

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 － 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

血栓性素因を有する疾患の診断治療管理において *in vivo* を反映する凝固機能評価はきわめて重要である。本研究ではまず、栓友病の原因としても代表的なプロテイン C およびプロテイン S 欠乏の包括的評価を目的としてプロテイン C (PC) / プロテイン S (PS) 経路異常スクリーニング検査を用いて反復流産既往妊婦を経時的に評価し、各凝固因子欠乏血漿を用いた添加実験も実施した。本症例の PC/PS 経路異常には PS 低値に加えて第 VIII 因子 (FVIII) 高値も関与していた。 *In vitro* 添加実験から FV と FVIII が本経路へ大きく関与することが判明した。栓友病スクリーニング検査として PC、PS、FV、FVIII 等の異常を包括的に評価可能な本法の有用性が期待される。次に、トロンピ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。トロンピン生成・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

本邦遺伝性血栓症 3 大素因 (プロテイン C: PC、プロテイン S: PS、アンチトロンピン: AT) のうち、PC、PS の 2 つは共同して抗凝固機能を発揮する。本経路にはさらに第 V 因子 (FV)、FVIII などの凝固因子や抗リン脂質抗体、トロンボモジュリンなど多数の因子が関与している。

我々は本邦初の APC 抵抗性 FV 分子異常症 (FV W1920R) 患者の解析を通じて、PC 経路機能の凝血的評価手法を確立してきた。本分担研究では、母子に効果的な栓友病スクリーニング項目として、PC/PS 経路機能検査が有用であるかどうかの基礎的検討を実施した。栓友病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。トロンピ

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ピ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

PC 活性測定は STA 試薬シリーズプロテイン C (クロット) を用いた。PS 活性測定は STA ライアテスト フリー・プロテイン S を用いた遊離抗原測定で代用した (いずれもロシュ・ダイアグノスティックス)。PC 経路機能検査である Thrombopath® (Instrumentation Laboratory) は被検血漿に Ca と組織トロンボプラスチン添加後、合成基質を用いてトロンピン生成能を評価する。その際、PC 活性化

剤である Protac 添加の有無によって比較し、PiCi% (Protac-induced coagulation inhibition %)を算出する。つまり、PC 経路が Protac で活性化された場合にトロンビン生成能がどの程度抑制されるかを評価した。これによりPS、PC、FV、FVIII、抗リン脂質抗体等の異常を効率的に(感度 95%、特異度 86%)スクリーニングできるとされる(Toulon, 2009)。本法は市販キット化されており、血液凝固自動分析装置(ACL TOP、三菱化学メディエンス)で測定できることから汎用性が高い。本法を用い、反復流産既往妊婦(先天性 PS 欠損症疑い)の PC 経路機能と関連する諸因子を経時的に評価した。

また、市販各凝固因子欠乏血漿に純化 FII、FV、FVII、FVIII、FIX、FX をそれぞれ添加して PiCi% の変動を in vitro で評価した。

トロンビン・プラスミン生成同時測定試験ではトリガー試薬(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。37 10 分加温後蛍光発色基質を添加した。次に、CaCl₂ 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

1. プロテインC/プロテインS経路異常スクリーニング

まず健常成人 30 例の血漿で実施した Thrombopath[®] のパラメータ(平均 ± SD)は、Protac(+) 96.4 ± 31.4mOD/min、

Protac(-) 823.3 ± 40.2 mOD/min、PiCi% 88.2 ± 4.1%であった。

文献(Toulon, 2009)に従い、PiCi%で 84.1%以下(-1SD)を異常低値とした。これにより、前述したスクリーニング感度を得られるとされる。

症例は 44 歳女性。2 度の流産既往があり、3 度目の妊娠前に PS 活性(45%)、FXII:C(46%)低値を認めた。PS 欠損症として、妊娠 5 か月からヘパリン投与が開始された。妊娠中も PS は 38-42%を推移し妊娠前と変化は無く(図 1 上段)、PC、AT、FV:C は正常範囲内であった。しかし、妊娠前は正常範囲にあった PiCi%(86%、cut off 値 84%)は妊娠経過とともに徐々に低下し(60%)、トロンビン生成能も亢進した(730 910mOD/min)(図 1 下段)。妊娠経過中に FVII:C、FVIII:C、FXII:C は増加を認めた(図 2)。出産直前には PiCi%が 52%とさらに低下し、トロンビン生成能 1000mOD/min、FVII:C 204%、FVIII:C 416%、FXII:C 144%と凝固機能が著明に亢進した(図 1)が、無事正期産に至った。本例の PS 活性は出産 7 か月後には 60%に回復した。PS 遺伝子異常について現在解析中である。尚、出生児の生後 7 か月時の PS 活性は 85%と正常であった。

