◆原 著◆

DIC におけるプロトロンビン・フラグメント F 1+2 の測定意義

鈴木 隆 史* 天 野 景 裕* 緋 荘 和 子*
福 武 勝 幸* 藤 巻 道 男*

Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Plasma Prothrombin Fragment F 1+2 in DIC

Takashi SUZUKI*, Kagehiro AMANO*, Kazuko KUROSO*,
Katsuyuki FUKUTAKE* and Michio FUJIMAKI*

Key words: prothrombin fragment F 1+2, enzyme immunoassay, disseminated
intravascular coagulation, hypercoagulable state

The activation of prothrombin by prothrombinase complex results in cleavage of the prothrombin molecule into two polypeptides, alpha-thrombin and prothrombin fragment F 1+2. Recently, an enzyme immunoassay (Enzygnost F 1+2; Behringwerke AG, Germany) was developed to measure the activation peptide for the clinical diagnosis of hypercoagulable states. The accuracy and clinical usefulness of this test were evaluated using blood samples of healthy individuals and patients with disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC). Plasma F 1+2 levels in the healthy individuals were 0.49 ± 0.29 nmol/l (Mean $\pm$ SD, n=67). The levels in the initial samples of patients with DIC were 10.52 ± 12.99 nmol/l (Mean $\pm$ SD, n=17), which were significantly higher than those in healthy individuals. In cases with improved DIC, plasma F 1+2 levels tended to decrease after starting anticoagulant therapy. However, in the cases showing deterioration high levels persisted. These results suggest that the plasma F 1+2 level well reflects hypercoagulable states in DIC and is a useful molecular marker to monitor the effects of therapy.

プロトロンビン・フラグメント F 1+2 (以下 F 1+2) はプロトロンビンが、活性型第 V 因子、 Ca^{2+} 、リン脂質の存在下に活性型第 X 因子 (F. Xa) と巨大複合体 (prothrombinase) を形成し、Arg²⁷⁴-Thr²⁷⁵ の間で限定分解を受けて活性

化され α -トロンビンとなる際に遊離される N 末端ペプチドである。F 1+2 は 274 個のアミノ酸から構成される分子量約 34,000 の 1 本鎖ポリペプチドであり、その N 末端側には 10 個の Gla ドメインを有している¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。したがって、

* 東京医科大学臨床病理学教室 (〒 160 東京都新宿区西新宿 6-7-1) : Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, 7-1, Nishishinjuku 6-chome, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan. 受付: 1992. 2. 5, 受理: 1992. 4. 6.

F1+2 は第 X 因子活性およびトロンビン生成を反映するものと考えられる。

今回, 新しく開発された EIA 法による F1+2 測定法の信頼性を検討し, また DIC 症例において DIC 改善群と非改善群に分類し, F1+2 値の変化を調べ考察した。

I. 対象および方法

A. 対 象

健康者 67 名 (男性 38 名; 18~39 歳, 女性 29 名; 18~37 歳) および急性 DIC 症例 17 症例を対象とした。

B. 被検検体

検体は 3.2% クエン酸ナトリウム 1 容に対して全血 9 容の割合で採取した血液を 3,000 rpm, 4°C にて 20 分間遠心して得た血漿を用いた。保存は -80°C で行った。

C. 試 材

F1+2 の測定は Enzygnost F1+2 (Behringwerke AG, Germany)⁶⁷⁾ を使用した。

D. 原理および操作法

原理は, 一次抗体として抗ヒト F1+2 家兔抗体を, 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトプロトロンビン家兔抗体を用いる二抗体サンドイッチ法に基づいた EIA 法である。

操作手順は, まず一次抗体がコーティングされた特殊チューブに, 添付のサンプル緩衝液 (ヘパリン, EDTA, Tween 20 を含む) 100 μ l と添付標準物質 (0.04, 0.2, 2.0, 10.0 nmol/l), コントロール血漿または血漿検体を各々 100 μ l を加えて, 37°C 恒温槽にて 30 分間反応させた。患者血漿については 4 倍希釈を行い検体とした。洗浄液 (Tween 20 を含むリン酸緩衝液) にて 3 回吸引洗浄後, 二次抗体液 200 μ l を加え同様に 37°C, 30 分間反応させた後, 洗浄液にて 3 回吸引洗浄した。o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 基質を, H₂O₂ 含むリン酸緩衝液で溶解した発色剤を 200 μ l 加え, 室温, 暗所にて 30 分間反応させた後, 反応停止液 (0.5 N 硫酸) 1,000 μ l を加え, 反応終了後, 精製水を盲検として波長 492 nm の吸光度を測定した。各濃度の標準物質に対して得られた吸光度より両対数グラフ上で標準曲線を作成し, これより

