

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））
分担研究報告書

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」の確立を目指す。

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。

することにより、各検体固有の線溶活性、並びに固有のフィブリン安定化程度を検出することができる。今回、全血クロット作成時の、凝固あるいはフィブリン形成過程がどのように溶解時間に影響するかという基礎的事項を検討した。

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」の検証を行い、線溶系因子の異常をどのように反映するか検証する。方法は、採血後の全血をトロンビン処理後、一定時間反応後に生成された D-dimer 量を測定する方法である。その際アプロチニン添加により線溶系を抑制した検体における D-dimer 量と比較

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確立する。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。今回 home-made の種々抗体を用い、測定法の最適化を検討する。

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。また を用いて、正常血漿中の活性型 PAI-1 量への PAI-1 中和抗体の影響を解析し、スクリーニング法として妥当か検討する。

低 PAI-1 活性による出血症例の検討

PAI-1 低値による異常出血症例に関して、遺伝子検査により先天性欠損症を除外するとともに、その原因を検討する。
(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

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

commercial base の抗体の信頼性、並びに供給の継続性を勘案し、home-made 抗体を作成し評価している。Biotin 標識 uPA を用いた活性型 PAI-1 の測定に関しては、すでに良好な検量線を得ており、測定可能となっている。これに関しても home-made 抗体の適性を評価している。

PAI-1 中和抗体の同定及び活性測定法の確立

PAI-1 中和抗体を用いて正常血漿を用いた ECLT への影響を解析した。中和抗体は ECLT を有意に短縮し、抗 PAI-1 自己抗体の検出に有用と考えられた。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症例が増えており、自己抗体の有無を検査は必須である。

低 PAI-1 活性による出血症例の検討

3 症例を検討した。いずれも遺伝子異常は認めず、PAI-1 中和抗体の存在も含め検討中である。

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」と「微量 PAI-1 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。また最近の基礎的研究により、TAFI による線溶制御の重要性を再認識した。これまでの TAFI 活性の測定は、血漿クロット溶解時間を carboxypeptidase inhibitor の存在下、及び非存在下で測定し、その差から TAFI 活性を測定していた。我々の最近の研究で可溶性トロンボモジュリンを添加しないと TAFI の全活性を血漿クロット溶解時間に反映することは難しい事実が明らかになった (Brzoska T, et al, *Thromb Haemost* 2017)。新規の血漿 TAFI 活性測定法の確立を目指し、その生理的意義を再検討する予定である。

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces and Fibrin. *J Thromb Haemost* in press

2. 学会発表

1. Brzoska T, Suzuki S, Suzuki Y, Sano H, Tomczyk M, Tanaka H, Urano T. "Coagulation-dependent initiation of fibrinolysis takes place on the surface of activated platelets, and is targeted by TAFI. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. 2016. 10. 17
2. Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T. "A mutation of highly conserved glycine in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 caused its deficiency due to self-polymerization, which was also observed in other serin proteinase inhibitors. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. 2016. 10. 17
3. 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. 2016.10.9
4. Urano T. "Coagulation-Dependent Initiation and Amplification of Fibrinolysis on Activated Platelets Demonstrated by Confocal Microscopy Imaging Analyses." 62nd Annual Meeting of Scientific

& Standardization Committee of the
ISTH. 2016. 5. 26

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし