

血友病と線溶系

野上恵嗣*, 中島由翔

Hemophilia and fibrinolysis system

Keiji NOGAMI, Yuto NAKAJIMA

要約：血液凝固第 VIII 因子欠乏症の血友病 A は、細胞基盤型凝固機序により生じるトロンビン生成が著明に低下し、フィブリン生成も極めて少なくかつ不安定で重篤な出血を呈する。従来の血液凝固研究は、内因系/外因系/抗凝固系/線溶系の個々の反応系は十分に研究され発展した。しかし凝固過程中、これら複数系が巧みに絡み合って進行していく概念が近年支持されている。凝固と線溶は巧妙にバランスをとりながら恒常性の維持を保っている。特に第 VIII 因子が両反応系のクロストークポイントの一つであることが明らかとなり、さらに血友病の病態に第 VIII 因子以外にトロンビン活性化線溶阻害因子の関与も近年注目されている。この病態解明に包括的に凝固線溶動態を評価できる測定法も近年発展してきた。近い将来、凝固系-線溶系制御軸を中心とした患者個々の重症度の予測や止血管理の方針、長期にわたる止血方針を立案することが可能になるかもしれない。

Key words: factor VIII, hemophilia, plasmin, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, global assay

緒言

血液凝固反応機序は Hoffman ら¹⁾ が提唱した cell-based coagulation model theory が現在支持されている。活性型第 (F) VII 因子 (FVIIa) が出血部位に露出される組織因子と複合体を形成し、FX を活性化して微量のトロンビンが生成される (初期相)。このトロンビン量では十分なフィブリン形成に至らず止血機能は不十分であるが、同時に血小板および FVIII や FV を活性化する。これにより活性化血小板上で凝固因子の活性化が連鎖的に起こりトロンビン生成は増大する (増幅・増大相)。このトロンビンバーストにより thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) を介した線溶抵抗性の安定フィブリンが形成される²⁾。活性化 FVIIIa は FIXa の補因子として内因系 FXa 反応系の FXa 生成反応速度を著明に増加

させる。よって、FVIII 欠乏症の血友病 A では、トロンビン生成が著明に低下し、フィブリン生成も極めて少なくかつ不安定で重篤な出血を呈する。F8 遺伝子の cDNA が 1984 年にクローニングされ、以後 FVIII 分子の機能構造解析は著しい発展を遂げ、同時に血友病 A の詳細な病態解明と治療にも貢献してきた³⁾。一方、従来の血液凝固研究は、内因系/外因系/抗凝固系/線溶系に分けられ、個々の系について十分に研究され現在まで発展してきた。しかしながら、凝固過程中ではこれら複数系が巧みに絡み合って進行していく概念が近年支持されてきているが、未だ解明されていないことが多い。最近、FVIII 欠乏病態の血友病と線溶系との関連性が特に注目されてきた。本稿では FVIII 分子と線溶系制御の関係、血友病と線溶系との関連について最近の知見も含め述べる。

