原 著

各種血液疾患，肝疾患，糖尿病，膠原病，血栓性疾患
および DIC における組織プラスミノゲンアクチ
ベーター (t-PA) の動態：one-step ELISA
による血漿 t-PA の定量

高 橋 芳 右* 高 桑 悦 子* 帯 刀 亘*
和 田 研* 花 野 政 晴* 庭 野 裕 恵*
吉 野 紀 子* 林 千 治** 柴 田 昭*

Behaviors of tissue plasminogen activator (t-PA) in various
hematologic disease, liver disease, diabetes mellitus, collagen
disease, thrombotic disease, and disseminated intravascular
coagulation (DIC): Quantitative measurement of
plasma t-PA by a one-step ELISA

Hoyu TAKAHASHI*, Etsuko TAKAKURA*, Wataru TATEWAKI*,
Ken WADA*, Masaharu HANANO*, Hiroe NIWANO*,
Noriko YOSHINO*, Senji HAYASHI** and Akira SHIBATA*

Key words: tissue plasminogen activator, plasmin- α_2 -plasmin inhibitor
complex, von Willebrand factor, fibrinolysis, disseminated
intravascular coagulation

Plasma antigen levels of tissue plasminogen activator (t-PA) were measured by a newly developed one-step sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) together with plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex (PAP) and other coagulation parameters in patients with hematologic disease, liver disease, diabetes mellitus, collagen disease, thrombotic disease and disseminated intravascular coagulation (DIC). The mean plasma levels of t-PA and PAP in 20 normal subjects were $6.12 \pm \text{SD } 2.41 \text{ ng/ml}$ and $0.18 \pm 0.13 \text{ } \mu\text{g/ml}$, respectively. Plasma t-PA was elevated in a variety of diseases, especially in DIC ($28.3 \pm 20.2 \text{ ng/ml}$), liver disease ($26.5 \pm 18.0 \text{ ng/ml}$) and thrombotic disease ($16.2 \pm 13.6 \text{ ng/ml}$). Plasma PAP was increased as well in various diseases studied.

* 新潟大学医学部第一内科〔〒951 新潟市旭町通 1 番町 754 番地〕; The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

** 新潟大学医学部公衆衛生; Department of Public Health, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan. 受付: 1989. 3. 25 受理: 1989. 6. 20.

Marked elevations in PAP were found in DIC (especially DIC associated with leukemia and vascular diseases) and thrombotic disease (especially deep vein thrombosis and pulmonary embolism). On the whole, t-PA values correlated positively with von Willebrand factor antigen, indicating that both are endothelial markers released by common stimuli. The correlation between t-PA and PAP was poor, suggesting that other factors participate in the process of plasmin generation after the release of t-PA from endothelial cells into the circulation. In addition, plasma levels of t-PA and PAP elevated following venous occlusion or DDAVP infusion. These findings indicate that measurement of t-PA would be valuable for the assessment of fibrinolysis in selected disease states.

緒 言

生体にはいったん形成されたフィブリン血栓の溶解・除去に働く線溶機構が存在し、過度あるいは長期の血栓形成を制御する役割を果たしている。線溶が発現するためには、流血中あるいはフィブリン塊に吸着したプラスミノゲンがプラスミノゲンアクチベーター (PA) によりプラスミンに変換されることが必要である。PA には組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) とウロキナーゼ (u-PA) があるが、生理的に重要なのは血管内皮細胞に由来する t-PA である¹⁾²⁾。プラスミンは生成されると直ちに生理的阻害因子の α_2 -プラスミンインヒビター (α_2 PI) と複合体、すなわちプラスミン- α_2 PI 複合体 (PAP) を形成し不活化される¹⁾。従って、線溶始動は t-PA の放出により惹起され、PAP の存在は生体内でのプラスミン生成の直接的指標となる。

