

Behavior of Leukocyte Elastase in Leukemia and its Role in Degradation of Fibrinogen and/or Fibrin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8129

白血病における白血球エラスターゼの動態とそのフィブリノゲン、 フィブリン分解に関する研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

齊 藤 正 典

(平成1年6月20日受付)

白血病における白血球エラスターゼの動態をエラスターゼ・ α_1 プロテアーゼインヒビター複合体 (elastase- α_1 proteinase inhibitor complex, E- α_1 PI) を指標に解析し、白血球エラスターゼのフィブリノゲン、フィブリン分解におよぼす影響についても検討した。種々の白血病59例において血漿中の E- α_1 PI を測定したところ、急性骨髄性白血病 (acute myelocytic leukemia, AML), 急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL), 急性骨髄単球性白血病, 慢性骨髄性白血病で著増を示し、急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL), 急性リンパ性白血病では正常範囲内であった。抗白血球エラスターゼモノクローナル抗体を用いて白血病の腫瘍細胞を免疫染色したところ、E- α_1 PI が著増を示した AML 例は陽性に染色され、E- α_1 PI が正常値を示した AMoL 例は陰性を示し、血中での E- α_1 PI の測定および白血球エラスターゼ特異的免疫染色は顆粒球系細胞の指標になるとともに白血病の病型分類に有用と考えられた。白血病診断時の E- α_1 PI をその時の末梢白血球数に対する比に換算した値は APL で著増しており、また急性白血病に対する寛解導入療法後の E- α_1 PI の変動をみると APL 以外の急性白血病では白血球減少と平行して低下を認めたが、APL では白血球減少時においても11例中6例で E- α_1 PI の上昇が続いていた。白血球エラスターゼによるフィブリノゲン、フィブリンの分解産物 (fibrinogen and/or fibrin degradation products, FDP) は抗フィブリノゲン抗体を用いた従来の FDP 測定法では反応を示し、モノクローナル抗体を用いた2種類の安定化フィブリン分解産物 (crosslinked fibrin degradation products, XDP) 測定法では一方は反応性を示し、他方は反応性を示さなかった。このことはモノクローナル抗体の性質の差によると考えられた。APL 例において白血球エラスターゼと FDP, XDP 形成の関係を検討したところ E- α_1 PI 値と FDP 値との間には有意な正の相関関係が認められ、また APL の中でプラスミン・ α_2 アンチプラスミン複合体が正常な例、すなわちプラスミンの関与が少ないと考えられる例では E- α_1 PI が高い群において FDP, XDP が有意に上昇していた。以上の結果より前骨髄球は大量の白血球エラスターゼを含んでおり、また APL での FDP, XDP 形成に白血球エラスターゼが関与している可能性が示唆された。

Key words leukocyte elastase, elastase- α_1 proteinase inhibitor complex, acute promyelocytic leukemia, fibrinogen and/or fibrin degradation products, immunocytochemical staining

Abbreviations: ALL, acute lymphocytic leukemia; AMoL, acute monocytic leukemia; AML, acute myelocytic leukemia; AMMoL, acute myelomonocytic leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; APPAP, alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase; α_1 PI, α_1 proteinase inhibitor; ATIII, antithrombin III; BSA, bovine serum

ヒト白血球エラスターゼは白血球中に含まれる重要な中性プロテアーゼの一つでありその分子量は約30,000の糖蛋白質である¹⁾。本酵素は基質特異性が低く、エラスチン、コラゲーン、プロテオグリカンなどの結合組織成分の他、補体、凝固線溶因子などの血漿蛋白も基質としそれらを分解するため、種々の炎症性疾患、肺気腫などの病因に深く関与していることが示唆されており²⁻⁴⁾、また慢性期脳梗塞や糖尿病などの動脈硬化性疾患で上昇するとの報告もある⁵⁾。一方、白血球エラスターゼは血中に放出されると主に α_1 プロテアーゼインヒビター (α_1 PI) によって中和され、1:1のモル比で結合し、エラスターゼ $\cdot\alpha_1$ PI 複合体 (elastase- α_1 PI complex, E- α_1 PI) を形成するため、血中の E- α_1 PI を測定できれば白血球エラスターゼの放出の指標となり得ると考えられる⁷⁾。白血球エラスターゼは主に顆粒球由来の酵素であるが、種々の分化段階で腫瘍性増殖を示す各種白血病での細胞内エラスターゼの同定や血中での E- α_1 PI の測定は白血病の病型分類に役立つ可能性も考えられる。

血液中の線溶系酵素としてはプラスミンがその主役をなしていることは以前より言われているが、血栓の中に白血球がまきこまれていること⁸⁾、血液が凝固する際に白血球よりエラスターゼが放出されること¹⁰⁾、またエラスターゼが基質としてフィブリノゲン、フィブリンを分解すること¹¹⁾などより、生体で特に白血球エラスターゼが増加する病態で別の線溶機構として白血球エラスターゼが働いている可能性が考えられる。

本研究では、さまざまな種類の白血病において E- α_1 PI を定量測定しその動態を解明し、また一部の例で抗白血球エラスターゼ抗体を用いて白血病細胞内のエラスターゼを免疫染色し、その局在を調べ比較検討した。また、白血球エラスターゼにて試験管内でフィブリノゲン、フィブリンを消化し、フィブリノゲン、フィブリン分解産物 (fibrinogen and/or fibrin degradation products, FDP) を形成させ従来の FDP 測定法ならびに最近測定が可能になった安定化フィブリン分解産物 (crosslinked fibrin degradation products, XDP) 測定法にこれら白血球エラスターゼによる分解産物がどのように影響するかを検討した。さらに白血病のなかでも凝固線溶異常を高率に合併す

る急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL)¹²⁾¹³⁾での FDP 形成に白血球エラスターゼが関与しているかどうかについてもプラスミンと対比させることにより検討を加えた。

対象および方法

I. 対象

対象は白血病58例、真性多血症 (polycythemia vera, PV) 1例の計59例で白血病の内訳は急性骨髄性白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 11例、APL 14例、急性骨髄単球性白血病 (acute myelomonocytic leukemia, AMMoL) 3例、急性単球性白血病 (acute monocytic leukemia, AMoL) 3例、赤白血病 (erythroleukemia, EL) 1例、急性リンパ性白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 7例、慢性骨髄性白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) 19例である。白血病の診断は従来の形態学による方法、細胞化学的性質を利用した特殊染色、フローサイトメトリーによる膜表面抗原の解析などによった。急性白血病においては診断時および化学療法施行後経時的に採血し、白血球減少状態 (nadir) まで経過を観察した。対照としては健康人10例を用いた。なお、血漿は血液9容に対し1容の3.8%クエン酸ナトリウムにて採血したものを3000回転10分間遠心後、上清を分離して用い、FDP 測定用の血清はトロンビン5単位と抗プラスミン剤を含んだ専用採血管にて採血後、3000回転10分間遠心後、上清を分離したものをを用いた。

II. 各種白血病における白血球エラスターゼの測定
患者血中への白血球エラスターゼの放出の指標として白血球エラスターゼ $\cdot\alpha_1$ プロテアーゼインヒビター複合体 (E- α_1 PI) を血漿を用いて測定した。測定は MERCK 社 (Darmstadt, Germany) のキットを用い酵素免疫測定法 (enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)⁸⁾¹⁴⁾にて行った。測定法の概略は以下の通りである。標準溶液および51倍に希釈した検体を抗白血球エラスターゼ抗体をコーティングしたポリスチレンチューブに加え60分インキュベート後洗浄し、酵素標識した α_1 PI に対する抗体溶液を加える。インキュベート後洗浄し、基質を加え遮光しインキュベート後、反応を停止させる。吸光度計 (UV-120-02, 島津, 京都) にて吸光度を測定し、検量線から検体中の

albumin; CML, chronic myelocytic leukemia; E- α_1 PI, elastase- α_1 proteinase inhibitor complex; EL, erythroleukemia; ELISA, enzymelinked immunosorbent assay; FDP, fibrinogen and/or fibrin degradation products; FgDP, fibrinogen degradation products; PCIA, particle counting immunoassay; Pm- α_2 AP, plasmin- α_2 antiplasmin complex;

