

線維素(原)溶解酵素系研究法としての Euglobulin

分層法の意義と吟味(産婦人科出血および

血液凝固に関する研究 第5報)

Supplementary Studies on the Euglobulin Fraction Method as
a Tool of Reserch of Fibrino(geno)lytic Enzyme System.

(Hemorrhage and Blood Coagulation in Obstetrics and Gynecology. Report 5)

弘前大学医学部産科婦人科学教室(主任 品川信良教授)

真木 正博 Masahiro MAKI 佐藤 利広 Toshihiro SATO

菊池 永清 Eisei KIKUCHI

従来、線維素(原)溶解酵素(以下線溶酵素と略す)については極めて多くの研究が行なわれており、その測定法も非常に多彩であり、これらに関する綜説的報告も少なくない^{1)~4)}。どういう測定法を用いるかということは、研究目的によつて当然異なるわけであるが、ここでは euglobulin 分層のカゼイン分解法について報告する。

Euglobulin 分層法は Loomis⁵⁾, Downie⁶⁾, Kaula⁷⁾ や早川⁸⁾によつてすでに発表されているところであり、特に目新しい方法ではない。しかしこの方法の線溶酵素系で占める位置とか、本法を用いた場合の活性度の解釈とか、その意義等に関しては、必ずしも正しく理解されてはいない。また一方、この euglobulin 分層法を用いて種々の基礎的研究を重ねているうちにわたくしたちは、線溶酵素活性の測定条件や、それに附随する2, 3の興味ある事項にも遭遇したので、これらをここに一括して報告することにした。

実 験

試 薬

1. 醋酸水 水19容と1%醋酸0.32容との混合物
2. 2%カゼイン⁹⁾メルク製カゼイン2gを100mlコルベンに入れ、M/15 第2磷酸ソーダ75mlを加えて煮沸浴中で20分加熱、完全に溶解させた後、水を加えて100mlとした。pH 7.4となる。

3. M/15磷酸緩衝液(Sørensen) pH7.73
4. 0.44Mトリクロル醋酸(trichloroacetic acid, 以下TCAと略す)
5. 0.55M炭酸ソーダ
6. Folin のフェノール試薬¹⁰⁾、使用時8倍に稀釈した。
7. ストレプトキナーゼ(以下SKと略す)としてはパリダーゼ(レダリー)を使用し、その濃度は1000単位/mlとした。
8. トルオール
9. チメロサル(エチル水銀チオサリチル酸ソーダ)
10. チロジン標準溶液 200 γ /ml N/10塩酸
11. 3.8%クエン酸ソーダ
12. 50%グリセロール磷酸緩衝液 グリセロールと磷酸緩衝液(3)との等量混合物
13. トリプシンとして持田製トリプシン結晶を用いた。
14. ブタノール醋酸水3:2:1の混合物
15. 水飽和フェノール
16. 0.2%ニンヒドリン・ブタノール溶液
17. 加銅フェノール試薬¹¹⁾
18. 沈澱試薬 B¹²⁾
19. ニンヒドリン試薬¹³⁾

方 法

特にことわらない限り次の実験方法を用いた。

1. 採血: 3.8%クエン酸ソーダ1容に対し肘静脈血5容をとり混和遠心して血漿を得た。

2. 酵素液の分離調製：血漿 0.5ml に 冷醋酸水 9.5 ml を加え10分後3000r.p.m. で10分間遠心，上清をすてて30分間濾紙上に逆さに立てておき可及的水分を除き，これに磷酸緩衝液 0.5ml を加えた。

3. 酵素分解：この酵素液に 2%カゼイン 2.5ml を加え37°C，20時間加水分解した。この時防腐剤としてトルオールを使用した。

4. 比色による力価測定：上記水解液に 0.44TCA 2.5mlを加えてよく混和し，30分後東洋濾紙 No. 6 を用いて濾過，濾液 0.1～2 ml をとり（水で総量 2 ml とする），これに0.55M炭酸ソーダ 5 ml，稀釈フェノール試薬 1 ml を加えて30分，30°Cに保温した後 Beckman 型分光光度計を用いて 660m μ で比色した。盲検としては水解しないで直ちに0.44MCTAを加えたほかは全く同上の操作を行なったものを用いた。

