薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (2) 186-192 (1983)

ブタ膵カリクレインのエンザイムイムノアッセイに関する研究

柴田 正, 長谷川隆一, 持田研秀

国立衛生試験所大阪支所

Studies on the Enzyme Immunoassay of Hog Pancreatic Kallikrein

TADASHI SHIBATA,* RYUICHI HASEGAWA and KENSU MOCHIDA

National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch,

Hoensaka, Higashi-ku, Osaka

(Received July 19, 1982)

Hog pancreatic kallikrein A and B were separated by DEAE-Sephadex A-50 chromatography and purified by preparative high performance liquid chromatography (TSK GEL G2000 SW column). Kallikrein A and B were homogeneous in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Antisera were elicited in rabbits by immunization of these purified antigens. The precipitin lines formed during diffusion of kallikrein A and B against the antisera, using double diffusion method, were completely confluent and relative cross reactivity of respective antisera were quite similar.

The Fab' fragments were conjugated with β -D-galactosidase using *N,N*-o-phenylenedimaleimide as a coupling reagent. Using this antibody-enzyme complex, it was possible to determine as little as 1 ng/ml of kallikrein by the sandwich enzyme immunoassay.

The results obtained with various samples of kallikrein (K-1000, K-200, K-100 and K-25) were in accord with the activities of biological assay.

Keywords—hog pancreatic kallikrein; kallikrein A and B; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; high performance liquid chromatography; enzyme immunoassay; sandwich method

キニン遊離酵素カリクレインの定量法として古くより Frey unit²⁾ を基にし、イヌ頸動脈圧降下測定法およびイヌ股動脈血流増加法³⁾ が我が国では採用されているが、生物的検定法は操作が煩雑である。一方 *in vitro* の力価測定法のうち、合成基質のアルギニンエステルを用いる esterolytic activity 測定法は夾雑するトリプシン⁴⁾、キモトリプシン⁴⁾ の影響を受け易く、また、キニノーゲンを基質に遊離するキニンの測定にはラジオイムノアッセイ⁵⁾、平滑筋収縮作用を測定する方法⁶⁾ が用いられているが、キニン分解酵素キニナーゼ⁷⁾ の影響を受け易く、予め妨害する酵素を除去する必要がある。この理由から特異性の高いラジオイムノアッセイ⁸⁾ およびエンザイムイムノアッセイの開発が進められた。エンザイムイムノアッセイは安全性が高く、特に多価抗原に対してサンドイッチ法は感度が優れており⁹⁾ 近年 ricin¹⁰⁾ immunoglobulin G¹¹⁾ thyroid-stimulating hormone¹²⁾ α -fetoprotein¹³⁾ などの糖たん白質の測定に適用されている。本研究ではエンザイムイムノアッセイのカリクレインへの適用と標準化の可能性について検討した。

実 験 の 部

試薬および試料

ブタ膵カリクレイン (EC 3.4.4.21): Bator 社より供与された 1180 KU/mg の活性を有する凍結乾燥品、K-1000, K-200, K-100, K-25 は東京理大(故)森脇教授より共通試料(厚生科学研究用)として配布された。p-Toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) は東京化成 KK, β -D-galactosidase (EC 3.4.1.23, *E. coli*), ペプシンは Boeringer Mannheim 社(西ドイツ), ウシ血清アルブミン (Fraction V) は片山化学 KK, *N,N*-o-phenylenedimaleimide は Aldrich 社(アメリカ), DEAE セルロースは生化学工業 KK, DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-150, G-25 および Sepharose 4B は Pharmacia Fine Chemicals 社(スウェーデン), 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside は Sigma Chemicals 社(アメリカ), 4-methylumbelliferone は片山化学 KK, コ

ロジオンパック (SM 13200) は Sartrius-Membranefilter GmbH (西ドイツ). その他の試薬特級品を購入して用いた. 緩衝液 A として, 0.1 M 塩化ナトリウム, 1 mM 塩化マグネシウム, 0.1% アジ化ナトリウムおよび 0.1% ウシ血清アルブミンを含有する 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いた. また緩衝液 B として, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を用いた.

装置

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ウォーターズ製 3000 A ポンプ, 日本分光製 UVIDEK 100-II 型紫外線検出器, 東洋曹達製 TSK GEL G-2000 SW (0.75×60 cm) カラム.

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Pharmacia Fine Chemicals 製 GE-4II 型.

