

自己免疫性出血症治療の「均てん化」のための実態調査と「総合的」診療指針の作成
に関する研究

分担研究課題 後天性線溶異常症に関する研究

研究分担者 浦野 哲盟 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨

自己免疫性出血症の内、線溶系因子に対する自己抗体による症例の診断及び重症度分類の基盤となる、検査法の確立を目指す。具体的には「包括的線溶活性測定法」と「微量PAI-1活性測定法」の確率を目指す。

A．研究目的

自己免疫性出血症の内、線溶系因子に対する自己抗体による症例の診断及び重症度分類の基盤となる、検査法の確立を目指す。

B．研究方法

包括的線溶活性測定法の確立

前回の厚労科研時に取り組んだ「包括的線溶活性測定法」の検証に関して、凝固あるいはフィブリン形成過程がどのようにフィブリン溶解時間に影響するかという基礎的事項を検討した。ユーグロブリン溶解時間では、クロット形成に必要とするトロンビン濃度に応じて溶解時間は短縮する。これはトロンビンによる plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) の高分子複合体形成による活性中和による。血漿を用いた系においてもクロット形成に要する添加トロンビン量を増加させると高濃度では溶解時間が短縮したが、低濃度では逆に延長した。また血漿クロット作成時に外因系、並びに内因系凝固カスケードを活性化させ内因性トロンビン産生を増加させると溶解時間は短縮した。その際 2Antiplasmin をフィブリンに架橋するFXIIIa の阻害薬、及び thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) の阻害薬を添加しておく、溶解時間はさらに短縮した。これらの結果を基盤に後述のようにTAFIの活性をより良く反映する方法も含め、条件を再検討している。

微量PAI-1活性測定法の確立

AlphaLISA法を用いた、微量PAI-1抗原量、並びに活性型PAI-1測定法を本学薬理学講座の岩城孝行准教授と共同で開発している。抗原量に関しては、

通常のELISA法に比べ2オーダー高い感度で測定可能である結果をすでに得ている。現在home madeの種々抗体を用い、最適な組み合わせを検討している。

PAI-1中和抗体の同定及び活性測定法の確立

PAI-1欠損症例は、euglobulin clot lysis time (ECLT) がcalcium ion (Ca⁺⁺) 存在下で短縮するというPAI-1依存性及びトロンビン依存性の現象を欠く事実より発見された。同法を用いて、正常血漿の患者血漿添加に伴うCa⁺⁺ 依存性ECLTの短縮が患者血漿により消失する現象を用い、PAI-1中和抗体存在のスクリーニングが可能か検討する。これにもstandard として用いる。

（倫理面への配慮）

症例の解析においては、連結可能匿名化により検体を扱い、患者保護を徹底する。

C．研究結果

包括的線溶活性測定法の確立

依然健常人ボランティアの検査に限っており、患者検体はPAI-1欠損症例1例のみの解析でそれ以降の解析は進んでいない。

微量PAI-1活性測定法の確立

AlphaLISA法を用いた、微量PAI-1抗原量、並びに活性型PAI-1測定法を本学生理学講座及び薬理学講座の共同研究で開発している。抗原量に関しては、通常のELISA法に比べ2オーダー高い感度で測定可能である結果をすでに得ている。Biotin標識uPAを用いて活性型PAI-1の良好な検量線を得た。当初準備したBiotin標識uPAが、活性中心mol濃度の測定に

は十分な高濃度でなかったため、再度標識中である。測定法の一部は新規の PAI-1 欠損症例の報告に際し紹介した(Iwaki T et al, Thromb Haemost 2017 117(5):860-869)。

PAI-1中和抗体の同定及び活性測定法の確立

現在PAI-1中和抗体を用いて正常血漿を用いたECLT (Calcium ion存在下及び非存在下) への影響を解析しているところである。PAI-1欠損を疑わせるECLT所見を有しながら遺伝子解析で異常が認められなかった2症例で自己抗体の有無を検査予定である。また現在臨床治験が進んでいるPAI-1阻害薬の検体を用いてECLTを測定している。

新規TAFI活性測定法の確立

tPA添加血漿クロット溶解時間を用いたTAFI活性測定法が報告されており我々も使用してきたが、今回血漿の有する総TAFI活性を測定する方法を考案し、現在その有用性を検証中である。これはtPA添加血漿クロット溶解時間を用いたTAFI活性測定法を改変した方法で、多血小板血漿と可溶性トロンボモジュリンを用いて凝固と線溶のクロストークを解析した我々の報告(Brzoska T et al, Thromb Haemost 2017 7. 682-690)を基盤に確立した方法である。従来法との組み合わせで、先天性あるいは後天性のTAFI活性低下に伴う出血症例の同定に貢献すると期待する。

D . 考察

線溶異常症の解析には現在進行中の「包括的線溶活性測定法」、「微量PAI-1活性測定法」と「新規TAFI活性測定法」が有効と考え、早期の確立を目指している。その中で後天性の異常症に関しては中和抗体の存在とその活性を解析する必要があり、「PAI-1中和抗体の同定及び活性測定法」を中心に、その手法の確立を目指している。

E . 結論

線溶異常症の同定方法の確立と、異常症を惹起する自己抗体の同定方法および活性測定方法の確立に向け努力中である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- . Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T. Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerization. Thromb Haemost 2017 117(5):860-869
- 2. Brzoska T, Suzuki Y, Sano H, Suzuki A, Tanaka H, Urano T. Imaging analyses of coagulation-dependent initiation of fibrinolysis on activated platelets and its

modification by thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. Thromb Haemost 2017 7. 682-690.

2. 学会発表

- . Urano T, Demonstration of Coagulation-Dependent Initiation of Fibrinolysis by Real Time Imaging Analyses in Vitro and in Vivo, The 9th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis, Taipei(Taiwan), October2016

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし