◆原 著◆

肝疾患における血中組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) 活性, 抗原量および凝血学的分子マーカーに よる凝固線溶異常の解析

高 取 正 雄^{*1} 岩 淵 省 吾^{*1} 鴨 川 旭^{*1}
森 山 直 哉^{*1} 吉 田 由 香^{*1} 水 口 明 洋^{*1}
須 階 二 朗^{*1} 安 室 洋 子^{*2}

Analysis of Coagulation-fibrinolytic Abnormalities in Liver Diseases Using Bioimmunoassay for Plasma Free-t-PA, t-PA Antigen and Molecular Markers on Coagulation-fibrinolytic System

Masao TAKATORI^{*1}, Shogo IWABUCHI^{*1}, Asahi KAMOGAWA^{*1},
Naoya MORIYAMA^{*1}, Yuka YOSHIDA^{*1}, Akihiro MIZUGUCHI^{*1},
Jiro SUGAI^{*1} and Yohko YASUMURO^{*2}

Key words: liver diseases, tissue plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibitor

Coagulation-fibrinolytic abnormalities in patients were investigated by newly developed bioimmunoassay method for t-PA activity, t-PA antigen (EIA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and various coagulation-fibrinolytic molecular markers. Plasma levels of t-PA antigen were markedly increased in severe liver diseases involving decompensated liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and fulminant hepatitis. Plasma levels of t-PA activity, however, varied from low to high levels. Consequently, the ratio of t-PA activity versus antigen decreased markedly in the severe state. It was revealed that the majority of increased plasma t-PA antigen obtained from severe liver diseases actually consisted mainly of complexes of t-PA and PAI-1.

After trans-catheter embolization (TAE) therapy for patients with hepatocellular carcinoma, plasma levels of t-PA activity immediately increased and reached peak levels within 6 hours, while symmetrical decreases in PAI-1 were observed. On the other hand, the levels of D-dimer, plasmin-alpha 2 plasmin inhibitor complex (PIC), thrombin-antithrombin 3 complex (TAT) subsequently increased in plasma following the increase in t-PA and decrease in PAI-1. Therefore, plasma t-PA activities evaluated by this bioimmunoassay

^{*1} 聖マリアンナ医科大学第二内科〔〒213 川崎市宮前区菅生2-16-1〕; Second Department of internal medicine, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, 213, Japan.

^{*2} 同 臨床検査部; Clinical Pathology, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, 213, Japan. 受付: 1991.2.6, 受理: 1991.4.26.

were considered to be a sensitive indicator of fibrinolysis activation.

Plasma t-PA activity in various liver diseases had significant positive correlation with PIC levels, and negative correlation with PAI-1. However, t-PA activities had no correlation with levels of t-PA antigen, TAT, and D-dimer. It is difficult to correctly evaluate coagulation-fibrinolytic condition with limited specific markers. It was concluded that combination assay for t-PA activity, t-PA antigen, PAI-1 and other molecular markers is required to assess the coagulation-fibrinolytic condition in severe liver diseases.

緒 言

我々は血中・組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) は肝でのクリアランス低下に伴い上昇し、肝不全マーカーとしての性質を有すること、また DIC 合併、腫瘍塞栓術 (TAE) 施行時など二次線溶作動時にも増加することを報告してきた¹⁾。しかし、ELISA 法による t-PA 抗原量は plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) との複合体も検出するため、free t-PA の動態および複合体との量的関係は不明であった。今回モノクローナル抗体による Bioimmunoassay 法の改良法²⁾により PAI-1 との複合体を含まない free t-PA (以下 t-PA 活性) を測定し、抗原量および他の凝血学的分子マーカーと比較し、重症肝疾患での凝血異常のメカニズムについて検討した。

対象および方法

対象は急性肝炎 (AH) 7 例、劇症肝炎 (Ful. H) 3 例、慢性肝炎 (CH) 10 例、肝硬変症 (代償性: LC-c 9 例, 非代償性: LC-d 9 例), 肝細胞癌 (代償性: HCC-c 10 例, 非代償性: HCC-d 6 例, LC の有無に関わらず顕性黄疸、腹水のいずれかを有するものを HCC-d とした) の計 54 例。健常成人 88 例をコントロールとした。t-PA 活性は抗ヒト t-PA モノクローナル抗体固定化スティック封入の専用真空採血管にて血液を採血直後に希釈し、即時型インヒビターの影響を除いた²⁾。スティックに結合した t-PA 活性はプラスミノゲンからの遊離プラスミン量で定量した²⁾。t-PA 抗原量, PAI-1, D-dimer, PIC, TAT はいずれも市販の EIA

