原 著

白血病細胞の凝固活性について*

権 守 日出海** 田 中 広** 上 野 達 雄**
 高 橋 美代子** 田 中 省 三** 小 林 紀 夫**
 前 川 正**

Key words : tissue thromboplastin, promyelocytic DIC,
 leukemia

緒 言

白血病特に急性前骨髄球性白血病 (APL) では高頻度に DIC を伴う。その原因を究明するために種々の白血病細胞中の凝固促進物質、線溶物質、抗凝固因子の有無が検討されている。特に APL 白血球には強い組織トロンボプラスチン (TP) 活性があることが指摘されている¹⁻³⁾。その他の白血病細胞、培養した単球、リンパ球、分葉好中球にも TP 活性の存在が報告されており、これらの細胞が生理的にも、病的状態においても TP を産生する能力を持ち、血液凝固に重要な役割を持つことが示唆されている。われわれは最近イヌおよびヒトの各種臓器より TP の蛋白部分を精製し⁴⁾⁵⁾、その特性について比較検討してきたが、その知見および手技を用い、白血病患者の白血球中の TP について検討を加えたので、ここにその成績を報告する。

I. 対象並びに方法

対象は急性骨髄性白血病 (AML) 9 例, APL 5 例, 慢性骨髄球性白血病 (CML) 4 例で、対照は献血のために来院した健常者 20 例である。

血球浮遊液の調整 : これら対象例の静脈血をその 9 分の 1 容の 3.8% クエン酸ソーダを加えて採血し、220G 10 分間遠沈分離した buffy coat

または少量のヘパリンを加えて採取した骨髓穿刺液より以下のごとく白血球浮遊液を作製した。全ての操作は 4℃で行なった。先ず 0.225% NaCl 溶液を加え 30 秒間の hypotonic lysis を行ない、4 分の 1 容の 3.6% NaCl 溶液を加えた後、220G で 10 分間遠沈、沈渣を Hanks' Balanced Salt Solution (Hanks' BSS) に再浮遊し、再び遠沈、これを 3 回繰り返す、最後に沈渣を適当量の Hanks' BSS に再浮遊して細胞数を算定した。この浮遊液中の赤血球および血小板の混入は 1% 以下であった。健常者の赤血球または血小板浮遊液は、白血球 buffy coat 作製時の沈渣および上清をとり、遠沈により同様にして Hanks' BSS で 3 回洗浄して浮遊液とした。この中の血球の混入は 0.1% 以下であった。

血球ホモジネート : 血球浮遊液を Potter のホモジナイザーを用い、1,000 ないし 1,200 r. p. m., 1~2 分間ホモジナイズしたものである。

白血球デオキシコール酸 Na(DOC)抽出液 : 白血球浮遊液を 2,000G 10 分間遠沈分離した沈渣にアセトンを加え、10 分間混和後、2,000G 10 分間遠沈、沈渣に再びアセトンを加えて混和する。同様の操作を 3 回繰り返す、次にヘプタン : ブタノール混液 (2 : 1) により同様にして白血球を脱脂した。最後に得た沈渣を風乾後、1.25% DOC 溶液を加え、Potter のホモジ

* Studies on the procoagulant activity of leukocytes. (The Fifth Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 19, 1976).

** 群馬大学医学部第三内科 [〒371 前橋市昭和町 3-39-15], Hidemi GONMORI, Hiroshi TANAKA, Tatsuo UENO, Miyoko TAKAHASHI, Syozo TANAKA, Norio KOBAYASHI, Tadashi MAEKAWA: The Third Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine, Maebashi, Japan.

