原 著

組織トロンボプラスチンに関する研究

続報：胃癌組織の組織トロンボプラスチン

権守日出海* 田中 廣* 上野 達雄* 竹内 季雄*
田中 省三* 小林 紀夫* 前川 正*

Studies on tissue thromboplastin

II. Tissue thromboplastin in gastric cancer tissue

Hidemi GONMORI*, Hiroshi TANAKA*, Tatuo UENO*,
Toshio TAKEUCHI*, Shozo TANAKA*,
Norio KOBAYASHI* and Tadashi MAEKAWA*

Key words: tissue thromboplastin, gastric cancer, disseminated
intravascular coagulation

Tissue thromboplastin (TP) in gastric cancer tissue (Ca) from 9 patients were studied in comparison with that in normal mucous membrane (Ul) and muscular plus serous membrane (M) from the resected stomach of 8 patients with gastric ulcer. Azocaseinolytic activity and fibrinolytic activity (measured by standard fibrin plate method) were also studied.

Average TP activities measured by Nemerson's two stage method of the homogenates of Ca, Ul and M were 301 ± 289 (SD), 123 ± 76 , and 34 ± 19 units per mg protein, respectively. The activities of the former two were as strong as it of purified human brain TP. These homogenates also contained azocaseinolytic and fibrinolytic activities. These activities exist in granular fractions in differential centrifugation studies. Desoxycholate (DOC) extracts obtained by the method reported previously from Ca and Ul contained substance which showed partial identical antigenicity to purified human placenta TP (PTP) apoprotein by Ouchterlony analysis. DOC extracts regained TP activity when relipidated with phospholipid mixture (PL) from Ca. Similar result was obtained when PL from human brain was substituted for PL from Ca. In both cases, optimum ratio was observed in PL/protein and it was 1.3 for Ca and 0.16 to 0.33 for Ul. Relipidated TP activities of DOC extracts of three cases of Ca and a case of Ul seems to be dependent on Factors VII, X and V but not on Factors IX and VIII. Relipidated DOC extracts of a case of Ca and a case of Ul did

* 群馬大学医学部第三内科〔〒371 前橋市昭和町3—39—22〕, The Third Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine, Maebashi, Japan.

not show azocaseinolytic and fibrinolytic activities. Anti-PTP γ -globulin fraction neutralized about 90 % of the TP activities of the homogenates of Ca and Ul time dependently.

These results suggest that Ca and Ul tissues contain TP, which is lipoprotein, and has same properties to TPs from other tissues, and independent from fibrinolytic and protease activities.

緒 言

悪性腫瘍患者が凝固異常を合併する頻度の高いことは良く知られており、特にわが国では胃癌の症例に多い¹⁾²⁾。その原因として腫瘍組織中に凝固線溶系の促進物質の存在することが報告されている²⁻⁵⁾。今回われわれは胃癌および潰瘍胃健常部組織を用い、原因物質の一つとされている組織トロンボプラスチン (TP) について線溶活性、蛋白分解活性と対比しながら検討を加えたのでここに報告する。

I. 対象ならびに方法

対象は9例の摘出胃癌組織 (Ca)、8例の胃潰瘍手術例より得た摘出胃の健常部粘膜 (Ul)、その内3例の筋層と漿膜をあわせたもの (M) である。それら組織より、組織ホモジネート (1g 当り 5 ml の 0.25M 蔗糖液を添加後ホモジナイズ)⁵⁾、DOC 抽出液 {脱脂後 Na Desoxycholate (DOC) 中でホモジナイズ、37,500G 遠沈した上清。活性測定時は DOC を透析して除いた}⁶⁾ を調製し以下の検討を行った。(1)TP 活性、線溶活性、蛋白分解活性；それぞれ Nemerson 二段法⁶⁾、標準フィブリン平板法、Phillips ら⁷⁾ の azocaseinolytic method の変法を用いた。最後の azocasein (シグマ社) と検体の孵置は60分とした。relipidate した DOC 抽出液 (後述) の各種欠乏血漿への影響は Quick 一段法を用い検討した。(2)抗ヒト胎盤 (P) TP 抗体を用いた検討：(a) TP 活性中和試験—Ca、Ul のホモジネート、TP の対照として異種の Bacto TP (Difco)、抗 PTP γ グロブリン分画⁵⁾⁶⁾ を用いた。抗体の代りにバッファと各種検体を孵置した場合も検討した⁶⁾。(b)Ouchterlong 法による分析—Ca、Ul の DOC 抽出液、精製 PTP

を用いた。(3)Ca、Ul の subcellular fractionation と各分画の TP 活性の分布⁵⁾、(4)DOC 抽出液と粗製リン脂質⁶⁾(PL) との再結合 (relipidation) およびその最適比⁶⁾、以上(2)~(4)は既報の方法によった⁵⁾⁶⁾。(5)蛋白分解活性の TP 測定系への影響：各種濃度のトリプシンの一段および二段法への影響を検討した。(6)soy bean trypsin inhibitor (STI) の Ca、Ul TP 活性に対する影響；Ca、Ul ホモジネート、Bacto TP (それぞれ200単位/ml)、トリプシン (5 μ g/ml) と、STI (Nemerson 二段法の一段目での最終濃度 1, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml) を混和、30℃30分孵置後通常の二段法により TP 活性を測定した。また Ca ホモジネートの一段目を完了後、すなわち VII, X 因子を充分活性化後 STI を混和した場合も検討した。その他、蛋白量、リン脂質量は Lowry 法⁸⁾、Chen らの方法⁹⁾ により測定した。

