◆原 著◆

肝照射家兎の凝固・線溶活性と放射線障害

伊 藤 要 子^{*1}, 宮 田 伸 樹^{*1}, 小 栗 隆^{*2}

Perturbed Blood Coagulation and Fibrinolysis in Rabbits after Irradiation to the Liver

Youko HISHIKAWA-ITOH^{*1}, Nobuki MIYATA^{*1}, Takashi OGURI^{*2}

Key words: radiation, coagulation, fibrinolysis, fluorogenic substrate, free radical

Effects of X-ray irradiation to the liver were studied in rabbits with special reference to the free radicals induced by the irradiation at various doses of 5, 10, 20 and 40 Gy. Results were summarized as follows:

- 1) APTT and PT significantly prolonged immediately after irradiation and on day 1, and recovered thereafter to the control levels.
- 2) Levels of blood coagulation factors I, II and plasminogen, t-PA and plasma prekallikrein showed similar trends, namely, an initial rapid decrease immediately after irradiation, followed by a transient increase on day 3 and a subsequent recovery to the control level on days 7 and 10.

These changes coincided with the prolongation of APTT and PT.

- 3) The SOD activity and the plasma albumin level also decreased immediately after irradiation, recovered once from 3 to 7 days and decreased again on days 10.

The decreased SOD activity noted immediately after irradiation indicates production of free radicals induced by the irradiation. This finding may suggest that the free radicals thus produced may have perturbed blood coagulation and fibrinolysis, at least in part, by blocking the secretion of relevant proteins from the hepatocytes.

結 言

放射線照射が、凝固・線溶系におよぼす影響についての報告は少なく、わずかに凝固時間や血小板に関して放射線障害の立場から研究され

ているのみであり、その結果も凝固時間の延長するもの、短縮するもの様々であり、血小板についても数量的変化についての報告が多い。特に、凝固・線溶系の各因子について、放射線の影響を検討した報告は非常に少ない。また、放

^{*1} 愛知医科大学放射線医学教室〔〒480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21〕; Department of Radiology, Aichi Medical University, Nagakute-cho, Aichi-prefecture 480-11, Japan.

^{*2} 同第二内科学教室: Secd. Dept. of Internal Medicine, Aichi Medical University.

受付: 1991.2.28, 受理: 1991.5.10

放射線医学領域の立場から考慮すると、放射線照射によって生じる生物効果は、多くが照射により生じた Free radical による作用であるにもかかわらず、これらと凝固・線溶系との関連を検討した報告は未だになされていない。しかし、放射線治療を受ける症例は増加しており、また術中・術後照射、Hyperthermia 併用による照射、移植に対する全身照射など中線量照射の機会も増加しており、放射線が凝固・線溶系におよぼす影響を検討することは、放射線障害および放射線生物学の立場からも、きわめて興味深い。

凝固・線溶因子の多くは肝臓で合成されていることが肝細胞による *in vitro* 実験からも実証されていることより、肝臓へ放射線照射を行い、凝固・線溶系におよぼす影響を Free radical による放射線障害をふまえて検討することを目的とした。

実験材料および方法

1. 実験動物と放射線照射

体重約 2.5 kg の雄家兔を、麻酔下で仰臥位に固定し、リニアック (NELAC-1018, 日本電気) にて、照射条件を 10 MV X 線, SSD 100 cm, Dose rate 5 Gy/min とした。照射線量は、肝臓の耐用線量 35 Gy を基準とし 5, 10, 20, 40 Gy の 4 種類の線量を肝臓へ各々 1 回局所照射した。照射野は肝全体が含まれるよう 8×4 cm とし、照射野の設定は、X 線撮影にて照射部位の確認を行った。各群はおのおの 8~5 羽の家兔を使用し、実験結果は t-検定により有意差検定を行った。

2. 採血および検体処理

採血は、照射直後、12 時間後、1, 3, 7, 10, 14 日後と経時的に行った。3.8% クエン酸ナトリウム 1 容: 血液 9 容の割合で耳静脈より血液を採血した。