*責任者連絡先：

奈良県立医科大学小児科

〒634-8522 奈良県橿原市四条町 840

Tel: 0744-29-8881, Fax: 0744-24-9222

E-mail: roc-noga@naramed-u.ac.jp

1. FVIII-線溶系制御

1) FVIII/FVIIIa の機能構造^{3,4)}

FVIII はアミノ酸組成の相同性より A1-A2-B-A3-

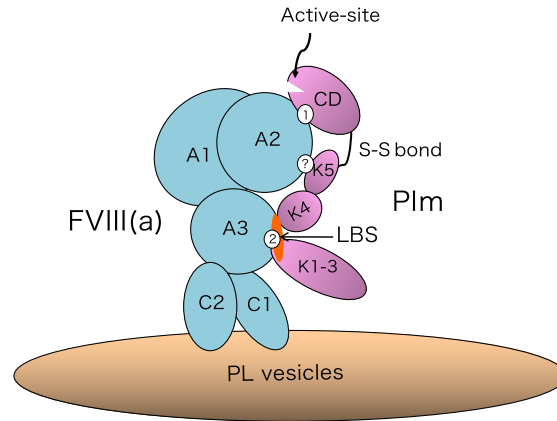


図1 FVIII-Plasmin 相互作用の結合モデル⁹⁾

①と②は結合部位を示す。LBS：リジン結合部位，K：Kringle domain，PL：リン脂質膜，Plm：Plasmin

C1-C2 のドメイン構造を呈する。循環血漿中、A1-A2-B ドメインの重鎖 (90~210 kDa) と、A3-C1-C2 ドメインの軽鎖 (80 kDa) の heterodimer として存在し、von Willebrand 因子と複合体を形成している。FVIII はトロンビンや FXa により、重鎖 Arg³⁷²、Arg⁷⁴⁰ と軽鎖 Arg¹⁶⁸⁹ で開裂し、重鎖は 50-kDa A1 と 40-kDa A2 ドメイン、軽鎖は 70 kDa A3-C1-C2 ドメインに分解され、FVIIIa heterotrimer となる。FVIIIa は FIXa 惹起 FX 活性化の凝固反応速度を約 10⁶ 倍増強する。FVIIIa に一旦活性化されると、容易に A2 ドメインが解離して FVIIIa が不活化され、さらに活性型プロテイン C/プロテイン S (APC/PS) や FXa のセリンプロテアーゼが Arg³³⁶、Arg⁵⁶²、Lys³⁶ で分解し、完全に失活させる³⁻⁵⁾。APC/PS 惹起 FVIIIa 不活化機序に FV がその補因子として作用し、不活化をさらに増強させる³⁻⁵⁾。本邦で欧米人に存在する FV_{Leiden} (R506Q) 以外で FV 変異による APC レジスタンスによる重篤な血栓症を呈する症例 (FV Nara; R1920W) が初めて発見された⁶⁾。このように幾つもの凝固因子による FVIII 制御機序により、FVIII(a) 活性化と不活化のバランスを絶妙に制御することにより、易出血または過凝固を防いでいる。

2) プラスミン-FVIII 関連制御

In vitro 純化系において、プラスミノゲンから活性化された極少量のプラスミン (Plm) でさえ、FVIII を反応初期相において急峻に活性化し、その後急速に不活化する。その際、Plm は FVIII 分子内の 6 部位

を sequential に限定分解 (Lys³⁶、Arg³³⁶、Arg³⁷²、Arg⁷⁴⁰、Arg¹⁶⁸⁹、Arg¹⁷²¹) するが、同部位を開裂する FXa や APC に比し FVIII 活性化および不活化はより急峻である⁷⁾。この活性化・不活化機序は von Willebrand 因子やリン脂質膜の存在には全く影響されない。Plm は分子上のリジン結合部位 (LBS) を介してフィブリンをはじめ多くの凝固蛋白と相互作用をなす。しかし、FVIII-Plm 相互作用において、FVIII の A2 ドメインと Plm の活性化ドメインは LBS を介さず (非依存性) 結合することにより Arg³³⁶、Arg³⁷² や Arg⁷⁴⁰ を開裂させ、FVIII 活性化および不活化を制御する^{8,9)}。一方、FVIII の A3 ドメインは Plm の Kringle 1-3 ドメインと LBS を介して結合して Lys³⁶ を開裂させることにより不活化制御している^{9,10)}。そして、FVIII-Plm 相互作用は tenase 複合体では FIXa により制御されている。以上から、Plm が FVIII を凝固初期相で活性化/不活化する FVIII-Plm 制御軸において、その結合反応様式を初めてモデリングすることができた (図 1)。元来、Plm は線溶能のみならず、向凝固能も有することは報告されていたが、これは Plm による直接的な FVIII 活性化が寄与する事も明らかになった。さらに全血や血漿を用いた、より生理的機能を反映しうる包括的凝固機能の評価においても、FVIII-Plm 制御軸における向凝固能が観察されている¹¹⁾。

