

## 新しい線溶系賦活試験の開発と基礎的知見

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 辻, 和夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8569">http://hdl.handle.net/2297/8569</a>

## 新しい線溶系賦活試験の開発と基礎的知見

金沢大学医学部公衆衛生学講座 (主任代理: 中村裕之助教授)

辻 和 夫

動脈硬化症と線溶-凝固系との関係は以前より研究されており、線溶系の賦活化試験としては静脈閉塞試験 (venous occlusion test, VOT) が広く行われている。しかし、この VOT にはヘマトクリット (hematocrit, Ht) が上昇するという大きな欠点がある。そこで、新しい線溶系の賦活化試験として、振動負荷前後でフィブリンプレート法により線溶能を評価した。その賦活化試験では、動脈硬化性疾患や冠動脈疾患が否定された50人の健常群と心筋梗塞または脳梗塞で入院した50人の動脈硬化群の2群を対象に、周波数 120Hz、加速度 50m/sec<sup>2</sup>、国際標準化機構の x 方向の正弦波振動をハンドルに把持させた手に5分間、暴露させ、振動負荷前後のフィブリンプレート輪 (fibrin plate ring, FPR) を測定した。その結果、FPR の再現性を調べる実験では、FPR における変動係数は 0.74% とユーグロブリン溶解時間の 3.89% に比べ、極めて再現性が良いことが認められた。また振動負荷試験では VOT と異なり Ht の上昇はなく、酸素分圧はかえって上昇した。健常群では、振動負荷により線溶能は有意に亢進し、この程度は50歳前後で比較すると50歳を越える者で変化量が有意に大きいことが認められた。同時に50歳を越える健常群では振動負荷試験による血液粘度の上昇とともにフィブリノーゲンの活性の亢進も認められた。したがって高齢者で健常な人は線溶-凝固系のバランスがよく保たれていると考えられた。これに対し動脈硬化群では振動負荷による線溶能の変化はなく、年齢による差もみられなかった。以上の結果から、振動負荷試験によって得られる血中 FRP の負荷前後値を評価することにより動脈硬化症を定量的に評価できることが示され、さらに年齢別にみた FPR の反応により、動脈硬化症の発展には外部刺激によって亢進すべき線溶能が反応しない状態、すなわち線溶能の破綻という機序が想定された。

**Key words** aging, arteriosclerosis, euglobulin, fibrinolysis, fibrin plate ring, vibration

近年、脳卒中とくに脳出血の減少により、脳血管疾患の死亡率は、悪性新生物、心疾患につづく死亡原因の第3位になった<sup>1)</sup>。しかし、昨今の死亡構造の変化で注目されてきたのは、脳梗塞の減少をはるかに上回る心筋梗塞の著しい増加が見られることであり、血管障害はかならずしも減少しておらず、むしろ高齢化社会が進行するわが国において、動脈硬化性疾患の重要性はかえって増加していると考えられる。動脈硬化症の成因として、耐糖能や脂質代謝の異常などに加えて、凝固線溶系との関係についても注目されてきている。凝固線溶系については、閉塞性静脈炎などの閉塞性静脈疾患で凝固能の亢進状態のあることがよく報告されるようになった<sup>2)</sup>のみならず、心筋梗塞において発症後約10日間にわたって線溶能の低下しているという報告<sup>3)</sup>にあるように、動脈硬化性閉塞性疾患においても、凝固線溶系における均衡の破綻が指摘されるようになった。

動脈硬化と凝固線溶系との関係については、凝固系の関与以上に線溶系を重視する考えがあり、Buckell ら<sup>4)</sup>の初期の報告では健常者に比して高齢者において低下しているとされたが、後の研究ではむしろ高齢者で線溶能が亢進してくるという研究結果が多い<sup>5)</sup>。線溶能はアドレナリン<sup>6)</sup>、手術、外傷<sup>7)</sup>、不安<sup>8)</sup>など種々の刺激により亢進することが知られている。かつて、Clarke ら<sup>9)</sup>は静脈の駆血により線溶能が亢進することを報告

し、静脈閉塞試験 (venous occlusion test, VOT) と名付けた。さらに、VOT を用いて高齢者や動脈硬化症では、VOT による線溶系の賦活化の障害を報告した Robertson ら<sup>10)</sup>や、VOT に対する反応性の低下と動脈硬化との関連を指摘した Shaper ら<sup>11)</sup>により、この検査法は動脈硬化を線溶系の面から定量的に評価する検査法と考えられている<sup>10)11)</sup>。しかし、線溶系を予備能も含めて評価が可能な VOT であるが、VOT には Holemans<sup>12)</sup>が指摘するようにヘマトクリット (hematocrit, Ht) が上昇するという欠点を有する。

振動刺激は、種々の末梢循環動態に対する負荷試験として有用であるとされてきており、しかも Ht の上昇を引き起こさないといわれているので、本研究では、VOT にかわる線溶系を賦活する方法として、振動刺激に着目し、振動負荷による線溶系の応答を明らかにすることを試み、新しい検査法としての可能性について検討した。

## 対象および方法

## I. 対 象

動脈硬化性疾患の既往を有さない健常人および胸痛を主訴として来院したが、冠動脈造影で心血管障害が否定された50人を健常群、心筋梗塞または脳梗塞で入院し、発症後1ヶ月以内の

平成6年6月16日受付, 平成6年7月14日受理

Abbreviations:  $\alpha_2$  PI,  $\alpha_2$  plasmin inhibitor; ATIII, antithrombin III; BV, blood viscosity; CV, coefficient of variance; ELT, euglobulin lysis time; FPF, fibrin plate ring; FRG, fibrinogen; Ht, hematocrit; PLG, plasminogen; SO<sub>2</sub>, saturated O<sub>2</sub>; tPA, tissue plasminogen activator; VOT, venous occlusion test

50人からなる動脈硬化群を対象として研究した。健常群、動脈硬化群の年齢分布および平均値土標準誤差はそれぞれ21歳~81歳で  $58.0 \pm 2.73$  歳と41歳~83歳で  $59.5 \pm 1.45$  歳であり、両群間には有意な差はなかった。全症例で肝機能障害を認めず、動脈硬化群では発症より本試験までの間にウロキナーゼ、アスピリン、チクロピジン等の線溶凝固系に影響を与える薬剤の投与は行っていないことを確認した。すべての対象者には、本研究の実験趣旨を説明し、合意を得ている。

