

## 第 70 回 SSC2024 学術報告 - 19 -

Subcommittee on Fibrinolysis Session: SSC Session - Fibrinolysis

幹事 関 泰一郎

2024 年 6 月 24 日 16:30 - 18:30

Room: 210 A-D

Moderator: Tetsumei Urano, JP

Gael Morrow, UK

Ze Zheng, US

### Introduction

Tetsumei Urano, JP

Subcommittee on Fibrinolysis では、線溶系が生体内や血漿においてどのように調節されているかに焦点を当てて研究を進めてきた。今回は、これらの因子の異常に焦点を当て、以下の 2 つのセッションにより討論を行う。

- 1 線溶制御系の障害による出血（座長：Gael Morrow, Tetsumei Urano）
- 2 外傷患者の線溶耐性能力を評価するための迅速な測定系（座長：Ze Zheng, Tetsumei Urano）

線溶は血栓形成後、迅速に血栓を分解除去する機構であるが、3 つの異なる制御系により調節されている。Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は、遊離の tissue-type plasminogen activator (tPA) 活性を制御し線溶を調節する。Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) -thrombomodulin (TM) システムは、fibrin の C-末端リシン残基を切除し、fibrin の安定化に寄与する。 $\alpha_2$  antiplasmin ( $\alpha_2$ AP) は、液相での plasmin 活性を迅速に阻害し、架橋 fibrin を保護する。最初のセッションでは、線溶系因子の障害による出血、原因不明の出血ならびに未分類の出血性疾患について Will Thomas 博士が話題提供する。

Takayuki Iwaki 博士は重篤な出血症状を示す 2 つの異なる PAI-1 欠損症について、Magdalena Lewandowska 博士はアメリカ合衆国からはじめて報告された PAI-1 欠損症の家族の出血傾向について、Futaba Nonaka 博士は Protein C 欠損と TAFI 欠損の表現型を示す TM-Nagasaki (長崎) について報告する。また、第一のセッションの最後に線溶系因子の障害によっておこる出血傾向に対する診断のガイドライン作成のための提言をしたい。第二のセッションでは、長年この SSC Subcommittee on Fibrinolysis で議論されてきた外傷患者の線溶耐性能力を評価するための迅速な測定系について Ernest E. Moore 博士に紹介していただく。

### Bleeding of unknown cause and unclassified bleeding disorders

Will Thomas, UK

血液学者が診断を依頼される出血傾向の患者の多くは「原因不明の出血性疾患 (BDUC) (Introduction slide には、unclassified bleeding disorder (UBD) ; bleeding of unknown cause (BUC) とも表記されていた)」に分類される。2018 年の Gebhart らのウィーン出血バイオバンク (Vienna Bleeding Biobank: VIBB) の研究では 73%の患者が BDUC と診断され、これは、近年 BDUC の診断が増加していることを示す他の研究とも一致し、この 10 年間で BDUC は最も一般的な軽度の出血性疾患として認識されるようになった。BDUC の定義は研究グループによって若干異なる。全てに共通するのは非血液学的な出血原因 (壊血病など) が除外されており、臨床的に重要な出血傾向を呈する患者であること、通常の血液凝固検査では異常が検出されないことであるが、診断および治療に関する明確なガイドラインはまだ整備されていない。

BDUC 患者の出血表現型は、血小板機能障害や von Willebrand 病と区別できず、症状としては重度の月経過多、出産後の出血、手術中または手術後の過度の出血、鼻出血、血腫などであり、出血リスクに対する懸念は BDUC 患者の QOL にも悪影響を与える可能性がある。特に、明確な診断基準がないことが止血上の問題に対する対応を困難にしている。

