

ヒト胎盤のウロキナーゼ阻害因子に関する研究

金沢大学医学部第二病理学講座(主任:石川大刀雄教授)

川野 武彦

(昭和47年9月4日受付)

〔I〕胎盤からの抽出と精製

生体内で線容系の活性酵素と拮抗関係を維持する阻害因子として、血漿中にプラスミン阻害因子の存在することが知られ^{1)~5)}、その分離・精製や性状について多くの報告がなされてきた^{6)~16)}。一方、プラスミノゲンの活性化段階に対する阻害因子の存在も示唆されてはいたが^{17)~21)}、プラスミン阻害因子との区別問題が多く、プラスミノゲン活性化因子であるウロキナーゼに対する阻害因子がヒト血漿中に存在することが明らかにされたのは近年(1968年)²²⁾のことである。その後、血漿・血清あるいは組織抽出液を用いてのウロキナーゼ阻害活性の測定は活潑に行なわれているが^{23)~30)}、阻害因子そのものに関する研究はほとんど行なわれていない現状である。

著者も先に、ヒト胎盤抽出液が、プラスミンをほとんど阻害しないがウロキナーゼを極めて強力に阻害することを見出し³¹⁾、多量のウロキナーゼ阻害因子の胎盤中の存在を明らかにした³²⁾。ついでヒト胎盤からウロキナーゼ阻害因子の分離・精製を行ない、その性状および線容系の拮抗関係における役割などについて種々の検討を行なったので、得られた成績を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 実験材料

1) ウロキナーゼ(以下UKと略す)

KKミドリ十字製を0.1M磷酸緩衝液(pH7.2)で100Ploug³³⁾U/mlに溶解したものを原液とし、小分けして凍結保存し、用時その一部を融解・希釈して用いた。

2) プラスミン(以下PLと略す)

Sgouris らの方法³⁴⁾のHinkらの変法³⁵⁾により調製した酸性可溶性ヒト・プラスミノゲンを、UKで活性化して用いた。PL活性はカゼイン分解法³⁶⁾により測定した。

3) トリプシン(以下TRと略す)

NBC製、2回結晶、塩類フリー、を用いた。

4) フィブリノーゲンおよびトロンビン

いずれもヒト由来、KKミドリ十字製を用時溶解して用いた。

2. 実験方法

1) UK阻害活性の測定法

Astrup らのフィブリン平板法³⁷⁾の Alkjaersig らの変法³⁸⁾を用いた。また、前述のUK原液を0.9%食塩水で希釈して20U/mlの溶液を作り、これを100%活性とし、その2倍希釈液(10U/ml)を50%活性とした。測定試料の、0.9%食塩水による2倍希釈液列を作り、原液および各希釈液をUK100%活性溶液と等量混合した。対照のUK溶液(20U/mlおよび10U/ml)、および上記の測定試料との等量混液の各0.02mlをフィブリン平板に滴下し、37°C、20時間後溶解面積を測定した。溶解面積は、溶解円の短径およびそれに直交する径の積をもって現わし、1試料液について2回測定の平均値をとった。試料液の希釈倍数を横軸に、溶解面積を縦軸にとって測定値をプロットし、50%活性溶液(10U/ml)の示す溶解面積に相当する試料の希釈倍数(N)を求め、10×Nによってもとの試料(原液)の阻害活性単位を算出した。この方法によると、50%阻害点においてUK1単位の活性を阻止する阻害活性を、1単位として求めたことになる。

2) PLおよびTRの阻害活性の測定法

前項のフィブリン平板を80°C、60分加熱してプラスミノゲンを破壊した加熱平板³⁹⁾を用いた。PLは0.9%食塩水に、TRは0.025M塩化カルシウムに溶解・使用した。

測定試料の阻害活性の評価は、前述の方法に準じ50%阻害点において求めたが、阻害活性単位は、PL阻害の場合1カゼイン単位のPLを阻止する阻害活性

Studies on the Urokinase Inhibitor Extracted from Human Placenta. **Takehiko Kawano**, Department of Pathology(II) (Director : Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

を1単位, TR阻害の場合1 μ gのTRを阻止する阻害活性を1単位とした。

3) 吸光度測定

必要に応じ試料の吸光度を波長280m μ および410m μ において測定した。280m μ における吸光度は試料中の蛋白量を, 410m μ における吸光度はヘモグロビンの混在量を知るために用いた。

II. 実験成績

1. 胎盤抽出液の阻害活性

1) 正常血清および妊婦血清との比較

胎盤抽出液は, 娩出されたヒト胎盤の外側を水洗し, ポリエチレン袋に入れ直ちに凍結したものを200個を, 径5mm以上の粗大片を認めなくなるまでくさき, 0.9%食塩水200lを加え, 30分間5~10°Cで攪拌抽出し, 1,500g \times 20分の遠心分離により固形物を除いて調製した。抽出液の蛋白濃度は約2%で, そのうち50~70%がヘモグロビンであった。

正常血清は, 100人から集めてプールしたクエン酸塩加血漿⁴⁰⁾に, トロンビンを2U/mlの割合に加えて凝固させ, 血餅退縮後, 上清を分離することによって得た。

妊婦血清は, 妊娠8~9ヵ月の妊婦から得た血液を一夜冷蔵庫中において凝固させ, 血餅退縮後, 上清を

分離することによって得た。

これらの試料について阻害活性を測定した結果は表1の如くであった。胎盤抽出液および正常血清は, 多人数の平均的なものとして得られているのに対し, 妊婦血清は個人から得られているという相違がある。また, 正常血清はクエン酸塩加血漿から作られているので, 本来の血清に較べ10~20%稀釈されている。

表1の成績は各群間の差を明瞭に示している。すなわち, ウロキナーゼ阻害因子(UKI)は, 胎盤抽出液に極めて多量に含まれており, 妊婦血清にも, Brakmannら¹⁸⁾の示唆したように, 正常血清の数倍含まれている。一方, トリプシン阻害因子(TRI)は, Faarvangら⁴¹⁾の指摘したように, 妊婦血清には正常血清の約2倍量含まれているが, 胎盤抽出液には少ない。プラスミン阻害因子(PLI)は, あまり明瞭ではないが, 妊婦血清では正常血清に較べ僅に増加傾向がうかがわれる成績であるが, 胎盤抽出液には少ない。TRIおよびPLIの胎盤抽出液中の存在量は妊婦血清の1/10程度であり, 胎盤抽出液の血清蛋白量から推定される妊婦血清の混在量と略々一致し, 妊婦血液に由来していると考えられる。これに反しUKIは, 妊婦血清の約8倍の濃度に存在し, これが単に胎盤に含まれていた妊婦血清に由来するものではないこ

表1 胎盤抽出液, 妊婦血清および正常血清の阻害活性

試料	No.	ウロキナーゼ 阻害 (U/ml)	プラスミン 阻害 (U/ml)	トリプシン 阻害 (U/ml)
胎盤抽出液	1	1,420	< 10	378
	2	1,970	< 10	337
	3	1,810	26	359
妊婦血清	1	109	259	3,630
	2	180	291	2,755
	3	297	285	4,970
	4	218	621	4,310
	5	237	158	3,000
	6	220	—	4,670
	7	175	150	3,355
正常血清	1	48	136	1,855
	2	30	157	2,350
	3	30	—	1,470
	4	32	240	1,585

とを示している。胎盤抽出液は胎盤1個から平均1,200ml得られるので、胎盤1個から抽出されたUKIの総活性は妊婦血清の約10ℓに相当することになる。以上のことから、胎盤には、特にUKIが多量存在することは明らかである。

2) 抽出部位との関係

新鮮なヒト胎盤の外側を水洗し、凍結させることなく、ガーゼで外側を軽く拭き、胎児側(臍帯側)を下にして台上に広げ約3×3cmの大きさの組織を切り出し、厚さ(約5cm)の方向で3分した。胎児側、中間部、母体側組織のそれぞれをハサミで細片とし、0.9%食塩水を加え、0°CでPotter-Elvehjem型ホモジナイザーにかけた後遠心分離によって得た上清を1次抽出液とした。遠心沈渣に再び0.9%食塩水を加え、ホモジナイザーにかけて得た抽出液を2次抽出液とした。別に、臍帯および羊膜についても同様に抽出(1回)を行なった。

