

実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎における眼内および血中 トロンボモジュリンの測定

慶野 博¹⁾, 山川 直之¹⁾, 後藤 浩¹⁾, 臼井 正彦¹⁾, 中野 昌彦²⁾

¹⁾東京医科大学眼科学教室, ²⁾三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所

要 約

Thrombomodulin(TM)は血管内皮細胞膜上に存在し, トロンビンと複合体を形成後, protein C を活性化させ血液抗凝固能を発現する糖蛋白である。また, 全身的な血管炎を伴う疾患における血管内皮細胞の傷害マーカーとして, 近年注目を集めている。

本実験では, ラットに惹起させた実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)の眼内における TM の局在と, 眼内および血中の TM 量の動態について検討した。EAU を惹起させたのち眼球を経時的に摘出し, 病理組織学的ならびに免疫組織化学的に検索したところ, 前房内のフィブリン析出部位や網膜血管炎の存在部位に一致して TM

の存在を示す所見が認められた。眼内および血中 TM 量を EAU の発症前から経時的に測定したところ, 炎症の進行に伴い眼内 TM 量の上昇が認められたが, 血中 TM 量の変動はごく僅かであった。EAU の眼内において TM は血管炎に伴う血栓形成や前房内のフィブリン形成に対して抑制的に作用し, 血液や房水の流動性の維持に重要な働きを果たしていることが示唆された。(日眼会誌 102: 28—33, 1998)

キーワード: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎, Thrombomodulin(TM), 血管炎, フィブリン形成

Measurment of Thrombomodulin Values in the Serum and Eyes of Experimental Autoimmune Uveoretinitis

Hiroshi Keino¹⁾, Naoyuki Yamakawa¹⁾, Hiroshi Goto¹⁾, Masahiko Usui¹⁾ and Masahiko Nakano²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College

²⁾Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc, Niigata Research Laboratory

Abstract

Thrombomodulin(TM) is a protein, present on intact endothelial cell surfaces, that plays a major role in the protein C anticoagulant system. Plasma TM is produced by injured endothelium, and is recognized in circulating blood or urine as a sign of endothelium cell damage. The localization of TM within the eye and its kinetics in the eye and the serum were investigated in rats with experimental autoimmune uveoretinitis(EAU). An immuno-histochemical study showed the presence of TM at sites of fibrin in the anterior chamber and retinal vasculitis. The amount of TM in the eye increased with progression of intraocular in-

flammation, but the serum level of TM did not significantly differ from the values in the control group. These data suggest that TM may play a role in preventing thrombosis in cases of vasculitis and fibrin formation in the anterior chamber in EAU, thus maintaining blood flow and the fluidity of aqueous humor. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 28—33, 1998)

Key words: Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), Thrombomodulin(TM), Vasculitis, Fibrin formation

I 緒 言

近年, 血中の thrombomodulin(TM) が慢性関節リウマチや全身性ループスエリテマトーデス, ウェジナー肉芽

腫症などの全身的な血管炎を伴った膠原病の活動期や, 播種性血管内凝固症候群, さらに網膜症を有する糖尿病患者などで高値を示すことが明らかとなり, 血管内皮細胞傷害の分子マーカーとして注目を集めている^{1)~9)}。

別刷請求先: 160 東京都新宿区西新宿 6—7—1 東京医科大学眼科学教室 慶野 博
(平成 9 年 3 月 21 日受付, 平成 9 年 8 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Keino, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical College, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received March 21, 1997 and accepted in revised form August 27, 1997)

TM は血管内皮細胞膜上に存在する糖蛋白であり、トロンビンと複合体を形成することによりトロンビンの procoagulant 活性を抑制し、かつ血液凝固因子である protein C を活性化する。活性化された protein C は血液凝固因子である第 5 因子や第 8 因子を分解し、血液凝固カスケードを制御する働きがある。さらに、活性型 protein C は plasminogen activator inhibitor を不活化し、線溶系の亢進にも機能を有することが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。

一方、TM の局在部位については当初、血管内皮細胞膜上にのみ存在するとされていたが、最近、胸腔内および腹腔内組織表面や滑膜細胞、くも膜細胞表面にも存在することが報告¹²⁾されるようになった。これらの血管内皮細胞外に存在する TM は、胸水や腹水、髄液などの流動性の維持に関与するものと推察されている¹³⁾¹⁴⁾。

