原 著

マクロファージのプラスミノゲン・アクチベーター分泌に及ぼすリンフォカインの刺激効果

東海林真司* 伊崎 誠一* 瀬川 郁雄* 日比野利彦*

Plasminogen activator secreted from macrophages
stimulated by lymphokinesShinji TOKAIRIN*, Seiichi IZAKI*, Ikuo SEGAWA*
and Toshihiko HIBINO*

Key words: plasminogen activator, inflammation,
macrophage, lymphokines, γ -interferon

In our previous study, we have demonstrated that plasminogen activators (PAs) with Mr=24,000 and Mr=48,000 play an important role in tissue fibrinolysis during the development of hypersensitivity granulomas. In order to investigate the cellular source of these PAs, we cultured mouse peritoneal macrophages in different conditions. C57BL/6N mice were used with or without infection by *Mycobacterium lepraemurium*. Antigen stimulated peritoneal exudate macrophages were obtained by intraperitoneal injection of sonicated *M. lepraemurium* to the infected mice. PA activity in conditioned media was assayed by using two-stage colorimetric method and electrophoretic enzymography. Resident peritoneal macrophages secreted PA with Mr=48,000. However antigen stimulated peritoneal exudate macrophages secreted a high activity of PA with Mr=24,000 in addition to Mr=48,000. In order to investigate secretion mechanism, in vitro stimulation of macrophages was carried out by lymphokines which were obtained from culture supernatants of splenic cells exposed with antigen or splenic T cells with Concanavalin A. The results clearly demonstrated that macrophages became secretable of PA with Mr=24,000 by lymphokine stimulation. Further experiments showed that the effect of lymphokine to induce secretion of PA was par-

---

* 岩手医科大学医学部皮膚科学講座〔〒020 盛岡市内丸19-1〕, The Department of Dermatology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan. 受付: 1987.7.16. 受理: 1987.9.9.

tially represented by γ -Interferon. These data indicated that the immunological stimulation induced macrophages to secrete PA, the molecular weight of which was altered from resident macrophages.

目 的

鼠らいを用いた慢性肉芽腫性炎の研究において、われわれはこれまで肉芽腫抽出液中に、分子量 48,000 および 24,000 のプラスミノゲン・アクチベーター (PA) が出現することを報告している¹⁾。今回、常在性腹腔マクロファージ (Resident peritoneal macrophages) あるいは腹腔浸出マクロファージ (Peritoneal exudate macrophages) をおのおの培養し、その培養上清中に出現するプラスミノゲン・アクチベーター (PA) 活性を測定し、さらには分子量について比較検討した。加えて、常在性腹腔マクロファージ培養液中に、リンフォカインあるいはマウスガンマイインターフェロン (mouse γ -IFN) のような免疫学的刺激を加える実験を行ないマクロファージ PA の分泌に及ぼす影響について検討した。

I. 方 法

1. マクロファージの培養と刺激実験

非感染マウスから常在性腹腔細胞を採取した²⁾。鼠らい菌感染マウスに、超音波処理鼠らい菌抗原懸濁液を腹腔内注射し³⁾、4 日後に腹腔浸出細胞を採取した。

これらの細胞を、おのおの 3×10^5 個/cm² となるように 10% 熱処理牛胎児血清 (10% HT-FCS) を含むダルベッコ変法イーグル培養液 (DMEM) 中で 4 時間培養した。非付着細胞を、食塩加リン酸緩衝液にて 3 回洗い流してマクロファージを得た²⁾。さらに 24 時間 DMEM + 10% HT-FCS 中に培養し、その後 PA 活性測定のため 24 時間毎に HT-FCS を含まない DMEM と交換した。プラスチック付着細胞の同定のために、非特異的エステラーゼ染色⁴⁾ および Latex 貪食試験⁵⁾を行った。

