 原 著

フィブリン懸濁液を基質とした血中 プラスミン活性測定法 (I)

金 井 正 三* 岡 本 寛*
玉 浦 裕* 稲 田 祐 二*

Fibrin suspension as a substrate for plasmin: Determination and kinetics

Shozo KANAI*, Hiroshi OKAMOTO*,
Yutaka TAMAURA* and Yuji INADA*

Key words: plasmin, plasminogen, fibrin suspension, fibrinogen

Fibrin polymers formed from fibrinogen with thrombin in the presence of EDTA were suspended in a medium containing glucose, arabic gum and imidazole-HCl buffer and were sonicated at 20 kHz for 20 min to make a suspension containing fibrin particles of small size. The fibrin suspension was used as a substrate for determining the enzymic activity of plasmin and plasminogen activated with urokinase. The kinetic study on the reaction of the fibrin particles with plasmin in the presence and the absence of fibrinogen revealed that the K_m value of fibrin for plasmin is $4.2 \times 10^{-7} M$ and the K_i value of fibrinogen is $1.2 \times 10^{-5} M$.

緒 論

血中のプラスミノゲンの活性化によって生ずるプラスミン活性の測定は炎症、悪性腫瘍等の診断に必要であり、特に最近では DIC の早期発見に迅速簡便な測定法が強く望まれるようになった。従来のプラスミン活性測定法は、プラスミンの基質としてカゼイン¹⁾、フィブリノゲン²⁾を用いる方法、フィブリン平板法³⁾⁴⁾、フィブリン標識法⁵⁾⁶⁾等があるが、いずれも測定に長時間を要し定量操作が煩雑である。また最近、合成基質 H-D-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilide

を用いる方法⁷⁾が開発され短時間で測定可能であるがプラスミンに対する K_m 値が大である。

本研究はプラスミンの本来の基質であるフィブリンを用い短時間にプラスミン活性を測定する方法を開発することを目的とした。まずフィブリン微粒子を懸濁させ、プラスミンによる濁度の減少を分光学的手段で追跡することによりプラスミン活性を10分以内に測定することを可能にした。さらに速度論的研究を行ないプラスミンに対するフィブリン粒子の K_m 値およびフィブリノゲンの K_i 値を求め比較検討した⁸⁾。

* 東京工業大学理学部化学科生物化学教室〔〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1〕, Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.

I. 方 法

フィブリン懸濁液の調製法：0.3M NaCl に溶解した3%フィブリノゲン 50ml 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、フィブリン塊を作る。十分水で洗滌後、8M尿素に溶解し、水で十分透析する。析出するフィブリン微粒子を熱処理した後、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、超音波破碎 (20kHz, 10分) し、100mM NaCl を含む 50mM イミダゾール緩衝液 (pH 7.5) [最終濃度] を加え、さらに10分超音波碎しフィブリン懸濁液を得る。この懸濁液中に含まれるフィブリン粒子の半径は平均 $3\mu\text{m}$ であり、懸濁は長時間保持される。

プラスミン活性測定法：フィブリン懸濁液 0.5ml に 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.7), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM リジンを含む 0.5ml のプラスミンを加える。フィブリン粒子の可溶化に伴って生ずる懸濁液の濁りの減少を、分光器を用い 370nm の波長で記録する。その際用いるセルは光路長 1cm, 厚さ 0.4cm のものを用いる。プラスミン活性は時間に対する濁度の減少の最大値、 v を指標とする。プラスミノゲンについてはウロキナーゼを添加し活性化した。

II. 結 果

図1の左側はフィブリン懸濁液に種々の濃度 (0.13~1.0units/ml) のプラスミンを添加した際の濁度の減少を示したもので、プラスミン濃度の増加に伴って濁度の減少が大きくなることがわかる。それぞれの曲線の時間に対する最大減少量、すなわち勾配、 v をプラスミン濃度に対してプロットすると図1の右に示す曲線が得られる。プラスミンの低濃度領域では直線となるが高濃度領域でわずかに直線よりはずれる。

実際フィブリン粒子がプラスミンの作用によって可溶化されたことを証明するため、消化程度の異なるフィブリン懸濁液を遠心分離し、上澄に存在する蛋白量を定量するとともに可溶化

Fig. 1 The absorbance decrease at 370nm after adding plasmin with various concentrations to the fibrin suspension as a substrate for plasmin (the left side panel), and the relation between the rate of absorbance decrease, v , and plasmin concentration (the right side panel). Curves A, B, C, D, E and F; 0.13, 0.25, 0.38, 0.50, 0.75 and 1.0 units/ml plasmin, respectively.

