ウロキナーゼの腸管吸収と血中線溶活性化

須見 洋行* 丸山 真杉* 赤澤 憲治* 美原 恒*

Gastrointestinal absorption of urokinase and
activation of plasma fibrinolysisHiroyuki SUMI*, Masugi MARUYAMA*,
Kenji AKAZAWA* and Hisashi MIHARA*

Key words: intrarectal administration, urokinase, urokinase derivative,
intestinal absorption, plasma fibrinolysis

Following intrarectal administration of high molecular weight urokinase (HMW-UK; mol. wt. 53,000, 124,000 IU/mg protein) or its functionally-active heavy chain (H-chain UK; mol. wt. 31,800, 212,000 IU/mg protein) to mice, prolonged activation of plasma fibrinolysis was observed. The plasma levels of pyro-Glu-Gly-Arg-pNA amidolytic and euglobulin fibrinolytic activities reached a maximum (42.8 ± 5.6 nmoles/ml and 10.6 ± 7.1 mm/0.03 ml, respectively) at 1 to 2 hr after the administration of 300 IU of either enzyme per mouse. Thereafter, both activities declined slowly. Absorption of the UK was confirmed by pooling the fractions which were eluted by 6 M urea buffer following [N^{α} -(ϵ -aminocaproyl)-DL-homoarginine hexylester]-Sepharose affinity chromatography. Although the eluted fractions were shown to form a precipitation arc with appropriate antisera by immunodiffusion, the neutralization was not complete and approximately 40% of the activity remained. Activation of plasma fibrinolysis may not be due only to UK absorption but also be related to some enzyme indirectly released.

はじめに

ウロキナーゼ(UK)の経口投与が試みられ、人工血栓の犬¹⁻³⁾の他、臨床²⁻⁴⁾でも線溶効果が

認められつつあるが、その機序は未だ明確でない。今回、われわれは分子構造の異なる二種のUKをマウス直腸内に投与し、その血中凝固線溶系への影響とUKの腸管吸収について検討し

* 宮崎医科大学第二生理〔〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町木原 5200〕, The Second Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan.

た。

I. 方 法

HMW-UK (MW 53,800 ; 124,000 IU/mg 蛋白) とその分子内 active H 鎖, H chain UK (MW 31,800 ; 212,000 IU/mg 蛋白) の調整は既報⁵⁾ のように行った。各 UK (300 IU) を 2.5 mg のムチン (和光) を含む 0.5 ml 生食に溶解し、マウス (ddY ♂, 19-22 g) 直腸内に投与した。線溶活性を pyro-Glu-Gly-Arg-pNA 分解⁶⁾ および標準フィブリン平板法⁷⁾ で調べた。血液凝固系は常法に従い、また血中 plasminogen activator (PA) の分離⁸⁾ および UK の免疫学的実験⁹⁾ はすでに報告した方法で行った。

II. 成 績

両 UK 群で、共に投与 1 ~ 2 時間後に強い血漿アミド分解活性 (42.8 ± 5.6 nmoles/ml) および euglobulin 分画のフィブリン分解活性 (10.6 ± 7.14 mm/0.03 ml) の亢進が認められ、その効果は長時間続いた (表 1)。また投与 1 時間後のマウス血漿を集め affinity chromatography で分離した血漿 PA 活性を調べた。対照群 (生食) に比べて UK 投与群で回収される PA 活性の高いこと (マウス血漿量を 1 ml として約 10 IU 含む) がわかった。さらに同 PA は免疫拡散法で、家兎の抗 HMW-UK および抗 active H 鎖 (56°C, 30分処理) と反応し、おのおの一本の沈降線を示すことが確認された。しかし同抗血清の線溶活性 (標準フィブリン平板法) に対する抑制効果は完全ではなく (約 40% の活性残存) (図 1), PA 分画中に UK と免疫学的に異なる他の線溶酵素も含まれることが予想された。一方、直腸投与による UK の凝固系因子への影響を調べたが APTT (21 ± 4 S) および Re Ca⁺⁺ T (87 ± 34 S) で共に変化は認められなかった。

III. 考察と結論

UK の腸管吸収のありうることおよびその際生じる血中線溶活性化に UK と異なる PA も関与するらしいことがわかった。UK の吸収率は約 3 % 以下と計算されるが、従来の各種プロ

Table 1 Measurement of enzyme activities in mouse plasma following intrarectal administration of HMW-UK and H-chain UK

	Amidolytic activity 1) (nmole)	Fibrinolytic activity 2) (mm ²)
Normal	33.1 ± 4.6	0.7 ± 1.5
Control (hrs)		
1	32.9 ± 4.9	0.6 ± 1.5
2	32.2 ± 4.2	1.1 ± 2.2
4	32.8 ± 4.5	0.5 ± 1.1
HMW-UK administration (hrs)		
1	42.8 ± 5.6**	10.6 ± 7.1**
2	36.2 ± 6.2	9.3 ± 7.8*
4	36.3 ± 5.1	2.0 ± 2.4
H-chain UK administration (hrs)		
1	42.2 ± 8.5	9.1 ± 5.5**
2	41.1 ± 6.5**	10.9 ± 9.4*
3	38.2 ± 6.5	3.9 ± 4.7

Each value represents the mean ± S.E. Significant difference from normal range, which was estimated from 13 animals: *p ≤ 0.01, **p ≤ 0.001. Each time period (hrs) represents the blood collection time after UK administration.

- 1) Amidolytic activity in IU/ml was determined by adding 0.2 ml of each plasma to 3×10^{-4} M S-2444 substrate.
- 2) Fibrinolytic activity with 0.03 ml euglobulin was represented by the lysis area (mm²) of the standard fibrin plate.