これらの抽出液につき、UKI活性、波長280mμおよび410mμにおける吸光度を測定した成績の代表例を表2に示す。組織g当り阻害活性は、胎児側よりも母体側において高い傾向が見られる。特に血液混入の少ない2次抽出液においてその傾向は明瞭である。OD₂₈₀およびOD₄₁₀当りの阻害活性においてもその傾向は一致し、母体側組織の方がUKIに富んでいる。

別に、羊水などの混入の少ない後血(retroplacental blood)から分離した5検体の血清についてUKI活性を測定したが、25~50(平均36)U/mlであり、妊婦血清のそれより低く略々正常値であった。

2. ウロキナーゼ阻害因子の分離・精製

実験成績1. 1)に記載した方法によって得た胎盤抽出液から、下記の如き方法でUKIを分離・精製した¹²⁾。処理はすべて4~6°Cで行なった。

すなわち、胎盤抽出液を水で5倍に稀釈し、1N HClでpH3.7に調整した後1N NaOHでpH7にもどすと、暗褐色の沈澱が生じるので遠心分離して除去する。上清に硫酸アンモニウムを380g/lの割合に加え、攪拌・溶解し生じた蛋白性沈澱を濾過することによって集める。この沈澱を少量の水に懸濁し、水に対して充分透析する。透析後存在する不溶物を除去し、上清に、0.01M磷酸塩緩衝液(pH6.6)で平衡化した湿潤状のCM-Sephadexを100g/lの割合に加えて攪拌し、濾過してCM-Sephadexを分離する。濾液をセロファン・チューブに入れ、乾燥したSephadex G-150にうずめて濃縮後、Sephadex G-150のカラム(6×60cm)にかけ、0.02M磷酸塩緩衝液(pH6.8)で溶出する。UKIと不純蛋白とは完全には分離しないので、ゲル濾過前に較べOD₂₈₀当り比活性が2倍以上に上昇した画分を集める。プールした画分を水に対し透析し、更に約1/10量に濃縮した後、hydroxylapatiteのカラム(2×23cm)にかけ、0.01M, 0.05M, 0.1Mおよび0.2M磷酸塩緩衝液(pH6.8)で段階的に溶出する。0.01Mおよび0.05Mの溶出液にはUKI活性はなく、0.1M溶出液のUKI活性は総活性・比活性ともに低い。0.2M溶出液のUKI比活性は高く、この画分を精製画分とした。各ステップにおける総活性・比活性などを

表2 抽出部位別ウロキナーゼ阻害活性

部 位	阻 害 活 性			
	U/g組織	U/抽出液OD ₄₁₀	U/抽出液OD ₂₈₀	
胎 盤 (一次抽出)	胎児側	618	8.9	10.3
	中 間	1,395	12.3	15.4
	母体側	1,060	11.4	13.3
胎 盤 (二次抽出)	胎児側	205	11.3	6.8
	中 間	361	18.3	11.2
	母体側	442	21.6	14.0
羊 膜 (一次抽出)	393	10.0	12.0	
臍 帯 (一次抽出)	0	—	—	

表3 ウロキナーゼ阻害因子の分離・精製

ステップ	総活性 ($\times 10^3$ U)	回収率 (%)	比活性 (U/OD ₂₈₀)	精製度
胎盤抽出液*	1,960	100	24.7	1.0
硫酸沈澱 (透析後)	1,040	53	201	8.1
CM-Sephadex 処理濾液	1,190	61	331	13.4
ゲル濾過後	455	23	579	23.4
精製画分	117	6	3,038	123

* 胎盤抽出液 2 l から出発

代表例について示すと、表3の如くであった。要約すると、出発材料の胎盤抽出液から精製画分に至る間に、OD₂₈₀当り比活性は123倍に上昇し、活性回収率は6%であった。

Ⅲ. 考 察

プラスミノゲン活性化因子は、一般に、産科領域の器官、例えば卵巣^{43)~45)}と子宮^{43)~47)}には高いレベルで含まれているにもかかわらず、胎盤にはその活性が殆んど認められない^{46)~50)}。線溶系に対する阻害因子の胎盤中の存在が示唆されてはいたが⁵⁰⁾⁵¹⁾、表1の成績は、この阻害因子はプラスミンに対するものではなく、プラスミノゲン活性化段階に対するものであり、かつ多量の阻害因子が存在することを示している。プラスミノゲン活性化因子としてウロキナーゼを用いたことから、Lauritsen²²⁾と著者³²⁾とは、相前後してこの阻害因子をウロキナーゼ阻害因子と呼んだ。

この阻害因子が単に胎盤に含まれている妊婦血液によるものではないことは、既に実験成績の1.1)の項で述べた通りである。妊娠の経過中血液の中に増量してくる阻害因子¹⁸⁾は分娩後正常に復する¹⁸⁾⁵²⁾。分娩の時間的経過を追って血液の線溶活性を測定した Shaper⁵³⁾の成績によると、陣痛時まで妊婦血液の線溶活性は低く抑えられているが、分娩後胎盤はその位置にあり(ただし恐らく胎盤の剥離は完了している)、

帯はまだ切断されていない時点で、既に正常レベルに復帰していることを示した。著者の測定した、胎盤剥離後の後血のウロキナーゼ阻害活性も、正常血清のレベルまで低下していた。胎盤とともに多量の阻害因子が体外に排出されることと考えあわせ、妊婦血液の線溶活性の低下はウロキナーゼ阻害因子の増量が原

因の1つであり、その阻害因子は胎盤剥離時に血中から胎盤に集まるのであろうと考えられる。この阻害因子の増量と胎盤への集中は、母体側の胎盤剥離創面からの出血を抑制する機能を果すことを示唆している。もしそうであるならば、胎盤の母体側の部位において、胎児側に比べ、阻害因子レベルが高いことが予想される。表2の成績で示される胎盤の部位別の測定で、この考えは或る程度支持されるであろう。

実験成績の項で述べた如く、胎盤1個から抽出される阻害因子の総活性は、平均として、妊婦血清の約10 l分に相当する。従って、妊婦血液中に増加してきた阻害因子の全量が胎盤に集中したとして計算した量よりも、なお多い。Januszko⁵⁴⁾の Wistar 系ラットを使った実験では、妊娠第2週目の胎盤において既に線溶系阻害因子は相当高いレベルに達し、妊娠の経過中阻害因子が胎盤で産生または蓄積されることを示している。ヒトの場合でも、妊娠中既に胎盤に相当量のウロキナーゼ阻害因子の蓄積があり、胎盤剥離時に更に母体血液中の阻害因子が胎盤に集中する、と考えるべきであろう。

分娩時異常出血の頻度は、500ml以上の出血は2.3~20.2%で平均10%程度、1,000ml以上の出血は0.45~6.45%、1,500ml以上のものは0.2~3.27%とされている⁵⁵⁾。分娩総数の大きさから考えて軽視できない問題と見なされる。異常分娩のうち胎盤早期剥離に限ってみれば、Ratnoff⁵⁶⁾は1/85(1.18%)~1/250(0.4%)の出現頻度を報告し、Hatton⁵⁷⁾は113例の胎盤早期剥離の中20%に低フィブリノーゲン血症を報告している。Phillipsの報告⁵⁸⁾では、低フィブリノーゲン血症は0.2%と低率であるが、その中35%は胎盤早期剥離による

ものである。馬⁵⁹⁾は12例の胎盤早期剥離のうち8例(66%)に低フィブリノーゲン血症を認めている。低フィブリノーゲン血症の原因については、凝固系因子と線溶系因子とが交錯して単純ではないが、胎盤早期剥離と低フィブリノーゲン血症との間に関連があるし、胎盤早期剥離の場合には正常分娩に比較し、母体血液および胎盤中のウロキナーゼ阻害因子量は不十分であろうから、少くとも胎盤早期剥離に伴う低フィブリノーゲン血症の原因の1つとして、ウロキナーゼ阻害因子の不足が関係している可能性が充分考えられる。またこのことは、逆に、正常分娩における生体防衛機構にウロキナーゼ阻害因子が関与していることを意味している。