E- α_2 PI 濃度を求め、希釈倍数51をかけ、患者血漿中の E- α_2 PI 濃度とした。

III. 免疫染色

白血病の一部の症例に対して白血病細胞内エラスターゼの同定を抗白血球エラスターゼモノクローナル抗体 (Dako 社, Glostrup, Denmark) を用いた免疫染色¹⁵⁾にて行った。使用した各抗体の希釈は0.03%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 加トリス塩酸緩衝液 (tris buffered saline, TBS, pH 7.4) にて行い、反応は室温、湿潤箱内で乾燥を防止して行った。スライド標本を乾燥後、エタノール・ホルマリン液にて60秒間固定し TBS にて洗浄後 3% BSA-TBS にてブロッキングを行った。抗白血球エラスターゼ抗体と30分間反応させ、TBS にて数分間洗浄後、抗マウス免疫グロブリン抗体 (Dako 社) と30分間反応させた。TBS にて同様に洗浄後、アルカリフォスファターゼ抗アルカリフォスファターゼ複合体 (alkaline phosphatase monoclonal anti-alkaline phosphatase complex, APPAP Complex, Dako 社) と30分間反応させた。次に TBS にて洗浄後、アルカリフォスファターゼ基質にて15分間反応させ、洗浄乾燥後、カラッチヘマトキシリン核染色液にて後染色を行った (図1)。

IV. APL での凝固線溶パラメーターの測定

播種性血管内凝固症候群を合併した APL を対象に血漿フィブリノゲン値、血清 FDP 値、血漿 XDP 値および血漿中のプラスミン・ α_2 アンチプラスミン複合体 (plasmin- α_2 antiplasmin complex, Pm- α_2 AP) 値を測定した。フィブリノゲンは Clauss 法¹⁶⁾を用いて自動測定装置 (Auto-Fi, Dade 社, Miami, USA) にて測定、FDP は抗フィブリノゲン抗体を感作したラテックス凝集法にて、XDP は粒子計数免疫測定法 (particle counting immunoassay, PCIA)¹⁷⁾¹⁸⁾にて測定した。Pm- α_2 AP はプラスミノゲンに対する抗体を固定化したビーズと酵素標識した α_2 アンチプラスミンに対するモノクローナル抗体を用いたワンステップサンドイッチ ELISA 法¹⁹⁾にて測定した。

V. フィブリノゲンおよびフィブリン消化試験

1. フィブリノゲンおよび安定化フィブリンの調整
精製フィブリノゲン (ミドリ十字, 大阪) を 0.05M トリス塩酸 0.15M NaCl 緩衝液 (TBS) に溶解し 1mg/ml のフィブリノゲン溶液とした。安定化フィブリン

は 1mg/ml のフィブリノゲン溶液に 10単位/ml の第 XIII 因子 (ミドリ十字, 大阪) 10 μ l, 50単位/ml の トロンビン (持田, 東京) 20 μ l, 1M CaCl₂ 10 μ l を加え、1時間インキュベートして作成し、3000回転10分間遠心後、クロットを取り出し TBS に再浮遊させて用いた。

2. 消化試験

フィブリノゲンおよび安定化フィブリンをそれぞれプラスミンならびに白血球エラスターゼにて消化した。フィブリノゲン溶液 1ml に 5cu/ml のプラスミン (ミドリ十字) 50 μ l を、安定化フィブリンに対しては 100 μ l 加えて 37°C でインキュベートし、反応開始後、15分、30分、45分、1時間、6時間、18時間、30時間後に 10000単位/ml の アプロチニン (Bayel 社, Leverkusen, Germany) 100 μ l を加えて反応を停止させ、それぞれフィブリノゲン分解産物 (fibrinogen degradation products, FgDP), 安定化フィブリン分解産物 (XDP) とした。同様に 1ml のフィブリノゲン溶液および安定化フィブリンに 2単位/ml の白血球エラスターゼ (Protogen 社, Laufelfingen, Switzerland) 100 μ l を加えて 37°C でインキュベートし、反応開始後 1時間、6時間、18時間、30時間後に 1% 大豆トリプシンインヒビター (Sigma 社, St. Louis, USA) 100 μ l にて反応を停止させ、それぞれ白血球エラス

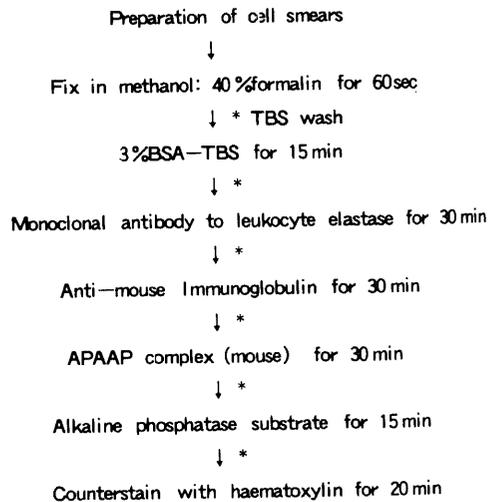


Fig. 1. Immunocytochemical staining procedure with monoclonal anti-leukocyte elastase antibody.

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PV, polycythemia vera; SDS, sodium dodecyl sulphate; t-PA, tissue-type plasminogen activator; TBS, tris buffered saline; WBC, white blood cell; XDP, crosslinked fibrin degradation products

ターゼ分解による FgDP, XDP とした。

3. 各種測定法による検討

プラスミンおよび白血球エラスターゼによる消化によって得られた FgDP, XDP を現在利用されている各種 FDP および XDP 測定法にて測定し比較検討した。用いた測定法は3種類で、1) 抗フィブリノゲン抗体感作ラテックス凝集を自動分析装置 (COBAS-FARA, Roche 社, Basel, Switzerland) にて定量する FDP 測定法, 2) 抗Dダイマーモノクローナル抗体感作ラテックス凝集を用いてその凝集程度を肉眼的に判定し半定量する XDP 測定法 (DIMERTEST-LATEX, Mabco 社, Springwood, Australia)²⁰, 3) 抗D分画モノクローナル抗体を用いたラテックス凝集を自動粒子カウンターにて定量する XDP 測定法 (PCIA, 第一化学薬品, 東京) である。

4. ポリアクリラマイドゲル電気泳動 (SDS, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

SDS-PAGE はトリス・グリシン緩衝液を用い、Laemmli の方法²¹に従って行った。4%–20%のグラディエントゲルにプラスミンおよび白血球エラスターゼにて消化して得られた分解産物を SDS 化後添加し、60mA, 90分間電気泳動した。染色はコマーシェープリリアント青にて行い、分子量マーカーは、それぞれの蛋白のサブユニットを含んだキット (Pharmacia 社, Uppsala, Sweden) を用い、その内容はミオシン (212,000), α_2 マクログロブリン (170,000), β -ガラクトシダーゼ (116,000), トランスフェリン (76,000), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (53,000) である。

5. イムプロットティング

白血球エラスターゼにて消化して得られたフィブリ

ン分解産物の FDP-D 分画に対する抗体に対する反応性を調べるためにイムプロットティングを行った。フィブリンの白血球エラスターゼ分解産物を SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写し²², 膜を0.05% Tween 加 TBS (T-TBS) にて洗浄後, ブロックエース (大日本製薬, 大阪) をマウントし, 37°C 1時間インキュベートしてブロッキングを行った。T-TBS にて洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗 D 分画抗体 (Stago 社, Asnieres-sur-seine, France) を100倍希釈してマウントし, 37°C 1時間インキュベートした。T-TBS にて洗浄後, ペルオキシダーゼ用発色溶液に浸漬し数分間発色させ, バンドが認められたのち T-TBS で洗浄し反応を停止させた。

VI. 統計処理

各群の測定結果は平均±標準偏差で表示した。各群の平均値の差の検定は正規分布する場合は対応のない t 検定を用い, 正規分布しない場合は対応のないノンパラメトリック Wilcoxon 検定を用い, 両側検定で危険率 5% 以下を有意とした。

成 績

I. 各種白血病における E- α_1 PI 値の変動

1. 白血病診断時での E- α_1 PI 値

健常者における血漿 E- α_1 PI は $91 \pm 21 \mu \text{g/l}$ (n=10) であった。各種白血病診断時の E- α_1 PI 値は

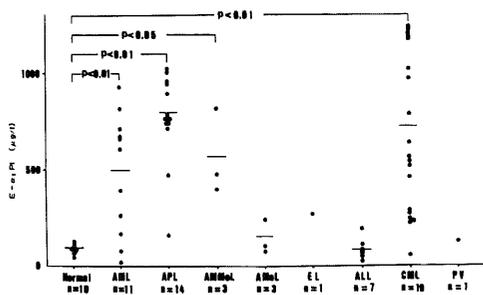


Fig. 2. Levels of elastase- α_1 proteinase inhibitor complex (E- α_1 PI) in patients with various types of leukemia at diagnosis. Marked elevation of E- α_1 PI levels was observed in patients with AML, APL, AMMoL or CML.

