

カラゲニン誘発炎症におけるフィブリノゲンならびに プラスミノゲン分解酵素活性についての研究

門谷 文子¹⁾, 松嶋 理恵²⁾, 林 奈央子²⁾, 堀江 登²⁾

(武庫川女子大学大学院家政学研究科食物栄養専攻¹⁾, 武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科²⁾)

Studies on fibrinogenolytic activity and plasminogenolytic activity during carrageenan-induced inflammation.

Ayako Kadotani, Rie Matsushima, Naoko Hayashi and Noboru Horie

¹⁾Food Science and Nutrition Major,
Graduate School of Home Economics,

²⁾Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan

This paper is a study concerning plasminogenolytic and fibrinogenolytic products in plasma. Two types of the spleen or the lung were made preparation for this study. One type is the spleen or the lung on 10th day after carrageenan injection, and non treated ones. The plasminogenolytic and fibrinogenolytic activities in plasma were increased by carrageenan induced inflammation. These digested products with the spleen or the lung are similar to ones with commercial cathepsin G. We came to conclusion that the plasminogen degraded products in plasma were ones by cathepsin G in the lung or the spleen.

はじめに

播種性血管内凝固症(DIC)は、血液凝固系ならびに線維素溶解系の活性化により種々の病態と臨床症状を示す。このDICなどの線維素溶解系の治療に抗線維素溶解剤イプシロンアミノカプロン酸やトランスキサム酸を投与してもそれらの効果が認められないことがある。このことは、食作用を有する細胞が血栓を異物と認識したために生じたフィブリノゲン除去作用であった可能性がある。また、プラスミノゲンに対する抗体を一次抗体として、正常血漿のイムノプロットを行うとプラスミノゲンに由来する低分子量バンドが検出されることがあり、カラゲニン誘発炎症では、さらに著しくみられる。

本研究は、全身性の炎症を誘発するモデルとしてカラゲニンをマウスの皮下に注入し全身性の血栓化傾

向¹⁾を誘発させ、血漿中のフィブリノゲンやプラスミノゲンの分解機序を追及することを目的として行ったものである。

実験材料と方法

本実験には、雄性8週齢のJcl-ICR系マウス(日本クレア, 東京)を使用した。マウス10匹のうち5匹には、2%のカラゲニン(Type IV Lambda Carrageenan, Sigma Chem. Co., St. Louis)を0.8mlずつ皮下に注入し¹⁾、残りの5匹は、対照群として10日間飼育した。飼育には、温度22~24℃、湿度45~55%に調節された環境制御飼育装置(日本クレア)を使用した。明暗のサイクルは12時間(明期8:00~20:00)とした。給餌は固形飼料MF(オリエンタル酵母, 東京)を使用し、給水は給水瓶によって水道水を自由摂取させた。エーテル麻酔によってマウス

を安楽死させた後、採血と臓器(肺・脾臓)を摘出し、個々に重量を測定した後、 -30°C で急速冷凍し、その状態で保存した。

各臓器からの酵素の抽出は、次のように行った。プラスチック製の遠心管に入れた臓器に適量の生理食塩水を加えてホモジナイズし、 4°C 、 7000G で10分間高速冷却遠心機を用い、遠心分離して上清を除去した。この操作を5回繰り返す、血液成分を十分に取り除いた後の残渣重量の5倍の 2M 過塩素酸ナトリウム液を加えてホモジナイズした。2時間水中で抽出後、 4°C 、 7000G で30分間遠心分離を行って、得られた上清を各臓器由来の 2M 過塩素酸ナトリウム抽出画分とした。

SDS-PAGE法は、Laemmliの方法²⁾に準拠して、10%ポリアクリルアミドを支持体として使用するSDS-PAGE法によった。精製プラスミノゲンは、Deutsch and Mertzの方法³⁾で作製したリジンセファローズCL-4Bを使用して、Brockway and Castellinoの方法⁴⁾で、ラットの血漿から精製した。精製プラスミノゲンと臓器から抽出した酵素を 37°C でオーバーナイトの反応をさせ、熱処理したものをSDS-PAGEの試料として用いた。プロットイングは泳動後のポリアクリルアミドゲルをディアポア膜にウエスタン・プロットイングし、抗マウス・プラスミノゲン家兎血清を一次抗体とし、二次抗体にはHRP-conjugated 抗ウサギ・ヤギ血清(Bio-Rad, Richmond)を使用した。

