

# 小児微小変化型ネフローゼ症候群における 血液凝固・線溶動態

## 第2報 各種抗血栓因子の動態

奈良県立医科大学小児科学教室

宮里 馨, 中島 充, 橋本 和子, 吉岡 章

奈良県立医科大学附属病院新生児集中治療部

高橋 幸博

奈良県立奈良病院小児科

上辻 秀和

### HEMODYNAMICS OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN CHILDREN WITH MINIMAL CHANGE NEPHROTIC SYNDROME II. CHANGES OF ANTICOAGULANTS

KAORU MIYAZATO<sup>1)</sup>, YUKIHIRO TAKAHASHI<sup>2)</sup>, MITSURU NAKAJIMA<sup>1)</sup>,  
HIDEKAZU KAMITSUJI<sup>3)</sup>, KAZUKO HASHIMOTO<sup>1)</sup> and AKIRA YOSHIOKA<sup>1)2)</sup>

1) *Department of Pediatrics, Nara Medical University*

2) *Division of Neonatal Intensive Care, Nara Medical University Hospital*

3) *Department of Pediatrics, Nara Prefectural Nara Hospital*

Received October 18, 1996

*Abstract*: To elucidate hemostatic condition, plasma levels of antithrombin III antigen (AT III), heparin cofactor II antigen (HC II), protein C antigen (PC), protein S antigen (PS: Ag), PS activity (PS: Act) and C4b-binding protein (C4bp) were measured both in acute phase and in remission phase of 25 children with freshly developed minimal change nephrotic syndrome (MCNS). The results indicated that AT III levels in acute phase were lower than normal levels and in remission phase were not different from normal levels. PC and C4bp levels were higher than normal levels in both phases. PS: Ag levels in acute phase were higher than normal levels and in remission phase not different from normal levels, while PS: Act and HC II levels in both phases were not different from normal levels. These findings suggest that anticoagulant factors, especially PC could play an important role to prevent thromboembolic events.

#### Index Terms

antithrombin III (AT III), protein C (PC), protein S (PS), heparin cofactor II (HC II), minimal change nephrotic syndrome (MCNS)

---

## 緒 言

著者の一人宮里は、第1報で小児期MCNSの初発ないし再発時と寛解期における血液凝固・線溶反応のマーカーとしてそれぞれの進展過程で産生されるthrombinやplasminとそれらに対する抑制物質との複合体[thrombin-AT III複合体(以下TAT), plasmin- $\alpha_2$ plasmin inhibitor複合体(以下PIC)]や特異的なfibrin分解産物[FDP D-dimer(以下D-dimer)]について報告した。MCNSでは初発時および再発時といった増悪期にはTATおよびD-dimerが有意に増加するもののPICは正常対照と差異はなかった。したがって、MCNSの増悪期には血液凝固系は亢進状態にあるものの、plasmin産生はさほどみられず、相対的な線溶低下状態にあることが推察された。

今回、さらにこの凝固亢進/相対的線溶低下状態に呼応した生体内凝固・線溶動態を知るために、各種抗血栓因子の動態を検索した。thrombinを初めとする凝固系セリンプロテアーゼ(活性化第IX因子, 活性化第X因子など)の抑制物質で、heparin存在下で著しい抗血栓性、すなわち、凝固抑制を示すantithrombin III(以下AT III)、血管内皮下組織に存在するdermatan sulfate存在下でthrombinを特異的かつ著しく抑制するheparin cofactor II(以下HC II)、凝固過程補因子である凝固第V因子(以下FV)や第VIII因子(以下FVIII)を抑制するprotein C(以下PC)およびその補助因子であるprotein S(以下PS)を測定し、その動態とMCNSの病態との関連について検討した。

## 対 象

対象は第1報で報告した症例のなかで、1991年1月から1996年2月までに奈良県立医科大学付属病院、奈良県立奈良病院、天理市立病院および星ヶ丘厚生年金病院に入院したMCNS患児のうちの初発例22例(11か月から11歳, 平均 $5.0 \pm 2.6$ 歳; 男13例, 女9例)である。ネフローゼ症候群の診断は1974年の厚生省研究班の診断基準によった<sup>1)</sup>。また、MCNSの診断は臨床経過により、通常のスteroid剤(以下ス剤)治療[プレドニン換算で $60 \text{ mg/m}^2$ を4週間投与, 今回パルス療法施行例はない]で速やかに寛解状態を得られ、その後の漸減投与を含む1クルールの治療の後、6か月以内に再発を認めないものとした。寛解期はネフローゼ症候群の診断基準を1項目も満たさない時期とした。再発は有意の蛋白尿[ $40 \text{ mg/hr/m}^2$ 以上, またはウロラプスティックス<sup>®</sup>(バイエル・三共, 東京)で+++以上]が3日以上続くものとした。