In vitro でのマクロファージに対する免疫学的刺激実験のために、リンフォカインの調整を

行った。鼠らい菌抗原を混入した感染マウス脾細胞⁶⁾、あるいはレクチンとして $5 \mu\text{g/ml}$ コンカナバリン A (Con A) を混入した非感染マウス脾臓 T 細胞を、おのおの 37°C 4 時間 5% HT-FCS を含む RPMI 培養液中で培養し抗原刺激リンフォカイン (Ag-Lymphokine) あるいはレクチン刺激リンフォカイン (Con A-Lymphokine) を得た。脾臓 T 細胞は、ナイロンウールカラム法⁷⁾を用いて調整した。これらのリンフォカインを、30% vol/vol の濃度で常在性腹腔マクロファージの培養液中に培養開始より 24 時間混入した。あるいは常在性腹腔マクロファージの培養液中にマウス γ -IFN⁸⁾⁹⁾ (塩野義製薬株式会社より供与) を $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ U/ml の濃度にそれぞれ培養開始より 72 時間、あるいは培養開始 4 日後から 48 時間混入した。

2. PA 活性の測定

1) 発色合成基質を用いた 2 段階測定法

Coleman and Green¹⁰⁾の方法を一部変更して用いた。Deutsch and Mertz¹¹⁾の方法に準じ、リジンセファロース・アフィニティークラム法を用い、犬血漿中より犬プラスミノゲンを精製した。マクロファージ培養上清を、PD-10 (Sephadex G-15 M カラム, ファルマシア社) にて脱塩しこれをサンプルとした。サンプルと 0.2 ng/ml 精製犬プラスミノゲン、および 0.05 M Glycine-buffer (pH 8.0) + 0.1% Triton X-100 + 0.1% Gelatin とを、それぞれ $50 \mu\text{l}$ ずつ等量混合し、37°C にて 45 分間反応させプラスミノゲンの活性化を行った。その後 $50 \mu\text{l}$ の 4 mM S-2251 (Val-Leu-Lys-pNA) と $700 \mu\text{l}$ の 0.2 M Phosphate-buffer (pH 7.4) + 0.2 M NaCl を加え、37°C にて 30 分間反応させ、遊離した p-nitroaniline を A_{405} にて測定した。Urokinase を用いたスタンダードカーブを作製し、測定した PA を Urokinase 活性換算値 (U/ml) で表した。

2) エンザイモグラフィー

Fig. 1 Morphological feature of cultured macrophages. A) Phase contrast micrograms of cultured resident peritoneal macrophages at 72 h after removing non-adherent cells. B) Nonspecific esterase staining of resident peritoneal macrophages. C) Phase contrast micrograms of resident peritoneal macrophages after latex phagocytosis. D) Phase contrast micrograms of resident peritoneal macrophages after administration of lymphokines for 24 hours. Lymphokines were obtained from conditioned media of splenic cells cultured with sonicated *M. lepraemurium* for 48 hours.

酵素活性の分子量を決定するために、Heussen and Dowdle¹²⁾の方法に準じ、 α -Casein を基質としたエンザイモグラフィーを行った。すなわち、1% α -Casein と 2.0 ng/ml 精製犬プラスミノゲンを混入したスラブゲル内にて SDS-PAGE をおこない、泳動後ゲル内でプラスミノゲンの活性化と α -Casein の分解を行った。

II. 成 績

1) プラスチック付着細胞は、培養日数の経過につれて細胞突起を他方向性に伸張させて次第にマクロファージに特徴的な形態を示した(図 1-A)。非特異的エステラーゼ染色にて、細胞質内に赤褐色の顆粒状集塊が98%以上に認められた(図 1-B)。さらに、Latex 粒子の食

食試験で98%以上の細胞に貪食が観察された(図 1-C)。

2) 常在性腹腔マクロファージの培養上清中の PA 活性は、培養初期においては約 10^{-3} U/ml の低い値を示したが、培養日数の経過につれて上昇を示した(図 2-A)。エンザイモグラフィーの結果、常在性腹腔マクロファージの分泌する PA は、主として分子量 48,000 の酵素からなることが明らかになった(図 3-A)。

3) 抗原刺激腹腔浸出マクロファージの分泌する PA は、約 10^{-2} U/ml 以上の高い活性を示した。これは、対照とした鼠らい菌感染マウスに生食を腹腔内注射して得られた腹腔マクロファージ、あるいは非感染マウスに鼠らい菌抗原を腹腔内注射して得られた腹腔マクロファージの培養上清中に認められた PA 活性に比較し

Fig. 2 PA activity secreted from cultured macrophages.
 A) PA activity of resident peritoneal macrophages.
 B) PA activity of peritoneal exudate macrophages by injection (i. p.) of sonicated *Mycobacterium lepraemurium* to the infected mice (●—●). Control macrophages were obtained by injection of either sonicated *M. lepraemurium* to the non-infected mice (●····●) or saline to the infected mice (●····●). Means $\pm$ S.D. (bars) were showed.

