家兎頸静脈血栓モデルによる
Pro-Plasminogen Activator の血栓溶解能

板東 博志* 岡田 清孝* 上嶋 繁*
菊池 啓* 酒井 鉄博* 松尾 理*
田中 憲次** 塚田 稔** 伊賀 善郎** 有村 博文**

Thrombolytic effect of pro-plasminogen activator in
a rabbit jugular vein thrombosis model

Hiroshi BANDO*, Kiyotaka OKADA*, Shigeru UESHIMA*,
Hiraku KIKUCHI*, Tetsuhiro SAKAI*, Osamu MATSUO*,
Kenji TANAKA**, Minoru TSUKADA**, Yoshio IGA** and
Hirofumi ARIMURA**

Key words: pro-plasminogen activator, urokinase, fibrinolysis,
fibrinogenolysis, thrombosis model

The thrombolytic effect of proform of urinary plasminogen activator (Pro-PA) was examined in the rabbit using a jugular vein thrombosis model. Infusion of a low dose (120,000 IU/kg) of either urokinase (UK) or Pro-PA did not produce any significant thrombolysis. However, UK administration at such a dose caused 20% degeneration of circulating fibrinogen. A high dose (480,000 IU/kg) caused significant thrombolysis. The degree of fibrinogenolysis was about 20% in Pro-PA, but about 80% in UK. The thrombolytic efficiency, which is obtained by the ratio of fibrinolysis (thrombolysis) per fibrinogenolysis, was higher in Pro-PA than that of UK. Analysis of fibrinolytic parameters such as plasminogen, α_2 -plasmin inhibitor etc. suggested that UK caused systemic activation of the fibrinolytic system, but Pro-PA, locally limited activation on the fibrin surface (fibrinolysis). These results indicate that Pro-PA represents a highly efficient thrombolytic agent without producing fibrinogenolysis.

* 近畿大学医学部第二生理〔〒589 大阪府南河内郡狹山町西山〕. Department of Physiology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan.

** ミドリ十字中央研究所, Central Laboratory, Green Cross, Co. Ltd., Osaka, Japan.

はじめに

尿または腎細胞培養液より精製された urokinase (以下 UK) は, fibrin に対する親和性が低いため, 少量投与では血栓溶解効果が低く, また大量投与により全身線溶活性化による副作用が危惧されている¹⁾²⁾. UK の前駆体である pro-plasminogen activator (以下 Pro-PA) は, UK と類似性を有しながらも一本鎖であるため fibrin 親和性が高く, 組織性 plasminogen activator (以下 t-PA) 様の作用が期待されている所である. 本研究では, このような Pro-PA を用いて家兎頸静脈血栓モデルにおいて, 血栓溶解効果を検討した.

I. 材料と方法

ヒト腎細胞を無血清下で培養し, 得られた培養液を抗 UK IgG-Sepharose により精製 (Lot. TL 009) し, 以下の実験に用いた³⁾. 家兎を Nembutal 麻酔下にて頸静脈部分を側枝 1 本を残し約 4 cm 周辺組織から剝離し, 血栓作製部

位に予め羊毛糸を通しておいた. 側枝にカテーテルを挿入し, 羊毛糸刺入・刺出部にクランプをかけ, 内腔の残存血液をカテーテルから除去し, 生食で内腔を洗浄した. ¹²⁵I-fibrinogen をヒト新鮮血液と混和させ, 頸静脈内部で thrombin-CaCl₂ 液により凝固させ, 血栓モデル⁴⁾とした. 血栓溶解率は, 血栓形成時に血栓内に取り込まれた ¹²⁵I-fibrinogen の放射活性と実験終了後に摘出した血栓内部の放射活性の比率から求めた. 尚, 放射活性の回収率は血栓部分以外に甲状腺 (実験前に NaI を投与した), 肺, 尿, 血液, 組織液等に分布する放射活性から算出した. Pro-PA の対照として UK を用い, また全体のコントロールとして 1% albumin 液を用いた. 投与方法は全体の 1/10 量を one shot で, 残りを 4 時間の点滴静注で投与した. 血液サンプリングを投与開始前, 以後 1 時間毎に 6 時間まで行い, fibrinogen, plasminogen, α_2 -plasmin inhibitor, FDP, plasmin 活性を測定した.