検体は、ス剤投与前とス剤投与後8週目に採取した。正常対照として健常児(4歳~15歳)13名の血漿を測定した。

## 方 法

### 1) 血漿採取

静脈より採取した全血9容に対し、3.8%クエン酸ナトリウム1容を混和後、3,000 rpmで10分遠心分離し、乏血小板血漿を得た。分離した血漿は分注後速やかに $-80^\circ\text{C}$ で凍結保存した。測定の際は $37^\circ\text{C}$ で速やかに解凍した。

### 2) 抗血栓因子の測定

(1) AT III抗原量(以下AT III:Ag): 自家製抗ヒトAT III家兎抗体を用いたLaurell法<sup>2)</sup>により測定した。被検血漿8  $\mu\text{l}$ を、0.075 Mペロナル緩衝液(pH 8.6)を用いて作製した0.6%抗ヒトAT III家兎血清を含む1%アガロースゲル平板上で、0.6 mA/cm, 16時間の電気泳動を行った。常法どおりゲルを乾燥後、クマシーブリリアントブルーにて染色し、そのロケット高を算定した。AT III:Agは正常ヒトプール血漿を100%として算出した。

(2) HC II抗原量(以下HC II:Ag): 抗ヒトHC II抗体(ASSERA Hep. Co. II<sup>®</sup>, DIAGNOSTICA STAGO, Asmieres, フランス)を用いたLaurell法により測定した。生食で、3倍に希釈した被検血漿8  $\mu\text{l}$ を、tris-glycine緩衝液(pH 8.8)を用いて作製した0.6%抗ヒトHC II家兎血清を含む1%アガロースゲル平板上で、0.8 mA/cm, 16時間の電気泳動を行った。HC II:Agは正常コントロール血漿(Dade CoagCal<sup>®</sup> N, Dade, Miami, FL)を100%として算出した。

(3) PC抗原量(以下PC:Ag): ヒトPCのうち活性化に際し遊離される部分を認識するモノクローナル抗体(以下mAb)を一次抗体としてポリスチレンボールに固定し、Glaの構造変化を認識するmAbを酵素標識して二次抗体とした。これらで、活性化され得るPCのすべてを挟んで免疫複合体を形成させ、この酵素活性を求めるELISAにより測定した(Protein Cテスト「テイジン」<sup>®</sup>, Teijin Inc, 東京)。

(4) 総PS抗原量(以下total PS:Ag), PS活性(以下PS:Act)およびC4bp-binding protein抗原量(以下C4bp:Ag): PSは流血中では補体成分C4bと結合しうる蛋白(C4bp)と結合しており、このC4bpに結合したPSにはPS活性がなく、PS活性はC4bpと結合していないfree PSに存在する。total PS:Agは自家製抗ヒトPS家兎抗体を用いたLaurell法により測定した。

被検血漿 8 μl を, 0.075 M ベロナル緩衝液(pH 8.6)を用いて作製した 1.5 %抗ヒト PS 家兎血清を含む 1 %アガロースゲル平板上で, 0.7 mA/cm, 16 時間電気泳動し, 染色した. 総 PS 抗原量は正常コントロール血漿(トロンボキャリプレター<sup>®</sup>, Boehringer Mannheim, Mannheim, ドイツ)を 100 %として算出した. PS : Act は PS 欠乏血漿, 活性化 PC(APC)試薬および活性化第 V 因子試薬を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間法により測定した(スタクロットプロテイン S<sup>®</sup>, Boehringer Mannheim, Mannheim, ドイツ). PS : Act はトロンボキャリプレター<sup>®</sup>を標準に用いて算出した.