Fig. 3 Electrophoretic pattern of PA from cultured macrophages. Effect of in vivo stimulation.
 A) Resident peritoneal macrophages. B) Peritoneal exudate macrophages obtained by injection (i. p.) of sonicated *M. lepraemurium* to the infected mice.

て約 10~100 倍の上昇であった (図 2-B). エンザイモグラフィーの結果, 抗原刺激腹腔マクロファージの分泌する PA は, 分子量 24,000 の酵素が主体で, 分子量 48,000 の酵素はむしろ弱く観察された (図 3-B).

4) リンフォカインの効果

常在性腹腔マクロファージの培養液中に, 培養開始より 24 時間 Ag-Lymphokine を混入したところ, 明らかなマクロファージの形態学的変化が観察された (図 1-D). このとき培養上清中の PA 活性は, 対照に比して培養 2 日目と 3 日目において有意に上昇していた (表 1). エンザイモグラフィーの結果, 常在性腹腔マクロファージが, 分子量 48,000 の PA を主に分泌

する (図 4-A) のに対して, Ag-Lymphokine (図 4-B) あるいは Con A-Lymphokine (図 4-C) を混入した常在性腹腔マクロファージは, 分子量 48,000 に加え分子量 24,000 の PA を分泌するようになることが明らかになった.

5) マウス γ -IFN の効果

常在性腹腔マクロファージの培養液中に γ -IFN を, 培養開始より 72 時間混入したところ, 培養上清中の PA 活性は, 低下を示した (図 5-A). しかしながら, 常在性腹腔マクロファージを 4 日間培養した後に, 48 時間 γ -IFN を混入したところ培養上清中の PA 活性は, 最初の 24 時間は急峻な上昇を示したが, 続く 24 時間のうちに低下を示した (図 5-B). 上昇時の培養上清中

Table 1 Effect of in vitro stimulation on plasminogen activator of cultured macrophages.

Culture days	2 days	3 days
Mø*+ culture supernatant of Spleen cells + Ag**	3.56 ± 3.38***	8.45 ± 1.14
Mø + culture supernatant of Spleen cells	1.80 ± 0.42	6.34 ± 0.84
Mø	1.88 ± 0.70	5.66 ± 1.10

* Mø; macrophages

** sonicated *M. lepraemurium* suspension*** Means ± S.D. (n=3) PA activity ($U \times 10^{-3}/ml$)

には、エンザイモグラフィーの結果、分子量 48,000 と 24,000 の PA 活性が認められた (図 4-D)。

III. 考 察

マウスの慢性肉芽腫性炎の抽出液中に認められた PA は、分子量 24,000 の酵素が主体であることが報告されている¹¹⁾¹³⁾。本研究は、常在性腹腔マクロファージの分泌する PA が主に分子量 48,000 であることを明らかにした。次に腹腔内で鼠らい菌抗原を用いてマクロファージを In vivo において免疫学的に刺激する実験を行った結果、マクロファージの培養上清は高い PA 活性を示すようになり、同時に上清中に認められた PA の分子量が変化し、これまで分子量 48,000 の PA が主であったのが、分子量 24,000 の PA を主体とするようになることを明らかにした。

リンフォカイン (Ag-Lymphokine, Con A-Lymphokine) は、培養常在性腹腔マクロファージを活性化し、その培養液中に分子量 48,000 の PA に加えて分子量 24,000 の PA も出現するようになることを、in vitro にて実験的に再現した。1978年 Gordon and Cohn¹⁴⁾は、BCG 感染マウスを用い、T cell の分泌するファクター (リンフォカイン) が、マクロファージの分泌する PA の活性を著明に上昇させることを報告している。本研究では、PA 活性の上昇のみならず分泌される PA の分子量変化を明らかにし

Fig. 4 Electrophoretic enzymographic pattern of PA from cultured macrophages. Effect of in vitro stimulation.

