

血液凝固線溶系における D-dimer の生化学的研究

日大生産工（院） ○岡 安 由 季
日大生産工 神 野 英 毅

1 緒言

血液は、体外への放出時や負傷時に凝固する（血液凝固作用 Fig. 1）。血液の凝固作用は血管の損傷により開始し、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する。これによりカスケード反応が起こり、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 Cross-linked Fb となる。血管内において Cross-linked Fb の発現は、血栓の形成を来す。血栓の増大に伴い、血栓を溶解するため肝臓で生産された plasminogen が plasmin となる。そして、plasmin は過剰な Fb を分解し、線溶機構が働く (Fig. 1)。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 の分解を行い、Fb を分解したときのみ D-dimer は生成される。

健康状態では、この線溶機構が正常に機能するが、循環器系疾患を含む血液疾患の伴う場合において、凝固作用と線溶機構の均衡が崩れる。そのため、形成された血栓は溶解されることなく残存する。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)}。

血栓症や血栓溶解の治療目的として、臨床診断における Latex 凝集反応を用いた D-dimer の精密測定が注目されている。そして、これらの疾患の迅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 Latex 凝集反応による臨床診断薬に関する研究を行ってきた。Latex 試薬の特徴として、Latex 粒子の表面上に直接抗体を結合させたものよりも spacer 分子を間に導入し

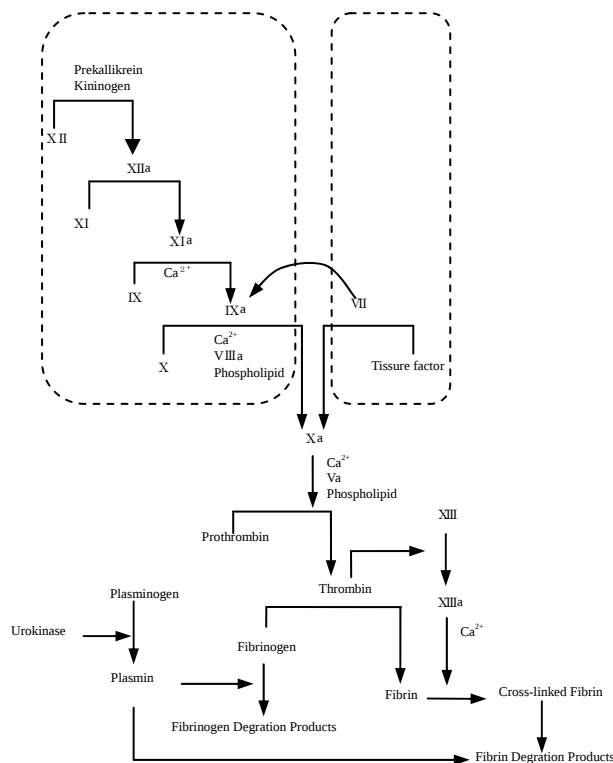


Fig. 1 生体における凝固・線溶機構

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 spacer 分子をアミノ酸に置き換え、Latex 粒子にアミノ酸を付加させ、Latex 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 Latex 粒子に抗 D-dimer 抗体を感作させることで高感度な Latex 試薬の開発を目的とする。

2 実験

○Latex 試薬作製

・物理吸着試薬

1%のカルボキシル基付加 Latex 懸濁液に D-dimer 抗体を加え、カルボキシル基と抗体との結合を行う (27°C, 30min)。さらに、変性 BSA 溶液を加え、Latex

粒子上の抗体未結合部位のブロッキングを行う (27°C, 30min)。遠心分離操作 (160,000rpm, 20min) を行い、沈殿物を緩衝溶液 (Tris-HCl, pH8.2) で懸濁させて物理吸着 Latex 試薬とする。

・化学結合試薬 (spacer なし)

1%のカルボキシル基付加 Latex 懸濁液に Water Soluble Carbodiimide (WSC) 及び N-Hydroxy Succinimidemethyl (NHS) を加え Latex 粒子上のカルボキシル基の活性化を行う (27°C, 30min)。

