

# 人尿性カリクレインの病態生理学的研究

金沢大学医学部病理学第2講座(主任 石川大刀雄教授)

佐 古 英 二

(昭和47年9月7日受付)

1926年 Frey<sup>1)</sup> によるカリクレイン発見の端緒となった尿性カリクレインは、初期において比較的良好に研究されたにもかかわらず、その後は臓器性カリクレインなどに比べて、あまり活発な研究がない。とくに人尿性カリクレイン(以下HUKと略す)については研究が乏しく、薬理学的研究なども断片的であった。その原因として人尿ではカリクレインの含量が極めて微量<sup>2)</sup>で、収率よく標品を集めることが困難だったことがあげられる。筆者は薬理学的研究に供しうるHUK標品の純度として、ひとまず血液凝固系に関連する因子<sup>3)</sup>、血液型物質、蛋白分解能を有する因子<sup>4)</sup>などを含まないことを定め、これを満足するHUKの分離精製法を検討し、得た標品につき免疫学的分析を行い、ついで正常動物の血圧ならびに臓器血流量に及ぼす影響を調べ、さらに自然発症高血圧ラット<sup>5) 6)</sup>の血圧に対する作用の検討を行った。

## 実験材料と実験方法

### I. HUKとその分離精製法

健康男子尿より以下に述べる方法で抽出分離した粗製HUK(3.5EU/mg)と精製HUK(12.9EU/mg)を主たる実験材料として用いたほか、免疫学的分析のために守屋の方法<sup>7)</sup>によって高度精製HUK(200EU/mg)も製して用いた。なお、EUとはHUKに由来するエステラーゼ活性<sup>8)~10)</sup>の単位であり、測定法は後記する。分離精製操作は4~6°で行い、得た画分は、その適当量を冷水に対して一夜透析して、そのEU値と280m $\mu$ の吸光値(OD)を測定した。

健康男子尿(1000ml)のpHを3~10の範囲で種々に変え、生成した沈澱物を濾過して除いたのち(以下前処理尿という)、その100ml当りDEAE・セファデックスA-50を交換容量として2.5 meqあるいはシリカゲル(180°-4時間加熱活性化)を2.5g加えてまぜ、pHを再び所定の値にもどし、2時間攪拌後、濾過して濾液のEU値を測定した。なお、この場合、E

U値が小なるほど吸着剤のHUK吸着能が大きいとみなせるので、この成績をもとにして、シリカゲルとDEAE・セファデックスのHUK吸着能を比較検討した結果、シリカゲルの吸着能が高かった。そこで、HUKを吸着したシリカゲル1gに対して、種々のモル濃度を有するpH8.0の塩化アンモニウム・アンモニア緩衝液、リン酸緩衝液(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH)を4mlの割合に加え、1時間攪拌したのち、一夜放置してHUKを溶出した。溶出液のEU値を測定し、前処理尿のEU値に対する%より、それぞれの液のEU溶出率を求めたところ、塩化アンモニウム・アンモニア緩衝液がすぐれていることが判った。この溶出液に対して守屋、Pardoらの方法<sup>7)11)12)</sup>と同じく固体硫酸アンモニウムによる塩析を行ったのち、上澄液のEU値と280m $\mu$ の吸光値を測定して硫酸アンモニウム添加量を定めた。一方、沈澱は少量の水にとかしたのち、守屋らの方法<sup>7)</sup>によってセファデックスG-75カラム(1.8×60cm)を用いてゲル濾過を行い、6mlずつを分取し、硫酸アンモニウムの混在を定性的に調べ、さらに溶出液のEU値と280m $\mu$ の吸光度を測定してHUK画分を集めた。つぎにHUK画分を24時間冷水で透析したのち、凍結乾燥して粗製HUKを得た。粗製HUKについてさらにstepwise法でDEAE・セファデックス・クロマトグラフィーを行った<sup>7)</sup>。すなわち、粗製HUKの約15000EUを0.18Mリン酸緩衝液(pH6.0)にとかしたのち、同緩衝液で平衡化したDEAE・セファデックスA-50カラム(2.5×37cm)に負荷し、同緩衝液の約800mlで洗い、同緩衝液、ついで塩化ナトリウムを0.2Mおよび1.2M含む緩衝液により溶出した。得たHUK画分は粗製HUKの場合と同様にして乾燥末とした(精製HUK)。なお、上記の各段階におけるHUKの回収率は総EU値の回収率で、精製度は比活性(EU/OD280m $\mu$ )の上昇倍数で示した。

### II. 比較試料

2 回結晶トリプシン(Merck社製、以下TP)、豚膵

臓性カリクレイン（守屋博士より御恵与を受けた。以下HPK）、ウロキナーゼ活性化ヒト・プラスミン（ミドリ十字製。以下PL）、合成ブラジキニン（Sandoz社製。以下BK）ならびに合成カリジン（Sandoz社製。以下Kd）を用いた。

### Ⅲ. 性状ならびに純度分析法

1. 血液凝固系関連因子：Alkjaersigら<sup>13)</sup>の方法によって塩化カルシウム添加のもとにおける検液と対照液（pH7.4の0.05Mペロナール緩衝液）が正常ヒト血漿を凝固させる時間（前者をA秒，後者をB秒とする）を求め、凝固時間の差から凝固促進因子（ $B-A > 0$ ）または遅延因子（ $B-A < 0$ ）の混在を調べた。

2. 血液型物質：抗Aおよび抗B血清（ミドリ十字製）を生理食塩液で2倍段階希釈し、夫々の希釈液0.1mlに対し生理食塩液にとかした検液，対照の生理食塩液ならびに生理食塩液で2000倍希釈した人血清同種凝集素中和用血液型特異物質A，B試薬（ニュートロAB，ミドリ十字製）の0.1mlずつを混ぜ、これらに0.2%A型，B型赤血球生理食塩液浮遊液0.1mlずつを対応する抗血清の系に加え、室温に15分間放置し、血球凝集が生じる抗血清最大希釈倍数を求めた。

3. 蛋白分解活性：Kunitz法<sup>13)</sup>に準じ、カゼイン消化力を調べた。35°，20分間反応を行い、280m $\mu$ OD増加量を測定して、毎分のOD増加量（OD増加量/20）を出し、HUK 1 EUあたりに混在するトリプシン活性〔TU〕<sub>EU</sub><sup>14)</sup>をしらべた。なお、試料は水にとかして検液とし、基質液はカゼイン（Merck社製）を1%濃度に0.1Mリン酸緩衝液，pH7.6にとかしたのち、沸騰水浴中で15分間加熱し、冷室に保存したものをを用いた<sup>14)</sup>。

4. 電気泳動法による分析：HUK水溶液につき正常ヒト血清を対照として Peacockら<sup>14)</sup>のアクリルアミド（2.5%）・アガロース（0.5%）混合ゲルを用いて平板法で電気泳動<sup>15)</sup>（ゲル：115×175×3mm，試料溝：1×2.5×3mm，緩衝液：トリス-EDTA緩衝液，pH8.6，予備泳動：40mA，30分，泳動：40mA，250~300V，2時間）を行ったのち、守屋ら<sup>16)</sup>の方法によってアミド黒10Bによる蛋白染色と Gomori の  $\alpha$ -ナフチール・アセテート法<sup>17)</sup>によってエステラーゼ活性染色をした。なお、試料の量は、蛋白染色のときはHUK0.5mg，人血清10 $\mu$ lを，酵素染色のときはHUK10EU，人血清20 $\mu$ lとした。

5. アルギニンエステル分解能：基質として p-tosyl-l-arginine methyl ester (TAME)を用いる守屋らのTAME法<sup>8)~10)</sup>と、p-benzoyl-l-arginine ethyl ester (BAEe)を用いるBAEe法<sup>18)</sup>によって測定

した。なお、筆者は前述の基質TAME量が60 $\mu$ molにおいて、37°-1時間の反応で2.86 $\mu$ molのTAMEを分解するHUK活性を1単位(EU)とした。BAEe法では、0.08Mトリス-EDTA緩衝液，pH8.6にとかしたHUK液0.2mlと1.026mgのBAEeを含む水溶液3.0mlを常法どおり25°で反応させた。

6. 遊離キニン量測定法：鹿取の方法<sup>19)</sup>によりラット子宮筋を用いるキモグラフ法で測定した。試料は0.3M塩化ナトリウム加トリス緩衝液（0.05M，pH8.6）にとかした。子宮筋は体重150~180gの処女ラットに合成濾胞ホルモン（ヘキスロン，帝口臓器社製）5mgを皮下注射し，18時間後断頭瀉血したのちとり出し，空気を流入した de Jalon 液中，4~5°で12~24時間保存した。キノノーゲン液はクエン酸ナトリウム加入血漿を60°，30分間処理後，遠心して析出物を除き冷水で透析したのち<sup>20)</sup>，pH8.6としたものを用いた。活性測定に際しては，検液0.4mlとキノノーゲン液0.4mlをまぜ，30°でインキュベートし，反応液0.4mlを organ bath（8.1ml栄養液，30°）に投入し，子宮筋の収縮度をBK水溶液のそれと対比し，遊離キニン量をBK量で示した。栄養液は硫酸アトロピンを1mg/ml加えた de Jalon 液を用いた。

7. 遊離キニンの同定：キニン遊離量測定法と同様にして得た反応液中のキニンを田村ら<sup>21) 22)</sup>の方法でDNS化し，重ね合せ法によって同定した。ただし，検液とキノノーゲン液のインキュベート時間は90分間とした。そしてキノノーゲン液は多少とも精製した方がよいと思われたので，Suzukiら<sup>23) 24)</sup>の方法を参考にして，プールされた人血漿より製したキノノーゲン液270mlを固体硫酸アンモニウムで50%飽和して沈殿させ，水にとかして透析したのち，さらに0.005M酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液，pH6.5で透析し，透析後液をCM・セファデックス・カラム（2.4×36cm）に負荷し，同緩衝液で溶出した。4ml宛採集し，280m $\mu$ のODが高い画分（試験管番号7~13）を集め，透析後凍結乾燥した。

用時，凍結乾燥末を50mg/mlの濃度に水にとかした。なお，この末1mgより0.05 $\mu$ gBK相当のキニンがHUKの作用（30°，10分間）によって遊離する。反応液からのキニンの抽出は，反応液に3倍量の水酢酸を加えて行い，抽出液に8倍量のエーテルを加えてキニンを沈殿させ，遠心して集めたのち，水酢酸抽出とエーテルによる沈殿の操作を3回くり返して精製したのち，Dansyl化（DNS化）し，シリカゲルHで薄層クロマトグラフを行ったのち，DNS-キニンの部分をとり出し，同様にして製したDNS-BK，DNS-Kdと

の重ね合せ法で再クロマトグラフを行った。なお、クロマトグラフの展開は、酢酸メチル：イソプロパノール：28%アンモニア水（9：7：4）を用い室温で行った。

8. 活性阻害実験：上記(6)のキニン遊離量測定法に準じて行ったが、検液1mlに阻害剤の水溶液1mlを加え、30°で5分間放置したのち、その1mlとキニンノーゲン液1mlを混ぜ、30°でインキュベートして反応させ、その0.4mlを organ bath に投入した。インキュベートの時間は検液に阻害剤を加えないとき（対照液）、約0.1 $\mu$ gBK相当のキニンを遊離するように定めた。そして阻害の程度は対照液の遊離キニン量に対する%で示した。阻害剤として、soybean trypsin inhibitor (Sigma 社製、以下SBTI)、lima bean trypsin inhibitor (Sigma 社製、LBTI)、egg white trypsin inhibitor (NBC 社製、EWTI)、Trasylol (Merck 社製)、 $\epsilon$ -aminocaproic acid (ACA)、4-aminomethyl-cyclohexane-1-carboxylic acid (AMCHA) を用いた。

#### IV. 免疫学的分析

1. 抗HUK家兎血清：成熟家兎（体重2~2.5kg）12匹を用い、Freund's complete adjuvant に懸濁して粗製HUKを家兎四肢の足蹠皮下および肩甲骨下筋肉内、大腿部筋肉内などに1週間おきに注射した。家兎A群は第1回10KU、第2回30KU、第3回50KU、B群はA群と同じ処理を行って、3週後に追加免疫100KUを1回行った。C群はそれぞれ10KU、50KU、100KUを投与した。各群とも、最後免疫後3週間目に全採血し、分離血清にメルチオレートを加え、-20°Cで保存した。ここでKUとは、カリクレインの生物活性単位で、HUKの場合、この1単位はエステラーゼ活性（EU）の1単位に相当する<sup>9)</sup>。

