

〔原 著〕

## 内因性線溶に関する研究：活性化と阻害について

佐藤雅寛男

東日本学園大学歯学部内科学講座

(主任：安河内太郎教授)

## Studies on Intrinsic Fibrinolysis: Activation and Inhibition

Masahiro SATOH

Department of Internal Medicine, School of Dentistry,  
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Tarou YASUKOUCHI)

### Abstract

The activation of coagulation Factor XIII results in initiation of the intrinsic fibrinolysis. This study was carried out to clarify what promoting and inhibitory factors are related to the process.

(1) Promotion ① In vitro: The fibrinolytic activities were determined by the contact activation of Factor XIII with four reagents, kaolin, dextran sulphate, ellagic acid and celite. Kaolin showed the strongest effect on increasing in fibrinolysis, which was caused via prekallikrein, namely Factor XIII dependent pathway. Though the potency of dextran sulphate to activate prekallikrein was weak, but it enhanced the fibrinolysis independently of Factor XIII. ② In vivo: No contact activating reagent to use in man was available, so any experiment was not done.

(2) Inhibition ① In vitro: It is known that contact factors (Factor XIII, Factor XI, prekallikrein and high molecular weight kininogen as cofactors) are under the regulation of C1-inhibitor. To investigate the role of C1-inhibitor in regulation of the intrinsic fibrinolysis, normal healthy subjects and a patient of hereditary angioneurotic edema were examined. By the inactivation of C1-inhibitor, using its blocking reagent, flufenamate, normal plasma showed an increase in fibrinolysis. In plasma of a patient of hereditary angioneurotic edema, conversion of prekallikrein to kallikrein was easily occurred and the fibrinolytic activity was

very high with or without activating reagents.

② In vivo: At the point of view that C1-inhibitor regulates the intrinsic fibrinolysis, flufenamate was administrated in three healthy subjects. They showed an enhancement of fibrinolysis and prekallikrein activation by the administration. It is the first report to recognize the manifestation of the intrinsic fibrinolysis in vivo, by the method of inactivation of C1-inhibitor.

It is suggested that Factor XIII plays an important role in the initiation of rather the fibrinolytic system than the coagulation system.

key words : intrinsic fibrinolysis, contact activation, coagulation Factor XIII, C1-inhibitor, prekallikrein.

## 結 言

血漿が有する線維素溶解能（線溶性）は外因性<sup>1)2)3)</sup>および内因性<sup>4)5)6)</sup>線溶に分類される。外因性線溶はtissue plasminogen activator (tPA)<sup>7)</sup>によってもたらされるが、近年、その研究は著しい成果を挙げた。今日、すでにtPAは分離精製され、遺伝子工学的製造もされるようになり臨床応用の段階に入っている<sup>8)9)10)</sup>。

一方、内因性線溶は接触因子すなわち凝固第XIII因子（XIII因子）、Prekallikrein (PK)、凝固第XI因子（XI因子）、の活性化によってもたらされるが<sup>11)12)13)</sup>、この際cofactorとしての高分子キニノーゲン（High molecular weight kininogen:HMWKgn）が必要とされる（XIII因子依存性経路）。その他、XIII因子非依存性の線溶活性化経路として血中のprourokinase (Pro-UK)が関与する<sup>14)15)</sup>。これらの内因性線溶の生体における意義は安静時の基本的な血栓防御機転のひとつと考えられるが、その発現の機序は、いまだ不明な点が多い。本研究では内因性線溶のinitiatorとしてのXIII因子および、それに引き続き活性化されるPK、XI因子の役割を明らかにせんと試みた。この検討のためには内因性線溶を規定する、促進系の活性化物質と阻害因子の不活性化の条件を明らかにする必要がある。接

触因子の活性化には陰性荷電の存在が重視され<sup>18)</sup>、生体内成分ではcollagen fiber<sup>16)17)</sup>が、in vitroではkaolin<sup>19)</sup>、dextran sulphate (DXS)<sup>20)</sup>、ellagic acid<sup>20)</sup>、およびcelite<sup>18)</sup>などについて検討がされてきた。

一方、接触系の阻害因子としてはC1-inhibitor (C1-INH)、 $\alpha_2$ macroglobulin ( $\alpha_2$ M) その他のantiplasminが関与するとされている<sup>21)22)</sup>。線溶活性の測定は検体としてeuglobulin fraction<sup>24)</sup>(Eug. Fr.)が用いられてきたが、このFr.には既知のplasmin inhibitor (Pln. INH)としては特に、C1-INHの残存が認められる<sup>25)</sup>。また、このC1-INHはflufenamic acid (flufenamate : FLUF)によって阻害されることが知られている<sup>26)</sup>。

本研究では健常人、XIII因子欠乏血症（Hageman trait）、および、遺伝性血管神経性浮腫（Hereditary angioneurotic edema : HANE）において、内因性線溶の促進系、および、阻害系について検討した。接触因子の活性化には前述のkaolin等4種類の活性化剤を用い、C1-INHの不活性化にはFLUFを用いた。また、線溶活性の発現はフィブリン平板<sup>27)</sup>および、crossed immunoelectrophoresis (CIE)による免疫学的反応により判定した。

## 材料および方法

### 1. 検体および採血

すべての採血は早朝空腹時に原則的に駆血帯を用いず、外因性線溶の活性化を避けて行われた。正常健康人、遺伝性血管神経性浮腫の症例(17歳女子)よりクエン酸加血漿を採取し、直ちにあるいは測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結保存し、検体とした。Ⅷ因子欠乏血漿はGeorge King Bio-Medical, Inc., Kansas City, U. S. A.のものを用いた。

### 2. Eug. Fr.の作製

血漿1 mlに冷却蒸留水9 mlを混じ、0.25%酢酸でpH5.9とした後、 $4^{\circ}\text{C}$ に30分間放置し、 $4^{\circ}\text{C}$ で5分間2,000rpmで遠沈した。生じた沈殿を1 mlのethylenediamine tetraacetate (EDTA) buffer (0.005M Sodium diethylbarbiturate, 0.25% Gelatin, 0.1M NaCl, 2.7mM EDTA, pH7.8)で再溶解したものをRegular Eug. Fr. (Reg. Eug. Fr.)とした。活性化剤は、kaolin, DXS (Dextran T500, mw50万, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), ellagic acid, celite (Johns-Manville Sales Corp., Denver, U. S. A.: Celite 512)の4種を使用した。活性化Eug.Fr.の作製は各活性化剤のEDTA bufferの溶液1 ml, 血漿1 mlおよび冷却蒸留水8 mlを混じ、以下Reg. Eug. Fr.と同様に作製した。

### 3. フィブリン平板 (fibrin plate) の作製および線溶活性の測定

Bovine plasminogen-rich fibrinogen (第1化学薬品, 東京, 以下, 第1化学)の0.1%溶液6 mlにThrombin (持田製薬, 東京, 以下持田)の0.1%溶液0.2mlを加えてプラスチックPetri dishに注ぎ, Astrup法<sup>28)</sup>に準じてフィブリン平板を作製した。線溶活性はEug. Fr.の $30\mu\text{l}$ をフィブリン平板にのせ、 $37^{\circ}\text{C}$ で18時間放置後、フィブリン溶解窓の直径を測定した。C1-INHの

阻害目的でFLUFを添加する際は, Eug. Fr.上に重層(終濃度2 mM)して用いた。Fibrinogen溶解液の組成は以下のごとくである: 0.05M Sodiumdiethyl barbiturate, 0.093M NaCl, 1.66mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.69mM  $\text{MgCl}_2$ , pH7.8. また, Thrombin溶解液は以下のごとくである: Bovine Thrombin 5,000 NIH units, 0.25% Gelatin, 250ml Saline (Thrombin終濃度20u/ml).

