シンポジウム 血栓症の病態生理と治療

1. 凝固亢進状態

(1) 血栓形成における組織トロンボプラスチンの役割に関する研究

群馬大学医学部第三内科 小林紀夫

序—凝固亢進状態

血栓形成の要因として血管壁、血流および血液成分の変化があげられ、Virchowのトリアスとして知られている。血栓はこれら諸要因が複雑に絡み合つて形成されるが、血小板・凝固・線溶系などの血液成分と血管壁の相互反応が中心的役割を果たすと考えられている。一般に、血栓症を伴い易い諸疾患では血小板の数の増加や機能の亢進、血液凝固能の亢進あるいは血液凝固制御機構や線溶機構に種々の障害のみられることが指摘されている¹⁾。これらは血栓好発状態あるいは凝固亢進状態と総括されることもある。つまり、凝固亢進状態とは本来、通常血栓を形成しないような刺激に対して異常に血栓形成をみるという生体内で見られる病態を意味するが、単に体外に取り出された血液が試験管内で凝固し易い事を表現する場合もあり、用語の混乱がある。本稿では前者の病態をさすこととする。凝固亢進状態の成因は複雑であるが、著者らは持続的な血管内における凝固過程の促進が関与することを指摘してきた²⁾。

組織トロンボプラスチン（TP）はリポ蛋白である。脂質部分は部分トロンボプラスチンと同様数種のリン脂質よりなる。蛋白部分（アポ蛋白）は疎水性の糖蛋白で分子量は50000から56000と報告されている^{3)~6)}。このアポ蛋白のみではTP活性はなく、リン脂質と結合してはじめて活性がみられる。従来、TPは活性VII因子と複合体を形成しX因子を活性化する外因系凝固機序の引金と考えられてきた⁷⁾⁸⁾。しかし近年、TPとVIIaの複合体はIX因

子を活性化し、さらにVIII因子が介在してX因子を活性化する機序が指摘され⁹⁾、血管内での凝固活性化はむしろこの系が重要であることが注目されている¹⁰⁾。血栓症やその特殊な病態である播種性血管内血液凝固症候群（DIC）を含む凝固亢進状態に共通する過程は、血管内凝固活性化である。しかし、血管内凝固活性化におけるTPの作用機序についての詳細は不明な点が少なくない。以下、血栓形成や凝固亢進状態の成因におけるTPの役割につき著者らの教室の成績を中心に報告したい。

対象および方法

当内科および関連病院に入院した非リンパ性急性白血病患者40例、心筋梗塞および脳梗塞患者104例、健常者30例を対象とした。

白血球細胞などのTP活性の測定：白血球細胞はGonmoriら¹¹⁾に従い分離した。これをHanks' BSSに再浮遊し、Potter-Elvehjemのhomogenizerでhomogenize後、Nemersonの2段法の変法¹²⁾によりそのTP活性を測定した。結果は凝固時間または標準曲線を用いて単位に換算して表現した。正常者より得た白血球、赤血球、血小板のTP活性も同様に測定した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養：Jaffeら¹³⁾の方法に従つて行なつた。実験には2～3代継代培養したものを用いた。

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞のTP活性測定：Confluentに達した培養細胞の培養液を血清非添加のそれに変え、エンドトキシンあるいはトロンビン添加後さらに60～360分間培養した。培養後、

Symposium on Pathophysiology and Treatment of Thrombosis. 1. Hypercoagulable State.

(1) Study on the role of tissue thromboplastin in the formation of thrombosis.

Norio KOBAYASHI, The Third Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine

内皮細胞を剥離し、Hanks'BSS液に再浮遊してhomogenizeし、白血病細胞と同様にしてそのTP活性を測定した。また、一部の実験ではS-2222を用いて細胞を破壊することなくin situでそのTP活性を測定した¹³⁾¹⁴⁾。この際、エンドトキシン添加と同時に培養液中に¹²⁵I標識精製X因子を添加し、内皮細胞へのX因子結合を測定した。