5. 酵素活性の表現

種々の表現方法であるが，ここでは次の2つの表現を用いた。

i) 水解濾液 2 ml あたりの比色値（ γ チロジン）より盲検値（ γ チロジン）を差引いた値 $a\gamma$ をもって表現するか，あるいは

ii) [PU] 2% Cas. FR. γ . Tyr./dl Plasmaをもって表現する。この1単位とは非稀釈血漿 100ml あたり1分間に1 γ チロジン相当量的水解物を生じたときをいう。実際上の計算は上記の実験条件下では， $a \times 0.55$ でこの単位を得ることが出来る。

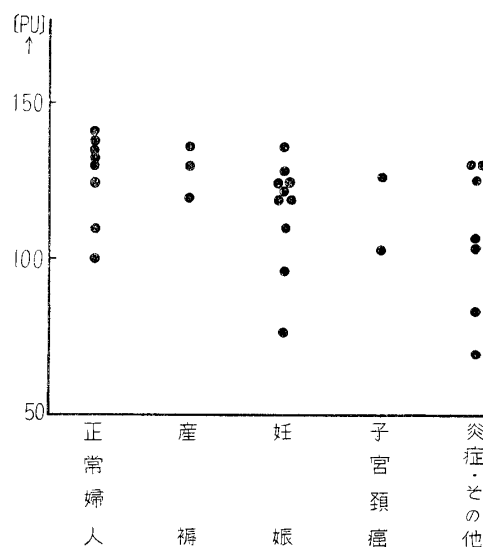
実験結果 1. SK 活性化による 酵素活性の測定

元来 euglobulin 分層は主に線溶酵素の proenzymeである，非活性の plasminogen分層であるわけで，これをSKなどの activator で活性化していわゆる全酵素活性を測定する方法がより多くとられている。ここでも酵素液の調製にあたり，先にSK溶液 0.1ml を，次に磷酸緩衝液を加えて総量を 0.5ml とした。この場合酵素活性は極めて高いので水解時間は短時間でよいわけであるが，他との比較上意識的に20時間とした。TCA濾液は 0.5ml を使用した。

検査対象は非妊健康婦人8例，妊婦10例，産褥婦人3例，子宮頸癌患者2例，および炎症や良性腫瘍などの患者7例，総計30例であり，その結果は図1に示すごとくである。

100単位以下のものは30例中4例で，大部分はそれ以上であった。疾患別にみてもその間に著差はなく，比較的その範囲もせまいようである。

図1 諸疾患別SK活性化酵素値



実験結果 2. グリセロール処置による酵素活性の測定

Plasminogen は50%グリセロール・磷酸緩衝液中で37°C 5日間で完全に活性化されることが報告されている¹⁴⁾ので高価なSKを使用しなくてもすむのではないかの考えからグリセロールによる活性化を試みた。すなわち euglobulin分層に50%グリセロール・磷酸緩衝液 0.5mlを加えて37°C・5日間孵置したものを酵素液として，正常妊娠10，妊娠中毒症8，産褥3，子宮頸癌5，子宮筋腫5，機能性子宮出血4の計35例について本法を施行した。結果は図2の如くである。すなわち疾患別による特殊な関係もなくまた同一疾患でも分散がひどくなんらの法則も見出されないようである。このように結果に統一がない原因がどこにあるのかを探るために，更に次の実験を行った。

(i) Euglobulin分層のグリセロール中における経日の酵素活性変化。

5例の血漿につき，それぞれ euglobulin 分層を得て，これに50%グリセロール・磷酸緩衝液 0.5mlを入れて37°Cに孵置し，経日的にその酵素活性を測定した。その結果は図3の如くである。すなわち3例は明らかにグリセロール中で酵素活性が増強したが，1例は一時増強した後低下し，他の1例は激減した。

(ii) 同様な目的で，同一血漿の euglobulin 分層を50%グリセロール・磷酸緩衝液中に37°C・5日間孵置した後の酵素活性と，磷酸緩衝液を加えて直ちに酵素活性を測定（後述の潜性活性）したものと値を比較してみた。その結果は図4の如くである。すなわち50例の試験

