

マイクロプレートを利用した血栓溶解酵素活性の簡便な濁度測定法

原, 敏夫

九州大学農学部遺伝子資源研究センター微生物遺伝子部門

田所, 優子

九州大学農学部遺伝子資源研究センター微生物遺伝子部門

樽井, 寛

九州大学農学部遺伝子資源研究センター微生物遺伝子部門

里山, 俊哉

九州大学農学部遺伝子資源研究センター微生物遺伝子部門

<https://doi.org/10.15017/23556>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 50 (1/2), pp.31-35, 1995-11. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

マイクロプレートを利用した血栓溶解酵素活性の 簡便な濁度測定法

原 敏 夫・田 所 優 子
樽 井 寛・里 山 俊 哉

九州大学農学部遺伝子資源研究センター微生物遺伝子部門

(1995年6月28日受理)

A Simple, Easy and Turbidimetric Assay of Thrombolytic Enzyme Activity in Microtiter Plates

Toshio HARA, Yuko TADOKORO,
Hiroshi TARUI and Toshiya SATOYAMA

Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81

緒 言

現在、わが国の死亡率の第一位は癌だが、血栓症を原因とするすべての病気を合わせると死亡率の第一位は循環器疾患になるといわれている。納豆から見出されたナットウキナーゼ (Sumi *et al.*, 1990b) は、分子量35,000、等電点8.6の1本鎖の蛋白質で、プラスミン非存在下でも血栓の成分、フィブリンを強力に分解する。ナットウキナーゼを腸溶カプセルとして経口投与すると長時間にわたり血中の血栓溶解能が充進され、人工的な血栓症を起こさせた動物を用いた *in vivo* 実験でも血栓溶解効果が認められた (Sumi *et al.*, 1990a)。最近、納豆菌からセリンプロテアーゼがクローニングされ、その塩基配列から予想されたアミノ酸配列がナットウキナーゼのそれと一致することが明らかになった (Nakamura *et al.*, 1992)。

血栓溶解酵素活性の測定には従来のフィブリン平板法 (Deutsch and Mertz, 1970) に替わり、フィブリン塊の溶解に要する時間から算出する Clot Lysis Time (CLT) 法 (須見ら, 1993) や抗体反応を利用したサンドイッチ法 (Yuki *et al.*, 1994) が考案されている。最近、微量遠心チューブ中 (Carlson *et al.*, 1988) やマイクロプレートのウェル中 (Beebe and Aronson, 1987; Vernon, 1988; Jones and Meunier, 1990; Marian *et al.*, 1991) で CLT 法

を行う方法が開発された。いずれも微量の試料で酵素活性を測定できるという利点を持つが、フィブリン塊の形成とその溶解が微量遠心チューブ中やマイクロプレートのウェル中で同時に進行するために操作条件を一定に設定することが困難で、特に、フィブリン塊の形成に熟練度を必要とする。一方、フィブリン平板法はシャーレを用いるため人工血栓の調製とフィブリン溶解窓の作製に熟練を要する。本研究では、低コストで、信頼度が高く、簡便な血栓溶解酵素活性測定法の開発を目指し、フィブリン平板法とマイクロプレート-プレートリーダー法を組み合わせ、予め調製したウェル中のフィブリン塊に試料抽出液を重層し、インキュベーター庫内でフィブリン塊の波長655nmの光の吸光度の変化量を測定することにより試料中に含まれる血栓溶解酵素活性を測定する方法を考案した。

材 料 と 方 法

1. フィブリン平板の調製

牛フィブリノーゲン (Nakarai Tesque 製) は Deutsch と Mertz の方法 (1970) に従って Lys-セファロースカラムを通過させ、含まれるプラスミノゲンを除去した。牛トロンビン (持田製薬製) は生理食塩水に溶解後 (50単位/ml)、-80℃で保存し、用時解凍して用いた。プラスミノゲンフリーなフィブリン平板は Ploug と Kieldgoapy (1957) の方法に

