〔報 告〕

ヒトプラスミノゲン プラスミンに混在する
蛋白分解酵素 凝固および線溶因子の分析*

宮 谷 勝 明**

はじめに

線溶系酵素を測定することは線溶亢進状態の検索、また、血栓症における臨床検査の診断として血栓に伴う二次線溶の検索、さらには線溶療法における治療効果の判定などにきわめて重要^{1,2)}である。

ところが、正確な測定値を得ようとするにはどうしても高純度に精製されたヒトプラスミノゲンやヒトプラスミン³⁾が要求されているにもかかわらず、技術的にきわめて難しいために、この領域の研究者の間でさえも入手することは容易ではない。

著者は、すでに線溶系酵素を測定するための製剤、すなわち、ヒトフィブリノゲン^{4,5)} ヒトトロニン⁶⁾ さらにウロキナーゼ⁷⁾ に混在するとみられる蛋白分解酵素、凝固因子、線溶因子、蛋白分解酵素阻害因子を中心に検索を行い、共存因子から考察を加えてきたが、今回はヒトプラスミノゲンとヒトプラスミンの市販品を実験の対象に用いて、生物学的に蛋白分解酵素を、免疫化学的に凝固因子と線溶因子を検索するとともに、併せて共存因子から考察を加えたので、その成績を報告する。

実験方法

1. 試 薬

ヒトフィブリノゲン：Behringwerke のフィブリノゲン (Lot No. 140873) を実験時に 200 mg/dl フィブリノゲン溶液になるように生理食塩水で溶解した。

ヒトトロニン：Calbiochem のトロニン 500 u/vial (Lot No. 501803) を 20 u/ml トロニン溶液になるように生理食塩水を用いて溶解した。

抗ヒト凝固因子家兎血清：Behringwerke の抗プロトロンビン、抗第 VIII 因子、抗第 XIII 因子 Subunit A

および S を用いた。

凝固および線溶因子の標準物質：フィブリノゲン、プロトロンビン、プラスミノゲンは Behringwerke の蛋白標準血漿を用い、第 XIII 因子 Subunit A および S はミドリ十字 (Green Cross Corpo.) の製品を用いた。

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

ヒトプラスミノゲン：Kabi 社 (Lot No. 58806, Lot No. 70030, Lot No. 72680), ミドリ十字 (Lot No. RW003MO), Worthington Biochemical Corpo. (W. B. C., Lot No. 59B339, Lot No. 59C459) を実験時に乾燥重量で 5 mg/ml プラスミノゲン溶液になるように生理食塩水で溶解した。

ヒトプラスミン：Kabi 社 (Lot No. 58808), ミドリ十字 (Lot No. KU101YU, Lot No. PL-33, Lot No. PL-34, Lot No. PL-35) を実験時に乾燥重量で 5 mg/ml プラスミン溶液になるように生理食塩水で溶解した。

3. フィブリン平板の作製⁸⁾

200 mg/dl ヒトフィブリノゲン溶液 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プラスチック製平板に入れ、ついで 20 u/ml ヒトトロニン溶液を 0.2 ml 添加してすばやく回転させてよく混和して、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⁹⁾

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

* Analysis of proteinase, coagulant and fibrinolytic factors contained in human plasminogen and plasmin reagents.

** Katsuaki Miyatani, 宇治黄槿病院臨床検査科。
(受付 1981年11月28日)

になったとき、抗ヒト血清を抗プロトロンビン、抗第VIII因子、抗第XIII因子Subunit A およびSをいずれも濃度1.0%の割合で混和し、水平にした直径15 mm、高さ2 mmの小円型7検体分を含む直径60 mmの円型プラスチック製平板に1検体あたり0.3 mlずつ分注して厚さ1 mmのアガロースゲルを作製した。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。

5. 凝固および線溶因子の測定法

4種の免疫拡散板の小孔に各種の5 mg/ml ヒトプラスミノゲン溶液と5 mg/ml ヒトプラスミン溶液、さらに3濃度の蛋白標準血漿をマイクロシリンジで3.0 μ l分注してから、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。

フィブリノゲン、プラスミノゲンの測定にはBehringwerkeの免疫拡散板^{10,11)}を用いた。得られた定量値は同時に測定した検量線から求めた。

6. 蛋白分解酵素の測定法

フィブリン平板上に各種の5 mg/ml ヒトプラスミノゲン溶液と5 mg/ml ヒトプラスミン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0.1 mmの単位まで測定した。

