◆原 著◆

大動脈瘤における凝固線溶分子マーカーと サイトカインの検討

井 原 章 裕^{*1}, 小 林 康 記^{*1}, 川 本 俊 治^{*2}
吉 野 孝 司^{*2}, 雨 宮 彰^{*3}, 大 竹 重 彰^{*3}
井 原 勝 彦^{*3}, 藤 村 欣 吾^{*4}, 藏 本 淳^{*4}

Clinical Significance of Thrombosis-Related Markers and Cytokines in Patients with Aortic Aneurysm

Akihiro IHARA^{*1}, Yasuki KOBAYASHI^{*1}, Toshiharu KAWAMOTO^{*2}
Takashi YOSHINO^{*2}, Akira AMAMIYA^{*3}, Shigeaki OTAKE^{*3}
Katsuhiko IHARA^{*3}, Kingo FUJIMURA^{*4}, Atsushi KURAMOTO^{*4}

Key words: aortic aneurysm, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor, thrombosis-related markers

Determination was made of serum soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels, and plasma D-dimer, plasmin- α 2 plasmin inhibitor (PIC) and thrombin-antithrombin III complex (TAT) levels in patients with aortic aneurysm for clarification of the functions of cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis.

Mean sIL-2R and IL-6 values in the patients were 1158.61 ± 778.53 U/ml and 12.80 ± 13.90 pg/ml respectively, these being significantly higher ($p < 0.01$) than in the aged controls (488.22 ± 164.25 U/ml and 3.04 ± 0.21 pg/ml). TNF- α was essentially the same in the patients and aged controls. Mean plasma D-dimer, PIC and TAT in the patients were 1197.59 ± 1342.11 ng/ml, 2.34 ± 2.41 μ g/ml, 25.20 ± 17.08 ng/ml, respectively, significantly exceeding the values for the aged controls (103.71 ± 44.47 ng/ml, 0.72 ± 0.27 μ g/ml and 2.52 ± 1.21 ng/ml respectively).

Many more patients (6/6) with higher IL-6 than those (6/11) with lower IL-6 had higher

^{*1} 国立呉病院内科〔〒 737 呉市青山町 3-1〕: Department of Internal Medicine, Kure National Hospital, Chugoku District Cancer Center, Kure, 737 Japan.

^{*2} 国立呉病院循環器科: Department of Cardiology, Kure National Hospital, Chugoku District Cancer Center, Kure 737, Japan.

^{*3} Department of Cardiovascular Surgery, Kure National Hospital, Chugoku District Cancer Center, Kure 737, Japan.

^{*4} 広島大学原医研血液内科〔〒 734 広島市南区霞 1-2-3〕: Department of Hematology and Oncology, Division of Clinical Research, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima, 734 Japan. 受付: 1995. 3. 13, 受理: 1995. 5. 24.

D-dimer ($\chi^2=3.8$, $p<0.05$) and far more patients (9/10) with higher sIL-2R than those (3/8) with lower sIL-2R had higher D-dimer ($\chi^2=5.5$, $p=0.04$). Significant correlation was noted between IL-6 and sIL-2R levels ($r=0.76$, $n=17$) in the patients. No correlation could be found between TNF- α and IL-6, sIL-2R. It thus follows that sIL-2R and IL-6 in patients should be determined to clarify the pathogenesis of atherosclerosis.

緒 言

粥状動脈硬化の病巣には早期よりマクロファージばかりでなく T リンパ球の存在することも知られ、T リンパ球の産生、放出するサイトカインが内皮細胞 (EC)、平滑筋、マクロファージなどの血管内に存在する細胞を刺激し、その機能を抑制するようなパラクラインの機構が働いていることも知られている¹⁾。

実際に大動脈瘤などでは、血管組織の著明な破壊に伴って多数の T 細胞の浸潤が認められることが知られており、その血管障害には細胞性免疫の関与が強く示唆されるが、詳細には明らかにされていない²⁾。