3. Activated partial thromboplastin time (APTT) および Prothrombin time (PT)

APTT は、APTT 試薬としてアクチン (国際試薬) を加え、凝固時間を Fibrosystem (BBL Co.) にて測定した。PT は、PT 試薬と

して家兔脳由来トロンボプラスチン C (トロンボプラスチン C: 国際試薬) を混和し、Fibrosystem にて凝固時間を測定した。

4. 凝固・線溶因子

1) Fibrinogen 量測定

Fibrinogen 量は Tyrosine 法¹⁾ を用いて Clottable protein として定量した。

その他、凝固・線溶因子活性測定に関しては、蛍光基質法にて測定した。各因子を活性化剤で活性型に転換した後、おのおのの活性型因子に対する蛍光基質²⁾ (ペプチド研) を使用し、分解され遊離した蛍光 (AMC; AminoMethyl-Coumarin) を蛍光光度計 (日立 F-3000; Excitation 380 nm, Emission 460 nm) にて測定した。なお、活性単位は、 10^{-7} M AMC を 1 単位とし、血漿 100 μ l あたりの値として表示した。

2) Prothrombin 活性測定

Prothrombin に関しては、Echis carinatusvenom (E. C. V.: Sigma 社) にて Thrombin に活性化した³⁾。測定に当たっては至的条件を予め検討し、以下の条件を適用した。血漿を、50 mM Tris-HCl, pH 8.2-0.175 M NaCl-1 mg/l ポリブレンにて 500 倍希釈した家兔血漿 100 μ l に 10 μ g/ml の E. C. V. 50 μ l を加え、37°C で 10 分間反応させた。これに基質用 Buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0-100 mM NaCl-10 mM CaCl₂) にて 0.1 mM に調節した Thrombin 用蛍光基質液 (Boc-Vol-Pro-Arg-MCA) を 150 μ l 加え 37°C にて 10 分間反応させ 17% 酢酸 500 μ l 加えて反応を停止し、遊離した蛍光を測定した。Blank は血漿の代わりに血漿希釈用 Buffer を使用した。

3) Factor X 活性測定

Factor X は、Russell's viper venom (R. V. V.: BMY K. K.) にて活性化した。測定に当たっては至的条件を予め検討し、以下の条件を適用した。50 mM Tris-HCl, pH 8.2-0.2 M NaCl-1.5 mg/l ポリブレンにて 20 倍希釈した家兔血漿 300 μ l に 0.15 M CaCl₂-0.05 M NaCl にて 0.3 mg/ml に調節した R. V. V. 液を 10 μ l 加え 30 秒間 37°C で反応させた後 Factor

X_a 用蛍光基質液を加えて測定した。これに基質用 Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0-100 mM NaCl-10 mM CaCl₂) で 0.05 mM に調製した Factor X_a 用蛍光基質 (Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA) を 300 μ l 加え, 37°C で 10 分間反応させた。そして 50% 酢酸 200 μ l を加え反応を停止させ遊離した蛍光を測定した。Blank は血漿のかわりに血漿希釈用 Buffer を使用した。

4) Plasminogen 活性測定

Plasminogen は, Urokinase (UK: ミドリ十字) を活性化剤として使用した。測定に当たっては至的條件を予め検討し, 以下の条件を適用した。血漿を Inhibitor 処理するため, 血漿 50 μ l に 1/6 N HCl 50 μ l を加え室温にて 20 分間放置し酸処理した後, 1/6 N NaOH 50 μ l と Buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4-0.012 M NaCl) 350 μ l を加えて 10 倍希釈した血漿 100 μ l に, 1000 IU/ml の UK を 50 μ l 加え, 37°C で 15 分間反応させた。次に, 基質用 Buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.0) にて 0.1 mM に調製した Plasmin 用蛍光基質 (Boc-Glu-Lys-Lys-MCA) 150 μ l を加え, 37°C で 10 分間反応後, 17% 酢酸 500 μ l を加え反応を停止させた。Blank は, 血漿の代わりに血漿希釈用 Buffer を使用し同様の操作をした。

