原 著

ヒト血漿からの Plasminogen の分離法
およびヒト-フィブリン寒天平板を使用
したその測定値について*

山 本 順一郎** 岡 本 歌 子**

Key words : plasminogen, lysine-sepharose, trans-4-aminomethylcyclohexane carboxylic acid (t-AMCHA), urokinase.

序 論

ヒト血漿のプラスミノゲン値の測定については多くの報告^{1)10)~13)15)16)}があるが、その正常値については研究者間に大きい開きがあり、比較が困難である。その原因はプラスミノゲンの分離法の可否と、その力価測定法の差異にあると考えられる。

プラスミノゲンの分離精製に関しては、lysine-sepharose affinity chromatography を利用した優れた方法⁹⁾が開発され、本邦においてもすでに臨床測定に使用されている。しかしこれらの方法にも、細部についてはなお検討の余地が残されている。山本¹⁷⁾¹⁸⁾は lysine-sepharose に吸着したプラスミノゲンは trans-aminomethyl cyclohexane carboxylic acid によってよく溶出されることを報告した。本論文はその方法にさらに検討を加え、血漿プラスミノゲン分離の適切な条件を定め、それにより得た正常値を測定したものである。測定にはヒト-フィブリンノーゲンで作製している市販フィブリン寒天平板³⁾を、種々の吟味の後使用した。

I. 材料および方法

1. 材 料

〔ヒト-フィブリンノーゲン (H-Fg)〕ミドリ十字株式会社
のヒト血漿 Cohn I 分画。

〔ウシ-フィブリンノーゲン (B-Fg)〕Miles Labora-

tories のウシ血漿 Cohn I 分画。

〔ウシ-トロンビン (Th)〕持田製薬株式会社の局所用ウシトロンビン。

〔ヒト-フィブリン寒天平板 (F-A 平板)〕Hyland, Enzodiffusion Fibrin Plate (Lot No. 0465X002A1 Dec-4-74)

〔ウロキナーゼ (UK)〕持田製薬株式会社のウロナーゼをリン酸緩衝液に溶解して使用した。

〔ストレプトキナーゼ (SK)〕Lederle Laboratories の Varidase を生理食塩水に溶解して使用した。

〔純化ヒト-プラスミノゲン (H-Plg), 純化ヒト-プラスミン (H-Pl)〕Plasminogen KABI, 25 Sgouris casein unit per vial および plasmin KABI, 20 Sgouris casein unit per vial, AB KABI, Stockholm.

〔lysine-sepharose (Lys-Seph)〕Deutsch and Mertz⁹⁾の方法にしたがって Sepharose 4B (AB Pharmacia) に L-lysine を結合させて作製した。

〔純化ウシ-プラスミノゲン (B-Plg)〕神戸屠殺場より得たクエン酸血より血漿を作り、これをあらかじめ 0.14 M NaCl を含む 0.01 M トリス緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Lys-Seph のカラムに流した。同緩衝液で非吸着蛋白を十分に洗い流した後、同緩衝液に 0.001 M t-AMCHA を含む溶出液で結合した Plg を溶出させた。得られた Plg を同緩衝液で透析し、-15° に保存した。

* A separation method of plasminogen from human plasma, and its activity measured by human fibrin agar plate. (Received Sept. 1975)

** 神戸学院大学栄養学部生理研究室 [〒 673 神戸市垂水区伊川谷町] Jun-ichiro YAMAMOTO and Utako OKAMOTO: Laboratory of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Kobe, Japan.

Table 1 Detection of the fibrinolytic factors contained in fibrin plate (F plate) and fibrin agar plate (F-A plate)

Plate	Incubation time (h)	UK (100 CTAu/ml)	SK (1,000 u/ml)	UK+B-Plg	SK+B-Plg	Saline+B-Plg
F-A plate	2.5	0 mm ²	0 mm ²	22.09 mm ²	24.51 mm ²	0 mm ²
	23	0	0	127.69	121.00	33.64
Fplate	23	0	0	440	330	0

Table 2 Comparison of the plasminogen assays on F plate and F-A plate in the accuracy and reproducibility