血中の t-PA 活性はこれまでフィブリン塊溶解時間法³⁾、フィリブリン平板法、発色性合成基質法^{4)~6)} などにより測定されてきたが、手技がやや煩雑であるとともに採血後迅速に酸性化処理し失活を防ぐ必要があった。一方、t-PA 抗原量はラジオイムノアッセイ (RIA)⁷⁾、immunoradiometric assay (IRMA)⁸⁾⁹⁾、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{10)~13)} により定量されている。今回、最近開発された one-step sandwich ELISA により血漿中 t-PA 濃度を PAP とともに測定し、各種疾患における線溶動態を解析したので報告する。

I. 対象および方法

1. 対 象

健常人 20 例、血液疾患 75 例 (血友病 A 5 例、von Willebrand 病 2 例、プロテイン C 欠乏症 2 例、血小板機能異常症 4 例、急性骨髄性白血病 14 例、急性リンパ性白血病 12 例、慢性骨髄性白血病 12 例、その他の慢性骨髄増殖性疾患 10 例、悪性リンパ腫 8 例、骨髄腫 3 例、その他 3 例)、肝疾患 29 例 (急性肝炎 5 例、慢性肝炎 5 例、肝硬変 7 例、肝細胞癌 7 例、肝内胆汁うっ滞症 5 例)、代謝性疾患 23 例 (糖尿病 22 例、その他 1 例)、膠原病 4 例、血栓性疾患 54 例 (深部静脈血栓症または肺塞栓症 20 例、血管腫、静脈瘤または血栓性静脈炎 12 例、大動脈瘤 1 例、冠動脈疾患 11 例、脳血管障害 5 例、網膜動静脈血栓症 4 例、その他 1 例)、播種性血管内凝固症候群 (DIC) 47 例 (基礎疾患は白血病 17 例、悪性リンパ腫 8 例、固形癌 6 例、敗血症 8 例、外傷 1 例、火傷 1 例、血管性疾患 6 例)、その他 28 例を対象とした。

2. 採血および血漿・血清の作製

対象患者および健常人より静脈採血し、直ちに 1/10 容の 0.129 M クエン酸ナトリウムを含んだシリコン処理試験管に移し、十分混和後 4℃ にて 2,000 g で 20 分間遠心し、上清の血漿を得た。FDP 測定用血清はアプロチニン、レプチラーゼ、トロンビン、カルシウム含有試験管に全血 2 ml を加え、30 分以上放置した後遠心し、上清を分離して作製した。

静脈うっ血負荷試験は、10分間安静を保ち前

採血を行い、次いで中間血圧で10分間前腕静脈をうっ滞させ後採血を行って施行した。DDAVP 負荷は、安静時前採血を行った後、酢酸デスマプレシン（協和発酵工業）0.3~0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を20 ml の生食水で希釈し20分かけて静注し、経時的に採血した。

3. 測定法

血漿 t-PA は one-step sandwich ELISA (イムザイン tPA; 富士レビオ) により定量した。各トレイに未希釈または希釈検体あるいは標準 t-PA 溶液 (0, 5, 10, 20, 40 ng/ml) 50 μl , ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗 t-PA 抗体 200 μl およびモノクローナル抗 t-PA 抗体固定ポリスチレンビーズを加え、37°C にて2時間反応させた。洗浄後ビーズを試験管に移し、過酸化水素を含んだ発色液 (ABTS) を 400 μl 加え室温で反応させ、1時間後に稀酸溶液 2 ml を加え反応を停止させ、十分混和した後分光光度計にて波長 420 nm で吸光度を測定した。各標準物質の吸光度から作成した検量線に当てはめ、検体中 t-PA 濃度を求めた。検量線の1例を図1に示したが、0~40 ng/ml の範囲ではほぼ直線となった。標準 t-PA 溶液 5, 10, 40 ng/ml を用い同時再現性を検討すると、変動係数 (CV) はそれぞれ 4.9%, 6.1%, 1.9% であった。

血漿 PAP はポリクローナル抗プラスミノゲン抗体とペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗 $\alpha_2\text{PI}$ 抗体を用いた ELISA (帝人) にて定量した¹⁴⁾¹⁵⁾。活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), プロトロンビン時間 (PT), フィブリノゲンは標準的方法にて測定した。血清

Fig. 1 A standard reference curve for the t-PA antigen assay by ELISA.

