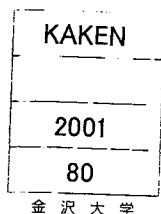


白血病における白血球インテグリンMaC-1を介する線溶機序

著者	森下 英里子
著者別表示	Morishita Eriko
雑誌名	平成13(2001)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2000-2001
ページ	41p.
発行年	2002-03
URL	http://doi.org/10.24517/00051157





白血病における白血球インテグリン Mac-1 を介する線溶機序

研究課題番号 12672239

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 森下 英理子
(金沢大学医学部助教授)

著 者 寄 贈

は し が き

白血病特に急性前骨髄性白血病 (acute promyelocytic leukemia ; APL) では、高率に凝固線溶異常を合併することが知られているが、その機序については不明な点が多い。その凝固開始機序としては、以前より白血病細胞が発現する組織因子 (tissue factor ; TF) が重要であるといわれているが、我々は APL 患者血中に必ずしも TF が高値を示さない例が存在することを確認しており、また APL 細胞で TF 抗原が確認できない例の報告もあり、TF 以外の別の凝固開始機序の可能性を考えている。一方、白血球表面に発現される接着因子レセプターである Mac-1 (別名 CD11b/CD18) は、凝固第 X 因子 (FX) と特異的に結合し FX を活性化第 X 因子 (FXa) に活性化することが明らかとなり、TF 以外の凝固開始機構として興味深い。そこでわれわれは、白血病における凝固系異常の原因の一つとして、TF 以外の別系路として Mac-1 を介する Xa 生成機序が存在するかどうかについて検討した。

研 究 組 織

研究代表者：森下英理子（金沢大学医学部助教授）

研究分担者：山崎雅英（金沢大学医学部助手）

交付決定額（配分額）

平成 12 年度 2000 千円

平成 13 年度 1400 千円

総計 3400 千円

研 究 発 表

(1) 学会誌

1. Morishita E, Asakura H, Saito M, Yamazaki M, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Matsuda T, Nakao S: Elevated plasma levels of free-form of TFPI in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 154: 203-212, 2001.
2. Morishita E, Yamaguchi K, Asakura H, Saito M, Yamazaki M, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Nakao S: One missence mutation in the factor X gene causing factor X deficiency (factor X Kanazawa). *Internatinal*

- Journal of Hematology* 73: 390–392, 2001.
3. Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato N, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Suga Y, Miyamoto K, Takami A, Nakao S: Elevated levels of free tissue factor pathway inhibitor antigen in cases of disseminated intravascular coagulation caused by various underlying diseases. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 12: 1–8, 2001.
 4. Asakura H, Aoshima K, Suga Y, Yamazaki M, Morishita E, Saito M, Miyamoto K, Nakao S: Beneficial effect of the active form of vitamin D3 against LPS-induced DIC but not against tissue-factor-induced DIC in rat models. *Thrombosis and Haemostasis* 85: 287–290, 2001.
 5. Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato N, Saito M, Kumabashiri I, Morishita E, Yamazaki M, Aoshima K, Nakao S: An enhanced fibrinolysis prevents the development of multiple organ failure in disseminated intravascular coagulation in spite of much activation of blood coagulation. *Critical Care Medicine* 29: 1164–1168, 2001.
 6. Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Ito T, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Suga Y, Miyamoto K, Nakao S: Depressed plasma activity of plasminogen or a₂ plasmin inhibitor is not due to consumption coagulopathy in septic patients with DIC. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 12: 275–281, 2001.
 7. Asakura H, Aoshima K, Ichino T, Suga Y, Saito M, Morishita E,

- Yamazaki M, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Miyamoto K, Nakao S:
All-trans retinoic acid is partially effective against lipopolysaccharide-
induced but not against tissue-factor-induced DIC in rat models.
Blood Coagulation and Fibrinolysis 12: 301-306, 2001.
8. Asakura H, Myou S, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Nakao S: Vitamin K administration to elderly patients with osteoporosis induces no hemostatic activation, even in those with suspected vitamin K deficiency. *Osteoporosis International* 12: 996-1000, 2001.
9. Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Ito T, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Aoshima K, Takami A, Yoshida T, Suga Y, Miyamoto K, Nakao S: Decreased plasma activity of antithrombin or protein C is not due to consumption coagulopathy in septic patients with disseminated intravascular coagulation. *European Journal of Haematology* 67: 170-175, 2001.
10. Morishita E, Minami S, Ishino C, Kanno M, Uotani C, Asakura H, Matsuda T, Nakao S: Atorvastatin reduces plasma levels of factor VII activity and factor VII antigen in patients with hyperlipidemia. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 9: 2002. In press
11. 青島敬二、朝倉英策、山崎雅英、齊藤正典、熊走一郎、森下英理子、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、松田保：血液透析患者における血中 tissue

- factor pathway inhibitor (TFPI)の1年間の変動とヘパリン負荷テストによるTFPIの変化. 腎臓 22: 224-227, 2000.
12. 森下英理子、朝倉英策、斉藤正典、山崎雅英、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、中尾真二: Arg¹⁶⁹/Trp 変異を認めた先天性プロテインC欠乏症. 臨床血液 42: 104-109, 2001.
 13. 森下英理子: スタチンの線溶系ならびにレオロジーへの効果. Geriatric Medicine 39: 581-586, 2001.
 14. 森下英理子: 先天性プロトロンビン異常症 (Prothrombin Himi). 日本血栓止血学会誌 12: 231-234, 2001.
 15. 奥平真理子、朝倉英策、佐野陽子、管幸生、山崎雅英、青島敬二、森下英理子、斉藤正典、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、宮本謙一、中尾真二: LPS または組織因子誘発ラット DIC モデルにおける血管作動性物質の動態の比較. 日本血栓止血学会誌 12: 273-279, 2001.
 16. 奥平真理子、朝倉英策、佐野陽子、管幸生、山崎雅英、青島敬二、森下英理子、斉藤正典、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、宮本謙一、中尾真二: 生理的状態のラットにおける一酸化窒素の抗血栓性の役割. 日本血栓止血学会誌 12: 288-293, 2001.
 17. 山崎雅英: 抗リン脂質抗体症候群の病態について. 日本血栓止血学会誌 12: 333-, 2001.
 18. 山崎雅英、伊藤貴子、吉田知孝、加藤みのり、御館靖雄、水谷朋恵、斉藤正典、森下英理子、朝倉英策、塚正彦、中尾真二: 網膜中心静脈血栓症を

併発した抗リン脂質抗体陽性重症再生不良性貧血の 1 例. 日本血栓止血学会誌 12: 487-492, 2001.

19. 御館靖雄、朝倉英策、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、山崎雅英、森下英理子、吉田知孝、斉藤正典、青島敬二、南真司、中尾眞二：ループスアンチコアグラントの検出について一冠攣縮性狭心症から心筋梗塞をきたした 1 例を通じて一. 日本血栓止血学会誌 12: 493-499, 2001.
20. 御館靖雄、朝倉英策、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、山崎雅英、森下英理子、吉田知孝、斉藤正典、青島敬二、南真司、中尾眞二：摘脾後に肺梗塞を発症した抗リン脂質抗体症候群合併 ITP の 1 例. 日本血栓止血学会誌 13: 47-54, 2002.

(2) 口頭発表

1. Morishita E. Hemostatic imbalance in patients with hyperlipidemia. XVth International Congress on Fibrinolysis and Haemostasis Proteolysis. 2000. 6. 25-29, Hamamatsu, Japan.
2. 山崎雅英、朝倉英策：Inflammatory Cytokine と播種性血管内凝固. 第 21 回日本炎症学会. 2000. 7. 4-5, 東京.
3. 朝倉英策、菅幸生、奥平真理子、山崎雅英、斉藤正典、森下英理子、中尾眞二：組織因子または LPS 誘発 DIC モデルの病態比較とエンドセリン受容体拮抗薬の効果. 第 24 回ヘパリン研究会. 2000. 7. 22, 東京.