C4bp : Ag は自家製抗ヒト C4bp 家兎抗体を用いた Laurell 法により測定した. 生理食塩水で 10 倍に希釈した被検血漿 8 μl を, 0.075 M ベロナル緩衝液(pH 8.6)を用いて作製した 1 %抗ヒト C4bp 家兎血清を含む 1 %アガロースゲル平板上で, 0.6 mA/cm, 16 時間電気泳動し, 染色した. C4bp 抗原量はトロンボキャリプレター<sup>®</sup>を標準に用いて算出した.

3) 統計学的処理

得られた成績の統計学的処理法は, 有意差は t 検定により p < 0.05 を有意差ありと判定した. 相関は Spearman の順位相関で p < 0.05 を有意な相関とした. また, PC では 10 ng/ml 以上は 10 ng/ml として計算した.

成 績 (表 1)

1. AT III : Ag

AT III : Ag はス剤投与前は平均±標準偏差で 49±20 % (最低~最高; 19~81 %, 以下同様)と, 対照の 87±20 % (70~140 %) に比して有意に低値 (p < 0.0001) であった. そして, 8 週目には 90±21 % (67~145 %) と正常範囲となった.

2. HC II : Ag

HC II : Ag はス剤投与前は 70±30 % (35~116 %) と, 正常対照の 94±24 % (91~98 %) と有意差はなかった. ス剤投与後 8 週目は 81±28 % (46~133 %) で, 対照ともス剤投与前とも有意な差はなかった.

3. PC : Ag

PC : Ag はス剤投与前は 5.5±1.6 ng/ml (2.8~≥10.0 ng/ml) と, 正常対照の 3.4±0.9 ng/ml (1.5~4.3 ng/ml) に比して有意に高値であった (p < 0.01). ス剤投与後 8 週目には 6.1±2.1 ng/ml (2.9~≥10.0 ng/ml) とまだ高値が続いたが, 長期に経過を追った 7 例では寛解期には 3.4±0.9 ng/ml (2.4~4.1 ng/ml) と正常域に復した.

4. PS 量

total PS : Ag は, ス剤投与前は 116±15 % (95~142 %) と, 正常対照の 75±14 % (52~140 %) に比して有意に高値であった (p < 0.01). ス剤投与後 8 週目は 90±21 % (62~130 %) で, 対照と有意差はなかった. PS : Act はス剤投与前は 76±32 % (10~120 %) と, 正常対照の 80±14 % (60~104 %) と有意差はなかった. ス剤投与後 8 週目は 90±17 % (66~120 %) で, 正常対照ともス剤投与前とも有意な差はなかった. C4bp : Ag はス剤投与前は 150±38 % (98~210 %) と, 正常対照の 62±13 % (50~87 %) に比して有意に高値であった (p < 0.0001). ス剤投与後 8 週目には 101±29 ng/ml (61~143 %) と, まだ高値が続いた. そこで, total PS : Ag, PS : Act および C4bp : Ag との関連を検討するため total PS : Ag が PS 活性を有する free PS 抗原量と結合した PS 抗原量からなるものと仮定したところ, ス剤投与前の total PS : Ag / PS : Act と C4bp : Ag / PS : Act の間にはよい相関関係があった (ρ = 0.915, 図 1).

Table 1. Changes in plasma levels of anticoagulants in patients with minimal change nephrotic syndrome

Variable	At onset		vs Control p	8 weeks after				Control	
	M±SD	n		M±SD	n	vs		M±SD	n
			At onset p			Control p			
AT III : Ag ( % )	49±20	21	<0.0001***	90±21	21	<0.0001***	0.0744	87±20	13
HC II : Ag ( % )	70±30	10	0.0899	81±28	10	0.4221	0.3117	94±24	8
PC : Ag (ng/ml)	5.5±1.6	22	0.0005**	6.1±2.1	17	0.2806	0.0007**	3.4±0.9	10
Total PS : Ag ( % )	116±15	11	0.0027**	90±21	10	0.0033**	0.2833	75±14	6
PS : Act ( % )	76±32	11	0.7646	90±17	10	0.4371	0.7903	80±14	7
C4bp : Ag ( % )	150±38	11	<0.0001***	101±29	10	0.0042**	0.0011**	62±13	10