TPアポ蛋白抗原量の測定： 既報のradioimmunoassay (RIA) により測定した⁶⁾。

5分間うつ血前後の静脈血中のプラスミノゲンアクチベータ (PA) およびフォンビレブランド因子抗原 (vWF:AG) の測定： 空腹時被検者を仰臥位とし、上腕を血圧計のマニシェットを用い、中間圧で5分間加圧してうつ血させ、その前後で正中静脈より採血した。採血後直ちに遠沈して血漿を分離した。この血漿中のvWF:AGはLaurell法で測定した。また、この血漿よりユーグロブリン分画を分離し、そのPA活性を合成基質S-2251を用いて測定した¹⁷⁾。

フィブリノゲン代謝： ¹²⁵I標識フィブリノゲン (Sorin Biomedico社) を用いて測定した。被検者に約50 μ Ciの¹²⁵I標識フィブリノゲンを静注し、

その後の血中の放射活性の変動からAtencioら¹⁶⁾の2コンパートメントモデルに従って解析した。

成 績

正常血球および白血病細胞のTP活性： 正常者より得た血小板、赤血球および白血球のTP活性を図1上段に示した。いずれの細胞もNemmer-sonの2段法の変法¹²⁾で測定した凝固時間は短縮せず、TP活性は認められなかった。これに対し、図1下段に示したように急性前骨髄球性白血病では測定した全症例の白血球で、また一部の急性骨髄性白血病患者の白血球にも明らかなTP活性を認めた。

白血病細胞のTP活性とDICの発症： 図2に10⁷個当たりの白血病細胞のTP活性とDICの発症との関連を示した。10⁷個当たりの白血病細胞のTP活性が、約2単位を越えるとほとんどの症例でDICを発症した。

内皮細胞ホモジネートのTP活性： 内皮細胞ホモジネートの凝固活性はVIIおよびX因子欠乏血漿の一段法凝固時間を短縮せず、TPアポ蛋白に対する抗血清⁶⁾によりその活性が中和されることよりTP活性であることが明らかとなった。

図1. 正常赤血球、白血球及び血小板の組織トロンボプラスチン活性

図2. 急性非リンパ性白血病細胞の組織トロンボラスチン活性とDIC合併

エンドトキシン刺激による培養内皮細胞ホモジネートTP活性およびTPアポ蛋白量の変動：非刺激時の内皮細胞ホモジネートのTP活性は 2.8 ± 0.68 単位/mg蛋白量（平均値 $\pm$ SD）であつたが、エンドトキシン1, 10, 20 μ g/mlの添加により1時間後にはそれぞれ 6 ± 2.3 , 7.3 ± 0.8 , 9.6 ± 5.1 単位/mgと活性値は明らかに上昇し、3時間後にはそれぞれ 9.5 ± 3.3 , 12.8 ± 3.5 , 10.5 ± 1.4 単位/mgのピークに達した。TPアポ蛋白量は非刺激時 99 ± 43 ng/mgが、エンドトキシン1, 10, 20 μ g/mlの添加後1時間でそれぞれ 108 ± 72 , 162 ± 75 , 232 ± 91 ng/mgに、3時間後には 223 ± 73 , 217 ± 60 , 200 ± 22 ng/mg、6時間後には 217 ± 25 , 225 ± 110 , 225 ± 24 ng/mgと上昇した。

ヒトロンビン刺激内皮細胞のTP活性およびTPアポ蛋白量の変動：ヒトロンビン5単位/mlの添加1時間、3時間、6時間後のTP活性はそれぞれ2.4, 4.0, 15.8単位/mgと上昇し、TPアポ蛋白量はそれぞれ 109 ± 54 , 139 ± 42 , 272 ± 182 ng/mgといずれもふ置時間とともに上昇した。

エンドトキシン刺激内皮細胞へのX因子の結合：培養液中に血清因子とカルシウムを加え、さらに 125 I標識精製X因子を添加してエンドトキシン10 μ g/mlで刺激した際の内皮細胞のTP活性および標識X因子の内皮細胞への結合を図3に示した。この際、内皮細胞のTP活性は細胞をホモジネートすることなく合成基質S-222をもちいて測定した¹³⁾¹⁴⁾。図に示したように、ふ置時間の経過とともに細胞表面のTP活性が上昇し、これに伴つ

