

線溶系検査に求められるもの

浦野哲盟^{1,2*}, 鈴木優子³

What we want to know from the laboratory tests on fibrinolysis

Tetsumei URANO, Yuko SUZUKI

要約：線維素溶解（線溶）系は様々な要因で活性化が時空間的に制御されており、その破綻が血栓症発症や出血のような病態につながる。線溶系は基本的にフィブリン（線維素）形成後に発動するため、血小板および凝固系活性化、フィブリン形成、また血管内皮細胞の影響を強く受ける。従って播種性の血管内凝固や、炎症および広範な内皮障害等では、線溶系も大きく変動する。刻々と変化する病態の正確な把握には、線溶系の精緻な制御系の理解と、必要に応じた検査の実施と結果の適切な解釈が不可欠である。各因子の抗原量、活性に関しても凝固系も含めた全体像の中での解釈が必要である。凝固系とは異なり線溶系では活性の包括的測定法がまだ確立されていない。最近提唱されているいくつかの新規測定法が本特集でも紹介されている。各々が時空間的制御機構のどの部分に焦点を当てた検査方法であるかを理解し、結果を正しく解釈することが必要である。

Key words: fibrinolysis, global fibrinolytic assay, α 2-Antiplasmin, TAFI, PAI-1

はじめに

線維素溶解（線溶）系の役割は不要な血栓を溶解し除去することにより血流を維持することであり、その抑制系の役割は未熟止血血栓の早期溶解や、不要な部位での線溶活性の過剰発現による出血を防ぐことにある。生体内では凝固系と同様に多くの生理的因子により活性発現及び制御が修飾されている¹⁾。特に血管内皮細胞、凝固系活性化あるいはフィブリン形成は線溶系の活性化及び制御機構に大きく影響する。これらの修飾はいずれも生体内の必要な場所で、必要なタイミングで線溶活性を発現するために必須の機構であり、線溶活性の時空間的制御として理解されている。これらの生理的制御機構の破綻は、血栓症や出血等の病態につながることになる。無秩

序な凝固系の過剰発現、広範な内皮障害と播種性の血栓形成等の既知の病態に加え、最近トロンビンの形成不全も過剰な線溶活性発現に伴う出血に関わることが示された。これらの病態の把握には凝固・線溶系の制御機構の正しい理解に基づく適切な線溶系検査項目の実施と結果の解釈が必要である。

本稿では、まず時空間的制御機構を概説し、その破綻に伴い発現しうる病態とその検査方法に言及する。後半で包括的線溶活性測定法に触れ、「線溶系検査法に求められるもの」に言及する。

1. 線溶系の時空間的制御機構

線溶系の制御機構は以下の三つに大別できる（図1¹⁾）。(1) 不要あるいは余剰血栓の迅速な除去に関わる「フィブリン形成に伴う線溶系活性化促進機構」。 (2) 止血血栓の早期溶解を防ぐ「止血血栓安定化機構」。 (3) 血栓形成時の迅速溶解に関わる組織型プラスミノゲンアクチベータ（tPA）量を制御する「線溶活性発現ポテンシャル制御機構」。これらが異なる時空間で線溶活性発現を制御している。

¹ 静岡社会健康医学大学院大学

² 浜松医科大学

³ 浜松医科大学医生理学講座

*責任者連絡先：

静岡社会健康医学大学院大学

〒420-0081 静岡県静岡市葵区北安東4-27-2

Tel: 054-295-5400, Fax: 054-248-3520

E-mail: uranot@air.ocn.ne.jp

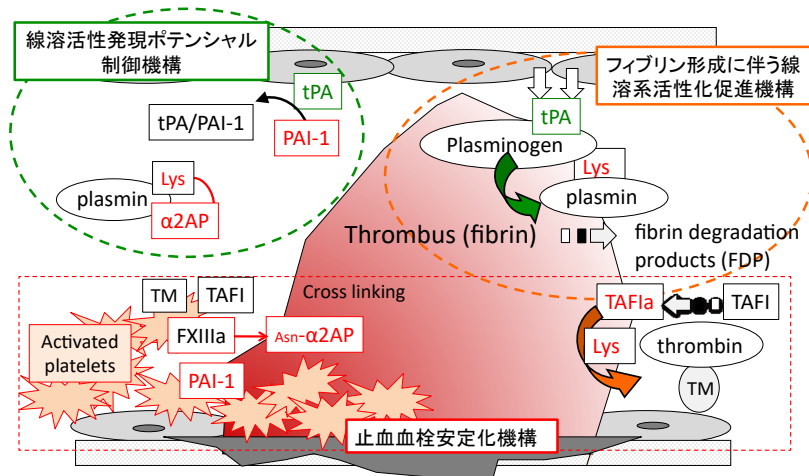


図1 線溶活性の時空間的制御機構

線溶活性は異なる時間と空間で異なる機構で制御されている。(1) フィブリン形成に伴う線溶系活性化促進機構、(2) 線溶活性発現ポテンシャル制御機構、(3) 線溶活性発現ポテンシャル制御機構、として表示している。(文献1 改変)

