

血栓症の診断における包括的凝固機能検査の臨床的応用の基礎検討

分担研究者 教授 嶋 緑倫 奈良県立医科大学小児科

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。最近我々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。本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ことが期待される。今回、本生成試験を用いた栓友病診断の臨床的応用について、抗凝固因子添加における本生成試験へ与える影響について検討した。抗凝固因子（活性型プロテイン C、アンチトロンビン、トロンボモジュリン）の過剰量の添加はいずれも凝固能ならびに線溶能を抑制することがわかった。今後、血栓症を呈する各欠乏血漿検体を用いて、抗凝固因子過剰存在下での本法で検討する予定である。

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。また、診断まで時間を費やすことも多い。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。昨年度は、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の確立を報告した。今年度の分担研究は、トロンビン・プラスミン生成試験を用いた栓友病診断の臨床的応用について、抗凝固因子添加における本生成試験へ与える影響について検討した。

B. 研究方法

トロンビン・プラスミン生成試験: 本法は、組織因子 (TF)、合成リン脂質 (PL)、組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) をトリガー試薬とし、血漿と CaCl₂ を添加してトロンビンとプラスミンが同時に生成する。トリガー試薬の血漿中の最終濃度は TF 1 pM, PL 4 uM, tPA 3.3nM に調整した。生成された両者を蛍光発色基質法で測定する。得られた波形を一次微分して、波形からは Lag time, Peak height, Time to peak, EP (総生成量) の各パラメータが得られる。この反応の際、抗凝固因子である活性型 PC (APC)、アンチトロンビン (AT)、トロンボモジュリン (TM) をそれぞれ CaCl₂ 添加前に添加して、トロンビン生成およびプラスミン生成への影響について検討した。今回は正常プール血漿における抗凝固因子の影響について、添加濃度の条件設定を行い検討した。

(倫理面への配慮) 被験者の血液採取にあたり、informed consent について厳格に行い同意を得て、得られる個人情報については各種法令等遵守し、個人情報等保護に十分配慮し実験を行った。

C. 研究結果

正常血漿でのトロンビン・プラスミン生成は従来、Matsumotoらがすでに報告している同様の生成パラメータを示した。さらに、抗凝固因子の APC、AT、および rTM をそれぞれ添加し、その影響を本法にて施行した。いずれの抗凝固因子の過剰な存在も、トロンビン生成および引き続くプラスミン生成を濃度依存性に抑制した。これら濃度依存性反応から検討した本法の至適濃度は APC 20 nM, AT 2.0 U/ml, rTM 400 nM (最終濃度) であった。

D. 考察・結論

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とされる。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我々はすでに確立している。本法は出血性素因を包括的に評価する上に極めて有用な評価法であり、本研究では、血栓症の診断への本法の臨床的応用としての基礎実験である。今回の検討から、抗凝固因子 (APC、AT、rTM) の過剰な存在はいずれも凝固能ならびに線溶能を抑制することがわかった。今後、血栓症を呈する各欠乏血漿検体を用いて、抗凝固因子過剰存在下での本法で検討する予定である。

F.研究発表

1.論文発表

1) Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2014 99(10): e211-213.

2) Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A. Delivery of full-length factor VIII using a piggyBack transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PLoS One*. 2014 9(8): e104957.

3) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 2014 124(20):3165-3171.

4) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014 12(9): 1503-1512.

5) Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (sPCC) moderate the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. *International Journal of Hematology*. 2014 99(5):577-587.

6) Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood*. 2014 123(15): 2420-2428.

G. 知的財産権の出願・登録状況、参考文献

研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室:野上恵嗣、橋本直樹、松本智子