



The Significant Enhancement of Fibrinolysis by Calcium Ion in a Cell Free System: The Shortening of Euglobulin Clot Lysis Time by Calcium Ion

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小島, 由美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1040

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 187号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏 名	小 島 由 美		
論文題目	The Significant Enhancement of Fibrinolysis by Calcium Ion in a Cell Free System : The Shortening of Euglobulin Clot Lysis Time by Calcium Ion (液相におけるカルシウムイオンによる線溶促進機構：カルシウムイオンによるユーグロブリン溶解時間の短縮)		

博士(医学) 小 島 由 美

論文題目

The Significant Enhancement of Fibrinolysis by Calcium Ion in a Cell Free System: The Shortening of Euglobulin Clot Lysis Time by Calcium Ion

(液相におけるカルシウムイオンによる線溶促進機構: カルシウムイオンによるユーグロブリン溶解時間の短縮)

論文の内容の要旨

[はじめに] ユーグロブリン溶解時間 (ECLT) は tissue plasminogen activator (tPA) 及び plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) と強い相関をもち、線溶活性を総括的に示すとされている。本研究において、我々はカルシウムイオン (Ca^{++}) がユーグロブリン溶解時間 (ECLT) を著明に短縮することを見いだしたので、その線溶促進機構を解析した。

[方法] ECLT: ユーグロブリン分画は新鮮血漿を20倍希釈し、pH 5.2に酸性化することによって調整した。ECLTには microtiter plate を用い、150 μl のユーグロブリン分画に50 μl のヒトトロンビン液を加えることにより開始した。クロット溶解は濁度の変化を340 nmの透過度の変化として測定した。バリウム吸着血漿は Biggs & Macfarlane の方法 (1962) により調整した。ヒト protein C 及び ヒト X 因子は Enzyme Research Lab. (IN USA) より購入した。X 因子欠乏血漿は、George King Bio-Medical (USA) より、X 因子抗体は Nordic Immunological Laboratories (Netherlands) より購入した。ヒト fibrinogen 及び α_2 -antiplasmin ($\alpha_2\text{AP}$) はカビ社 (Sweden) より購入した。

Glu-plasminogen 及び C_1 -inactivator は新鮮凍結結成より、Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) は PAI-1 発見 DNA で transfect した大腸菌より精製した。

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Leammli の方法 (Nature 1970) により行い fibrin autography は Granelli-Diperno の方法 (J.Exp.Med 1978) により行った。

[結果] 1) Ca^{++} は濃度依存性に ECLT を短縮した。生理的濃度 (1.5-2.0 mM) 以上で約4~5倍の短縮を認めた。またこの短縮は他の二価イオンであるマグネシウム、亜鉛、マンガンでは認められなかった。2) 血漿のクロット溶解時間は Ca^{++} 添加により延長した。3) fibrinogen、Glu-plasminogen、tPA 及び thrombin を用いた純化した系では Ca^{++} 添加による影響は認められなかった。4) 抗 tPA 抗体、PAI-1、 C_1 -inactivator は ECLT を延長したが Ca^{++} 添加により短縮した ECLT には影響を及ぼさなかった。5) $\alpha_2\text{AP}$ はすべての Ca^{++} 濃度で ECLT を延長した。6) Ca^{++} 添加により、ユーグロブリン分画において plasmin の生成が早まることが fibrin autography により確認された。7) バリウム吸着血漿においては Ca^{++} 添加により ECLT は短縮しなかったが、バリウム吸着分画の添加により再度短縮が認められた。8) バリウム吸着血漿に Xa 因子を加えると Ca^{++} 添加による ECLT の短縮が再び認められるようになった。9) X 因子欠乏血漿では Ca^{++} 添加による ECLT の短縮は認められなかった。10) 抗 X 因子抗体の添加により、 Ca^{++} により ECLT の短縮は著明に弱められた。

[考察] 本研究により Ca^{++} により ECLT が著明に短縮されることが示された。 Ca^{++} による線溶促進作用は濃度依存性であり、生理的濃度においても認められた。血漿のクロット溶解時間が Ca^{++} 添加により延長したのは、トロンビンによって活性化された13因子がフィブリン血栓を安定化すると共に