ナイザーで1,200r.p.m., 5分間ホモジナイズし, 37,000G 30分間遠沈分離した上清を透析チューブに入れ, 外から陰圧を加えて濃縮したものである。

ヒト脳 (B) および胎盤 (P) TP 蛋白部分の精製: 既報の方法⁵⁾ を用いて精製した。

粗製ヒト B および P-TP: 既報の方法⁵⁾ によるおのおのの臓器のホモジネート37,000Gの分画を遠沈により洗浄, Owren's veronal buffer に再浮遊したものである。

凝固活性の測定: TP 活性は Nemerson の二段法の変法⁵⁾ (以下二段法) で行ない, 既報のごとく作製した標準曲線より単位に換算した。

APL 白血球ホモジネートの各種欠乏血漿に対する影響の検討: 第Ⅷ, Ⅸ, Ⅶ, Ⅹ因子欠乏血漿および正常プール血漿を基質として Quick の一段法(以下一段法)により凝固時間を測定した。対照として Simplastin, Platelin および Hanks' BSS を用いた。

遠沈分画法による TP 活性の細胞内分布の検討: APL 白血球ホモジネートを700G10分, 5,000G10分, 15,000G10分, 105,000G60分で上清を順次遠沈し, 各分画の沈澱を適量の Hanks' BSS に再浮遊し, 容量を測定後, 二段法により TP 活性を測定し, 各分画の総活性を算出してその分布を検討した。

抗 P-TP 血清: 既報⁵⁾の方法で精製したヒト P-TP の蛋白部分で免疫した家兎血清である。

Ouchterlony 法による PT の抗原性の分析: 抗 P-TP 血清を用い, 1% アガロース板上で Ouchterlony 法により, 白血病細胞の DOC 抽出液中の TP 類似抗原の存否, および抗原性の精製 P- および B-TP との比較分析を行なった。検体を穴に入れ, 24時間室温で湿室中に放置後, 生食および蒸留水で洗浄し, Amidoblack 10B で染色した。

TP 活性中和試験: 抗 P-TP 血清の33%硫酸分画を buffered saline (Owren's veronal buf-

Fig. 1 Clotting Activity of Red Blood Cells, White Blood Cells and Platelets from Normal Subjects (by Two Stage Assay)

Table 1 Procoagulant Activity of Promyelocytes Studied with Various Deficient Plasmas

Substrate Plasma	Hemogenate of Promyelocytes	Simplastin	Platelin	Buffer
Factor VIII Deficient	25.6sec.	10.0sec.	220.0sec.	360.0sec.
Factor IX Deficient	20.0	15.0	215.0	360.0
Factor X Deficient	141.4	45.0	170.0	360.0
Factor VII Deficient	51.0	44.2	85.8	166.0
Normal Plasma	26.0	18.0	87.4	144.0

fer 1:0.9% NaCl 9) で透析して硫酸を除去し, 同量の検体と混和し, 37°Cの水浴中に孵置し, 直後, 10分, 30分, 60分にその一部の TP 活性を一段法により測定した。

II. 結 果

各種血球の TP 活性 (図1): 各血球のホモジネートの稀釈系列を作り, TP 活性を二段法で測定し, その結果を直線で結んで示した。白血病例では各症例別に, 健常例は一つに混じて測定した。対照として Platelin および Hanks' BSS を用いた。この測定法に部分トロンボプラスチンは影響しなかった。APL 白血球ホモジネートは濃度依存性の高い活性を示し, 10^7 個の細胞当たり280から55単位に分布し, 平均152単位であった。一部の症例では高濃度となると活

Table 2 Centrifugation Study on Homogenates of Promyelocytes

	Volume ML.	TTP Activity U./ML.	Total Activity U.	Recovery %
Homogenate	8	10	80	100
700 G ↓ 10min. → Ppt.	3.2	11	35.2	44
Sup.				
5,000 G ↓ 10min. → Ppt.	2.4	8.5	20.4	25.5
Sup.				
15,000 G ↓ 10min. → (No Ppt.)				
Sup.				
105,000 G ↓ 60min. → Ppt.	1.9	2.8	5.3	6.6
→ Sup.	6	1.1	6.6	8.3
Total Loss				15.6%

Fig. 2

性の低下するものがみられた。ホモジナイズしない浮遊液のまま測定すると活性は著しい低値であった。AML の 1 例で 10^7 個の細胞当たり 3.8 単位を示し、細胞数が増加するとかなりの活性を示したが、他の AML, CML および正常者の白血球、赤血球、血小板はほとんど活性を示さず、あっても 1 単位以下であり、多くは対照とした Platelin またはバッファーと著変なかった。

