加齢によるラット血中プラスミンおよびプラスミン阻害活性の 性差におよぼす影響について

小 島 尚

EFFECT OF AGING ON SEX-RELATED DIFFERENCES IN PLASMA PLASMIN AND PLASMIN-INHIBITING ACTIVITIES IN RATS

TAKASHI KOJIMA

Abstract

The purpose of this study was to determine whether aging influences sex-related differences in plasmin and plasmin-inhibiting activities in rats. We measured plasmin activity and plasmin-inhibiting activity in 5-, 12-, 45-, and 60-week-old male and female rats ; and we also examined the effects of a gonadectomy and sex hormone treatments in adult male and female rats. The present study showed that the plasmin activity was higher in male rats than in females in all four age groups, which confirmed our previous findings. However, there was no significant sex-related difference in plasmin-inhibiting activity among the four age groups. An increase in age induced a decrease in plasmin activity and plasmin-inhibiting activity in both male and female rats. An ovariectomy significantly boosted plasmin and plasmin-inhibiting activity in female rats. Estradiol treatment induced a decrease in plasmin activity of orchietomized male and ovariectomized female rats, and the plasmin-inhibiting activity of ovariectomized female rats. However, an orchietomy slightly boosted plasmin-inhibiting activity in male rats. Testosterone treatment, on the other hand, did not significantly influence plasmin activity and plasmin-inhibiting activity in orchietomized male and ovariectomized female rats.

It is suggested that estrogen regulates the system of plasmin and plasmin-inhibiting activities in rats, and a decrease of the plasmin and plasmin-inhibiting activities in aged rats is one of the reasons for more frequent thrombotic formation in aged rats.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2000, 49 : 277~284)

key word : sex-related difference, aging, plasmin activity, plasmin-inhibiting activity.

I. 緒 言

閉経前の女性を同世代の男性と比較すると、男性の方が女性よりも血栓性疾患の罹患率が高いこと¹⁾、また、実験動物でも雄の方が雌よりも形成しやすいこと²⁾が報告されている。血栓形成は血小板、凝固系、線溶系などの各種の要因が複雑に関連している。これまで、我々はラットを用いて雌雄の血栓形成の差異を検討した結果、血小板機能が雄の方が雌よりも高いことを明らかにした³⁾。また、アラキドン酸代謝産物でも、抗血小板作用や血管弛緩作用を有し血管壁で産生されるプロスタサイクリン(PGI₂)系は雄よりも雌の方が

高いこと⁴⁾、血小板凝集作用や血管収縮作用を有し血小板で産生されるトロンボキサン(TX)A₂系は雄の方が高いことを示した⁵⁾。しかし、線溶系のプラスミン活性は雄の方が雌よりも高いことも明らかとなり^{6~8)}、雄で血栓を溶解するプラスミン活性が高いことは雄の方が雌よりも血栓を発症しやすいことに相反する結果であった。血栓形成の雌雄の差異を血小板凝集能やプロスタノイド産生の性差だけで説明することはできない。さらに、加齢とともに血栓性疾患の増加が報告されているが⁹⁾、血圧の上昇⁹⁾や動脈硬化の発生¹⁰⁾などが一因といわれている。これらの基礎疾患の因子である凝固線溶系の機能において、線溶系の低下

や凝固系の亢進などにより血栓形成傾向にあることも指摘されている。今回、正常な雌雄ラットでは加齢とともに線溶系活性はいかなる変化を示し、雌雄の差異は加齢とともに変化するか、また、性腺摘除や性ホルモンを投与することにより雌雄の差異は変化するかを検討した。これにより、生理的変動や栄養状態などにおける運動の効果などを検討する場合、血液流動性に雌雄や月齢を考慮する必要があることを明らかにしたい。

II. 方 法

A. 実験動物

1. 加齢ラットの実験

4週齢の雌雄ウィスターラットをSLCより購入し、5週齢、12週齢、45週齢および60週齢まで飼料(CE-2)及び水道水を自由摂取させた。前記に示した各週齢において、エーテル麻酔下、腹部大動脈より抗凝固剤に3.8%クエン酸ナトリウムを用いて採血し、1700×g 10分間遠心分離し血漿を得たのち、使用時まで-80℃で保存した。血球数の測定は血球測定装置(F-800, 東亜医用電子)を用いた。また、血漿中の血小板数は 1×10^4 個/ μ l以下であった。

