原 著

内毒素性 DIC と骨髄細胞の 組織トロンボプラスチン活性

平田 陸正* 角田 伸子* 稲田 捷也* 吉田 昌男*

Endotoxin-induced DIC and tissue thromboplastin activity of bone marrow cells

Michimasa HIRATA*, Nobuko TSUNODA*, Katsuya INADA*
and Masao YOSHIDA*

Key words: endotoxemia, thromboplastin, DIC,
bone marrow cells, phospholipid

1. Endotoxin injection caused significant increase in procoagulant activity (PCA) of bone marrow cells. Endotoxin also caused an increase in PCA of supernatant (sup) obtained from bone marrow suspension.
2. Both activities were destroyed by heating at over 56°C. The activity of mouse brain thromboplastin used as reference preparation was destroyed at 60°C but stable at 80°C.
3. PCA of bone marrow cells decreased after incubation with Concanavalin A (Con A). The activity recovered by addition of α -methyl-D-glucoside.
4. Polymyxin (PxB) inhibited the PCA of either cells (20 %-inhibition) or sup (50 %-inhibition).
5. Addition of phospholipid (PL) to the cells or sup caused enhancement of PCA.
6. Degrees of heat inactivation, Con A- or PxB-inhibition, and PL-enhancement of PCA were higher in sup than those in the bone marrow cells.

Procoagulants of the cells and sup were shown to be tissue thromboplastin (Tp) which consists of glycoprotein-phospholipid complex functioning as active sites. Membrane perturbation due to endotoxin would initiate the increase in exposure and/or contents of the active site (PL) on the membrane surface and would participate in the manifestation of Tp activity. As a result of

* 岩手医科大学医学部細菌〔〒020 盛岡市内丸 19-1〕, Department of Bacteriology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan.

membrane alteration, release of Tp from the cell surface into circulation may also be caused in endotoxemia.

はじめに

内毒素性ショックや内毒素血症においては、しばしば播種性血管内凝固(DIC)を合併する。内毒素性DIC発症の機作として、内毒素による内因性および外因性凝固系の活性化がよく知られているが、著者らは骨髓細胞(顆粒球, マクロファージ)のProcoagulant(P)活性を介した外因性凝固系の活性化が重要であることを強調してきた。その主な根拠として①内毒素により、骨髓に顆粒球を中心とした細胞毒性反応が惹起される。②これらの細胞の膜画分のP活性が亢進し、その本態が組織トロンボプラスチン(Tp)である。③Tp活性の高まったこれらの細胞が末梢へ動員されることなどがあげられる¹⁻⁴⁾。

今回は、骨髓全体についてのP活性をみるため骨髓細胞と骨髓浮遊液の遠心上清を対象として、内毒素投与後のP活性を比較し、さらにこれらのP活性の性状について種々の角度から検討した。

I. 材料および方法

マウス: ddY, 静岡株, 雄, 10~12週齢, 体重30~40gのものを使用した。内毒素標品: *S. typhimurium* LT2株からフェノール抽出し精製したもの(自家製)および*E. coli*: 0111:B4 (Westphal型, Difco製)のもの。*S. minnesota* Ra株より抽出したlipid Aは西ドイツ, マックスプランク研究所, ルーデリッツ博士より分与された。内毒素は生理食塩水に浮遊後氷水中で20~30秒間音波処理しマウス当り50~100 μ gを, lipid Aは少量のトリエチルアミンで可溶化し, 生理食塩水で希釈後に25 μ gを腹腔内または静脈内に投与した。1群5頭のマウスを用いた。