2. 抗体価：重層沈降法とHUK活性阻害作用で調べた。重層法は抗血清を5%アラビアゴム液で倍々希釈し、抗原は免疫に用いた粗製HUKの生理食塩液溶液0.01、0.1、1%を用い、25 $\times$ 1.5mmのガラス管内で行った。活性阻害作用は、抗血清を56°、30分間加熱して、抗血清中のカリクレイン活性阻害因子<sup>25)</sup>を不活性化したのち、生理食塩液で希釈して、その1mlと精製HUKの生理食塩液溶液1ml（1KU）をまぜ、30°で30分間インキュベートした。そののち遠心して、上澄液0.1mlをウレタン麻醉犬の股動脈に注射し、後記の方法で局所動脈の血流量の変化を測定し、その変化率と抗血清の希釈倍数との相関を求めた。阻害率は精製HUKを0.05KU投与したときの血流増加量に対する%で示した。

3. ゲル内拡散法：Ouchterlony 法と Oakley 法<sup>26)</sup>によった。Oakley 法では50 $\times$ 4 mmのガラス管を用い、1.3%寒天ゾルで1~4倍に希釈した抗血清を最下層（15mm）とし、その上に1.3%濃度に寒天を加えたペロナール緩衝液（0.1M, pH8.0, 15mm）、抗原液（10mm）を順次重層し、室温で1週間放置した。

Oakley 法では高度精製HUK<sup>7)</sup>を生理食塩液に0.1%と加したものを抗原として用いた。

4. 免疫電気泳動法：HUKの生理食塩液溶液（1%）ならびに正常ヒト血清を1.3%寒天ゲル平板（25 $\times$ 70 $\times$ 2mm）上で電気泳動したのち、抗血清と反応させた。泳動はペロナール緩衝液（ $\Gamma/2=0.1$ , pH8.6）で15mA, 200Vで行った。

拡散または泳動したのちの寒天ゲルを水洗し、先に述べたアミド黒10Bによる蛋白染色あるいは $\alpha$ -ナフチール・アセテート法によってエステラーゼ活性染色を行った。

#### V. 薬理学的作用

試料は生理食塩液にと加して検液とした。HUKは精製HUKを用いた。

1. 犬による実験：背位に固定したウレタン麻醉犬（雄雑種、体重8~11kg、ウレタン2g/kg筋注）を用い、検液投与後の血圧ならびに血流量の変化を調べた<sup>9) 27)</sup>。ウレタン麻醉犬に気管内挿管後、大気下で人工呼吸を行い、血圧の変化は頸動脈にカニューレを入れ、血流量は注射局所より末梢側の血管に矩形波電磁流量計のプロープを装着してポリグラフ（日本光電社製RM-150型）で記録した。

血圧、血流量のほか、心搏振幅も解析の対象とし、呼吸曲線、心電図（第II誘導）も記録した。なお、検液の注射量は5ml以下とし、休止期間を15分以上とし、同一犬に通常3回、最高8回投与した。

2. モルモット摘出心による実験：Langendorff法により冠血流量の変化と心尖運動を記録した。すなわちモルモット心の大動脈にカニューレを挿入し、電磁流量計を用いて冠血流量を測定すると同時に、心尖端に張力計トランジューサーを連結させて心運動を記録した。なお、検液0.1mlを流量計と心の中から注入した。灌流液として同一モルモット血液を Ringer-Locke 氏液で10倍希釈したものをを用い落差60~80cmで灌流した。

3. ラットによる実験：生後20週前後の高血圧自然発症ラット（雄、体重350~400g）を用いたが使用に先立って、中尾らのプレシモグラフ改良法<sup>28)</sup>によりカフを介して尾部を圧迫し、尾動脈の脈波が停止し、

圧迫を緩解していくとき再び脈波が顕われる点の血圧を測定し、その圧が160~180mmHgのものを選別して用いた。ウレタン1g/kgまたはチオペンタール・ナトリウム30mg/kgの静脈注射によって麻酔したのち、犬の場合と同様、頸動脈にカニューレを入れ、検液1mlを尾静脈内に注射し血圧の変化を測定した。

実 験 成 績

I. 分離精製について

原尿 (pH6.5, 0.11EU/ml) のpHを3~10の範囲に変えてHUK活性を測定したところ、pHが4以下または9以上になるとHUK活性は減少するので、尿中HUK活性はpHの影響を受けることが判る。このようにpHを変えた前処理尿にシリカゲルまたはDEAE・セファデックスを投入して、HUKを吸着させたのちの濾液の総エステラーゼ活性残存率(原尿の総EU値に対する%)を測定したところ、図1. のようであった。すなわちHUKの安定なpH領域(4~9)において、吸着剤としてのシリカゲルとDEAE・セファデックスを比較して見ると、吸着時のpHは4~5と狭いが、吸着能が80~98%とすぐれているシリカゲルを用いた方が良好である。

つぎに、HUKを吸着したシリカゲルからのHUKの溶出を種々のモル濃度とpHを有するトリス緩衝液を用いて予備的に検討したところ、緩衝液のpHが8付近で、モル濃度の大きいほど溶出効果がすぐれていることが判ったが、トリス緩衝液では前処理尿の総EU値の72%を溶出するのが限度であった。そこでpH8の緩衝液3種を用いて、前処理尿1000mlから得たシリカゲル25gに対して溶出を行い、それぞれの緩衝液の溶出効果を比較検討した結果、溶出率が前処理尿の総EU値(118)に対して91~95%で、かつ塩濃度にはほとんど関係なく溶出効果の一定している塩化アンモニウム・アンモニア緩衝液が最もすぐれていることが判った(図2)。この溶出操作によって原尿の液量は1/10になり、比活性は約7倍(2.06)となった。

上記の吸着溶出操作によって得た塩化アンモニウム・アンモニア緩衝液(pH8.0, 0.3M)よりなる溶出液100mlに固体硫酸アンモニウムを種々の量加えて塩析したのち、その上澄液のEU値(溶出液の総EU値108に対する%)と280m $\mu$ の吸光値を測定した結果は図3のようである。

つぎに硫酸アンモニウム60%飽和によって得た沈殿の全量を水10mlにとかし、セファデックスG75によるゲル濾過を行った。HUK活性部分は試験管番号12~18

図1 シリカゲルと DEAE・セファデックスの HUK 吸着能比較

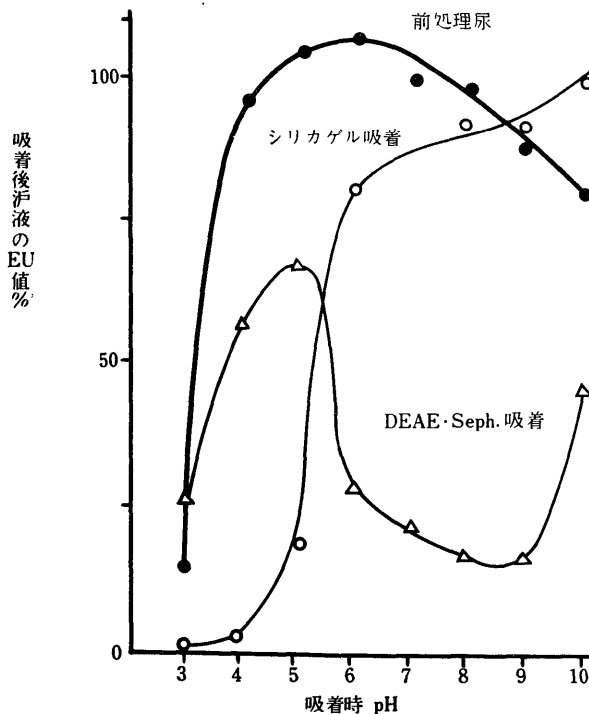


図2 各種緩衝液 (pH 8.0) の HUK 溶出能比較

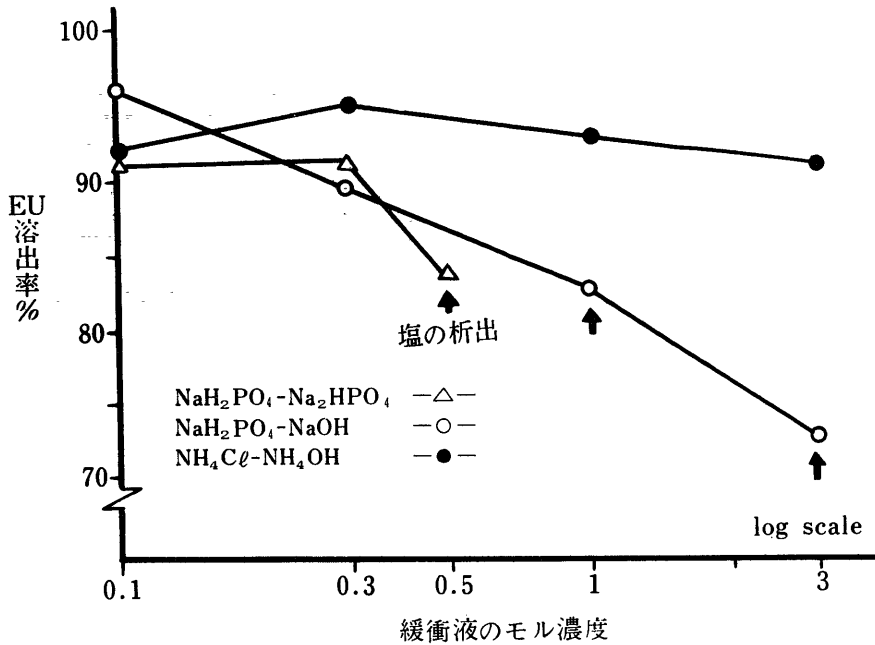
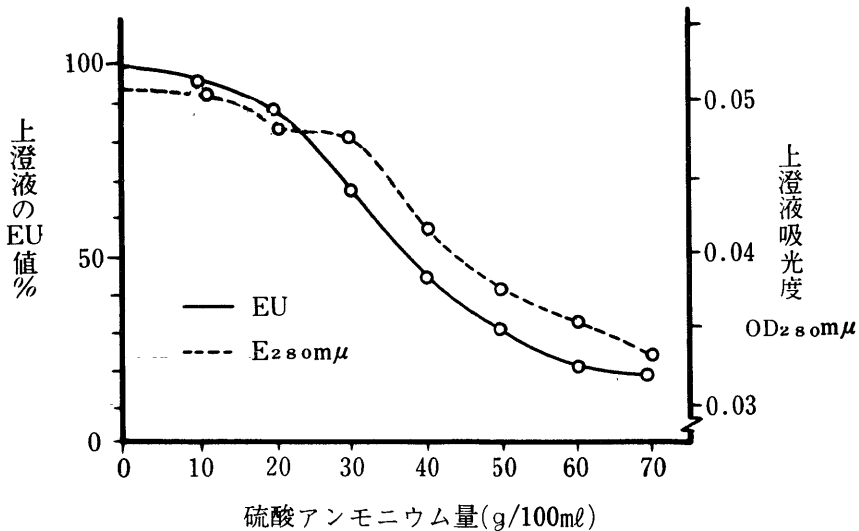


図3 硫酸アンモニウムの塩析能

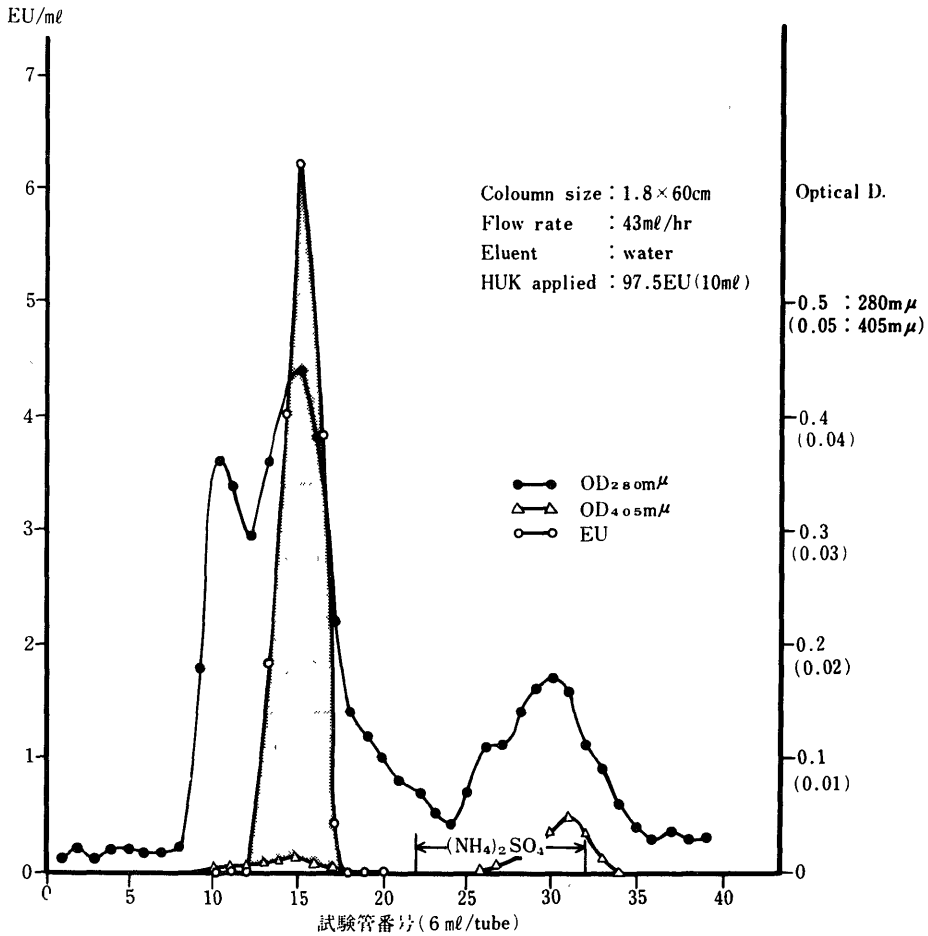


に集り、褐色物質は多少混在したが、硫酸アンモニウムと完全に分離した(図4)。この場合、HUK画分の総EU値は97.2であって活性の回収率は99.7%であり、比活性は2.7倍に上昇して8.28となった。