Plate No.		Incubation time						20 h M±SD(C. V.)		
		2.5 h M±SD(C. V.)			4.5 h M±SD(C. V.)					
F-A plate (5 μl plasmin)	1 (n=6)	47.39 mm²±1.04 mm²(2.2)			66.70 mm²±0.84 mm²(1.3)			189.53 mm²±2.25 mm²(1.2)		
	2 (n=6)	48.78 ±1.49 (3.1)			68.34 ±0.70 (1.0)			185.43 ±3.61 (2.0)		
	3 (n=6)	47.39 ±1.36 (2.9)			66.97 ±1.23 (1.8)			190.00 ±4.06 (2.1)		
	4 (n=6)	48.54 ±1.43 (3.0)			65.62 ±1.79 (2.7)			197.43 ±4.60 (2.3)		
Total	(n=24)	48.02 ±1.39 (2.9)			66.91 ±1.52 (2.3)			190.60 ±5.63 (3.0)		
F plate (30 μl plasmin)	1 (n=3)							455 ± 17 (3.7)		
	2 (n=2)							462 ± 0 (0.0)		
	3 (n=3)							477 ± 38 (8.0)		
	4 (n=3)							434 ± 34 (7.8)		
	5 (n=3)							459 ± 31 (6.8)		
Total	(n=14)							457 ± 28 (6.1)		

〔ヒト血漿およびユーグロブリン (Eug) 液〕 3.8% クエン酸ソーダを 1/10 容含んだ 静脈血血漿を蒸留水で 20 倍に希釈し, 1% 酢酸で pH を 5.2 に調整し, 4° で一夜放置後 3,000 rpm, 15 分間遠心分離して Eug の沈殿を得た. これを元の血漿量のリン酸緩衝液に溶解し, Eug 液とした.

〔緩衝液〕 リン酸緩衝液 (PBS) は 0.01 M Na₂HPO₄ と 0.01 M KH₂PO₄ とを混和し, pH を 7.4 とし, これに 0.14 M NaCl を溶解した. 硼酸緩衝液は, H₃BO₃ 11.25 g, Na₂B₄O₇·10 H₂O 4.0 g, NaCl 2.25 g を溶解し (pH 7.75) 1 l とした.

〔Trans-aminomethyl cyclohexane carboxylic acid (t-AMCHA)〕 第一製薬株式会社の粉末トランサミンを使用した.

2. 方法

a. 線溶活性測定法

〔Plg 除去非加熱ヒト-フィブリン平板 (F 平板) による測定〕 H-Fg および Th を, それぞれ 0.8%, 10 u/ml になるように硼酸緩衝液に溶解した. H-Fg はあらかじめ上記緩衝液で平衡化した Lys-Seph カラムを通過させ, 混在する Plg を吸着させ, 非吸着液

を Plg を含まない H-Fg として用いた. F 平板は内径 9 cm のシャーレに上記 Plg 除去 Fg 4.0 ml と, 2% CaCl₂ 0.1 ml, Th 2.0 ml とをよく混和し, 静置して作製した. 線溶活性は, F 平板上に滴下した 30 μl の試料が 37° で 23 時間後に起こす溶解面積 (長径×短径) で表した.

〔市販の Plg 除去ヒト-フィブリン寒天平板 (F-A 平板) による測定〕 Hyland 社製 F-A 平板にマイクロシリンジで 5 μl の試料を滴下し, 37° で incubate し, 種々の incubation 時間の後に示す溶解窓の直径を田島産業社製の viewer で測定した.

b. Plg 力価の測定

あらかじめ力価のわかった純化 H-Pl および純化 H-Plg を, それぞれ PBS および 0.001 M t-AMCHA を含む PBS に溶解し, それらを溶解した緩衝液でそれぞれ希釈した. H-Pl の場合はそのまま H-Plg の場合はその 4 容に 1 容の UK (2,000 CTA u/ml PBS) を加え, 37° で 10 分間 preincubate した. その溶液 5 μl を F-A 平板に滴下し, 37° で 4 時間 incubate した後溶解窓の直径を測定した. 直径と力価 (Sgouris et al. の casein unit) の対数との間にほぼ直線関係

が得られた。この標準直線を用いて溶解窓の大きさを力価に換算した。

c. 蛋白質の定量

試料中の蛋白は、280 nm による吸収、および Lowry et al.⁹⁾ 法による 750 nm の吸収で測定した。750 nm による吸収は試料を次のように処理した後測定した。0.4 ml の試料に 2.0 ml の混液 (50 ml の 2% Na_2CO_3 -0.1 N NaOH 溶液, 1.0 ml の 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 1.0 ml の 1% 酒石酸カリ・ソーダの混合液) を加え、室温で 10 分間放置した。ついで 0.2 ml の 1 N フェノール試薬を加え、室温で 30 分間以上放置した後、日立 101 分光光度計で吸収を測定した。

