

糖尿病網膜症症例における血中トロンボモジュリン

池田 誠宏¹⁾, 佐藤 圭子¹⁾, 岩崎 哲也¹⁾, 久米 千鶴²⁾, 平石さゆり³⁾, 石井 秀美³⁾¹⁾大阪市立総合医療センター眼科, ²⁾大阪市立大学医学部眼科学教室, ³⁾帝京大学薬学部臨床生化学教室

要 約

トロンボモジュリンは血管内皮細胞の膜表面に存在する糖蛋白である。最近トロンボモジュリンが血中にも存在することが明らかとなり、血管内皮細胞障害の新しい分子マーカーとして注目されている。我々は糖尿病網膜症症例における血中トロンボモジュリンを測定し、網膜症の増悪とともに血中トロンボモジュリンの上昇を認めた。統計学的には、網膜症を有さない例と増殖網膜症 ($p=0.002$), 単純網膜症と増殖網膜症 ($p=0.01$), 増殖前網膜症と増殖網膜症 ($p=0.03$) の間に有意差を認めた。血中トロンボモジュリンの上昇が眼局所における血

管内皮細胞障害を反映しているのか、もしくは全身的な血管内皮細胞障害の反映であるのかは未だ検討を要する。しかし、全身的に血管内皮の障害傾向が生ずれば、当然眼内でも同様の変化が生じているものと考えられ、血中トロンボモジュリンを経時的に測定することにより網膜症の増悪時期が予測可能と考えられる。(日眼会誌 98: 283—286, 1994)

キーワード: トロンボモジュリン, 糖尿病網膜症, 血管内皮細胞

Thrombomodulin in Diabetic Retinopathy

Tomohiro Ikeda¹⁾, Keiko Sato¹⁾, Tetsuya Iwasaki¹⁾, Chizu Kume²⁾, Sayuri Hiraishi³⁾ and Hidemi Ishii³⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Osaka City General Hospital²⁾Department of Ophthalmology, Osaka City University Medical School³⁾Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

Abstract

Thrombomodulin is a glycoprotein located on the surface membrane of vascular endothelial cells. Recently the presence of thrombomodulin antigens was detected in circulating blood plasma. The thrombomodulin antigens are thought to have been released from injured endothelial cells, and thus plasma thrombomodulin has been attracting attention as a new molecular marker indicating injuries to vascular endothelial cells. We investigated plasma thrombomodulin levels in relation to the severity of diabetic retinopathy, and found that they increased as retinopathy progressed. The Mann-Whitney U test revealed significant differences between no

retinopathy and proliferative retinopathy ($p=0.002$), between simple retinopathy and proliferative retinopathy ($p=0.01$), and between preproliferative retinopathy and proliferative retinopathy ($p=0.03$). However, ocular vascular injuries may correlate with systemic vascular injuries. Therefore, the progress of retinopathy may be predicted by monitoring plasma thrombomodulin levels in selected patients. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 283—286, 1994)

Key words: Thrombomodulin, Diabetic retinopathy, Vascular endothelial cell

I 緒 言

トロンボモジュリン (TM) は、1981年に Esmonら¹⁾により発見された血管内皮細胞の膜表面に存在する糖蛋

白である。TMは内皮細胞表面でトロンビンと結合し、トロンビンの血液凝固機能を阻害する。すなわち、トロンビンの有するフィブリノーゲンを限定分解してフィブリンを形成する作用や、血液凝固因子であるV、VIII因子

別刷請求先: 534 大阪府大阪市都島区都島本通2-13-22 大阪市立総合医療センター眼科 池田 誠宏
(平成5年7月6日受付, 平成5年10月12日改訂受理)

Reprint requests to: Tomohiro Ikeda, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka City General Hospital, 2-13-22 Miyakojimahondori, Miyakojima-ku, Osaka-shi, Osaka-fu 534, Japan

(Received July 6, 1993 and accepted in revised for October 12, 1993)

の活性化作用, 血小板活性化作用を抑制する. 一方では, トロンビンのプロテインC活性化作用を著しく増強する. 活性型プロテインCは凝固に必須なVaおよびVIIIaを分解し, 血液凝固カスケードを制御する. また, プラスミノゲンアクチペータインヒビタを不活性化し, 線溶系の亢進にも機能する. このようにして, TMは血管内における血液の非凝固性の維持に重要な役割を果たしている^{2)~4)}.

