

## 牛乳中のプラスミノゲン・アクチベーターの分離と分娩後の動態

堀 江 登

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

### Separation of plasminogen activator in bovine milk, and its various days after delivery

Noboru Horie

*Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan*

Plasminogen activator was separated by gel-filtration of skimmed milk from bovine until 9<sup>th</sup> day after delivery. The separation pattern of plasminogen activator in bovine milk was different from one of human milk. The activities of plasminogen activator in bovine milk were compared among three groups of skimmed milk samples obtained in 1~3day, 4~6day, 7~9day after delivery. The mean value for each group were 3.2IU/ml(1~3day), 3.5IU/ml(4~6day) and 0.3IU/ml(4~9day).

#### 緒 言

人乳中のプラスミノゲン・アクチベーターの存在については、すでに Astrup & Sterndorff の報告<sup>1)</sup>があり、著者らはこのプラスミノゲン・アクチベーターの分布ならびに性質について詳細な研究<sup>2)~5)</sup>を行ってきた。多量に入手することが困難な人乳を実験材料として使用することは、プラスミノゲン・アクチベーターの生理的意義を追及するための動物実験に大きな障害となってきた。本研究は、この問題を解決するために豊富に入手できる牛乳を素材として、これからプラスミノゲン・アクチベーターを検出することを目的として行われたものである。

#### 材料および方法

牛乳は、ホルシュタイン種乳牛より搾乳後すぐに-20℃で凍結し、用時流水で解凍した。スキムミルクは、解凍乳を1800×g、15分間遠心分離して得た。ゲルろ過には5×60cmのセファアクリルS-

200(Pharmasia, Uppsala)のカラムを使用した。

プラスミノゲン・アクチベーター活性は、プラスミノゲン含有フィブリン平板およびプラスミノゲン除去フィブリン平板を使用した既述の方法<sup>4)</sup>により求めた。プラスミノゲン・アクチベーターの国際単位(IU)はウロキナーゼ(ミドリ十字, 大阪)のIUとプラスミノゲン含有フィブリン平板の溶解面積(m<sup>2</sup>)との標準曲線から換算した。

プラスミン阻害活性は下に記すようにフィブリン凝固塊溶解時間法によって求めた。リジン・セファローズ法<sup>6)</sup>によって精製したプラスミノゲン(10CTAU/ml)50μlとウロキナーゼ(1000IU/ml)50μlを37℃で10分間プレインキュベートした。これに0.14M食塩を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.4)100μl, 検体400μl, 0.33%牛フィブリンゲン(Miles Lab., Edkhardt)300μl, 50IU/ml牛トロロンビン(持田, 東京)100μlを混和し, 37℃の恒温水中に静置し, 生じたフィブリン凝固塊が完全に溶解するまでの時間を求め, その逆数に1000を乗じた値として表現した。

## 結果および考察

プラスミノゲン・アクチベーター活性測定のために、牛スキムミルク 30 $\mu$ l をプラスミノゲン含有フィブリン平板上に滴下し、37 $^{\circ}$ C で 18 時間インキュベートした。18 時間で平板の溶解は認められなかったが、さらに 24 時間放置したところ顕著な溶解窓が現れた。このことは、長時間のインキュベーション中におこる阻害物の破壊か、それとも拡散速度の異なる阻害物質のフィブリン網中での分離によると推察された。

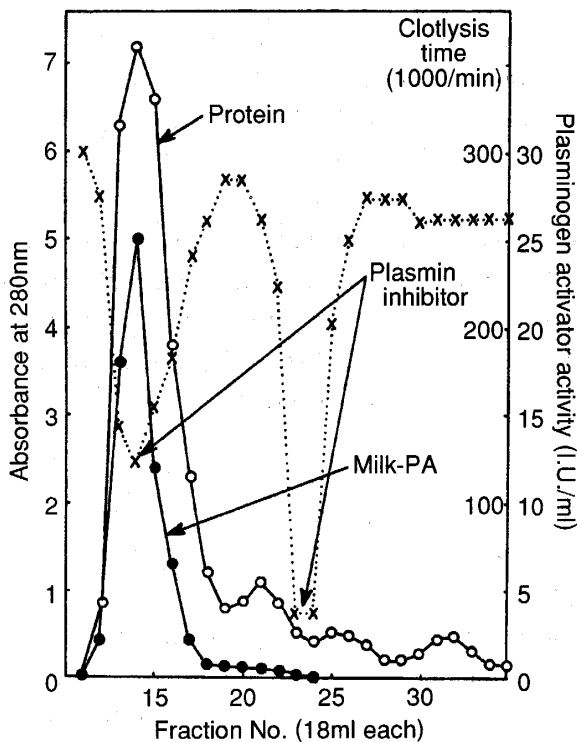


Fig. 1. Sephacryl S-200 gel-filtration pattern of bovine skimmed milk. Column dimension: 5 $\times$ 60cm, equilibration buffer: 0.14M NaCl in 0.01M Na-phosphate buffer (pH7.4), flow rate: 100ml/hr at 4 $^{\circ}$ C.