プラズマ: マウスプラズマは既報の方法に準じて心臓穿刺によってえた。マウス脳トロンボプラスチン(MBT): Nemerson⁵⁾の方法に準じた。10頭のマウスよりえた脳のアセトン粉末を0.15Mクエン酸ナトリウム溶液に浮遊させ3,000 rpm, 5分遠心し上清を得る。これを20,000 rpm, 30分遠心し沈渣を蒸留水に浮遊しさらに20,000 rpmの遠心で沈渣をえた。ウサギ脳トロンボプラスチン(RBT): 市販のシンプラスチンを用いた。コンカナバリンA(Con A), ポリミキシンB(PxB): Sigma製のもの。リン脂質(PL): 牛脳より抽出した製剤トロスチン(中外製薬)でホスファチジルエタノールアミン, —セリンなどを含む。骨髓細胞および骨髓遠心上清(Sup)の調整: 既報^{1,3,6)}の方法によって大腿骨の骨髓浮遊液をえ, これを1000 rpm, 10分遠心し上清(Sup)と沈渣の細胞に分け, 後者は遠心洗浄をくり返した後に一定細胞数の浮遊液とした。SupについてはLowryの方法に準じて蛋白量を定量した。P活性の測定: P活性の測定法としてカルシウム再加時間(RCT)より部分トロンボプラスチン時間(PTT)を応用した方法がより感度が高いことをすでに報告⁷⁾しているが, 今回は熱安定性, Con A, PxBさらにPLの影響を調べP活性の性状を検討することを目的としているため, PLを加えていない系すなわちRCT法を用いた。プラズマに検体とCaCl₂溶液(25 mMまたは50 mM)を加えプラズマの凝固時間を測定し, この値と標準トロンボプラスチン単位で表現した。統計処理: 既報に準じてt検定を行なった。また, 平行性の検定は黒川ら⁷⁾の方法によって行なった。表には平均 $\pm$ S.E.で表現してある。

略語 DIC: 播種性血管内凝固, P活性: Procoagulant活性, Tp: 組織トロンボプラスチン, MBT: マウス脳トロンボプラスチン, RBT: ウサギ脳トロンボプラスチン, Con A: コンカナバリンA, PxB: ポリミキシンB, LP: 磷脂質, GP: 糖蛋白

Table 1 Procoagulant activity of supernatant
—Dose response—

Dose of LPS ^a (μ g)	Clotting time (sec)	Thromboplastin units ^b	Index
0	51.7 $\pm$ 1.8	1866 $\pm$ 291	1.0
50	42.6 $\pm$ 2.3 ^c	4104 $\pm$ 861 ^c	2.2
200	37.7 $\pm$ 2.8 ^c	6996 $\pm$ 1579 ^c	3.8
400	30.5 $\pm$ 1.9 ^c	14484 $\pm$ 3358 ^c	7.8

^a Supernatants of bone marrow suspension were obtained 18 hr after i. p. injection of endotoxin (E. coli).

^b P-activity is expressed as thromboplastin units per 120 μ g of protein.

^c $p < 0.05$ compared with control.

Clotting time of saline control was 103.7 $\pm$ 8.6 sec (N=12).

Five mice were used in each group.

II. 結 果

1. 骨髓浮遊液の遠心上清 (sup) の P 活性

骨髓浮遊液を遠心して骨髓細胞を除いた上清 (sup) は組織トロンボプラスチン (Tp) を含んでおり当然のことながら P 活性を示した. 種々の量の内毒素を投与し 18 時間後に一定量の sup (2 mL) をえ, さらに sup の蛋白濃度を一定としこれらの P 活性を同様にしてえた対照群のものと比較した. 表 1 に示すように, 投与内毒素量に依存してプラズマの凝固時間が短縮し標準 Tp 単位でみても 50, 200, 400 μ g の内毒素により対照群の 2.2, 3.8, 7.8 倍と有意に P 活性が高まった. すなわち, 内毒素投与により骨髓細胞のみならず骨髓の遠心上清の P 活性も亢進した. なお, sup の蛋白の絶対量は対照群, 内毒素投与群で有意差は認められなかった.

2. P 活性の熱安定性

骨髓細胞の音波破壊液を各温度で 10 分間加熱し, その影響を同様に処理したマウス脳トロンボプラスチン (MBT) と比較した (図 1). 骨髓細胞の P 活性は 56°C 以上の加熱で失活 (凝固時間が延長) したが, MBT の場合は 60°C で最も失活しやすく 70~80°C ではむしろ安定であった. 加熱温度を 56°C と一定にして加熱時間を 10~50 分に変えていく系では, いずれも加熱時間の経過とともに P 活性は失活し, その失活パターンからみて骨髓細胞と MBT は相似であったが, 100 μ g の内毒素 (S. typhimurium)

Fig. 1 Heat stability of procoagulant activity
—Sonic Lysate—

Sonic lysate of bone marrow cells were incubated for 10 min at the indicated temperature.