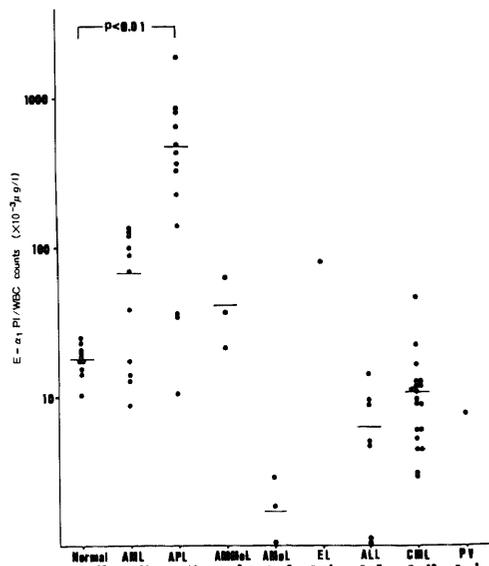


Fig. 3. Ratio of E- α_1 PI levels to leukocyte counts in patients with various types of leukemia at diagnosis. Marked elevated values were observed in patients with APL.

AML で $491 \pm 322 \mu\text{g/l}$ ($n=11$), APL で $792 \pm 273 \mu\text{g/l}$ ($n=14$), AMMoL で $564 \pm 222 \mu\text{g/l}$ ($n=3$), CML で $716 \pm 473 \mu\text{g/l}$ ($n=19$) とそれぞれ健常者に比較して有意な上昇が認められた (図 2). 一方, AMoL は $141 \pm 92 \mu\text{g/l}$ ($n=3$), ALL は $84 \pm 55 \mu\text{g/l}$ ($n=7$) と両白血病群では健常者と有意な差は認めなかった.

診断時の E- α_1 PI 値をその時の末梢白血球数に対する比に換算すると, APL で $477 \pm 499 \times 10^{-3} \mu\text{g/l}$ ($n=13$) と健常者や他の白血病群と比較して著増していた. CML では E- α_1 PI は著増を示したものの末梢白血球数に対する比に換算すると $11.1 \pm 9.5 \times 10^{-3} \mu\text{g/l}$ ($n=19$) と健常者とほぼ同様な値が得られた (図 3).

2. 化学療法後の E- α_1 PI 値の変動

急性白血病23例を APL 11例, APL 以外の急性白血

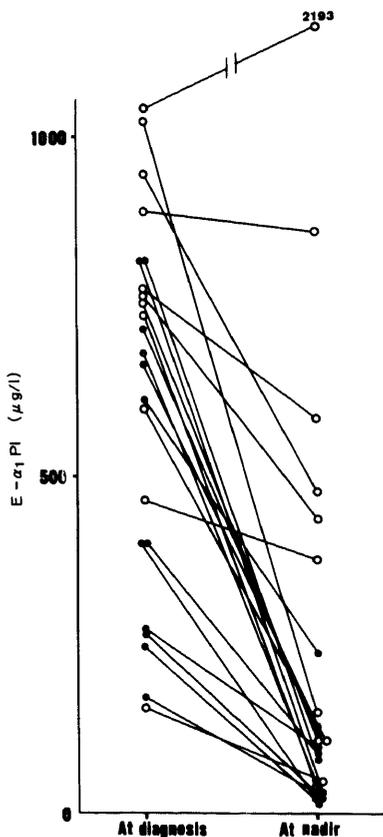


Fig. 4. Change of E- α_1 PI levels in 23 patients with acute leukemia who received remission induction therapy. Results were given at diagnosis and at the nadir of leukocyte counts. ○, APL; ●, AML, AMMoL and EL.

病12例に分け初回寛解導入療法前から白血球数が最低値を示した時期 (nadir) までの E- α_1 PI 値の変動を図 4 に示す. 黒丸で示すごとく APL 以外の急性白血病では治療前に著増を示していた E- α_1 PI が nadir 時にはほとんどの例で正常化した, 白丸で示す APL では11例中5例にしか正常化は認めず, 6例では高値が持続していた. そのうち1例でむしろ治療前に比べ約2倍に上昇するものが認められた.

次に E- α_1 PI の nadir までの変動と白血球数との関係を調べた. 図 5 に示すごとく黒丸で示した APL 以外の急性白血病では白血球数の減少の程度にしたがい E- α_1 PI 値が低値を示すのが観察されるが ($r=0.54$, $p<0.01$, $n=39$), 白丸で示した APL では白血球数が減少しても E- α_1 PI 値が高値を示す例が多く観察された ($r=0.20$, ns, $n=58$).

II. 抗白血球エラスターゼ抗体による免疫染色

健常者における末梢血および骨髓標本では前骨髓球をはじめとする幼若顆粒球および好中球が陽性に染色され, 赤芽球系, リンパ系細胞, 形質細胞, 巨核球, 網内系細胞は陰性, 単球は陰性ないし弱陽性に染色された (図 6). 白血病患者における検討では, E- α_1 PI が著増を示した AML 例の腫瘍細胞は陽性に染色され, E- α_1 PI が正常値を示した AMoL 例の腫瘍細胞は陰性であった (図 7).

III. フィブリノゲン, フィブリン消化試験

1. 各種測定法による FgDP, XDP の測定

1) COBAS-FARA

抗フィブリノゲン抗体を用いて FDP を測定する本

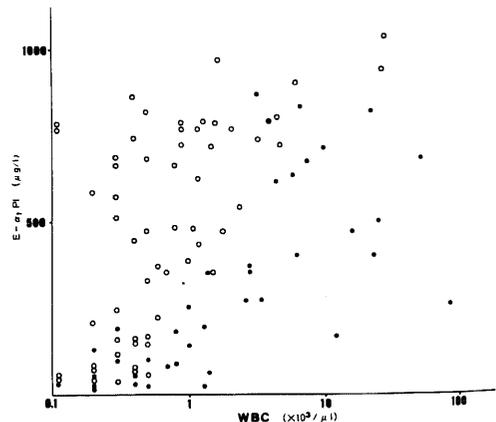


Fig. 5. Relationship between the levels of E- α_1 PI and leukocyte counts measured simultaneously during the course of remission induction therapy. ○, APL; ●, AML, AMMoL and EL.

