

## 担癌マウスの腹水貯留と組織プラスミノゲン・アクチベーター の関連について

木下明美, 堀江 登  
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

### Tissue type plasminogen activator in ascites on tumor-bearing mice.

Akemi Kinoshita and Noboru Horie

*Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663, Japan.*

The behaviors of coagulation and fibrinolysis in the ascites and of ascitic volume after intraperitoneal injection of sarcoma 180 cells ( $2 \times 10^7$ ) were investigated. After the injection of sarcoma 180 cells, both levels of FDP (fibrin-fibrinogen degradation products) and t-PA (tissue type plasminogen activator) in the ascites were increased in parallel with the store of ascites, the ascitic fibrinogen level was decreased. The t-PA found in the ascites was attached to fibrin and polyclonal antibodies were raised against human t-PA isolated from uterus.

In experiments with tranexamic acid or antibody for human uterus t-PA, the store of ascitic volume on the 5th day after injection of sarcoma 180 cells was remarkably decreased, but the fibrinogen and the FDP levels were not influenced.

These results suggest that the t-PA may play an important role for store of ascites.

### 緒 言

プラスミノゲン・アクチベーター(PA)は、タンパク質分解酵素の前駆体であるプラスミノゲン(PG)を限定分解することによって、プラスミン(PL)に活性化される酵素である。この酵素は免疫学的に組織型のPA(t-PA)とウロキナーゼ(UK)型のPA(u-PA)に区別される。これらの酵素が、癌細胞により生成され、これらの増殖と転移の過程に関与することが推察されている。<sup>1)2)3)</sup>種々の腹水中にフィブリノゲン(FG)とこの代謝産物(FDP)さらにPAの存在が報告され、腹水中での凝固・線溶系因子の動態が注目される。<sup>4)5)6)7)</sup>

著者らは、ザルコーマ180細胞をマウスの腹腔内に接種して作製した実験モデルにおいて、u-PAおよびt-PAの両者が腹水中に存在することをすでに報告した。<sup>8)</sup>本論文においては、同じ実験モデルを用いて腹

水貯留の過程における腹水中ならびに血中のt-PAならびにFGとFDPの動態、さらに腹水貯留量を追求することにより、t-PAの腹腔内における役割を検討した。

### 材料および方法

実験動物として、8~10週齢雄性マウス(Jcl-ICR)を使用し、 $2 \times 10^7$ 個のザルコーマ180細胞を腹腔内に接種した後、1, 3, 6, 10, 15日目にエーテル麻酔下で剖検し、腹水の採取と腹部後大静脈から採血した。

血液について、クエン酸加血液を使用して白血球数を、クエン酸加血漿を使用してFG濃度、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)、FDP濃度、およびt-PA濃度を測定した。腹水について、腹水量、癌細胞数、FG濃度、FDP濃度およびt-PA濃度を測定した。

白血球数はクエン酸加血液を Türk 液で、また癌細胞数は腹水を 0.3% トリパンブルー液で希釈して、Bürker-Türk 計算盤で計測した。腹水量は腹水採取前と採取後の体重量の差から求めた。FG 濃度はトロンビン時間法によって求め、APTT にはエラジン酸を含む活性化セファロプラスチンであるアクチン(Dade 社, Aguada)を、PT にはトロンボプラスチン C(Dade 社)を使用した。これらの凝固時間の測定には血液凝固自動測定装置(KC1A, Heinrich Amelung 社, Lemgo)を用いた。FDP 濃度は Hawinger et al.<sup>9)</sup> のブドウ球菌(Sigma Chem. 社, St. Louis)を使用した凝集試験法(SCT)によった。

マウスの t-PA 濃度の測定は、東洋紡績(大津)より供与されたヒト子宮筋から単離した t-PA に対して作製した家兎血清を一次抗体に使用した酵素免疫法によった。また、ヒト t-PA に対して作製した家兎血清よりプロテイン A セファローズ CL-4B (Pharmacia LKB Biotechnology 社, Uppsala)を使用して IgG 画分を精製した。このヒト t-PA に対する家兎 IgG ならびにトラネキサム酸(t-AMCHA: 第一製薬, 東京)の腹水の貯留量に対する影響は、ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、4mg/体重 kg のヒト t-PA に対する IgG ならびに 1g/体重 kg または 2g/体重 kg の t-AMCHA を毎日背部皮下および腹腔内に注入し、5 日目の腹水量を測定することによって調べた。