Bone marrow cells (5 mice) were collected 18 hr after i. p. injection of 100 μ g of S. typhimurium endotoxin.

投与群の骨髓細胞の P 活性 (対照の約 5 倍に亢進) はとくに熱に弱く失活の程度が著明であった. すなわち, 対照群, 内毒素投与群の細胞 (1.34×10^6) および MBT (100 μ g) の加熱前の P 活性を 100% とすると, 加熱 10 分でそれぞれ 65, 20, 45% となり 30 分で 30, 5, 30% であった.

sup の P 活性も細胞と同様に 56°C 以上の加熱

Table 2 Con A inhibition of P-activity of bone marrow cells
—Intact cells—

Bone marrow cells	—Con A	+Con A ^a		
	Units ^b	Units	4Units	(%)
Control	1414 ± 121	83 ± 12 ^e	1331 ± 115	(94.0 ± 0.8)
Endotoxin ^c	4085 ± 301 ^d	538 ± 60 ^{d,e}	3547 ± 261 ^d	(86.7 ± 0.9 ^d)

^a The mixture of 0.15 ml of cell suspension (4×10^7 /ml) and 0.15 ml of Con A (1 mg/ml) was incubated at 37°C for 10 min, and 0.3 ml of 50 mM-CaCl₂ was added. Then, 0.2 ml of the mixture was added to 0.1 ml of mouse plasma.

^b P-activity is expressed as thromboplastin units per 2×10^6 cells.

^c Bone marrow cells were collected 4 hr after i. v. injection of 50 µg of *S. typhimurium* endotoxin.

^d $p < 0.001$ compared with control.

^e $p < 0.001$ compared with control incubated with buffer.

Five mice were used in each group.

で失活した。また、一定温度 (56°C) で加熱時間を変えた系では図 2 に示すごとく、先の細胞の場合と同様に内毒素投与群の sup の P 活性はより失活しやすかった。

3. コンカナバリン A (Con A) による P 活性の抑制

骨髓細胞 (音波処理しない intact cell) に Con A を加え、37°C, 20 分インキュベートし P 活性への影響をみた (表 2)。50 µg の内毒素投与により P 活性が対照の 2.9 倍 (4085/1414) と高まったが、いずれの P 活性も Con A 処理により 90% 程度抑制された。対照群では P 活性が 1331 単位 (△units) 減少したが内毒素投与群では 3547 単位の減少であり、後者において、より Con A による抑制が著明であった。なお、MBT の活性も同様に Con A により 85~90% 抑制され、△units でみて 3800~5400 単位が抑制された。

Con A による P 活性の抑制が可逆であることを表 3 に示した。25 µg の lipid A 投与 4 時間後の骨髓細胞 (音波破壊液) の P 活性は対照の 3.6 倍 (769/216) に亢進した。この音波破壊液に Con A を加えると前述と同様にほとんどの P 活性が抑制された。一方、Con A を加えてインキュベートした後に α-methyl-D-glucoside (α-MG) を添加しさらにインキュベ

Fig. 2 Heat stability of procoagulant activity
—Supernatant—

ートした場合、また、α-MG を最初の反応系に添加した場合いずれにおいても P 活性が回復した。

Sup の P 活性も Con A により著明に抑制され残存活性は 8% 程度であった。対照群の sup では Con A により 4500 単位抑制されたが、内毒素投与群の sup では 15000 単位相当もの P 活性が抑制され、前述の細胞や MBT に対するものより抑制作用が強かった。なお、sup や MBT の活性に対する Con A の抑制は細胞に対するものと同様に可逆的であった。すなわち、内毒素投与群の sup の P 活性 (3500 単位

Table 3 Con A Inhibition of P-activity of Bone Marrow Cells

1 st Incubation	2 nd Incubation	P-activity Units/ 2×10^6 cells	Activity (%)
Post-lipid A-cells*	—	769	100
Post-lipid A-cells + Con A	—	74	9.6
Post-lipid A-cells + Con A	α -MG**	368	47.9
Post-lipid A-cells + Con A + α MG	—	344	44.7

* Bone marrow cells were collected 4 hr after i. v. injection of 25 μ g of lipid A.