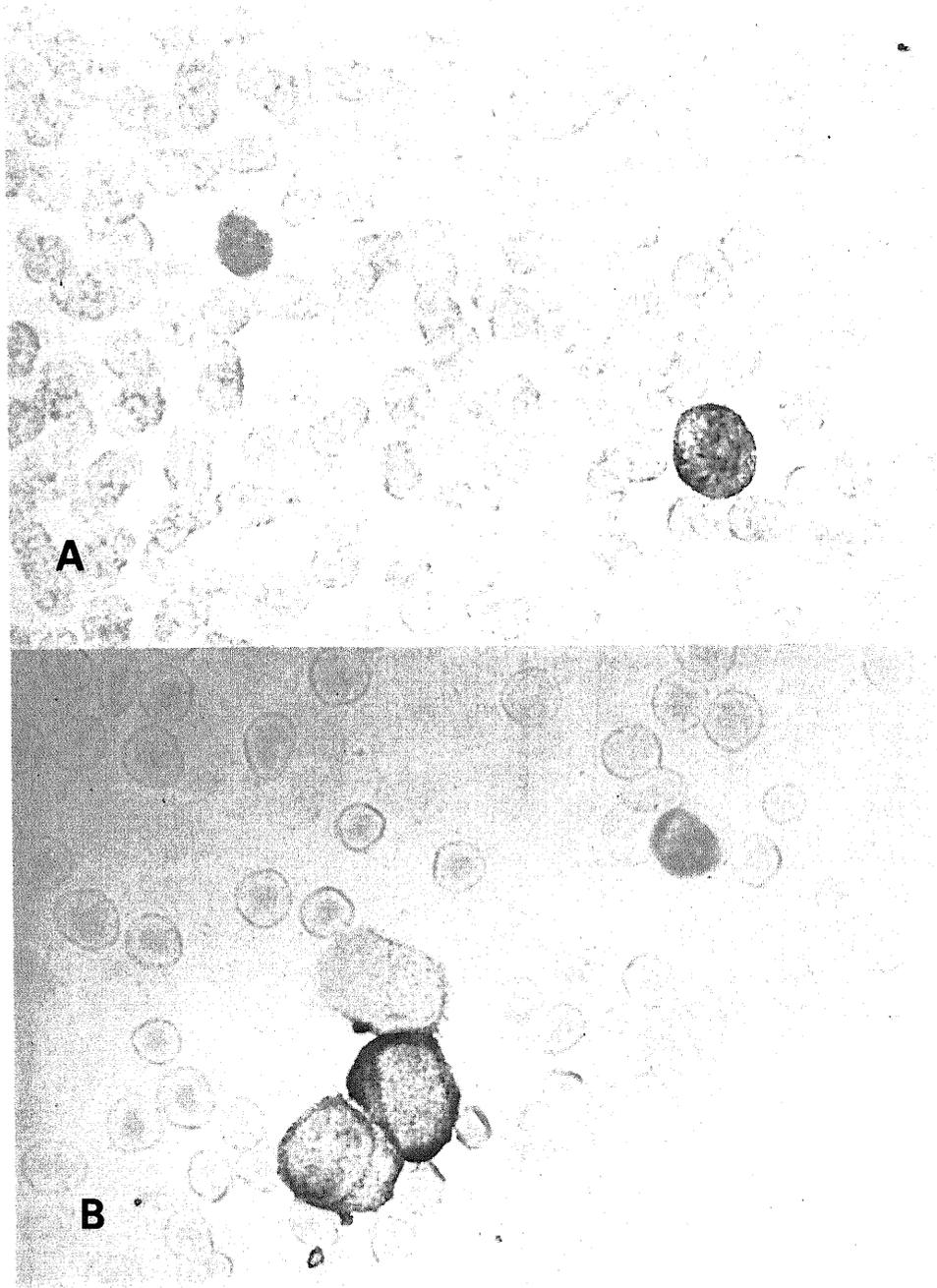


Fig. 6. Elastase-specific immunostaining of cell smears from a normal subject. Peripheral blood (A). Bone marrow (B). Neutrophil and promyelocyte stained positive, but lymphocyte stained negative. Nuclei are stained by Carazzi's Hematoxylin. ($\times 1000$).

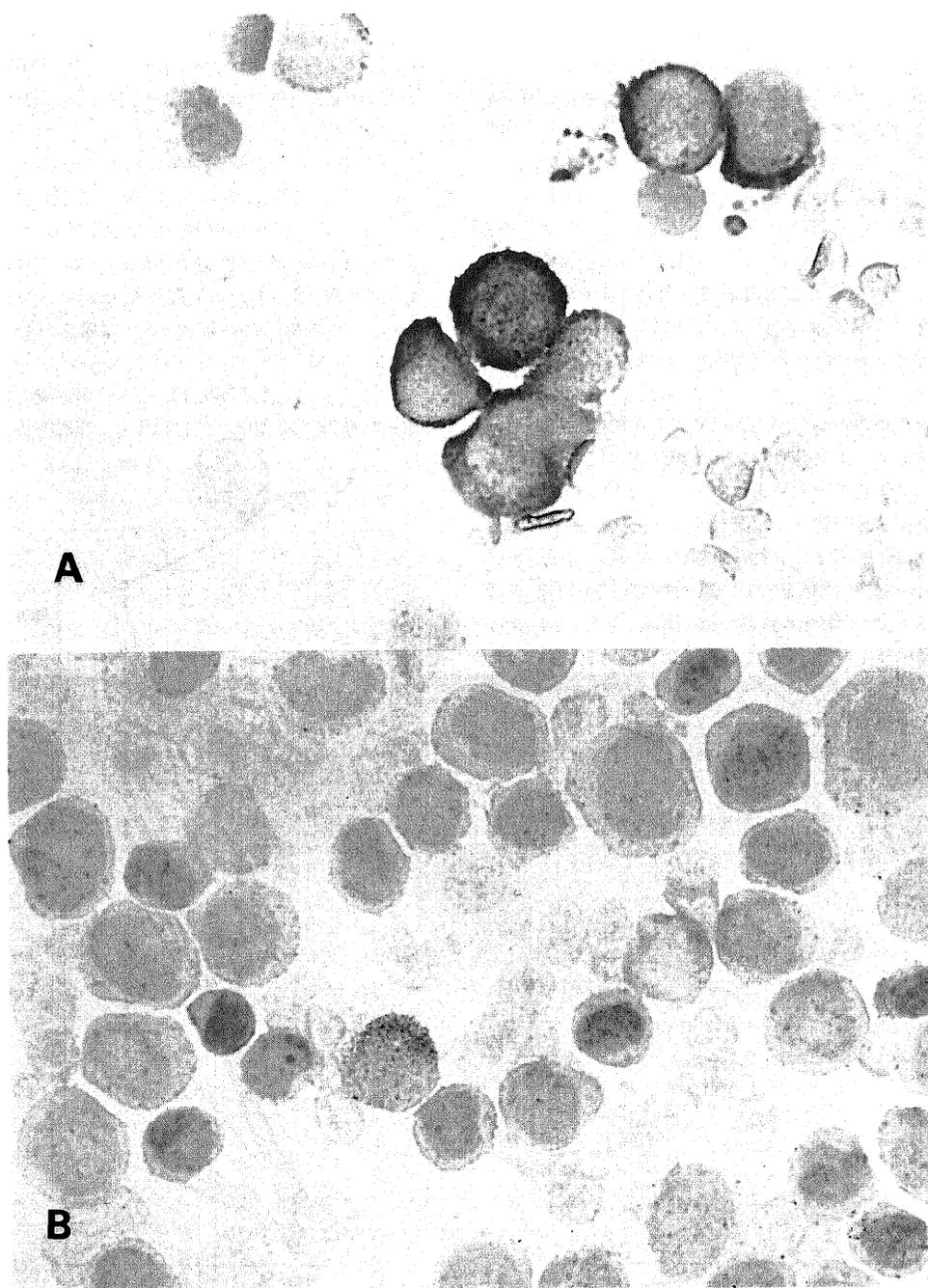


Fig. 7. Elastase-specific immunostaining of bone marrows from patients with leukemia. Leukemic cells stained positive in a patients with AML who had a elevated level of E- α ₁PI in plasma (A). Leukemic cells stained negative in a patients with AMoL who had a normal level of E- α ₁PI in plasma (B). Nuclei are stained by Carazi's Hematoxylin. ($\times 1000$).

法においてはプラスミン分解による FgDP, XDP は経時的にみた場合ほぼ同様な反応性を示した。白血球エラスターゼによる分解産物は FgDP, XDP とも反応し本法にて測定されることが示された (図 8)。

2) DIMERTEST-LATEX

FDP のうち D ダイマー分画に対するモノクローナル抗体を用いて安定化フィブリン分解産物 (XDP) のみを検出する本法でプラスミン分解産物の反応性をみた場合 FgDP は予想どおり反応を示さなかったが, XDP に対しては早期の分解産物に強い反応性を示し, 分解が進むにつれ反応性は低下した。白血球エラスターゼ分解による FgDP, XDP は両方とも反応性を示さなかった (図 9)。

3) PCIA

本法も FDP-D 分画に対するモノクローナル抗体を用いて XDP のみを検出する測定法であるが, プラス

ミンによる分解をみた場合やはり FgDP には反応を示さず, XDP については分解 1 時間後で最も強い反応性を示し分解が進行するにつれ反応性は低下した。白血球エラスターゼによる分解では FgDP および XDP とも反応し 1 時間後で最も強い反応性を示した (図 10)。

2. SDS-PAGE およびイムノブロットング

白血球エラスターゼによる安定化フィブリン分解様式を SDS-PAGE にて経時的に観察した (図 11)。プラスミン分解により生ずる D ダイマーと比較するとそれよりも低分子量のものが出現し, 経過とともにさらに分解が進行した。白血球エラスターゼによりこのように得られた分解産物を D 分画に対する抗体でイムノブロットングして反応性を確認したところ高分子量から低分子量にわたってほぼ一様に染色されこれらの分解産物が抗体に対して反応性を有していることが確認された (図 12)。