FDP はラテックス凝集法 (FDP テスト; ベーリンガー・マンハイム山之内) にて測定した。第 VIII 因子活性 (VIII:C) は一段法にて、von Willebrand 因子抗原 (vWf:Ag) およびプロテイン C は ELISA (Asserachrom: ベーリンガー・マンハイム山之内) にて、リストセチンコファクター (RCof) はホルマリン固定血小板の凝集初速度法にて定量した¹⁶⁾。アンチトロンビン III (ATIII), $\alpha_2\text{PI}$, プラスミノゲンは合成基質法にて測定した¹⁵⁾。

4. 統計学的解析法

結果は平均±標準偏差 (SD) にて示した。平均値の群間差は分散分析および対応のない t テストにて検定した。回帰分析は最小二乗法にて行い、相関係数 (r) を算出した。

II. 成績

1. 健常人における血漿 t-PA および PAP 値

健常人 20 例における安静時 t-PA 濃度は

Fig. 2 Plasma levels of t-PA and PAP in normal subjects and patients with various diseases. DM denotes diabetes mellitus. The bars for each group indicate the mean values and SD. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (as compared with normal subjects).

Fig. 3 Distribution of plasma t-PA and PAP in patients with hematologic diseases. vWD denotes von Willebrand disease; PC, protein C; AML, acute myelogenous leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; CMPD, chronic myeloproliferative disorders. The bars for each group indicate the means.

$6.12 \pm 2.41 \text{ ng/ml}$ (範囲 $2.2 \sim 10.5 \text{ ng/ml}$) であった。血漿 PAP は $0.18 \pm 0.13 \text{ μg/ml}$ (範囲 $0.0 \sim 0.4 \text{ μg/ml}$) であった。

2. 各種疾患における血漿 t-PA および PAP 値

患者群 260 例全体の t-PA 濃度は $17.2 \pm 15.1 \text{ ng/ml}$ (範囲 $2.5 \sim 116.0$)、PAP は $1.25 \pm 1.83 \text{ μg/ml}$ (範囲 $0.0 \sim 12.5$) と上昇していたが、

Fig. 4 Distribution of plasma t-PA and PAP in patients with liver diseases. The bars for each group indicate the means.

個体差が大きかった。

疾患別にみると、t-PA は DIC ($28.3 \pm 20.2 \text{ ng/ml}$) および肝疾患 ($26.5 \pm 18.0 \text{ ng/ml}$) で最も高値であり、次いで血栓性疾患 ($16.2 \pm 13.6 \text{ ng/ml}$) で高かった (図 2)。PAP は DIC 群で最も高値 ($2.70 \pm 3.04 \text{ μg/ml}$)、次いで血栓性疾患 ($1.27 \pm 2.05 \text{ μg/ml}$) で高かった (図 2)。各種血液疾患の中では、t-PA は良性疾患あるいは凝血異常症に比し悪性腫瘍性疾患とくに悪性リンパ腫および慢性骨髄性白血病で高値であり、PAP は腫瘍性疾患のみならず血友病

Fig. 5 Distribution of plasma t-PA and PAP in patients with thrombotic diseases. DVT denotes deep vein thrombosis; PE, pulmonary embolism. The bars for each group indicate the means.

症の一部でも上昇していた(図3)。肝疾患では慢性肝炎を除き t-PA の著増例が多く PAP は急性肝炎および肝細胞癌で上昇していた(図4)。血栓性疾患では種々の病態で全体的に t-PA が高値であり、PAP は深部静脈血栓症および肺塞栓症で著増例が存在した(図5)。DIC 症例を基礎疾患別に解析すると、t-PA は外傷、火傷例および白血病例の一部を除き著明に上昇しており、PAP は白血病と血管性疾患に由来する DIC で著増していた(図6)。

3. 他の指標との相関

対象患者の APTT は 37.7 ± 10.3 (範囲 21.4

Fig. 6 Distribution of plasma t-PA and PAP in various disease states underlying DIC. The bars for each group indicate the means.