図2 諸疾患別グリセロール処置酵素値

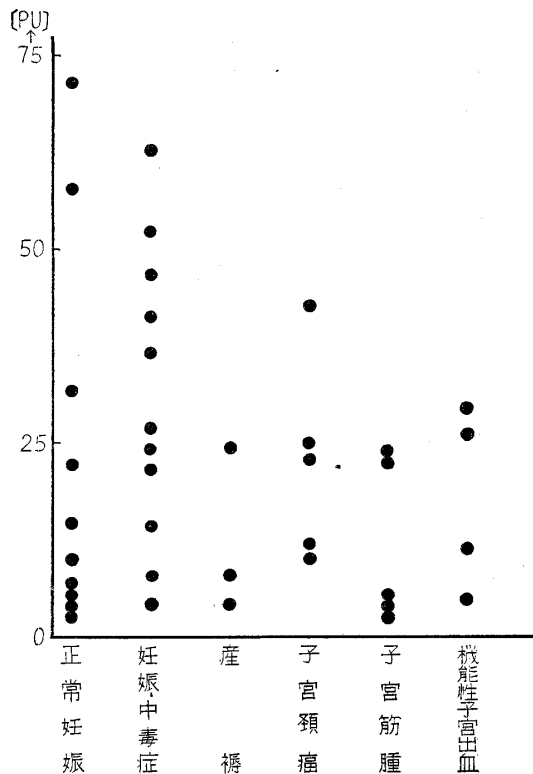
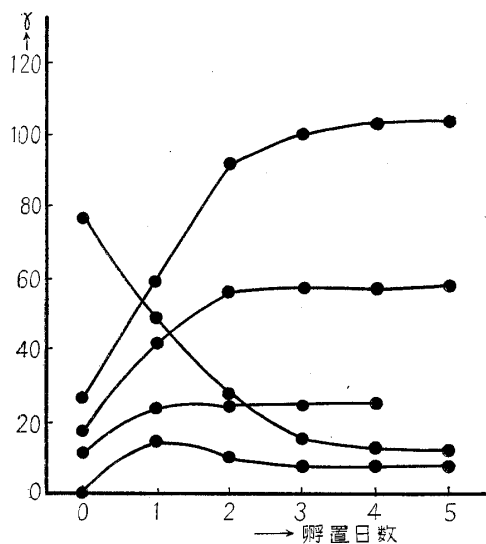
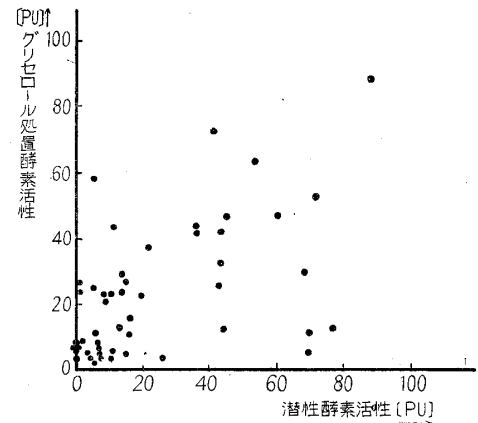


図3 グリセロール中における経日の酵素活性変化



においてグリセロール処置によつて活性度が高くなつたものは26例、逆に減つたものは22例、不変のものは2例であつた。今かりに潜性活性20単位以上のもの20例についてみると、この中グリセロールで活性が高くなつたものは7例、低下したものは12例、不変のものは1例であつた。

図4 潜性酵素活性とグリセロール処置酵素活性



(i) と (ii) の結果からしてグリセロール中で酵素活性の高まるものと逆に低下するものがあること、さらに潜性活性の高かつたものの方に、グリセロール緩衝液中で酵素活性が低下するものが多いこと等が明らかになつたが、その理由は依然として不明である。euglobulin 分屑には以上のような条件で比較的不安定な蛋白分解酵素が含まれていて破壊されて行くのかも知れないし、また抗プラスミンの混在も充分に考えられる。