α_2 AP をフィブリンに架橋しプラスミンに抵抗性のあるフィブリン血栓を形成したためと考えた。純化した系では Ca^{++} 添加による影響を認められなかったことにより tPA によるプラスミノーゲンの活性化あるいはプラスミンによるフィブリンの分解は Ca^{++} による線溶活性化の原因ではないと考えられた。抗 tPA 抗体、PAI-1、C₁-inactivator が Ca^{++} 添加により短縮した ECLT には影響を及ぼさなかったことにより、 Ca^{++} の作用は既知の t-PA を介する線溶の外因系や、X II 因子、prekallikrein、HMW-kininogen 等の接触因子を介する線溶の内因系とは異なる新しい機序を介していると考えられた。バリウム吸着血漿を用いた実験よりバリウムに吸着されるビタミン K 依存性凝固因子が、 Ca^{++} による線溶の活性化に必須であると考えられた。活性化プロテイン C (APC) の線溶活性化作用が報告されているが、APC の添加も抗 APC 抗体の添加も Ca^{++} 添加により短縮した。ECLT には影響を及ぼさず、APC による PAI-1 の中和は、この機構には重要ではないと考えられた。X 因子欠乏血漿では Ca^{++} 添加による ECLT の短縮は認められなかったこと、更に抗 X 因子抗体の添加により ECLT の短縮の程度が弱められたことから、 Ca^{++} 添加により線溶活性化機構に X 因子の存在が不可欠であると考えられた。この X 因子を介する新しい線溶活性化経路は、従来から指摘されている凝固と線溶の密接な cross talk を解明する手掛かりになるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

血液凝固系と線溶系が fibrin の形成（血栓形成による止血）と fibrin の溶解（血流の保持）という二律背反の作業を行っているにもかかわらず生体では巧妙に homeostasis が保たれている。この理由として両者間に互いに制御する機構が存在する筈であると考えられてきたが、未だ明確にされたとは言えないのが現状である。

申請者はカルシウムイオン (Ca^{++}) がユーグロブリン溶解時間を著明に短縮することを見だし、これより出発して血液凝固系の活性化 (X 因子の活性化) が線溶系の活性化を惹起させるという両者の制御機構の一つを初めて明らかにした。

線溶系測定に用いられるユーグロブリン溶解時間 (ECLT) の系に生理的濃度以上 (1.5-2.0mM) の Ca^{++} を加えると、ECLT は約 4 - 5 倍に短縮し、この短縮は他の二価イオンであるマグネシウム、亜鉛、マンガンでは認められなかった。そこで、この機序を明らかにするために以下の実験を行った。純化した fobrinogen、Glu-plasminogen、tPA に thrombin を加えて形成させる純化 fibrin の系に Ca^{++} を添加しても溶解時間の短縮は認められなかった。抗 tPA 抗体、PAI-1、C₁-inactivator を加えると ECLT は延長するが、 Ca^{++} 添加により短縮する ECLT の系にこれらを加えても影響はみられなかった。バリウム吸着血漿を作製し X 因子などビタミン K 依存性凝固因子を除去すると Ca^{++} 添加による ECLT 短縮作用は消失するが、これにバリウム吸着分画や X 因子を添加すると再度 ECLT 短縮作用が復活した。また X 因子抗体の添加により Ca^{++} による ECLT の短縮作用が減弱した。

以上の成績より Ca^{++} による ECLT の短縮には X 因子が関与することが強く示唆された。

本研究により凝固と線溶における互いの制御機構の一端が明らかになった。凝固・線溶カスケード・マップに新しい経路を加えるという画期的仕事であり、高く評価された。

申請者の発表に対し、次のような質疑がなされた。

- 1) ユーグロブリン分画のクロットと血漿のクロットの差異、特に構造上の差異、溶解の差異について
- 2) ECLT の反応系において長い潜伏時間の後、一挙に反応が進行するのは何故か
- 3) 抗凝固剤としてクエン酸ソーダを用いたのは何故か

- 4) Ca^{++} 存在下と存在下における fibrin 繊維の構造上の差異について
- 5) X 因子と Ca^{++} との結合について
- 6) II、VII、IX 因子においてこのようなことはないのか
- 7) 何故 X 因子だけでこのようなことが起こるのか
- 8) phosphatidyl-serine、phosphatidyl-choline を添加した場合はどうなるか
- 9) α_2 AP が存在する状況下での線溶（血漿のクロット溶解時間）では Ca^{++} を加えると何故溶解時間が延長するのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 寺 尾 俊 彦

副査 教授 市 山 新 副査 教授 菅 野 剛 史

副査 教授 寺 川 進 副査 講師 大 西 一 功