IV. 結 語

ヒト胎盤抽出液、妊婦血清および正常血清について、ウロキナーゼ、プラスミンおよびトリプシンに対する阻害活性を測定し、ウロキナーゼ阻害因子が妊婦血液中に増加してくるばかりでなく、胎盤に多量に存在することが示された。

2. ヒト胎盤抽出液のプラスミンおよびトリプシンに対する阻害活性は、抽出液中に存在する妊婦血清の量に略々見合うが、ウロキナーゼに対する阻害活性は妊婦血清よりはるかに強い。このことは、前2者に対する阻害活性が母体血に由来するのに対し、ウロキナーゼに対する阻害活性は、主として、胎盤から抽出されたことを示している。

3. 胎盤の部位で分けると、ウロキナーゼ阻害因子は、胎児側よりも母体側に多い。

4. 胎盤から多量に抽出されるウロキナーゼ阻害因子は、一部は妊娠経過中に胎盤に蓄積され、一部は分娩時に母体から胎盤に集中するもの、と考えられる。また、胎盤剥離後の子宮創面の生理的止血機構に、ウロキナーゼ阻害因子の関与が推測される。

5. ウロキナーゼ阻害因子を胎盤抽出液から分離・精製し、比活性123倍、回収率6%の精製画分を得た。

〔II〕 ウロキナーゼ阻害因子の性状

前編で述べた方法により分離したウロキナーゼ阻害因子精製画分につき、主として生物学的性状の検討を行なった。

I. 実験方法

1. ウロキナーゼ(UK)阻害活性の測定法

1) フィブリン平板法

前編で述べた通りであるが、阻害率(%)は、100%活性UK溶液の希釈系列の溶解面積を測定し、作成した

標準曲線から、UKI溶液と等量混合した場合の溶解面積に相当する残存活性率を読み取るにより求めた。

2) フィブリン溶解時間法(試験管法)

Plougらの方法³³⁾の一部変法⁶⁰⁾を用いた。阻害率(%)は、上記と同様、別に作成した標準曲線から求めた。

3) エステル分解法

UKはリジンおよびアルギニンのエステルを分解する活性を有し、acetylglucyl-lysine methyl ester (AGLMe)は感度が良いので基質として適している⁶¹⁾。AGLMeを基質とするUK活性測定法⁶²⁾を応用して、UKIによる阻害を測定した。

2. プラスミン(PL)阻害活性の測定法

前編で述べた通りであるが、阻害率(%)は、別に作成した標準曲線から求めた。

3. トリプシン(TR)阻害活性の測定法

前編で述べた通りであるが、阻害率(%)は、別に作成した標準曲線から求めた。

4. ストレプトキナーゼ(SK)活性増強の測定法

胎盤抽出液は、妊婦血液と同じく、SKの活性を増強する³¹⁾ので精製画分についてもその作用の有無を観察した。すなわち、NBC製のSKの5U/ml溶液を試料と等量混合し、フィブリン平板(非加熱)にかけ、別に求めたSK活性に対する溶解面積の標準曲線から、活性増強作用の有無・程度を測定した。

II. 実験成績

1. 阻害活性の特異性

胎盤抽出液および精製画分を0.9%食塩水に対して透析し、更に0.9%食塩水でUK阻害活性に関して同じレベルに両者を希釈・調製した。このレベルは、予備実験により下記の作用が最も観察し易いように選んだ。PL阻害、TR阻害およびSK活性増強の各作用を、両者について比較した結果は表4の如くであった。

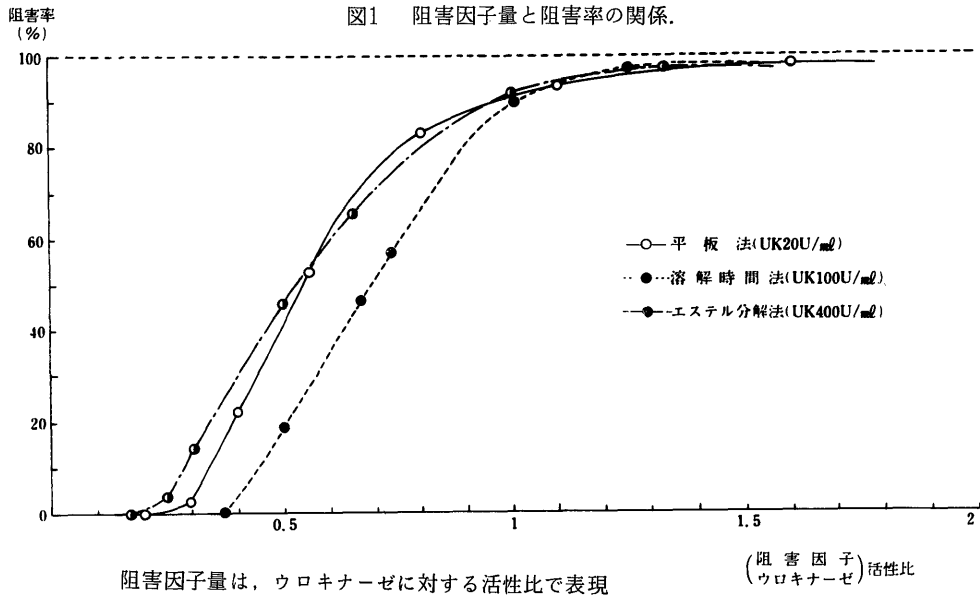
胎盤抽出液についてみられるTR阻害およびSK活性増強作用は、精製画分では完全に除かれている。PLに対する阻害は僅に残っているが、後に考察するように、それがUK阻害の評価において占める割合は1%程度にしか過ぎない。胎盤抽出液の段階でも3~4%に過ぎないが、分離・精製の過程において更に減少していることは、PL阻害がUKIそのものによるものでないことを示している。またデータは省略したが、胎盤抽出液の有する強いトロンボプラスチン作用も精製画分では全く認められなかった。UKIの作用がUKに対して特異的であると考えてよいと思われる。

2. 阻害反応の検討

表4 胎盤抽出液および精製画分の活性比較

試料	影響率 (%)		
	ウロキナーゼ 活性化 プラスミン	トリプシン	ストレプト キナーゼ
胎盤抽出液	- 21	- 100	+ 92
精製画分	- 6	0	0
試料のウロキ ナーゼ阻害活 性 (U/ml)	470	240	15

注：表中 (-) は阻害, (+) は活性増強. 各酵素の 100 % 活性値はプラスミン 6.3カゼイン単位/ml, トリプシン 23.4 μ g/ml, ストレプトキナーゼ 2.5単位/ml.



1) 阻害因子量と阻害率の関係

図1は、一定量のUKに対しUKIの量を変えた場合の阻害率を、平板法、溶解時間法およびエステル分解法で測定した結果を示している。UKとUKIの間には阻害平衡の存在がうかがわれ、TRIによるTR阻害^{63)~66)}のような stoichiometric inhibition ではない。図1の曲線の形は、典型的な一次反応とはやゝ異なり、反応の次数に関しては検討を要する。

また、プラスミノゲン-プラスミン系の関与しないエステル分解法において阻害が起こることは、UKIが直接UKに作用することを示している。

2) 阻害の可逆性

図1からうかがわれる阻害平衡の存在は阻害の可逆性を意味し、また生体内で活性系と阻害系とが共存する条件では阻害は可逆的なものであらうと考えられる

が、可逆性を直接証明したのが表5の成績である。すなわち、UK (50U/ml) とUKI (500U/ml) とを等量混合し (完全阻害でUK活性は検出されない)、その混液を4Mロダン酸カリと等量混合し、90分後に1N塩酸でpH2に調整、15分後に中性にもどし透析してロダン酸カリを除いた。対照として、UKIの代りに0.9%食塩水を用いた試料につき同じ操作を行ない、透析後のUK活性を100%とした。UKIで阻害した試料の、処理前後のUK活性は表5の如く、平板法では78%、溶解時間法では20%、エステル分解法では41%のUK活性が現われ、阻害の可逆性が認められた。

