

一 般 演 題 抄 録

## 2. 線溶系因子の微量高感度測定法の検討

湯浅晴之 岡田清孝

近畿大学医学部第2生理学教室

血液線溶系の活性測定法には, fibrin plate 法, clot lysis 法, 合成基質法等の方法がある.

今回, 96-well flat bottom microwell plate (CORNING) を用いて, fibrin の濁度を測定することにより, 微量でかつ鋭敏である plasminogen activator (PA), および plasminogen activator inhibitor (PAI) の活性測定法を確立した.

まず 1 well あたり, 微量の plasminogen をふくむ fibrinogen 溶液 (4 mg/m) 100  $\mu$ l を注入後 thrombin (5 IU/ml)  $\cdot$  CaCl<sub>2</sub> (0.5mM) 20 $\mu$ l と PA を含む検体を添加した. その直後, 吸光度 405 nm で fibrin 形成から溶解にいたる過程の濁度を経時的に測定した. PA の standard には urokinase-type PA (u-PA) をもちい, 測定結果を PA 活性に換算した. また, PAI 活性の測定には, PAI-1 を特異的に分泌する fibrinosarcoma の cell line, HT-1080 細胞の培養液を PAI-1 の検体とし, PAI-2 を特異的に分泌する白血病細胞の cell line, PL-21 細胞の培養液を PAI-2 として検討した. さらに, この測定系を用いて分子量, 硫酸基の含量の異なる 3 種類のデキストランサルフェー

トの線溶系に及ぼす影響について検討した.

最初に, 各 PA 濃度の最大吸光度の 1/2 となる時間 (t1/2) を求め, 縦軸に t1/2 横軸に u-PA の濃度をとった両対数グラフにプロットしたところ, 濃度依性のほぼ直線的な検量線が得られた. また, 再現性も良好であった.

この系を用いて PAI 活性測定法を検討した. clot lysis は, PAI-1, PAI-2 をそれぞれ含む培養液を加えた場合 control に比べ, その濃度に依存性に t1/2 の延長していた.

最後に, PAI を加えた系でのデキストランサルフェートの影響を検討した. 同様の方法で t1/2 を求めたところ, すべてのデキストランサルフェートにおいて濃度依性的に t1/2 が短縮していた.

以上のように, 微量で多くの検体について PA 活性, PAI 活性を測定する方法を確立した. また, PAI の存在下においては, デキストランサルフェートが, 線溶系を亢進させることも明らかになった. しかし, その機序については十分明らかに出来ていないので, 今後検討していきたい.