5) Prekallikrein 活性測定

Prekallikrein は, Prekallikrein activator (PKA: 第一化学) にて Kallikrein に活性化した。測定に当たっては至的條件を予め検討し, 以下の条件を適用した。血漿を 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 Buffer にて 20 倍希釈した家兎血漿 300 μ l に原液の PKA を 10 μ l 加え, 37°C で 5 分反応させた。これに 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 Buffer にて 0.05 mM に調節した Kallikrein 用蛍光基質液 (Z-Phe-Arg-MCA) を 300 μ l 加え 37°C にて 10 分間反応させ, 50% 酢酸 200 μ l にて反応を停止した。

6) t-PA (tissue type plasminogen activator) 様活性測定

t-PA は, 血漿自体の t-PA 様活性を t-PA 用蛍光基質 (Pyr-Gly-Arg-MCA) にて測定した。血漿 50 μ l に 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 Buffer

を 100 μ l 加えて希釈し, 0.1 mM t-PA 用蛍光基質液を 150 μ l 加え, 37°C 10 分間反応させ, 17% 酢酸 500 μ l を添加し反応を停止後, 遊離した蛍光を測定した。

4. Albumin 定量測定

Albumin 定量は BCG 法による Albumin 発色試薬 (片山化学) にて測定した。

5. SOD (superoxide dismutase) 活性測定

SOD 活性は総 SOD 活性を Oyanagi による亜硝酸法⁴⁾ にて測定した。

結 果

Fig. 1-6 についてはすべて, 横軸に経過日数を, 縦軸に非照射のコントロール群の値を 100% とした各群の比率を示した。*は $P < 0.01$ (1%) の, *は $P < 0.05$ (5%) の危険率での有意差を示す。

1. APTT および PT

家兎肝照射による APTT および PT の結果を照射直後から 14 日後まで経時的にまた, 線量別に **Fig. 1** に示した。APTT においては, 照射直後から 1 日後著しい延長を認め, その後回復した。特に 40 Gy 照射の 12 時間後では, 2 倍以上の延長を認めたのち, 7 日後には回復した。5 Gy 照射のみ有意な変化はなかった。PT においては, 40, 20 Gy 照射の高線量群で 1 日後凝固時間の延長を認めたが, その後は変化なく, 低線量照射群ではまったく変化を示さなかった。

2. 凝固・線溶因子測定

1) Fibrinogen 量: 照射による血中 Fibrinogen の変動は全群ともに照射直後は変化なく, 12 時間後から急激に増加し, 1 日後にはピークに達し, その後高線量群では増加が継続し, 低線量群では回復した (**Fig. 2**)。

2) Prothrombin 活性: Prothrombin 活性は, 40 Gy 照射で照射直後, 低下したのち 3 日から 7 日後有意な増加を認めた。20 Gy, 10 Gy 照射では 40 Gy 照射程有意ではないが同様に照射直後低下傾向を示し, 3 日から 7 日後増加を認めた (**Fig. 3**)。

3) Factor X 活性: Factor X 活性は, 照射 3 日から 7 日後有意に増加し, 40 Gy を除いて,

Fig. 1 APTT and PT of rabbit plasma

Values are means $\pm$ SD of 5~8 animals.

The asterisks * and ** in this and the following figures represent $p < 0.05$ and $p < 0.01$ between the value at the time indicated and the control value as 100%, respectively.

Fig. 2 Fibrinogen level in rabbit plasma

Values are means $\pm$ SD of 5~8 animals

その後回復する傾向をみた。

4) Plasminogen 活性: Plasminogen 活性は、照射直後低下を示し、40 Gy 群ではその後次第に有意な上昇を示した。その他の群は3日から7日後上昇し、その後回復した (Fig. 4)。

5) Prekallikrein 活性: Prekallikrein 活性は、照射1日後低下を示し、3日後増加したのち、10日後有意な低下を示した。

6) t-PA 様活性: t-PA 様活性は、40 Gy にて12時間後有意に低下を示し、その後10日後ま

Fig. 3 Prothrombin activity of rabbit plasma
Values are means $\pm$ SD of 5~8 animals

Fig. 4 Plasminogen activity of rabbit plasma
Values are means $\pm$ SD of 5~8 animals