図3. エンドトキシン刺激培養内皮細胞の組織トロンボラスチン活性産生とX因子結合

てX因子の結合量も増加した。このTP活性の上昇とX因子結合量の増加はホスホリパーゼC20 μ g/mlの添加で阻止された。

心筋梗塞および脳梗塞における上腕うつ血前後のvWF：AGおよびPAの変化：図4に示したように、うつ血前後のvWF：AGはともに患者群で同年令の正常者群に比し有意 ($p < 0.005$) に高値であつた。一方、患者群のうつ血前のPAは有意 ($p < 0.005$) に低値であつた。

心筋梗塞および脳梗塞におけるフィブリノゲン代謝：検討し得た患者群29例のフィブリノゲン半寿命は 2.60 ± 0.29 日であり、7例の正常者 3.25 ± 0.27 日より有意 ($p < 0.005$) に低値であつた。一方、フィブリノゲン1日消費量は患者群で 69.1 ± 18.3 mg/kg/dであり、正常者の 34.8 ± 8.1

図4. 心筋梗塞および脳梗塞における上腕うっ血前後のvWF:AGおよびPAの変化

mg/kg/dに比し有意に高値であった。

うっ血前後の静脈血中のvWF:AGまたはPAと、フィブリノゲン半寿命または1日消費量との関係: 表1にうっ血前後の静脈血中のvWF:AGまたはPAと、フィブリノゲン半寿命または1日消費量との相関係数をしめた。有意の相関関係が、フィブリノゲン半寿命とうっ血前のvWF:AG($r = -0.381$, $p < 0.05$), うっ血後のvWF:AG($r = -0.450$, $p < 0.01$), うっ血後のPA($r = 0.684$, $p < 0.005$), またはうっ血前後のPA増加量($r = 0.636$, $p < 0.005$)との間に認められた。フィブリノゲンの1日消費量とうっ血前のvWF:AG($r = -0.438$, $p < 0.01$), うっ血後のvWF:AG($r = 0.492$, $p < 0.01$), うっ血後のPA($r = -0.476$, $p < 0.01$)またはうっ血前後のPA増加量($r = -0.460$, $p < 0.01$)との間にも有意の相関関係が認められた。

考 察

DICは種々の疾患に合併する病態で、全身の微小血管に血栓を多発する血栓症の特異な型である。他の血栓症と異なり複数臓器の血栓による虚血性変化と、消費性凝固障害を特徴とする。白血病はDIC合併頻度の最も高い疾患であり、なかでも急性前骨髄球性白血病は最も高いDIC発現率を示す。著者らの教室の症例では、白血病寛解導入治療中に発現した症例を含めると100%にDICを併発した。これらの患者の白血病細胞には強いTP

表1. うっ血前後の静脈血中vWF:AG又はプラスミノゲンアクチベータ(PA)とフィブリノゲン代謝との関係(相関係数)

	フィブリノゲン代謝	
	半寿命(T/2) 日	1日消費量 mg/kg/日
うっ血前のvWF:AG	-0.381*	0.438**
うっ血後のvWF:AG	-0.450**	0.492**
うっ血前のPA	0.249	-0.068
うっ血後のPA	0.684***	-0.476**
Δ vWF:AG	-0.197	0.134
Δ PA	0.636***	-0.460**

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$

活性が認められた(図1)。急性前骨髄球性白血病以外の急性非リンパ球性白血病でもDICを併発する症例があった。これらの症例でもその白血病細胞のTP活性は高値で、一般に、 10^2 個当たりの白血病細胞のTP活性が2単位を越えると殆どの症例でDICを併発することが判明した。これらの成績から、急性白血病のDIC併発は白血病細胞のもつTP活性が主因であると考えられる。

このTP活性は細胞を破壊するのみで認められることから、生体内でも白血病細胞の破壊によりTPが血液に露出して血管内凝固を活性化することが推定される。しかし、著者らは培養細胞HL-60を用いた検討で、細胞破壊のない状態で、培養液中に強いTP活性を認めており¹⁸⁾、TPが細胞から放出される可能性も考えておく必要がある。従って、白血病におけるTPによる凝固活性化の機序に関してさらに検討が必要と思われる。

