信大・医短・紀要
Vol 20. 1994

顆粒球エラスターゼによりFDPが高値を示したと考えられるDICおよび非DIC症例の検討

奥村　伸生[1)]，松沢亜可根[1)]，寺澤　文子[1)]，佐々木由美子[2)]
中越りつこ[2)]，石川伸介[2)]，橋倉　泰彦[3)]，松波　英寿[3)]
川崎　誠治[3)]，幕内　雅敏[3)]，勝山　努[4)]，降旗　謙一[4)]

Study on Patients with Elevated Levels of FDP Presumably Produced by Ganulocyte Elastase

Granulocyte elastase (GEL)-α_1-antitrypsin complex (EAT) levels were determined by enzyme immunoassay in plasmas from twelve patients with disseminated intravascular coagulation (DIC) and eight recipients of living related liver transplantation (LLT), and compared with neutrophil counts, C-reactive protein (CRP) concentrations, and coagulation profiles. In two DIC patients and one LLT recipient, fibrin and/or fibrinogen degradation products (FDP) levels fluctuated several days after the EAT levels changed without remarkable plasmin activation. Therefore, elevated levels of FDP in these patients presumably resulted from degradation of fibrin and/or fibrinogen by activated GEL. However, in most of the cases, changes in EAT level were not in parallel with those in peripheral neutrophil count and/or CRP concentration. These findings raised the possibility that the elevated levels of GEL and EAT in patients with DIC and recipient of LLT were derived from activation of neutrophils by underlying conditions. We suggest that EAT is a novel, useful parameter reflecting neutrophil activation and inflammatory conditions.

Key Words:
granulocyte elastase（顆粒球エラスターゼ），granulocyte elastase-α_1-antitrypsin complex（顆粒球エラスターゼ-α_1-アンチトリプシン複合体），fibrin and/or fibrinogen degradation products（フィブリン，フィブリノゲン分解産物），disseminated intravascular coagulation（播種性血管内凝固），living related liver transplantation（生体部分肝移植）

1）信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科；Nobuo Okumura, Akane Matsuzawa, Fumiko Terasawa, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.
2）同医学部附属病院中央検査部；Yumiko Sasaki, Ritsuko Nakagoshi, Shinsuke Ishikawa, Central Clinical Laboratory, Shinshu Univ. Hospital
3）同医学部第一外科学教室；Yasuhiko Hashikura, Hidetoshi Matsunami, Seiji Kawasaki, Masatoshi Makuuchi, First Dept. of Surgery, Shinshu Univ. School of Medicine
4）同医学部臨床検査医学教室；Tsutomu Katsuyama, Kenichi Furihata, Dept. of Laboratory Medicine, Shinshu Univ. School of Medicine

はじめに

顆粒球エラスターゼ(GEL)は，顆粒球(好中球）の一次顆粒に含まれる30-38kDaのライソゾーム中性セリンプロテアーゼである[1]．この酵素は，本来好中球内において貪食した細菌や異物を消化・処理するのに重要な働きをしているが[2]，好中球が活性化された状態や好中球の損傷あるいは細胞死に際して放出される[3,4]．基質特異性が低く蛋白分解能が強いために，種々の血漿蛋白[5-8]や生体構成成分[9,10]を非特異的に分解し，組織障害性[11,12]を有することが明らかになった．近年，血液中のGELの測定系が確立され[13,14]，ARDS (adult respiratory distress syndrome)[15]，白血病[16-18]，敗血症[19-21]，ショック[22]，体外循環[23]，血液透析[24]など様々な病態において，上昇することが報告されている．今回，われわれはGELによりフィブリンおよびフィブリノゲン分解産物(FDP)が増加したと考えられる，播種性血管内凝固症候群(DIC)および非DIC症例について，プラスミンによりFDPが増加したと考えられる症例と比較検討したので報告する．

検討対象及び方法

1．検討対象

DIC診断基準[25]によりDICと診断され，経過を観察することができた12症例と，信州大学医学部第一外科で生体部分肝移植手術を受け，DICを併発しなかったにもかかわらず，FDP-D-dimer（DD）が異常に高値となった8症例の患者の血清あるいは血漿を検討対象とした．DICを併発した患者の基礎疾患は，表1に示すとおりであった．

血清はトロンビンおよびアプロチニン入りの採血管に採血し，遠心分離したFDP検査用のものを用いた．一方，血漿は3.8%クエン酸ナトリウムと1：9になるように採血した血液から遠心分離したものを用いた．

