

# 高感度トロンビン産生試験による血漿中の tissue factor と tissue factor pathway inhibitor の機能的バランスの評価

井上りな, 神窪勇一\*

## Assessment of the functional balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in plasma using highly sensitive thrombin generation test

Rina INOUE, Yuichi KAMIKUBO

**Key words:** tissue factor, factor VIIa, tissue factor pathway inhibitor, initial thrombin, thrombin generation test

### はじめに

血液凝固反応は止血機能を担う重要な生体防御機構の一つである。正常な凝固反応は凝固を促進する系と、それを抑制・制御する系との巧妙なバランスのもとに維持されている。凝固促進系を代表する凝固因子として組織因子 (tissue factor: TF) があり、またそのカウンターパートの制御因子としては TF 凝固経路インヒビター (tissue factor pathway inhibitor: TFPI) が挙げられる。TF は膜内在性タンパク質であり、血管外膜、表皮、粘膜上皮、大脳皮質、腎糸球体など生体内の様々な組織の細胞に発現している<sup>1)</sup>。TF は FVIIa と複合体を形成することで血液凝固を開始する<sup>2)</sup>。この TF-FVIIa 複合体は、FX を活性化して FXa を生成する。FXa は、その後血小板由来の FVa や、FXa によって活性化された FVa とともにプロトロンビナーゼ複合体 (FVa-FXa) を形成し、プロトロンビンを活性化してトロンビンを生成する。しかし、この TF 凝固経路によるトロンビン産生は、TFPI によって強く制御されており、その活性は微量かつ限定的である<sup>3)</sup>。TFPI は、TF-FVIIa 複合体および FXa の活性を阻害することにより、過剰なトロンビン産生を防ぐ役割を担っている。

凝固促進因子である TF と、それに拮抗する TFPI の抗凝固活性とのバランスが何らかの要因によって破綻すると、病的な凝固異常を引き起こす可能性がある。ヒトにおいては、TF や TFPI の遺伝的異常や欠損症は報告されていないため、その詳細は定かでないが、ノックアウトマウスを用いた研究により、止血における両者のバランスの重要性が明らかとなっている<sup>4)</sup>。具体的には、TFPI の欠損マウスでは、TF-FVIIa による凝固活性の亢進により、播種性血管内凝固症候群 (DIC) に関連する重篤な出血が生じ、胎生期に致死となる。しかし、TF の発現を低下させることでこの致死性は回避可能である。一方、TF 発現の低下したマウスでは、肺や胎盤に出血が認められるが、TFPI を欠損させると、これらの出血が消失すると報告されている。

また、TF による凝固促進系が過剰に亢進すると、過凝固状態が誘導され、血栓症のリスクが高まると考えられている。実際に、感染症や敗血症、がん、動脈硬化などの病態においては、TF 発現が著しく亢進することが報告されており、これらの病態における血栓形成の一因とされている<sup>5,6)</sup>。一方、TFPI による凝固抑制系が過剰に機能した場合には、逆に止血困難を招き、出血傾向が顕著となる。実際、FV

\*責任者連絡先: 株式会社血栓トランスレーショナルリサーチラボ (〒860-0812 熊本市中央区南熊本 3-14-3)  
Tel: +81-96-288-1742, Fax: +81-96-288-1742, E-mail: y-kamikubo@t-trl.com



この記事はクリエイティブ・コモンズ [表示 - 非営利 - 継承4.0国際] ライセンスの下に提供されています。  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.ja>

East Texas と呼ばれる FV の遺伝子異常を有する患者の血漿において、TFPI 活性の著しい増加が認められ、これが重篤な出血症の原因となることが示唆されている<sup>7)</sup>。これらの事例は、TF と TFPI のバランス破綻が、血栓症および出血症という相反する病態の発症に関与していることを強く示唆している。