(iii) グリセロール処置で完全活性化が起るか

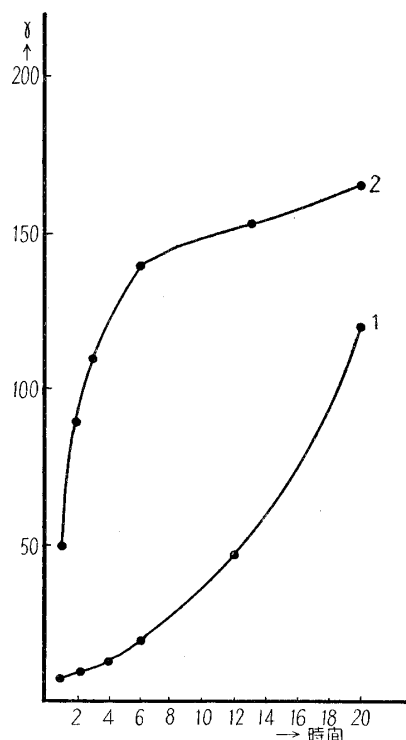
さきの実験で明らかになつた如く、SK活性化酵素値はグリセロール処置酵素値に比して、その活性度が極めて高い。したがつてグリセロールで処置してもその活性化は不充分であることが推定される。そこで50%グリセロール磷酸緩衝液中で37℃5日間処置したものと、これに更にSKを加えたものとの酵素活性を比較してみると、それぞれ60%および20%であつた。すなわちグリセロール活性化は不充分であり、さらにSKによつて活性化されることが分つた。

実験結果3. 活性化しない場合の euglobulin 分屑の酵素活性 (潜性活性)

前述せる如く euglobulin 分屑は主に plasminogen 分屑と考えられるので、この分屑を種々な activator によつて活性化しないで測定することははなはだ無意味、かつ反常識的であるとさえ考えられている。ところが実際には、活性化操作をなんら加えなくともある程度の酵素活性は存在する、いまこの潜性活性の酵素反応速度を時間的にみて行くと図5の曲線1の如くなる。(ただしこの場合はチロジン量は10倍にしてある。) なお対照としてSK活性化酵素の反応速度も検した(図5, 曲線2)。

実験結果4. 潜性活性酵素値と活性化酵素値の

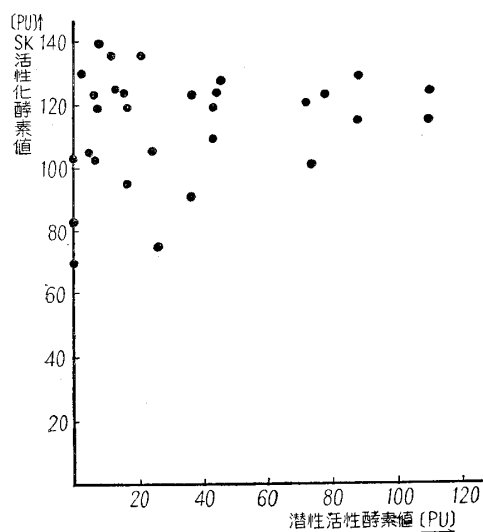
図5 euglobulin 分層のカゼイン分解速度



関係

同一血液について同時に潜性活性酵素値とSK活性化酵素値を測定してみると図6の如き結果を得た。すなわちいずれの場合もSK活性化酵素値の高い値を示して居り、これは理の当然と思われるが、興味あることは両者が非常に近い値を示しているものも少なくない。このような場合には、ほとんど総ての酵素が活性型になつてい

図6 潜性活性酵素値とSK活性化酵素値



るものと考えてよいと思う。

実験結果5. 酵素安定性の問題

Euglobulin 分層がグリセロール処置に対してまちまちな態度を示すのは、euglobulin 分層にある蛋白分解酵素の安定性が大いに関係するのではないかと考えて、この実験を行なった。

(i) トリプシンそのものの安定性

トリプシンが euglobulin 分層に入る可能性が実際にあるかどうかは分らないが、一応その安定性を検してみた。すなわちトリプシン10,000H.U.M. を50%グリセロール磷酸緩衝液 5 ml にとかし、37°Cに一定時間孵置してその活性を測定した。その結果は表I Aに示すごとくである。

