

子宮頸癌における urokinase-type plasminogen activator の局在とリンパ節転移との関係

浜松医科大学産科婦人科学教室

藤城 卓 小林 浩 寺尾 俊彦

Urokinase-type Plasminogen Activator as a Predictor for Lymph Nodes Metastasis of Uterine Cervical Cancer

Suguru FUJISHIRO, Hiroshi KOBAYASHI and Toshihiko TERAO

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu

概要 癌細胞が産生する single-chain urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) は酵素学的に不活性であり, plasmin, kallikrein, cathepsin B などにより活性化され, high molecular weight-uPA (HMW-uPA) に変換され周囲組織や基底膜を破壊し癌細胞の浸潤に関与する. 一方, 癌組織に浸潤してくる炎症細胞 (好中球など) から産生される human leukocyte elastase (HLE) は pro-uPA を酵素学的に不活性な two-chain uPA に変換するため, 癌細胞の浸潤に対して抑制的に作用する可能性がある. 今回, 我々は子宮頸癌Ⅱ期症例29例 (骨盤内リンパ節転移陽性例13例と転移陰性例16例) において組織中の uPA, uPA receptor を生化学的に検索するとともに, 免疫組織染色を行い uPA および HLE の局在および染色態度を比較し, リンパ節転移における両者の意義を検討した.

子宮頸癌組織の uPA receptor はその50%以上が飽和されているが, receptor 結合 uPA のほとんどは pro-uPA であった. また, uPA receptor の飽和率はリンパ節転移陽性例が陰性例より高値を示した. また, uPA は癌細胞によりその染色態度に heterogeneity を認め, 特に, 癌細胞の浸潤部位に強く染色され, リンパ節転移陽性例は陰性例に比較して強い uPA 染色を認めた ($p < 0.01$). 一方, 癌細胞に浸潤してくるリンパ球や好中球は癌組織の中あるいはその周囲に多く認められ, HLE 免疫染色が強いほどリンパ節転移は少ないことが判明した ($p < 0.05$). したがって, uPA と HLE は子宮頸癌のリンパ節転移にとって相反する独立した parameters であり, uPA は癌細胞の浸潤に対して促進的に作用するのに対し, HLE は防衛的に作用することが示唆された.

Synopsis The present study was undertaken to assess the role of tumor infiltrating lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte-derived human leukocyte elastase (HLE) as an inactivator of urokinase-type plasminogen activator (uPA) activity. We have investigated the localization of pro-uPA/uPA and HLE immunohistochemically and quantitated in paraffin-embedded formalin-fixed uterine cervical cancer tissue sections (stage II) in 13 patients with positive lymph-nodes metastasis and in 16 cases with node-negative. The invasively growing and metastasizing tumor cells consistently contained uPA enzyme activity. When investigated immunohistochemically with antibody to uPA, different parts of individual tumors showed a pronounced heterogeneity in staining intensity. Strong staining was found in the areas with invasive growth and degradation of surrounding normal tissue. A statistically significant higher node-positive rate was observed in patients having tumors with strong uPA stainings than in those with weak stainings. On the other hand, inflammatory cells such as polymorphonuclear cells were located in aggregates or diffusely spread within tumor stromal tissue. The inflammatory reaction seemed to be most intense at the border between the surrounding normal stromas and the tumor tissue. These cells produced and secreted HLE. A statistically significant higher node-positive rate was observed in patients having tumors with weak HLE stainings than in those with strong stainings. Thus, uPA and HLE staining intensities in tissue specimens appear to be independent predictors of increasing and decreasing risk

for node-positive, respectively, suggesting that HLE may act as a defence against tumor cell invasion and metastasis.

Key words: Urokinase-type plasminogen activator • Human leukocyte elastase • Uterine cervical cancer • Lymph node metastasis

緒 言

癌細胞の産生する各種 protease が基底膜, 間質組織, 細胞外マトリックスを破壊し, 浸潤, 転移する機構が示唆されており¹⁾²⁾, urokinase-type plasminogen activator(uPA), plasmin, cathepsin B, D, L, collagenase などが知られている³⁾⁴⁾. In vitro および in vivo 実験モデルにおいてこれらの protease に対する特異抗体や protease inhibitors により癌細胞の浸潤が抑制されることも確認されている^{5)~9)}.