** α -methyl-D-glucoside.

Bone marrow cells (4×10^7 /ml, sonic lysate) were incubated at 37°C for 30 min with saline alone, Con A alone (2 mg/ml), Con A alone for 15 min before the addition of α -MG (100 mg/ml), or α -MG and Con A together for 30 min.

P-activity of normal-cells was 216 units/ 2×10^6 cells.

Table 4 Effect of Polymyxin B on The P-activity
—Intact cells—

	—Polymyxin B Units ^b	+Polymyxin B ^a Units Δ Units (%)		
Control	329 $\pm$ 74	256 $\pm$ 59	73 $\pm$ 19	(21.9 $\pm$ 3.8)
Endotoxin ^c	1168 $\pm$ 332	976 $\pm$ 289	192 $\pm$ 52 ^d	(17.6 $\pm$ 3.0)

^a The mixture of 0.15 ml of cell suspension (4×10^7 /ml) and 0.15 ml of polymyxin B (20 μ g/ml) was incubated at 37°C for 20 min.

^b P-activity was measured by one stage assay and expressed as thromboplastin units per 2×10^6 cells.

^c Bone marrow cells were collected 18 hr after i. p. injection of 100 μ g of S. typhimurium endotoxin.

^d $p < 0.05$ compared with control.

Five mice were used in each group.

=100%) は Con A とのインキュベーションにより160単位 (4.6%) に低下したがグルコース (45 mg/ml) を後から、または最初から添加した場合それぞれ1732単位 (49.4%), 2168単位 (61.8%) とP活性が回復した。同様のことはMBTに対しても示され、4 mg/ml のMBTの活性 (9640単位=100%) が Con A で1825単位 (18.9%) に低下したが、最初の系に116 mg/ml のシュクロースを加えることで5039単位 (52.3%) とP活性が回復した。

4. ポリミキシン B (PxB) による P 活性の抑制

骨髓細胞 (intact cell) に PxB を加え37°C, 20分インキュベートしP活性への影響を調べた (表4)。対照群, 内毒素投与群の細胞いずれに対しても PxB のP活性抑制は弱く, 20%程度であった。なお, PxB のMBTに対する抑制

も同程度であった。表には示していないが, 音波破壊液 (lysate) を用いた実験ではP活性の30~40%が PxB で抑制され細胞に対する抑制より強かった。

一方, Sup に対する PxB の抑制作用はさらに強く, 対照群, 内毒素投与群いずれも50%のP活性が抑制された (表5)。

PxB の抑制作用が intact cell, lysate, sup に対して異なることが示され, この点, PxB と検体とのインキュベーションの温度, 時間など変えて今後さらに検討したい。

5. 燐脂質 (PL) の影響

ウサギ脳トロンプラスチンをブタノールで処理してリン脂質を除去したものはほとんど活性を示さなかった。そこで, 骨髓細胞や Sup に PL を添加したときのP活性への影響を調べた。表6に示すように, 種々の濃度の intact

Table 5 Effect of Polymyxin B on The P-activity
—Supernatant—

	—Polymyxin B Units	+Polymyxin B ^a Units Δ Units (%)		
Control	1963 $\pm$ 423	968 $\pm$ 205	995 $\pm$ 220	(50.2 $\pm$ 1.1)
Endotoxin ^b	2616 $\pm$ 385	1350 $\pm$ 189 ^c	1267 $\pm$ 202	(48.2 $\pm$ 1.9)

^a The mixture of 0.15 ml of supernatant and 0.15 ml of polymyxin B (20 μ g/ml) was incubated at 37°C for 20 min.

^b Supernatant was obtained 18 hr after i. p. injection of 100 μ g of *S. typhimurium* LT 2 endotoxin.

^c $p < 0.05$ compared with control incubated with saline (—Polymyxin B). Five mice were used in each group.

