

機関番号：30110

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590583

研究課題名 (和文) 可溶性フィブリンの血中動態と血栓症における測定意義に関する研究

研究課題名 (英文) Study on the kinetics of soluble fibrin in blood and the utility of SF measurement in thrombosis.

研究代表者

家子 正裕 (IEKO MASAHIRO)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50250436

研究成果の概要 (和文)：可溶性フィブリン (SF) には様々な複合体が存在しており、血栓形成直前に現れる SF 複合体の血栓早期診断の予測因子なるか検討した。血栓性素因および急性心筋梗塞患者の急性期の FMC 値は有意に増加しており、局所の血管内の血栓も反映することが示唆された。0.2 $\mu$ m および 0.45 $\mu$ m フィルター処理検体による検討では、急性期に高～中分子 SF 複合体が増加した。二次元等電点電気泳動後 F405 を用いた Western Blot による解析でも、急性期に様々な分子量の SF が pH5～10 領域の広い範囲で確認され、血栓形成急性期における SF の多様性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Various complexes of soluble fibrin (SF) are present in blood of patients with thrombosis. We investigated which in various complexes of SF increase immediately prior to the formation of thrombus, and whether the complex is a predictive factor for thrombosis. In patients with thrombotic tendency and with acute myocardial infarction, plasma FMC was significantly elevated in the early stage of thrombosis. Our results suggested that the thrombus formation in a small blood vessel can be reflected on FMC level. The determination of SF in the sample treated with 0.20  $\mu$ m or 0.45  $\mu$ m filter showed that the large ~ intermediate molecule of SF complexes increased in the early stage samples. When western blot analysis using monoclonal anti-fibrin monomer antibody, F405, after the isoelectric focusing electrophoresis, SF of various molecular weight were detected within the wide range (pH5~10 area) in early stage samples, suggesting the variety in blood kinetic of SF complexes in early stage of thrombus formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学

キーワード：臨床検査医学, 凝固線溶学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦においても脳梗塞や心筋梗塞に代表される血栓症に伴う疾患が増加してきている。本邦の死因の 1/3 は血栓が関与していると言われていた。しかしながら、血栓症の早期発見に関しては十分に検討されているとは言い難い。画像検査や病理検査は血栓が形成されてからの検査所見であり、血栓症の予防という観点からは血栓形成の直前を検出できることが理想である。

血中において凝固亢進に伴い prothrombin から thrombin が形成されると、thrombin は fibrinogen に作用し、fibrin monomer (FM) を産生する。FM は fibrinogen や fibrinogen 関連物質と複合体を形成して可溶性フィブリン (soluble fibrin: SF) となる。SF の血中存在様式およびその動態に関しては不明の部分が多い。血栓形成直前の SF を測定することができれば、血栓症の予測をすることができ、多くの血栓形成に伴う疾患の治療予防が可能になると考えられる。

現在、3種類の有用な FM および SF に対する monoclonal 抗体がある。F405 は fibrinogen より FPA を放出した後の FM の Aa 鎖 N 末端に新たにあらわれる構造を認識する抗体である。IF-43 は 1 分子の FM と 2 分子の fibrinogen が複合体を形成した際に Aa 鎖 N 末端に生じる構造を認識する抗体である。また近年開発された J2-23 は fibrinogen が FPA を放出した際に Aa 鎖の C 末端が構造変化を起こし新たに出現した構造を認識する抗体である。これらの抗体を駆使することで、XIIIa で架橋される以前の SF の存在様式および動態を検討することは可能である。

2. 研究の目的

凝固亢進状態における血中 SF の存在様式を解明し、種々の SF が血栓 (安定化フィブリン) 形成まで間にどのように変化して fibrin polymer を形成し stable fibrin nets を形成していくかを明らかにする。さらに、

種々の血栓性疾患を対象にして、どの様式の SF が血栓形成の予測因子になりうるかを明確にする。

3. 研究の方法

(1) 患者血漿での SF, FMC の測定: 血栓性疾患を有する患者よりインフォームドコンセントを行った上でクエン酸添加採血管を用いて静脈血採血を行い、SF, FMC の変動を確認する。特に急性心筋梗塞患者血漿を用いて、①局所の血管 (冠動脈) 内の血栓性病変を反映するかを検討、②線溶療法を行った場合でも SF, FMC は血栓を反映できるかを検討した。

(2) 血漿 SF の形態による分離: ①フィルター処理血漿による検討: 血栓性病態を有する患者より得た静脈血を、0.2 μm および 0.45 μm のフィルターを用いて 2 種類のフィルター処理血漿と無処理血漿の 3 種類の血漿サンプルを作成した。これらの SF および FM をモノクローナル抗体 F405, IF-43 および J2-23 を用いた測定試薬オート LIA FM (ロシュ・ダイアグノスティックス), イアトロ SF (三菱化学メディエンス) およびナノピア SF (積水メディエンス) で測定した。②二次元電気泳動による解析: 患者血漿をプロテアン IEF セルラーゼ レディゲルラーゼゲルシステム (Bio-Rad) および IPG ストリップゲル pH3-10 を用いて二次元電気泳動を行った後、ゲルからセルロースアセテート膜に転写し peroxidase 標識抗 FM 抗体 F-405 を用いて Western Blot を行った。セルロース膜を分子量で 2 分画および電気移動度で 3 分画に分け (図 1)、SF が存在する部位を確認した。