実験方法

カリクレイン A および B の精製 500 KU/mg の効力を有するカリクレイン 200 mg をとり, DEAE Sephadex A-50 クロマトグラフィー (1.5×40 cm) に負荷し, 0.2—0.55 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) の濃度勾配溶出後, カリクレイン A (525—625 ml) および B (625—700 ml) の各画分を集め, 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で透析後, コロジオンバッグを用いて全量を 2 ml に濃縮し, HPLC (溶媒: 0.05% デオキシコール酸ナトリウム, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5), 溶出速度: 1.0 ml/min, UV: 280 nm) を用いて精製した. 得られた画分は精製水で透析後, 凍結乾燥した.

抗体作成 カリクレイン A および B 各々 1 mg を生理食塩水 1 ml に溶かし, Complete Freund's adjuvant に懸濁し, 雄性家兎の背部数ヶ所に分け皮下注射した. 1 週間毎に 2 回追加免疫し, 3 ヶ月後に採血して得た血清を硫酸ナトリウム法¹⁴⁾により免疫グロブリンを分画し, 更に DEAE セルロースクロマトグラフィー¹⁵⁾を用いて IgG のフラクションを調製した.

家兎 IgG より Fab' の調製 Nisonoff らの方法¹⁶⁾に従い, 上述の調製した IgG 10 mg をとり, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に 4°C, 1 夜透析し, 0.2 mg のペプシンを加え, 37°C, 16 時間インキュベートした. 反応液を 1 N NaOH で pH 8.0 となし, Sephadex G-150 (1.0×40 cm) に負荷し, 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて溶出した. 各フラクションは 280 nm の吸収を測定して溶出画分を集めた. コロジオンバッグで濃縮し, 緩衝液 B で透析した後, F(ab')₂ の 2 mg 相当量を取り, 10 mM 2-mercaptoethylamine の緩衝液 B 溶液 2 ml を加え, 37°C, 90 分間インキュベートした. Sephadex G-25 (1.0×40 cm) カラムに負荷し, 緩衝液 B を用いて溶出し, 低分子物質を除去した.

抗体-酵素複合体の調製 Kato らの方法¹⁷⁾に従い, Fab' 2 mg 相当量を取り, 緩衝液 B に飽和溶解させた *N,N*-*o*-phenylenedimaleimide 溶液 (約 0.75 mM) 1 ml 中に 0°C で滴下し, 30°C, 20 分間放置した後, 緩衝液 B で平衡化した Sephadex G-25 カラムを通して未反応の *N,N*-*o*-phenylenedimaleimide を除去した. 得られた Fab'-dimaleimide の 0.5 mg 相当量を取り, 30°C, 20 分間インキュベートし, 1 N NaOH で pH 7.0 となし, 4°C, 1 夜放置後, 緩衝液 A で平衡化した Sepharose 4B (1.5×40 cm) カラムを通して未反応の Fab' を除去した.

サンドイッチ法 操作法は Kato らの方法¹⁷⁾を準用した. 即ちシリコンゴム片 (3×2.5 mm) を抗カリクレイン IgG の 0.1% 溶液に浸して 4°C, 24 時間放置し, 洗浄後小試験管にとり, 各種濃度の標品のカリクレイン溶液または試料溶液を 50 μl および緩衝液 A を 100 μl 加え, 37°C, 48 時間インキュベートした. 4°C, 1 夜放置後洗浄し, 緩衝液 A を 150 μl および抗体-酵素複合体を 4000 U 加え, 37°C, 5 時間インキュベートし, 緩衝液 A で洗浄後, 酵素活性を測定した.

β-D-Galactosidase 活性 試料に 3×10⁻⁴ M 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside 緩衝液 A 溶液 50 μl を加え, 30°C, 10 分間インキュベートし, 0.1 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 10.3) を 2.5 ml 加えて反応を止め, 10⁻⁶ M 4-methylumbelliferone を対照とした. 励起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm で蛍光を測定して酵素活性を求めた.

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Weber らの方法¹⁸⁾に従って 10% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (0.5×6 cm), 0.1% SDS, トリス塩酸緩衝液 (pH 8.9) を用い, ゲル 1 本当たり 2 mA の電流を 3 時間通電した.

Esterolytic Activity 森脇らの方法¹⁹⁾に従った. 基質に TAME を用い, 水解によって生じたメタノールを酸化して生成したホルムアルデヒドをクロモトロップ酸で呈色させ, 吸光度を測定した.

結 果

カリクレインの精製

Fig. 1 の DEAE Sephadex A-50 による溶出曲線に示されるように, カリクレイン A と B が分離されたが,

Fig. 1. Separation of Kallikrein A and B on DEAE-Sephadex A-50

The column (1.5 × 40 cm) was equilibrated with 0.2 M ammonium acetate pH 6.7. 100 mg of partially purified kallikrein were applied. Elution was performed a linear gradient 0.2 → 0.55 M ammonium acetate pH 6.7 obtained with a mixing chamber.