2. 血友病と線溶系

血液凝固反応により生成されたトロンビンは、最終的にフィブリン塊を形成して止血を完了させる。その後、形成されたフィブリンは、Plmによる線溶作用によって分解・除去される¹²⁾。Plmによる線溶機構は、フィブリンのPlmによる部分加水分解により、フィブリン分子上に出現するC末端のリジン残基を介してプラスミノゲンやPlm、組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)が結合することにより効率よく展開される。

1) トラネキサム酸 (TXA)

TXAは、リジンと類似した構造を有する線溶阻害剤である。TXAはプラスミノゲンのリジン結合部位を介して、フィブリンへの吸着を阻止することで抗線溶作用を発揮し、血友病患者における粘膜出血への止血に対して現在まで臨床の場で多数使用されてきた。最近、TXAの血友病に対する臨床効果における更なる新しい知見が報告されている。Tranら¹³⁾は、インヒビター保有血友病A患者にTXAとバイパス止血剤の遺伝子組換え型FVIIa製剤または活性化型プロトロンビン複合体製剤との併用療法で治療し、rotational thromboelastometry (ROTEM)を用いて包括的に凝固能を評価したところ、バイパス止血剤単独療法よりTXAとの併用療法のほうが有効であり、血栓症や凝固促進を示唆する様な所見は認めなかったと報告している。またJanbainら¹⁴⁾は、FVIIIノックアウトマウス(FVIII-KO)を用いて、FVIII単独とFVIII+TXAの併用療法における凝固能をトロンビン生成能で評価し、形成したフィブリンを走査型電子顕微鏡での解析にて比較した。トロンビン生成試験ではTXAとの併用効果は有意差を認めなかったが、走査型電子顕微鏡での観察では、FVIII+TXA併用療法の方がより強力なフィブリン網を形成していることが示唆された。また、FVIII-KOマウスに対して外的な膝関節出血を施し、FVIII単独とFVIII+TXAの併用療法の治療効果をMRI画像で比較したところ、TXAを併用したマウスは関節出血を有意に減少させていた。これらの結果は、TXAとFVIII製剤、もしくはTXAとバイパス止血剤の併用療法が血友病患者の治療としての一助になる可能

性があるといえよう。

2) TAFI

TAFIは凝固系と線溶系の両者に関与する線溶抑制因子である²⁾。TAFIはトロンビンにより活性化され、活性化TAFI(TAFIa)に変換される。TAFIaはフィブリンのC末端リジン残基を除去することにより、線溶系酵素のフィブリンへの結合を阻害することにより線溶反応を抑制する。TAFIの濃度が一定以下になればフィブリン上のC末端のリジン残基数が多くなり、Plm生成を促進し、線溶反応が亢進する。近年、血友病A患者におけるTAFIの関連性が特に注目されている。Wyseureら¹⁵⁾の報告では、抗FVIII抗体投与による後天性血友病Aモデルマウス、TAFIを欠損させた後天性血友病Aモデルマウス、先天性血友病Aモデルマウスを用いて関節障害を施したところ、TAFI欠損の後天性血友病Aマウスと先天性血友病Aマウスは重度の関節出血を認めたが、後天性血友病Aモデルマウスは顕著に軽症であった。また、循環血中TAFI活性を測定したところ、先天性血友病AマウスではTAFIの活性化は認められなかったが、後天性血友病Aマウスでは顕著なTAFIの活性化を認めた。先天性血友病AマウスではTAFIが著しく欠損している事により関節出血が悪化したことを示唆しており、血友病性関節出血におけるTAFIの重要な関与を示唆した。

同グループ¹⁶⁾は、さらに血友病患者はTAFI活性の減少が異常な血管リモデリングを引き起こすという仮説のもと、関節出血後の血管リモデリングにおけるFVIIIおよびTAFIの関与について検討した。後天性血友病Aマウスに抗TAFI抗体を投与し関節障害を施したところ、過度の血管リモデリングと血管拡大が持続した。また、血友病AマウスにおけるTAFIの過剰発現は、異常な血管の拡大と血管漏出を防止することが明らかになった。これらの結果より、血友病患者におけるTAFI欠乏では、関節出血後の不適応な血管リモデリングが引き起こされることが示唆された。