## II. 方 法

すべての研究段階において、後述する振動負荷を行い、その前後において線溶能を調べた。

### 1. 振動負荷方法

振動負荷装置は、動電型振動試験機 EMIC 513-A (新日本測器, 東京), 増幅器 TA-100 (立川電子, 東京), オシレーター NF-MODEL E1011 (エヌエフ回路設計ブロック, 横浜), 振動計 EMIC 505-D (新日本測器) を組合わせて構成されている。加振機の振動板上に直径 40mm の円柱ハンドルを有するアクリル製の手部加振装置を試作して固定し、これに振動レベル測定用の加速度ピックアップ EMIC 541-A (新日本測器) を取り付け、振動計 EMIC 505-D (新日本測器) により加振中のハンドルの振動レベルを監視した。

被験者100人は、 $23 \pm 1$ °C の部屋で30分以上安静にさせ、また試験前1時間は禁煙させた。実験に際しては、坐位で右腕(あるいは左腕)を右下前方(あるいは左下前方)にのばしてハンドルを軽く握らせ、振動を負荷した。ハンドルにはストレインゲージをはりつけし、ひずみ増幅器 San-ei 5L30 (三栄測器, 東京) に表示し、負荷中の把持力を 5kg とはば一定になるよう配慮した。負荷した振動は、周波数 120Hz, 加速度  $50 \text{ m/sec}^2$  の正弦波振動でその方向は、国際標準化機構<sup>19)</sup>の x 方向とし、負荷時間は5分間とした。なお、脳梗塞患者では、健常側に負荷を加えた。

### 2. 線溶能の測定

健常群、動脈硬化群に対して振動負荷前後、すなわちハンドルを把持する直前、および振動負荷直後の把持のままの状態、負荷側の正中静脈より、駆血帯を用いず採血し、EDTA-2Na 加試験管とクエン酸ナトリウムを含む採血管に分注した。前者からは毛細血管法により Ht と、後者からは直ちに 3,000rpm, 20分間、遠心し、血清分離した後、ユーグロブリン分画でのフィブリンプレート輪 (fibrin plate ring, FPR), ユーグロブリン溶解時間 (euglobulin lysis time, ELT),  $\alpha_2$  プラスミンインヒビター ( $\alpha_2$  plasmin inhibitor,  $\alpha_2$  PI), アンチトロンビン III (antithrombin, ATIII), プラスミノゲン (plasminogen, PLG), フィブリノーゲン (fibrinogen, FRG) の測定を行った。なお、一部の被験者においては、全血を用いて円錐-平板回転法により全血血液粘度 (blood viscosity, BV) を測定した。また、一部の被験者においては経皮酸素分圧測定装置ライフスパン 100tcPo<sub>2</sub> (バイオケム, 東京) を用いて酸素分圧 (saturated O<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>) を測定した。

#### 1) ユーグロブリン分画の抽出

0.5ml の血漿に蒸留水 9.5ml を加え、1% 酢酸で pH5.7 に調整した。2,000rpm, 5分間遠心し、上清を捨て、遠心管に付着している水分を濾紙で拭き取り、沈さに pH7.35 に調整した Owren-Veronal の HCl-NaCl 緩衝液 0.5ml を加えて溶解し以下の測定に使用した。

#### 2) FPR の測定

プラスミノゲン, 第 X III 因子を除去したフィブリンを含むアガロース平板「北研」(第一化学, 東京) に直径 3mm の穴をゲルパンチャーであけ、上記の方法で得たユーグロブリン分画抽出液 5 $\mu$ l をマルチチャンネル・ピペット (Eppendorf, Hamburg, Germany) で注入し、24時間、37°C のインキュベーターに放置し、マイクロビューア (PEAK, 東京) を用いて溶解窓の直径を測定した。各検体については2個ずつ測定し平均を測定値とした。

#### 3) ユーグロブリン溶解時間の測定

トロンビン (持田製薬, 東京) を生理食塩水で希釈し10単位/ml のトロンビン液を調整し、0.1ml のトロンビン液にユーグロブリン分画抽出液 0.5ml を加え、37°C のインキュベーターで凝固させ、フィブリンクロットライシスタイムレコーダー (利康商事, 東京) を用いて溶解時間を測定した。この場合も2検体の平均値を測定値とした。

#### 4) $\alpha_2$ PI, ATIII, PLG の測定<sup>20)</sup>

これらの測定は、比色法により行い基質及び発色試薬はカラテスト TR (三共, 東京) をもちいた。ATIII では、血漿 20 $\mu$ l にヒドロメキニメチルアミノメタン 50mM の希釈用緩衝液を 2ml 加え混和し希釈検体とした。この検体を 0.1ml 取り、これに 0.147 単位/ml のウシトロンビン液を 0.2ml 加え 37°C で5分間混和し、ATIII 用基質 (ps-915 5.27mg/ml) を 0.1ml を加え、さらに5分間混和し、発色試薬 (チモール 15mM + メタ過ヨウ素酸ナトリウム 3mM) 2ml を加え、10分後に 635nm にて吸光度の測定を行った。吸光度より標準曲線と比較し ATIII の値を百分率 (%) で得た。 $\alpha_2$  PI では、希釈検体 0.4ml に 0.098 単位/ml のヒトプラスミンを 0.2ml 加え5分間混和し、 $\alpha_2$  PI 用基質 (ps-994 7.83mg/ml) を 0.1ml を加え、さらに5分間混和し、発色試薬 (チモール 15mM + メタ過ヨウ素酸ナトリ

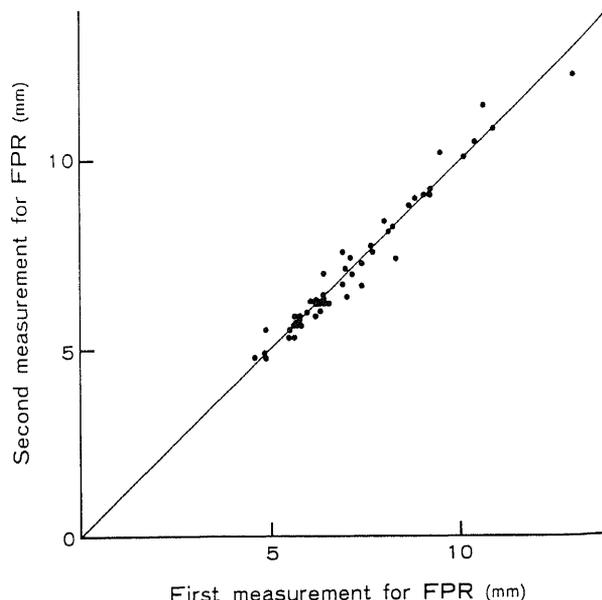


Fig. 1. Relationship between the two measurements for fibrin plate ring (FPR) in the 50 healthy subjects. The horizontal and longitudinal axes represent the first and second measurement for FPR, respectively. Intravariance calculated by the coefficient of variance is 0.74%.

