原 著

D-dimerモノクローナル抗体による安定化 フィブリン分解産物測定の臨床的意義

中川 雅夫* 辻 肇* 宇野 雅史* 豊田 武夫*
沢田 昌平* 白井 馨* 小林 恭一郎*
高淵 洋彰* 渡辺 雅彦*

Clinical significance of the measurement of crosslinked fibrin derivatives with monoclonal antibody

Masao NAKAGAWA*, Hajime TSUJI*, Masashi UNO*, Takeo TOYODA*,
Shohei SAWADA*, Kaoru SHIRAI*, Kyoichiro KOBAYASHI*,
Hiroaki TAKABUCHI* and Masahiko WATANABE*

Key words: crosslinked fibrin degradation products, DIC, anti D-dimer
monoclonal antibody, ELISA, Latex agglutination assay

Plasma levels of crosslinked fibrin degradation products(XDP)in 500 healthy subjects (250 male and 250 female), 18 patients with disseminated intravascular coagulation (DIC) and patients with thrombotic disease were measured by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using specific anti D-dimer monoclonal antibody.

Plasma levels of XDP in 500 healthy subjects were 174 (38~309) ng/ml and sex related change was observed ($p<0.01$). High XDP values were observed in all of 18 patients with DIC. The results were also well correlated with those obtained by the latex agglutination assay.

These results indicate that the measurement of XDP using anti D-dimer monoclonal antibody could be one of the sensitive parameters in thrombotic and fibrinolytic condition especially DIC.

* 京都府立医科大学 第二内科学教室〔〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町〕; Second Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan. 受付: 1988. 9. 10. 受理: 1989. 1. 7.

はじめに

DIC をはじめ種々の血栓性疾患など血液凝固の亢進状態が存在する場合には生体の恒常性の維持機構の作動により線維素溶解現象も亢進することが知られている。しかしながら線溶療法時などにみられる一次線溶の亢進の結果産生されるフィブリノゲン分解産物と DIC のごとく一旦形成された血栓の溶解（二次線溶）により生じる安定化フィブリンからのフィブリン分解産物との鑑別はその病態を検索する上で重要である。この度、酵素免疫測定法による D-dimer 測定キットを用い、健常者ならびに各種血栓性疾患々者の血漿につき若干の検討を行ったので報告する。

I. 試料および方法

A 検体

健常成人 500 名（男性 250 名、女性 250 名、平均年齢 34.8 ± 12.5 歳）ならびに各種血栓性疾患々者 57 名から静脈採血を行い 3.8% クエン酸ナトリウム加血漿を得てこれを試料とした。

B D-dimer 測定法

i) Asserachrom D-Di 法 (Stago 社):

マイクロタイタープレートのウェルに抗 D-dimer マウスモノクローナル抗体液 $200 \mu\text{l}$ を添加し室温で一晩コーティングし、洗浄後希釈した添付標準品および検体 $200 \mu\text{l}$ を加えて室温にて一時間反応させた。洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗 FDP-D 分画抗体液 $200 \mu\text{l}$ を加えて同様に反応させ、基質としてオルトフェニレンジアミン液 $200 \mu\text{l}$ で発色させ、3M 硫酸 $50 \mu\text{l}$ で反応を停止させ、光電比色計を用い波長は 492 nm にて吸光度を測定した。なお測定値はフィブリノゲン換算量にて表現した。

ii) Dダイマー測定用試薬「BMY」[D-Di Test 法] (Stago 社、ベーリンガー・マンハイム山之内):

D-dimer 分画に対して得られたモノクローナル抗体をコーティングしてあるラテックス試薬 $20 \mu\text{l}$ を黒背景のスライドガラス上に滴下し、検体 $20 \mu\text{l}$ を加えて攪拌し、2 分後に凝集