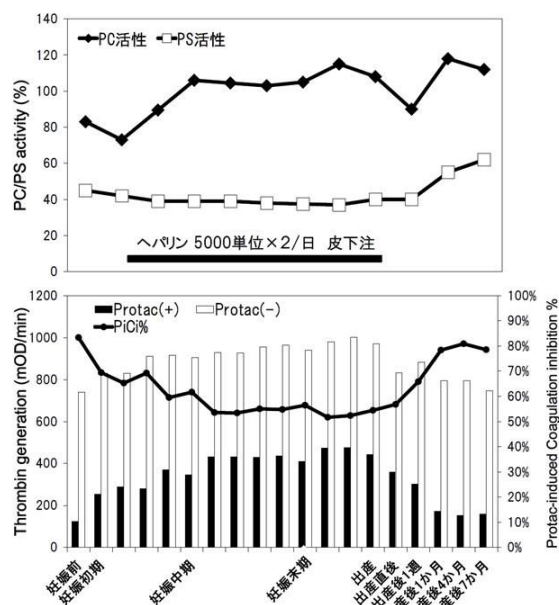


図 1. 習慣流産既往妊婦の PC/PS 活性(上段)および Thrombopath[®] パラメータ(下段)の推移

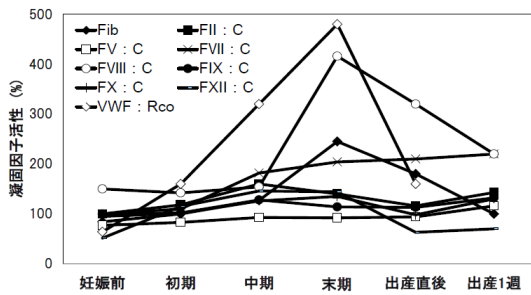


図 2. 習慣流産既往妊婦の各凝固因子活性と VWF:RCo の推移

本例で PS 値が不変でありながら PiCi% が低下した機序解明のため、各凝固因子欠乏血漿 (Geroge King) に各欠乏因子を 50 ~ 200% で in vitro で添加したところ、PiCi% は各凝固因子濃度依存性の変化を示し、FV 添加で増加、FII、FVII、FIX、FX 添加によって軽度低下、FVIII 添加によって著明な低下を示した (図 3)。つまり、PC 経路の機能発現には FV、FVIII の関与が大きく、本例の妊娠経過中の PiCi% の低下には FVIII 増加が関与していることが示唆された。