-kit により測定した (t-PA: American diagnostica 社 IMUBIND-5 tissue plasminogen activator Elisa Kit, PAI-1: biopool 社: IMULYSE PAI-1, D-dimer: Mabco 社 Dimertest EIA, TAT: Behringwerke 社 Enzygnost TAT, PIC: 帝人社)。

統計処理: 成績は平均値±標準偏差であらわれ、3 群以上の群間比較は分散分析で確認後に non pair's Student's t-test を行った。各群での変動差については pair's Student's t-test を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

1) 各種肝疾患における血中 t-PA 活性, 抗原量, 活性抗原比および PAI-1

t-PA 活性は対照 $0.61 \pm 0.42 \text{ ng/ml}$ ($n=24$) に比し AH, CH ではそれぞれ $0.64 \pm 0.54 \text{ ng/ml}$ ($n=5$), $0.53 \pm 0.40 \text{ ng/ml}$ ($n=9$) とほぼ同程度であった。一方, LC-c $1.21 \pm 1.36 \text{ g/ml}$ ($n=9$), LC-d $1.15 \pm 1.36 \text{ ng/ml}$ ($n=9$), HCC-c $1.10 \pm 0.80 \text{ ng/ml}$ ($n=10$) と変動幅は大きいが高値例を多く認め、LC-c, HCC-c では健常成人に比し有意の高値を示した。また HCC のなかでは HCC-c の 1.10 ± 0.80 に比し HCC-d では $0.45 \pm 0.32 \text{ ng/ml}$ ($n=6$) と低値傾向を認めた。Ful. H では 3 例と少数ではあるが、 $0.05 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$ ($n=3$) と全例著明な低値を示した (Fig. 1)。

t-PA 抗原量は対照 $6.1 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ ($n=24$) に比し AH $14.1 \pm 4.5 \text{ ng/ml}$ ($n=5$), CH $10.5 \pm 5.2 \text{ ng/ml}$ ($n=9$), LC-c $10.9 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$ ($n=7$), LC-d $32.7 \pm 11.6 \text{ ng/ml}$ ($n=8$), HCC-c $13.5 \pm 5.6 \text{ ng/ml}$ ($n=10$), HCC-d $17.1 \pm$

Fig. 1 t-PA activity and antigen in various liver diseases

10.1 ng/ml (n=5), Ful. H 42.1 ± 20.8 ng/ml (n=3) と肝疾患全般で高値傾向を示し、例数の少ない Ful. H を除いては健常成人に比し有意の高値を認めた。なかでも LC-d, HCC-d, Ful. H は他の肝疾患に比し高値を示した (Fig. 1)。

t-PA 活性抗原比は、対照 0.12 ± 0.10 (n=24) に対し、AH 0.07 ± 0.07 (n=5), CH 0.07 ± 0.07 (n=9), LC-c 0.17 ± 0.13 (n=7), HCC

-c 0.08 ± 0.05 (n=10) と同レベルであった。一方、LC-c, HCC-c に対し LC-d 0.04 ± 0.03 (n=8), HCC-d 0.05 ± 0.05 (n=5) と非代償性例において低値傾向を示し、なかでも LC-d は対照に比し有意の低値を示した。また Ful. H の 3 例は 0.002 ± 0.002 (n=3) と著しく低値を示した (Fig. 2)。

PAI-1 は対照 13.2 ± 7.9 ng/ml (n=88) に対し、AH 15.4 ± 8.4 ng/ml (n=4), CH 9.5 ±

Fig. 2 t-PA activity/antigen and PAI-1 in various liver diseases

7.1 ng/ml (n=9), LC-c 6.5±6.0 ng/ml (n=9), LC-d 11.0±7.2 ng/ml (n=8), HCC-c 7.5±5.3 ng/ml (n=10), HCC-d 9.7±8.1 ng/ml (n=5) と有意差は認めず, 5 ng/ml 以下の低値例から高値例まで幅広く分布した。各種肝疾患群間では LC-c, HCC-c に比し LC-d, HCC-d で高値例を多く認めたが, LC, HCC では正常よりむしろ低値を示す例も多く認めた。一方, Ful. H では 36.0±17.4 ng/ml (n=3) と著しい高値を示した (Fig. 2)。

2) t-PA 活性と凝血学的マーカーの相関

肝疾患全体 (AH 3 例, CH 8 例, LC 10 例, HCC 8 例) では t-PA 活性は PAI-1 と負の相関 ($r=0.50$), PIC とは正相関 ($r=0.60$) を認