基質を含むSDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法は、Heussen & Dowdleの方法⁵⁾に準拠して、0.1% SDSを含む3%ポリアクリルアミドゲル(pH6.8)の濃縮ゲルと0.1% SDSを含む11%ポリアクリルアミドゲル(pH8.8)の分離ゲル、基質としてプラスミノゲンを含むフィブリノゲン(ウシ・タイプI, 第一化学, 東京)とプラスミノゲンを含まないフィブリノゲンを使用し、ミニスラブ電気泳動装置(AE-6530 アトー)で行った。サンプルとして、臓器をホモジナイズして、血液成分を十分に取り除いたものに沈殿の重量の5倍のSDS処理液(メルカプトエタノールを含まない)を加えて反応させた後、 4°C 、 7000G で遠心して得た上清 $20\mu\text{l}$ をそれぞれのレーンに泳動した。泳動には、Laemmli²⁾のトリス・グリシン緩衝液(pH8.3)を使用した。泳動後、ゲルを2.5% TritonX-100と蒸留水の等量混和液に浸して30分間ゆっくりと攪拌する操作を行い、外液を捨てた。次にTritonX-100, 0.1Mグリシン・水

酸化ナトリウム緩衝液(pH8.3)の混和液に浸してゆっくりと30分間攪拌する操作を2回繰り返した。その後、0.1Mグリシン・水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.3)と蒸留水の溶液中で、 37°C で24時間インキュベートした。ゲル中のプロテアーゼ活性を50%トリクロロ酢酸溶液に浸して酵素反応を停止させ、7%酢酸溶液でトリクロロ酢酸溶液を除去した後、アミドブラックで染色した。7%酢酸で脱色後、出現した溶解窓を観察した。分子量の測定には、牛血清アルブミン(67kDa, sigma), 卵白アルブミン(43kDa, sigma), 大豆トリプシンインヒビター(20.1kDa, sigma)を分子量既知マーカーとして使用した。

統計処理は、すべての成績を平均と標準偏差で表し、Student's t-testを行い、危険率5%以下を有意な差とした。

実験結果及び考察

白血球数(Fig. 1.)は、対照群に比べてカラゲニン注入群の方が有意に増加していた。体重に対する脾臓重量の比も対照群と比べ、カラゲニン注入群の方が有意に増加した(Fig. 2.)。また、トロンビン時間についても、対照群に比べて、カラゲニン注入群の方に延長傾向がみられた(Fig. 3.)。堀江らの実験により、フィブリン分解物(FDP)やフィブリン分解活性においても増加している報告⁶⁾がある。このことから、カラゲニン誘発の炎症による線維素溶解系の影響がみられたものと考えられた。

正常血漿においてもわずかに検出されるプラスミノゲンに由来する分解物のバンドはカラゲニン誘発炎症により多く検出された。

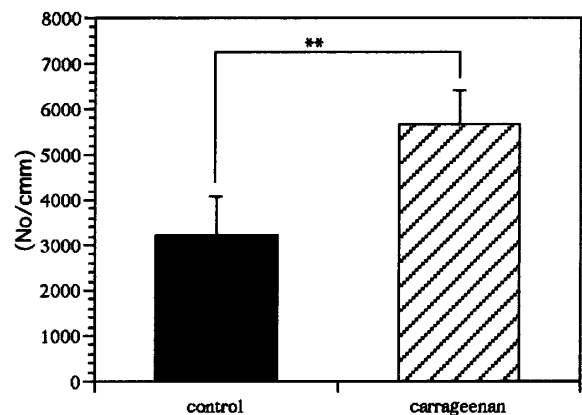


Fig. 1. Variations of leukocyte number on 10th day after carrageenan injection. Several bars are average and SD. **: $p < 0.01$