次に、プラスミノゲン・アクチベーター活性の出現を阻害していた物質とプラスミノゲン・アクチベーターとの分離を目的としてセファクリル S-200 を使って分娩後 3 日目のスキムミルクをゲルろ過した。プラスミノゲン・アクチベーター活性の測定はフィブリン平板法で行い、その典型的な溶出パターンを図 1 に示す。プラスミノゲン・アクチベ

ター活性は、ポイドボリューム付近に現れた。この活性はプラスミノゲン含有フィブリン平板を使って、37 $^{\circ}$ C、18 時間のインキュベーションで容易に測定された。一方、フィブリン凝固塊溶解時間法で測定すると、プラスミン阻害活性はポイドボリューム付近(プラスミン・インヒビター 1)と分離番号 23・24(プラスミン・インヒビター 2)に現れた。後者(プラスミン・インヒビター 2)とポイドボリューム画分を合わせてプラスミノゲン含有フィブリン平板上に滴下すると、プラスミノゲン・アクチベーター活性は現れなかった。これに対して、ポイドボリューム付近にはプラスミン・インヒビター 1 が存在するにもかかわらずプラスミノゲン・アクチベーター活性が出現した。これらのことより、スキムミルク中のプラスミノゲン・アクチベーターがプラスミノゲン含有フィブリン平板では現れなかったことは、プラスミン・インヒビター 2 の共存によると推察される。このプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター 2 は、ゲルろ過法で分子量約 20k ダルトンであり、またトリプシンの活性も阻害することから、Laskowski ら<sup>7)</sup>のトリプシン・インヒビターと同一物質であると考えられる。Pedersen ら<sup>8)</sup>は、分娩後第 1 日目の牛乳にはトリプシン・インヒビターが 1ml 当たり 500~600 $\mu$ g 含まれているのに対して、人乳には分娩後 2~3 日目にわずかに 20~40 $\mu$ g しか含まれていないと報告している。このトリプシン・インヒビターは、牛乳中に含まれる免疫抗体が消化酵素によって分解されることを防いでいると考えられている。以上のことにより、岡本ら<sup>9)</sup>の実験で、牛、家兎および羊のスキムミルク中に、プラスミノゲン・アクチベーター活性がプラスミノゲン含有フィブリン平板法で検出されなかったことは多量の阻害剤が共存していたためと推察される。ゲルろ過法を使うことによって、牛乳中のプラスミノゲン・アクチベーター活性の測定を不可能にしていたトリプシン・インヒビターを分離することができたので、9 頭の牛より搾乳し、分娩後 1~3 日、4~6 日、7~9 日の 3 グループに分け、それぞれのスキムミルクをセファクリル S-200 でゲルろ過し、それぞれのプラスミノゲン・アクチベーター活性をプラスミノゲン含有フィブリン平板で測定した(表 1)。プラスミノゲン・アクチベーター活性は、分娩後 1~3 日に 3.2IU/ml、4~6 日に 3.5IU/ml そして 4~9 日に 0.3IU/ml であった。No. 3 と No. 7 の 2 頭にはプラスミノゲン・アクチ

ベーター活性が認められなかった。その他の7頭については、人乳と同様に、初乳に多く常乳に少ない傾向を示した。この事実は、初乳においてプラスミノゲン・アクチベーターが何らかの生理的に重要な役割をしていることを強く暗示するものである。

**Table 1.** Plasminogen activator activities in bovine milk. The plasminogen activator activity after gel-filtration of skimmed milk was calculated by fibrin plate assay. (see text)

Number	Days after delivery		
	1-3	4-6	7-9
1	5.8	2.4	0
2	5.6	2.0	1.2
3	0	0	0
4	2.0	1.0	1.2
5	9.0	10.0	0
6	0.8	9.6	0
7	0	0	0
8	2.4	2.8	0
9	3.2	3.6	0
Mean±SD	3.2±2.9	3.5±3.6	0.3±0.5

(I.U. /ml skimmed milk)

## 結 論

ゲルろ過法によるインヒビターとの分離で、これまで牛乳中に認められなかったプラスミノゲン・アクチベーター活性を初めて見出すことに成功した。この牛乳中のプラスミノゲン・アクチベーターは、セフアクリル S-200 によるゲルろ過でポイドポリウム付近に溶出した点において人乳プラスミノゲン・アクチベーターとは異なったが、人乳中のプラスミノゲン・アクチベーター活性と同様に初乳に多く常乳になるとほとんど認められなかった。

## 文 献

- 1) Astrup, T. and Sterndorff, I. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**: 605-608, 1953.
- 2) 岡本歌子, 永松陽子, 松本正子, 山本順一郎: 日血会誌, **37**: 121-131, 1974.
- 3) Okamoto, U., Horie, N., Nagamatsu, Y. and Yamamoto, J. : *Acta Haematol. JPN*, **43**: 743-746, 1980.
- 4) 堀江 登, 岡本歌子, 山本順一郎: 日血会誌, **43**: 564-571, 1980.
- 5) Okamoto, U., Horie, N., Nagamatsu, Y. and Yamamoto, J. : *Thromb. Haemostas.*, **45**: 121-126, 1981.
- 6) Deutsch, D.G. and Mertz, E.T. : *Science*, **170**: 1095-1096, 1970.
- 7) Laskowski, M.Jr and Laskowski, M. : *Fed. Proc.*, **9**: 194, 1950.
- 8) Pedersen, V. B., Keil-Dlouba, V. and Keil, B. : *FEBS letters*, **17**: 23-26, 1971.