ウム 12.5mM) 2ml を加え, 10分後に 635nm にて吸光度の測定を行った. 吸光度より標準曲線と比較し  $\alpha_2$ PI の値を百分率で得た. PLG では, 希釈検体 0.4ml に 0.5 単位/ml のストレプトキナーゼ (三共, 東京) を 0.2ml を加え, 5 分間混和し, 発色試薬 (チモール 15mM + メタ過ヨウ素酸ナトリウム 3mM) 2ml を加え 10分後に 635nm にて吸光度の測定を行った. 吸光度より PLG の値を百分率で得た. なお, 吸光度の測定には, 吸光度測定器 200-20 (日立, 東京) を用いた.

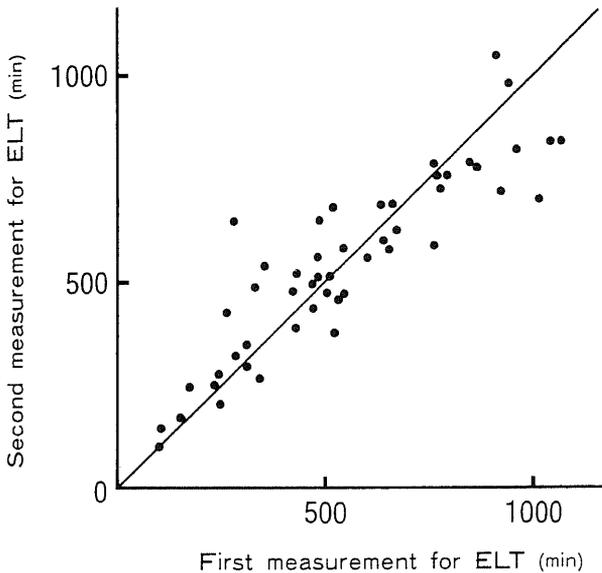


Fig. 2. Relationship between the two measurements for euglobulin lysis time (ELT) in the 50 healthy subjects. The horizontal and longitudinal axes represent the first and second measurement for ELT, respectively. Intravariance calculated by the coefficient of variance is 3.89%.

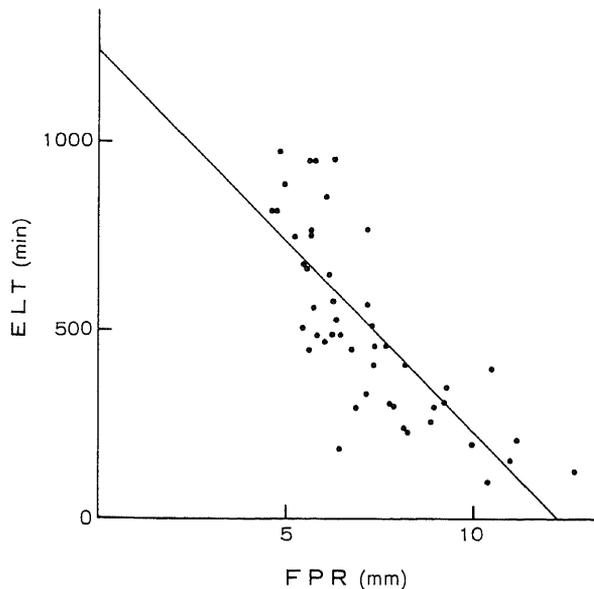


Fig. 3. Relationship between fibrin plate ring (FPR) and euglobulin lysis time (ELT) in the 50 healthy subjects. The regression equation is  $Y = -102X + 1236$ , where Y and X are ELT and FPR, respectively. The Pearson's correlation coefficient is  $-0.771$  ( $p < 0.01$ ).

5) FRG の測定

トロンビン時間法により測定し国際試薬製のキットを使用した. 血漿を 0.5ml を pH7.35 に調整した Owren-Veronal の HCl-NaCl 緩衝液で 10 倍に希釈し, 0.1ml を小試験管にいれ, 37°C で 3 分間放置して, 100 単位/ml のトロンビン液 0.1ml を加えフィブリン形成までの時間を測定した. これを標準液で得た両対数検量線よりフィブリン濃度を求めた.

III. 統計処理

諸検査値の評価には, 平均値 ± 標準誤差で表し, 振動負荷前後の平均値の比較は, 対応のある t 検定を用い, また健常群と動脈硬化群, あるいは 50 歳以下と 50 歳をこえる群の比較には, 分散が等しい場合には Student の t 検定, 等しくないときには Welch の t 検定を用いた. 相関分析には Pearson の相関係数を用いた. すべての統計処理では, 有意水準は危険率 5% (両側検定) で有意差ありとした.

成 績

I. 健常群での観察

1. FPR および ELT の再現性の検討

図 1 および図 2 は, それぞれ FPR と ELT の測定における再現性をみたものである. すなわち, 50 人の対象者に対して FPR (図 1) および ELT (図 2) を 2 度測定し, 第 1 回目および第 2 回目の値をそれぞれ横軸, 縦軸にプロットした. FPR における変動係数 (coefficient of variance, CV) は 0.74% と極めて再現性が良いのに対して, ELT の CV は 3.89% とややばらつくことが認められた. また, 図 3 に示すように FPR と ELT とは負の有意な相関関係が認められた.

