腹腔および肺胞マクロファージの非プラスミン性 線溶活性とプラスミノゲンアクチベーター活性

今井 英雄* 遠藤 英二* 有賀 豊彦* 沢井 洋子*
吉田真理子* 塩沢 和夫* 高折 雅章* 大柴 進*

Non-plasminic fibrinolytic enzyme coexisted with plasminogen activator in the peritoneal and alveolar macrophages

Hideo IMAI*, Eiji ENDOH*, Toyohiko ARIGA*, Hiroko SAWAI*,
Mariko YOSHIDA*, Kazuo SHIOZAWA*, Masaaki TAKAORI*
and Susumu OSHIBA*

Key words: macrophages, fibrinolytic activity, non-plasminic
fibrinolytic enzyme, plasminogen activator, fibrinolysis autograph

In the present study we observed that peritoneal and alveolar macrophages of mice produced non-plasminic fibrinolytic enzyme (NPFE) which was different from plasminogen activator (PA), and the activity of NPFE was enhanced when the macrophages were stimulated. The stimulation of macrophages was carried out by injecting heat killed *Corynebacterium anaerobium* into the abdominal cavity of mice, and the peritoneal and alveolar macrophages were harvested one week after, and then they were subjected to cultivation in the medium (RPMI-1640) containing 20% fetal calf serum for up to 96 hours. The fibrinolytic activity in macrophages were observed by the fibrinolysis autograph according to Todd and the released fibrinolytic activity in the medium was analysed by the polyacrylamide gel electrophoresis and the fibrin plate method.

The following results were obtained ;

1) The stimulated macrophages clearly demonstrated two types of fibrinolytic enzyme, one of which was NPFE, and the other was PA. The former lysed plasminogen-free fibrin, and its activity was inhibited with a specific non-plasminic fibrinolytic inhibitor, Boc-Try-Leu-Val-CH₂Cl (TLVCK). The later lysed plasminogen-rich fibrin and its activity were inhibited with t-AMCHA.

* 日本大学医学部第二生理〔〒173 東京都板橋区大谷口上町 30-1〕, Department of Physiology, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan.

2) The NPFE in cells became undetectable when cells were kept in culture medium, whereas PA was still present during cultivation.

3) The non-plasminic fibrinolytic enzyme activity was detected in the culture medium at the early cultivation phase, but tended to be undetectable at the late phase. On the other hand, the release of PA into the medium was observed to be retarded.

4) Both NPFE and PA in the macrophages were determined to be basic proteins, but they were an electrophoretically different entity.

はじめに

ラットの脾内の組織固定型マクロファージ(M ϕ)を *Corynebacterium anaerobium* (CA) によって活性化すると、細胞内に顕著な線溶活性が出現した¹⁾。この活性は *t*-AMCHA で抑制されないことから、非プラスミン性の脾臓線溶酵素 (SFP)²⁾ によるものと思われた。今回は、腹腔および肺胞中の遊離型 M ϕ の活性化に伴う非プラスミン性の線溶酵素 (NPFE) の産生、並びにその放出様式について plasminogen activator (PA) のそれと対比して検討した。

I. 実験方法

マウスの腹腔内に CA を投与し、1週後に腹腔および肺胞内より活性化 M ϕ を採取した。M ϕ の培養は 20% FCS 添加 RPMI-1640 液を用い、24~96 時間行った。M ϕ 中の線溶活性は Todd 法³⁾ によって検索した。細胞外の線溶活性については、培養液を濃縮した後に PAGE を行い、そのゲル中の線溶活性を fibrin plate 法⁴⁾ で測定した。線溶酵素の inhibitor としては、*t*-AMCHA および最近岡田ら⁵⁾ によって開発された TLVCK を用いた。

Fig. 1 Fibrinolysis autograph of the peritoneal macrophage by using plasminogen-free fibrin.

- a. the stimulated macrophages were covered with the fibrin film.
- b. the stimulated macrophages were covered with the fibrin film containing TLVCK. Both films were incubated at 37°C for 24 hours and stained with hematoxylin. (magnification; $\times 80$)

Fig. 2 Electrophoresis of the culture medium of stimulated macrophages, and the measurement of the gel slices. PA indicates plasminogen activator and NPFE does non-plasminic fibrinolytic enzyme.

II. 成績および考察

1. 腹腔および肺胞 Mφ 中の NPFE 活性

採取直後のマウスの活性化腹腔 Mφ について, plasminogen-free fibrin film を用い Todd 法を行った結果, 細胞に一致して明瞭な溶解窓の出現を観察した (図-1a). この線溶は, t-AMCHA で全く抑制されず TLVCK で強く抑制された (図-1b). 活性化肺胞 Mφ でも同様の結果を得た. 一方, SPF マウスから採取した腹腔および肺胞 Mφ 中には線溶活性は検出されなかった. 以上の成績は, Mφ が活性化されると細胞内に NPFE 活性が顕著に出現することを示している. この NPFE 活性は, 培養 24 時間以降では細胞中より消失した.

2. 活性化 Mφ 中の PA 活性

活性化腹腔 Mφ に plasminogen-rich fibrin film を用いて Todd 法を行うと, 明瞭な線溶活性が細胞に一致して出現した. この線溶は TLVCK では抑制されなかった. しかし, t-AMCHA によって強く抑制された. このことは, 活性化 Mφ に PA が存在することを示し

ている. この PA は 96 時間培養後でも細胞内に残存していた.

3. 培養液中の NPFE 活性および PA 活性

96 時間培養後の活性化腹腔 Mφ の培養液を pH 4.3 で PAGE を行った後, ゲル中の線溶活性を測定した (図 2). その結果 t-AMCHA で抑制されない線溶活性, すなわち NPFE (破線の部) に二つの peak を観察した. このことは, NPFE に電気易動度の異なる二種のものが存在することを示している. 斜線の部は PA 活性を示し, NPFE とほぼ同じ位置に二つの peak が認められた.

III. 結 論

マウスの腹腔および肺胞 Mφ は, CA によって活性化されると細胞内には PA と NPFE が顕著に出現した. PA は, 培養時間の経過に伴って細胞外に緩徐に持続的に放出され, NPFE は培養初期に急速に大量に放出された. この PA および NPFE は共に塩基性蛋白であり, いずれも電気易動度の異なる二種のものより成り立っていることが証明された.

文 献

- 1) 今井英雄, 遠藤英二, 有賀豊彦, 沢井洋子, 塩沢和夫, 明石喜久, 大柴 進: ラット脾臓中のフィブリン分解活性の組織内局在について, 血液と脈管, **13**(3); 28~31, 1982.
- 2) Okamoto, U., Nagamatsu, Y. and Amemiya, T.: Human spleen insoluble fibrinolytic proteinase acting at neutral pH: Its partial purification and characterization. *Thromb. Haemost.*, **45**(2); 180~185, 1981.
- 3) Todd, A.S.: Fibrinolysis autographs. *Nature*, **181**; 495~496, 1958.
- 4) Asturup, T. and Permin, P.M.: Fibrinokinase and fibrinolytic enzyme. *Nature*, **161**; 689, 1948.
- 5) Okamoto, U., Nagamatsu, Y. and Okada, Y.: A new polypeptide substrate, Suc-Tyr-Leu-Val-PNA, specific for spleen fibrinolytic proteinase (SPF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**(1); 28~32, 1982.