眼内における TM の局在については、これまで健常なヒトやサル、ウサギの眼球を用いた報告¹⁵⁾¹⁶⁾はみられるが、血管炎を伴った眼球内における TM の局在や眼内 TM 量の定量についての報告はない。

本研究では網膜血管炎を起こすことが知られている実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis, EAU)を用い、眼内における TM の局在について免疫組織化学的に検索し、かつ眼内および血中の TM を経時的に定量し、TM の動態について検討したので報告する。

II 材料と方法

1. 実験動物および EAU の作製

Redmond らの方法¹⁷⁾に準じて、ウシ網膜から interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) を精製した。IRBP 50 μ g を完全 Freund アジュバント (CFA) とともに生後 8 週齢の雄 Lewis ラットの片足蹠部皮下に接種した群を EAU 群 (n=6) とし、対照として未接種のラット正常群 (n=6)、さらに、CFA のみを接種した群を CFA 群 (n=6) とした。

2. 眼内 TM の免疫組織化学的検索

正常群および EAU 群 (接種後 14 日目) のラットをエーテル麻酔下に屠殺し、眼球を摘出した。眼球は 10% 中性緩衝ホルマリンで 24 時間固定後、パラフィンに包埋して切片を作製した。脱パラフィン後、蒸留水で 5 分間洗浄し、0.3% 過酸化水素水に 10 分間浸して内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。0.01 M リン酸緩衝液 (PBS) で 10 分間洗浄を行った後、ブロッキング正常ウサギ血清 (Vector 社) に 20 分間反応させ、余剰の反応液を吸収した後、切片に 25 倍および 50 倍希釈したウサギ抗ラット TM ポリクローナル抗体 (三菱瓦斯化学株式会社) を室温で 60 分間反応させた。陰性対照として、25 倍および 50 倍希釈した正常ウサギ血清と反応させた。PBS で洗浄した後、300 倍希釈 (5 μ g/ml) したビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (Vector 社) を滴下し、30 分間反応させた後、PBS で

洗浄後、アピチン・ビオチン化ペルオキシダーゼ (Vector 社) をさらに滴下し 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、基質溶液 (0.02% 過酸化水素水 + ジアミノベンチジン 1 mg/ml) を滴下して 5 分間反応させた後、蒸留水で 1 分間洗浄した。その後、上昇エタノール系列で脱水、カナダバルサムでスライドガラス上に封入し、光学顕微鏡を用いて観察を行った。観察には正常群、EAU 群それぞれ 6 眼ずつを用いた。

3. 眼内および血中 TM 量の測定

正常群は未接種のものを、EAU 群および CFA 群は、接種後それぞれ 5, 8, 10, 14, 21, 28, 45 日目にエーテル麻酔下で心臓採血し、血清を分離して TM 量の測定に用いた。摘出した眼球は前房水を 30 G 針で採取し、TM 測定の試料とした。その後、眼球は 10 mM ベンザミジンを含む生理食塩水中で輪部から約 1 mm 後方に切開を加え、顕微鏡下で角膜、水晶体を除いた前眼部 (虹彩・毛様体) と硝子体、強膜を除いた後眼部 (網膜・脈絡膜) とに分け、各々抽出バッファー (20 mM トリス塩酸緩衝液, 0.25 mM サッカロース, 10 mM ベンザミジンを含む, pH 7.5) 4 ml でホモジナイズして懸濁液を作製した。これを 3,000 回転で 15 分間遠心し、その上清を試料 1 とした。残った沈渣に 0.5% トライトン X-100 を含む抽出バッファー 4.0 ml を沈渣に加えて、もう一度ホモジネートし、その後、ジソフルオロリン酸を 10 μ l 加え氷上で 2 時間攪拌した後、15,000 rpm で 10 分間遠心し、その上清を試料 2 とした。試料 1 と 2 は各々を合計して TM 量の測定に用いた。1 眼当たりから得られる試料が微量のため、6 眼を合計したものを試料とし、測定結果は 1 眼当たりの TM 量に換算した。