2. 振動負荷試験に対する FPR の反応

図 4 では振動負荷試験に対する FPR の反応を年齢別に示した. 対象者全体でみた場合, 振動負荷後値が前値に対して有意に高値を示した. また 50 歳以下の 21 人の FPR の前値,  $7.22 \pm 0.35$ mm は, 後値の  $7.60 \pm 0.48$ mm に対し, 10% の危険

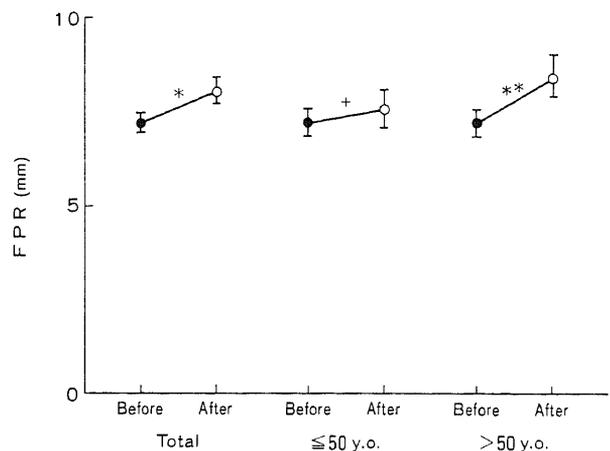


Fig. 4. Changes of fibrin plate ring (FPR) induced by the vibration exposure test according to the age classification of over and below 50 years old (y.o.) in the 50 healthy subjects. \* $p < 0.1$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  when compared with the respective value before tests. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. ●, before the test; ○, after the test.

率で増加する傾向にとどまったのに対し、50歳を越える29人の前値、 $7.20 \pm 0.35 \text{mm}$  に比べ、後値の  $8.47 \pm 0.56 \text{mm}$  は有意に増加していた。また、前値に対する後値の変化量を50歳前後で比較すると、50歳以下の  $0.38 \pm 0.19 \text{mm}$  であるのに対し、50歳を越える人の FPR の  $1.26 \pm 0.33 \text{mm}$  は、有意に高い値であった ( $p < 0.001$ ) (図4)。

### 3. 振動負荷試験に対する FPR 以外の項目の反応

健常群45人について振動暴露による賦活試験による Ht を観察した結果、表1に示すように負荷前後の平均値はそれぞれ、40.9%、41.0% となり、試験の前後での有意な変化を認めなかった。ELT では後値が前値に比べ、有意に短い時間を呈した。 $\alpha_2 \text{PI}$ 、ATⅢ、PLG においては、有意な変化は認められなかった。6人と少ない健常人での検討であったが、BV は後値が前

値に比べ、有意の増加を認めた。SO<sub>2</sub> は検討した6例全例で負荷後に上昇し、後値の上昇は有意であった(表1)。

### 4. FPR と他の検査項目との相関

健常群の負荷前値の検討で、 $\alpha_2 \text{PI}$ 、ATⅢ、PLG、BV、Ht と FPR の相関のうち、有意な相関が認められた項目はなかった。負荷後値と前値との差をみると、PLG において有意な正の相関が認められた(表2)。

### 5. 年齢による FPR 以外の検査項目の変化

FPR 以外の他の検査項目については表3に示したが、振動負荷により、50歳を越える人の ELT において有意な減少が、FRG においては有意な増加が観察された(表3)。FRG の負荷前後の差は、50歳を越える人において50歳以下のそれより有意に高いことが認められた。

Table 1. Changes of fibrinolytic-coagulative parameters by vibration test in the healthy subjects

Time examined	Values (mean±SEM) of						
	Ht (%) (45) <sup>a</sup>	ELT (min) (50)	$\alpha_2 \text{PI}$ (%) (28)	ATⅢ (%) (28)	PLG (%) (28)	BV (cp) (6)	SO <sub>2</sub> (%) (6)
Before the test	40.9±0.5	515±34	94.0±2.0	101.2±2.7	86.7±2.3	4.28±0.09	26.7±1.5
After the test	41.0±0.5	456±35*	93.7±2.4	98.2±2.8	86.3±2.4	4.37±0.09*	47.9±4.2***

Ht, hematocrit; ELT, euglobulin lysis time;  $\alpha_2 \text{PI}$ ,  $\alpha_2$ plasmin inhibitor; ATⅢ, antithrombin Ⅲ; PLG, plasminogen; BV, blood viscosity; SO<sub>2</sub>, saturated O<sub>2</sub>.

<sup>a</sup> Number of subjects examined.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  against the value before the test.

Table 2. Correlation coefficient of fibrin plate ring (FPR) to values before the test and the difference between before and after test in the healthy subjects

Parameter	Number of subjects examined	Correlation coefficient of FPR to	
		Value before the test	Difference between before and after the test
Ht	45	0.182	-0.174
$\alpha_2 \text{PI}$	28	0.109	-0.184
ATⅢ	28	0.087	0.053
PLG	28	0.030	0.437*
BV	6	0.211	0.635

Ht, hematocrit;  $\alpha_2 \text{PI}$ ,  $\alpha_2$ plasmin inhibitor; ATⅢ, antithrombin Ⅲ; PLG, plasminogen; BV, blood viscosity.

\*  $p < 0.05$ .

Table 3. Changes of fibrinolytic-coagulative parameters by vibration test according to age classification over and below 50 years old in the healthy subjects

Age (years)	Time examined	Values (mean±SEM) of				
		ELT (min) (21, 29) <sup>a</sup>	$\alpha_2 \text{PI}$ (%) (12, 16)	ATⅢ (%) (12, 16)	PLG (%) (12, 16)	FRG (mg/dl) (12, 16)
≤50	Before the test	492.1±56.3	98.2±2.9	106.8±2.9	93.6±3.6	27.34±0.48
	After the test	487.9±51.5	96.2±3.3	104.4±2.2	90.2±1.6	27.52±0.50
>50	Before the test	528.6±43.8	93.2±2.4	100.2±3.2	85.5±2.5	27.02±0.31
	After the test	437.3±47.0***	93.3±2.8	97.1±3.2	85.6±2.8	27.88±0.42**

ELT, euglobulin lysis time;  $\alpha_2 \text{PI}$ ,  $\alpha_2$ plasmin inhibitor; ATⅢ, antithrombin Ⅲ; PLG, plasminogen; FRG, fibrinogen.

<sup>a</sup> Number of subjects examined with age over and below 50 years old.

\*\*\*  $p < 0.001$  against the value before the test.

