ヒト血中の組織型プラスミノゲン-アクチベーター

(2) ELISA 法と Parabolic Rate Assay 法による

血中 t-PA のゲルろ過分析

桜間 照喜* 藤江 禎二* 安河内太郎** 佐藤雅寛男**
家子 正裕* 藤間 祐紀* 山岸 郁子* 沢田 賢一*
半田 洋* 中川 昌一*

Tissue plasminogen activator in human blood

(2) Gel filtration analysis of t-PA in human plasma by the
method of ELISA and parabolic rate assay

Shoki SAKURAMA*, Teiji FUJIE*, Taro YASUKOUCHI**,
Masahiro SATOH**, Masahiro IEKO*, Yuki THOMA*,
Ikuko YAMAGISHI*, Ken-ichi SAWADA*, Hiroshi HANDA*
and Shoichi NAKAGAWA*

Key word : tissue plasminogen activator, ELISA, parabolic rate assay,
plasminogen activator inhibitor (PAI), gel filtration

It was reported that immediate acidification is necessary for measurement of t-PA activity in blood samples to avoid its inactivation by t-PA inhibitor (PAI).

In this study, the immunological activity and enzymatic activity of t-PA were determined by ELISA method and parabolic rate assay method, respectively, and the interaction between t-PA and PAI was analysed by gel filtration method with Sephadex G-200. The following results were obtained.

1. Standard t-PA, obtained from Bio pool AB, showed one peak with $M_r = 60$ kDa by gel filtration, in which both immunological and enzymatic activities were found consistently.

* 北海道大学医学部第二内科 [〒060 札幌市北区北15条西7丁目], The Second Department of Medicine, Hokkaido University School of Medicine Sapporo, Japan.

** 東日本学園大学歯学部内科, Department of Internal Medicine, Higashi Nippon Gakuen University, School of Dentistry, Hokkaido, Japan.

2. By the same method, the plasma sample from a pregnant woman (PAI rich plasma) showed one peak with $M_r=120$ kDa in which only immunological activity of t-PA was found, and no enzymatic activity was found.

3. On the other hand, the mixture of standard t-PA and the plasma showed an increased peak with $M_r=120$ kDa showing only immunological activity of t-PA, and showed a decreased peak with $M_r=60$ kDa showing enzymatic activity of t-PA.

From these results, it was presumed that activity of t-PA ($M_r=60$ kDa) was immediately inhibited with PAI in human blood, by forming a t-PA -PAI complex ($M_r=120$ kDa), which was undissociable under the gel filtration method. Accordingly, the M_r of PAI seemed to be 60 kDa. PAI might play an important role in regulation of fibrinolysis, and its clinical significance remained to be elucidated.

緒 言

先にわれわれは、血中の組織型プラスミノゲン-アクチベーター (t-PA) 活性を測定する際には、可及的迅速に検体を酸処理することが必要であることを報告し⁴⁾、この現象には血中に共存している t-PA に特異的な inhibitor (PAI) が関与していることを示唆した。今回はこの点をさらに解析するため、PAI が高値であった妊婦血漿を用いてゲルろ過法で検討したので報告する。

I. 試薬と方法

1) Glu-plasminogen, fibrin monomer は既報のごとく、ヒト血漿から調製した⁴⁾。t-PA 標準標品は Bio Pool 社製 t-PA 測定用 ELISA kit に添付の t-PA standard を用いたが、本標品の比活性は UK を対照とすると 0.1 I.U./ml であった。PAI rich plasma は妊婦 71 例の中から選択した Case No. 59 (以下 Plasma No. 59) の血漿を用いた。

2) t-PA 酵素活性は Wiman ら¹⁾²⁾³⁾ の開発した parabolic rate assay (PRA) 法に準じ、既報⁴⁾ のように測定した。

3) t-PA 抗原量は Bio Pool 社 (Sweden) 製の ELISA kit⁵⁾ を用いて測定したが、本 kit 中の peroxidase 結合抗体は不純のことがあり、ゲルろ過法で精製し、 $M_r=200,000$ dalton (200

kDa) の分画をえて使用した。

4) PAI 活性は Wiman らの方法⁶⁾ に準じて測定した。

5) ゲルろ過は Sephadex G-200 カラムを用い、条件の詳細は結果の項に記載した。

II. 結 果

妊婦血漿中の PAI 活性は既報^{7),8)} の如く妊婦の経過とともに上昇する傾向がみられ、これらの検体のうち、高い PAI 活性 ($33.5 \text{ ng t-PA/ml plasma}$) を示した検体 (Plasma No. 59) を被験血漿として用いた (t-PA 抗原量は 10.8 ng/ml , t-PA 酵素活性は 0 ng/ml)。

