凝固の線溶におよぼす影響

高田 明和* 高田由美子*

Influence of coagulation on fibrinolysis

Akikazu TAKADA* and Yumiko TAKADA*

Key words: plasminogen, α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI), α_2 macroglobulin (α_2 M), tranexamic acid

Glu-plasminogen (Glu-plg) was better activated by urokinase (UK) in the presence of fibrin or tranexamic acid. Lys-plg was not influenced by their presence, and acid treated plg (A-plg) was less activated by UK in their presence. Inhibitory effects of α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI) on plasmin were counteracted by fibrin, tranexamic acid and α_2 macroglobulin (α_2 M). Since fibrin, tranexamic acid, and α_2 PI bind with lysine binding sites of plasminogen, there are competitions for these sites among α_2 PI, fibrin, and tranexamic acid.

はじめに

凝固と線溶とは密接な関係にある。われわれは最近凝固がおこると plasminogen の立体構造に変化がおこり, activator により活性化されやすくなることを示した¹⁾²⁾。今回は plasminogen の種々の type が凝固の際に urokinase (UK) により活性化される程度がいかに変化をうけるかを示す。

I. 方 法

1. Glu-plasminogen (Glu-plg): 保存血漿を透析後, aprotinin の存在下で lysine-Sepharose を通して得た。Casein unit は Robbins and Summaria の方法により計算した³⁾。

2. Plg I と plg II: plg I と plg II は 3×14 cm の lysine-Sepharose のカラムに Glu-plg をのせ, 6-aminohexanoic acid の 20mM までの直線濃度勾配で溶出した。2つの peak の内, 前に溶出したものを plg I とし, 後に溶出されるものを plg II とした。

3. 酸処理 plg (A-plg): A-plg は lysine-Sepharose より溶出に 0.1M の酢酸を用いて得たものである。

4. Lys-plg: Glu-plg を固相化 plasmin で活性化して作成した。

5. 各種 plg の分子量: SDS-gelelectrophoresis により Glu-plg は 93,000, plg I は 93,000, plg II は 89,000, Lys-plg は 86,000, A-plg は 86,000 と 62,000 の分子量をもつことが示され

* 浜松医科大学第二生理学教室 [〒431-31 浜松市半田町3600], Department of Physiology, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

Fig. 1 Effects of clot formation on the activation of various plasminogens by UK.

Fig. 2 Effects of α_2 PI and α_2 M on the activation of plasminogen by UK in the presence or absence of clot.

A Effects of various concentration of α_2 PI.

B Effects of the mixture of various concentration of α_2 PI and α_2 M.

C Effects of the mixture of various concentration of α_2 PI and 0.8 μ M of α_2 M.

た。

II. 結果と考察

(1) 0.1ml の plg (0.1casein unit: 0.1c.u.), 0.1ml のヒト fibrinogen (KABI, 0.6 mg), 0.05ml のヒト thrombin (0.5u) または buffer, 0.2ml の tris buffer を 0.5ml の S-2251 (100 μ g) と混合し、時間をおいて 1.5 ml の 50% 酢酸を加え、反応を止め、溶液中のプラスミン活性を合成基質 S-2251 を用いて測定した。図 1 はこの結果を示すもので、Glu-plg, plg I, plg II は凝固時の方が凝固のない時より UK により活性化され易い。A-plg はむしろ凝固時の方が活性化されにくくなる。一方、Lys-plg は凝固の存在と関係なく活性化された。

(2) 上記の混液の tris-buffer に種々濃度の α_2 PI, α_2 M, または両者を加え、凝固時のプラスミン活性に対する α_2 M, α_2 PI の作用をしらべた。

