[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
21(6) 502-505 (1995)

濁度変化を指標とした線溶酵素活性の測定

中川輝昭*†¹, 北澤英徳†¹, 小林史明†¹, 佐藤 均†¹,
足立伊佐雄†¹, 上野雅晴†², 堀越 勇†¹
富山医科薬科大学附属病院薬剤部†¹
富山医科薬科大学薬学部†²

Measurement of Fibrinolytic Enzyme Activity Using the Variation in Turbidity

TERUAKI NAKAGAWA*†¹, HIDENORI KITAZAWA†¹,
FUMIAKI KOBAYASHI†¹, HITOSHI SATOH†¹, ISAO ADACHI†¹,
MASAHARU UENO†² and ISAMU HORIKOSHI†¹
Department of Hospital Pharmacy†¹, Faculty of Pharmaceutical Sciences†²,
Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received January 24, 1995
Accepted September 13, 1995)

The fibrinolytic activities of commercially available urokinase were compared using a platelet aggregometer, which is capable of measuring the change in turbidity during the fibrinogen dissolution process.

The fibrinolytic activities were evaluated from the half-lives of the turbidity ratio at 660 nm using fibrin as a plasmin substrate. A clear linear relationship was evidenced between the half-life of the turbidity ratio and fibrinolytic activity, conforming that this method is superior to others with regard to accuracy, sensitivity, reproducibility, and quickness of measurement.

Furthermore, no difference was seen between the fibrinolytic activities of two commercially urokinase preparations. In conclusion, the platelet aggregometer was found to be very useful device for evaluating the fibrinolytic activity of urokinase.

Keywords—urokinase, turbidity, fibrinolytic activity, platelet aggregometer, plasmin

はじめに

線溶酵素剤として広く臨床で利用されているウロキナーゼは、ヒト尿中に多量に存在するセリンプロテアーゼの一種で、プラスミノーゲンを活性化してプラスミンを生成する酵素であり、心筋梗塞や血栓症の治療に汎用されてきた。

ウロキナーゼの線溶活性測定法は、これまでに試験管法¹⁾、フィブリン平板法²⁾、チャンドラ・ループ法³⁾、二段法⁴⁾、合成基質法⁵⁾が報告されており、更に著者らの開発したチャンドラ・ループ変法⁶⁾、トロンボエラストグラム法⁷⁾、微小熱量計法⁸⁾などが知られている。

試験管法と二段法は、検液中の気泡が消失するまでの時間を測定する方法であり、フィブリン平板法はフィブリン溶解窓の面積から判定するが、

†^{1,2} 富山市杉谷 2630; 2630, Sugitani, Toyama,
930-01 Japan

これらの方法は試験管の直径・液量あるいはフィブリン平板の厚さ等に厳密な規定がなく、主観の入る余地が残されている。合成基質法は、感度は優れているが、天然基質を用いていない。チャンドラ・ループ法は、未溶解の血栓の取り出しの操作にバラツキの生じ易いことや、測定に時間のかかるのが欠点である。チャンドラ・ループ変法は、これを改良し、新鮮血の代わりにフィブリノーゲンとトロンビンをを用い、測定時間を短縮させている。トロンボエラストグラム法は、フィブリン形成のゲル化過程とフィブリン溶解のゾル化過程での時間のズレを指標として線溶活性を測定する方法である。また、微小熱量計法は、フィブリノーゲンが分解する際の熱的变化を指標としているが、フィブリンを用いていないことや、試料が多量(4ml)なことが欠点である。

本研究では、天然の基質および血小板凝集メータを用い、試料は少量で、短い時間内に線溶活性を測定し得る方法がないかと検討したところ、興味ある新しい方法を見出したので、以下にその詳細を報告する。

実験の部

1. 試薬

フィブリノーゲン；凝固性蛋白1g/瓶(Lot No. 6750B)、トロンビン；500U/瓶(Lot No. 237)、プラスミノーゲン；1.5mg/瓶(Lot No. 006 GN)、プラスミン；4.2U/mg(Lot No. KU114 YU)、ウロキナーゼミドリ 6000U/Vial(Lot No. 244GN)はミドリ十字社の製品を用いた。ウロキナーゼ 6000U/Vial(Lot No. 4B372)は持田製薬の製品を用いた。塩化ナトリウム特級、EDTA、アラビアゴム、グルコース、イミダゾールは和光純薬の製品を用いた。

2. フィブリン懸濁液の調製

フィブリン懸濁液の調製は既存⁹⁾の調製方法に準じた。すなわち、0.3%のNaCl溶液に溶解した3%フィブリノーゲン 33.3mlに同量の0.3M NaClおよび2mM EDTAを含むトロンビン溶液(1.0unit/ml)を加え、フィブリン塊を形成させる。次に蒸留水で十分洗浄後、8Mの尿素溶液

に溶解し、更に蒸留水(25°C)で十分透析する。透析の終了したフィブリン懸濁液を加熱処理(60°C, 30分間)してトロンビンを不活化した後、アラビアゴムおよびグルコースをそれぞれ1%, 3%になるように加え、超音波(強度10, 20分間)処理し、これに100mM NaClを含む50mMのイミダゾール(pH 7.5)〔最終濃度〕を加え、更に10分間超音波処理する。