4. Yamazaki M, D.A.Triplett : Relationship between a subtype of antiprothrombin antibodies (anti-PT) and a clinical feature of antiphospholipid syndrome (APS). IXth International Symposium of Antiphospholipid Syndrome. 2000. 9. 12-16, France.
5. 山崎雅英、杉森尚美、高見昭良、近藤恭夫、中条達也、塩原信太郎、中尾眞二、金沢大学骨髄移植チーム : Mycophenolate mofetil (MMF)が奏効した治療抵抗性 GVHD. 第 42 回日本臨床血液学会. 2000. 11. 8-10, 倉敷.
6. 朝倉英策、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、斉藤正典、森下英理子、山崎雅英、青島敬二、吉田知孝、中尾眞二 : 組織因子または LPS 誘発 DIC モデルの病態比較—凝固・線溶・臓器傷害の観点から—. 第 42 回日本臨床血液学会. 2000. 11. 8-10, 倉敷.
7. 朝倉英策、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、斉藤正典、森下英理子、山崎雅英、青島敬二、吉田知孝、中尾眞二 : ラット DIC モデルにおける経時的病態変動の比較— DIC 誘発物質による相違—. 第 23 回日本血栓止血学会学術集会. 2000. 11. 21-22, 名古屋.
8. 森下英理子、佐々木明子、扇谷晶子、朝倉英策、斉藤正典、山崎雅英、中尾眞二 : PC R169W: 先天性プロテイン C 欠乏症 (Protein C Kanazawa) の遺伝子解析. 第 23 回日本血栓止血学会学術集会. 2000. 11. 21-22, 名古屋.
9. 山崎雅英、小川博和、加藤みのり、御館靖雄、水谷朋恵、青島敬二、斉藤正典、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二 : 抗リン脂質抗体症候群の多様性

- と抗プロトロンビン抗体の多様性との関連：血管内皮細胞に及ぼす影響。第 23 回日本血栓止血学会学術集会. 2000. 11. 21-22, 名古屋.
10. Yamazaki M, Nakao S, D.A.Triplett. : Four different subtypes of anti-prothrombin antibodies (anti-PT) with different ligand-specificity determine heterogeneity in hemostatic features of antiphospholipid syndrome (APS): further characterization of their thrombotic effects in vitro. 42nd American Society of Hematology. 2000. 12. 1-5, Sanfrancisco, USA.
11. 朝倉英策、奥平真理子、佐野陽子、森下英理子、山崎雅英、中尾眞二：ラット DIC モデルにおける血管作動性物質の役割。厚生省特定疾患調査研究事業血液凝固異常症調査研究. 2001. 2. 10, 京都.
12. 御館靖雄、金谷由紀子、栗山政人、米山宏、手丸理恵、五島敏、真司、山崎雅英、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二：抗リン脂質抗体の検出について 一非 Q 波性心筋梗塞を合併した一例を通じて一。第 183 回日本内科学会北陸地方会. 2001. 3. 11, 金沢.
13. 森下英理子、朝倉英策、斉藤正典、山崎雅英、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、中尾眞二：血小板膜蛋白 $Ib\alpha$ の遺伝子多型と冠動脈疾患。第 63 回日本血液学会総会. 2001. 4, 名古屋.
14. 山崎雅英、伊藤貴子、加藤みのり、御館靖雄、水谷朋恵、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二：劇症型抗リン脂質抗体症候群における血漿吸着療法の有用性。第 63 回日本血液学会総会. 2001. 4, 名古屋.

15. 朝倉英策、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、齊藤正典、森下英理子、山崎雅英、青島敬二、吉田知孝、中尾眞二：ラット LPS 誘発 DIC モデルにおけるエンドセリンの役割. 第 63 回日本血液学会総会. 2001. 4, 名古屋.
16. 加藤みのり、朝倉英策、松本雅則、藤村吉博、齊藤正典、森下英理子、山崎雅英、御館靖雄、水谷朋恵、中村喜久、大竹茂樹、中尾眞二：vWF 特異的切断酵素に対する自己抗体が証明された産褥期血栓性血小板減少性紫斑病の一例. 第 63 回日本血液学会総会. 2001. 4, 名古屋.
17. 渡邊有美、森下英理子：甲状腺機能亢進症と血中 TAFI 抗原量の変動. 第 26 回北陸臨床病理集談会総会. 2001, 9, 金沢.
18. 吉田知孝、藤田信一、小林勉、森下英理子：抗リン脂質抗体症候群における血中 TAFI 抗原量の検討. 第 26 回北陸臨床病理集談会総会. 2001. 9. 9, 金沢.
19. 上田暁子、森下英理子：触媒領域に新しい変異を認めた先天性第 X 因子欠損症の遺伝子解析. 第 26 回北陸臨床病理集談会総会. 2001. 9.9, 金沢.
20. 浜中由実子、森下英理子、平野京子、吉田知孝、朝倉英策、山崎雅英、中尾眞二、丸田高広：先天性プロテイン C 欠損症の遺伝子解析. 第 26 回北陸臨床病理集談会総会. 2001. 9. 9, 金沢.
21. 森下英理子、朝倉英策、齊藤正典、山崎雅英、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、中尾眞二：甲状腺機能亢進症と血中 TAFI 抗原量の検討. 第 43 回日本臨床血液学会総会. 2001. 11, 神戸.
22. 水谷朋恵、森下英理子、吉田知孝、朝倉英策、齊藤正典、魚谷知佳、

- 山崎雅英、御館靖雄、加藤みのり、中尾眞二：高脂血症患者における血中 TAFI 抗原量の検討. 第 43 回日本臨床血液学会総会. 2001. 11, 神戸.
23. 御館靖雄、朝倉英策、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、山崎雅英、森下英理子、斉藤正典、青島敬二、吉田知孝、中尾眞二：摘脾後に肺梗塞を発症した抗リン脂質抗体症候群合併 ITP の一例. 第 43 回日本臨床血液学会総会. 2001. 11, 神戸.
24. 山崎雅英、伊藤貴子、加藤みのり、御館靖雄、水谷朋恵、朝倉英策、中尾眞二：抗プロトロンビン抗体の血管内皮・単球・血小板に及ぼす影響. 第 43 回日本臨床血液学会総会. 2001. 11, 神戸.
25. 山崎雅英、吉田知孝、加藤みのり、御館靖雄、水谷朋恵、斉藤正典、森下英理子、伊藤貴子、青島敬二、朝倉英策、中尾眞二：エバンス症候群における抗リン脂質抗体の頻度と臨床的意義. 第 24 回日本血栓止血学会学術集会. 2001. 11, 京都.
26. 金田みのり、山崎雅英、吉田知孝、朝倉英策、伊藤貴子、御館靖雄、水谷朋恵、青島敬二、斉藤正典、森下英理子、中尾眞二：LA 診断におけるラッセル蛇毒試験の意義. 第 24 回日本血栓止血学会学術集会. 2001. 11, 京都.
27. 朝倉英策、奥平真理子、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、山崎雅英、青島敬二、森下英理子、斉藤正典、吉田知孝、宮本謙一、中尾眞二：LPS および組織因子誘発ラット DIC モデルにおける血中 NOX、エンドセリンの動態. 第 24 回日本血栓止血学会学術集会. 2001. 11, 京都.

研 究 成 果

主として平成 12 年度に行った患者白血病細胞の procoagulant activity (PCA) および第 X 因子活性化能、プラスミン活性化能についての研究成果と、平成 13 年度に行った患者白血病細胞上 Mac-1 の発現率と臨床的な凝血学的所見についての研究成果を報告する。

(I) 患者白血病細胞の procoagulant activity (PCA) および tissue factor (TF) 活性・抗原量、プラスミノゲン活性化能

白血病は DIC の重要な基礎疾患であり、また逆に DIC は白血病のきわめて重要な合併症である。白血病の型別の DIC の合併率をみると、APL の合併率が 60~64%に達し、しかもその際の致死率は 9~26%と報告されている^{1) -3)}。

白血病細胞、とくに APL 細胞の含む凝固促進因子については古くより検討されており、DIC の発症に白血病細胞由来の TF が深く関与していることは確かである。今までの報告によると、APL 細胞は強い凝固促進作用を有することが示されており、この凝固促進作用は外因系を介し、免疫学的に脳の TF と交差性があり、さらに TF としての高い活性が存在がし、しかも DIC の合併に関連することが証明されている。

今回白血病患者 12 例を対象として、PCA、TF 活性および TF 抗原量を測定し、凝固促進作用と TF の関連についてまず検討した。さらに、プラスミン生成量を測定し線溶活性化能について検討した。