ゲル濾過後、凍結乾燥末とした粗製HUKのリン酸

緩衝液(13,300EU, 比活性5.10)につき、DEAE・セファデックスでカラムクロマトグラフィーを行った結果は図5のとおりであって、280mμのシャープなピーク直後の1700~1900mlの無色の溶出部分に集り、その活性回収率は72.8%で、比活性は21.9となった。

図4 塩析沈澱物のセファデックス G75によるゲル濾過



以上の分離・精製操作を11回くり返し行って得た結果を表1に要約した。

## II. 性状ならびに純度について

1. 血液凝固系関連因子：粗製HUKでは凝固遅延因子の混在が推定されたが、精製HUKは凝固遅延因子も促進因子も含有しなかった(図6)。

2. 血液型物質：抗A血清、抗B血清を中和するニュートロAB添加群では、抗血清の希釈倍数が64のところでは血球の凝集を生じたのに対して、抗血清中和因子を含まない生理食塩液添加群では256倍希釈で血球は凝集した。原尿では8倍希釈のところでは凝集するので、かなり多量の型物質が含まれており、これは粗製HUKでは完全に除去されていなかった。精製HUK添加群は生理食塩液添加群と同じ希釈倍数で凝集したので型物質を含まない(表2)。

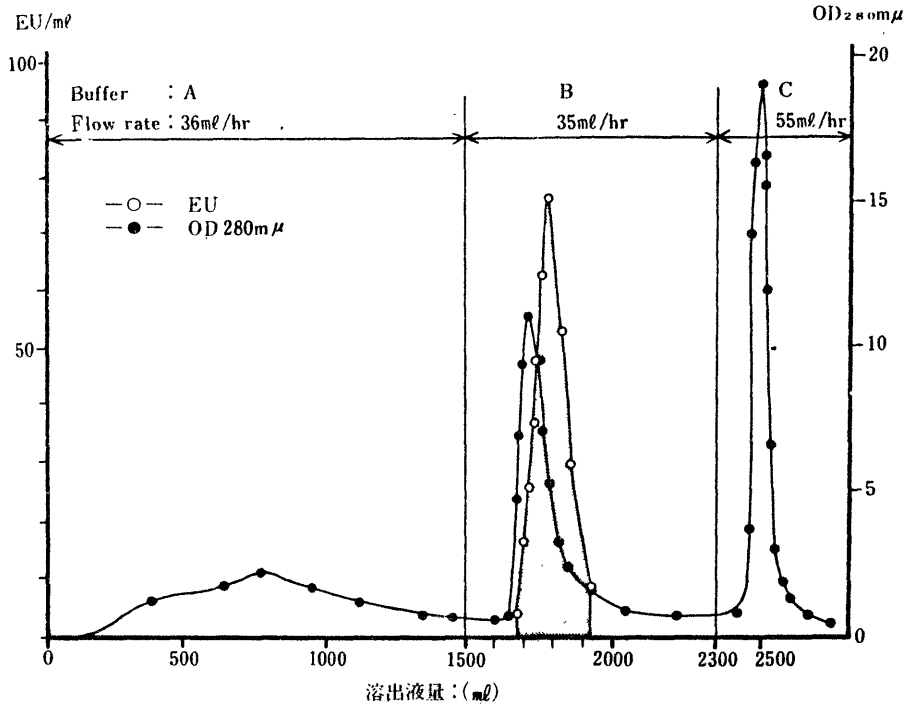
3. カゼイン消化力：粗製HUKでは0.004(TU)<sup>4.5</sup><sub>EU</sub>

の僅かなカゼイン消化力を示したが、精製HUKではほとんど活性が認められなかった。

4. アルギニンエステル分解能：TAMEの分解活性を測定するに先立って、基質液に加えるべきTAME量とこれに作用させるHUKの至適量を求めた。すなわち活性測定系(トリス緩衝液1ml, TAME水溶液1ml, 検液1ml)における検液のかわりに水1mlを加え、以後活性測定の場合と同様に操作して、基質液1ml中のTAME量と反応生成物の525m $\mu$ 吸光値との関係を調べ、TAME量が100 $\mu$ mol以下で直線関係  $y=9.55x+9.35$ (ただし、 $y$ は525m $\mu$ 吸光値 $\times 10^3$ ,  $x$ はTAME $\mu$ mol)が成立することを知り、つぎに基質TAME量を22~91.3 $\mu$ mol/mlとして、これに反応させるHUKの至適量を求めたところ、図7の成績を得た。なお、ここでは精製HUKを用いたが、このものは守屋によってあらかじめ生物活性値(KU)が測定されており、こ



図5 ゲル濾過のHUKのDEAE・セファデックスA50によるカラムクロマトグラフィー



Column size : 25 × 370mm. HUK applied : 13,300EU (640ml)

Buffer : A...0.18Mリン酸緩衝液 (pH6.0)

B...0.2 M塩化ナトリウム加リン酸緩衝液 (0.18M, pH6.0)

C...1.2 M塩化ナトリウム加リン酸緩衝液 (0.18M, pH6.0)

図6 人血漿の凝固系に及ぼす影響

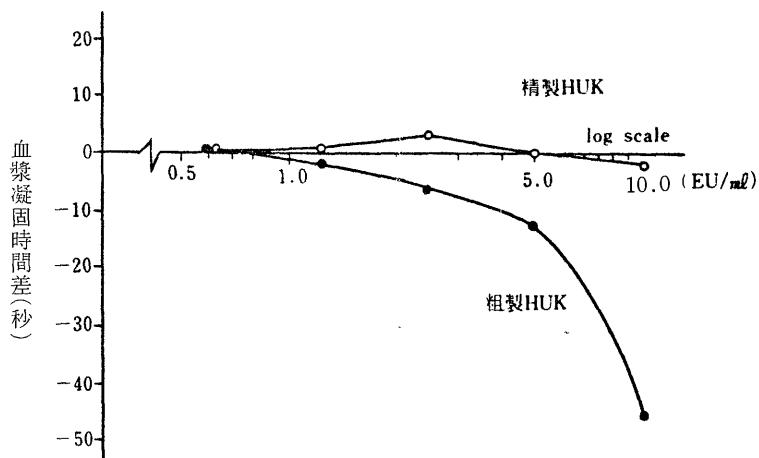


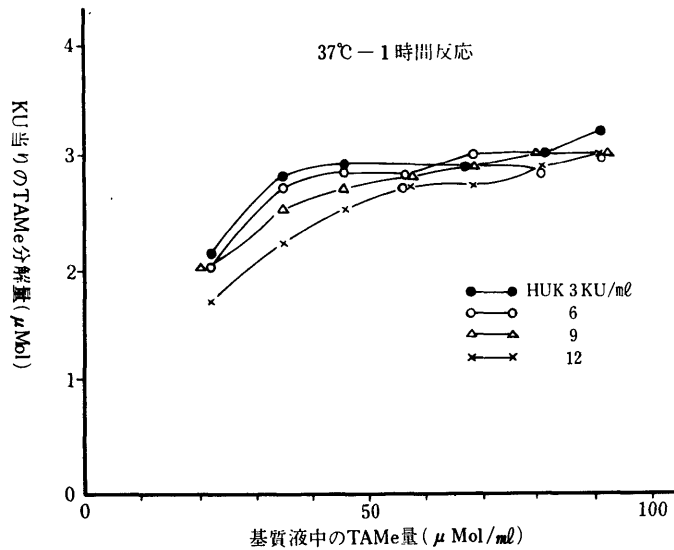


表3 精製HUKのカゼイン消化力

単位 (EU)	E <sub>280mμ</sub>		ΔE <sub>280mμ</sub> (a)-(b)	[TU] <sup>cas</sup> EU
	検液(a)	盲検(b)*		
0	0.085	0.085	0.0	0.0
0.63	0.084	0.086	-0.002	
1.25	0.100	0.110	-0.010	
2.50	0.111	0.100	0.010	
5.0	0.122	0.116	0.006	
10.0	0.172	0.170	0.002	

\* 盲検：カゼイン液 1 ml に 5%TCA 3 ml を加えたのち酵素液 1 ml を加える。

図7 TEMe 法における HUK 添加量と基質 TAME 量の関係



の値をもとにして加えた。HUKのエステラーゼ活性をTAME分解量から求めるときは、図から明らかなように、基質液 1 ml 中のTAME量を50~70μmolとし、HUKの添加量を最大9 KUとすると、KU当りのTAME分解量が一定となる。この条件で数回測定を行った結果から、37°、1時間の反応で、2.86±0.02μmolのTAMEを分解するHUKのエステラーゼ活性を1 EUと規定すると、エステラーゼ活性単位と生物学的活性単位が等価となる<sup>17)</sup>。つぎに精製HUK液0.2ml(2.04EU)とBAEe液3.0ml(1.026mg)を混ぜ、25°で反応させたとき、10分間に吸光値が0.10増加したので、BAEeが1 EUのHUKによって1分間に分解される量は0.0137

μmolであった。

5. キニン遊離活性：検液中の精製HUK、TP、PLの濃度を種々変えて、それぞれの検液がキニノーゲン液より遊離するキニン量(BK換算)を求め、図8の成績を得た。いずれの試料においても酵素濃度とキニン遊離量の間には直線性があり、それぞれの1単位1分間当りのキニン遊離量はHUKで約0.225μg、TPで約0.320μg、PLで約0.083μgであった。なお、このキニノーゲン液 1 ml に対して、各種のEUを含有する精製HUK液 1 mlを30°で作用させると、図9の曲線が得られる。

6. 遊離キニンの同定：精製HUK 3 EU、TP50mcg、

図8 HUK, TP, PL による人キニノーゲン液からのキニン遊離量

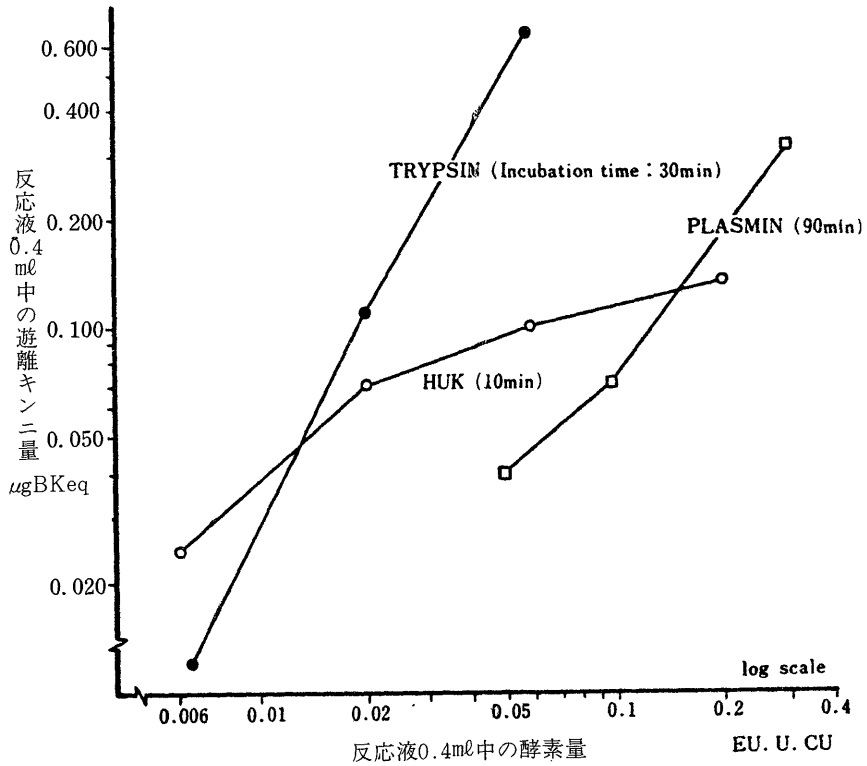


図9 HUK によるキニン遊離反応速度曲線

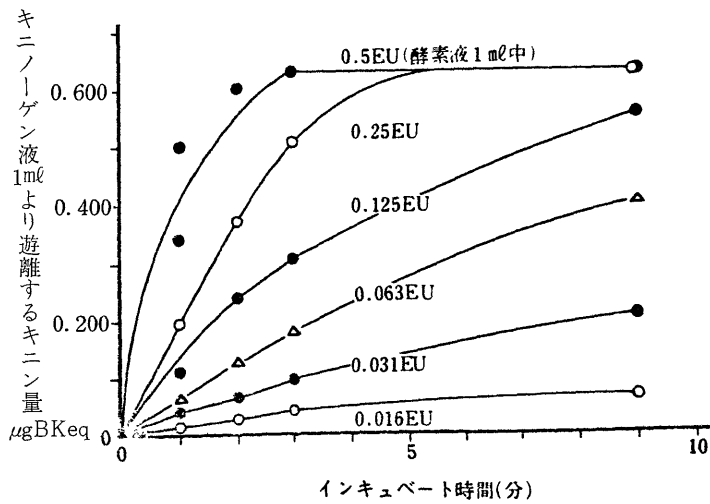


表4 HUK, TP, PLの阻害スペクトラム

阻 害 剤		遊 離 キ ニ ン 量 %		
種 類	濃 度 (mg/0.4ml反応液)	精 製 H U K (0.02EU-10min*)	ト リ プ シ ン (0.01U-30min)	プ ラ ス ミ ン (0.1CU-90min)
無 添 加 (対 照)		100% (0.076 $\mu$ gBKeq**)	100% (0.093 $\mu$ gBKeq)	100% (0.125 $\mu$ gBKeq)
S B T I	0.01	108	0	0
	0.1	102	0	0
	1.0	93	0	0
L B T I	0.01	94	0	0
	0.1	103	0	0
	1.0	105	0	0
E W T I	0.1	86	0	85
	1.0	100	0	40
	10.0	30	0	2
T R A S Y L O L	0.5 KIU	93	102	57
	5.0	0	0	0
	50.0	0	0	0
A M C H A	0.01	105	100	80
	0.1	86	100	63
	1.0	110	100	85
A C A	0.01	100	100	88
	0.1	94	102	100
	1.0	103	100	104

