

D-dimer の測定による血栓症の臨床診断薬の開発

日大生産工(院) ○岡安 由季
日大生産工 神野 英毅

【緒論】

人体は日々、発汗、発熱、消化、ホルモン調節などの多くの生命維持活動を行っている。その活動の中でも酸素、栄養素、そして老廃物の運搬、細菌や異物の排除などは血液と深く関与している。

血液は、生体内において常に流動性を保ちながら先に挙げた機能を営んでいる。また、血液の大きな特徴としては、体外への放出時や負傷時に凝固することが挙げられる(血液凝固作用 Fig.1)。凝固作用は血管の損傷により開始する。これにより血液中の15種類の凝固因子が次々と連続して反応し、最終的にトロンビンの作用により Fibrinogen(Fg)が Fibrin(Fb)へ転換する。この Fb が重合して Crosslinked Fb となる。血管内において Crosslinked Fb の発現は、血栓の発現を意味する。血栓が適度な大きさになるのに伴わない、肝臓で生産された plasminogen が plasmin となる。そして、plasmin は過剰な Fb を分解し、血栓を溶解する(線溶)。Fb が分解されると D-dimer を主とする Fb 分解産物(Fibrin Degradation Products:FDP)が生成される。また、plasmin は Fb だけでなく Fg の分解も行うが、D-dimer は Fb を分解したときのみ生成される。健康な人間では、この線溶機構(Fig.1)が正常に機能する。

しかし、肝疾患をはじめとする様々な疾患の伴う場合において、線溶機構が正常に機能しない。そのため、形成された血栓は溶解されることなく増大し続ける。次第に血管は血栓によりふさがれ、心筋梗塞、脳梗塞、血栓症静脈炎などの血栓症を引き起こす^{1),2)}。

近年では、血栓症や血栓溶解治療のモニターなどの臨床診断はラテックス凝集反応を用いた D-dimer の測定によって行われている。そして、これらの疾患の迅

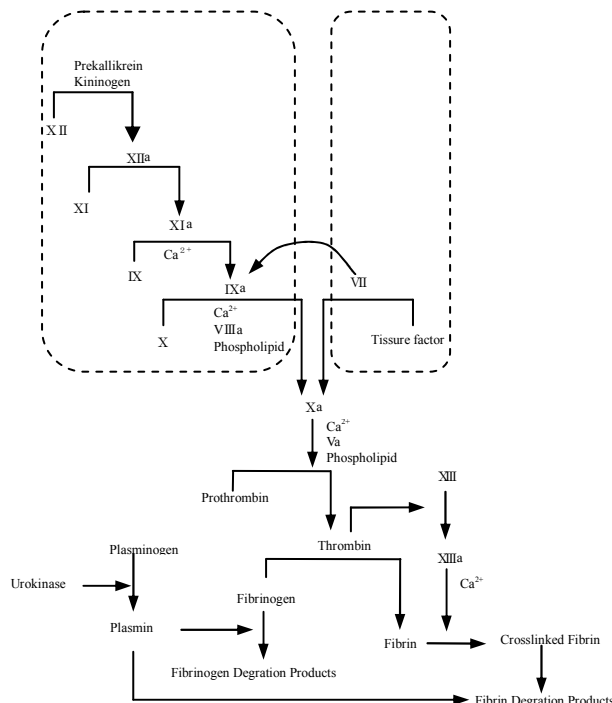


Fig.1 The cascade system of blood coagulation and fibrinolysis.

速な診断を行うことにより早期治療が可能となる。また、本研究室では抗原抗体反応を用いたラテックス凝集反応による臨床診断薬に関する研究を行ってきた。ラテックス試薬の特徴として、ラテックス粒子の表面上に直接抗体を結合させたものよりもスパーサー分子を間に導入したものは感度的に安定であることが挙げられる。また、このスパーサー分子をアミノ酸に置き換え、ラテックス粒子にアミノ酸を付加させ、ラテックス粒子表面と抗体分子の距離をあけることにより、更に高感度測定が可能となることが判明した³⁾。そこで本研究では、アミノ酸付加ラテックス粒子に抗 D-dimer 抗体を感作させることで高感度なラテックス試薬の開発を目的とする。

Study on the Mechanism of Thrombosis based on D-dimer Formation.

