

肝細胞癌患者における凝固線溶系分子マーカー

北海道大学医学部第1外科

中川 隆公 宇根 良衛 嶋村 剛
神山 俊哉 秦 庸壮 松下 通明
佐藤 直樹 中島 保明 内野 純一

肝細胞癌 (HCC) 患者において凝固線溶系と thrombin-antithrombin III complex (以下, TAT と略記), plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex (以下, PIC と略記), D-dimer との関連を, 臨床所見および病理組織学的因子から検討した. 最近3年間に教室で肝切除術を施行した75症例を対象とした. TAT, PIC, D-dimer の平均値(mean \pm S.E.)はそれぞれ $4.49\pm 0.58\mu\text{g/l}$, $1.36\pm 0.07\mu\text{g/ml}$, $1.325\pm 0.270\mu\text{g/ml}$ であり, いずれも高値であった. 非癌部肝組織像, 腫瘍細胞の分化度, 被膜形成の有無, 門脈侵襲の有無と相関はなかった. Stage と TAT は正の相関がみられ ($p=0.064$), 肝内転移と D-dimer は有意な正の相関をみとめた ($p=0.005$), HCC の肝内転移の進展と凝固線溶系亢進との関連が示唆された.

Key words: hepatocellular carcinoma, thrombin-antithrombin III, D-dimer, plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex, intrahepatic metastasis

はじめに

担癌状態では凝固亢進状態となり, disseminated intravascular coagulation (以下, DIC と略記) に陥りやすいとされている¹⁾. 最近, thrombin-antithrombin III complex (以下, TAT と略記), plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex (以下, PIC と略記), D-dimer などの凝固線溶系分子マーカーが測定されるようになり, 出血症状や臓器症状といった DIC による臨床症状を示さず, DIC 診断基準を示さない症例においても, 分子マーカーの高値などにより, DIC 準備状態の診断が可能となってきた.

一方, 肝細胞癌 (以下, HCC と略記) 患者は慢性肝機能障害を基礎にもっている例が多く, 最近の凝固線溶系分子マーカーの測定法の普及により過凝固状態の病態が多く報告されている²⁾. また, 癌組織で線溶因子の産生がみられるという報告や³⁾, 癌の浸潤・転移において, プロテアーゼによる基底膜の分解が重要視されており⁴⁾, 癌の病態との関連は興味深い, なお明確ではない. また, 臨床例において HCC 切除例の病理組織学的因子と凝固線溶系分子マーカーとの関係についての詳細な報告はいまだされていない.

今回, 我々は HCC 切除例を対象とし, その臨床所見および病理組織学的因子と, 術前の凝固線溶系分子マーカーとの関連について検討した.

対象と方法

1991年4月より1993年5月までに教室にて切除術を施行した肝細胞癌患者75症例を対象とした. 男性55例, 女性20例で, 平均年齢は 58.2 ± 9.4 歳であった.

HBsAg 陽性23例 (30.7%), HCV 抗体陽性は38例 (50.7%)であり, 両者とも陰性のものは14例 (18.7%)であった. 組織学的肝硬変34例 (45.3%), 慢性肝炎24例 (50.7%)であった.

対象75例中, 術前治療は47例に行われており, その内訳は血管造影時に lipiodol (以下, LPD と略記) のみを動注したものの10例, LPD と epi-adriamycin などの抗癌剤の emulsion を動注したものの29例, percutaneous transhepatic ethanol injection therapy を施行したものの6例, percutaneous transhepatic portal embolization を施行したものの2例であった.

今回は, 切除標本の病理学的因子と分子マーカーとの関係の検討を目的としたので, 肝切除直前の凝固線溶系の状態を得るために分子マーカーの測定は術前5日以内に行った.

TAT は ELISA 法 (Enzygnost TAT micro, ベーリングベルケ社) で, PIC はワンステップサンドイッチ

チ法EIAキット(PICテスト「テイジン」, 帝人株式会社)で, D-dimerはラテックス法(LPIA-200専用試薬, イアトロン社)を用いた。

病理組織学的所見は原発性肝癌取扱い規約⁵⁾によった。

測定結果はmean±S.E.で表した。統計学的解析は, 分子マーカー各測定値の分布が, 対数変換で正規分布に近づいたことにより, 群間の平均値の有意差検定には対数変換後, 2群間の検定ではt検定を, 多群間の検定には一元配置分散分析とScheffeの多重比較を用いた。連続変数間の相関はKendallの順位相関係数により検討した。p<0.05を有意とした。