2. 性腺摘除およびホルモン投与ラットの実験

4週齢の雌雄ウィスターラットをSLCより購入し、5週齢において性腺摘除した。雄ラットでは24匹を4群に分け、3群18匹をエーテル麻酔下で両方の精巣を摘除した。雌ラットでは24匹を4群に分け、3群18匹をエーテル麻酔下で背部より両側の卵巣を摘除した。摘除3日後から、雌雄の性腺摘除した1群(6匹)にはテストステロン(和光, 生化学用)2 mg/kgを、雌雄の性腺摘除した1群(各6匹)にはエストラジオール(シグマ, E 8872)50 μ g/kgを、雌雄の性腺摘除した1群(6匹)および雌雄の正常群(各6匹)にはホルモンを溶解した綿実油を1 ml/kgを頸背部に週2回実験終了まで皮下投与した。ホルモン投与量は我々が以前行った血管壁および血小板のアラキドン酸代謝実験の投与量および投与期間を参考に行っ

た^{3,4)}。投与10週間後に、エーテル麻酔下採血を行い、加齢実験と同様に血漿を得た。

B. 線溶系活性の測定方法

1. ウロキナーゼ活性化プラスミン活性

以前、我々が報告した方法⁶⁻⁸⁾と同様に以下のように行った。ウロキナーゼ(UK)活性化プラスミン活性の測定は、血漿0.05 mlに0.05 mol/l トリス塩酸緩衝液(pH 7.4, 0.012 mol/l 塩化ナトリウム含有)0.05 ml および1/6 mol/l 塩酸0.1 mlを加え20分間室温に置いた。酸処理血漿に1/6 mol/l 水酸化ナトリウム0.1 mlで中和し、トリス塩酸緩衝液0.7 mlを加えた。血漿溶液0.1 mlに1000 U/ml UK(日立化成)0.05 mlを加え、37℃ 15分間加温した。血漿中のプラスミン活性は蛍光合成基質3105 V (Boc-GLU-Lys-Lys-MCA, ペプチド研)を用いて測定した¹¹⁾。UK 活性化プラスミン活性は3105 Vから遊離する蛍光物質(MCA)量とした。

2. プラスミン阻害活性

プラスミン阻害活性はKulftらの方法¹²⁾を参考にして以下のように行った。0.05 mol/l トリス塩酸緩衝液(pH 7.4, 0.012 mol/l 塩化ナトリウムおよび0.02% Tween 80含有)で20倍に希釈した血漿0.05 mlに、10 U/ml ラットプラスミン25 μ lを加え、37℃ 5分間加温した。プラスミン残存活性はプラスミンに対する合成基質3105 Vを用いて測定した。この残存活性からプラスミン阻害活性を求め、活性をUK 活性化ウシプラスミンで表し、3105 Vから遊離する蛍光物質(MCA)量とした。

C. 統計処理

結果は平均値と標準誤差(mean $\pm$ SE)で示し、student-t-testを用い、有意差検定の限界は5%以下とした。

III. 結 果

1. 加齢によるプラスミン活性の変化

各週齢における雌雄ラットのUK 活性化プラ

Fig. 1. UK-activated plasmin activity in young and aged male and female rats.

■ ; male rats, □ ; female rats.

The activity is presented as the percentage relative to the mean value obtained from the 5-week-old male rats. Values are the means $\pm$ SE of 6 animals.

Significantly different from the mean value of rats of the same-age male rats at * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$.

Significantly different from the value mean of 5-week-old each sex rat at ★ ; $p < 0.05$, ★★ ; $p < 0.01$.

スミン活性の結果を図1に示している。酸処理した血漿にUKを作用させプラスミノゲンから生じたプラスミンの活性をUK活性化プラスミン活性(以下、プラスミン活性)とした。プラスミン活性の結果は5週齢の雄ラットの活性を100%として相対活性で表している。以前、我々は雌雄ラットのプラスミン活性を測定した結果、雄の方が雌よりも活性が高いことを報告している⁶⁻⁸⁾。今回の結果でも、5週齢から60週齢の各週齢において、雄の方が雌よりも活性が高いことがこれまでの結果と同様に確認された。一方、雌雄別に各週齢の活性を比較すると、雌雄ともに5と12週齢には活性に変化は見られなかった。しかし、12週齢に比べて、45週齢では雌雄ともにプラスミン活性が有意に低下し、60週齢では雌雄ともにさらに活性が低下していた。今回の実験に用いた60週齢までのラットでは加齢とともにプラスミン活性が有意に低下したが、雌雄の差異に変化は認められなかった。

Fig. 2. Plasmin inhibiting activity in young and aged male and female rats.

