原 著

 α_2 -M と生体制禦

高塚 純* 久保田和博* 瓜田 有三*
野中 杏栄* 松本 光民* 柴 忠明*
竹内 節夫* 五十嵐紀子**

The role of α_2 -macroglobulin in control mechanism of
coagulation and fibrinolysis

Jun TAKATSUKA*, Kazuhiro KUBOTA*, Yuzo URITA*,
Kyoei NONAKA*, Mitsutami MATSUMOTO*
and Tadaaki SHIBA*

Key words : α_2 -macroglobulin, plasmin, thrombin, trypsin, DIC

α_2 -Macroglobulin (α_2 -M), one of the proteinase inhibitors in blood, binds to various proteinases such as plasmin, thrombin, trypsin kallikrein, and inhibits their activities. In this papers the respective reactions between α_2 -M and plasmin, thrombin or trypsin were investigated with the use of α_2 -M conjugated agarose.

α_2 -M was purified from human plasma using lysin agarose, Sepharose 6B and the Ultrafiltration cell (M.W. 300,000). Thrombin was purified using SP Sephadex and plasmin was made using lysin agarose.

It was found by the experiments using α_2 -M agarose that plasmin was eluted with 1M NaCl in phosphate buffer (pH 7.5) but trypsin was not eluted with 1M NaCl in phosphate buffer (pH 7.5).

Thrombin was not eluted from α_2 -M agarose even with 1M or 2M NaCl in phosphate buffer (pH 7.5) and it was strongly probable that the reaction between α_2 -M and thrombin were irreversible. The reactions between α_2 -M and thrombin was also examined by polyacrylamide disc gel electrophoresis. It was observed that three or four bands were found on the electrophoresis after the reaction, which indicated the changes in the low molecular structure changes of α_2 -M due to reaction with thrombin. However, no quantitative change was found by immunological assay of the same specimen. It was made clear that α_2 -M irreversibly changed in its properties by reacting with thrombin and lost its biological activity. On the basis of the fact that α_2 -M in blood of a DIC patient loses its activities the following experiment in vitro was performed.

After the incubation of plasmin and α_2 -M, different amount of thrombin was

* 東邦大学医学部第二外科 (〒143 東京都大田区大森西6-11-1), The Second Department of Surgery, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

** 同 生化学, Departmet of Biochemistory, Toho Uniuersity School of Medicine, Tokyo, Japan.

added and the fibrinolytic activity of this mixtures were examined on 0.2% plasminogen free fibrin plate.

It was noted that the lysis area was remarkably enlarged as the amount of thrombin was increased in the mixture. This implies that activity of α_2 -M as a plasmin inhibitor was decreased and plasmin was released by the coexistence of thrombin.

はじめに

血中多価蛋白分解酵素阻止物質である α_2 -Macroglobulin (α_2 -M) は plasmin, thrombin, kallikrein 等のプロテアーゼ (proteinase) と結合し抑制する¹⁾²⁾³⁾. われわれは α_2 -M の plasmin および trypsin の反応は、短時間内での反応においては反逆的であり、 α_2 -M の plasmin 阻止作用は基質 fibrinogen 濃度によって影響され、間接的に fibrinogen の血中濃度の維持に役立っており、凝固・線溶系の恒常性維持に大きな貢献をしているのであろうということを報告してきた⁴⁾. 今回さらにそれら諸酵素の相互的な α_2 -M に対する吸着への影響を明らかにすべく本研究を行なった.

I. 方法および結果

1. α_2 -M の純化

人血漿を53℃, 5秒間加熱し急激に4℃に冷却し沈殿してきた fibrinogen を除きこの脱 fibrinogen 血漿を, Lysin agarose に通し affinity chromatography を行ない, 血漿中の plasmin, plasminogen および α_2 -M に吸着している plasmin を除いた. この血漿を4℃下にて, 0.85% NaCl 加磷酸緩衝液 (pH 7.5) を加え10倍に希釈し分子分画300,000の分子篩膜 (Ultrafiltration cell) [Amicon 社製] を用いて分子量 300,000 以上の血漿蛋白の濃縮を行ないこれを Sepharose 6B® カラムクロマトグラフィーによるゲル濾過を行なって void volume に溶出する α_2 -M fraction を採取した. この分画を再び同様の分画分子量の分子篩膜を用い濃縮を行なった. これを再度 Sepharose 6B カラムクロマトグラフィーによるゲル濾過を行なって, α_2 -M を精製した (図1). 得られた α_2 -M

Fig. 1 Preparation of plasma α_2 -Macroglobulin.

fraction は 3.25% ポリアクリドアミド, DISC ゲル電気泳動において単一ピークを示した. また溶出ピークの比活性は40倍以上となった.