結 果

1. 分子マーカー

TATが 4.49 ± 0.58 (正常値3.0以下) $\mu\text{g/l}$ (以下省略), PICが 1.36 ± 0.07 (正常値0.8以下) $\mu\text{g/ml}$ (以下省略), D-dimerが 1.325 ± 0.270 (正常値1.0未満) $\mu\text{g/ml}$ (以下省略)であり, すべて正常範囲より高値であった (Table 1)。

各分子マーカー間の相関はTATとPICが $r=0.270$, TATとD-dimerが $r=0.268$, PICとD-dimerが $r=0.254$ で, それぞれ弱い正の相関がみられた。

2. 前治療と分子マーカー

前治療の無しの群と有りの群で比較すると, それぞれTATは 5.80 ± 1.47 , 3.79 ± 0.41 , PICは 1.37 ± 0.12 , 1.35 ± 0.10 , D-dimerは 1.701 ± 0.715 , 1.125 ± 0.168 であった。いずれも各群間に有意差はなかった ($p=0.1815$, $p=0.4946$, $p=0.4581$)。

3. 分子マーカーと肉眼的因子との関係

stage分類との関係では, TATは進行例で高値となる傾向があったが, 有意差はなかった ($p=0.0637$), PICは各群間に差はなかった。D-dimerは一元配置分散分析にて有意差を認め ($p=0.0048$), 特にII-IV群間 ($p<0.01$) に有意差があった (Fig. 1)。

周囲肝組織別にみると, 正常肝(normal), 活動性慢性肝炎(CAH), 非活動性慢性肝炎(CIH), 肝線維症(fibrosis), 肝硬変(LC)の5つの分類では, TAT, PIC, D-dimerともに各群間に有意差はなかった (Fig. 2)。

腫瘍の最大径と分子マーカーの関係は, 相関係数が, TATで $r=0.158$, PTCで $r=0.101$, D-dimerでは $r=0.125$ であり, 腫瘍の最大径とは1次相関はなかった (Fig. 3)。

4. 分子マーカーと病理学的因子との関係

Table 1 Clinico-pathological findings and molecular markers. The cases categorized based on the definition of "The General Rules for the Clinical and Pathological Study of Primary Liver Cancer." ⁵⁾

CAH; chronic active hepatitis, CIH; chronic inactive hepatitis, LC; liver cirrhosis

		N(%)	TAT($\mu\text{g/l}$)	PIC($\mu\text{g/ml}$)	D-dimer($\mu\text{g/ml}$)
all		75	4.49 ± 0.58	1.36 ± 0.07	1.325 ± 0.270
pathology of the liver	NORMAL	10 (13.3)	6.33 ± 2.91	5.00 ± 1.39	2.624 ± 1.808
	CAH	9 (12.0)	5.00 ± 1.39	1.67 ± 0.33	1.711 ± 0.537
	CIH	15 (20.0)	5.86 ± 1.66	1.37 ± 0.20	1.295 ± 0.378
	FIBROSIS	7 (9.3)	3.27 ± 0.45	0.97 ± 0.10	0.526 ± 0.258
	LC	34 (45.3)	3.46 ± 0.49	1.34 ± 0.10	1.018 ± 0.164
			$p=0.3188$	$p=0.4706$	$p=0.1032$
stage	I	12 (16.0)	2.53 ± 0.18	1.32 ± 0.20	0.769 ± 0.125
	II	39 (52.0)	3.62 ± 0.36	1.26 ± 0.08	0.778 ± 0.122
	III	13 (17.3)	5.51 ± 1.32	1.50 ± 0.26	1.681 ± 0.449
	IV	11 (14.7)	8.48 ± 3.21	1.55 ± 0.19	3.449 ± 1.580
			$p=0.0637$	$p=0.5744$	$p=0.0048$
degree of differentiation	well	19 (25.3)	4.88 ± 1.60	1.40 ± 0.14	1.823 ± 0.940
	mod	44 (58.7)	4.48 ± 0.68	1.39 ± 0.11	1.315 ± 0.216
	poor	6 (8.0)	4.30 ± 1.70	0.97 ± 0.10	0.415 ± 0.104
			$p=0.9827$	$p=0.3851$	$p=0.2108$
growth type	eg	62 (82.7)	4.19 ± 0.58	1.32 ± 0.08	1.264 ± 0.312
	ig	10 (13.3)	6.33 ± 2.47	1.64 ± 0.19	1.868 ± 0.575
			$p=0.2369$	$p=0.0611$	$p=0.0560$
fc	(+)	52 (69.3)	4.24 ± 0.67	1.29 ± 0.09	1.350 ± 0.367
	(-)	23 (30.7)	5.06 ± 1.15	1.50 ± 0.13	1.267 ± 0.302
			$p=0.2072$	$p=0.0951$	$p=0.4863$
vp	0	51 (68.0)	4.32 ± 0.68	1.34 ± 0.08	1.448 ± 0.371
	1-3	24 (32.0)	4.85 ± 1.12	1.39 ± 0.16	1.062 ± 0.304
			$p=0.3192$	$p=0.4897$	$p=0.1673$
im	0	51 (68.0)	3.47 ± 0.31	1.29 ± 0.08	0.838 ± 0.117
	1-3	24 (32.0)	6.65 ± 1.63	1.49 ± 0.17	2.359 ± 0.774
			$p=0.0611$	$p=0.1741$	$p=0.0058$