～77.3) 秒, PT 14.9 ± 2.7 (10.6～26.4) 秒, フィブリノゲン 330 ± 143 (60～800) mg/dL, FDP 11.3 ± 18.8 (1～80) $\mu\text{g/ml}$, ATⅢ 88.8 ± 27.7 (18～169) %, プロテイン C 92.1 ± 38.7 (11～210) %, $\alpha_2\text{PI}$ 96.0 ± 24.8 (9～153) %, プラスミノゲン 82.1 ± 24.3 (23～138) %, VIII : C 111 ± 36 (32～220) %, vWf : Ag 245 ± 119 (42～560) %, RCoF 226 ± 115 (55～560) % であった(先天性異常症の場合は、それに直結した検査値異常は解析から除外した)。

今回検討した t-PA 抗原量は、全体としては同時に測定した PAP 値とは全く相関しなかった(図7)。血栓性疾患では弱い正相関を、DIC

Fig. 7 Correlation between t-PA and PAP and between t-PA and vWf: Ag in the patients.

Table 1 Correlation of t-PA with other coagulation parameters

Variable	All patients	Hematologic diseases	DM	Thrombotic diseases	Liver diseases	DIC
PAP	0.094	-0.030	0.279	0.316*	0.336	-0.324*
APTT	0.274***	0.170	-0.040	-0.104	0.499**	0.369*
PT	0.323****	0.160	0.269	-0.064	0.488**	0.191
Fibrinogen	-0.023	0.065	0.362	-0.046	-0.246	0.095
FDP	0.241***	0.107	0.034	0.093	0.191	-0.170
ATIII	-0.219**	-0.194	-0.444	-0.067	-0.427	-0.130
Protein C	-0.297**	-0.021	-0.246	0.567	-0.377	-0.418
α_2 PI	-0.191**	-0.139	-0.546*	-0.063	-0.392	-0.140
Plasminogen	-0.298***	-0.183	0.048	-0.197	-0.558	-0.297
VIII : C	0.252***	0.249	0.430	0.572***	-0.464	-0.048
vWf: Ag	0.516****	0.496***	0.770***	0.662***	0.030	0.400*
RCof	0.465****	0.199	0.913**	-0.378	0.576	0.539**
vWf: Ag/VIII : C	0.474****	0.399**	0.702**	0.222	0.016	0.471**
RCof/vWf: Ag	-0.042	-0.156	0.102	-0.535	0.201	0.238

Correlation coefficients are given.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

では弱い逆相関を示した。その他の指標と t-PA の相関をまとめて表 1 に示したが、t-PA は α_2 PI, プラスミノゲン, FDP との相関も強いものではなかった。vWf: Ag, RCoF および vWf: Ag/VIII : C 比とは比較的強い相関が認められた (図 7, 表 1)。1 例として、慢性骨髄性白血病の急性転化時に出現した DIC の経過に伴う t-PA の変動を図 8 に示したが、t-PA と PAP および他の線溶系指標の変動は時期的に必ずしも一致しなかった。

4. 静脈うっ血負荷に対する反応

10 分間の静脈うっ血負荷前後で t-PA などを定量することにより、血管反応性を検討した。全体として t-PA は 8.0 ± 2.9 ng/ml から 18.9 ± 8.6 ng/ml へと上昇し、vWf: Ag は $176 \pm 45\%$ から $212 \pm 58\%$ に、PAP は 1.13 ± 0.76 μ g/ml から 3.32 ± 2.27 μ g/ml に増加した (図 9)。t-PA の増加量は vWf: Ag の増加量と正相関したが、PAP の増加量とは全く無関係であった (図 10)。

Fig. 8 Changes in t-PA and other fibrinolytic parameters during the course of DIC in a patient with chronic myelogenous leukemia in blast crisis.

5. DDAVP 負荷に対する反応

DDAVP 投与により t-PA は 7.0 ± 3.4 ng/ml から 30 分後 12.0 ± 6.3 ng/ml に, vWf: Ag は $126 \pm 82\%$ から $237 \pm 98\%$ に, PAP は 0.12 ± 0.24 μg/ml から 0.78 ± 0.47 μg/ml に上昇した (図 11). しかし, t-PA の増加量と vWf: Ag および PAP の増加量との相関は有意ではなかった (それぞれ $r=0.255$, $p=0.7$ および $r=0.592$, $p=0.3$).