1) フィブリン形成に伴う線溶系活性化促進機構

フィブリンは線溶系の基質であると同時に tPA によるプラスミノゲンの活性化を著しく促進するため、線溶系の活性発現および効率的な活性化に不可欠である。フィブリン上に tPA とプラスミノゲンが結合して3者複合体を形成することによる鑄型効果と、フィブリンへの結合に伴うプラスミノゲンの高次構造の変化により、活性化が著しく亢進することによる。プラスミノゲンの結合は重鎖のクリングル構造上のリジン結合部位 (lysine binding site: LBS) とフィブリン C 末端リジンを介しており、結合に伴いプラスミノゲンの分子内結合が解けて活性化されやすい高次構造に変化する²⁾。生じたプラスミンはフィブリン分子内のリジンあるいはアルギニンの C 末端側を切断して新規の C 末端リジンを露出することによりプラスミノゲンの結合と活性化を増幅することになる。

2) 止血血栓安定化機構

未熟止血血栓の早期溶解を防ぐために、上記促進機構を標的にした線溶活性制御機構がある。トロンビン活性化線溶阻害因子 (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor: TAFI) は、トロンボモジュリン (TM) 結合トロンビンによって活性化され (TAFIa)、フィブリン C 末端リジンを切断し線溶を阻害する³⁾。

トロンピンと正常内皮上の TM を必要とすることから、傷害内皮と正常内皮境界で活性化され止血血栓を安定化すると想定される。

活性化凝固 XIII 因子 (FXIIIa) は、フィブリン線維同士およびフィブリンと α 2-Antiplasmin (α 2AP) を架橋し止血血栓を安定化する。活性化血小板からの FXIII および TAFI の放出も安定化に関わる。

3) 線溶活性発現ポテンシャル制御機構

血管内線溶では tPA が主要な PA である。tPA は内皮細胞から一本鎖の活性型酵素として分泌され内皮細胞膜上に滞留して、正常内皮細胞近傍で生成された血栓の迅速な溶解に寄与する。tPA の特異インヒビターであるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 型 (PAI-1) は、通常血漿中には tPA の過剰量存在して、血漿中 tPA 活性及び血栓形成時の線溶活性発現ポテンシャルを制御している^{4,5)}。tPA はまた血管内皮膜上に滞留する tPA と高分子複合体 (tPA-PAI-1 複合体) を形成して引き剥がし血漿中に遊離することにより内皮上の tPA 活性も制御している⁶⁾。

2. 時空間的制御機構の破綻と病態

上記制御機構の破綻は、異常出血や血栓症発症につながる。

1) フィブリン形成に伴う線溶系活性化促進機構の破綻と病態

・出血

血管内で播種性にフィブリンが形成されると本促進機構も過剰に反応し線溶活性の過剰発現に伴う異常出血を認める（播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation: DIC））。頭部外傷直後の異常出血（trauma induced coagulopathy: TIC）も類似の病態と考えられる⁷⁾。組織（特に脳組織）破壊に伴う組織因子（TF）の血中への遊離⁸⁾が、播種性の血管内凝固と引き続く線溶活性の過剰発現を引き起こす。出血の原因は消費性およびプラスミンによる分解に伴う凝固第VIII因子（FVIII）やフィブリノゲンを含む凝固因子の減少に加え、 α 2APの消費性減少も加わる。後者が著しい場合は、thromboelastography（TEG）やrotational thromboelastometry（ROTEM）等のViscoelastic Hemostatic Assaysでも線溶活性の過剰発現として捉えられる。また血液検査では、消費性の凝固因子の減少、フィブリノゲンの減少、凝固および線溶系活性化マーカー（トロンビン・アンチトロンビン複合体：TAT、 α 2アンチプラスミン・プラスミン複合体：PAP）の増加、フィブリン分解産物（fibrinogen degradation products: FDP）およびDダイマーの増加が認められる。