II. 実験結果

1. F-A 平板と F 平板の比較

a. 両平板に含まれる線溶因子の比較

F-A 平板および F 平板に SK, UK, およびこれらに B-Plg を混合した液を滴下して、その溶解から両平板中に含まれる線溶因子について検討した。結果は表 1 に示す。表中の溶解窓の数値は同一試料について 2 回の測定の平均値である。

この成績から両平板ともに Plg の存在は認められなかった。しかし B-Plg と SK との混液は両平板に明らかな溶解を示した。このことは、ヒト Fg を使用しているの、両平板にはなお plasminogen activator (Proact) が残存していることを示している。

b. 両平板の定量性

両平板で測定する Plg と Pl 量を調べた。incubation time により異なるが、両平板ともに 0.04 cu/ml 以上の Plg と Pl を測定することができた。しかしその溶解は、F-A 平板のほうが早く起こり、短時間での測定には F-A 平板が適していた。

同一 Lot No. の F-A 平板および同一 Lot No. の Fg より作製した平板を用いて、同一平板上の、また各平板間の測定精度および再現性を検討した。F-A 平板と F 板にはそれぞれ 5 μl , 30 μl の H-Pl を滴下し、37°C で incubate した。結果は表 2 に示す。

この成績は、両平板ともに、1 枚の平板での変動係数 (C. V.) と各平板間の C. V. が同じであることを示している。したがって同一平板はもとより、各平板間にみられるバラツキが無視できる。

C. V. は F-A 平板では約 3%, F 平板では約 6% であり、測定精度、再現性において F-A 平板が F 平板より優れていた。C. V. は溶解面積により異なり、とくに F 平板においては溶解面積が 100 mm² 以下で

Fig. 1 Affinity chromatogram of human plasma on lysine-sepharose.

は約 16% であった。

F-A 平板では、試料を滴下する小孔の容積が一定であり、マイクロシリンジの代わりに毛管を使用しても試料容量は一定となる。

以上の成績から、Plg (および Pl) の定量には F-A 平板が F 平板より優れていることが示された。

2. F-A 平板によるヒト血漿中の Plg 定量法—予備実験

a. Plg 分画作製法の検討

ヒト血漿中の Plg 定量には、これを血漿から定量的に分離回収して測定することが望ましい。そこで、以下の 3 種の方法で Plg を含む分画を作製し、Eug の活性化に十分な量の UK (125 CTA u/ml) をそれぞれの分画の 1/4 容加え、37° で 10 分間 preincubate した後、それらの分画中の Plg 量を測定比較した。測定は F-A 平板を使用し、37° 4 時間の incubation で実験方法に記載したようにしてそれぞれの Plg 力価 (casein u/ml plasma) を求めた。

Pl を Plg と共存させた試料では Pl は Plg と行動をともし、以下の 3 種の方法ではいずれも同じ分画に入った。しかし健康なヒトの新鮮血漿を使用したこの実験では、いずれの試料にも Pl の存在は認められなかった。Plg 分画作製法は以下のとおりである。

〔Eug 分画〕前記の方法にしたがって作製した。

〔酢酸溶出分画〕Affinity chromatography により作製した。注射筒に Lys-Seph を入れ、bed volume

Fig. 2 Plasminogen binding capacity of a lysine-sepharose column.

Fig. 3 Procedure for estimating the content of plasminogen in human plasma.

の10倍量のPBSで平衡化させてカラムを作製した。このカラムにbed volumeと同量の血漿を通過させ、さらに10倍量のPBSで非吸着物質を洗い流した。ついで3倍量の0.1M酢酸(pH 3)で吸着した蛋白を溶出した。この分画中にPlg活性がみられた。この溶出分画を1N NaOHと0.5M Na_2HPO_4 でpHを7.4にし活性を測定した。

〔t-AMCHA 溶出分画〕前記の方法中の溶出緩衝液を0.001M t-AMCHAを含むPBSに代えて溶出した。活性はt-AMCHAを除外せずに測定した。

Plg力価の測定結果は、Eug分画では0.86、t-AMCHA分画では2.17、酢酸分画では1.09 u/ml plasmaであった。この結果は、3種の分画中、t-AMCHA溶出法で作製したPlg分画が、Plgを最もよく回収していたことを示している。

b. t-AMCHA 溶出分画の検討

Lys-Seph 吸着Plgをt-AMCHA溶液で溶出する場合には、酢酸で溶出するよりも回収率がよいことが前実験で示された。しかしなお、t-AMCHA液には溶出されないが酢酸では溶出される蛋白中にPlg存在の有無を調べるために次の実験を行った。