で増加した。その他の群でも 40 Gy 照射程度まではないが同様な変化を示した。

3. Albumin 量

Albumin は代表的な肝合成蛋白であり、肝臓の蛋白合成、分泌の指標である。この血中 Albumin 量は、肝照射により全群ともに照射直後から 1 日後に非照射群 (Cont.) に比し有意な減少を示したのち、3 日から 7 日後回復し、高線量照射群では再び 10 日後から低下を認めた (Fig. 5)。

4. SOD 活性

血中総 SOD 活性は、肝照射により全群において照射直後から 1 日後有意に活性低下し、その後 3 日から 7 日後回復したのち、5 Gy 照射群を除いて 10 日後より再び活性が低下した (Fig. 6)。

考 察

われわれは、家兎放射線全身照射により凝固時間の延長、血中 Fibrinogen 量の著明な増加、Plasminogen 活性の増加など放射線照射に

Fig. 5 Plasma albumin level in rabbit plasma
Values are means $\pm$ SD of 5~8 animals

Fig. 6 SOD activity of rabbit plasma
Values are means $\pm$ SD of 5~8 animals

より凝固・線溶系が大きく変化することを、既に報告⁵⁾した。そこで本論文では、家兎を用いて多くの凝固・線溶因子産生臓器である肝臓⁶⁾に放射線を照射し、血液凝固・線溶系に及ぼす影響を放射線障害の原因となる Free Radical の消去剤である SOD 活性をふまえて検討した。

実験を始めるにあたって、蛍光基質法による家兎血漿中の凝固・線溶因子活性測定法を確立した。各因子に関してのおおの最適活性化剤濃度と最適反応時間を検討し家兎血漿中の凝固・線溶因子を十分測定し得たものとする。

放射線照射による凝固・線溶系の変動に関する報告は、全身照射などで若干ながら認められる。内藤⁷⁾らおよび、Jackson ら⁸⁾は照射による凝固時間の延長を報告しており、われわれは家兎全身照射により (Kaolin+リン脂質) Clotting time, Recalcification time の延長を報告している。しかし Ponomarev⁹⁾は照射により凝固時間が短縮すると報告している。本実験では APTT, PT の延長が照射直後から1日後にかけて有意に認められ、その後は速やかに回復した。また、この APTT, PT の延長は凝固因子活性の低下と一致しており、照射による

Radiation and Free radical

Fig. 7 Schematic representation of free radical and liver-irradiation

SOD; Superoxide dismutase GSHPx; Glutathione peroxidase

凝固因子の活性の変動による影響と思われた。

Fibrinogen については、本実験では照射 12 時間後より急激に増加し、高線量照射群では観察期間中、約 2 倍の高値を持続した。ほかの報告においても照射により Fibrinogen 量の増加を報告⁵⁾ するものが多い。Prothrombin, Factor X, Plasminogen, Prekallikrein などの因子については、各因子ごとに放射線の影響を検討した報告は少なく比較し難い。本実験では、各因子ごとに結果に若干の差はあるものの照射直後では活性は低下し、3~7 日後増加する傾向を示した。これらは、後述する肝照射直後に発生する Free radical による肝細胞障害によると思われた。Komierska-Gradzka ら¹⁰⁾ は全身照射後の脾臓の Kallikrein 活性が増加すると報告している。また、肝照射による影響として Vitamin K 欠乏による PIVKA-II が、Proth 活性に反映することもある。

放射線照射による線溶系、特に t-PA の変動については、比較的多くの報告があり、Gerber ら¹¹⁾ はラットの片肺への放射線照射により線溶活性の減少を、Dancewicz ら¹²⁾ は全身照射により肺の線溶活性の増加を報告し、Svanberg ら¹³⁾ は放射線治療後の患者の血管壁 biopsy 標本で、線溶活性の有意な低下を報告している。t-PA 活性については、Tsao ら¹⁴⁾ は肺照射

後 t-PA 活性が低下し 2~6 カ月後増加すると報告し、Asted¹⁵⁾ は放射線照射ラットの血管壁の線溶活性の低下を報告している。一般には、放射線照射後の内皮細胞の直接障害に伴う t-PA 活性の低下による線溶活性の低下を報告するものが多い。本実験では照射直後 t-PA 活性は低下するが高線量照射群でその後次第に活性は増加し 14 日後回復し、低線量群では著明な変化は認めなかった。今回は、PAI については測定しなかったが、t-PA 活性は PAI の増減により大きく変動するため、PAI の変動をも考慮する必要があると思われた。

