線溶亢進状態例でみられたアミダーゼ活性法と 免疫学的活性法による α_2 PI 活性値の相異

加藤 正俊* 須澤 徹之* 緋田 和子*
藤巻 道男* 福武 勝博* 須澤 祝子**

Differences in quantity of α_2 PI determined as amidase activity
and immunoactivity in enhanced fibrinolytic state

Masatoshi KATO*, Tetsuyuki SUZAWA*, Kazuko KUROSO*,
Michio FUJIMAKI*, Katsuhiko FUKUTAKE* and Noriko SUZAWA**

Key words: α_2 plasmin inhibitor, chromogenic substrate,
defibrase

The authors have previously reported that the determination method for anti-plasmin using chromogenic substrate S-2251 was mainly sensitive to α_2 PI (α_2 Plasmin Inhibitor). In this paper, differences in quantity of α_2 PI determined as amidase activity and immunoactivity was investigated in enhanced fibrinolytic state.

Plasma specimen were obtained from enhanced fibrinolytic cases composed of 6 DIC syndrome and 4 healthy and 2 phlebotrombotic disease receiving a single injection of Defibrase. It was found that the samples collected at 4~24 hours after Defibrase injection showed relatively high values of α_2 PI activity by SRID method as compared to S-2251 method. This discrepancy was caused by the appearance of α_2 PI-plasmin complex, which was confirmed by the cross immuno-electrophoretic pattern of each fraction obtained by gel chromatography (Sephadex G-150) of the plasma from phlebotrombotic disease receiving Defibrase. It was concluded that the S-2251 method determines only free α_2 PI, whereas the SRID method determines both free α_2 PI and the α_2 PI-plasmin complex. On injection of Defibrase, a strong fibrinolytic state will take place, with FDP reaching 1,000~2,000 μ g/ml in 4~8 hours, and the α_2 PI-plasmin complex appears in the plasma. But this complex will disappear within 24~48 hours after Defibrase injection. The rapid metabolism of this complex can be deduced by the fact that no α_2 PI-plasmin complex was detected in DIC cases with high FDP level reaching 80~320 μ g/ml.

* 東京医科大学臨床病理〔〒160 東京都新宿区西新宿6-7-1〕, Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan.

** 横浜第一クリニック, Yokohama Daiichi Clinic, Kanagawa, Japan.

緒 言

発色性合成ペプチド基質 Chromogenic substrate S-2251 によるアンチプラスミンの測定法は血中に存在する種々プロテアーゼインヒビターのうち超速効的にプラスミンを阻害する α_2 プラスミンインヒビター（以下 α_2 PI と略す）を主に反映することが青木ら（1978）¹⁾、著者ら（1978）²⁾³⁾によってすでに明らかにされた。今回は本測定法の基礎的検討の一環として、 α_2 PI について S-2251 で測定されるアミダーゼ活性法と一元免疫拡散法（以下 SRID 法と略す）で測定される免疫学的活性法との関連性、とくに線溶亢進状態例でみられた両活性値の相異について若干の知見を得たので報告する。

I. 試材および方法

1) 線溶亢進状態の検体は Weber christian 病 2 例、胃癌 3 例、食道癌 1 例から誘発した DIC 6 症例 (FDP: 80~320 μ g/ml) と Defibrase 0.8~1.6 BU/kg を単回投与した正常者 4 例、深部静脈血栓症 2 例の 3.8% クエン酸ナトリウム加血漿を用いた。

2) α_2 PI の測定は S-2251 法ではテストチーム・アンチプラスミンキット（第一化学薬品扱）をそのまま使用し、免疫学的測定には α_2 PI

の抗血清（自治医大血液研究所および持田製薬からの提供品）濃度 2~5% を含有した 1% アガロース平板にて SRID 法および交叉免疫電気泳動法にて行った。

3) 血漿のカラムクロマトグラフィーによる分画は Sephadex G-150 を詰めた 2.6 $\times$ 70cm のカラム管を用い、サンプリングしたのち 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて流出し、各分画を得た。

II. 実験成績

1. α_2 PI の S-2251 法と SRID 法の相関

図 1-(a) は正常プール血漿の α_2 PI 量を 100% として肝疾患 28 例のクエン酸ナトリウム加血漿について S-2251 法と SRID 法との相関を示したもので、 $r=0.91$ と高い相関が認められ、 $y=1.18x-18.6$ (x 軸: SRID 法) の回帰直線が得られた。それに対して線溶亢進状態例について同様に観察すると図 1-(b) のごとくとなった。(●) のプロットは Defibrase 0.8~1.6 BU/kg を正常者 4 例に 4 時間の点滴静注を行い、経時的に測定した α_2 PI 活性である。実線で示した本来の回帰直線と比較するとアミダーゼ活性の低値域の一部に若干はずれたプロット群が観察された。このプロット群は Defibrase 投与してから約 4~24 時間後の α_2 PI 活性である⁴⁾。ま

Fig. 1 Correlation between amidolytic activity of antiplasmin and immunologic activity of α_2 PI.