このような出血の原因を解明する必要があるが、これまでに BDUC における

病態生理学的な出血メカニズムに関する報告はいくつかある。例えば、異なる 7 つの研究グループによって Thrombin Generation Assay (TGA) による検討がされている。Gebhart らのグループによる研究では、BDUC 患者は健康なボランティアと比較して、thrombin 生成時間の遅延、ピークまでの時間の延長、または最大 thrombin 生成の減少が報告されたが、全体的には 3 件がこのような positive な結果で他の 4 件ではこれらの結果は確認されなかった。これらの不一致は、thrombin 生成方法の違いになどによるものと考えられている。PAI-1、tPA、TAFI、 $\alpha_2$ AP などの線溶系因子や線溶機能に関しても euglobulin clot lysis time (ECLT) を測定して解析されている。講演ではこれらの測定結果を報告している 6 報の論文の概要について紹介された。Valke らによる最近の研究では、BDUC 患者の 21% で ECLT が延長し、16% で PAI-1 抗原ならびに活性レベルが低下していたが、他の研究では相反する結果も報告されている。High-throughput DNA sequencing による解析では、619 名の BDUC 患者の 3.2% に遺伝子欠損があった。遺伝子検査による診断の成功率は、検討を行った 619 名の患者においては低かったが、研究に用いられた遺伝子パネルが、出血や血栓症に関連する既知の遺伝子に限定されている点にも注意する必要がある。

以上要約すると、

- 1) BDUC の病態生理学的な出血メカニズムが解明されていないので今後さらなる研究が必要である。
- 2) これまでの BDUC に関する報告では、標準化されたアプローチがなされていない。
- 3) BDUC において線溶系の異常はまれである可能性があるが、その異常は顕著である。
- 4) BDUC 患者は、異なる原因により出血症状を引き起こしている可能性があり、明確な診断基準が求められていることが報告された。

ISTH からは最近以下のような論文が発表されている。

Baker RI *et al.*, ISTH SSC Von Willebrand Factor, Platelet Physiology, and Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis. Standardization of definition and management for bleeding disorder of unknown cause: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2024 Jul;

## Two distinct genetical PAI-1 deficiency in Japan

Takayuki Iwaki, JP

演者らが経験したはじめての PAI-1 欠損症患者と PAI-1 研究のタイムテーブルをまず示す。彼女は 1963 年生まれで、出生時に臍出血、5 歳時 (1968 年) に心室中隔欠損修復手術後の術後出血、10 歳時 (1973 年) に抜歯後の歯茎からの長時間の出血など、複数回の大出血を経験した。15 歳 (1978 年) で初潮があり、その際に命に関わる大量出血 (血液 13 ㍓以上) を経験した。その後 26 歳時 (1987 年)、27 歳時 (1988 年)、29 歳時 (1990 年) に妊娠した。これを PAI-1 研究の歴史と合わせると、PAI-1 は、1984 年に発見され (21 歳時)、1984 年 (23 歳時) に cDNA がクローニング、1988 年 (27 歳時) にゲノム DNA の解明、1992 年 (31 歳時) に世界で初の PAI-1 欠損症の報告、1993 年 (32 歳時) に PAI-1 遺伝子欠損マウスが作製されている。したがって、本日紹介する我々の PAI-1 欠損症例に関しては、PAI-1 が発見され、欠損症が報告される以前のものであり、PAI-1 が関与していることは知る由もなかった。

この症例について様々な検査を行ったが、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、血小板数、血小板機能、血漿 fibrinogen、von Willebrand factor (VWF)、 $\alpha_2$ AP、および第 VIII 因子、第 IX 因子、第 XIII 因子は正常であった。妊娠について報告する前に、このスライドを示しておきたい。ヒトの胎盤には、胎盤胎児部と胎盤母体部の間に母体の fibrin を主成分とする fibrinoid layer がある。

最初の妊娠は 26 歳で、16 週までの経過は順調であった。その後少量の性器出血が観察され、fibrinogen の減少、血漿 D-dimer の上昇がみられ新鮮凍結血漿 (FFP) が投与された。しかし、18 週末に血漿 D-dimer のレベルが突然上昇し、19 週で大量の性器出血が見られ流産した。その後、血漿 D-dimer は減少し、約 1 週間で出血は止まったが、合計 35U の FFP を使用し、総失血量は 5.1 ㍓であった。

