◆ 原 著 ◆

血漿 α_2 プラスミン・インヒビター—プラスミン複合体 (α_2 PIPC) 測定による糖尿病性腎症患者に おける線溶状態の評価

谷 亀 光 則* 鈴 木 大 輔* 渡 辺 一 史*
宮 野 龍 介* 窪 田 隆 浩* 江 口 一 彦*
町 村 英 郎* 金 重 秀 明* 堺 秀 人*

Fibrinolysis in Patients with Diabetic Nephropathy Evaluated
by Plasma Levels of α_2 Plasmin Inhibitor-plasmin Complexes

Mitsunori YAGAME*, Daisuke SUZUKI*, Kazufumi WATANABE*,
Ryusuke MIYANO*, Takahiro KUBOTA*, Kazuhiko EGUCHI*,
Hideo MACHIMURA*, Hideaki KANESHIGE*, Hideto SAKAI*

Key words: diabetic nephropathy, proteinuria, α_2 PIPC, fibrinolysis

Activation of fibrinolysis in patients with diabetic nephropathy was determined by the plasma levels of α_2 plasmin inhibitor-plasmin complexes (α_2 PIPC). The levels of α_2 PIPC in plasma were measured by the one-step sandwich enzyme immunoassay (EIA). This quantitative assay of α_2 PIPC could be valuable for the assessment of fibrinolysis. Plasma levels of α_2 PIPC in diabetic patients with overt proteinuria were significantly higher than those in diabetic patients without proteinuria or in chronic glomerulonephritis patients with proteinuria ($P < 0.01$, respectively). Plasma levels of α_2 PIPC in diabetic patients with intermittent proteinuria were also significantly higher than those in diabetic patients without proteinuria or in chronic glomerulonephritis patients with proteinuria ($P < 0.05$, respectively). These findings indicated that the activation of fibrinolysis as well as the coagulation system might play a role in the development and/or progression of diabetic nephropathy.

* 東海大学医学部内科学第七教室〔〒259-11 神奈川県伊勢原市望星台〕; Division of Metabolism and Nephrology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokai University, Bohseidai, Isehara City, Kanagawa, 259-11, Japan. 受付 1989.10.23, 受理 1990.3.10.

緒 言

血漿 α_2 プラスミンインヒビター (α_2 PI) は生体内の線維素溶解機構 (線溶系) に対する特異的な調節能を持ち、プラスミンと即時的、不可逆的に結合して止血栓の維持と溶解の調節に重要な役割を果たしている。この α_2 PI とプラスミンが結合して生じるのが血漿 α_2 プラスミンインヒビター-プラスミン複合体 (α_2 PIPC: 以下 PIPC と略す) であり、これはプラスミノゲンの活性化によるプラスミンの産生を鋭敏に反映しており、各種線溶亢進、特に汎発性血管内凝固症候群 (DIC) および DIC 準備状態の診断や治療効果の判定、血栓溶解療法および線溶療法での線溶状態のモニタリングに極めて有用であるとされている¹⁾。PIPC の測定法として、最近、酵素免疫法が開発され、各種病態の凝固線溶系についての、様々な報告がなされている^{1)~3)}。

糖尿病性腎症は、糖尿病合併症の中では生命予後に最も影響を及ぼす重要な合併症である。血糖や感染のコントロールがなされ糖尿病患者の長期生存が可能となった現在でも、糖尿病性腎症の治療は困難であり透析患者も増加してきている⁴⁾。このような糖尿病性腎症をはじめとする細小血管合併症の発症や進展に凝固線溶系が関与しているとされており⁵⁾⁷⁾、今回糖尿病性腎症の臨床的指標である蛋白尿の程度と血漿 PIPC 値について検討し、若干の知見を得たので報告する。

対象と方法

(1) 患者

対象とした患者は、東海大学病院内科学第七教室外来通院中の 44 名 (男 28 名, 女 16 名) のインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM: non-insulin dependent diabetes mellitus) 患者である。全症例の平均年齢は 54.0 歳であり、肝機能障害や血液凝固異常を呈する患者は対象から除外した。一月に一回の尿検査において、6 ヶ月以上試験紙法で蛋白尿のみられない 21 名 (男 12 名, 女 9 名: 年齢 32~68 歳, 平均 54.9 $\pm$ 8.7 歳) をグループ A、間欠的に蛋白尿