Yuki OKAYASU, Hideki KOHNO

【実験】

ラテックス試薬に結合させる抗 D-dimer 抗体を検討する為に血液からの抗原(D-dimer)の形成を行った^{4),5)}。

● Crosslinked Fibrin の形成

採血した血液 9 ml にクエン酸ナトリウム溶液 1 ml を氷上で混合し、20 分以内に 3,000rpm で 5 分間遠心分離操作を行い、血漿を得る。得られた血漿をスピッツ 1 本あたりに 1.0ml を 1 分注したものを 8 本用意する。各スピッツに 100 μ l の凝固剤(400unit/ml ウシ由来 Thrombin, 0.3M CaCl₂)を添加後、25°C で 1 時間放置し、Crosslinked Fibrin を形成させる。

● Crosslinked Fibrin の分解

得られた Crosslinked Fibrin に、予め 37°C で 30 分間反応させておいた Urokinase / Plasminogen 溶液 (Urokinase;1,000unit/ml, Plasminogen;9.7unit/ml)を 28 μ l 添加する。37°C で攪拌下経時的に分解反応を行い、反応停止剤として Aprotinin(2.0unit/ml) を 40 μ l 添加する。分解反応停止剤は分解反応開始後 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後にそれぞれ添加する。停止剤添加後、各分解溶液に遠心分離操作(10,000 \times g, 10min,4°C)を行い、上清を FDP 試料として採取する。

● PAGE による分解産物の確認

反応開始直後(0 時間)の溶液と 24 時間後の溶液各 1 μ l を 10%アクリルアミドゲルにアプライし、40mA・150V で 2 時間電気泳動を行う。

【結果及び考察】

Fig.2 に得られた Crosslinked Fibrin を示し、Fig.3 に Crosslinked Fibrin を分解して得られた FDP を示した。これらの結果より、目視においても Crosslinked Fibrin の形成・分解が確認できた。

Fig.4 に PAGE の結果を示した。M は分子量マーカー第一・II、①は反応開始直後(0 時間)の溶液、②は 24 時間後の溶液である。この結果により、24 時間分解反応を行うことにより、血液から形成が確認できた Crosslinked Fibrin が分解されたことが分かる。本講演会では、凝固線溶系のメカニズム及び新診断薬の開発について更に詳細な報告する。

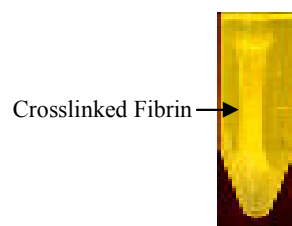


Fig.2 Crosslinked Fibrin

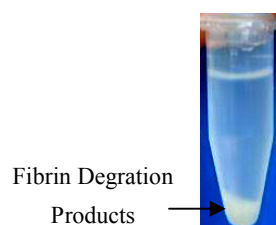


Fig.3 Fibrin Degradation Products

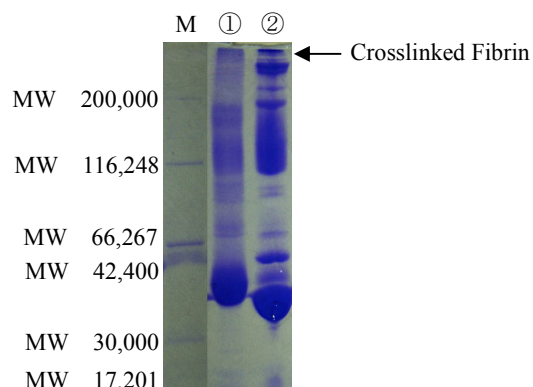


Fig.4 PAGE about Crosslinked Fibrin and Fibrin Degradation Products

【参考文献】

- 1) 松田道生, 鈴木宏治, 止血・血栓・線溶, 103-177
- 2) 小川哲平, 大島年照, 浅野茂隆, 血液学, 41-46
- 3) 福田梓, Amino acid spacer を用いた感作法による高感度 CRP 定量に関する研究
- 4) 徐吉夫, 河野功, 桜井錠治, 松田道生, フラグメント D のアミノ末端の構造を認識するモノクローナル抗体(JIF-23)を用いたフィブリンのプラスミン分解産物の解析, 血栓止血誌, p.105-113
- 5) 奥村伸生, 鎌谷ひとみ, 熊谷俊子, 亀子光明, 戸塚実, 斉藤博, 勝山努, 金子正光, SDS-PAGE と Immunoblot によるフィブリンおよびフィブリノーゲン分解産物の解析, 臨床病理, p.201-207