カラゲニン誘発炎症に伴って増強される マウス脾のプラスミノゲン分解活性

堀江 登* 梅原弓起子* 山本順一郎* 岡本 歌子*

Enhancement of spleen plasminogenolytic activity with carrageenan-induced inflammation

Noboru HORIE*, Yukiko UMEHARA*, Junichiro YAMAMOTO*
and Utako OKAMOTO*

Key words: plasminogen, inflammation, carrageenan-induced,
spleen

The variation of spleen plasminogenolytic activity was investigated using a carrageenan-induced inflammation in mice. Immuno-blotting method using antiserum for human plasminogen was adopted for the observation of plasminogenolysis by the spleen extract with 2 M KSCN. The plasminogenolytic activity was detected even in the normal spleen extract. The remarkable enhancement of it in the spleen from the 6th to the 10th day after the carrageenan injection followed the increases of plasma fibrinogen and serum FD (g) P levels. The hydrolysis of plasminogen by the spleen extract made fragments of 55 kDa, 35 kDa and 28 kDa, further the 55 kDa fragment changed to the small one. These plasminogenolytic activities were completely inhibited with diisopropyl fluorophosphate, soybean trypsin inhibitor or α_1 -trypsin inhibitor, but not inhibited with aprotinin. The variation of the spleen plasminogenolytic activity after the carrageenan injection and these effects of proteinase inhibitors for the activity were similar to the fibrinolytic activity in the spleen. These data show that the plasminogenolytic activity in the spleen was derived from a same proteinase as fibrinolytic activity.

* 神戸学院大学栄養学部生理学研究室 [〒673 神戸市西区伊川谷町有瀬], Department of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Kobe 673, Japan. 受付: 1988. 1. 7. 受理: 1988. 7. 12.

はじめに

正常マウス脾の 2 M KSCN 抽出液中には、ラット脾に存在する“フィブリン (F) を特によく分解する酵素”はほとんど認められない。しかし、カラゲニンを注入するとマウス脾にも F を分解する酵素が出現し、同時にヒト・プラスミノゲン (H-Plg) を分解する活性も生じてきた。

本実験は、この H-Plg 分解作用の由来を追求するために行われた。

I. 材料および方法

実験動物は Jcl-ICR マウス (8~10 週齢, 雄) を使用した。マウス背部に 2 ml の空気嚢を作成し、24 時間後 2% カラゲニン液 0.8 ml をその中に注入し、炎症を誘発させた¹⁾。動物はカラゲニン注入後 45 分~15 日目にエーテル麻酔下で全採血し、脾を摘出した。血液については、トロンビン時間法によりフィブリンゲン (Fg) 濃度²⁾ を、またブドウ球菌凝集試験法により FD(g)P 濃度³⁾ を測定した。脾は重量計測後、-20°C で一夜以上放置し、解凍後生理食塩水で十分に洗浄し、10 容の 2 M KSCN で抽出した。H-Plg は、新鮮クエン酸加血漿より

アプロチニンの存在する条件でリジン・セファローズ⁴⁾ とゲルろ過法で調整した。H-Plg に対する抗血清は前記の H-Plg を Freund's complete adjuvant と共に家兎の背部に皮下注射することにより作製した。脾抽出液による H-Plg の分解活性は、1 容の脾抽出液と 4 容の H-Plg 液 (2 mg/ml) を混和後、37°C で一定時間インキュベートし、Laemmli の方法⁵⁾ に準じて SDS-PAGE を行い、さらにイムノ・ブロッティング法⁶⁾ により判定した。脾のフィブリン分解活性は Plg 除去 F 平板により測定した⁷⁾。

II. 成績

カラゲニン注入後、血漿中 Fg 濃度は 12 時間後から増加し、1 日目をピークに、その後減少した。血清中の FD(g)P は Fg より早く 6 時間目から増加をはじめ、その後 Fg と同様に変動した。脾重量は 3 日目から増加をはじめ、10 日目をピークにその後回復した。2 M KSCN による脾抽出液中の F 分解活性は、脾重量の増加と同様に 6~10 日目をピークにその後減少した。また H-Plg 分解活性は、F 分解を認めない正常マウスにおいても認められたが、カラゲニン注入後 6~10 日目をピークにさらに増強された。正常マウス脾に認められた H-Plg

Fig. 1 Variation of spleen plasminogenolytic activity after carrageenan injection. Plasminogen derivative fragments were detected by immunoblotting method using antiserum for human plasminogen. Lane 1; intact plasminogen, 2; control mice, 3; 45 min after carrageenan injection, 4; 1.5 hr, 5; 3 hr, 6; 6 hr, 7; 12 hr, 8; 1 day, 9; 3 day, 10; 6 day, 11; 10 day, 12; 15 day.

Fig. 2 Effects of various proteinase inhibitors on spleen plasminogenolytic activity. Lane 1; marker proteins (Pharmacia fine chemicals), 2; spleen extract alone, 3; intact plasminogen, 4; hydrolysate of plasminogen induced by spleen extract, 5; hydrolysate by three times diluted extract, 6; hydrolysate by 9 times diluted extract, 7; hydrolysate with 10 mM FDP by extract, 8; hydrolysate with 1 mg/ml SBTI, 9; hydrolysate with 1,000 KIE/ml aprothinin, 10; hydrolysate with 100 μ g/ml α_1 -antitrypsin inhibitor.

分解により, H-Plg は分子量約 55 kDa, 35 kDa, 28 kDa のフラグメントに低分子化した。この 55 kDa フラグメントは脾の F 分解の増強に伴ってさらに低分子化した(図 1)。これらの H-Plg の低分子化は、脾の F 分解活性と同様に SBTI ならびに DFP により阻害されたが、アプロチニンでは阻害されなかった(図 2)。これらの H-Plg の低分子化によりリジン・セファローズに結合しないフラグメントが生じ、これは長時間インキュベートすることによりさらに低分子化した。

結 論

カラゲニン誘発炎症により増強されたマウス脾の H-Plg 分解は、同時に誘発された F 分解と同様の酵素に由来する可能性が唆された。

文 献

- 1) Tsurufuji, S., Sato, H., Min, K.R. and Ohuchi, K.: Difference in the anti-inflam-

matory effect of indomethacin between acute and chronic stages of carrageenin-induced inflammation. *J. Pharm. Dyn.*, **1**: 8~14, 1978.

- 2) 橋本仙一郎: トロンビン時間法によるフィブリノーゲンの定量。臨床病理, **21**: 615~620, 1973.
- 3) 中沢新平, 目黒 嵩, 山田善三郎, 山田兼雄: Staphylococcal clumping test (SCT) の検討およびその臨床的価値。臨床血液, **13**: 363~369, 1972.
- 4) Castellino, F.J. and Powell, J.R.: Human plasminogen. *Methods Enzymol.*, **80**: 365~378, 1981.
- 5) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680~685, 1970.
- 6) Reiser, J. and Wardale, J.: Immunological detection of specific proteins in total cell extracts by fractionation in gels and transfer to diazophenylthioether paper. *Eur. J. Bio-*

- chem., **114**: 569~575, 1981.
- 7) Okamoto, U., Yamamoto, J., Nagamatsu, Y. and Horie, N.: Fibrinolytic activity of lung and spleen extracts observed in conventional but not in germfree rats. *Thrombos. Haemostas.*, **42**: 726~733, 1979.
-