Fig. 1 The average levels of the serum TAT, PIC, and D-dimer in tumor stage. Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance and the Scheffe test. Bars represent the mean ± SE for the calculated averages.

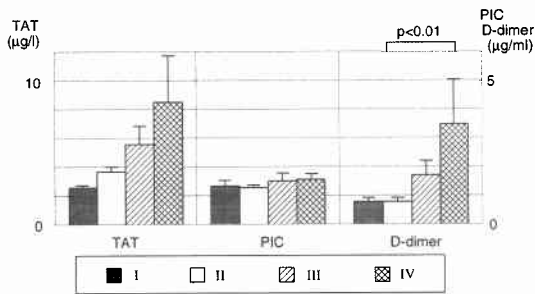


Fig. 2 The average levels of the serum molecular markers is the pathological degree of chronic changes of the liver parenchyma. Bars represent the mean ± SE for the calculated averages.

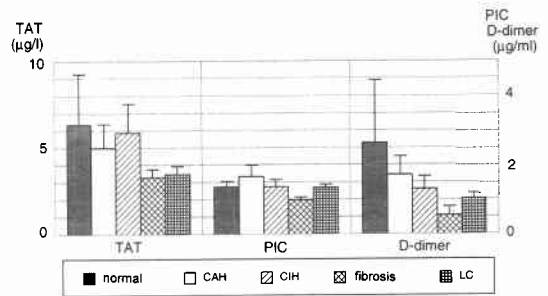
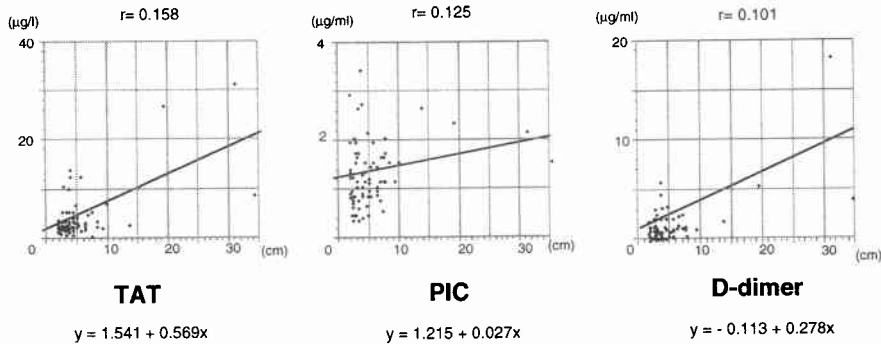


Fig. 3 Tumor size and molecular markers. Simple linear regressions and Relevant Kendall rank correlations were not found between maximum diameter of the tumors and TAT, PIC, D-dimer.



不明例と1例のみの未分化を除いた69例についてみると、組織学的分化度では差はなかった。

発育形式では、各群間に有意差はなかったが、PIC、D-dimerはigで高値の傾向があった(p=0.0611, p=0.0560). (Fig. 4a).

被膜形成の有無では、fc (+), fc (-)の群間に有意差はなかった。

脈管侵襲の有無との関係をvp因子により検討した。vp0 (vp (-))とvp1~3 (vp (+))の2群間に有意差はなかった。

肝内転移を、im0 (im (-))とim1~3 (im (+))の2群に分けると、TATはim (+)で高値の傾向があった(p=0.0611)。PICには有意差はなかった。しかしながら、D-dimerは有意にim (+)で高値であった(p=0.0058) (Fig. 4b).

最大割面における腫瘍壊死の比率とTATの関係を

Fig. 4a The serum molecular markers levels in the group with expansive growth or invasive growth.