放射線の作用¹⁶⁾ には、直接標的に作用する直接作用と、生体の 60% から 80% を占める水に作用して生じた $\cdot\text{H}$, $\cdot\text{OH}$, O_2^- , e_{aq}^- , H_2O_2 などの Free radical が標的に作用する間接作用がある。これら Free radical は脂質から水素を引き抜いて radical 連鎖反応を起こしたり、蛋白を攻撃して高分子化あるいは低分子化を誘発し、また核酸塩基を攻撃する。この反応を繰り返すことにより、細胞膜機能の低下、損失、傷害をひきおこすことが知られている (Fig. 7)。SOD は、この Free radical を消去する Radical scavenger であり、各臓器の中でも肝臓が最も多量に SOD を含んでおり、肝照射により強く影響を受けられる。一般に、

肝疾患時では血漿 SOD 活性は上昇するとの報告¹⁷⁾が多く、壊死におちいった肝細胞からの逸脱によるものと考えられている。しかし、本実験では肝照射直後、有意に SOD 活性は低下した。これは、照射により生じた多量の Free radical 消去のため、大量の SOD の消費、放射線照射による失活または肝細胞からの分泌抑制などによるものと思われ、病理組織結果から照射直後肝細胞の壊死は認められなかったことから肝疾患における機序と異なるものと考えられる。

肝照射直後の著しい SOD 活性の低下は照射により生じた Free radical を十分に消去できず、Free radical による障害を強く受けていることを示唆する。このため、Free radical による蛋白自体の直接的失活および特に肝細胞膜が強く障害を受け肝合成蛋白の放出が抑制されたものと思われる。これは、肝の代表的な合成蛋白である Albumin および多くの凝固・線溶因子が照射直後活性低下または減少し、その後回復または、増加している結果から推察される。放射線照射ではないが H_2O_2 , KO_2 などの酸化剤により肝細胞からの Prothrombin の分泌抑制が認められたとの報告¹⁸⁾もある。特に、著明に延長した APTT は主として血中の内因系凝固因子の影響を反映することから、肝臓で産生される血中凝固因子の影響を強く受けたものと考えられる。また、その後3日から7日後に認められる活性の増加は、各因子の放出抑制のため蓄積されていた因子の放出および照射により当該蛋白産生シグナルによる mRNA の発現、増加などによる結果と考えられる。その後、低線量照射では、回復するも高線量照射群ではその後の肝細胞の線維化（病理所見により確認）により産生量が減少し、低下すると思われる。

また、炎症性肺疾患、消化器疾患、および虚血性疾患の多くでは、その発症に Free radical の関与が報告¹⁹⁾されている。また、ショック、DIC の原因は多様であるが、いずれも Free Radical 産生系が亢進し²⁰⁾、生体膜の酸化、血管内皮細胞障害、血小板凝集などを生じ病態を増悪させる。この様に放射線照射以外にも

Free Radical が凝固・線溶系に大きな影響を与えていると思われた。

ま と め

蛍光基質法による家兎血中凝固・線溶因子活性測定法を確立し、多くの凝固・線溶因子を産生する肝臓に放射線を照射し血中凝固・線溶活性と Free radical による放射線障害との関連を検討し、以下の結果を得た。

1) 照射直後から APTT, PT の延長を認め、特に 12 時間後もっとも延長し、3 日～5 日後回復した。

2) 凝固・線溶因子は照射直後活性低下を示し、3 日から 5 日後活性増加または回復を示した。この照射直後の活性低下は APTT, PT の延長と一致した。

3) SOD 活性および血中 Albumin 量は、照射直後有意に低下し、3～7 日後回復を示した後、10 日後より活性は低下した。

以上の結果より、肝照射直後 SOD 活性は低下し、多量の Free Radical が生じ、肝細胞膜障害のため、Albuminをはじめとする凝固・線溶因子などの肝合成蛋白の放出が抑制された結果 APTT, PT の凝固時間が延長したものと考えられる。

本実験により、放射線照射により生じた Free Radical に起因する凝固・線溶系への障害が明らかとなったものと思われる。

謝辞: 本実験に御協力頂いた丹羽直 元当教室大学院生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 松岡松三: Tyrosine 法による血漿フィブリノーゲンの定量法。臨床検査, 2: 61, 1958.
- 2) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S.: New fluorogenic substrate for a-Thrombin, Factor-Xa, Kallikreins and Urokinase. J. Biochem. 82: 1495～1498, 1977.
- 3) 浅井紀一: 合成基質による測定法。1. プロトロンビン pp. 532～537, 青木延雄, 柴田昭 編: 血液学研究検査法, 中外医学社, 東京, 1980.
- 4) Oyanagi, Y.: Reevaluation of assay methods and

- establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142**: 290~296, 1984.
- 5) 伊藤要子, 綾川良雄, 宮田伸樹: 全身照射家兎の血液凝固・線溶. *日本医放会誌* **44**: 73~87, 1984.
- 6) 伊藤要子: 血液凝固・線溶 (藤井達三, 渡辺富久子, 奥田潤 編: 臨床化学総論 第2改稿版), pp. 182~192, 広川書店, 東京, 1988.
- 7) 内藤博行: 凝血学的立場より見たるレ線障害についての実験的研究. *日本医放会誌* **19**: 2234~2265, 1960.
- 8) Jackson, D.P., Cronkite, E.P., Leroy, G.V and Helpert, B.: Further studies on the nature of the hemorrhagic state in radiation injury. *J. Lab. Clin. Med.*, **39**: 449~461, 1952.
- 9) Ponomarev, J.T.: Zur Frage der Bedeutung von Störungen des Koagulations und Fibrinolyse systems des Blutes in der Pathogenese der Blutungs- bere itschaft bei der akuten Strahlenkrankheit. *Radiol. Radiother.*, **7**: 47~54, 1966.
- 10) Kocmierska-Grodzka, D. Radway, J.: Hydro- proteolytic activity in rat's pancreas after irradiation. *Strahlentherapie*, **150**: 80~86, 1975.
- 11) Geber, G.B., Dancewicz, A.M., Bessemans, B. and Casale, G.: Biochemistry of late effects in rat lung after hemithoracic irradiation. *Acta. Radial. Therapy. Physi. Biol.*, **16**: 447~455, 1977.
- 12) Dancewicz, A.M. and Kubicka, t.: Late biochemical changes in the rat lung after whole body irradiation. *Nukleonika*, **21**: 1029~1035, 1976.
- 13) Svanberg, L., Astedt, B. and Kullander, S.: On radiation decreased fibrinolytic activity of vessel walls. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **55**: 49~51, 1976.
- 14) Tsao, C., Ward, W.: Plasminogen activity in Lung and alveolar Macrophages of rats exposed single dose of γ -rays to rat right hemithorax. *Radiation. Res.* **103**: 393~402, 1985.
- 15) Asted, B., Bergentz, S.E. and Svanberg, L.: Effect of irradiation on the plasminogen activator content in rat vassels. *Experimentia.*, **30**: 1466, 1974.
- 16) 浦野宗保訳, Hall, E.J. 著: 放射線の直接作用と間接作用 pp. 8~11, 放射線科医のための放射線生物学, 篠原出版, 東京, 1980.
- 17) 富樫整, 新沢陽英, 石川誠, ほか: ウイルス性肝疾患における肝組織および血清中 SOD 活性の検討. *肝臓*, **28**: 681~686, 1987.
- 18) 伴野雅洋, 浦山功, 浅田敏雄, ほか: モルモット肝細胞におけるプロトンビンの分泌抑制. *血液と脈管*, **19**: 462, 1988.
- 19) Wadhwa, S.S., Perry, M.A.: Gastric injury induced by hemorrhage, local ischemia, and oxygen radical generation. *Am. J. Physiol.* **253**: 129~133, 1987.
- 20) Yoshikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N. et al.: Effects of superoxide dismutase and catalase on disseminated intra vascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas.* **50**: 869~872, 1983.