のみられる 9 名 (男 6 名, 女 3 名: 年齢 39~64 歳, 平均 50.9 $\pm$ 8.7 歳) をグループ B、持続して蛋白尿のみられる 14 名 (男 10 名, 女 4 名: 年齢 31~80 歳, 平均 54.6 $\pm$ 12.8 歳) をグループ C とした。なお間欠的蛋白尿とは、6 回の尿検査中 1~2 回に尿蛋白が $\pm$ ~+ を示したものとした。

また、持続的に蛋白尿を呈し、かつ糖尿病を合併していない慢性糸球体腎炎患者 (以下糸球体腎炎群と略す) 15 名 (男 9 名, 女 6 名: 年齢 20~63 歳, 平均 42.4 $\pm$ 13.4 歳) を対照とした。これらの原疾患の内訳は、IgA 腎症 9 名, 良性腎硬化症 3 名, 膜性腎症 1 名, 膜性増殖性糸球体腎炎 1 名, 半月体形成性腎炎 1 名であった。

(2) 血漿 PIPC の測定

血漿 PIPC の測定は、モノクローナル抗体を用いた one-step sandwich enzyme immunoassay (EIA) (帝人) で行った。まず、10 μ l の血漿を生食塩水で 8 ml (800 倍希釈) としたものを 200 μ l と、PIPC 標準液 (10, 20, 40 μ g/ml) 200 μ l を各々試験管に採取する。ついで、酵素標識マウス抗ヒト α_2 PI モノクローナル抗体液を各試験管に 200 μ l 加え、ウサギ抗ヒトプラスミノゲン抗体を固定した polystyrene ball を各試験管に加える。37°C の恒温槽中で 1 時間反応させた後、生理食塩水で 3 回洗浄し発色剤 (0.05% ABTS 含有 0.1 M リン酸クエン酸緩衝液) 400 μ l を各試験管に加える。さらに、37°C の恒温槽中で 30 分間反応させた後、反応停止液として 0.25 M シュウ酸を 1 ml 加え、420 nm の波長で吸光度を測定する。なお測定範囲は 0.3~40 μ g/ml であるが、測定感度以下の場合は、統計学的計算上 0.2 μ g/ml として処理した。帝人での血漿 PIPC の参考正常値は、0.8 μ g/ml 以下である。

(3) 臨床指標の検討

糖尿病患者に対しては、血漿 PIPC の測定時に下記の各項目について検索した。すなわち、糖尿病罹病期間、高血圧の有無、尿蛋白定性・定量 (定量はグループ C のみ)、尿糖、尿潜血反応、ヘモグロビン A1c、空腹時血糖、血清クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総コレス

Fig. 1 Plasma levels of PIPC among four groups of patients (CGN: chronic glomerulonephritis)

Table 1 Clinical parameters and their evaluation

Clinical parameters	Abbreviation	Evaluation
Duration of diabetes	DUR	years
Hypertension	HT	more than 140/90mmHg
Proteinuria degree	PRO	-:1, ±:2, +:3, ++:4, +++:5
amounts	UP	g/day
Glucosuria	GLU	-:1, ±:2, +:3, ++:4, +++:5
Hematuria	HEM	-:1, ±:2, +:3, ++:4, +++:5
Hemoglobin Alc	HBA	%
Fasting blood sugar	FBS	mg/dl
Serum creatinine	CR	mg/dl
Total protein	TP	g/dl
Serum albumin	ALB	g/dl
Total cholesterol	TC	mg/dl
Triglyceride	TG	mg/dl
Hemoglobin	HGB	g/dl
Platelets	PLT	$\times 10^4/\mu l$
Prothrombin time	PT	sec. (control: 10.6 sec)
Partial thromboplastin time	PTT	sec. (control: 32.4 sec)
Fibrinogen	FIB	mg/dl

テロール、中性脂肪、ヘモグロビン、血小板、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲンである。この内、尿蛋白定性、尿糖、尿潜血反応の3項目については、統計学的処理の可能なように数量化を行った (Table 1)。

(4) 統計学的検討

統計学的検討は、t 検定、単純相関分析、 χ^2 検定にて行った。

結 果

(1) 血漿 PIPC の測定

正常値以上 ($0.9 \mu\text{g/ml}$ 以上) の高値を示した症例は、グループ A では21例中2例 (9.5%)、グループ B では9例中3例 (33.3%)、グループ C では14例中10例 (71.4%)、糸球体腎炎群では15例中1例 (6.7%) であり、グループ C では PIPC が正常値以上を示す割合は、グループ A および糸球体腎炎群のそれと比較して、有意に高率であった (各々 $\chi^2 = 14.2874$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 12.9000$, $P < 0.01$)。グループ B とグループ C の PIPC 値はそれぞれ $0.76 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ (平