2 回目の妊娠は 27 歳のときで、妊娠が 7 週目に確認されると、すぐに入院し

FFP の継続的な投与を行った。妊娠 25, 6 週目に突然出血が起きたが制御可能であった。その後、血漿 D-dimer の上昇、制御不能な子宮収縮が見られたため、緊急帝王切開により出産した。2 回目の妊娠では、361U の FFP を投与し、総失血量は 7.2 ㇿに及んだ。

3 回目の妊娠は 29 歳であったが、2 回目の妊娠とほぼ同様な経過をたどった。前回の妊娠管理が成功したことを踏まえ、8 週目で入院し、継続的な FFP 投与が開始された。妊娠期間を通じて少量の性器出血があった 25 週目から出血量は増加し、胎盤早期剥離に伴う制御不能な子宮収縮が見られたため、再び緊急帝王切開が行われた。3 回目の妊娠では、441U の FFP を投与し、総失血量は 8.4 ㇿに及んだ。第 2 回、3 回の妊娠により誕生した女兒は健康で症状はなかった。

今回、経験した PAI-1 欠損症の患者の症状は、無 fibrinogen 血症や先天性第 XIII 因子欠損症を想起させた。実際、fibrinogen や第 XIII 因子の欠損マウスの表現型は、ヒトの症状と酷似している。一方、非常に混乱させる事実として、PAI-1 欠損マウスには完全な生殖能力があり、致命的な出血を起こすことなく正常に妊娠、分娩する。転機が訪れたのは、大学院生がこれらの患者の家族の ECLT を測定したときである。患者の夫の ECLT は、カルシウムイオンの添加により短縮したが、本人と娘 2 名は短縮しなかった（カルシウムイオン添加による thrombin 依存性の PAI-1 量の減少による短縮が起こらなかった）。そこで、血漿 PAI-1 濃度を測定することとした。その結果、患者本人の血漿 PAI-1 は検出されず、夫は 8.0 ng/ml、第一子 4.0 ng/ml、第二子 7.0 ng/ml であった。我が国では 2 つの民間の検査会社が ELISA による血漿 PAI-1 濃度の測定を受託しているが、検出限界は 10 ng/ml であり、若い女性の半数は検出限界以下の検査結果を示す。さらに、PAI-1 遺伝子のすべてのエクソンについてダイレクトサンガーシーケンスを行ったところ、夫は正常であったが、患者のエクソン 3 に一塩基の挿入があり、娘たちはヘテロ接合体であった。この変異遺伝子を COS-1 細胞に導入すると、細胞内にはのみ低分子量の PAI-1 がわずかに発現していたが、細胞外には分泌されていなかった。

われわれが経験した最初の PAI-1 欠損症の症例を要約すると、一般的な臨床検査では凝固・線溶因子は正常なパターンを示すが、出血による創傷治癒の障害、生命を脅かす過多月経がおこる。自然妊娠するが、妊娠の維持には大量の FFP の投与が必要であり、D-dimer レベルの上昇とともに制御不能な性器出血がおこ

り、妊娠 30 週前後に緊急帝王切開が必要となった。

第 2 例目の PAI-1 欠損症は、2010 年に 67 歳でくも膜下出血を発症した患者の血管造影の際の止血異常を発端に解析された。

この患者の PT、APTT、血小板数、第 XIII 因子、 $\alpha_2$ PI をはじめとした凝固・線溶系因子は正常であった。これまでの病歴チェックから、抜歯時の大量出血、15 歳の時に生命を脅かす過多月経、3 回の自然妊娠は、いずれも生命を脅かす出血をとともう自然流産となった。また、出血による創傷治癒の障害も見られ、先に報告した第一例と酷似した症状を示したので遺伝子解析を行った。その結果、エクソン 9 に一塩基置換が見つかった。これにより C 末端から 6 番目のグリシンがアルギニンに置換されていた。当初この変異の重要性を感じなかったが、この遺伝子を細胞に発現させると翻訳産物は細胞外に分泌されなかった。Blue-native PAGE と Western blotting により解析したところ、PAI-1 が凝集していることが明らかになった。このグリシンを他のアミノ酸に変換した変異体を作製したところアルギニンの荷電が重要ではないことが明らかになった。また、結晶構造解析を見ると、s5B 領域のグリシンはほぼすべての SERPIN で保存されており、立体構造の維持に重要なアミノ酸残基であることが考えられた。