■ ; male rats, □ ; female rats.

The activity is presented as the percentage relative to the mean value obtained from the 5-week-old male rats. Values are the means $\pm$ SE of 6 animals.

★ ; Significantly different from the value mean of 5-week-old each sex rat at $p < 0.05$.

2. 加齢によるプラスミン阻害活性の変化

図2は各週齢における雌雄ラットのプラスミン阻害活性の結果を示している。プラスミン阻害活性は5週齢の雄ラットの活性を100%として相対活性で表している。5週齢から60週齢の各週齢で雌雄を比較すると、いずれの週齢でも雄の方が雌よりも高い傾向にあったが、有意差はなかった。各週齢のプラスミン阻害活性を雌雄別に比較すると、5および12週齢では雌雄ともに変化は見られないが、雌雄ともに45週齢では5および12週齢よりも活性が低下する傾向にあり、60週齢では有意に活性が低下していた。今回の結果から、60週齢までの正常な雌雄ラットではプラスミン阻害活性は加齢とともに雌雄ともに活性が低下する傾向が、また、いずれの週齢でも雄の方が高い傾向にあるが有意差はなかった。

3. 性ホルモンのプラスミン活性への影響

性腺摘除した雌雄ラットおよび性ホルモンを投与した雌雄ラットにおけるプラスミン活性の変化を図3に示している。正常な雄ラットのプラスミン活性を100%として相対活性で表している。図1でも示したように雄の方が雌よりも有意に活性

Fig. 3. Effects of gonadectomy and sex hormones on UK-activated plasmin activity in rats.

■ ; male rats, □ ; female rats.

N; normal rats, G; gonadectomized male and female rats, G+T; testosterone-treated gonadectomized rats, G+E; estradiol-treated gonadectomized rats.

The activity is presented as the percentage relative to the mean value obtained from the normal male rats. Values are the means $\pm$ SE of 6 animals. Significantly different from the value mean of the normal male rats at *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$.

★; Significantly different from the value mean of the normal female rats at $p < 0.05$.

☆; Significantly different from the mean value of each gonadectomized rat at $p < 0.05$.

Fig. 4. Effects of gonadectomy sex hormones on plasmin inhibiting activity in rats.

■ ; male rats, □ ; female rats.

N; normal rats, G; gonadectomized male and female rats, G+T; testosterone-treated gonadectomized rats, G+E; estradiol-treated gonadectomized rats.

The activity is presented as the percentage relative to the mean value obtained from the normal male rats. Values are the means $\pm$ SE of 6 animals.

★; Significantly different from the mean value of the normal female rats at $p < 0.05$.

☆; Significantly different from the mean value of the ovariectomized female rats at $p < 0.05$.

が高いことがこの実験でも正常なラットでは確認された。この実験系において、雌ラットでは卵巣摘除することにより活性が有意に上昇し、精巣摘除した雄ラットの活性は有意に低下し、性腺摘除により雌雄がほぼ同レベルになった。精巣摘除した雄ラットにエストラジオールを投与すると、活性が精巣摘除ラットに比べてさらに低下したが、テストステロンを投与しても活性に有意な変化は見られなかった。一方、卵巣摘除した雌ラットにエストラジオールを投与すると、活性が卵巣摘除ラットに比べて有意に低下したが、テストステロンを投与しても活性は有意に変化しなかった。これより、性腺摘除した雌雄ラットではプラスミン活性に認められた雌雄の差異が減少し、上昇した活性はエストラジオール投与により有意に低下することがプラスミン活性に認められた。

4. 性ホルモンのプラスミン阻害活性への影響

図4は性腺摘除および性ホルモンを投与した雌雄ラットにおけるプラスミン阻害活性の変化を示している。正常な雄ラットのプラスミン活性を100%として相対活性で表している。図2の実験と同様に、プラスミン阻害活性にはプラスミン活性で認められるような雌雄の有意な差異が見られなかった。このようなプラスミン阻害活性でも、雌ラットでは卵巣摘除することにより活性が有意に上昇し、卵巣摘除した雌ラットにエストラジオール投与により活性は有意に低下し、正常な雌ラットの活性レベルになった。しかし、雄ラットでは精巣摘除しても活性は低下する傾向にあったが、精巣摘除ラットにテストステロン投与によってもエストラジオールを投与しても有意に活性に変化は認められなかった。これより、雄ラットでは精巣摘除や性ホルモンの作用は有意に認められなかったが、雌ラットでは卵巣摘除およびエスト