Table 2 Clinical parameters and statistical significance among for groups of patients

	Group A (without proteinuria)	Group B (intermittent proteinuria)	Group C (overt proteinuria)	statistical significance			Chronic glomerulo- nephritis
				A vs B	B vs C	A vs C	
DUR	7.86 $\pm$ 5.76	8.56 $\pm$ 7.65	13.0 $\pm$ 7.96	N.S.	N.S.	P<0.05	—
HT	42.9% (9/21)	55.6% (5/9)	71.4% (10/14)	N.S.	N.S.	N.S.	53.3% (8/15)
PRO	1.00 $\pm$ 0.00	1.56 $\pm$ 0.53	4.50 $\pm$ 0.65	P<0.05	P<0.01	P<0.01	3.53 $\pm$ 1.80
UP	—	—	3.29 $\pm$ 3.81	—	—	—	1.98 $\pm$ 1.98
GLU	1.90 $\pm$ 1.41	2.33 $\pm$ 1.50	2.29 $\pm$ 1.59	N.S.	N.S.	N.S.	1.07 $\pm$ 0.26
HEM	1.05 $\pm$ 0.22	1.33 $\pm$ 0.71	1.71 $\pm$ 0.73	N.S.	N.S.	P<0.01	2.67 $\pm$ 1.40
HBA	8.57 $\pm$ 1.22	9.03 $\pm$ 1.49	8.31 $\pm$ 1.43	N.S.	N.S.	S.S.	—
FBS	142.3 $\pm$ 45.7	179.8 $\pm$ 55.3	147.2 $\pm$ 47.6	N.S.	N.S.	N.S.	96.0 $\pm$ 25.2
CR	0.79 $\pm$ 0.18	0.78 $\pm$ 0.10	1.88 $\pm$ 1.67	N.S.	P<0.05	P<0.05	1.08 $\pm$ 0.46
TP	6.94 $\pm$ 0.55	7.12 $\pm$ 0.40	6.10 $\pm$ 0.79	N.S.	P<0.01	P<0.01	6.15 $\pm$ 0.79
ALB	4.23 $\pm$ 0.32	4.36 $\pm$ 0.34	3.75 $\pm$ 0.54	N.S.	P<0.01	P<0.01	3.81 $\pm$ 0.43
TC	193.4 $\pm$ 32.4	220.8 $\pm$ 36.2	226.6 $\pm$ 68.1	P<0.05	N.S.	N.S.	181.3 $\pm$ 50.7
TG	180.1 $\pm$ 183.9	142.3 $\pm$ 55.0	216.1 $\pm$ 115.0	N.S.	N.S.	N.S.	154.1 $\pm$ 124.7
HGB	13.48 $\pm$ 1.68	13.46 $\pm$ 1.66	12.24 $\pm$ 2.25	N.S.	N.S.	N.S.	13.09 $\pm$ 1.26
PLT	23.28 $\pm$ 5.08	26.02 $\pm$ 5.72	25.70 $\pm$ 4.48	N.S.	N.S.	N.S.	23.25 $\pm$ 4.75
PT	10.44 $\pm$ 0.43	9.87 $\pm$ 0.37	10.16 $\pm$ 0.43	P<0.01	N.S.	N.S.	10.58 $\pm$ 0.73
PTT	30.51 $\pm$ 2.56	28.54 $\pm$ 3.48	31.08 $\pm$ 2.70	N.S.	N.S.	N.S.	32.10 $\pm$ 3.29
FIB	258.4 $\pm$ 45.8	280.6 $\pm$ 50.4	312.7 $\pm$ 82.1	N.S.	N.S.	P<0.05	241.8 $\pm$ 43.7

mean $\pm$ ISD, N.S.: not significant**Table 3** Correlation between the plasma levels of PIPC and other clinical parameters

Clinical Parameters	r value	Statistical significance
DUR	0.2613	N.S.
HT	0.0963	N.S.
PRO	0.5330	P<0.01
GLU	-0.2520	N.S.
HEM	0.3895	P<0.05
HBA	-0.1890	N.S.
FBS	-0.3217	P<0.05
CR	0.3439	P<0.05
TP	-0.3535	P<0.05
ALB	-0.5639	P<0.01
TC	-0.0527	N.S.
TG	-0.1479	N.S.
HGB	-0.4337	P<0.01
PLT	0.2113	N.S.
PT	-0.1008	N.S.
PTT	0.1776	N.S.
FIB	0.1410	N.S.

