原 著

単離糸球体と U.K. との線溶能の比較について

川 口 憲 明* 三 好 雅 美* 関 浩*
 中 川 雅 夫* 松 岡 謙 二* 伊地知 浜 夫*

Fibrinolytic Activity of the Glomerulus
 —Comparison with Urokinase—

Noriaki KAWAGUCHI*, Masami MIYOSHI*, Hiroshi SEKI*,
 Masao NAKAGAWA*, Kenji MATSUOKA* and Hamao IJICHI*

Key words : isolated glomerulus, urokinase, ^{125}I -fibrinogen,
 plasminogen activator, S-P disc method

For the evaluation of fibrinolytic activity of the glomerulus, we employed the isolated glomeruli of the rat and compared with that of Urokinase. The fibrinolytic activities were examined by the fibrin agar plate, author's original method (S-P disc method) and the method using the chromogenic substrate, S-2444 which is specific for Urokinase. By S-P disc method fibrinolytic activities were determined by counting the radioactivities of the degraded products of ^{125}I -fibrinogen by means of fractionation with SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis.

The results obtained were as follows ;

- (1) Most of the fibrinolytic factors in the rat glomerulus were plasminogen activator.
- (2) By S-P disc method the difference of the fibrinolytic activity between isolated glomeruli and Urokinase were detected in the course of the degradation of ^{125}I -fibrinogen, i.e. isolated glomeruli produced mainly Fragment X, however Urokinase produced all of the Fg. D.P. fragments.
- (3) The homogenate of renal medulla and cortex had the amidolytic effect on S-2444 and the former showed higher activity than the latter. However isolated glomeruli showed neither enzyme activity on this specific substrate for Urokinase nor inhibitory effect on this system.

These findings suggest that in the fibrinolytic mode of action the plasminogen activator in the glomerulus is different from Urokinase which is reported to be synthesized in the renal tubular cells. And from these point of view glomerulus and renal tubulus may act the different part respectively in the fibrinolytic system of the kidney.

* 京都府立医科大学第二内科〔〒602 京都市上京区河原町通り広小路上ル〕, The Second Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

はじめに

糸球体組織線溶については現在まで Todd の Fibrin slide 法¹⁾による検鏡下での観察^{2,3)}, Astrup 法⁴⁾を用いて腎皮質から抽出した線溶因子についての検討,あるいは尿を検体とした間接的な方法^{5,6)}によるもの等が行われていた。

今回、私どもは単離糸球体を対象とすることにより糸球体以外の組織を除いた系を用いて、数種の線溶活性測定法により糸球体組織線溶因子の検討を行ない、Urokinase (以下, U.K.) と比較したのでその成績を報告する。

I. 方 法

ウイスター系ラットを脱血死させ腎を摘出した後 Fong らの方法⁷⁾を改変して糸球体を単離し⁸⁾, Fibrin agar plate 法 (以下 F.A.P. 法), 私どもの考案した ¹²⁵I-fibrinogen を基質とした S-P disc 法 (詳細は後述), および U.K. 特異性を示す合成基質 S-2444 を用いて, 糸球体のもつ線溶因子ならびに線溶能を検索した。

また, 単離糸球体浮遊液試料は単離時に糸球体内に残存する微量血液を可及的に除去するための灌流操作, および単離糸球体の sonication を組みあわせて調製した。

(1) F.A.P. 法

北里研究所製 Fibrin agar plate (Plasminogen 不含) を用い, 単離糸球体試料に一定濃度の U.K., 生食水, Plasminogen の各溶液を混じて plate の well に注入し, 37°C, 18時間静置した後の溶解窓の直径より Plasminogen, Plasmin, Plasminogen activator 活性を検索した。また, Antiplasmin 活性については単離糸球体と Plasmin 溶液を混じた試料と, Plasmin 溶液のみの溶解窓とを比較して測定した。

(2) S-P disc 法

本法は私どもが考案した方法⁸⁾で, ¹²⁵I-fibrinogen (Plasminogen 含有) を基質とし, これに線溶活性化物質, すなわちこの場合は単離糸球体を作用させ, 生じた分解産物の ¹²⁵I-Fg. D. P. を SDS-Polyacrylamide gel disc electrophoresis を用いて分画し, 各 Fg. D.P. の放射能を測定することにより線溶活性を観察する方

法である。なお各 fragments は marker として予め調製した非標識 Fg. D.P. を試料とともに泳動し, クーマシー・ブルーによる蛋白染色を行い同定した。

そして, 本法を用いて各単離糸球体調製試料の線溶能を反応系に添加する糸球体数の増加に伴う活性動態として検索し, U.K. の濃度に伴う線溶活性動態と比較した。

(3) 合成基質 S-2444 を用いる方法

S-P disc における ¹²⁵I-fibrinogen の放射能減少率がほぼ同等の値を示す単離糸球体数および U.K. 濃度の series を用いて S-2444 に対する Amidolytic activity を比較し, 同時にこれら単離糸球体試料と同等の蛋白濃度を有する腎髄質と腎皮質 homogenate の本基質への作用をも検討した。また, S-2444 に対する酵素反応系への糸球体内阻止因子および促進因子の有無については, U.K. に単離糸球体を添加した試料と U.K. のみの試料を S-2444 に作用させ両者を比較することにより検索した。