の有無を肉眼的に判定した。このとき添付の陽性コントロールと緩衝液（陰性）を同時に測定して参考とした。通常フィブリノゲン量に換算して $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上に相当する D-dimer 分画が含まれている場合には陽性の凝集像を示し、その場合にはさらに検体を緩衝液で希釈して測定を行った。

C 統計処理

健常者成人の測定結果に基づく各年齢層別の正常値の決定には確率紙法を用いた反復切断法により統計処理を行った。

II. 検討結果

A. 健常成人における D-dimer 値

i) Asserachrom D-Di

健常人 500 例の D-dimer 値のヒストグラムを 図 1 に示す。ヒストグラムは対数正規分布を示し、その平均値（信頼限界）は $174 (38 \sim 309) \text{ ng/ml}$ であった。又、性別の平均値は男性 $147 (32 \sim 263) \text{ ng/ml}$ 、女性 $198 (49 \sim 347) \text{ ng/ml}$ であり男女間に危険率 1% 以下で有意な差が認められた（図 2）。

更に、加齢とともに D-dimer 値が高値を示す傾向があった（図 3）。

ii) D-Di Test

健常人 500 例の D-Dimer 値のヒストグラムを 図 4 に示す。平均値は、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

B. 各種疾患における D-dimer 値

i) DIC

DIC 症例 18 例における Asserachrom D-Di の値は $650 \sim 16,000 \text{ ng/ml}$ と全例異常を示し、かつ広範囲に分布していた（図 5）。

D-Di Test では 18 例中 13 例が $1 \mu\text{g/ml}$ 以上であった（図 6）。

敗血症に DIC を合併した症例 1（図 7）及び肺癌に DIC を合併した症例 2（図 8）において D-dimer の測定値は、Latex 法による D-dimer の測定値あるいは従来法による FDP の測定値の変動と平行した増減を示し、また臨床経過とも良好な相関を示した。

ii) 他の血栓性疾患

白血病、肝癌、肺癌などの悪性腫瘍性疾患、

Fig. 1 Histogram of normal subjects with Asserachrom D-Di

Fig. 2 Sex related change in the plasma D-dimer levels with Asserachrom D-Di

敗血症などで高値を示したが、良好なコントロール状態にある糖尿病では正常値を示した（図5，図6）。

III. 考 察

凝固機序の作動時には生体の homeostasis の維持のために線溶機序も同時に作動することが知られており線溶機序と凝固機序の相互関係を同時に把握することが重要である。最近この目的にしたがって、種々の検討がなされてきたが、最も新しい検索法として注目されているのは、凝固・線溶機序の作動により産生される凝固線溶因子の分解産物の測定^{1)~3)}あるいは凝固・線溶系機序の活性化の結果として産生される活性化凝固因子あるいは活性化線溶因子とこ

Fig. 3 Age related change in plasma D-dimer levels with Asserachrom D-Di

れらの阻止因子の複合体の検出法である。しかし Thrombin-AT Ⅲ複合体 (TAT) あるいは Plasmin-Plasmin inhibitor 複合体 (PIC) の ELISA による検出法以外には複合体の測定に

Fig. 4 Histogram of normal subjects with D-Di Test

関しては実用化にはなお困難な問題が残されている。

分子生物学的研究の進歩によりモノクローナル抗体の作成が容易に行われるようになりこの成果が臨床に応用されようとしている。FDPの測定はDICなどの血液凝固・線溶亢進状態のパラメーターのひとつとして重要であるが、一次線溶と二次線溶を鑑別するためには従来用いられてきた多くの検査法では不十分な点が多かった。しかし近年D-dimer分画が安定化フィブリン由来の分解産物であることを利用して一次線溶と二次線溶とを鑑別しようとする試みがなされてきた⁴⁾⁵⁾。

今回の検討に用いた試薬のモノクローナル抗体は、安定化フィブリンから生じるフィブリン分解産物のうち比較的早期の分画(DD/E complex)に対して反応性が高く後期の分画(late D-dimer)に対する反応性は著明に低い特性を有することが知られており⁶⁾⁷⁾、二次線溶の病態を検討する上で有用と思われた。