APL 凝固活性の各種欠乏血漿に対する影響
(表 1): APL 白血球ホモジネートは第Ⅷ, Ⅸ因子欠乏血漿の凝固時間を正常血漿と同程度まで短縮した。第ⅦおよびⅩ因子欠乏血漿を基質とした場合は Platelin の場合よりは凝固時間を短縮したが著明でなく、これらの結果は Simplastin の場合と類似していた。

Fig. 3 Neutralization of Clotting Activity with Anti-Human Placenta Tissue Thromboplastin./TTP)

遠沈分画法による細胞内 TP 活性分布の検討
(表 2): 総量 80 単位より出発し、表のごとくに分画した。実験中 12.5 単位のロスがあったが、残りの約 2 分の 1 は 700 G, 4 分の 1 が 5,000 G 分画に分布していた。15,000 G 分画には沈渣なく、105,000 G 分画およびその上清にも活性はほとんどなかった。

免疫学的手技による検討: Ouchterlony 法による検討の結果を図 2 に示した。中心に抗 P-TP 血清、周辺に上下におのおの APL および CML 白血球 DOC 抽出液、左右に精製した B- および P-TP を配した。抗 P-TP に対しおのおの 1 本の沈降線を形成し、これらは互に融合し、P-TP と partial identical にみえる。AML でも多数の細胞よりの DOC 抽出液を濃縮して用いると、同様の沈降線がみられた。次にこの抗血清の 33% 硫酸分画による APL 白血

球ホモジネートの活性中和試験を行なった(図3)。粗製 P- および B-TP も同様に検討した。この結果, APL 白血球ホモジネートは P- および B-TP 同様 time dependent に活性を中和された。対照として正常家兎血清の33%硫酸分画で検討したが, 活性の変化はみられなかった。

III. 考 察

二段法により APL 白血球に強い凝固活性を証明した。この活性は各種欠乏血漿を基質とした一段法による検討で活性発現に VII, X 因子が必要で, VIII, IX 因子は必要でないことから TP 活性と確認された。二段法の場合には, VIII, X 因子混液を基質としているので, X を直接活性化化するものと区別できないが, VII 因子を必要とすることから X の直接活性化は否定できると思われる。二段法は部分トロンボプラスチンには影響されず, これを含有する血小板や, 赤血球には TP 活性を認めなかった。活性の細胞内の存在様式について遠沈分画法により検討した。400G分画に2分の1, 5,000G分画に4分の1が認められたことから, かなり大きな細胞内構造に活性が付着していることが考えられる。APL の活性が 5,000G 以上の分画²⁾, または 105,000G分画に存在する¹⁾との報告や, 好中球を培養した時に出現する TP が14,500G⁶⁾または 8,200G⁷⁾分画に存在する報告があるが, ホモジナイズの方法, 溶媒等の条件の違いがあり, さらに検討を要する。白血球ホモジネートの濃度の高いところで活性の低下が一部でみられたが, 至適濃度の存在, または好中球に報告されているような凝固阻止因子⁸⁾の関与などが考えられて興味深い。抗 P-TP 血清による Ouchterlony 法での検討で, P- および B-TP と部分的に共通な抗原性を持つことが推定され, 活性中和試験によりこの部分が, 活性に密接な関係を持つことが示された。活性が浮遊液のままでは検討すると TP 活性は弱く, ホモジネートにして始めて強い活性がみられるので, 抗腫瘍剤により細胞が破壊された場合に多量の TP 活性が血漿中に入り DIC を惹起する, または増悪することが推定される。AML で 3.8

単位/ 10^7 細胞の活性をみた症例では治療に際して DIC を併発した。その他の AML や CML の一部の症例に僅かながら活性がみられたしこれらの DOC 抽出液には微量の TP 様活性物質が証明された。われわれは現在抗 P-TP 血清を用いた Immunoperoxidase Staining 法により細胞内の TP を染色することに成功し, 検討を進めているが結果は機会を改めて報告したい。