IV. APL における FDP, XDP 形成と白血球エラスターゼの関係

図 13 に APL 2 例における経過を示す。症例 1 は

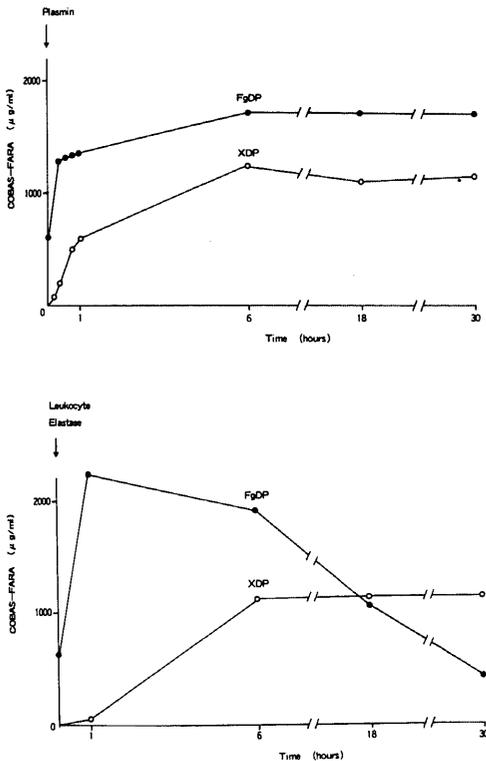


Fig. 8. Time course of the reactivities of plasmin or leukocyte elastase-treated degradation products of fibrinogen (FgDP) and those of crosslinked fibrin (XDP) which were measured by COBAS-FARA, FDP assay procedure using anti-fibrinogen antibody. ●—●, FgDP; ○—○, XDP.

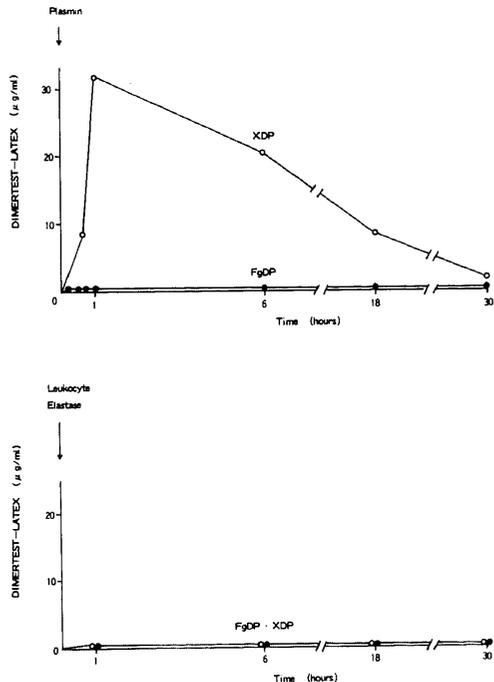
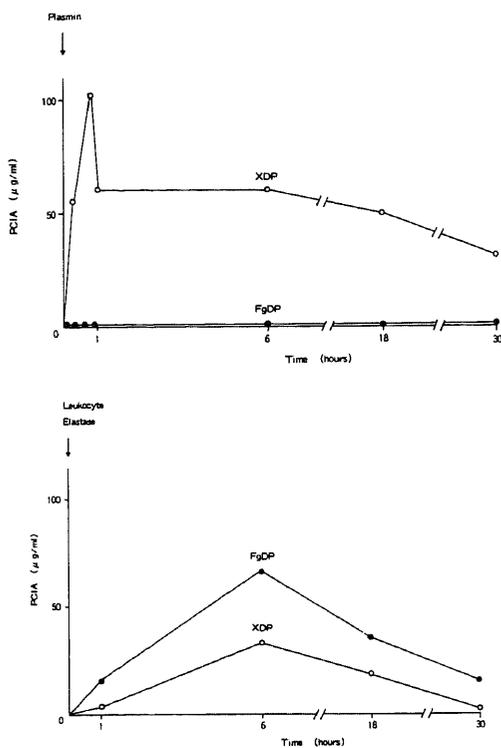


Fig. 9. Time course of the reactivities of plasmin or leukocyte elastase-treated FgDP and XDP which were measured by DIMERTEST-LATEX, XDP assay procedure using anti-D dimer monoclonal antibody. ●—●, FgDP; ○—○, XDP.



E- α_1 PI と Pm- α_2 AP が診断時より著増していた例であり FDP も高値を示していた。E- α_1 PI, Pm- α_2 AP が低下するとともに FDP も正常化した。症例2は診断時 FDP 高値, E- α_1 PI 高値を示していたが, Pm- α_2 AP が正常であった症例である。

APL 例において E- α_1 PI 値と FDP 値との相関を検討したところ, 両者には有意な正相関が認められた ($r=0.43$, $p<0.001$, $n=89$, 図14)。しかし, E- α_1 PI とフィブリノゲンとの間には有意の逆相関は認められなかった ($r=-0.16$, ns, $n=89$)。APL 例の中で Pm- α_2 AP 値が正常な例を集めその中で E- α_1 PI が高い群 ($>200 \mu\text{g/l}$) と低い群 ($<200 \mu\text{g/l}$) の2群に分け FDP 値, XDP 値を比較したところ両者とも E- α_1 PI 値が高い群で有意に高値を示した (図15)。

考 察

白血球エラスターゼは広い基質特異性をもつ酵素で

Fig.10. Time course of the reactivities of plasmin or leukocyte elastase-treated FgDP and XDP which were measured by PCIA, XDP assay procedure using anti-D monoclonal antibody. ●—●, FgDP; ○—○, XDP.

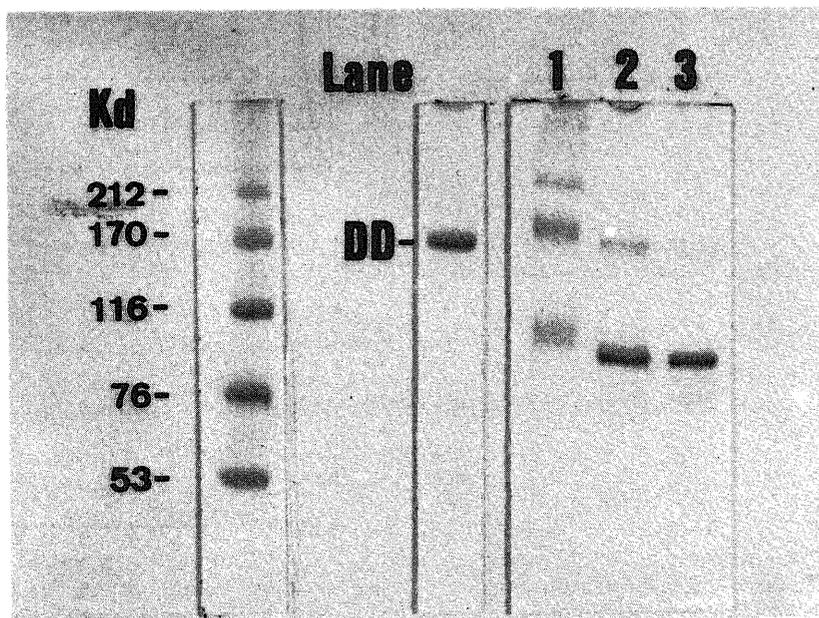


Fig.11. SDS-PAGE of progressive leukocyte elastase digestion of crosslinked fibrin. D-dimer (DD), produced by digestion of crosslinked fibrin by plasmin, was shown for comparison. Lane 1, 6 hours; Lane 2, 18 hours; Lane 3, 30 hours.