これまでの研究から、独自の ECLT 測定法を利用し、わが国の 2 つの PAI-1 欠損症を見つけることができた。さらに 4 例の ECLT 陽性例が存在するが、これらのゲノム解析の結果、*SERPINI* 遺伝子は正常であったことから、今後ゲノム変異を伴わない PAI-1 欠損症の存在に注目する必要がある。

## Genetical PAI-1 deficiency and their treatments

Magdalena Lewandowska, US

### PAI-1 deficiency: Experience from an older Amish kindred in Indiana

まず PAI-1 に関して、今回の講演に関連する重要な内容についてお話しておく。PAI-1 欠損症患者に対して標準的な血液検査を実施すると PT、APTT は正常であるが、ECLT は線溶活性の増加により短縮する。PAI-1 活性の測定に関しては、正常値がゼロから始まることから、正常と異常を区別することが困難で

あり、また結果の解釈に関しても標準化されていない。PAI-1 抗原も測定する必要があるが、異常 PAI-1 タンパク質に対しては有効でないことが問題である。

ここでは、インディアナ州南部のアーミッシュの女性の PAI-1 欠損症の例について紹介する。アーミッシュはシンプルな生活と自立を重んじ、電気、水道、電話、テレビ、インターネットなどの近代技術を使用せず、コミュニティの伝統や価値観を守っており、現代医療からも隔離されている。閉鎖的なコミュニティの中で結婚が行われるため、特定の遺伝性疾患が比較的多く見られる。彼女は、3歳で帽状腱膜下血腫、8歳で口蓋出血を起こし、入院して輸血治療を受けた。PT、APTT、血小板数、第Ⅷ因子、第Ⅸ因子、第ⅩⅢ因子、 $\alpha_2$ PI は正常で、出血時間 (BT) は9分であった。Total tPA は 5.9 ng/mL、free tPA は 3 ng/mL、血漿ならびに血小板 PAI-1 抗原量、活性は検出限界以下であった。この患者の *SERPIN1* のエクソン4には、ホモ接合型のフレームシフト変異 (c.669\_700dupTA→null allele) が確認された。患者の両親は、ヘテロ接合型で、10名の兄弟のうち患者を含めて2名がホモ接合型の変異、3名の兄弟はホモ接合型の正常遺伝子、5名がヘテロ接合型であった。患者を中心に7代まで遡って家系図をチェックし、この PAI-1 欠損症の血族分析を行った。その結果、1800年代の初頭にスイスで生まれたカップルの12名の子供のうち2名がこれまでに特定されたすべてのアーミッシュの PAI-1 ヘテロ接合体の祖先であると推察された。これらの生存子孫は推定1万人で、保因者は1500人以上にのぼる可能性がある。現在までに686名が検査され、127名にヘテロ接合体が検出された。このコミュニティについて約30年間観察したところ、怪我に関連した軟部組織の出血、アザ、筋肉血腫、関節症、抜歯による口内出血、肝臓裂傷による血腹膜炎、帽状下出血、頭蓋内出血、婦人科関連では、過多月経、出血性卵巣嚢腫破裂、出産前出血、早期流産、産後出血、創傷治癒の遅延などが観察される。現在、これらの治療には、トラネキサム酸やイブシロンアミノカプロン酸などの抗線溶薬の経口または静脈内投与、FFPなどが使用されている。また、PAI-1 欠損と cardiac fibrosis (CF) について研究を行ってきた。PAI-1 欠損マウスでは、心臓の損傷後の CF が悪化する。心筋細胞は心臓における TGF $\beta$  の供給源であり、心筋細胞における PAI-1 発現は TGF $\beta$  の合成をフィードバック阻害している。PAI-1 の欠損により、TGF $\beta$  が増加し、心臓の線維化が悪化することが考えられる。PAI-1 欠損症は、抑制性の Smad6 の心臓レベルの低下と関連している。すなわち PAI-