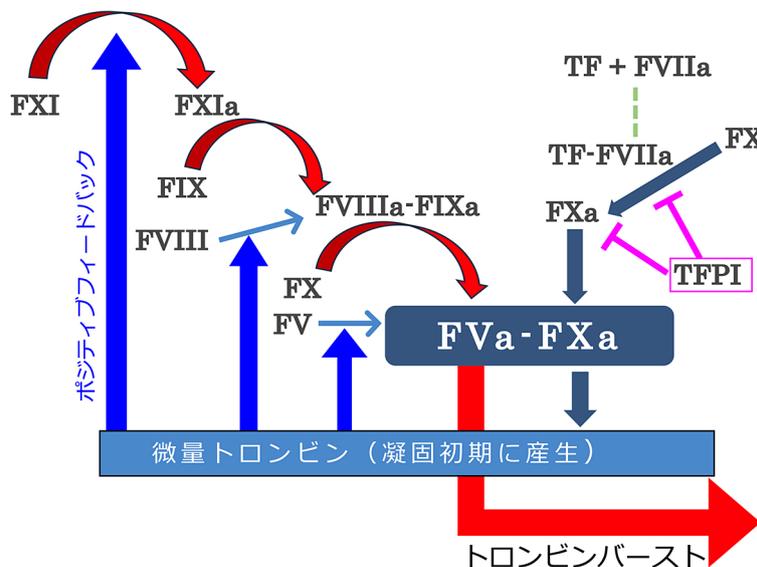
TF と TFPI のバランスを正確に把握し、個々の患者の病態に応じた凝固コントロール戦略を構築することは、今後の診断・治療上、極めて重要な課題である。この課題を解決するためには、血漿中に存在する TF と TFPI の機能的バランスを反映した、包括的な凝固検査の開発が求められる。従来の代表的な包括的凝固検査であるプロトロンビン時間 (prothrombin time: PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT)、トロンビン時間などの凝固時間法は、いずれも高濃度の活性化試薬を用いるため、血漿に極微量に存在する TF の凝固活性を検出するには適していない。また、血漿 TFPI の活性濃度を反映する検査として希釈 PT 法が知られているが、その定量性には限界がある。近年では、「トロンビン産生 (生成) 試験」と呼ぶ包括的な凝固能検査が、血栓症および出血症における凝固異常の解析手法として広く用いられている<sup>8)</sup>。特に、凝固カスケードの初期段階で生成される微量トロンビンは、後続のトロンビン産生を著しく増幅させるカギとなる凝固因子であり、極めて重要な役割を果たす (詳細は後述する)。著者らは最近、この凝固初期における微量トロンビンを高感度に測定可能なトロンビン産生試験 (Smart analysis of thrombin production: SMAT<sup>®</sup> と呼称) を開発した<sup>9,10)</sup>。さらに、この高感度トロンビン産生試験 SMAT<sup>®</sup> を応用することで、TF の凝固活性および TFPI の凝固阻害活性を定量的に評価可能な新たな検査法の構築にも成功した。本稿では、これまでの臨床研究において用いられてきた TF および TFPI の活性測定法を概説するとともに、著者らが開発した新規測定法の原理と、その応用可能性について紹介する。

## 1. 止血における TF と TFPI の機能的バランス

TF-FVIIa は凝固初期におけるトロンビン産生にお

いて重要な役割を担っている<sup>2)</sup>。しかし、TFPI による強力な制御機構のため、TF-FVIIa 凝固経路のみでは止血血栓の形成に十分な量のトロンビンを生成することは困難である。このため、TF-FVIIa による凝固経路は、内因系テンナーゼ複合体 (FVIIIa/FIXa) を介した内因系凝固の「スターター」として機能し、いわゆるプライミングの役割を果たすことで、最終的なトロンビン量の増大に寄与している (図 1)。実際に、TF-FVIIa 凝固経路を介して生じた微量のトロンビンが、ポジティブフィードバック機構を介して FVIII を活性化し、さらに FXI の活性化を通じて FIXa の産生を増加させ、内因系テンナーゼ複合体の生成を促進する。加えてトロンビンは、血小板の活性化および FV の活性化を引き起こすことで、プロトロンビナーゼ複合体の形成も促進する。こうした一連の活性化反応により、活性化血小板上のリン脂質膜における内因系テンナーゼ複合体による FXa の生成がより効率的に行われるとともに、プロトロンビナーゼ複合体の増加によりトロンビンの増産 (いわゆる「トロンビンバースト」) が引き起こされる。最終的に、このトロンビンの増産が安定的な止血血栓の形成に繋がる。

最近、TFPI の抗凝固活性を中和する抗 TFPI 抗体薬を用いた「リバランス療法 (rebalancing therapy)」が止血能の低下した血友病患者に対する新たな治療法として導入され、注目を集めている<sup>11,12)</sup>。この治療法では、FVIII または FIX の欠損あるいは機能不全によりトロンビンバーストが生じにくい血友病に対して、TFPI の抗凝固作用を抑制することで、出血傾向にある凝固バランスを正常な状態に近づけ、TF-FVIIa 凝固経路によるトロンビン産生の促進を図ることが期待されている。このことは、TF の凝固促進作用と TFPI の凝固抑制作用とのバランスの変化が止血能に大きく影響することを明確に示している。TF と TFPI の機能的バランスは、出血症だけでなく血栓症における凝固能異常を解析・診断するための新たな指標となる可能性がある。この可能性を実証するためには、血液や血漿中に存在する TF および TFPI の機能を反映しつつ、それぞれの活性を簡便かつ高い再現性で定量できる凝固検査法の確立が求められる。