血清、前房水中、および眼内組織の TM 測定には、抗ラット TM ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた。すなわち、ラット TM ポリクローナル抗体を固相化した 96 穴プレートに試料 0.2 ml をとり、4 $^{\circ}$ C で一晩静置の後に洗浄した horseradish peroxidase (HRP) 標識した抗ラット TM ポリクローナル抗体液 (1 μ g/ml) を 0.2 ml 加え、室温で 3 時間静置した。洗浄後基質 (0.015% 過酸化水素水および 1 mg/ml の o-フェニレンジアミン・2 塩酸塩) 0.2 ml を添加し、4 N-H₂SO₄ で反応を停止させ、490 nm で吸光度を測定した。上記の実験を計 3 回施行して平均値をとり、測定値とした。

4. 正常群、EAU 群および CFA 群の末梢血液、血清検査

実験に用いたラットは TM 測定値に影響を及ぼす可能性のある腎機能異常と全身状態を把握するために、正常群 (未接種)、EAU 群および CFA 群の末梢血中の blood urea nitrogen (BUN)、白血球数、lactate dehydrogenase (LDH) について測定を行った。

5. 統計学的検索

本実験における有意差の検出には Mann-Whitney 検定を用いた。

III 実験結果

1. 眼内 TM の局在

正常群 (n=6) および EAU 群 (接種 14 日目, n=6) の眼球で TM の局在を検討した結果, 正常の前眼部においては角膜内皮細胞, 虹彩上皮に陽性を示す染色像が認められた。また, 毛様体の血管壁にも陽性を示す所見が得られた (図 1)。網脈絡膜においては脈絡膜血管の一部に TM 陽性の所見が観察されたが, 網膜血管やその他の組織には明らかな陽性所見は認められなかった (図 2)。他の正常群 (n=5) においても同様の結果が認められた。EAU 群 (接種 14 日目) の前眼部では, 正常ラットと同様に虹彩上皮や毛様体上皮などに TM の局在を示す陽性所見が認められ (図 3), 角膜内皮細胞や前房内のフィブリン析出部位に一致して強い陽性所見が観察された (図 4)。また, 網膜血管や脈絡膜血管に強い陽性所見が認められた (図 5)。他の EAU 群 (n=5) においても同様の結果が認められた。また, 正常ウサギ血清を反応させた陰性対照の切片では, いずれの部位にも特異的な染色はみられなかった。

2. 眼内 TM 量と血中 TM 量の変動

眼内組織中の TM 量の変動を図 6 に示した。EAU 群では前眼部および後眼部の炎症に伴って, TM 量の増加傾向がみられた。さらに, 前眼部 TM 量の変動を正常群および CFA 群と比較してみると, EAU 発症初期から急激に上昇が認められ, 接種後 14 日目および 21 日目において有意差が認められた。一方, 後眼部 TM 量については大きな変動はみられず, いずれの群や時期においても有意な上昇は認められなかった。

次に, 前房水中における TM 量の変動を図 7 に示した。EAU 群では IRBP 接種後 14 日目に TM 量が最高値となり, 炎症の消退とともに減少する傾向が認められた。正常群および CFA 群との比較では接種後 14 日目にお

いてのみ有意差が認められた。

血清中の TM 量の変動は図 8 に示すごとく, EAU 群および CFA 群ともに接種前後で大きな変動はなく, 両群の間に有意差は認められなかった。

3. 末梢血液, 血清検査

BUN の結果は, 正常群と EAU 群で比較すると接種後 14 日目から上昇を示し, 28 日目まで増加した。同様に正常群と CFA 群とを比較すると接種後 8 日目から上昇を示し, 28 日目まで増加した。

白血球数は EAU 群および CFA 群の両群で接種後 5 日目から上昇し, 以後 28 日目まで増加傾向を示した。血中 LDH についても EAU 群および CFA 群の両群で接種後 8 日目に一時上昇, その後減少し, 接種後 14 日目から再び増加傾向を示した (表 1)。

IV 考 按

今回, 我々は眼内に網膜血管炎や前房内にフィブリン析出を生じることで知られるラット EAU モデルを用い, 眼内における TM の局在を検討した。さらに, 眼内および血中 TM 量の測定を試み, 眼内における房水の流動性を維持する糖蛋白としての側面と, 眼内血管炎の血液マーカーとしての意義について検討を行った。免疫組織化学染色の結果, 正常群および EAU 群の両群において角膜内皮や虹彩上皮, 毛様体上皮に TM 陽性所見が認められ, EAU 群では前房内のフィブリン析出部位, ならびに血管炎を生じている網脈絡膜血管内に一致して TM 陽性の所見が認められた。また, 眼内組織中の TM 量について IRBP 接種前から経時的に定量を行ったところ, 前眼部に関しては炎症の進行に合わせて上昇し, 炎症の消退とともに減少傾向を辿った。前房水中の TM 量については, 炎症の極期に一致して最高値を示した。