従来より大動脈瘤 (aortic aneurysm, 以下 AA と略す) は、多くは動脈硬化性であり従来より DIC 準備状態にあると考えられている³⁾。我々は既に成人大動脈瘤患者での可溶性インターロイキン-2 受容体 (sIL-2R) と D-dimer (DD) の高値を報告⁴⁾した。今回はさらに IL-6, TNF- α を測定し、これらサイトカインと D-dimer, thrombin-antithrombin III 複合体 (TAT), plasmin- α 2 plasmin inhibitor 複合体 (PIC) との関係を検討したので報告する。

対象および方法

対象は AA 患者 22 例 (59~89 歳, 平均 73 歳; 男 16 例, 女 6 例; 胸部 AA で腹部 AA に対する手術既往 5 例, 急性期や術直後を除く; 動脈瘤の平均直径 6.2 cm; 厚生省 DIC 診断基準による DIC score は、7 が 1 例, 6~4 が 7 例, 3 以下が 14 例) とコントロールとしての健常老人 (OC と略す) 101 例 (60~88 歳, 平均 73 歳) である。

方法は、血漿 DD, TAT, PIC はすでに報告⁵⁾

した測定キットで ELISA 法によった。サイトカイン測定は ELISA による測定キット, すなわち sIL-2R はセルフリー IL-2R (山之内製薬, 日本), IL-6 は Human IL-6 ELISA kit Fujirebio (富士レビオ, 日本), TNF- α はヒト腫瘍壊死因子- α (TNF- α) 測定キット (大塚製薬, 日本) を用いた。

成 績

(1) AA の血漿 DD, TAT, および PIC 値 (Fig. 1, 2, 3)

AA 22 例の DD の平均値 ± 1 SD は $1,197.59 \pm 1,342.11$ ng/ml で, OC (72 例) の 103.71 ± 44.47 ng/ml に比べ有意な ($p<0.0001$) 高値 (Fig. 1), TAT は 25.50 ± 17.08 ng/ml ($n=22$) で, OC 66 例の 2.52 ± 1.21 ng/ml に比べ有意な ($p<0.00005$) 高値 (Fig. 2), PIC は 2.34 ± 2.41 μ g/ml ($n=22$) で OC 70 例の 0.73 ± 0.27 μ g/ml に比べ、有意な ($p<0.005$) 高値を示した (Fig. 3)。

(2) AA の血清 sIL-2R, IL-6 および TNF- α 値

AA 18 例の sIL-2R の平均値 ± 1 SD は、 $1,158.61 \pm 778.53$ U/ml で, OC 27 例の 488.22 ± 164.25 ($n=27$) に比べ有意な ($p<0.0001$) 高値 (Fig. 4), IL-6 は AA 17 例中 14 例 (82%) が測定感度の 4 pg/ml 以上であり、その平均値 ± 1 SD は 14.90 ± 14.50 U/ml であった。OC 28 例中 2 例がともに 4.1 pg/ml で、他は感度以下であった。すなわち AA では明らかに有意な ($p<0.0001$) 頻度で IL-6 が検出感度以上を示した。TNF- α は AA 17 例中測定感度の 5 pg/ml 以上を示す例は 6 例 (35.3%, 平均 33.3 pg/ml) で, OC の 28 例中 9 例 (32.1%, 平均 24.3 pg/ml) と比べ差はみられなかった。

Fig. 1 D-dimer levels in patients with aortic aneurysm.

Fig. 2 Thrombin-antithrombin III complex levels in patients with aortic aneurysm.