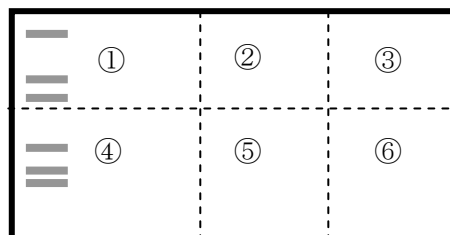


図 1. SF の 2 次元電気泳動による分画分析

#### 4. 研究成果

##### (1) 患者血漿での SF, FMC の測定

①血栓性素因での測定：先天性プロテイン S 欠損症や抗リン脂質抗体症候群などの血栓性素因を有する患者および明らかに深部静脈血栓症などの血栓症を呈している患者（血栓症群）45 例を血栓形成急性期と回復期に分けて FMC を測定した。Control 群（n=50：4.2±1.6 μg/ml）と比べ、急性期群（22.4±24.1）および回復期群（6.8±0.9）で有意に増加を認めた。一方、これらの FMC 値とイアトロ SF および ナノピア SF との相関は control 群では良好な相関だったが、血栓症群ではそれぞれ r=0.750 および r=0.782 とは弱い相関を示した。血栓症で二次線溶が進むと FMC と SF に乖離が生じ、それは各測定キットのモノクローナル抗体の性質によるものと考えられた。我々の以前の検討（Ieko M, et al: Clinica Chimica Acta 386; 38-45, 2007）より、線溶活性が存在する場合でも FMC は正確なフィブリンモノマー産生を反映しているものと思われる。

②急性心筋梗塞症例での測定：急性心筋梗塞症例を急性期（発症 48 時間以内）と回復期（発症後 120～600 時間）で FMC を比較した。急性期の FMC の増加を確認した（図 1）。これは FMC および SF が局所の血管における血栓形成を反映しうることを証明した。また、線溶療法が行われていても FMC の値には影響されなかった。

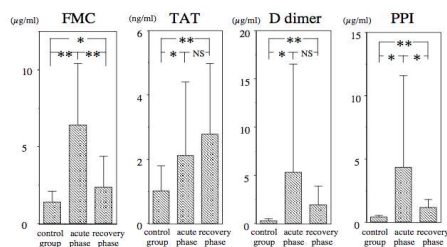


図 2. 急性心筋梗塞症例における FMC 値

#### 2. 形態による SF の分離とその意義

##### (1) フィルター処理血漿による検討：血

栓症患者の血漿には、0.45μm フィルターで除去される高分子 SF が平均 20.2%、さらに 0.20μm フィルターで除去される中等度分子 SF が約 2.7%、そして 0.20μm フィルターでも除去されない低分子 SF が 77.1% 存在した。血栓症急性期では高分子および中等度分子 SF の割合が増加し、回復期では低分子 SF の割合が再び増加する傾向が認められた。二次線溶を反映するものと考えられる。しかし、統計上は有意差を認めなかった。血漿作成中に試験管内で高分子 SF が線溶活性を受けて中等度～低分子 SF へと変換されている可能性も否定できない。

(2) 二次元電気泳動による解析：血栓症患者血漿を等電点電気泳動後、抗モノクローナル FM 抗体 (F405) を用いた Western Blotting を行い SF の分布を二次元で解析することができた（図 3）。

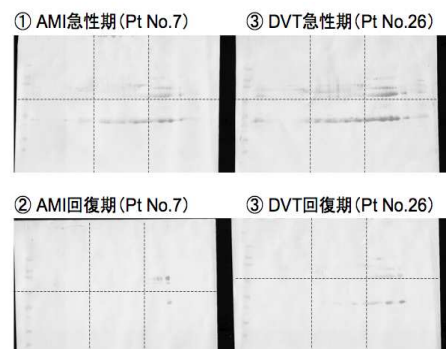


図 3. 二次元電気泳動による血漿中 SF の解析

SF 分布を認めた（図 3 上図①、③）が、回復期には高分子を中心とした pH10 付近の SF が中心であった（図 3 下図②、④）。この方法により二次元的に増加する染色スポットで血栓形成の時期が推定できる可能性がある。しかし、上記と異なる症例も少なくなく、症例を増やして検討予定である。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Hayakawa M, Sawamura A, Gando S,

- Kubota N, Uegaki S, Shimojima H, Sugano M, Ieko M: Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both by plasmin and neutrophil elastase. *Surgery* 149: 221-230, 2011.
2. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Nakabayashi T, Kanazawa K, Mizukami K, Mukai M, Atsumi T, Koike T: Increase in plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor may not contribute to thrombotic tendency in antiphospholipid syndrome because of inhibitory potential of antiphospholipid antibodies toward TAFI activation. *Int J Hematol* 91: 776-783, 2010.
3. Ieko M, Naito S, Yoshida M, Kanazawa K, Mizukami K, Sato H, Yui T, Nakabayashi T, Hirabayashi T, Oguma Y: Plasma soluble fibrin monomer complex as a marker of coronary thrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med* 219: 25-31, 2009.
4. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, Bohgaki M, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T: The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 60: 2457-2467, 2009.
5. 家子正裕 : 可溶性フィブリンモノマー複合体の測定試薬の特性. *検査と技術* 36: 430-433, 2008.

[学会発表] (計2件)

1. 家子正裕 : 抗リン脂質抗体症候群の症状診断と治療に臨床検査がいかに関わるかー特に可溶性フィブリンの有効性についてー. 第11回日本検査血液学会学術集会, 東京, 2010.
2. 家子正裕 : 抗リン脂質抗体による凝固亢進と血栓形成. シンポジウム「血栓性素因の病態と診断の進歩」. 第9回日本検査血液学会学術集会, 津, 2008.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :

出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

家子 正裕 (IEKO MASAHIRO)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 50250436

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :