ウロキナーゼに混在する蛋白分解酵素 および蛋白分解酵素阻害因子の分析*

宮 谷 勝 明**

ウロキナーゼ^{1,2)}は尿中に存在するプラスミノゲンアクトペターでトリプシン³⁾ ストレプトキナーゼ⁴⁾ やプロメライン⁵⁾ などと同じように、プラスミノゲンを活性化してプラスミンを生成させる酵素として知られている。

この酵素は臨床的に血栓溶解剤として広く用いられ、また、近年では抗癌剤との併用療法も行われ注目されている。

これに対して、臨床検査領域ではウロキナーゼ標準物質としてフィブリン体分解法、エステル分解法、さらにはカゼイン分解法⁶⁾ などの他に、ユーグロブリン分画にウロキナーゼを添加してプラスミノゲンを測定するときにも用いられている。⁷⁾

このウロキナーゼには夾雑物として凝固促進物質、蛋白など^{8,9)} が指摘されていることに注目して、著者は8社のウロキナーゼを実験の対象に用いて生物学的に蛋白分解酵素を、免疫化学的に蛋白分解酵素阻害因子を中心に検索を行うとともに、併せて共存因子について考察を加えたので、その成績を報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬

フィブリンノゲン: Behringer のヒトフィブリンノゲン 250 mg/vial を用いた。

トロンビン: Calbiochem. のヒトトロンビン500単位/vial のものを用いた。

抗ヒト蛋白分解酵素阻害因子家兎血清: Behringwerke の抗 α_1 -アンチキモトリプシン, 抗インター α_1 -トリプシンインヒビター, 抗 C1s-インヒビターを用いた。

蛋白分解酵素阻害因子の標準物質: Behringwerke の蛋白標準血漿と蛋白標準血清 B-I, B-II, B-III を用い

た。

アガロース: 半井化学薬品のアガロース A-37.

防腐剤: アジ化ナトリウム。

緩衝液: pH 8.6, イオン強度 0.05 のペロナール緩衝液を用いた。

2. 試 料

ウロキナーゼ: 持田製薬 (Lot No. B 950), 日立化成 (Lot No. UKI 516), 帝国臓器 (Lot No. KO 91), 興和 (Lot No. BG 805 M), 鐘紡 (Lot No. 0038N), ミドリ十字 (Lot No. 048RR5), 大塚製薬 (Lot No. 7A 82U1), 大五栄養化学 (Lot No. KM200) を実験時に乾燥重量で 30 mg/ml 溶液になるように生理食塩水を用いて溶解した。

3. フィブリン平板の作製¹⁰⁾

200 mg/dl ヒトフィブリンノゲン溶液 8.0 ml を直径 85 mm (内径 35 mm は空間), 高さ 4 mm でいわゆるドーナツ型のプラスチック製平板に入れ、ついで 20 単位/ml ヒトトロンビン溶液を 0.2 ml 加えてすばやく回転させてよく混和した後、厚さ 2 mm のフィブリン平板を作製した。

4. 免疫拡散板の作製¹¹⁾

アガロース 1.2 g, アジ化ナトリウム 100 mg をペロナール緩衝液 (pH 8.6, μ 0.05) 100 ml に混和した後、水浴中で加温して溶解した。溶解したアガロースが 56°C になったとき、抗血清を抗 α_1 -アンチキモトリプシンでは濃度 6.0%, 抗インター α -トリプシンインヒビターでは濃度 5.0%, 抗 C1s-インヒビターでは濃度 7.0% の割合で混和し、水平にしたプラスチック製の 7 検体用平板に 1 検体あたり 0.3 ml ずつ分注して厚さ 1 mm の平板を作製した。ついで、ゲル化したアガロースの中央に直径 2 mm の小孔をあけた。

* Analysis of fibrinolytic factors and proteinase inhibitors contained in urokinase reagents.

** Katsuaki Miyatani, 宇治黄蘗病院臨床検査科。

(受付 1980年10月22日)

5. 蛋白分解酵素の測定法¹⁰⁾

フィブリン平板上に各種の 30 mg/ml ウロキナーゼ溶液をマイクロシリンジで正確に 2.0 μ l 滴下し、静かに蓋をして室温に18時間放置した後、形成された溶解輪の直径を測定用スケール (2.0~14.0 mm) で測定した。

6. 蛋白分解酵素阻害因子の測定法

3種の免疫拡散板の小孔に各種の 30 mg/ml ウロキナーゼ溶液と3濃度の蛋白標準血漿をマイクロシリンジで正確に 3.0 μ l 分注してから、静かに蓋をして湿潤箱に入れ、室温に48時間放置した後、沈降輪の直径を測定用スケール (2.0~14.0 mm) で 0.1 mm の単位まで測定した。

得られた定量値は同時に測定した検量線から求めた。

α_1 -アンチトリプシン、アンチトロンビンⅢ、 α_2 -マクログロブリンの測定には Behringwerke の1元平板免疫拡散板^{12~14)}を用いて行った。

実験成績

1. ウロキナーゼに混在する蛋白分解酵素

各種のウロキナーゼ溶液を試料としてフィブリン溶解面積の測定を行った。

Fig. 1 に示したように、直接、フィブリンを分解したのはミドリ十字のみであった。他のウロキナーゼによる溶解輪は認められなかった。

2. ウロキナーゼに混在する蛋白分解酵素阻害因子

各種のウロキナーゼ溶液を抗原として6種の蛋白分解酵素阻害因子の測定を行った。

Table 1 に示したように、帝国臓器、大五栄養化学で

Fig. 1. ウロキナーゼに混存する蛋白分解酵素。

は C1s-インヒビター、ミドリ十字では α_1 -アンチトリプシンが定量された。

3. ウロキナーゼに混在する蛋白分解酵素阻害因子の占める割合

ウロキナーゼに混在する阻害因子蛋白量の総蛋白量に対する割合を Table 1 の結果より算出したところ、帝国臓器の C1s-インヒビターでは 0.3%、ミドリ十字の α_1 -アンチトリプシンと大五栄養化学の C1s-インヒビターではいずれも 0.2% であった。