対 象

対象症例は、金沢大学第三内科に治療のために入院した急性非リンパ性白血病（ANLL）患者 9 例、急性リンパ性白血病（ALL）患者 3 例である。内訳は FAB 分類にて、M2 : 2 例、M3 : 6 例、M4 : 1 例、L1 : 3 例である（表 1）。

方 法

1) 白血病細胞ホモジネートの作製

化学療法直前に、患者から採取した骨髓液より白血病細胞を分離し PBS に浮遊させ（ 1×10^8 個 /ml に調整）、ホモゲナイズした。得られた白血病細胞ホモジネートは測定時まで、 -70°C で凍結保存した。

2) HL-60 細胞培養

RPMI-1640 / 10% inactivated fetal calf serum (FCS) 培養液中に、 2×10^5 個/ml の HL-60 細胞になるように調整し、5% CO_2 、 37°C の条件で前培養した。エンドトキシン (lipopolysaccharide from *E. coli* 026: B6, Sigma, St. Loise, MO, USA) $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加後、0、2、4、6、12 時間後に細胞培養液から HL-60 細胞を $500 \times \text{g}$ 、10 分にて遠心分離した。採取した細胞を生理食塩水で 2 回洗浄後、phosphate buffered saline (PBS) に浮遊させ（ 5×10^6 個 /ml に調整）ホモゲナイズし、HL-60 ホモジネートを作製した。

得られた HL-60 ホモジネートは測定時まで、 -70°C で凍結保存した。

3) Procoagulant activity (PCA)の測定

PCA は一段法による凝固時間法にて測定した。つまり、各種細胞ホモジネート 0.1 ml と、正常血漿 0.1 ml を 37°C 、3 分間インキュベート後、25 mMol CaCl_2 0.1 ml を添加し、ただちに凝固時間を測定した。正常血漿の代わりに、第 VII 因子欠乏血漿 (Baxter, Miami, USA)、第 X 因子欠乏血漿 (Baxter) を用いて PCA を測定した。

4) Tissue factor (TF) activity の測定

各種細胞ホモジネート中の TF 活性は、各種細胞ホモジネートに血液凝固第 IX 因子複合体製剤 (PROPLEX ST, Baxter) を加え 37°C 、3 分間インキュベート後、発色合成基質 S2222 (Kabi) を加え、吸光度の変化により活性化第 X 因子の生成を測定した。

5) TF 抗原量の測定

各種細胞ホモジネート中の TF 抗原量は、ELISA kit (IMUBIND Tissue Factor ELISA; American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) を用いて測定した。検体は、緩衝液 0.05 M Tris, pH 7.5 / 2% bovine serum albumin / 0.05% Tween 20 で 1 : 5 に希釈して用いた。

6) 凝血学的検査および DIC の診断

採血は 3.8%クエン酸ナトリウム 0.5 ml 入り真空採血管に、4.5 ml の患者血液を採取し、速やかに 4℃、3000 rpm、10 分間遠心分離して血漿を得た。各測定項目のうち、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン濃度、FDP、D-dimer は採血後ただちに測定した。

PT はシンプラスチン (Oraganon Teknika, Turnhout, Belgium) を試薬とし、また APTT はプラテリン・プラス・アクチベータ (Oraganon Teknika) を試薬とし、Quick 一段法により自動測定装置 (Auto-Fi; Dade, Miami, USA) を用いて測定した。フィブリノゲンはトロンビン時間法による測定キットであるデータファイ・フィブリノゲン (Baxter) を用いて、自動測定装置にて測定した。血中 FDP 値および D-dimer は、エルピア FDP (帝国臓器、東京)、エルピアエース D-D ダイマー (ヤترون、東京) にて測定した。

DIC の診断は、1988 年の厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班の DIC 診断基準 (表 2) を用いた。

7) プラスミノゲン活性化能の測定

白血病細胞ホモジネートにプラスミノゲンを加えインキュベート後、発色合成基質 S2251 (Kabi) を加え、吸光度の変化によりプラスミン生成量を測定した。

8) 統計学的検討

凝血学的検査所見および PCA は平均値±標準誤差で示し、各白血病群を Wilcoxon 検定を用いて検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。白血病細胞ホモジネートの TF 活性や TF 抗原量は、正規分布しないため中央値（25-75 パーセンタイル値）で示し、統計学的解析は Mann-Whitney の U 検定あるいは Kruskal-Wallis の検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) 対象患者の DIC の判定

対象患者の症状、凝血学的検査所見から、DIC の診断基準に基づき DIC の判定を行った。化学療法開始前に DIC と診断された症例は M3 の患者 5 例であり、化学療法開始後に DIC に移行した症例が 2 例（M2：2 例）であった（DIC 群）。5 例が DIC の合併を認めなかった（非 DIC 群）。

2) PCA の測定

患者白血病細胞ホモジネートおよび、エンドトキシン刺激後 HL-60 細胞ホモジネートを、正常血漿あるいは第 VII 因子欠乏血漿、第 X 因子欠乏血漿とインキュベートして、それぞれ PCA を測定をした（表 3）。正常血症を加えた場合、AML では ALL に比べて PCA は高値傾向を示した。特に、DIC を合併した M3（APL）では著しい高値を示す症例が多かった。

第 VII 因子欠乏血漿を加えると全例で PCA は低下するが、特に M3 での低下が顕著であり、M3 における凝固活性化のメインが TF-VII 経路であることが示される。第 X 因子欠乏血漿を加えた場合は、全例で PCA が著明に低下した。第 VII 因子欠乏血漿を用いると正常血漿を用いた場合に比べると凝固時間はかなり延長するが、第 X 因子欠乏血漿を用いた場合よりは短縮している。つまり、TF-VII 経路以外に FX を活性化して凝固を促進する機序の存在が考えられる。

3) HL-60 細胞ホモジネートの TF 活性および TF 抗原量の測定

HL-60 細胞ホモジネートを用いて、TF 活性および TF 抗原量を測定した。エンドトキシン刺激前の HL-60 細胞の TF 活性は 6 ± 2 U/ml であり、TF 抗原量は 160 ± 30 ng/ml であったが、エンドトキシンで 6 時間刺激後の TF 活性は 26 ± 4 U/ml、TF 抗原量は 471 ± 83 ng/ml と有意に上昇した。

4) 患者白血病細胞ホモジネートの TF 活性および TF 抗原量の測定

患者白血病細胞ホモジネートを用いて、TF 活性 (図 1) および TF 抗原量 (図 2) を測定した (表 4)。病型別にみると、M3 が他の病型に比べて TF 活性、TF 抗原量ともに高値であることが、表 4 や図 1、2 より示される。しかし、図 2 より M3 の中でも DIC を合併していない 1 例は、合併している 5 例に比べて明らかに TF 活性や TF 抗原量が低値であった。

次に、DIC 群と非 DIC 群とで分類した場合の結果を、表 5 に示す。DIC 群

では非 DIC 群に比べて、有意に TF 活性や TF 抗原量が増加していた。

5) 患者白血病細胞ホモジネートのプラスミノゲン活性化能の測定

患者白血病細胞ホモジネートを用いて、プラスミン生成量を測定した。DIC を合併した APL ではプラスミン生成量の著増例が多く、APL 以外の AML、ALL でも DIC 合併例では高値を示す症例も認められた。

考 察

以上の結果より、DIC を合併した患者由来の白血病細胞は、DIC を合併しないものよりも TF 活性や抗原量が高く、また APL 以外の白血病は APL に比べて白血病細胞中の TF 活性や抗原量が低かった。つまり、APL に伴う凝固障害については、TF が主とした要因になっているものと考えられる。しかし、APL に合併する凝固障害の発生機序が単一とは限らないことが、第 VII 因子欠乏血漿を用いた検討などから推測される。

なお、今回の HL-60 を用いた検討でも、エンドトキシン刺激により、TF 活性や抗原量は著増していた。白血病細胞の TF の発現はエンドトキシンによって増強するという報告があり⁴⁾、感染症を合併すると白血病細胞での TF の発現が増強し、DIC が増悪したり合併しやすくなると考えられる。