(ii) トリプシン加血漿の euglobulin分層の酵素活性

トリプシン結晶 10,000H.U.M. に血漿 5 ml を加えて溶解した後、この血漿から euglobulin 分層 をとり前同様50%グリセロール磷酸緩衝液を加え経日的に酵素活性を測定した。その結果は表I Bのごとくである。この場合の酵素活性はトリプシンにより活性化された線溶酵素によるものか、トリプシンそのものの混入によるものか、あるいはその両者によるものか明らかではない。おそらくは第3の場合と推定される。なお対照として同一血漿にトリプシンを加えないものを使用した(表I C)。

(iii) SK活性化酵素の安定性

血漿 5 ml よりeuglobulin 分層を得、これにSK 0.5 ml, 50% グリセロール磷酸緩衝液 4.5ml を加えて 0.5 ml をとり経日的に酵素活性を測定した。その結果は表I Dのごとくである。

表I 50%グリセロール磷酸緩衝液中における諸種酵素の安定性(単位γ)

孵置日数	A	B	C	D
0	1080	380	0	272
1	1120	412	15	268
2	1080	392	11	268
3	1080	404	8	260
4	1120	392	8	260
5	1070	392	8	—
6	1070	392	—	—

以上 (i), (ii), (iii) の実験結果からトリプシンそのものの、トリプシン加血漿の euglobulin 分層およびSK活性化酵素はいずれも50%グリセロール磷酸緩衝液中、37

昭和36年9月1日

真 木 他

1089—9

°Cという条件では相当安定なものであるといつてよいと思う。

(iv) 血漿として氷室または室温に放置した場合の潜性活性酵素値の変化

以上 (i), (ii), (iii) に述べた実験結果からすれば, 50%グリセロール燐酸緩衝液中で酵素活性が低下する機序については2つのことが考えられる。1つは人工的に活性化された線溶酵素と自然に活性化される線溶酵素とは全く別物であつて後者は極めて不安定なものではないかということであり, もう1つは euglobulin 分屑に僅か

図7 氷室(実線)または室温(点線)に血漿を放置した場合の経日的潜性活性酵素値の変化

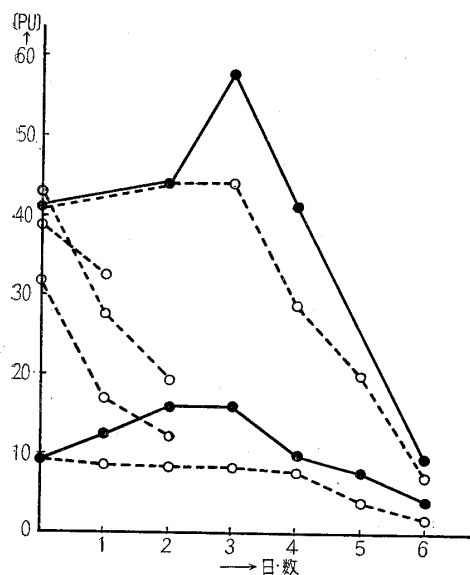
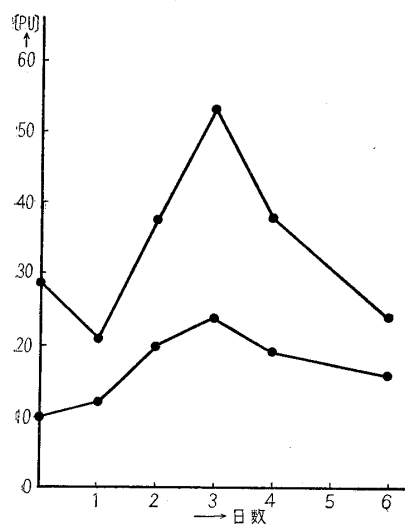


図8 氷室放置せる euglobulin 分屑の経日的潜性活性酵素値の変化



の抗プラスミンが混入する可能性である。そこでこの (iv) の実験を行なつた。すなわち血漿を氷室または室温に放置した場合の潜性活性を経日的に測定してみると図7のごとくである。室温に放置した場合一部の例外を除いてその活性は日数と共に低下する傾向にある。ところが氷室においた場合逆にその活性が一時高まるが、その後著明に低下した。いずれにしても、それ程安定なものといえないようである。