腹水中に出現した PA は、ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、6 日目の腹水に最終濃度が 1 unit/ml になるように牛トロンビン(持田製薬, 東京)を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、生じたフィブリン(F)を遠心分離により回収し、使用した腹水と等量の 2M チオシアン酸カリウム(KSCN)溶液で抽出した。さらに、この抽出液を 0.14M 塩化ナトリウムを含む 0.02M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3, PBS)の 10 倍量で希釈した後、ヒト t-PA に対する IgG を結合させたセファローズ 4B (Pharmacia LKB Biotechnology 社)を充填したカラムに通過させ、PBS で十分に洗浄した後、2M KSCN 溶液で PA を溶出した。

このようにして行われた PA 画分の電気泳動法による PA の同定は、PG を含む FG(第一化学, 東京)をあらかじめ混入させて作製した SDS ポリアクリルアミドゲルを支持体にして行う SDS-PAGE 法<sup>10)</sup>によった。

成績は平均値±標準偏差値で表し、Student's t-test によって統計処理し、危険率 5% 以下を有意な差とした。

## 結 果

- ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後の腹水の貯留量ならびに腹水中の FG と FDP 濃度の変動  
ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、腹水は 3 日目より出現し、その後腹水量は著しく増加した(図 1)。腹水中の FG は、腹水の採取が可能になった 6 日目に多く検出されたが、その後急速に減少し、10 日目にほとんど認められなかった。一方、腹水中の FDP は 6 日目にすでに出現し、その後腹水量の増加に伴って著しく増加した。

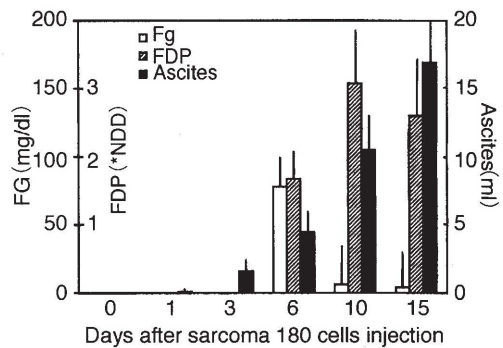


Fig. 1. Variations of ascitic volume, fibrinogen and FDP in ascites after sarcoma 180 cells injection. Samples were taken at each day after injection (I.P.) of sarcoma 180 cells. Values are mean  $\pm$  SD of 12 mice. \*NDD: numbers of double dilution.

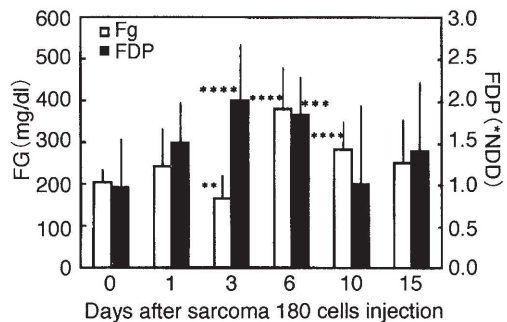


Fig. 2. Variations of fibrinogen and FDP in plasma after sarcoma 180 cells injection. Samples were taken at each day after injection (I.P.) of sarcoma 180 cells. Values are mean  $\pm$  SD of 12 mice. \*NDD: numbers of double dilution.

\*\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.01$  and \*\*\*\* :  $p < 0.001$  versus the control (0) in each group.

2. ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後の血漿中の FG 量と血清中の FDP 量の変動

血漿中の FG 濃度はザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、3 日目に対照に比べてわずかに減少したが、6 日目に著しく上昇し、その後わずかではあるが上昇傾向を示した(図 2)。また、血清中の FDP 量は 1 日目から著しく増加し、この傾向は 15 日目まで続いた。

3. ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後の血漿ならびに腹水中の t-PA 濃度の変動と腹水中に出現した PA の同定

ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、血漿中の t-PA 濃度は 1 日目に増加したが、3 日目以後減少した。一方、腹水中の t-PA 濃度は腹水の採取が可能になった 6 日目に増加し、その後減少した(図 3)。ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、6 日目の腹水中に検出された PA はヒト子宮筋由来の t-PA に対する IgG を結合させたセファローズ 4B に特異的に結合し、さらに F にも同様に結合した。しかも電気泳動法においても、対照に使用したヒト子宮筋由来の t-PA と同様の移動度を示し、またヒト子宮筋由来の t-PA の抗体によって PA 活性が消失した(図 4)。

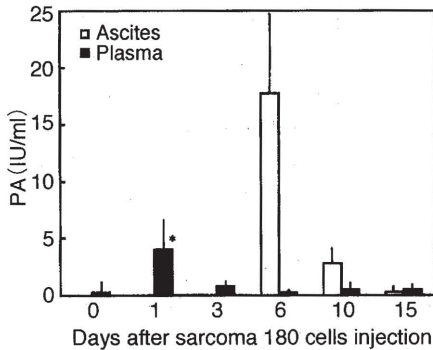


Fig. 3. Variations of t-PA in plasma or ascites after sarcoma 180 cells injection. Samples were taken at each day after injection (I. P.) of sarcoma 180 cells.

Values are mean  $\pm$  SD of 8 mice.

\*:  $p < 0.05$  versus the control (0) in each group.

4. ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後の腹水貯留量ならびに腹水中の FG と FDP 量に対するヒト t-PA 抗体と t-AMCHA の影響

ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後、ヒト t-PA に対する IgG ならびに t-AMCHA を毎日背部

皮下ならびに腹腔内に注射した 5 日目の腹水貯留量を図 5 に、また採取した腹水中の FG と FDP 濃度を図 6 に示す。腹水貯留量はヒト t-PA に対する IgG ならびに t-AMCHA の皮下注射(S. C.)によって有意に減少した。しかし、腹水中の FG と FDP 濃度にはほとんど差がなかった。また、ヒト t-PA に対する IgG ならびに t-AMCHA の腹腔内注射(I. P.)によっても、腹水貯留量ならびに腹水中の FG と FDP 量において S. C. と同様の成績が得られた。



Fig. 4. Fibrinogen containing SDS-PAGE patterns of ascitic plasminogen activator.

Left lane is t-PA (H-tPA) from human uterus, center lane is a mixture of saline and PA (A-PA) from ascites, right lane is a mixture of anti-tPA and PA (A-PA) from ascites.

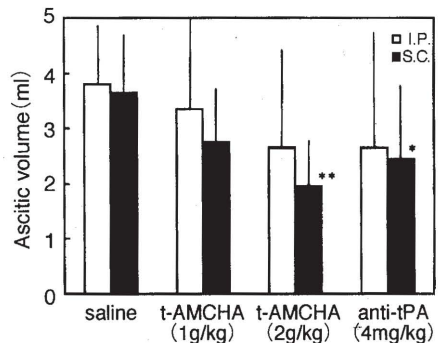


Fig. 5. Effects of tranexamic acid (t-AMCHA) or anti-tPA on ascitic volume of the 5th day after injection of sarcoma 180 cells.

Values are mean  $\pm$  SD of 7 mice. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$  versus the saline in each group.

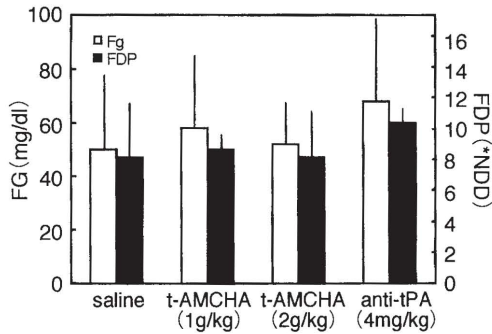


Fig. 6. Effects of subcutaneous injection of tranexamic acid (t-AMCHA) or anti-tPA on ascitic fibrinogen or FDP of the 5th day after sarcoma 180 cells injection.

Values are mean  $\pm$  SD of 7 mice. \*NDD: numbers of double dilution.