N.S.: not significant

に低値を示した (各々, $P<0.05$, $P<0.01$) (Fig. 1).

(2) 他の臨床検査成績

グループ A とグループ B の間には, 蛋白尿定性, 総コレステロール, プロトロンビン時間の各項目において, 統計学的有意差が認められた (各々, $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$). また, グループ B とグループ C の間には, 蛋白尿定性, 血清クレアチニン, 総蛋白, 血清アルブミンの各項目において, 統計学的有意差が認められた (各々, $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). さらに, グループ A とグループ C の間には, 罹病期間, 蛋白尿定性, 尿潜血反応, 血清クレアチニン, 総蛋白, 血清アルブミン, フィブリノーゲンの各項目において, 統計学的有意差が認められた (各々, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$) (Table 2).

(3) 血漿 PIPC と他の臨床検査成績

全症例の血漿 PIPC 値と他の各項目との相関関係を示したものが Table 3 である. 血漿 PIPC 値は, 尿蛋白定性, 尿潜血反応, 血清クレアチニンと有意な正の相関が認められた (各々, $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$). また, 同様に, 空腹時血糖, 総蛋白, 血清アルブミン,

均 $\pm$ SD), 1.00 $\pm$ 0.39 $\mu\text{g/ml}$ であり, グループ A の 0.52 $\pm$ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ に比べ有意に高値を示した (各々, $P<0.05$, $P<0.01$). また糸球体腎炎群の PIPC 値は 0.49 $\pm$ 0.21 $\mu\text{g/ml}$ であり, グループ B やグループ C と比べ, 有意

ヘモグロビンと有意な負の相関が認められた (各々, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$) (Table 3).

考 察

線溶系の中心的役割を担うプラスミンを直接測定することは、現在では不可能であるが、プラスミンと α_2 プラスミン・インヒビター (α_2 PI) との複合体である血漿 PIPC は測定可能であり^{1)8)~10)}、今回は糖尿病患者の血漿 PIPC を one-step sandwich EIA¹⁾ を用いて測定し検討した。この PIPC は、生体内で線溶系の活性化の鋭敏な指標になりうると考えられているが、今回の検討では、PIPC は糖尿病性腎症患者において高値を示した。

抗 α_2 PI モノクローナル抗体¹¹⁾ を用いた本法は、PIPC を定量的に測定可能であり、その測定範囲も $0.3 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ と非常に広く、またわずか $10 \mu\text{l}$ の血漿で測定できるなどの特長を持っている。さらに、プラスミノゲンや α_2 PI などの類似蛋白や乳び、ビリルビン、ヘモグロビンの影響を受けずに特異性が高いことも特長の一つである。

従来、糖尿病患者では、血液凝固亢進と線溶活性の低下が認められるとする報告が多い^{5)~7)} が、PIPC を測定しての線溶状態の評価をしている報告は見られていない。今回の検討では、糖尿病性腎症の臨床的特徴とされている蛋白尿を持続的に示す糖尿病患者、あるいは間欠的に蛋白尿を示す糖尿病患者では、蛋白尿を示さない糖尿病患者および持続的蛋白尿を呈する慢性糸球体腎炎患者より、PIPC 値が高い傾向が認められた。なお糖尿病患者の各グループ間の平均年齢に有意差はなく、aging の影響はないものと考えられる。また、尿所見異常のない健常人の血漿 PIPC は、男性では $0.19 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ (平均 $\pm$ SD, $n=25$)、女性では $0.35 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ ($n=50$) と報告されている¹⁰⁾。蛋白尿を示さない糖尿病患者でさえも、これら尿所見異常のない健常人と比較すると、PIPC 値は統計学的に有意に高値を示す ($P < 0.01$) ことから、糖尿病患者では臨床的に蛋白尿のみられない比較的早期から線溶系の活性化が生じてお

り、蛋白尿の出現とともにさらに線溶活性が増すことが示唆される。この線溶系の活性化は、従来の報告を考えると、糖尿病患者では元来血液凝固能が亢進しており、それに対し結果的に線溶系の活性化が生じたものと推測される。

