血中の Urokinase 活性, 抗原量とその臨床的意義

林 滋* 山田 兼雄**

Urokinase activity and antigen in the blood and its clinical significance

Shigeru HAYASHI* and Kaneo YAMADA**

Key words: urokinase, UK activity in plasma, UK antigen in plasma, anti-UK serum, anti-UK sepharose

Although studies of UK have been developed, it is still uncertain as to the presence of UK in the circulating blood. In addition, the relation between UK antigen and its inhibitor was not fully examined. The present study was carried out to elucidate these problems.

Anti-UK serum used in this experiment was obtained from rabbit, immunized by low molecular weight UK and showed a single arc on Ouchterlony's immunodiffusion or immunoelectrophoresis. This anti-serum neutralized UK activity. The relationships between UK antigen, UK activity and α_2 PI antigen in the healthy adults or patients with thrombosis were examined. The correlation between UK antigen and UK activity was $r=0.36$ ($p<0.05$), UK activity and α_2 PI antigen was $r=-0.1$ ($p<0.05$), and UK antigen and α_2 PI antigen was $r=0.23$ ($p>0.05$).

In the experiment of gel filtration of UK and plasma on Sepharose 2B, UK activity was decreased and UK antigen was migrated more anode region on Laurell electrophoresis than UK only, when UK was incubated with plasma.

Normal plasma or plasma with thrombosis were eluted on anti-UK Sepharose column chromatography, electrophoresed on SDS polyacrylamide. Several protein bands were migrated on polyacrylamide gel. These results suggest the possibility that UK is present in the circulating blood, forming a complex with inhibitor. However, further investigation is required to resolve this possibility.

はじめに

血中の urokinase (以下 UK) 抗原量は, ラ

ジオイムノアッセイや Laurell 法により測定されているが¹⁾²⁾, 抗血清に問題が残されており, 広く認められていない. われわれは, 合成基質

* 荻窪病院内科 [〒167 東京都杉並区今川3-1-24], Internal Medicine, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

** 聖マリアンナ医科大学小児科, Department of Pediatrics, St. Marianna Medical University, Kanagawa, Japan.

を用いた血中 UK 活性測定法を確立し³⁾, UK 投与時, 非投与時の血中 UK を測定し, UK 非投与時に UK 活性を認めた. しかし, この UK 活性と考えられるものが, いわゆる腎由来の UK なのか, それとも, tissue activator や vascular activator なのか, 不明である. 今回われわれは, UK の抗原性の面からこの問題に組み, インヒビターとの係わりあいについても検討した.

I. 方法および対象

UK 活性: S-2444 を用いた方法³⁾. UK 抗原量: 純化した低分子 UK (MW 約3.3万) を, アジュバントとともにウサギに注射して, UK 抗血清を作製した. この抗血清をラテックスにつけて, ラテックス凝集法を開発し, これにより UK 抗原量を測定した. また, Laurell 法 (2.5% 抗血清, 120V, 10h 泳動) によっても UK 抗原量を測定した. α_2 -plasmin inhibitor (α_2 PI) 活性: S-2251 を用いた方法⁴⁾. α_2 PI 抗原量: 免疫拡散法. anti UK-Sephrose: UK 抗血清を硫酸塩析, DEAE Sephadex A-50 で精製し, IgG 分画を得て, Sepharose 4B にカップリングした. elution buffer は 0.17M グリシン塩酸バッファー (pH 2.3), 中和用バッファーは 0.5M 炭酸重炭酸バッファー (pH 9.0), starting buffer は 0.05 M Tris H_3PO_4 (pH 7.6) を用い, 使用前に elution buffer で十分洗滌し, 流す plasma は, starting buffer で十分透析した.

対象: 健康成人, 各種血栓性疾患, 腎疾患計 85 例を対象とし, UK 活性測定では, アプロチニン (最終濃度 50KIU/ml) を含んだ plasma を用いた.

II. 成績

1) UK 抗血清の性状 (図1) オクロニー法では, 単一な沈降線が形成され, 免疫電気泳動では, $\gamma \sim \beta_2$ 領域にかけて単一な沈降線が形成された. 中和試験でも, この抗血清は, UK の活性を中和した. また, α_1 AT, plasminogen, plasmin とは沈降線を形成しない.

2) UK 非投与時における健康成人, 各種血

Fig. 1 Ouchterlony's immunodiffusion and immunoelectrophoresis using anti-UK serum

栓性疾患, 腎疾患の患者の UK 活性, UK 抗原量, α_2 PI 抗原量の関係 (図2)

UK 抗原量と UK 活性の関係は, $r=0.36$ ($P<0.05$) で有意の相関を認めた. しかし個々の例では, 抗原が認められても活性が0であったり, 抗原が0でも活性が認められることもあった.