準じて作製した。96穴平底マイクロプレート (Nunc社製, Nunc-Immuno Plate PolySorp) の各ウェルに0.05M ホウ酸-生理的食塩水緩衝液 (BSB, pH 7.8) に溶解したプラスミノゲンフリーなフィブリノーゲン (5 mg/ml BSB) 200 μ l を入れ、トロンビン10 μ l を添加した後、攪拌してフィブリンを凝固させ、人工血栓を調製した。

2. 血栓溶解酵素活性の測定

市販納豆に6倍量の生理的食塩水を加え、5分間ホモジナイズ後、12,000rpm で10分間遠心分離し、得られた上澄液を納豆酵素液とした。この酵素液25 μ l をマイクロプレートのウェル内の人工血栓に加え、庫内温度が37℃のインキュベーター (ヤマト社製, Model IC-42) 内に設置したマイクロプレートリーダー (日本バイオラッド社製, Model 450) を用いて各ウェルにおける波長655nm の吸光度を経時的に測定した。

なお、マイクロプレートのウェル容量は0.4ml、底面積は0.32mm²であり、酵素液がウェル内の人工血栓の内部に吸収、拡散し、反応が定量的に進行するためにはウェルに重層する酵素液量は25 μ l が最適であった。

3. プロテアーゼ活性の測定

生理的食塩水を用いて市販納豆から調製した粗酵素液のプロテアーゼ活性の測定は前報 (Hara *et al.*, 1983) に準じて行い、基質にカゼインを用いて遊離してくるアミノ酸量からチロシン換算で求めた。

結果と考察

1. 納豆酵素液による血栓溶解活性の経時変化

マイクロプレートの各ウェル内の人工血栓に納豆酵素液25 μ l を加え、波長655nm の吸光度を経時的に測定した。本反応系では反応開始時に吸光度が最大となり、反応の進行とともに吸光度は減少した。そこで、納豆酵素液を添加後、30分間隔で吸光度を測定し、各反応時間後の吸光度を反応開始時の吸光度から差し引いた値 $-\Delta OD_{655}$ を算出した。その結果を納豆酵素液による血栓溶解活性の経時変化量 $-\Delta OD_{655}$ として Fig. 1 に示した。 $-\Delta OD_{655}$ は、反応開始後10時間後まで反応時間の経過とともにほぼ直線的に増加した。これは納豆に含まれる血栓溶解酵素により基質である人工血栓が分解を受け、フィブリンの低分子化が経時的に進行したことにより光の透過度が増加したためと考えた。なお、反応時間が10時間を越えると $-\Delta OD_{655}$ の増加率は低下し、さらに酵素反応を続けると OD_{655}

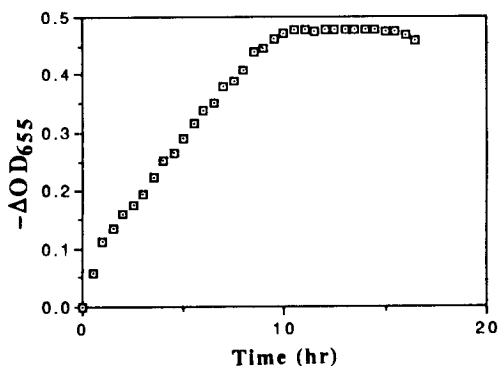


Fig. 1. Effect of incubation time on the thrombolytic activity of "natto" extract.

The "natto" extract was used as a thrombolytic enzyme. The OD_{655} was measured by using Model 450 plate reader at 37°C. The $-\Delta OD_{655}$ was calculated by subtracting OD_{655} before adding "natto" extract from OD_{655} at indicated incubation period.