Pro-uPA は plasmin, kallikrein, trypsin, cathepsin B, cathepsin L などにより酵素学的に活性をもつ HMW-uPA に変換されるが, thrombin, human leukocyte elastase (HLE) により生成された two-chain uPA は酵素学的に uPA としての活性をもたない⁹⁾. HLE は好中球から多量に産生される酵素であり, 癌組織には程度の差は認められるが好中球やリンパ球が浸潤することがあり, 炎症細胞の浸潤が多い癌ほど予後がよいことも知られている¹⁰⁾.

今回, 我々は子宮頸癌の II 期症例に限り, 骨盤内リンパ節転移を有する症例と転移陰性症例において免疫組織学的に uPA と HLE の局在に量的, 質的差異が認められるかどうか検討するとともに, 子宮頸癌組織中の uPA および uPA binding protein (uPA receptor) についてリンパ節転移との関連性を検討した.

実験材料および方法

1. 対象

1983年から1990年までに当科において手術を施行した子宮頸癌 II 期症例29例の手術摘出標本であり, 骨盤内リンパ節転移陽性例が13例, 転移陰性例が16例である. 組織型および術後進行期分類は表1に示した.

2. 免疫組織染色

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片は3ミクロンで作成し, コントロール, uPA, HLE 免疫

組織染色を行った. 脱パラフィン後, 正常家兎血清により blocking し, 抗 uPA モノクローナル抗体 (monoclonal antibody 394; uPA の B-chain を認識する抗体であり, American Diagnostica 社より入手) および抗ヒト HLE モノクローナル抗体 (Dako, Copenhagen Denmark) を一次抗体として Alkaline phosphatase-Anti-alkaline phosphatase (APAAP) 法により免疫染色を行った¹¹⁾. 免疫組織染色の判定は染色強度と染色範囲を考慮して, marked(++), moderate(++), mild(+), slight(±), none(-) の5段階に分類し, それぞれ5, 4, 3, 2, 1点とし, scoring 化して統計学的評価を行った. 組織染色の判定はそれぞれ独立した2名の婦人科医により行われた.

3. 細胞膜成分の抽出

比較的癌組織が多く保存されていたリンパ節転移陽性の5例, 転移陰性の4例の原発巣から細胞膜成分を抽出した. 液体窒素中に保存された組織を抽出 buffer (0.25M sucrose, 0.5%triton X 加 0.01M Hepes buffer, pH 7.2) にて1g/10ml の割合で homogenize し, 1,700g, 10分遠心後, 上清を12,000g, 15分遠心し, さらに44,000g, 45分遠心して pellet を回収し, 0.25M sucrose 加0.01M Hepes buffer, pH 7.2にて洗浄し, 細胞膜成分とした.

4. 細胞膜成分に対する biotinylated diisopropylfluorophosphate (DFP)-HMW-uPA の結合特異性

ヒト HMW-uPA を DFP により不活性化し, Guesdon et al. の方法¹²⁾により N-hydroxysuccinimide biotin-amidocaproate (Sigma) を用いて biotinylated DFP-HMW-uPA を作成した. 96穴 microtiter plate (Costar) に細胞膜成分を固相し (~1μg/ml; 16h, 4℃) 2%の bovine serum albumin (BSA) にて blocking, 洗浄後に, 5nM の biotinylated DFP-HMW-uPA を添加 (16h, 4℃) して洗浄, avidin-peroxidase (0.4μg/ml;

1h, 23℃)にて反応後, tetramethylbenzidine により発色させ, EIA reader にて (450nm) 測定した. また, 細胞膜成分を最初に 50mM glycine-HCl, 0.5M NaCl, pH 3.0 で処理し遠心後に Hepes buffer で中和し ligand を receptor より除去してから上述のごとく biotinylated DFP-HMW-uPA 結合実験を行った³⁾⁷⁾.

5. Immunoabsorbent-amidolytic assay

96穴 microtiter plate に moAB 377 を固相し (5 μ g/ml; 16h, 4℃), 癌組織から抽出した細胞膜成分を添加 (150 μ l; 16h, 4℃) し, 洗浄後, plasmin 非添加のままの場合と, plasmin 添加しすべての pro-uPA を HMW-uPA に変換してから洗浄後, 合成基質 S-2444 を添加して EIA reader にて (405nm) uPA 活性を測定した. 細胞膜成分に含まれる HMW-uPA は plasmin 非添加のままで測定した値から換算して得られ, pro-uPA は plasmin 添加後に測定した値 (total uPAs) から HMW-uPA の量を差し引くことにより得られる¹³⁾.

6. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) と ligand-blotting analysis (癌細胞膜における uPA receptor の検出)

SDS-PAGE は 5~15% の濃度勾配の gel を作成して行った. Gel 内の蛋白を semi-dry blot (Marysol, Tokyo) により polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写 (40mA/gel, 90min, 23℃) した. この PVDF 膜に biotinylated DFP-HMW-uPA を添加し, free uPA 結合蛋白 (free uPA receptor) を検出した. 上記と同様に avidin-peroxidase 添加後 4-chloro-1-naphtol にて発色させた³⁾.

結 果

1. 子宮頸癌組織に含まれる uPA, uPA receptor の解析

細胞膜成分を ELISA plate に固相し, 5nM biotinylated DFP-HMW-uPA を 4℃ にて反応させると 30分で飽和状態に達した (図 1, inset). また, biotinylated DFP-HMW-uPA を用量依存性に増加させると, 約 2nM (range 1.6~2.5nM) で

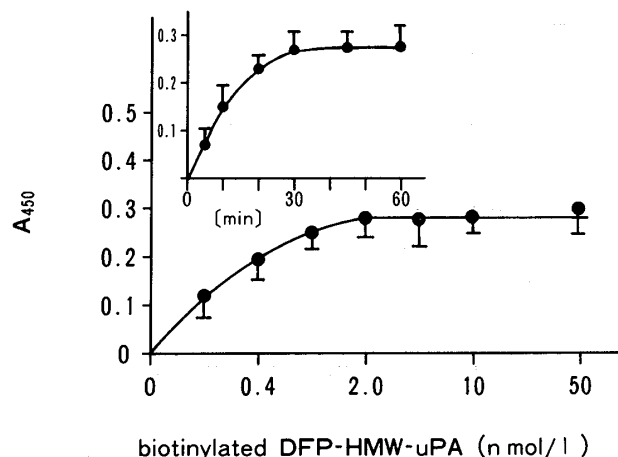


図 1 子宮頸癌の細胞膜成分に対する biotinylated DFP-HMW-uPA の結合. Biotinylated DFP-HMW-uPA は濃度依存性に結合し, 約 2nM で飽和する. 4℃ における biotinylated DFP-HMW-uPA (2nM) の結合は 30 分で飽和状態に達した (図 1 inset).

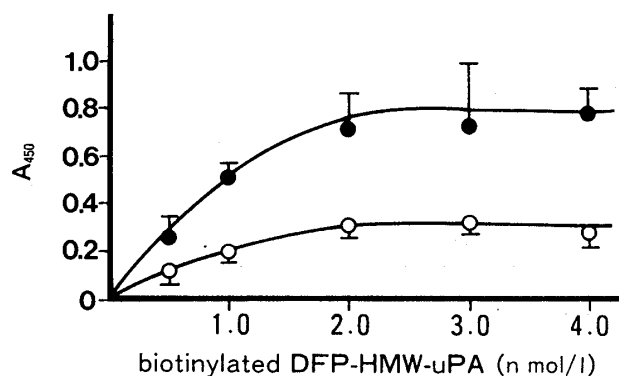


図 2. 細胞膜成分に対する biotinylated DFP-HMW-uPA 結合の酸処理による影響. 酸処理として 50mM glycine-HCl, 0.5M NaCl, pH 3.0 を用いた. 酸処理により uPA receptor から ligand が除去され, biotinylated DFP-HMW-uPA の結合が増す (●). ○は PBS 処理によるコントロールを示す.

飽和に達した (図 1). 次に, 細胞膜成分を glycine-HCl, pH 3.0 による酸処理後 ELISA plate に固相し同様な検討を行った. その結果, biotinylated DFP-HMW-uPA の結合能は約 2 倍に上昇した (図 2). 酸処理する前の biotinylated DFP-HMW-uPA の結合能 (free uPA receptor の量に相当する) はリンパ節転移陽性例が転移陰性例の 1.5~2 倍低値を示した (リンパ節転移陽性例の平均 OD 値は 0.20 に対して転移陰性例の OD 値は 0.33 である) が, 酸処理後の結合能は両者とも同じであった (平均 OD 値は両者とも約 0.80 を