II. 結 果

(1)各種ホモジネート中の TP、蛋白分解、線溶活性：各種組織ホモジネートの三種の活性を測定した結果を表1に示す。TP 活性はホモジネート中の蛋白 1 mg 当りの TP 活性に換算して表わした。その Ca、Ul、M の平均値はそれぞれ 301 $\pm$ 289 (SD)、123 $\pm$ 76、34 $\pm$ 19 単位/mg 蛋白で組織型と対比すると mucinous adenoca、の1例で1,000単位/mg 蛋白、signet ring cell Ca 3例中2例で500単位/mg 蛋白に近い高値を示した。しかし同じ組織型でも低値のものもあり Ul にもかなり高値を示すものがある。M にも些かながら活性が認められる。蛋白分解および線溶活性もほとんどの例に認められたが、これら三種の活性の間に明らかな相関は認められない。(2)TP活性中和試験：Ca、Ul ホモジネー

Table 1 Procoagulant activity of the homogenates of gastric tissue and mucous membrane from gastric ulcer measured by Nemerson's two stage method compared to azocaseinolytic activity and fibrinolytic activity

Case No.	Pathohistology	Clotting activity (u./mg protein)	Azocaseinolytic activity (OD at 440nm)	Fibrinolytic activity lysis area (mm ²)
Gastric cancer	3 Tubular adenoca. (well diff.)	54	.005	...
	4 Mucinous adenoca.	163	.025	...
	8 Signet-ring cell ca. (scirrhous)	71	0	...
	9 Poorly diff. adenoca	122	.016	...
	14 Signet-ring cell ca.	471	.015	100
	15 Signet-ring cell ca. (scirrhous)	480	.025	144
	16 Mucinous adenoca.	1,000	.040	81
	17 —	235	.045	400
	18 Poorly diff. adenoca.	115	.015	120
Gastric ulcer	1 Mucous membrane	40 (33)*	.009	...
	2 "	70	.009	...
	3 "	95 (11)*	0	...
	4 "	158	.040	225
	5 "	93 (58)*	.040	144
	6 "	295	.020	25
	7 "	158	0	...
	8 "	75	0	...

* Tunica muscularis + serosa

とともに time dependent に活性が中和され、60分後の TP 活性は二段法で Ca, UI それぞれ89%, 95%が抗 PTP 抗体により中和された。対照の Bacto TP の活性はほとんど変化しなかった。(3)Ouchterlony 法による分析: Ca および UI の DOC 抽出液中には PTP と partial identity を示す抗原の存在を認めた。(4) Ca および UI の DOC 抽出液の relipidation と各種活性および欠乏血漿への影響: DOC 抽出液中に TP 活性は認められないが, relipidation すると Ca, UI とともに活性が再現された(図1)。Ca, 人脳⁵⁾どちらの PL を用いても同様の結果が得られ, PL/蛋白の結合最適比はCaで1.3, UIで0.16~0.33である。DOC 抽出液, PL を別に透析後混和しても TP 活性は出現し

ない。relipidation した Ca の症例 No. 16 に蛋白分解活性, No. 15, 16 に僅かな線溶活性を認めたが, No. 14および UI の1例には TP 活性のみしか認めなかった。この三者の Ca および UI の relipidation した DOC 抽出液の各種欠乏血漿および正常血漿に対する影響を一段法で検討した(表2)。これらの活性は第IX, VIII因子は必要とせず, VII, X, V 因子を必要とすることが分った。(5)蛋白分解活性の TP 測定系への影響: トリプシンは一段法で正常血漿に10μg/0.1mlに加えると最短凝固時間を示すが, 他の欠乏血漿への影響は複雑である。二段法へは0.5μg/0.1mlの濃度で加えた時最短時間を示し, TP 10単位/0.1mlに相当した。(6)STI の Ca, UI ホモジネート TP 活性に対する影響:

Table 2 Procoagulant activity of relipidated DOC extracts of gastric cancer tissue and mucous membrane from gastric ulcer
Studied with various deficient plasmas by Quick's one stage method

Substrate plasma	Cancer tissue			Mucous membrane of ulcer	Trypsin (10 μ g in 0.1ml)
	Case No. 14	No. 15	No. 16		
F IX def	29.0 sec	27.2 sec	35.0 sec	40.6 sec	63.0 sec
F VIII def	21.4	26.0	30.6	24.2	66.2
F VII def	150.0	120.0	122.0	180.0	75.0
F X def	240.0<	240.0<	240.0<	240.0<	121.0
F V def	240.0<	240.0<	240.0<	240.0<	240.0<
Normal plasma	30.6	31.4	28.0	39.0	21.0