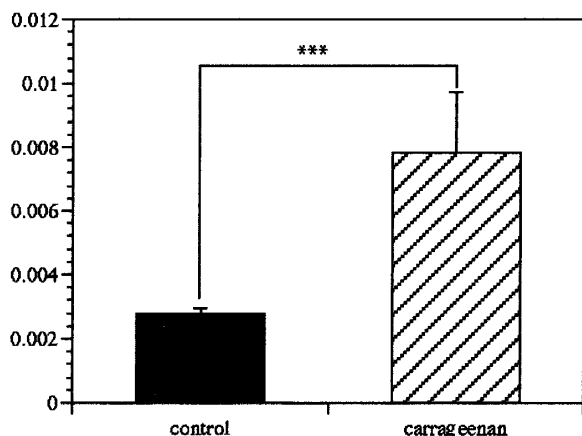


Fig. 2. Variations of the spleen weight on 10th day after carrageenan injection. Several bars are average and SD. ***:p<0.001

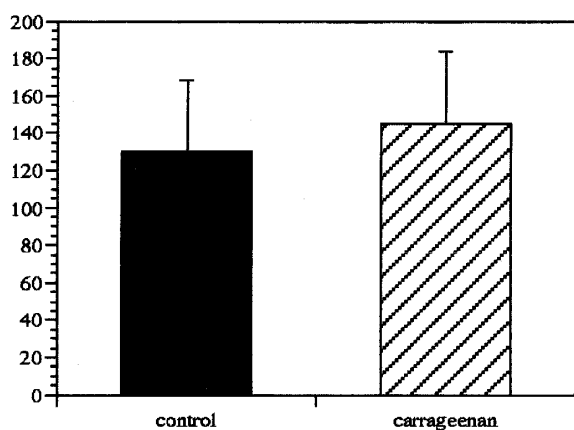
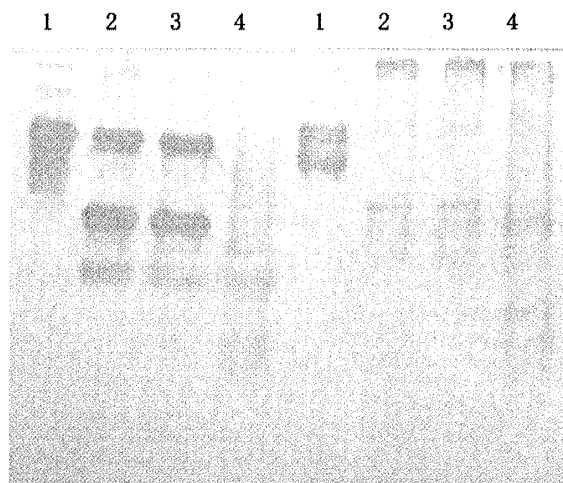


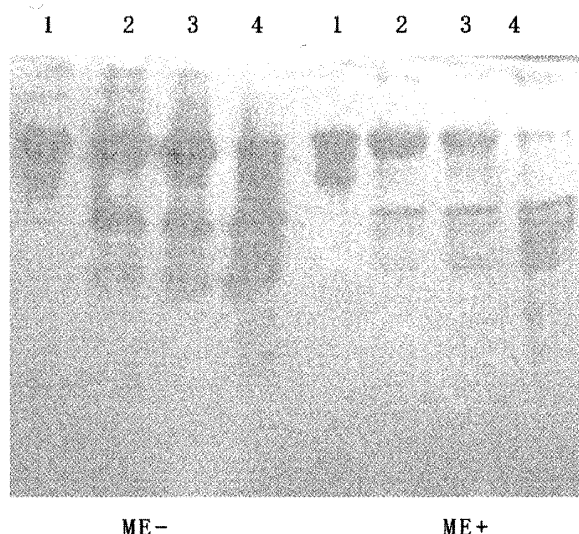
Fig. 3. Variations of thrombin time on 10th day after carrageenan injection. Several bars are average and SD.