血管内皮細胞表面に存在する TM が血液の流動性保持に作用しているということを鑑みれば, 房水循環の経路に関わる器官に一致した TM の発現は房水の流動性保持の側面からみて大変興味深い結果であった。EAU 群における眼内組織の TM 量の増加には二つの要因が考

表 1 末梢血液, 血液検査

	BUN (mg/dl)		白血球数 (個/μl)		LDH (IU/l)	
	EAU 群	CFA 群	EAU 群	CFA 群	EAU 群	CFA 群
正常群 (未接種)	15.3 ± 2.7	15.3 ± 2.7	3,760 ± 1238	3,760 ± 1238	1,882 ± 902	1,882 ± 902
接種 5 日目	16.7 ± 1.2	15.9 ± 1.6	12,150 ± 1343**	8,600 ± 1300**	1,879 ± 30	3,040 ± 118
接種 8 日目	17.5 ± 4.1	23.9 ± 8.8*	9,233 ± 2284**	10,866 ± 1888**	3,683 ± 629**	3,404 ± 492*
接種 10 日目	15.9 ± 1.1	16.7 ± 1.2	13,500 ± 2901**	15,566 ± 1604**	2,145 ± 669	2,531 ± 633
接種 14 日目	19.7 ± 3.5*	19.7 ± 0.4*	10,000 ± 5027*	10,400 ± 3269**	4,467 ± 2941	7,991 ± 2502**
接種 21 日目	23 ± 2.0**	22.9 ± 1.0**	10,616 ± 1724**	13,200 ± 2421**	4,888 ± 754**	3,381 ± 254**
接種 28 日目	24.7 ± 2.6**	24.7 ± 2.6**	15,033 ± 218**	13,033 ± 833**	5,586 ± 1458**	3,195 ± 967

BUN: blood urea nitrogen LDH: lactate dehydrogenase EAU: experimental autoimmune uveoretinitis CFA: 完全 Freund アジュバンド *: p<0.05 **: p<0.01

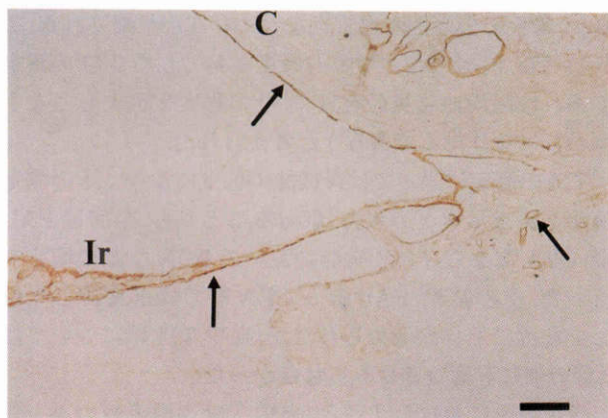


図1 正常 Lewis ラットの前眼部免疫組織化学所見。
角膜内皮細胞, 虹彩上皮および毛様体血管の一部にThrom-
bomodulin (TM) 抗原陽性の所見が観察される(矢印)。
C: 角膜, Ir: 虹彩. パーは 250 μ m

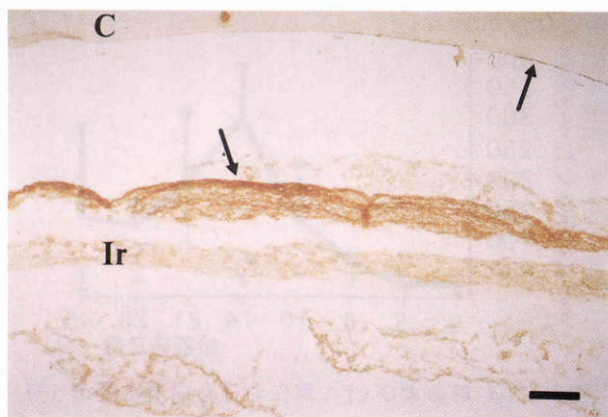


図4 EAU 発症時の前房内の免疫組織化学所見。
角膜内皮細胞, 前房内のフィブリン析出部位に一致して
強い陽性所見が観察される(矢印)。
C: 角膜, Ir: 虹彩. パーは 400 μ m