一方、APL などではプラスミノゲン活性化能が有意に高値であったが、Mac-1 発現率は M4 などと比べると高くなかった。したがって、APL の線溶亢進にお

ける Mac-1 の関与はプラスミンほど大きくなく、むしろ好中球エラスターゼの関与の方が優位である可能性が示された。

(II) 患者白血病細胞上 Mac-1 の発現率と臨床的な凝血学的所見

白血病特に APL では、高率に凝固線溶異常を合併することが知られており、その凝固開始機序としてはすでに述べたが白血病細胞が発現する TF が重要である。しかし我々は前述した検討で、APL 患者血中に必ずしも TF が高値を示さない例が存在することを確認しており、また APL 細胞で TF 抗原が確認できない例の報告もあり、TF 以外の別の凝固開始機序の可能性を考えている。また、第 VII 因子および第 X 因子欠乏血漿を用いた PCA の測定の検討からも、白血病の凝固活性化機序が単一ではない可能性が考えられる。

一方、白血球表面に発現される接着因子レセプターである Mac-1 (別名 CD11b / CD18) は、凝固第 X 因子 (FX) と特異的に結合し FX を活性化 (Fxa) することが明らかとなり⁵⁾、TF 以外の凝固開始機構として興味深い。そこで、白血病における凝固系異常の原因の一つとして、TF 以外の別系路として Mac-1 を介する Xa 生成機序が存在するかどうかについて検討した。

対 象

対象症例は、金沢大学第三内科に治療のために入院した白血病患者 27 例である。年齢：18～72 歳 (中央値 40 歳、平均値 42.2 歳)、性別：男/女=17 例/10 例。内訳は、急性非リンパ性白血病 (ANLL) 18 例 (FAB 分類にて M1 : 3 例、M2 : 9 例、M3 : 2 例、M4 : 3 例、M6 : 1 例)、急性リンパ性白血病 (ALL) 3 例、Large granular cell leukemia (LGL 白血病) 1 例、急性混合

性白血病 (AMixL) 2 例、骨髓異形成症候群 (MDS) 1 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 2 例である。病期別では、LGL 白血病が first relapse 症例であり、CML は 2 例とも急性転化例であったが、その他の症例は全例初発例であった。

方 法

1) フローサイトメトリー (FCM) による Mac-1 陽性率の測定

治療開始前に白血病患者末梢血を採取し、その検体を比重遠心法にて単核球分離し、洗浄後 PBS に浮遊させた。この検体を FITC 標識 CD45 抗体 (Becton Dickinson, NJ, USA) で標識し、FACScan (Becton Dickinson) で芽球分画を gating したのち、FITC 標識 Mac-1 抗体 (Becton Dickinson)、CD14 抗体 (Becton Dickinson) と反応させた。芽球分画は 10,000 個取り込み、Mac-1、CD14 陽性率を解析した。

2) 凝血学的検査

採血は 3.8%クエン酸ナトリウム 0.5 ml 入り真空採血管に、4.5 ml の患者血液を採取し、速やかに 4℃、3000 rpm、10 分間遠心分離して血漿を得た。各測定項目のうち、PT、APTT、フィブリノゲン濃度、FDP、D-dimer は採血後ただちに測定し、残りの血漿は-80℃にて凍結保存し、随時融解して使用した。

PT はシンプラスチン (Oraganon Teknika, Turnhout, Belgium) を試薬とし、また APTT はプラテリン・プラス・アクチベータ (Oraganon Teknika)

を試薬とし、Quick 一段法により自動測定装置 (Auto-Fi, Dade, Miami, USA) を用いて測定した。フィブリノゲンはトロンビン時間法による測定キットであるデータファイ・フィブリノゲン (Baxter, Miami, USA) を用いて、自動測定装置にて測定した。血中 FDP 値および D-dimer は、エルピア FDP (帝国臓器、東京)、エルピアエース D-D ダイマー (ヤترون、東京) にて測定した。血中トロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT)、プラスミン・ α_2 プラスミンインヒビター複合体 (PIC) の測定は、それぞれの ELISA キットであるエンザイグノスト TAT micro (デイド・ベーリング、東京)、エルピアエース PPI (ヤترون) を使用した。

DIC の診断は、1988 年の厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班の DIC 診断基準 (表 2) を用いた。

3) 統計学的検討

凝血学的検査所見は平均値±標準誤差で示し、DIC 群と非 DIC 群を Wilcoxon 検定を用いて検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。白血病細胞表面上の Mac-1 や CD-14 の発現率は、正規分布しないため中央値 (25-75 パーセンタイル値) で示し、統計学的解析は Mann-Whitney の U 検定あるいは Kruskal-Wallis の検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) 対象患者の血液学的所見

対象患者の症状、凝血学的検査所見から、DICの診断基準に基づきDICの判定を行った。化学療法開始前にDICと診断された症例は3例（M2：1例、M3：1例、M6：1例）であり、化学療法開始後にDICに移行した症例が5例（M3：1例、ALL：2例、LGL白血病：1例、AMixL：1例）であった（DIC群）。その他の10例は、DICの合併を認めなかった（非DIC群）。

DIC群および非DIC群の凝血学的所見は、表6に示す。DIC群では非DIC群に比べて、FDP、D-dimer、TAT、PIC値が有意に高値であったが、PT、APTT、フィブリノゲン、AT III値には有意差を認めなかった。

2) 末梢血白血病細胞上のMac-1陽性率

それぞれのMac-1発現率は、病型別に図3に示した。Mac-1陽性率は、ALLに比べてAMLの方が高く、特にAMixL（中央値：54.0%）、CML急性転化例（中央値：42.5%）で高値であり、M2（中央値：18.0%）やM4（中央値：11.0%）の中にも80%以上の陽性率を示す症例が認められた。しかし、予想に反して臨床的にDICを合併しやすいM3（中央値：7.5%）では最も低値であった。

3) DICとMac-1

M3の2例を含むDIC群8例と非DIC群19例における白血病細胞上Mac-1発現率を比較すると、DIC群の中央値は16.0%、非DIC群は32.0%であり

有意差を認めなかったがむしろ非合併例で高値であった（表 7）。

4) 凝血学的所見と Mac-1

Mac-1 発現率が 90% と高値であった M4 では、TAT、PIC の増加はわずかであった。Mac-1 発現率と、凝固線溶系パラメーター PT（図 4）、APTT（図 5）、FDP（図 6）、D-dimer（図 7）、フィブリノゲン（図 8）、TAT（図 9）、PIC（図 10）の間には有意な相関は認められなかった。

5) 末梢血白血病細胞上の CD14 発現率

CD14 は LPS レセプターとしての機能を有しており、今回同時に発現率を検討した。それぞれの CD14 発現率は、病型別に図 11 に示した。CD14 陽性率は、M2 で 2 例、M4 で 1 例高値を示した。予想に反して、臨床的に DIC を合併しやすい M3 では低値であった。

DIC の合併の有無で比較すると、DIC 群の中央値は 1.0%、非 DIC 群も 1.0% であり両群間に有意差を認めなかった（表 7）。

考 察

以上の結果より、白血病細胞上の Mac-1 を介した凝固活性化機序が、臨床的な凝固亢進状態を引き起こす可能性はきわめて少ないと考えられる。少なくとも、APL における DIC の発症には、Mac-1 の関与よりも白血病細胞中の TF

による凝固活性化が重要な要因になっているといえよう。APL細胞の破壊によってTFが血中に放出され凝固系を活性化し、その結果線溶系も活性化される。APL細胞には凝固促進物質以外に線溶促進物質も持つことが証明されているし⁶⁾、白血球エラスターゼやシステインプロテアーゼ等の蛋白分解酵素も含まれている⁷⁾。これらの因子が、DICの病態をさらに複雑にしているといえよう。

したがって、白血病に伴うDICの発生には白血病細胞由来の凝固促進因子、おもにTF、線溶促進因子および蛋白分解酵素が関与し、感染を合併すれば細菌由来のエンドトキシンや単球由来のサイトカインが病態を修飾すると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, et al. Acute promyelocytic leukemia. MD Anderson Hospital Experience. *Am J Med* 1986, 80; 789-797.
- 2) Cunningham T, Gee TS, Clarkson BD, et al. Acute promyelocytic leukemia. Treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood* 1989, 73; 1116-1122.
- 3) Rodeghiero F, Avvisati G, Castman G, et al. Early deaths and anti-hemorrhagic treatments in acute promyelocytic leukemia. A GIMEMA retrospective study in 268 consecutive patients. *Blood* 1990, 75; 2112-2117.
- 4) Naitoh M, Andoh K, Sadakata H, et al. Prediction of disseminated intravascular coagulation in patients with leukemia. *Intern Med* 1994, 33; 131-135.
- 5) Altieri DC, Morrissey JH, Edgington TS. Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation protease cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85; 7462-7466.
- 6) Stephens R, Alitalo R, Tapiovaara H, et al. Production of an active

urokinase by leukemia cells. A novel distinction from cell lines of solid tumors. *Leuk Res* 1988, 12; 419-422.