Fig. 4b The serum molecular markers levels in the groups without intrahepatic metastases or with them. Bars represent the mean ± SE for the calculated averages. Statistical analysis was performed using the non-paired t-test of Student-Fisher.

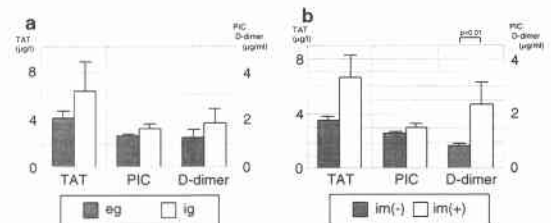
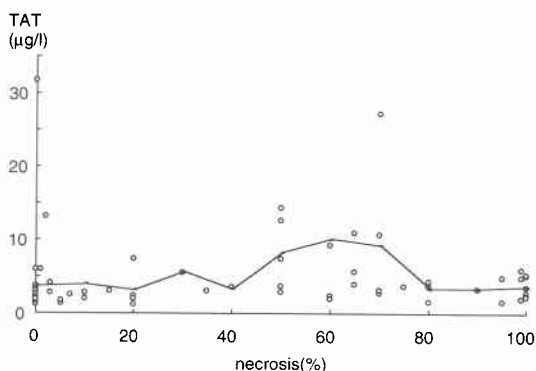


Fig. 5 Correlation between the serum TAT level and the ratio of the histological tumor necrosis. The line in the chart shows the average level of TAT in each 10 per cent point of necrosis ratio.



みると、腫瘍壊死10%区間ごとのTATの平均値は、50~70%で最大値をとり、壊死が100%に近づくと低下する傾向であった (Fig. 5)。

考 察

凝固線溶系分子マーカーは、HCC症例で高値であることが報告されている²⁾⁶⁾⁷⁾。

また、TAEなどの治療により、これら分子マーカーは上昇するが、治療後7日程度で低下するとされている⁶⁾⁷⁾。今回対象とした症例はいずれも何らかの前治療より2週間以上を経過しており、前治療の侵襲による治療直後の分子マーカーの動的変化を過ぎ、治療による腫瘍の変化が落ちついた静的状態でデータが得られたと考えている。

TAE後のTATの上昇は、塞栓物質による凝固活性化、阻血性肝細胞壊死により生じた組織トロンボプラスチンによるといわれているが⁷⁾、今回の症例でも腫瘍壊死がみられる一部の症例ではTATが高値をきたしたものがあつた。さらに腫瘍壊死が進み完全壊死になると腫瘍からの凝固促進物質が放出しなくなり、TATが低下すると考えられた。

一般に、進行癌では、DICに陥りやすいが¹⁾、本検討でも、stageの進行例に凝固線溶系の亢進がみられた。今回の対象症例は、リンパ節転移例はなく、遠隔転移例は1例のみであり、stageの決定因子は、T因子が主であった。T因子は腫瘍の最大径、脈管侵襲の有無、肝内転移の有無により、決定される。それぞれについて、検討したが、腫瘍の最大径、脈管侵襲の有無では、凝固線溶系との有意な関係はみられなかった。

癌組織が浸潤性増殖を来す場合には癌細胞が周囲正

常組織の構築を破壊しながら広がっていくと考えられている。今回、有意差はなかったものの、浸潤性増殖の群では、線溶系の亢進傾向がみられた。

血行性の癌転移は、原発巣からの癌細胞の浸潤、血管内侵入、運搬、定着、血管外脱出、初期増殖というプロセスを経て成立する⁸⁾。肝内転移とD-dimerに有意な関連性がみられたことは、線溶系の亢進が肝内転移のプロセスのいずれかのステップに関与していることを示唆しているものと思われた。この癌の転移、浸潤に対する分子生物学的アプローチの1つとして、細胞間物質(細胞外マトリックス, extracellular matrix: 以下、ECMと略記)と、それを破壊する一群のメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: 以下、MMPと略記)の構造と機能が解明されている⁴⁾。

脈管性の転移において、癌細胞が結合組織内に存在する血管やリンパ管内に侵入するとき、または脈管内から周囲組織内へ浸出するとき、基底膜や結合組織の構成成分であるECMを局部的に分解するMMPの作用が重要であるとされている⁹⁾。MMPは不活性化前駆体で分泌される。この生体内活性因子としてplasminやtrypsinなどのセリン・プロテアーゼが考えられており、これらプロテアーゼにより前駆体MMPは活性型のMMPに変換されると考えられている⁹⁾。