表1　DIC症例の基礎疾患とプラスミンおよびエラスターゼの関与

症例	性別	年齢	基礎疾患	FDP産生に関与したと推定される酵素	
				プラスミン	エラスターゼ
1	M	15	急性白血病（M0）	+	−
2	M	16	急性白血病（M2）	+	+
3	M	18	急性白血病（M3）	+	+
4	M	44	急性白血病（M3）	+	+
5	M	15	悪性リンパ腫骨髄転移	+	+
6	M	67	ネフローゼ症候群	+	−
7	F	36	全身性エリテマトーデス，ネフローゼ症候群，肺炎	+	+
8	F	65	多発性骨髄腫，全身真菌症 慢性活動性肝炎急性増悪	+	+
9	F	59	肝硬変，肝細胞癌破裂，肝細胞癌骨転移	−	+
10	M	73	肝細胞癌術後	−	+
11	M	63	肝細胞癌術後	+	+
12	M	32	Klippel-Weber症候群術後	+	+

2．顆粒球エラスターゼの測定法

顆粒球から放出されたGELの90%以上は，血中で生体内のinhibitorであるα_1-antitrypsin（α_1AT）と結合し複合体(EAT)を形成している[26]．EATの濃度はGEL濃度を反映するので，MERCK社製酵素抗体法キットにより測定した[13]．すなわち，GELに対する抗体を固相化した試験管に血漿を加え，固相抗体にEAT複合体が結合する．次にalkaline phosphataseを標識した抗α_1AT抗体を反応させ，洗浄後4-nitro-phenylphosphateを基質として発色させた．健常人20名より求めた基準範囲は60-130 ng/mlであった．

3．プラスミンとFDPの測定

プラスミノゲンから活性化されたプラスミンは，血液中ではα_2-plasmin inhibitorと複合体（PAP）[27]を形成して存在しているので，PAPの濃度はプラスミンの濃度を反映する．血漿中のPAPは帝人の酵素抗体法キット[28]により測定した．基準範囲は0.8μg/ml以下であった．一方，FDPとFDP-DDはそれぞれエルピアFDP，エルピアエースDDダイマーキットを用いてLPIAシステムL-100（ダイアヤトロン）で測定した．FDPは血清，FDP-DDは血清あるいは血漿について測定し，基準範囲はそれぞれ4.1μg/ml以下，0.7μg/ml以下であった．

4．好中球数とCRPの測定

自動血球計測装置により求めた白血球数と，塗抹標本を作製して求めた好中球比率から好中球の絶対数を求めた．一方，CRPはエルピアエースCRPキットを用いてLPIAシステムL-200（ダイアヤトロン）で測定した．基準範囲は0.1 mg/dl以下であった．

5．FDP分画の解析

FDP分画の解析は，われわれが既に報告した方法[29,30]によって実施した．すなわち，TEFCO社製SDS-PAGE4-12%グラジエントゲルに，SDS化した血清10μl(最終FDP濃度を約3μg/mlになるように生理食塩水で希釈）を添加し泳動した．セミドライ方式にてニトロセルロース膜に転写し，ブロッキング後，抗フィブリノゲンウサギ抗体(MBL)，およびhorse radish peroxidase標識抗ウサギIgG抗体(MBL)を順次反応させた．洗浄後3,3'-diamino benzidine tetrahydrochlorideとH_2O_2を加えて発色させた．

結果

1．DIC症例におけるEATの経過観察

DICの12症例において，FDPおよびFDP-DDの増減がPAPの増減と一致している例が2例(図1；症例1)，PAPおよびEATの増減と一致している例が8例(図2；症例7）であった．一方，PAPで測定したプラスミンの増加はわずかであり，EATで測定したGELの増加によりFDPおよびFDP-DDが増加したと考えられる例が2例あった（表1）．特に症例9（図3）では，EATの増減に数日遅れてFDPおよびFDP-DDが増減した．

次に，EATの変動を好中球数(あるいは白血病細胞数）およびCRPの変動と比較した．症例9では，EATの増減は白血球数およびCRPの増減とほぼ一致していた（図3）．一方，症例7におけるEATの増減は，好中球数の増減とは一致したが，CRPの増減とは一致しなかった(図2)．さらに，症例1では，EATの増減は白血病細胞数およびCRPの増減とまったく一致しなかった（図1）．