被検検体の F1+2 濃度を測定した。

なお, 今回の検討にあたり, 他の分子マーカーとして, トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (TAT) は Enzygnost TAT (Behringwerke AG, Germany), プラスミン・ α_2 -プラスミンインヒビター複合体 (PIC) は PIC テスト (テイジン), FDP-E はエルピア FDP-E (ダイアヤトロン) を用いて測定した。

II. 成 績

A. 測定法の検討

1. 再現性

0.7, 1.0, 2.0, 3.0 nmol/l の異なる濃度の血漿 4 検体について 10 回同時測定を行った。その変動係数は 10.9~16.1% であった。添付コントロール血漿 (0.5 nmol/l) を用いての日差再現性は, 0.49 ± 0.07 nmol/l (Mean $\pm$ SD) であり, 変動係数は 13.3% (n=6) であった。

2. 希釈直線性

4 倍希釈血漿を用いて測定した F1+2 値が 2.0~18.4 nmol/l を示した 7 検体について検討したところ, 6.4, 7.2, 18.4 nmol/l を示した 3 検体で抗原過剰による反応低下のためと考えられる直線性の悪化を認めた。

B. 臨床的検討

1. 健康者における血漿 F1+2 濃度

健康者 67 名における血漿 F1+2 濃度は, 0.17~1.71 nmol/l の範囲を示した。Mean $\pm$ SD は, 男性 0.47 ± 0.33 , 女性 0.50 ± 0.19 , 全体 0.49 ± 0.29 nmol/l であり, Welch の t 検定により危険率 5% にて男女間に有意差は認めなかった (Fig. 1)。

2. 急性 DIC 症例における血漿 F1+2 濃度

対象とした急性 DIC 症例 17 例の内訳は産科的疾患 3 例, 手術後 3 例, 悪性新生物 8 例, 敗血症 2 例, 劇症肝炎 1 例であり, 治療後の DIC 改善例は 8 例, 非改善例は 9 例であった。

17 症例の発症初期における F1+2 値は 0.58~40.0 nmol/l と幅広く分布した (Fig. 2)。Mean $\pm$ SD は 10.52 ± 12.99 nmol/l であり, Welch の t 検定にて危険率 0.1% 以下で健康者に比し有意に高値を示した。異常値出現率は 88% (17 例中 15 例) であり, 同一検体におけ

Fig. 1 Plasma F1+2 levels in normal healthy individuals.

る TAT と同率であった。

Fig. 3 に、治療経過における F1+2 値の変動を DIC 改善例と非改善例とに分けて示した。DIC 改善例では F1+2 値は経時的に低下し (Fig. 3-a), 非改善例では持続的に高値を示した (Fig. 3-b)。改善例では、対応のある Wilcoxon 検定にて危険率 1.8% 未満で、治療後の F1+2 値は発症初期に比し有意な低下を認めた。非改善例では両者に有意差は認めなかった。

DIC 17 症例の全経時検体 103 検体を用いて、他の分子マーカーとの相関を求めた。F1+2 は、TAT とは $r=0.75$ ($n=75$, $P<0.001$) (Fig. 4), PIC とは $r=0.45$ ($n=55$, $P<0.005$) (Fig. 5), FDP-E とは $r=0.59$ ($n=84$, $P<0.001$) と有意な正相関を示し、血小板数 (PLT) とは $r=-0.29$ ($n=100$, $P<0.005$) の弱い負の相関が得られた。

3. 臨床症例

Fig. 6 に DIC 改善例における F1+2, TAT, PIC, FDP-E, PLT の経過を示した。症例は下垂体腺腫にて脳外科的腫瘍摘出術を施行されたが、術後 12 日目より血小板およびフィブリノゲンの減少, APTT の延長を認め、DIC と診断され抗凝固療法を開始した患者である。治療開始前には異常高値を示していた F1+2 値は、開始後より低下傾向を示し、同時に他の凝血学的デ

Fig. 2 Plasma F1+2 levels in normal healthy individuals and patients with DIC. The samples of DIC were initially collected from 17 patients.