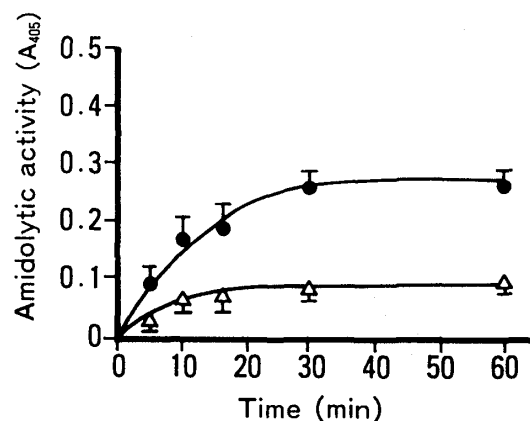


図3 細胞膜成分に含まれる pro-uPA と HMW-uPA (Immunoabsorbent-amidolytic assay による解析). HMW-uPA はほとんど認められず, 大部分は pro-uPA である. △は HMW-uPA を, ●はすべての pro-uPA を plasmin により HMW-uPA に変換してから測定した (total uPA を表す).

示した). すなわち, 細胞膜に結合している total uPA receptor の量はリンパ節転移の有無によって差は認めないが, リンパ節転移のある症例では free uPA receptor は少なく, ligand によって占拠された receptor が多いことを示している.

細胞膜成分中の uPAs に含まれる pro-uPA と HMW-uPA の比率を immunoabsorbent-amidolytic assay により検討した. plasmin 非添加時にもごく軽度の amidolytic activity が認められるが, plasmin 添加後はさらに上昇した. これは細胞膜成分に含まれる uPA のほとんどは酵素学的に不活性の pro-uPA として存在し, plasmin により HMW-uPA に変換されたことを示唆する

ものである. 標準曲線から計算すると, total immunoreactive uPAs のうち80%以上は pro-uPA として存在していることが判明した. 一方, リンパ節転移陽性例と転移陰性例における pro-uPA/HMW-uPA の比率に差異は認めなかった (図3).

細胞膜成分を SDS-PAGE 後, PVDF 膜に転写し, 膜上に存在する uPA receptor を調べるために, 4nM biotinylated DFP-HMW-uPA を反応させた. その結合蛋白として分子量50~60KDa の broad な単一のバンドが認められた (図4). これは100nM HMW-uPA, pro-uPA および1 μ M ATF により完全にその結合が抑制され, uPA receptor と考えられる. 細胞膜成分を酸処理した後の検討ではリンパ節転移陽性例と転移陰性例に明らかな量的相違を認めなかった (図5). すなわち, リンパ節転移の有無により癌細胞膜の uPA receptor に差を認めなかった.

2. uPA および HLE の免疫組織染色 (表1, 図6)

uPA と HLE の染色性は異なり, uPA は癌細胞質にびまん性に染色されるのに対し, HLE は腫瘍に浸潤する多核白血球に顆粒状に染色された. リンパ節転移陽性13例について (++) 以上のものに着目すると, uPA 染色の結果は, 9例 (69%) に, また, HLE 染色の結果は4例 (30%) に認められた. 一方, リンパ節転移陰性16例についての結果は, uPA 染色は, 4例 (25%) に, また, HLE 染色は12例 (75%) であった. 各症例別の解析に

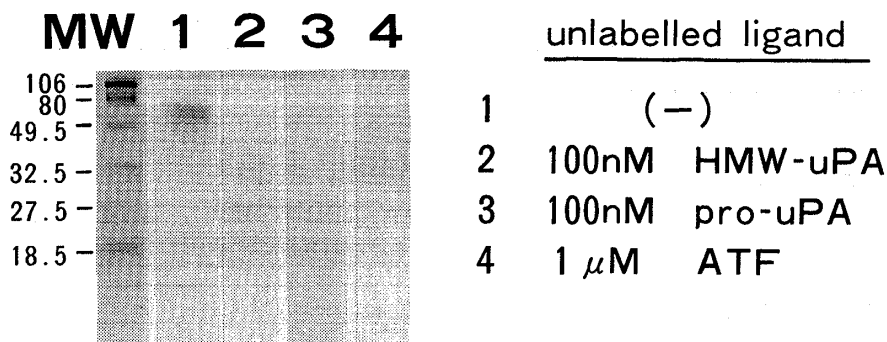


図4 Ligand-blotting assay による uPA receptor の検出. Lane 1の polydisperse band (分子量50~60KDa) が uPA receptor である. Lane 2, 3, 4は100nM の HMW-uPA, pro-uPA, 1 μ M の ATF が添加されており, biotinylated DFP-HMW-uPA の結合が阻害されている.