(3) 凝固線溶分子マーカー (DD, TAT, PIC) とサイトカインの関連

AA では DD と sIL-2R の相関係数は $r=0.1$ であり有意ではなかった。また虚血性心疾患 (IHD) の DD 値が 500 ng/ml を越える例は 79 例中 1 例 (819 ng/ml) であり⁵⁾、したがって 500 ng/ml 以上を DD 高値群とした。AA は 18 例中 13 例が DD 高値群であり sIL-2R の平均値 $\pm 1SD$ は、 $1,287.47 \pm 780.06$ pg/ml で、DD 低値群の 724.83 ± 428.84 pg/ml に比べ高値を示したが、有意差は ($p=0.11$) なかった。しかし OC の sIL-2R の平均値の 2SD 以上 (800 U/ml 以上) を sIL-2R 高値群とすると高値群 10

例中 9 例が DD 高値群であり、sIL-2R の高値と DD 高値は χ^2 検定で有意な ($\chi^2=5.5$, $p=0.04$) 関連が認められた。DD 高値群の IL-6 の平均値 $\pm 1SD$ は、 15.67 ± 14.41 pg/ml で DD 低値群の 5.48 ± 3.55 pg/ml に比べ高値を示したが、有意差はなかった ($p=0.11$)。しかし同様に IL-6 高値 (13 pg/ml 以上) は 6 例あり、全例 DD 高値群であり、IL-6 低値例の 11 例中 DD 高値例は 5 例であり、IL-6 高値と DD 高値がカイ 2 乗検定で有意な ($\chi^2=3.9$, $p<0.05$) 関連が認められた。TNF- α では高値例が少なく DD との関連が明らかでなかった。

PIC および TAT と sIL-2R および IL-6 に一

Fig. 3 Plasmin- α 2 plasmin inhibitor complex levels in patients with aortic aneurysm.

定の相関はなかった。TAT と TNF- α 及び PIC と TNF- α は TNF- α の高値例が少なく相関性があきらかでなかった。sIL-2R と IL-6 に $r=0.76$ ($n=17$) で有意な ($p=0.0004$) 相関がみられた (Fig. 5)。TNF- α と IL-6 および sIL-2R, CRP と IL-6 および sIL-2R には相関はなかった。

考 察

大動脈瘤患者における凝固線溶分子マーカーの多数例による報告はなく、われわれは DD, TAT, PIC の著明高値を報告し、AA が DIC 準備状態にあることを示した。さらに sIL-2R

Fig. 4 sIL-2R levels in patients with aortic aneurysm and in the aged controls.

sIL-2R levels were significantly higher ($p<0.0001$) in patients with AA (1126.71 ± 733.52 U/ml, $n=18$) than in the aged controls (488.22 ± 164.25 U/ml, $n=27$).

AA : aortic aneurysm, OC : aged controls

と IL-6 の高値も示した。IL-2 は活性化 T リンパ球の培養上清中に培養ヒト T 細胞の増殖を促進する因子として発見された⁶⁾。IL-2 を結合する受容体 (IL-2R) は T リンパ球膜表面に存在し、活性化 T リンパ球膜上に発現が増強すること、さらに IL-2R はリンパ球膜上に発現するのみでなく活性化 T リンパ球の培養上清中に、可溶性 IL-2R (sIL-2R) として遊離することがしめされた⁷⁾。IL-2R は活性化された T リンパ球では α 鎖、 β 鎖がともに発現し、高親和性レセプターを構築しているが、 α 鎖の発現が 10 倍たかく、 α 鎖 β 鎖の構成が細胞の分画によりさまざまであり⁸⁾、sIL-2R は IL-2 receptor α 鎖を発現している活性化されたリンパ球あるいは腫瘍細胞から遊離されるといわれ、この sIL-2R α 鎖測定法もすでに開発されている⁹⁾。さらにアテロームの活性化 T リンパ球は IL-2 を多く放出すること¹⁾、さらにこれらの活性化 T リンパ球膜表面に IL-2R 発現が確認されている¹⁰⁾¹¹⁾ ところから、IL-2R が血中に放出され、アテロームを伴う動脈硬化性疾患で高値を示す可能性が示唆される。IL-2 は EC に対して血小板凝集阻害物質であるプロスタサイクリンの合成

Fig. 5 Correlation between IL-6 and sIL-2R in patients with aortic aneurysm.