### 4. 血漿蛋白の免疫学的測定

Plasminogen (Plg.), C1-INH, Antithrombin III (AT-III),  $\alpha_2$ -Macroglobulin ( $\alpha_2\text{M}$ ),  $\alpha_1$ -Antitrypsin ( $\alpha_1\text{AT}$ )は, M-Partigen (Behring Insitut, Frankfurt, Germany, 以下Behring),  $\alpha_2$ -Plasmin inhibitor ( $\alpha_2\text{PI}$ )は持田の抗血清を用いsingle radial immunodiffusion法<sup>29)</sup>で測定した。

### 5. PK活性の測定

血漿および活性化剤を $4^{\circ}\text{C}$ 下に等量混合し、合成基質S-2302 (H-D-Proryl-L-phenyl-alanyl-

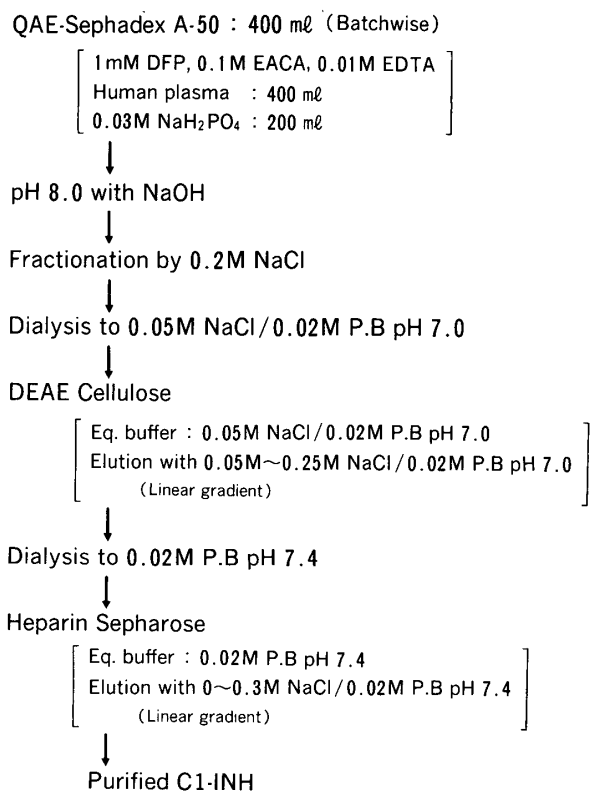


Fig. 1 PURIFICATION OF C1-INH

arginine-p-nitroanilide dihydrochloride. KabiVitrum, Molndal, Sweden, 以下, Kabi) を基質として end point法<sup>30)</sup>で測定した。PK activator は ellagic acid, cephalin, XIII 因子および, HMWKgn を含む Kabi のものを使用した。

## 6. C1-INH 活性の測定

C1-INH の活性は C1s の N- $\alpha$ -Acetylglycyl-L-Lysine Methyl ester (AGLMe) 水解能を阻害する効果で測定した<sup>31)</sup>。C1-INH は QAE-Sephadex A-50, DEAE Cellulose, Heparin Sepharose を用いて Fig. 1 のごとく精製した。

## 7. 交差免疫電気泳動法 (Crossed Immunoelectrophoresis: CIE)

特異抗血清は Plg., C1-INH, AT-III,  $\alpha_2$ M,  $\alpha_1$ AT は Behring,  $\alpha_2$ PI は 持田のものを用いた。CIE は 1% Agarose (協和メディックス, 東京, type HSA) を Tris-Veronal buffer (pH 8.6) で溶解し作製し, 至適量の特異抗血清を用いて施行した<sup>32)</sup>。

## 8. FLUF の経口投与実験

健康男子 3 人 (35, 29, 28 歳) に FLUF (Arlef, 三共製薬, 東京) 500mg を早朝空腹時に投与し経時的に採血し, クエン酸加血漿を検体とした。

$\alpha_2$ PI の活性は合成基質 S-2251 (H-D-Val-Leu-lys-p-nitroanilide dihydrochloride. Kabi) を用いた P1n の活性の阻害で測定した<sup>33)</sup>。他の血漿蛋白の生物活性および免疫活性は前述のごとく測定した。脳血栓後遺症患者は 62~74 歳 (平均 68 歳) の男子 3 人, 女子 3 人で FLUF 300mg の経口投与を行った。なお, FLUF の血中濃度は三共製薬に測定 (蛍光法) を依頼した。

## 結 果

### 1. 線溶活性に関する検討

#### 1) 線溶活性化に関する検討

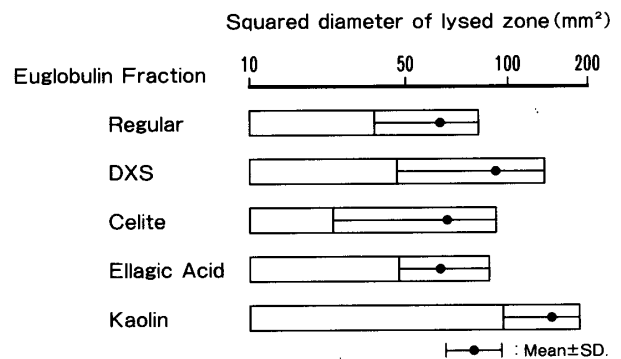


Fig. 2 Fibrinolytic activities of regular and activated euglobulin fractions of fresh normal plasmas (n=12) on plasminogen-rich fibrin plate.

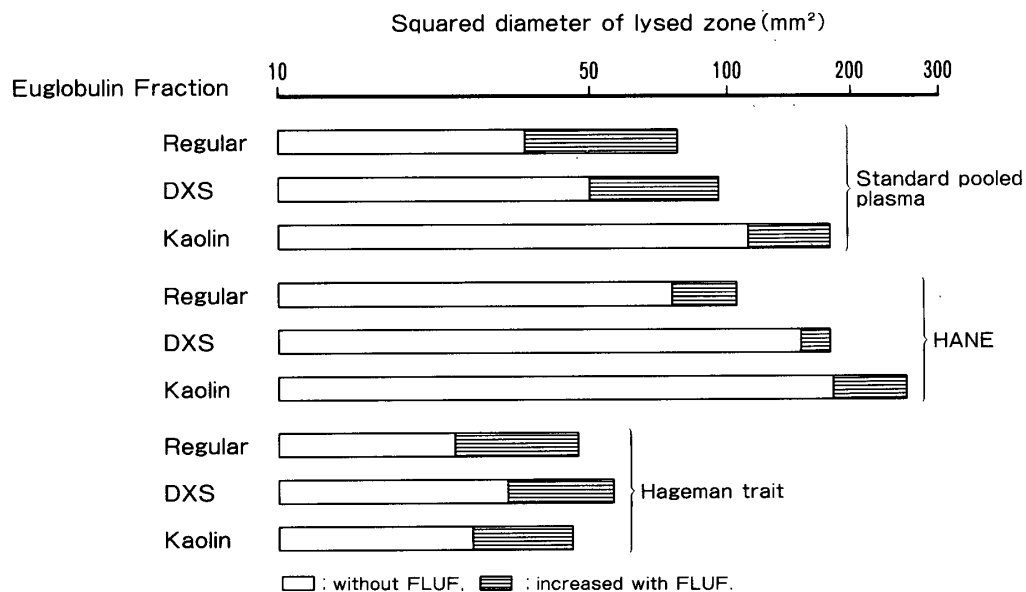


Fig. 3 Fibrinolytic activities of regular, dextran sulphate and kaolin euglobulin fractions of standard pooled plasma (n=10), HANE and Hageman trait plasma on plasminogen-rich fibrin plate.

① 接触因子活性化物質による検討

前記4種の活性化剤による活性化した血漿のEug. Fr.の線溶活性を測定すると、DXSおよびkaolinによつてのみ、Reg. Eug. Fr.に比較して有意な活性上昇を認めた (Fig. 2) (それぞれ、 $p < 0.03$ ,  $p < 0.01$ )。ellagic acid, および, celiteによつては線溶活性の変化は認めなかった。

② XIII因子欠乏血漿による検討

XIII因子欠乏血漿のEug. Fr.の線溶活性は、Regular, kaolinおよびDXSで活性化したEug. Fr.のすべてで低値を示した。正常血漿では、Regularに比べてkaolin活性化によりEug. Fr.の線溶活性は2倍以上に上昇した (Fig. 3)。これらの結果はkaolinにより活性化される線溶活性がXIII因子に由来することを示す結果であった。しかし、XIII因子欠乏血漿でも正常血漿と同様に、DXSにより線溶活性の上昇が見られるので、XIII因子非依存性の内因性線溶活性化経路の存在を示唆した。

2) 阻害因子に関する検討

C1-INHが活性化XIII因子 (XIIIa) を阻害する報告<sup>21)</sup>にもとづいて、内因性線溶の発現へのC1-INHの関与に関して実験を行った。