ラジオール投与の作用がプラスミン阻害活性に認められた。

IV. 考 察

プラスミンは正常な状態ではほとんど血中に検出されず、プラスミンの前駆体プラスミノゲンとして存在し、変換されたプラスミンもフィブリンと結合しないと直ちに阻害酵素により失活するといわれている¹³⁾。本検討では血漿を酸処理して阻害酵素を失活させ¹⁴⁾、ウロキナーゼによりプラスミンに変化させて測定しており、測定したプラスミン活性は血中に存在するプラスミノゲンを含めた血中総プラスミン活性と呼ぶべきものである。従って、血中の総プラスミン活性をプラスミン阻害活性と合わせて測定することは血栓溶解に直接関与する線溶系活性の潜在能力を含め、線溶系酵素を総合的に評価することができる。また、運動による効果や栄養による影響を血液流動性で検討する場合に簡便で有用な方法であり、加齢変動や雌雄の差異を明確にすることが線溶系活性を利用する場合に基礎的な知見を提供するものとなる。今回の実験では、幼若期の5週齢、成獣前期の12週齢、後期の45週齢および老齢前期の60週齢の正常な雌雄ラットにおけるプラスミン活性およびプラスミン阻害活性の測定を行い、さらに、性腺摘除した雌雄ラットや性腺摘除に性ホルモンを投与したラットでプラスミン活性およびプラスミン阻害活性を測定した。加齢により血栓溶解に直接関与する線溶系で雌雄の差異が変動するか、また、性ホルモンの影響はみられるかを検討した。

これまで、相馬らの報告では加齢によるヒトの血中プラスミノゲンは変化しなかったが、プラスミン阻害活性は加齢とともに低下することを報告している¹⁵⁾。一方、Hashimotoらの世代間比較によれば年齢とプラスミン阻害活性の増大には相関性があり、加齢とともに増大することが報告されている¹⁶⁾。実験動物においては、6ヶ月齢の雄ラットと24ヶ月齢の雌ラットで血中プラスミノゲンおよび $\alpha 2$ -アンチプラスミンを比較した結果、加齢による変動はなかったことが報告されている¹⁷⁾。この報告ではこの著者らの以前の实

験では雌雄ラットの活性に差異がないことから、生存月齢が長い雌と成獣の雄ラットの活性を比較している。これまで、加齢による線溶系の変動に関する報告は必ずしも一定の結果が得られておらず、ラットで雌雄を一致させた場合、加齢とともに線溶系の活性は変動するのか不明のまま残されている。今回の実験では幼若期から老齢前期までの雌雄ラットについて線溶系酵素活性を比較したところ、血中のプラスミン活性もプラスミン阻害活性も雌雄ともに加齢とともに活性が低下することが明らかになった。

以前から加齢に伴って各種の代謝酵素で活性が減少したり、不活性化することが明らかになっている^{18,19)}。老齢ラットの肝臓ではグルタミンシテターゼおよびグルコース6リン酸デヒドロキシラーゼが成獣ラットと比較すると酵素の免疫交差に変化はないが、活性が低下することが報告されている²⁰⁾。この原因を検討した実験では酵素が酸化的変性を受けることにより失活すること、また、老齢ラットで成獣ラットに比べ、肝臓の酸化障害を受けたタンパク質を除去するプロテアーゼ活性が低下が起こり、酸化変性を受けた酵素が老化とともに蓄積することが示されている²¹⁾。測定した線溶系酵素のプラスミン活性のチモーゲンであるプラスミノゲンおよびプラスミン阻害酵素の中心的な酵素である $\alpha 2$ -アンチプラスミンのいずれも、肝臓が主な産生部位であると言われる^{22,23)}。肝臓の線溶系酵素活性を今回の実験では測定しなかったが、加齢により血中の線溶系酵素活性の低下した原因は肝臓での酵素の産生能が低下しているか、酵素の産生能に変化は見られないが構造的変化を生じているか、あるいは、産生された酵素が他のプロテアーゼで示されているように酸化的障害を受けやすくなるなどのいずれかの理由により、また、これらの複合的な原因により酵素活性が低下している可能性があり、このような要因により加齢に伴って線溶系酵素活性も低下したと考えられた。