を促進させ¹²⁾, EC に対して IL-1, TNF の如く組織因子 (TF) は産生させない¹²⁾が, 単球/マクロファージに対して TF 活性を促進させる¹³⁾. 従って現在のところ患者血清中の sIL-2R と患者 T リンパ球の IL-2 放出量の相関の報告はないが, 本報告での AA の sIL-2R の高値は, 活性化 T 細胞からの IL-2 の放出を意味する可能性があり, AA での過凝固の原因となっていることも推測される.

IL-6 は, T 細胞, マクロファージ, EC などの多くの細胞から産生され, その作用が当初観察された B 細胞の抗体産生細胞への分化誘導のみならず, T 細胞, 肝細胞, 造血細胞などに対しても多彩な生理作用を示す多機能サイトカインであることが明らかとなった¹⁴⁾. IL-6 は, IL-1 β や TNF と同様 EC 培養上清中の PA 活性と t-PA 抗原を減少させるのに対し, PAI を増加させ, 細胞の TF 活性を一過性に発現させ, 生体内において凝固亢進状態を引き起こす主要な原因物質の一つであると考えられている¹⁵⁾. IL-6 は EC の物質透化性亢進や PGI₂ 産生減少をもたらし, 内皮細胞の選択的透化性と抗血栓性の維持機能を抑制する作用があると報告されている¹⁶⁾. この面から EC を障害する働きがある. 以上より IL-6 は EC の凝固促進とそれにもとづく線溶抑制を誘導し, 局所での血栓形成の促進, ひいては循環障害や臓器障害をもたらす敗血症性ショックや DIC の病態と深く関与するものと考えられている¹⁵⁾. 腫瘍壊死

因子- α (TNF- α) は, アテロームでのマクロファージ, T 細胞よりの放出が言われており¹⁾, 内皮細胞表面でのトロンボモジュリン (TM) の活性を抑制し, 組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) を減少させ, プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI) の産生を増加させ, さらに TF 活性を発現させるといわれる^{17)~20)}. 従ってこれらのサイトカインは凝固亢進, 線溶抑制に働くと考えられる. sIL-2R は川崎病で高値を示し, TNF- α と sIL-2R が高値を示す例に大動脈瘤の合併が多いことを報告²¹⁾されている.

本報告の AA 患者で DD, TAT, PIC, IL-6 と sIL-2R の有意な高値を示し, さらに DD と sIL-2R および IL-6 に有意な相関が, サイトカイン間では sIL-2R と IL-6 に良い相関が認められた. TNF- α については OC と比べ有意な高値を示さず AA での病態への関与は不明である. また瘤径や臨床病態とサイトカインおよび凝固線溶分子マーカーに明らかな相関はなかった. 血中に増加した IL-6 はマクロファージ, EC および T または B リンパ球より反応性に放出された可能性が考えられ, また同様に sIL-2R の増加は, T リンパ球の活性化によるものと推定される. すなわち細胞性免疫の関与により過凝固線溶抑制が AA の増悪に関与していると考えられ, 少なくとも AA において sIL-2R, IL-6 が病態になんらかの役割を果たしていると考えられる.

結 語

1. AA では慢性期でも DD, TAT, PIC が著明高値で、過凝固と二次線溶亢進状態にある。

2. AA では、sIL-2R, IL-6 が明らかに高値を示したが、TNF- α は有意な高値を示さなかった。

3. sIL-2R と IL-6 に有意な相関があり、DD と sIL-2R および IL-6 に相関があるところから、IL-2 および IL-6 が AA の病態形成に細胞性免疫によるメカニズムが関与している可能性も示唆した。

