原 著

セトレキセート，アガロースによるプラス
ミノゲンアクチベーターの分離精製*

柴 忠明** 竹内 節夫** 寺嶋 剛** 久保田和博**
高塚 純** 瓜田 有三** 小沢 博樹** 野中 杏栄**
栗津 三郎** 五十嵐紀子*** 浅田 敏雄***

Key words : cetraxate-agarose, affinity-chromatography,
plasminogen activator, plasminogen, thrombin

はじめに

Plasminogen を plasmin に転換する際の活性化物質は plasminogen activator とよばれている。この plasminogen activator は種々の組織や体液中に様々な程度に分布していることが知られている。この plasminogen activator が種々の生理的または病態生理的要求によって合目的あるいは非合目的に線溶現象その他を介して生体現象にかかわるであろうことは容易に想像されるところである。しかしながらこの plasminogen activator の本体に関してはまだ不明の点も多く、その意義に関してもさらに解明されなくてはならない問題は多い。この意味において activator 研究への一つの過程として、より簡便な、より高回収率の純化法を開発することは意義深いことである。

ある種の plasminogen activator は lysine, あるいは arginine の methyl-ester を分解する esterase であることが知られている。この性質を利用し lysine および arginine あるいはそれらの誘導体を支持体に固定化し、その affinity-chromatography を行なって plasminogen acti-

Fig. 1 Cetraxate

vator の分離を行なう試みがあり興味ある成績をあげている。

cetraxate は山村、藤井等によって開発された薬剤である。その構造はリデン誘導体であり、抗プラスミン作用はもちろん、胃潰瘍、十二指腸潰瘍その他消化管出血治療剤としての臨床応用が検討されている。ことに胃炎に対しては著効を示すとされている。著者等はこれらの点から本剤は抗 activator 作用を有するものと考えた場合によっては抗 thrombin 作用をも持つのではないかと類推し、本剤を sephrose-4B に固定化し activator, thrombin, plasmin,

* Separation of plasminogen activator by affinity-chromatography on cetraxate-agarose. (The 5th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 19, 1976).

** 東邦大学医学部第二外科〔〒143 東京都大田区大森西6-11-1〕, Tadaaki SHIBA, Setsuo TAKEUCHI, Takeru TERASHIMA, Kazuhiro KUBOTA, Jun TAKATSUKA, Yuzo URITA, Hiroki OZAWA, Kyoei NONAKA and Saburo AWAZU: The Second Department of Surgery, School of Medicine Toho University, Tokyo, Japan.

*** 同 生化学, Michiko IGARASHI and Toshio ASADA: Department of Biochemistry, School of Medicine, Toho University, Tokyo, Japan.

Table 1 Separation of Urokinase by Affinity-chromatography on Each Column
(mm×mm)

Column	Fr No.	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4	Fr 5
cetraxate-agarose	—	—	13×13	—	—	—
lysine-agarose	2×2	—	16×16	8×8	—	—
arginine-agarose	—	—	17×17	12×12	—	—
E.A.C.A.-agarose	9×9	—	15×15	4×4	—	—
sepharose-4B	15×15	—	8×8	—	—	—

Each fraction was put on standard plate. After the plates were left for 18 hours at 38°C each lysis area was estimated by measuring the product of two perpendicular diameters.

Fr 1: non adsorbed and 0.005M PBS eluted fraction

Fr 2: 0.005M PBS+0.85% NaCl eluted fraction

Fr 3: 0.005M PBS+1M NaCl eluted fraction

Fr 4: 0.005M PBS+2M NaCl eluted fraction

Fr 5: 0.1M HAC eluted fraction

plasminogen, 等の分離を試みた. さらにすでに報告したところの lysine-agarose, arginine-agarose をはじめに E.A.C.A.-agarose との比較検討を行なった. また, 本研究の意図するところは, 現在その測定が不確実である抗 activator 測定に逆説的に応用することができないかという点にもある.

