



# 人乳におけるプラスミノゲン活性化系の研究：人乳中のプラスミノゲン・アクチベーター（ミルク・アクチベーター）とウロキナーゼとのフィブリノゲン結合における差異

堀江, 登

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1980-02-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0673

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000673>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	ほり 堀	え 江	のぼる 登	(福岡県)
学位の種類	医学博士			
学位記番号	医博ろ第 586 号			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位授与の日付	昭和 55 年 2 月 27 日			
学位論文題目	人乳におけるプラスミノゲン活性化系の研究 IV. 人乳中のプラスミノゲン・アクチベーター (ミルク・アクチベーター)とウロキナー ゼとのフィブリン結合における差異			
審査委員	主査 教授 岡本 彰 祐 教授 山口 延 男 教授 松尾 保 教授 埴 功			

## 論文内容の要旨

### 緒 言

生体内における何らかの原因によるフィブリン析出は血栓形成をおこすが、この血栓は活性化された線維素溶解系(線溶系)により除去されうる。この線溶現象は、線溶系の自然阻害物質が多量に存在する血液中においても容易に出現する。また一方この血栓溶解は、合成線溶阻害物質である EACA 又は t-AMCHA の存在下では抑制されることも周知の事実である。

申請者は血栓溶解におけるプラスミノゲン活性化機序をフィブリンとの関連において研究しようとして本研究を企画した。プラスミノゲン・アクチベーターとしては申請者らがはじめて部分純化した人乳アクチベーター(参考論文 3, 日血会誌, 第 43 巻, 第 3 号)を使用し、そのフィブリン塊へのとり込み、フィブリンとの結合性、およびこれらに対する合成線溶阻害物質の作用等を検討した。

結果として、人乳アクチベーターは、形成されるフィブリン塊中にとり込まれ、フィブリンと特異的に結合することが明らかにされた。また結合したアクチベーターは、低濃度の線溶阻害物質で特異的に溶出され、またこれらにより、アクチベーターとフィブリンとの結合も阻害されることが明らかにされた。これらの研究からプラスミノゲン活性の場としてのフィブリンが浮彫りにされ、また合成線溶阻害物質の作用の今まで知られていなかった一面が示された。

### 実験成績

#### A 人乳中のプラスミノゲン・アクチベーター(ミルク・アクチベーター)

人乳中のプラスミノゲン・アクチベーター活性は、成乳ではほとんど認められないが、初乳およ

び移行乳では高い(参考論文4, Acta Haem. Jap., 第43巻 掲載予定)。したがって本研究では分娩後5~10日に採取した母乳からアクチベーターを精製した。遠心分離によりクリームを除去したスキムミルクを, さらにクロロホルムで脱脂し, 硫酸塩析, セファテックス・ゲル透過により精製した。

このアクチベーターは, さらにイオン交換クロマトグラフィーで純化した後の成績で, 分子量約86,000, pH 7.2, 6.9および6.6に等電点をもつタンパクであり, ウロキナーゼ(UK)とは物理化学的性質の異なる因子であった(参考論文3, 日血会誌, 第43巻, 掲載予定)。

## B ミルク・アクチベーターとフィブリンとの結合

### 1. フィブリン塊へのとり込み

ミルク・アクチベーターの存在下にフィブリノーゲンにトロンピンを加えてフィブリンを作製し, フィブリンを除去した反応液中の残存アクチベーター量を測定し, フィブリンのアクチベーターとり込み率を計算した。とり込み率はフィブリノーゲン濃度と共に上昇したが, 70~80%で平衡に達した。

ミルク・アクチベーターの代わりにUK(分子量53,000および33,000の2者を使用)を使用した場合にはUKはフィブリン中にとり込まれなかった。

### 2. フィブリン線維とミルク・アクチベーターとの結合

あらかじめ作製したフィブリン線維をミルク・アクチベーター液に浸し, とり出した後十分洗浄し, 単に付着しているアクチベーターを除去し, 結合アクチベーター量を次のようにして測定した。このフィブリンをプラスミノゲン液中に浸して保温し, フィブリン溶解をおこさせ, 一定時間後の残存フィブリン量から, 結合アクチベーター量を推定した。

この実験でフィブリンを浸したアクチベーター液中のアクチベーター濃度に比例してフィブリンへのアクチベーターの結合量が増加する, という成績がえられた。

この実験でもUKはフィブリンと結合しなかった。

## C フィブリンに結合したミルク・アクチベーターの分離

B1でフィブリン塊中にとり込まれたアクチベーターは緩衝液でくり返し洗浄しても分離せず, フィブリンとの間に何らかの分子間結合が起っていることを推定させた。このアクチベーターの分離には, KSCN, KCl, NaClでは1モル以上の濃度が必要であった。しかし, リジン, EACA, t-AMCHAでは $10^{-2}$ モルでも上記の高濃度塩溶液と同様の効果があった。

## D アクチベーターのフィブリンへの結合阻害

B1の反応液中に種々のアミノ酸を混合しておき, フィブリンのアクチベーターとり込みに対する阻害効果をみた。

結果は, リジン, アルギニン, グリシンではNaClと同様, 高濃度でもとり込み阻害は起らなかった。しかし, EACA, t-AMCHAでは明らかな阻害効果が認められた。50%阻害は, EACAでは $2.5 \times 10^{-3}$ モル, t-AMCHAでは $7 \times 10^{-4}$ モルであり,  $10^{-2}$ モルのEACAでは80%阻害, t-AMCHAでは92%阻害が認められた。