の吸光度が増加し、逆に光の透過度は減少した。

2. 納豆酵素液濃度の一 ΔOD_{655} に及ぼす影響

納豆酵素液から生理的食塩水を用いて2倍希釈液、5倍希釈液、10倍希釈液と50倍希釈液を調製し、血栓溶解活性に及ぼす酵素濃度の影響を検討した。Table 1に各希釈率の酵素液を用いてマイクロプレートの8連のウェル内で反応させたときの、反応開始30分後から4時間後までのそれぞれの $-\Delta OD_{655}$ 値から最小二乗法により直線の勾配を算出した結果を示した。希釈率50倍の納豆抽出液でも変動係数 CV%は10%以内となり、高い信頼度が得られた。人工血栓の調製には通常熟練度を必要とし、フィブリン平板法および CLT 法では基質となる人工血栓の調製具合がきわめて重要となる。マイクロプレートのウェル内で人工血栓を調製すると、反応開始時のウェルごとの吸光度には0.2以上の開きが生じたが、 $-\Delta OD_{655}$ 値は影響を受けなかった。したがって、本反応系ではウェル内の人工血栓の調製の出来不出来はほとんど問題にならないことが明らかになった。

Table 1 から得られた $-\Delta OD_{655}$ 値に基づき、反応開始4時間までの納豆酵素液濃度の一 ΔOD_{655} に及ぼす影響を検討した。その結果を Fig. 2 に示した。 $-\Delta OD_{655}$ の変動パターンは、血栓溶解酵素として

Table 1. Reliability of $-\Delta OD_{655}/hr$ at various degrees of dilution.

Well	Degree of dilution				
	1	2	5	10	50
1	0.0517	0.0430	0.0378	0.0292	0.0171
2	0.0537	0.0434	0.0340	0.0289	0.0184
3	0.0539	0.0445	0.0340	0.0294	0.0162
4	0.0499	0.0453	0.0330	0.0294	0.0160
5	0.0469	0.0433	0.0323	0.0259	0.0141
6	0.0518	0.0446	0.0379	0.0277	0.0143
7	0.0516	0.0413	0.0365	0.0279	0.0150
8	0.0536	0.0411	0.0369	0.0269	0.0177
$-\Delta OD_{655}/hr^a$	0.0517	0.0433	0.0349	0.0282	0.0161
CV%	4.6	3.5	8.1	4.6	9.8

^a $-\Delta OD_{655}/hr$ represents the average of eight microtiter wells for each degree of dilution.

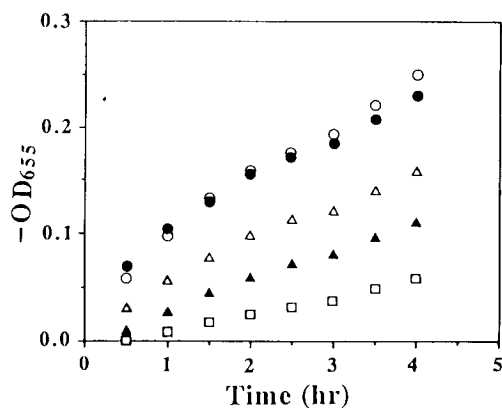


Fig. 2. Relation between the amount of "natto" extract and its thrombolytic activity on fibrin plates.

○, 原液; ●, 2倍希釈液; △, 5倍希釈液; ▲, 10倍希釈液; □, 50倍希釈液.

The "natto" extract was diluted with physiological salt solution to the indicated concentration. The experiments were carried out at 37°C for 4 hrs under the same conditions as described in Fig. 1.

用いた納豆酵素液のすべての濃度で直線性を示し、 $-\Delta OD_{655}$ から得られる直線の勾配と添加した酵素量の間に相関が認められた。

3. $-\Delta OD_{655}$ から得られた直線の勾配と血栓溶解酵素量の関係

$-\Delta OD_{655}$ 値の変化量に基づき回帰計算から得られ

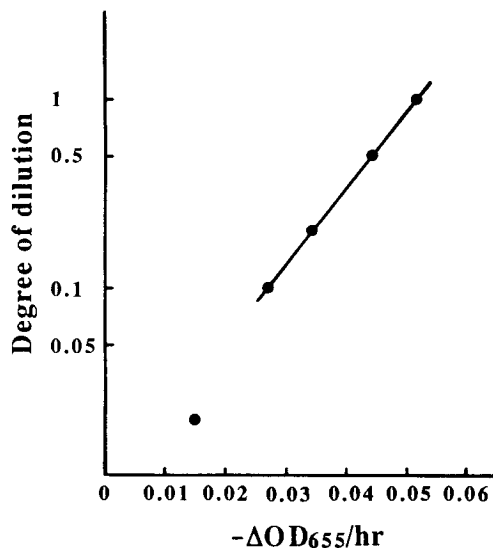


Fig. 3. Relation between the degree of dilution of "natto" extract and $-\Delta OD_{655}/hr$.