1 の欠損により抑制性 Smad6 が減少し、心線維化が亢進する。

上述のアーミッシュの 15 歳から 35 歳の PAI-1 ホモ接合体の 10 人中 7 人に 1-19%の心線維化が MRI により観察された。線維化率 19%の患者は駆出率が 32%と低く、数年前に心突然死を起こした。この患者は PAI-1 欠損患者における CF の最初の症例となった。

現在 PAI-1 欠損症のホモ接合体の CF に対する特異的な治療法は確立されておらず、また、未治療の場合心不全を起こす可能性がある。いずれにしても PAI-1 欠損症における CF を個別に予測する基本情報はなく、これらに関する基礎的な知見を得るためのインターベンションを早急に始める必要がある。

本日述べた PAI-1 欠損のホモ接合体についてまとめると、PAI-1 欠損症はまれであるが、我々が診ている患者は *SERPIN1* エクソン 4 のホモ接合性のフレームシフト変異 (c.669\_700dupTA→null allele) により不活性あるいは不安定な PAI-1 mRNA/タンパク質が合成される。ホモ接合型の PAI-1 欠損症では、受傷後の外傷性出血や婦人科・産科領域の自然出血、また、重度の出血がみられる場合がある。これらの出血は、経口または静脈内への線溶阻害剤投与により効果的に治療することができる。CF は、PAI-1 欠損症の深刻な合併症である。8 世代 21,000 人の家系の中にヘテロ接合性の両親とホモ接合性欠損症のリスクのある子供を持つ 5 つの家族が存在し、11 名のホモ接合体が同定されている（うち 10 名が生存）。ヌル対立遺伝子の保因者は、出血異常や CF を起こさない。

未解決の問題で今後なすべきこととして、診断と出血管理に関しては、出血性疾患に対する認識の向上、確立された検査による発生率／有病率の検証、PAI-1 異常タンパク質の診断を行うための検査法の確立、検査結果の誤解による過剰診断の予防、遺伝子診断の確立と検証、個々の症例（表現型）に基づいた重症度のカテゴリ化などが必要である。CF に関しては、PAI-1 欠損症の患者すべてにリスクがあるのか（例えば完全欠損のみか？）、CF 発症年齢と進行速度に関する情報も不足しているので PAI-1 欠損患者は CF 診断のゴールドスタンダードである MRI を受ける制度の確立も必要である（現在 CF の代替バイオマーカーは存在しない）。CF を予防、改善するための特別な治療法はなく、現在は対症療法のみである。CF は心筋細胞内の PAI-1 欠損によるものであるが、血漿交換や PAI-1 の補充により CF が予防または改善できるか今後検討が必要である。

## Thrombomodulin Nagasaki Futaba Nonaka, JP

Thrombomodulin (TM) は、内皮細胞表面に発現する thrombin 結合タンパク質で、凝固や炎症を制御する。本日、我々は thrombin 結合ドメインの変異タンパク質 (G412D=TM-Nagasaki) に起因する TM 機能不全のはじめての症例を報告する。この患者は、現在 18 歳の男性で生後 3 か月から皮下出血を繰り返し、入退院を繰り返している。彼は 3 つ子の 3 番目で、彼の両親は血族婚 (再従兄弟・姉妹) で血液疾患の家族歴はない。臨床検査の結果、血小板数、PT、APTT、Protein C 活性には異常値は見られなかったが、凝固系の数値に異常がみられ、FDP、D-dimer、TAT、PIC の上昇、fibrinogen 濃度の減少に加え、TM は検出限界以下であった (<1.0 : 正常値 2.3-3.7 ng/mL)。TM 欠損の臨床例は報告されておらず、我々はこの患者が TM 欠損の病理を説明できる可能性を考えた。