Semeraroら¹⁷⁾は、オンデマンドで治療された重症血友病Aの患者61人を年間出血回数で軽症、中等症、重症に分類し、血栓溶解時間、TAFI活性、精製TAFIaの添加時の線溶時間の延長としてのTAFIa

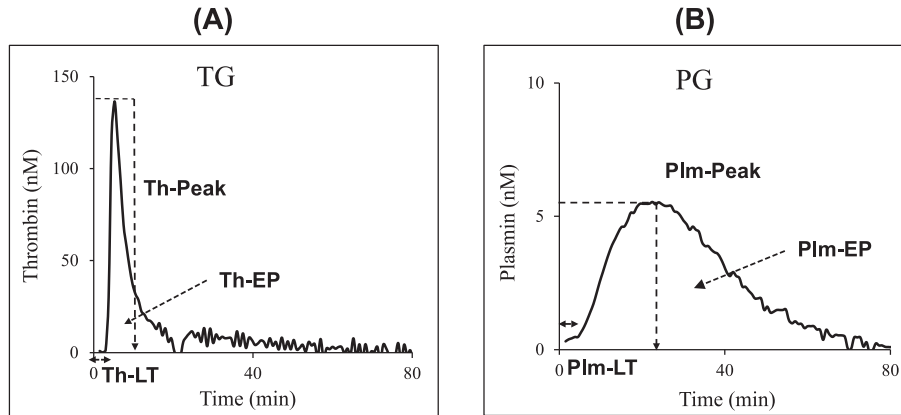


図2 正常血漿におけるトロンビン・プラスミン生成試験 (T/P-GA)

正常血漿から得られるトロンビン生成波形 (TG) (A) とプラスミン生成波形 (PG) (B) とそのパラメータを示す. Th: thrombin, Plm; plasmin, LT; lag time, Peak; peak level, EP; endogenous potential.

への反応性, さらに血中 TAFIa/ai 濃度測定について解析を行った. その結果, 血友病患者は健常者と比較すると, TAFIa/ai 濃度は同程度であったが, 血栓溶解時間が短く, TAFIa の生成量は少なく, TAFIa への反応性も低下していた. 血栓溶解時間は, 軽度, 中等度, 重度の血友病患者では差を認めなかったが, 出血傾向が重篤になるに従い TAFIa の生成量と TAFIa への反応性は低下した. 血友病 A 患者における TAFI 経路の損傷度が出血傾向と相関することから, TAFI 検査が血友病 A 患者の出血傾向を予測するために有用であることも報告されており, 今後の臨床応用へのさらなる発展が期待される.

3. 血友病における包括的凝固線溶解析

正常な止血反応では, 凝固反応と線溶反応の両者が適度なバランスを維持することで行われている. したがって, 両者のバランスが均衡状態なのか不均衡状態なのか, すなわち凝固線溶能を同時に測定することにより, 全体的な止血能を評価することが可能と考えられる. 最近我々は, 従来から包括的凝固機能検査として用いられていたトロンビン生成試験および凝固波形解析をさらに発展させた, トロンビン・プラスミン生成試験 (Thrombin/Plasmin-Generation Assay: T/P-GA) と凝固線溶波形解析 (Clot Fibrinolysis Waveform Analysis: CFWA) の開発に成功した. 以下

に概説する.

1) T/P-GA (図2)¹⁸⁾

血漿検体へのトリガー試薬として, 従来のトロンビン生成試験 (Thrombin generation assay: TGA) のトリガー試薬である組織因子/リン脂質に加えて組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) を添加し, 生成されたトロンビンと Plm を各々の蛍光発色基質を用いて検出することで潜在的な凝固線溶能を同時に包括的に評価できる T/P-GA を確立した. T/P-GA は, トロンビンと Plm の生成量を, 反応の開始時間である Lag time, ピーク値 (Peak thrombin or plasmin), ピークに達する時間 (time to peak), 総生成量 (Endogenous potential of thrombin or plasmin) などのパラメータを算出して定量的に凝固線溶動態を評価できる.