① HANE症例の検討

本症例血漿のC1-INHの活性は14%で抗原量は35%であった。HANEの線溶活性は全てのEug. Fr.においていちじるしく高値で、C1-INHの活性低下が内因性線溶の活性化が起こりやすい状態を作っているものと考えられる (Fig. 3)。特に接触因子を活性化していないReg. Eug. Fr.においても線溶活性が高値で、HANEでは内因性線溶の活性化が起こっていることを示唆した。

② PKの活性化におけるC1-INHの影響

4種の活性化剤のPK活性化能は (Fig. 4) kaolinが最も強く、ついでceliteで、DXSおよびellagic acidの作用はごく微弱であった。

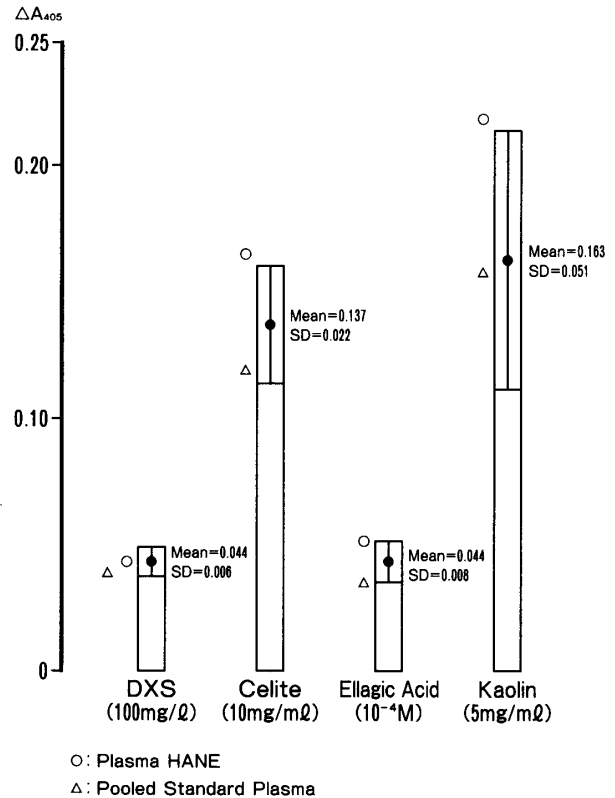


Fig. 4 Plasma prekallikrein activation with contact activating reagents on S-2302 ( $6 \cdot 10^{-3}M$ ). ●: Fresh plasma of volunteers (n=12). ○: Plasma of HANE. △: Pooled standard plasma (n=10).

HANEの血漿ではkaolinおよびceliteによるPKの活性化が起こり易く、PK-KKを介する線溶活性経路においてもC1-INHによる抑制機序が存在することが示された。

③ Eug. Fr.におけるC1-INHの線溶活性阻害

活性化されていないReg. Eug. Fr.の線溶活性に及ぼすC1-INHの影響を、C1-INH阻害剤のFLUFを用いて検討した結果がFig. 5である。線溶活性はFLUF 2 mM (終濃度) でピークに (約2.5倍) 達し、また同濃度のFLUFによってC1-INHの活性は測定限界下限値にまで低下した。

④ Eug. Fr.の線溶系INHおよびPlg.の抗原量の測定

RegularおよびDXS活性化Eug. Fr.の血漿に対するC1-INHの回収率は23%前後であり

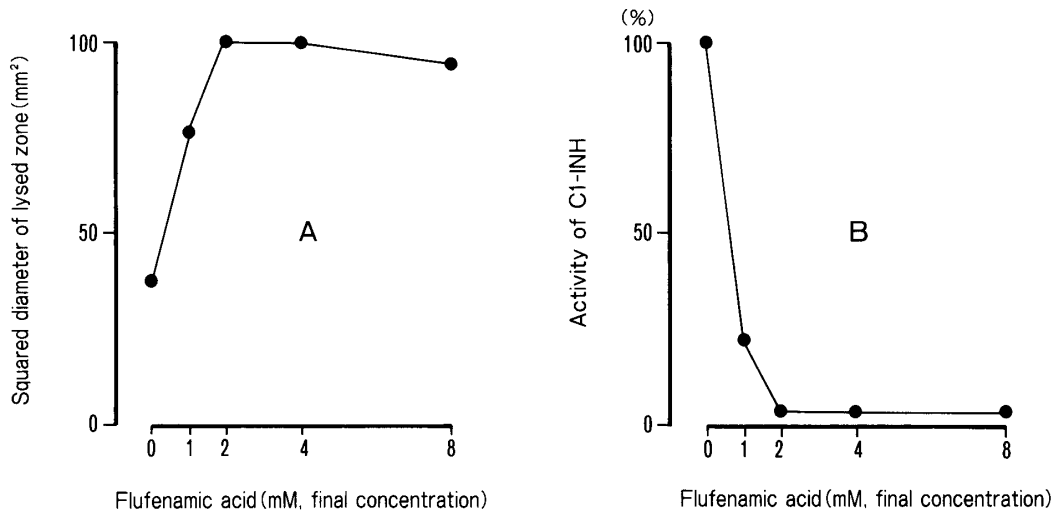


Fig. 5 Changes of fibrinolytic activity (A) AND C-IINH activity (B) of regular euglobulin fraction by adding flufenamic acid. C-IINH activity was determined by hydroxamate method.

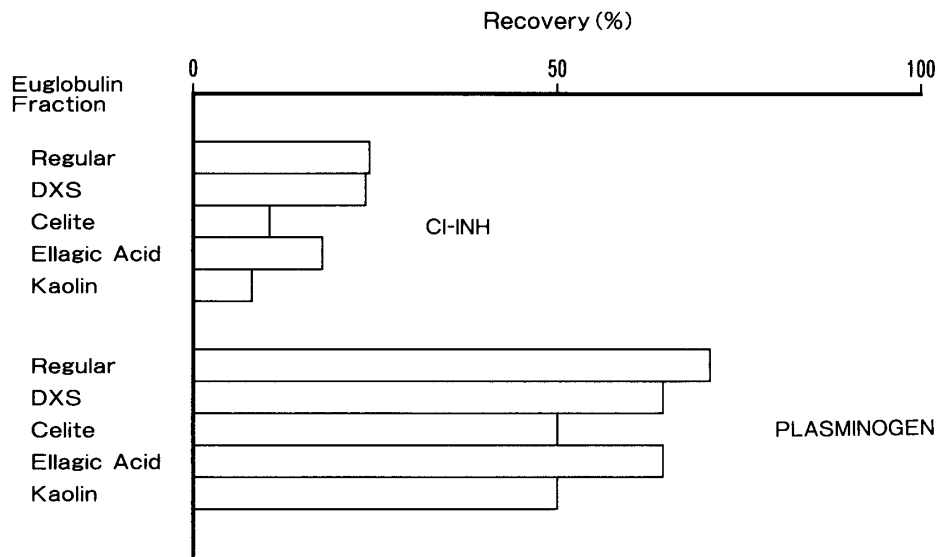


Fig. 6 Recovery of C-IINH and plasminogen in regular and activated euglobulin fractions. (euglobulin fraction/plasma, determined by the method of SRID).

他のEug. Fr.に比して多かった。kaolinでは7%と低く、このEug. Fr.の線溶活性が特に高いことの一因と考えられた(Fig. 6)。一方、その他のINHは $\alpha_2$ PI, AT-III,  $\alpha_2$ M, および、 $\alpha_1$ ATのすべてがほぼ測定不能であった。またPlg.は全てのEug. Fr.で50-70%回収されたが、線溶活性の測定はPlg.の添加されたフィブリン平板を用いたためPlg.量が測定に影響をもたないことが確認された。

## 2. 交差免疫電気泳動法 (CIE) による検討

内因性線溶はEug. Fr.というINHの影響の極めて少ない条件下で、その活性は測定することができた。しかし、血漿のままでも発現するかを検証するため血漿を検体としてCIEによる検討を行った。