(v) Euglobulin 分屑を氷室に保存した場合の活性変化

Euglobulin 分屑を作り, これを氷室に保存し経日的にその活性度を測定してみた。その結果は図8のごとくで, 意外にも一時酵素活性が著明に高まり, のち低下した。全く説明しかねる現象である。

実験結果 6. 酵素分解産物のペーパークロマトグラフィー

酵素液の調製

(i) 潜性活性50.3単位の比較的高活性の血漿 5 ml から euglobulin 分屑を作り, これを 2 ml 燐酸緩衝液にかして酵素液 (i) とした。

(ii) トリプシン 10,000 H.U.M. 燐酸緩衝液 2 ml に溶かして酵素液 (ii) とした。これらの酵素液に 2% カゼイン 10 ml を加え, セロファン管に入れ, 200 ml 蒸留水に透析しながら36時間, 37°Cに水解した。透析外液を真空蒸溜濃縮して 5 ml とし, このうち 1 ml は生物学的活性の検査に使用し, 残りの 4 ml は更に濃縮して 0.3 ml とした。この際, 析出塩類はできるだけよく除

表 II 酵素分解産物のペーパークロマトグラフィー

アミノ酸その他	酵素液 i	酵素液 ii
aspartic acid	+	+
glutamic acid	+	+
lysine	+	+
histidine	+	+
arginine	+	+
oxypoline	+	+
tyrosine	+	+
methionine or tryptophane	+	+
leucine	+	+
phenylalanine	—	+
alanine	+	—
unknown spots	3 ヶ	—

いてペーパークロマトグラフに用いた。濾紙は東洋濾紙 No. 50を用い、2次元展開を行なった。1次元展開にはブタノール・醋酸・水を、2次元展開には水飽和フェノール（使用時30ml に1滴の28%アンモニアを加えた）を用い、それぞれ25cm展開した。結果の判定は分解産物が遊離アミノ酸だけでなく、種々の程度のペプチドが混在していると考えられるので確実とはいえないが、標準アミノ酸のペーパークロマトグラムから推定して、一応表Ⅱの如く判定した。

実験7. 分解産物の生物学的活性

前記の酵素分解産物を用いて畔柳¹⁵⁾の方法に従いC P P作用（毛細管透過性亢進作用）をみたが、いずれの場合も結果は陰性であった。

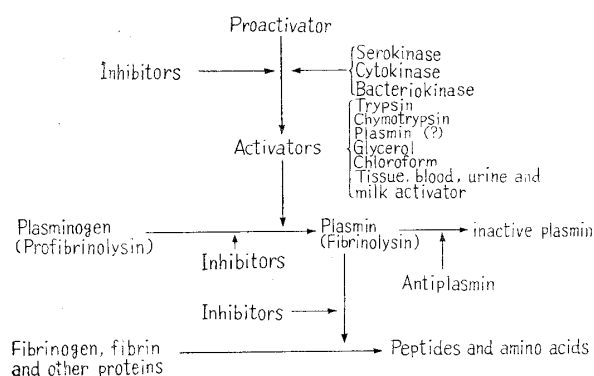
実験8. 定量法簡素化の試み

潜性線溶酵素の測定の時間を短縮し、できるだけ迅速に結果を得たいと考えて、試薬の感度をあげるため加銅フェノール試薬を用いたり、また低濃度のT C A溶液すなわち沈澱試薬Bを用いてみたが、同時に盲検の値も高くなるのみで満足すべき結果は得られなかった。またニンヒドリン試薬も用いてみたが、その感度はフェノール試薬よりも低かった。

考 按

線溶酵素は図9のような1つの酵素系を形成しており、なかなか複雑である。従つて線溶酵素の活性の測定も複雑多岐にわたり、いずれの方法を用いるかはその目的によつて異なるわけである。