—●—: absorbance at 280 nm,
—○—: esterolytic activity.

各試料の含量はそれぞれの検量線の最も勾配の大きい点（縦軸の 40 unit/assay tube 付近）における標品と試料の重量比から求めた。その結果を Table II に示す。共通試料の K-1000, K-200, K-100 および K-25 の K の後の数値は血流増加法によるおよその KU/mg 値を示し、また Bayer 社より供与された高純度のカリクレイン

各分画の HPLC クロマトグラムは Fig. 2 の chart 2 に示されるように夾雑物が認められた。しかし HPLC を用いてカリクレイン画分を分取したところ、chart 1 に示されるように A, B 画分ともに単一ピークとなった。これはリサイクルを繰り返しても単一ピークを示した。凍結乾燥品として、カリクレイン A: 5.8 mg, B: 9.7 mg を得た。また SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像は Fig. 3 に示すようにそれぞれ 1 バンドであった。

抗血清の交差性

寒天二重拡散法による沈降線は Fig. 4 に示されるように完全融合し、A, B 間の抗原特異性の差異は認められなかった。また Table I に示すようにエンザイムイムノアッセイにおける交差性に差異は認められなかった。

エンザイムイムノアッセイ

Fig. 5 に示されるように片対数プロット法による標品の検量線は 1 ng/ml—1 μg/ml の範囲で測定が可能であり、1.6 ng/assay tube を用いた測定値の偏差 (c.v. 値) は 3.2% で、日差変動は 6.6% であった。

Fig. 2. Liquid Chromatograms of Divided Kallikrein A (K-A) and Kallikrein B (K-B) by DEAE-Sephadex A-50

Chart 1. (A) divided K-A, (B) divided K-B.

Chart 2. (C) K-A separated by DEAE-Sephadex A-50,

(D) K-B separated by DEAE-Sephadex A-50.

Chart 3. partially purified kallikrein K-500 (500 KU/mg).

Conditions

Column: Toyo Soda TSK GEL G2000 SW (0.75 × 60 cm). Column Temp.: Room Temp. Mobile phase: 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5 containing 1.2% NaCl and 0.05% sodium deoxycholate. Flow rate: 1.0 ml/min. Detector: UV (280 nm). Sensitivity: × 0.08.

Fig. 3. SDS Disk Gel Electrophoresis of Kallikrein A and B

Electrophoresis was carried out in 10% polyacrylamide gel at pH 8.9 in Tris-glycine buffer for 3 h at 2 mA/gel. Gels were stained with Amide black.

Fig. 4. Immunodiffusion in 1% Agarose, using a Petri Dish of the Hog Pancreatic Kallikrein A and B against Kallikrein A and B Specific Rabbit Antiserum

20 μ g of each kallikrein dissolved in 50 μ l of phosphate buffered saline pH 7.2, were applied in the under well, 150 μ l of antiserum in the upper well. After diffusion (48 h), unprecipitated proteins were washed off and the precipitate was stained with Amide black.

A: kallikrein A, B: kallikrein B,
Anti-A: anti-A serum, Anti-B: anti-B serum.

TABLE I. Cross Reactivity of Anti-kallikrein A and B antiserum against Kallikrein A and B by Enzyme Immunoassay

Antiserum	Kallikrein	Recovery	<i>n</i>	S.D.
Anti-A	K-B	100.6	6	5.4
Anti-B	K-A	99.0	6	6.9

The amounts of kallikrein A and B were 1.6 ng per assay tube.

の 1180 KU/mg を基準とすると、エンザイムイムノアッセイの結果から換算して各試料の KU 値は 983, 189, 112 および 21 KU/mg となり、従来の生物検定法で得られた効力比とほぼ一致する結果が得られた。

Esterolytic Activity

Table II に示されるように Bayer-K を基準にして換算するとそれぞれ 1021, 565, 469 および 88 となり、K-1000 では生物学的効力比とほぼ一致したが、他は一致しなかった。

試料中の夾雑物

HPLC の溶出曲線と SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像を Fig. 6 に示すが、Bayer-K は高純度であるが K-1000 以下 K-25 まで含量が低くなると夾雑物の増加が認められた。

Fig. 5. Immunoassay of Kallikrein with the Rabbit (Anti-Kallikrein) Antibody Fab'- β -D-Galactosidase Complexes by the Sandwich Method

—○—: purified K, —▲—: K-200,
—●—: Bayer-K, —×—: K-100,
—△—: K-1000, —◇—: K-25.