Thrombin は、フィブリン網の形成を促進し、同時に TM に結合することによって Protein C と TAFI を活性化する。活性化された Protein C は凝固を阻害し、フィブリン網の形成を阻害する。また、TAFI は抗炎症作用を示す。TM 欠損が起こっていると仮定して、その病態生理に関する仮説を立てた。TM が存在しないと、thrombin は TM に結合することなく直接フィブリン網を形成すると同時に Protein C や TAFI の活性化は減少する。これにより凝固系と線溶系が同時に亢進して非出血時においても凝固因子は消費され、慢性的な出血傾向を示すと考えた。そこでこの患者の末梢血単核細胞から RNA を調製し、RT-PCR により TM mRNA 発現量を調べたところ健常対象者と差はなく、また、ポリクローナル抗体を用いた ELISA では血中濃度は正常範囲であったが、thrombin 結合部位を認識するモノクローナル抗体を用いた ELISA では TM は検出されなかった。これらの結果から、患者 TM の thrombin 結合部位に変異がある可能性が示唆された。患者の遺伝子のダイレクトシーケンシングを行ったところ TM の thrombin 結合部位 (EGF5 ドメイン) に変異があり 412 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換されるホモ変異が起きていた。他の家族にはヘテロ変異が起きていた。この TM 変異タンパク質を我々は TM-Nagasaki と命名した。次に TM-Nagasaki の機能について検討した。Thrombin 結合能を *in vitro* で検討したところ、TM-Nagasaki は thrombin に全く結合しなかった。また、正常ボランテ

ィアの血漿に正常ヒト組換え TM、TM-Nagasaki を種々の濃度で添加して PT、APTT、Total Clotting Time を測定したところ、TM では濃度依存的な延長が観察されたが、TM-Nagasaki では全く変化しなかった。Thrombin Generation Assay では TM は濃度依存的に Thrombin Generation を阻害したが、TM-Nagasaki では阻害は観察されず、抗凝固活性がないことが示唆された。Protein C と TAFI の活性化についても TM と Recomodulin® (native TM と同様の活性を有する組換え TM 細胞外ドメイン) はほぼ同様に両者を活性化したが、TM-Nagasaki は全く活性化しなかった。

この患者に対して出血期には FFP と Recomodulin®の投与を行ってきたが、加齢とともに出血はより深部へ、また、頻度、重症度も悪化傾向にあるため週一回の Recomodulin®の投与を行っている。ROTEM を用いた凝固・線溶機能の測定では、顕著な効果は得られていない。Recomodulin®の半減期は短いことから、今後適切な投与量や投与期間を検討していく必要がある。

Proposal for establishing guideline for rare bleeding disorders caused by  
dysfunction of fibrinolysis inhibitors  
Tetsumei Urano, JP

ここでは、線溶阻害因子の機能不全に起因する稀少出血性疾患に対するガイドラインの策定について提案したい。これらの的確な診断、治療に加えて治療費などの経済支援の面でもガイドラインは重要である。先に報告のあった TM-Nagasaki の治療においても高価な組換え体タンパク質を大量に必要としていた。これらの患者の出血の特徴については、広く産婦人科、小児科など臨床医の間で共有される必要がある。また、ガイドラインには、「確実な」患者（確定診断）のみならず、「可能性の高い」患者も含めるべきである。

症状に関しては、1.遅発性出血 2.外傷、外科手術、抜歯、月経、妊娠に関連した出血 3.繰り返される出血 などが上げられる。

最も難しい問題ではあるが、臨床検査に関しては以下の 4 点にまとめられる。

## 1. D-dimer (FDP) と plasmin- $\alpha_2$ AP complex (PAP) の上昇

これらの変化は通常状態では観察されず、何らかの傷害時に測定して見る必要がある。同時に第 XIII 因子が正常であることを確認する必要がある。

## 2. PAI-1 欠損症

PAI-1 タンパク質濃度、PAI-1 活性を測定する必要があるが、これらは通常 (特に若年女性では) 検出限界以下であることに注意する必要がある。ECLT の測定による PAI-1 活性の低下について検討する必要がある。ECLT は古典的な方法ではあるが、tPA 濃度と正の相関、total PAI-1、free PAI-1 と負の相関を示す。またカルシウムイオンの添加により ECLT は短縮する。これは ECLT 測定反応において、クロット形成による thrombin の生成により PAI-1 が分解されることによる。したがってカルシウムイオン存在下での成績と比較することにより PAI-1 の欠損を確認することができる。現時点で、このカルシウムイオン添加 ECLT 法は、PAI-1 欠損患者のスクリーニングに役立つ方法の一つである。

