

学 位 論 文 題 名

内因性線溶に関する研究：活性化と阻害について

学位論文内容の要旨

緒 言

内因性線溶は接触因子，すなわち，凝固第Ⅻ因子（Ⅻ因子），Prekallikrein（PK），凝固第Ⅺ因子（Ⅺ因子），の活性化によりもたらされ，この際 cofactor として高分子キニノーゲン（High molecular weight kininogen : HMWKgn）が必要とされる（Ⅶ因子依存性経路）。この他，Ⅻ因子非依存性の線溶活性化経路として血中の prourokinase（Pro-UK）が関与すると言われる。これらの内因性線溶の生体における意義は，安静時の基本的な血栓防御機転のひとつと考えられるが，その発現の機序は，いまだ不明な点が多い。本研究では内因性線溶の initiator としてのⅦ因子および，接触因子の役割を明らかにせんと試みた。接触因子の活性化には陰性荷電の存在が重視され，生体内成分では collagen fiber が，in vitro では，kaolin, dextran sulphate (DXS), ellagic acid, および，celite などについて検討されてきた。

一方，接触因子の活性化は C1-inhibitor (C1-INH)， α_2 macroglobulin (α_2 M)，その他の antiplasmin により阻害を受けるとされる。本研究は健常人，Ⅻ因子欠乏血症，および，遺伝性血管神経性浮腫（HANE）の症例において，内因性線溶の促進系，および，阻害系について検討した。実験方法として，前述の kaolin 等 4 種類の活性化剤と，C1-INH 阻害剤として flufenamic acid (flufenamate : FLUF) を用いた。

材料および方法

1. Euglobulin の作製：健常人（12人），遺伝性血管神経性浮腫の症例（17歳女子）の血漿，および，Ⅻ因子欠乏血漿（George King Bio-Medical, Inc., Kansas City, U.S.A.）は以下のごとく処理し，Eug.Fr. とした。血漿を冷却蒸留水で10倍希釈し，pH5.9に調整後，4℃に30分間放置し，遠沈後，生じた沈澱を ethylenediamine tetraacetate (EDTA) を含む buffer で再溶解し，元血漿容量としたものを Regular Eug.Fr. (Reg.Eug.Fr.) とした。活性化剤は，kaolin, DXS (mw 50万), ellagic acid, celite の 4 種を使用し，活性化 Eug.Fr. は各活性化

剤の溶液と血漿を接触させた後、以下 Reg.Eug.Fr. と同様に作製した。

2. フィブリン平板の作製および線溶活性の測定：Bovine plasminogen-rich fibrinogen を用い Astrup 法に準じてフィブリン平板を作製し、Eug.Fr. の $30\mu\text{l}$ をフィブリン平板のにせ、 37°C で18時間放置後、フィブリン溶解窓の直径を測定した。

3. 血漿蛋白の免疫学的測定：Plasminogen(Plg.), Cl-INH, Antithrombin III(AT-III), $\alpha_2\text{M}$, α_1 -Antitrypsin ($\alpha_1\text{AT}$), および, α_2 -plasmininhibitor ($\alpha_2\text{PI}$) はそれぞれの特異抗血清を用い SRID 法で測定した。

4. RK 活性の測定：血漿および活性化剤を 4°C 下に等量混合し、合成基質 S-2302 (Kabi) を基質として end point 法で測定した。PK activator は ellagic acid, cephalin, XII 因子および, HMWKgn を含む Kabi のものを使用した。

5. Cl-INH 活性の測定：Cl-INH の活性は Cls の N- α -Acetyl-glycyl-L-Lysine Methyl ester (AGLMe) 水解能を阻害する効果で測定した。

6. 交差免疫電気泳動法(Crossed Immunoelectrophoresis:CIE):Plg., および, 各 inhibitor (INH)(Cl-INH, AT-III, $\alpha_2\text{M}$, $\alpha_1\text{AT}$, $\alpha_2\text{PI}$) の特異抗血清, および, Agarose (協和メディックス, 東京, type HSA) を用い実施した。

7. FLUF の経口投与実験：FLUF (Arlef, 三共製薬) を健常男子 3 人脳血栓後遺症患者 6 人に投与し線溶活性, 接触因子, および, INH の活性を測定し, 変動を観察した。

結 果

1. 線溶活性に関する検討

1) 促進系：DXS および kaolin による活性化 Eug.Fr. のみ。Reg.Eug.Fr. に比較して有意な線溶活性の上昇を認め、ellagic acid, および, celite によっては変化は認めなかった。XII 因子欠乏血漿ではすべての Eug.Fr. において線溶活性は正常血漿に比べ低下していたが、正常血漿と同様に DXS による活性上昇が見られ、XII 因子非依存性の線溶活性経路の存在が示唆された。

2) 阻害系：Eug.Fr. 中の Cl-INH は FLUF (終濃度 2mM) の添加で失活し、線溶活性は添加前値の約 2.5 倍に上昇した。HANE 症例血漿の線溶活性は全ての Eug.Fr. で上昇し、また、PK の活性化も起こり易かった。

2. 交差免疫電気泳動法 (CIE) による検討：活性化剤のみでは plasmin (Pln.) の出現、および, INH の変化を示す結果は得られなかった。血漿を PK activator で活性化すると CIE のパターンは以下のように変化した。(intact な血漿の CIE パターンとの比較)

1) 促進系: 抗 Plg. 血清を用いた CIE のパターンは陰極側に新しいピークを生じ, Pln. のできたことを示唆した。

2) 阻害系: 抗 Cl-INH 血清, および, 抗 α_2 PI 血清を用いた CIE パターンはピークの高さは低くなり陰極側に新たな肩を生じた。これらの変化より, Cl-INH と KK の, および, α_2 PI と Pln. の複合体形成を推定した。

