原 著

牛眼球の硝子体および房水における
プラスミノゲン・アクチベーター
の活性および局在について

林 研* 中島 豊* 居石 克夫* 田中 健蔵*

Fibrinolytic activity and localization of plasminogen
activator in bovine vitreous body and aqueous humor

Ken HAYASHI*, Yutaka NAKASHIMA*,
Katsuo SUEISHI* and Kenzo TANAKA*

Key words : plasminogen activator, PA inhibitor, immunohisto-
chemistry, vitreous body, aqueous humor

We studied the fibrinolytic activity, amount and localization of plasminogen activator (PA) in bovine vitreous extract (VE) and aqueous humor (AH). Fibrinolytic activity of VE and AH was quenched by adding anti-human t-PA IgG, but not by anti-human HMW u-PA IgG. After SDS electrophoretic analysis, enzymographic distributions of PA in VE and AH were detected at about Mr. 66 K and 110 K. These findings suggested the fact that the main PA in VE and AH was t-PA. Estimating fibrinolytic activity of VE and AH by amidolytic assay, activity was 0.12 ± 0.10 IU/ml ($n=10$) in VE and 0.04 ± 0.07 IU/ml ($n=10$) in AH. Measuring the amount of t-PA by RIA, t-PA was 4.1 ± 0.9 ng/ml ($n=10$) in VE, and 3.3 ± 0.8 ng/ml in AH. Investigating the PA activity by Todd's fibrinolysis autography, clear lytic areas could be seen on the small vessels of the iris, and the subepithelial stroma and along the endothelium of the cornea. In immunohistochemical studies using anti-human t-PA IgG, vascular endothelial cells and corneal epithelial cells showed the positive reactivity.

* 九州大学医学部第一病理学教室〔〒812 福岡市東区馬出3-1-1〕, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

はじめに

眼球内硝子体および房水の線溶活性は、低いとされている¹⁾。しかし、各種の眼球内炎症に際し、フィブリンの折出がみられるが、早期に溶解され、さらに眼球内出血においても blood clot は形成されることが少なく、眼球内における線溶現象の重要性は明らかである。

そこで、今回われわれは、牛眼球の硝子体および房水におけるプラスミノゲン・アクチベーター (PA) 活性及び濃度を測定し、さらにその由来を検討するうえで、PA の局在を検索した。

I. 材料および方法

屠殺後1時間内の牛眼球より房水および硝子体を採取し、4℃に保った状態で、房水は×15000 g、30分、硝子体は×10000 g、60分遠沈して、その上清を材料とした。さらに沈査より、IMN H₄SCN にて抽出し残余活性を測定したが、それぞれの PA 活性量の5%以内であった。

それぞれの PA 活性は、フィブリン・プレート法および合成基質 S-2251 を用いた Wiman の Amidolytic Assay²⁾ により測定した。さらに抗原量は、ラクトペルオキシダーゼ法にてラベルした ¹²⁵I-抗ヒト組織 PA³⁾⁴⁾ 家兎 IgG を用いて、ラジオイムノアッセイ法にて測定した。抗ヒト組織 PA 家兎 IgG のウシ PA に対する交叉性は、充分に高く、ウシ PA の定量として、ほぼ類似した値を示すと考えられた。

PA の分子量測定には、10% SDS ポリアクリルアミド電気泳動後、Fibrinolysis enzymography を行ない、その溶解巣より算出した。また、Reverse fibrinolysis enzymography を行ない、未結合の PA インヒビターの存在も検討した。

また同様の眼球より採取した組織を、アセトン・ドライアイスにより凍結し、凍結切片をえた。一部の凍結切片は、眼球組織の線溶活性の局在を検索するために、Todd の Fibrinolysis autography⁵⁾ を施行した。さらに一部の凍結切片は、30分間アセトン固定後、前記の抗体

を、更に Affinity Chromatography を用いて精製した Monospecific 抗ヒト組織 PA IgG を用いて、酵素抗体間接法 (ビオジン・アビジン法)⁶⁾ を行ない、組織 PA の局在を検討した。

II. 結果

1. 線溶活性

i) フィブリン・プレート法

フィブリン・プレート法によると、硝子体中には、約 0.15 IU/ml の線溶活性が認められた。房水中には線溶活性が低く溶解巣として認めえなかった。

ii) Amidolytic assay

合成基質を用いた Wiman らの方法で活性を測定すると、硝子体中には 0.12 ± 0.10 IU/ml ($n=10$)、房水中には 0.04 ± 0.01 IU/ml ($n=10$) の線溶活性が認められた (表1)。活性は可溶性フィブリンの存在下で促進された。硝子体抽出物および房水を、抗ヒト組織 PA 家兎 IgG (17 μ g/ml) と反応させると、その線溶活性は抑制されたが、抗ヒトウロキナーゼ家兎 IgG (17 μ g/ml) と反応させても抑制されなかった。

2. 抗原量

ラジオイムノアッセイ法によると、硝子体中に 4.1 ± 0.9 ng/ml ($n=10$)、房水中に 3.3 ± 0.8 ng/ml ($n=10$) の組織 PA の抗原量が認められた (表2)。前記のように、抗ヒト組織 PA IgG のウシ PA に対する交叉性は充分であるが、ウシ組織 PA の定量として、やや低値を示している可能性も考えられた。抗原量に比し、両者の活性発現は弱く、PA インヒビターの存在する可能性が示唆された。