\* 反応液0.4ml中の酵素量とキニノーゲンとのインキュベート時間

\*\* 反応液0.4ml中に遊離したキニン量 (BK換算 $\mu$ g)

PL 1 CUを含む検液の作用によってキニノーゲン液から遊離するキニンの種類を同定したところ、HUKによって遊離するキニンはKdであって、BKは痕跡程度にすぎず、一方、TP、PLは支配的にBKを遊離することが判った(図10)。

7. 各種阻害剤に対する態度：精製HUK、TP、PLにつき各種阻害剤に対する態度を調べ、表4の成績を得た。阻害剤を加えないとき精製HUKは10分間のインキュベートで反応液の0.4ml当り0.076 $\mu$ g、TPは30分で0.093 $\mu$ g、PLは90分で0.125 $\mu$ gのBK換算量のキニンを遊離した。HUKはEWTI、TrasyloIによって阻害されたが、TP、PLはこのほかにSBTI、LBTIに

よっても阻害され、HUKの阻害スペクトルはTP、PLと明らかに異った。AMCHA、ACAは、いずれの酵素に対しても、ほとんど阻害作用を示さなかった。

8. 電気泳動分析：粗製ならびに精製HUKと人血清をアクリルアミド・アガロース混合ゲル平板で電気泳動し、蛋白染色を行うと、HUKはいずれも血清アルブミン位とトランスフェリン位に相当する個所が染ったが、トランスフェリン位は極く淡かった。一方、酵素染色によっては、粗製HUKではアルブミン位のみが濃く染った。精製HUKでは、このほかにトランスフェリン位とマクログロブリン位と思われる個所も淡く染った。人血清では、アルブミン位とトランスフェ

リン位の2個所が酵素染色された(図11).

### Ⅲ. 免疫学的分析結果について

1. 抗体価: 抗HUK家兔血清の抗体価を重層法で調べ、表5の成績を得た。この抗血清を56°, 30分間非働化したのち、精製HUK液と混ぜてHUK活性の阻害率を調べたところ、図12に示す通り、阻害率の推移には2種類の型がある。この抗原抗体反応では抗原と抗血清との反応量に最適域があり、他の抗原過剰域、抗体過剰域ではともに可溶性の抗原抗体結合物が形成されることが推定された。

2. 抗原分析: つぎに抗原として高度精製HUK液(0.1%)を用い、Oakley法で沈降線の出現を調べたところ、最高4本の沈降線が認められた。ただし、中央の2本は強い(図13)。

この4本の沈降線は蛋白染色を行うと特に中央の2本がよく染色された。エステラーゼ染色でもこの2本

が比較的濃く染色された。Ouchterlony法によって粗製、精製HUK、HPK、市販カリクレイン注射剤ならびに人血清との反応を行い、室温72時間放置後の沈降線を調べたところ、抗血清(原液)は粗製HUK(0.1%、0.2%液)および人血清に対して通常3本の沈降線を生じたが、精製HUK(0.2%液)、HPK(0.1%液)、市販カリクレイン注射剤(0.1%液)との間には沈降線を生じなかった。粗製HUKと人血清に認められた3本の沈降線のうち、抗血清側の2本は粗製HUKと人血清の間で融合した。精製HUKの濃度を1%と大にして反応させたところ、1~3本の沈降線を生じた。

このとき、人血清、粗製HUK(0.1%液)も同時に抗血清の周縁に配置したが、抗血清は人血清アルブミンと推定される成分と反応して強い沈降線を生じ、この沈降線は粗製HUKと抗血清の間に生じた沈降線と

図10 HUK, TP, PL によって遊離するキニンの同定

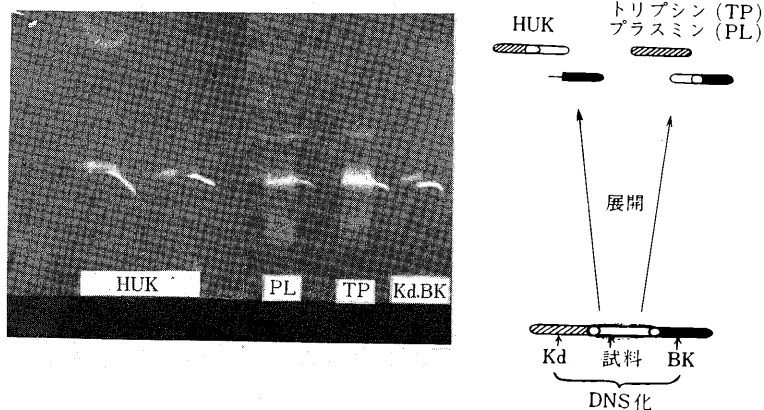


図11 HUK, HPK ならびに人血漿のエステラーゼ活性染色

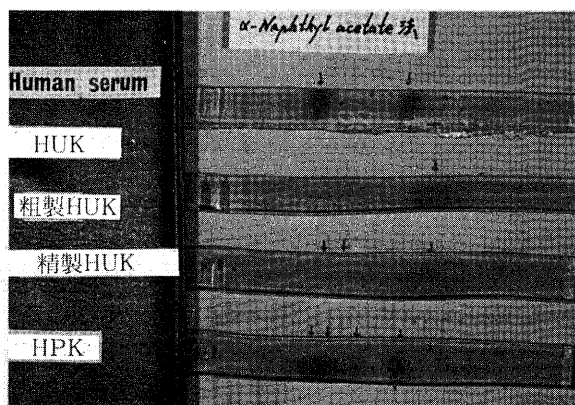


表5 抗HUK家兎血清の抗体価

群	免疫方法	家兎No.	抗体価*		
			抗原濃度 1%	抗原濃度 0.1%	抗原濃度 0.01%
A	第1回10KU**	1	64	32	32
	1週後第2回30KU	2	64	32	32
	1週後第3回50KU	3	64	32	32
		4	64	64	64
		5	64	32	32
		6	128	64	64
B	第1回10KU	3	64	256	
	1週後第2回30KU	4	128	64	
	1週後第3回50KU	5	64	32	
	3週後追加免疫100KU	6	128	128	
C	第1回10KU	7	128	128	128
	1週後第2回50KU	8	256	128	128
	1週後第3回100KU	9	128	64	64
		10	途中死亡	—	—
		11	128	128	64
		12	128	128	128

\* 反応陽性の抗血清最大希釈倍数

\*\* 家兎1匹当りの注射抗原量

融合し、精製HUKと抗血清の間に生じた沈降線の1本と交差した。この交差する精製HUKの沈降線は粗製HUKの抗体側のもう1本別の沈降線と spur を形成した(図14)。

つぎに、高度精製HUK(0.1%液)を反応させたところ、HUKと抗血清との間に2本の沈降線を生じ、そのうちの1本はヒト血清の沈降線と融合し、他の1本は交差した。この交差した沈降線はエステラーゼ染色で染色された(図15)。なお、高度精製HUKは抗ヒト血清ウマ血清との間にも1本の沈降線を生じたが、これは酵素染色されなかった。

粗製、精製HUK(1%液)につき免疫電気泳動によって人血清と比較して分析したところ、精製HUKは人血清アルブミンよりもやや速く(+)側に移動して沈降線を形成した。粗製HUKでも同じであったが、沈降線は精製HUKの場合よりもさらに(+)側のところで認められた(図16)。そして、これらのアルブミン

に近いが、それよりもやや易動度の大きい沈降線は酵素染色によってエステラーゼ活性を有することが示された。

#### IV. 薬理作用成績

##### 1. 血圧への作用

1) 正常血圧への作用：ウレタン麻酔犬の4匹の1匹当りに、HUK0.1~10KUを股静脈に注射し、頸動脈圧を測定したところ投与量0.1KUを閾値として血圧は全例において降下し、とくに最低血圧の低下が大であった。そして投与量が大なるほど血圧降下の度合も大となり、持続時間も長い、代表的な例を示すと、図17のようである。ただ血圧の降下度には個体差があり、たとえば2KUの投与量で投与前値に対して8~37%の範囲に降下率が分布した。しかしながら、各個体においては、一定範囲内においてかなり dose-response 関係が成立するようにみえた(図18)。

2) 高血圧ラットへの作用：SHRの尾静脈にHUKを

図12 抗血清のHUK 活性阻害曲線

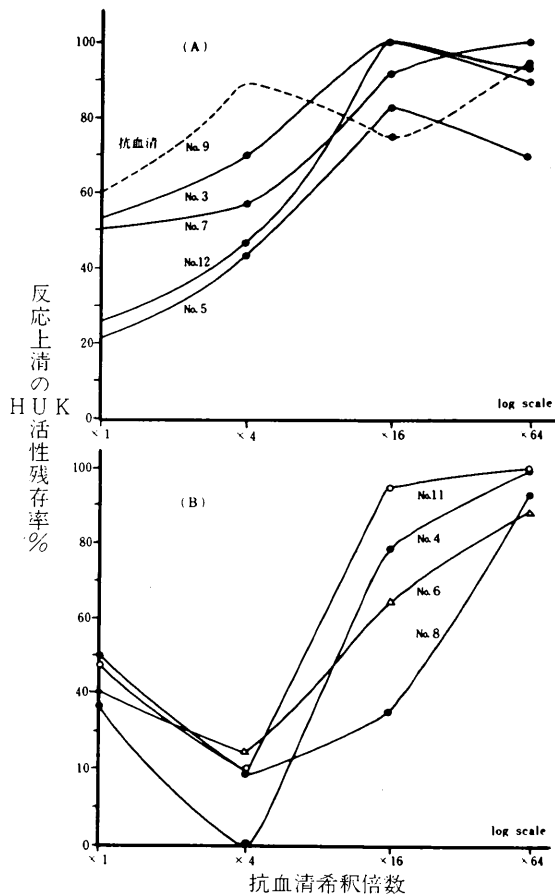


図14 Ouchterlony 法によるゲル拡散  
抗血清：No. 11

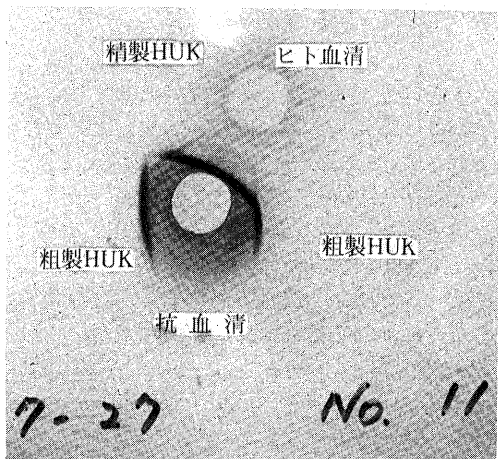


図13 Oakley 法によるゲル拡散  
抗原：精製 HUK. 抗血清：No. 9

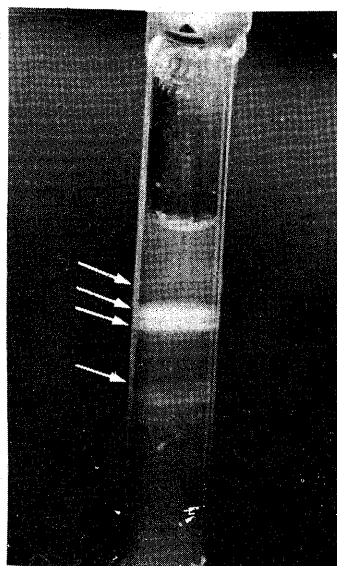
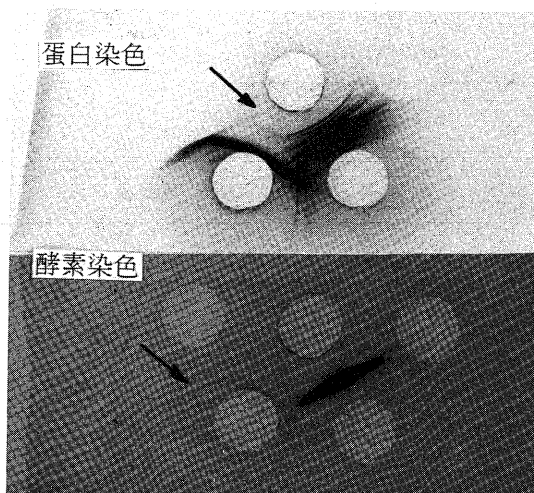