**図1** 凝固反応のスキームとトロンビン産生機序について。TFはFVIIaと複合体を形成し、FXを活性化してFXaを生成する。FXaは、その後FVaとともにプロトロンビナーゼ複合体(FVa-FXa)を形成し、プロトロンビンを活性化してトロンビンを生成する。このTF凝固経路によるトロンビン産生は、TFPIによって強く制御されているため、止血血栓の形成に十分な量のトロンビンを生成することは困難である。そのため、TF-FVIIa凝固経路を介して生じた微量のトロンビンが、ポジティブフィードバック機構を介してFVIIIを活性化し、さらにFXIの活性化を通じてFIXaの産生を増加させる。これにより、内因系テンナーゼ複合体(FVIIIa-FIXa)が形成され、FXの活性化が加速される。このようにして、一連の増幅的な活性化反応を経て、トロンビンの大量産生、いわゆる「トロンビンバースト」が引き起こされる。

## 2. 高感度トロンビン産生試験を用いた血漿TFの凝固活性測定

TFは、その発現が血管壁細胞などの細胞膜に局在していることから、長らく血液や血漿中には存在しないと考えられてきた。しかし、1999年Giesenらは、凝固活性を有するTF分子が血液中にも存在し、血栓形成を促進することを初めて報告した<sup>13)</sup>。その後の研究により、血液中には主に次の2種類のTF分子が存在することが明らかとなった<sup>5,6,14)</sup>：1) 細胞外ドメインのみから構成される選択的スプライシング分子(alternative splicing TF: asTF)；2) 細胞外小胞(extracellular vesicles: EVs)に結合したTF分子(以下、TF+EVs)。asTFは、TFの活性発現に必要な膜貫通ドメインを欠いているため、凝固活性は極めて低い。一方、TF+EVsは、活性化単球や癌細胞などから血液中に放出される分子であり、凝固活性を有するTFの主たる構成分子と考えられている。本稿では、TF+EVsを含む血漿を対象とした凝固活性

の測定法について解説する。

### 1) 既存の血漿TFの凝固活性測定法

これまで多くの臨床研究において血漿中のTF+EVsの凝固活性が、市販のキットや各研究室で独自に構築された手法を用いて測定されてきた。2024年には、既存のTFの凝固活性測定法の感度、特異性、および再現性を比較する多施設共同研究が、International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)のVascular BiologyのScientific and Standardization Committee (SSC)サブコミッティの主導により実施され、その結果が報告された<sup>15)</sup>。本研究は、21の研究室が参加し、合計18種類の検査(16種類のFXa産生試験と2種類のトロンビン産生試験)によって同一の血漿検体を用いて測定結果を比較するという初めての試みが行われた。使用された血漿検体には、TF陽性細胞から調製したEVsを添加したTF+EVs血漿、TF陰性細胞由来のEVsを添加したTF陰性コントロール血漿、ヒト母乳由来のTF+EVsを添加した血漿、さらにリポポリサッカライド(LPS)

で活性化した単球由来の TF+EVs を含む血漿が含まれていた。測定の際には、まず TF+EVs 血漿検体から TF+EVs を単離するため、血漿の高速遠心分離 (16,000~24,000 g, 15~60 分間) により TF+EVs を含むペレットを調製した。血漿成分と分離したこのペレットに緩衝液を加え、TF+EVs を含む懸濁液を調製したうえで、FXa 産生試験またはトロンビン産生試験が実施された。FXa 産生試験では、懸濁液に FVIIa と FX を添加して一定時間反応させ、TF-FVIIa 複合体によって生成された FXa 量を測定することで、TF+EVs の凝固活性を定量した。一方、トロンビン産生試験では、TF+EVs を含む懸濁液に血漿あるいは、FVIIa, FX, FVa およびプロトロンビンからなる混合液を添加し、生成されたトロンビン量により活性を評価した。その結果、使用された TF 活性測定法はいずれも高い特異性と検出感度を有することが確認されたが、同一検体を測定しても手法間で得られた測定値に大きなばらつきが認められた。この変動は、遠心分離による TF+EVs の遠心分離条件や、FXa 生成反応における反応時間の違いなどが主な要因と考えられている。現状では、血漿中の TF の凝固活性の測定に関しては、まだ国際的な統一がなされていない。