Table 1 Thrombolysis and recovery of isotope after infusion of Pro-PA or UK in rabbits with jugular vein thrombosis.

Dose Agents	Low dose ¹⁾		High dose ²⁾		Solvent
	UK	Pro-PA	UK	Pro-PA	
n	5	5	5	5	5
Thrombolysis (%)	14.6	15.9	32.2	30.6	15.5
SEM	6.2	3.1	10.0	7.2	4.0
Isotope Recovery (%)	100.0±5.6	95.0±2.5	97.5±3.7	95.4±1.1	92.9±3.5

1) 120,000 IU/kg, 2) 480,000 IU/kg.

Table 2 Degree of fibrinogenolysis after infusion of Pro-PA, UK or solvent in rabbits with jugular vein thrombosis.

Time (hr)	Low dose ¹⁾		High dose ²⁾		Solvent
	UK	Pro-PA	UK	Pro-PA	
0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
1	90±3	97±2	60±5	88±3	97±1
2	85±4	94±3	39±5	84±2	101±2
3	79±4	99±1	23±5	80±4	105±4
4	79±8	98±2	15±4	79±2	106±4
5	76±8	102±7	17±4	79±5	112±3
6	80±8	110±4	24±5	78±5	116±5

1) 120,000 IU/kg, 2) 480,000 IU/kg

II. 結 果

1% albumin 溶液投与の場合、血栓溶解率は $15.9 \pm 3.1\%$ ($n=5$) であった。Pro-PA 120,000 IU/kg の投与で $14.6 \pm 6.2\%$ ($n=5$) と 1% Albumin 溶液の投与と有意差が認められなかった。投与量を 480,000 IU/kg にした場合、Pro-PA では $30.6 \pm 7.2\%$ ($n=5$) および UK で $32.2 \pm 10.1\%$ ($n=5$) であった (表 1)。この際、血漿中の fibrinogen の分解率は Pro-PA では 20%, UK では 80% 以上であった。

以上より血栓溶解特性⁵⁾を算出すると 480,000 IU/kg で UK が 0.42 であったのに対し、Pro-PA が 1.39 と約 3 倍高値を示した。また UK 480,000 IU/kg 投与では、血漿中の plasminogen の活性化や α_2 -plasmin inhibitor の消費も進み、FDP や plasmin 活性も高値を示した。

III. 考 察

実験的血栓モデルによる Pro-PA 血栓溶解能を比較した。Pro-PA は fibrin 親和性が UK より高い³⁾⁶⁾ 為に高血栓溶解能が予想されたが、本実験条件下では Pro-PA と UK とでは差が認められなかった。これには実験的血栓モデル (例えば文献 7~10) 作製時の条件 (自家血使用の有無, CaCl_2 使用の有無, さらに使用する血管・臓器の特性など) が関与していると思われる。特に本実験では、血栓局所への血流が頸静脈の血栓作製操作による収縮のためかなり低下していた (外径の狭小化が観察された) ことが原因の 1 つに考えられる。しかし、fibrinogen の分解率は UK の方が 4 倍も高く、Pro-PA は fibrinogen 分解を惹起しない事より t-PA 様の作用¹¹⁾¹²⁾を持ち、有効な血栓溶解剤と考えられた。

文 献

- 1) Hanaway, J., Torack, R., Fletcher, A.P. and Landau, W.M.: Intracranial bleeding associated with urokinase therapy for acute ischemic hemispherical stroke. *Stroke*, **7**; 143~146, 1976.
- 2) Matsuo, O., Mihara, H. and Rokushima, Y.:

Assessment of the thrombolytic effect of low urokinase concentrations. *Acta Haematol. Jpn.*, **39**; 298~305, 1976.