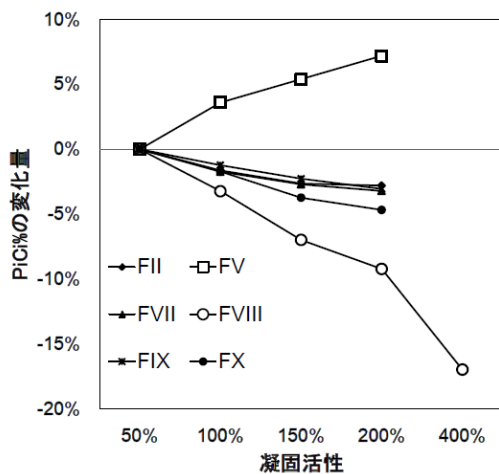


図 3. 各凝固因子欠乏血漿に欠乏因子を in vitro で添加した場合の PiCi% の変化量

II. トロンビン・プラスミン生成同時測定

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 4)。

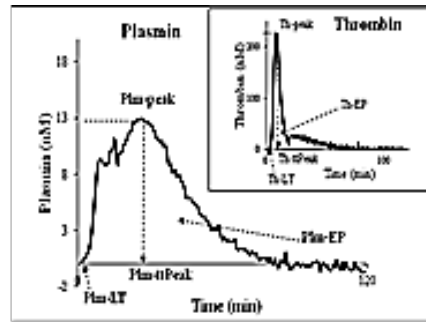


図 4. 正常血漿におけるトロンビン・プラスミン同時測定

さらに、これらの raw data の 1 次微分からトロンピンおよびプラスミン生成曲線が得られた (図 5)。

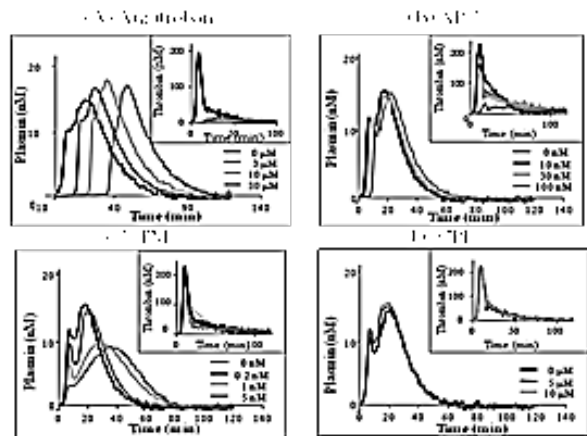


図 5. 各種凝固因子濃度添加時の T/P-G

トロンビン生成ではトロンビン生成が開始するまでの時間 (lag time: LT)、トロンビンピーク値 (peak thrombin: Peak)、peak に至るまでの時間 (time to peak; ttPeak)、トロンビン総生成量 (endogenous potential: EP) の定量的パラメーターを算定した。プラスミン生成でも、同様にプラスミン生成開始までの時間 (LT)、プラスミンピーク値 (Peak)、peak に至るまでの時間 (ttPeak)、総プラスミン生成量 (EP) のパラメーターを算定した。

このトロンビン / プラスミン生成試験 (T/P-G 測定) が凝固反応系と線溶反応系間の協働的バランスを反映するものかについてトロンピン特異性のインヒビター (アルガトロバン) や抗凝固因子である APC やトロンボモジュリン (TM) を添加して検討した。アルガトロバンは濃度依存性に TG に抑制した。本抑制効果は著明で、アルガトロバン治療

濃度 10 μ M で > 90%抑制した。一方、プラスミン生成において LT を濃度依存性に延長したが、Peak はむしろ増加した。APC や TM の抑制パターンは異なっていた。すなわち、両因子はアルガトロバンと同様にトロンピン生成を濃度依存性に抑制したが、TM はプラスミン生成を抑制したが、APC は抑制しなかった。APC のプラスミン生成抑制効果はみられなかった。以上より、T/P-G 測定はトロンピン依存性の抗線溶因子である thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) に感受性が高いことも示唆された。

次に、本研究では、様々な凝固因子や抗凝固因子の凝固・線溶系における役割を検討するためにそれぞれの因子欠乏血漿を用いて T/P-G 測定を行った。トロンピン生成では第 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。 α_2 PI 欠乏症の 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ピン生成さらに、およびプラスミン生成を改善した。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。

D. 考察

I. プロテイン C / プロテイン S 経路異常スクリーニング

本症例は妊娠前から PS 活性が低く、妊娠経過中の変動は乏しかったにもかかわらず PiCi% が徐々に低下した (図 1)。凝固因子添加実験 (図 3) の結果をふまえると FVIII の上昇が本症例の PiCi% 低下に最も影響したと考えられた。また、近年我々が APC 抵抗性の FV 分子異常症患者 (FV_{Nara}) を報告するまでは日本人の APC 抵抗性 FV 例はなく、FV との関連は本邦ではまだ十分に検討されてお

らず興味深い。

本法のスクリーニング検査としての有用性を評価するためには、正常妊婦や血栓症 (流産) 既往妊婦を対象にした多数の症例蓄積が必要である。また、新生児・乳児における評価も重要である。妊産婦・新生児の生理的変動を考慮した上で、本法のような包括的凝固/抗凝固検査が遺伝的血栓症のスクリーニングに有用かどうか、引き続き検討する。

II. トロンピン・プラスミン生成同時測定

凝固系と線溶系の協働作用を評価する目的でトロンピン/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) トロンピ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ピ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 はトロンピ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 α_2 PI はプラスミン生成を増強するがトロンピ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

PC/PS 経路依存性抗凝固機能の包括的測定を用いて反復流産既往妊婦の経時的評価を実施した。本法では PC、PS に加えて、FV、FVIII が大きく影響した。栓友病スクリーニング検査として本法の有用性が期待されるが、十分な検討を要する。

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ピン生成、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.
- 9) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia.* 2012 Suppl 4:81-8.

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
- 3) 中川隆志、荻原建一、佐道俊幸、野上恵嗣、松本智子、矢田弘史、嶋緑倫: 反復流産の既往を持つ妊婦の PC/PS 経路依存性抗凝固能評価. 第34回日本血栓止血学会東京都 2012.6.8.
- 4) 荻原建一、野上恵嗣、篠澤圭子、松本智子、古川晶子、西屋克己、矢田弘史、福武勝幸、嶋緑倫: 第V因子変異 R506Q (FV_{Leiden})より強い APC レジスタンスを示した FV 変異 W1920R (FV_{Nara}) 第34回日本血栓止血学会 東京都 2012.6.9

H. 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