精製 Tissue type plasminogen activator の遠心方式 全自動測定化への試み

水田 正* 今井 千佳*

Assay of purified tissue type plasminogen activator with a flexible centrifugal auto-analyzer system

Tadashi MIZUTA* and Chika IMAI**

Key words: tissue type plasminogen activator, centrifugal auto-analyzer COBAS FARA, chromogenic substrate, rate assay, fibrinolytic activity

Automated assay method for purified tissue type plasminogen activator (tPA) was established which used a flexible centrifugal auto-analyzer COBAS FARA (F. Hoffmann-La Roche & CO.) and a chromogenic substrate S-2288. A release of the product, p-nitroaniline was continuously monitored by the absorbance at 405 nm and the data obtained were analyzed by a computer-aided processor. When compared with the conventional assay methods reported, this method has several advantages. The time required for the measuring and data-analysis is very short (10 min). The sensitivity is high; a small quantity of sample can be measured (10 μ l) with less amount of the expensive substrate, S-2288 (26 μ M).

はじめに

組織性 plasminogen activator (以下 tPA と略) は fibrin 結合してはじめてその plasminogen を plasmin に変換する作用をもつことから、血栓溶解剤として使用した場合、全身線溶状態を惹起することが少なく、優れた血栓症治療剤となり得ると期待されている。tPA 活性を測定

するためには、plasminogen 存在下での fibrin 溶解能を見る fibrin clot lysis time 法¹⁾, fibrin-overlay 法²⁻⁶⁾, ¹²⁵I-fibrin 法⁷⁾, fluorescein fibrin 法⁸⁾, 特異的モノクローナル抗体との結合能を見る RIA 法⁹⁾, EIA 法¹⁰⁾, およびアミド分解能を測定する¹¹⁻¹⁵⁾, などの諸方法がある。

われわれは種々の細胞の培養液中の tPA 並

* 明治乳業ヘルスサイエンス研究所薬理学〔〒250 神奈川県小田原市成田 540〕, Division of Pharmacology, Meiji Institute of Health Science, Odawara, Japan.

Fig. 1 Dose-response curve of tPA with chromogenic substrate, S-2288. 10 μ l of purified tPA, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 1283 IU/ml (final concentration 0.06-67.53 IU/ml) were incubated with 50 μ l of S-2288, 1.39, 0.56, 0.28, 0.14, 0.06 mg/ml (final concentration 633, 255, 128, 64, 26 μ M) and rate assay (Δ mE) at 1 min were measured. The inserted figures represent the final concentration (μ M) of S-2288.

Fig. 2 Dose-response curve of tPA with chromogenic substrate, S-2444. 10 μ l of purified tPA, 4, 8, 16, 32, 64 IU/ml (final concentration 0.21-3.38 IU/ml) were incubated with 50 μ l of S-2444, 1.39, 0.56, 0.28, 0.14 mg/ml (final concentration 733, 295, 148, 74 μ M) and rate assay (Δ mE) at 1 min were measured. The inserted figures represent the final concentration (μ M) of S-2444.

びに精製した tPA の活性等を極少量の検体と低濃度の基質で、かつ多数の検体を短時間のうちに測定することが必要となった。今回は tPA および urokinase (UK) に特異的といわれている S-2288 および S-2444 を基質として遠心方式全自動分析装置(ロシュ社, COBAS FARA)を用いて、ヒト細胞由来精製 tPA 活性の測定が可能であるか、さらにその測定法の妥当性について検討した。

I. 実験方法

1) ヒト細胞由来 tPA の精製；関口ら¹⁶⁾によってセルライン化された小児頸部原発横紋筋肉腫 KYM-I のうち変異浮遊化セルライン KYM-1 (IFO 登録番号；50085)を浮遊搅拌培養した。培養液中の tPA の分離は Miyahara ら¹⁷⁾が開発した tPA モノクローナル抗体アフィニティー、クロマトグラフィーを用いて行な

い、Rijken ら¹⁸⁾の一般的方法に準じてセファクリール S-200 (Pharmacia 社)のゲル透過にて精製した。得られた精製 tPA は 10 mM PBS, 0.3 M NaCl, 0.01 M Tween 80 (pH 6.5) の溶液に溶解し -80°C で貯蔵後、用時調整して用いた。