2. α_2 -M agarose と凝固・線溶因子との反応

この純化精製 α_2 -M をシアンプロマイド (Br-CN) で活性化した agarose に結合させて α_2 -M agarose を作製し trypsin, urokinase, thrombin, plasmin を pH 7.5 にて反応させ検討した. 反応時間は3時間, 18時間に分け, 室温にて行なった. 溶出に用いた緩衝液は磷酸緩衝液を用いたが加えた塩濃度を0.14M, 1M, 2Mと変え溶出を行ない α_2 -M に対する吸着の強さを調べた (表1). trypsin は α_2 -M agarose と室温にて3時間反応後では 0.14M NaCl 加磷酸緩衝液にて溶出を行なったが, 全く回収されず, α_2 -M に吸着されていた. 1M以上の塩濃度の磷酸緩衝液では全量回収された. しかし18時間後では回収率は1/2以下となった. これは α_2 -

Table 1 α_2 -M agarose was made and reactions between trypsin, UK, thrombin and plasmin.

	S.T.h	+NaCl P.B.S.	0.14M	1M	2M
Trypsin	3		0	100	100
	18		0	40	50
UK	3		100	100	100
	18		98	98	98
Thrombin	3		0	20	20
	18		0	0	0
Plasmin	3		0	98	98
	18		0	50	50

S.T.h: Standing time hour
P.B.S: Phosphate buffer solution

M と trypsin の反応は長時間になると irreversible になるものと思われた。UK に対してはほとんど吸着は認められなかった。thrombin に対しては3時間後では、0.14M NaCl 加磷酸緩衝液で全く回収されず、1M NaCl 加磷酸緩衝液でも20%しか回収されずさらに塩濃度を上げて回収率の増加は認められなかった。18時間後では全く回収されなかった。plasmin に対しては、3時間後、0.14M加磷酸緩衝液では溶出されず、plasmin は α_2 -M に吸着されている、1M NaCl 加磷酸緩衝液ではほぼ100%溶出された。18時間後では1Mおよび2M NaCl 加磷酸緩衝液では回収率50%と低下しているが、対照とした plasmin のみの活性値の低下(約60% 18時間後)と近似していることより plasmin の失活によるものと思われた。 α_2 -M agarose を用いて thrombin との反応を行なった場合、不可逆的であったことより、この α_2 -M と thrombin との反応に注目し α_2 -M が thrombin との反応により構造に変化が起こる可能性が示唆された。

3. PAG 電泳による α_2 -M thrombin 複合体の検討

このことをさらに明確にするため、純化精製 α_2 -M と純化精製 thrombin を反応させた後、SDS ポリアクリドアミド DISC ゲル電気泳動

Fig. 2 SDS polyacrylamide electrophoresis in 3 per cent gel of:

- 1. Reacted α_2 -M after 1-hour incubation with thrombin.
- 2. Reacted α_2 -M after 2-hour incubation with thrombin.
- 3. Reacted α_2 -M after 3-hour incubation with thrombin.
- 4. Reacted α_2 -M after 5-hour incubation with thrombin.

を行なった(図2)。1は α_2 -M と thrombin とを37℃恒温槽にて1時間反応させた後電気泳動を行なったもの。2は α_2 -M と thrombin とを37℃にて2時間反応させたもの。3は同様にして3時間反応させたもの。4は5時間反応させたものである。この電気泳動で示すごとく時間の経過とともに α_2 -M は thrombin によって分断され4では3~4本のバンドに分断された。すなわち α_2 -M の構造に変化が起こり失活することが明らかになった。またこの1~4の検体を免疫学的に量的測定を行なったところ含有量の差は認められなかった。このことは α_2 -M が thrombin によって切断変性されながらも抗原性は残存していることを示すものである。 α_2 -M は plasmin に対しては可逆的に反応し⁴⁾,

thrombin に対しては不可逆的に反応する⁵⁾. *in vivo* では α_2 -M はこれらの酵素の間においての regulator として非常に重要なものと思われた.

4. Thrombin による α_2 -M plasmin 複合体の解離

そこでこれらの三者について、1つの酵素が異常に増加した場合、例えば DIC 症候群のように thrombin が多量に放出された場合を想定して実験を行なってみた. すなわち α_2 -M の plasmin inhibitor 作用の変化を 0.2% plasmin free fibrin 平板を用いて測定した. α_2 -M は 480 mg/dl, plasmin は 25U/ml を用いのおおの 25 μ l を 37°C 30分反応させた後それぞれに thrombin 50U/ml, 250U/ml, 500U/ml, それぞれ 25 μ l 滴下しこれらの各検体を 0.2% plasmin free fibrin 平板に滴下し 15時間 37°C 放置後溶解窓を測定した. またこれらの反応に用いた α_2 -M, plasmin, thrombin は精製したものを使用した (図 3). 1の平板は thrombin 50U/ml を加えたもの、2の平板は thrombin 250U/ml を加えたもの、3の平板は thrombin 500U/ml を加えたものである. 1の平板の溶解窓の面積に比べ2の平板の溶解窓の面積比は 6 倍となっていた. また 1, 2, 3 の各平板における α_2 -M 量を免疫学的一次元拡散法により測定したところ、量的な差異は認められなかった. この平板において最も注目すべきことは thrombin 量の増加にしたがい溶解窓の面積が著しく拡大することである. もちろん α_2 -M と plasmin の反応したものだけでは平板の溶解窓は非常に小さく、thrombin のみでは平板の溶解窓は認められない. すなわち thrombin 量の増加により、 α_2 -M の plasmin 抑制作用が消失し α_2 -M に吸着されていた plasmin が遊離され fibrin 平板を溶解してしまった. 3の平板では対照とした同濃度の plasmin のみの溶解窓とはほぼ同じであり

