原 著

線溶酵素活性測定法の自動化の試み

梶 江 勇* 丹 下 由紀子*
伊 藤 要 子* 山 本 紘 靖*

The studies of auto-analyzer system for fibrinolytic activity
of plasma by means of chromogenic substrate

Isamu SUGIE*, Yukiko TANGE*, Yoko ITO*
and Hiroyasu YAMAMOTO*

Key words: auto-analyzer, chromogenic substrate, kinetics,
end point, fibrinolytic activity of plasma

With the use of chromogenic substrate (S-2251), rate assay (kinetics) and end point assay of enzyme activity of human plasmin and human plasminogen, euglobulin and plasma by SK or UK were studied using by auto-analyzer (Hitachi-Co., type-703).

The chromogenic substrate was enzymatically good substrate for plasmin and K_m value of plasmin was 7.6×10^{-4} mM. When plasma was activated by SK, the highest value of kinetics was seen at initial time but UK had lag time. From these results, it is suggested that even with the use of small dose of substrate (0.1 μ M), auto-analyzer could be applied to measure fibrinolytic activity of human plasma (0.05 ml) activated by SK (500 U) on kinetics.

はじめに

線溶酵素の測定法について、われわれはこれまで ELT 装置の開発やフィブリン平板法における線溶諸因子の判別測定法を発表してきた^{1~4)}。しかし、近年線溶酵素の役割が単に出血機序にとどまらず、各種疾患時や生理的にもその動態が注目されるとともに各分野で線溶酵素の測定が要求されるようになった。

われわれはこの線溶酵素測定法の自動分析化のため当初 fibrin 基質を微細粒子として測定を試みたが、安定した粒子の作成および比濁法に難点があり中断した。しかし最近 Kabi 社において合成ペプチドと発色団による chromogenic

Substrate (C-Sub.) が開発された。この C-Sub. は線溶凝固系の各酵素に特異的な基質が開発されており、今回は Plasmin に特異的な S-2251 を用い、自動分析機として酵素反応速度測定装置(日立 703 型)を用いて、血漿 Plasmin 活性の測定が可能であるか、さらにその測定法の妥当性について検討した。

I. 測定方法

1. 反応ライン 基本動作としてあらかじめ恒温水槽(37℃)に配列されている小試験管に buffer (0.05M Tris pH 7.4) 1.4ml と試料 0.05ml をサンプリングノズルで注入し、15分後にディスペンサーで基質(S-2251) 0.1ml を

* 愛知医科大学第一生理〔〒480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21〕, Dept. of Physiology, Aichi Medical University, Aichi, Japan.

注入, 攪拌, 1 分後に測光により反応速度 (Kinetics) および end point を測定した。

2. 測定項目 反応速度は反応開始 1 分後から 35 秒間に 64 点を測定し, その前後各 32 点の吸光度の差を Recorder による直線性の検討および平均 ΔE を digital 表示により求めた. end point は任意の時間における吸光度を digital 表示で求めた. Kinetics や end point の Unit 値は今回は用いなかったが, ある係数を乗ずることができるため測定項目による定数をあらかじめ求めておけば unit 表示をすることができる. 測光装置は 2 波長測光法であるため λ_1 450nm, λ_2 415nm を用いた. この 2 波長についてはあらかじめ S-2251 および反応生成物である p-Nitro-aniline の吸収曲線を求め, 今回の測定目的に合致することを確認している。

II. 成績および考按

1. Plasmin と S-2251

S-2251 濃度, 0.5, 1, 2, 3mM/l の各溶液 0.1ml (基質 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 μ M) 量と一定量の Plasmin (Kabi 社) 0.1CU とを反応させ時間的経過を追って Kinetics と end point を測定した結果, end point は基質量と比例し時間経過とともに漸増する放物線状の反応曲線を示し, Kinetics では最初の 1 分で基質量に比例しかつ最も高い値を示し以後時間経過とともに減少する減衰曲線状の反応曲線を示した。

Lineweaver plot による K_m 値は 7.6×10^{-4} mM であった. 基質量の選定は反応曲線よりできる限り少量を選び, 基質量としては 0.1 μ M を用いることとした. 0.1 μ M 基質量における Plasmin 量との関係は Plasmin 0~0.25CU の範囲で end point (10') および Kinetics の測定値は直線関係を示した(図 1), 各種 Plasmin 量におけるフィブリン平板法と C-Sub., Lysis time と C-Sub. の測定値の相関性を求めたが,

Fig. 1 Calibration curve of plasmin. Plasmin (from 0.025 CU to 0.25 CU) were incubated with 0.1ml of 1mM chromogenic substrate, S-2251, and kinetics (ΔE) at 1 min. and end point (E) at 10 min. were measured.

Fig. 2 Reaction curve of SK-plasminogen, SK-euglobulin, SK-plasma and UK-plasma with chromogenic substrate.