## 考察ならびに結論

実験成績 A で記載したように、ヒトの初乳および移行乳から精製したミルク・アクチペーターを使用した B1 および B2 の成績は次の事実を示す。(1) 本アクチペーターは、フィブリノーゲンからフィブリンが形成される際にフィブリン塊中にとり込まれる。(2) すでに形成されているフィブリンにもよく結合する。

この事実は、文献的にすでに知られているプラスミノゲンのフィブリンへの特異的結合と考え合わせると、フィブリン上でのプラスミノゲンの活性化を強く示唆する。これらの結合に際してフィブリン塊中では、プラスミノゲンやアクチペーターの濃度に比べて血漿中の自然阻害物質が少ない条件が作られることが予想される。フィブリンの形成がプラスミンの活性を著明にするというすでに知られている事実も、プラスミノゲン活性化の場をフィブリンが提供する、という考え方で説明されよう。

このようなフィブリンとの結合は尿中のアクチペーターである UK ではまったく認められない。この事実は、合成基質で測定した力価と、フィブリン分解で定めた力価とが、ミルク・アクチペーターと UK では必ずしも同一でない場合があることの理由を説明する。

このアクチペーターとフィブリンとの結合を示唆する研究は、すでに、組織から抽出したアクチペーターで行われているが、ミルク・アクチペーターで得られた申請者の成績は、ミルク・アクチペーターが UK 型ではなく、組織アクチペーター型のプラスミノゲン・アクチペーターであることを示している。

C の成績から、フィブリンに結合したアクチペーターは、機械的洗浄では分離せず、その分離には高濃度の塩溶液又は特殊なアミノ酸が必要であることが示された。このアミノ酸は、リジン、EACA、t-AMCHA であり、何れも線溶阻害作用をもつものであった。とくに EACA および t-AMCHA は臨床的にひろく使用されている合成線溶阻害剤である。

D の成績からは、EACA および t-AMCHA は、一度結合したアクチペーターを分離するのみならず、アクチペーターとフィブリンとの結合をも阻害することが示された。

C および D でみられた事実は、プラスミンの特異的酵素阻害剤として報告されている EACA および t-AMCHA の線溶系阻害機序に別の阻害様式の存在の可能性を示唆した。

以上、本研究は、血液中の血栓溶解の機序、および合成特異的線溶阻害物質の作用について新しい見解を示したものと考える。

## 論文審査の結果の要旨

### I 本研究の意義

生体内の線溶系の生理学的、病態生理学的意義については今日論をまたないところである。従って線溶に関与する因子に関する研究も進展し、プラスミノゲン、フィブリノーゲン、あるいはウロキナーゼ (UK) 等に関する知見は文字通り山積しつつあるが、組織性あるいは (UK を除く) 体液性アクチペーターに関する研究は、種々の技術的理由により、今日尚その進展をはばまれている

現状である。

申請者らは、たまたま人乳、特に初乳がアクチペーターの好個の材料であることを見出し、人乳がプラスミノーゲンをほとんど含まないこと等の利点を利用して、アクチペーターの部分純化を行うと共に、アクチペーターのフィブリンへのとり込みおよびリジン、EACA、t-AMCHA等によるフィブリン結合アクチペーターの遊離等の諸事実を明らかにすることに成功し、線溶系研究に貴重な礎石を提供した意義は大きい。

## II 方法ならびに結果について

(1) 人乳に存在するプラスミノーゲン、アクチペーターに関する研究は、古くAstrup & Stern-doff (1953)にさかのぼるが、申請者らがヒトの初乳にアクチペーター活性の高い標本が高い頻度で発見されることを報告して以来、ヒトのミルク・アクチペーターの実験的研究がはじめて事実上可能となった。すなわち、人乳より得たスキムミルクのクロロホルム脱脂後、硫酸塩析、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー等により、分子量86,000、pH7.2、6.9、および6.6に等電点をもつタンパクを分離した。純化係数は580ないし約3,000であった。なお、この活性は明らかにUKとは異った。

(2) 次に、アクチペーターとフィブリンとの結合について検討した。この際分子量53,000 および33,000のUK標本が対照として使用された。

実験の結果、i) フィブリンノーゲン、アクチペーター、トロンビンの系および ii) フィブリン、アクチペーターの系において、フィブリンノーゲンの濃度に依存し、あるいは加えたアクチペーターの濃度に依存して、フィブリン塊に吸着されるアクチペーター量が見事に増加する事実が示されたことは注目に値する申請者の発見であった。なお、この性質はUKにはみられなかった。さらにこの事実から、ミルク・アクチペーターのUKと異なる性質が示された。

(3) フィブリンと結合したアクチペーターは、洗浄によっては分離しないが、1モル以上のKSCN、KCl、NaCl等の塩溶液により遊離した。さらに興味深いことは、 $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$ モルのEACAおよびt-AMCHAでアクチペーターが放出されたことであった。またアクチペーターとフィブリンの結合は低濃度のEACAおよびt-AMCHAで阻害された。

上記の事実は、プラスミンおよびアクチペーターの特異的阻害物質として知られるEACAおよびt-AMCHAの線溶阻害に、別の阻害様式が存在することを示した重要な知見である。なお、使用したフィブリンノーゲンまたはフィブリンにはプラスミノーゲンは含まれていない。

## III 結 論

本研究は、従来ほとんど研究されていなかった人乳の線溶系の特徴を明らかにすると共に、そのアクチペーターの部分純化に成功し、さらにこのアクチペーターのフィブリンとの結合ならびにEACAまたはt-AMCHAによる遊離あるいは結合の阻害の事実を明らかにしたものであって、意義ある集積と認める。よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。