めた。一方, t-PA 抗原量, D-dimer, TAT とは有意の相関を認めなかった (Fig. 3)。

3) 肝癌例に対する TAE 前後の t-PA 活性と凝血学的マーカーの変動

t-PA 活性は対象 8 例中 7 例で TAE 施行直後から 6 時間後にかけて一過性に上昇し, 1 つの peak を形成した。PAI-1 は 8 例中 7 例において施行直後より 12 時間以内に一過性に低下し, t-PA 活性とは鏡像の変動を示した。また 12 時間以降には rebound 的に上昇しており, t-PA 活性に比べ変動の peak は施行後やや遅れて認められた。これら t-PA 活性, PAI-1 の変動に比し t-PA 抗原量の変動率は僅かであった (Fig. 4)。

Fig. 3 Correlation between plasma t-PA activity and molecular markers in various liver diseases

Fig. 4 Changes of plasma t-PA activity, antigen and PAI-1 during treatment for hepatocellular carcinoma with TAE

Fig. 5 Changes of molecular markers during treatment for hepatocellular carcinoma with TAE

TAE 後, D-dimer, TAT は t-PA 活性の上昇にやや遅れ, 12~24 時間後に増加のピークを認めた。一方, PIC は D-dimer, TAT に比べやや早期に増加する傾向を示した (Fig. 5)。

考 案

肝疾患における血中 t-PA 抗原量増加は, 主として肝不全に伴う肝細胞あるいは網内系でのクリアランスの低下による^{1),3)}。また, 著者らは t-PA の血中存在様式にも多様性がみられることを報告した⁴⁾。これらのなかで, 線溶活性を惹起する血中 t-PA 活性の肝疾患における動態は, 従来行われてきた spectrophotometric assay⁵⁾ や solid-phase-bioimmuno assay⁶⁾ では不明な点が多かった。この要因としては, 測定血漿中の PAI の影響を除外できないことや肝実質障害に伴う低蛋白血症によりユーグロブ

リン分画抽出が困難なことなどがある。今回の t-PA 活性測定法は, PAI-1 の影響を簡便に除き得る点で生体内での動態をより正確に把握し得る。

肝疾患での血中 t-PA 抗原量は肝実質障害の進展に伴い増加するのに対し, 活性は一定の傾向は示さず, 活性抗原比はむしろ低下した。重症肝疾患, 特に非代償性肝硬変, 肝細胞癌, 劇症肝炎等において上昇する血中 t-PA の多くは, PAI-1 との複合体であり, free t-PA の占める割合は極めて少ないことが明らかになった。

しかし, 肝癌例の t-PA 活性は TAE 施行直後より速やかに増加し, PAI-1 の鏡像的低下, その後の PIC, TAT, D-dimer 等の増加を伴っている。t-PA 活性は TAE 後の凝固線溶作動を鋭敏に反映していると考えられた。また今回

測定した PAI-1 は PAI-1 活性と相関を有するといわれる⁷⁾。すなわち PAI-1 による t-PA の両活化も極めて速やかに行われ、t-PA 活性、PAI-1 両者の消費性低下を示すものと考えられた。森山は⁸⁾、t-PA 複合体も含めた total PAI-1 について TAE 前後に検討し、同様の成績を報告している。

肝硬変、肝硬変合併肝癌など重症肝疾患での出血傾向の一因として線溶亢進の関与があげられ、PAI 活性の低下を重視する報告がある⁹⁾。今回の検討で t-PA 活性と PAI-1 が負の相関を認めたことはこの報告を支持するものであろう。一方、肝不全状態では PAI 抗原量、活性ともに上昇するという相反する報告もあり¹⁰⁾、PAI 測定法の違いによるものと考えられる¹¹⁾。

t-PA 活性は PIC と正相関、PAI-1 と負の相関傾向を認め、t-PA 活性高値例では線溶亢進状態にあることも示唆された。しかし t-PA 活性高値例では必ずしも TAT、D-dimer の増加を伴わない例も多く認められた。このことより、t-PA 活性増加は凝固亢進よりも、t-PA と PAI-1 バランスに依存すると考えられた。よって二次線溶亢進状態でも、PAI-1 優位となれば血中 t-PA 活性は減少することも示唆された。

重症肝疾患ではプラスミノゲンあるいは $\alpha 2PI$ の肝での合成低下のため、線溶亢進例でも PIC が増加しない可能性も指摘されている¹²⁾。さらに、TAT や D-dimer は有腹水例では血中、腹水中とも高値を示し、腹水の影響も考慮しなければならない¹³⁾。このように重症肝疾患における線溶亢進の把握には単独の凝血学的分子マーカーでは困難である。我々は重症肝疾患に ATIII 濃縮製剤を投与した成績から、DIC 合併の診断には D-dimer、PIC の組み合わせが最も有用と考えた¹⁴⁾。線溶亢進の評価も複雑化しつつあるが、著者らは肝疾患での線溶動態把握には t-PA、PAI バランスが最も重要と考えられた。