あり、組織構築に必要な成分、例えばエラスチン、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニンなどを分解する他、血中の補体、凝固線溶因子、大腸菌細胞壁なども分解することが知られている²³⁾²⁵⁾。生体における役割としては組織破壊物の処理や感染に対する防御など生体にとって有利な作用を示す一方、この酵素の阻害物質である α_1 PI が先天的に欠損する患者では肺胞壁を破壊し肺気腫をきたすことなどより、生体にとって危険な作用を有するという側面を持っている⁹⁾。また白血球エラスターゼはその名が示す通り、白血球なかでも顆粒球系に多く含まれる酵素であるが、顆粒球系の各分化段階における産生能、また他の系統の細胞での動態を知ることは興味深い。本研究ではそれぞれ白血球の分化段階で腫瘍化する病態である白血病を対象にその白血球エラスターゼの動態を E- α_1 PI を指標として検討した。白血病のなかで E- α_1 PI が増加を示したものは AML, APL, AMMoL, CML であり, AMoL, ALL では正常であった。このことは AML, APL, AMMoL, CML では腫瘍細胞の白血球エラスターゼ含量が増加しているかあ

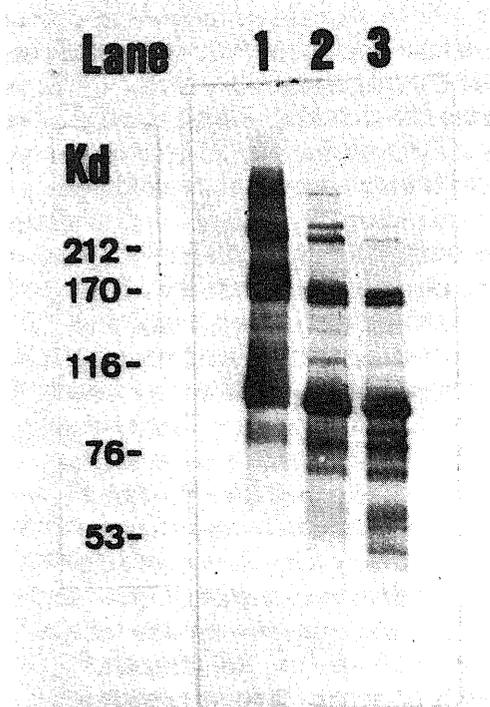


Fig. 12. Immunoblotting of progressive leukocyte elastase digestion of crosslinked fibrin. The membrane was immunostained with antibody to FDP-D component. Lane 1, 6 hours; Lane 2, 18 hours; Lane 3, 30 hours.

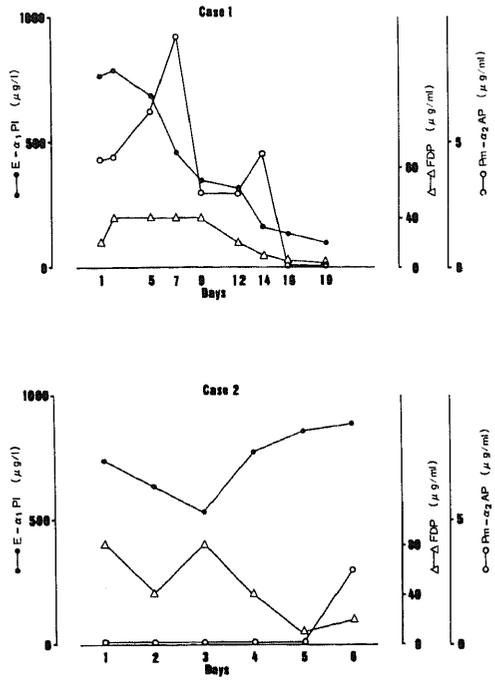


Fig. 13. Levels of E- α_1 PI, Pm- α_2 AP and FDP in two cases of APL. In case 1, E- α_1 PI levels decreased during chemotherapy. In case 2, E- α_1 PI levels were persistently elevated during chemotherapy with increased concentrations of FDP, although Pm- α_2 AP levels remained within normal limits. ●-●, E- α_1 PI; ○-○, Pm- α_2 AP; △-△, FDP.

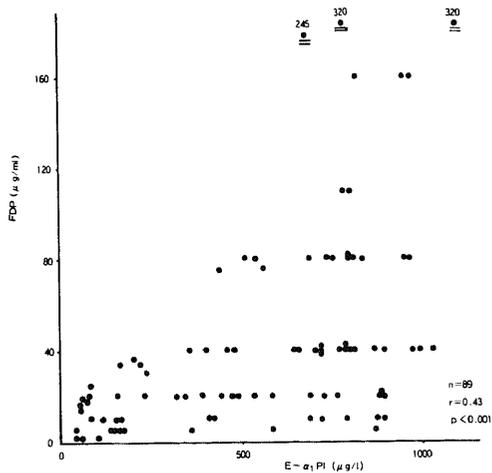


Fig. 14. Relationship between the levels of E- α_1 PI and FDP in patients with APL. The correlation was statistically significant.

るいはその放出がさかんであると考えられ、それに比べ AMoL, ALL では正常にとどまっていることはリンパ系, 単球系の細胞においては白血球エラスターゼの含有量が少ないか放出が低下していると考えられた。白血球エラスターゼに対するモノクローナル抗体にて白血病における腫瘍細胞内エラスターゼを免疫染色した結果, E- α_1 PI が高値を示した AML の細胞で強く染色され, E- α_1 PI が正常であった AMoL の細胞はこの免疫染色で陰性であったことは細胞内エラスターゼの含有量が血中の E- α_1 PI 値に反映されていることを示唆している。以前より免疫染色による白血球エラスターゼの存在が顆粒球系腫瘍のマーカーとなり単球系, リンパ系腫瘍との鑑別に有用との報告^{24)~26)}があるが, 本研究の結果からは血中の E- α_1 PI を測定すれば顆粒球系腫瘍のマーカーとなり得るとも考えられ, 今後臨床的に有用と考えられた。

細胞の分化段階における白血球エラスターゼの産生に関してはごく最近になり遺伝子レベルでの研究が進み, 白血球エラスターゼの mRNA の発現が前骨髄球で最もさかんであり, 分化するに従って mRNA の発現は低下し好中球においては mRNA の発現はみられず, 好中球はエラスターゼを含有しているものの産生が行われていないことが示唆されている²⁷⁾²⁸⁾。本研究で E- α_1 PI 値をその時の末梢白血球数に対する比に換算した場合 APL で著増していることは APL の腫瘍細胞 1 個あたりの白血球エラスターゼ産生能が非常に高く, それが血中への放出に反映していることを示す成績と考えられた。また, 白血病に対する化学療法後の E- α_1 PI の変動をみた場合, APL 以外の急性白血

病では白血球数の減少とともに E- α_1 PI は低下し, nadir に際してはほぼ正常化した, APL では白血球数減少に比例せず, nadir でしかも骨髓所見で完全寛解に入っているにもかかわらず E- α_1 PI 値の上昇が 11 例中 6 例に認められた。この事実も APL の腫瘍細胞の特殊性を示すものであり, 白血球エラスターゼがその病態により深く関わっている可能性が示唆された。

白血球エラスターゼは試験管内では凝固第 II, V, VIII, XII, XIII 因子やフィブリノゲンおよびフィブリンなどを分解することが知られており^{1)29)~32)}, また線溶系因子としてはプラスミノゲン, α_2 アンチプラスミン (α_2 AP) を分解する性質を持っている³³⁾³⁴⁾。さらに生体において, 特に白血病や重症感染症で白血球エラスターゼが凝固線溶異常に関与しているとの報告³⁵⁾³⁶⁾もみられる。なかでも白血球エラスターゼによるフィブリノゲン, フィブリンの試験管内における分解の研究は多くみられ, その分解様式および得られる分解産物の分子量がプラスミン分解によるものと異なること^{1)30)~32)}, 白血球エラスターゼによるフィブリノゲン分解産物の持つ抗凝固作用はプラスミン分解によるものと異なること³⁷⁾³⁸⁾なども報告されている。またフィブリノゲン, フィブリンの白血球エラスターゼによる分解産物が現在利用されている FDP や XDP の測定法にどのような影響を与えるかを検討することは今後 FDP, XDP 値の解釈をする場合重要と思われる。本研究において, 抗フィブリノゲン抗体を用いた従来の FDP 測定法では白血球エラスターゼ分解産物が反応することが示された。モノクローナル抗体を用いた 2 種類の XDP 測定法で白血球エラスターゼ分解産物を測定したところ両者には解離を認め, DIMERTEST-LATEX では FgDP, XDP とも反応しなかったが, PCIA では FgDP, XDP とも反応性を示した。このことは抗体の性質の差によるものと考えられ DIMERTEST-LATEX に用いられている抗体が白血球エラスターゼ分解により出現する neo 抗原に反応せず, PCIA で用いられている抗体はそれに反応することを意味している。白血球エラスターゼによるフィブリノゲン分解産物のイムノプロットングでは高分子量から低分子量にわたって抗 D 分画抗体に対して反応性を示したことによりこれらすべてが FDP として測定されることが示唆された。従って, 臨床上プラスミン分解以外に白血球エラスターゼによる線溶が起きているような病態では白血球エラスターゼ分解による FgDP, XDP が測定値に影響を与える可能性が考えられた。

APL では従来よりプロトロンビン時間, 活性化部

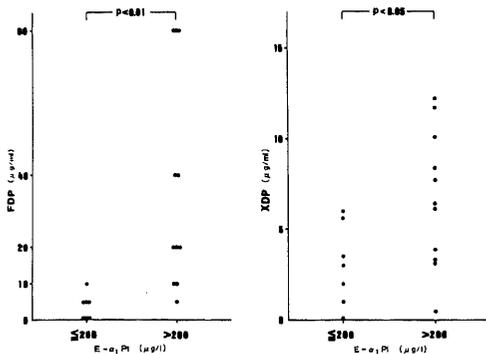


Fig. 15. Concentrations of FDP and XDP in cases of APL with normal levels of Pm- α_2 AP. FDP and XDP values significantly increased in cases with elevated levels of E- α_1 PI (>200 μ g/l).