臨床検体ではDIC症例のD-dimer濃度は、Asserachrom D-Diでカットオフポイン

Fig. 5 Plasma D-dimer level in various diseases with Asserachrom D-Di

Fig. 6 Plasma D-dimer level in various diseases with D-Di test

Fig. 7 Changes of hemostatic parameters during the course of DIC in a patient with septicemia

トを 500 ng/ml とすると特異度 98.2%, 鋭敏度 100% で DIC 診断に非常に有用であると考えられた。

D-Di Test ではカットオフポイントを 0.5

Fig. 8 Changes of hemostatic parameters during the course of DIC in a patient with lung cancer

μg/ml 以下とした場合特異度 96.6%, 鋭敏度 72.2% であった。本測定法では D-dimer に特異性が高いモノクローナル抗体が用いられており, EIA 法による D-dimer の測定が高感度に行えると考え, 健常者成人ならびに各種血栓性疾患患者の血漿検体について検討を行ったが, ラテックス凝集法による半定量法の測定値

とも良好な相関を認めた。本法においては精製フィブリノゲンとの交差反応性を認めたとの報告⁷⁾もあるが、従来の FDP 測定法では困難であった一次線溶と二次線溶との鑑別が本法により容易に行えることが推測された。

VI. 結 論

1) EIA 法を用いた Asserachrom D-Di による D-dimer の測定値は Latex 凝集法による測定値より定量性の面で優れていることが確認された。

2) 健常者における FDP D-dimer の値は年齢と共に増加し、各年代ごとの D-dimer 測定値は男性よりも女性において高値を示した。

3) 各種血栓性疾患における D-dimer の値は健常者に比較して高値を示した。

4) DIC 症例の臨床経過からその他の各種指標と良好な相関関係がみられ、凝固亢進状態の検出の鋭敏な指標となることが推測された。

以上、モノクローナル抗体を用いた EIA 法による D-dimer の測定を 500 名の健常者および各種血栓性疾患患者の血漿につき検討を行い、凝固亢進状態ともなう線溶亢進の指標となりうるかどうかの検討を行った。

本法は D-dimer に対して高い特異性を有し、従来の FDP 測定法に比較し安定化フィブリンのプラスミンによる溶解をきわめて早期に検出できると考えられ、凝固亢進状態における二次線溶の病態の把握に有用な検査法と思われた。

文 献

- 1) Qexa, S. A. & Budzynski, A. Z.: Primary soluble plasmonic degradation products of human cross linked fibrin. Isolation and stoichiometry of the (DD) E complex. *Biochemistry*, **8**: 991~995, 1979.
- 2) Francis, C.W. & Marder, V.J.: A molecular model of plasmonic degradation of cross linked fibrin. *Semin. Thromb. Haemost.*, **8**: 25~35, 1982.
- 3) Mihalyi, E.: Kinetics and molecular mechanism of the proteolytic fragment of fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **408**: 60 ~70, 1983.
- 4) 緋田和子, 他: モノクローナル抗体を用いたラテックス凝集法による安定化フィブリン分解産物の検出について. *臨床病理*, **33**: 1435~1439, 1985.
- 5) 藤巻道男, 他: モノクローナル抗体を用いた D, D-D 分画の測定. 厚生省血液凝固異常症調査研究班・昭和 59 年業績集報告, 1985, p.105~110.
- 6) Amiral, J., et al: Measurement and clinical relevance of D-Dimer by ELISA. Presented at the Fibrinogen Workshop, Giesen FRG. May 21-24, 1986.
- 7) 緋田和子, 池松 正次郎, 藤巻 道男: ASSER-ACHROM D-Di による D dimer 分画の定量測定法の検討. *臨床検査機器・試薬*, **10**: 6, 1065~1069, 1987.