我々は, T/P-GA を用いて各凝固因子欠乏症の凝固線溶能を評価したところ, FV, FX 欠乏症はトロンビン, Plm 生成量が共に低下するが, フィブリノゲン欠乏症やプラスミノゲン欠乏症は, トロンビン生成量は正常であるが, Plm 生成量が低下してした. 先天性血友病 A 20 例を T/P-GA で評価したところ, トロンビン生成量は低下していたが Plm 生成量は正常血漿とほぼ同等であり, 血友病 A 患者は凝固能と線溶能の不均衡が生じていることが明らかになった¹⁸⁾. 最近, 我々は後天的に重篤な出血をきたす後天性血友病 A 患者のモニタリングにも T/P-GA が有用であ

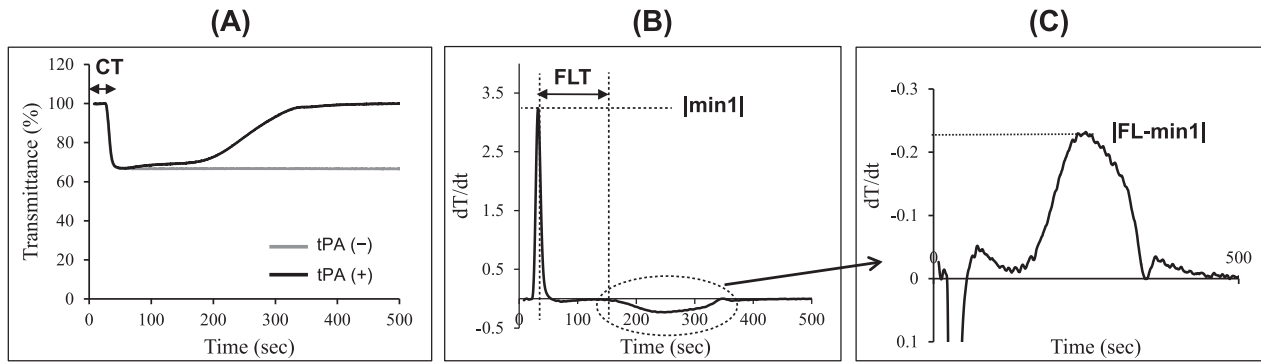


図3 正常血漿における凝固線溶波形解析 (CFWA)

正常血漿から得られる tPA 非存在下および存在下の凝固線溶波形 (A) とそのパラメータを示す. (B) (A) の一次微分波形, (C) (B) の線溶部分の逆波形を示す. tPA; tissue-type plasminogen activator, CT; clot time, FLT; fibrinolysis lag time, |min1|; maximum coagulation velocity, FL-|min1|; maximum fibrinolysis velocity

ることを報告した¹⁹⁾. 後天性血友病 A 患者の重篤な出血症状時はトロンビン生成だけでなく Plm 生成も極めて低下しており, トロンビンより Plm 生成の方が早期に回復し, Plm 生成が患者の臨床症状の評価に有用であることが示唆された.

2) CFWA (図 3)²⁰⁾

凝固波形解析 (Clot waveform analysis; CWA) は, 透過光分析による自動凝固分析装置を用いて, フィブリン形成過程における血漿サンプルの透過度の変化を検出し, 包括的凝固能を評価できる. 我々は最近, APTT の CaCl₂ 添加時に tPA を同時に添加することにより CFWA を用いて凝固線溶動態を同時に評価できる測定法を確立した. CFWA では, 凝固相は凝固時間 (Clot time: CT), 凝固波形を一次微分して凝固速度を算出し, その最大値である最大凝固速度 (|min1|) で解析し, 線溶相は CT から溶解開始までの時間 (Fibrinolysis lag time: FLT), 線溶波形を一次微分して線溶速度を算出し, その最大値である最大線溶速度 (FL-|min1|), 線溶反応総量 (Endogenous fibrinolysis potential: EFP) により定量的に解析できる.