II. 動脈硬化群における観察

1. 振動負荷試験に対する検査項目の反応

50人の動脈硬化群に対する検討では FPR において前値が 6.97±0.20mm から後値 7.05±0.22mm となり変化はなかった。ELT における前後値の比較においても有意な差は認められなかった(表4)。SO<sub>2</sub> については有意な上昇が認められたが、α<sub>2</sub>PI, ATⅢ, PLG, BV にも有意な変化はなかった。

2. 年齢による変化

50歳以下および50歳を越える人においても FPR の前後値に有意な変化はみられなかった。しかし、後値を50歳以下と越える人を比較すると、50歳以下が 6.44±0.27mm であるのに対し、50歳を越えるものでは、7.14±0.25mm と10%の危険率であるが、振動負荷によって増加する傾向がみられた。負荷前後の差では50歳以下が -0.10±0.07mm に対し、50歳を越えるものでは 0.11±0.15mm と有意差は認められなかった(図5)。

3. FPR とその他の検査との関係

FPR とその他の検査項目との関係を表5に示したが、有意な相関を示す項目はなかった。

4. 健常群との比較

1) 振動負荷前値における FPR の比較

健常群と動脈硬化群の振動負荷前値を、すべての年齢、50歳以下および50歳を越える人で比較したが、いずれにおいても有意の差は認められなかった(図6A)。

2) 振動負荷後値における FPR の比較

年齢全体の比較では、健常者の 8.09±0.37mm であるのに対し、動脈硬化群では 7.05±0.22mm で有意に動脈硬化群で低値を示した。50歳以下でもそれぞれ、7.60±0.4mm, 6.44±0.29mm であり、また50歳を越えても、8.47±0.54mm に対し 7.14±0.25mm であり、いずれも動脈硬化群で有意に低値で

あった(図6B)。

3) 前後の差の比較

年齢全体では健常群の前後差が 0.88±0.21mm であるのに対し、動脈硬化群では 0.08±0.14mm と動脈硬化群で有意に低く、50歳以下、50歳を越えるもののいずれにおいても、その関

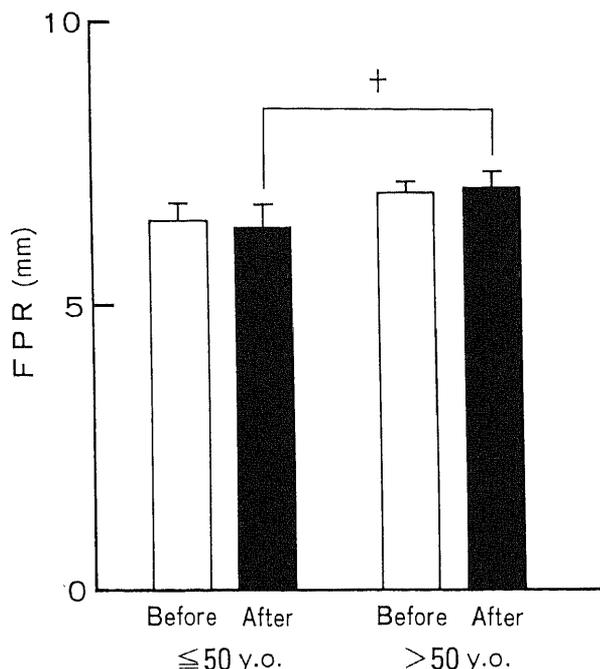


Fig. 5. Changes of fibrin plate ring (FPR) induced by the vibration exposure test according to the age classification of over and below 50 years old (y.o.) in the arteriosclerotic subjects. \*p<0.1. Results are expressed as mean±SEM. □, before the test; ■, after the test.

Table 4. Changes of fibrinolytic-coagulative parameters by vibration test in the 50 arteriosclerotic subjects

Time examined	Values (mean±SEM) of						
	FPR (mm) (50) <sup>a)</sup>	ELT (min) (50)	α <sub>2</sub> PI (%) (32)	ATⅢ (%) (32)	PLG (%) (32)	BV (cp) (32)	SO <sub>2</sub> (%) (6)
Before the test	6.97±0.20	503±31	88.9±2.7	88.2±2.8	79.3±3.2	4.35±0.15	21.4±2.1
After the test	7.05±0.22	510±33	88.3±2.7	90.3±2.9	79.1±3.3	4.38±0.16	46.0±9.0***

FPR, fibrin plate ring; ELT, euglobulin lysis time; α<sub>2</sub>PI, α<sub>2</sub>plasmin inhibitor; ATⅢ, antithrombin Ⅲ; PLG, plasminogen; BV, blood viscosity; SO<sub>2</sub>, saturated O<sub>2</sub>.

<sup>a)</sup> Number of subjects examined.

\*\*\* p<0.001 against the value before the test.

Table 5. Correlation coefficient of fibrin plate ring (FPR) to values before the test and the difference between before and after the test in the arteriosclerotic subjects

Parameter	Number of subjects examined	Correlation coefficient of FPR to	
		Value before the test	Difference between before and after the test
Ht	48	-0.001	0.144
α <sub>2</sub> P I	32	0.001	0.131
ATⅢ	32	0.058	-0.021
PLG	32	0.128	-0.132
Viscosity	32	-0.033	0.006

Ht, hematocrit; α<sub>2</sub>P I, α<sub>2</sub>plasmin inhibitor; ATⅢ, antithrombin Ⅲ; PLG, plasminogen; BV, blood viscosity.