図 2 A は種々濃度の α_2 PI を凝固時、非凝固時に加え、Glu-plg より UK により活性化された plasmin の S-2251 水解能をしらべたものである。0.2 μ M の α_2 PI の存在下では凝固のない時 (non-clot) は plasmin 活性は完全に阻止される。一方凝固の存在時にはある程度 plasmin 活性があらわれ、凝固は α_2 PI の作用に拮抗することがわかる。これに種々濃度の α_2 M を加えたものが図 2 B である。 α_2 PI に種々濃度の α_2 M を加えていくと、たとえば 0.1 μ M の α_2 PI と 0.4 μ M の α_2 M の存在下では非凝固時もある程度の S-2251 水解を示す。 α_2 M にとり込まれた plasmin は S-2251 を水解する能力をもち、さらに α_2 PI などの inhibitor によりもはや阻害されなくなるので、この部分の活性は α_2 M にとり込まれた plasmin によると思われる。図 2 C は 0.8 μ M の α_2 M を α_2 PI の他に加えたもので、0.2 μ M の α_2 PI 存在の非凝固時にもある程度の plasmin 活性がみられる。すなわち α_2 M の濃度をませば α_2 PI と反応する plasminogen の量は減少する。凝固がおこればさらに α_2 PI の作用は少くなる。

(3) 図 3 は α_2 PI と tranexamic acid の拮抗

Fig. 3 Effects of various amounts of tranexamic acid on the activation of Glu-plasminogen by UK.

"0.02 μ M α_2 PI" indicates the hydrolysis of S-2251 in the presence of 0.02 μ M of α_2 PI. " α_2 PI(-)" indicates the hydrolysis of S-2251 in the absence of α_2 PI.

作用を示す。0.1ml の Glu-plg (0.1c.u.), 0.1 ml の UK (100u), 0.1ml の tranexamic acid, 0.2ml の α_2 PI 溶液 (0.02 μ M) を 0.5ml の S-2251 と混合、37 $^{\circ}$ C で 15 分間 incubate した。 α_2 PI のない所では Glu-plg は tranexamic acid の濃度をますとともに活性化されやすくなり、1mM の所で peak に達する。さらに tranexamic acid の濃度をますと、plg の活性化はやや抑制される。 α_2 PI の存在下では plasmin の作用は抑制されるが、1mM の tranexamic acid の存在下では抑制が少なく、plasmin の作用があらわれる。

以上の現象は plg の lysine binding site (LBS) の反応により説明されうる。Plg には 5 ~ 6 この LBS があり、Glu-plg の LBS に tranexamic acid や fibrin が結合すると Glu-plg は立体構造に変化をおこし、UK 等により非常に活性化され易くなる。一方 Lys-plg は tranexamic acid 等との結合で立体構造に変化をおこさない。A-plg は degradate した plg で、tranexamic acid 等が結合すると、むしろ UK により活性化されにくくなる。 α_2 PI も LBS に

より plg または plasmin と結合するので fibrin や tranexamic acid と拮抗する。

結 論

凝固時には Glu-plg は UK により活性化されやすくなり, Lys-plg は変化をうけず, A-plg はむしろ活性化されにくくなる。fibrin, tranexamic acid, α_2M は α_2PI の作用に拮抗する。

文 献

- 1) Takada, A., Ohashi, H., Matsuda, H. and Takada, Y.: Effects of tranexamic acid, cis-AMCHA, and 6-aminohexanoic acid on

the activation rate of plasminogen by urokinase in the presence of clot. *Thrombos. Res.*, **14**; 915~923, 1979.

- 2) Takada, A., Urano, T. and Takada, Y.: Influence of coagulation on the activation of plasminogen by streptokinase and urokinase. *Thrombos. Haemostas.*, **42**; 901~908, 1979.
- 3) Robbins, K.C. and Summaria, L.: Purification of human plasminogen and plasmin by gel filtration on sephadex and chromatography on diethylaminoethyl-sephadex. *J. Biol. Chem.*, **238**; 952~962, 1963.

●自分で実際にやれる手術書！

植 田 小 児 外 科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著

B 5 判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒240円)

101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768