Table 6 Effect of Phospholipid on The P-activity of Bone Marrow Cells
—Intact Cells—

	No. of cells $\times 10^6$	—Phospholipid Units	+Phospholipid Units Δ Units (%)	
Control	2.5	2667	3058	391 (14.7)
	1.25	1105	1226	121 (11.0)
	0.625	334	458	124 (37.0)
Endotoxin ^a	2.5	7179	8193	1014 (14.1)
	1.25	2564	2889	325 (12.7)
	0.625	870	1270	400 (46.0)

To 0.2 ml of cell suspension, 0.2 ml of phospholipid (20 μ g/ml) and 0.4 ml of 50 mM CaCl_2 were added. Then, 0.2 ml of the mixture was added to 0.1 ml of mouse plasma, and clotting time was measured. P-activity is expressed as thromboplastin units.

^a Bone marrow cells were collected 18 hr after i. p. injection of 100 μ g of *S. typhimurium* endotoxin.

cell に PL を加えると P 活性の増加がみられた。いずれの群でも Δ units でみてとくに P 活性の高い（細胞数の多い）ところで PL の影響が大きかった。

種々の濃度の Sup に対する PL の影響を表 7 に示した。Sup に対する PL の亢進作用は細胞に対するものより強く、非添加の 3～5 倍の P 活性を示した。また、この成績でも内毒素投与群の P 活性が PL でより高まる傾向がみられた。プラスマにベロナール緩衝液と CaCl_2 または PL (20 μ g/ml) と CaCl_2 とを加えたときの凝固時間はそれぞれ 89.7 ± 0.7 , 88.1 ± 0.6 秒 ($n=5$) であり、PL 単独の影響はなかった。この条件下で MBT に対する PL の影響をみたところ、MBT 1 mg/ml の活性（凝固時間 46.3 秒）に対し MBT に PL を加え 37°C、15 分間イ

ンキュベートしたものは 47.3 秒であり、MBT の活性は高まらなかった。

表 7 の成績をもとにして Sup の濃度を X 軸に、P 活性としての凝固時間（秒）を Y 軸に両対数でプロットすると回帰直線がえられる。これらの回帰直線について回帰係数および平行性検定を行なった結果を表 8 に示した。4 本の回帰直線はどの組み合わせにおいても平行性が認められ、また、MBT の回帰直線（係数 -0.2607）とも平行した。対照群、内毒素投与群いずれも PL 添加により回帰係数が大きくなり、このことは表 7 に示されるように、とくに高濃度の Sup に PL を加えると凝固時間がより短縮し P 活性（ Δ units）が大きくなることを表現している。さらに、対照群の Sup に PL を加えた場合の係数が内毒素投与群の係数に近くなった。

Table 7 Effect of Phospholipid on The P-activity —Supernatant—

	Concentration of sup	—Phospholipid Units	+Phospholipid Units Δ Units (%)	
Control	2 ⁰	1809	6343	4534 (251)
	2 ⁻¹	718	2908	2190 (305)
	2 ⁻²	284	1269	985 (347)
Endotoxin	2 ⁰	2145	7324	5179 (241)
	2 ⁻¹	791	3881	3090 (391)
	2 ⁻²	281	1411	1135 (404)

To 0.2 ml of supernatant, 0.2 ml of phospholipid (20 μ g/ml) and 0.4 ml of 50 mM CaCl₂ were added. Then, 0.2 ml of the mixture was added to 0.1 ml of mouse plasma and clotting time was measured.

Supernatant was collected 18 hr after i. p. injection of 100 μ g of *S. typhimurium* endotoxin.

Table 8 Regression Coefficients and Parallel Line Assay

	Regression Coefficient	Parallelism
Control-Sup	-0.2403	Yes
Control-Sup + PL*	-0.2892	
.....		Yes.....
Endotoxin-SUP	-0.2709	Yes
Endotoxin-SUP + PL	-0.2999	

* Phospholipid

III. 考 察

細胞由来の P 活性物質についてはほとんどが in vitro の培養系で研究されている。マクロファージ (M ϕ)、単球に内毒素を加えて培養すると組織トロンボプラスチン (Tp; 組織因子)⁸⁾、Prothrombinase⁹⁾、X 因子 activator¹⁰⁾などが産生される。顆粒球自体にも Tp 活性があることが Saba ら¹¹⁾によって報告されているが、in vitro の系で内毒素刺激した場合に P 活性が産生されるかどうか成績は一定していない^{8, 12)}。