プラスミン活性は正常な雄ラットの方が雌よりも高いこと⁶⁾、また、遺伝的および実験的な高血圧ラットでも雌雄の差異は同様に認められること

を我々は明らかにした^{7,8)}。プラスミン阻害活性において、Smokovitisらは心臓や動脈のプラスミン阻害活性が雄の方で雌よりも高いことを報告している²⁴⁾。今回の実験は血中で測定した結果に有意差は認められなかったが、彼らの報告と同様に雄の方が雌よりも活性は高い傾向にあった。そこで、性ホルモンのプラスミンおよびプラスミン阻害活性に及ぼす作用が認められるかを検討した。性腺を摘除した雌雄ラットにおいて、プラスミン活性は性腺摘除により雌雄の差異が消失した、また、プラスミン阻害活性は雌で卵巣を摘除したことにより、活性が増大し正常な雄レベルより亢進していた。性腺摘除したラットに性ホルモンを投与することにより、雌雄の差異は回復するかについて検討した。テストステロンを投与しても、性腺摘除した雌雄ラットのプラスミンおよびプラスミン阻害活性に大きな影響を与えなかった。一方、卵巣を摘除した雌ラットにエストラジオールを投与すると、プラスミン活性およびプラスミン阻害活性は低下することが認められた。この結果、性ホルモンにより線溶系酵素活性が作用を受けている可能性が示された。プラスミノゲンおよび α 2-アンチプラスミンの主要産生部位である肝臓にテストステロンおよびエストラジオールのレセプターが存在することが報告されており^{25,26)}、肝臓でこれら酵素の産生が性ホルモンにより制御されていることが考えられた。テストステロンの作用はエストラジオールの作用に比べ明確ではない部分があった。今回用いたホルモン投与量は以前、我々が行った血小板や血管壁などのエイコサノイド代謝に関連した実験の方法や投与期間等を参考に実験を行った。その原因を明らかにできなかったが、作用する組織や臓器によりテストステロンに対する感受性に相違があるため生じた可能性が考えられる。

これまで、我々は血栓形成の雌雄の差異の原因を明らかにするため、血小板機能や血管壁でのプロスタノイド産生の雌雄の差異を明らかにし、性ホルモンにより制御されていることを明らかにしてきたが、今回の結果は線溶系酵素活性にも雌雄の差異が存在し、同様に性ホルモンの作用を受け

ている可能性が示唆された。我々の以前の報告では、血小板凝集能抑制作用や血管拡張作用を有し、血管で産生されるPGI₂は雌の方が雄よりも高く、また、エストラジオールによりPGI₂および代謝産物の6-keto-PGF_{1 α} 産生が増大することを示している⁴⁾。血栓形成の引き金となる血小板凝集能が雄の方が雌よりも高いこと、また、血小板で産生され、血小板凝集能の亢進作用や血管収縮作用を有するTXA₂の代謝産物のTXB₂産生は雄の方が高いことを報告している⁵⁾。これらの結果はいずれも雄の方が雌よりも実験的血栓を形成しやすいことが裏付けられている。一方、プラスミン酵素活性は雄の方が雌よりも高いことは雄で雌よりも血栓形成傾向にあることと相反しているが、一つには他の血栓形成要因を補完するよう線溶系機能が亢進している可能性が考えられた。しかし、プラスミンの働きは血栓溶解のみならず、内皮細胞やその他細胞でプラスミノゲンのレセプターが存在し、活性化されたプラスミンは直接に、また、コラゲナーゼなどのプロテアーゼを介する間接的な作用により細胞外マトリックスを分解すること²⁷⁾、また、動脈硬化の成因でも内皮細胞の傷害やタンパク分解の働きにより進展すること²⁸⁾、さらに、炎症や創傷治癒などの生理現象にも重要な役割を有すること²⁹⁾が報告されている。血栓性疾患の発症では血栓や梗塞を原因とする以外に、出血性の因子や動脈硬化による血管壁の病変も心筋梗塞や脳梗塞などの血栓性疾患の発症の要因になっている。従って、プラスミン活性が雄で雌よりも高いことが血栓性疾患の性差と相反するものではなく、血栓形成を増幅する一因と捉えられる。