されたフィブリンの分解物を電気泳動で同定した。その結果を図2に示す。左のパネルはフィブリン懸濁液の濁りの減少 (A, B, C) と可溶化された蛋白質の増加 (a, b, c) を示したものである。また右のパネルは可溶化蛋白の電気泳動で、消化が進むに伴ない (A→B→C→D) 分子量 8.3 万および 5 万に相当する蛋白量が増加している。これらの高分子はフィブリン分子のプラスミン分解産物 Fragment D および Fragment E に相当する。

臨床的に本法を利用するためには、血漿中に存在するフィブリノゲン、および種々のプラスミン阻害蛋白の本定量におよぼす影響を調べる必要がある。フィブリン懸濁液中にフィブリノゲンを共存させた際の影響を調べるため、種々の濃度 (0, 9.1, 18.2 μM) のフィブリノゲンをフィブリン懸濁液に共存させプラスミン添加による v 値を求めた。図3はその結果であり (左のパネル) 常法にしたがって $1/v$ と $1/s$ をプロットすると3本の直線が得られ、それぞれの直線は縦軸の1点で交った。すなわちフィブリノゲンはプラスミンのフィブリン消化を拮抗的に阻害する。プラスミンのフィブリンに対する K_m 値は $4.2 \times 10^{-7} \text{M}$, フィブリノゲンに対

する K_i 値は $1.2 \times 10^{-5} M$ である。すなわちプラスミンは、フィブリンに対してフィブリノゲンに対するよりも30倍以上の親和力を有する。

上述の方法および著者らが開発したフィブリノゲンの迅速定量法⁹⁾を用い、心房中隔欠損の手術を行った患者の術前、術後のプラスミン活性およびフィブリノゲン量を測定したところ、次の結果を得た。

フィブリノゲン (mg/dl)	プラスミン活性 (相対値 %)	
210	100	手術前
250	88	手術直後
660	1	術後24時間
1,350	82	術後72時間

III. 考 察

本法の特徴はプラスミン活性測定に際しきわめて微小なフィブリン粒子懸濁液の調製にあり、またフィブリン重合体がプラスミン本来の基質であること、操作が簡便であり測定が短時間で終了することである。しかし本定量法を実際臨床的に利用し、血中プラスミン量を決定するには多くの問題を残している。本研究によって、血中に存在するフィブリノゲンはプラスミンに対する親和力がフィブリンに比べて小であることを証明したが、血中に存在する α_2 -プラスミンインヒビター、 α_2 -マクログロブリン等のプラスミン活性阻害蛋白質が本定量におよぼす影響を調べる必要がある。現在、妨害物質の影

Fig. 2 Increase of amount of soluble proteins released from fibrin particle (the left side panel) and electrophoresis pattern of the solubilized proteins (the right side panel). The left side panel: Curves A, B and C; absorbance decrease (turbidity) at 370 nm caused by the digestion of fibrin with 0.05, 0.13 and 0.25 units/ml plasmin, respectively. Curves a, b and c; absorbance increase at 280 nm measured for the supernatants of the fibrin suspensions, using the same samples as above. The right side panel: Curves A, B, C and D; electrophoresis patterns obtained for the supernatants of the fibrin suspension after digesting for 0, 4, 7 and 10 min using 0.13 units/ml plasmin. Electrophoresis with 7% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate was carried out for 4 hrs at 8 mA per tube.

Fig. 3 Kinetic study of the enzymic reaction of plasmin with fibrin in the presence and absence of fibrinogen. The left side panel: Plotting of the rate, v , of absorbance decrease of the fibrin suspension in the presence (curves B and C) and in the absence (curve A) of fibrinogen against various amounts of fibrin $[S]$. Curves B and C; in the presence of $9.1 \mu M$ and $18.2 \mu M$ fibrinogen, respectively. The right side panel: a double-reciprocal plot of v and S .

響を考慮して波長540nmで血漿中のプラスミノゲンによる減少速度、および血漿中にさらに精製したプラスミノゲンを添加したときの減少速度を測定し、血中総プラスミノゲン量およびインヒビター量を算出する方法を確立しつつある。

文 献

- 1) Remmert, L.F. and Cohen, P. P.: Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum. *J. Biol. Chem.*, **181**; 431~448, 1949.
- 2) Nanninga, L.B. and Guest, M.M.: Activity-pH relationship and Michaelis constants during activation of profibrinolysin and during fibrinogenolysis. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **19**; 492~498, 1968.
- 3) Lassen, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. *Acta Physiol. Scand.*, **27**; 371~376, 1952.
- 4) Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**; 346~351, 1952.
- 5) Sawyer, W.D., Fletcher, A.P. and Sherry, S.: Studies on the thrombolytic activity of human plasma. *J. Clin. Invest.*, **38**; 1086~1095, 1959.
- 6) Genton, E., Fletcher, A.P., Alkjaersig, N. and Sherry, S.: Assay of plasma thrombolytic activity with fluorescein-labelled clots. *J. Lab. Clin. Med.*, **64**; 313~320, 1964.
- 7) Soria, J., Soria, C. and Samama, M.: Dosage du plasminogène à l'aide d'un substrat chromogène tripeptidique. *Pathol. Biol.*, **24**; 725~729, 1976.
- 8) Kanai, S., Okamoto, H., Tamura, Y. and Inada, Y.: Fibrin suspension as a substrate for plasmin; Determination and kinetics. *Thrombos. Haemostas.*, **42**; 1153~1158, 1979.
- 9) Inada, Y., Okamoto, H., Kanai, S. and Tamura, Y.: Faster determination of clot-table fibrinogen in human plasma: An improved method and kinetic study. *Clin. Chem.*, **24**; 351~353, 1978.

●内科と眼科の統合による成果！

糖尿病性網膜症

編集 東北大学内科教授 後藤由夫

琉球大学眼科教授 福田雅俊 専門医37氏分担執筆

A 5 判 355頁 図92 表86 原色10 定価7,800円(〒200円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768