TICにおける線溶活性過剰発現に伴う異常出血は線溶系インヒビターであるトラネキサム酸（TXA）による治療対象となる。TXAが外傷後の出血量を有意に減らすことが報告され⁹⁾、その後周産期出血¹⁰⁾、消化管出血¹¹⁾等でも有効性が検討された。TXAの有用性は未だ未確定であり、有効な症例は限られている。しかし血栓症等の有害事象も多くなか安価でもあることから、医療環境の十分でない国では大量出血に際してTXAの投与が奨励されている。TXAは効果発現機序が明らかな薬剤であり、本来その使用にあたっては必要な症例のみとして不要な症例への投与は避けるべきである。必要とする症例に時機を得た安全なTXA治療を実施するには、これらの病態の迅速で簡便な診断法の開発は必須である。

・血栓症

tPA投与による血栓溶解療法時やDICの際に、消費に伴いプラスミノゲン量は低下しうる。その際は

正常血中濃度がプラスミノゲン（約2 μ M）の約半量（約1 μ M）の α 2PIも消費されており、必ずしも血栓症のリスクとはならない。先天性の異常症としては日本人では酵素活性をほぼ欠失するプラスミノゲン栃木（Ala601Thr変異）が多く、全体として人口の約4%がプラスミノゲン欠損症のヘテロ接合体であると報告されている¹²⁾。原則血栓症の直接のリスクにならないとされるが、感染症等の他のリスク合併時には注意を要する。さらに若年者の脳梗塞例が複数報告されており¹³⁾、今後の症例の蓄積が必要である。

2) 止血血栓安定化機構の破綻と病態

・出血

先天性の α 2APおよびFXIII欠損症がよく知られている。 α 2AP欠損症の第一例は α 2AP発見者の青木延雄先生による¹⁴⁾。いずれも後出血という止血後の再出血を特徴とし、FXIII欠損症では創傷遅延が加わる。近年は自己抗体による後天性欠損症が注目されている。他の後天性血友病同様に高齢者に多くFXIII活性低下を示す。確定診断には交差混合試験が必要である¹⁵⁾。また、TICの出血にも α 2APの消費は関わる¹⁶⁾。

TAFIの遺伝子欠損動物が明らかな発現型を示さないことからその生理機能は不明であったが、最近血友病の出血にトロンビン産生不全に伴うTAFI活性化不全が関わるという報告がある¹⁷⁾。同様の機構はTXAが効果を示す他の病態でも関わる可能性がある。生体内でのTAFI活性化の評価に関しては、活性化後に不活性化されたTAFIa/iの測定により可能である¹⁸⁾。また本特集別項の「線溶検査の再考：線溶時間検査」に紹介したTM/TAFI機能評価法は本病態の把握に寄与する可能性はある。しかしながら血漿を用いた検査法で、出血局所における凝固・線溶系の制御不全が十分に解析できるかは難しい問題でもある。

TMの異常症による出血も報告されている¹⁹⁾。トロンビン結合領域であるEGF5領域内のGly412Asp変異症例で、プロテインCとTAFIの活性化能を有さない。TMは抗凝固能が注目されがちだが本異常症例は繰り返す皮下出血が主症状であり、TAFIを介する血栓安定化作用の生理的重要性を示す症例であ

る。血漿中可溶性 TM の機能異常として捉えることは可能と考えられるが原則遺伝子診断が必要である。

3) 線溶活性発現ポテンシャル制御機構の破綻と病態・出血

tPA 量は駆血、激しい運動等で血中濃度が増加する。運動等での急激な血中濃度の増加でも tPA 活性あるいは線溶活性発現ポテンシャルは PAI-1 の血中濃度との比でよく表される²⁰⁾。出血との関連は明らかでないが、外傷等の凝固機転が加わると出血のリスクは高まると考えられる。

PAI-1 低値でも線溶活性発現ポテンシャルは高まる。PAI-1 は血中濃度及び活性の生理的変動幅が大きく、痩せ型の若年女子では測定可能範囲より低い例も多い。低値例での出血に関しては議論があるが、下記 PAI-1 欠損症例のヘテロ接合体例では明らかな病的出血は認めない。

遺伝子診断で確定している先天性の PAI-1 欠損症例は 3 家系で、そのうち 2 家系は我々の報告した本邦例である²¹⁻²³⁾。詳細は別項で詳述されているが、いずれもホモ接合体は、月経、出産、外科手術時等に致死的な出血を呈する。いずれもユーグロブリン溶解時間 (euglobulin clot lysis time: ECLT) の結果から PAI-1 欠損を疑うことが可能であったが、確定診断には遺伝子診断が必須である。