本測定法を用いて, 正常血漿に様々な濃度のアルガトロバン (トロンビン阻害剤), TXA, トロンボモデュリンを添加し, 凝固線溶動態を検討した. アルガトロバンを添加した場合, 濃度依存性に CT が延長し |min1| は低下した. さらに, CT 延長に伴って FLT も延長し, 線溶開始が遅延していた. TXA の存

在下では, 凝固相に影響は与えなかったが, 濃度依存性に FLT の延長と FL-|min1| の低下を認めた. 低濃度のトロンボモデュリンを添加した血漿では, 凝固相に影響は与えなかったが, FL-|min1| の低下を認めた. 高濃度のトロンボモデュリンでは, 凝固相も線溶相も阻害した. これらの結果は本測定法が凝固能と線溶能の相互作用 (interplay) を反映できていることも示された²⁰⁾.

FVIII 欠乏血漿を CFWA で解析すると, 凝固相は正常血漿より延長し, 線溶相はフィブリン形成前に開始していることが明らかになった²⁰⁾. FL-|min1| は正常血漿とほぼ同等であったが, 二峰性の線溶波形を示し, EFP は著明に増加していた. この結果も, 血友病 A が凝固系と線溶系が不均衡であることを示していた. FVIII 欠乏血漿または FIX 欠乏血漿に様々な濃度の FVIII 製剤, FIX 製剤をそれぞれ添加して CFWA を用いて解析すると, 両者共に, 凝固相における CT と |min1| は濃度依存性に改善した. 線溶相は, 低濃度の FVIII (< 1 IU/dL) の場合は改善効果を認めなかったが, FIX の場合は低濃度 (< 1%) でも FLT と EFP が濃度依存性に改善した. TXA を FVIII 欠乏血漿および FIX 欠乏血漿への添加により, 低濃度の TXA でさえ両欠乏血漿の線溶相を抑制し, 高濃度の TXA を添加すると, ほぼ完全に線溶反応を抑制した. CFWA を用いることにより, 凝固因子欠乏症の病態解析, 凝固因子製剤や抗線溶薬の治療効果などにおける凝固線溶動態を包括的に評価するこ

とが可能と考えられた。最近、本法がFVIII製剤やEmicizumab存在下で形成されるフィブリン構造やその安定性を評価することにも有用であったことを報告した²¹⁾。また、血友病以外の疾患領域にもT/P-GAとCFWAの両測定法が臨床的に応用可能であったことが最近数々報告されている²²⁻²⁴⁾。

4. おわりに

生体内では凝固と線溶は巧妙にバランスをとりながら恒常性の維持を保っている。これまで凝固系と線溶系で各々数多くの研究成果が得られてきたが、FVIIIが両者のクロストークポイントの一つであることがわかった。最近では血友病の病態がFVIII以外にTAFIの線溶系制御因子の関与もクローズアップされている。さらに血漿検体を用いて両系の凝固線溶動態を評価できる測定法も発展してきた。近い将来、これらの新概念での制御軸を中心とした、患者個々の重症度の予測や止血管理の方針、長期にわたる止血方針を立案することも可能になるかもしれない。