- 3) Kasai, S., Arimura, H., Nishida, M. and Suyama, T.: Thrombolytic properties of an inactive proenzyme form of human urokinase secreted from human kidney cells. *Cell Str. Funct.*, **10**; 151~159, 1985.
- 4) Collen, D., Strassen, J.M. and Verstraete, M.: Thrombolysis with human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in rabbits with experimental jugular vein thrombosis. Effect of molecular form and dose of activator, age of the thrombus, and route of administration. *J. Clin. Invest.*, **71**; 368~376, 1983.
- 5) Matsuo, O., Nishida, Y., Akazawa, K. and Mihara, H.: Effect of urokinase on fibrinolysis and fibrinogenolysis. *Jpn. J. Physiol.*, **32**; 879~883, 1982.
- 6) Husain, S.S., Gurewich, V. and Lipinski, B.: Purification and partial characterization of a single-chain high-molecular weight form of urokinase from human urine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **220**; 31~38, 1983.
- 7) Gurewich, V., Pannell, R., Louie, S., Kelley, P., Suddith, R.L. and Greenlee, R.: Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). *J. Clin. Invest.*, **73**; 1731~1739, 1984.
- 8) Collen, D., Stassen, J.M., Blaber, M., Winkler, M. and Verstraete, M.: Biological and thrombolytic properties of proenzyme and active forms of human urokinase. III. Thrombolytic properties of natural and recombinant urokinase in rabbits with experimental jugular vein thrombosis. *Thromb. Haemost.*, **52**; 27~30, 1984.
- 9) Sumi, H., Maruyama, M., Matsuo, O., Mihara, H. and Toki, N.: Higher fibrin-binding and thrombolytic properties of single polypeptide chain—High molecular weight urokinase. *Thromb. Haemost.*, **47**; 297, 1982.
- 10) Collen, D., Stump, D., Werf, V.D., Jang, I.K., Nobuhara, M. and Lijnen, H.R.: Coronary thrombolysis in dogs with intravenously administered human pro-urokinase. *Cir-*

ulation, 72: 384~388, 1985.

- 11) Matsuo, O., Rijken, D.C. and Collen, D.: On the thrombolytic properties of human tissue plasminogen activator and urokinase. In: Urokinase: Basic and Clinical Aspects. P.M. Mannucci and A. D'angles (Ed.) London-Academic Press, 1982, p. 55~61.
- 12) Eachmann, F. and Kruithof, I.E.K.O.: Tissue plasminogen activator: Clinical and Physiological aspects. Semin. Thromb. Haemost., 10: 6~7, 1984.

●血小板研究のすべてを網羅して体系化!

血 小 板 — 基礎と臨床 —

編集 東京大学教授 山中 學 専門医44氏分担執筆
A 4 判 447頁 図159 表74 定価8,800円(〒300円)

今日ほど基礎と臨床の両面から、血小板に対する関心が寄せられている時はない。心筋梗塞や脳梗塞などの発症と血栓形成の関係が重大視され、わけても血小板の役割に注目が集まっている。本書は血小板に関するすべての研究の成果を網羅して体系化し、血小板研究の現状を理解するとともに将来への展望を知ることができる。

●内容：第1章 血小板の生成と崩壊，Ⅰ. 巨核球の成熟，Ⅱ. トロンボポエチン，Ⅲ. 血小板のturnover，Ⅳ. 血小板のpopulation，第2章 血小板の形成(電顕)，Ⅰ. 巨核球分化と血小板産生，Ⅱ. 血小板の形態と機能，第3章 血小板機能と代謝，Ⅰ. 糖・エネルギー代謝，Ⅱ. 血小板機能と脂質代謝，Ⅲ. 血小板のcyclicAMPとcyclicGMPの代謝，第4章 血小板機能と検査法，Ⅰ. コラゲンと血小板反応，Ⅱ. 血小板膜と機能，Ⅲ. 血餅収縮と血漿因子，Ⅳ. 粘着能測定法，Ⅴ. 凝集能測定法，Ⅵ. 血小板凝固因子測定法，第5章 血小板異常と臨床，Ⅰ. 血小板と免疫，Ⅱ. 血小板機能異常症，Ⅲ. 血小板と線溶，Ⅳ. 血栓症と血小板(抗血小板凝集剤)，Ⅴ. 女性と血小板，第6章 血小板保存と輸血，Ⅰ. 血小板保存と血小板機能，Ⅱ. 血小板輸血。