### 1) 活性化剤による検討

抗Plg.血清を用いたCIEにおいて、intactな血漿と活性化剤により処理した血漿とのパターンの差は認めなかった。各INHの抗血清を用いた場合も同様であった。

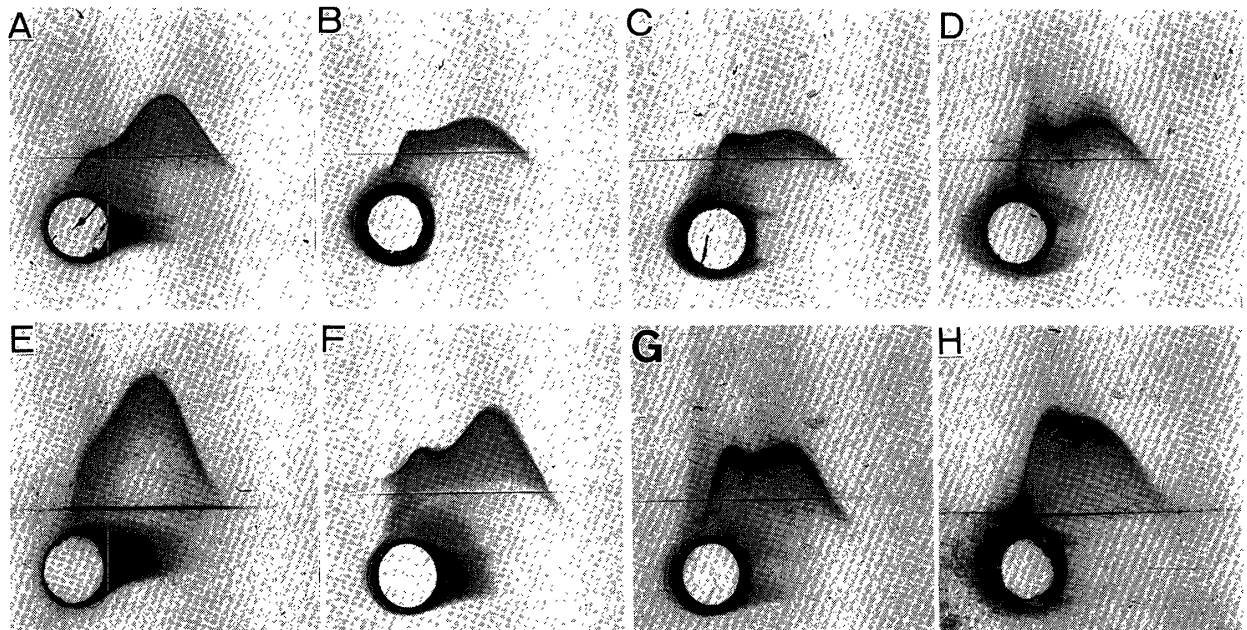


Fig. 7 Changes of CIE pattern using anti-plasminogen antibody. A~D; time course. A; intact plasma. following B~D were incubated at 37°C (B: 1 minute, C; 15 minutes and D; 1 hour) with prekallikrein activator (containing ellagic acid, cephalin, activated XIII and high molecular weight kinogen, Kabi, and original 100% concentration was used.) E; intact plasma, following F~H were incubated with purified kallikrein (kabi) for 1 hour. F; 0.06u/ml of kallikrein, G; 0.12u/ml and H; 0.24 u/ml.

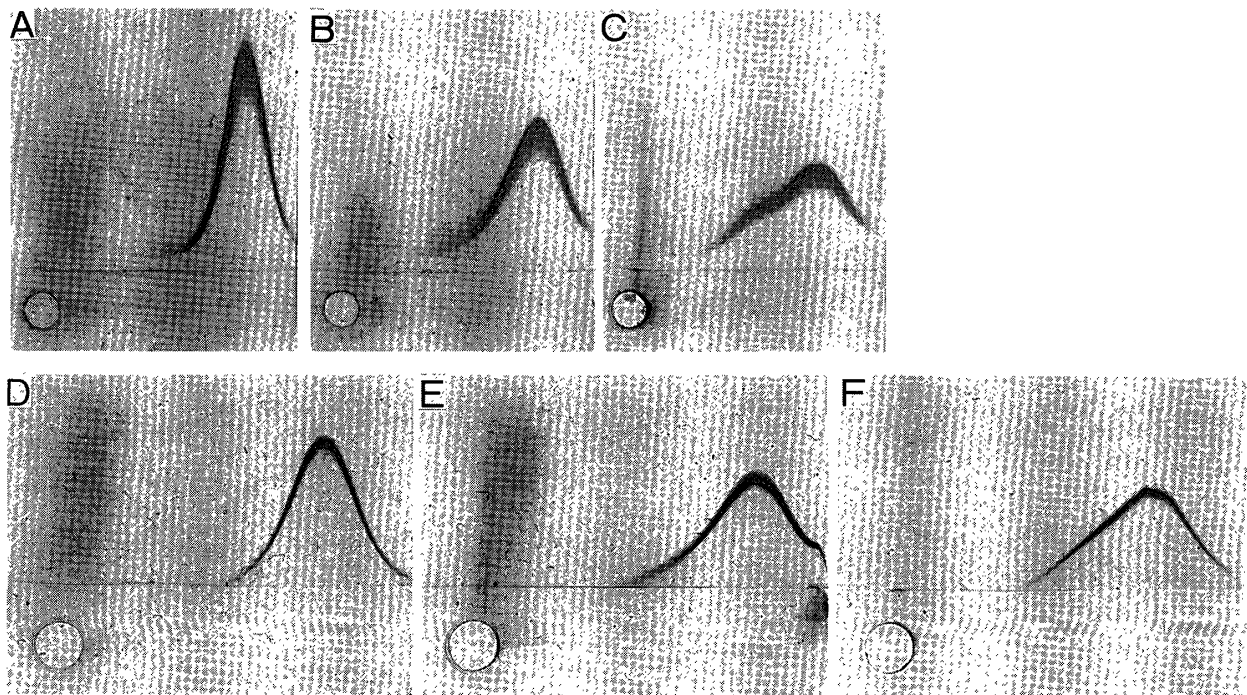


Fig. 8 Changes of CIE pattern of plasma incubated with prekallikrein activator (Kabi) using anti-C1-INH antibody (A, B and C), and anti- $\alpha_2$ PI antibody (D, E and F). A and D; intact plasma, B and E; incubated with 50% concentrated prekallikrein activator and C and F; incubated with 100% prekallikrein activator.

## 2) PK activatorによる活性化

Ⅲ因子およびHMWKgnが補充された、PK activatorを用いて血漿を活性化した。この結果KK出現、および、PlgからPlnが生じたことによるCIEのパターンの変化が以下のように認められた。

## ① Plgの変化

抗Plg血清を用いたCIEにおいて、時間経過に従って陰極側に新しいピークが出現し、Plnの生成を示した(Fig. 7, A-D)。また、精製KKを血漿に添加するとその濃度上昇に比例してピークはより高くなり(Fig. 7, E-H)、KKによるPlgの活性化が示された。

## ② C1-INHの変化

PK activatorの濃度を増加させると、ピークの高さは低くなり陰極側に新たな肩を生じ(Fig. 8, A-C)。

③  $\alpha_2$ PIの変化

抗 $\alpha_2$ PI血清を用いたCIEにおいては、PK activator濃度を上昇させるとピークの陰極側への広がりを生じた(Fig. 8, D-F)。これらの結果は線溶の発現とともに $\alpha_2$ PIとPlnとの複合体を形成したことを推定させた。

## ④ HANE症例の変化

抗Plg血清を用いたCIEで、PK activatorにより、正常血漿よりも、より顕著な、陰極側の高いピークが認められた(Fig. 9, A,B)。また対照としてDICの症例を同時に検討したがHANEとよく似たパターンを示し、線溶活性の亢進が見られた。(Fig. 9, C,D)。

C1-INH、および、 $\alpha_2$ PI以外のINHについてはCIEのパターン上の変化は認めなかった。

## 3. C1-INHの阻害による生体内での内因性線溶の活性化

FLUFの経口投与による生体における内因性線溶の活性化を試みた。

1) 35歳の健康男性にFLUFの経口剤、500mgを経口投与して線溶活性を観察した。検体とし

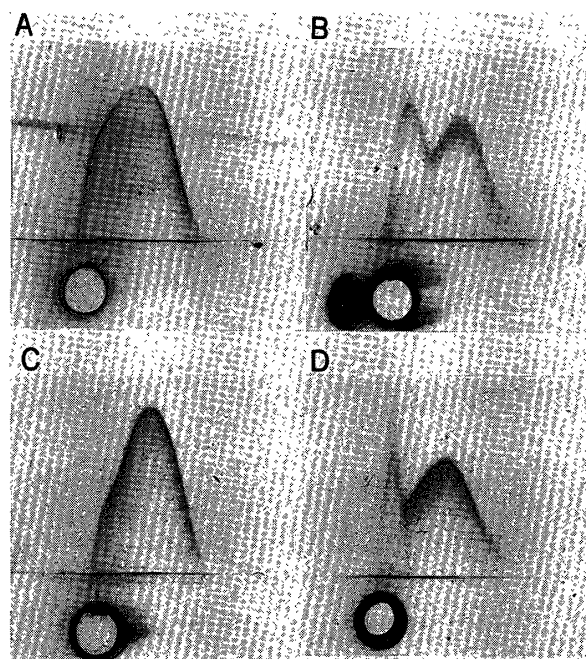


Fig. 9 CIE pattern of plasmas of a patient of HANE and a patient of DIC using antiplasminogen antibody. A; plasma of HANE without activation. B; plasma of HANE activated with prekallikrein activator, C; plasma of DIC patient (promyeroctytic leukemia) without activation and D; plasma of DIC activated with prekallikrein activator.