表 1 患者背景と免疫組織染色結果

リンパ節転移陽性例					リンパ節転移陰性例				
症例	Stage	組織型	uPA 染色	HLE 染色	症例	Stage	組織型	uPA 染色	HLE 染色
1	II b	LNK	+++	±	1	II b	LNK	+	±
2	II b	K	+++	+	2	II b	SNK	±	++
3	II b	K	++	+	3	II a	LNK	+	++
4	II b	K	++	+	4	II b	K	±	++
5	II b	LNK	+++	±	5	II b	LNK	++	+
6	II a	K	++	+	6	II b	Adeno	+	±
7	II b	LNK	+	±	7	II b	K	+	++
8	II b	LNK	++	±	8	II a	LNK	±	++
9	II b	SNK	±	±	9	II b	Adeno	++	++
10	II b	LNK	++	++	10	II b	K	+	++
11	II b	LNK	++	++	11	II a	LNK	±	++
12	II b	LNK	+	++	12	II a	LNK	++	+
13	II b	LNK	+	++	13	II b	Adeno	+	++
					14	II b	K	+	++
					15	II a	LNK	±	+++
					16	II a	LNK	++	+++

LNK, large cell non-keratinizing; K, keratinizing; SNK, small cell non-keratinizing;
Adeno, adenocarcinoma.

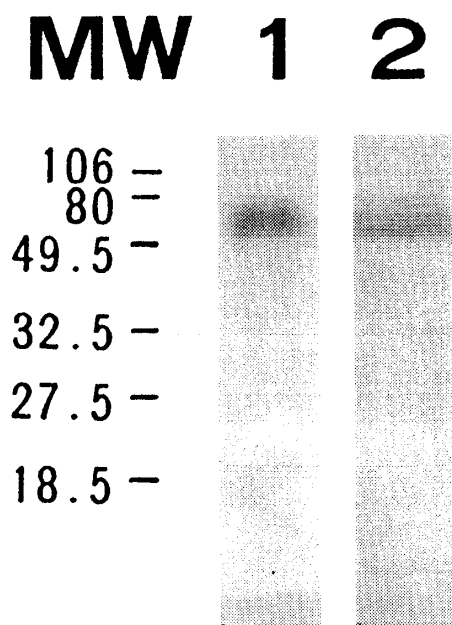


図5 リンパ節転移陽性例と陰性例における uPA receptor の検出. Lane 1はリンパ節転移陽性例から得られた酸処理後の細胞膜成分を用いて ligand-blotting assay を行ったものであり, lane 2はリンパ節転移陰性例から得られた結果であり, 両者の uPA receptor に明らかな量的な差は認めない.

おいても, リンパ節転移陽性例で uPA (+) 以下かつ HLE (++) 以上は 1 例のみであり, また, リンパ節転移陰性例で uPA (++) 以上かつ HLE (+)

以下は存在しなかった. 全般的にみるとリンパ節転移陽性例では uPA が HLE に比べて強く染色され, リンパ節転移陰性例では, 逆に uPA に比べて HLE が強く染色された. それぞれ, scoring 化し平均値±標準偏差を求めると, uPA に関してはリンパ節転移陽性例 2.75 ± 0.74 , 転移陰性例 1.89 ± 0.56 であり, $p < 0.01$ において有意差を認めた. また, HLE に関してはリンパ節転移陽性例 1.91 ± 0.69 , 転移陰性例 2.81 ± 0.69 であり, $p < 0.05$ において有意差を認めた. 図 6 にその代表例を示すが, 図 6A はリンパ節転移陽性例であり, uPA 染色(++), HLE 染色(+)であり, 図 6B はリンパ節転移陰性例で, uPA 染色(+), HLE 染色(++)である. A を強拡大で観察すると, uPA は癌細胞の細胞質にびまん性に染色され(1), HLE は腫瘍巣の周囲に散在性に認められるだけ(2)である. これに対し, B を強拡大で観察すると, uPA はやはり癌細胞の細胞質および細胞膜に弱陽性に染色される(3)のに対し, HLE は腫瘍巣の周囲に密集して認められる(4).