TABLE II. Determination of Kallikrein in Various Samples by Enzyme Immunoassay and Enzymatic Method

Samples	Enzyme immunoassay (%)	CV (%)	Biological activity (KU/mg) (Calcd)	Enzymatic activity ^{a)}	Biological activity (KU/mg) (Calcd)
Purified-K	100.0 ± 1.8	1.8	—	12.5 ± 0.15	—
Bayer-K	95.8 ± 1.1	1.14	1180	11.9 ± 0.13	1180
K-1000	79.8 ± 2.6	3.7	983	10.3 ± 0.17	1021
K-200	15.3 ± 1.1	7.0	189	5.7 ± 0.20	565
K-100	4.1 ± 0.8	8.2	112	4.7 ± 0.15	469
K-25	1.7 ± 0.1	5.7	21	0.89 ± 0.09	88

a) μ mol/min/mg, using TAME by the Chromotropic acid method. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of nine experiments.

Fig. 6-2

Fig. 6. Liquid Chromatography and SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Various Samples

K-1000 (1000 KU/mg), K-200 (200 KU/mg), K-100 (100 KU/mg), K-25 (25 KU/mg), Bayer-K (1180 KU/mg).

HPLC conditions

Column: Toyo TSK GEL G2000 SW (0.75 $\times$ 60 cm). Mobile phase: 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5, containing 1.2% NaCl and 0.05% sodium deoxycholate. Flow rate: 1.0 ml/min. Detector: UV (280 nm), Sensitivity: $\times 0.08$.

Electrophoresis

Gel: 10% polyacrylamide gel in Tris-glycine buffer, pH 8.9. Electrophoresis: 2 mA/gel for 3 h. Stain: Amide black.

考 察

ブタ膵カリクレインは A, B 2 種類の isoenzyme が存在し, アミノ酸組成は同一で, 糖鎖部分の異なること²⁰⁾ が知られているが, 生物活性および esterolytic activity は同等であるとされている.²¹⁾ 現在用いられている沈殿法とイオン交換法を併用した精製法では A と B の混合物であるため, A の抗 B, B の抗 A に対する交差反応性を調べ, エンザイムイムノアッセイに及ぼす影響を検討した.

A, B を単離するには DEAE Sephadex A-50 を用いて分画し, 更に数種の Sephadex を用いて精製する手法が用いられている²²⁾が, 操作工程が長く, 試料を多量必要とする. そこで HPLC を用いて容易に少量の試料を精製することが可能となった.

水溶媒系 GPC カラム (TSK GEL) を用いた分離過程で esterolytic activity の低下は認められなかった. また A および B は Fig. 2 および 3 に示されるように HPLC でそれぞれ 1 ピーク, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像は 1 バンドを示し, 高純度であることが認められた.

ところで Ikekita ら^{20b)} は isoelectric focusing によって A はさらに 2 つの, B は 3 つの subtype に分離されるが, sialidase 処理によって subtype は消失し, A, B それぞれ 1 ピークになると報告している. そこで抗 A, 抗 B 抗血清の B, A に対する交差性に差異があるときはさらに 5 つの subtype 間の交差性を確かめる必要がある. まず精製 A, B に対する抗血清は Table I, Fig. 4 に示されるように A および B に対し交差性はおよそ 100 % であった. 即ち subtype 間の交差性の有無に関わらず, 抗 A, 抗 B 抗血清に対し, A, B いずれもがエンザイムイムノアッセイの標品として用いられることを示す.

組織内カリクレイン様物質もブタ膵カリクレインと共通の抗原決定基をもつこと²³⁾が明らかにされている. 現在医薬品原料にはブタ膵臓のみが用いられる. 従って他臓器起源のカリクレインを医薬品として用いるときは, 本法の適用にあたって各々の交差性を検討することが必要である. また製剤, 特に錠剤の定量に際し, 酵素活性が損失するにもかかわらず抗原性を保持した形のカリクレインの存在の有無を確認し, もし交差性が無視し得ない程度あるならば, 特異抗体の精製を考慮する必要がある.