3. Cl-INH の阻害による生体内での内因性線溶の活性化: : 健常人で FLUF500mg 投与すると, 線溶活性は二峰性に上昇した (1, および, 8 時間後)。Cl-INH 活性は次第に低下し, 投与前の約 40% のレベルに達した。また PK 活性の上昇も認めた (最大約 180%)。

考 察

生体は極く少量の XII 因子の活性化により活性型接触因子 (XIIa, KK, VIa) を多量に生じる positive feedback 機構を有する。しかし, 内因性凝固開始機転に必須な接触因子の欠損症患者は重篤な出血は示さず, むしろ血栓症を起こすことが報告されている。これらは接触因子, 特に VII 因子は線溶の開始機転にも重要な役割を果たしていることを示唆している。また, 活性型接触因子が直接 Plg. を活性化すると報告もこのことを支持する。本研究では kaolin による XII 因子依存性の, DXS による XII 因子非依存性の内因性線溶活性経路が示された。しかし, DXS による線溶活性は PK 欠乏血症でも見られ, 抗 UK 抗体により阻害される報告などより血中の pro-UK の活性化により生じている可能性が高い。一方, pro-UK は KK, XIIa, および, Pln. によっても活性化されるので内因性線溶を従来のように, XII 因子依存性, 非依存性経路に分類することは問題が残る。Cl-INH は活性型接触因子を阻害することで内因性線溶を制御するが, HANE の症例の検討, および, Cl-INH 阻害剤投与実験の結果などより生体内で果たす役割が大きいことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 川 昌 一

副 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 川 上 義 和

内因性線溶の発現、およびその生体における意義については不明な点が多い。今回、申請者は血液凝固第Ⅻ因子（Ⅻ因子）を内因性線溶の発現の initiator としてとらえる見地に立ち、その活性化と阻害について検討した。Ⅻ因子の活性化を kaolin, dextran sulphate (DXS), ellagic acid (EA), および celite の 4 種の陰性荷電表面を有する活性化剤を用いて行い、また阻害因子として、特に Cl-inhibitor (Cl-INH) の役割について分析した。

その結果、

- (1) Euglobulin (Eug) 分画の線溶活性は DXS, および kaolin によって上昇し, EA, および celite は活性化作用がなかった。
- (2) 活性化の有無に関わらず Eug 分画に残存する内因性線溶の阻害因子は Cl-INH であった。また, α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI) 他の plasmin inhibitors はこの分画には認めなかった。
- (3) Eug 分画の線溶活性を規定する Cl-INH の不活性化は 2 mM のフルフェナム酸（終濃度）によってもたらされ, この条件で線溶活性はピークにまで上昇した。
- (4) 正常血漿においては, kaolin および DXS による内因性線溶の活性化が生じるが, Ⅻ因子欠乏血漿においては kaolin による活性化が起こらず, DXS によってのみ活性化が起こった。
- (5) Cl-INH の欠損症である遺伝性血管神経性浮腫 (HANE) の症例では, 正常に較べ有為な内因性線溶活性の上昇が認められた。
- (6) 血漿では kaolin は強い prekallikrein (PK) 活性化作用を示す。また HANE では正常血漿に較べ高い PK 活性が生じ易い結果であった。
- (7) インヒビターが共存する血漿において内因性線溶の活性化現象を交差免疫電気泳動法を用いて分析し, 以下の結果を得た。

① Plasminogen は kallikrein (KK) によって活性化され二峰性ピークの泳動像のパターン変化として示され, plasmin の出現を示唆した。

② インヒビターの中で, 線溶の活性化に伴って変化を示したのは Cl-INH と α_2 PI であった。

③ HANE の血漿では plasminogen の活性化が容易に、かつ高度に起こった。

(8) C1-INH の阻害剤であるアーレフ（フルフェナム酸）の経口投与実験（健常男子 3 名）により生体でも C1-INH 活性の低下、PK 活性の上昇とともに、線溶活性の上昇が見られた。

以上の結果、

1. 内因性線溶には kaolin により活性化される XII 因子依存性の活性化経路が存在する。またこの経路では PK より KK が生じることが重要であった。
2. 内因性線溶には DXS により活性化される XII 因子非依存性の活性化経路が存在する。
3. 内因性線溶の阻害機序においては、C1-INH が中心的役割をになっている。
4. C1-INH の欠損している HANE の症例では内因性線溶の活性化が起こりやすく、またその際、高い線溶活性を示す。
5. 内因性線溶の活性化現象は fibrinolysis としてとらえた他、plasmin の出現を交差免疫電気泳動法による免疫学的な変化としてとらえることが出来た。また、同方法によってインヒビターとして C1-INH と α_2 PI が関与していることが示された。
6. 生体において C1-INH が阻害されると内因性線溶の活性化、および PK の活性化が生じる。
7. XII 因子は従来、内因性凝固活性化経路の開始機転の最重要な因子と考えられてきた。しかし XII 因子、PK、および XI 因子のそれぞれの欠損症において重篤な出血症状がなく、逆に肺塞栓症や心筋梗塞などの血栓症が多いとする報告と本研究の結果をあわせて考えると、XII 因子は凝固よりもむしろ内因性線溶の initiator としての役割が大きいことが示唆された。

試問に際し、宮崎教授より以下の質問①血栓防御機転における内因性線溶の関わり、特に凝固と線溶の開始順序について。②実際、生体において C1-INH の関与する病態としてどのようなものが考えられるか。③protein s, protein c と内因性線溶はどのような関わりがあるか。④臓器、とくに肺、腎などにおける XII 因子の活性化についてはどのように考えるか。また、川上教授より、内因性線溶の活性化の機序、意義などに関する質問がなされたが、申請者は概ね適切な答弁をした。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定した。