The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Measurement of the variable forms of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) in plasma; levels in the hyperlipidemic patients
Author(s)	粉川, 俊則
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42928
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 31 】

氏　　名	粉川　俊則（こかわ　としのり）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学位記番号	第　14828　号
学位授与年月日	平成11年5月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Measurement of the variable forms of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) in plasma ; levels in the hyperlipidemic patients （リポ蛋白結合性凝固インヒビター（Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI）の測定法の確立と、その高脂血症患者における変動）
論文審査委員	（主査） 教授　松澤　佑次 （副査） 教授　金倉　　譲　　教授　荻原　俊男

論文内容の要旨

【目的】

TFPIは血管内皮傷害にはじまる外因系凝固の開始反応を阻害するプロテアーゼインヒビターであり、血漿中ではリポ蛋白結合型および遊離型として存在している他、大部分はheparin投与により血漿中へ遊離される血管内皮細胞結合型として存在している。従来、高脂血症患者では、血漿中総TFPIが増加することは報告されていたが、各分画の変動については検討されていなかった。そこで、各分画を定量可能にするため従来の測定法を改良すると同時にLDL-apheresis施行中の患者を含めたII型高脂血症患者の各分画における変動を検討した。

【方法】

I）血漿中各TFPI分画活性の測定：血漿をSuperdex 200カラムを用いてゲル濾過し、LDL/VLDL結合型、HDL結合型および遊離型のTFPI活性を、組織因子-VIIa複合体によるX因子の活性化反応に対する阻害活性として、Xaに対する蛍光性ペプチド基質を用いて測定した。

II）TFPI抗原量の測定：TFPIのKunitz type domain-3を認識するモノクロナール抗体を用いたEIA法により血漿中の遊離型およびheparinにより遊離した血管内皮細胞結合型抗原量を測定した。

【成績】

I-1）ゲル濾過に用いた緩衝液中のNaCl濃度を従来の0.15 Mに対して1 Mに設定して健常人血漿のゲル濾過を行うと、各TFPIの分離には差はなかったが、回収率は1 Mに設定した方がはるかに良く、特に遊離型の回収率が上昇し、血漿中総TFPI活性の約50%を占めることが明らかとなった。これにより、血漿中リポ蛋白結合型および遊離型TFPI活性を分別定量する方法を確立した。

I-2）この条件を用いて、健常人および高脂血症患者の血漿をゲル濾過し、各TFPIについて解析したところ、高脂血症患者では健常人に比しLDL/VLDL結合型活性は上昇していたが、逆に遊離型活性は低下していることが明らかとなった。特にLDL-apheresis施行中の患者では遊離型活性の低下は著しかった。

I-3）LDL-apheresis施行患者では、TFPIはapheresis columnにより生体内から除去されていた。これは、ほとん

どが血管内皮細胞結合型由来であった。

II-1）遊離型抗原量のみを測定可能なEIA法について、希釈に用いられた緩衝液中のNaCl濃度を従来の0.15 Mに対して0.6 Mに設定することにより、heparinのTFPI抗原量測定値に対する影響はほぼ消失した。これにより、heparinにより血漿中へ遊離される血管内皮細胞結合型抗原量を同時大量に測定する方法を確立した。

II-2）この条件を用いて高脂血症患者の遊離型抗原量を測定すると、活性の場合と同様に健常人に比べて有意な低下が認められた。

II-3）健常人および高脂血症患者に一定量のheparinを投与し遊離した血管内皮細胞結合型抗原量と遊離型抗原量の間には正の相関があることが明らかになった。

【総括】

以上の成績から、従来、健常人に比し血漿中総TFPIの増加が報告されていた高脂血症患者では、LDL/VLDL結合型の増加することが明らかとなり、活性を有する遊離型抗原量が低下しており、さらにその低下は血管内皮細胞結合型抗原量の低下と関連することが明らかとなった。また、LDL-apheresis施行患者では、heparin投与により血管内皮細胞結合型TFPIが血漿中に遊離され、これがリポ蛋白と結合し、apheresis columnにより生体内から除去されたことによって、非施行患者に比べより血管内皮細胞結合型抗原量が低下すると考えられた。これら高脂血症患者における血管内皮細胞結合型の低下は、外因系凝固反応の亢進につながるものと考えられた。今後、この方法を用いて各種疾患における各TFPI抗原量の変動を調べ、それぞれの臨床的意義を明らかとすることにより、高脂血症あるいは、心筋梗塞など血栓性疾患の診断、治療に応用できる可能性があると思われる。

論文審査の結果の要旨

TFPI（Tissue Factor Pathway Inhibitor）は外因系凝固開始反応の阻害蛋白であり、血漿中リポ蛋白結合型、遊離型および血管内皮細胞結合型の存在が知られているが、それらを分別定量する方法は開発されていなかった。本研究では、TFPIの各分画（血漿中リポ蛋白結合型、遊離型および血管内皮細胞結合型）の測定法を確立し、高脂血症患者における変動について検討を行った。測定法の確立については以下の結果が得られた。

1）各分画を分離するためのゲル濾過の条件を検討することにより血漿中遊離型の回収率が上昇し、血漿中総TFPI活性の約50％を占めることを明らかにした。2）TFPI抗原量測定時の条件を検討することによりheparinにより血管内皮上から遊離されたTFPIを測定することを可能にした。これらを用いて高脂血症患者の各TFPI分画の変動について以下の結果が得られた。1）高脂血症患者では健常人に比し血漿中遊離型活性と抗原量、および血管内皮細胞結合型抗原量が低下していた。2）血漿中遊離型抗原量と血管内皮細胞結合型抗原量は正相関していた。以上の結果から、高脂血症患者では血漿中遊離型の低下が血管内皮細胞結合型の低下と関連していることが明かとなった。これら遊離型および血管内皮細胞結合型の低下は、外因系凝固反応の亢進につながるものと考えられた。

本研究は、TFPIの各分画測定法の確立、血漿中遊離型と血管内皮細胞結合型との関係、および高脂血症患者でのこれら分画の変動を明らかにしたものであり、今後この方法により各種疾患におけるTFPIの臨床的意義を解明する端緒を開いたものである。よって本研究は学位論文として十分値すると認められる。