著者らは in vivo の実験系で顆粒球の役割に注目している。内毒素を投与すると骨髓に顆粒球を中心とした細胞毒性反応が惹起され、これと相関して骨髓 M ϕ および顆粒球の P 活性が高まる^{4) 13) 14)}。細胞毒性反応は内毒素投与 1 時間から認められ 18~20 時間で最大となる。骨髓細胞のもつ P 活性は 4 時間で最大となり以後 18~20 時間まで同程度の活性が持続する。また、骨髓内有核細胞数の減少のパターンは細胞毒性

と一致してみられ、この骨髓細胞の減少は末梢での白血球減少およびそれに続く白血球増多を反映したもので骨髓細胞の末梢への動員に由来するが、さらに上記の骨髓での細胞破壊も関与する。骨髓細胞の P 活性は intact cell が音波破壊液より高いこと、14500 $\times$ g 画分に存在することはすでに報告したが^{4) 6) 15)}、今回の Con A, PxB 処理による intact cell の P 活性の抑制実験からも P 活性は細胞膜に存在することが強く支持された。骨髓浮遊液の遠心上清 (Sup) を用いた今回の実験で、内毒素投与 18 時間後に Sup の P 活性が投与内毒素量に依存して高まった。このことは、内毒素により顆粒球、M ϕ の細胞膜変化が惹起され、これが原因となって細胞の P 活性が亢進すると同時に、P 活性物質の細胞膜表面からの遊離がおこり Sup の P 活性亢進に結びつくことが考えられる。

さて、P 活性が Tp であることを証明する方法として、①外因性凝固系を活性化⁸⁾。②標準品の Tp と検体との回帰直線が平行す

る¹⁶⁾。③ Anti-Tp 抗体で中和される¹⁷⁾。④ Tp が糖蛋白 (GP), 磷脂質 (PL) 両者を活性基とする複合体であり, それぞれの活性基を Con A, PxB などでブロックすると失活する¹⁸⁾¹⁹⁾, などがありこれらが組合わせて用いられている。著者らは①, ②の方法により骨髓細胞の P 活性の本態は Tp であることを報告してきたが¹⁻⁴⁾¹⁴⁾, ④の方法による今回の成績からもこのことが確認された。

加熱による Tp 活性への影響をみた実験では, 骨髓細胞, Sup いずれの Tp 活性も 56°C 以上の加熱で温度に依存して失活したが標準 Tp である MBT では 60°C で失活し 70~80°C では安定であった。また, 内毒素投与群の細胞, Sup いずれも対照群と比べ熱で失活しやすかった。これら熱に対する態度の差が Tp としての構造上の差にもとづくことが考えられる。

Tp としての活性発現には前述の 2 つの活性基が必要であり, それぞれ単独では活性を示さない。Liu²⁰⁾ らはウシ脳, 肺組織の Tp からそれぞれ GP, PL を単離し再構成実験を行ない, GP:PL が 1:6~1:12 で Tp 活性が最大となること, また, 脳由来の GP と肺由来の PL, その逆の組合わせによる再構成でも Tp 活性が発現されることを報告している。Nemerson⁵⁾ の成績によると活性をもつ PL の構造としてホスファチジルエタノールアミン (PE), -コリンなどがあるが, -セリンは活性を示さず, また, これらを混合したとき PE 単独と比べ再構成による Tp 活性が高い。

著者らは骨髓細胞, Sup の Tp 活性発現における PL の役割に注目している。細胞, Sup に PL を添加すると活性がさらに上昇することから, これらの Tp の構造は標準品の MBT と比べて不完全なものであり GP に対する PL 量が少ないものと思われる。内毒素を投与すると細胞膜 PL に量的変化, あるいは質的变化 (活性基として細胞膜表面への露出が高まる) が起こり, この結果露出した活性基に PxB が容易に効率よく結合し Tp 活性がブロックされるものとする。これらのことは, 蛋白量を一定とした実験系で内毒素投与群の Sup の Tp 活性が対照群より高く Tp 活性は蛋白量に依存していな

いこと (表 1), さらに, Sup に PL を添加すると Tp 活性が高まり, とくに対照群の Sup に PL を加えたときの回帰係数が内毒素投与群のそれに近くなること (表 8) などからも支持されよう。