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

- Hoffman M, Monroe DM 3rd: A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* **85**: 958–965, 2001.
- Declerck PJ: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *Hamostaseologie* **31**: 165–166, 168–173, 2011.
- 野上恵嗣：血友病Aの分子病態の進歩—VIII因子構造・機能からみた病態—。日本小児血液がん学会雑誌 **51**: 452–458, 2014.
- Fay PJ: Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* **18**: 1–15, 2004.
- Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ: Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J Biol Chem* **278**: 16502–16509, 2003.
- Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M: Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood* **123**: 2420–2428, 2014.
- Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Yoshioka A: Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: a crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J Biol Chem* **282**: 5287–5295, 2007.
- Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, Takeyama M, Tanaka I, Yoshioka A, Shima M: Identification of a plasmin-interactive site within the A2 domain of the factor VIII heavy chain. *Biochim Biophys Acta* **784**: 753–763, 2008.
- Nishiya K, Nogami K, Okada K, Matsuo O, Takeyama M, Ogiwara K, Shima M: Determination of a factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalysed activation and inactivation of factor VIII(a). *Thromb Haemost* **104**: 105–117, 2010.
- Nogami K, Saenko EL, Takeyama M, Ogiwara K, Yoshioka A, Shima M: Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. *J Biol Chem* **284**: 6934–6945, 2009.
- Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M: Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis* **21**: 568–576, 2010.
- Rijken DC, Lijnen HR: New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* **7**: 4–13, 2009.
- Tran HT, Sørensen B, Rea CJ, Bjørnsen S, Ueland T, Pridd AH, Tjønnfjord GE, Holme PA: Tranexamic acid as adjunct therapy to bypassing agents in haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* **20**: 369–375, 2014.
- Janbain M, Enjolras N, Bordet JC, Bolbos R, Brevet M, Leissinger C, Dargaud Y: Hemostatic effect of tranexamic acid combined with factor VIII concentrate in prophylactic setting in severe hemophilia A: A preclinical study. *J Thromb Haemost* **18**: 584–592, 2020.
- Wyseure T, Cooke EJ, Declerck PJ, Behrendt N, Meijers JCM, von Drygalski A, Mosnier LO: Defective TAFI activation in hemophilia A mice is a major contributor to joint bleeding. *Blood* **132**: 1593–1603, 2018.
- Wyseure T, Yang T, Zhou JY, Cooke EJ, Wanko B, Olmer M, Agashe R, Morodomi Y, Behrendt N, Lotz M, Morser J, von Drygalski A, Mosnier LO: TAFI deficiency causes maladaptive vascular remodeling after hemophilic joint bleeding. *JCI Insight* **4**: pii: 128379, 2019.
- Semeraro F, Mancuso ME, Ammolto CT, Dirienzo L, Vitulli A, Santagostino E, Tripodi A, Colucci M: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor pathway alterations correlate with bleeding phenotype in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* **18**: 381–389, 2020.
- Matsumoto T, Nogami K, Shima M: Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* **110**: 761–768, 2013.
- Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Taguchi M, Yada K, Okahashi N, Amano I, Kimura H, Shima M: Possible assessment of coagulation function and haemostasis therapy using comprehensive coagulation assays in a patient with acquired haemophilia A. *Haemophilia* **23**: e46–e50, 2017.
- Nogami K, Matsumoto T, Sasai K, Ogiwara K, Arai N, Shima M: A novel simultaneous clot-fibrinolysis waveform analysis for assessing fibrin formation and clot lysis in haemorrhagic disorders. *Br J Haematol* **187**: 518–529, 2019.

- 21) Shimonishi N, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nakazawa F, Soeda T, Hirata M, Arai N, Shima M: Emicizumab improves the stability and structure of fibrin clot derived from factor VIII-deficient plasma, similar to the addition of factor VIII. *Haemophilia*. Mar 11. doi: 10.1111/hae.13961, 2020.
- 22) Yoshizawa H, Nogami K, Matsumoto T, Tsujii N, Sakai T, Takase T, Tanaka I, Shima M: Dynamic evaluation of hemostasis in the acute phase of Kawasaki disease using comprehensive coagulation functional assays. *Thromb Res* **174**: 76–83, 2019.
- 23) Ishihara T, Nogami K, Ochi S, Ishida T, Kosaka Y, Sawada A, Inoue M, Osone S, Imamura T, Hosoi H, Shima M: Disordered hemostasis associated with severely depressed fibrinolysis demonstrated using a simultaneous thrombin and plasmin generation assay during L-asparaginase induction therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **67**: e28016, 2020.
- 24) Ishihara T, Nogami K, Takeshita Y, Ochi S, Shima M: Fibrinolytic abnormality associated with progression of pediatric solid tumor. *Pediatr Int* **60**: 540–546, 2018.