2) 線溶活性の測定；精製された tPA の線溶活性は西崎ら¹⁹⁾の fibrin clot lysis time 法に準じて測定した。すなわち、 4°C 条件下で径 12 mm のガラス試験管内に 0.6 ml の buffer 液 (50 mM PBS, 0.1 M NaCl, 0.25% gelatin, 0.01% Tween 80, pH 7.75) 並びに検体 0.1 ml を入れ、human fibrinogen 1.2 mg, human plasminogen 15 μ g, human thrombin 2 IU を添加搅拌後、直ちに 37°C water bath 中に移した。次に径 3.3 mm のナイロン球 1 個を固まっ

Fig. 3 Reaction curve of tPA with chromogenic substrate, S-2288. 30 μ l of purified tPA, 32, 64, 128 IU/ml (final concentration 1.75, 3.5, 7 IU/ml) were incubated with 50 μ l of S-2288, 0.14 mg/ml (final concentration 68 μ M) and the absorbances at intervals of 4 min were measured. The inserted figures represent the final concentration (IU/ml) of purified tPA.

た fibrin clot 上に落とし, thrombin 添加時からナイロン球が試験管の底に着いて, 動かなくなるまでの時間を測定した. 得られた時間はあらかじめ求めておいた国立衛生試験所標準品 UK¹⁹⁾の標準曲線から UK・IU 単位に換算した. さらに, 検体は Lowry 法にてタンパク濃度を求め比活性値を算出した. 本実験に用いた精製 tPA の比活性値は 47,695 IU/mg であった. なお各測定は 1 検体につき 3 回行ないその平均値を求めた.

3) 自動分析装置による測定; 37°C の遠心キュベットに assay buffer 液 90 μ l と検体 10 μ l を試薬ニードルおよびサンプルニードルから同時注入し, 60 秒間, 1000 rpm で遠心混合後, サンプルニードルから基質 (S-2288 または S-2444) 50 μ l を注入し 1000 rpm で遠心混合した. 基質から遊離した p-nitroaniline (黄発色) は, 遠心中に波長 405 nm で測光した. 測光は基質注入 2 秒前に検体ブランクとして 1 回, 5 秒後に試薬ブランクとして 1 回, さらに 10 秒後から

30 秒間隔で 10 分間 21 回行なった. 各時点での測光は 5 回行ないその平均値を表示した. rate assay は反応開始 10 秒後から 10 分までの吸光度が直線的に増加する部分での平均 Δ mE/min を, endpoint assay は任意の時間における吸光度と反応開始 10 秒後の吸光度との差から mE を求めた. unit 値は国立衛生試験所 UK 標準品あるいはヒト melanoma tPA 一本鎖および二本鎖標準品 (WHO 標準) を標準として用い求めた. なお各測定値は 1 検体につき 3 回測定しその平均値で示した.

4) 用手法による測定; assay buffer 液 70 μ l と検体 30 μ l 並びに S-2288 溶液 50 μ l (最終濃度 633 μ M) をエッペンドルフチューブに入れ攪拌後, 37°C water bath 内で 90 分間 incubation を行なった. 次に 14% 酢酸溶液 200 μ l を加えて反応を停止し, 吸光度計にて波長 405 nm で測定し endpoint assay を行なった. 各測定は 1 検体につき 3 回行ないその平均値を求めた.

Fig. 4 Dose-response curve of tPA and UK with chromogenic substrate, S-2288 and S-2444. Purified tPA (final concentration 0.21–6.75 IU/ml) and UK (final concentration 0.26–2.6 IU/ml) incubated with S-2288 (final concentration 633 μ M) and S-2444 (final concentration 733 μ M).