正常の血管内皮細胞は強い陰性荷電をもち、かつプロスタサイクリン¹⁹⁾を産生放出して血小板の活性化を防止し、血液凝固因子を活性化する作用はみられない。また、何らかの原因で血管内でトロンビンが形成されても内皮表面ではヘパラン硫酸がアンチトロンビンIIIのトロンビン不活性化を促進し²⁰⁾²¹⁾、トロンボモジュリン²²⁾はトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して、進行中の血液凝固機転にnegative feed backをかける。他方、プラスミノゲンアクチベータを産生放出して生成されたフィブリンを溶解するなど、内皮細胞は強い血栓性を持つ内皮下組織と血液との接触

を防ぐ単なる隔壁のみではなく、むしろ積極的に血栓防止に作用していることが知られている。しかし、エンドトキシンやトロンビンで内皮細胞を刺激するとTP活性が生ずることはここに示した通りである。同様の成績は他にも報告されている^{23)~25)}。一方、エンドトキシンで刺激した内皮細胞はTP活性の発現に伴ってX因子を結合した。この他にIX因子および活性IX因子も内皮細胞に結合することが知られている²⁶⁾。さらに、Sternらは内皮細胞に結合したIXaはVIII因子の存在下でX因子を活性化すること、さらに、XaはV因子の存在下でプロトロンビンを活性化すること、VIIaと刺激された内皮細胞によるXaの生成はIXとVIII因子の存在で10倍速度が上昇する事から刺激された内皮細胞はTPを産生し、VII因子を介してその膜表面でIX因子活性化より始まり、フィブリン形成に至る凝固過程の進行を提案している¹⁰⁾。今回の我々の成績もこの仮説を支持するものと考えられる。さらに、Sternらは、この凝固機序が生体内でも止血や血栓形成に重要な役割を果たす可能性を指摘している¹⁰⁾。

以上のように、血管内皮細胞がTP生成を介して血栓形成にかかわるとすれば臨床的に内皮機能の測定が重要となる。今回、心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症患者の内皮機能を測定する目的で、内皮細胞の産生・放出するプラスミノゲンアクチベータとvWF:AGの静脈うつ血前後の血中濃度を測定した。これら疾患群では対照正常群に比し、うつ血前後のvWF:AGは有意に高値であり、うつ血前のPAは有意に低値であつた。同様の成績は他にも多数報告されている²⁸⁾。しかし、これらの数値が何を意味するか十分明らかでないが、少なくとも内皮機能の変化の一端を示すものと考えられる。

一方、凝固亢進状態では血小板数の増加やその機能の亢進、血液凝固因子の増加や制御因子、線溶因子の低下などが多数により指摘され、血小板のターンオーバーやフィブリンノゲンなどの凝固因子の代謝が亢進することが報告されている¹⁾。このフィブリンノゲンの代謝亢進はワーファリンの投

与で正常化することから、著者らは凝固亢進状態を直接表現するものと考えている。さらに、これらの成績に基づき持続的な凝固過程の活性化による凝固因子の消費増大があり、それに対応して過剰産生が惹起された状態がこれら症例の多くで共通してみられる凝血的異常の成因と考えている²⁾。今回検討した血栓症患者でもフィブリンノゲン半寿命の短縮と1日消費量の増大を認めた。さらに、これらのフィブリンノゲン代謝の異常の程度と、静脈血中のvWF:AGやPAの異常と相関関係のみられた事が注目される。もし、うつ血前後の血中vWF:AGやPAが内皮機能の変化を反映すると仮定すれば、凝固亢進状態における血管内凝固の成因として内皮のTPが関与している可能性も示唆される。この点につきさらに検討が必要と考えられる。

結 論

血栓形成におけるTPの役割につき検討を加え、以下の結果を得た。

1) 急性白血病のDICの惹起物質として白血病細胞のTPが重要である。細胞が破壊されて、TPが血液に露出する機序が推定されるが、TPが血中に放出される可能性もある。

2) 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞はエンドトキシンまたはトロンビン刺激によりTPを産生する。

3) 心筋梗塞および脳梗塞患者では静脈血中のvWF:AGおよびPA濃度に異常が認められる。一方、フィブリンノゲン代謝の亢進が認められ、両者間に密接な関連が推定された。