この活性化 Latex 懸濁液に抗 D-dimer 抗体を加えてカルボキシル基と抗体との結合を行う (37°C, 30min)。さらに、変性 BSA 溶液を加え、Latex 粒子上の抗体未結合部位のブロッキングを行う (27°C, 30min)。遠心分離操作 (160,000rpm, 20min) を行い、沈殿物を緩衝溶液 (Tris-HCl, pH8.2) で懸濁させて化学結合 Latex 試薬とする。

・化学結合試薬 (Arginine spacer 付加)

1%のカルボキシル基付加 Latex 懸濁液に Water Soluble Carbodiimide (WSC) 及び N-Hydroxy Succinimidemethyl (NHS) を加え Latex 粒子上のカルボキシル基の活性化を行う (27°C, 30min)。

この活性化 Latex 懸濁液にアミノ酸 spacer を結合させる。そして、抗 D-dimer 抗体を加えて spacer と抗体との結合を行う (37°C, 30min)。さらに、変性 BSA 溶液を加え、Latex 粒子上の抗体未結合部位のブロッキングを行う (27°C, 30min)。遠心分離操作 (160,000rpm, 20min) を行い、沈殿物を緩衝溶液 (Tris-HCl, pH8.2) で懸濁させて化学結合 Latex-spacer 試薬とする。

OD-Dimer 測定

全自動免疫血清検査システム (Latex Photometric Immune Assay : LPIA-500) を用いて、作製した 3 種の Latex 試薬と各種検体中の D-dimer の凝集反応速度を測定した。

本実験では検体として、健常者と血栓症を併発すると考えられる糖尿病患者及び慢性肝硬変患者の血漿を使用した。

D-dimer 標準試薬により作成した検量線により、検体中の D-dimer の定量を行った。そして、アミノ酸 spacer 付加 Latex 試薬による、高感度測定の有用性

について検討した。

3 結果及び考察

Fig. 2 に物理吸着 Latex 試薬を用いて測定した各検体の血漿中の平均 D-dimer 値を示した (健常者, 糖尿病患者, 慢性肝硬変患者)。Fig. 2 より、糖尿病及び肝炎患者における D-dimer 値が健常者のものよりも高いことが分かる。その中でも慢性肝硬変においては、D-dimer 値の顕著な増加が見られる。この結果は肝炎患者の肝機能低下による、plasmin 生産量が低下し、凝固作用の亢進と線溶機構の後退の均衡が崩れたためと考えられる。そして、D-dimer は、肝炎の段階を調査する重要なパラメータであることを示唆する。

本発表会では、物理吸着及び 2 種類の Latex 試薬による D-dimer 測定について詳細な報告を行う。また、アミノ酸付加 Latex 試薬による高感度測定の有用性についても報告する。

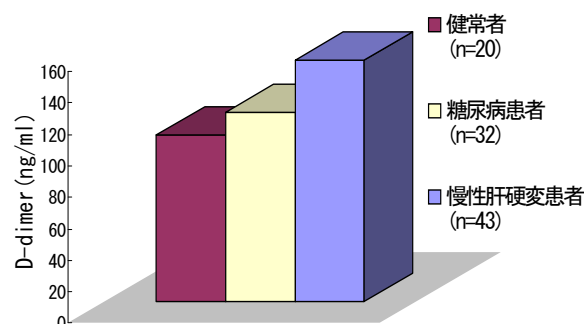


Fig. 2 健常者, 糖尿病患者, 慢性肝硬変患者における血漿中の平均 D-dimer 値

4 参考資料

- 1) 松田道生, 鈴木宏治, 止血・血栓・線溶, 中外医学社, 1994, p. 103-177
- 2) 小川哲平, 大島年照, 浅野茂隆, 血液学, 中外医学社, 1991, p. 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, 日本大学生産工学部応用分子化学科卒業論文発表会, 2006, p. 60