重症肝疾患のなかでも劇症肝炎では全例 t-PA 抗原量が著高を示したにもかかわらず PAI-1 も高値を示し、t-PA 活性値は極めて低値を示した点は特徴的であった。これは t-PA の肝

でのクリアランス低下のみならず、血管内皮細胞からの t-PA 放出増加を上回る PAI-1 の放出により t-PA 活性は低値を示したものと考えられた。この現象はヘパプラスチンテストが 50%以下の重症型急性肝炎では、t-PA 活性に一定の傾向を認めなかったのとは異なり、両疾患の凝固線溶状態の差異を検討する上で興味深いものと思われた。

結 語

改良型 bioimmunoassay 法による t-PA 活性と種々分子マーカーを用い肝疾患における凝固線溶動態を解析した。肝不全に伴い増加する血中 t-PA の多くは t-PA・PAI-1 複合体であり t-PA 活性の占める割合は少ないことが明らかになった。しかし t-PA 活性は腫瘍塞栓術前後の検討から、その時々々の線溶系作動を鋭敏に反映した。また、t-PA 活性は活性発現後早期に PAI-1 による制御を受け、t-PA・PAI バランスが肝疾患の線溶動態把握に重要と考えられた。

本論文の要旨は第 12 回日本血栓止血学会学術集会 (大阪) において発表した。

文 献

- 1) 高取正雄: 肝疾患における組織プラスミノゲンアクチベーターの血中変動の臨床的意義. 肝臓, **30**: 778~785, 1989.
- 2) Watanabe, S., Sasamata, M., Katoh, M., Itoh, K., Yano, S., Ezoe, H., Yamada, R., Yasumoro, Y., Yamada, S. and Ishii, A.: t-PA activity assay method in blood sample using dipstick coated with a monoclonal antibody SP-322. Thromb. Haemost., **62**: 95, 1989.
- 3) Einarsson, M.: Uptake and degradation of tissue plasminogen activator in rat liver. Thromb. Haemost., **59**: 474~479, 1988.
- 4) 高取正雄, 鴨川 旭, 岩淵省吾, 森山直哉, 水口明洋, 須階二郎: 肝疾患の血中組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) に関するゲル濾過およびアフィニティカラムクロマトグラフィによる質的検討. 臨床病理, **XXXVIII**: 171~175, 1990.
- 5) Verheijen, J.H., Mullaart, E., Chang, G.T.G., et al.: A simple, sensitive spectrophotometric assay

- for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma. *Thromb. Haemost.*, **48**: 226~229, 1982.
- 6) Mahmoud, M., Gaffney, P.J.: Bioimmunoassay (BIA) of tissue plasminogen activator (tpa) and its specific inhibitor (tpa/INH). *Thromb. Haemost.*, **53**: 356, 1985.
- 7) Declerck, P.J., Alessi, M., Verstreken, M., Kruithof, E.K.O., Juhan - Vague, I. and Collen, D.: Measurement of Plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murin monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*, **71**: 220~225, 1988.
- 8) 森山直哉: 肝疾患におけるプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター 1 (PAI-1) の変動. 聖マリアンナ医大誌, **18**: 142~153, 1990.
- 9) Hersch, L.S., Kunelis, T. and Francis, B.R. Jr.: The pathogenesis of accelerated fibrinolysis in liver cirrhosis: A critical role for tissue plasminogen activator inhibitor. *Blood*, **69**: 1315~1319, 1987.
- 10) Kruithof, E.K.O., Guidinchet, A. and Bachmann, F.: Plasminogen activator inhibitor 1, plasminogen activator 2 in various liver disease states. *Thromb. Haemost.*, **59**: 7~12, 1988.
- 11) 岩淵省吾, 鴨川 旭, 須階二郎: プラスミノゲン・アクチベーターインヒビター. 日臨, **47**: 872~876, 1989.
- 12) 永島佳代子, 田原千枝子, 風間睦美, 木下忠俊, 滝川 一, 大沢 仁, 三宅和彦, 山中正己: 凝血学的分子マーカーよりみた肝疾患時の線溶動態解析. 肝臓, **29**: 141, 1988.
- 13) 高取正雄, 岩淵省吾, 吉田由香, 鴨川 旭, 水口明洋, 須階二郎: 非代償性肝硬変症における血中および腹水中凝血学的分子マーカーの比較検討. 肝胆脾, 投稿中
- 14) 岩淵省吾, 水口明洋, 高取正雄, 森山直哉, 吉田由香, 鴨川 旭, 須階二郎: Thrombin・Antithrombin III 複合体 (TAT) による重症肝疾患凝固線溶動態の解析. 肝臓, **30**: 125, 1989.