## 2) 高感度トロンビン産生試験による血漿 TF の凝固活性測定方法

トロンビン産生 (生成) 試験は、TF などの開始試薬を塩化カルシウムとともに血漿検体に添加した後、トロンビンに対する蛍光基質の Z-Gly-Gly-Arg-amino-methylcoumarin (AMC) を用いて、生成するトロンビンの活性を連続的かつリアルタイムに測定する包括的凝固機能検査である<sup>8,16)</sup>。この試験では、初期凝固時間の長さを表す Lag time や、ピークに達するまでの時間、ピークの値、総トロンビン生成量といったパラメーターを定量的に評価することで、凝固能を検査する。トロンビン産生試験は、凝固を促進する系と、それを抑制・制御する系とのバランスを解析する上で非常に優れた手法であるが、TFPI のコントロール下における極微量 TF の凝固活性の評価には適していない。

一方、著者らが開発した高感度トロンビン産生試験 (以下、SMAT<sup>®</sup>) は、凝固初期に生じる微量のト

ロンビンを高感度で定量することが可能な凝固検査である<sup>10)</sup>。本手法では、凝固の初期段階で反応を停止させ、トロンビンの検出感度を飛躍的に高めた蛍光性のトロンビン基質 (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC) を用いることで、従来の試験では検出困難であった凝固初期の微量トロンビンを測定することが可能となっている。なお、SMAT<sup>®</sup>凝固検査には、以下の2種類の手法が存在する。

### (1) SMAT<sup>®</sup>-Active Pro-Coagulant Detector (APCD)

#### 凝固検査: 血漿中に存在する TF の凝固活性測定

本検査では、まず第1ステップとして、合成リン脂質を含む試薬を塩化カルシウムと一緒に被験血漿に添加し、37°C で約3分間反応させてトロンビンを生成させる。この際、血漿中に内在する TF がトリガーとなりトロンビンが生成される。トロンビン産生が TF 依存性であることを確認するために、同一の検体に抗 TF 中和抗体を添加して同様の操作を行い、非添加検体とのトロンビン産生量を比較することで、TF 活性の特異的測定が可能となる。続く第2ステップでは、生成されたトロンビンの活性を定量する。具体的には、反応停止試剤 (EDTA) を含むトロンビン蛍光基質を血漿に添加し、37°C で約2分間反応させる。反応中、トロンビンによる基質の加水分解に伴い発せられる蛍光を、蛍光プレートリーダー (励起波長: 355 nm, 蛍光波長: 460 nm) を用いて経時的に測定する。得られた蛍光強度の時間変化 (例: 蛍光強度/秒) をもとに、既知濃度の精製トロンビンによる検量線を参照して、検体中に生成されたトロンビン濃度へと換算する。さらに、得られた値を、正常プール血漿に対する百分率 (%) で表すことも可能である。

### (2) SMAT<sup>®</sup>-TF 凝固検査: TF 凝固経路を介した凝固初期のトロンビン産生能の解析法

本検査は、TF 凝固経路を介するトロンビン産生能を調べることで、TF 凝固反応の亢進や低下を評価するものである。実際の検査では、低濃度の TF (2.5 または 7.5 pM) および合成リン脂質を含む試薬を塩化カルシウムと一緒に被験血漿に添加し、37°C で約3分間反応させてトロンビンを生成させる。トロンビン検出は、前述の方法に準じて行う。

### 3) SMAT<sup>®</sup>凝固検査を用いたメタボリック症候群における血漿 TF の凝固活性の動態解析

メタボリック症候群の患者（高血圧症、脂質異常症、肥満、高血糖を合併）は、動脈硬化に起因して向血栓状態から血栓症へと進行するリスクが高いことが知られている<sup>17,18)</sup>。このため、近年ではメタボリック症候群における血栓性素因の同定や、向血栓状態を評価するためのバイオマーカーに関する研究が数多く行われている<sup>19)</sup>。その代表的なマーカーの一つが凝固トリガー因子である TF である<sup>20)</sup>。しかし、肥満を含むメタボリック症候群において、血漿中の TF の凝固活性がどのように変化するかについては、これまで十分に解明されてこなかった。