7) Falanga A, Alessio MG, Barbui T et al. A new procoagulant in acute leukemia *Blood* 1988, 71; 870-875.

表 1 患者背景

No.	性別	年齡	FAB 分類
1	F	35	M2
2	M	42	M2
3	M	42	M3
4	M	58	M3
5	M	38	M3
6	F	64	M3
7	F	39	M3
8	F	35	M3
9	F	37	M4
10	M	18	L1
11	M	72	L1
12	F	40	L1

表 2 厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班の DIC 診断基準
(1988 年改訂)

I. 基礎疾患		
あり		1
なし		0
II. 臨床症状		
1. 出血症状 (注 1)		
あり		1
なし		0
2. 臓器症状		
あり		1
なし		0
III. 検査成績		
1. 血清 FDP 値 ($\mu\text{g/ml}$)		
$40 \leq$		3
$20 \leq < 40$		2
$10 \leq < 20$		1
$10 >$		
2. 血小板数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		
$50 \leq$		3
$80 \leq > 50$		2
$120 \leq > 80$		1
$120 >$		0
3. 血漿フィブリノゲン濃度 (mg/dl)		
$100 \geq$		2
$150 \geq > 100$		1
$150 <$		0
4. プロトロンビン時間		
時間比 (正常対照値で割った値)		
$1.67 \leq$		2
$1.25 \leq < 1.67$		1
$1.25 >$		0
IV. 判定 (注 2)		
1. 7 点以上		DIC
6 点		DIC の疑い (注 3)
5 点以下		DIC の可能性は少ない
2. 白血病その他注 1 に該当する疾患		
4 点以上		DIC
3 点		DIC の疑い (注 3)
2 点以下		DIC の可能性は少ない
V. 診断のための補助的検査成績、所見		

1. 可溶性フィブリンモノマー陽性
2. D-D ダイマーの高値
3. トロンビン-アンチトロンビン III 複合体の高値
4. プラスミン- α 2 プラスミンインヒビター複合体の高値
5. 病態の進展に伴う得点の増加傾向の出現、とくに数日以内での血小板数あるいはフィブリノゲンの急激な減少傾向ないし FDP の急激な増加傾向の出現
6. 抗凝固療法による改善

VI.

注 1：白血病および類縁疾患、再生不良性貧血、抗腫瘍剤投与後などの骨髓巨核球減少が顕著で、高度の血小板減少をみる場合は血小板数および出血症状の項は 0 点とし、判定は IV-2 に従う。

注 2：基礎疾患が肝疾患の場合は以下の通りとする。

- a. 肝硬変および肝硬変に近い病態の慢性肝炎（組織上小葉改築傾向を認める慢性肝炎）の場合には、総得点から 3 点減点した上で、IV-1 の判定基準に従う。
- b. 劇症肝炎および上記を除く肝疾患の場合は、本診断をそのまま適応する。

注 3：DIC の疑われる患者で V. 診断のための補助的検査成績、所見のうち 2 項目以上満たせば DIC と判定する。

VII. 除外規定

1. 本診断基準は新生児、産科領域の DIC の診断には適用しない。
 2. 本診断基準は劇症肝炎の DIC の診断には適用しない。
-

表3 PCAの測定

	PCA (sec)				
	M2	M3	M4	L1	HL-60
正常血漿	68.1	39.8	62.3	72.1	55.2
第VII因子欠乏血漿	98.6	81.4	95.6	93.6	82.6
第X因子欠乏血漿	>180	>180	>180	>180	>180

表4 患者白血病細胞ホモジネートのTF活性およびTF抗原量 (病型別)

	TF活性 (U/10 ⁸ cells)	TF抗原量 (pg/ml/10 ⁸ cells)
M2	13.3 (9.6-17.0)	187 (145-229)
M3	15.3 (15.0-21.0)	188 (101-204)
M4	4	22
L1	9.6 (5.3-10.4)	59 (31-85)

中央値 (25-75%値)

表5 DIC群と非DIC群における白血球細胞ホモジネートのTF活性およびTF抗原量

	DIC群 (n = 7)	非DIC群 (n = 5)
TF活性 (U/10 ⁸ cells)	15.5 (15.0-23.7)	9.6 (6.2-10.6)*
TF抗原量 (pg/ml/10 ⁸ cells)	191 (155-223)	59 (22-68)**
中央値 (25-75%値)、*p < 0.05、**p < 0.005		

表6 DIC群と非DIC群における凝血学的検査所見

	DIC群 (n = 8)	非DIC群 (n = 19)
PT (sec)	12.5 ± 0.9	12.0 ± 0.9
APTT (sec)	37.9 ± 16.5	31.8 ± 5.0
FDP (μg/ml)	29.2 ± 36.2**	4.6 ± 2.8
D-dimer (μg/ml)	25.1 ± 33.5**	2.1 ± 1.9
TAT (ng/ml)	15.5 ± 18.3*	2.5 ± 2.5
PIC (μg/ml)	3.3 ± 3.0*	1.2 ± 0.6
Fbg (mg/dl)	378 ± 204	371 ± 93
AT III (%)	91 ± 21	90 ± 18
平均値 ± SD、*p < 0.05、**p < 0.01		

表7 DIC群と非DIC群における白血球細胞表面上 Mac-1、
CD14の発現率

	DIC群 (n = 8)	非DIC群 (n = 19)
Mac-1 (%)	16.0 (7.5-24.0)	32.0 (6.3-75.3)
CD14 (%)	1.0 (1.0-6.5)	1.0 (1.0-17.8)
中央値 (25-75%値)		