いずれも直線性は示さず Semi-log グラフで直線となった。

2. Plasminogen-SK, UK と S-2251

精製した人 Plasminogen (0.2CU) を SK および UK で活性化し S-2251 との反応を調査した. 同 unit の SK と UK による Kinetics は SK で初期により高い値が得られ UK では時間的経過とともに漸増, その後減少する山形の曲線を示したことから SK に比し UK の Plg. 活性化速度が遅いとみられた. Plg.-SK の反応は SK 量に比例し Kinetics の値は増大し, ことに 1 分以内に maximum に達していることが明らかとなった. また, SK 量による Kinetics の変化は end point より比較的広範囲であり 0~750U まで変化がみられ Kinetics の

Table 1 Specific properties of chromogena substrate, S-2251, with plasmin, SK-, UK-activated plasma and inhibitors.

Substrate	Enzyme (inhibitor)	Kinetics	end point
S-2251 1mM 0.1ml	Plasmin	0~0.2CU	0~0.25CU
	Plg. (0.2CU)+SK	0~750U	0~50U
	Plg.+SK (500U)	0~0.3CU	0~0.2CU*
	Plg. (0.2CU)+UK	0~20U	0~20U
	Plasma+SK (500U)	0~0.05ml	0~0.04ml
	Pl. (0.1CU)+t-AMCHA	1mg<	1mg<
	Pl. (0.1CU)+trasylol	0~5U*	0~3U
	Pl. (0.1CU)+plasma	0~0.02ml*	0~0.006ml

* indicate none linear relationship.

値は単に生成 Plasmin 量を示すばかりでなく活性化速度も示していた。UK の活性化の場合には比較的長い反応時間による end point の測定が有意であった。SK (500U) 一定量における Plg. 量の測定範囲 (0~0.3CU) で直線性を示した。

3. Plasma-SK と S-2251

Plasma を SK で活性化し S-2251 との反応を調べた結果 Plasmin や Plg.+SK と同様な反応曲線を示し、SK 量や Plasma 量に比例して Kinetics および end point 値に変化がみられた。図2は Plg., Eug. や Plasma を試料として SK および UK で活性化した反応曲線である。このことから Plasma-SK により Plasmin 測定が可能であると判断された。SK 500U, S-2251 0.1μM における Plasma 量の測定範囲は Kinetics で 0~0.075ml で直線性を示し、試料 0.05ml で測定可能であった。Plasma 中の Fibg. 量による影響は Plasmin—S-2251 の反応系に 0~1,000mg/dl の人 Fibg. を添加しても特に著しい影響はなく、最も変化のあった Kinetics でも高濃度でわずかに数%の減少がみられたのみである。

また、Plasma の anti-plasmin 効果、t-AMCHA, Trasylol の anti-plasmin 効果も測定であることを確めた。anti-plasmin 効果は end point により直線関係が求められた。調査の結果をまとめたものが表1である。

これまで S-2251 について Blombäck⁵⁾, Kosow⁶⁾ らの研究はあるが本実験結果より Plasma

の Plasmin 作用が自動分析化可能であることが明らかとなった。また Plasma の anti-plasmin 作用についても Teger-Nilsson⁷⁾, Edy⁸⁾ らの報告のごとく測定可能であり、本実験からも自動分析化をすることができることが明らかとなった。

結 語

酵素反応速度自動分析機 (日立 703 型) を用いて、Chromogenic Substrate S-2251 と Plasmin, SK-plasminogen, SK-euglobulin, SK-plasma との反応を rate assay (Kinetics), end point の両面より調査した。これらの酵素的分析から少量の基質 (0.1μM) であっても SK (500U) で活性化された Plasma (0.05ml) の線溶活性は Kinetics を測定することにより、anti-plasmin は end point を測定することにより自動分析化できる見通しがついた。

文 献

- 1) 梶江 勇, 他: ELT の新しい写真判定式測定装置の開発. 名市大医誌, 20; 357~364, 1969.
- 2) 小塩昌洋: ELT の意義と測定法の検討. 名市大医誌, 20; 673~690, 1970.
- 3) 菱川要子, 他: 人および牛の Plasminogen free fibrin plate の作製と検討. 愛知医大誌, 1; 132~143, 1973.
- 4) 菱川要子, 他: Plasminogen free fibrin plate を用いた線溶因子の指数について. 日生理誌, 39; 1~11, 1977.

- 5) Svendsen, L.: Synthetic chromogenic substrate for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Thrombosis Res.*, **1**; 267~278, 1972.
 - 6) Kosow, D. P.: Kinetic mechanism of the activation of human plasminogen by SK. *Biochem.*, **14**; 4459~4464, 1975.
 - 7) Teger-Nilsson, A.C.: Determination of new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin specific tripeptide substrate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* to be published.
 - 8) Edy, J. et al.: Inhibition of plasmin by normal and anti-plasmin-depleted human plasma. *Throm. Res.*, **8**; 513~524, 1976.
-