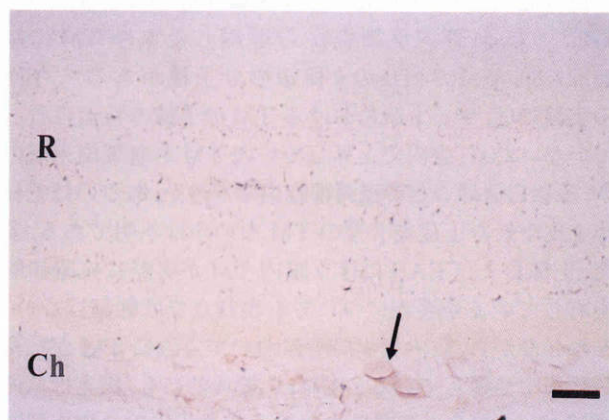


図2 正常 Lewis ラットの後眼部免疫組織化学所見。
脈絡膜血管の一部に TM 抗原陽性の所見が観察される
(矢印)。
R: 角膜, Ch: 脈絡膜. パーは 200 μ m

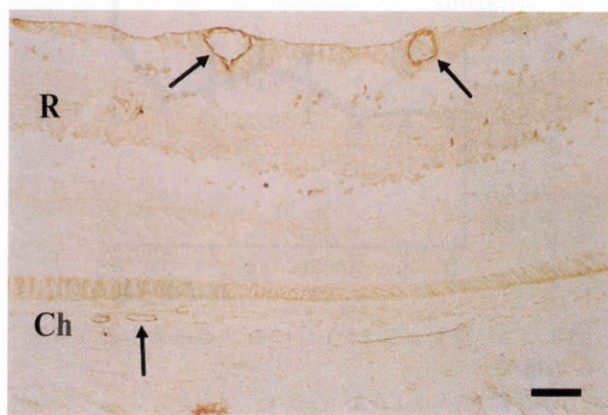


図5 EAU 発症時の後眼部免疫組織化学所見。
網膜血管や脈絡膜血管の一部に強い陽性所見が観察され
る(矢印)。
R: 網膜, Ch: 脈絡膜. パーは 200 μ m

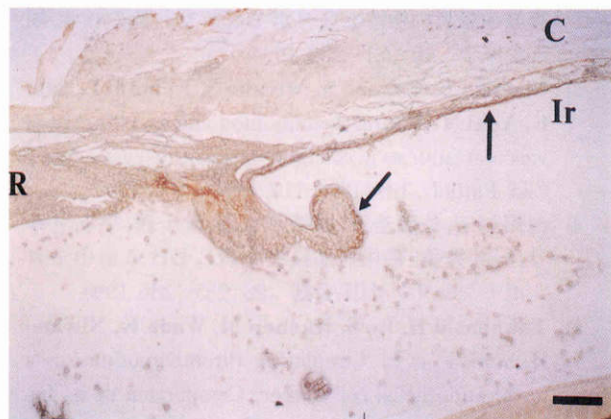


図3 Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)
発症時の前眼部免疫組織化学所見。
虹彩上皮および毛様体上皮に TM 抗原の強い陽性の
所見が観察される(矢印)。
C: 角膜, Ir: 虹彩, R: 網膜. パーは 400 μ m

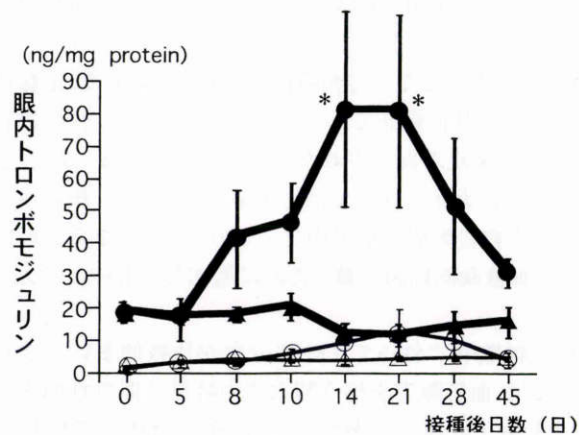


図6 EAU群およびcomplete Freund's adjuvant (CFA)
群における前眼部組織中の TM 量の推移。
グラフ中のバーは標準偏差を示す。*: $p < 0.01$ (Mann-
Whitney test)
●: EAU 群前眼部, ○: EAU 群後眼部, ▲: CFA
群前眼部, △: CFA 群後眼部