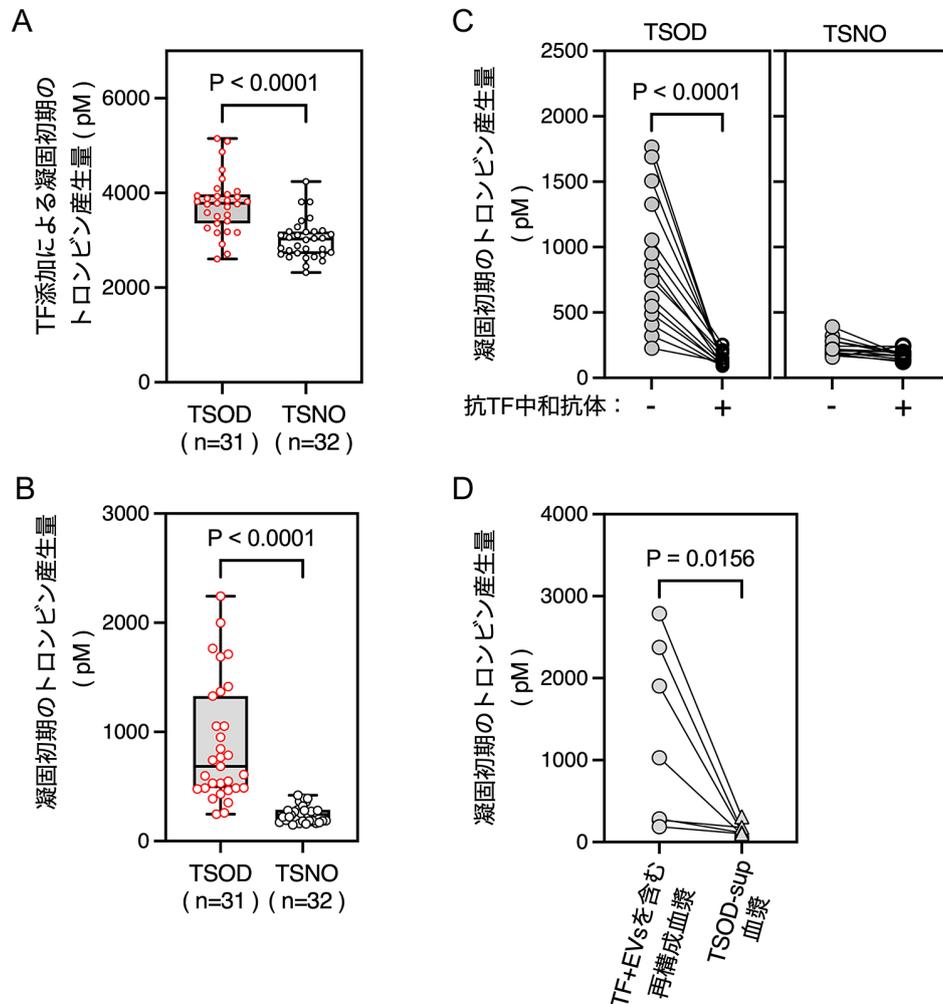
そこで、自然発症型メタボリック症候群モデルマウスである Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) マウスを用いて、血漿 TF の凝固活性の動態解析を行った<sup>10)</sup>。TSOD マウスは、正常対照群である Tsumura Suzuki Non-Obese (TSNO) マウスと比較して、体重および血中総コレステロール、トリグリセリド、グルコースレベルの中央値がいずれも有意に高値であった（体重、g：58.4 (n = 31) vs. 35.8 (n = 32), p < 0.0001；総コレステロール、mg/dL：129 (n = 16) vs. 71 (n = 16), p < 0.001；トリグリセリド、mg/dL：206 (n = 21) vs. 116 (n = 16), p < 0.01；グルコース、mg/dL：191 (n = 26) vs. 149 (n = 27), p < 0.001)。

これらのマウスからクエン酸採血を行い、得られた platelet-poor plasma (PPP) に対し、ヒト TF 試薬（濃度：7.5 pM）を添加して SMAT<sup>®</sup>-TF 凝固検査を実施した。その結果、TSOD マウスの TF 凝固経路を介したトロンビン産生量が、TSNO マウスに比べて有意に高いことが判明した（**図 2A**）。一方で、APTT や PT の凝固時間には有意差は認められなかった。さらに、TSOD マウスの PPP 中に凝固活性を有する TF の存在の有無を検証するため、リン脂質のみを添加した SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査を実施したところ、TSOD マウスではより顕著なトロンビン産生の上昇が確認された（**図 2B**）。この上昇は、マウス TF に対する中和抗体（AF3178, R&D Systems）を添加することで、TSNO マウスと同等レベルにまで抑制された（**図 2C**）。加えて、血漿中で確認された TF 凝固活

性が TF+EVs に由来するかを検討するため、TSOD マウスの PPP を 13,000 g で 1 時間の高速遠心を行い、TF+EVs を含むペレットと、TF+EVs を含まない PPP の上清 (TSOD-sup) を分離・調製した。次に、TSNO マウスの PPP を同様の方法で高速遠心分離し、得られた上清 (TSNO-sup) を TSOD マウス由来のペレットに添加して、再構成 PPP を作製した。この再構成 PPP を用いたトロンビン産生試験では、TSOD-sup と比較して有意なトロンビン産生の上昇が確認された（**図 2D**）。これらの結果は、メタボリック症候群モデルマウスにおいて、凝固活性を有する TF+EVs が循環血液中に増加していることを示唆している。