3) 基質との拮抗性

阻害の基質との拮抗性を、UKの基質がプラスミノゲンの場合としてプラスミノゲンを添加した溶解時間法、基質がエステルの場合としてAGLMe法、を用い

表5 ログン酸カリ処理・酸処理による
阻害されたウロキナーゼ活性の回復

測定方法	ウロキナーゼ活性*	
	処理前	処理後
平板法	0%	78%
溶解時間法	0	20
エステル分解法	0	41

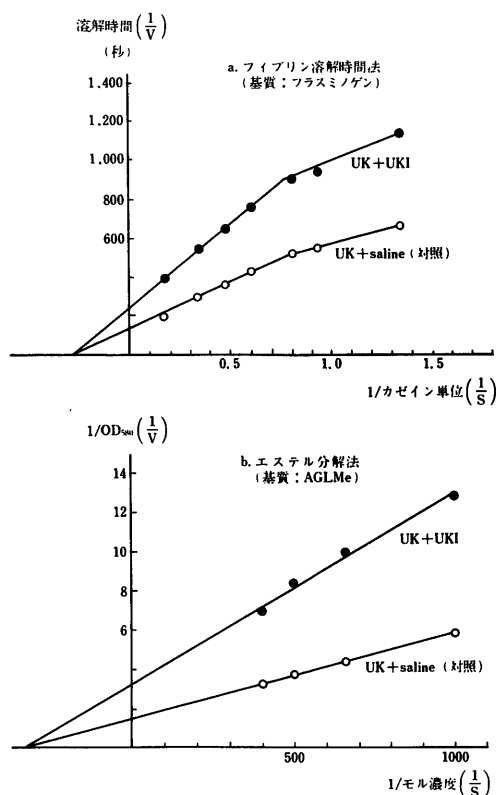
* 対照(阻害因子無添加)の活性を100%とする

Lineweaver-Burk プロット⁶⁷⁾により検討した。反応速度の逆数(1/V)として、溶解時間法では溶解時間(秒)そのものを⁶⁸⁾⁶⁹⁾、AGLMe法では、30分のインキュベーションにより生じたメタノールのクロマトロブ酸による発色(OD₅₈₀)の逆数をとった。また、基質濃度(S)として、プラスミノゲンの場合はml当りカゼイン単位、AGLMeの場合はモル濃度を用いた。その結果は図2-a, bの如く、いずれの場合も非拮抗的阻害として示された。フィブリン溶解時間法の実験データは、プラスミノゲン低濃度で直線の折れ曲りを示した。その理由については後に考察する。

3. 阻害因子の不活化

或種の合成有機化合物が plasma clot の溶解を促進する現象については主として von Kaulla らによって研究され^{70)~77)}、化学構造⁷³⁾⁷⁴⁾や抗炎症作用⁷⁵⁾との関係が明らかになってきている。一方、線溶機構からの検討では、これらの化合物が主としてプラスミノゲン活性化段階の阻害因子を不活化(阻害)することが報告されている⁷⁷⁾。その報告では、プラスミノゲン活性化の阻害因子として、ヒト血清の antiactivator が用いられているが、同じくプラスミノゲン活性化の阻害因子である胎盤性UKIについても同様な現象が認められるかどうか、を検討した。合成化合物としてγ-レゾルシン酸(東京化成工業製)を選び、NaOHでpH6.5~7.0に調整したレゾルシン酸溶液1容、UKI溶液1容およびUK溶液(20U/ml)1容を混合し、常法によりフィブリン平板の溶解面積を測定した。対照としてUKIの代りに0.9%食塩水を用いた。フィブリン平板の溶解面積は、レゾルシン酸の存在によって影響を受けないことが予め確認された。その結果は図3の如く、レゾルシン酸の添加によってUKIの作用は減弱し(UKIの不活化)、UKIの量が多い程UKIの作用を中和するのに多量のレゾルシン酸を要する(量的関係)ことが認められた。レゾルシン酸の高濃度で、対照よりも寧ろ大きい溶解面積が得られるのは、UKI画分に、UKI-activator 複合体が混在しており、UKI

図2 Lineweaver-Burk プロット。



a. UK : 200U/ml b. UK : 400U/ml
UKI : 170U/ml UKI : 300U/ml

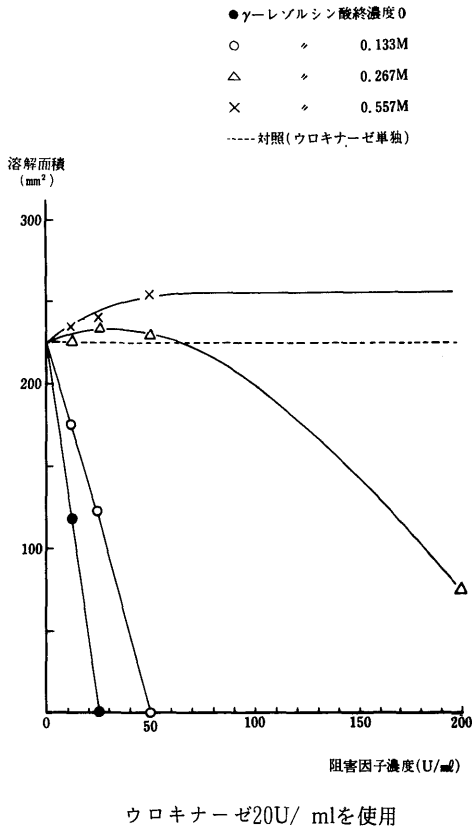
が完全に不活化されると activator 活性が発現し、UK活性にプラスされるためと考えられる。血清の antiactivator を不活化する合成化合物(fibrinolysis-inducer⁷⁷⁾) がUKIも不活化することが認められ、両者の共通性が示された。

III. 考 察

本因子の作用がウロキナーゼ(プラスミノゲン活性化因子)に対して特異的なものであることは、前編において、胎盤抽出液の示す阻害活性の量的関係から論じた。本編においては、本因子の精製過程における他の生物活性の分離を追究した。その結果は表4の如く、胎盤抽出液の示すトリプシン阻害活性およびストレプトキナーゼ増強作用は、本因子の精製画分から完全に除去されている。

ウロキナーゼで活性化したプラスミンに対する阻害は精製画分でもなお僅かに残っていたが、胎盤抽出液

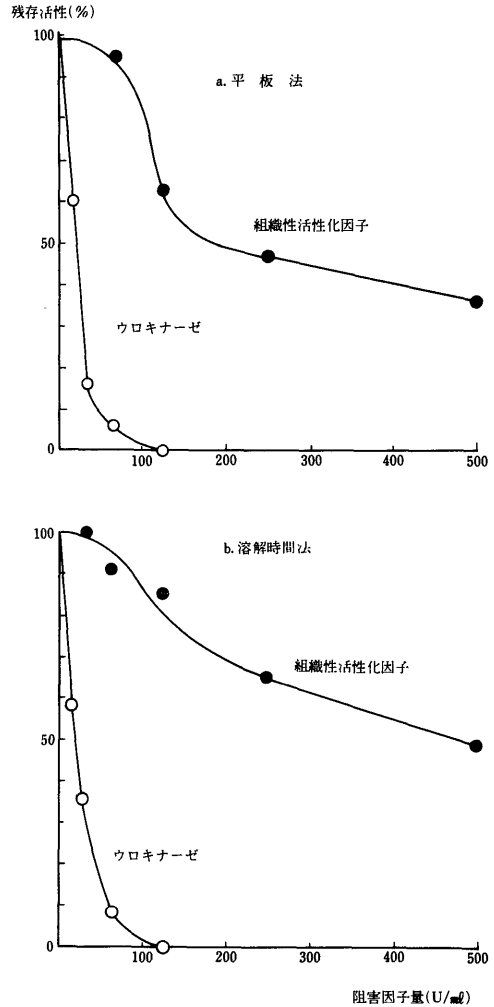
図3 ウロキナーゼ阻害因子不活性複合体に対するγ-レゾルシン酸の影響.