最近, TMが血中および尿中にも存在することが明らかにされた⁵⁾. この血中TMは血管内皮細胞の障害により血中に逸脱したものと考えられ⁶⁾, 血管内皮細胞障害の新しい分子マーカーとして注目されている. 一方, 糖尿病網膜症は病期の進行とともに網膜毛細血管床の閉塞を生じ, 広範に血管内皮細胞が障害される. この結果, 内皮細胞からTMが逸脱し, 血中TM濃度の上昇する可能性が考えられる. 今回我々は, 各病期の糖尿病網膜症症例における血中TMを測定し, 血中TMと糖尿病網膜症の重症度との関連性について検討を行ったので報告する.

II 対象および方法

対象は糖尿病症例211例で, 腎不全例および透析例は除外した. 糖尿病網膜症の病期は, 網膜症を有さない例(no diabetic retinopathy, NDR)58例, 単純糖尿病網膜症(simple diabetic retinopathy, SDR)37例, 増殖前糖尿病網膜症(preproliferative diabetic retinopathy, PPDR)81例, 増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy, PDR)35例であった. 各々の性別, 年齢, 糖尿病罹病期間を表1に示す.

網膜症の病期は, 検眼鏡所見および蛍光眼底造影所見から分類した. NDR症例およびSDR症例のうち, 蛍光眼底造影を施行しなかった症例では細隙灯顕微鏡を用いた眼底検査にて診断を行った. また, PPDRの診断はDavisら⁷⁾の分類に準ずるとともに, 蛍光眼底造影上網膜毛細血管床の閉塞を認めるが, 増殖性変化を伴っていない例とした.

血中TMは, 3種類のモノクローナル抗体(TMmAb 20, 2, 11)を用いた酵素免疫測定法により測定した⁸⁾.

表1 対象症例における糖尿病網膜症の病期および各々の症例数, 性別, 年齢, 罹病期間

| 糖尿病網膜症* | 症例数 | 性別 | | 年齢(歳)** | 糖尿病**罹病期間(年) |
|---------|-----|----|----|-----------|--------------|
| | | 男 | 女 | | |
| NDR | 58 | 24 | 34 | 61.5±10.6 | 7.3±5.4 |
| SDR | 37 | 16 | 21 | 60.5±11.5 | 11.8±13.1 |
| PPDR | 81 | 38 | 43 | 60.2±9.9 | 13.7±9.0 |
| PDR | 35 | 15 | 20 | 61.1±11.6 | 14.6±9.0 |

*NDR:糖尿病網膜症を認めない SDR:単純糖尿病網膜症
PPDR:増殖前糖尿病網膜症 PDR:増殖糖尿病網膜症
**平均値±標準偏差

概略は, TMmAb 20(TMのトロンビン結合部位を認識するモノクローナル抗体)をコートしたプレートに標準TMおよびTMmAb 2, 11を添加し, 洗浄後発色試薬(0.015% H_2O_2 およびo-フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド0.4mg/mlを含む50mMクエン酸緩衝液, pH 5.0)を加え, 2N- H_2SO_4 で反応停止後490nmの吸光度を測定した.

また, 独立2群の差の検定法としてはMann-Whitney testを用いた.

被験者には事前に本研究に対する十分な説明を行い, 同意を得た上で採血を行った.

III 結果

糖尿病網膜症の各病期における血中TM(平均値±標準偏差)

表2 網膜症の各病期における血中トロンボモジュリンのMann-Whitney testによる差の検定

| 糖尿病網膜症 | | P |
|--------|---------|-------|
| NDR | vs SDR | NS |
| | vs PPDR | NS |
| | vs PDR | 0.002 |
| SDR | vs PPDR | NS |
| | vs PDR | 0.01 |
| PPDR | vs PDR | 0.03 |