さらに、ヒトにおいても同様の検討を行った。BMI 25~30 kg/m<sup>2</sup> の肥満者から得られた PPP に対し、リン脂質のみを添加した条件下で SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査を実施したところ、肥満者のトロンビン産生量は、BMI 25 kg/m<sup>2</sup> 未満の正常者に比べて有意に高値であった（**図 3A**）。ヒト TF に対する中和抗体（HTFK-180, 化血研より供与）の添加により有意に低下した（**図 3B**）。一方、SMAT<sup>®</sup>-TF 凝固検査の結果には、両群間で有意な差は認められなかった（**図 3C**）。このことから、肥満者においても凝固活性を有する、おそらく TF+EVs が脂肪細胞、血管内皮細胞、あるいは活性化単球から血液中に放出されている可能性が考えられる。しかし、その量は極微量であると推定される。従って、従来のトロンビン産生試験では、メタボリック症候群における血漿 TF の動態を分析することは、困難であるだろう。一方、SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査は、凝固活性を有する TF 分子の検出において優れた手法であると考えられる。

以上の本高感度トロンビン産生試験を用いた解析により、メタボリック症候群では血液中に存在する TF が、TFPI の制御能を回避するほどの凝固活性を有しており、向血栓状態へとバランスが傾いていることが明らかとなった。このバランスの破綻が、血栓症の発症に直結するかどうかは、今後の最も重要な検討課題である。

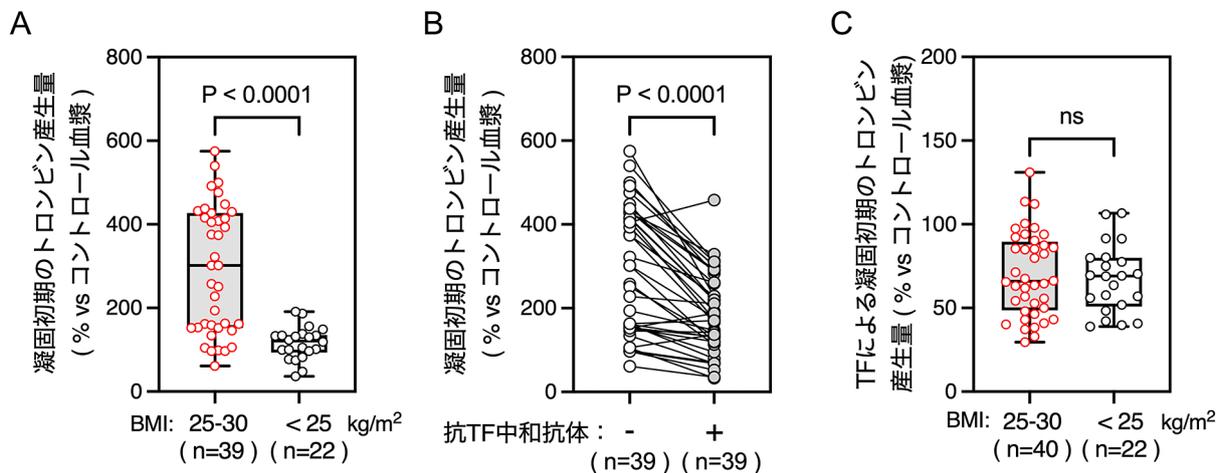


**図 2** 高感度トロンビン産生試験 (SMAT<sup>®</sup>) によるメタボリック症候群モデルマウスにおける凝固機能亢進状態の解析。メタボリック症候群モデルとして Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) マウス, コントロールの正常マウスとして Tsumura Suzuki Non-Obese (TSNO) を用いた。A. TF 凝固経路を介したトロンビン産生能の解析。マウス血漿にヒト TF 試薬 (7.5 pM) を添加して SMAT<sup>®</sup>-TF 凝固検査を実施した。中央値および 25% と 75% パーセンタイルを示す。B. リン脂質のみを血漿に添加して生成されるトロンビン量の測定。SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査によって実施した。中央値および 25% と 75% パーセンタイルを示す。C. 血漿中に存在する TF 凝固活性。マウス TF に対する中和抗体を血漿に添加して SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査を実施した。D. SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査による血漿中の TF+EVs の凝固活性の測定。TSOD マウス血漿から単離した TF+EVs を含む再構成血漿のトロンビン産生量を, TSOD-sup 血漿と比較した。群間の有意差検定は, Mann-Whitney test によって行い,  $p < 0.05$  を有意差ありと判定。文献 10 より引用, 一部改変。