図15 Ouchterlony 法で生じた沈降線の蛋白  
ならびに酵素染色 抗原：高度精製 HUK.  
抗血清：No. 11



配置図

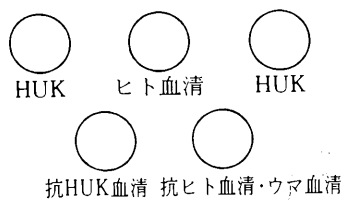
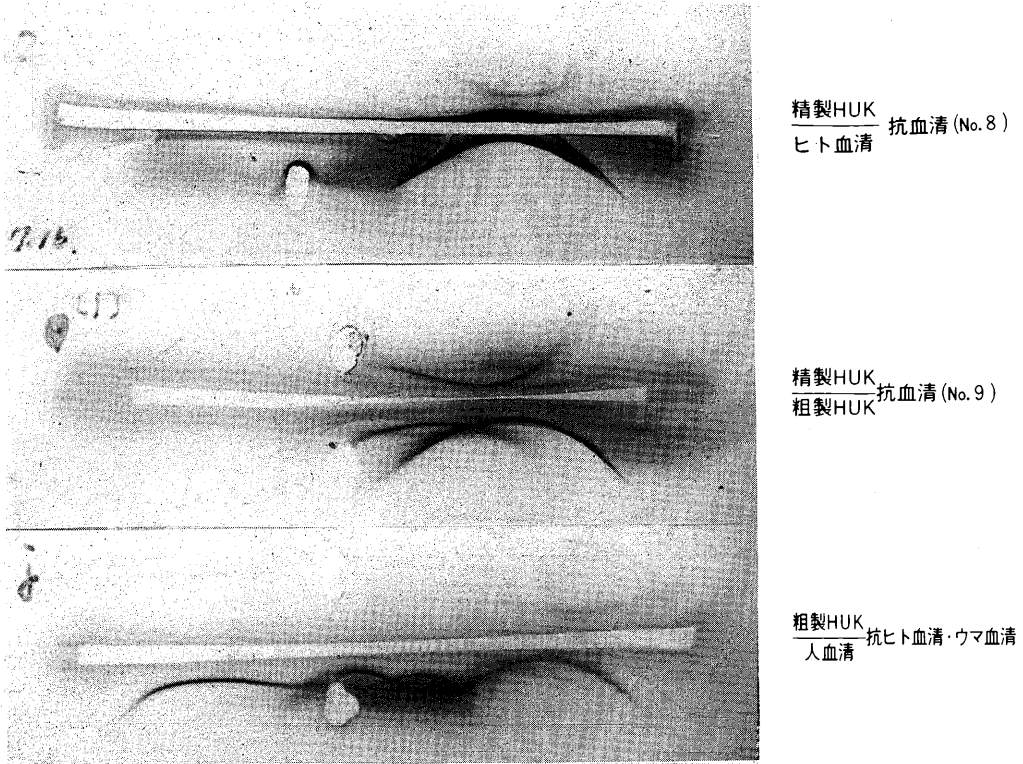


図16 免疫電気泳動図



ラット当り10KU投与しても頸動脈圧の降下を認めなかった。HPKの10KUを投与しても同じ結果であったので、BKを投与したところ、 $2.5\mu\text{g}$ の投与ではじめて約60mmHg低下した(図19)。なお、この現象はウレタンおよびチオペンタールナトリウムの麻酔剤による差はなかった。

すなわち、以上のSHRの血圧に及ぼすHUKの作用を犬の場合と比較すると、犬では0.1KUの静脈内投与で血圧が明らかに低下しはじめているのに対して、SHRでのこの現象は極めて異常であり、投与量をkg当りに換算すると、犬の2500倍の投与量でも血圧が低下しないことになる。この現象を解析するために、通常のWistar系ラットから採血してクエン酸ナトリウム加血漿を集め、これを $60^\circ$ 、30分間の加熱処理をして製したラット・キノーゲン液と精製HUKを反応させ、遊離するキニン量を測定した。比較のために、犬、ヒトのキノーゲン液についても試験した。その結果、犬、ヒトのキノーゲン液からは、低濃度のHUK液(0.05KU/ml)でも明らかにキニンが遊離したのに対して、ラットのキノーゲン液からは1.5KU/mlの高濃度HUKによってもキニンは遊離しなかった。

この場合、キノーゲン液を $60^\circ$ 、30分間加熱処理したというものの、なおキノーゲン液中にキニン分解酵素であるキナーゼ<sup>25)</sup>が残存することも考えられたので、反応液にキナーゼ阻害剤であるO-フェナンスロリン<sup>29)</sup>を $0.8\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に添加したが結果は同じであった。さらにHUKにかえて過剰のトリプシン(1mg)を加え、さらにO-フェナンスロリンも加えて同様に試験したが、ラット・キノーゲン液からは1ml当り $0.025\mu\text{g}$ のキニンを遊離したにすぎず、ヒト・キノーゲンの場合の $4\sim 5\mu\text{g}$ 、犬のキノーゲンからの $4.5\mu\text{g}$ <sup>30)</sup>に比べて著しく小さい値であった。これと同じことがSHRにも適応しうかどうか不明だが、SHRの血圧に対してHUKが作用しなかった原因を暗示するものと思われる。

2. 呼吸、心電図、心搏数ならびに心搏振幅への作用

先のウレタン麻酔犬において血圧を測定すると同時に呼吸曲線、心電図を記録し、心搏数、心搏振幅も測定したが、呼吸曲線、心電図はほとんど変化しなかったのに対して、心搏数は減じ、心搏振幅は増大した。このとき閾値は血圧降下のときよりも少し大きく3.0

図17 HUK 静脈投与によるウレタン麻醉犬の頸動脈圧の変化

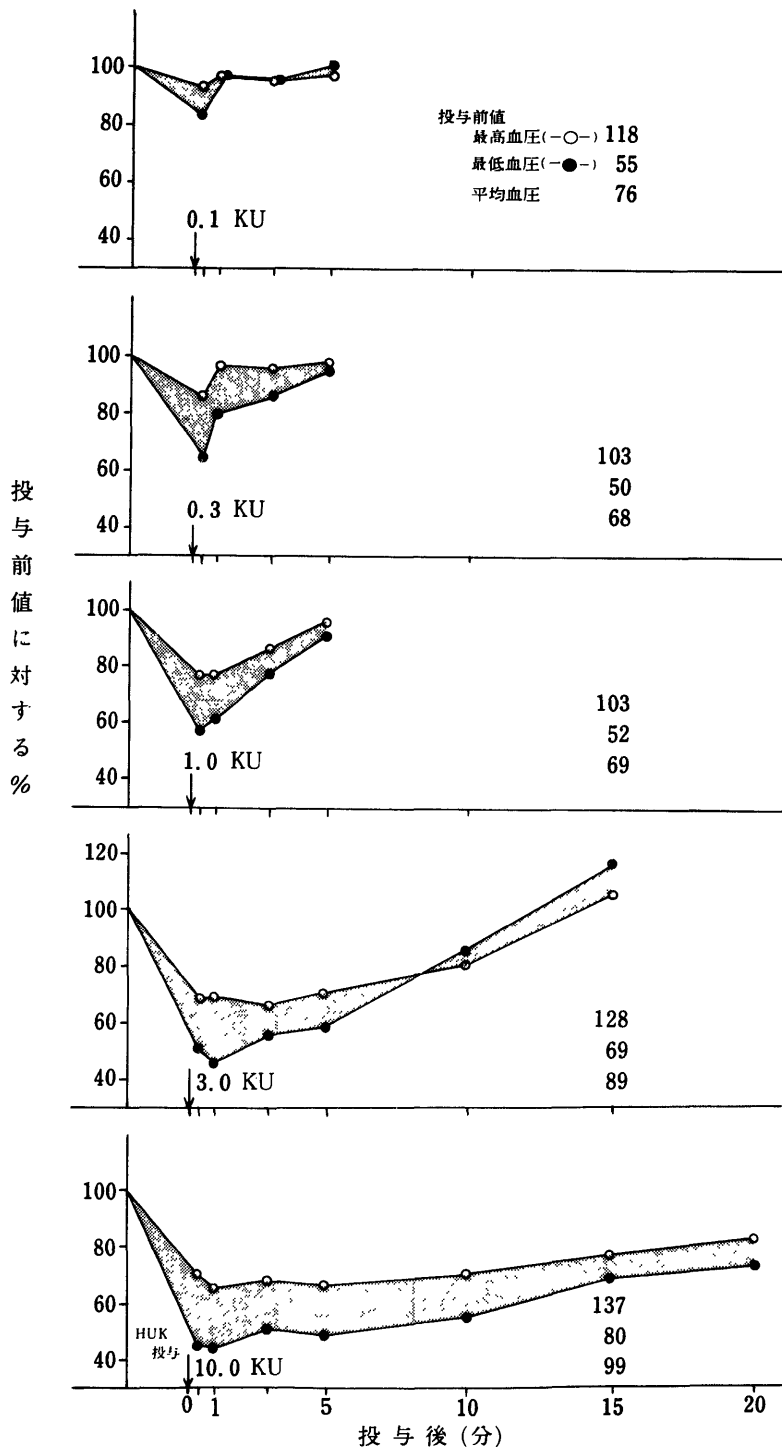




図18 HUK 静脈投与によるウレタン麻醉犬の頸動脈圧変化と HUK 投与量の関係

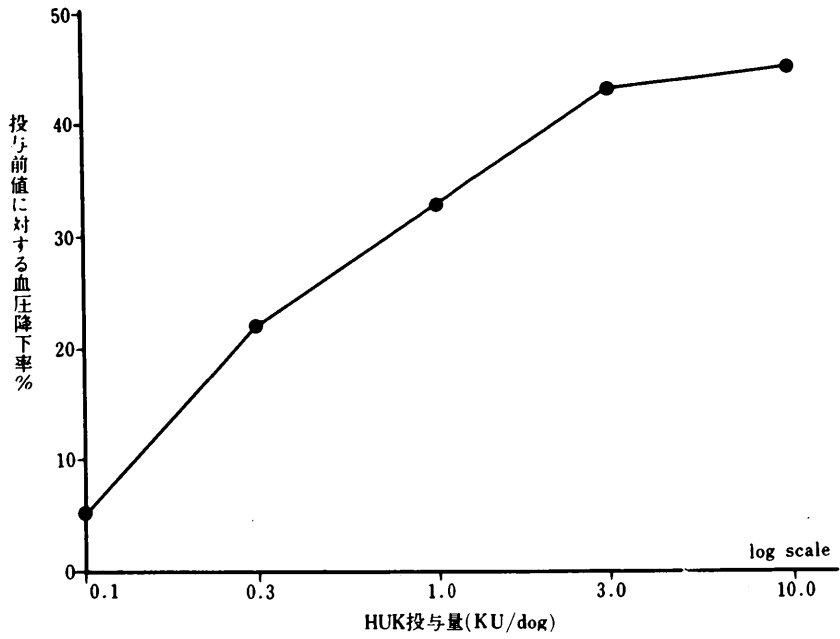
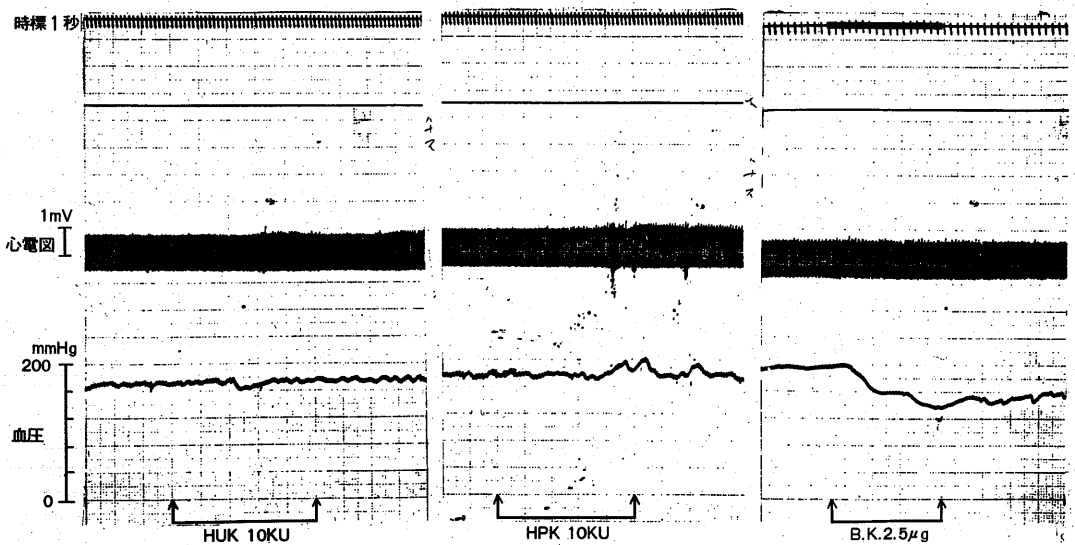