100 ml 新鮮血漿をPBSで平衡化したカラム(2.1×14 cm)を通過させ、吸着蛋白を0.001M t-AMCHAを含む緩衝液で溶出した。さらに0.1M酢酸200 mlを使用し、残存する蛋白を溶出させた。これらの溶出

液中の蛋白量とともに、Plg 活性および SK 線溶活性を測定した。

Plg は溶出液に同量の UK (130 CTA u/ml) を加えて Lassen⁷⁾ に準拠した加熱 B-F 平板で測定し、SK 線溶活性は、溶出液に同量の SK (1,000 u/ml) を加えて Astrup and Müllertz²⁾ に準拠した非加熱 B-F 平板で測定した。

図 1 に示すように、t-AMCHA 溶出蛋白に一致して Plg 活性が認められるが、酢酸溶出蛋白中には Plg 活性が認められなかった。この事実は、t-AMCHA 液溶出では酸可溶蛋白と分離して Plg を溶出できることを示す。この成績と、前記 a. の成績から、血漿よりの Plg 分離には、Lys-Seph 吸着蛋白を t-AMCHA 液で溶出する方法が優れていることが示された。

c. Plg 活性化に必要な UK 量

PBS で平衡化した Lys-Seph カラムを bed volume と同量のヒト血漿を通過させ、10 倍量の PBS で非吸着物質を洗い流した後、0.001 M t-AMCHA を含む PBS 3 倍量で Plg を溶出した。この Plg 4 容に種々の力価の UK 1 容を加えて、10 分間 preincubate した後、F-A 平板で測定を行った。

本実験よりこの Plg の活性化に要する

UK の力価は、終濃度で 100 CTA u/ml であることが示された。Preincubation 時間は、2 分から 60 分まで種々の間隔で調べたが、この間では何分でも生成 Pl 量は一定であった。したがって、操作を一定させるためにここでは 10 分をとった。

d. Lys-Seph が吸着しうる Plg 量の測定

2.0 ml の注射筒に 0.5 ml の Lys-Seph カラムを作り、5.0 ml の PBS で洗浄し、それぞれのカラムに 1.0, 1.5, 2.0 および 3.0 ml の血漿を通過させた。5.0 ml の PBS でカラムを洗浄後、0.001 M t-AMCHA を含む PBS 1.5 ml で Plg を溶出した。それぞれの溶出液 4 容に 1 容の UK (2,000 CTAu/ml) を加えて、37° 10 分間 preincubate した後、F-A 平板で生成 Plg 力価を測定した。同時に蛋白量を 280 nm と 750 nm による吸収で測定した。結果は図 2 に示す。

この成績は 0.5 ml の Lys-Seph が 3.0 ml の血漿中の Plg を十分吸着しうることを示している。また

Table 3 Plasminogen (plasmin) contents in plasmas of healthy persons

Sex	Age	OD ₂₈₀	OD ₇₅₀	Plg (casein units /ml plasma)	Pl (casein units /ml plasma)
M	22	0.104	0.242	1.67	0
M	19	0.073	0.180	1.21	0
M	19	0.102	0.248	1.67	0
M	22	0.103	0.245	1.67	0
M	20	0.112	0.269	1.96	0
M	20	0.092	0.238	1.67	0
M	20	0.085	0.195	1.31	0
M	20	0.078	0.186	1.31	0
M	21	0.077	0.211	1.31	0
M	21	0.092	0.212	1.52	0
M	22	0.092	0.239	1.52	0
M	19	0.076	0.198	1.31	0
M	19	0.087	0.237	1.52	0
M	18	0.086	0.213	1.42	0
F	18	0.082	0.198	1.31	0
F	18	0.076	0.202	1.31	0
F	19	0.104	0.250	1.52	0
F	19	0.097	0.242	1.67	0
F	18	0.096	0.232	1.52	0
Mean value		0.09±0.012	0.223±0.025	1.49±0.19	

Plasminogen (plasmin) unit was calculated by using the following equation. $P \times 3/2^* \times 5/4^{**} \times 10/9^{***} = \text{Plg (Pl) u/ml plasma}$.
P: Plg (Pl) unit calculated from the diameter by using unit-diameter standard curve, *: coefficient to correct dilution on preparing Plg (Pl) fraction, **: coefficient on activation, ***: coefficient on preparing plasma.

