胃腺性カリクレイン

〔I〕 力価測定法の基礎的検討

吉田 良子* 五十嵐紀子* 浅田 敏雄*
鈴木 陽一** 吉田 誠** 大塚 幸雄**

**Stomach kallikrein : 〔I〕 A method measuring the
glandular kallikrein activity**

Ryoko YOSHIDA*, Michiko IGARASHI*, Toshio ASADA*,
Youichi SUZUKI**, Makoto YOSHIDA** and Sachio OTSUKA**

Key words : glandular kallikrein, chromogenic substrate, esterolytic activity, naphthylester derivative, low molecular weight kininogen

Although various chromogenic substrates have been developed for determination of proteases, there are few reports on the determination of glandular kallikrein (GK) in tissues using chromogenic substrates.

The authors have determined GK of the rat stomach by measuring its esterolytic activity on Pro-Phe-Arg-NE (PPA-NE) which is one of the naphthylester derivatives.

The extracted rat stomach was kept frozen for one week ; then thawed, homogenized, and ultracentrifuged for sixty minutes at 105,000G.

The supernatant was used as specimens and examined for the existence of contaminative proteases. The results showed that their amounts were so small that their effects on determining the activity of GK were negligible.

The authors determined the esterolytic activity of the specimen on PPA-NE and also the amount of kallidin produced from low molecular weight kininogen acted by the specimen, and studied correlation between the values of two measurements. The correlation coefficient for these two variables was :

$$r=0.953 \quad [y=10.354x+0.051]$$

This high correlation implies that GK of the rat stomach can be estimated by its esterolytic activity on PPA-NE.

* 東邦大学医学部生化学〔〒143 東京都大田区大森西5-21-16〕, Department of Biochemistry, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

** 同 第一内科, Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

はじめに

近年、合成基質の開発が盛んになり、各種プロテアーゼについての研究が行われてきている。なかでも線溶・凝固系に大きな影響を持つ血漿カリクレイン (PK) 測定においては多く報告がなされているが組織中のカリクレイン測定については生理活性で検定する場合が多く合成基質を用いた報告は少ない。最近、蛋白研・藤井・内田ら¹⁾によりラット胃腺性カリクレイン (GK) が精製および同定されたことを機に胃の病態生理を明確化する手がかりとなるべく GK の測定を行った。現在 GK 測定用の特異基質としてブラジキニンのC末端構造を持つ Tripeptide 合成基質 Pro-Phe-Arg-MCA²⁾ 等があるが蛍光光度計を必要とする。われわれは新たに開発され同様の Peptide 構造を持ち比色定量が行える Naphthylester 誘導体³⁾の Pro-Phe-Arg-N E (PPA-NE) [Torii Co. Ltd.] を用いて GK 測定の検討を行った。また同時に生理活性も測定し相関を検索した。

I. 方 法

1) GK 測定法

測定原理は GK が PPA-NE のエステル部分を水解し α -Naphthol を遊離する。この遊離した α -Naphthol にジアゾ試薬の Fast Violet B 塩を作用させ Conc. 酢酸で沈殿を溶解し反応停止後 505nm で比色定量を行う⁴⁾。

2) 検液の作製

約 200g の雄 Donryu Rat の胃を摘出し生食でよく洗浄後、 -20°C にて1週間フリーズする。これは胃組織保存の経時的測定の検討によりインヒビターの影響も少なく一番安定した高い活性を得ることができるからである。凍結融解後、50mM Phosphate Buffer pH 7.0を用いて20倍希釈液作製し 800G, 10分遠心し、さらに 105,000G, 60分超遠心を行ってその上清を検液として用いた。

II. 結 果

1) 検液に混在する他種プロテアーゼの PPA-NE に対する影響

Fig. 1 Comparison of virtual values in sample and presumptive values of contaminative protease in blood which is calculated from the sample.