考 案

癌組織中の uPA の濃度が高いほど早期に再発し, 予後が不良であることが乳癌では報告されて

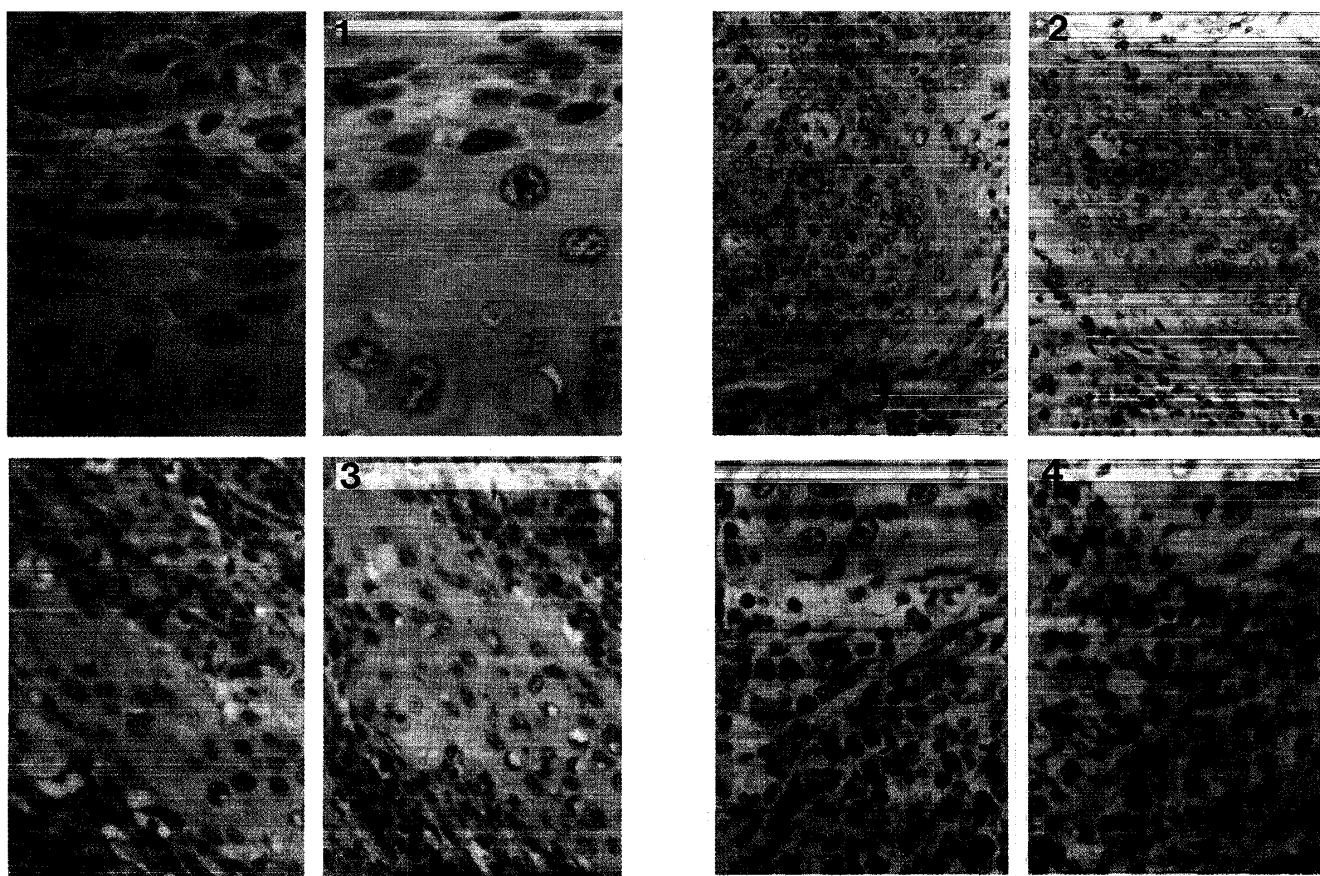
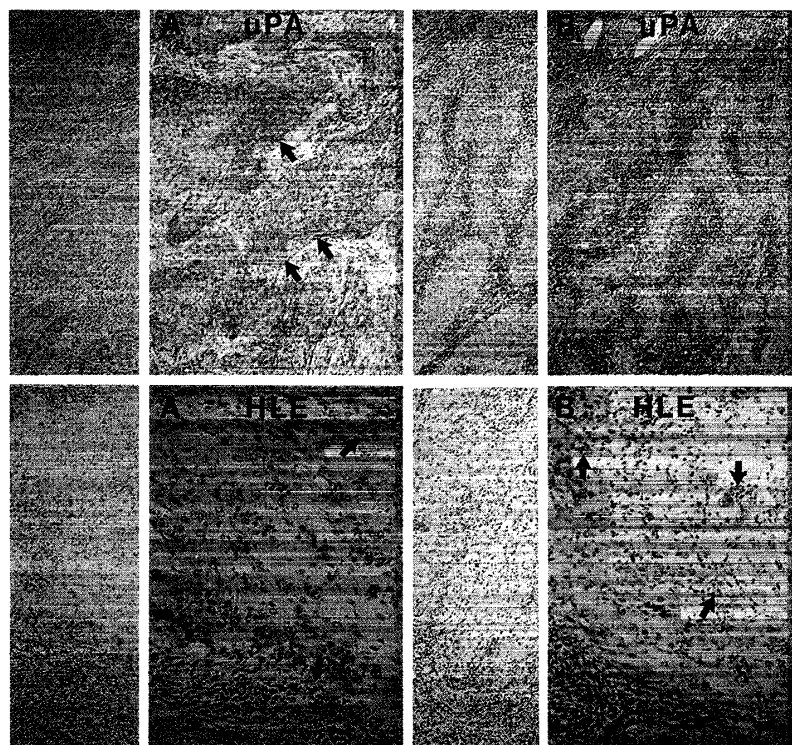