Plg 力価と蛋白量との間にほぼ比例関係が存在することを示している。

なお Lys-Seph を通過した分画を、さらに他の同一条件で生成した Lys-Seph カラムに流し、ふたたび t-AMCHA で溶出し、Plg 力価と蛋白量を測定した。

2 回目の溶出液には蛋白量として 1 回目のその約 10%、活性として約 5% の Plg が認められた。2 回目のカラムの非吸着分画は Eug 沈殿にしても活性が認められなかった。

以上の成績はカラムを 1 回通過させるだけで、約 95% の Plg が吸着されることを示した。

3. ヒト血漿 Plg 値の定量

以上の実験結果から、使用する血漿量をできるだけ少なくし、血漿中の Plg (Pl) を十分回収できる条件を考慮しながら図 3 および次記のような操作で Plg を分離し、F-A 平板で、ヒト血漿の Plg(Pl) を定量した。

Plg (Pl) の分離には、① 2 ml の注射筒に作製し

た 0.5 ml の Lys-Seph カラムを 5.0 ml の PBS で平衡化し, ② これに 1.0 ml の クエン酸血漿を加え, ③ 1.0 ml の PBS で 5 回洗浄し, ④ ついで 1.5 ml の 0.001 M t-AMCHA を含む PBS で Plg (Pl) を溶出する.

Pl の測定は溶出液 5 μ l をそのまま市販の F-A 平板に滴下する. Plg 測定には溶出液 0.4 ml に 0.1 ml の UK (1,000 CTA u/ml) を加えて 10 分間 preincubate した後, その 5 μ l を同上 F-A 平板に滴下する. これらの活性は, 前記の標準直線によって求める.

Incubation 時間は一応 4 時間としたが, 2 時間でも測定可能である.

同時に上記のようにして分離した Plg 分画の蛋白量を 280 nm または 750 nm 吸収で測定する. この分画の Plg (Pl) 値と蛋白量は比例するので (図 2), この吸収を Plg 値判定までの参考 data とすることができる.

Lys-Seph は 0.1 M 酢酸で洗浄後, 水で洗浄して 4° で保存すれば, くり返しての使用が可能である.

この方法で 18~22 歳の健康男女 19 名の血漿 Plg 力価と分画中の蛋白量とを求めた. 得られた値は 1.49 ± 0.19 casein u/ml plasma, OD₂₈₀ では 0.091 ± 0.012 /eluate, OD₇₅₀ では 0.223 ± 0.025 /eluate であった (表 3).

III. 考 察

血漿より分離した Plg の値を測定する場合, たとえ Plg が, 他の因子を除外して活性を保ったまま分離されたとしても, その測定法の精度と再現性の良否によって値は異なってくる. したがって本論文では, まず Plg の定量法についての検討を行なった.

Plg の定量法としてはその定量性のうえから casein 分解法または合成エステル分解法が推奨されている. しかしいずれも自然基質とはいいがたく, そのうえ casein は同一純度の標準品を入手することが困難であり, 合成基質は Plg-Act 活性も同時に測定することになり, この場合, 適切な基質とは考えがたい. これらの条件から, 著者らは Plg (Pl) 測定に市販の Plg 除去ヒト F-A 平板を使用し, これが著者らの目的にかなうものであるか否かをまず吟味した.

Plg (Pl) の測定には, 当然のことながら基質中に Plg が含まれていないことが第一条件である. この F-A 平板に使用している Fg は活性炭処理により Plg を除去したものであるが, 著者らが使用した F-A 平

板では, UK で測定した限りでは Plg 十分に除去されていた (表 1). しかし SK 反応性 Proact はなお多少残存している成績が得られた. この点は宮谷¹⁴⁾らの報告とは異なるが, 宮谷らの実験では SK+B-Plg による溶解をみていないためと考えられる. ある Lot No. の製品には微量な Plg の存在を示すものもあったが, その量は非常に微量であり, 血液 Plg 測定には十分無視できる程度であった. また測定の精度, データの再現性についても他の Plg 除去 F 平板に比して満足すべき結果が得られた. 判定時間は 4 時間をとったが, 2 時間でも血漿 Plg の定量に使用可能であった. この点は従来の F 平板法が判定までに長時間を要することを補っている.