に比較すると減少している。なお、この実験に用いた精製画分とは異なるバッチにおいて、プラスミン阻害の認められない精製画分も得られたので、プラスミン阻害は不純物によるものであり、本因子に随伴する作用ではない。

表4の成績において、プラスミン阻害活性は胎盤抽出液で1.3カゼイン単位、精製画分で0.38カゼイン単位である——プラスミンの100%値(6.3単位)にそれぞれの阻害率を乗じて求まる。ウロキナーゼ活性の1カゼイン単位が12 Ploug 単位に相当するという報告⁷⁸⁾に準じて換算すると、上記のプラスミン阻害活性はそれぞれ15.6および4.56 (Ploug) 単位になる。一方、ウロキナーゼ阻害活性は、いずれも470 (Ploug) 単位であるから、プラスミン阻害は、胎盤抽出液で3%強、精製画分で1%弱、の割合に過ぎない。また、詳細は他に報告したが⁴²⁾、Normanの方法¹⁾に従い、ストレプトキナーゼで活性化したプラスミンに対する阻害を調べた結果、胎盤抽出液では弱い阻害

図4 ウロキナーゼ阻害因子による阻害の比較.



が認められたが、精製画分では阻害は認められなかった。以上の点から、本因子はウロキナーゼ(プラスミノゲン活性化因子)に対する特異的阻害因子であると考えられる。本因子がウロキナーゼに直接作用することは、ウロキナーゼのエステル分解作用を阻害することから明らかである。

阻害因子の濃度と阻害率との関係は、フィブリン平板法および溶解時間法、エステルの分解法のいずれにおいても近似しており、阻害因子低濃度で阻害が現われ、高濃度で漸近的に100%阻害に至る。トリプシン阻害因子のような stoichiometric inhibition^{63)~66)}でなく、阻害反応の平衡の存在を示している。平衡の存在は、すなわち、阻害反応の可逆性を意味している

が、このことを直接証明するため、ウロキナーゼと阻害因子の不活性化複合体をロダン酸カリで処理し、更に pH2 で処理し、ウロキナーゼ活性の回復をみた。回復の程度は測定方法により異なるが、平板法では 78% に達した。pH2 処理は、Lauritsen²²⁾ が血漿のウロキナーゼ阻害活性を失活させるのに用いた方法であるが、この方法だけでは不十分であり、ロダン酸カリ処理をつけ加えた。Tissue activator を抽出・分画する古典的な Astrup らの方法⁷⁹⁾ が、ロダン酸カリ抽出と pH1 処理で成り立っていることは興味深い。すなわち、この Astrup らの方法は、ことによると、tissue activator を抽出するための必須条件というより、tissue activator 活性を阻害している阻害因子を失活させる方法であるかもしれない。

阻害因子の基質との拮抗（競合性）は、阻害の様式を大きく分類する性質であるが、本因子の場合プラスミノゲンを基質とするフィブリン溶解時間法においても、また AGLMe を基質とするエステル分解法においても、ウロキナーゼに対する阻害は基質と非拮抗的であった。すなわち、どんなに基質過剰の状態でも阻害は起る。この点では血清の antiactivator⁸⁰⁾ と異なるようである。プラスミノゲンを基質とするフィブリン溶解時間法で、基質低濃度（1/S が大）で Lineweaver-Burk プロットは折れ曲りを示した。Ali ら⁸¹⁾ は、合成阻害剤を用いカゼイン分解法で活性測定を行なった実験で、一部同様な結果を提示しているが、著者のデータは、阻害因子無添加の対照においても折れ曲りがある点で異なる。この実験で用いたフィブリンノーゲンは、KKミドリ十字製品を Gallimore らの方法⁸²⁾ で更に精製し、プラスミノゲンを加えない場合の溶解時間が 100 分以上のものである。従って、フィブリンノーゲンに含まれるプラスミノゲン量が 1/S の値を狂わせたとは考え難い。むしろ、プラスミノゲン低濃度領域では、プラスミンへの活性化、またはプラスミンによるフィブリン分解、の速度が大きくなることを示唆していると思われる。

それ自体では線溶活性を有しないある種の合成有機化合物が、血漿とインキュベートされると血漿の線溶活性を発現させる現象は興味のあるところであるが、これら fibrinolysis-inducer と呼ばれる⁷⁷⁾ 化合物に構造上の共通性が認められ（芳香族の環に親水性のアニオン側鎖のついたものが多い^{70,71)}）、また薬理学的作用と関連がありそうなこと（抗炎症剤は fibrinolysis-inducer であることが多い⁷⁸⁾）は一層興味を深める。これらの合成化合物が血漿の線溶活性を発現させる原因として、血漿中の antiactivator を阻害し

activator によるプラスミノゲンの活性化を起させることが仮説として考えられ⁷²⁾、antiactivator に対する阻害は証明されつゝある^{77,80)}。著者は fibrinolysis inducer として γ -レゾルシン酸を用いウロキナーゼ阻害因子の不活性化を調べた。その結果は図 3 に示された通り、ウロキナーゼ阻害も γ -レゾルシン酸によって不活性化され阻害作用は中和された。阻害の基質拮抗性の場合とは異なり、この場合は、血清の antiactivator と共通の性状が認められた。

なおウロキナーゼ阻害因子の理化学的性状については別に報告したが⁴²⁾、

(1)電気泳動的には α -グロブリン（セルロース・アセテート膜およびポリアクリルアミド・ゲル）、特に α_1 -グロブリン（デンパン・ゲル）、に属する蛋白であり、

(2)等電点は、isoelectric focusing 法により、pH 4.8~4.9（ただし精製過程で除かれる等電点 pH 5.8 の小画分もある）であり、

(3)分子の大きさは、ゲル濾過法により、分子量約 43,000 と約 70,000 の 2 つがある、という結果が得られている。

胎盤からの阻害因子の精製は、その後 Uszynski ら⁸³⁾ も報告しており、電気泳動的挙動と等電点は著者の知見と略々同じであるが、分子量に関しては 100,000 という異なった値になっている。精製法の相異が原因か否か、更に検討を要する点である。

IV. 結 語

ヒト胎盤から分離精製したウロキナーゼ阻害因子についてその性状を調べたことがらを明らかにした。

1. 本因子の阻害活性はウロキナーゼに対して特異的であり、トリプシンおよびプラスミンは阻害しない。極くわずかなプラスミン阻害活性の認められる場合もあるが、これは不純物によるものであり、本質的に随伴する作用ではない。

2. 本因子は、ウロキナーゼのプラスミノゲン活性化作用とともにエステル分解作用に対しても阻害を示した。

3. ウロキナーゼと本因子との間には阻害反応の平衡が存在し、stoichiometric inhibition ではなく、また、阻害反応の可逆性も示された。

4. 阻害反応は基質と非拮抗的であった。

5. Synthetic fibrinolysis-inducer の 1 つである γ -レゾルシン酸によって本因子は不活性化され、ウロキナーゼ阻害活性の消失が示された。

〔Ⅲ〕 組織性活性化因子および血清 antiactivator との関係

生体内の線溶系活性化因子として血液などの体液中に存在する blood activator (または plasma activator)^{84)~88)} と、組織に存在する tissue activator (組織性活性化因子)^{79),81),89)~95)} とがよく知られ、生理学的に、前者は活性化の general process に、後者は local process に、関係すると理解されている⁹⁶⁾。尿中の活性化因子ウロキナーゼについて、上記の活性化因子との関係や生体内における意義は、未だ充分明らかになっていない。他の活性化因子として、最近、血管壁から抽出される vascular activator^{97),98)}、赤血球から抽出・精製される erythrokinase⁹⁹⁾、などが報告されているが、これら新に登場した活性化因子と従来からよく知られていた活性化因子との関係も明らかでない。

他方、活性化段階の阻害因子として、ウロキナーゼ阻害因子、血清 antiactivator、などが報告されているが、阻害因子の比較、複数の活性化因子に対する阻害作用の比較、は未だ殆んど行なわれていない。

そこで、著者の得た胎盤性ウロキナーゼ阻害因子と組織性活性化因子との関係を阻害作用の面から、また、胎盤性ウロキナーゼ阻害因子と血清 antiactivator との関係を免疫学的方法で検討した。

Ⅰ. 実験材料および方法

1. 実験材料

ウロキナーゼ (UK)、フィブリノーゲン、トロンピンについては〔Ⅰ〕編の実験材料の項で述べた。ウロキナーゼ阻害因子 (UKI) は前〔Ⅱ〕編で記載した精製画分である。