脾臓及び肺に含まれる酵素を 2M 過塩素酸ナトリウム液で抽出し、精製プラスミノゲンと反応させ、その分解物を SDS-PAGE によって解析した。カラゲニン誘発炎症の脾臓 (Fig. 4) と肺 (Fig. 5) の結果については、各臓器中の酵素によるプラスミノゲンの分解物が炎症によって頻繁にみられた血漿のものと同様のよく似た泳動パターンを示しており、また、白血球カテプシン G (コスモ・バイオ、東京) をプラスミノゲンに作用させたものとも類似していた (Fig. 6)。これらのことから、循環血液中にあるプラスミノゲンの分解物は白血球由来のカテプシン G によるものの可能性が示唆された。

フィブリノゲンをあらかじめ含む SDS-PAGE に脾臓 (Fig. 7) から抽出した酵素を泳動させ、マーカー蛋白質の移動度と分子量で作成した標準曲線より、脾臓中の酵素の分子量は 89kDa, 33kDa,



ME- ME+
Fig. 4. Digestion of plasminogen by carrageenan-injected spleen. Lane 1; plasminogen alone, lane 2; 1/25 dilution of spleen extract and plasminogen, lane 3; 1/5 dilution of spleen extract and plasminogen, lane 4; spleen extract and plasminogen.



ME- ME+
Fig. 5. Digestion of plasminogen by carrageenan-injected lung. Lane 1; plasminogen alone, lane 2; 1/25 dilution of lung extract and plasminogen, lane 3; 1/5 dilution of lung extract and plasminogen, lane 4; lung extract and plasminogen.

30kDa を示し、89kDa の活性は対照群に強くあらわれ、33kDa と 30kDa の活性は、カラゲニン注入群に強くあらわれた。分子量 78kDa, 52kDa, 43kDa, 40kDa の部位にプラスミノゲン・アクチベータによる溶解窓がみられた。52kDa のプラス

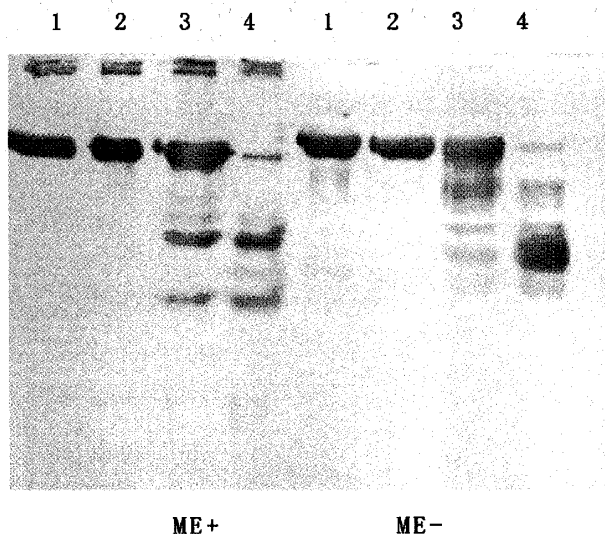


Fig. 6. Digestion of plasminogen by cathepsin G. Lane 1; plasminogen alone, lane 2; human leukocyte cathepsin G(0.05units)and plasminogen, lane 3; cathepsin G(0.4units)and plasminogen, lane 4; cathepsin G(2units)and plasminogen.

ミノゲン・アクチベータは、ブタの脾臓で 53kDa にウロキナーゼタイプであることが報告されていることから、ウロキナーゼタイプであるものと推察する⁶⁾。

脾臓は細網内皮系器官のひとつであり、リンパ球の生成や抗体産生作用や老廃赤血球の破壊作用をもつ。また、脾臓に存在するマクロファージなどの食作用を有する細胞で異物や細菌を取り込み、生体防御の一役を担っている。こうした脾臓が本来持つ食作用の機能から考えて、プラスミノゲン分解物は、脾臓に存在する食作用を有する細胞による可能性が示唆される。

フィブリノゲンをあらかじめ含む SDS-PAGE に肺(Fig. 8.)の酵素を含む抽出液を泳動させ、マーカープロテインを使ってあらかじめ作成した移動度と分子量の標準曲線より、肺抽出液中の酵素の分子量は 90kDa と 33kDa を示し、ここでも対照群に比べカラゲニン注入群に強くあらわれた。分子量 72kDa, 61kDa, 46kDa の部位にプラスミノゲン・アクチベータによる溶解窓がみられた。

肺にも脾臓と同様に肺胞マクロファージが存在し、これがプラスミノゲンの分解に一役を担っているのではないかと推定する。酵素活性の増強については、脾臓に比べて肺の方がカラゲニンによって強まる傾向があった。