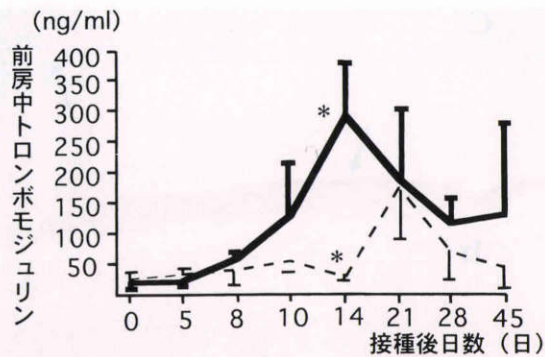


図7 EAU 群およびCFA 群における前房水中のTM量の推移。

EAU 群 n=6, CFA 群 n=6

グラフ中のバーは標準偏差を示す。*: $P < 0.01$ (Mann-Whitney test) —: EAU 群, ---: CFA 群

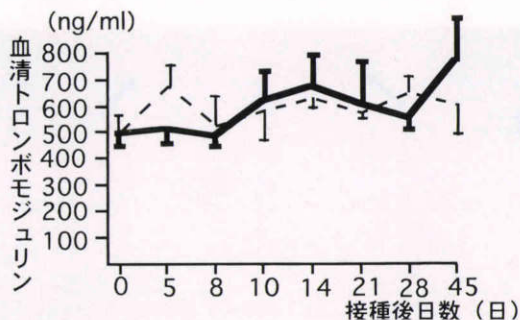


図8 EAU 群およびCFA 群における血清中のTM量の推移。

EAU 群 n=6, CFA 群 n=6

グラフ中のバーは標準偏差を示す (Mann-Whitney test)。

—: EAU 群, ---: CFA 群

えられた。一つはEAUに伴う血液房水欄や血液網膜欄の破壊により、血中のTMが前房中あるいは硝子体中に移行・漏出することによって増加した機序、もう一つはEAUが引き金となって角膜内皮細胞、虹彩上皮、毛様体上皮といった正常群でもTMの存在が認められた器官で、TMの発現が促進されたものと考えられる。また、眼内のTMが炎症に伴って高値を示したことは、網膜血管炎に伴う血栓形成や前房内フィブリン形成、ならびに眼内の血液凝固抑制に働くために増加したものと考えられる。

ヒト組織中においてTMの分布が比較的多いとされる肺では、血管障害を伴う肺水腫や特発性間質性肺炎などで血中TM値が上昇するという¹⁸⁾。血中のTM量をEAU群およびCFA群との間で比較した結果では、両者の間に有意な差は認められなかった。今回の実験結果のように、眼内という限局した組織炎症で生じたTM量の上昇は、血中のTM量には反映されにくいことが明らかになった。このことは、血中のTM量が増加している場

合、全身性で広範囲な血管炎などの存在が予測される。これに対し、前房水などの眼内液を試料としたTMの測定であれば眼内血管炎の有無や、その程度を示す有力な手がかりになり得るであろうと考えられた。

TMの測定に当っては腎機能の低下によってその測定値が高値を示すとの報告⁹⁾があることから、今回はEAU群、CFA群ならびに正常群においてBUNなどの測定を行った。その結果、EAU群とCFA群では正常群と比較して有意に上昇が認められたが、血中TM量については3群の間に有意な差はみられなかった。

炎症局所におけるTMと、血中TMの測定値の不一致について、Conwayら¹⁹⁾は慢性関節リウマチの患者の関節液および血中のTM量を測定し、関節内では血中に比べ有意に増加しており、かつ、関節液内のTMは血漿や多核白血球および滑膜細胞上に存在するTMに由来していると報告している。ヒトTMの分子量については、内皮細胞結合型のTM、つまり組織TMの分子量は105 kDa、一方、血管内皮細胞から遊離した血中TMには28, 31, 80, 85, 105 kDaの6種類の分子種がある²⁰⁾。今回の実験では、ラット眼におけるTM分子種の特定は行っていないため、眼内で上昇していたTMが血漿由来なのか、多核白血球などの浸潤細胞由来なのか、あるいは毛様体上皮や虹彩上皮結合型のTMなのかは不明である。また、正常およびEAUに伴う眼内TMが実際に抗凝固能を有しているか否かについても現時点では確証はない。しかしながら、眼内炎症局所において実際にTMが抗凝固作用を発揮しているとすれば、臨床的にも、例えば急性前部ぶどう膜炎の発作時における線維素析出の機序解明にも繋がるものと考えられる。