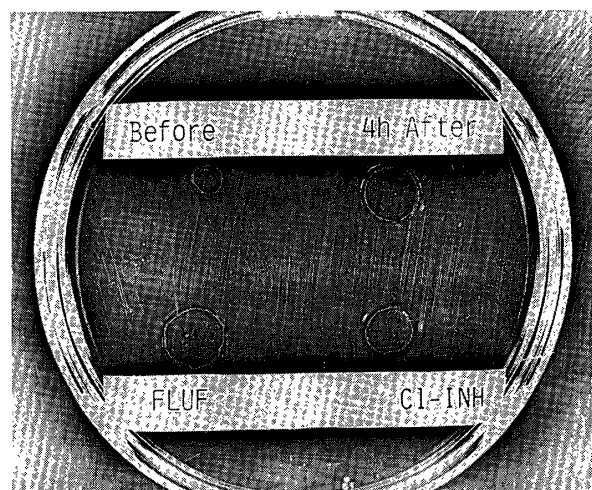


Fig.10 Fibrinolytic activities before and after the administration of flufenamic acid (500 mg/body) in a healthy man. Before; before the administration. 4hAfter; 4 hour after the administration. FLUF; flufenamic acid (2 mM) was added to the sample of before the administration. C1-INH; purified C1-INH (final concentration 0.2mg/ml) was added to the sample of 4 hour after the administration. All the samples were regular euglobulin fraction.



て接触因子を活性化していない Reg. Eug. Fr.を用いた。検体の線溶活性により生じたフィブリン平板の溶解窓の写真をFig.10に示す。FLUFの投与後4時間の検体は投与前のものに比して溶解窓の拡大を示した (Fig.10, before, 4h after)。4時間後の検体に終濃度2 mMのFLUFを添加してもその溶解窓の大きさは変化しなかったが (Fig.10, FLUF), 終濃度0.2mg/mlの精製C1-INHを添加すると、溶解窓の縮小が認められた (Fig.10, C1-INH)。

2) FLUF300mgを6人の脳血栓後遺症の患者に投与すると8時間後にFig.11に示すごとく線溶活性の上昇を認めた。

3) 3人の健常男子でFLUF 500mgの経口投与による線溶活性の他にPK活性, および, INH諸因子の変動を測定した。

- ① FLUFの血中濃度のピークは1時間から4時間後に見られ, 線溶活性は1時間と8時間の二峰性の上昇を示した (Fig.12, A, C)。
- ② C1-INH活性は投与後低下し始め, 2例においては8時間後に投与前の約40%にまで達し, 24時間後でも50%にとどまった。他の1例は1時間後に80%に低下し8時間後には投与前値に復した (Fig.12, B)。
- ③ PKの活性は投与後上昇し1時間後にピークに達し, 24時間後でも120から200%であった (Fig.12, D)。図には示さないがこの他 $\alpha_2$ PI活性の軽度の低下を認めた以外は他のINHには変化はなく, 同時に測定した凝固系 (プロトロンビン時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間) にも変化は認められなかった。

## 考 案

### 1. XII因子の活性化と線溶の発現

内因性凝固の開始機転はXII因子の活性化に

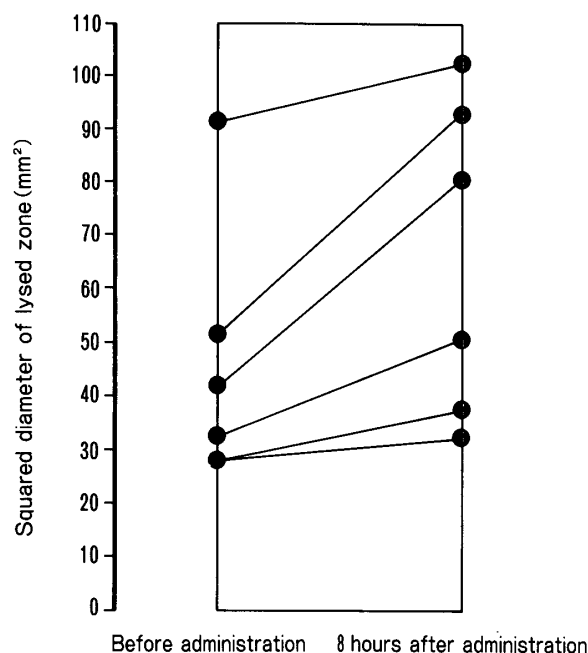


Fig.11 Fibrinolytic activities of regular euglobulin fractions after the administration of flufenamic acid (300mg/body) in the patients who had cerebral vascular thrombosis in the past.

よって始まる。活性化XII因子(XIIa)が生じると, ついでXI因子が活性化され, XIIaはHMWKgnの存在下にPKをKKに変換する。KKはpositive feedback機構によりXII因子の活性化を行う。したがって, 極く少量のXII因子の活性化が多量のXIIa, XIa, KKを生じる<sup>34)</sup>。ところが, この内因性凝固の中枢に位置する, 接触因子すなわち, XII因子, XI因子, PKおよびHMWKgnのいずれか, ひとつの欠損症患者は重篤な出血症状を示さず, むしろ肺塞栓症, 深部静脈血栓症や心筋梗塞などの血栓性の疾患を起こすことが報告されている<sup>35)36)37)</sup>。こうした事実は接触因子の欠損が凝固異常ではなく線溶異常に関連する可能性を示唆し, 特にXII因子は内因性凝固のinitiatorだけでなく, 線溶の開始機転にかかわる重要な因子としての役割を持つことを意味する。血管内血栓の溶解機転は主としてtPAによって生じる<sup>1)2)3)38)</sup>が, XII因子をはじめとする接触因子の活性化型(XIIa, KK, XIa)もPlg.のactivator (ACT)作用を有するとの報告<sup>11)12)13)</sup>が多い。