最近, 内毒素によるマクロファージ (Mφ) からの Tp 産生が細胞膜脂質代謝と関連することが示唆される成績があいついで報告された。プロスタグランジン (PG) 合成阻害剤のインドメタシンで Tp 産生が抑制され, この抑制は PGE₂, PGE₁ の添加で回復した²¹⁾。また, 内毒素が Mφ の細胞膜に結合し膜磷脂質代謝が変化し細胞膜蛋白当りの磷脂質含量が増加することなど報告され²²⁾興味深い。

以上のことから, 内毒素による顆粒球, Mφ の膜の Perturbation が trigger となって Tp の活性基としての膜磷脂質が変化し, その結果 Tp 活性が亢進するものと考ええる。また, これらの膜変化によって細胞膜から Tp が遊離することも示唆された。

結 論

1. 内毒素投与により骨髓細胞および骨髓浮遊液の遠心上清 (Sup) の P 活性が亢進した。
2. これらの P 活性は 56°C 以上の加熱で失活したが MBT は 60°C で失活し 70~80°C で安定であった。
3. 骨髓細胞の P 活性は MBT と同様に Con A で抑制された。この抑制は可逆的であり α -methyl-D-glucoside の添加で P 活性は回復した。Sup の P 活性も Con A により抑制されたが, その抑制は細胞に対するものより強かった。
4. 骨髓細胞, Sup の P 活性は PxB によってそれぞれ 20%, 50% 抑制された。
5. 磷脂質 (PL) の添加によって細胞, Sup の P 活性が高まり, とくに Sup において著明であった。
6. 加熱による失活は細胞, Sup いずれにおいても内毒素投与群でそれらの程度が高かった。

以上のことから, 骨髓細胞, Sup の P 活性の本態は糖蛋白・磷脂質複合体で両者を活性基と

する組織トロンボプラスチン (Tp) であることが確認された。内毒素は骨髄顆粒球やマクロファージの細胞膜に影響を与え、Tp の活性基としての磷脂質の量的増加や細胞膜表面への露出を高め、その結果 Tp 活性が亢進すること、さらに膜変化にもとづく細胞からの Tp の遊離も示唆された。

本論文の要旨は、第7回日本血栓止血学会 (1984年、東京) において発表した。

文 献

- 1) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 毛利英満, 工藤一顕, 吉田昌男: 内毒素投与による骨髄内細胞毒性と骨髄細胞の凝固亢進作用. 血液と脈管, **11**; 609~212, 1980.
- 2) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 吉田昌男: 内毒素血症における骨髄細胞の Procoagulant 活性の亢進 (その本態について). 血液と脈管, **12**; 285~288, 1980.
- 3) Hirata, M., Inada, K., Tsunoda, N. and Yoshida, M.: Relationship between cells in bone marrow and intravascular coagulation in endotoxemia. *Bacterial Endotoxins and Host Response*; Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 255~272, 1980.
- 4) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 吉田昌男: 内毒素血症と血液凝固・線溶系・マウス系統と内毒素に対する感受性. 血液と脈管. **15**; 340~348, 1984.
- 5) Nemerson, Y.: The phospholipid requirement of tissue factor in blood coagulation. *J. Clin. Invest.*, **47**; 72~80, 1968.
- 6) 平田陸正, 角田伸子, 稲田捷也, 遠藤重厚, 吉田昌男: 内毒素血症と血液凝固系. 1. 脾細胞の Procoagulant 活性とその性状. 血液と脈管, **13**; 233~236, 1982.
- 7) 黒川正身, 高橋宏一, 石田説而: バイオアッセー (生物定量法, その医学生物学領域での適用), 近代出版. 東京, p. 105~122, 1978.
- 8) Rivers, R.P.A., Hathaway, W.E. and Weston, W.L.: The endotoxin induced coagulant activity of human monocytes. *Br. J. Haematol.*, **30**; 311~316, 1975.
- 9) Schwartz, B.S., Levy, G.A., Fair, D.S. and Edgington, T.S.: Murine lymphoid procoagulant activity induced by bacterial lipopolysaccharide and immune complexes is a monocyte prothrombinase. *J. Exp. Med.*, **155**; 1464~1479, 1982.
- 10) Shands, J.W.Jr.: The endotoxin-induced procoagulant of mouse exudate macrophages: A factor-X activator. *Blood*, **62**; 333~340, 1983.
- 11) Saba, H.I., Herion, J.C., Walker, R.I. and Roberts, H.R.: The procoagulant activity of granulocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**; 614~620, 1973.
- 12) Lerner, R.G., Goldstein, R. and Cummings, G.: Endotoxin induced disseminated intravascular clotting: Evidence that it is mediated by neutrophil production of tissue factor. *Thromb. Res.*, **11**; 253~261, 1977.
- 13) Yoshida, M., Hirata, M., Satodate, R. and Chiba, I.: Immunological and cytochemical studies on in vivo cytotoxic influences on granulocytes and lymphocytes caused by endotoxin. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **27**; 114~117, 1974.
- 14) Hirata, M., Yoshida, M., Tsunoda, N. and Inada, K.: Endotoxemia and blood coagulation-Procoagulant activity of mouse bone marrow cells-. *Bacterial Endotoxins*, Edited by Westphal, O. Verlag Chemie, p. 351~362, 1984.
- 15) 平田陸正, 角田伸子, 鈴木善明, 稲田捷也, 吉田昌男: 内毒素血症と血液凝固系. 2. 骨髄, 脾細胞由来の anticoagulant 活性. 血液と脈管, **13**; 237~240, 1982.
- 16) Rickles, F.R., Rick, P.D., Why, M.V.: Structural features of Salmonella typhimurium lipopolysaccharide required for activation of tissue factor in human mononuclear cells. *J. Clin. Invest.*, **59**; 1188~1195, 1977.
- 17) Edward, R., Rickles, F.R. and Eobrove, A. M.: Mononuclear cell tissue factor: Cell of origin and requirements for activation. *Blood*, **54**; 359~370, 1979.
- 18) Zacharski, L.R., Rosenstein, R. and Phillips, P.G.: Concanavalin A inhibition of tissue factor (Thromboplastin) activity. *Blood*, **44**; 783~787, 1974.
- 19) Niemetz, J.: Coagulant activity of leukocytes.