図19 チオペンタール麻醉 SHR の血圧に及ぼす影響



KUであった。先の図17の犬の例で心搏数と心搏振幅の変化を示す(図20)。

3. 血流量への作用

ウレタン麻酔犬(延17匹)の股静脈あるいは各種動脈に検液を注射して頸動脈圧の変化との関連の上で各種動脈の血流量の変化を調べ、表6に要約する結果を得た。血圧、血流量の変化は検液投与後ただちに始まり、血圧と血流量の変化が最大となる時間は一致した。変化は通常数分以内に終了した。HUKを静脈注射すると、血圧は例外なく低下したが、血流量は不変(肺動脈)、不変または減少(腎動脈)、増加(内頸動脈)というように一定した結果が得られなかった。H

UK動脈注射の場合は、投与量の関係もあってか血圧は低下しなかったが、少なくともここで測定した総頸動脈、股動脈においては、いずれも血流量は増加した。特に股動脈の血流量増加が著しかった。これらの代表的なポリグラフの図を示す(図21)。

血流量の変化が最も著しかった股動脈注射において、HUK活性測定法と関連して、HPKとの対比の上で、投与量と局所動脈血流量の変化の関係を別の犬で調べたところ、投与量と血流量変化の間に一定の相関関係がなりたつことを知った(図22, 23)。

このほか、モルモット摘出心を用い、HUKを5~20 KU注入したが、心運動は変化せず、血流量は増加

図20 ウレタン麻酔犬における HUK 静脈注射後の血圧降下と心搏数, 心搏振幅の関係

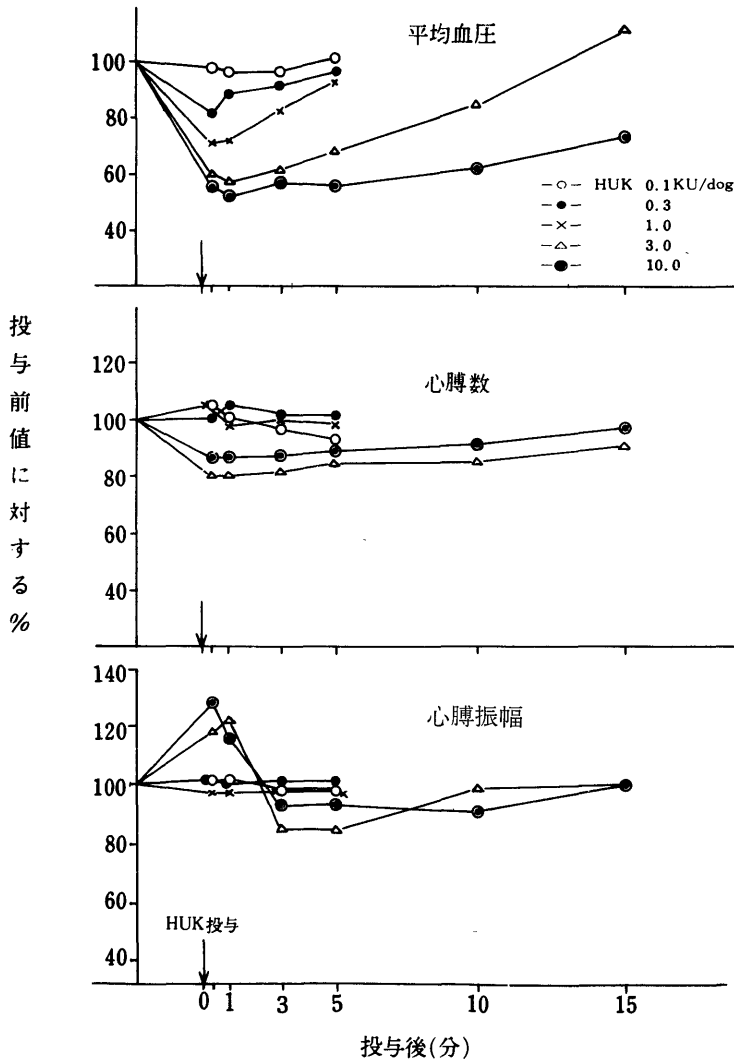


図21 HUK 投与後のウレタン麻醉犬の血圧および血流量ポリグラフ

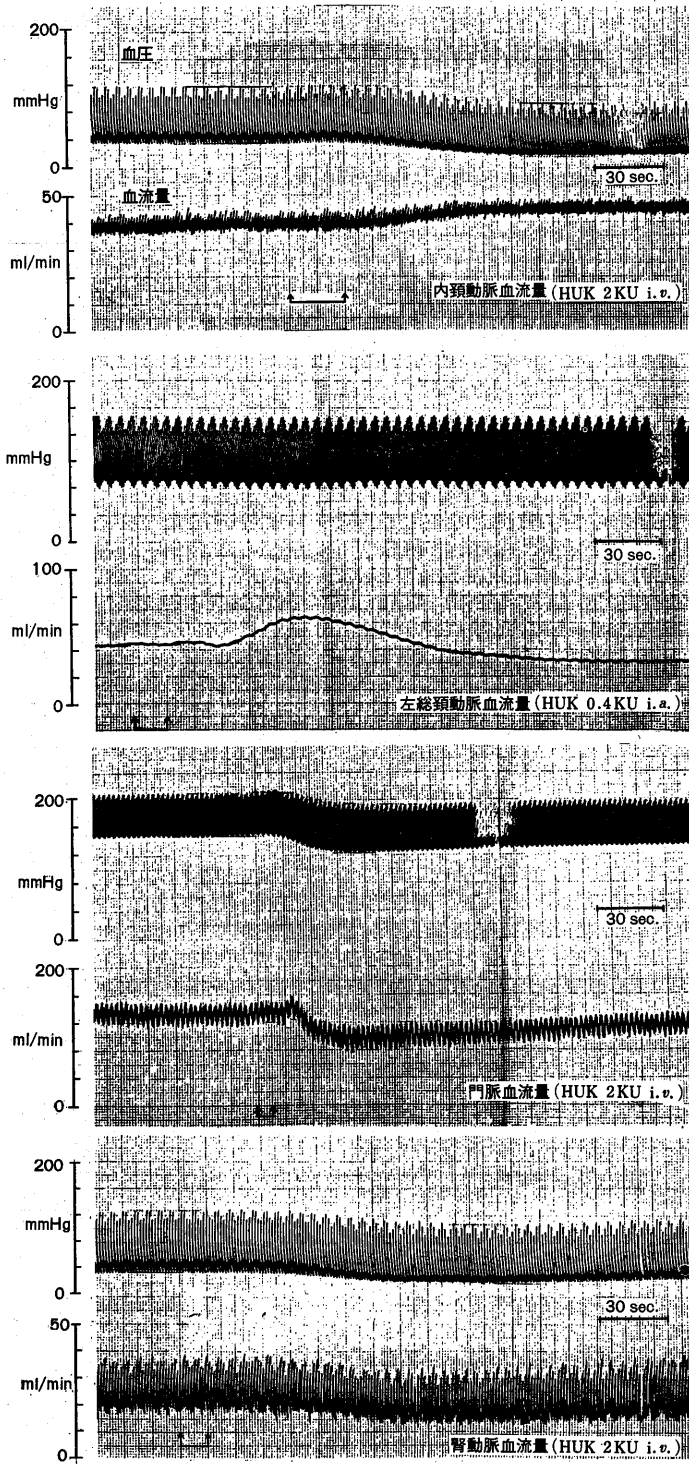


表6 HUK, HPK, BK がウレタン麻酔犬の血圧および血流量に対する作用

血流量測定局所名	投与物質	投与方法	投与量 (/dog)	血 流 量 ml/min			平均頸動脈圧 mmHg		
				投与前値	投与後 最低値 最高値	変 化 率 (%)	投与前値	投与後 最低値	変 化 率 (%)
内頸動脈	HUK	i. v.	2KU	39	50	+28	64	44	-31
		i. v.	2	50	55	+10	54	36	-33
左総頸動脈	HUK	i. a.	0.4	45	65	+44	160	161	0
肺動脈(右)	HUK	i. v.	2	200	200	0	81	69	-15
		i. v.	2	177	175	-1	74	62	-16
		i. v.	2	173	170	-2	75	63	-16
門 脈	HUK	i. v.	2	115	61*	-47	168	146	-13
		i. v.	2	143	110*	-23	169	157	-7
		i. v.	2	197	165	-16	164	148	-10
		i. v.	2	265	180	-32	106	89	-16
	HPK	i. v.	2	231	188	-19	106	76	-28
腎動脈	HUK	i. v.	1	25	20	-20	73	49	-33
		i. v.	2	18	18	0	93	64	-31
		i. v.	2	23	17	-29	91	59	-35
		i. v.	2	15	15	0	147	136	-8
		i. v.	5	15	15	0	142	129	-9
股動脈	HUK	i. v.	1	20	17	-15	85	55	-35
		i. a.	0.05	40	77	+92	88	89	+1

\* 投与直後、血流量が115→119または143→148と一時的に上昇した。

表7 摘出モルモット心の冠血流に対する HUK, HPK ならびに BK の作用

試 料	投与量	投与前値*に対する%	
		最高血流量	3分後血流量
HUK	5KU	103	97
	10	111	97
	20	124	98
HPK	10KU	112	109
BK	0.010 $\mu$ g	139	82
	0.025	133	111

\* 試験は各群において3~4回行なった。投与前値は平均0.10 (0.08~0.12)ml/secであった。

図22 HUK と HPK 投与後のウレタン麻酔犬股動脈血流量ポリグラフ

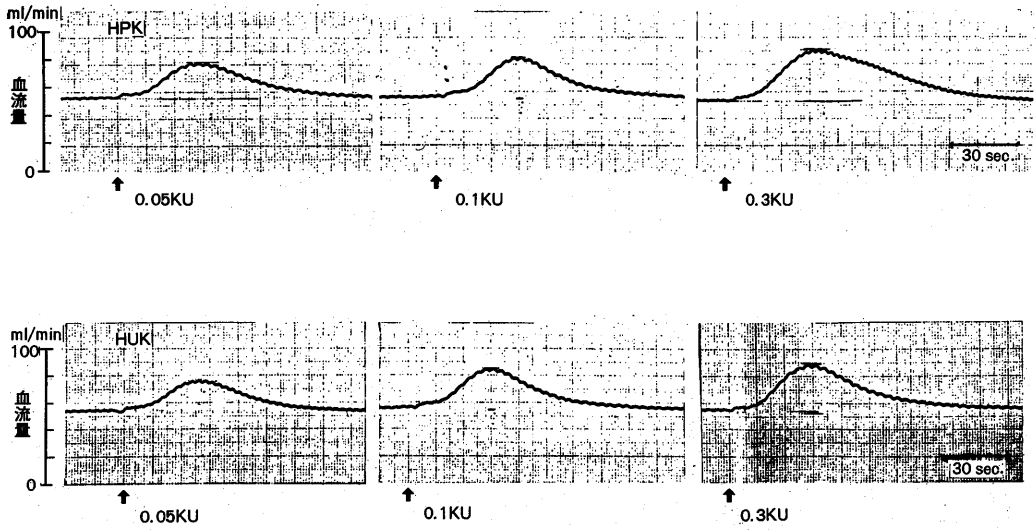
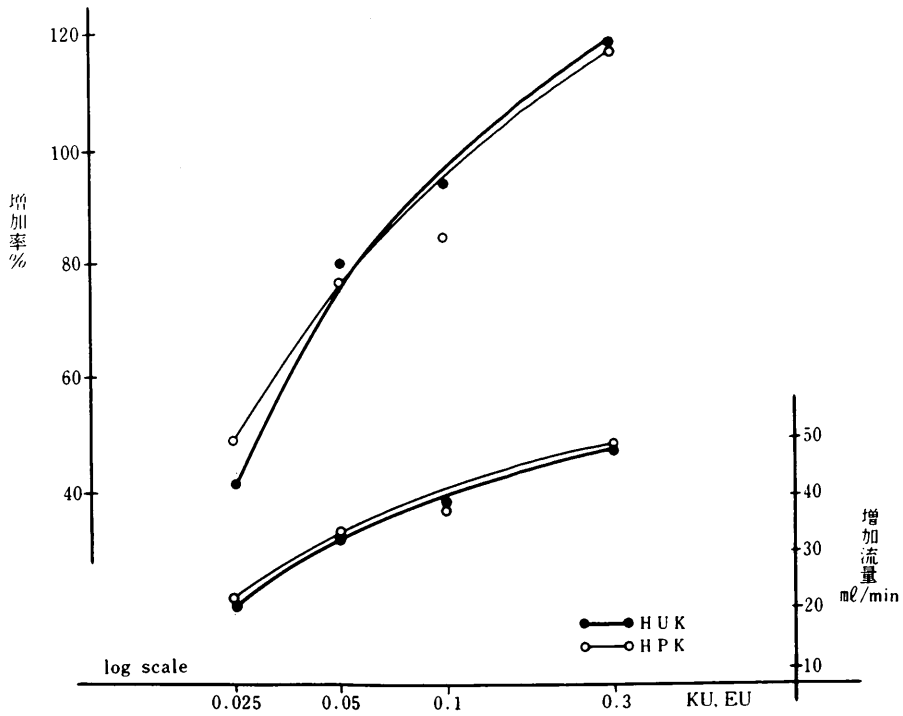