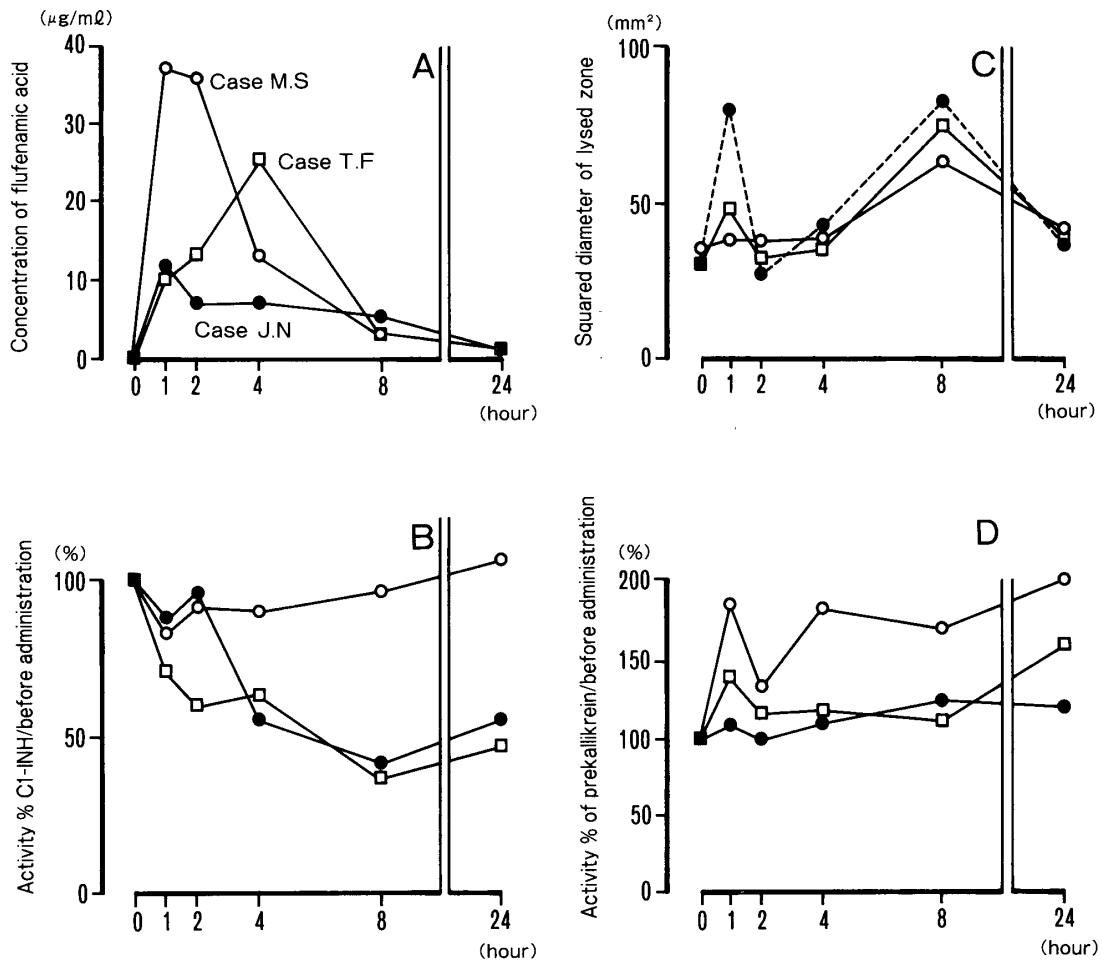


Fig.12 The changes after the administration of flufenamic acid (500 mg/body, p.o) in healthy subjects (35 ●, 29 □ and 28 ○ year old men). A : plasma concentration of flufenamic acid. B : plasma (%) activity of C1-INH. C : fibrinolytic activity of regular euglobulin (fibrin plate method). D : Plasma activity of (%) prekallikrein (S-2302)

これら結果に基づき、本研究では内因性線溶の発現について検討した。

ガラス面上での凝固が発見されたことをきっかけとして、 $\text{XII}$ 因子の活性化には陰性荷電の存在が重要で、特に表面上に一定間隔の陰性荷電が存在する物質が有効な $\text{XII}$ 因子の活性化剤となることが判明した<sup>18)</sup>。この特性を備える物質としてkaolin, DXS, ellagic acid, celiteなどが研究されてきた。本研究ではこれら4種の活性化剤を用いて凝固と同様に線溶活性も起こるのかを検討した。 $\text{XII}$ 因子の活性化に引き続いて線溶の活性化が起こるという観点で見ると、kaolinが極めて高い線溶活性をフィブリン平板法で示す結果であった。

$\text{XII}$ 因子は陰性荷電上でHMWKgnの存在のもとにconformational changeを起こし、PKによるproteolytic activationを受ける。この結果、陰性荷電との結合部分を持つ $\alpha\text{XIIa}$  (mw 80 kD) と、結合部分を持たない $\beta\text{XIIa}$  (mw 28 kD) の二つの物質を生じる<sup>39)</sup>。 $\alpha\text{XIIa}$ と $\beta\text{XIIa}$ は同時に産生され、 $\alpha\text{XIIa}$ の方が多量に生じるが、二者の比率は不明である。また、 $\text{XI}$ 因子を活性化する作用は $\alpha\text{XIIa}$ は $\beta\text{XIIa}$ の100倍とされている<sup>30)</sup>。また両者はfluid phaseではPKに対して同等のcatalytic activityを有するが、陰性荷電上では $\alpha\text{XIIa}$ の作用は高度に増強される<sup>40)</sup>。これらの事実と本研究におけるkaolinの強いPK活性化作用を合わせ考えると、kaolinの表面陰性荷電は他の

活性化剤に比べ多量の $\alpha$  XIIaを生じることを示している。犬におけるellagic acidの注入実験では、凝固は生じるが、線溶の発現は極めて遅いと報告されている<sup>41)</sup>。このin vivoの実験結果は本研究でのellagic acidの有する線溶活性化作用、および、PK活性化作用の両方がともに弱いという結果と一致した。すなわち、ellagic acid表面の陰性荷電は、少なくともkaolinのそれよりはかなり少量の $\alpha$  XIIaしか生じさせない性状であることが示唆された。

celiteによる活性化Eug. Fr.の中のC1-INHの回収量は、kaolinと同様に少ない。すなわちINH量が少なく、また、kaolinについてPKの活性化作用も強く、線溶活性が起こり易い条件を備えていながら、なぜ活性がみられないか疑問が残った。しかしながら、内因性線溶が有意に亢進する条件を検索することが主なる目的であるため、線溶活性をもたらせない活性化剤であるceliteについては検討を加えていない。

DXSはフィブリン平板で線溶性の亢進をもたらすが、PKの活性化作用が極めて弱く、XII因子欠乏血漿においてkaolinとは異なった新たな線溶活性を付加する点を考慮すると、XII因子非依存性の径路によって内因性線溶を活性化するものと考えられた。血液中にはDXSによるのみ活性化される線溶活性が存在することは知られている<sup>42)</sup>。この活性がXII因子あるいはPKの欠乏血漿でも起こることや、抗UK抗体によって阻害される<sup>42)</sup>報告などより、DXSは血漿中のPro-UKを活性化する可能性が高い。しかしPro-UKはKKによっては強力に、XIIaによってはゆっくりと活性化され、またPln.によっても活性化される<sup>43)</sup>ので、内因性線溶を従来のように、XII因子依存性、XII因子非依存性に分類することは問題が残ると考えられた。

XIIa, XIaおよびKKの直接的なPlg. ACT活性は、血管内皮より放出される外因性のACTであるtPAに比べると4桁は低い<sup>44)</sup>とされている。

このことが生体内での抗血栓性機序として内因性線溶の意義があまり重要視されない理由と考えられる。しかし、ひとたびXII因子が僅かでも活性化されるとpositive feedback機構によってこれらの活性型の因子を次々とcyclicに作ることで、さらにこれらの因子はpro-UKを活性化することによってPlg. ACT活性の高いUKを作り出す<sup>42)43)</sup>ことなどより従来考えられている以上の線溶活性を発現させるものと推察される。(現在、歴史的にpro-UK, UKという名称が使われているが、国際委員会の命名に従うとsingle chain urinary plasminogen activator: scu-PA, およびurinary plasminogen activator: u-PAに相当する。)

## 2. 内因性線溶のinhibitor

内因性線溶の発現は二つのステップで阻害を受ける。ひとつはXIIa, XIa, KKの阻害の段階であり、他は最終段階で生じたPln.の阻害である。Pln.の阻害についてはAoki等の詳細な研究<sup>45)</sup>によると、血液中に生じるPln.は $\alpha_2$ PIによって即時に、かつ強力に阻害され、以前はPln. INHの主座を担うと考えられていた $\alpha_2$ Mは $\alpha_2$ PIに比してかなり弱いINHであることが判明した。その他、 $\alpha_1$ AT, AT-IIIは単独ではさらに弱いINHである<sup>46)</sup>。次に述べる活性型接触因子のINHであるC1-INHはPln. 1:1の複合体を形成した後、徐々に分解され、やはりPln. INHとしては極めて弱い<sup>46)</sup>とされている。一方、接触因子の活性化の段階での阻害をみると、KKの阻害強度は、C1-INH (52%) >  $\alpha_2$ M (35%) > AT-III (13%) >  $\alpha_1$ AT,  $\alpha_2$ PIの順で<sup>22)</sup>、XIIaについては $\alpha$  XIIa,  $\beta$  XIIaともにC1-INH (約90%) >  $\alpha_2$ PI >  $\alpha_2$ M, ATIIIの順で<sup>21)47)</sup>あり、XIaについては $\alpha_1$ AT > AT-III, C1-INH,  $\alpha_2$ Mの順に強い<sup>47)48)</sup>と報告されている。これらを総合すると内因性線溶の活性化の初期段階の主なINHはC1-INHと言える。本研究でもEug. Fr.に残るC1-INHを阻害することで線溶活性の大きな上