ータの改善を認めた。

Fig. 7 に DIC 非改善例における F1+2, TAT, PIC, FDP-E, PLT の経過を示した。症例は上咽頭癌および全身転移にて放射線療法および化学療法を繰り返していた患者である。過去数回にわたり上記治療を受け、全身状態は比較的良好に保たれていたが血小板数が徐々に減少し、凝血学的データの悪化を認め、DIC の診断にて治療を開始した。しかしながら治療に反応せず、F1+2 値は異常高値を示したまま死亡に至った。

III. 考 察

血中でのトロンビン活性を測定することができれば、凝固活性化の程度をより直接的に知ることができる。しかしながら血中のトロンビンは網内系での処理、自己分解や、フィブリン、アンチトロンビン III (ATIII), トロンボモジュリン、ペパリンコファクター II などと早期に結合して失活するため、直接血中のトロンビン活性を測定することは不可能であった。これまで

Fig. 3 Fluctuations of plasma F 1+2 levels during course of DIC.

Fig. 4 Correlation between thrombin-antithrombin complex (TAT) and F 1+2 in patients with DIC.

Fig. 5 Correlation between plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex (PIC) and F 1+2 in patients with DIC.

にトロンビン生成マーカーとして TAT, フィブリノペプチド A, フィブリンモノマーが利用されているが, F1+2 は F. Xa によるトロン

ビン生成をより直接的に反映しているものと考えられ, 新しい凝固系分子マーカーとして高い有用性が期待される。

本検討において, 血漿 F1+2 の正常値は $0.49 \pm 0.58 \text{ nmol/l}$ (Mean $\pm$ 2 SD) であり, 男女間に有意差は認めなかった。本邦における高橋ら⁸⁾ の成績と平均値の差の検定 (Welch の t 検定) にて比較したが, 危険率 1% で有意差は認められなかった。

DIC 症例では, その発症初期において凝固亢進状態を反映して有意に高値を示し, その診断的価値は高いことが示唆された。また DIC の改善例, 非改善例とに分けての検討からは, 治療経過において明らかな差を認め, DIC の治療効果の判定の指標としても有用であることが示唆された。発症初期における DIC 改善例と非改善例の F1+2 値には有意差は認められなかったが, 非改善例のうち基礎疾患として悪性新生物が 9 例中 6 例とその多くを占めていた。しかし, DIC の基礎疾患による F1+2 値の差異は認められず, 今後症例数を重ねての検討が必要と思われる。また, 同じ凝固系分子マーカーである TAT との間には有意な正の相関が認められ, DIC の発症初期において F1+2 と TAT は, 同率で異常高値を示した。しかし, 正常化する時期は必ずしも一致せず, これは F1+2 と TAT の分子量, 生体内半減期, および排泄経

Fig. 6 Case in which DIC improved.

Clinical course of DIC which developed in a patient after surgical operation for pituitary adenoma. Low molecular weight (LMW) heparin and regular heparin were used to treat the DIC.

Fig. 7 Case in which DIC deteriorated.

Clinical course of DIC in a patient with suprapharyngeal carcinoma which treated with radiation and chemotherapy. LMW heparin was used to treat the DIC.

路の違いなどが影響していると考えられ, まだ検討不十分であり, 結論には至っていない。今回の検討では過凝固状態における分子マーカーとして両者の明らかな相違点は示されなかったが, PreDIC 状態での F1+2 と TAT との比較など, 今後さらに詳細な検討が必要と思われる。また, F1+2 は凝固系の変化を主に反映しているものと考えられたが, PIC, FDP などの線溶系の分子マーカーとも比較的良好な正の相関が得られた。

F1+2 は, 先天性血栓傾向 (AT III, Protein C, Protein S などの先天的欠乏症)⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ を示す疾患や各種血栓症 (深部静脈血栓症, 肺塞栓症, 心筋梗塞など), および SLE, 癌, 糖尿病などにおいても異常高値を認めることが報告されており⁶⁾¹²⁾¹³⁾, 血栓形成期, 非形成期における F1+2 値の変動を検討することにより, その予防および治療への応用も期待し得るものである。さらに, 妊娠時においても F1+2 は TAT と同様に上昇すると報告されている¹³⁾。また抗凝固療法中の F1+2 値は正常者に比し低値を示すことも報告されており⁷⁾¹⁴⁾, その治療効果のモニタリングにも有用と考えられている⁷⁾⁸⁾¹³⁾。