閉経後の女性では血栓性疾患の罹患率は男性との差異が減少するといわれるが、今回の実験では線溶系酵素活性に正常な老齢前期までの雌雄ラットには差異が認められた。また、雌ラットでの性周期による線溶系酵素活性の変動は、今回の結果には示さなかったがプラスミン及びプラスミン阻害活性に有意な影響は見られず、プラスミン活性に有意な雌雄の差異を認めた。老齢前期まで性差が認められた原因には性差が消失するまで老齢化

していない,あるいはヒトとラットとの加齢には相違があるなどの動物に由来する原因か,また,線溶系活性には性差はみられても他の血小板や凝固系等の因子による影響を受けるため血栓形成での性差が消失している可能性などがあげられる。

以上の結果から,正常なラットの線溶系酵素活性は加齢とともに低下することが明らかになり,その活性に存在する雌雄の差異はエストロゲンにより制御されていることが示めされた。また,血液流動性における運動の効果や栄養状況による影響を検討する場合,線溶系酵素活性系の結果からも雌雄や月齢による差異を考慮する必要性が示された。

V. 要 約

プラスミン活性は雄の方が雌よりも高いことを報告しているが,5週齢,12週齢,45週齢および60週齢の雌雄ラットの線溶系活性はいかなる変動が認められるかを,また,性腺摘除や性ホルモン投与により線溶系活性は変動するかを検討した。

1. 加齢によりプラスミン活性およびプラスミン阻害活性はともに低下するが,雌雄の差異は存在することが示された。
2. プラスミン活性はいずれの週齢でも雄の方が雌よりも高いことが確認されたが,プラスミン阻害活性は雌雄に有意な差異は認められなかった。
3. プラスミン活性の雌雄の差異は性腺摘除することにより消失し,また,プラスミン阻害活性で見られた雄が高い傾向も消失した。
4. エストラジオールを投与することにより,プラスミンおよびプラスミン阻害活性が低下することが認められた。

以上の結果から,正常なラットの線溶系活性には雌雄の差異が存在し,性ホルモンによる制御を受けている可能性が示めされた。また,雌雄ともにプラスミンおよびプラスミン阻害活性が加齢とともに低下し,血栓形成傾向の増大の一因になると考えられた。

謝 辞

本研究は神奈川県重点基礎推進事業の助成を受けて行われた。本研究遂行にあたり終始ご指導いただいた神奈川県衛生研究所食品薬品部元部長 堀口佳哉博士に深くお礼申し上げます。

(受理日 平成11年12月22日)

引 用 文 献

- 1) 上田一雄. 久山町における脳血管障害の変貌, 脳卒中, (1991), **13**, 464-469.
- 2) Uzunova, A. D., Ramey, E. R. and Ramwell, P. W. Effect of testosterone, sex and age on experimentally induced arterial thrombosis. *Nature*, (1976), **261**, 712-713.
- 3) Morikawa, M., Kojima, T., Inoue, M. and Tsuboi, M. Sex differences in the effect of aspirin on rat platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. *Japan. J. Pharmacol.*, (1985), **37**, 317-323.
- 4) Morikawa, M., Kojima, T., Inoue, M. and Tsuboi, M. Sex differences in the inhibitory effect of aspirin on prostacyclin production in rat aortas. *Japan. J. Pharmacol.*, (1984), **35**, 1-7.
- 5) Morikawa, M., Kojima, T., Inoue, M. and Tsuboi, M. Sex difference in the effect of aspirin on intracellular Ca^{2+} mobilization and thromboxane A_2 production in rat platelets. *Japan. J. Pharmacol.*, (1986), **40**, 463-468.
- 6) Kojima, T., Inoue, M., Morikawa, M. and Horiguchi, Y. Contribution of plasmin to sex differences in platelet aggregation in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, (1993), **82**, 351-356.
- 7) Kojima, T., Doi, K., Kishi, M. and Horiguchi, Y. Comparison of plasma total plasmin activities in male and female hypertensive rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, (1995), **88**, 233-236.
- 8) 小島 尚. L-N-ニトロアルギニン誘発高血圧ラットにおける血液凝固・線溶系の検討. *医学と生物学*, (1997), **134**, 155-159.
- 9) SHEP Cooperative Research Group: Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. *JAMA*, **265**, (1991), 3255-3264.
- 10) 大山俊郎, 血管と老化. *動脈硬化*, (1991), **19**, 123-127.
- 11) Kato, H., Adachi, N., Ohno, Y., Iwanaga, S., Takada, K. and Sakakibara, S. New fluorogenic peptide substrates for plasmin. *J. Biochem.*, (1980), **88**, 183-190.
- 12) Kulft, C., Wijngaards, G. and Van Voorthuizen, H. Revised reference curve for the α 2-antiplasmin assay by the addition of detergents. *Thromb. Haemost.*, (1984), **51**, 297-301.
- 13) 松尾 理. 血液凝固系のメカニズム, t-PA と Pro-UK, 学際企画, 東京, (1986), 41-59.
- 14) 伊藤要子, 水谷洋子, 山田 学, 宮田伸樹, 山田