昇が見られ、また、C1-INHの欠損しているHANEの症例で線溶活性がきわめて高いことが示された。Pln.の活性を線維素溶解能でみる系においても内因性線溶はC1-INHによって強力に阻害、制御されていることが示された。血漿を用いたCIEでも、接触因子の活性化に対応しておこるINHの変化は、C1-INHと $\alpha_2$ PIであり、C1-INHはXIIaおよびKKとの、また $\alpha_2$ PIはPln.との複合体を形成した結果と考えられた。

### 3. in vivoでの内因性線溶の発現

血漿中ではINHが優位であるために、線溶活性は一定の処理をせずに測定することは難しい。まして生体において内因性線溶の活性化がいかにか起きているのか、また実際にその発現は生理的、ならびに病理的意義がどの程度あるのかを見定めることは困難である。1979年にWigginsとCochraneが家兎でkaolinなどを用いて陰性荷電上でのXII因子のautoactivationを報告した<sup>49)</sup>。以来、ヒトの血漿においても、陰性荷電を有する成分が存在すると前述のpositive feedback機構により活性型の接触因子ができ、内因性線溶は起こり得ると考えられてきた。さらにこの反応系はsolid phaseにおいては加速化されて起こる<sup>34)</sup>ため、XII因子の活性化を起こす生体成分として研究されてきたcollagen fiberの血流への暴露<sup>16)17)</sup>など、血管内皮障害が起こっている病態では、その関与が有り得ると考えられる。データは示していないが血管炎に基づく内皮障害がありうるSLEの症例(9人)では、XII因子の凝固活性が正常人に比して有意に高く、また、XI因子活性およびPK活性の上昇と正の相関を示した。このように接触因子の活性化は亢進していたが、内因性線溶活性の上昇は見られず、その原因は活性上昇が認められた $\alpha_2$ PI, AT-III, およびC1-INHによる活性型接触因子活性およびPln.活性の阻害によるものと考えられた。

血漿のCIEによる検討では、血漿の活性化剤

による陰性荷電面への暴露、あるいはcold contact activationのみではPlg.の免疫学的変化までは起こし得なかった。しかしXII因子およびHMWKgnの添加と陰性荷電の場の存在によって、明らかな線溶活性が生じ、これはKKの生成によるところが大きいものとする。このように内因性線溶はin vitroにおいても捕らえることが難しい。しかし生体では常に血管障害や血栓形成のriskを有しており、局所の外因性線溶に加えて循環血液に由来する内因性線溶の果たす役割も少なくないものと考えられる。In vivoにおけるC1-INHの阻害剤投与による内因性線溶の活性化はACT側からではなく、INH側からバランスを崩す方法であるが、ヒトにおいてこのようなtriggerを用いて線溶活性を起こしたのは初めての報告である。

### 4. 内因性線溶の意義

近年、古典的凝固のcascade theoryにおいて、接触因子の位置付けについて修正を要する点が出て来た。すなわち、組織障害時の止血機転においては内因性凝固よりも外因性凝固が主なる役割を果たしているという研究結果である。外因性凝固因子であるXII因子と組織因子(tissue factor, TF)との複合体(VII/TF)が、極く少量のXa及びIXaによって活性型のVIIIa/TFを形成すること。さらにこの複合体が内因、外因の共通凝固径路であるX因子をXaに変換する反応を進め、Xaは再度VIIIa/TFを生じさせ、多量のXaが生成されるpositive feedback機構が成立するという機序が証明された<sup>50)51)</sup>。ここに生体は接触因子の関与なしに外因性凝固が主体となって止血機転が進行するプロセスを有していることが判明した。

一方、接触因子が凝固、線溶のバランス調整上、むしろ線溶系の因子として役割を果たしていることは以下のことから支持される。XII因子はtPA, UKなどとアミノ酸配列の相同性があり、Plasminogen ACTに属するという結果<sup>52)</sup>、

またpro-UKはⅫ因子依存性にも、活性化されるという合目的システムが存在することなどがあげられる。さらに、UKに対するreceptorがヒトの臍帯静脈の内皮細胞や単球をはじめとする種々の細胞に証明され<sup>53)54)55)</sup>、内因性に活性化されたUKが抗血栓性に働くだけでなく、癌転移の制御や免疫反応に関与している可能性が示唆されている。さらにin vivoでは、接触系の活性化により生じたKKは、HMWKgnよりkininを生じせしめ血管内皮よりtPAの放出を促す。このように内因性線溶と外因性線溶がlinkする生体にとって極めて効率的な血栓防御機序が存在するものと推論できる。

## 結 語

1. 接触因子（凝固第Ⅻ因子，凝固第Ⅺ因子，Prekallikrein, High molecular weight kininogen)は表面陰性荷電を有する活性化剤，とくにkaolinによって活性化され，活性型接触因子はさらにplasminogenをplasminに変換し内因性に線溶活性をもたらす。
2. Dextran sulphateは凝固第Ⅻ因子非依存性に内因性線溶を活性化し，その起源のひとつはprourokinaseと考えられるが，prourokinaseは凝固第Ⅻ因子依存性にも活性化され，内因性線溶を凝固第Ⅻ因子依存性，非依存性と分けることは不相当と考えられた。
3. 血漿の内因性線溶の発現を交差免疫電気泳動法を用いて証明した。
4. 内因性線溶の中心的inhibitorはC1-inhibitorであり，その活性を強力に制御している。これは，活性型接触因子の阻害によるものと考えられる。
5. C1-inhibitorを阻害することで，in vitro, in vivoとも血漿の線溶活性は上昇する。
6. 接触因子は凝固第Ⅻ因子を中心に，plasminogen proactivatorとして作用し，凝固系よりはむしろ線溶系のinitiatorとしての役割

が重視されるべきであると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるに当り，懇切なる御指導と御校閲を頂いた，北大内科学第二講座教授中川昌一先生に深謝致します。また，直接，実験の御指導と多くの助言，御校閲頂いた東日本学園大学歯学部内科学講座教授安河内太郎先生に深く感謝致します。また，様々な面から御協力を頂きました北大第二内科，桜間照喜先生，沢田賢一先生ならびに家子正裕先生に御礼申し上げます。

## 文 献

1. Todd, A. S.: The histological localization of fibrinolysin activator. *J. Pathol. Bact.*, 78:281-283, 1959.
2. Warren, B. A.: Fibrinolytic properties of vascular endothelium. *Br. J. Exp. Pathol.*, 44:365-372, 1963.
3. Aoki, N. and von Kaulla, K. N.: The extraction of vascular plasminogen activator from cadavers and a description of some of its properties. *Am. J. Clin. Pathol.*, 55:171-179, 1971.
4. Ogston, D., Ogston, C. M., Ratnoff, O. D., et al.: Studies on a complex mechanism for the activation of plasminogen by kaolin and by chloroform-the participation of Hageman factor and additional cofactors. *J. Clin. Invest.*, 48:1786-1801, 1969.
5. Kaplan, A. P. and Austen, K. F.: The fibrinolytic pathway of human plasma. Isolation and characterization of the plasminogen proactivator. *J. Exp. Med.*, 136:1378-1393, 1972.
6. Schreiber, A. D. and Austen, K. F.: Hageman factor-independent fibrinolytic pathway. *Clin. Exp. Immunol.*, 17:587-600, 1974.
7. Aoki, N.: Preparation of plasminogen activator from vascular trees of human cadavers and human urokinase. *J. Biochem.*, 75:731-741, 1974.
8. Collen, D., Lijnen, H. R.: Molecular mechanism of thrombolysis: implications for therapy. *Biochem. pharm.*, 40:1776-1786, 1990.

