原 著

慢性肉芽腫性炎症に伴う Urokinase 阻害因子の
組織内出現 : 局所 Fibrin の消長との関連から伊崎 誠一** Sanford M. GOLDSTEIN*
Kimie FUKUYAMA* William L. EPSTEIN*Tissue induction of a urokinase inhibitor associated with
chronic granulomatous inflammation : correlation with
local fibrin deposition and clearingSeiichi IZAKI**, Sanford M. GOLDSTEIN*,
Kimie FUKUYAMA* and William L. EPSTEIN*

Key words : proteinase inhibitors, urokinase, plasmin, fibrin
deposition, chronic inflammation

Both activation and inhibition of proteolysis are considered to regulate tissue reactions in inflammation. Present studies investigate inhibitors against fibrinolytic processes using synthetic chromogenic substrates in the extract of granulomatous tissue in schistosomiasis. Hepatic extracts prepared from schistosoma-infected mice demonstrated rapid, time dependent, stoichiometric and irreversible inhibition of urokinase ; extracts from noninfected mice, however, elicited negligible inhibition. A small amount of plasmin inhibition was shared by both noninfected and infected mice. Pattern of Sephadex G-200 gel-chromatography of an ammonium sulphate fraction illustrates two peaks exhibiting urokinase inhibition, distinguishing an antiplasmin peak. Apparent induction of urokinase inhibitors in the granulomatous tissue accounted for increase in the whole anti-fibrinolytic activity previously measured by lysis time assay of fibrin clots.

In frozen sections of the liver, fibrin was found to deposit on immature granulomas by use of immunofluorescence microscopy. However, deposited fibrin was cleared at the center of each lesions when granulomatous inflammation fully developed.

We postulate, therefore, that the proteinase inhibitor in tissue limits activation of the local fibrinolysis, and subsequently may regulate the development of chronic granulomatous inflammation.

* 米国加州大学サンフランシスコ校医学部皮膚科, Department of Dermatology, University of California School of Medicine, San Francisco, California, U.S.A.

** 岩手医科大学医学部皮膚科, Department of Dermatology, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Japan.

序 論

凝固系の活性化と病変局所の fibrin (Fn) 沈着が、遅延性過敏反応の発現にとって重要な病態生理学的役割を担うことを Colvin & Dvorak (1975) は強調している。著者等は遅延性過敏反応が病因の一端を担う¹⁾、慢性肉芽腫性炎症発現に伴う Fn の沈着、また引続く組織内の線溶活性化あるいは線溶阻害の動態について、マウスの住血吸虫感染症を用い研究を進めてきた²⁻⁵⁾。本稿では、組織内に新たに出現した urokinase (UK) 阻害物質に焦点をあて、これと病変の推移との関連を述べる。

I. 実験方法

マウス (BALB/c) に Manson 住血吸虫の幼虫を皮下注射した。感染または非感染マウスから肝を採取し、その一部から H & E 標本を作製し、他の一部から蛍光抗体法検索のため凍結切片を作製し、残りを生食または他の緩衝液とともに磨碎し組織抽出液を作製した。抽出液中の UK に対する阻害効果を Pyroglu-Gly-Arg-pNA を基質として用い測定した⁵⁾。同様に plasmin (PL) 阻害活性を H-Val-Leu-Lys-pNA を用いて測定した⁵⁾。また総合的な線溶阻害能を UK による Fn clot の溶解時間におよぼす延長効果によって測定した。この際阻害物質を加えない時の UK による control lysis time を 25 分になるよう、通常の測定法に比較して長くとしたが、測定精度に影響はなかった²⁾。組織中の Fn は抗マウス Fn 血清を用いて蛍光抗体法間接法により観察した⁴⁾。

II. 結 果

1) 慢性肉芽腫性炎症の成立および推移

H & E 標本の光顕的観察により、感染後 7～8 週より類上皮細胞肉芽腫(以下肉芽腫と略)の形成を認めた。10～14 週には類上皮細胞の数も増加し、病巣も最大に成長し、肝組織切片全体の 40% の面積を占めるようになった(図 2 A)。その後次第に縮小し、線維性組織に置き換えられていった¹⁾。

2) Urokinase 阻害物質

Fig. 1 Comparative gel-chromatography of hepatic extracts prepared from schistosome-infected and noninfected mice. An ammonium sulfate fraction (AS 40 ~70%) was applied on Sephadex G-200 column. The fractions (G-I, -II and -III) expressing antifibrinolytic activity by a clot lysis time method were further examined in quantitative assays by use of chromogenic substrates. Urokinase inhibitor activity was demonstrated only in G-II and G-III of infected mice representing 80% of recovery, but not in G-I or those of noninfected mice. Plasmin inhibition was, however, found in all peaks. Column size, 15×780mm; buffer solution, 0.05 M Tris-HCl+0.1M NaCl buffer (pH 7.4); volume of a fraction, 2.5 ml.

非感染マウスの肝抽出液は UK 阻害活性を表わさなかった。しかし感染 9～11 週後に同じ方法で得た抽出液は、著明な UK 阻害を示した(表 1 A)。UK 阻害の発現には、基質を加える前に UK と阻害物質を予じめ 5 分間混和しておく必要があった。この 5 分の間に阻害物質は UK と化学量論的に、進行性に、かつ恐らくは不可逆的に結合を進めることが、Ackerman-Potter の plot から明らかになった⁵⁾。

Table 1 Inhibition of urokinase and plasmin by hepatic extracts.