NDR:糖尿病網膜症を認めない
SDR:単純糖尿病網膜症
PPDR:増殖前糖尿病網膜症
PDR:増殖糖尿病網膜症

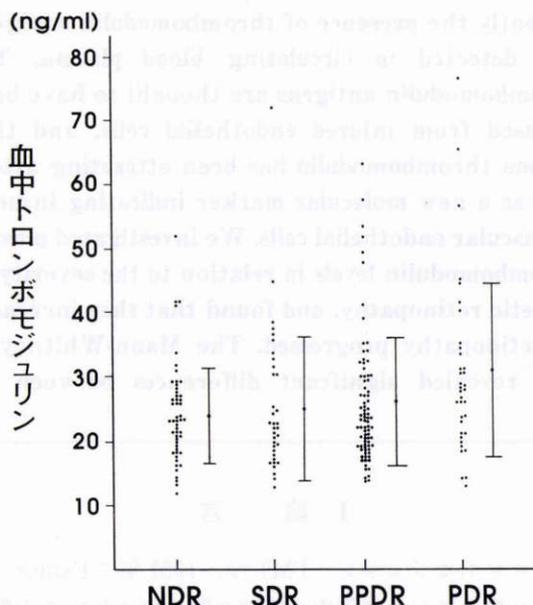


図1 糖尿病網膜症の各病期における血中トロンボモジュリン.

血中トロンボモジュリンの分布と平均値および標準偏差を示す. NDR:糖尿病網膜症を認めない SDR:単純糖尿病網膜症 PPDR:増殖前糖尿病網膜症 PDR:増殖糖尿病網膜症

準偏差)は、NDR 23.8 ± 7.4 ng/ml, SDR 25.0 ± 11.2 ng/ml, PPDR 26.1 ± 10.0 ng/ml, PDR 31.1 ± 13.6 ng/mlで、病期の進行とともに上昇する傾向を認めた(図1)。各病期における最小値と最大値は、NDR 11.9, 51.8 ng/ml, SDR 12.8, 71.7 ng/ml, PPDR 13.6, 63.1 ng/ml, PDR 14.4, 76.8 ng/mlであった。

各病期の血中 TM 間に差の検定を行うと、表2のごとく NDR と PDR ($p=0.002$), SDR と PDR ($p=0.01$), PPDR と PDR ($p=0.03$) との間にそれぞれ有意差を認めた。

IV 考 按

血中 TM は、血管内皮細胞の障害により血中に逸脱すると考えられている⁹⁾。このため糖尿病、播種性血管内凝固症候群、全身性エリテマトーデスなどの血管内皮細胞の障害を伴う疾患では血中 TM が高値を示すと報告されている^{9)~13)}。

糖尿病網膜症との関連についても論じられているが、内科領域からの報告^{9)~12)}がみられるのみである。これらの報告の多くでは、網膜症の進行と血中 TM の上昇との間に相関を認めたとしている⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾。しかし、Scott 分類での検討や網膜症の有無のみでの検討がほとんどで、血管閉塞の有無を考慮した検討は行われていない。

今回、我々は糖尿病症例において、蛍光眼底造影上での網膜毛細血管床閉塞を考慮して網膜症を分類し、各病期での血中 TM を検討した。その結果、網膜症の病期の進行とともに血中 TM の上昇を認め、増殖糖尿病網膜症を有する症例の血中 TM は他の病期と比べ有意の上昇を示した。このことから、血中 TM の上昇が眼内の血管障害を反映している可能性が考えられた。しかし、個々の症例で検討した場合、最小値と最大値からも明らかなように網膜症の病期との間に相関を示さない例も認められた。この原因を以下のごとく考察した。

血中 TM は、血管内皮の障害により血中に逸脱するため、測定した時点における血管障害を反映していると考えられる。石井ら¹⁴⁾は家兎の肺から精製した TM を¹²⁵I でラベルし、これを家兎に静注することにより血漿中の TM の半減期を検討している。この結果、TM の半減期は約5分であったとしており、ヒトにおいてもその半減期はごく短時間であると考えられる。このことから、血中 TM が過去に遡っての血管障害を反映するとは考えにくい。すなわち、広範な網膜毛細血管床閉塞が過去に生じて増殖網膜症に至った症例でも、測定時に新たに血管床閉塞が進行していない場合には血中 TM は高値を示さないと考えられる。

つまり、血中 TM は現在進行中の血管障害の指標であり、過去の病変を反映するものではない。これが進行した病期の例においても血中 TM が低値を示す場合のある一つの理由であろう。今後、血中 TM の経時的計測が