図23 HUK, HPK 投与量と股動脈血流量の変化の相関性



し、HPKの10KU、BKの0.01 $\mu$ gおよび0.025 $\mu$ g投与でも同じ結果を得た。

そしてHUKとHPKの10KU注入で冠血流量は投与前値に対してほぼ等しい血流量増加率を示したので、先の股動脈血流量の場合と同様、この値からもHUKとHPKの1KUはほとんど等価であることが判った(表7)。

## 考 察

### 1. 分離精製について。

HUKの薬理学的研究を行うに際して、これに供し得るHUKの精製度については、はっきりとした報告はない。Websterら<sup>31)</sup>は、粗製のHUKには、カリジン(Kd)をブラジキニン(BK)に転換するアミノペプチダーゼが存在すると述べ、また守屋<sup>3)</sup>は豚膵臓性カリクレイン(HPK)の場合、精製度の悪い標品はカゼイン分解力を有する画分が混在すると述べている。人尿由来の物質について薬理学的研究を行う場合、トロンボプラスチン様活性物質あるいは血液型物質の混在が問題になるから<sup>3)</sup><sup>32)</sup>、筆者は、これらの因子が混在しないHUKを薬理学的研究に供しうる標品と定め、その精製法を検討した。

HUKの分離精製法で最も重要な段階は、尿中に極く微量<sup>3)</sup>しか含まれていないHUKを能率よく濃縮する操作である。筆者は、ここに報告したシリカゲル、DEAE・セファデックスの他に、従来からHUKの吸着剤として使用されているIRC-50やDEAE・セルローズなど<sup>7)</sup><sup>33)</sup>も用いて原尿からのHUK吸着を検討したが、HUKの安定なpH領域(4~8)における吸着能とその後の操作の容易性から、シリカゲルが最もすぐれていると結論した。シリカゲルからのHUKの溶出は塩化アンモニウム・アンモニア緩衝液で行うことにしたが、このようにして溶出された液のHUK含量は、原尿の1/10の液量となり、比活性も7倍と濃縮されるので、以後は通常精製法を適当に組み合わせて精製することが可能となる。筆者はPardoら<sup>11)</sup><sup>12)</sup>の硫酸アンモニウム沈殿、守屋ら<sup>7)</sup>のゲル濾過、カラムクロマトグラフィーを行うことにした。本報告では原尿1000mlを出発量として分離・精製した結果についてのみ報告したが、本法の規模をそのまま拡大して(カラムは最高径10cm、長さ100cmまで大とすることが可能である)、原尿1500 $\ell$ (通常180,000EUを含有する)より粗製HUK90,000EU、精製HUK65,000EUを得ることが出来る。

### 2. 純度と性状について。

精製HUKではトロンボプラスチン様活性物質の混

在を認めなかったが、粗製HUKでは、逆に血漿の凝固を遅延させる因子の含有が推定された。この因子の本態は判っていない。精製HUKでは型物質もカゼイン消化力を有する因子も含んでいなかった。カゼイン消化活性のないことは、HUKと同じようにキニノーゲンに作用してキニンを遊離すると同時に蛋白分解活性を有するトリプシン(TP)、プラスミン(PL)の混在を否定することになるから重要である。

HUKは、カリクレインの一般的性質にもとづいて、N- $\alpha$ -アシル-L-アルギニンエステルを加水分解する。そしてHUKの場合、他の臓器性カリクレインと異って、他にこのエステラーゼ活性を有する夾雑物が含有されていないので、この値がHUKそのものの活性を示すことは、すでに守屋ら<sup>7)</sup><sup>33)</sup><sup>31)</sup>が指摘するところである。この性質を利用したカリクレイン力価測定法が守屋、Websterら<sup>8)</sup><sup>10)</sup>によって定められているが、ただエステラーゼ活性値のどの量をもって1単位とするかが必ずしも明確でなかった。筆者は守屋によって生物活性値(KU)が定められたHUKを用い、その1KUと等価になる化学的活性値(エステラーゼ活性値)の測定条件を検討し、37 $^{\circ}$ で1時間反応することにより2.86 $\mu$ molのTAMEを分解する量を1EUと定めた。このようにするとHUKの化学的活性値と生物学的活性値が1:1となって便利である。なお、Dinizら<sup>11)</sup>によれば、HUKはTAMEを分解するが、BAEeはほとんど分解しないと述べているが、筆者の標品ではBAEeも分解した。カリクレインが血漿キニノーゲンと作用して、BKまたはKdを遊離することは周知されているところであるが<sup>31)</sup><sup>35)</sup><sup>39)</sup>、精製HUKは腺カリクレインの特徴であるKdの遊離作用を示し、BKを遊離するTP、PLとは明らかに区別された。そしてこのことは、先に述べたアミノペプチダーゼが精製HUKにほとんど存在しないことを間接的に証明していると思われる。HUKは遊離するキニンの種類によるほか、各種の阻害剤による阻害の受け方からもTP、PLと区別された。なお、精製HUKの阻害スペクトラムはWerleら<sup>40)</sup><sup>43)</sup>の報告とほとんど一致した。

電気泳動分析によると精製HUKには人血清のアルブミン、トランスフェリン、マクログロブリン位に相当する個所に、それぞれ1個宛のエステラーゼ活性を認めたが、尿中にHUK以外にエステラーゼ活性を有するものが存在しないという従来の説からすれば、これらはすべてHUKであると思われるが、粗製HUKではアルブミン位のみこの活性を認めるにすぎないので、分離精製の過程で生じた人工的なもの<sup>14)</sup>か、または守屋ら<sup>45)</sup><sup>46)</sup>が指摘する isozyme の存在を示唆する

ものか明らかでない。なお、人血清にもアルブミン位とトランスフェリン位に同じようにエステラーゼ活性が存在したが<sup>47)</sup>、このものとHUKのエステラーゼ活性がどのように関連しているかについても判っていない。

### 3. 免疫学的分析結果について

HUKに関する免疫学的研究は、Websterら<sup>48)</sup>によってなされているにすぎず、得られた抗HUK家兔血清は精製HUK (50FU/mg) と反応してHUKに特異的と思われる1本の沈降線を生じ、かつこの抗血清はHUKの血管拡張作用を阻害するが、エステラーゼ活性はあまり阻害しないと述べている。筆者らの製した抗血清もHUKの血流量増加作用を阻害するが、この阻害程度と抗血清の希釈倍数との関係から、抗血清が抗原HUKと反応するとき、抗原HUKと抗血清の間に反応最適比の領域があり、他の域では可溶性の抗原抗体結合物が形成されるらしいことを推定したが、これと同じような現象が犬小腸フォスファターゼで示されている<sup>49)</sup>。なお、家兔血清にはカリクレイン作用を阻害する阻害物質が存在するといわれている<sup>27)48)</sup>。筆者の実験によればこの阻害物質は、56°、30分間の加熱処理で不活性化されることが、正常家兔血清を用いてのHUKの血流量増加試験成績より判っている。このような抗血清を用いて免疫学的な分析を行った結果より、HUKの本質は免疫学的に人血清アルブミンに近い性質を有するが、アルブミンよりも易動度のやや大きい性質をもつものが主体であろうと推定した。実際このものはエステラーゼ活性染色によって染色されたので、この推定はほぼ確実なものと思われる。

### 4. 薬理作用について

HUKに限らず、カリクレインは末梢組織に対して直接に作用せず、キノーゲンからのキニン遊離を介して作用するから、カリクレインの薬理作用はキニンの薬理作用にはかならない。本報告では実験動物の血圧および血流量に及ぼす薬理作用を主に検討したが、これは周知されるキニンの血管、特に毛細血管、細動脈の拡張作用にもとづくものである<sup>50)~53)</sup>。HUKを犬の股静脈に注射したところ、0.1KU/dogを閾値として頸動脈圧は例外なく降下したが、この現象は、そもそもカリクレイン発見の端緒となった作用であり、すでにFreyら<sup>54)</sup>によって報告されているところである。一方、この血圧降下作用は、人の本態性高血圧症に近いといわれている高血圧自然発症ラット (SHR) では認められず、HPKでもほとんど同じであり、BKの大量投与 (2.5μg/Rat) によってのみ、かろうじて認められた。この原因として筆者はSHRにはカリク

レインと反応するキノーゲンが血漿中に不足するのではないかと推定したが、Fascioloら<sup>35)56)</sup>もラット血清からHPKや腺カリクレインによってキニンが遊離し難いと述べている。そのほか、先に述べた家兔血清にみられるようなカリクレイン・インヒビターが存在するか、あるいはまたカリクレインによって生成されたキニンを分解するキナーゼが極めて多量に存在するかもしれない、もしキナーゼが多量存在するとすれば、SHRにBKを大量投与しても血圧が低下しなかったことをある程度理由づけられると思われるが、通常のラット血清より製したキノーゲンにキナーゼ阻害剤であるO-フェナンスロリンを加えた実験成績からみて、その可能性は少いように思われる。

先のウレタン麻酔犬において、HUKを股静脈に注射すると、頸動脈圧の低下とともに心搏数は減少し、心搏振幅 (脈圧) は増大したが、Freyら<sup>54)55)</sup>は心搏数も増大すると報告している。ただし、Frey自身も使用した計器の精度は乏しいと断わっている。カリクレインの注射によって内頸動脈血流量が増加することはKellerら<sup>56)57)</sup>によってすでに知られており、かつこの増加とともに脳容量が著しく増大し、頭蓋内の細動脈血管が拡張することが知られている<sup>58)59)</sup>。HUKの静脈投与によっても内頸動脈血流量が増加しているので、このような現象が頭蓋内で生じているであろうと推察される。HUKの静脈注射によって肺動脈血流量はほとんど変化しなかったが、これに関する報告はない。ただカリクレイン、BKを静脈内投与すると肺動脈圧の上昇、venous returnの増大があることが報告されている<sup>60)~62)</sup>。門脈血流量の変化についても報告は見当たらないが、比較材料として用いたHPKでも同じ成績が得られているので、門脈血流量の減少はHUKに特異的と考え難い。腎動脈血流量もHUKの投与によって減少したが、BKを用いての実験から血管の抵抗性が減弱し血流量は増大する<sup>63)64)</sup>との報告と異ったが、その理由については判っていない。HUKの股動脈注射によって股動脈血流量が著しく増大したが、この現象はすでに知られているところであり、この高い感受性を利用してカリクレインの生物活性すなわちカリクレイン単位 (KU) の測定法とすることが提唱されている<sup>9)</sup>。この場合、血流量の増加率には犬の個体差があるが、筆者の実験成績を見ても判るように入一個体においては、投与量と血流量増加には明らかに相関性があり、一定の標準品と対比の上で血流量増加率を求めると常に一定の活性値を得ることが出来る。筆者らは守屋の豚脾臓性カリクレイン標準品を用いることにしている。

以上述べたHUKの薬理作用は投与量にもよるが、通常投与後数分間で終了した。これはHUKの作用によって生じたキニンが流血中の諸因子ですみやかに破壊されることによる<sup>30)65)</sup>と思われるが、それでもキニン投与のときに比べると効果の持続時間は長いようである。なお、カリクレインの頻回投与によるtachyphylaxisの報告<sup>66)</sup>があるが、今回のHUKによる実験範囲(1回投与後、15分以上休止、最高投与量1回10KU/dog、投回数8回まで)では、そのような現象は認められなかった。その原因として基質キニノーゲンの血中レベルの減少が考えられるから<sup>7)</sup>、HUK投与によるtachyphylaxis招来は十分予想されることである。

