Enzyme immunoassay による t-PA の 高感度測定法について

綿引 洋一* 鎮目 研吾** 吉田 正也***
高田由美子*** 高田 明和***

Characterization of Various Antibodies Against Tissue Plasminogen Activator using Highly Sensitive Immunoassay

Yoichi WATAHIKI*, Kengo SHIZUME**, Masaya YOSHIDA***,
Yumiko TAKADA*** and Akikazu TAKADA***

Key words: plasminogen, tissue plasminogen
activator, enzyme immunoassay

Polyclonal and monoclonal anti-tissue plasminogen activator (t-PA) antibodies were characterized by using enzyme immunoassay (EIA) in which β -D-galactosidase was coupled to anti-t-PA antibody (Fab'). 2:2 B10 and 1:3 G5 antibodies, specific for both one-chain and two-chain t-PA, strongly bound with one-chain t-PA purified from cultured melanoma cell lines, but 1:3 C5 antibody bound weakly with such t-PA. When polyclonal t-PA antibody was used as the first reaction antibody immobilized on silicone pieces, anti-t-PA polyclonal antibody mainly reacted with 2:2 B10 or 1:3 C5 antigenic determinant. When t-PA levels in the plasma were determined, the presence of EDTA enhanced the sensitivity of t-PA determination by the present EIA technic. 2:2 B10 monoclonal antibody detected a part of t-PA molecules in the plasma that polyclonal antibody detected. T-PA was mainly detected in the endothelial cells, but not in the muscular layer of inferior mesenteric artery when immunochemical technic was used where polyclonal t-PA antibody was applied.

---

* 浜松医科大学第二外科 [〒431-31 浜松市半田町 3100], Department of Surgery, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

** 同 脳神経外科, Department Neuro-surgery, Hamamatsu University of Medicine, Hamamatsu, Japan.

*** 同 第二生理, Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

はじめに

Tissue plasminogen activator (t-PA) は、Urokinase に比べ、fibrin との親和性が強く、しかも、fibrin 存在下で plasmin 活性を促進するため、血栓症の治療に有用であるとの報告も多い¹⁾。このため、種々の t-PA 測定法が報告されている²⁻⁵⁾。今回、われわれは高感度の Enzyme immunoassay (EIA) による t-PA 測定法を開発したので報告する。

I. 方 法

EIA の一次抗体には、t-PA に対する monoclonal 抗体を用いた。monoclonal 抗体及び純化 t-PA は、Dr. P. Wallen (University of Umea, Umea, Sweden) から恵贈された。2:2 B10 と 1:3 G5 は、一本鎖と二本鎖の t-PA に反応し、1:3 C5 は、一本鎖のみに反応する。monoclonal 抗体の作成は、Kearny ら⁶⁾、Köhler ら⁷⁾ の方法によった。t-PA は、melanoma の細胞培養液から純化されたもので、一本鎖のものが95%以上であり、比活性は、218000 IU/mg である。

二次抗体には、純化 t-PA を家兎に免疫して得た polyclonal 抗体を、酵素には、 β -Galactosidase (β -Gal)⁸⁻¹⁰⁾、または、Horse radish peroxidase (HRP) を用いた。

II. 結 果

t-PA の検量線をみると(図1)、酵素として β -Gal を用いた方が感度が良く、0.05 ng/ml 程度まで測定可能であった。また、一次抗体に用いた monoclonal 抗体 (1:3 C5, 1:3 G5, 2:2 B10) を比較すると、1:3 G5, 2:2 B10の方が感度が良好であった。一方、一次抗体として polyclonal 抗体を用いると感度が低下した。

血漿の t-PA 測定時の EDTA の影響をみるため、血漿に種々の濃度の t-PA を加え、その値を測定した(図2-A)。EDTA の存在しない際には、実際の値より低く算出されるが、EDTA を加えると、ほぼ正確な値が得られた。EDTA の効果について

は、Rijken ら¹¹⁾によっても同様の報告がなされているが、作用機序は不明である。一方、heart extract では、EDTA の影響はなかった(図2-B)。

以上から、一次抗体に 2:2 B10, 二次抗体に polyclonal 抗体、酵素に β -Gal を用い、EDTA を加えて健康成人の血漿中の t-PA 値を測定すると、 5.74 ± 0.22 ng/ml であった。

polyclonal 抗体を用い、酵素抗体間接法により、人の末梢動脈 (IMA) における t-PA の局在を調べたが、t-PA は、血管内皮にのみ認め、筋層内には認めなかった。

III. 結 論

高感度 EIA による t-PA の定量法について報告した。EIA の一次抗体として 2:2 B10, 二

Fig. 1: Standard curves obtained from Enzyme immunoassay using β -Galactosidase and Horse radish peroxidase.