用いた二段法の系では基質および活性化された VII, X 因子への STI の影響を除くことはできない。しかしトリプシンの著明な阻害に比し他では著明な阻害は見られず, protease inhibitor では不活化されないといわれる TP (ここでは Bacto TP) と Ca, UI ホモジネートは同様な結果を示した。(7)subcellular fractionation: 回収された TP 活性の総和に対し, Ca, UI それぞれの700G分画に30.3, 25.7%, 5,000G分画に45.9, 20.2%, 15,000G分画に7.5, 15.4%, 105,000G 沈渣に10.0, 26.8%, 上清に6.3, 11.9%が分布した。

III. 考 察

Ca ホモジネート中に強い TP 活性が証明された。同時に蛋白分解, 線溶活性も認められたが DOC 抽出液中には症例 No.14 のごとくこれらの活性を持たず TP 活性のみを示すものがある。この TP は抗 PTP 抗体による検討, relipidation による検討で他の組織の TP⁵⁾と似た性質を持ち, リポ蛋白であることが分った。細胞中の顆粒成分に結合しているが DOC により抽出可能である。Gordon ら²⁾の報告では Ca の凝固促進物質は X を直接活性化し PL を必要としない。桜川ら³⁾の検討では, TP 活性は protease inhibitor により活性が阻止され, 線溶活性と不可分である。われわれの検討した TP は前者と異なる。後者の材料は Ca ホモジネートの10,000rpm 遠心後の上清で, マイクロゾームに種々の活性が結合している可能性があり, protease inhibitor の検討を行った系もそ

Fig. 1 Effect of phospholipid/protein ratio on the procoagulant activity of DOC extracts of gastric cancer tissue and mucous membrane from gastric ulcer after relipidation (two stage method)

の基質に対する影響を無視できない。これに対しわれわれは DOC 抽出によりこれら活性の分離を試み, TP 測定系についてもこのことを考慮して検討した。その結果は, TP 活性は蛋白分解活性とは異なり, 89%が抗 PTP により中和されることが分った。他方 UI にも強い TP 活性があり, subcellular fractionation, relipidation のための PL/蛋白最適比等に多少の違いはあるが, Ca の TP と同様の性質を持ち, 両者の異同についてはさらに精製を進めて検討

する必要がある。以上得られた結果では Ca 患者における凝固異常は単に組織中の TP 含量、性質の違いでは説明できず、分泌、転移等の機序を含めた検討が必要である。ムチン産生組織に比較的高い TP 活性が認められ、ムチンが凝固を促進するという報告⁹⁾もあり、この点についても検討を進めている。

結 語

胃癌組織および潰瘍胃健常部粘膜は強い TP 活性を持つ。この TP は他の TP と類似の性質を持つリポ蛋白で、細胞中の顆粒成分に結合しているが、DOCにより可溶化できる。この TP 活性は蛋白分解活性、線溶活性とは別の物質であることが示唆された。

文 献

- 1) 前川 正, 小林紀夫, 権守日出海, 他: DIC の臨床病態統計。汎発性血管内血液凝固 症 調査研究班・昭和53年度業績報告, 1979, p.6~15.
- 2) 前川 正, 小林紀夫: 癌と DOC. 臨床科学, **14**; 1232~1240, 1978.
- 3) Gordon, S.G. and Lewis, B.J.: Comparison of procoagulant activity in tissue culture medium from normal and transformed fibroblasts. *Cancer Res.*, **38**; 2467~2472, 1978.
- 4) Sakuragawa, N., Takahashi, K., Hoshiyama, M. et al.: The extract from the tissue of gastric cancer, as procoagulant in disseminated intravascular coagulation syndrome. *Thrombos. Res.*, **10**; 457~463, 1977.
- 5) 権守日出海, 田中 廣, 上野達雄, 他: 白血病細胞の凝固活性について。血液と脈管, **9**; 179~183, 1978.
- 6) Gonmori, H. and Takeda, Y.: Properties of human tissue thromboplastins from brain, lung, arteries, and placenta. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **36**; 90~103, 1976.
- 7) Phillips, D.R. and Jakabova, M.: Ca^{2+} dependent protease in human platelets. Special cleavage of platelet polypeptides in the presence of added Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.*, **252**; 5602~5605, 1977.
- 8) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. J., et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**; 265~276, 1951.
- 9) Chen, Jr., P.S., Toribara, T. Y. and Warner, H.: Microdetermination of phosphorous. *Ann. Chem.*, **28**; 1756~1758, 1956.
- 10) Pineo, G. F., Regoez, E., Hatton, M. W. C., et al.: The activation of coagulation by extracts of mucous: A possible pathway of intravascular coagulation accompanying adenocarcinomas. *J. Lab. Clin. Med.*, **82**; 255~266, 1973.

●白血病治療の理論と実際！

白血病の化学療法—基礎と臨床

編集 滋賀医科大学学長 脇坂行一 専門医28名分担執筆

A 5 判 292頁 図60 表42 定価5,800円(〒200円)

●101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768