必要と考えられる。

また、別の要因としては糖尿病腎症による腎機能障害が考えられる。糖尿病以外を原因疾患とする、全身的な血管障害を伴わない腎機能低下例においても血中 TM は上昇するとされている⁹⁾¹³⁾。糖尿病網膜症と糖尿病腎症はしばしば併存することからも糖尿病腎症による腎機能障害の影響は無視できない。Oida ら¹²⁾はこの要素を除外するために、蛋白尿を認めない症例で網膜症と血中 TM の関連を検討した結果、増殖前網膜症および増殖網膜症の症例で有意に高値を示したとしている。しかし、増殖前網膜症4例、増殖網膜症10例と例数が少なく、より多数例での検討が必要である。我々も腎機能の正常な例での検討を試みたが、やはり腎機能の正常な増殖網膜症の症例数はごく少数となり結論は得られなかった。今後、腎機能障害による影響を補正した血中 TM 値の算出法が必要と考える。

糖尿病状態では凝固線溶系、血液粘度、赤血球・血小板の異常などにより血栓形成傾向にある。一方、糖尿病状態による機能性蛋白の糖化促進やポリオール代謝異常により血管内皮細胞自体も障害される。このような血管内皮細胞の異常が血液性状の異常に基づく血栓形成傾向をさらに助長する。そしていったん血栓が形成されれば、より広範囲に高度の内皮細胞障害が生ずると考えられる。こうした血管内皮細胞の障害は、種々の糖尿病合併症の発現に關与する。糖尿病網膜症は全身における血管障害の一部分症をなすにすぎず、眼内における血管障害が果たして血中 TM の上昇にどの程度關与しているのかは明らかではない。しかし、全身的に血管内皮の障害傾向が生ずれば、当然眼内でも同様の変化が生ずるものと考えられ、血中 TM の経時的な測定により、網膜血管床閉塞の増悪時期が予測可能と推論される。今後、個々の症例における網膜症と血中 TM の推移を検討することにより、この点を明らかにすることができるものと考えられる。

本論文の要旨は第95回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) **Esmon CT, Owen WG**: Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. Proc Natl Acad Sci USA 78: 2249—2252, 1981.
- 2) **Esmon CT**: The regulations of natural anticoagulant pathways. Science 235: 1348—1352, 1987.
- 3) **Esmon CT**: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. J Biol Chem 264: 4743—4746, 1989.
- 4) **Dittman WA, Majerus PW**: Structure and function of thrombomodulin. A natural anticoagulant. Blood 75: 329—336, 1990.
- 5) **Ishii H, Majerus PW**: Thrombomodulin is present in human plasma and urine. J Clin Invest 76:

2178—2181, 1985.

6) **Ishii H, Uchiyama H, Kazama M**: Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemostas* 65: 618—623, 1991.

7) **Davis MD, Myers FL, Bresnick GH, der Venecia G**: Natural evolution. In: L'Esperance FA Jr (Ed): *Current Diagnosis and Management of Chorioretinal Diseases*. CV Mosby, St Louis, 179—184, 1977.

8) **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. *Thromb Haemostas* 63: 157—162, 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味. *臨床病理* 37: 266—271, 1989.

10) **Tanaka A, Ishii H, Hiraishi S, Kazama M,**

Maezawa H: Increased thrombomodulin values in plasma of diabetic men with microangiopathy. *Clin Chem* 37: 269—272, 1991.

11) **Iwashima Y, Sato T, Watanabe K, Ooshima E, Hiraishi S, Ishii H, et al**: Elevation of plasma thrombomodulin level in diabetic patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes* 39: 983—988, 1990.

12) **Oida K, Takai H, Maeda H, Takahashi S, Tamai T, Nakai T, et al**: Plasma thrombomodulin concentration in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 10: 193—196, 1990.

13) **Takaya M, Ichikawa Y, Kobayashi N, Kawada T, Shimizu H, Uchiyama M, et al**: Serum thrombomodulin and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 9: 495—499, 1991.

14) 石井秀美, 中野昌彦, 内山浩之, 風間睦美: Thrombomodulinの代謝. *臨床病理* 特81 (臨時増刊号): 143—148, 1989.