I. 材料および方法

1. 実験材料

- 1) cetraxate-agarose: 自家製
- 2) lysine-agarose: 第一化学製
- 3) arginine-agarose: 第一化学製
- 4) E.A.C.A.-agarose: 自家製
- 5) sepharose-4B
- 6) ウシ plasminogen free fibrinogen: 第一化学製
- 7) ウシ plasminogen: 第一化学製
- 8) ウシ thrombin: 持田製薬製
- 9) urokinase: 市販品 (持田製薬製)
- 10) 種々の濃度に NaCl を含有する phosphate buffer (PBS) pH 7.5
- 11) 0.1M HAC
- 12) 新鮮人尿
- 13) ウサギ腎組織抽出液
〔6), 7), 8), 9)は 0.005M PBS 加 0.85% NaCl または 0.005M PBS で種々の濃度に溶解して使用した.〕

2. 測定法

1) 標準平板溶解能測定

0.2%ウシ plasminogen free fibrinogen 溶液中に 1u/ml になるようにウシ plasminogen を加えて混和したのち, ペトリシャーレにその 7 ml をとり, 25u/ml ウシ thrombin 液を 0.4ml 加えて混和後, 静置して標準平板を調製する. この平板上に被検液をマイクロピペットで正確に 0.004ml 滴下し, 37°C18時間の放置後, 溶解窓の測定を行なった.

2) Plasminogen free 平板溶解能測定法

0.2%ウシ plasminogen free fibrinogen 液 7 ml をペトリシャーレにとり, 25u/ml ウシ thrombin 液 0.4ml を加えて混和後静置して plasminogen free 平板を調製した. 測定は標準平板と同様にした.

3) Urokinase 平板溶解能測定法

0.2%ウシ plasminogen free fibrinogen 液に 10u/ml になるように urokinase を添加し混和, その 7 ml をペトリシャーレにとり 25u/ml ウシ thrombin 液 0.4ml を加えて混和後静置して urokinase 平板を調製した. 測定は標準平板と同様にした.

4) Thrombin 測定

0.2%ウシ plasminogen free fibrinogen 液 0.5ml に被検液を適宜に希釈して加えた後, 37°C温浴中で凝固時間を測定した.

3. 分離法

1) column の調製: cetraxate-agarose, lysine-agarose, arginine-agarose, E. A. C. A.-agarose, および sepharose-4B を 1ml づつ別個に 5 ml ディスポーザブル注射筒に入れ, 0.005M PBS で静かに洗浄したのち使用した.

2) sample の調製: 市販 urokinase 製剤溶液より urokinase の分離を行なう際は製剤を 0.005M PBS で 50u/ml に溶解して sample とした. 人尿中より urokinase の分離を行なう場合は 0.005M PBS で新鮮人尿を10倍に希釈して sample とした. plasminogen 液を sample とする場合は 0.005M PBS で 10u/ml に溶解して用いた. thrombin 液を sample とする場合は 0.005M PBS で 10u/ml に溶解して用いた. plasmin 液を sample とする場合は UK 活性化 plasmin 液を調製したのち lysine-agarose で処理して urokinase を除き, 10u/ml plasmin 液を調製して用いた.

3) 分離操作: 一定量の sample を各 column 上に静かに注ぎ未吸着部を得たのち, 種々の溶液の各 3 ml で順次溶出を行ない, 溶出された液を分画的に採取した. 測定にあたっては各分画および各 sample を被検液とした. また, 0.1M HAC で溶出した分画は 0.5M Na_2HPO_4 液で pH 7.4 に調節した.

II. 成 績

1. Urokinase の cetraxate-agarose への親和性 Lysine-agarose, arginine-agarose, E. A. C. A.-agarose 等への親和性を比較する目的で 50u/ml urokinase 溶液 1ml を sample とし各 column 分離操作を行なった. すなわち未吸着分画を得たのち, 0.005M PBS 3ml で溶出を行ない両者をあわせて Fraction 1 (Fr 1) とした. 以下 0.005M PBS 加 0.85% NaCl 3ml, 0.005M PBS 加 1M NaCl 3ml, 0.005M PBS 加 2M NaCl 3ml, 0.1M HAC 3ml で溶出を行ないそれぞれ Fr 2, Fr 3, Fr 4, Fr 5 とした. そして各 Fr を被検液として標準平板溶解能を測定した. その成績は表 1 に示すごとくである.

2. 吸着量の検討

Cetraxate-agarose, lysine-agarose, arginine-

Table 2 Separation of Urokinase from Urine by Affinity-chromatography on Each Column (mm×mm)

Fr No.	Fr 1	Fr 2	Fr 3
Column			
cetraxate-agarose	—	—	7×7
cetraxate-agarose (revived)	—	—	7×7
lysine-agarose	—	—	11.5×11.5
arginine-agarose	—	(—)	11×11
urine	13.5×13.5		

Fr 1: non adsorbed fraction

Fr 2: 0.005M PBS eluted fraction

Fr 3: 0.005M PBS+17 NaCl eluted fraction

agarose の各 1 ml に少なくとも何単位以上の urokinase が吸着されるかを検討する目的で 5 u/ml urokinase 溶液を sample として各 column に連続的に注ぎ, その未吸着分画を 3 ml 毎に分画的に採取し, それぞれを標準平板で測定した. 3 者とも第18分画までは溶解窓を全く形成せず, 少なくとも 1 ml について270単位以上の urokinase を吸着すると思われた.