図1－3に示した症例のFDP分画の解析結果を図4に示した．GELによってFDPおよびFDP-DDが増加したと考えられる症例

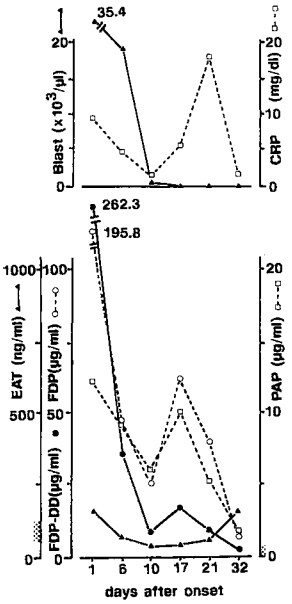

図1　症例1（DIC）のEAT経時変化

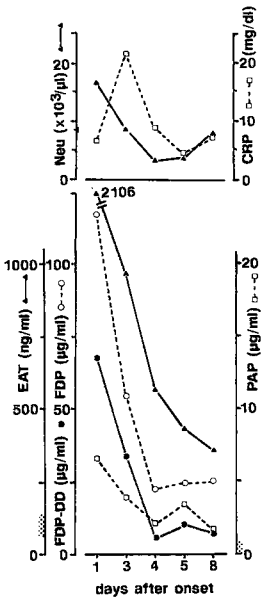

図2　症例7（DIC）のEAT経時変化

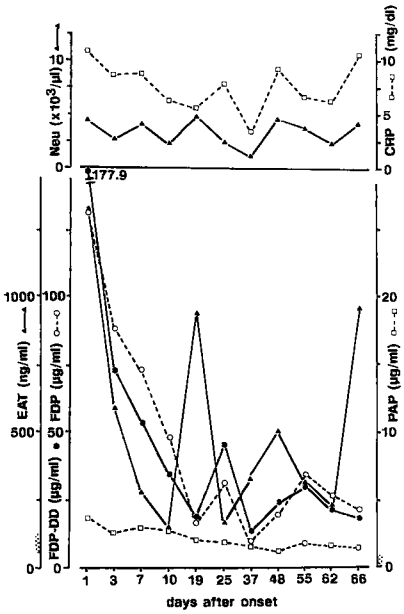

図3　症例9（DIC）のEAT経時変化

9（図3）と，プラスミンによってFDPおよびFDP-DDが増加した症例1（図1）において，それぞれに特異的なFDP分画の出現は認められなかった．

2．非DIC症例におけるEATの経過観察

DICを併発しなかったにもかかわらず，FDP-DDが非常に高値を示した生体部分肝移植症例について，FDP-DDの増加とGELの関与について検討した．検討した8症例の内7例については，FDP-DDの増加はPAPの増加と一致しており，EATの増加に数日遅れて観察された(図5；症例13)．一方，残りの1症例は経過観察中PAPの値が基準範囲以上となったのは，僅かに越えた1回だけであった．これに対してEATは経過中つねに基準範囲よりも異常に高値を示し，FDP-DDがピークとなる4日前にピークとなった（図6；症例14)．

次に，DIC症例と同様にEATの変動を好中球数およびCRPの変動と比較した．この結果，Fig.5,6に示した2症例とも，EATの増減は好中球数およびCRPの増減と一致しなかった．このことは図に示さなかった他の