・血栓症

PAI-1 の遺伝子発現調節部位には各種サイトカイン、血清脂質、時計蛋白質等の応答部位があり、生理的あるいは病的条件下で血液中濃度が大きく変動する²⁴⁾。急性相蛋白質の一つとして炎症時等に急増し、感染症の際には正常範囲の 100 倍もの高値を示す。血中 PAI-1 の増加の臨床的重要性は、感染症²⁵⁾及び外傷後²⁶⁾における PAI-1 血中濃度の増加と死亡率との関連で示されている。頭部外傷後でも直後は線溶活性亢進による出血を呈するが、その後 PAI-1 増加に伴い線溶活性発現ポテンシャルは低下して (fibrinolysis shutdown) 血栓症や臓器不全の原因となる⁷⁾。受傷直後に推奨される TXA 治療はこの段階では避けるべきである。TIC の病態は急速に変化するため、その理解には迅速な検査法が必要になる。PAI-1 抗原量か活性測定あるいはこれらを代替する ECLT が必要な検査である⁵⁾が、現状の検査法では

ベッドサイドでの実施は困難である。

PAI-1 は肥満、脂質異常、加齢等でも血中濃度が増加し血栓症のリスクになる²⁷⁾。血漿中 total PAI-1 高値例では tPA-PAI-1 複合体量も多く、また bio-immunoassay で測定した free PAI-1 量も多い^{4,5)}。その結果血漿中の free tPA 量及び tPA 活性は低下し²⁷⁾、内皮上の tPA 活性低下と相俟って血栓症のリスクが高まることになる。事実これらの測定が可能になった 1990 年代半ばには血漿中 tPA 量 (多くは tPA-PAI-1 複合体量) の高値が血栓症のリスクであるとの報告が相次ぎ^{28,29)}、混乱をきたした。tPA-PAI-1 複合体量高値例では、total PAI-1 量、free PAI-1 量も多く、基本的に血栓症のリスクになると考える方が良い。

3. 線溶系の検査に求められるもの

血栓症及び異常出血に関わる線溶系因子の異常は、病態から推定した候補因子の抗原量、活性の測定、及び遺伝子検査で可能である。また生体内での線溶系活性化は、そのマーカーである α 2AP-plasmin complex (PAP) や、FDP 及び D ダイマーの測定で評価できる。一方、線溶活性化系と抑制系を包括的に評価するためにはフィブリンの存在が不可欠であり、フィブリンを基質とするクロット溶解時間測定が最も合理的である。しかしながら現状では凝固系のプロトロンビン時間あるいは活性化部分トロンボプラスチン時間のような、迅速で簡便な包括的活性測定法は線溶系では確立されていない。

TEG や ROTEM を含む包括的線溶活性測定法の問題点は、(1) 全ての線溶系の因子の影響が反映されるので、目的とする個々の因子の状況を把握しにくいこと、(2) α 2AP のプラスミン阻害活性の影響が強いため感度が低く、血漿中の残存活性が相当低下しないと線溶活性過剰発現を感知できないこと、等である。近年、TEG/ROTEM の改変法や、プラスミン生成測定法、凝固線溶波形解析、また各制御因子の特異阻害薬等を併用すること (本特集別項参照) 等により、目的因子の活性及びその制御活性を評価する検査法が試みられている。我々は PAI-1 及び α 2AP 活性を不活性化した血漿と未処理血漿のクロット溶解時間を比較して線溶抵抗性残存活性を評

価する迅速測定法を確立すべく、現在その妥当性を検証中である。早期の実用化を目指したい。いずれの方法においても、線溶系の精緻な時空間的制御機構のいずれの部分に焦点を当てた検査方法であるかを知り、適切に結果を解釈する必要がある。詳細は別項の「線溶時間検査」に記載した。

4. おわりに

近年 TAFI の生理的機能の理解が深まったことや、様々な病態での TXA の効果が解明されたことにより、線溶系の精緻な時空間的制御の破綻が様々な病態に関わる事実が明らかになってきた。これらの病態を正確に理解し適切に介入するための診断方法が待望されている。本稿では線溶活性の時空間的制御機構とその破綻に伴う病態を紹介し、診断に資する検査方法を議論し、現況を紹介した。