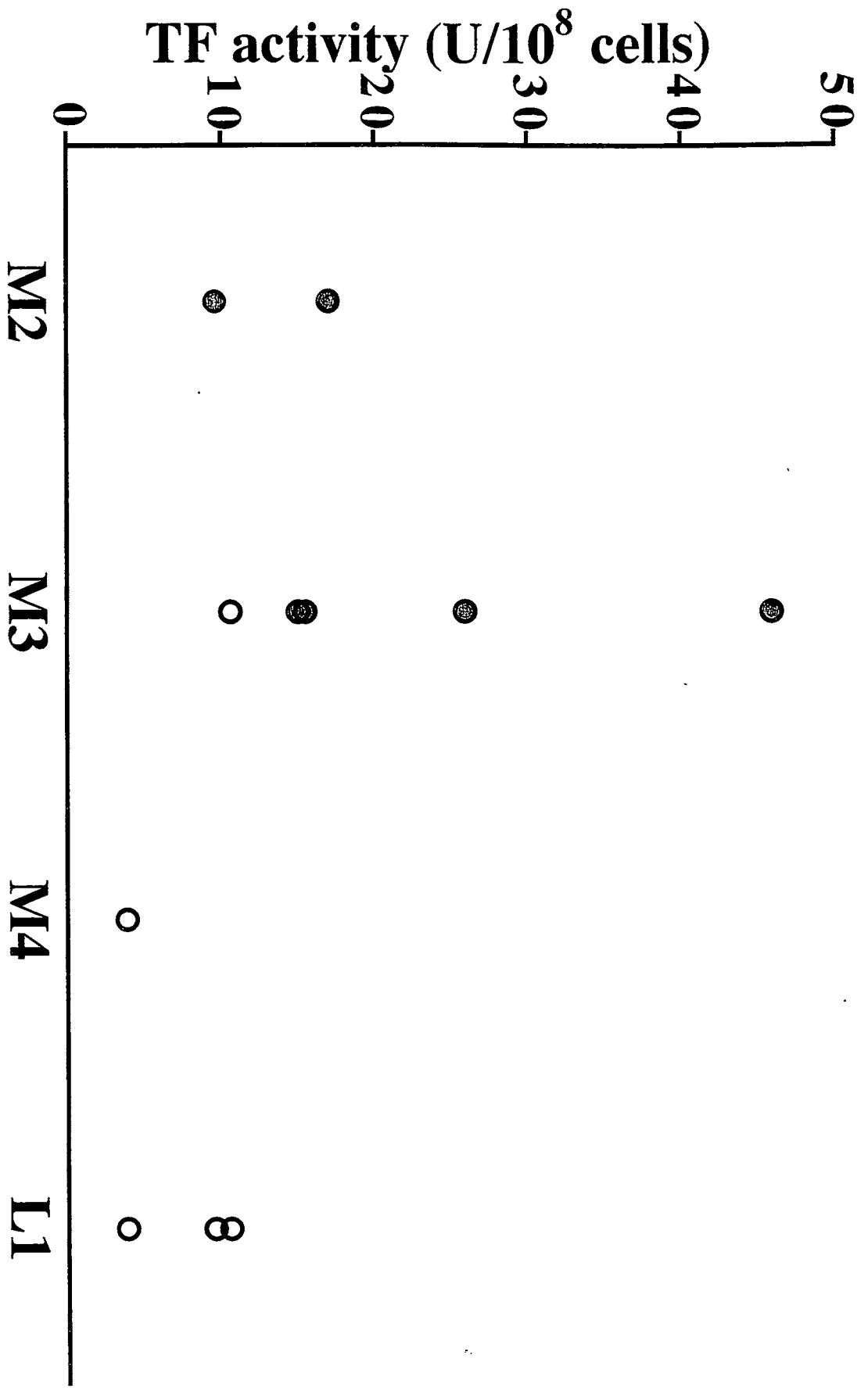


図1 患者白血病細胞ホモジネート中のTF活性

● : DIC合併例、○ : DIC非合併例

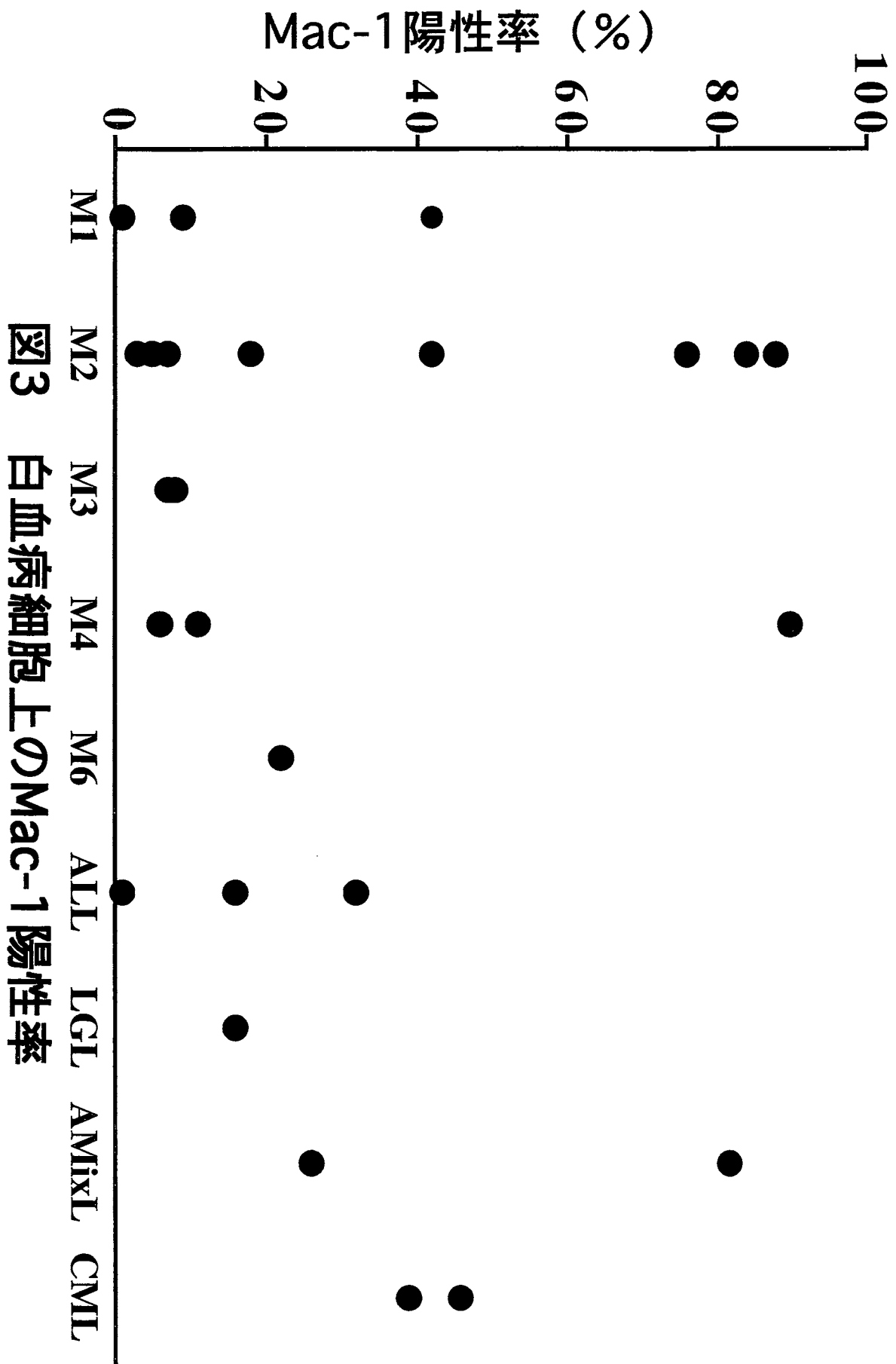


図3 白血病細胞上のMac-1陽性率