た直線の勾配と用いた納豆酵素液量、すなわち血栓溶解酵素量の関係は二次関数とみなせた。直線の勾配と血栓溶解酵素量を片対数にプロットすると、直線の勾配と用いた酵素量の間には良好な直線が得られた (Fig. 3)。 $-\Delta OD_{655}/hr$ をある酵素濃度における反応の初速度とみなすと、酵素反応の初速度と酵素濃度の対数間で直線関係が成立することは、酵素濃度が増加するとともに反応の初速度が低下したことを示している。この現象は、フィブリン分子と酵素分子の親和性が高

Table 2. Comparison of thrombolytic activity in "natto" determined by this method.

Samples of natto	Thrombolytic activity ^a (%)	Protease activity ^b (Units/ml of extract)
A	100	50.3
B	84.5	41.7
C	55.7	43.5
D	95.4	42.3

^a Thrombolytic activity in sample "A" was defined to be 100.

^b Protease activity in extract was represented as the casein hydrolytic activity at pH 7.0.

いために一部酵素が高分子フィブリンから低分子化して生成したフィブリン分解物と結合した状態で存在することから生じる反応生成物阻害に起因するものと考えられる。しかしながら、4時間以内の任意の時間に波長655nmにおける吸光度を測定した後、 $-\Delta OD_{655}$ 値の変化量から得られた単位時間当たりの $-\Delta OD_{655}$ 値の変化量、 $-\Delta OD_{655}/hr$ を算出し、Fig. 3に示した直線から外挿法により検体中に存在する血栓溶解酵素活性の測定が可能となった。

4. 納豆の血栓溶解酵素活性

市販納豆に含まれる血栓溶解酵素活性を本法で測定した結果をTable 2に示した。血栓溶解酵素活性はA社から市販されている納豆を用いて得られた酵素活性を100として相対比で表示し、プロテアーゼ活性はカゼイン分解活性で示した。納豆によっては人工血栓の溶解活性にかなりの差があることが認められたが、プロテアーゼ活性にはほとんど差が認められなかった。バチルス属細菌からアルカリ性、中性及び酸性プロテアーゼが多数発見されている(鶴, 1991)が、納豆菌が生産する主なプロテアーゼは至適pHが7付近にある中性プロテアーゼである(大西ら, 1988)。納豆中の血栓溶解酵素をセリンプロテアーゼと考えれば(Nakamura *et al.*, 1992)、中性プロテアーゼ活性が高いほど血栓溶解活性も高い酵素活性を示すといえる。しかしながら、表2に示したように、血栓溶解酵素活性とプロテアーゼの間に相関は認められなかった。Sumi *et al.* (1990a)によりナットウキナーゼと命名された血栓溶解酵素のみが納豆酵素液ではフィブリン溶解活性を有するといわれている(1990b)が、本法でも血栓溶解酵素活性の測定に際しプロテアーゼの影響は無視できると考えられた。

したがって、マイクロプレートとマイクロプレートリーダーを組み合わせた本法は、低コストで、信頼度

が高く、簡便な測定方法となりえることが明らかとなり、血栓溶解酵素活性の測定法として有効な方法と考えられる。

要 約

1) マイクロプレートとプレートリーダーを組み合わせた血栓溶解活性測定法を開発した。本法は4時間以内に酵素活性を測定でき、操作も簡便で、さらに基質量もきわめて少量ですみ、低コストであった。