(a): Samples from patient with liver disease.

(b): Samples from patient with DIC syndrome (○) and from after single injection of defibrase to healthy (●).

(A)

(B)

Fig. 2 Cross immunoelectrophoresis patterns of α_2 PI

(A): Samples from patient after single injection of defibrase to phlebotrombotic disease.

(B): Samples from patient with DIC syndrome.

た(○)のプロットは DIC 6 症例の α_2 PI 活性であるが、本来の回帰直線上にはば分布されていた。

2. α_2 PI の交叉免疫電気泳動像

次に Defibrase を投与した深部静脈血栓症 2 例と DIC 6 症例について α_2 PI の交叉免疫電気泳動像を観察した。図 2-(A) は Defibrase 投与前、8 時間後または 4 時間後、24 時間後の泳動像を示した。8 時間後あるいは 4 時間後のものでは α_2 PI・プラスミンの複合体のピークが出現し、二峰性のパターンがみられた。しかし、

24 時間後では複合体のピークは消失するとともに α_2 PI の単一ピークの高さは投与前に比べ低値を示した。また、DIC 症例では図 2-(B) で示すように、全例ともに正常者の単一ピークの高さに比べ明らかに低く、 α_2 PI・プラスミン複合体は検出されなかった。

3. α_2 PI・プラスミン複合体の検出された血漿のカラムクロマトグラフィー

深部静脈血栓症 2 例の Defibrase 投与後、 α_2 PI・プラスミン複合体のみられた 4 時間後および 8 時間の血漿を等量混和し、1.0ml を

Fig. 3 Gel filtration of plasma after single injection of defibrase to phlebothrombotic disease.

Sephadex G-150 にてゲル濾過を行い、各分画について α_2 PI を S-2251 法および SRID 法で測定した (図 3)。両者ともに No. 24 にピークを持ち、活性値でも同様な値を示した。しかし、SRID 法では No. 19~21 にもう 1 つのピークと思われる肩がみられた。そこで次に No. 19~28 について α_2 PI の交叉免疫電気泳動を観察した。図 4 に示すように、No. 19 では α_2 PI・プラスミン複合体のみで α_2 PI の単一ピークはみられない。しかし、No. 21 では両方のピークが出現している。そして分画とともに α_2 PI・プラスミン複合体は消失し、 α_2 PI の単一ピークが表われた。すなわち No. 19~21 は α_2 PI・プ

ラスミン複体の分画であり、No. 24 前後は α_2 PI の分画であることが確認された。

III. 考察および結論

今回、線溶亢進状態例として Defibrase 投与例と DIC 症例について S-2251 法によるアミダーゼ活性と SRID 法による免疫学的活性としての α_2 PI 量を比較したところ、Defibrase 投与例についてのみに部分的に本来の回帰直線上からはずれるものがあり、SRID 法の方が S-2251 法より高値を示した。この原因は交叉免疫電気泳動像および血漿のゲル濾過した分画の観察から、Defibrase を投与した場合には α_2 PI・プラスミンの複合体が検出され、S-2251 法はフリーの α_2 PI のみを測定

しているが、SRID 法はフリーの α_2 PI と α_2 PI・プラスミン複体の両方を測定しているための差であることが確認された。

Defibrase を投与すると 4~8 時間で FDP が 1,000~2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と激しい線溶亢進状態がみられ、血漿中に α_2 PI・プラスミンの複合体が出現するが、24 時間後にはすでに複合体が消失してしまうことから、生体内で形成される α_2 PI・プラスミン複合体は比較的早く代謝されるものと考えられる。このことは DIC 症例で FDP が 80~320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 検出されたにもかかわらず α_2 PI・プラスミン複合体が観察されなかったことから理解できる。したがって、 α_2 PI の

Fig. 4 Cross immunoelectrophoresis patterns of α_2 PI fractions from gel filtration of plasma after single injection of defibrase to phlebothrombotic disease.

測定に際してはきわめて急激な線溶亢進状態が起り、 α_2 PI・プラスミン複合体が血漿中に存在する場合には免疫学活性はアミダーゼ活性に比べ見かけ上の高値を示すものと思われた。

文 献

- 1) Naito, K. and Aoki, N.: Assay of α_2 -plasmin inhibitor activity by mean of a plasmin specific tripeptide substrate. *Thromb. Res.*, **12**; 1147~1156, 1978.
- 2) Kato, M., Fujimaki, M., Fukutake, K., et

al.: Studies on nature of so-called anti-plasmin measured by chromogenic substrate S-2251 and its automatic determination with ABA 100. *VIIth International congress on thrombosis and haematosi*s, London, 1979.

- 3) 加藤正俊, 藤巻道男, 福武勝博: P-ニトロアニリン法によるアンチプラスミンおよびヘパリンの測定. *Biomedical J.*, **3**; 789~796, 1979.
- 4) 加藤正俊, 松原泰久, 藤巻道男, 他: 蛇毒の生体内投与による線溶系因子への影響. *血液と脈管*, **11**; 75~78, 1980.