Fig. 10 Correlation between increases in t-PA and vWf: Ag (left) and between increases in t-PA and PAP (right) during venous occlusion in 12 patients with thrombotic diseases.

Fig. 9 Levels of t-PA, vWf: Ag and PAP before and after venous occlusion in 12 patients with thrombotic diseases. The bars indicate the mean values.

III. 考 案

線溶亢進は主として t-PA の過剰放出および線溶阻止因子とくに α_2 PI の欠乏によって生ずる²⁾。血栓が形成された場合の生理的反応として重要であり, 凝固活性化により生じたトロン

Fig. 11 Changes in plasma t-PA, vWf: Ag and PAP following DDAVP infusion in five subjects.

ピンは直接血管内皮細胞に作用して t-PA を放出させる¹⁷⁾が、運動、静脈うっ血、DDAVP など各種の刺激によっても t-PA が放出される¹²⁾。また血中 t-PA は主に肝で処理され消失する¹⁸⁾。今回、各種疾患における血中 t-PA 濃度を定量し、線溶系始動の有無と程度を検討した。同時に血中 PAP を測定することにより、t-PA 放出に引き続いてどの程度のプラスミン生成に至っているかも検討した。

今回用いた t-PA 測定法は one-step ELISA 法のため、従来の two-step 法に比し手技が簡単であった。また定量性も良好であった。正常値は $6.12 \pm 2.41 \text{ ng/ml}$ であったが、これは RIA による Wiman ら⁶⁾の成績 ($4.4 \pm 1.3 \text{ ng/ml}$)、IRMA による Rijken ら⁸⁾ ($6.6 \pm 2.9 \text{ ng/ml}$) および MacGregor ら⁹⁾の成績 ($7.1 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$) あるいは ELISA による Bergsdorf ら¹⁰⁾ ($7.1 \pm 1.6 \text{ ng/ml}$) および Francis ら¹⁹⁾ ($5.2 \pm 2.6 \text{ ng/ml}$) の成績に近似していたが、

Holvoet ら¹³⁾ ($3.4 \pm 0.8 \text{ ng/ml}$) および Matsuo ら¹¹⁾ ($1.22 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$) はより低い正常値を報告している。

種々の疾患で測定してみると、ほとんどの疾患で血中 t-PA および PAP が上昇していた (図 2)。このことより、ある程度の線溶発現あるいはプラスミン生成は極めて高頻度に行っているものと考えられる。t-PA は DIC、肝疾患、血栓性疾患での上昇が高度で、糖尿病ではごく軽度の上昇にとどまり (図 2)、従来の報告^{19~21)}と類似した傾向であった。血液疾患では平均としてみるとごく軽度の上昇が認められたに過ぎなかったが、基礎疾患を細分して解析すると、腫瘍性疾患では比較的高値であった。また急性肝炎や肝細胞癌でも肝硬変症例に匹敵する t-PA 値を示すことが分かった (図 3, 4)。肝疾患での t-PA 上昇は血中からの処理能力の低下が主たる原因であり、血栓性疾患および DIC での高値は血管内皮細胞の反応を反映しているものと思われる。

一方、PAP は大別した場合 DIC、次いで血栓性疾患とくに深部静脈血栓症または肺塞栓症での上昇が高度であった (図 2, 5)。DIC 症例を基礎疾患別に分析すると、群間差が著明で、白血病群および血管性疾患で著増しており、t-PA が基礎疾患の種類とは無関係にほとんどの例で著増していたのとは異なる所見であった (図 6)。肝疾患の中では急性肝炎および肝細胞癌での増加が目立ち (図 4)、また肝疾患全体として t-PA の上昇度に比し PAP の増加は軽度であり、t-PA 高値には t-PA のクリアランス遅延も関係しているためと考えられた。