Fig. 1 shows standard curves of the determination of purified t-PA using anti-polyclonal t-PA antibodies coupled with β -Galactosidase or Horse radish peroxidase. Gradual increase in fluorescence intensity between 0.01 and 0.1 ng/ml was also observed. On the other hand, use of Horse radish peroxidase resulted in little change in the optical density at 492 nm even up to 1 ng/ml. These results show that use of β -Galactosidase gives more sensitive assays for the determination of t-PA than use of Horse radish peroxidase does.

Fig. 2-A: Plasma

Fig. 2-B: Heart extract

Effects of EDTA on the sensitivity of Enzyme immunoassay

Human plasma or heart extract was added with various amounts of t-PA. Plasma or heart extract was then added with 5 mM EDTA, and the calibration curves of t-PA in the plasma or heart extract were obtained in the presence or the absence of EDTA.

Fig. 2-A shows that the calibration curve of pure t-PA was similar to t-PA added to the plasma in the presence of EDTA, but in its absence the calibration curve was lower. On the other hand the presence or absence of EDTA did not influence the calibration curve of t-PA in the heart extract (2-B).

次抗体として polyclonal 抗体, 酵素として, β -Gal を用いるのが最も感度が良好であり, 血中の t-PA 測定に充分と思われた。

文 献

- 1) Korniger, C., Matsuo, O., Suy, R., Stassen, J.M. and Collen, D.: Thrombolysis with human extrinsic (tissue type) plasminogen activator in dogs with femoral thrombosis. *J. Clin. Invest.*, **69**; 573~580, 1982.
- 2) Ranby, M., Norrman, B. and Wallen, P.: A sensitive assay for tissue plasminogen activator. *Thrombos. Res.*, **27**; 743~749, 1982.
- 3) Rijken, D.C., Juhan-Vague, I., DE Cock, F. and Collen, D.: Measurement of human tissue-type plasminogen activator by a two site immunoradiometric assay. *J. Lab. Clin. Med.*, **101**; 274~278,
- 4) Wiman, B., Mellbring, G. and Ranby, M.: Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. *Clin. Chem. Acta*, **127**; 279~288, 1983.
- 5) Bergsdorf, N., Nilsson, T. and Wallen, P.: An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. *Thromb. Haemost.*, **50**; 740~744, 1983.
- 6) Kearny, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. and Rajewsky, K.: A new mouse melanoma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.*, **123**; 1548~1550, 1979.
- 7) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond.)*, **256**; 495~497, 1975.
- 8) Kato, K., Hamaguchi, Y., Fukui, H. and Ishikawa, E.: Novel method for synthesis of the insulin β -D galactosidase

- conjugate and its applicability for insulin assay.
- 9) Takada, Y., Shirahama, S. and Takada, A.: Enzyme immunoassay of C1q and its application to the detection of C1q antigens in urine. J. Clin. Lab. Immunol., **16**; 169~172, 1985.
  - 10) Urano, T., Takada, Y. and Takada, A.: The enhanced activation of Glu-plasminogen by urokinase in the presence of fibrin or des A fibrin as measured by the release of B peptide and FDP. Thromb. Res., **36**; 429~435, 1984.
  - 11) Rijken, D.C., Wijngaards, G. and Welbergen, J.: Relationship between tissue plasminogen activator and the activators in blood and vascular wall. Thromb. Res., **18**; 815~830, 1980.

●わが国唯一のビタミンB₁₂研究の完全な集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5判 367頁 図157 表73 定価7,800円(〒300円)

ビタミンB₁₂は最も新しく発見されたものであるが、その構造の特異性や作用の独自性から、その研究の進歩は著しいものがある。最近では、その同族体の臨床応用が広がってきたものの、生化学、酵素学などの基盤にたった合理的な使用法はまだほど遠い所にある。本書はわが国でのB₁₂研究を現時点で集大成し、関係各方面の研究者に便ならしめた。

●内容: 第1章 ビタミンB₁₂研究の進歩と問題点, 第2章 ビタミンB₁₂の吸収, 第3章 ビタミンB₁₂の腸管吸収機構, 第4章 Whole body counterのビタミンB₁₂吸収試験ならびにB₁₂代謝への応用, 第5章 悪性貧血と胃の自己免疫, 第6章 悪性貧血の成因に関する自己免疫的考察, 第7章 ビタミンB₁₂の生体内転換利用, 第8章 ビタミンB₁₂結合蛋白, 第9章 Acid-resistant binding capacity と “granulocyte related” binding proteinについて, 第10章 トランスコバラミンII欠乏症, 第11章 ビタミンB₁₂のradioassay, 第12章 ビタミンB₁₂と葉酸代謝, 第13章 ビタミンB₁₂と中毒, 第14章 巨赤芽球性貧血, 第15章 尿中メチルマロン酸排泄とビタミンB₁₂代謝, 第16章 高ビタミンB₁₂血症, 第17章 ビタミンB₁₂代謝と神経系, 第18章 ビタミンB₁₂と神経疾患。