Fig. 3 Dissolution areas of 0.2% fibrin plate of:

1. Mixture of 480mg/dl α_2 -M, 25U/ml plasmin and 50U/ml thrombin.
2. Mixture of 480mg/dl α_2 -M, 25U/ml plasmin and 250U/ml thrombin.
3. Mixture of 480mg/dl α_2 -M, 25U/ml plasmin and 500U/ml thrombin.

α_2 -M の plasmin 抑制作用が全く消失してしまっている. このことは α_2 -M と thrombin がより強力に反応し不可逆的な変化を示し、そのためプラスミンを遊離したものである.

II. 考 察

α_2 -M は plasmin に対して短時間に反応し吸着し、また離す可逆的な反応形式を示すが、thrombin との反応は不可逆的な反応形式を示しその時 α_2 -M の構造に変化が起こり α_2 -M は分断され低分子化が起こるが抗原性は残存している. このように α_2 -M は plasmin および thrombin すなわち凝固・線溶系の両者にまたがる inhibitor であり regulator である. α_2 -M は thrombin に対しては非常に強力に反応し失活する. その時保持していた plasmin を遊離してしまう. このことは、例えば DIC 症候群のような病態の時著明な凝固亢進が起こり多量の thrombin が放出された場合、thrombin を強力に抑制するが、その時逆に保持していた plasmin を遊離し異常な線溶亢進を惹起し、出血傾向をさらに助長してしまうということは十

分想定されるものであろう。 α_2 -M は凝固・線溶系のホメオスターシスを維持するものとして非常に大きな役割を担っているものと思われる。

文 献

- 1) Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrback, K. (eds.): "The Enzymes", 3rd ed., Vol. 3, Academic Press, New York, 1971.
- 2) Rinderknecht, H. and Geokas, M. C.: On the physiological role of α_2 -macroglobulin. Biochim. Biophys. Acta, **295**; 233, 1973.
- 3) Norman, P.S. and Hill, B.M.: Studies of the plasmin system. J. Exp. Med., **108**; 639, 1958.
- 4) 五十嵐純子, 高塚 純, 柴 忠明, 竹内節夫: " α_2 -macroglobulin". 日血会誌, **41**; 589~596, 1978.
- 5) Igarashi, M., Takatsuka, J. and Asada, T.: Effects of α_2 -macroglobulin on DIC. Acta Heml. Jap., **41**; 1118~1122, 1978.
- 6) 高塚 純, 五十嵐純子, 竹内節夫, 栗津三郎, 他: 線溶と α_2 -macroglobulin. 第17回プラスミン研究会報告集, 名古屋, 1977.

●内科疾患のカルシウム代謝とその異常

カルシウムの臨床

編集 神戸大学内科教授 藤田拓男 専門医15氏分担執筆
B5判 365頁 図129 表78 定価9,800円 (〒240円)

カルシウムは人体のあらゆるところに存在し、あらゆる機能に関与する。したがって、内科疾患のすべてに密接に関連しており、内科学を理解するためにカルシウム代謝とその異常をまず知らなければならない。本書は内科疾患のあらゆる部分にわたってカルシウムの影を探し求め、カルシウムの臨床を通して内科学を再構成しようとしたユニークかつ野心的な試みの産物である。

●内容: 総論, 第1章 神経系疾患とカルシウム代謝異常, 第2章 心血管疾患とカルシウム, 第3章 腎疾患とカルシウム, 第4章 呼吸器疾患とカルシウム, 第5章 消化器疾患とカルシウム, 第6章 血液疾患とカルシウム, 第7章 内分泌疾患とカルシウム, 第8章 リウマチ様関節炎とカルシウム代謝, 第9章 膠原病および免疫アレルギー疾患とカルシウム, 第10章 物理的原因による疾患とカルシウム, 第11章 薬剤とカルシウム代謝異常, 第12章 老年病とカルシウム, 第13章 悪性腫瘍とカルシウム, 第14章 カルシウム代謝検査法, 索引