A) Resident peritoneal macrophages. B) Effect of Ag-Lymphokines. Ag-Lymphokines were prepared from conditioned media of cultured splenic cells with *M. lepraemurium*. C) Effect of Con A-Lymphokines. Con A-Lymphokines were prepared from conditioned media of cultured splenic T cells with 5 $\mu g/ml$ Concanavalin A. D) Effect of mouse recombinant γ -IFN.

Effect of γ -Interferon

Fig. 5 Effect of γ -IFN on cultured macrophages. Relative PA activity in comparison to resident peritoneal macrophages was expressed as % activity.
 A) After removing non-adherent cells, γ -IFN was added for 0-72 hours. B) γ -IFN was added after 4 days of culture for the subsequent 48 hours.

た。しかしながらリンフォカインに含まれる主要なマクロファージ活性化因子すなわち γ -IFN を培養マクロファージに最初の24時間加えたところ、かえってPA分泌を阻害する結果が得られた。それに対し4日間培養を続けたのちに γ -IFN を投与することにより常在性腹腔マクロファージ培養上清中のPA活性は上昇した。従って、 γ -IFN の働く前段階として粘着等によりマクロファージを部分的に活性化し γ -IFN に対する反応性が獲得されたと解釈された。マクロファージの段階的活性化に関しては、Ruco and Meltzer¹⁵⁾¹⁶⁾は、腫瘍細胞傷害効

果、あるいは活性酸素産生の系において同様のことを報告している。本研究では、 γ -IFN は、マクロファージのPA分泌に対するリンフォカインの作用を部分的に再現した。

PA には、Urokinase-type¹⁷⁾ と tissue-type¹⁸⁾ とがあることが報告されている。ヒトの単球/マクロファージが、無刺激の条件で分泌するPAは、Urokinase-type であることが Saksela 等¹⁹⁾により報告されており、またマウスのUrokinase の分子量が 48,000 であることが Belin 等²⁰⁾によって報告された。したがって本研究でみられたマウスマクロファージの分泌する分子

量 48,000 の PA は、マウスの Urokinase と同一の物質である可能性が高い。ヒト単球／マクロファージを用いた研究で、Stepens and Golder²¹⁾は、単球／マクロファージの分泌する PA 活性がリンフォカイン等の刺激により上昇し、この時分泌される PA の性質が変化することを報告している。ヒト Urokinase が分子量 55,000 と 33,000 の二つの酵素からなり、分子量 33,000 の酵素は、分子量 55,000 の酵素がプラスミン等のトリプシン様セリン酵素により限定分解を受けたものであることが報告されている²²⁾²³⁾。この事より、マウスマクロファージの分泌する分子量 24,000 の PA は分子量 48,000 の PA の限定分解産物である可能性が最も高いと著者は考えている。今後この二つの酵素の、抗原性、フィブリン親和性、基質特異性等を検討する必要があると考える。