図6 子宮頸癌症例の免疫組織染色。Aはリンパ節転移陽性例であり、uPA染色(++)、HLE染色(+)である。各染色の左側にコントロールを示す。Bはリンパ節転移陰性例であり、uPA染色(+), HLE染色(++)である。矢印はuPAあるいはHLEの陽性部位を示す。1, 2は症例Aの強拡大, 3, 4は症例Bの強拡大であり, 1, 3はuPA染色, 2, 4はHLE染色を示す。

おり、リンパ節転移陰性例でも pro-uPA/uPA の濃度が高い場合には adjuvant chemotherapy が必要であるといわれている¹⁴⁾。uPA は癌細胞の浸潤、特に、intravasation に関しては必須の protease であり、現在までの我々の知見をまとめると以下のような機構が推定される。まず、癌細胞が産生する uPA は酵素学的に不活性な pro-uPA であり、これが癌細胞の膜に結合している cathepsin B あるいは cathepsin L により pro-uPA の 158番目が切断されて HMW-uPA に変換され、plasminogen を plasmin に変換する³⁾¹⁵⁾。このように、癌細胞は独自の機構により pro-uPA を活性化することができ、cathepsins が plasmin 生成の initiator として作用すると考えられる。この plasmin が直接細胞外マトリックスを破壊するのみならず、procollagenase を活性化して、collagen 分解を介して細胞外マトリックスを破壊し、癌細胞の浸潤を容易にする。したがって、癌組織中の uPA の濃度と予後との関連も理解できる¹⁴⁾¹⁵⁾。

今回の検討により、子宮頸癌細胞も膜表面に uPA receptor を発現していることが確認された。その50%以上は ligand により飽和されているが、ほとんどは pro-uPA であった。おそらく、癌組織の周辺部で今まさに浸潤しようとしている細胞のみが HMW-uPA として存在しているものと思われる。現在、pro-uPA と HMW-uPA を区別して染色できる抗体の存在は知られていないので今回染色した uPA のほとんどは pro-uPA であると推定される。我々が卵巣癌や乳癌等で検討した結果は、uPA receptor のほとんどは free であり、せいぜい20~30%しか uPA が結合していない。それに比較して子宮頸癌の場合には50%以上が飽和されているのが特徴的であった。おそらく組織型の相違が大きく影響している可能性があり、扁平上皮癌の場合には腺癌に比べて uPA receptor が飽和されやすいのかも知れない。リンパ節転移の有無による uPA receptor の差異を検討した今回の成績では、リンパ節転移の有無にかかわらず、uPA receptor には量的相違を認めなかったが、uPA の飽和度が異なり、リンパ節転移陽性例のほうが陰性例より膜表面の uPA receptor の飽和度は高