著者全員の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y: Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. *J Thromb Haemost* **16**: 1487–1497, 2018.
- Law RH, Caradoc-Davies T, et al.: The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep* **1**: 185–190, 2012.
- Plug T, Meijers JC: Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* **14**: 633–644, 2016.
- Urano T, Sakakibara K, Rydzewski A, et al.: Relationships between euglobulin clot lysis time and the plasma levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1. *Thromb Haemost* **63**: 82–86, 1990.
- Urano T, Sumiyoshi K, Pietraszek MH, et al.: PAI-1 plays an important role in the expression of t-PA activity in the euglobulin clot lysis by controlling the concentration of free t-PA. *Thromb Haemost* **66**: 474–478, 1991.
- Suzuki Y, Mogami H, Ihara H, et al.: Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood* **113**: 470–478, 2009.
- Moore EE, Moore HB, Kornblith LZ, et al.: Trauma-induced coagulopathy. *Nat Rev Dis Primers* **7**: 30, 2021.
- Yasui H, Donahue DL, Walsh M, et al.: Early coagulation events induce acute lung injury in a rat model of blunt traumatic brain injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **311**: L74–86, 2016.
- CRASH-2 trial collaborators; Shakur H, Roberts I, Bautista R, et al.: Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): A randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **376**: 23–32, 2010.
- Collaborators WT: Effect of early tranexamic acid administration on mortality, hysterectomy, and other morbidities in women with post-partum haemorrhage (WOMAN): An international, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **389**: 2105–2116, 2017.
- HALT-IT Collaborators: Effects of a high-dose 24-h infusion of tranexamic acid on death and thromboembolic events in patients with acute gastrointestinal bleeding (HALT-IT): An international randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **395**: 1927–1936, 2020.
- Okamoto A, Sakata T, Mannami T, et al.: Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in the Japanese: The Suita Study. *J Thromb Haemost* **1**: 2397–2403, 2003.
- Nagayama M, Nagayama T, Ohnuki Y, et al.: Expanded spectrum of coagulopathy in the etiology of cerebral infarction in younger adults in Japan—Comprehensive analysis of 77 patients. *Cerebrovasc Dis* **6**: 350–355, 1996.
- Favier R, Aoki N, de Moerloose P: Congenital alpha(2)-plasmin inhibitor deficiencies: A review. *Br J Haematol* **114**: 4–10, 2001.
- 日本血栓止血学会診断基準作成委員会 自 F : 自己免疫性出血病 FXIII/13 診断ガイド. *血栓止血誌* **26**: 658–668, 2015.
- Barrett CD, Moore HB, Vigneshwar N, et al.: Plasmin thrombelastography rapidly identifies trauma patients at risk for massive transfusion, mortality, and hyperfibrinolysis: A diagnostic tool to resolve an international debate on tranexamic acid? *J Trauma Acute Care Surg* **89**: 991–998, 2020.
- Semeraro F, Mancuso ME, Ammollo CT, et al.: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor pathway alterations correlate with bleeding phenotype in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* **18**: 381–389, 2020.
- Tregouet DA, Schnabel R, Alessi MC, et al.: Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: The AtheroGene study. *J Thromb Haemost* **7**: 49–57, 2009.
- Okada M, Tominaga N, Honda G, et al.: A case of thrombomodulin mutation causing defective thrombin binding with absence of protein C and TAFI activation. *Blood Adv* **4**: 2631–2639, 2020.
- Urano T, Suzuki Y, Arakida M, et al.: The expression of exercise-induced tPA activity in blood is regulated by the basal level of PAI-1. *Thromb Haemost* **85**: 751–752, 2001.
- Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, et al.: Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerisation. *Thromb Haemost* **117**: 860–869, 2017.
- Iwaki T, Tanaka A, Miyawaki Y, et al.: Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable

- phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost* **9**: 1200–1206, 2011.
- 23) Iwaki T, Urano T, Umemura K: PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol* **157**: 291–298, 2012.
- 24) Samad F, Loskutoff DJ: Hemostatic gene expression and vascular disease in obesity: Insights from studies of genetically obese mice. *Thromb Haemost* **82**: 742–747, 1999.
- 25) Westendorp RG, Hottenga JJ, Slagboom PE: Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet* **354**: 561–563, 1999.
- 26) Menges T, Hermans PW, Little SG, et al.: Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* **357**: 1096–1097, 2001.
- 27) Urano T, Suzuki Y, Iwaki T, et al.: Recognition of plasminogen activator inhibitor type 1 as the primary regulator of fibrinolysis. *Curr Drug Targets* **20**: 1695–1701, 2019.
- 28) Jansson JH, Olofsson BO, Nilsson TK: Predictive value of tissue plasminogen activator mass concentration on long-term mortality in patients with coronary artery disease. A 7-year follow-up. *Circulation* **88**: 2030–2034, 1993.
- 29) Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, et al.: Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* **332**: 635–641, 1995.