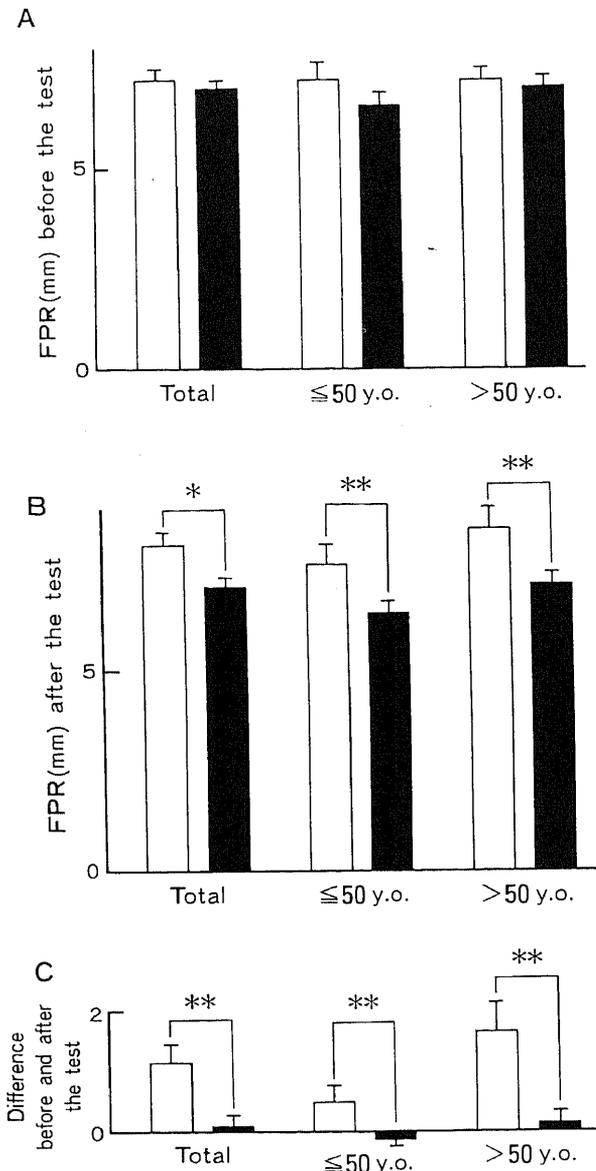


Fig. 6. Comparisons of fibrin plate ring (FPR) before (A) and after (B) the test, and the difference before and after the test (C) between the 50 healthy and 50 arteriosclerotic subjects according to the age classification of over and below 50 years old (y.o.). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  when compared between the two groups. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. □, healthy subjects; ■, arteriosclerotic subjects.

係は同様であった (図 6 C)。

### 考 察

動脈硬化を非侵襲的に動脈の弾性より評価する試みとして脈波伝播速度の測定<sup>21)</sup>、超音波エコーによる血管のコンプライアンスの測定など<sup>22)</sup>が行われてきた。しかし、これらの方法では測定結果が心機能に影響されやすく、心拍量や心収縮力の低下している場合にはその評価が困難となる。とくに動脈硬化の定量的評価を必要とする高齢者においては、心機能が低下している場合が多々あり、この場合、動脈硬化を弾性によって評価すれば、みかけ上の動脈硬化も多く出現することになる。また

昨今、動脈硬化に対する血液生化学的なスクリーニングの指標として広く用いられている高比重リポ蛋白コレステロールと低比重リポ蛋白コレステロールの比で表される動脈硬化指数は動脈硬化を定量的に評価するものではなく、むしろ脂質代謝を中心とした動脈硬化の危険因子を定量的に評価しようとするものである。

動脈硬化と凝固線溶系との関係に関心が持たれるようになり、動脈硬化群において凝固能の亢進が多くの研究者<sup>23)</sup>により指摘された。しかし健康診査での随意的な1回のみ検査によれば、動脈硬化を高感度に検出するには不十分であるために、負荷試験を施行するようになった。線溶系に対する負荷試験として広く用いられている VOT は、駆血帯で一定時間加圧し、うっ血状態を作るため、Ht の上昇をきたし、FPR の測定値を大きく増加させる<sup>18)</sup>。さらに研究者間で駆血帯に加える圧を一定にしていないこと<sup>23)~26)</sup>から、Ht や線溶系に対する諸影響を考慮に入れる必要があり解釈が難しい。本研究で提唱する振動負荷試験では、Ht の上昇が認められず、線溶系における諸検査結果を比較的単純に評価することが可能と考えられる。さらに VOT による人工的低酸素血症は、線溶能への影響を与えること<sup>27)</sup>に対し、本振動負荷試験では酸素分圧の上昇を認めた。特定の振動数では末梢循環動態を改善することが知られており<sup>28)</sup>、低酸素血症の影響を受けない本報の利点があることが示された。そこで本研究では、振動負荷試験による FPR の変化を線溶能の指標にし、他の検査項目と比較検討した。線溶能の評価として最近、組織プラスミノゲンアクチベーター (tissue plasminogen activator, tPA) の測定が可能になったが、tPA は 1 型 tPA インヒビターにより PLG に対する作用が遮断される以外に、フィブリンの存在下では極めて大きく賦活化され<sup>29)</sup>、フィブリンの値に大きく左右されるために tPA を用いて線溶能を全体として正しく評価できない。さらに、プラスミノゲンアクチベーターには、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターが存在するために線溶能を全体としてとらえるためには、従来から存在する FPR、または ELT を調べる必要がある。本研究で FPR および ELT の再現性を検討した結果、ELT に比べ、FPR の再現性が極めて良好であることが認められたことから、FPR を指標にする検査法がすぐれていることが確認された。

健康群および動脈硬化群の負荷前値である安静時における FPR では、両群間に差は観察されなかった。また、健康群での年齢による差は認められなかった。ところで、線溶能との年齢あるいは動脈硬化との関係は、健康者においては安静時には線溶能は加齢に伴って亢進し、これに対し動脈硬化症の患者では、低下する報告もある<sup>30)</sup>。ただし、賦活化を試みていないこれらの研究は、健康人と患者を明確に区別できる方法を提供しなかったのに対し、本研究の結果は、振動負荷を加えることにより線溶能が賦活化され、患者群と健康群を極めてよく判別し、個々の症例においても本振動負荷試験によって評価が可能なものとなった。さらに凝固・線溶系と言われるように、両者は表裏一体となっている関係があり、賦活を行わない線溶系の検査では評価法としては不十分であると考えられる。

本研究で明らかにされた振動負荷による線溶能の動態は非常に注目される。すなわち、健康群では50歳を越える人で振動負荷による有意な上昇が観察され、さらにその上昇の程度も50歳以下のそれに比べて有意であった。一方、動脈硬化群では振動

負荷による有意な上昇が認められなかった。血管内では動脈硬化などにより血管内皮に損傷が加わったところに血栓が形成されやすいことは衆知の事実である<sup>31)~33)</sup>。このことから、血管内皮の性状の変化は、血栓の形成につながり、線溶系の賦活が生じることが考えられる。健常群では振動負荷を加えることにより血管内皮と血液との反応性が高まり、特に、高齢者の健常人では血管内皮に加齢による変化があるために、微小血栓の形成が促進され、この結果、線溶能が亢進してきたと推測される。しかも同時に、高齢者では振動負荷試験による BV の上昇の大きな要因である FRG の活性の亢進も生じた。この結果が示すように、線溶能の亢進に続いて凝固能における亢進も認められたことから、高齢者で健常な人は線溶-凝固系のバランスがよく保たれていることが推察される。このように振動負荷に対する線溶-凝固能、特に線溶能の亢進が振動負荷による 1 次的な応答であることを考えれば、線溶能の動態をみることにより血管内皮の状態についての評価が可能となると考えられる。