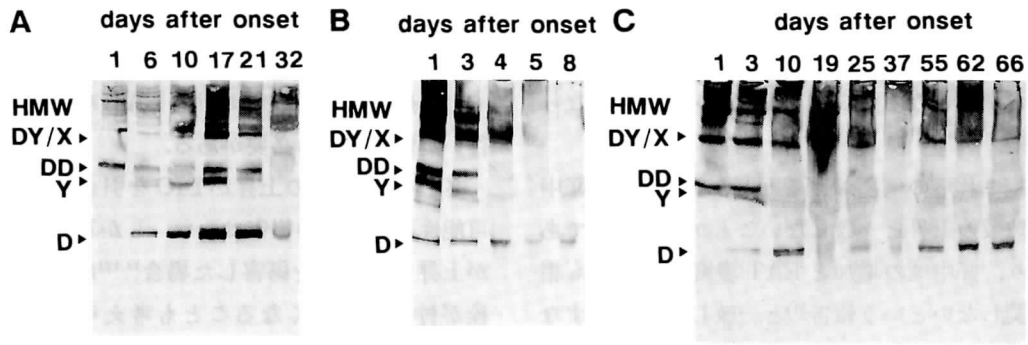

図4　SDS-PAGEとWestern blottingによるFDP分画の解析
A：症例1，B：症例7，C：症例9

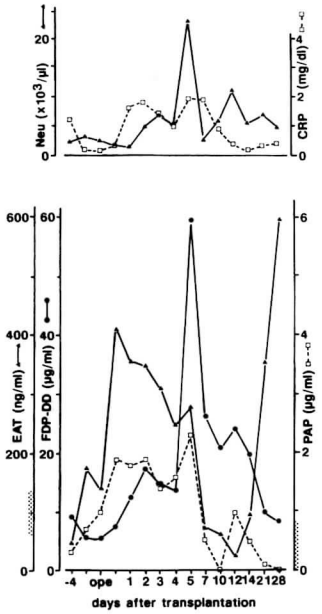

図5　症例13（生体部分肝移植）のEAT経時変化

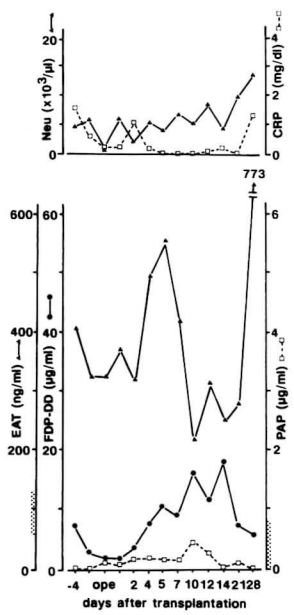

図6　症例14（生体部分肝移植）のEAT経時変化

6症例においても同様であった．

考察

GELおよびEATはARDS[15]，白血病[16-18]，敗血症[19-21]，ショック[22]等の疾患および体外循環による心肺手術[23]や血液透析[24]の時に，血中濃度が上昇することが報告されている．今回われわれはDICおよびFDP-DDが高値となった非DIC症例におけるEATの経過観察を行なった．この結果12例のDIC症例の内10例において，FDPとFDP-DDの増減と一致してEATが増減することが明らかとなった．10例中2例では，PAPの増加がわずかであり，EATの増減に数日遅れてFDPとFDP-DDが増減した．一方，DICを併発しなかったにもかかわらず，FDP

-DDが非常に高値を示した生体部分肝移植症例8例においても，全例でFDP-DDがピークとなる数日前にEATがピークとなった．

これらの例におけるEATの上昇は，好中球数の上昇と一致しないことがほとんどであり，好中球の増加とEAT濃度が必ずしも相関しないという報告[21]と一致していた．すなわち，好中球がGELを放出するのは，好中球が活性化され貪食や殺菌等の機能を発揮した場合と，好中球自体が障害されたり細胞死に陥った時であるので，循環血液中の好中球数の増加が直ちに血中GELやEATの上昇に反映しないと考えられる．EAT濃度の増加が白血球数やCRPの増加とよく一致する症例も報告[31]されてはいるが，われわれの検討した症例では，EATの増減がCRPの増減と一致した例は少なかった．したがって，血中EATの推移は従来の炎症マーカーである白血球数（好中球数），CRP，赤血球沈降速度，発熱などの推移とは異なるために，炎症時における新たな臨床的意義が存在するものと考えられている[31]．

DICにおける血中のEAT異常高値は，DICになった結果として生じたものではなく，DICを起こす基礎疾患や病態により増加したものと考える．すなわち，M3をはじめとする急性骨髄性白血病では，DICを発症していない状態においても，白血病細胞に由来するGELが異常値を示すと報告されている[16-18]．また，敗血症をはじめとする重篤な感染症においてもGELおよびEATが異常に高値になることが報告されている[19-21]．

一方，今回われわれが検討したDICを併発しなかった生体部分肝移植症例の経過から，広範囲・長時間におよぶ手術では組織を障害し，その過程で好中球が活性化され，血中EATが増加することが考えられた．このことは生体部分肝移植という特殊な手術でなく，一般的な手術後におけるEATの測定を行い比較検討する必要がある．

さらに，GELの上昇がDICを引き起こす可能性についての報告はない．しかし，GELが上昇し血管壁を傷害した場合[11,12]には，血栓が付着しやすくなることも考えられるので，その他の要因が重なった場合には，DICが生じる可能性はあると思われる．