分トロンボプラスチン時間の延長、フィブリノゲンの著明な低下などの重篤な凝固障害が高頻度に見られるが、アンチトロンビンIII (antithrombin III, ATIII) が低下しない事実やプラスミノゲンや α_2 APが著明に低下する事実から線溶亢進のみでも説明できる病態とも考えられていた³⁹⁾⁴⁰⁾。最近になり XDP の著増、トロンビン・ATIII 複合体の上昇などより血管内凝固や血液凝固活性化の存在も明らかとなり、凝固と線溶の両方が同時に活性化されている病態であると考えられるに至った⁴¹⁾。しかしながら、組織プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 値が α_2 AP の低下および Pm- α_2 AP の上昇に見合うほど高くないことなどより t-PA-プラスミン系以外の酵素が線溶に関与している可能性もあり⁴²⁾ その病態の特殊性に関しては議論の多いところである。よって APL においてプラスミン以外の線溶の別経路として白血球エラスターゼのフィブリノゲン、フィブリン分解への関与を検討することは重要かつ興味深いと思われる。また血液が凝固する際に白血球からエラスターゼが放出される事実⁴³⁾ や生理的濃度のプロテアーゼインヒビター存在下においても白血球表面にあるフィブリノゲンは放出されてくる白血球エラスターゼにより分解されるという実験結果⁴⁴⁾ は生体においてもフィブリノゲン、フィブリン分解に白血球エラスターゼ関与しうる可能性を裏づけている。本研究で APL において E- α_1 PI 値と FDP 値が有意な正相関を示し、また Pm- α_2 AP 値が正常な APL 例すなわちプラスミンが線溶に関与していないと考えられる例で E- α_1 PI 値の高い群において FDP, XDP 値が有意に高値を示した。ここで用いた FDP, XDP 測定法では白血球エラスターゼによる分解産物が測定され得ることも考えあわせると以上より、APL における FDP, XDP 形成に白血球エラスターゼが関与している可能性が示唆された。

結 論

各種白血病における白血球エラスターゼの動態をエラスターゼ・ α_1 プロテアーゼインヒビター複合体 (E- α_1 PI) を指標として解析し、また白血球エラスターゼによるフィブリノゲン・フィブリン分解に関する検討を行い以下の結果を得た。

1. 急性骨髄性白血病 (AML), 急性前骨髄球性白血病 (APL), 急性骨髄単球性白血病, 慢性骨髄性白血病で診断時の血漿中 E- α_1 PI は健康者および急性単球性白血病 (AMoL), 急性リンパ性白血病に比較して著明に上昇しており顆粒球系の腫瘍のマーカーとなる可能

性が考えられた。

2. 一部の例で抗白血球エラスターゼ抗体にて白血病細胞を免疫染色したところ E- α_1 PI が高値を呈した AML 例で陽性、E- α_1 PI が正常値を呈した AMoL 例で陰性を示した。

3. 白血病診断時の E- α_1 PI をその時の末梢白血球数に対する比に換算すると APL では他の白血病に比較して著明な高値を示した。また化学療法後の白血球減少状態においても E- α_1 PI の上昇が続く例が多くみられたことより、APL の一個あたりの腫瘍細胞内のエラスターゼ産生および放出が著しく亢進していることが示唆された。

4. 試験管内におけるフィブリノゲン、フィブリンの白血球エラスターゼによる分解産物は抗フィブリノゲン抗体を用いた測定法には反応するが、モノクローナル抗体を用いた安定化フィブリン分解産物の測定法では測定法間でその反応性に解離を認め、用いられている抗体の性質の差によるものと考えられた。

5. APL の中でプラスミンの関与が少ないと考えられる例を集め、E- α_1 PI の低値群と高値群に分けた場合、E- α_1 PI の高値群で FDP, XDP とも高値を示し、APL における FDP, XDP 形成に白血球エラスターゼが関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始研究の御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる感謝の意を表します。

研究に御協力頂きました金沢大学医学部第三内科凝固グループをはじめ教室員の各位、並びに金沢大学医学部検査部血液検査室の皆様へ深謝いたします。

なお、本論文の一部は、第11回日本血栓止血学会 (1988年) において発表した。

文 献

- 1) Baugh, R. J. & Travis, J.: Human leukocyte granule elastase: Rapid isolation and characterization. *Biochemistry*, **15**, 836-841 (1976).
- 2) Janoff, A. & Scherer, J.: Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. XI. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 1137-1155 (1968).
- 3) Janoff, A.: Elastase in tissue injury. *Annu. Rev. Med.*, **36**, 207-216 (1985).
- 4) Brantly, M., Nukiwa, T. & Crystal, R. G.: Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Med.*, **84** (suppl. 6A), 13-31 (1988).

- 5) 齊藤正典, 朝倉英策, 魚谷知佳, 定梶裕司, 熊走一郎, 松田 保: 慢性期脳血管障害例における血中トロンビン・アンチトロンビンIII複合体およびエラスターゼ・ α_1 プロテアーゼインヒビター複合体の検討. 日老医誌, 25, 430-431 (1988).
- 6) 魚谷知佳, 朝倉英策, 齊藤正典, 定梶裕司, 熊走一郎, 松田 保: 糖尿病における血管内凝固活性化と血中エラスターゼ・ α_1 プロテアーゼインヒビターの検討. 動脈硬化, 16, 935-938 (1988).
- 7) Brower, M. S. & Harpel, P. C.: Alpha-1-antitrypsin-human leukocyte elastase complexes in blood: Quantification by enzymelinked differential antibody immunosorbent assay and comparison with alpha-2-plasmin inhibitor-plasmin complexes. Blood, 61, 842-849 (1983).
- 8) Neumann, S., Gunzer, G., Hennrich, H. & Lang, H.: "PMN-Elastase assay": Enzyme immunoassay for human polymorphonuclear elastase complexed with α_1 -proteinase inhibitor. J. Clin. Chem. Biochem., 22, 693-697 (1984).
- 9) Henry, R. L.: Leukocyte and thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh., 13, 35-46 (1965).
- 10) Plow, E. F.: Leukocyte elastase release during blood coagulation. J. Clin. Invest., 69, 564-572 (1982).
- 11) Bilezikian, S. B. & Nossel, H. L.: Unique pattern of fibrinogen cleavage by human leukocyte proteases. Blood, 50, 21-28 (1977).
- 12) Baker, W., Bang, N. U., Nachman, R. L., Raafat, R. T. & Horwitz: Hypofibrinogenemic haemorrhage in acute myelogenous leukemia treated with heparin. Ann. Intern. Med., 61, 116-123 (1964).
- 13) Rand, J. J., Maloney, W. C. & Sise, N. S.: Coagulation defects in acute promyelocytic leukemia. Arch. Inter. Med., 123, 39-47 (1969).
- 14) Neumann, S., Hennrich, N., Gunzer, G. & Lang, H.: Enzymelinked immunoassay for elastase from leukocytes in human plasma (Abstract). J. Clin. Chem. Biochem., 19, 232 (1981).
- 15) Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., Macdonald, S., Pulford, K. A. F., Stein, H. & Mason, D. Y.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP Complexes). J. Histochem. Cytochem., 32, 219-229 (1984).
- 16) Clauss, A.: Grinnuungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. Basel, 17, 237-246 (1957).
- 17) Sakai, Y., Maeda, M., Takei, F., Matsumoto, T., Nishijima, Y. & Nakamura, K.: Determination of FDP in human plasma by a novel latex immunoassay. Thromb. Res., 50, 469-479 (1988).
- 18) 齊藤正典, 朝倉英策, 伊藤恵子, 定梶裕司, 魚谷知佳, 熊走一郎, 松田 保: 各種疾患におけるフィブリン分解産物 (XDP) の定量測定. 臨床血液, 29, 2042-2047 (1988).
- 19) Mimuro, J., Koike, Y., Sumi, T. & Aoki, N.: Monoclonal antibodies to discrete regions in α_2 -plasmin inhibitor. Blood, 69, 446-453 (1987).
- 20) Rylatt, D. B., Blake, A. S., Cottis, L. E., Massingham, D. A., Fletcher, W. A., Masci, P. P., Whitaker, A. N., Elms, M., Bunce, I., Webber, A. J., Wyatt, D. & Bundesen, P. G.: An immunoassay for human D dimer using monoclonal antibodies. Thromb. Res., 31, 767-778 (1983).
- 21) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227, 680-685 (1970).
- 22) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354 (1979).
- 23) McDonald, J. A. & Kelley, D. G.: Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. J. Biol. Chem., 255, 8848-8858 (1980).
- 24) Kramps, J. A., Van der Valk, P., Van der Sandt, M. M., Lindeman, J. & Meijer, C. J. L. M.: Elastase as a marker for neutrophilic myeloid cells. J. Histochem. Cytochem., 32, 389-394 (1984).
- 25) Crocker, J., Jenkins, R. & Burnett, D.: Immunohistochemical demonstration of leukocyte elastase in human tissues. J. Clin. Pathol., 37, 1114-1118 (1984).
- 26) Pulford, K. A., Erber, W. N., Crick, J. A., Olsson, I., Micklen, K. J., Gatter, K. C. & Mason, D. Y.: Use of monoclonal antibody against human neutrophil elastase in normal and