試料の作製法についての検討では, lysine-sepharose affinity chromatography で, 溶出に t-AMCHA を用いる方法が, 従来報告されている同 chromatography 法⁵⁾⁸⁾¹¹⁾より優れていることが確認された.

Liu & Mertz⁹⁾が記載しているように, lysine-sepharose は, Plg の他に中性溶液には不溶で酸性溶液には可溶な, 280 nm に吸収をもつ蛋白を吸着することを著者らも確認した (図 1). したがって Plg を選択的に溶出するためには, 酢酸のような酸性溶液の使用は避けるべきである. 溶出液としては lysine, EACA, などが使用されているが, 著者らは予備実験において, t-AMCHA が前記二者よりも Plg の鋭い溶出ピークを得るためには適していることを確かめている. したがって本実験では t-AMCHA を使用した. また本文に示した方法では, 1 回の chromatography でほぼ 95% の血漿 Plg を回収できた.

Plg の活性化に SK を使用している研究者³⁾¹¹⁾が多いが, 結果判定の混乱を避けるためには UK を使用すべきであろう. 血漿中の SK 反応性蛋白 (Proact) は, この方法で, Plg (Pl) 溶出分画中に同様に溶出される (図 1). したがって Plg と Proact との比が異なる試料では, 一定の SK を加えても生成される Pl は試料により異なることになる. また SK 反応性蛋白が Plg (Pl) である, という立場に立っても, 未知量 Plg を十分に活性化するために適切な量の SK 単位を知ることは困難である. すなわち Kline & Fishman⁶⁾, De Renzo et al.⁴⁾ が主張するように, Plg (Pl) が SK と 1:1 のモル比で結合して Plg-Act を形成するとすれば, SK 量が多い場合には Plg のほとんどが Plg-Act となり, 形成される Pl はわずかであるという結果になろう. したがって Plg 測

定時の活性化物質としては、SK よりも Plg を直接活性化する UK を使用すべきである。

本実験で得た成績から、一定の条件下で測定を行えば、Plg 力価を、あらかじめ求めた力価・溶解窓標準直線から絶対値で表しうることが示された。しかし F 分解で得た値をそのまま casein 単位に換算することは、なお問題がないとはいえない。Fibrin 単位の設定を考えるべきであろう。

図 2 の成績は、Plg 力価と蛋白量とがほぼ比例することを示している。Zolton et al.⁽⁹⁾ の試みにならえば、t-AMCHA 溶出 Plg は純度の高いものであり、その力価を 280 nm または 750 nm の吸収で補助的に表現できることを示している。

前記の種々の実験で得た成績を基礎にして、比較的簡易に多数の試料の Plg を短時間に測定する方法として図 3 に示したような測定法を考案した。今後種々の病的条件における Plg 値を測定する対照として、本論文では正常人血漿で Plg 値を測定した。得られた Plg 値は、 1.49 ± 0.19 casein units/ml plasma であった。この値は松本⁽¹¹⁾の報告とは大きく異なっている。本実験で使用した casein units は Sgouris et al. に従ったものであるが、松本のそれは論文に記載されていないので、そのまま両者の値を比較することはできない。正常人血漿の Plg 値は、方法に基因する差異も予想されるが、検討しておくべき問題であろう。本論文に記載した方法によりさらに人血漿 Plg 値の生理的、病理的変動を追求していく予定である。

総 括

1) t-AMCHA を溶出に使用する lysine-sepharose affinity chromatography による Plg 分離法と、市販の F-A 平板を用いる Plg (および Pl) 定量法について吟味を行い、高い精度と再現性でヒト血漿 Plg を測定するのに適切な条件を定めた。

2) 上記の条件を満たし、かつ比較的短時間に多数の試料を測定できる定量法を考案し、健康人 19 名の血漿 Plg 値を測定した。その値は、 1.49 ± 0.19 casein units/ml plasma であった。また t-AMCHA を使用する Plg 分離法は非常に選択性が高いので、溶出液の吸光度を活性測定の補助手段として使用することができた。その値は、OD₂₈₀ では $0.091 \pm 0.012/\text{eluate}$ 、OD₇₅₀ では $0.223 \pm 0.025/\text{eluate}$ であった。