試料 5 種の電気泳動像および HPLC の溶出曲線において含量が低くなると夾雑物の増加が認められるが, Fig. 5 の検量線に示されるように低含量の活性の勾配が標品より小さいため, 定量値の c.v. 値が大きい原因の 1 つになる. また定量値から換算した KU 値は生物学的効力比とほぼ一致する結果を得た. 一方 K-200, K-100 および K-25 の esterolytic activity は夾雑する他の加水分解酵素のため高く, またキニン測定法では夾雑するキニナーゼがブラジキニン, カリジンを分解し, キニノーゲンを基質としたキニン遊離活性の測定は不可能であること²⁴⁾がわかった.

以上今回開発したエンザイムイムノアッセイは特異性と感度に優れ, また定量値は生物学的効力比とほぼ比例することが判明した. 本法は *in vitro* のカリクレイン標準化の一方法として有力であると認められる.

謝辞 本研究に際し終始御指導を賜りました大阪大学薬学部 青沼 繁教授に深謝いたします.

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第 102 年会で発表, 大阪, 1982 年 4 月.
- 2) a) E.K. Frey, "Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren," Ferdinand Enke, Stuttgart, 1968, p. 10; b) E.K. Frey, H. Kraut, E. Werle, "Kallikrein (Padtin)," Ferdinand Enke, Stuttgart, 1950.
- 3) C. Moriwaki, Y. Hojima, H. Moriya, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 975 (1974).
- 4) a) H. Kato, T. Suzuki, *J. Biochem. (Tokyo)*, **68**, 9 (1970); b) S. Naito, M. Matsumoto, S. Niki, H. Yoshihara, *薬理と治療*, **4**, 83 (1976).
- 5) M.L. Mashford, M.L. Roberts, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2727 (1972).
- 6) I. Trautshold, "Bradikinin, Kallidin and Kallikrein," *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 25, ed. E.G. Erdös, Springer-Verlag, New York, 1960, p. 52.
- 7) E.G. Erdös, *Adv. in Pharmacol. and Chemother.*, **4**, 1—90 (1966).
- 8) a) E. Fink, "Kininogenases, Kallikrein, 4, Physiological Properties and Pharmacological Rationals," ed. by G.L. Harberland, J.W. Rohen and T. Suzuki, 1977, p. 47; b) K. Mann, R. Gerger, *ibid.*, 1977,

- p. 55; c) E. Fink, J. Seerfert, C. Guttel, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **290**, 183 (1978); d) 矢内原昇, 第三回キニン研究会予稿集, 福岡, 1979年, p. 19.
- 9) Y. Hamaguchi, K. Kato, E. Ishikawa, K. Kobayashi, N. Kakinuma, *FEBS Lett.*, **69**, 11 (1976).
- 10) N. Koja, T. Shibata, K. Mochida, *Toxicon*, **18**, 611 (1980).
- 11) E. Ishikawa, S. Yoshitake, Y. Endo, S. Ohtaki, *FEBS Lett.*, **111**, 353 (1980).
- 12) E. Ishikawa, Y. Hamaguchi, M. Imagawa, M. Inada, H. Imura, N. Nakazawa, H. Ogawa, *J. Immunology*, **1**, 385 (1980).
- 13) 加藤兼房, 石川栄治, 臨床病理, **25**, 373 (1977).
- 14) R.A. Kekwick, *Biochem. J.*, **34**, 1248 (1940).
- 15) H.B. Levy, H.A. Sorber, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 250 (1960).
- 16) A. Nisonoff, M.M. Livers, *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 460 (1961).
- 17) K. Kato, Y. Hamaguchi, H. Fukui, E. Ishikawa, *J. Immunol.*, **116**, 1554 (1976).
- 18) K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- 19) 森脇千秋, 井上典子, 法島義男, 守屋 寛, 薬誌, **91**, 413 (1971).
- 20) a) H. Fritz, I. Eckert, E. Werle, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **328**, 15 (1962); b) M. Ikekita, H. Moriya, S. Ogawa, K. Kizuki, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 545 (1981).
- 21) a) H. Fritz, I. Eckert, E. Werle, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1087 (1967); b) *Idem, ibid.*, **351**, 1002 (1970); c) F. Fiedler, G. Leysath, E. Werle, *Eur. J. Biochem.*, **36**, 152 (1973).
- 22) C. Kutzbach, G.S. Kastner, "Kininogenases, Kallikrein, 1st Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationals," ed. by G.L. Harberland and J.W. Rohen, F.K. Schatteruer Verlag, Stuttgart, New York, 1972, p. 23.
- 23) 大軽靖彦, 矢内原千鶴子, 矢内原昇, 日本薬学会第 102 年会講演要旨集, 1982, p. 217.
- 24) a) 森脇千秋, 昭和 55 年度厚生科学研究報告; b) 藤本幸男, 薬物療法, **10**, 483 (1977).