- leukaemic myeloid cells. *J. Clin. Pathol.*, **41**, 853-860 (1988).
- 27) **Takahashi, H., Nukiwa, T., Basset, P. & Crystal, R. G.**: Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2543-2547 (1988).
- 28) **Fouret, P., Bois, R. M., Bernaudin, J. F., Takahashi, H., Ferrans, V. J. & Crystal, R. G.**: Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J. Exp. Med.*, **169**, 833-845 (1989).
- 29) **Henriksson, P., Nilsson, I. M., Ohlsson, K. & Stenberg, P.**: Granulocyte elastase activation and degradation of factor XIII. *Thromb. Res.*, **18**, 343-351 (1980).
- 30) **Plow, E. F. & Edgington, T. S.**: An alternative pathway for fibrinolysis. *J. Clin. Invest.*, **56**, 30-38 (1975).
- 31) **Gramse, M., Bingenheimer, C., Schmidt, W., Egbring, R. & Havemann, K.**: Degradation products of fibrinogen by elastaselike neutral protease from human granulocytes. *J. Clin. Invest.*, **61**, 1027-1033 (1978).
- 32) **Francis, C. W. & Marder, V. J.**: Degradation of cross-linked fibrin by human leukocyte proteases. *J. Lab. Clin. Med.*, **107**, 342-352 (1986).
- 33) **Moroz, L. A.**: Mini-plasminogen: A mechanism for leukocyte modulation of plasminogen activation by urokinase. *Blood*, **58**, 97-104 (1981).
- 34) **Brower, M. S. & Harpel, P. C.**: Proteolytic cleavage and inactivation of α_2 -plasmin inhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 9849-9854 (1982).
- 35) **Egbring, R., Schmidt, W., Fuchs, G. & Havemann, K.**: Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood*, **49**, 219-231 (1977).
- 36) **Sterrenberg, L., Haak, H. L., Brommer, E. J. P. & Nieuwenhuizen, W.**: Evidence of fibrinogen breakdown by leukocyte enzymes in a patients with acute promyelocytic leukemia. *Haemostasis*, **15**, 126-133 (1985).
- 37) **Sterrenberg, L., Gravesen, M. Haverkate, F. & Nieuwenhuizen, W.**: Granulocyte enzyme mediated degradation of human fibrinogen in plasma in vitro. *Thromb. Res.*, **31**, 719-728 (1983).
- 38) **Sterrenberg, L., van Liempt, G. J., Nieuwenhuizen, W. & Hermans, J.**: Anticoagulant properties of purified X-like fragments of human fibrinogen produced by degradation with leukocyte elastase. *Thromb. Haemostas.*, **51**, 398-402 (1984).
- 39) **Matsuda, T., Ito, K., Asakura, H., Saito, M., Uotani, C. & Joukaji, H.**: Role of fibrinolysis in coagulopathy in cases of acute promyelocytic leukemia. In P. J. Gaffney, F. J. Castellino, E. F. Plow & A. Takada (eds.), *Fibrinolysis: Current Prospects*, 1st ed., p257-263, John Libbey & Company Limited, London, 1988.
- 40) 朝倉英策, 伊藤恵子, 定槻裕司, 齊藤正典, 魚谷知佳, 熊走一郎, 松田 保: 急性前骨髄球性白血病患者における α_2 PI-Plasmin 複合体の測定意義. *臨床血液*, **29**, 534-538 (1988).
- 41) **Asakura, H., Saito, M., Ito, K., Joukaji, H., Uotani, C., Kumabashiri, I. & Matsuda, T.**: Levels of thrombin-antithrombin III complex in plasma in cases of acute promyelocytic leukemia. *Thromb. Res.*, **50**, 895-899 (1988).
- 42) **Matsuda, T., Asakura, H., Ito, K., Saito, M., Joukaji, H., Uotani, C. & Kumabashiri, I.**: Changes in levels of t-PA and α_2 PI-plasmin complex in plasma in patients with DIC. *Thromb. Res.*, Suppl. VIII, 143-151 (1988).
- 43) **Plow, E. F. & Plescia, J.**: Neutrophil secretion during blood coagulation: Evidence for a prekallikrein independent pathway. *Thromb. Haemostas.*, **59**, 360-363 (1988).
- 44) **Weitz, J. I., Huang, A. J., Landman, S. L., Nicholson, S. C. & Silverstein, C.**: Elastase-mediated fibrinogenolysis by chemoattractant-stimulated neutrophils occurs in the presence of physiologic concentrations of antiproteases. *J. Exp. Med.*, **166**, 1836-1850 (1987).

Behavior of Leukocyte Elastase in Leukemia and its Role in Degradation of Fibrinogen and/or Fibrin Masanori Saito, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 716—730 (1989)

Key words leukocyte elastase, elastase- α_1 proteinase inhibitor complex, acute promyelocytic leukemia, fibrinogen and/or fibrin degradation products, immunocytochemical staining

Abstract

The present study was performed to examine the behavior of leukocyte elastase in leukemia and clarify the role of this enzyme in degradation of fibrinogen and fibrin. The concentrations of elastase- α_1 proteinase inhibitor complex (E- α_1 PI) were assayed in 59 patients with various types of leukemia. Marked elevation of E- α_1 PI levels was observed in patients with acute myelocytic leukemia (AML), acute promyelocytic leukemia (APL), acute myelomonocytic leukemia, chronic myelocytic leukemia at diagnosis. In the case of AML which had a marked elevated level of E- α_1 PI, elastase specific immunostaining demonstrated that leukemic cells stained strongly positive, whereas in the case of acute monocytic leukemia which had a normal level of E- α_1 PI, leukemic cells stained negative. It is suggested that the detection of E- α_1 PI and specific elastase immunostaining are useful as specific markers of tumor cells of the neutrophilic myeloid lineage and such markers are helpful in differential diagnosis of leukemia. The ratio of E- α_1 PI concentrations to leukocyte counts markedly elevated in patients with APL. During the course of remission induction therapy, levels of E- α_1 PI decreased in parallel with decline of leukocyte counts in the patients with acute leukemia other than APL. However, the E- α_1 PI levels were persistently elevated regardless of leukopenia in 6 of 11 patients with APL. The degradation products of leukocyte elastase-treated fibrinogen and fibrin could be measured by conventional assay method of fibrinogen and/or fibrin degradation products (FDP) using the anti-fibrinogen antibody. However, when these products were assayed by two newly developed assay methods of crosslinked fibrin degradation products (XDP) using a monoclonal antibody, one reacted and the other did not. It is suggested that these results were due to the difference of characteristics of antibodies used in these methods. In this study, the role of leukocyte elastase in coagulation and fibrinolysis abnormalities in APL were also examined. In the case of APL, there was a statistically significant correlation between E- α_1 PI and FDP levels. The concentrations of FDP and XDP markedly increased in some cases of APL whose levels of plasmin- α_2 antiplasmin complex were within normal limits, though levels of E- α_1 PI usually increased in these cases. From these results, it is concluded that promyelocyte contains large amounts of elastase which participates in the degradation of fibrinogen or fibrin in some cases of APL.