II. 成 績

(1) F.A.P. 法

すべての単離糸球体調製試料からは Plasminogen activator 活性のみが検出され, Plasminogen, Plasmin, Antiplasmin 活性は検出しえなかった。また, t-AMCHA による plate の前処置によりこの糸球体線溶活性は抑制ないし消失した。

(2) S-P disc 法

本法を用いて単離糸球体試料の線溶活性を図1のごとく反応系に添加する糸球体数の増加に伴う動態として観察すると, 糸球体数の増加にしたがって基質である ¹²⁵I-fibrinogen の放射能は減少し, 分解産物の Fg. D.P. の放射能は増加した (以下, 放射能を略す)。そして, この場合, 主として Fragment X のみが著増を示し他の fragments の増加は軽微であった (図1)。

他方, U.K. の場合は, U.K. 濃度の上昇に伴い基質である fibrinogen は減少し, 分解物の Fg. D.P. は増加したが, 単離糸球体の場合とは Fg. D.P. の生成において相異を認めた。

すなわち、単離糸球体の場合、基質 fibrinogen の減少は主として early Fg. D.P. である Fragment X の増加として反映されるのに反し、U. K. では単離糸球体試料とほぼ同等の fibrinogen の減少に対して Fragment X のみでなく、Y, D, E, A, B, C その他の small fragments を含んだすべての Fg. D.P. の増加として反映された (図 2)。

すなわち、単離糸球体と U. K. とは Fg. D.P. の生成反応において線溶態度を異にするといえる。

(3) 合成基質 S-2444 を用いる方法

S-P disc 法で ^{125}I -fibrinogen の放射能減少率がほぼ同等 (各 Fg. D.P. 生成活性は同等でない) の単離糸球体数と U.K. 濃度を用いて S-2444 に対する Amidolytic activity を比較すると、U.K. については濃度の上昇に伴って直線的に p-nitroaniline の遊離が増加するが、単離糸球体試料については糸球体添加量を増加させても全く S-2444 に作用せずこの合成基質に対する Amidolytic activity は認めなかった。

一方、単離糸球体と同等の蛋白濃度を有する腎髄質および腎皮質 homogenate についてこれらの活性を検索すると、単離糸球体では見出しえなかった本合成基質に対する酵素活性を軽度ではあるが明らかに検出し、髄質は皮質に比して高い活性を示した (図 3)。

さらに S-2444 反応系における糸球体阻害因子および促進因子の有無を検索したがこれを認

Fig. 1 Fibrinolytic activity of the isolated glomeruli incubated for 1 hour with respect to the number of glomeruli. (S-P disc method)

Fig. 2 Fibrinolytic activity of urokinase incubated for 1 hour with respect to the U.K. concentration. (S-P disc method)

めえなかった。

III. 結論および考案

Fig. 3 Amidolytic effect on S-2444 of urokinase and renal tissue.

以上、ラットの単離糸球体を用いて F.A.P. 法、S-P disc 法、S-2444 を用いた方法で糸球体組織線溶因子の性質を検討した。その結果

(1) 糸球体の主たる線溶因子は Plasminogen activator であった。

(2) 糸球体組織 activator は S-P disc 法を用いた観察で Fg. D.P. の構成 Fragments の生成において U.K. と線溶態度を異にした。

(3) U.K. に特異性を示す合成基質 S-2444 に対して、腎髄質および腎皮質の homogenate は Amidolytic effect を示し、髄質の方が皮質に比べて活性が大きいことを知った。しかし、単離糸球体試料は本基質に全く作用せず、本反応系に対する阻害因子も促進因子も認めなかった。

これらの成績は、U.K. が fibrinogen および S-2444 を基質として作用するのに反し、単離糸球体の場合は S-2444 に作用せず、かつ fibrinogen に対する作用も主として Fragment X の遊離のみに止まることを見出し、単離糸球

体の Plasminogen activator が U.K. と同一なものではないことを現象的に示すものである。

よって基質および activator の種属差の問題が残されているものの、糸球体と U.K. 生成部位である尿細管との腎の組織線溶における関与の相異が示唆され、この両者の役割については今後の検討に待ちたい。

文 献

- 1) Todd, A. S.: The histological localization of fibrinolysin activator. *J. Path. Bact.*, **78**; 281~283, 1959.
- 2) McConnel, D., Johnson, J. G., Young, I. and Holemans, R.: Localization of plasminogen activator in kidney tissue. *Lab. Invest.*, **15**; 980, 1966.
- 3) Myhre-Jensen, O.: Localization of fibrinolytic activity in the kidney and urinary tract of rats and rabbits. *Lab. Invest.*, **25**; 403~411, 1971.
- 4) Astrup, T. and Sterodorff, I.: The plasminogen activator in animal tissue. *Acta Physiol. Scand.*, **36**; 250~255, 1956.
- 5) 風間睦美: 凝固、線溶と各種疾患、腎炎。日本臨牀, **32**; 1061~1064, 1974.
- 6) Wardle, E. N., Menon, I. S. and Rastogi, S. P.: Study of proteins and fibrinolysis in patients with glomerulonephritis. *Brit. Med. J.*, **2**; 260~263, 1970.
- 7) Fong, J. S. C. and Drumond, K. N.: Method for preparation of glomeruli for metabolic studies. *J. Lab. & Clin. Med.*, **71**; 1034~1039, 1968.
- 8) 川口憲明: ラット馬杉腎炎発症過程における糸球体内凝固・線溶系に関する研究、一単離糸球体を中心としての検討一。日腎誌, **20**; 1175~1199, 1978.