4) 以上の成績より、凝固亢進状態におけるTPの役割につき考察した。

本研究は厚生省循環器病研究委託費(58C-1)、厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究費および文部省総合研究(A)血栓形成・溶解の機序と血栓症の診断、治療、予防に関する研究費に拠つた。

研究協力者: 松本 操, 内山俊正, 安藤 潔, 前川 正

文 献

- 1) Davies JA and McNicol GP: Detection of a prethrombotic state. Haemostasis and Thrombosis ed, by Bloom AC and Thomas DP, Churchill Livingstone Edinburgh, London, Mel-

- bourne, and New York 1981, p593.
- 2) 小林紀夫, 他: 肝と凝固—凝固因子の生成と代謝—立山シンポジウムI凝固・線溶・血小板研究—基礎と臨床—, 風間睦美, 松田道雄, 桜川信男 編, 宇宙堂八木書店, 1982, p101.
 - 3) Hvatum M and Prydz H: Studies on tissue thromboplastin. I. Solubilization with sodium deoxycholate. *Biochim Biophys Acta* 130: 92, 1966.
 - 4) Liu DTH and McCoy LE: Tissue extract thromboplastin quantitation, fractionation and characterization of protein components. *Thromb Res* 7: 99, 1975.
 - 5) Bjorklid E, et al: An immunoradiometric assay for factor III. *Brit J Haematol* 39: 445, 1978.
 - 6) 前川 正: 組織トロンボプラスチンのradioimmunoassay. 厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班, 昭和58年度研究報告書, 1984, p56.
 - 7) Davie E and Ratnoff O: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310, 1964.
 - 8) MacFarlane R: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202: 498, 1964.
 - 9) Osterud B and Papaport SI: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5260, 1977
 - 10) Stern D, et al: An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2523, 1985.
 - 11) Gonmori H and Takeda Y: Properties of canine tissue thromboplastins from brain, lung, arteries and veins. *Am J Physiol* 229: 618, 1975
 - 12) Gonmori H and Takeda Y: Properties of human tissue thromboplastins from brain, lung, arteries and placenta. *Thromb Diathes Haemorrh* 36: 90, 1976.
 - 13) Hische EAH, et al: Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 27: 1427, 1981.
 - 14) Schorer AE, et al: Structural features of endotoxin required for stimulation of endothelial cell tissue factor production; exposure of preformed tissue factor after oxidant-mediated endothelial cell injury. *J Lab Clin Med* 106: 38, 1985.
 - 15) Jaffe EA, et al: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 52: 2745, 1973.
 - 16) Atencio AC, et al: Studies on the metabolism and distribution of fibrinogen in young and older rabbits. I. Methods and models. *Lab Clin Med* 66: 1, 1965.
 - 17) Campbell EE, et al: A colorimetric assay for releasable plasminogen activator. *Clin Chem* 28: 1125, 1982.
 - 18) Kubota T, et al: Tissue factor of leukemia cell lines (HL-60, MOLT-4) and leukemia cells from patients with acute non-lymphoid leukemia. *Thromb Haemostas* 54: 258, 1985.
 - 19) Moncada S, et al: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663, 1976.
 - 20) Stern D, et al: Interaction of antithrombin III with bovine aortic segments. Role of heparin in binding and enhanced anticoagulant activity. *J Clin Invest* 75: 272, 1985.
 - 21) Shimada k, et al: The potency of heparin-like activity of glycosaminoglycans released by human endothelial cells in culture. *Esperientia* 41: 671, 1985.
 - 22) Esmon W, et al: Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 257: 859, 1982.
 - 23) Stern D, et al: Activation of factor IX bound to cultured bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 913, 1984.
 - 24) Lyberg T, et al: Cellular cooperation in endothelial cell thromboplastin synthesis. *Brit J Haematol* 53: 85, 1983.
 - 25) Colucci M, et al: Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest* 71: 1893, 1983.
 - 26) Stern D, et al: Binding of factor IX and IXa to cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4119, 1983.
 - 27) Ponati O, et al: Correlation between changes induced by venous occluding on factor VIII—von Willebrand factor components and fibrinolytic activity. *Haemostasis* 14: 179, 1984.