検液中には GK 以外に PPA-NE に対して感受性を有するプロテアーゼが存在すると思われる。とくに混入血液によるプロテアーゼが問題である。そこで混入血液量を測定するため、検液のヘモグロビン測定を行ったところ 1g 組織あたり約 0.013ml であった。この血液量より検液に混入する各プロテアーゼを計算するとおおよそ Thrombin (Th) ... 0.042NIH.U., Plasma kallikrein (PK) ... 0.0065 FU., Plasmin (PL) ... 0.00013mg, Factor Xa ... 0.0052 μ g, Urokinase ... 0.033I.U. となる。この計算量の各プロテアーゼの PPA-NE 水解活性を測定した。総計は検液の示す PPA-NE 水解活性値の 51.4% (Th 31.2+PK 19.9+PL 0.3%) と半量を占める割合となった (図 1)。このことが実際におこりうれば非常に問題となるので特に影響の大きいと思われる Th と PK について検索した。

2) 検液中における Th, PK の検索

検液中の Th, PK がどれほど活性化されていて測定に影響をおよぼすか検討した。Th, PK の既知量に十分量の Antithrombin III (AT-III)+Heparin(Hep), Soybean trypsin inhibitor (SBTI) を加えて PPA-NE で阻害をみたところ、図 2 上段のように Th は 14%, PK は 16% の残存活性を示した。インヒビター作用をみるのに PPA-NE 基質では不適当と考え Th, PK

Fig. 2 Effect of inhibitors on substrates

の特異基質である Tos-Gly-Pro-Arg-PNA, および Bz-Pro-Phe-Arg-PNA を用いて同様の測定を行った。既知量の Th, PK はインヒビターではほぼ完全に抑制された。次に検液の活性を調べたところ検液の Th 基質への活性はなく, また PK 基質に対しての活性は小さく PK 単位として 0.0016FU であり SBTI を添加すると消失した (図 2 下段)。この単位を PPA-NE 水解活性に換算すると検体 100% に対して 4.8% となり, 問題になる量ではない。

3) 検液における GK インヒビターの検討

検液における GK インヒビターの存在を調べるため精製豚カリクレインを検液に添加し, PPA-NE 水解活性の減少率を求めた。結果は平均 101.6% となりこの方法において検液中に GK インヒビターの影響はほとんどないものと

Fig. 3 Correlation of esterolytic activity on PPA-NE and kallidin value in rat stomach tissue.

* BAEE: Benzol arginine ethyl ester

思われる。

3) 検液の PPA-NE 水解活性とキニン遊離量との相関

長沢ら⁵⁾の方法により人 plasma より Low molecular weight kininogen (LMK) を精製し

これを基質としてマグヌス法⁶⁾を行いキニン遊離を測定した。未経産ラット子宮を摘出し合成 Bradykinin を作用させ検量線として用い PPA-NE 水解活性との相関を図3に示した。相関係数は $r = 0.953$ と良好な結果となった。

III. 考察および結語

新たに開発された合成基質 PPA-NE を用いた測定として今まで主に尿中カリクレイン⁷⁾ 用として検討されてきた。今回、われわれは PP A-NE を用いてラット胃腺性カリクレイン測定を試みた。検液中の他種プロテアーゼの混在、また GK インヒビターの存在を検索したがほとんど打消された。さらに腺性カリクレインの天然基質 LMK を用いて生理活性との相関が得られた。よってラット胃腺性カリクレインは合成基質 PPA-NE を用いて測定が可能と考えられる。

文 献

- 1) Uchida, K., Yokoshima, A., Niinobe, M., Kato, H. and Fujii, S.: Purification and properties of rat stomach kallikrein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **614**; 501, 1980.
- 2) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takeda, K., Kimura, T. and Sakakibara, S.: New fluorogenic substrate for α -thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J. Biochem.*, **82**; 1495~1498, 1977.
- 3) Niinobe, M., Hitomi, Y. and Fujii, S.: A sensitive colorimetric assay for various proteases using naphthyl ester derivatives as substrate. *J. Biochem.*, **87**; 779~783, 1980.
- 4) 杉山哲資, 沢井省三, 青山卓夫: 尿中 kallikrein の測定法. SP 懇談会記録集, p. 7~12, 1979.
- 5) Nagasawa, S. and Nakayasu, T.: Enzymatic and chemical cleavages of human kininogens, In "Chemistry and Biology of the Kallikrein-kinin System in Health and Disease". Fogarty International Center Proceedings, **27**; 139~144, 1977.
- 5) 守屋 寛: キニン系とその抑制薬. 医薬品開発基礎講座 V, 薬効の評価 (I), 薬理試験法 (下), 地人書館, 1975, p. 945.
- 7) Hitomi, Y., Niinobe, M. and Fujii, S.: A sensitive colorimetric assay for human urinary kallikrein. *Clinica Chimica Acta*, **100**; 275, 1980.

血液細胞の分化と増殖—基礎と臨床

編集 自治医科大学学長 中尾喜久 自治医科大学教授 高久史磨

専門医21氏分担執筆

A5判 251頁 図126 表47 定価4,800円(千200円)