## 3. $\alpha_2$ AP 欠損

ELISA ならびに活性測定により判定可能である。 $\alpha_2$ AP の血中濃度は PAI-1 と比較すると 1000 倍高いので測定には信頼性がある。

## 4. TM-TAFI の異常

TM-TAFI の異常に関しても優れた検出方法がないのが現状である。TM は内皮細胞に結合したタンパク質であるが、可溶性 TM が一定量血漿に存在している。先の講演の TM-Nagasaki の例でも特定のエピトープに対するモノクローナル抗体を使用した ELISA により欠損は確認できている。また我々は低 TM-TAFI を検出することができる plasma clot lysis time (PCLT) assay を確立している (plasma (37.5%)、tPA (1 nM)、thrombin (1 U/mL)、CaCl<sub>2</sub> (10 mM)、soluble TM (5 nM)、TAFIa 阻害剤 (1  $\mu$ M))。この tPA 添加測定系では、TAFIa の阻害剤の有無によって内因性 TAFIa の活性を測定することができる。この方法を TM-Nagasaki に適用してみたところ、非常に短い PCLT を示し、TAFIa 阻害剤の影響は受けなかった。さらに TM-Nagasaki 患者に Recomodulin®を投与後、血漿を調製して PCLT を測定したところ、PCLT は正常化し、またこれらの血漿

に TAFIa 阻害剤を添加したところ、PCLT の短縮が観察された。このように Clot Lysis Time の測定は、線溶系因子やその制御因子の機能、その異常の同定に非常に有用であるといえる。しかしながら  $\alpha_2$ AP、TM-TAFI、PAI-1 などすべての因子の機能を反映した結果が得られるので、それぞれに特異的な阻害剤を適宜使用してそれらの寄与度を判定していくことが肝要である。また、これらの生化学検査ののち適切な遺伝子解析を実施することが必要である。

遺伝率に関しては、若年発症（40 歳以下）、家族歴、また、鑑別診断においては、血小板の機能障害、凝固因子の機能障害に加えて、DIC、AL アミロイドーシス、腹部大動脈瘤、APL などに続発する二次性の線溶亢進症に注意しなくてはならない。

### Novel quick assays for hyper-fibrinolysis mediated bleeding

Ernest E. Moore, US

これまでに Moore 博士らは、線溶表現型について臨床データを基に病態との関連について報告してきている。2 年前の第 67 回 SSC (Subcommittee on Fibrinolysis ; 2022 年 7 月 12 日) では、臨床において簡便、迅速に線溶を評価する検査法として、rapid conventional thromboelastography (rCTEG) を用いた clot 形成後（最大振幅後）30 分の溶解能 (Ly30) を測定する方法の有用性について報告している。その中で、LY30 が 0%、D-dimer が 2,600 ng/mL を超えると、線溶は完全に停止し、深部静脈血栓症 (DVT) などの血栓性イベントのリスクが著しく上昇すること、また、線溶の表現型を Fibrinolytic Shut-down (Ly 30: <0.8%)、生理的な線溶状態 (Physiologic, Ly 30: 0.9-2.9%)、Hyper (Ly 30>3%) と定義し、死亡率や救命率との関係について報告した。

今回は、従来の rCTEG に加えて、tissue-type plasminogen activator (tPA) を添加した TEG (tPA-TEG) により線溶抑制因子が枯渇した状態で測定すると、従来判定できなかった外傷後の Fibrinolytic Shut-down と低線溶を区別することができることと仮説を立て、外傷後の線溶表現型をさらに細分化し、死亡リスクをより適切に分類・評価しようとした。