UK 活性と α_2 PI 抗原量の関係は, $r=-0.1$ ($P>0.05$) で, 逆相関ではあるが, 有意ではなかった. しかし全体として眺めると, α_2 PI が低値の時に, UK 活性は高目になっている. 個々の例でも, UK 活性高値の時, α_2 PI が低くなっていることが多かった.

UK 抗原量と α_2 PI 抗原量の関係は, $r=0.23$ ($P>0.05$) で, 有意の相関は認めなかった.

3) UK と plasma を反応させた際の活性と抗原性の変化 (図3)

UK (48,000IU) を Sepharose 2B でゲル濾過し, 各分画の活性, 抗原量 (Laurell 法) を測定したのが図3-aである. UK 抗原量は陰極側に泳動され, 同時に UK 活性も認められた.

UK (48,000IU) を plasma 1ml で溶解し, 同様に Sepharose 2B でゲル濾過すると, 図3-b のようになる. UK 抗原量は, 陰極側と陽極側に泳動され, UK 活性は, 最高0.8で

Fig. 2 Gel filtration profiles of UK or UK with plasma on Sepharose 2B

20%ほど低下していた。

4) anti UK-Sepharose を用いた血中 UK 抗原物質の検討

ラテックス凝集法および Laurell 法により UK 抗原の認められた plasma を, anti UK-Sepharose により溶出させ, SDS ゲル電気泳動, 免疫電気泳動で検討したところ, 分子量約 6 万のバンドを主に, 他に 4~5 本のバンドが認められた。

III. 考 察

今回作製した UK 抗血清は, 低分子 UK を抗原として作製したものであるが, 高分子 UK とも沈降線を形成し, 他の血清蛋白とは沈降線を形成せず, UK の特異的抗血清である。

Laurell 法, 免疫電気泳動法, ラテックス凝集法等の成績より, 血中に UK が存在していると考えられる。しかも, UK 抗原と UK 活性の関係より, 多くの症例で, UK 抗原と活性が同時に認められ, Shakespeare ら²⁾ がいうように, 必ずしも inactive な UK でなく, 活性を持った UK が血中に認められると考えられ

Fig. 3 Relationships between UK antigen and UK activity, UK antigen and α_2 PI, and UK activity and α_2 PI

る。しかし、この UK が tissue activator とは別で、腎由来のいわゆる UK それ自体であるかどうかは、さらに検討を要すると思われる。

また、ゲル濾過や、anti UK-Sepharose の成績より UK が inhibitor と complex を形成して血中に存在している可能性も強く示唆されるが、その場合、抗原性にも何らかの変化を受けていると考えられる。

文 献

- 1) 若山雄次: Urokinase の radioimmunoassay と血中 UK 動態. 血液と脈管, 7; 161~164,

1976.

- 2) Shakespeare, M. and Wolf, P.: The demonstration of urokinase antigen in whole blood. Thromb. Res., 14; 825~835, 1979.
- 3) 林 滋, 山田兼雄: 合成基質 S-2444 を用いた UK 活性測定法の検討及び UK 投与時の UK 活性について. 日血会誌, 43; 406, 1980.
- 4) Naito, K. and Aoki, N.: Assay of α_2 -plasmin inhibitor activity by means of a plasmin specific tripeptide substrate. Thromb. Res., 12; 1147~1156, 1978.

●わが国唯一の葉酸補酵素研究の完全な集大成!

葉 酸 — 基礎と臨床 —

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀
専門医18氏分担執筆

A 5 判 484頁 図172 表104 定価9,800円(千200円)

文部省科学総合研究「葉酸補酵素の臨床的応用に関する基礎的研究」の成果をふまえて、さらに最新の葉酸研究を包括して編集した。現時点までの文献をできるだけ集積し、ほぼ完全な集大成ができた。葉酸に関するすべての知識はこの一冊に網羅されている。臨床医のみならず、生化学、栄養学の基礎および応用に携わる方々の常備すべき一冊である。

●内容: 第1章 緒言, 第2章 わが国における葉酸研究の歴史, 第3章 葉酸の基礎, I.概説, II.葉酸の定量法, III.葉酸補酵素の形態, IV.葉酸の含量, V.葉酸補酵素の作用機序, VI.葉酸補酵素の酵素の生成と相互転換, 第4章 葉酸の臨床化学, I.生体内運命, II.食品の葉酸測定と摂取量, III.食品中の葉酸のavailability, IV.放射性同位元素を用いる葉酸測定法, V.正常血液葉酸値, 第5章 葉酸欠乏症, I.欠乏症, II.シロネズミの葉酸欠乏飼料の調製法とその応用, III.無菌動物の葉酸代謝—葉酸代謝に対する腸内細菌の関与面—, IV.核酸代謝からみた葉酸欠乏症, 第6章 葉酸の臨床, I.臨床応用とその展望, II.葉酸代謝異常症, III.わが国における葉酸欠乏症, IV.葉酸利用障害, V.再生不良性貧血における葉酸療法に対する一考察, VI.再生不良性貧血に対する葉酸の効果。