組織性活性化因子 (TA) は、Bachmann らの方法⁹⁴⁾によって精製した。すなわち、心臓とは関係のない疾患で死亡した患者の心臓組織から凝血、脂肪ならびに血管を取り除き、サイコロ型に細断し、その280gを Waring blender に入れ、酢酸カリ緩衝液 (0.3M, pH4.2) 中で5分間細碎し、その後4°Cで16時間抽出した。その後は、ブタの心臓からの原報⁹⁴⁾に従い、Sephadex G-100カラム (1.9×95cm) によるゲル濾過後の活性画分を集めて凍結保存し、使用前に融解し1N NaOHで中和した。プール液は、加熱平板³⁹⁾を用いる試験で、蛋白分解酵素活性を示さなかった。

血清 antiactivator は、Aoki らの方法⁷⁷⁾に従い、ヒト血清を硫酸で粗分画した。

UKIに対する抗体は、デンブン・ゲル電気泳動で特

に精製したUKIを、Freund's Complete Adjuvant とともに、1回4mgを家兎肩胛下腔に、1週おきに3回投与、2週後1回追加免疫、更に1週後全採血を行なった。血清から硫酸50%飽和でグロブリン画分を集め、0.9%食塩水で透析後0.1%に窒化ソーダを加えて4~6°Cに保存した。

2. 実験方法

UKIによるUKおよびTAの活性阻害は、前〔Ⅱ〕編で述べたフィブリン平板法および溶解時間法によった。ただし100%活性溶液は、UKでは20U/mlであるが、TA調製原液の活性は6U/mlしかなく、これをそのまま100%活性溶液とした。平板法および溶解時間法の各々についてUKおよびTAの標準曲線を作成し、UKIと混合した場合の残存活性率を求めた。

UKI抗体を用いる免疫学的分析は、ゲル内2重拡散法^{100),101)}および寒天免疫電気泳動法¹⁰¹⁾によった。

Ⅱ. 実験成績

1. UKIによるTA (組織性活性化因子) の阻害

平板法および溶解時間法で得られた成績は図4-aおよび-bの如くであった。

UKIによるTAの阻害は、UKに較べその程度が可成り弱い。すなわち、平板法では、UK20UがUKI100Uで略々完全に阻害されるのに対し、TA6UはUKI500Uでも約35%の活性が残存した。溶解時間法では、UK20UがUKI100Uでやはり略々完全に阻害されるのに対し、TA6UはUKI500Uでも約50%の活性が残存した。

2. UKI抗体との反応

抗UKI家兎血清グロブリンは、Ouchterlony 法で、UKIとの間に数本の沈降線を生じたので以下の如く吸収操作を行なった。すなわち、UKIを大過剰のUKと反応させ、0.05M磷酸塩緩衝液 (pH6.0) で平衡化した CM-Sephadex のカラムを通過させた。UKおよびUKと反応したUKIは CM-Sephadex に吸着された。通過液はUKI試料に存在する不純蛋白を含んでいるので、吸収前抗体と混ぜ、37°30分、次いで4°6時間反応させ、生じた沈澱を分離し、上清を吸収処理抗体とした。吸収処理前後の抗体価を、平板法によるUKI活性の中和で測定したが、吸収処理による抗体価の低下はなかった。

吸収処理により、Ouchterlony 法でUKIとの間の沈降線は1本になった (写真1)。免疫電気泳動法では、 α -グロブリン位に1本のアークを示し、正常血清との間にも同様なアークを示した (写真2)。次にこの抗体と、胎盤抽出液、正常血清 (5倍稀釈)、妊婦血清 (5倍稀釈) およびUKIを反応させると、共通な沈

降線が得られた(写真3)。すなわち、[I]編で述べたUKI活性の強い胎盤抽出液ばかりでなく、正常血清にもUKI抗体と反応する因子が含まれていることが示された。更にこの抗体を、ヒト血清硫酸画分⁷⁷⁾A、BおよびC (antiactivator 画分)と反応させると、antiactivator 画分との間にはUKIと共通する明瞭な沈降線を生じたが、画分AおよびBの間には明瞭な沈降線は認められなかった(写真4)。

III. 考 察

ウロキナーゼと他の活性化因子との関係について、Kucinskiら¹⁰²⁾は抗ウロキナーゼ血清を用い、免疫学的にウロキナーゼが組織性活性化因子とも plasma activator とも異なることを報告した。Kokら⁹⁵⁾は、ゲル濾過分析およびゾーン電気泳動の結果から、ウロキナーゼは組織性活性化因子と異なるであろうと推定した。Aliら⁸¹⁾は、家兎腎臓の組織性活性化因子がヒトのウロキナーゼに似ていると報告したが、腎臓からの活性化因子の場合は他にも抗ウロキナーゼ血清による阻害が報告されており¹⁰²⁾、それ以外の組織と区別して考える必要があると思われる。Thorsenら¹⁰⁴⁾は、ヒトのウロキナーゼとブタの組織性活性化因子とは合成阻害剤(EACAおよびAMCHA)による阻害の様相が異なると報告した。

著者の実験成績は、ウロキナーゼ阻害因子によるヒト心臓の組織性活性化因子の阻害が、ウロキナーゼに較べ著しく弱いことを示しており、ウロキナーゼと組織性活性化因子とは異なるという最近の考え方に1つの証拠を加えるものである。また、この実験ではすべてヒト由来の材料が使用されており、人体内における線溶系の拮抗関係を示唆している。

ウロキナーゼが plasma activator とも組織性活性化因子とも異なるものであるならば、ウロキナーゼ阻害因子の生体内存在の意義は何であらうか。Bernikら¹⁰⁵⁾の報告はこれに関連して極めて興味深い。すなわち彼らは、腎臓のみならず成人の腎血管、胎児の尿道および肺の組織培養液に免疫学的にウロキナーゼ型の活性化因子の蓄積を認めており、また成人の腎血管、膀胱および肺、胎児の腎臓、肺および心臓の組織培養液にウロキナーゼに対する選択的阻害活性を認めている。これらのことは、ウロキナーゼ型の活性化因子およびウロキナーゼ阻害因子が生体内において広く産生され拮抗を保っていることを示唆している。更に、免疫学的にウロキナーゼと異なる組織型活性化因子も培養液中に認め、この型の活性化因子は傷害された細胞から放出され、一方ウロキナーゼ型の活性化因子は代謝を営む生細胞の培養で産生されると

報告している。もしそうであるならば、生理学的には、ウロキナーゼ型活性化因子とウロキナーゼ阻害因子との拮抗関係が、組織型因子拮抗関係に比較し、より重要な意味を持つが。この点に関しては今後慎重な検討を必要としよう。

主として Aoki, von Kaulla らによって研究されてきた vascular activator^{77)97,98)}と血清 antiactivator⁷⁷⁾⁸⁰⁾との拮抗関係も、また、生理学的に非常に重要な意味を持つと思われる。詳細は別に報告するが¹⁰⁶⁾、ウロキナーゼ阻害因子による阻害の強さは、urokinase>vascular activator>tissue activatorであり、一方血清 antiactivator による阻害の強さは、vascular activator>urokinase>tissue activatorである。組織性活性化因子に対応する阻害因子は未だ明らかにされていないが、組織性活性化因子に対する阻害が特異的に低下した患者例が報告され¹⁰⁷⁾、その存在は示唆されている。

前記(実験成績)の如く、ウロキナーゼ阻害因子に対する抗体は正常血清、なかんずく antiactivator 画分と明瞭な沈降線を示した。これは、正常血清および antiactivator 画分に比較的多量のウロキナーゼ阻害因子が含まれているか、または、antiactivator がウロキナーゼ阻害因子と共通抗原性を有しているか、2つの可能性を示している。第1の可能性は、[I]編で正常血清のウロキナーゼ阻害活性が弱いと述べたこと、必ずしも矛盾しない。ウロキナーゼ阻害因子の大部分が活性化因子と結合した状態で存在すれば、阻害活性は弱くとも沈降反応は強く出るのであろう。Lauritsen²⁴⁾は、血漿 euglobulin 画分をpH2で処理し、ウロキナーゼ阻害活性を不活化することにより、euglobulin 画分のカゼイン分解活性の増加を報告している。すなわち、阻害因子と結合した活性化因子の存在を示唆している。然しながら、Lauritsenの指摘するウロキナーゼ阻害活性が、著者の得たようなウロキナーゼ阻害因子によるものか、または、Aokiらの antiactivator によるものかは明らかでない。