図9 線維素(原)溶解酵素系



線溶酵素活性の測定法を2大別すると、(1) Macfarlane¹⁶⁾, Halse¹⁷⁾の方法のように、血漿全体すなわち総ての酵素系を含んだ状態で測定する方法と、(2) Ungar¹⁸⁾, Loomis⁵⁾や Downie⁶⁾のように抗プラスミンを含まないeuglobulin分屑を得てその活性を見る方法とにな

る。正常状態では、たとえある程度の線溶酵素活性化すなわち plasminogen→plasmin の転化が起つても、血中には強力な抗プラスミン作用があるので、実際には顕性 (manifest) の形で線溶酵素活性が現われることはない。ところがある種の疾病では明らかにこの酵素系のバランスが破れて線溶酵素活性が著明に発現することがある。したがつて第1の方法のような測定法でとらえ得るのは顕性の線溶酵素活性とでもいうべきものであつて、甚だ好ましくない状態であり、このような状態は plasminogen→plasmin の転化亢進と同時に抗プラスミンの低下があつてはじめて起る現象と考えられる。

これに反し第2の euglobulin 分屑を用いる方法は抗 plasmin を含まない状態（全く含まないかどうかは疑問である）で酵素活性を測定出来る。前述せる如く euglobulin 分屑は plasminogen 分屑とでもいうべきものであつてS K活性化を行なえば抗 plasmin の影響を受けない、いわば全線溶酵素活性を測定することが出来る。しかし、種々な疾患の場合についてこのS K活性化酵素値を測定してみると如何なる場合も比較的近似した値を示した。これは plasminogen は如何なる場合も、例えば血漿蛋白や血糖が比較的恒値を示すのと同じように、比較的一定した血中濃度を保つためではないかと考えられる。

Euglobulin 分屑の50%グリセロール燐酸緩衝液処置による酵素活性の変化については活性化されるもの、逆に失活するものなどまちまちであつたが、特に後述の潜性活性の高いものに失活傾向が強い。この現象を究明しようとしてS K活性化酵素、トリプシン、トリプシン加血漿の euglobulin 分屑の50%グリセロール燐酸緩衝液中における安定性等をみたが、このような条件下では酵素活性は極めて安定であつた。

また、一方 Alkjaersig¹⁴⁾らは、相当純粋な plasminogen を用いての実験ではあるが、50%グリセロール燐酸緩衝液、37°C・5日間で線溶酵素はほとんど完全に活性化され、しかも極めて安定なものであるとしている。したがつてわたくしたちの euglobulin分屑には抗 plasmin のようなものが混入しているのか、あるいは自然に活性化された酵素が不安定であるのかどちらかであると考えられる。事実、血漿を室温に放置した場合、活性は著明に減少する傾向があるから(図7)、後者の可能性は当然考えられる。

次に euglobulin 分屑や血漿を氷室に放置した場合、一時的にもせよ、活性が高くなる(図7～8)傾向があ

るのは、極めて興味のある問題であるが、その理由についてはいくつか知ることすらできない。輸血の問題などにもからんで、今後検討すべき重大な問題と考えられる。

次に euglobulin 分屑を特に活性化することなしに、酵素活性を測定してみると、場合によつては、相当に高い活性を示すことがある。その場合の反応速度は図5～1のごとくで、S K活性化酵素の反応速度(図5～2)とは全く異なる。図5～1の曲線の状態から考えれば、これは autocatalytic な反応である。(ただし、plasminogen→plasmin 転化に関して autocatalysis を否定するものもあり、spontaneous activation という語を用いている人が多い。)本酵素の定量法簡素化に失敗したものもこの辺に1つの原因があつたかも知れない。すなわち、なんらかの原因で plasminogen→plasmin の転化が起つているときに euglobulin 分屑を得たと仮定すれば、この euglobulin 分屑に plasminogen と共に活性 plasmin が一緒に混入し、この活性 plasmin が plasminogen に autocatalytic に徐々に作用して活性を示すものと考えられる。この場合、活性 plasmin 量が多ければ多いほど、autocatalysis が促進され、高い酵素活性を示すものと解される。さらに考えられる因子として euglobulin 分屑に含まれる plasminogen activator と estrase thrombin などの問題があるのが、これは今後の課題であろう。いずれにせよ、このような方法すなわち euglobulin 分屑を特に活性化することなしに測定する方法は、Macfarlane 等の第1の方法では抗プラスミンの妨害のために絶対に捕えられないような plasminogen→plasmin 転化の模様を捕えることができるという、極めて有利な方法であるといえよう。したがって著者らはこれを顕性線溶酵素活性に対して“潜(在)性(latent)線溶酵素活性”と呼ぶことを提唱する。肝にたとえば、“潜在性肝障害”とか“subicterus”の状態に対する検査法とでもいふべきものではなからうか。