全体としては t-PA 抗原と PAP は相関せず (図 7)、経時的にみても t-PA の動きは PAP の変動とは必ずしも時期を同じくしなかった (図 8)。この t-PA と PAP の解離には両者の血中半減期が異なること、また t-PA の阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1) の存在が影響しているものと思われる。循環血中の t-PA の多くはこの PAI-1 と結合しており、free t-PA のみが活性を有するとされている。PAI-1 の増加は敗血症²²⁾、心筋梗塞²³⁾、深部静脈血栓症²⁴⁾などで報

告されており、この点に関しては今後の検討を必要とする。また t-PA は vWf: Ag と比較的良好な相関関係にあり (図 7), 両者が類似の機序により放出される血管内皮細胞マーカーであることが確認された。

血栓性素因とくに静脈血栓症の原因追求のためにしばしば静脈うっ血負荷試験が行われている。最近静脈うっ血負荷に対する反応が不良な際の機序として、t-PA 放出不全の場合と、t-PA は十分放出されるが PAI-1 過剰のため PA 活性が発現しない場合があることが明らかにされた²⁴⁾。今回の検討では、t-PA 抗原の放出量は vWf: Ag の増加と平行するが、PAP 増加量とは相関せず、刺激後の線溶発現 (プラスミン生成) には t-PA 放出に加え他の要因も関与していることが推察された。これが PAI-1 のみにより規定されているのか否かは今後の課題である。DDAVP 負荷の場合も反応性に個体差が大きく、さらに症例数を増加して検討する価値があるものと思われた。

以上、今回の検討で多くの臨床病態で t-PA の増加がみられ、種々の程度の線溶始動が起きていることが確認された。t-PA とともに PAP および PAI-1 の同時定量により線溶活性化の実態がさらに明らかになるものと思われた。

結 語

最近開発された one-step sandwich ELISA により、血漿 t-PA 抗原量を健常人 20 例、各種疾患患者 260 例で測定し、PAP 定量と併用することにより、線溶動態を解析した。

健常人の t-PA 濃度は 6.12 ± 2.41 ng/ml であった。ほとんどの疾患で t-PA は上昇していたが、DIC および肝疾患、次いで血栓性疾患でその上昇が著明であった。一方、PAP の正常値は 0.18 ± 0.13 μ g/ml であったが、DIC、次いで血栓性疾患で高値であった。中でも白血病や血管性疾患による DIC と深部静脈血栓症および肺塞栓症で著増していた。

血中 t-PA 濃度は vWf: Ag 量と正相関し、両者は共通の刺激により放出される血管内皮細胞マーカーと考えられた。t-PA と PAP との

相関関係は弱く、t-PA 放出からプラスミン生成に至る過程には PAI-1 など他の要因も関与していることが推定された。逆に、t-PA は他の線溶系指標からはその血中濃度を必ずしも推定できない独立した指標と考えられた。

また、静脈うっ血や DDAVP 負荷により t-PA の血中濃度が種々の程度に上昇し、血管反応性の解析に有用な指標であることが確認された。

謝辞：本研究の一部は厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究費の助成を受けた。また t-PA 測定試薬を提供して頂いた富士レビオ㈱に感謝する。

文 献

- 1) Collen, D.: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb. Haemostas.*, **43**; 77~89, 1980.
- 2) 高橋芳右: DIC と一次線溶亢進症との鑑別. *Prog. Med.*, **7**; 2319~2326, 1987.
- 3) Gaffney, P. J. and Curtis, A. D.: A collaborative study of a proposed international standard for tissue plasminogen activator (t-PA). *Thromb. Haemostas.*, **53**; 134~136, 1985.
- 4) Verheijen, J. H., Mullaart, E., Chang, G. T. G., Kluft, C. and Wijngaards, G.: A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thromb. Haemostas.*, **48**; 266~269, 1982.
- 5) Wiman, B., Mellbring, G. and Ranby, M.: Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. *Clin. Chim. Acta*, **127**; 279~288, 1983.
- 6) Wiman, B., Ljungberg, B., Chmielewska, J., Urden, G., Blomback, M. and Johnson, H.: The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **105**; 265~270, 1985.
- 7) Urden, G. and Blomback, M.: Determination of tissue plasminogen activator in plasma by means of a radioimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **44**; 495~502, 1984.
- 8) Rijken, D.C., Juhan-Vague, I., De Cock, F.

