蛍光性合成基質による胎盤性ウロキナーゼ・ インヒビター活性の測定に関する試み

細野 幸多* 棚倉 正江* 布施 養慈*

Assay for urokinase-inhibitor in human placental tissue with fluorogenic substrate

Yukita HOSONO*, Masae TANAKURA* and Yoji FUSE*

Key words : placenta, urokinase inhibitor,
fluorogenic substrate, MCA

The activity of placental urokinase inhibitor (PUKI) was examined using a new fluorogenic substrate, Glutaryl-Gly-Arg-MCA, which is specific for urokinase. The rate of AMC release was determined by the increment of fluorescence from 5 to 10 min. after the incubation of the assay mixture. The activity of PUKI was determined indirectly by measurement of residual urokinase after incubation with the inhibitor separated from placental extract using Lysine-Sepharose.

The residual urokinase activity was observed to be much higher in the presence of more than 0.3 % albumin in the assay mixture, which was due to increased stability of urokinase. The residual urokinase activity was also quite labile at pH 7.5, but stable at pH 8.0. The relative fluorescence and residual urokinase activity was found to be linear in the range of 5-20 IU/ml (Fig. 1).

The usefulness of this method was evaluated by comparison with fibrin plate method. The correlation coefficient obtained from assays of 33 samples was 0.78 (Fig. 2).

目 的

胎盤組織中には PUKI (placental urokinase inhibitor) が大量に存在する¹⁾²⁾がその活性測定

法は fibrin plate 法³⁾が主流をなしている。最近開発された urokinase に特異性が高く、また測定が簡単で迅速な蛍光性ペプチド基質を用いた方法^{4,5)}で PUKI の活性測定を試みた。

* 帝京大学附属溝口病院産婦人科〔〒213 川崎市高津区溝口 74〕, Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Mizonokuchi, School of Medicine, Teikyo University, Kawasaki, Japan.

Fig. 1 Standard curve of residual urokinase activity.

I. 方 法

ヒト胎盤組織の抽出液を Lysine-Sepharose にて分画⁶⁾, 蛋白質研究奨励会より入手した蛍光発色合成基質 Glutaryl-Gly-Arg-MCA を用いて urokinase inhibitor 活性を測定した^{7,8)}. その方法は Albumin を含む Tris-HCl Buffer 中の一定量の UK (Mochida) と胎盤組織抽出分画液の UKI を一定時間反応させたのち, これを dimethyl sulfoxide を含む Tris-HCl Buffer に溶解された合成基質内に添加し, 残存する UK 活性を Glutaryl-Gly-Arg-MCA からの 7-amino-4-methyl coumarin (AMC) 遊離量で求めた. Protopath 蛍光光度計 (DADE) を用いて励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm における蛍光を初速度法により測定した.

II. 結 果

酵素反応のタイムコースは Lag や Burst 現象が微少であり, UK による AMC 遊離は数分後に一定となり, 検量線は直線を示し, 以後測定には基質内に反応液添加後 5 分より 10 分まで

の遊離量でもとめた. UK 活性は 0.1% の Albumin 存在下においては, 0.3% の Albumin 存在下より不安定で低かった. 0.3% と 0.5% の Albumin とでは有意差はみとめられなかった. 残余の UK 活性は pH 7.5 で不安定であったが, pH 8.0 で安定した. しかし反応に用いる UK 濃度 10 IU/ml の場合, pH 8.0 と pH 8.5 において安定性に有意差はみられなかった. UK 溶解液は pH 8.0 で 0.5% Albumin 存在下において, UK 濃度が 5 IU/ml, 10 IU/ml とともに 5 時間まで安定していた. 検量線作製には 20 人の無作為に選択された凍結融解処理の胎盤抽出分画液をプールしたものを使用した. また検体と反応させる UK 量は 10 IU/ml を使用した. これより胎盤組織 1 g 中の PUKI 活性は $(2.84 + 10 - X) \times 800$ で求められる. (2.84 はプール中の PUKI 活性量, X は被検体と UK 10 IU/ml の反応後の残存する UK 量で 800 は希釈倍数である.) その結果検量線は, $r = 0.99$ という良好な直線関係が得られた (図 1). 特に 2~3 IU/ml 以上の UK に対しては fibrin plate 法では dose response は乏しく, peptide

Fig. 2 Correlation of the PUKI assay using between MCA substrate and fibrin plate.

MCAの方が良好であった。再現性も非常に良かった。さらに従来、われわれが用いた fibrin plate 法により測定した PUKI 活性値とこの合成基質により測定した活性値と相関をみたが、 $n=33$ で $r=0.78$ と正の相関をみた (図2)。

III. 結 論

本法は測定が簡単で迅速であり、再現性も高かった。またプールされた胎盤組織拍出分画液一定量存在下での UK の希釈系列により非常に良好な直線の検量線が得られた。

文 献

- 1) Uszynski, M., Uszynska-Folejewska, R.: Plasminogen activator and urokinase inhibitor in myometrium, placenta, and amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **7**; 1041~1043, 1969.
- 2) Åstedt, B., Holmberg, L., Lecarder, I.: An inhibitor from placenta specifically binds urokinase and inhibits plasminogen activator released from ovarian carcinoma in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **544**; 128~137, 1978.
- 3) 川野武彦: ヒト胎盤のウロキナーゼ阻害因子に関する研究. 十全医会誌, **81**; 269~285, 1972.
- 4) 鈴木宏治, 西岡淳治二, 橋本仙一郎: 2種の蛍光性基質に対する UK ならびに SK 活性化プラスミンの反応性の差異. 日血会誌, **44**; 690~698, 1981.
- 5) Zimmerman, M., Ashe, B., Yurewicz, E.C., and Patel, G.: Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. *Anal. Biochem.*, **70**; 258~262, 1977.
- 6) 五十嵐紀子, 他: アフィニティクロマトグラフィーを用いる線溶能の検査. 臨床検査, **17**; 713~722, 1973.
- 7) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T., and Sakakibara, S.: New fluorogenic Substrates for α -thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J. Biochem.*, **82**; 1495~1498, 1977.
- 8) 鈴木宏治, 西岡淳二, 橋本仙一郎: 蛍光性ペプチド基質を用いた尿中ウロキナーゼの測定. 臨床病理, **27**(3); 218~222, 1979.