かった¹⁶⁾¹⁷⁾。

また、従来より癌組織には tumor infiltrating leukocytes や好中球がみられ、癌組織に炎症細胞が多く浸潤しているものは比較的予後良好であるといわれているが、その詳細な理由は不明である。我々は好中球が産生する protease である elastase に着目し、この HLE が pro-uPA の modulator として作用することを報告した。すなわち、HLE は pro-uPA の160および166番目を切断して two-chain uPA に変換するが、この uPA は生物活性を全くもたなくなってしまう⁹⁾。つまり、癌細胞が産生した pro-uPA を HLE が不活性化してしまうので HLE は癌細胞の浸潤にとって抑制的に作用する酵素と考えられる。このため、癌組織に炎症細胞が多くみられる症例ほど予後が良好であることが推定される。我々はこの事実を免疫組織染色により初めて明らかにした。

担癌患者の予後を推定するためには TNM 分類や組織学的特徴のみならず、癌細胞の特徴、すなわち、DNA-content や aneuploidy, EGF receptor 量などの質的評価が必要である¹⁵⁾。癌細胞の浸潤、転移は positive regulation と negative regulation のバランスのうえに成り立っており、positive regulator として uPA, plasmin, cathepsins, matrix metallo protease 等の proteases が関与し、negative regulator として PAI-1, 2, TIMP 等が関与していることが確認されており、elastase も negative regulator の一つとして作用することが示唆された。HLE は癌組織周囲の elastin を分解し、癌細胞の浸潤にとって positive regulator として作用する可能性も考えられたが、今回の検討では否定的であった。

現時点ではまだ症例の蓄積が少ないため、子宮頸癌患者の無病期間や生存期間との相関は検討していないが、uPA/HLE 染色態度や ELISA による濃度測定によりリンパ節転移の有無のみならず、生存期間等も推定できる可能性が示唆され、予後因子として利用され得るものと思われる。将来はこれらの因子により治療法の個別化を行っていきたいと考えている。

文 献

1. Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen PI, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139—266
2. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49: 636—649
3. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M, Günzler WA, Jänicke F, Graeff H. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J Biol Chem* 1991; 266: 5147—5152
4. Schmitt M, Goretzki L, Jänicke F, Calvete J, Eulitz M, Kobayashi H, Chucholowski N, Graeff H. Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. *Biomed Biochem Acta* 1991; 50: 731—741
5. Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD, Stetler-Stevenson WG. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 775—779
6. Hearing VJ, Law LW, Corti A, Appella E, Blasi F. Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase of murine melanoma cells. *Cancer Res* 1988; 48: 1270—1278
7. Kobayashi H, Ohi H, Sugimura M, Shinohara H, Fujii T, Terao T. Inhibition of *in vitro* ovarian cancer cell invasion by modulation of urokinase-type plasminogen activator and cathepsin B. *Cancer Res* 1992; 52: 3610—3614
8. Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: Requirement for a proteinase cascade. *Cell* 1986; 47: 489—498
9. Schmitt M, Kanayama N, Henschen A, Holtrieder A, Hafter R, Gulba D, Jänicke F, Graeff H. Elastase released from human granulocytes stimulated with N-formyl-chemotactic peptide prevents activation of tumor cell prourokinase (pro-uPA). *FEBS Lett* 1989; 255: 83—88
10. Pontremoli S, Melloni E, Michetti M, Sacco O, Sparatore B, Salamino F, Damiani G, Horecker BL. Cytolytic effects of neutrophils: Role for a membrane-bound neutral proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1685—1689
11. Burgess R, Hyde K, Maguire PJ, Kelsey PR, Lin Yin JA, Geary CG. Two-colour immunoenzymatic technique using sequential staining by APAAP to evaluate two cell antigens. *J Clin Pathol* 1992; 45: 206—210
12. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1131—1139
13. Corti A, Nolli ML, Cassani G. Differential detection of single-chain and two-chain urokinase-type plasminogen activator by a new immunoadsorbent-amidolytic assay (IAA). *Thromb Haemost* 1986; 56: 407—410
14. Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, Gössner W, Graeff H. Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet* 1989; II: 1049
15. Schmitt M, Jänicke F, Graeff H. Tumor-associated fibrinolysis: The prognostic relevance of plasminogen activators uPA and tPA in human breast cancer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990; 1: 695—702
16. Casslén B, Gustavsson B, Astedt B. Cell membrane receptors for urokinase plasminogen activator are increased in malignant ovarian tumours. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1445—1448
17. Cohn RL, Xi X-P, Crowley CW, Lucas BK, Levinson AD, Scuman MA. Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. *Blood* 1991; 78: 479—487

(No. 7441 平5・10・1受付)