Table 1. ウロキナーゼに混在する蛋白分解酵素阻害因子。

種 類	メーカー 製造番号	持田製薬	日立化成	帝国臓器	興和	鐘紡	ミドリ十字	大塚製薬	大化五栄養学
		B950	UKI5116P	KO91	BG805M	0038N	048RR5	7A82U1	KM200
α_1 -アンチトリプシン		—	—	—	—	—	6.4	—	—
α_1 -アンチキモトリプシン		—	—	—	—	—	—	—	—
アンチトロンビンⅢ		—	—	—	—	—	—	—	—
インター α -トリプシン インヒビター		—	—	—	—	—	—	—	—
α_2 -マクログロブリン		—	—	—	—	—	—	—	—
C1s-インヒビター		—	—	7.4	—	—	—	—	6.2

(mg/dl)

考察および総括

ウロキナーゼの分画は必ずしも容易でないとされるが、血栓溶解剤として治療に用いられることから、分画精製については各社で努力⁶⁾がなされている。

ウロキナーゼは治療薬として役割がきわめて大きな比重を占めているだけでなく、臨床検査領域においてもウロキナーゼ標準物質⁶⁾や線溶活性の測定試薬⁷⁾として広く用いられている。特に、線溶系酵素を測定するときに考慮を払うべき因子として、蛋白分解酵素とその阻害因子の混在であろうと考えられる。

市販ウロキナーゼをアフィニティクロマトグラフィにかけて約5倍の力価を有する純化精製¹⁵⁾が行われているが、この精製技術を臨床検査領域において応用するまでに至っていないのが現状であろう。

したがって、高純度のウロキナーゼを安価に入手することが現在のところきわめて難しいために、どうしてもウロキナーゼ以外の因子の出来るだけ混在していない製剤を選択する必要にせまられよう。

まず、プラスミノゲンの含まれていないヒトフィブリン平板上で各種のウロキナーゼについて蛋白分解酵素の検索を試みた。

ウロキナーゼはプラスミノゲンを活性して、生成されたプラスミンの作用によってフィブリンを分解することから、ミドリ十字のウロキナーゼの中にはフィブリンを分解する何らかの蛋白分解酵素が混在していることを示しているものとみられる。

ついで、各種のウロキナーゼの中に蛋白分解酵素阻害因子が混在しているか否かについて吟味した成績では、帝国臓器と大五栄養化学のウロキナーゼにC1s-インヒビターが、ミドリ十字のそれに α_1 -アンチトリプシンがそれぞれ定量された。

さらに、各種のウロキナーゼに混在する蛋白分解酵素阻害因子の存在量として表わした場合、帝国臓器のC1s-インヒビターでは0.3%、ミドリ十字の α_1 -アンチトリプシンと大五栄養化学のC1s-インヒビターではいずれも0.2%を占めていた。

いずれにしてもこのような成績から、ウロキナーゼの

精製を進めていく過程でどうしても収量が著しく減少するため、価格の点をも考慮して残存しているとみられる蛋白の中に α_1 -アンチトリプシンとC1s-インヒビターが除去しきれないで混在していたとも考えられる。

6種の蛋白分解酵素阻害因子のうち、 α_1 -アンチトリプシン、アンチトロンビンⅢ、 α_2 -マクログロブリン、C1s-インヒビターのプラスミンに対する阻害作用^{16,17)}が認められることを考え合わせれば、ウロキナーゼに混在する α_1 -アンチトリプシンとC1s-インヒビターはプラスミン作用機構に対して関与するものとみられるので、これらの因子の混入していないウロキナーゼ製剤が選ばれるべきであろう。

文 献

- 1) Williams, J. R. B. : British. J. Exp. Pathol., **32** : 530, 1951.
- 2) Sobel, G. W. et al. : Am. J. Physiol., **171** : 768, 1952.
- 3) Hagan, J. J. et al. : J. Biol. Chem., **235** : 1005, 1960.
- 4) Christensen, L. R. : J. Gen. Physiol., **28** : 363, 1945.
- 5) Opher, A. W. and Miller, J. M. : Exp. Med. Surg., **22** : 246, 1964.
- 6) 安部 英 : 総合臨床, **18** : 1734, 1969.
- 7) 松岡松三, 桜川信男 : 臨床血液, **7** : 513, 1966.
- 8) 延原正弘 : MRC ウロキナーゼ研究会 (西日本大会), 持田製薬, 東京, p. 1, 1977.
- 9) 五十嵐紀子 : MRC ウロキナーゼ研究会 (東日本大会), 持田製薬, 東京, p. 1, 1977.
- 10) 宮谷勝明, 福井 巖 : 臨床病理, **19** : 641, 1971.
- 11) Mancini, G. et al. : Immunochem., **2** : 235, 1965.
- 12) 宮谷勝明, 福井 巖 : 衛生検査, **24** : 291, 1975.
- 13) 宮谷勝明他 : 臨床検査, **19** : 80, 1975.
- 14) 宮谷勝明他 : 臨床検査, **18** : 317, 1974.
- 15) 田村禎通, 藤井節郎 : 臨床病理, **24** : 301, 1976.
- 16) 寺野由剛 : 化学の領域, 105号(増刊), 1, 1974.
- 17) 青木延雄, 諸井将明 : 代謝, **14** : 1099, 1977.