テアーゼ類¹⁰⁻¹⁴⁾ に比べるとかなり高率である。また二種の UK で効果に差のないこと、および各酵素の構造の違い^{5,9)} を考え合わせると、UK の L 鎖にあると考えられる fibrin-binding site はこうした間接的な線溶効果にはあまり関係ないように思われる。一方では最近、セラチアプロテアーゼ、トリプシンが熱傷時に逆の効果 (抗線溶能) を示すといった報告もあり¹⁵⁾、今後酵素の特異性と作用機序の違いについてをより詳しく検討したいと思っている。

Fig. 1 Inhibitory effects of anti HMW-UK and anti H-chain UK sera on the fibrinolysis of affinity eluates prepared from UK administered mouse plasma.

Equal amounts of the several diluted antisera and urokinase solution (200 IU/ml) were mixed, and 50 μ l portions of the mixtures were used for the estimation of fibrinolysis (standard fibrin plate method).

文 献

- Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K. and Robbins, K.C.: Oral administration of urokinase. *Thromb. Res.*, **20**: 10~23, 1980.
- Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K. and Robbins, K.C.: Oral administration of high molecular weight urokinase in human subjects and in an experimental dog model. *Progress in Fibrinolysis*, Vol. V. ed. Davidson, J.F., Nilsson, I.M. and Astedt, B., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981, p. 439~440.
- Robbins, K.C., Sumi, H., Sasaki, K. and Toki, N.: The transport of high molecular weight human urinary urokinase across the intestinal tract of dogs and human subject. *Urokinase: Basic and Clinical Aspect.* ed. by Mannucci, P.M. and Angelo, A.D., Academic Press, London, 1982, p. 63~71.
- 安部 英, 風間睦美, 木下忠俊, 内藤 巖, 大串利弘, 吉村祐一, 照尾 純, 清水直容: 経口ウロキナーゼ投与時における生体線溶系の動態——二重盲検交叉法による検討——. *血液と脈管*, **13**: 472~479, 1982.
- Sumi, H. and Robbins K.C.: A functionally active heavy chain derived from human high molecular weight urokinase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 8014~8019, 1983.
- Claeson, G., Friberger, P., Knos, M. and Erikson, E.: Method for determination of prekallikrein in plasma, glandular kallikrein and urokinase. *Haemostasis*, **7**: 76~78, 1978.
- Astrup, T. and Millertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**: 346~351, 1952.
- Sumi, H., Kosugi, T., Matsuo, O. and Mihara, H.: Physicochemical properties of highly purified kidney cultured plasminogen activator (single chain urokinase). *Acta Haem. Jap.*, **45**: 119~128, 1981.
- Sumi, H., Toki, N., Maehara, S., Kosugi, T., Akazawa, K., Matsuo, O. and Mihara, H.: Immunochemical studies of high and

- low molecular forms of urokinase. *Acta Haematol. Basel*, **67**; 263~267, 1982.
- 10) Kabacoff, B.L., Wohlman, A., Umhey, M. and Avakian, S.: Absorption of chymotrypsin from the intestinal tract. *Nature, London*, **199**; 815, 1963.
- 11) Katayama, K. and Fujita, T.: Studies on biotransformation of elastase. II. Intestinal absorption of ^{125}I -labeled elastase in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **288**; 181~189, 1972.
- 12) Popp, M., Feher, S., Folly, G. and Horvath, E.J.: Absorption of pancreatic lymphatics. *Experientia*, **33**; 1191~1192, 1977.
- 13) Fink, E., Dietl, I., Seeifert, J. and Fritz, H.: Studies on the biological functions of glandular kallikrein. *Kinins II, Systemic Proteases and Cellular Function.* ed. Fujii, S., Moriya, H. and Suzuki, T., Plenum Press, New York, 1980, p. 261~274.
- 14) Miyata, K., Hirai, S., Yashiki, T. and Tomoda, K.: Intestinal absorption of Serratia protease. *J. Appl. Biochem.*, **2**; 111~116, 1980.
- 15) Kakinuma, A., Moriya, W., Kawahara, K. and Sugino, H.: Repression of fibrinolysis in scalded rats by administration of Serratia protease. *Biochem. Pharmacol.*, **31**; 2861~2866, 1982.

●内科と眼科の統合による成果!

糖尿病性網膜症

編集 東北大学内科教授 後藤由夫

琉球大学眼科教授 福田雅俊

専門医37氏分担執筆

A 5 判 355頁 図92 表86 原色10 定価7,800円(〒200円)

今世紀初頭、糖尿病は死の病気であったが、インスリンや抗生物質が発見されて、寿命は飛躍的に延長した。しかし、寿命の延長によって新たな問題が起こってきている。それは慢性合併症（眼・腎・神経障害など）である。とくに糖尿病性網膜症による失明は近年大きな問題となり、世界的に大規模な研究が進められている。ここに内科、眼科の専門医が従来の研究をまとめ、治療法、発症の防止法を一書に論じたのが本書である。

●内容：第1章 糖尿病性網膜症の頻度、第2章 網膜症患者にみられる病態、第3章 内科的諸条件と網膜症の発生と進展、第4章 糖尿病性網膜症の分類、第5章 糖尿病性網膜症の診断と予後、第6章 糖尿病性網膜症の発生病理、第7章 眼局所状態と網膜症との関係、第8章 糖尿病患者の網膜電図、第9章 Diabetic maculopathy の実態について、第10章 糖尿病の治療と網膜症、第11章 糖尿病性網膜症の内科的治療、第12章 糖尿病性網膜症による視覚障害者のリハビリテーション、第13章 網膜光凝固療法による網膜症の治療。