血漿中の Glu-プラスミノゲン, Lys-プラスミノ
ゲンの高性能アフィニティクロマトグラフィー
による直接的分析

伊藤 尚史* 野口 康二* 風間 睦美** 笠井 猷一***

Direct analysis of Glu-plasminogen and Lys-plasminogen in
human plasma with high-performance affinity chromatography

Naofumi ITO*, Kohji NOGUCHI*,
Mutsuyoshi KAZAMA** and Ken-ichi KASAI*

Key words: high-performance affinity chromatography, Asahipak,
plasminogen, on-line activation, specific detection

Glu-plasminogen (Glu-Plg) and Lys-Plg were specifically separated with high-performance affinity chromatography, but it was almost impossible to analyze them in human plasma in a short time because of the existence of a large amount of other components. This problem was solved by introducing specific detection system. Plasminogens were specifically detected by plasmin activity which was produced by the on-line activation using urokinase. A small amount of human plasma (40 μ l) without pretreatment could be directly applied to the column packed with an adsorbent coupled with *p*-aminobenzamidine (Asahipak GS520-AHA-ABA; Asahi Chemical Industry Co.). The existence of Lys-Plg was observed in most plasmas. When urokinase was added to the normal plasma, Lys-Plg disappeared faster than Glu-Plg and active plasmin was not detected at all. These findings directly indicate that Lys-Plg is more susceptible to activation by urokinase than Glu-Plg and that the active plasmin in plasma is immediately trapped by inhibitors. Differences between normal and hereditary abnormal plasma was also clearly observed. This new system should be widely applicable in many fields, *e.g.*, in clinical diagnosis and a therapeutic monitor for thrombosis.

* 旭化成工業株式会社〔〒210 川崎市川崎区夜光 1-3-2〕, Asahi Chemical Industry Co., Kawasaki, Japan.

** 帝京大学医学部第一内科, Department of Medicine, Teikyo University, School of Medicine, Tokyo, Japan.

*** 帝京大学薬学部, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Japan.

目 的

われわれは、高性能アフィニティークロマトグラフィーにより、Glu-プラスミノゲン (Glu-Plg), Lys-Plg, プラスミン (PI) が、迅速、高感度かつ特異的に分離分析できることを示した^{1,2)}。しかし、血液試料中の Plg 直接分析への応用は、共存成分の影響が大きいため困難であった。ここでは、システムを改良して、血漿そのままでの Plg を分析できるようにすることを目的とした。

I. 方 法

HPLC 用カラム Asahipak (旭化成) の充填剤に、ペンツアミジンをリガンドとして固定化した親和性吸着体のカラムを備えた高性能液体クロマト装置 (図 1) を用いた。カラムで Plg を分離した後、装置の流路内で連続的に活性化および酵素反応を行なわせることで、特異的に検出できるようにした。まず、カラムからの溶出液にウロキナーゼ (UK) を混合し、Plg を活性化する。次に、PI 用蛍光基質 (Boc-Glu-Lys-Lys-MCA) を加え、酵素反応の生成物を検出した。人血漿 (40 μ l) を前処理せずに直接注入して、Glu-Plg, Lys-Plg を分離、検出した。

III. 成 績

血漿を直接カラムに注入した時も、精製蛋白と同様¹⁾の挙動を示し、Glu-Plg, Lys-Plg の順に溶出された。カラムから溶出した Glu-Plg の活性化、検出には、活性化用 UK 溶液に、 ϵ -アミノカプロン酸 (ϵ ACA) を添加することで、感度向上が可能であった。Lys-Plg の場合には、 ϵ ACA を含まない UK 溶液を用いた。調べた血漿のほとんどについて、微量の Lys-Plg を検出することができた (図 2 (1))。健常者血漿に、*in vitro* で UK を加えると、Lys-Plg は Glu-Plg に比べて急速に消失した。この時、活性 PI は全く検出されず、生成した PI が直ちに血中インヒビターと結合する³⁾ことが直接的に示された (図 2 (2))。また、UK 静注を行なった急性心筋梗塞患者の血漿でも同様の現象が観察された。Glu-Plg の挙動は、従来の測定法⁴⁾の結果とほぼ対応すること、回復期頃の血漿中には Lys-Plg が出現していることが確認できた。遺伝性異常 Plg 症患者血漿と、健常者血漿との差も明確に示された。なお、カラムの再生時間を含めて、1 時間ごとの繰返し分析が可能であった。