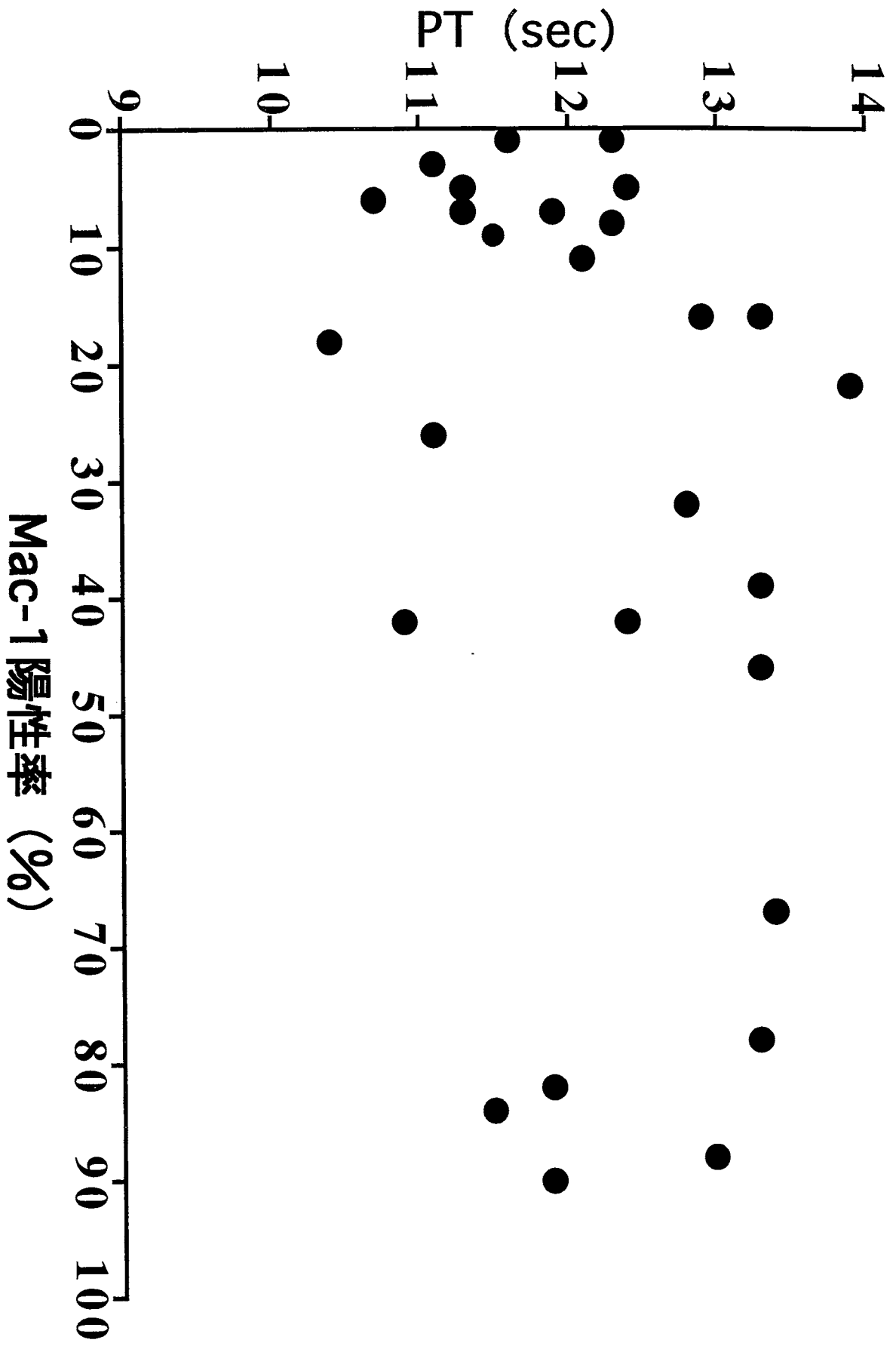


図4 Mac-1陽性率とPTとの相関

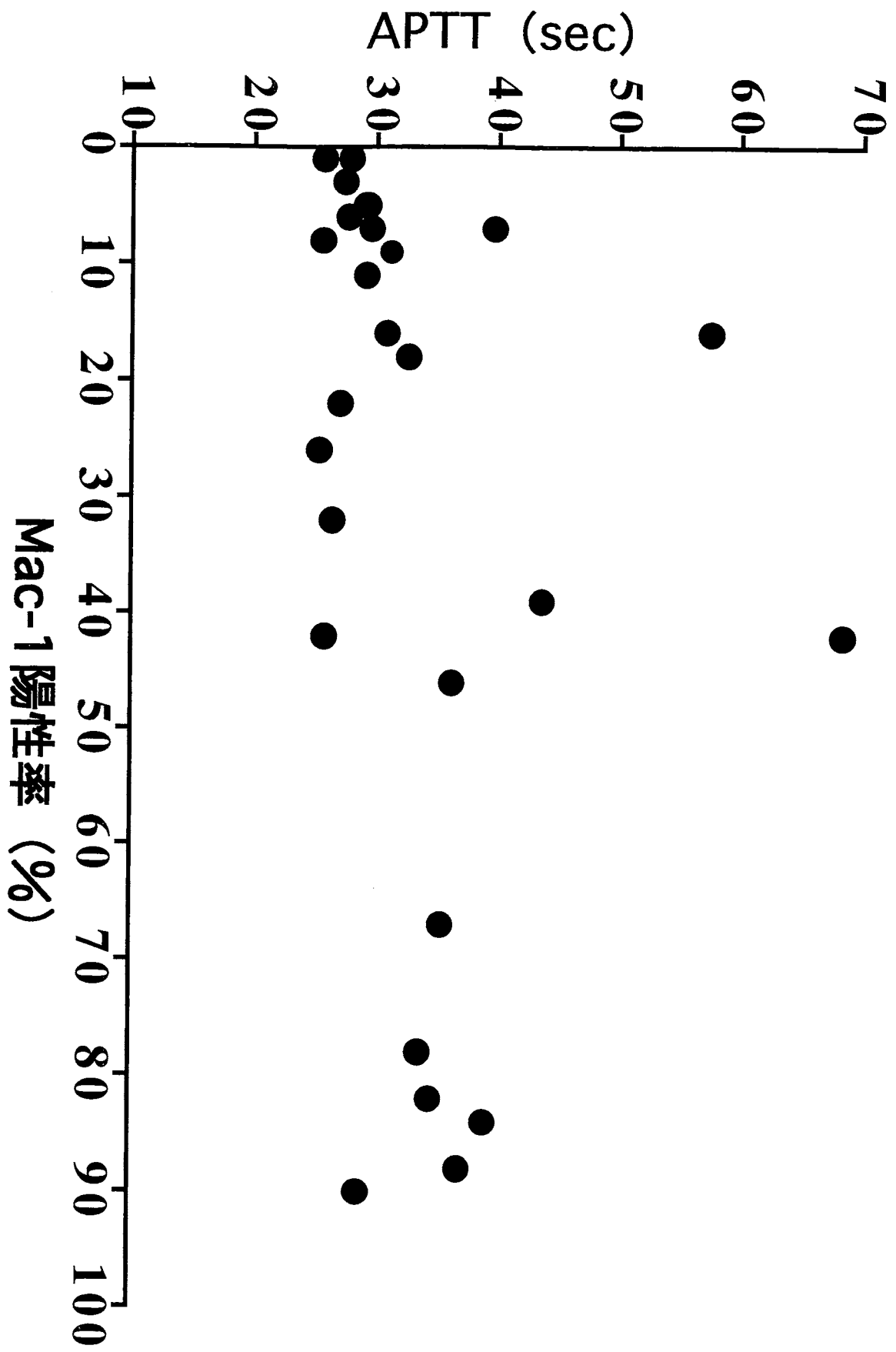
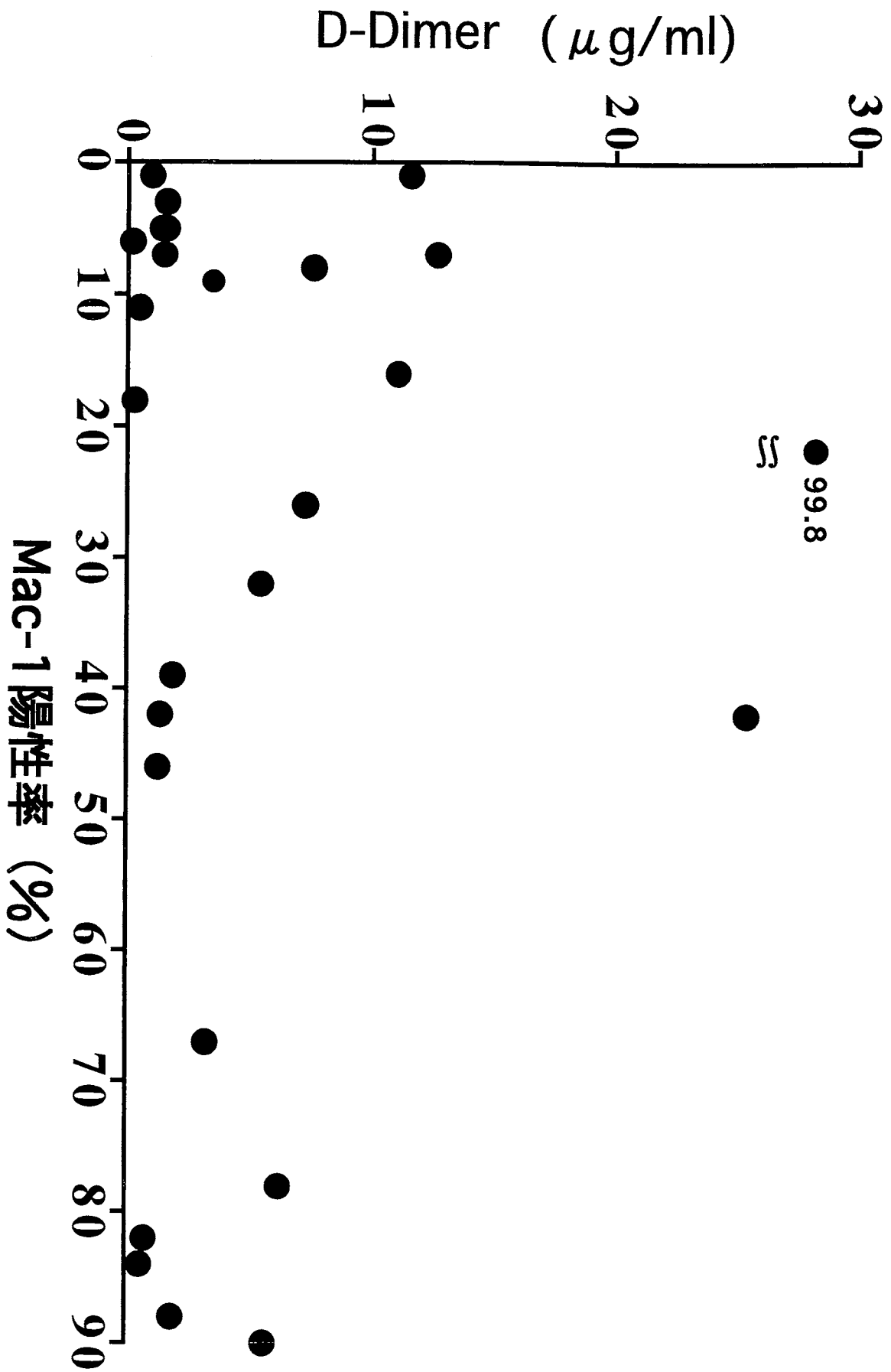