実験成績

1. ヒトプラスミノゲンのフィブリン溶解面積

Kabi社3種、ミドリ十字1種、W.B.C. 2種をそれぞれ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、フィブリンを溶解したのはW.B.C.のLot No. 59B339が最も大きく、ついでW.B.C.のLot No. 59C459、ミドリ十字のLot No. RW003MO、Kabi社のLot No. 58806の順に縮小した。一方、Kabi社のLot No. 70030、Kabi社のLot No. 72680による溶解輪は認められなかった。

2. ヒトプラスミンのフィブリン溶解面積

Kabi社2種、ミドリ十字4種をそれぞれ試料としてフィブリン溶解面積の測定を行った。

Fig. 2に示したように、Kabi社のLot No. 58808が最も大きく、ついでミドリ十字のLot No. KU101YU、Kabi社のLot No. 60857、ミドリ十字のLot No. PL-34、ミドリ十字のLot No. PL-33、ミドリ十字のLot No. PL-35の順に縮小した。

Fig. 1. ヒトプラスミノゲンのフィブリン溶解面積。

Fig. 2. ヒトプラスミンのフィブリン溶解面積。

Table 1. ヒトプラスミノゲンに共存する凝固および線溶因子.

	Kabi 社			ミドリ十字	Worthington 社	
	58806	70030	72680		59B339	59C459
フィブリノゲン	—	—	—	—	—	—
プロトロンビン	—	—	—	—	—	—
第 VIII 因子	—	—	—	—	—	—
第 XIII 因子 Subunit A	—	—	—	—	—	—
第 XIII 因子 Subunit S	—	—	—	—	—	—
プラスミノゲン (mg/dl)	4.7	4.8	4.8	4.9	4.4	4.1

3 回測定の平均値

Table 2. ヒトプラスミンに共存する凝固および線溶因子.

	Kabi 社		ミドリ十字			
	58808	60857	KU101YU	PL-33	PL-34	PL-35
フィブリノゲン	—	—	—	—	—	—
プロトロンビン	—	—	—	—	—	—
第 VIII 因子	—	—	—	—	—	—
第 XIII 因子 Subunit A	—	—	—	—	—	—
第 XIII 因子 Subunit S	—	—	—	—	—	—
プラスミノゲン (mg/dl)	13.4	29.6	15.6	5.6	6.0	5.6

3 回測定の平均値

3. ヒトプラスミノゲンに共存する凝固および線溶因子

フィブリノゲン, プロトロンビン, 第 VIII 因子, 第 XIII 因子 Subunit A および S については実験 1. で用いた試料を抗原として測定を行ったのに対して, プラスミノゲンについては実験 1. で用いた試料の 1/100 倍の濃度を抗原として測定を行った.

Table 1 に示したように, プラスミノゲン以外のフィブリノゲン, プロトロンビン, 第 VIII 因子, 第 XIII 因子 Subunit A および S では沈降輪の形成は認められなかった.

4. ヒトプラスミノゲンの比較含有率

各種のヒトプラスミノゲンに含まれるプラスミノゲン量の総蛋白量に対する割合を Table 2 の結果より算出したところ, ミドリ十字の Lot No. RW003MO では 98%, Kabi 社の Lot No. 70030 と Lot No. 72680 とでは 96%, Kabi 社の Lot No. 58806 では 94%, W.B.C. の Lot No. 59B339 では 88%, W.B.C. の Lot No. 59C459 では 82% であった.

5. ヒトプラスミンに共存する凝固および線溶因子

実験 2. で用いた試料を抗原としてフィブリノゲン, プロトロンビン, 第 VIII 因子, 第 XIII 因子 Subunit A および S, さらにプラスミノゲンの測定を行った.

Table 2 に示したように, プラスミノゲン以外のフィブリノゲン, プロトロンビン, 第 VIII 因子, 第 XIII 因子 Subunit A および S では沈降輪の形成は認められなかった.

6. ヒトプラスミンに混在するプラスミノゲンの占める割合

各種のヒトプラスミンに混在するプラスミノゲン量の総蛋白量に対する割合を Table 2 の成績より算出した結果, Kabi 社の Lot No. 60857 では 5.9%, ミドリ十字の Lot No. KU101YU では 3.1%, Kabi 社の Lot No. 58808 では 2.7%, ミドリ十字の Lot No. PL-34 では 1.2%, ミドリ十字の Lot No. PL-33 と Lot No. PL-35 では, ともに 1.1% であった.