III. 考 察

高性能アフィニティークロマトグラフィーによ

Fig. 1 Chromatographic System

Column: 6 mm ϕ $\times$ 10 cmL SUS

Adsorbent: Asahipak GS520-AHA-ABA (AHA 347 μ mol/g, ABA 96 μ mol/g)

Activation Coil & Reaction Coil: 0.25 mm ϕ $\times$ 4 mL PTFE

Fig. 2 Analysis of human plasma on Asahipak GS520-AHA-ABA. The column was equilibrated with B1. The eluent and urokinase solution were changed as indicated in (1). Normal plasma ($40 \mu\text{L}$) was applied to the column at time 0. The elution of an active plasmin was observed at about 35 min in another experiment. (2) (a) Normal plasma ($40 \mu\text{L}$) (b) Urokinase (9 U) was added to normal plasma and the mixture was incubated for 3 min at 37°C . The activation mixture was immediately applied to the column (time 0). (c) The mixture was incubated for 9 min and was applied to the column. An active plasmin could not be observed at all in (b) and (c). Detection of protein is omitted in (2).

—————	plasmin activity	ex. 285 nm, em. 340 nm
—————	(detection of plasminogen)	
— — — —	protein	ex. 365 nm, em. 460 nm
Eluent B1: 50 mM Na-Pi + 100 mM NaCl (pH 7.4)		
B2: B1 + 20 mM ϵ ACA (pH 7.4)		
B3: B2 + 3 M Urea (pH 7.4)		
Urokinase solution		
1. 500 U/ml B2 (for Glu-Plg)		
2. 100 U/ml B1 (for Lys-Plg)		

る特異的な分離と、UK 活性化—蛍光基質を利用した特異的検出法を組合せたことにより、画期的な分析システムができた。従来、ほとんど不可能と考えられていた、血漿中の Glu-Plg, Lys-Plg の直接的分析が初めて可能になった。本システムにより、分析前の試料の状態をそのまま反映したデータが得られる。各種疾患患者血漿の分析でも、従来の知見と対応する結果が得られるのに加えて、これまでにない情報も得られつつある。線溶系の基礎研究における利用

は言うまでもなく、今後の検討で病態との関連を明確にしていくことにより、臨床分析、治療モニターとしての利用など幅広い分野での貢献が期待される。

文 献

- 1) 笠井献一, 志村清仁, 伊藤尚史, 野口康二, 風間睦美: プラスミン, プラスミノゲンの新しい分析法—高性能アフィニティークロマトグラフィーの利用—. 血液と脈管, **16**(1); 23~

- 25, 1985.
- 2) Ito, N., Noguchi, K., Kazama, M., Shimura, K., Kasai, K.-I.: Separation of human Glu-plasminogen, Lys-plasminogen and plasmin by high-performance affinity chromatography on Asahipak GS-gel coupled with p-aminobenzamidine. J. Chromatogr., **348**; 199~204, 1985.
- 3) Moroi, R., Aoki, N.: Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. J. Biol. Chem., **251**; 5956~5965, 1976.
- 4) 松田 保: プラスミノゲン, プラスミンの測定. 臨床検査, **27**(8); 863~867, 1983.

●内科疾患のカルシウム代謝とその異常

カルシウムの臨床

編集 神戸大学内科教授 藤田拓男 専門医15氏分担執筆

B5判 365頁 図129 表78 定価9,800円(〒350円)

カルシウムは人体のあらゆるところに存在し、あらゆる機能に関与する。したがって、内科疾患のすべてに密接に関連しており、内科学を理解するためにカルシウム代謝とその異常をまず知らなければならない。本書は内科疾患のあらゆる部分にわたってカルシウムの影を探し求め、カルシウムの臨床を通して内科学を再構成しようとしたユニークかつ野心的な試みの産物である。

●内容: 総論, 第1章 神経系疾患とカルシウム代謝異常, 第2章 心血管疾患とカルシウム, 第3章 腎疾患とカルシウム, 第4章 呼吸器疾患とカルシウム, 第5章 消化器疾患とカルシウム, 第6章 血液疾患とカルシウム, 第7章 内分泌疾患とカルシウム, 第8章 リウマチ様関節炎とカルシウム代謝, 第9章 膠原病および免疫アレルギー疾患とカルシウム, 第10章 物理的原因による疾患とカルシウム, 第11章 薬剤とカルシウム代謝異常, 第12章 老年病とカルシウム, 第13章 悪性腫瘍とカルシウム, 第14章 カルシウム代謝検査法, 索引