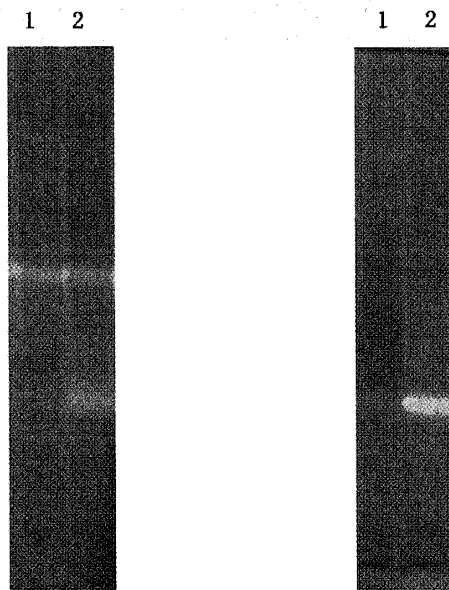


Fig. 7. Digestion of fibrinogen by spleen extract. Lane 1 are digestion pattern of fibrinogen by control spleen. Lane 2 are digestion pattern of fibrinogen by carrageenan-injected spleen.

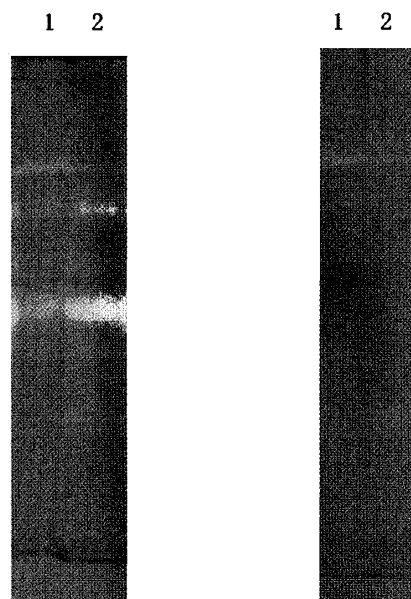


Fig. 8. Digestion of fibrinogen by lung extract. Lane 1 are digestion pattern of fibrinogen by control lung. Lane 2 are digestion pattern of fibrinogen by carrageenan-injected lung.

フィブリノゲンを含む SDS-PAGE において、市販のヒト白血球エラスターゼ(コスモ・バイオ, 東京)は 33kDa 付近にブロードな溶解窓を、また市販

のヒト白血球カタプシン G は 30kDa 付近にシャープな溶解窓を認めた。また、脾臓と肺はともに 33kDa 付近にシャープな溶解窓であった。この溶解窓の分子量は、ヒト白血球エラスターゼと同じであったが、フィブリノゲンに対する溶解性において違っていた。また、プラスミノゲンの分解物は、臓器中に含まれる酵素とヒト白血球カタプシン G とのバンドが類似のものであった。これらの差は、動物種による可能性があり、この同一性を追及するためには、同種動物による検討が必要であろう。

まとめ

カラゲニンを皮下注射して 10 日目のマウスの血漿中にみられるプラスミノゲンの分解物について検討した。脾臓並びに肺に含まれる酵素を 2M 過塩素酸ナトリウムで抽出したものによるプラスミノゲンの分解物と血漿プラスミノゲンの分解物と同様の部位にみられた。これらの分解物は、ヒト白血球カタプシン G による分解物と同様の部位であった。

脾臓並びに肺の SDS 抽出液中のフィブリン分解酵素によるフィブリノゲン溶解窓は、ヒト白血球由来エラスターゼと同様の部位にみられ、ヒト白血球由来カタプシン G によるものより、わずかに高分子の部位にみられた。このフィブリノゲン分解酵素活性は、カラゲニン誘発炎症により増強した。

文 献

- 1) Horie, N., Kinoshita, A., Iemoto, A., Okamoto, U. and Okada, Y., *Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci.*, **41**, 27-34 (1993)
- 2) Laemmli, U.K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 3) Deutsch, D.G. and Mertz, E.T., *Science*, **170**, 1095-1096 (1970)
- 4) Brockway W.J. and Castellino, F.J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 194-199 (1972)
- 5) Heussen, C. and Dowdle, E.B., *Analytical Biochem.*, **102**, 196-202 (1980)
- 6) 堀江 登, 岡本 歌子, 清水 はじめ, 太田 直登, *医学のあゆみ*, **136**, 139-140 (1986)