5) 材料および試薬；

fibrinogen；SIGMA 社

plasminogen；ミドリ十字社

thrombin；持田製薬社

UK；持田製薬社製ウロナーゼ 6000 IU

UK 標準品¹⁹⁾；国立衛生試験所標準品, Control 821, (120, 260 IU/mg)

一本鎖および二本鎖 tPA 標準品；American Diagnostica 社製ヒト melanoma 由来 tPA (一本鎖；500,000 IU/mg, 二本鎖；520,000 IU/mg, WHO 標準 Lot 83/512, NIBSC, Holly Hill, London)

S-2288 および S-2444；Kabi 社

assay buffer；50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween-80 (pH 8.8)

II. 結 果

1) 基質 S-2288, S-2444 の比較検討；S-

Fig. 5 Dose-response curve of single-chain tPA and two-chain tPA with chromogenic substrate, S-2288 and S-2444. Single, two-chain human melanoma purified tPA (final concentration 5.26, 13.15, 26.3 TPA·IU/ml as compared to a WHO reference standard Lot 83/512 NIBSC) and purified tPA (final concentration 3.6, 7.1, 14.2 TPA·IU/ml) incubated with S-2288 (final concentration 633 μ M) and S-2444 (final concentration 733 μ M).

2288 および S-2444 の濃度を変化させ 0.06～67.53 IU/ml の tPA の rate assay を行なった。結果は図 1, 2 に示されているように、S-2288 では最低 0.1 mE/min 以上から直線関係を示し基質の低濃度化に伴ない直線は右にシフトした。S-2444 でも同様の結果が得られたが、S-2288 に比べて反応速度の低下という相違がみられた。これらの結果から S-2288 基質が 26 μ M の低濃度では tPA の約 1 IU/ml まで、また 633 μ M の高濃度では約 0.1 IU/ml まで測定可能であることが示された。tPA の基質に対する親和性は Lineweaver-Burk plot から S-2288 の K_m 値は 3.6×10^{-4} M, また S-2444 では 2.9×10^{-3} M で、S-2288 の方が S-2444 に比べて約 8 倍の高親和性が認められた。これらの結果から、rate assay を行なうにあたり S-

Fig. 6 Correlation diagram of purified tPA amidolytic activity measured with the centrifugal auto-analyzer "COBAS FARA" and the manual method, giving the equation $y = 1.04x - 0.02$ and $r = 0.9957$ ($n = 38$). Manual method; 30 μl of purified tPA (2-128.3 IU/ml) were diluted with 70 μl of assay buffer and were incubated with 50 μl of S-2288, 2.78 mg/ml (final concentration 692 μM) at 37°C for 90 min, after which the reaction was stopped with 200 μl of 14% acetic acid and all absorbances were measured at 405 nm with the spectrophotometer "KONT-RON". COBAS FARA method; 10 μl of purified tPA (2-128.3 IU/ml) were diluted with 90 μl of assay buffer and were incubated with 50 μl of S-2288, 0.14 mg/ml (final concentration 64 μM) at 37°C for 10 min and rate assay at 30 sec were measured.

2288 基質量の最少限選定は K_m 値の 1/4 以下となる 26~64 μM とした。

2) incubation time; 基質 S-2288 と各濃度の tPA を反応させ時間経過的に測定した結果 (図 3), tPA の 1.75, 3.5 IU/ml では 100 分まで, 7 IU/ml では 60 分まで時間経過に伴って直線的な増加を示した。この結果より吸光度の直線的補償は E で 0~2.5 までとした。一方 rate assay を行なった結果 tPA の 3.5 IU/ml までは incubation time 0~100 min (20 mE/min) と 0~10 min (19 mE/min) との間に有意の差が認められなかった。7 IU/ml でも

0~60 min (40 mE/min) と 0~10 min (38 mE/min) との間に有意の差が認められなかったことから, incubation time は 10 分とした。また 10 分以内では反応は確実に直線的に進行することから, rate assay と同様に endpoint assay でも満足すべき結果が得られることが認められた。

3) tPA と UK の比較; 図 4 に示すように, S-2288, S-2444 を基質として用い rate assay を行なうと tPA および UK おおの 6.75 IU/ml, 2.60 IU/ml までは直線的な用量反応曲線が得られた。tPA については S-2288 では UK

Fig. 7 Comparison of purified tPA activity analysed with the present chromogenic substrate method (which tPA, 4-128.3 IU/ml were incubated with S-2288, final concentration 64 μ M) and a fibrin clot lysis method, giving the equation $y=1.02x-0.22$ and $r=0.9985$ ($n=51$).