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.0001

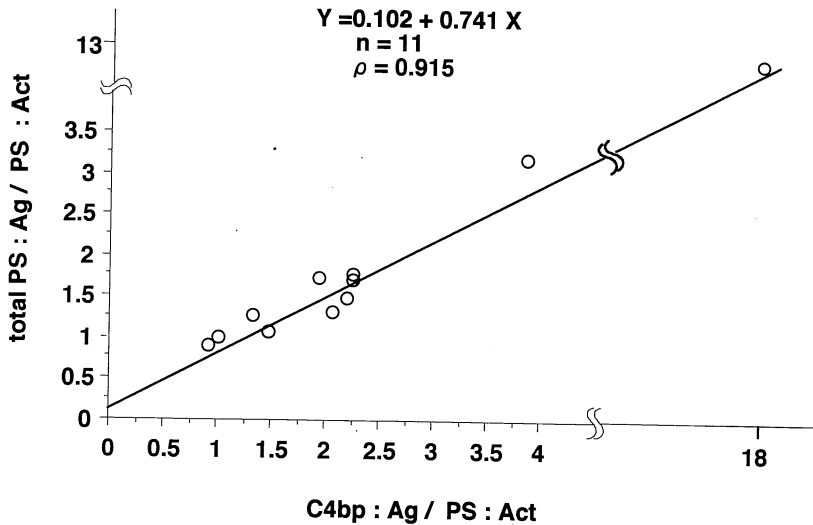


Fig. 1. Correlation between total protein S antigen (total PS : Ag)/PS activity (PS : Act) and C4b binding protein (C4bp : Ag)/PS : Act in patients with minimal change nephrotic syndrome at onset time.

## 考 察

MCNSの増悪期における抗血栓因子の変動として、AT IIIは有意に低下し、HC IIはさほど低下せず、PCは有意に高値をとりその後も持続した。また、PCの補因子であるPSに関してはtotal PS : Agは高値をとるが、PS : Actは変化せず、流血中でPSと結合しているC4bpが高値をとることが判明した。これらの結果はほぼ諸家の報告に一致した<sup>3,4,5,6,7)</sup>。これらの変化のうちAT III, HC II, total PS : Ag, C4bp : Agはス剤による治療開始後、病勢の改善と共に8週目には正常値に復した。しかしPCはス剤治療開始後8週目にも高値を示した。PCはその後、寛解期(ス剤治療開始後4か月～3年6か月で、ス剤を維持量投薬中であった。)に採血し得た7例ではようやく正常値に復していた。AT IIIの低値はTATの生成のごとくthrombin生成による消費の他、谷口の報告<sup>3)</sup>にあるようにその多くは尿中への漏出による低下と考えているが、HC IIはAT IIIに比しさほど低下していなかった。このことは、血管内で生成されたthrombinが流血中ではより多く存在するAT IIIで不活化を受けるものと考えられる。一方HC IIは、本来血管内皮が高度に障害を受け露出されたdermatan sulfateの存在下にトロンビンと複合体を形成してトロンビンを不活化するが<sup>8)</sup>、MCNSでは血管障害が少ないことから低下しな

いものと考えられた。しかし、尿中への排泄がAT IIIに比し少ない可能性も否定できない<sup>4)</sup>。一方、PCはAT IIIとほぼ同じ分子量であるが、谷口<sup>3)</sup>の報告にあるようにAT IIIが尿中漏出により低下するのに対し、PCが高値を示したことは治療に使用したス剤の大量投与による肝臓での合成亢進によるものか、腎での排泄障害によるかは今後さらに検討を要する。いずれにせよPCの高値は生体内では、第1報で報告したごとくMCNSの増悪期に高値を示すF V a, F VIII aを特異的に抑制することで抗血栓性に働いているものと想定される。我々の成績と同様、MCNSに対しPCの変化を観察したUedaら<sup>2)</sup>もス剤治療中の持続的PCの高値を報告している。

PSでは、total PS : Agは高値であったがPS : Actは正常範囲内であった。一方、C4bp : Agは高値であったことからC4bpの増加により相対的にPS : Actの低下を示していることが想定された。また、total PS : Ag / PS : ActとC4bp / PS : Actの間に以下のような良い相関があった。

$$\begin{aligned} \text{total PS : Ag / PS : Act} \\ = 0.741 \times (\text{C4bp : Ag / PS : Act}) + 0.102 \end{aligned}$$