3. 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の、Fibrinolysis enzymography によると硝子体、房水共に組織 PA と思われる66Kと、組織 PA-PA インヒビター複合体と思われる約 110 Kの部分に、活性の分布が認められた。Enzymography に用いるフィブリン膜に抗ヒト組織 PA 家兎 IgG (25 μ g/ml) を混ぜておくと活性は抑制されたが、抗ヒトウロキナーゼ家兎 IgG (25 μ g/ml) では抑制されなかった。Re-

Table 1 Fibrinolytic Activity by Chomogenic Assay

Vitreous body (n=10)									
V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀
0.10	0.13	0.10	0.13	0.12	0.14	0.12	0.10	0.10	0.12
0.12±0.01 IU/ml (Mean Value±S.D.)									
Aqueous humor (n=10)									
A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀
0.06	0.03	0.03	0.05	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04	0.02
0.04±0.02 IU/ml (Mean Value±S.D.)									

Table 2 Concentration of Tissue-Plasminogen Activator by RIA

Vitreous body (n=10)									
V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀
4.8	4.8	4.2	3.0	2.8	2.8	5.0	4.7	4.8	3.0
4.1±0.9 ng/ml (Mean Value±S.D.)									
Aqueous humor (n=10)									
A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀
4.0	4.0	4.0	2.7	2.7	4.0	4.0	4.0	2.5	3.0
3.3±0.8 ng/ml (Mean Value±S.D.)									

verse fibrinolysis enzymography を施行すると、フィブリン膜はすべて溶解し、未結合の PA インヒビターは認められなかった。上記の実験より、硝子体ならびに房水に存在する PA の主体は、組織 PA と考えられた。Enzymography にて高分子量、低分子量ウロキナーゼに相当する活性バンドは認められず、また抗ヒトウロキナーゼ家兎 IgG (25 µg/ml) にても 66 K, 110K のバンドの活性に影響を与えなかったことから、ウロキナーゼの存在を明らかにしえなかった。

4. 組織における線溶活性の局在

凍結切片を用い、Todd の Fibrinolysis auto-graphy を行なうと、虹彩および毛様体の血管に明らかな溶解窓が認められた。溶解窓は反応時間に比例して拡散していくのがみられた。大血管の明らかな溶解窓に比し、毛様体の毛細血管の溶解は明らかでなかった。また角膜においては、上皮下実質および内皮に沿って溶解窓が認められた。共に、上皮および内皮より下方に

向かって、反応時間に従って溶解窓は拡散していた。さらに上皮より上方に向かった溶解は認められなかった。また、上皮の剥離した部分では、溶解は上方にも拡がっており、線溶活性の拡散は上皮によりとどめられていることが観察された。

5. 組織における組織 PA の局在

酵素抗体間接法を用いて、組織 PA の局在を検索すると、虹彩および毛様体の血管内皮細胞の胞体内に反応が認められた。毛細血管も明らかな染色性を示した。また、角膜においては、やや弱いながらも、角膜上皮、特に顆粒層に明らかにその反応が認められた。さらに、凍結切片においてはその保存が困難ながらも、残存した角膜内皮細胞内に陽性反応が認められた。

III. 考 按

眼球内硝子体および房水中に弱い線溶活性が存在することは以前より明らかにされている。

る¹⁾。今回、われわれは硝子体および房水中に PA が存在することを認め、さらに、その PA の主体は組織 PA であることを明らかにした。ウロキナーゼの存在は明らかにしえなかった。さらに、抗原量と線溶活性の差や、活性の分子量の推定より、PA インヒビターの存在も示唆された。ただし、Reverse fibrinolysis enzymography の結果からは、未結合の PA インヒビターの存在は認めえなかった。以上より、眼球内においては、PA インヒビターは、ほとんどが、PA-PA インヒビター複合体をつくって存在していることが考えられた。このように、血中と対照的に、眼球内において、PA が、PA インヒビターに対し優位の状態に傾むいていることは、房水ならびに硝子体の凝固・線溶系の動態を解析するうえで重要であると考えられた。

また、眼球内溶液中の PA の由来に関しては、組織学的検索の結果より、虹彩および毛様体の血管内皮細胞ならびに角膜内皮細胞における産生が推定されたが、さらに今後の検索が必要と考えられた。

文 献

1) Pandolfi, M. and Kwaan, H.C.: Fibrinolysis

in the anterior segment of the eye. Arch. Ophthalmol., **77**; 99~104, 1967.

- 2) Wiman, B., Mellbring, G. and Randy, M.: Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. Clonica Chimica Acta, **127**; 279~288, 1983.
- 3) Sueishi, K., Nanno, S., Okamura, T., Inoue, S. and Kenzo, T.: Purification and characterization of human kidney plasminogen activator disimilar to urokinase. Biochim. Biophys. Acta, **717**; 326~327, 1982.
- 4) Sueishi, K., Kenzo, T.: Purification and characterization of human kidney and vascular plasminogen activators disimilar to urokinase. Haemostasis, **11** (Suppl. 1); 5, 1982.
- 5) Todd, A.S.: The histochemical localization of fibrinolysis activator. J. Pathol. Bacteriol., **4**; 569~578, 1985.
- 6) Hsu, S.M., Rain, L. and Franger, H.: The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and immunoperoxidase techniche.: A comparison between ABC and unlabelled (PAP) procedure. J. Histochem. Cytochem., **27**; 1131~1139, 1981.

●葉酸研究の完全なる集大成！

葉 酸 — 基礎と臨床

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀
専門医18氏分担執筆

A5判 484頁 図172 表104 定価9,800円(〒300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