9. Pennica, D. and Collen, D. et al.: Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. Coli. *Nature*. 301: 214-221-1983.
10. Collen, D.: Coronary thrombolysis: streptokinase or recombinant tissue-type plasminogen activator? *Ann. Intern. Med.*, 112: 529-538, 1990.
11. Goldsmith, G. H., Saito, H., Ratnoff, O. D.: The activation of plasminogen by Hageman factor (Factor XIII) fragments. *J. Clin. Invest.*, 62: 54-60, 1978.
12. Mandel, R. J., Kaplan, A. P.: Hageman factor-dependent fibrinolysis: Generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood*. 54: 850-861, 1979.
13. Colman, R. W.: Activation of plasminogen by human plasma kallikrein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35: 273-279, 1969.
14. Kluft, C., Wijngaards, G. and Jie, A. F. H.: Intrinsic plasma fibrinolysis: Involvement of urokinase-related activity in the factor XIII-independent plasminogen proactivator pathway. *J. Lab. Clin. Med.*, 103: 408-418, 1984.
15. Wunt, T. C., Schleunig, W. D. and Reich, E.: Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *J. Biol. Chem.*, 257: 3276-3283, 1982.
16. Niewarowsky, S., Bankowsky, E. and Rogowicka, I.: Studies on the adsorption and activation of Hageman factor (factor XIII) by collagen and elastin. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 14: 387-400, 1965.
17. Wilner, G. D., Nossel, H. L. and Leroy, E. C.: Activation of Hageman factor by collagen. *J. Clin. Invest.*, 47: 2608-2615, 1968.
18. Nossel, H. L.: The contact system. "Human Blood Coagulation, Haemostasis, and Thrombosis" ed. by Biggs, R., pp. 81-142, Blackwell Scientific pub., London, 1976.
19. Soulier, J. P. and Prou-Wartelle, E.: New data on Hageman factor and plasma thromboplastin antecedent: The role of contact in the initial phase of blood coagulation. *Br. J. Haematol.*, 6: 88-101, 1960.
20. Tankersley, D. L., Alving, B. M. and Finlayson, J. S.: Activation of Factor XIII by dextran sulphate: The basis for an assay of Factor XIII. *Bood*. 62: 448-456, 1983.
21. Pixley, R. A., Schapia, M. and Colman, R. W.: The regulation of human factor XIIIa by plasma proteinase inhibitors. *Blood*. 66: 198-203, 1985.
22. Marc, S.: Major inhibitors of contact phase coagulation factors. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*. 13: 69-78, 1987.
23. Ratnoff, O. D. and Crum, J. D.: Activation of Hageman factor by solution of ellagic acid. *J. Lab. Clin. Med.*, 63: 359-377, 1964.
24. Brakman, P., Sobrero, A. J. and Astrup, T.: Effects of different systemic contraceptives on blood fibrinolysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 106: 187-192, 1970.
25. Kluft, C. and Brakman, P.: Effect of flufenamate on euglobulin fibrinolysis: Involvement of C1-inactivator, in Davidson, J. F., Samama, M. M. and Desnoyers, P. C. (eds.): *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*. New York, Raven, pp. 375-381, 1975.
26. Miles, L. A., Burnier, J. P., Verlander, M. S., Goodman, M., Kleiss, A. J. and Griffin, J. H.: Inactivation of purified human  $\alpha_2$ -antiplasmin and purified human C1-inhibitor by synthetic fibrinolytic agents. *Blood*. 57: 1015-1024, 1981.
27. Harverkate, F.: A simple device for measuring diameters of fibrinolysis zones on fibrin plates. *Haemostasis*. 1: 55-60, 1972.
28. Astrup, T. and Arkjaersig, N.: Estimation of proteolytic enzymes by means of their fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 37: 99-105, 1952.
29. Mancini, G., Vaerman, J. P., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F.: A single-radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins. In *Protide Biol. Fluids*, (11th Colloq, Bruges), (ed. Peeters, H.), Pergamon Press, Oxford. pp. 370-373-1964.
30. Claeson, G., Friberger, P., Knos, M. and Eriksson, E.: Methods for determination of prekallikrein in plasma, glandular kallikrein and urokinase. *Haemostasis*. 7: 76-78, 1978.
31. Harpel, P. C.: The differentiation of esterase and fibrinolytic activity in human plasma eug-

- lobulin preparations. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 19: 596-598, 1968.
32. Laurell, C. B.: Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 10: 358-361, 1965.
  33. Naito, K. and Aoki, N.: Assay of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor activity by means of a plasmin specific tripeptide substrate. *Thrombos. Res.*, 12: 1147-1156, 1978.
  34. Griffin, J. H.: Role of surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XIII). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75: 1998-2002, 1978.
  35. Goodnough, L. T., Saito, H. and Ratnoff, O. D.: Thrombosis or myocardial infarction in congenital clotting factor abnormalities and chronic thrombocytopenias: A report of 21 patients and a review of 50 previously reported cases. *Medicine (Baltimore)*. 62: 248-255, 1983.
  36. Brodsky, J. B. and Burgess, G. E.: Pulmonary embolism with factor XI deficiency. *J. A. M. A.*, 234: 1156-1157, 1975.
  37. Currimbhoy, Z., Vincigurra, V., Palakavongs, P., Kuslansky, P. and Degnan, T. J.: Flecher factor deficiency and myocardial infarction. *Am. J. Clin. Pathol.*, 65: 979-974, 1976.
  38. Ogston, D., Bennett, B. and Mackie.: Properties of a partially purified preparation of a circulating plasminogen activator. *Thrombos. Res.*, 8: 275-284, 1976.
  39. Griffin, J. H. and Cochrane, C. G.: Recent advances in the understanding of contact activation reactions. *Semin. Thromb. Haemost.*, 5: 254-273, 1979.
  40. Cochrane, C. G. and Griffin, J. H.: The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma. *Adv. Immunol.*, 33, 241-306, 1982.
  41. Botti, R. E. and Ratnoff, O. D.: Studies on the pathogenesis of thrombosis: An experimental "hypercoagulable" state induced by the intravenous injection of ellagic acid. *J. Lab. Clin. Med.*, 64: 385-398, 1964.
  42. Miles, L. A., Rothchild, Z. and Griffin, J. H.: Dextran sulphate-dependent fibrinolytic activity in whole human plasma. In *Progress in Fibrinolysis*, vol.6, ed. Davidson, J. F., Bachman, F., Bouvier, C. A. and Kruithof, E. K. O. Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 58-61-1983.
  43. Wun, T. C., Ossowski, L. and Reich, E.: A proenzyme form of human urokinase. *J. Biol. Chem.*, 257: 7262-7268, 1982.
  44. Schleuning, W. D.: The plasminogen activators in pooled human plasma. In Davidson, J. F., Bachman, F., Bouvier, C. A. and Kruithof E. K. O., Eds: *Progress in Fibrinolysis*, vol. VI. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 39-42, 1983.
  45. Aoki, N., Moroi, M. and Tachiya, K.: Effect of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor on fibrin clot lysis. Its comparison with  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Thrombos. Haemostas.*, 39: 22-31, 1978.
  46. Ogston, D. and Bennett, B.: *Biochemistry of naturally occurring inhibitors of fibrinolytic system "Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Pathology"* ed. by Ogston, D. and Bennett, B. John Wiley & Sons, London, New York, Sydney and Toront. pp. 230-238, 1977.
  47. de Agostini, A., Lijnen, H. R., Pixley, R. A., Colman, R. W. and Schapira, M.: Inactivation of factor XIII active fragment in normal plasma. Predominant role of C1-inhibitor. *J. Clin. Invest.*, 73: 1542-1549, 1984.
  48. Scott, C. F., Schapira, James, H. L., Cohen, A. B. and Colman, R. W.: The inactivation of Factor XIa by plasma protease inhibitors. Predominant role of  $\alpha_1$ -protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kininogen. *J. Clin. Invest.* 69: 844-852, 1982.
  49. Wiggins, R. C. and Cochrane, C. G.: The autoactivation of rabbit Hageman factor. *J. Exp. Med.*, 150: 1122-1133-1979.
  50. Nemerson, Y., Repke, D.: Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: The role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb. Res.*, 46: 325-335, 1985.
  51. Rao, L. V. M. and Rapaport, S. I.: Activation of factor VII bound to tissue factor: A key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6687-6691, 1988.
  52. Patty, L.: Evolution of the proteases of blood

- coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*. 41 : 657-663, 1985.
53. Behrent, N., Ronne, E., Ploug, M., Petri, T., Lober, D., Nielsen, L. S., Schleuning, W. D., Blasi, F. and Dano, K. : The human receptor for urokinase plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, 265 : 6453, 6460, 1990.
54. Barnathan, E. S., Kuo, A., Kariko, K., Rosenfeld, L., Murray, S. C., Behrendt, N., Ronne, E., Weiner, D., Henkin, J. and Cines, D. B. : Characterization of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA. *Blood*. 76 : 1795-1806, 1990.
55. Roldan, A. L., Cubellis, M. V., Masucci, M. T., Behrendt, N., Lund, L. R., Dano, K., Appella, E. and Blasi, F. : Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *E. M. B. O. J.* 9 : 467-474, 1990.