- and Collen, D.: Measurement of human tissue-type plasminogen activator by a two-site immunoradiometric assay. *J. Lab. Clin. Med.*, **101**; 274~284, 1983.
- 9) MacGregor, I. R. and Prowse, C. V.: Tissue plasminogen activator in human plasma measured by radioimmunoassay. *Thromb. Res.*, **31**; 461~474, 1983.
- 10) Bergsdorf, N., Nilsson, T. and Wallen, P.: An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. *Thromb. Haemostas.*, **50**; 740~744, 1983.
- 11) Matsuo, O., Kato, K., Matsuo, C. and Matsuo, T.: Determination of tissue plasminogen activator by an enzyme-immunoassay method. *Anal. Biochem.*, **135**; 53~63, 1983.
- 12) Rijken, D. C., Van Hinsberg, V. W. M. and Sens, E. H. C.: Quantitation of tissue-type plasminogen activator in human endothelial cell cultures by use of an enzyme immunoassay. *Thromb. Res.*, **33**; 145~153, 1984.
- 13) Holvoet, P., Cleemput, H. and Collen, D.: Assay of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies to t-PA. *Thromb. Haemostas.*, **54**; 684~687, 1985.
- 14) 青木延雄, 武永 強, 長谷川 淳, 小熊 豊, 小林紀夫, 坂田洋一, 藤巻道男, 池松 正次郎, 縑 莊和子, 松田 保, 伊藤 恵子, 藤原研司, 富谷 智明, 林 茂樹, 中村克己, 飯島 憲司, 鷺見芳彦, 小池行也, 鈴木英明, 細田健治: EIA法による α_2 PI (TD-80) および α_2 PI プラスミン複合体 (TD-80C) 測定キットの基礎的検討. 臨床病理, **35**; 1275~1281, 1987.
- 15) 高橋芳右, 滝沢 慎一郎, 花野政晴, 帯刀 亘, 小池 正, 笹川康夫, 水戸 将郎, 和田 研, 柴田 昭: 血漿プラスミン- α_2 プラスミンインヒビター複合体による線溶亢進状態の評価: 播種性血管内凝固症候群, 血栓性血小板減少性紫斑病, 一次線溶亢進症 および線溶療法での検討. 血液と脈管, **19**; 82~92, 1988.
- 16) 高橋芳右: von Willebrand 因子. 臨床病理, 特集, **70**: 129~139, 1987.
- 17) Levin, E. G., Marzec, U., Anderson, J. and Harker, L. A.: Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **74**; 1988~1995, 1984.
- 18) Nilsson, T., Wallen, P. and Mellbring, G.: *in vivo* metabolism of human tissue-type plasminogen activator. *Scand. J. Haematol.*, **33**; 49~53, 1984.
- 19) Francis, R. B. and Seyfert, U.: Tissue plasminogen activator antigen and activity in disseminated intravascular coagulation: Clinicopathologic correlations. *J. Lab. Clin. Med.*, **110**; 541~547, 1987.
- 20) Juhan-Vague, I., Rijken, D. C., De Cock, F., Mandez, C. and Collen, D.: Extrinsic plasminogen activator levels in clinical plasma samples. *Prog. Fibrinolysis*, **6**; 65~69, 1983.
- 21) Hersch, S. L., Kunelis, T. and Francis, R. B.: The pathogenesis of accelerated fibrinolysis in liver cirrhosis: A critical role for tissue plasminogen activator inhibitor. *Blood*, **69**; 1315~1319, 1987.
- 22) Colucci, M., Paramo, J. A. and Collen, D.: Generation in plasma of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. *J. Clin. Invest.*, **75**; 818~824, 1985.
- 23) Hamsten, A., Wiman, B., De Faire, U. and Blomback, M.: Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of a myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **313**; 1557~1563, 1985.
- 24) Juhan-Vague, I., Valadier, J., Alessi, M. C., Aillaud, M. F., Ansaldi, J., Philip-Joet, C., Holvoet, P., Serradimigni, A. and Collen, D.: Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb. Haemostas.*, **57**; 67~72, 1987.