また、ヒト胃癌細胞がトリプシン様酵素、プラスミン様酵素、および組織型カリクレイン様酵素を多量に分泌することが見出されており¹⁰⁾、これらmatrix serine proteinase (MSP)がMMPの活性化および直接的ECMの破壊に関与しているとされる。

MMPの一種であるコラゲナーゼはECMの主要成分であるIV型コラーゲンばかりでなく、ゼラチン、フィブリノーゲン、フィブロンectinなども分解する⁹⁾。肝内転移のみられる例では、MMPやplasminなどのプロテアーゼによる分解産物の1つとして、D-dimerが多く産生され、高値を来していると考えられる。したがってD-dimerの高値は、転移における基底膜などの分解亢進を間接的に現していると考えられる。進行癌においては癌細胞による局所的な線溶関連プロテアーゼの分泌が、癌の進行とともに全身的凝固線溶系の異常を誘発し、進行癌末期状態でのDIC発生の一因となっていると考えられる。

癌組織による線溶系酵素の産生ばかりでなく、宿主による凝固線溶系の亢進が癌の転移に促進的に働く可能性もある。肝切除などの侵襲の大きい手術では、術後の凝固線溶系の変動が、手術侵襲による宿主免疫能

の低下や術後の各種再生因子の分泌などと複雑に結び付き、術後再発に関連している可能性も推測される。今後検討すべき問題であると思われる。

文 献

- 1) Edgington TS: Activation of the coagulation system in association with neoplasm. *J Lab Clin Med* 96: 1-4, 1980
- 2) Tomiya T, Fujiwara K: Plasma Thrombin antithrombin III complexes in the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma complication liver cirrhosis. *Cancer* 67: 481-485, 1991
- 3) Duffy MJ: Plasminogen activators and cancer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1: 681-687, 1990
- 4) 宮崎 香, 越川直彦, 船橋佳谷乃ほか: 癌細胞が分泌するプロテアーゼとそのインヒビター. *組織培養* 18: 280-285, 1992.
- 5) 日本肝癌研究会編: 臨床・病理. 原発性肝癌取扱い

規約. 金原出版, 東京, 1992

- 6) 大元謙治, 山本晋一郎, 井出口清治ほか: 慢性肝疾患における Thrombin-antithrombin III complex と Plasmin- α_2 plasmin inhibitor complex 測定の臨床的意義. *日消病会誌* 87: 1837-1845, 1990
- 7) 水口明洋, 岩淵省吾, 森山直哉ほか: 肝癌例に対する経肝動脈の治療の凝固線溶系への影響. *日消病会誌* 87: 790-798, 1990
- 8) 川口隆憲, 五十嵐誠治: 接着と癌転移・病理学的観察. 鶴尾 隆 編. *癌転移の分子機構*. メジカルビュー社, 東京, 1993, p2-17
- 9) 宮崎 香: マトリックス・プロテアーゼと癌の浸潤・転移. 鶴尾 隆 編. *癌転移の分子機構*. メジカルビュー社, 東京, 1993, p92-107
- 10) Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M et al: Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52: 5046-5053, 1992

Molecular Markers of Blood Coagulation and Fibrinolysis in Patients with Hepatocellular Carcinoma

Takahito Nakagawa, Yoshie Une, Tsuyoshi Shimamura, Toshiya Kamiyama, Tsunetake Hata, Michiaki Matsushita, Naoki Sato, Yasuaki Nakajima and Junichi Uchino
First Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine

Molecular markers of blood coagulation and fibrinolysis were studied in seventy-five patients with hepatocellular carcinoma (HCC) who underwent hepatectomy in the past 3 years. The serum concentration of thrombin-antithrombin III complex (TAT), plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex (PIC), and D-dimer were analyzed. We investigated the relation between those markers and the clinicopathological findings. The average levels (\pm S.E.) of TAT, PIC, and D-dimer were $4.49 \pm 0.58 \mu\text{g/l}$, $1.36 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$, and $1.325 \pm 0.270 \mu\text{g/ml}$, respectively, all slightly above the normal ranges. The serum levels of the molecular markers closely correlated with the tumor stage and intrahepatic metastases. However, there was no correlation with the pathological degree of chronic changes of the liver parenchyma, differentiation of HCC cells, capsular formation, or portal vein involvement. Progression of the intrahepatic metastases of HCC are suggested to be related to the acceleration of blood coagulation and fibrinolysis.

Reprint requests: Takahito Nakagawa First Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine
N15 W7, Kita-ku, Sapporo, 060 JAPAN