2) 生理的食塩水で市販納豆から抽出した酵素液で人工血栓は溶解され、各反応時間後の吸光度を反応開始時の吸光度から差し引いて得られた $-\Delta OD_{655}$ 値のCV%は、用いたマイクロプレートの8連のウエルで10%以内となり、高い信頼度を示した。

3) $-\Delta OD_{655}$ を経時的にプロットすると測定時間内で直線性を示した。また、単位時間当たりの $-\Delta OD_{655}$ の変化率から得られる直線の勾配と粗酵素であっても納豆から調製した血栓溶解酵素濃度の対数値がよく相関した。

4) 各種市販納豆中の血栓溶解酵素活性を測定したところ納豆により大きな違いのあることが分かった。このことより、本法は血栓溶解酵素活性の測定に適した簡便な方法であることが明らかになった。

文 献

- Beebe, D. P. and D. L. Aronson 1987 An automated fibrinolytic performed in microtiter plates. *Thromb. Res.*, 47: 123-128
- Carlson, R. H., R. L. Garnick, A. J. S. Jones and A. M. Meunier 1988 The determination of recombinant human tissue-type plasminogen activator activity by turbidimetry using a microcentrifugal ana-

- lyzer. *Anal. Biochem.*, **168**: 428-435
- Deutsch, D. G. and E. T. Mertz 1970 Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, **170**: 1095-1096
- Hara, T., Y. Fujio and S. Ueda 1983 Effect of glycine on extracellular protein production by *Bacillus mesentericus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**: 2237-2242
- Jones, A. J. S. and A. M. Meunier 1990 A precise and rapid microtiter plate clot lysis assay: methodology, kinetic modeling and measurement of catalytic constants for plasminogen activation during fibrinolysis. *Thromb. Haemostas.*, **64**: 455-463
- Marian, L. L., D. S. Nachtwey and K. L. Damron 1991 A miniaturized fibrinolytic assay for plasminogen activators. *Thromb. Res.*, **64**: 223-234
- Nakamura, T., Y. Yamagata and E. Ichijima 1992 Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, *aprN*, of *Bacillus subtilis* (*natto*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 1869-1871
- 大西礼子, 安部啓子, 本間清一, 相田 浩 1988 納豆菌によるプロテアーゼ. *家政誌*, **39**: 13-19
- Ploug, J. and N. O. Kieldgoapy 1957 Urokinase. An activator of plasminogen from human urine. I. Isolation and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**: 278-282
- Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi and H. Hiratani 1990a Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.*, **84**: 139-143
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki 1990b A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**: 1110-1111
- 須見洋行, 中島伸佳, 田谷直俊 1993 血栓溶解酵素ナットウキナーゼの活性測定法. *醸協*, **88**: 482-486
- 鶴 大典 1991 *Bacillus* 属細菌の分泌するプロテアーゼの比較生化学. *農化*, **65**: 50-55
- Vernon, S. K. 1988 A rapid, simple method for monitoring fibrinolysis in vitro. *Thromb. Res.*, **52**: 349-352
- Yuki, Y., T. Nakagawa, M. Fujita, A. Asada, K. Nakanishi and K. Kato 1994 A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for nattokinase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 366-370

Summary

A turbidimetric assay for thrombolytic enzyme was performed in microtiter assay plates, wherein decrease in light scatter at 655 nm of fibrin plates in individual wells at 37°C was recorded automatically at different times and used as a quantitative measure of fibrin dissolution.

Use of an automated microtiter plate reader facilitated this assay considerably and allowed many assays to be performed rapidly, with a large amount of replication. The reliability of the $-\Delta OD_{655}$, CV%, calculated by subtracting OD_{655} at individual indicated incubation time in eight microtiter wells from OD_{655} of microtiter wells before adding "natto" extract was found to be in 10% throughout various degrees of dilution of "natto" extract. Logarithmic values of the degree of dilution of "natto" extract and $-\Delta OD_{655}/hr$ showed a linear relation, irrespective of the sample quality, indicating that this is a good method for the determination of thrombolytic activity in "natto" products.