FDPが低下するのに従ってEATが低下したDICおよび非DIC症例では，フィブリンあるいはフィブリノゲンの分解にプラスミンだけでなくGELも関与[32-39]している可能性がある．しかし，GELは試験管内においてフィブリン・フィブリノゲン[32-39]だけでなく，凝固第Ⅴ，Ⅷ，Ⅻ，XIII因子[5]，プラスミノゲン[6]，アンチトロンビンIII[7]，α_2-プラスミンインヒビター[7,8]などを分解することが証明されている．したがって，生体内においてGELが直接フィブリンあるいはフィブリノゲンを分解するのか，それともGELがα_2-プラスミンインヒビター[7,8]を分解することにより，プラスミンの作用が抑制できないために，フィブリンあるいはフィブリノゲンが分解されるのか明らかではない．

そこで，FDPあるいはFDP-DDの増減がプラスミンの影響をほとんど受けずに，GELの増減だけと一致したDIC症例の2例と生体部分肝移植術後の1例において，FDP分画について比較した．GELはフィブリノゲンに作用してプラスミンとは異なる分解産物を生じることが報告[34-39]されている．ひとつはプラスミンによるフィブリノゲン分解産物Xよりやや分子量の小さい（X-like；270 kDa）もので[34-36,38]，もうひとつはプラスミンによるフィブリノゲン分解産物Dよりやや分子量の

小さい（De；80 kDa）もの[37]である．今回のわれわれの検討では，図4に示したようにGELに特異的な分解産物を検出することはできなかった．とりわけX-like分画は，フィブリンの分解も同時に生じている症例において，われわれの使用しているSDS-PAGEの条件ではXあるいはDY分画との区別が困難であった．このため，今回は生体内においてGELがフィブリンあるいはフィブリノゲンを分解していることを，直接的に証明することはできなかった．

一方，生体部分肝移植症例においては，α_2-プラスミンインヒビターおよびプラスミノゲンは，FDP-DDとPAPが最も高くなった時に最も低値を示しており，EATが最高値となった時ではなかったので，生体内でGELが有意にα_2-プラスミンインヒビターを分解している可能性はないと考えられる．以上のことから，DICおよび非DIC症例において，高値となったGELがフィブリンあるいはフィブリノゲンを直接分解する可能性が大きいと考えられる．

結語

DICおよびFDP-DDが異常高値を示した非DIC症例において，GELがフィブリンあるいはフィブリノゲンを直接分解した可能性のある症例を報告した．しかし，GELの増減は好中球数やCRPの増減と一致しない症例が大部分であった．

文献

1)Ohlsson K, Olsson I: The neutral proteases of human granulocytes: Isolation and partial characterization of granulocyte elastase. Eur J Biochem, 42: 519-527, 1974.

2)DeDure C, Wattiaux, R: Functions of lysosomes. Ann Rev Physiol, 28: 435-492, 1966.

3)Weissmann G, et al.: Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. Am J Pathol, 68: 539-559, 1972.

4)Janoff A, Zeifach BW: Production of inflammatory changes in the microcirculation by cathionic proteins extracted from lysosomes. J Exp Med, 120: 747-764, 1964.

5)Schmit W, et al.: Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes on isolated clotting factors. Thromb Res, 6: 315-326, 1975.

6)Moroz LA: Mini-plasminogen:A mechanism for leukocyte modulation of plasminogen activation by urokinase. Blood, 58: 97-104, 1981.

7)Brower MS, Harpel PC: Proteolytic cleavage and inactivation of α_2-plasmininhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. J Biol Chem, 257: 9849-9854, 1982.

8)Klingemann HC, et al.: Digestion of α_2-plasmin inhibitor by neutral proteases from human leukocytes. Thromb Res, 24: 479-483, 1981

9)Kaiser H, et al.: Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral protease - A model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglycan.J Clin Invest, 57: 625-632, 1976.

10)Mainardi CL, et al.: Specific cleavage of human type III collagen by human polynuclear leukocyte elastase. J Biol Chem, 255: 12006-12010, 1980.

11)Janoff A: Elastase in tissue injury. Annu Rev Med, 36: 207-216, 1985.

12)Fritz H, et al.: Granulocyte proteinases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation: A review. In proteinases in inflammation and tumor invasion, ed. by Harald T, p.1,