考察および総括

プラスミノゲンやプラスミンは電気泳動学的に β -グロブリン分画に易動度をもつ蛋白¹²⁾である. 近年, プラス

ミノゲンの精製法については、リジンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィを用いて特異的に吸着させることが報告されて以来、比較的簡単に行えるようになった¹⁸⁻¹⁹⁾ し、プラスミンについても N- α -ホモアルギニンヘキシルエステルやストレプトキナーゼをアガロースに結合させ、EDTA 処理したユーグロブリン分画を出発物質として精製純化が行われている。^{3,17)}

しかしながら、これらの精製技術が多くの臨床検査施設において実施されることは容易でないと考えられる。検査室の実状としては、どうしても市販製剤に頼らざるを得ないことから、プラスミノゲンやプラスミンを用いたい場合、必然的に線溶系酵素に影響を及ぼす因子が共存していない製剤の選択にせまられることになる。

まず、プラスミノゲンの混在していないヒトフィブリン平板上で各種のプラスミノゲン溶液を滴下して溶解面積の測定を行ったところ、プラスミノゲンの純度は高ければ高い程、フィブリンを分解する作用も少ないと解釈されることから、Kabi 社の3種のうち Lot No. 70030 と Lot No. 72680 についてはきわめて高純度の製剤であることを示しているものとみられる。

W.B.C. の2種のヒトプラスミノゲンについてはミドリ十字のそれよりも、直接、フィブリンを分解する蛋白分解酵素の含有量がより多く共存していることを示唆するものである。また、これらの製剤のパラツキは、製造会社の間だけでなく、製造番号の間においても確認された。

次に、ヒトプラスミンについては、ミドリ十字の Lot No. PL-34, Lot No. PL-33, Lot No. PL-35 のフィブリン溶解面積は、Kabi 社の Lot No. 58088, ミドリ十字の Lot No. KU101YU, Kabi 社の Lot No. 60857 のそれらに比較して明らかに縮小していた。

このように、ヒトプラスミンについてもヒトプラスミノゲンと同じように、製造会社の間による差だけでなく、製造番号の違いによる差もみられるので、一連の実験に際してはあらかじめ吟味を行った上で用いる必要がある。

製剤に共存する因子については各種のヒトプラスミノゲン、ヒトプラスミンともプラスミノゲン以外の因子は定量されなかった。ヒトプラスミノゲンの中で95%以上の比較含有率を示していたのは、Kabi 社の Lot No. 58808 と Lot No. 60857, ミドリ十字の Lot No. KU101YU であった。

ヒトプラスミンについては、全ての製剤にプラスミノゲンの混在が確かめられたことから、現在のところプラスミノゲンを完全に除去することは技術的に容易でないことを示唆しているものと考えられる。

ヒトプラスミンに混在するプラスミノゲンの存在量として表わした場合、ミドリ十字の Lot No. PL-34, Lot No. PL-35 の占める割合は、純度の点ですぐれているとみられる Kabi 社の Lot No. 60857, ミドリ十字の Lot No. KU101YU, Kabi 社の Lot No. 58808 の占め割合よりも明らかに低い値を示した。このことは精製純化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に、価格の点をも考慮して他の蛋白が添加されているものと推論される。

いずれにしてもヒトプラスミノゲンは、蛋白分解酵素の混在していない製剤が選ばれるべきである。一方、ヒトプラスミンについては最も強いフィブリン溶解作用が認められていることと、混在しているプラスミノゲン量が出来だけ少ないこと、現在のところこの両者を考慮に入れた上で製剤が選ばれるべきであると考えられる。

文 献

- 1) 田中健蔵：臨床病理，**22**：531，1974.
- 2) 藤巻道男，青木延雄：臨床病理，**24**：297，1976.
- 3) 田村禎通，藤井節郎：臨床病理，**24**：301，1976.
- 4) 宮谷勝明：臨床病理，**26**：801，1978.
- 5) 宮谷勝明：臨床病理，**27**：537，1979.
- 6) 宮谷勝明：生物物理化学，**23**：325，1980.
- 7) 宮谷勝明：生物物理化学，**24**：353，1981.
- 8) 宮谷勝明，福井 巖：臨床病理，**19**：641，1971.
- 9) Mancini, G. et al. : Immunochem., **2** : 235, 1965.
- 10) 宮谷勝明他：臨床検査，**17**：780，1973.
- 11) 宮谷勝明他：臨床検査，**18**：882，1974.
- 12) 河合 忠：血漿蛋白，基礎と臨床，東京，医学書院，1969，p. 256.
- 13) Deutsch, D. G. and Mertz, E. T. : Science, **170** : 1095, 1970.
- 14) Rickli, E. E. and Cuendet, P. A. : Biochim. Biophys. Acta, **250** : 447, 1971.
- 15) Liu, T. H. and Mertz, E. T. : Can. J. Biochem., **49** : 1055, 1971.
- 16) Brockway, W. J. and Castellino, F. J. : J. Biol. Chem., **246** : 4641, 1971.
- 17) 藤井節郎，村松 睦：医学のあゆみ，**86**：388，1973.