3. 人尿中 urokinase の分離

10倍希釈尿各 50ml を sample として cetraxate-agarose, 再生 cetraxate-agarose, lysine-agarose, arginine-agarose 各 1ml の各 column にかけて未吸着分画, 0.005M PBS 3ml 溶出分画, 0.005M PBS 加 1M NaCl 溶出分画を標準平板と plasminogen free 平板で測定した. その成績はいづれの分画も plasminogen free 平板上には溶解窓を形成せず, また標準平板上の成績は表 2 に示すごとくであった.

4. Cetraxate-agarose によるその他の線溶関連物質の分離

50u/ml urokinase 溶液, plasminogen 溶液, plasmin 溶液, ウサギ腎組織抽出液, thrombin 溶液各 1ml を sample として cetraxate-agarose column で分離を行なった. 各 sample とも溶出条件は同一とし, 未吸着分画を採取した後, 0.005M PBS 加 0.15M NaCl, 以下, 0.005M PBS に 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.2M, 1.6M, 2.0M の NaCl を加えた溶液および 0.1M HAC の各 3ml で順次溶出を行ない, 各溶出分画を採取し被検液とした. urokinase 溶液系は標準平板で, ウサギ腎組織抽出液系は標準平板

Fig. 2 Separation of tissue activator and thrombin by affinity-chromatography on cetraxate-agarose.

Fig. 3 Separation of urokinase, plasminogen and plasmin by affinity-chromatography on cetraxate-agarose.

と plasminogen free 平板で, plasmin 系は plasminogen free 平板で, plasminogen 系は urokinase 平板で, また thrombin 系は I-2-4) に示した方法で測定した. 測定結果は sample を被検液とした測定結果を 100% として, それぞれの成績を%で表現した. 測定結果は図 2, 図 3 に示すごとくであった.

III. 考 案

Urokinase の cetraxate-agarose への親和性を検討した結果, urokinase は cetraxate に親和性を持つと考えられた. また, 他の column との比較においてその回収率は lysine-agarose, arginine-agarose よりも劣るものと思われた.

この回収率の低さの原因は cetraxate の urokinase への阻止作用とも考えられ, 本研究の基礎的段階で分子量 5 万前後を中心とするといわれる A 社製の urokinase 製剤を用いた場合と, 分子量 3 万前後を主成分とするといわれている B 社製の urokinase 製剤を用いた場合, その回収率に著るしい差のあることが認められたことと考えあわせると興味ある問題である. さらにこの成績は可逆的, および否可逆的阻止作用の鑑別にも応用し得ることを示している. cetraxate-agarose による他の線溶物質の分離のうち興味ある点は plasmin と plasminogen の回収性の差であり, 両者の分別回収の可能性を示唆するものとも思われた.

<ABSTRACT>

Separation of plasminogen activator by affinity-chromatography on cetraxate-agarose.

by

Tadaaki SHIBA, Setsuo TAKEUCHI, Take-ru TERASHIMA, Kazuhiro KUBOTA, Jun TAKATSUKA, Yuzo URITA, Hiroki OZAWA, Kyoei NONAKA, Saburo AWAZU, *Michiko IGARASHI and Toshio ASADA

from

The Second Department of Surgery and *Department of Biochemistry School of Medicine, Toho University, Tokyo, Japan.

It is known that the plasminogen activator of a certain type is an esterase for methyl-ester of lysine or arginine. And we reported the method of isolating urokinase and other

plasminogen activators, also by choosing lysine-agarose and arginine-agarose as the affinity-chromatography. Recently, we contrived a method which isolate urokinase, thrombin, plasmin, and plasminogen using affinity-chromatography on cetraxate-agarose. Cetraxate, one of methyl-ester of lysine and activator inhibitor, was produced by Fujii, Yamaura and others in 1971. So we would like to report them here.

The results were as following.

- 1; Urokinase was adsorbed to cetraxate-agarose, and was eluted with 0.005M phosphate buffer containing 0.85% NaCl.
- 2; Cetraxate-agarose seemed to have a possibility of the separation of plasmin from the mixture of plasmin and plasminogen.
- 3; It was suggested that affinity-chromatography on the inhibitor-agarose has a possibility of discrimination between reversible and irreversible inhibition mechanism.