一方、動脈硬化群では振動負荷に対する線溶能の反応性は低下していたという本結果から、動脈硬化と線溶能との間に密接な関係があることが示唆される。特に線溶能の反応がほとんどないことから、動脈硬化群では、振動負荷に対して、線溶-凝固系のバランスが破綻し、凝固優位となっている状態の存在が想定される。こうした動脈硬化患者における凝固能の亢進は、多くの研究<sup>34)</sup>によって報告されている。また線溶系で大きな役割を果たしているのは tPA であるとされており、その tPA の作用として PLG をプラスミンに変換させ、血管内に形成された血栓を選択的に溶解させると考えられている<sup>29)</sup>。線溶系の障害に関しては、血管内皮の tPA が枯渇しているか、tPA の放出が障害されているかのいずれかであるが、組織学的な検討では動脈硬化のある血管ではむしろ tPA が多く存在し、放出障害があるという<sup>35)</sup>。したがって、潜在的な動脈硬化を有する高齢者においては、組織内の tPA が増加しているため振動負荷に対して大きく反応し、さらに動脈硬化が進行した患者では、tPA の放出による枯渇と放出障害が加わるために、振動負荷に対する反応性は逆に低下すると考えられる。事実、本結果では負荷後値と前値との PLG の差と FPR との正の関係が健常群においてのみ認められており、線溶系での PLG の役割<sup>36)</sup>を同時に考えれば、動脈硬化において tPA の問題が深く関与していることが想定される。

以上、振動負荷試験によって得られる血中 FPR の負荷前後値を評価することにより動脈硬化症を定量的に評価できることを示し、さらに年齢別にみた FPR の反応により、動脈硬化症の発展には外部刺激によって亢進すべき線溶能が反応しない状態、すなわち線溶能の破綻という機序を想定した。本研究において対象としなかった血中パラメーターあるいは動脈硬化関連因子が本振動負荷試験に対していかなる応答を示すかを調べることによって、複雑な動脈硬化症の成立機序がさらに明らかになると考えられる。

## 結 論

新しい線溶系の賦活化試験として、振動負荷前後でフィブリンプレート法により線溶能を評価した。その賦活化試験では動脈硬化性疾患や冠動脈疾患が否定された 50 人の健常群と心筋梗塞または脳梗塞で入院した 50 人の動脈硬化群の 2 群を対象に、周波数 120Hz、加速度 50m/sec<sup>2</sup>、国際標準化機構の x 方向の

正弦波振動をハンドルに把持させた手に 5 分間、暴露させ、振動負荷前後の FPR を測定した。その結果は、以下の如くである。

1. FPR の再現性を調べる実験では、その再現性は ELT に比べて極めて良好であることが認められた。

2. 振動負荷試験では VOT と異なり Ht の上昇はなく、酸素分圧はかえって上昇した。

3. 健常群では、振動負荷により線溶能は有意に亢進し、この程度は 50 歳前後で比較すると 50 歳を越える者で変化量が有意に大きいことが認められた。同時に 50 歳を越える健常群では振動負荷試験による BV の上昇とともに FRG の活性の亢進も認められた。したがって高齢者で健常な人は線溶-凝固系のバランスがよく保たれていると考えられた。

4. 動脈硬化群では振動負荷による線溶能の変化はなく、年齢による差もみられなかった。

以上の結果から、振動負荷試験によって得られる血中 FRP の負荷前後値を評価することにより動脈硬化症を定量的に評価できることが示され、さらに年齢別にみた FPR の反応により、動脈硬化症の発展には外部刺激によって亢進すべき線溶能が反応しない状態、すなわち線溶能の破綻という機序が想定された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜りました恩師の岡田晃金沢大学長に衷心より深甚なる謝意を表します。また、御懇切な御校閲を賜りました金沢大学医学部第一生理学講座の永坂鉄夫教授に深謝いたします。また、終始御指導を賜りました中村裕之助教授をはじめ公衆衛生学講座の諸先生方に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 厚生統計協会：国民衛生の動向。厚生指標，624，37-80 (1993)。
- 2) Theiss, W., Kriessmann, A., Trubestein, G., Swart, C. A. M., Marbert, G. A. & Loo, J. C. W.: Systemic fibrinolytic activity and inhibitor levels during treatment of deep vein thrombosis with urokinase and streptokinase. *Thromb. Haemostasis*, 50, 664-668 (1983)。
- 3) Yamazaki, H., Takahashi, T. & Sano, T.: Hyperaggregability of platelets in thromboembolic disorders. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 34, 95-105 (1975)。
- 4) Chakrabarti, R., Hocking, E. D. & Fearnley, G. R.: Reaction pattern to tree stresses —electroplexy, surgery, and myocardial infarction— of fibrinolysis and plasma fibrinogen. *J. Clin. Pathol.*, 22, 659-662 (1969)。
- 5) Buckell, M. & Elliott, F. A.: Diurnal fluctuation of plasma fibrinolytic activity in normal males. *Lancet*, 1, 660-662 (1959)。
- 6) Hume, R.: The relationship to age and cerebral vascular accidents of fibrin and fibrinolytic activity. *J. Clin. Pathol.*, 14, 167-171 (1961)。
- 7) Chakrabarti, R., Hocking, E. D., Fearnley, G. R., Mann, R. D. & Attwell, T. N.: Fibrinolytic activity and coronaryartery disease. *Lancet*, 1, 987-990 (1968)。
- 8) Gader, A. M. A., Costa, J. & Cash, J. D.: The

effect of propranolol, alprenolol and practolol on the fibrinolytic and factor VIII responses to adrenaline and salbutamol in man. *Thromb. Res.*, **4**, 25-33 (1974).

9) **Holemans, R.**: Enhancement of fibrinolysis in the dog by injection of vasoactive drugs. *Am. J. Physiol.*, **208**, 511-520 (1965).

10) **Innes, D. & Sevitt, S.**: Coagulation and fibrinolysis in injured patients. *J. Clin. Pathol.*, **17**, 1-13 (1964).

11) **Ogstin, D., McDonald, G. A. & Fullerton, H. W.**: The influence of anxiety in tests of blood coagulability and fibrinolytic activity. *Lancet*, **2**, 521-523 (1962).