稿を終るに当たり、永松陽子助手、堀江登助手のご協力に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 安部 英, 田原千恵子, 風間睦美, 飛田野エミ子, 安田純一: アガール・アガロース・フィブリン平板法および FDP 抗体被覆ラテックス粒子凝集法. 第 13 回 プラスミン研究会報告集, 89~92, 1973.
- 2) Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys., **40**; 346~351, 1952.
- 3) Bishop, R., Ekert, H., Gilchrist, G. S. and Shanbrom, E.: The preparations and evaluation of a standardized fibrin plate for the assesment of fibrinolytic activity. Thromb. Diath. haemorrh., **23**; 202~210, 1970.
- 4) De Renzo, E. C., Barg, W., Boggiano, E., Englert, M. E. and Davies, M. C.: Interaction of streptokinase and plasminogen. Biochem. Biophys. Res. Comm., **12**; 105~110, 1963.
- 5) Deutsch, D. E. and Mertz, E. T.: Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. Science, **170**; 1095~1096, 1970.
- 6) Kline, D. L. and Fishman, J. B.: Proactivator function of human plasmin as shown lysine esterase assay. J. Biol. Chem., **236**; 2807~2812, 1961.
- 7) Lassen, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. Acta Physiol. Scand., **27**; 371~376, 1952.
- 8) Liu, T. H. and Mertz, E. T.: Studies on plasminogen. IX. Purification of human plasminogen from Cohn Fraction III by affinity chromatography. Can. J. Biochem., **49**; 1055~1061, 1971.
- 9) Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**; 265~270, 1951.
- 10) 真木正博: 線溶現象—特に測定法とその解釈. 臨床病理, **18**; 563~568, 1970.
- 11) 松本光民: アフィニティー・クロマトグラフィーによる線溶系の測定 I—線溶測定上におけるユー

グロブリン分画の問題点. 日血会誌, **37**; 834~842, 1974.

- 12) 松本光民, 五十嵐紀子, 竹内節夫, 曾 篤如, 玉置 充, 浅田敏雄: TNP 法による蛋白分解酵素の測定. Ⅲ. Eu-globulin を使った Plasmin 活性新測定法. 東邦医会誌, **19**; 475~478, 1972.
- 13) 松岡松三, 桜川信男: フィブリン平板法の検討. 臨床血液, **7**; 513~521, 1966.
- 14) 宮谷勝明, 高畑譲二, 福井 巖: 市販フィブリン寒天平板を用いたプラスミンの測定法に関する検討. 臨床検査, **18**; 74~76, 1974.
- 15) 中村恵美子: 私信.
- 16) 太田瑛子, 三浦 裕, 戸沢敬夫: フィブリン寒天平板 (Fibrin-Agar-Plate) 法による線溶活性の新測定法について. 臨床血液, **13**; 793~799, 1972.
- 17) 山本順一郎: Hyland の plate を用いたヒト血漿中の plasminogen 量測定法の検討. 第14回プラスミン研究会報告集, 266~267, 1974.
- 18) 山本順一郎, 永松陽子: Lysine-Sepharose chromatography による大分子量 plasminogen proactivator の低分子化. 日本生理誌, **36**; 176~185, 1974.
- 19) Zolton, R. P., Mertz, E. T. and Russell, H. T.: Assay of human plasminogen in plasma by affinity chromatography. Clin. Chem., **18**; 654~657, 1972.

<Abstract>

A separation method of plasminogen from human plasma, and its activity measured

by human fibrin agar plate.

by

Jun-ichiro YAMAMOTO and Utako OKA-MOTO.

from

Laboratory of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Kobe, Japan.

This paper describes the plasminogen contents of human plasma obtained by the modified affinity chromatographical method.

The plasminogen (plasmin) fractions of healthy persons were prepared by affinity chromatography on lysine-sepharose by using t-AMCHA as an eluant. Plasminogen (plasmin) activity was estimated on the plasminogen free human fibrin agar plate after activation by UK (or without activation). The protein content in this fraction was also estimated in measuring the absorbance at 280 and 750 nm (Lowry et al.). This value could help the quantitative analysis of plasminogen (plasmin) because of the high selectivity to plasminogen (plasmin) of t-AMCHA elution.

The mean values of plasminogen activity and protein content thus obtained were as follows. Plasminogen activity was 1.49 ± 0.19 casein units/ml plasma, and optical density at 280 nm was $0.091 \pm 0.012/\text{eluate}$, $0.223 \pm 0.025/\text{eluate}$ at 750 nm. Plasmin activity was not observed in all specimens.