文 献

- 1) 青木延雄, 大玉信一, 高野省吾, 藤巻道男, 福武勝幸, 吉沢靖之, 他: トロンボモジュリンの各種病態における血中濃度. 臨床病理 42: 1279—1286, 1994.
- 2) 田中光彦, 小林茂人, 田村直人, 橋本博史, 風間睦美: 膠原病患者の血清トロンボモジュリン値の検索. 順天堂医学 40: 221—229, 1994.
- 3) Ohdama S, Takano S, Miyake S, Kubota T, Sato K, Aoki N: Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular disease. Am J Clin Pathol 101: 109—113, 1994.
- 4) 池田誠宏, 佐藤圭子, 岩崎哲也, 久米千鶴, 平石さゆり, 石井秀美: 糖尿病網膜症症例における血中トロンボモジュリン. 日眼会誌 98: 283—286, 1994.
- 5) Takahashi H, Ito S, Hanano M, Wada K, Niwano H, Seki Y, et al: Circulating thrombomodulin as a novel endothelial cell maker: Comparison of its behavior with von Willebrand factor and tissue type plasminogen activator. Am J Hematol 41: 32—39, 1992.
- 6) 風間睦美: 可溶性トロンボモジュリン. 臨床血液 32: 103—107, 1991.

- 7) 樋口真琴, 石丸裕晃, 猪野健二郎, 山本登紀子, 大塚秀勇, 風間睦美, 他: 網膜血管障害を有する患者の血中 Thrombomodulin の測定. 眼紀 45: 19—22, 1994.
- 8) Dittman WA, Majerus PW: Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant. Blood 75: 329—336, 1990.
- 9) 石井秀美, 内山浩之, 平石さゆり, 中野昌彦, 坪内二郎, 風間睦美, 他: 血中トロンボモジュリン測定の意義. 臨床病理 37: 266—271, 1989.
- 10) Esmon CT: The regulation of natural anticoagulant pathways. Science 235: 1348—1352, 1987.
- 11) Esmon CT: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. J Biol Chem 264: 4743—4746, 1989.
- 12) Boffa MC, Burke B, Haudenschild CC: Preservation of thrombomodulin antigen on vascular and extravascular surfaces. J Histochem Cytochem 35: 1267—1276, 1987.
- 13) McCachren SS, Diggs J, Weinberg JB, Dittman WA: Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. Blood 78: 3128—3132, 1991.
- 14) Ishii H, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW: Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. Blood 67: 362—365, 1986.
- 15) 上原文行, 丸山征郎, 鶴木一彦, 米沢 傑, 井形明弘, 大庭紀雄: トロンボモジュリンの眼内分布に関する免疫組織学的研究. あたらしい眼科 3: 1197—1199, 1986.
- 16) Kawamura H, Hiramatsu Y, Watanabe I: Localization of thrombomodulin in a rabbit eye. Curr Eye Res 15: 938—942, 1996.
- 17) Redmond TM, Wiggert B, Robey FA, Nguyen RN, Lewis MS, Lee L, et al: Isolation and characterization of monkey interphoto-receptor retinoid-binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. Biochem 24: 787—793, 1985.
- 18) 加藤士郎, 大野邦彦, 大沼 天, 中路貴士, 浅井寿彦, 中元隆明, 他: 肺血管障害と血中トロンボモジュリンの動態について. 臨床呼吸生理 25: 63—71, 1993.
- 19) Conway EM, Nowakowski B: Biologically active thrombomodulin is synthesized by adherent synovial fluid cells and is elevated in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Blood 81: 726—733, 1993.
- 20) Ishii H, Nakano M, Tsubouchi J, Ishikawa T, Uchiyama H, Hiraishi S, et al: Establishment of enzyme immunoassay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. Thrombosis and Haemostasis 63: 157—162, 1990.