## 考 察

本研究で使用したザルコーマ 180 細胞には PA の合成と分泌能の有無の確認はされていないが, Petersen et al.<sup>8)</sup> はヒトの同タイプの細胞が 1 本鎖 u-PA の前駆体を分泌すること, さらに Hayashi & Yamada<sup>4)</sup>, Hafter et al.<sup>5)</sup>, Funahara<sup>6)</sup>, 今井他<sup>7)</sup> は腹腔内に線溶系酵素と非プラスミン性線溶系酵素さらに FDP が存在することなどを報告し, 腹水中の線溶系が亢進状態であることを示唆した。

本研究において, ザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後, 腹水は徐々に貯留し始め, 日を追うに従って加速度的に増加した。今回使用したザルコーマ 180 細胞では, 採取された腹水中の凝固・線溶系因子が測定可能になるのは細胞を接種して 5 日目以降であった。この腹水中の FG は腹水の採取が可能になった 6 日目に多く, その後急激に減少した(図 1)。腹水の APTT も 6 日目では測定が可能であったが, その後凝固せず測定が不能になった。一方, 腹水中の FDP 量は 6 日目以降増加した。これらのことは, 図 3 に示すように 6 日目以降に PA が腹腔内で多く検出され, 線溶系が亢進して FG ならびに凝固系因子が分解したためと推察する。著者らは, この PA が Petersen et al.<sup>8)</sup> がヒトのザルコーマ細胞で検出した u-PA や Hayashi & Yamada<sup>4)</sup> が乳癌患者の腹水中で検出した u-PA とは異なり, t-PA も関与していたことを電気泳動法と免疫的な方法を使用することによって同定

した(図 4)。さらに, この PA が t-PA 抗体, F ならびにリジン・セファロースカラムに結合したことから t-PA であったことを確認した。また, 著者らはザルコーマ 180 細胞を接種したマウスの腹水をベンズアミジン・セファロース 4B カラムに吸着させた画分にヒトの UK と同様の移動度を示す PA 活性が検出されたことを報告した。<sup>8)</sup> この UK 様 PA は Petersen et al.<sup>11)</sup> および Hayashi & Yamada<sup>4)</sup> が報告した u-PA と同様に癌細胞に由来するものであったと推察する。また, 採取した腹水中の癌細胞数は 6 日目に多く, その後減少した。このことは腹水中の栄養源が減少し, これを求めて血管新生が著しく亢進していた腸間膜などの血管の周囲に付着したためと推察する。これらのことから, 本研究において検出された t-PA は癌細胞に由来したものではなく, 癌細胞を腹腔内に接種した後の腸間膜, 腹膜と横隔膜に認められる著しく新生した血管内皮細胞に由来したものと推察する。

一方, 血液中の凝固・線溶系に関するパラメーターでは, FG 量は図 2 に示すようにザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後, 3 日目で一時的に減少したが, 6 日目から増加した。それに対して FDP 量は細胞接種後すぐに増加した。また, この FG の増加は, ザルコーマ 180 細胞を接種した後, 図 3 に示すように血中に t-PA が検出され, 線溶系による F 分解が亢進したために生じた FDP や急増した白血球に由来する Hepatocyte-stimulating factor<sup>12)</sup> およびインターロイキン 1 によって肝細胞が刺激され, 急性期タンパク質である FG が一時的に増加したものと推察する。また, 血中 FDP の増加は増加した好中球などに由来するカテプシン G やエラスターゼによったもの<sup>13)</sup> とも考える。血漿の APTT と PT はザルコーマ 180 細胞接種後の APTT が 1 日目と 3 日目でわずかに短縮したが, 6 日目にいずれも延長し, 凝固因子の一時的な消耗が誘発された。また, 高分子量キニンゲンが 6 日目以降減少し, カリクレイン・キニン系の亢進も認められた。これらのことはザルコーマ 180 細胞を接種した後, 腹腔内と同様に血中の凝固・線溶・キニン系に著しい変動が生じたことを暗示するものであった。