各グループ間の比較では、グループ A とグループ C の間に、罹病期間と血尿で有意差がみられている。罹病期間が長くなるにつれて糖尿病性腎症の有病率が高くなることは、広く知られているが、血尿については不明である。しかし、腎生検を施行していないため、グループ C には糖尿病患者に慢性糸球体腎炎が偶然合併した症例も含まれていることが考えられ、有意差の出現した原因の一つと思われる。血清クレアチニン、総蛋白、アルブミン値は、腎症の進行あるいは蛋白尿の増加とともに変化するもので、各グループ間に有意差があることが容易に理解される。また、グループ A, B, C の順に、フィブリノーゲンが上昇し、特にグループ A とグループ C の間には、有意差が存在するが、これは梅津ら⁹⁾ の報告と一致し、グループ C ではグループ A よりも血液凝固能が亢進していることが示唆される。

全症例での血漿 PIPC と各検査項目との比較では、いくつかの項目と正相関あるいは逆相関を示している。とくに、PIPC と空腹時血糖値とが逆相関を示したことは注目すべきことであるが、PIPC とヘモグロビン A1c とは有意な相関は認められなかった。このことから、長期ではなく短期の血糖コントロールと PIPC は何か関連があることが示唆されるが、測定法に影響を与えていることは考えにくく、明らかな意義は見出だせない。

梅津ら⁹⁾ は、糖尿病性腎症では、血液凝固亢進が特に腎局所でみられるため、血漿より尿中の凝固関連物質の測定が重要であると報告している。このことから考えると、線溶活性の評価には、血漿のみならず尿中 PIPC の測定も重要であると考えられる。

今回は、糖尿病患者の血漿 PIPC 値と糖尿病性腎症の臨床的特徴である蛋白尿との関係を報告した。糖尿病患者の血液凝固線溶系は、腎症をはじめとする細小血管合併症の発症・進展に

重要な役割を担っていると考えられ, その解明は, 今後の研究課題の一つである。

参考文献

- 1) 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, 緋荘和子, 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研究. 臨床病理 **35**: 1275~1281, 1987.
- 2) 福田千左子, 飯島憲司, 井上信正, 高島義顕, 渡辺千晶, 中村克己: EIA 法による α_2 プラスミンインヒビターおよび α_2 プラスミンインヒビター—プラスミン複合体動態の臨床的意義—主として災害外科領域から—。臨床病理 **36**: 346~350, 1988.
- 3) 飯島憲司: 活性化凝固・線溶系因子—阻止物質との複合体—。臨床病理 **36**: 623~626, 1988.
- 4) 小高通夫: 透析患者の予後と死因。日本臨床 (特別号) **43**: 481, 1985.
- 5) 永川祐三, 折茂 肇, 原沢道美, 沢田皓史: 動脈硬化症および糖尿病における血小板凝集能, β -トロンボグロブリン, アポ蛋白, アンチトロンビン III, 線溶に関する研究。日本老年医学会雑誌 **22**: 13~19, 1985.
- 6) 海津嘉蔵, 森田恵美子, 瓜生康平, 竹内昭彦, 伊藤幸郎, 江藤澄哉, 鈴木秀郎: 糖尿病における凝固・線溶系—特に, 糖尿病性腎症を中心として—。血液と脈管 **17**: 362~364, 1986.
- 7) Geiger M and Binder BR.: Nonenzymatic glucosylation as a contributing factor to defective fibrinolysis in diabetes mellitus. Haemostasis **16**: 439~446, 1986.
- 8) Harpel PC.: α_2 -plasmin inhibitor and α_2 -macroglobulin-plasmin complexes in plasma; Quantitation by an enzyme-linked differential antibody immunosorbent assay. J. Clin. Invest. **68**: 46~55, 1981.
- 9) Holvoet P, de Boer A, Verstecken M and Collen D.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of plasmin- α_2 -anti-plasmin complex in human plasma; Application to the detection of in vivo activation of the fibrinolytic system. Thromb. Haemost. **56**: 124~127, 1986.
- 10) 緋荘和子, 赤尾昌文, 山元泰之, 池松正次郎, 藤巻道男: α_2 -プラスミンインヒビター・プラスミン複合体の測定について。機器・試薬 **10**: 1075~1079, 1987.
- 11) Mimuro J, Koike Y, Sumi Y and Aoki N.: Monoclonal antibodies to discrete regions in α_2 -plasmin inhibitor. Blood **69**: 446~453, 1987.