3. 装置および原理

二光バイオサイエンス社の4チャンネル自動血小板凝集計(Model PAT-4A)を使用した。血小板凝集計は図1に示すような構造をしており、37°C条件下で試料用セルにウロキナーゼとプラスミノーゲンを注入しプラスミンを生成させた後、フィブリン懸濁液を注入すると、フィブリン塊がプラスミンによって溶解されるにつれて透過率が増加する。フィブリン塊がすべて溶解されれば、最大の透過量を示すことになる。この透過率の変化は、光電密度として光電池で感知され、これを電圧に変え、増幅後、連続記録される。

4. 測定方法

血小板凝集計を用い、フィブリン懸濁液の濁度を100%、生食のそれを0%に設定する。

(1) プラスミン活性測定

フィブリン懸濁液 200 μ lを37°Cで2分間インキュベートし、これにゲルろ過したプラスミン10 μ lを各濃度(2.79, 2.09, 1.86, 1.40, 0.93,

図1. Platelet aggregometerの概略図

0.56, 0.28, 0.14) cu/ml で 37°C, 1 分間インキュベートしたのち加え, 透過率の変化を測定する。

(2) ウロキナーゼ活性測定

37°C 恒温下でプラスミノゲン (14cu/ml) 20 μ l にウロキナーゼ 20 μ l を加え, 更に 1 分間インキュベートする。これにフィブリン懸濁液 200 μ l を加え, 透過率の変化を測定する。

結果および考察

天然の基質として用いたフィブリンの懸濁液は, 調製過程で尿素を添加するとフィブリノーゲンには影響せず, 血液凝固第 XIII 因子のみを不活化する¹⁰⁾ので, この方法を利用した。この結果, フィブリンとプラスミンの反応が短時間に進み, 血小板凝集計の測定条件で分光光度計の測定と同様の結果が得られた。

活性値既知のプラスミンを用い, 濁度が50%になる時間 ($T_{1/2}$) を測定し, 両対数グラフ上にプロットして図2に示す直線 (検量線) を得た。

半減期法^{11,12)}は, この検量線を利用するものであり, 直線については図2の相関係数0.82が得られたので, この直線を検量線として利用可能であることが確認できた。

そこで, この検量線を利用して, 2 種のウロキ

ナーゼ製剤を種々の濃度に希釈し, 50%濁度を測定し, 図3の結果を得た。図3では, 2 製品ともウロキナーゼ濃度が $10 \sim 10^3$ unit/ml の範囲で, $\log T_{1/2}$ とウロキナーゼ活性の間に一次の直線関係が得られたことから, 本法は臨床でも利用可能なことがわかった。

図3によると, ウロキナーゼミドリはウロナーゼよりもやや高い線溶活性を示したが, 有意差は認められなかった。本実験では1 サンプルあたり10分程度の時間で酵素活性を測定することが可能

図2. プラスミン活性と50%透過率に達する時間 ($T_{1/2}$) との関係

図3. ウロキナーゼ活性と50%透過率に達する時間 ($T_{1/2}$) との関係

なことがわかった。

ウロキナーゼ製剤より後発の組織プラスミノゲンアクチベータ (TPA) やウロキナーゼ前駆物質 (Pro-UK) は、フィブリンに対する親和性がウロキナーゼよりも高い。したがってそれらの活性評価を行う際、天然基質のフィブリンを使用している点で本法の有用性は高いと考えられる。

また、本法は他の方法に比べ測定時間が飛躍的に短く手技が簡単で、少量の試料で測定でき、天然の基質を用いており、総合的にみて従来の方法より応用価値の高い測定方法である。

引用文献

- 1) 松岡松三, 桜川信男, 米山泰夫, 嶋岡 洵, 臨床と研究, **46**, 932-935 (1969).
- 2) N. Sakuragawa, M. Matsuoka, et al., *Acta Med. Biol. (Niigata)*, **21**, 1-11 (1973).
- 3) A. B. Chandler, *Lab. Invest.*, **7**, 110-114 (1958).
- 4) 山本博嗣, 田島英男, 酒巻道夫, *J. Med. Enzymol.*, **1**, 137-140 (1975).
- 5) Svendsen, L. et al., *Thrombosis Research*, **1**, 267 (1972).
- 6) 堀越 勇, 中川輝昭, 今村曜子, 宮崎博子, 高橋薫, 桜川信男, 病院薬学, **7**(2), 123-127 (1981).
- 7) 中川輝昭, 安田晶子, 鳥居塚和生, 上野雅晴, 堀越 勇, 病院薬学, **12**(5), 369-372 (1986).
- 8) 中川輝昭, 川端奈緒美, 足立伊佐雄, 上野雅晴, 堀越 勇, 病院薬学, **16**(3), 185-188 (1990).
- 9) 金井正三, 岡本 寛, 玉浦 裕, 稲田裕二, 血液と脈管, **11**(1), 62-65 (1980).
- 10) 三輪史朗, “臨床検査技術全書3 (血液検査)”, 医学書院, 東京, 1978, p.511.
- 11) 宮嶋孝一郎, “医薬品の開発15巻”, 廣川書店, 東京, 1989, p.136-140.
- 12) 後藤 茂, “医薬品の開発16巻”, 廣川書店, 東京, 1990, p.156-175.