総 括

APL 白血球は強い TP 活性をもつ。この活性は白血球ホモジネートの 700G 分画に主として存在する。胎盤および脳の TP と共通の抗原性を示し, 類似した蛋白構造を持つと推定される。白血球浮遊液として検討すると活性が弱く, ホモジネートとして始めて強い活性が認められるので, 抗白血病剤による治療は TP 活性の血中浸入を招きやすいと考えられる。

文 献

- 1) 安藤泰彦, 他: 急性骨髄性白血病における DIC の原因と病態生理, 臨床血液, 17; 389, 1976.
- 2) Gouault-Heilman, M. et al.: The procoagulant factor of leukemic promyelocytes: Demonstration of immunologic cross reactivity with human brain tissue factor. Brit. J. Hemat., 30; 151, 1975.
- 3) Gralnick, H.R. et al.: Acute promyelocytic leukemia: Haemorrhagic manifestation and morphologic criteria. Brit. J. Haematol. 29; 373, 1975.
- 4) Gonmori, H. et al.: Properties of canine tissue thromboplastins from brain, lung, arteries, and veins. Am. J. Physiol., 229; 618, 1975.
- 5) Gonmori, H. et al.: Properties of human tissue thromboplastins from brain, lung, arteries, and placenta. Thromb. Diath. Haemorrhag., 36; 90, 1976.
- 6) Niemetz, J.: Coagulant activity of leukocytes, tissue factor activity. J. Clin. Invest., 51; 307, 1972.
- 7) Kociba, G.J. et al.: Development of procoagulant (tissue thromboplastin) activity in cultured leukocytes. J. Lab. Clin. Med.,

79 ; 778, 1972.

- 8) Saba, H.I. et al. : The anticoagulant activity of lysosomal cationic proteins from polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 46 ; 580, 1967.

<ABSTRACTS>

Studies on the procoagulant activity of leukocytes.

by

Hidemi GONMORI, Hiroshi TANAKA, Tatsuo UENO, Miyoko TAKAHASHI, Syozo TANAKA, Norio KOBAYASHI and Tada-shi MAEKAWA

from

Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine, Maebashi, Japan.

Tissue thromboplastin (TP) have been detected in various types of leukocytes as well as many other organs and it is suggested to play important roles in blood coagulation. In this report, we studied on TP in the leukocytes from various types of leukemia in order to estimate its responsibility for the development of DIC, which accompanied by these patients. We also compared it to brain (B) and placenta (P)TP by means of immunological techniques.

Washed leukocyte suspensions were prepared by centrifugation and hypotonic lysis technique from 9 acute myelocytic leukemias (AML), 5 acute promyelocytic leukemias (APL), 4 chronic myelocytic leukemias and 20 healthy

subjects. The TP activity was estimated by Nemerson's two stage method and effects on clotting times of various deficient plasmas were studied by Quick's one stage method. The distribution of the activity in the homogenate of APL leukocytes was studied by differential centrifugation. Anti-P-TP was produced and used for immunological studies employing Ouchterlony method and clotting activity neutralization technique.

Homogenates of APL leukocytes showed significant TP activity as much as 152 units per 10 million cells on the average, while homogenates of other blood cells, except a case of AML which had an activity of 3.8 units per 10 million cells, showed little activity. APL homogenates demonstrated striking shortening of the clotting times of Factor VIII and IX deficient plasmas but did not show this effect on Factor VII and X deficient plasmas. This activity was weak, when cell suspensions were used without homogenization. It sedimented mainly at 700G in the centrifugation study and was neutralized time dependently by anti-P-TP in the same manner as when B- and P-TP were examined. By Ouchterlony method, desoxycholate extract of APL leukocytes showed single precipitin line against anti-P-TP, which fused into the lines formed by purified B- and P-TP.

In conclusion, APL leukocytes have strong TP, which has similar antigenicity to B- and P-TP. It is conceivable that this TP causes or enhances DIC, especially when leukemic cells were destroyed by anti-leukemic therapy.