図5 Mac-1陽性率とAPTTとの相関



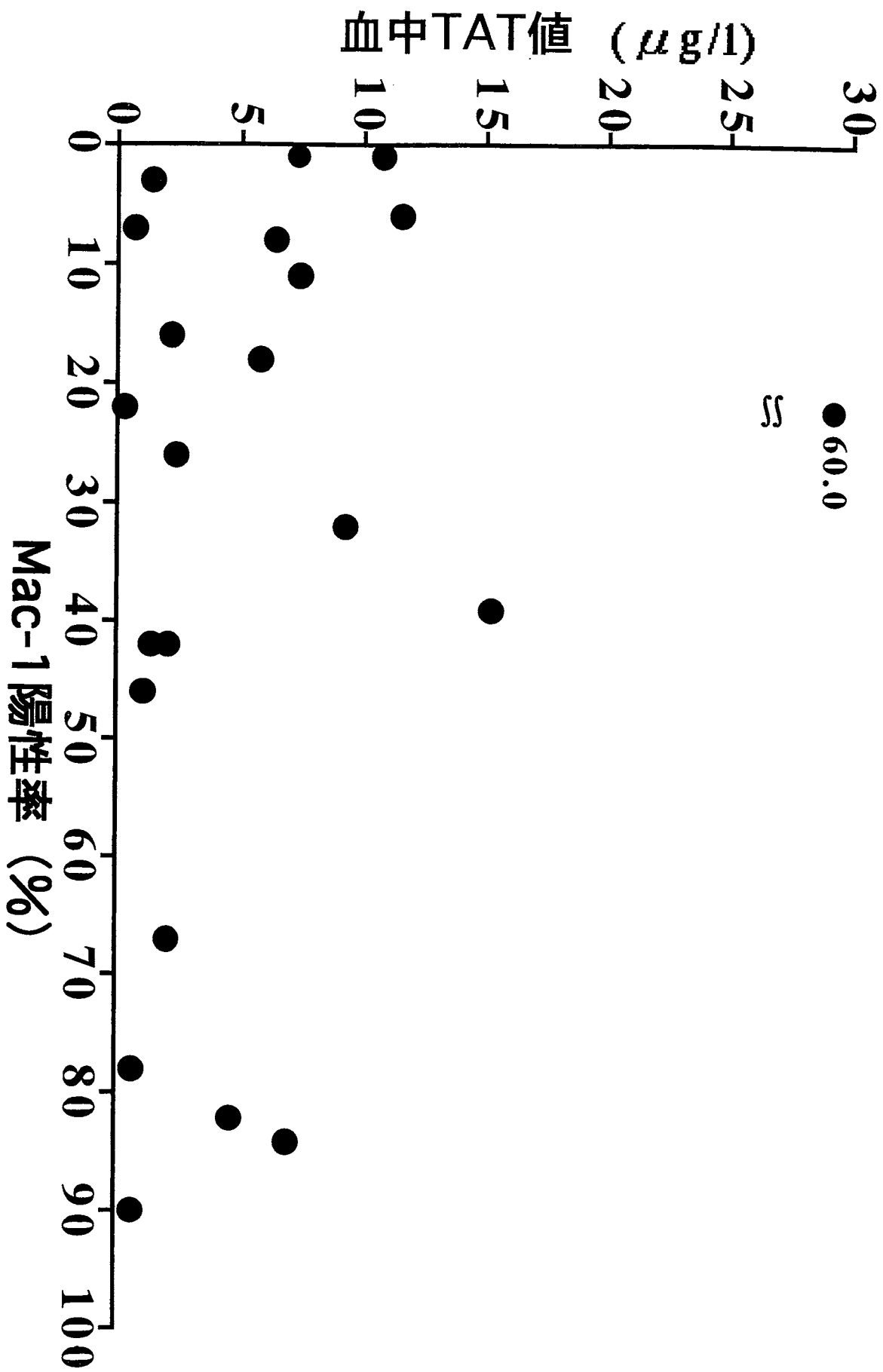


図9 Mac-1陽性率と血中TAT値との相関

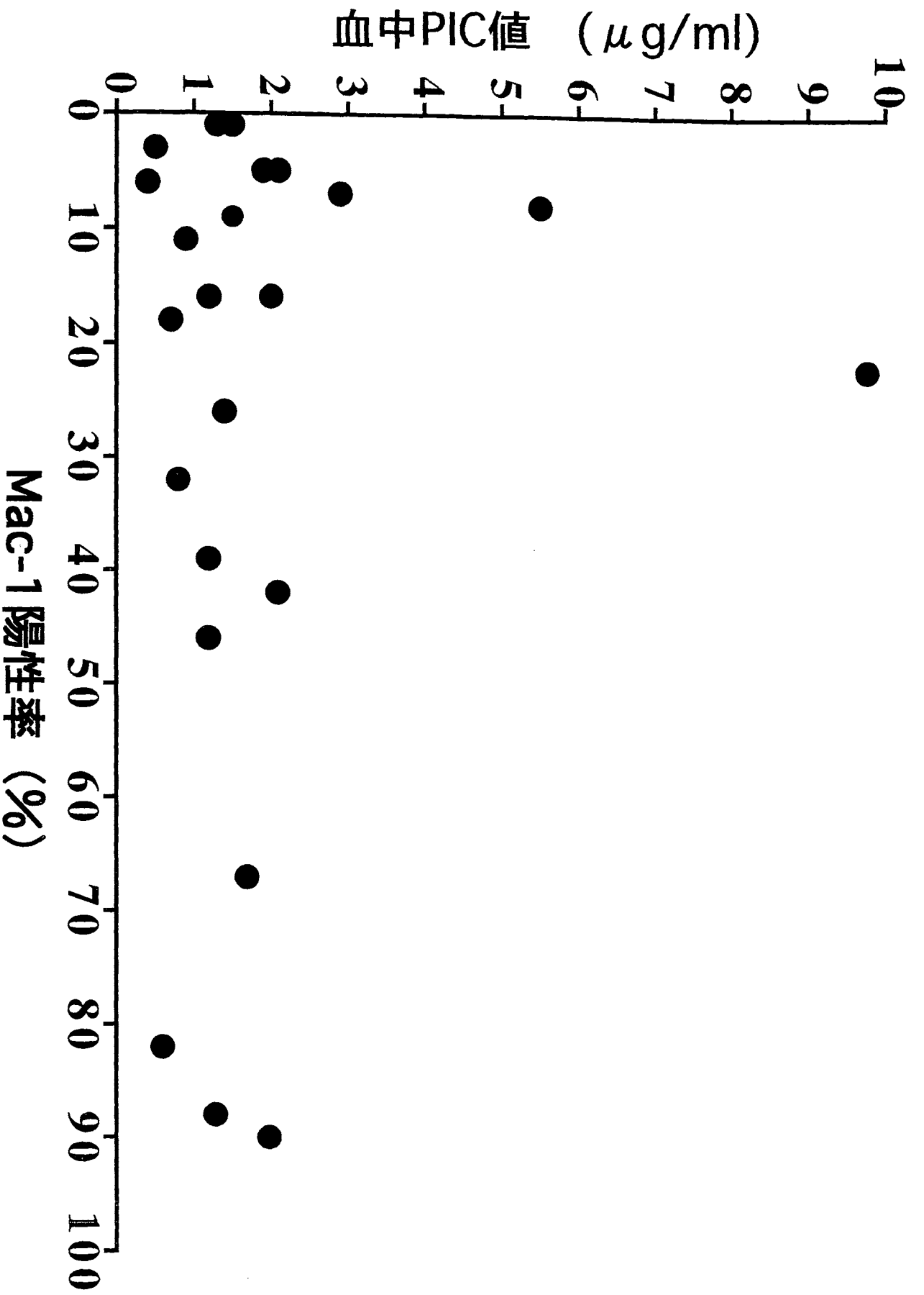


図10 Mac-1陽性率と血中PIC値との相関