第2の、ウロキナーゼ阻害因子と antiactivator との共通抗原の可能性であるが、両者の阻害活性については、既述の如く、同一ではないが共通性があり、硫酸画分の際の沈澱性も似ており、また、合成有機化合物による不活化現象も共通している。従って、両者が抗原として共通性を持つ可能性はあるが、明確な証明は精製された antiactivator の得られるまで待たねばならない。

ウロキナーゼ阻害因子の分娩時に果しているであろう

う役割については、〔I〕編において考察した。分娩時以外の、生理学的な線溶系の拮抗関係における役割を考察するには、今後なお多くの関連する事実の解明が必要であろう。然しながら、少なくとも、ウロキナーゼ阻害因子に対する抗体と反応する因子が正常血清中に存在することは、上述の生理学的役割を示唆するものであろう。

IV. 結 語

1. ヒト胎盤から抽出・精製したウロキナーゼ阻害因子の、ヒト心臓から抽出・精製した組織性活性化因子に対する阻害を観察し、組織性活性化因子もウロキナーゼによって阻害されるが、その程度はウロキナーゼに比較するとはるかに弱いことを示した。

2. ウロキナーゼ阻害因子と家兔吸収抗体との間に、ゲル拡散法で単一の沈降線を認めた。また、胎盤抽出液、妊婦血清、正常血清および血清 antiactivator 画分に、ウロキナーゼ阻害因子と免疫学的に共通に反応する物質の存在を認めた。

稿を終るに当り、御指導と御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授、ならびに本学がん研病態生理部倉田自章教授に心から感謝の意を表します。また、研究遂行に際して御指導・御助言を頂きました内藤良一博士、渡辺良三博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Christensen, L. R. & MacLeod, C. M. : J. Gen. Physiol., **28**, 559 (1945).
- 2) Guest, M. M., Ware, A. G. & Seegers, W. H. : Am. J. Physiol., **150**, 661 (1947).
- 3) Grob, D. : J. Gen. Physiol., **33**, 103 (1950).
- 4) Norman, P. S. : J. Exp. Med., **108**, 53 (1958).
- 5) Norman, P. S. & Hill, B. M. : J. Exp. Med., **108**, 639 (1958).
- 6) Ganrot, P. O. : Acta Chem Scand., **21**, 602 (1967).
- 7) Iwamoto, M. & Abiko, Y. : Biochim. Biophys. Acta, **214**, 402 (1970).
- 8) Shamash, Y. & Rimon, A. : Vox Sang., **10**, 599 (1965).
- 9) Shamash, Y. & Rimon, A. : Biochim. Biophys. Acta, **121**, 35 (1966).
- 10) Rimon, A., Shamash, Y. & Shapiro, B. : J. Biol. Chem., **241**, 5102 (1966).
- 11) Schultze, H. E., Heide, K. & Haupt, H. : Klin. Wochschr., **40**, 427 (1962).
- 12) Ambrus, C. M. & Markus, G. : Am. J. Physiol., **199**, 491 (1960).
- 13) Sawyer, W., Alkjaersig, N., Fletcher, A. P. & Sherry, S. : Thromb. Diath. Haemorrh., **5**, 149 (1961).
- 14) Ambrus, C. M., Weintraub, D. H., Dunphy, D., Dowd, J. E., Pickren, J. W., Niswander, K. R. & Ambrus, J. L. : Pediatrics, **32**, 10 (1963).
- 15) Taylor, F. B., Allen, I. W. & Bickford, A. F. : Arch. Biochem. Biophys., **104**, 277 (1964).
- 16) Nanninga, L. B. & Guest, M. M. : Arch. Biochem. Biophys., **108**, 542 (1964).
- 17) Nilsson, I. M., Krook, H., Sternby, N. H., Söderberg, E. & Söderström, M. : Acta Med. Scand., **169**, 323 (1961).
- 18) Brakman, P. & Astrup, T. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **15**, 603 (1963).
- 19) Chr. Dudok de Wit : Thromb. Diath. Haemorrh., **12**, 105 (1964).
- 20) Januszko, T., Buluk, K., Uszynska Folejewska, R. & Uszynski, M. : Pol. Med. J., **5**, 914 (1966).
- 21) Bennett, N. B. : Thromb. Diath. Haemorrh., **17**, 12 (1967).
- 22) Lauritsen, O. S. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **22**, 314 (1968).
- 23) Beller, F. K., Douglas, G. W., Morris, R. H. & Johnson, A. J. : Am. J. Obst. Gynec., **101**, 587 (1968).
- 24) Lauritsen, O. S. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **23**, 121 (1969).
- 25) Lauritsen, O. S. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **23**, 191 (1969).
- 26) Uszynski, M. & Uszynska-Folejewska, R. : Am. J. Obst. Gynec., **105**, 1041 (1969).
- 27) Spöttl, F. & Holzknacht, F. : Thromb. Diath. Haemorrh., **24**, 100 (1970).
- 28) Bennett, N. B. : Thromb. Diath. Haemorrh., **23**, 533 (1970).
- 29) Moxley, R. T., Brakman, P. & Astrup, T. : J. Applied Physiol., **28**, 549 (1970).
- 30) Bennett, N. B. & Ogston, D. : Clin. Sci., **39**, 549 (1970).
- 31) 川野武彦 : 十全医会誌, **74**, 485 (1966).
- 32) Kawano, T., Morimoto, K. & Uemura, Y. : Nature, **217**, 253 (1968).
- 33) Ploug, J. & Kjeldgaard, N. O. : Biochim.

