凝固線溶検査 第60回日本臨床検査医学会学会 神戸市 2013.11.2

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 参考文献

特許取得

特許 4671823 血液凝固因子の不活性化及び血液凝固因子