### 3. 高感度トロンビン産生試験を用いた血漿 TFPI の凝固阻害活性測定

TFPI は, 血漿, 血小板, および血管内皮細胞に存在するプロテアーゼインヒビターである<sup>3,21)</sup>。TFPI は 3 つの Kunitz ドメインを有しており, 第 1 ドメインが FVIIa, 第 2 ドメインが FXa に結合し, それぞれを阻害する。第 3 ドメインは長らくヘパリン結合

ドメインと考えられていたが, 近年の研究により, プロテイン S と結合することで TFPI の FXa 阻害活性を高める機能を持つことが明らかとなった<sup>22)</sup>。さらに, TFPI はカルボキシ末端の塩基性アミノ酸に富む領域を介して, FV のスプラインシングアイソフォームである FV-short の B ドメイン内の酸性領域と結合し, プロテイン S を含む TFPI-FV-プロテイン S の 3 量体を形成することで, FXa に対する阻害効



**図3** 高感度トロンビン産生試験 (SMAT<sup>®</sup>) による肥満者における凝固機能亢進状態の解析。BMI 25~30 kg/m<sup>2</sup> の肥満者およびBMI 25 kg/m<sup>2</sup> 未満の正常者から血漿を調製してトロンビン産性能を比較した。A. リン脂質のみを血漿に添加して生成されるトロンビン量の測定。SMAT<sup>®</sup>-APCD 凝固検査によって実施した。中央値および25%と75%パーセンタイルを示す。B. 血漿中に存在するTF凝固活性。ヒトTFに対する中和抗体を血漿に添加してSMAT<sup>®</sup>-APCD凝固検査を実施した。C. TF凝固経路を介したトロンビン産性能の解析。血漿にTF試薬 (2.5 pM) を添加してSMAT<sup>®</sup>-TF凝固検査を実施した。中央値および25%と75%パーセンタイルを示す。群間の有意差検定は、Mann-Whitney testによって行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定。ns: 有意差なし。文献10より引用、一部改変。

果を相乗的に高めることが報告されている<sup>23)</sup>。なお、TFPIには、3つのKunitzドメインを持つ $\alpha$ 型に加え、第3ドメインを欠く $\beta$ 型アイソフォームも存在する<sup>3,21)</sup>。これまで、TFPIの抗原および活性を測定する手法を用いて、血漿中のTFPIレベルと血栓症や出血症の病態との関連が数多く研究されてきた<sup>24)</sup>。しかし、TFPIの存在様式およびその機能の複雑さにより、測定の臨床的意義に関する統一かつ明確な結論は得られておらず、現在のところ臨床応用には至っていない。

著者らは、TFPIがTF凝固経路を介した凝固初期におけるプロトロンビナーゼ複合体生成を特異的に阻害することに着目し、SMAT<sup>®</sup>-TF凝固検査をTFPIの凝固阻害活性測定へ応用することを検討した。全長型のTFPI $\alpha$ を正常プール血漿に添加したところ、濃度依存的にトロンビン産生が抑制された。この抑制効果は、TFPIに対する中和ポリクローナル抗体 (AF2974, R&D Systems) の添加によって完全に回復した。

以上の結果から、SMAT<sup>®</sup>-TF凝固検査はTFPIの凝固阻害活性の測定に有用であると考えられる。なお、血漿中のTFPIの凝固阻害活性は、抗TFPI中和抗体

添加血漿 (TFPI欠乏血漿に相当) と、非添加血漿とのトロンビン産性能の相対比を、arbitrary unitsで表示することも可能である。

## おわりに

以上、著者らが開発した高感度トロンビン産生試験の原理と、その応用可能性について紹介した。本凝固検査は、凝固初期におけるTF依存性の凝固経路で生成されるトロンビンに着目した、初めての凝固機能検査である。TFの凝固活性およびTFPIの凝固阻害活性を定量的に評価することで、TF凝固経路における凝固バランスの状態を把握できる点が特徴である。このことにより、本検査は、多様な疾患における凝固異常の診断や、抗血栓治療薬・止血薬のモニタリング検査など、幅広い臨床応用が期待される。今後は、本凝固検査の有用性と臨床的意義を実証するための大規模な臨床研究が必要となる。将来的には、高感度トロンビン産生試験が凝固機能検査の一つとして臨床現場において広く活用されることを願ってやまない。