さらに, 本研究においてザルコーマ 180 細胞を腹腔内に接種した後の腹水の貯留と腹水中の FG 代謝に対するヒト t-PA 抗体と t-AMCHA の影響を検討した。図 5 に示すようにザルコーマ 180 細胞を接種した後の腹水の貯留に対して, t-AMCHA ならびにヒト t-PA 抗体が有意に抑制した。これらの成績は, Åstedt et al.<sup>14)</sup> は t-AMCHA が癌細胞の増殖を抑制したこと,

Tanaka et al.<sup>15)</sup> は t-AMCHA が癌細胞の転移を抑制したこと、Ossowski & Reich<sup>16)</sup> は u-PA の抗体が癌細胞の転移を抑制したこと、森口<sup>17)</sup> はエールリッヒ細胞を移植したマウスの腹腔内の線溶系を t-AMCHA が抑制したこと、さらに Funahara<sup>6)</sup> はエールリッヒ細胞を移植したマウスの腹水貯留を t-AMCHA が抑制したことなどの報告と一致した。しかし、図 6 に示すようにザルコーマ 180 細胞を接種した後の FG 量の減少と FDP 量の増加に対して t-AMCHA ならびにヒト t-PA 抗体がほとんど影響しなかった。

これらのことは、ザルコーマ 180 細胞を接種した後の腹腔内における FG 代謝に対して、凝固・線溶系ばかりではなく好中球やマクロフェージによるエラストラーゼならびにカテプシン G による FG 分解と F 除去機構<sup>13)</sup> が関与していることを示唆するものである。

## 結 語

ザルコーマ 180 細胞を接種した後、腹水の貯留に伴ってヒト t-PA に対する抗体ならびに F に特異的に結合する t-PA が腹水中に出現し、FG 代謝が亢進した。また、ヒト t-PA に対する抗体ならびに t-AMCHA が腹水の貯留を抑制した。これらのことから、腹水の貯留に対して t-PA が関与する可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Reich, E., *Proteases and Biological Control*, ed. by Reich, E., Rifkin, D. B. and Shaw, E., Cold Spring Harbor Lab. NY, 331-341 (1975)
- 2) Markus, G., *Semin. Thromb. Hemost.*, **10**, 61-70 (1984)
- 3) Peterson, H. I., *Acta Chir. Scand.* [suppl] **394**, 1-42 (1968)
- 4) Hayashi, S. and Yamada, K., *Thromb. Res.*, **38**, 459-467 (1985)
- 5) Hafter, R., Klaubert, W., Gollwitzer, von Hugo, R. and Graeff, H., *Thromb. Res.*, **35**, 53-64 (1984)
- 6) Funahara, Y., *Kobe J. Med. Sci.*, **11**, 79-88 (1965)
- 7) 今井英雄, 遠藤英二, 有賀豊彦, 沢井洋子, 吉田真理子, 塩沢和夫, 高橋雅章, 大柴 進, 血管と脈管, **14**, 370-372 (1983)

- 8) 堀江 登, 和中敬子, 山本順一郎, 血管と脈管, **19**, 495 (1988)
- 9) Hawinger, J., Niewiarowski, S., Gurewick, V. and Thomas, D. P., *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 93-108 (1970)
- 10) Horie, N., Okamoto, U. and Wijngaards, G., *Thromb. Res.*, **45**, 703-707 (1987)
- 11) Petersen, L. C., Lund, L. R., Nielsen, L. S., Dano, K. and Skriver, L., *J. Biol. Chem.*, **263**, 11189-11195 (1988)
- 12) Ritchie, D. G. and Fuller, G. M., *Annal. NY Acad. Sci.*, **408**, 490-502 (1983)
- 13) 永松陽子, 岡本歌子, 大田洋嗣, 高橋道子, 津田裕子, 岡田芳男, 医学のあゆみ, **132**, 870-871 (1985)
- 14) Åstedt, B., Glifberg, I., Mattsson, W. and Trope, C., *JAMA*, **238**, 154-155 (1977)
- 15) Tanaka, N., Ogawa, H., Kinjo, M., Kohga, S. and Tanaka, K., *Br. J. Cancer*, **46**, 428-435 (1982)
- 16) Ossowski, L. and Reich, E., *Cell*, **35**, 611-619 (1983)
- 17) 森口爽子, 日本生理誌, **33**, 355-363 (1971)