De Gruyter, 1986.
13)BrowerMS, HarpelPC: Alpha-1-antitrypsin-human leukocyte elastase complexes in blood: Quantification by an enzymelinked differential antibody immunosorbent assay and comparison alpha-2-plasmin inhibitor -plasmin complexes. Blood, 61: 842-849, 1983
14)Neumann S et al.: "PMN-Elastase Assay": Enzyme immunoassay for human polymorphonuclear elastase complexed with α_1-proteinase inhibitor. J Clin Chem Clin Biochem, 22: 693-697, 1984.
15)Shimanuki K, et al.: Perioperative fluctuation in plasma levels of granulocyte elastase and alpha-1-antitrypsin: The influence of the severity of surgical intervention and their effect on the respiratory index. Jpn J Surg, 19: 410-417, 1989.
16)Galloway MJ, et al.: Elastase-α_1-antitrypsin complexes in acute leukemia. Thromb Res, 38: 311-320, 1985.
17)Saito M, et al.: Quantitative estimation of elastase-α_1-proteinase inhibitor (E-α_1PI) complex in leukemia: Marked elevation in cases of acute promyelocytic leukemia. Thromb Res, 53: 163-171, 1989.
18)相馬正幸，他：急性前骨髄球性白血病患者での線溶機構における PMN elastase の役割. 臨床血液，31:1445-1449,1990.
19)Duswald FH, et al.: Released granulocytic elastase: An indicator of pathobiochemical alterations in septicemia after abdominal surgery. Surgery, 98: 892-899, 1985.
20)Speer CP, et al.: Elastase-α_1-proteinase inhibitor in early diagnosis of neonatal septicemia. J Pediatr,108: 987-990, 1986.
21)田中　裕，他：敗血症時における顆粒球エラスターゼの変動：臓器障害に及ぼす影響について. 日本外科学会誌，90:334-342,1989.
22)田中　裕，他：ショック時の Polymorphonuclear leukocyte elastase の変動；呼吸障害に及ぼす影響について. 日本外科学会誌，88: 1756-1763,1987.
23)Antonsen S. et al.: Neutrophil lysosomal enzyme release and complement activation during cardiopulmonary bypass. Scand J Thorac Cardiovasc Surg, 21: 47-52, 1987.
24)Horl WH, et al.: Proteolytic activity in patients with hypercatabolic renal failure. Adv Exp Med Biol, 167: 405-416, 1984.
25)青木延雄，長谷川淳：DIC 診断基準の「診断のための補助的検査成績，所見」の項の改訂について. 厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班昭和62年度研究報告書，p37-41，1988.
26)Ohlsson K, Olsson I: Neutral proteases of human granulocytes. III Interaction between human granulocyte elastase and plasma protease inhibitors. Scand J Clin Lab Invest, 34: 349-355, 1974.
27)Harpel PC: α_2-plasmininhibitor and α_2-macroglobulin-plasmin complexes in plasma. Quantitation by an enzyme linked differential antibody immuno-sorbent assay. J Clin Invest, 68: 46-55, 1981.
28)青木延雄，他：EIA 法による α_2PI(TD-80)および α_2PI プラスミン複合体(TD-80C)測定キットの基礎的検討. 臨床病理，35:1275-1281,1987.
29)奥村伸生，他：SDS-PAGE と Immunoblot によるフィブリンおよびフィブリノゲン分解産物の解析. 臨床病理，38:201-207,1990.
30)奥村伸生，他：FDP の分画解析による一次線溶と二次線溶の半定量的鑑別. 臨床病理，40: 789-794,1992.
31)櫻林郁之介：好中球エラスターゼ. 臨床検査，38:457-460,1994.
32)Plow EF: The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. Biochem Biophys Acta, 630: 47-56, 1980.
33)Moroz LA: Nonplasmin-mediated fibrinolysis. Semin Thromb Hemost, 10: 80-86, 1984.
34)Plow EF, Edgington TS: An alternative-pathway for fibrinolysis. I. The cleavage of

fibrinogen by leukocyte proteases at physiologic pH. J Clin Invest, 56 : 30-38, 1975.
35)Bilezikian SB, Nossel HL : Unique pattern of fibrinogen cleavage by human leukocyte proteases. Blood, 50 : 21-28, 1977.
36)Plow EF, Edgington TS : Comparative immunochemical characterization of products of plasmin and leukocyte protease cleavage of human fibrinogen. Throm Res, 12 : 653-665, 1978.
37)Plow EF, et al. : Immunochemical discrimination of leukocyte elastase from plasmic degradation products of fibrinogen. J Lab Clin Med, 102 : 858-869, 1983.
38)Sterrenberg L, et al. : Evidence of fibrinogen breakdown by leukocyte enzymes in a patient with acute promyelocytic leukemia. Haemostasis, 15 : 126-133, 1985.
39)Weitz JI, et al. : Development of an assay for in vivo human neutrophil elastase activity. Increased elastase activity in patients with α_1 -proteinase inhibitor deficiency. J Clin Invest, 78 : 155-162, 1986.

受付日：1994年9月29日
受理日：1994年11月22日