に比して反応速度 (Δ mE/min) は約 2.7 倍, S-2444 では約 1.4 倍という値が得られた。UK については S-2288 に比べ S-2444 の方が高い反応速度値を示した。これらのことから S-2288 は tPA に, S-2444 は UK の測定に適した基質であることが示された。一方, tPA の線溶活性を fibrin clot lysis time 法を用いて二本鎖 tPA 標準品と国立衛生試験所 UK 標準品との両者をスタンダードとして求めたところ, tPA・IU 1 単位は UK・IU 8 単位に相当した。なお本実験では tPA の活性と UK の活性との効力比較を容易にするために, tPA の測定 unit 値は UK・IU 単位で統一した。

4) 一本鎖および二本鎖 tPA の比較; WHO 標準品 tPA スタンダードによる一本鎖 tPA と二本鎖 tPA 活性を S-2288 並びに S-2444 を用いて rate assay によって測定した。図 5 に示されたように S-2288 では二本鎖 tPA は一本鎖 tPA に比して反応速度 (Δ mE/min) は約 6

倍の高値を示した。一方 S-2444 では二本鎖 tPA と一本鎖 tPA とでは約 16 倍の差が認められた。さらに KYM-1 培養液より得られた精製 tPA を同様に測定した結果, S-2288 および S-2444 とともに二本鎖 tPA とほぼ一致した反応曲線を示した。

5) 用手法との比較; 任意の濃度に調整した精製 tPA を用いて COBAS FARA と常法の用手法から求めた unit 値の相関性を求めた。その結果 (図 6), COBAS FARA と用手法で測定した unit 値の間では相関係数 $r=0.9957$ が求められ有意な ($p<0.001$) 相関が認められた。

6) fibrin clot lysis time 法との比較; 任意の濃度の精製 tPA を用いて fibrin clot lysis time 法と COBAS FARA から求めた unit 値の間の相関性を求めた。その結果 (図 7), 明らかな直線線が認められ, 相関係数 $r=0.9985$ が求められ有意な ($p<0.001$) 相関を示した。

III. 考 察

基質 S-2288 と S-2444 の比較検討を行なうと tPA の基質に対する親和性 (Km 値) は S-2288 の方が S-2444 より約 8 倍高いことが認められ、また UK との比較では S-2288 の方が S-2444 より反応速度値が高く、反対に UK は S-2444 の方が高いということから S-2288 は tPA に、S-2444 は UK の測定に適していると考えられる。このように両基質は多少の特異性が認められたが、しかしながら両基質ともに tPA と UK の交差反応を示すので完全な測定法としては問題を残しそうである。

本実験で COBAS FARA による測定結果と用手法による測定結果が有意な相関性を認めたことから、COBAS FARA の使用によって 10 分という短時間の incubation time (用手法の場合 90 分) のうちに、10 μ l の少量検体 (用手法の場合 30 μ l) および 26 μ M の低基質濃度 (用手法の場合 633 μ M) であっても tPA の酵素活性は十分測定可能であり、自動分析化できることが明らかとなった。

Rijken ら²⁰⁾の報告によれば、一本鎖 tPA と二本鎖 tPA については plasminogen 活性化能あるいは fibrin 吸着能では差がなく血栓溶解能は同じであるが合成基質のアミド分解能では二本鎖 tPA が高い活性を示すとされているが、本測定法においても二本鎖 tPA の方が一本鎖 tPA に比して約 6 倍高い反応速度を示し同様の結果を得ることができた。一方 KYM-1 由来精製 tPA の反応速度曲線パターンが S-2288 および S-2444 とともに二本鎖 tPA のパターンとはほぼ一致したことから、すでに fibrin-overlay 法によって確認されている結果²¹⁾も加味して本測定法によっても本標品が二本鎖 tPA であることが明らかとなった。

通常 tPA の線溶活性は合成基質のアミド分解能と必ずしもパラレルではない。しかしながら本実験に用いた精製 tPA については fibrin clot lysis time 法で求めた線溶活性値と COBAS FARA で求めた酵素活性値との間に高い相関性を認めた。このことは本測定法によって精製 tPA の線溶活性が測定できることを示し

ている。

結 語

ヒト肉腫細胞 KYM-1 由来精製 tPA と chromogenic substrate S-2288 並びに S-2444 との反応を万能型遠心方式全自動分析装置 (ロシュ社, COBAS FARA) を用いて rate assay, endpoint assay の両面より検討した。その結果 COBAS FARA の高感度性により短時間 (10 分) のうちに極少量 (10 μ l) の検体と低濃度の S-2288 基質 (26 μ M) で tPA の線溶活性を rate assay, endpoint assay の両面より測定でき自動分析化が可能となった。