文 献

- 1) Izaki, S., Hibino, T., Hsu, P.S., Izaki, M. and Matuo, O.: Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor associated with granulomatous inflammation: A study with murine leprosy. *Thromb. Haemostas.*, **52**: 243~249, 1984.
- 2) Unkeless, J.C., Gordon, S. and Reich, E.: Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.*, **139**: 834~850, 1974.
- 3) Sonozaki, H. and Cohen, S.: The macrophage disappearance reaction: Mediation by a soluble lymphocyte-derived factor. *Cell. Immunol.*, **2**: 341~376, 1971.
- 4) Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **55**: 283~290, 1971.
- 5) Cohn, Z.A. and Benson, B.: The differentiation of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, **121**: 153~169, 1964.
- 6) Dumonde, D.C., Wolstencroft, R.A., Panayi, G.S., Matthew, M., Moley, J. and Howson, W.T.: "Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature*, **224**: 38~42, 1969.
- 7) Julius, M.H., Simpson, E. and Herzenberg, L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**: 645~649, 1973.
- 8) Roberts, K.W. and Vasil, A.: Evidence for the identity of murine gamma interferon and macrophage activating factor. *J. Interferon Res.*, **2**: 519~532, 1982.
- 9) Havell, E.A. and Spitalny, G.L.: Two molecular weight species of murine gamma interferon. *Virology*, **129**: 508~513, 1983.
- 10) Coleman, P.L. and Green, G.D.J.: A coupled photometric assay for plasminogen activator. *Methods in Enzymology*, **80**: 408~414, 1981.
- 11) Deutsch, D.G. and Mertz, E.T.: Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, **170**: 1095~1096, 1970.
- 12) Heussen, C. and Dowdle, E.B.: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, **102**: 196~202, 1980.
- 13) Izaki, S., Hornbeck, L., Higuchi, M., Fukuyama, K., Epsrein, W.L., Tokairin, S. and Matsuo, O.: Detection of granuloma-associated plasminogen activator in experimental murine shistosomiasis. *Exp. Mol. Pathol.*, **43**: 82~89, 1985.
- 14) Gordon, S. and Cohn, Z.A.: Bacille Calmette-Guerin infection in the mouse. *J. Exp. Med.*, **147**: 1175~1187, 1978.
- 15) Ruco, L.P. and Meltzer, M.S.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Development of macrophage cytotoxic activity requires completion of a sequence of short-lived intermediary reactions. *J. Immunol.*, **121**: 2035~2042, 1978.
- 16) Ruco, L.P. and Meltzer, M.S.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Induction of tumoricidal macrophages by supernatants of PPD-stimulated Bacillus Calmette-Guerin-immune spleen cell cultures. *J. Immunol.*, **119**: 889~896, 1977.
- 17) White, W.F., Barlow, G.H. and Mozen, M.

- M.: The isolation and characterization of plasminogen activator (urokinase) from human urine. *Biochemistry*, **5**; 2160~2169, 1966.
- 18) Rijken, D.C. and Collen, D.: Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **256**; 7035~7041, 1981.
- 19) Saksela, O., Hovi, T. and Vaheri, A.: Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *J. Cell. Physiol.*, **122**; 125~132, 1985.
- 20) Belin, D., Vassalli, J-D., Combepine, C., Godeau, F., Nagamine, Y., Reich, E., Kocher, H.P. and Duvoisin, R.M.: Cloning, nucleotide sequencing and expression of cDNA encoding mouse urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.*, **148**; 225~232, 1985.
- 21) Stephens, R.W. and Golder, J.P.: Novel property of human monocyte plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.*, **139**; 253~258, 1984.
- 22) Soberano, M.E., Ono, E.B. and Johnson, A. J.: The effect of inhibitors on the catalytic conversion of urokinase. *Thromb. Res.*, **9**; 675~681, 1976.
- 23) Barlow, G.H., Francis, C.W. and Marder, V. J.: On the conversion of high molecular weight urokinase to the low molecular weight form by plasmin. *Thromb. Res.*, **23**; 541~547, 1981.

●内科疾患のカルシウム代謝とその異常

カルシウムの臨床

編集 神戸大学内科教授 藤田拓男 専門医15氏分担執筆

B5判 365頁 図129 表78 定価9,800円(〒350円)

カルシウムは人体のあらゆるところに存在し、あらゆる機能に関与する。したがって、内科疾患のすべてに密接に関連しており、内科学を理解するためにカルシウム代謝とその異常をまず知らなければならない。本書は内科疾患のあらゆる部分にわたってカルシウムの影を探し求め、カルシウムの臨床を通して内科学を再構成しようとしたユニークかつ野心的な試みの産物である。

●内容：総論，第1章 神経系疾患とカルシウム代謝異常，第2章 心血管疾患とカルシウム，第3章 腎疾患とカルシウム，第4章 呼吸器疾患とカルシウム，第5章 消化器疾患とカルシウム，第6章 血液疾患とカルシウム，第7章 内分泌疾患とカルシウム，第8章 リウマチ様関節炎とカルシウム代謝，第9章 膠原病および免疫アレルギー疾患とカルシウム，第10章 物理的原因による疾患とカルシウム，第11章 薬剤とカルシウム代謝異常，第12章 老年病とカルシウム，第13章 悪性腫瘍とカルシウム，第14章 カルシウム代謝検査法，索引