## 謝辞

本稿で記した著者らの研究は、大藏直樹先生（帝京大学薬学部）との共同研究によって行われたものであり、この場を借りて深謝いたします。

著者全員の利益相反（COI）の開示：

神窪勇一：エクイティ（株など）（血栓トランスレーショナルリサーチラボ）

井上りな：役員・顧問職・社員など（血栓トランスレーショナルリサーチラボ）

## 文献

- 1) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* **134**: 1087–1097, 1989.
- 2) Mann KG: Thrombin generation in hemorrhage control and vascular occlusion. *Circulation* **24**: 225–235, 2011. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.952648.
- 3) Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, et al.: Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **123**: 2934–2943, 2014. doi: 10.1182/blood-2013-11-512764.
- 4) Pedersen B, Holscher T, Sato Y, et al.: A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice. *Blood* **105**: 2777–2782, 2005. doi: 10.1182/blood-2004-09-372.
- 5) 久田洋平：組織因子陽性細胞外小胞とがん関連静脈血栓塞栓症. *血栓止血誌* **32**: 613–618, 2021. doi: <https://doi.org/10.2491/jjsth.32.613>.
- 6) Bonifay A, Cointe S, Plantureux L, et al.: Update on tissue factor detection in blood in 2024: A narrative review. *Hamos-taseologie* **44**: 368–376, 2024. doi: 10.1055/a-2381-6854.
- 7) Vincent LM, Tran S, Livaja R, et al.: Coagulation factor V (A2440G) causes east Texas bleeding disorder via TFPI alpha. *J Clin Invest* **123**: 3777–3787, 2013. doi: 10.1172/JCI69091.
- 8) Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al.: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* **33**: 4–15, 2003. doi: 10.1159/000071636.
- 9) Kamikubo Y, Mendolicchio GL, Zampolli A, et al.: Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex. *Blood* **130**: 1661–1670, 2017. doi: 10.1182/blood-2017-02-767079.
- 10) Kamikubo Y, Nagaya S, Inoue R, et al.: Tissue factor pathway-driven initial thrombin generation is associated with hypercoagulability in obesity. *Thromb Haemost*, in press, 2025. doi: 10.1055/a-2552-2050.
- 11) Eichler H, Angchaisuksiri P, Kavakli K, et al.: Concizumab restores thrombin generation potential in patients with haemophilia: Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling results of concizumab phase 1/1b data. *Haemophilia* **25**: 60–66, 2019. doi: 10.1111/hae.13627.
- 12) 鈴木伸明：抗 Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) 薬の基礎と臨床. *血栓止血誌* **33**: 23–30, 2022. doi: <https://doi.org/10.2491/jjsth.33.23>.
- 13) Giesen PLA, Rauch U, Bohrmann B, et al.: Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2311–2315, 1999. doi: 10.1073/pnas.96.5.2311.
- 14) Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, et al.: Alternatively spliced human tissue factor: A circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* **9**: 458–462, 2003. doi: 10.1038/nm841.
- 15) Bonifay A, Mackman N, Hisada Y, et al.: Comparison of assays measuring extracellular vesicle tissue factor in plasma samples: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Vascular Biology. *J Thromb Haemost* **22**: 2910–2921, 2024. doi: 10.1016/j.jtha.2024.05.037.
- 16) 嶋緑倫, 松本智子：トロンビン生成試験の実際と応用. *血栓止血誌* **18**: 217–225, 2007. doi: <https://doi.org/10.2491/jjsth.18.217>.
- 17) Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, et al.: Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: A systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. *J Am Coll Cardiol* **57**: 1877–1886, 2011. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.058.
- 18) Stein PD, Beemath A, Olson RE: Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. *Am J Med* **118**: 978–980, 2005. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.03.012.
- 19) De Pergola G, Pannacciulli N: Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol* **25**: 899–904, 2002. doi: 10.1007/BF03344054.
- 20) Samad F, Ruf W: Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood* **122**: 3415–3422, 2013. doi: 10.1182/blood-2013-05-427708.
- 21) 萩原建一, 野上恵嗣：Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) の新知見と臨床応用. *血栓止血誌* **25**: 11–22, 2014. doi: <https://doi.org/10.2491/jjsth.25.11>.
- 22) Hackeng TM, Seré KM, Tans G, et al.: Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3106–3111, 2006. doi: 10.1073/pnas.0504240103.
- 23) Dahlbäck B, Guo LJ, Livaja-Koshier R, et al.: Factor V-short and protein S as synergistic tissue factor pathway inhibitor (TFPIα) cofactors. *Res Pract Thromb Haemost* **2**: 114–124, 2017. doi: 10.1002/rth2.12057.
- 24) Winckers K, Cate HT, Hackeng TM: The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Rev* **27**: 119–132, 2013. doi: 10.1016/j.blre.2013.03.001.