- Biophys. Acta, 24, 278 (1957).
- 34) Sgouris, J. T., Inman, J. K., McCall, K. B., Hyndman, L. A. & Anderson, H. D. : Vox Sang., 5, 357 (1960).
- 35) Hink, J. H. Jr. & McDonald, J. K. : 特許公報, 昭40-9863 (1965).
- 36) Sgouris, J. T., Inman, J. K., McCall, K. B. & Anderson, H. D. : Vox Sang., 6, 53 (1961).
- 37) Astrup, T. & Müllertz, S. : Arch. Biochem. Biophys., 40, 346 (1952).
- 38) Alkjaersig, N., Fletcher, A. P. & Sherry, Y. : J. Biol. Chem., 234, 832 (1959).
- 39) Lassen, M. : Acta Physiol Scand., 27, 371 (1952).
- 40) 厚生省 : 生物学的製剤基準人血漿基準, 昭和43年版. 141頁, 東京, 厚生省, 1968.
- 41) Faarvang, H. J. & Lauritsen, O. S. : Nature, 199, 290 (1963).
- 42) Kawano, T., Morimoto, K. & Uemura, Y. : J. Biochem., 67, 333 (1970).
- 43) Albrechtsen, O. K. : Acta Physiol. Scand., 39, 284 (1957).
- 44) Lewis, J. H. & Ferguson, J. H. : J. Clin. Invest., 29, 1059 (1950).
- 45) Albrechtsen, O. K. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., 10, 91 (1958).
- 46) Albrechtsen, O. K. : Acta Endocrinol., 23, 207 (1956).
- 47) Phillips, L. L., Butler, B. C. & Taylor, H. C. : Am. J. Obst. Gynec., 71, 342 (1956).
- 48) Albrechtsen, O. K. : Acta Physiol. Scand., 47 Suppl. 165, 54 (1959).
- 49) Beller, F. K., Goessner, W. & Herrschlein, H. J. : Obst. Gynec., 20, 117 (1962).
- 50) Niezert, H. W. & Bachmann, F. : Zentr. Gynak., 78, 649 (1956).
- 51) Lieberman, J. : New Engl. J. Med., 265, 363 (1961).
- 52) Shaper, A. G., Macintosh, D. M., Evans, C. M. & Kyobe, J. : Lancet, ii, 706 (1965).
- 53) Shaper, A. G., Macintosh, D. M. & Kyobe, J. : Lancet, ii, 874 (1966).
- 54) Januszko, T. & Buluk, K. : Acta Physiol. Pol., 17, 473 (1966).
- 55) 真木正博 : 線溶現象の基礎と臨床 (岡本彰祐編), 第1版. 281頁, 東京, 医学書院, 1966.
- 56) Ratnoff, O. D., Pritchard, J. A. & Colopy, J. E. : New Engl. J. Med., 253, 63 (1955).
- 57) Hatton, R. L. : Am. J. Obst. Gynec., 82, 177 (1961).
- 58) Phillips, L. L. : Clin. Obst. Gynec., 7, 325 (1964).
- 59) 馬 英茂 : 産婦の世界, 12, 394 (1960).
- 60) 長沢佳熊 : 新薬と臨, 20, 1307 (1971).
- 61) Walton, P. L. : Biochim. Biophys. Acta, 132, 104 (1967).
- 62) Johnson, A. J., Kline, D. L. & Alkjaersig, N. : Thromb. Diath. Haemorrh., 21, 259 (1969).
- 63) Laskowski, M. Jr. & Laskowski, M. : J. Biol. Chem., 190, 563 (1951).
- 64) Laskowski, M. Jr., Mars, P. H. & Laskowski, M. : J. Biol. Chem., 198, 745 (1952).
- 65) Green, M. : J. Biol. Chem., 205, 535 (1953).
- 66) Faarvang, H. J. & Lauritsen, O. S. : Enzymol. Biol. Clin., 1, 189 (1961/62).
- 67) Lineweaver, J. & Burk, D. : J. Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934).
- 68) Berg, W., Korsan-Bengsten, K. & Ygge, J. : Thromb. Diath. Haemorrh., 14, 127 (1965).
- 69) Merrills, R. J. & Shaw, T. B. : Biochem. J., 106, 101 (1968).
- 70) Von Kaulla, K. N. : Thromb. Diath. Haemorrh., 7, 404 (1962).
- 71) Von Kaulla, K. N. : Thromb. Diath. Haemorrh., 10, 151 (1963).
- 72) Von Kaulla, K. N. : J. Med. Chem., 8, 164, (1965).
- 73) Von Kaulla, K. N. : Arzneimittel Forsch., 18, 407 (1968).
- 74) Von Kaulla, K. N. & Ens, G. : Biochem. Pharmacol., 16, 1023 (1967).
- 75) Roubal, Z. & Nemecek, O. : J. Med. Chem., 9, 840 (1966).
- 76) Aoki, N. & von Kaulla, K. N. : Exp. Biol. Med., 130, 101 (1969).
- 77) Aoki, N. & von Kaulla, K. N. : Thromb. Diath. Haemorrh., 22, 251 (1969).
- 78) Sgouris, J. T., Storey, R. W., McCall, K. B. & Anderson, H. D. : Vox Sang., 7, 739

(1962).

- 79) **Astrup, T. & Albrechtsen, O. K.** : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **9**, 233 (1957).
 80) **Aoki, N. & von Kaulla, K. N.** : Am. J. Physiol., **220**, 1137 (1971).
 81) **Ali, S. Y. & Evans, J.** : Biochem. J., **107**, 293 (1968).
 82) **Gallimore, M. J. & Shaw, J. T. B.** : Thromb. Diath. Haemorrh., **18**, 101 (1967).
 83) **Uszynski, M. & Abildgaard, U.** : Thromb. Diath. Haemorrh., **25**, 580 (1971).
 84) **Mole, R. H.** : J. Pathol. Bact., **60**, 413 (1948).
 85) **Bidwell, E.** : Biochem. J., **55**, 497 (1953).
 86) **Müllertz, S.** : Proc. Soc. Exp. Biol., **82**, 291 (1953).
 87) **Müllertz, S. & Lassen, M.** : Proc. Soc. Exp. Biol., **82**, 264 (1953).
 88) **Sherry, S., Fletcher, A. P. & Alkjaersig, N.** : Physiol. Rev., **39**, 243 (1959).
 89) **Astrup, T. & Permin, P.** : Nature, **159**, 681 (1947).
 90) **Astrup, T. & Stage, A.** : Nature, **170**, 929 (1952).
 91) **Astrup, T. & Sterndorff, I.** : Acta Physiol. Scand., **36**, 250 (1956).
 92) **Astrup, S.** : Fed. Proc., **25**, 42 (1966).
 93) **Astrup, T. & Stage, A.** : Acta Chem. Scand., **10**, 617 (1956).
 94) **Bachmann, F., Fletcher, A. P., Alkjaersig, N. & Sherry, S.** : Biochemistry, **3**, 1578 (1964).
 95) **Kok, P. & Astrup, T.** : Biochemistry, **8**, 79 (1969).
 96) **Astrup, T.** : Blood, **11**, 781 (1956).
 97) **Aoki, N. & von Kaulla, K. N.** : Am. J. Clin. Pathol., **55**, 171 (1971).
 98) **Aoki, N. & von Kaulla, K. N.** : J. Lab. Clin. Med., **78**, 354 (1971).
 99) **Semar, M., Skoza, L. & Johnson, A. J.**

- : J. Clin. Invest., **48**, 1777 (1969).
 100) **Kabat, E. A. & Mayer, M. M.** : Experimental Immunochemistry, 2nd. ed., p.85, Illinois, Charles C. Thomas, 1961.
 101) **浜島義輝・京極方久** : 免疫組織学, 改訂第2版. 15頁, 医学書院, 東京, 1968.
 102) **Kucinski, C. S., Fletcher, A. P. & Sherry, S.** : J. Clin. Invest., **47**, 1238 (1968).
 103) **Bernik, M. B. & Kwean, H. C.** : J. Lab. Clin. Med., **70**, 650 (1967).
 104) **Thorsen, S. & Astrup, T.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **130**, 811 (1969).
 105) **Bernik, M. B. & Kwaan, H. C.** : J. Clin. Invest., **48**, 1740 (1969).
 106) **Aoki, N. & Kawano, T.** : J. Am. Physiol., in press
 107) **Brakman, P., Mohler, E. R. Jr. & Astrup, T.** : Scand. J. Haemat., **3**, 389 (1966).

写 真 説 明

写真1.

- A : 未処理抗体 B : 吸収処理抗体
 2, 5 : ウロキナーゼ阻害因子画分
 1, 3, 4, 6 : 0.9%食塩水

写真2.

- Ab : 吸収処理抗体
 1 : ヒト正常血清 2 : ウロキナーゼ阻害因子画分

写真3.

- Ab : 吸収処理抗体
 1, 3, 5 : ウロキナーゼ阻害因子画分
 2 : 胎盤抽出液 4 : 正常血清
 6 : 妊婦血清

写真4.

- Ab : 吸収処理抗体
 1, 3, 5 : ウロキナーゼ阻害因子画分
 2 : ヒト血清画分B
 4 : ヒト血清画分C (antiactivator 画分)
 6 : ヒト血清画分A

Abstract

The author assayed inhibitory activity extracted from human placenta against urokinase, purified the urokinase inhibitor, investigated its properties employing the purified fraction and obtained the following results :

1. A large quantity of urokinase inhibitor was present in human placenta and the inhibitor was contained more in the maternal side region than in the fetal side region of placenta.
 2. The inhibitory activity of urokinase inhibitor was specific for urokinase (a plasminogen activator), that is, it did not inhibit trypsin and plasmin essentially.
 3. Urokinase inhibitor inhibited not only the plasminogen activation activity but also the esterolytic activity of urokinase.
 4. Inhibition by urokinase inhibitor was not a stoichiometric inhibition, reversible and uncompetitive with the substrates of urokinase.
 5. The inhibitory activity was inactivated (neutralized) by γ -resorcylic acid. This phenomenon indicated a similarity between urokinase inhibitor and serum antiactivator.
 6. Tissue activator purified from human heart was inhibited by urokinase inhibitor only to much less extent compared with urokinase.
 7. Presence of a substance showing immunologically common reaction with urokinase inhibitor was observed in placental extract, pregnant serum, normal serum and serum antiactivator fraction.
-