外傷後 2 時間以内に rCTEG と tPA-TEG が実施された成人外傷患者 981 人を

対象とし rcTEG の LY30 を指標として、まず線溶の表現型を Fibrinolytic Shutdown (Ly 30: <0.8%)、生理的な線溶状態 (Physiologic、Ly 30: 0.9-2.9%)、Hyper (Ly 30>3%) に分類し、さらに Youden Index を用いて tPA-TEG LY30 を指標に 9 つのグループを生成し、それらの死亡リスクについて評価した (表)。

表.9 つの線溶表現型

	rTEG LY30 <0.9% shutdown	rTEG LY30 0.9-3% normal	rTEG LY30 >3% hyperfibrinolysis
tPA LY 30 >35.5% sensitive	51(5%)	71(7%)	91(9%)
tPA LY 0.4-35.5% normal	185(19%)	392(40%)	135(14%)
tPA LY 30 <0.4% resistant	32(3%)	15(2%)	9(1%)

n=981

9 つの線溶表現型のうち 5 つは、死亡率の増加と関連していた。全体として、9 つの表現型は rcTEG または tPA-TEG 単独よりも死亡率の予測精度が高く、これらは多項ロジスティック回帰分析により 3 つの表現型 (true hyperfibrinolysis, early fibrinolysis shutdown, and hypofibrinolysis) に集約することができた。このように rcTEG と tPA-TEG の組み合わせにより、死亡率の予測精度は向上し、また、治療戦略による改善が期待される。tPA-TEG 感受性と血漿線溶系阻害因子の相関を見てみると、PAI-1、 $\alpha_2$ AP は負の相関、PAP は正の相関を示した。

さらにこれらの阻害因子に着目し、Suzuki らと共同研究で行ったドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、Triton X-100 を用いた新しい Turbidity Assay について紹介した。SDS は陰性荷電のイオン性界面活性剤であり、Triton X-100 は非イオン性の界面活性剤である。SDS は、SERPIN やセリン酵素の疎水性部位に結合してこれらの活性を阻害し、また、 $\alpha_2$ AP と plasmin の結合を解離させる。Triton X-100 は SDS とタンパク質の疎水結合をキャンセルして活性を復活させることができる。

*In vitro* での精製タンパク質を用いた plasmin generation assay では、SDS 処理により活性化は完全に抑制されるが、Triton X-100 の処理により活性は完全に回復する。また、正常血漿を用いた plasmin generation assay では、吸光

度の上昇はほとんど起こらないが、SDS / Triton X-100 の処理により顕著に上昇する。一方、 $\alpha_2$ AP 欠損血漿では、正常血漿と比較して吸光度の上昇は顕著であるが、SDS / Triton X-100 の処理の影響はほとんど受けないことから、 $\alpha_2$ AP の寄与がないことが理解できる（この界面活性剤を使用した assay では、 $\alpha_2$ AP、PAI-1 の影響を排除して反応を測定することができる）。

上述の 9 つの表現型（表）の貧血小板血漿ならびにヒト thrombin、tPA、塩化カルシウムを用いて 0.1% SDS / 1% Triton X-100 の存在下、非存在下で Plasma Clot Turbidity Assay（clot lysis assay）を行った（n=5）。その結果 tPA sensitive では、turbidity assay の吸光度変化は 0.1% SDS / 1% Triton X-100 の影響を受けずに同一のラインを描き、tPA resistant では、0.1% SDS / 1% Triton X-100 添加により吸光度の変化は短縮された。この新しい fibrinolysis resistance capacity (FRC) assay は、 $\alpha_2$ AP、PAI-1 の影響を排除して反応を測定することができ、重症外傷患者の線溶表現型を評価できる測定系として期待されている（実際、0.1% SDS / 1% Triton X-100 添加後の血漿 PAP 濃度は、添加前の血漿と比較してほぼ消失していた。なお、質疑応答において、陰性荷電したヘパリンの影響について質問があったが、まだ検討されていないとの回答であった）。

以 上