- Tissue factor activity. J. Clin. Invest., **51**; 307~313, 1972.
- 20) Liu, D.T.H. and McCoy, L.E.: Tissue extract thromboplastin: Quantitation, fractionation and characterization of protein components. Thromb. Res., **7**; 199~211, 1975.
- 21) Sitrin, R.G., Kaltreider, H.B. and Goldyne, M.E.: Prostaglandin E is required for the augmentation of procoagulant activity of LPS-stimulated rabbit alveolar macrophages. J. Immunol., **132**; 867~871, 1984.
- 22) Nishijima, M., Amano, F., Akamatsu, Y., Akagawa, K., Tokunaga, T. and Raetz, C. R.H.: Macrophage activation by monosaccharide precursors of Escherichia coli lipid A. Proc. Natl. Acad. Sci., **82**; 282~286, 1985.

●治療指針と問題点を解説する！

急性白血病の化学療法—基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人ほか 専門医33氏分担執筆
A 5 判 268頁 図106 表65 定価6,800円(〒200円)

最近の急性白血病化学療法の進歩は著しいものがあり、新しい薬剤の開発と作用機序の解明、量、種類、使い方など、臨床のための数々の基礎的研究が全世界的にわたって集積された。本書はそれらの研究を整理して、ルーチン化できるものは治療指針として設立し、しかも現在の問題点を浮き彫りにして解説し、今後の研究に資した。

●内容：〔急性白血病化学療法の基礎〕第1章 白血病細胞の分化と化学療法、第2章 抗白血病剤の作用機序と臨床効果、第3章 造血器腫瘍細胞培養株の薬剤感受性度、第4章 細胞回転と化学療法、第5章 急性白血病における新しい治療法の試み、第6章 染色体分析からみた急性非リンパ性白血病化学療法の二、三の問題点、〔急性白血病化学療法の臨床〕第1章 成人急性白血病の化学療法、第2章 小児の急性リンパ性白血病の治療、第3章 血球成分の輸血療法、第4章 出血症状とその治療、第5章 感染症の治療、第6章 無菌病室による急性白血病治療、第7章 無菌室治療における腸管内無菌化処置、第8章 白血病の顆粒球機能異常と感染症化学療法、総括。