- 高路, 小栗 隆. 急性アルコール投与によるハムスターの凝固・線溶, 血栓止血誌, (1990), **1**, 134-140.
- 15) 相馬正幸, 前田義久, 上田昌典, 笠倉新平, 島田逸人, 高島英世, 高田明和, 高田由美子. 加齢に伴う血中 plasminogen, α 2-PI, t-PAantigen および PAactivity の変動. 血液と血管, (1987), **18**, 385-387.
 - 16) Hashimoto, Y., Kobayashi, A., Yamazaki, N., Sugawara, Y., Takada, Y. & Takada, A. Relationship between age and plasma t-PA, PA-inhibitor, and PA activity. *Thromb. Res.*, (1987), **46**, 625-633.
 - 17) Emeis, J. J., Brouwer, A. Barelds, J., Horan, M. A., Durham, S. K. & Kooistra, T. On the fibrinolytic system in aged rats, and its reactivity to endotoxin and cytokines. *Thrombosis and Haemostasis*, (1992), **67**, 697-701.
 - 18) Finch C E. Enzyme activities, gene function and aging in mammals, *Exp. Gerontol.*, (1972), **7**, 52-67.
 - 19) Dreyfus, J.-C., Kahn, A. & Schapira, F. Posttranslational modification of enzyme, *Curr. Top. Cell. Regul.*, (1978), **14**, 243-297.
 - 20) Fucci L, Oliver, C. N., Coon, M. F. & Stdtman, E. R. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1983), **80**, 1521-1525.
 - 21) Starke-Reed, P. E. and Oliver, C. N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1989), **275**, 559-567.
 - 22) Saito, H., Hamilton, S. M., Tavill, A. S. Louis, L. and Ratnoff, O. D. Production and release of plasminogen by isolated perfused rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980), **77**, 6837-6840.
 - 23) Hogstorp, H. and Saldeen, T. Synthesis of alpha2-antiplasmin by rat liver cells. *Thromb. Res.*, (1982), **28**, 19-25.
 - 24) Smokovitis, A., Kokolis, N., and Tsandarliotou, M. Circadian variation of plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibitor and plasmin inhibition in aorta, heart, brain and lungs of the rat sex-related differences. *Thromb. Res.*, (1993), **69**, 425-433.
 - 25) Eagon, P. K., Seguiti, S. M., Rogerson, B. J., McGuire, T. F., Porter, L. F. and Seeley, D. H. Androgen receptor in rat liver: Characterization and separation from male-specific estrogen-binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1989), **268**, 161-175.
 - 26) Aten, R. F., Dickson, R. B. and Eisenfeld, A. J. Estrogen receptor in adult male rat liver. *Endocrinology*, (1978), **103**, 1629-1635.
 - 27) Durliat, M., Komano, O., Corre, P., Bertrand, O., Cohet, S., Caignard, A., Martin, F. and Burtin, P. Plasminogen receptors on rat colon carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, (1992), **66** 51-56.
 - 28) Bauer, P. I., Machovich, R., Buki, E. G., Csonka, E., Koch, S. A. and Horvath, I. Interaction of plasmin with endothelial cells. *Biochem. J.*, (1984), **218** 119-124.
 - 29) Stephens, R. W., Pollanen, J., Tapiovaara, H., Leung, K.-C., Sim, P.-S., Salonen, E.-M., Ronne, E., Behrendt, N., Dano, K. and Vaheri, A. Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: A proteolytic with surface-bound reactions. *J. Cell Bio.*, (1989), **108** 1987-1995.