1. PAI rich plasma による t-PA の阻害

Plasma No. 59 に t-PA を添加したのち回収される t-PA を検討したところ、表 1 に示したように、t-PA 抗原量は期待値通りであったが、t-PA 酵素活性は 6% 回収されたのみで、plasma 中には 33.5 ng/ml に相等する PAI が含有されていると思われる。

2. Sephadex ゲルろ過による分析

上記の現象を解析するため Sephadex ゲルろ過法で検討した (図 1)。

図 1-A に示したように、t-PA 単独をゲルろ過すると、t-PA の抗原量と活性はともに $M_r=60$ kDa の分画に一致して溶出され、その最大値はともに 1.10 ng/ml であった。

図 1-B に示したように、Plasma No. 59 単

A : G-200 (t-PA)

B : G-200 (Plasma No 59)

C : G-200 (t-PA + Plasma No 59)

Fig. 1 Sephadex Gel Filtration of t-PA, Plasma, and Mixture of t-PA and Plasma
column size 1.8×56 cm, flow rate 16 ml/h, fraction volume 3.1 ml, sample volume 3 ml, gel filtration
buffer 0.02 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.1 g/L Triton x-100.

Table 1 Enzymatic Activities and Antigenic Activities of t-PA in 3 ml of Samples

Samples (Volume in 3 ml)	Expected Values		Assayed Values	
	PRA	ELISA	PRA	ELISA
(A) t-PA (0.16 ml)	26.6 ng	26.6 ng	25.0 ng (94%)	25.2 ng (95%)
(B) Plasma No. 59 (0.75 ml)			0 ng	8.1 ng
t-PA (0.16 ml) + (C) Plasma No. 59 (0.75 ml)	26.6 ng	34.7 ng (26.6+8.1)	1.5 ng (6%)	33.6 ng (97%)

0.9 ml of plasma (or PBS) and 0.2 ml of t-PA (or 0.02 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.1 g/L Triton X-100) were incubated for 10 min. at room temp. Then the mixture was acidified with 0.9 ml of 1 M acetate buffer, pH 3.9, for 15 min. at room temp. 1.6 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.8, 0.2 M NaCl, 0.2 g/L Triton X-100, was added to the acidified sample, and the supernatant was obtained by centrifugation for 3,000 r.p.m. $\times$ 15 min. at 4°C. 3 ml of the supernatant was used for the gel filtration (see Fig. 1), and the rest of the supernatant was used for the quantitation of t-PA concentration.

独のゲルろ過では、t-PA 抗原量は $Mr \approx 120$ kDa に1峰性に溶出され、その分画の最大値は 0.46 ng/ml であったが、t-PA 活性は認められなかった。

一方、Plasma No. 59 に t-PA を添加した試料のゲルろ過では、図-C に示したように、t-PA 抗原量は $Mr \approx 120$ kDa に1峰（最大値は 1.85 ng/ml）を示したが、t-PA 活性は $Mr \approx 60$ kDa に僅かなピークとして（最大値は 0.09 ng/ml）認めた。

III. 考 察

ヒト血中の t-PA 酵素活性を測定するためには可及的迅速に検体を酸処理して t-PA 活性の低下を防ぐ必要がある^{1),4)}。血中で t-PA 活性が速やかに失活する理由は、図1に示したように、 $Mr \approx 60$ kDa の活性ある t-PA が血中に共存する PAI と結合して $Mr \approx 120$ kDa の活性のない t-PA $\cdot$ PAI 複合体に変化するためと考えられる。