### 結 語

諸種の薬理学的研究に供し得る人尿性カリクレイン(以下HUKと略す)の精製尺度として、血液凝固系関連因子、血液型物質、カゼイン消化力を有する因子を含有しないものと定め、これを満足する標品の分離精製法を検討し、得た標品につき、純度、性状を検討したのち、免疫学的分析を加え、さらに実験動物の血圧、血流量に対する作用を検討し、次の結果を得た。

1. 健康男子尿(1000ml)のpHを4~5とし、これに2.5%量のシリカゲルを加えてHUKを吸着したのち、0.3M塩化アンモニウム・アンモニア緩衝液(pH 8)で溶出することにより、尿中に微量に存在するHUKを濃縮した。この溶出液を硫酸アンモニウム60%飽和で塩析を行い、得た沈殿物を水にとかしてセファデックス・G75によるゲル濾過を行って粗製HUKを得た。これをさらにDEAE・セファデックスでカラムクロマトグラフィーを行って精製HUKとする方法を定めた。

2. 本法により原尿のエステラーゼ活性(EU値)は粗製HUKで56.4%、精製HUKで41%回収され、比活性(EU/OD280m $\mu$ )の上昇度から精製倍数を求めると、粗製HUKで17.2倍、精製HUKで74倍であった。

3. 本法でプールした粗製HUK(3.5EU/mg)、精製HUK(12.9EU/mg)につき純度を調べたところ、粗製HUKは血液凝固を遅延する因子、血液型物質ならびにカゼイン消化力を有する因子を多少とも含有したが、精製HUKにはこれらの因子は存在しなかった。

4. 精製HUKはp-tosyl-l-arginine methyl esterとp-benzoyl-l-arginine ethyl esterを分解した。

5. 精製HUKは人血漿キニノーゲンに作用してカリジンを遊離した。HUKのキニン遊離活性はTrasyolol,

egg white trypsin inhibitorによって阻害されるが、soybean, lima bean trypsin inhibitorによって阻害されない。このことからHUKは豚膵臓性カリクレイン、トリプシン、プラスミンと区別された。

6. HUKを電気泳動したのち、アミド黒10Bで蛋白染色を、 $\alpha$ -ナフチールアセテートによってエステラーゼ活性染色を行ったところ、粗製、精製にかかわらず、HUKの蛋白組成はアルブミン位に泳動する主成分、トランスフェリン位に泳動する微量成分よりなり、エステラーゼ活性は粗製HUK、精製HUKともにアルブミン位に認められたが、精製HUKでは微弱ながらトランスフェリン位とマクログロブリン位にも活性が認められた。

7. 抗粗製HUK家兔血清を用いて、HUKを免疫学的に分析したところ、HUKの本質は人血清アルブミンに近い性質を有するが、これよりも電気泳動的にやや易動度が大きく、アルブミンと区別された。

8. 精製HUKをウレタン麻酔犬の股静脈内に注射すると、0.1KU(犬当り)の投与量を閾値として、頸動脈圧は例外なく低下し、とくに最低血圧の低下度が著しかった。このとき閾値を3.0KUとして心搏数は減少し、心搏振幅は増大したが、呼吸曲線、心電図(第II誘導)には異常を認めなかった。血流量は1~5KUを静脈注射したとき、測定箇所(肺動脈、腎動脈、門脈、股動脈、内頸動脈)によって差があり、一定の傾向を示さなかったが、動脈局所に投与した場合、0.05, 0.4KUの微量でも測定した2箇所(総頸動脈、股動脈)において、いずれも血流量は増加した。

また、摘出モルモット心の動脈弓内にHUKを5~20KU注入したとき、冠血流量は明らかに増加した。

以上の成績は比較材料として用いた守屋の豚膵臓性カリクレインおよび合成ブラジキニン投与による成績と一致したし、かつ諸家の報告ともほぼ一致したので、HUKは他のカリクレイン(またはこれが遊離するキニン)と異なる特異的な薬理作用を示さないとと思われる。

9. 精製HUKの10KUを静脈内注射し、自然発症高血圧ラットの血圧に対するHUKの降圧作用をしらべたが、無効であった。ラット・キニノーゲンがカリクレイン、トリプシンの作用によってキニンを遊離し難いことが、その原因であろうと推定された。

稿を終るに臨み、終始御指導、御校閲を賜った恩師石川大刀雄教授に深甚なる感謝を捧げます。

また、種々御指導を戴いた金沢大学がん研究所倉田自



章教授、東京理科大学薬学部守屋寛教授ならびに本研究の遂行のために多大のご鞭撻を賜った内藤良一博士ならびに多大のご支援を戴いたカリクレイン研究グループの各位に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Frey, E. K. : Langenbecks Arch. Klin. Chir., 142, 663 (1926).
- 2) 守屋 寛・出口雅三・浅野英一 : 薬学誌, 78, 346 (1958).
- 3) Alkjaersig, N., Fletcher, A. P. & Sherry, S. : J. Lab. Clin. Med., 65, 732 (1965).
- 4) 守屋 寛 : 総臨, 16, 24 (1967).
- 5) 尾崎正若 : 医学のあゆみ, 78, 113 (1971).
- 6) Okamoto, K. & Aoki, K. : Jap. Circul. J., 27, 282 (1963).
- 7) Moriya, H., Pierce, J. V. & Webster, M. E. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, 172 (1963).
- 8) Webster, M. E. & Pierce, J. V. : Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 107, 186 (1961).
- 9) 守屋 寛 : 日臨, 22, 2659 (1964).
- 10) Werle, E. & Trautschold, I. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, 117 (1963).
- 11) Pardo, E. S., Pardo, J. L. & Brandi, C. M. W. : Arch. Int. Pharmacodyn., 137, 358 (1962).
- 12) Pardo, J. L., Pardo, E. S. & Brandi, C. M. W. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, 186 (1963).
- 13) Kunitz, M. : J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947).
- 14) 満田久輝 : 実験栄養化学, 408頁, 東京, いずみ書房, 1964.
- 15) Peacock, A. C. & Dingman, C. W. : Biochem., 7, 668 (1968).
- 16) 守屋 寛・山口裕子 : 臨病理, 特11, 69 (1968).
- 17) 吉川政己・宇尾野公義・室隆雄・田辺等・上田敏・朝長正徳 : 酵素研究法 (赤堀編), 第4巻, 641頁, 東京, 朝倉書店, 1968.
- 18) Habermann, E. : Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 328, 15 (1962).
- 19) 鹿取 信 : 医学のあゆみ, 68, 2号, おぼえがき (1969).
- 20) Webster, M. E. : Handbook of experimental pharmacology, XXV, p. 659, New York, Springer-Verlag, 1970.
- 21) 田村善蔵・中島暉躬 : 蛋・核・酵, 2, 729 (1967).
- 22) 吉田久信・久保博昭 : 代謝, 6, 663 (1969).
- 23) Yano, M., Kato, H., Nagasawa, S. & Suzuki, T. : J. Biochem., 62, 386 (1967).
- 24) Suzuki, T., Mizushima, Y., Sato, T. & Iwanaga, S. : J. Biochem., 57, 14 (1965).
- 25) Vogel, R. : Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 349, 926 (1968).
- 26) Oakley, C. L. & Fulthorpe, A. J. : J. Pathol. Bacteriol., 65, 49 (1953).
- 27) Moriya, H. & Yamazaki, K. : J. Biochem., 58, 201 (1965).
- 28) 中尾 健・平賀興吾・柳田知司 : 生体の科学, 6, 181 (1970).
- 29) Dyrud, O. K., Rinvik, S. F. & Jensen, K. B. : Acta, Pharm. Toxicol., 23, 235 (1965).
- 30) Diniz, C. R. & Carvalho, I. F. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, 77 (1963).
- 31) Webster, M. E. & Pierce, J. V. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, 91 (1963).
- 32) McNicol, G. P., Gale, S. B. & Douglas, A. S. : Brit. M. J., 1, 909 (1963).
- 33) Moriya, H., Yamazaki, K. & Fukushima, H. : J. Biochem., 58, 201 (1965).
- 34) Diniz, C. R., Pereir, A. A., Barroso, J. & Mares-Guia, M. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 5, 448 (1965).
- 35) Pierce, J. V. & Webster, M. E. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 5, 353 (1961).
- 36) Werle, E. & Vogel, R. : Arch. int. Pharmacodyn., 131, 257 (1961).
- 37) Habermann, E. & Blennemann, G. : Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol., 249, 357 (1964).
- 38) Lewis, G. P. : J. Physiol., 140, 285 (1958).
- 39) Vaan Armen, C. G. & Miller, L. M. : J. Pharmacol. exptl. therap., 131, 366 (1961).
- 40) Werle, E., Götzen, W. & Keppler, A. : Biochem. Z., 289, 217 (1937).
- 41) Werle, E., Forell, M. M. & Maier, L. : Naturwissenschaften, 41, 89 (1954).
- 42) Werle, E. & Maier, L. : Biochem. Z., 323, 279 (1952).

- 43) **Back, N. & Steger, R.** : Fed. Proc., **27**, 96 (1968).
- 44) **Habermann, E.** : Ann. N. Y. Acad. Sci., **104**, 130 (1963).
- 45) 守屋 寛 : 日医師会誌, **68**, 932 (1970).
- 46) 松田兆史・藤本幸男・守屋 寛・森脇千秋 : 日本薬学会第92年会, 講演要旨集, 第三分冊, 93頁 (1972).
- 47) 吉川政己・宇尾野公義・室 隆雄・田辺 等・上田 敏・朝長正徳 : 酵素研究法 (赤堀編), 第4巻, 620頁, 東京, 朝倉書店, 1968.
- 48) **Webster, M. E., Emmart, E. W., Turner, W. A., Moriya, H. & Pierce, J. C.** : Biochem. Pharmacol., **12**, 511 (1963).
- 49) **Schlamowitz, M.** : J. Immunol., **80**, 176 (1958).
- 50) 阿部圭志・三輪責力・吉永 馨 : 代謝, **8**, 491 (1971).
- 51) 土屋雅春・神坂幸良・織田正也 : 代謝, **8**, 484 (1971).
- 52) **Keatinge, W. R.** : Circulat. Res., **18**, 641 (1966).
- 53) **Kovalcik, V.** : Nature, **196**, 174 (1962).
- 54) **Frey, E. K. & Kraut, H.** : Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol., **133**, 1 (1928).
- 55) **Frey, E. K. & Kraut, H.** : Z. physiol. chem., **157**, 32 (1926).
- 56) **Keller, C. J.** : Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol., **154**, 357 (1930).
- 57) **Schneider, D. & Springorun, P. W.** : Langenbecks Arch. Klin. Chir., **194**, 373 (1939).
- 58) **Reeke, I. & Werle, E.** : Z. ges. exp. Med., **36**, 398 (1935).
- 59) **Sicuteri, F.** : Triangel, **6**, 116 (1963).
- 60) **Krayer, O. & Rühl, A.** : Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol., **162**, 70 (1931).
- 61) **Nakano, J.** : Arch. int. Pharmacodyn., **157**, 1 (1965).
- 62) **Emerson, T. E.** : Amer. J. physiol., **212**, 1455 (1967).
- 63) **Takacs, L. & Albert, K.** : Arch. int. Pharmacodyn., **155**, 117 (1965).
- 64) **Arcidiacono, F. A., Reininger, E. J. & Sapirstein, L. A.** : 4th European Conf. on Microcirculation, (ed. By Harders, H.) p. 29, Basel and New York, S. Karger, 1966.
- 65) **McCarthy, D. A., Potter, D. E. & Niedaides, E. D.** : J. Pharmacol. exp. Ther., **148**, 117 (1965).
- 66) **Habermann, E. & Klett, W.** : Bioch. Zeit., **346**, 133 (1966).
- 67) **Werle, E.** : Ärztl. Forsch., **18**, 281 (1964).

## Abstract

For the physiological studies of human urinary kallikren (HUK), it is desirable that the preparation of HUK is not contaminated with any thromboplastic and caseinolytic moieties as well as blood type substances.

The crude and partially purified HUK isolated from human urine by adsorption on silica gel and elution with 0.3M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  buffer, pH8.0.

This procedure was followed by salting out with ammonium sulfate, gel filtration on sephadex G-75 and column chromatography on DEAE-Sephadex A-50 according to the method of Pardo et al. and Moriya.

The crude HUN (3.5EU/mg. prepared by gel filtration) was not satisfactory in its purity, while the partially purified HUK (12.9EU/mg. chromatographically purified) had not the impure moieties described above, so the latter was chosen for the biochemical, immunological and physiological studies.

HUK could release kallidin from human plasma, and was distinguished from trypsin, plasmin and hog pancreas kallikren (HPK) on some biochemical and immunological properties, but could not distinguished substantially from HPK on the physiological properties, which increased the blood flow in the carotid or the femoral arteries of the normal anesthetized dog and in the isolated coronary artery of the guinea pig, and decreased the systemic blood pressure in the same dog, although HUK had no effect on the pressure of the spontaneously hypertensive rat.

The crude and partially purified HUK were immunologically analyzed using anti-HUK rabbit sera.