12) **Brozovic, M.**: Physiological mechanisms in coagulation and fibrinolysis. *Br. Med. Bull.*, **33**, 231-238 (1977).

13) **Clarke, R. L., Orandi, A. & Clifton, E. E.**: Induction of fibrinolysis is by venous obstruction. *Angiology*, **11**, 367-370 (1960).

14) **Robertson, B. R., Pandolfi, M. & Nilsson, I. M.**: "Fibrinolytic capacity" in healthy volunteers at different ages as studied by standardized venous occlusion of arms and legs. *Acta Med. Scand.*, **191**, 199-202 (1972).

15) **Shaper, A. G., Marsh, N. A., Patel, I. & Kater, F.**: Response of fibrinolytic activity to venous occlusion. *Br. Med. J.*, **3**, 571-573 (1975).

16) **Cash, J. D.**: Effect of moderate exercise on the fibrinolytic system in normal young men and women. *Br. Med. J.*, **2**, 502-506 (1966).

17) **Nilsson, I. M. & Pandolfi, M.**: Fibrinolytic response of the vascular wall. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **40** (suppl.), 231-242 (1970).

18) **Holemans, R.**: Increase in fibrinolytic activity by venous occlusion. *J. Appl. Physiol.*, **18**, 1123-1129 (1963).

19) **Griffin, M. J.**: *Handbook of Human Vibration*, 1st ed., p633-671, Academic Press, London, 1990.

20) 丹羽千登世, 丹羽正弘, 山岸良一, 前田美雪, 近藤信一, 桜川信男: 新しい合成基質を用いたアンチトロンビンⅢ,  $\alpha_2$  プラスミン・インヒビターおよびプラスミノゲン測定用キットの検討. *最新医学*, **40**, 376-382 (1985).

21) 川崎 健, 篠山重威: 脈波速度. *現代医療*, **19**, 2663-2668 (1987).

22) 川崎 健, 竹内光吉, 長谷川元治, 八木晋一, 中山 淑, 高山吉隆: 超音波変位計による非観血的総頸動脈化判定法. *脈管学*, **22**, 241-248 (1982).

23) **Holemans, R. & Tysinger, M. F.**: Site of origin of increased fibrinolytic activity during venous occlusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **118**, 448-491 (1965).

24) **Tighe, J. R. & Swan, H. T.**: Fibrinolysis and venous obstruction. *Clin. Sci.*, **25**, 219-222 (1963).

25) **Gritsyuk, A. I. & Schigelsky, V. I.**: Evaluation of blood coagulation and prethrombotic state in patients with coronary atherosclerosis by application of controlled local venous blocked. *Circulation*, **60**, 220A (1979).

26) **Walker, I. D., Davidson, J. F. & Hutton, I.**: "Fibrinolytic potential" The response to a 5 min venous occlusion test. *Thromb. Res.*, **8**, 629-638 (1976).

27) **Clarke, R. L.**: Oxygen saturation and spontaneous fibrinolytic activity. *Am. J. Med. Sci.*, **244**, 466-471 (1962).

28) **Okada, A. & Nakamura, H.**: Some features of peripheral circulatory and nervous functions in workers with hand-held vibratory tools. *In* H. Dupuis, E. Christ, D. J. Sandover, W. Taylor & A. Okada (eds.), *Proceeding 6th International Conference on Hand-Arm Vibration*, 1st ed., p37-60, Druckzentrum Sutter & Partner GmbH, Essen, 1993.

29) **Rånby, M.**: Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 461-469 (1982).

30) **Swan, H. T.**: Fibrinolysis related to age in men. *Br. J. Haematol.*, **9**, 311-318 (1963).

31) **Ross, R. & Glomset, J. A.**: The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, **295**, 369-377 (1976).

32) **Ross, R. & Glomset, J. A.**: The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.*, **295**, 420-425 (1976).

33) **Eichhorn, P., Hirzel, H. O., Kappenberger, L., Gander, M. P., Schlumpf, M. & Grüntzig, A. R.**: Perkutane transluminale koronare angioplastie: Spätresultate fünf jahre nach dem eingriff. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **115**, 678-684 (1985).

34) **Astrup, T.**: The biological significance of fibrinolysis. *Lancet*, **2**, 565-568 (1956).

35) **Donner, L. & Vodáková, L.**: Some fibrinolytic properties of the human arteries and vein wall. *Folia Haematol.*, **113**, 454-459 (1986).

**Development of a New Test for Enhancement of the Fibrinolytic Activity by Vibration Exposure, and Basic Findings** Kazuo Tsuji, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. J. J. Med. Soc., **103**, 701-709 (1994)

**Key words** aging, arteriosclerosis, euglobulin, fibrinolysis, fibrin plate ring, vibration

#### Abstract

The venous occlusion test (VOT) is widely used for enhancement of fibrinolytic activity for the purpose of examining the involvement of the fibrinolytic system in arteriosclerosis. However, VOT has a great disadvantage that the concentration of hematocrit (Ht) is increased following venous occlusion. To evaluate the fibrinolytic system using the fibrin plate method as a new test for enhancement of fibrinolytic activity by vibration exposure, the author developed the method in which the blood fibrin plate ring (FPR) before and after the exposure to the hand-arm vibration (120 Hz, 50 m/sec<sup>2</sup>, 5 min) in the X direction according to the International Organization for Standardization was measured, with the hand grasping a handle at a constant force. The subjects included 50 healthy volunteers and 50 arteriosclerotic patients with myocardial or cerebral infarction. As a result, the experiment examining the reproductiveness of the FPR showed that 0.74% of coefficient of variance was much smaller compared with 3.89% for the euglobulin lysis time. Ht was not changed and saturated O<sub>2</sub> was increased by the vibration exposure test. In the healthy group, the fibrinolytic activity was significantly enhanced by the test. In particular, the degree of the enhancement was greater for subjects over 50 years old than for subjects under 50 years old. By contrast, in the arteriosclerotic group, no enhancement of fibrinolytic activity by the test was observed, independent of the age classification. These results indicate that arteriosclerosis was evaluated quantitatively with the effects of the vibration test on FPR. The findings on the difference of FPR according to age classification in the healthy group suggest the mechanism is attenuated in arteriosclerosis in which the fibrinolytic activation is induced by the external stimulation.