以上より, 凝固亢進状態を示す各種疾患において F1+2 はプロトロンビン生成の状態をよく反映し, 今後凝固系の新たな分子マーカーとして広く臨床に応用されていくものと期待される。

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班研究費の助成を受けた。本研究の実施にあたり, 貴重な症例の諸情報ならびに検体の提供を頂きました東京医科大学病院脳神経外科学教室, 整形外科科学教室, 産婦人科学教室, 内科学教室第四講座, 臨床病理学教室の先生方, 健常者検体の提供を頂きました東洋公衆衛生学院の諸氏ならびに Enzygnost F1+2 の提供を頂きました Behringwerke AG, ヘキスト・ジャパン (株) に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Suttie, J.W. and Jackson, C.M.: Prothrombin structure, activation, and biosynthesis. *Physiological Rev*, **57**: 1~69, 1977.

- 2) Lau, H.K., Rosenberg, J.S., Beeler, D.L. and Rosenberg, R.D.: The isolation and characterization of a specific antibody population directed against the prothrombin activation fragments F2 and F1+2. *J Biol Chem*, **254**: 8751~8761, 1979.
- 3) Rabiet, M.J., Blashill, A., Furie, B. and Furie, B. C.: Prothrombin Fragment 1+2+3, a major product of prothrombin activation in human plasma. *J Biol Chem*, **261**: 13210~13215, 1986.
- 4) Teitel, J.M., Bauer, K.A., Lau, H.K. and Rosenberg, R.D.: Studies of the prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F2/F1+2 fragment and the thrombin-antithrombin complex. *Blood*, **59**: 1086~1097, 1982.
- 5) Pelzer, H. and Stuber, W.: Markers of hemostatic activation; New perspectives using immunochemical methods for determination of prothrombin fragment F1+2 and thrombin-antithrombin III complex. *Thromb Haemostas*, **62**: 165, 1989 (abstr).
- 6) Pelzer, H., Schwartz, A. and Stuber, W.: Determination of human prothrombin activation fragment 1+2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb Haemostas*, **65**: 153~159, 1991.
- 7) Bruhn, H.D., Dati, F., Conard, J., Mannucci, M., Monteagudo, J., Pelzer, H., Reverter, R., Samama, M., Tripodi, A. and Wagner, C.: Multicentric evaluation of a new assay for prothrombin fragment 1+2 determination. *Thromb Haemostas*, **65**: 1118, 1991 (abstr).
- 8) 高橋芳右, 古田理恵, 庭野裕恵, 和田研, 帯刀亘, 花野政晴, 柴田昭: 凝固活性化の新しい指標としてのプロトロンビンフラグメント F1+2. *血栓止血誌*, **2**: 469~473, 1991.
- 9) Bauer, K.A., Broekmans, A.W., Bertina, R.M., Conard, J., Horellou, M.H., Samama, M.M. and Rosenberg, R.D.: Hemostatic enzyme generation in the blood of patients with hereditary protein C deficiency. *Blood*, **71**: 1418~1426, 1988.
- 10) Bauer, K.A. and Rosenberg, R.D.: Congenital antithrombin III deficiency: Insights into the pathogenesis of the hypercoagulable state and its management using markers of hemostatic sys-

- tem activation. *Am J Med*, **87**(3 B) : 39 S~43 S, 1989.
- 11) Bauer, K.A., Goodman, T.L., Kass, B.L. and Rosenberg, R.D. : Elevated factor Xa activity in the blood of asymptomatic patients with congenital antithrombin deficiency. *J Clin Invest*, **76** : 826~836, 1985.
- 12) Bauer, K.A. and Rosenberg, R.D. : The pathophysiology of the prethrombotic state in humans ; Insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. *Blood*, **70** : 343~350, 1987.
- 13) Hursting, M.J. : An enzymelinked immunosorbent assay for prothrombin fragment 1. 2. XIII th International Congress on Thrombosis and Haemostasis. Lunch work shops., 2 nd. Jul, 1991.
- 14) Conway, E.M., Bauer, K.A., Barzegar S. and Rosenberg, R.D. : Suppression of hemostatic system activation by oral anticoagulants in the blood of patients with thrombotic diatheses. *J Clin Invest*, **80** : 1535~1544, 1987.
-