謝 辞：検体を測定いただいた斉藤豊彦氏、松田昌美氏、データ整理をしていただいた新田和子氏に感謝致します。

本研究は、厚生省循環器病研究委託費（4 公 3）による研究成果である。

文 献

- Libby, P. and Hansson, G.K. : Involvement of the immune system in human atherosclerosis: Current knowledge and unanswered questions. *Lab. Invest.*, **64**: 5-15, 1991.
- 世古義規: 血管壁における細胞性免疫反応と動脈硬化病変の形成. *最新医学* **5**: 978-984, 1994.
- Fisher, D.R. Jr, Yann D.H. and Grawford E.S. : Preoperative disseminated intravascular coagulation associated aortic aneurysm: A prospective study of 76 cases. *Arch. Surg.* **118**: 1252-1255, 1983.
- 井原章裕, 小林康記, 川本俊治, 吉野孝司, 石川勝憲, 西田幸弘, 雨宮 彰, 大竹重彰, 井原勝彦, 斉藤豊彦, 松田昌美, 山崎清二, 片山正一: 可溶性インターロイキン-2 受容体の動脈硬化性疾患での測定意義 —大動脈瘤での検討—. *臨床 病理中四会誌* **9**: 6-10, 1994.
- 井原章裕, 古林考保, 小林康記, 川本俊治, 吉野孝司, 石川勝憲, 藤村欣吾, 藏本淳: 虚血性心疾患における凝固線溶分子マーカーの測定意義—冠動脈造影所見との関連—. *血栓止血誌* **4**: 23-29, 1993.
- Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. : The differentiation and function of human T-lymphocytes. *Cell* **19**: 822-837, 1980.
- Rubin, L.A., Kurman, C.C., Fritz, M.E., Biddison, W.E., Boutin, B., Yarchoan, R. and Nelson, D.L. : Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphocytes in vitro. *J. Immunol.*, **135**: 3172-3177, 1985.
- Ohashi, Y., Takeshita, T., Nagata, K., Mori, S. and Sugamura, K. : Differential expression of interleukin-2 receptor subunits; p 55 and p 75 as various population of peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* **143**: 3548-3555, 1989.
- 小原 侃, Kung, P.C. : セルフリー IL-2R—可溶性インターロイキン 2 受容体 (sIL-R) の測定法. *臨床検査* **35**: 539-544, 1991.
- Hansson, G.K., Holm, J. and Jonasson, L. : Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am. J. Pathol.* **135**: 169-175, 1989.
- van der Wal, A.C., Das, P.K., van de Berg, D.B., van der Loos, C.M. and Becker, A.E. : Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab. Invest.* **61**: 166-170, 1989.
- Hall, E.R., Papp, A.C., Seifert, W.E.J.R. and Wu, K.K. : Stimulation of endothelial cell prostacyclin formation by interleukin-2. *Lymphokine Res* **5**: 87-96, 1986.
- Carlsen, E. and Prydz, H. : Activation of monocytes—more than one process. Differential effect of cytokines on monocytes. *Scand. J. Immunol.* **27**: 401-404, 1988.
- Kishimoto, T. : The Biology of interleukin-6. *Blood* **74**: 1-10, 1989.
- 新津義文: 血管内皮細胞の凝固線溶活性に及ぼす IL-6 の影響. *血栓止血誌* **4**: 406-416, 1993.
- Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. and Espevik, T. : The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin-6, interleukin-1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.* **169**: 333-338, 1989.
- Bevilacqua, M.P., Schleef, R.R., Gimbrone, M.A. and Loskutoff, D.J. : Regulation of the fibrinolytic system of cultured human vascular endothelium by interleukin 1. *J. Clin. Invest.* **78**: 587-591, 1986.
- Mawatari, M., Okamura, K., Matsuda, T.,

- Hamanaka, R., Mizoguchi, M., Higashio, K., Kohno, K. and Kuwano, M.: Tumor necrosis factor and epidermal growth factor modulate migration of human microvascular cells and production of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor. *Exp. Cell. Res.* **192**: 574-580, 1991.
- 19) Moore, K.L., Esmon, C.T. and Esmon, N.L.: Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* **73**: 159-165, 1989.
- 20) Nawroth, P.P. and Stern, D.M.: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **163**: 740-745, 1986.
- 21) Lin, C.Y., Lin, C.C., Hwang, B. and Chiang, B.N.: Cytokines predict coronary aneurysm formation in Kawasaki disease patients. *Eur. J. Pediatr.* **152**: 309-312, 1990.
-