A) Urokinase inhibition assayed in Pyroglu-Gly-Arg-pNA amyolysis			
Noninfected	(n=8)	0	(CTA u/mg protein)
Infected for 9 weeks	(n=4)	5.6±0.7	"
Infected for 11 weeks	(n=6)	4.3±1.4	"
B) Plasmin inhibition assayed in H-Val-Leu-Lys-pNA amyolysis			
Noninfected	(n=3)	1.49±0.46	(×10 ⁻³ CTA u/mg protein)
Infected for 9 weeks	(n=3)	1.17±0.62	"
Infected for 11 weeks	(n=3)	2.18±0.80	"

A) Each 1.0 ml of tissue extracts was mixed with 0.1 ml of UK solution and set in a water bath (37°C) for 5 minutes. The mixture (0.1 ml) was then drawn and transferred in a cuvette containing 0.8 ml of 0.05M Tris-HCl buffer (pH 8.8) and 0.1 ml of the substrate solution. Concentration of para-nitro-aniline liberated by UK was continuously measured by A⁴⁰⁵ at 37°C. Final concentrations of UK and the substrate were 13.0 CTA u/ml and 0.12 mM, respectively. Concentration of the extract protein was ca. 1.45 mg/ml in the reaction mixture. Degrees of inhibition were expressed by units of UK, since inhibition was found stoichiometrical (ref. 5).

B) Each 0.5 ml of extracts was mixed with 0.5 ml of UK-activated plasmin and placed in an ice bath for 5 minutes. Then, 0.1 ml of the mixture was added to 0.8 ml of prewarmed 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 0.1 ml of the substrate solution. Final concentrations of plasmin and the substrate were 0.0142 CTA u/ml and 0.4 mM, respectively. Concentration of the extract protein was finally ca. 1.9 mg/ml. Measurements and expressions of inhibition were done in the same way as in A).

UK 阻害物質は40%飽和硫酸アンモニウム溶液中ではほとんど沈殿せず, 70%飽和溶液中で沈殿した²⁾³⁾. この沈殿を再溶解しSephadex G-200にて展開すると, UK 阻害はふたつのピークに観察され, PL 阻害のピークと区別できた(図1).

3) Plasmin (PL) 阻害因子

非感染マウス, および感染マウスから得た組織抽出液のいずれも, PL 阻害活性を表わしその差は有意とは言えなかった(表1B).

4) 線溶阻害活性の推移

組織抽出液中の線溶阻害活性を Lysis Time 法により各週毎に測定した結果, 阻害効果は肉芽腫形成と同時期の7~8週に上昇し, 9~12週に最大に達した. しかし肉芽腫が縮小するに先んじて13週以後は阻害活性を減じた(図2D).

5) Fibrin 沈着と消失

感染後7~8週に円形のFn沈着が, 同時期に生じてきた肉芽腫と一致した範囲に明らかに

観察できた. 肉芽腫のよく発達してくる9~10週になると, 一旦沈着したFnが肉芽腫の中心部において消失し, ドーナツ状のFn沈着像を形成した(図2B).

III. 討論ならびに総括

本疾患において類上皮細胞肉芽腫が成立するのに伴い, 一旦病巣に沈着したFnが消失し, かつFn消失と同時期に組織内の線溶阻害活性が上昇した. この時PL阻害活性の変動は明らかでなく, 観察された線溶阻害活性の上昇は, ある特徴的な性質を有するUK阻害物質の新たな出現によるものと解釈できる(図2C). このUK阻害物質は, 酵素に対し急速に化学量論的結合を行って不活化していくことから, in vivoにおいてUKと同じ作用をする plasminogen activator の働きを抑え, Fn除去機転にある段階で調節あるいは限定するのにきわめて都合の良い性質を持つように思われる.

本研究は, 慢性肉芽腫性炎症の成立におい

Fig. 2 Summary chart illustrating (A) size of granulomas, (B) fibrin deposition and lysis, (C) appearance of urokinase inhibitor, and (D) modulation of whole antifibrinolytic activity in schistosome-infected mice.

て、凝固・線溶系の活性化および阻害がかなり複雑に統御されながら、病巣形成に関与している可能性を強く示唆している。

文 献

- 1) Epstein, W.L., Fukuyama, K., Danno, K., and Kwan-Wong, E.: Granulomatous inflammation in normal and athymic mice infected with *Schistosoma mansoni*: An ultrastructural study. *J. Pathol.*, **127**; 207~215, 1979.
- 2) Izaki, S., Fukuyama, K. and Epstein, W. L.: Modulation of anti-thrombin and anti-fibrinolytic activities in tissue during the development of granulomas induced by *Schistosoma mansoni*. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26**; 507~514, 1979.
- 3) Izaki, S., Epstein, W. L. and Fukuyama, K.: Tissue proteinase inhibitor in epithelioid cell granulomas. *Proceedings for the 8th International Congress on Sarcoidosis and Other Granulomatous Diseases*, Cardiff, Wales, in press.
- 4) Izaki, S., Goldstein, S. M., Fukuyama, K. and Epstein, W. L.: Fibrin deposition and clearance in chronic granulomatous inflammation. Correlation with T-cell function and proteinase inhibitor activity in tissue. *J. Invest. Dermatol.*, **73**; 561~565, 1979.
- 5) Goldstein, S.M., Izaki, S. and Epstein, W. L.: Inhibition of plasminogen activator associated with chronic granulomatous inflammation. *Thrombos. Res.*, **16**; 727~735, 1979.