終りに、データの細部に亘って助言を頂いた A. H.S./Japan 株式会社; 角田滋雄氏並びにご校閲頂いた明治乳業ヘルスサイエンス研究所生化学室長; 大橋彰博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 西崎笹夫, 川村次良: ウロキナーゼ製剤の力価測定について. 医薬品研究, **5**(3); 295~308, 1974.
- 2) Astrup, T. and Stage, A.: Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue, *Nature*, **170**; 929~930, 1952.
- 3) Sandberg, H.: Fibrinolytic activity of human tissues from adult and infant cadavers. *J. Lab. and Clin. Med.*, **26**; 571~579, 1968.
- 4) 甲賀 新, 金森利至, 川井法子: プラスミノゲン組織アクチベータ測定法. 臨床病理, **24**(4); 321~324, 1975.
- 5) Haverkate, F. and Brakman, P.: Fibrin plate assay, "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombosis" Vol. 1 (ed. by Davidson J.F. et al.), Paven Press, New York, 1957, p. 151~159.
- 6) Millar, W.T. and Smith, J.F.B.: The comparison of solid phase and fibrin plate methods for the measurement of plasminogen activators. *Thrombosis Res.*, **30**; 431~439, 1983.
- 7) Unkeless, J.C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J.P., Rifkin, D.B. and Reich, E.: An enzymatic function associated with transformed fibroblasts by oncogenic viruses. *J. Exp.*

- Med., **137**; 85~111, 1983.
- 8) Smith, D.S., Harmon, J. and Owen, W.G.: A sensitive and specific assay for plasminogen activators. *Thromb. Res.*, **37**; 533~541, 1985.
 - 9) Urden, G. and Blomback, M.: Determination of tissue plasminogen activator in plasma samples by means of a radioimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **44**; 495~502, 1984.
 - 10) Rijken, D.C., Van Hinsbergh, V.W.M. and Sens, E.H.C.: Quantitation of tissue-type plasminogen activator in human endothelial cell cultures by use of an enzyme immunoassay. *Thromb. Res.*, **33**; 145~153, 1984.
 - 11) 浅井紀一: 合成基質による検査法. 臨床検査, **24**(11); 1394~1402, 1980.
 - 12) Sumi, H., Kosugi, T., Matsuo, O. and Mihara, H.: Physicochemical properties of highly purified kidney cultured plasminogen activator. *Acta Haematol. Jpn.*, **45**; 119~128, 1982.
 - 13) Gilboa, N., Eraman, J. and Urizar, R.E.: Quantitative spectrophotometric assay of renal tissue plasminogen activator. *Kidney Int.*, **22**; 80~83, 1982.
 - 14) Zaoui, D., Fevre, B.L., Magdelenat, H. and Bieth, J.G.: A simple spectrophotometric assay of plasminogen activator: comparison with the fibrinolytic method. *Clin. Chim. Acta*, **141**; 101~109, 1984.
 - 15) Gyzander, F., Eriksson, E. and Teger-Nilsson, A.C.: A sensitive assay for tissue plasminogen activator activity in plasma, using adsorption on lysine-sepharose. *Thromb. Res.*, **35**; 547~558, 1984.
 - 16) 関口守正, 江里口正純, 藤井源七郎: 小児横紋筋肉腫由来培養細胞株の樹立とその性状. 第37回日本ガン学会要旨集, 1978.
 - 17) Miyahara, M., Nakamura, H. and Hamaguchi, Y.: Colcemid treatment of myeloma prior to cell fusion increases the yield of hybridomas between myeloma and splenocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**; 903~908, 1984.
 - 18) Rijken, D.C. and Collen, D.: Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **256**; 7035~7041, 1981.
 - 19) 川村次良, 福田秀男, 谷本 剛, 木村俊夫: 国立衛生試験所ウロキナーゼ標準品 (Control 821), 衛生試験所報告, **101**; 125~127, 1983.
 - 20) Rijken, D.C., Hoylaerts, M. and Collen, D.: Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, **257**; 2920~2925, 1982.
 - 21) 浜口好孝, 三上敦人: 未発表

●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(〒300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