PAI は、現在のところ、t-PA を阻害する活性として把握されているのみで、未だ単離・同定がなされていない。PAI は $Mr \approx 60$ kDa の t-PA と結合し、ゲルろ過法では解離しない、 $Mr \approx 120$ kDa の安定な複合体を形成して t-PA

活性を阻害すると思われ、また、その分子量は複合体と t-PA との差から $Mr \approx 60$ kDa と推定されるが、200 kDa との報告もあり⁶⁾、その詳細は不明である。PAI は線溶活性機構を制御する主要な因子であり、その臨床的意義の解明を検討中である。

謝辞：本研究の補助をして下さった森本美恵嬢に、また施設の利用を許可された本学中央研究部・松宮英視教授に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Wiman, B., Mellbring, B. and Rånby, M.: Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. Clin. Chim. Acta, **127**; 279~288, 1983.
- 2) Rånby, M. and Wallén, P.: A sensitive parabolic rate assay for tissue plasminogen activator. In: Davidsson, J.F., Nilson, I.M., Åstedt, B. eds. Progress in Fibrinolysis, Vol. 5, Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1981: 233~235.
- 3) Rånby, M., Norman, B. and Wallén, P.: A sensitive assay for tissue plasminogen activator. Thrombos. Res., **27**; 743~749, 1982.
- 4) 桜間照喜, ほか：ヒト血中の組織プラスミノ-

- ゲン, アクチベーターに関する研究. (1) t-PA の Parabolic Rate Assay 法による測定とゲルろ過による分析. 血液と脈管 (投稿中)
- 5) Bergsdorf, N., Nilsson, T. and Wallén, P.: An enzyme linked immunosorbent assay for tissue plasminogen activator applied to patient with thromboembolic disease. *Thromb. Haemost.*, **50**; 740~744, 1983.
- 6) Wiman, B., Chielewska, J. and Rånby, M.: Inactivation of tissue plasminogen activator in plasma. *J. Biol. Chem.*, **259**; 3644~3647, 1984.
- 7) 藤江禎二, ほか: 血中即時型組織プラスミノーゲン, アクチベーター, インヒビターの測定 (妊娠時の検討). 臨床血液第27回総会抄録集, 1985, p. 456.
- 8) Wiman, B., Csemiczky, G., Marsk L. and Robbe, H.: The fast inhibitor of tissue plasminogen activator in plasma during pregnancy. *Thromb. Haemost.*, **52**; 124~126, 1984.

● 疾病の免疫遺伝学的アプローチ!

HLA と 疾病

月刊「臨床免疫」第14巻冬季特別増刊号

編集 慶応大学教授 渡辺 格、東海大学教授 辻 公美、専門医22氏分担執筆

B5判 144頁 定価3,500円 (〒300円)

HLAは、免疫遺伝学的マーカーの一つとして、最近特に注目されており、疾病の遺伝要因を解明する有力な手段として期待されている。本書は各種疾患とくに難病とHLAの関連性を追求し、HLAと難病に関するすべてのデータを整理して1冊にまとめた。またHLA検査の方法、データの分析法についても詳細に解説し、誰でも検査を確実にできる手引書でもある。

●内容: 序文, 第1章 難病とHLA, 日本の現況, 第2章 HLAと疾病, 世界の現況, 第3章 疾患とHLAの相関—その機序, 第4章 HLA分析の問題点, HLA-D/DRと臨床応用, 第5章 疾患とHLA, 1. ペーチェット病とHLAとの相関, 2. 突発性難聴とHLA, 3. 特発性心筋症とHLA, 4. サルコイドーシスとHLA, 5. 潰瘍性大腸炎のHLA, 特にDR抗原よりの検討, 6. 潰瘍性大腸炎とHLA抗原, 7. 特発性門脈圧亢進症におけるHLA抗原の検討, 8. 21-OHase欠損とHLA, 9. 家族性アミロイドニューロパチーとHLA, 10. 血管炎とHLA, 11. 腎障害とHLA, 12. 再生不良性貧血とHLA, 第6章 HLA検査の方法論, 1. HLA-A, B, C, DRタイピング, 2. HLA検査の方法論—HLA-D, 3. Primed Lymphocyte Typing (PLT) 手技, 4. ヒト免疫グロブリン・アロタイプ, 5. HLA検査の方法論—統計処理。