総 括

血漿 euglobulin 分屑の酵素活性をカゼインを基質として測定し、次の成績を得た。

1. S K活性化 euglobulin 分屑はいかなる場合にも比較的一定した値を示す。
2. 50%グリセロール磷酸緩衝液処置では euglobulin 分屑には活性化されるものと失活化されるものとがあり、一定しない。

3. 活性プラスミンの安定性は、天然活性化の場合と人工活性化の場合とでは、異なるものようである。

4. 予め活性化操作を行なわない場合 euglobulin の分屑のカゼイン分解現象は、その反応様式からみれば autocatalysis によるものと考えられるが、activator の存在も無視することはできない。

5. わたくしたちは、血漿全体を用いた場合に見られる線溶現象を“顕性線溶酵素活性”，euglobulin 分屑の自然活性を“潜(在)性線溶酵素活性”と呼称している。また、これら両者を区別すべきことを提唱する。

6. 血漿を室温に放置すると、潜(在)性線溶酵素活性は次第に低下してゆく。

7. 血漿または euglobulin 分屑を氷室に放置すると一時活性が高まるが、のち低下する。

8. 酵素分解産物をペーパークロマトグラフで確かめた。

9. 分解産物の CPP 作用は陰性であつた。

10. 潜(在)性線溶酵素活性の定量迅速化について2, 3の実験を試みたが失敗した。

文 献

- 1) *Elsner, P.*: Fortsch. Geburtsh. & Gynäk., 6 (1957).
- 2) *Sherry, S., Fletcher, A.P. & Alkjaersig, N.*: Physiol. Rev., 39: 343 (1959).
- 3) 阿部: 日本臨床, 18: 2534 (昭和35).
- 4) 品川, 真木, 菊池(永): 産婦の世界, 13: 10 (昭和36).
- 5) *Loomis, E.C., George, C. & Ryder, A.*: Arch. Biochem. & Biophys., 12: 1 (1947).
- 6) *Downie, G.R. & Clifton, E.E.*: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71: 138 (1949).
- 7) *Kaulla, D.N. & Schultz, R.L.*: Am. J. Clin. Path., 29: 104 (1958).
- 8) 早川, 川崎, 金沢: 弘前医学, 7: 94 (1956).
- 9) 江上: 標準生化学実験, 文光堂 (昭和26).
- 10) *Folin, O. & Ciocalteu, V.*: J. Biol. Chem., 73: 629 (1927).
- 11) *Lowry, O.H., Rosenburgh, N.J., Forr, A.L. & Randall, R.T.*: J. Biol. Chem., 193: 265 (1951).
- 12) 酵素研究法, 2: 241 (昭和33).
- 13) *Glick, D.*: Methods of Biochem. Analysis, 2: 251 (1955).
- 14) *Alkjaersig, N., Fletcher, P. & Sherry, S.*: J. Biol. Chem., 233: 81 (1958).
- 15) 畔柳: 線維素溶解酵素, 医学書院 (1954).
- 16) 福武, 菅野: 血液凝固検査法, 克誠堂 (昭和32) より引用.
- 17) *Halse, T.*: Die Fibrinolyse, Editio Cantor, Freiburg (1948), Jürgens, J., Beller, F. K. & Gensslen, M.: Klin. Methoden der Blutgerinnungsanalyse, Georg Thieme Verlag (1959), より引用.
- 18) *Ungar, G. & Mist, S.H.*: J. Exp. Med., 90: 39 (1949).

(No. 1415 昭36・7・7 受付)