すなわち、 $\text{total PS : Ag} = 0.741 \times \text{C4bp : Ag} + 0.102 \times \text{PS : Act}$ の式が成り立ち、C4bp抗原量がC4bp binding PS抗原量と比例し、PS : Actがfree PS抗原量と比例すると

仮定すると, MCNS急性期においてPSとC4bpが大きく変動する症例においても従来からいわれている

$$\text{total PS} = \text{C4bp} + \text{bining PS} + \text{free PS}$$

という関係が成り立つ。

したがって, 先天性あるいは後天性のPS欠乏症(free PSの低下例)にMCNSが合併すると, C4bpの産生亢進による二次的PS:Actの著明な低下状態をきたしうることが示唆される。

今回検討した症例では血栓症発症例はなく, MCNSの凝固, 線溶系が微妙ながらほぼ良好なhemostasisの状態にあるものを観察したものと考えられる。第1報では, 諸家の報告のごとく, MCNSの血液凝固・線溶動態でhypercoagulabilityが観察されたが, 実際には小児MCNSでは血栓症の合併は多くはなく<sup>10,11)</sup>, むしろ, 他の何らかの誘因によりこのバランスがくずれ, thrombinを処理しきれなくなると血栓を生じると考えられる。臨床的にはAT IIIの補充など血栓症の予防が講じられているが, AT IIIの補充後にも血栓症を発症したとの報告例<sup>12)</sup>もある。したがって, MCNSの血栓予防には, 他の抗血栓因子や線溶因子とのバランスをも考慮するとともに今後血管障害といった観点からの検討も必要であろう。

謝辞 稿を終るにあたり, 御校閲, 御助言を賜りました本学第一内科学土肥和紘教授並びに泌尿器科学平尾佳彦教授に深く感謝いたします。また本研究の遂行にあたり終始御助力をいただきました小児科学教室の諸兄姉に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 山中文雄, 中野光郎: ネフローゼ症候群. 新小児医学体系第12巻B小児泌尿器病学II(小林 登, 多田啓也, 藪内百治編). 中山書店, 東京, p111-p138, 1987.
- 2) Laurell, C. B.: Quantitative estimation of proteins containing antibodies. Anal. Biochem. **15**: 45-52, 1966.
- 3) 谷口 明: 小児各種腎疾患におけるアンチトロンビンIIIの動態に関する研究. 第1報: 血中および尿中アンチトロンビンIIIの動態について. 奈医誌. **31**: 418-427, 1980.
- 4) Sie, P., Meguira, B., Bouissou, F., Boneu, B. and Barthe, Ph.: Plasma levels of heparin cofactor II in nephrotic syndrome of children. Nephron **48**: 175-176, 1988.
- 5) De Mattia, D. Penza, R., Giordano, P., Bitonto, G., Altomare, M., Del Vecchio, G. C. and Schettini, F.: Thromboembolic risk in children with nephrotic syndrome. Haemostasis **21**: 300-304, 1991.
- 6) 新名主宏一, 岡留敏秀, 丸山征郎, 納 光弘: ネフローゼ症候群における凝固抑制因子の動態. 血栓止血誌. **1**: 48-56, 1991.
- 7) Alain K.: Coagulation factors in nephrotic syndrome. Am. J. Nephrol. **10** (suppl 1): 63-68, 1990.
- 8) 橋本和子, 高橋幸博, 森井直之, 吉岡 章: 川崎病におけるヘパリン・コファクターIIの動態—冠動脈病変との関連性—. 日児誌. **100**: 61-66, 1996.
- 9) Ueda, N.: Effect of corticosteroids on some hemostatic parameters in children with minimal change nephrotic syndrome. Nephron **56**: 374-378, 1990.
- 10) Andrassy, K., Ritz, E. and Bommer, J.: Hypercoagulability in the nephrotic syndrome. Klin. Wochenschr. **58**: 1026-1036, 1980.
- 11) Llach, F.: Hypercoagulability, renal vein thrombosis and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. Kidney Int. **28**: 429-439, 1985.
- 12) 竹下佐知, 西村美保, 池田整昭, 東陽一郎, 緒方博子, 満留明久: 血中アンチトロンビンIII, プロテインCの低下を認め, 脳梗塞を併発した先天性ネフローゼ症候群の1例. 日児誌. **93**: 288-291, 1989.