

マイクロプレートを使用したフィブリンゲル溶解酵素活性測定法の開発

○ 横手 珠美*、岸本 憲明**、川口 洋**、西本 佳津子**、須見 洋行***、
 田野 達男** (*株式会社丸美屋、**くらしき作陽大、***倉敷芸科大)

【目的】 納豆菌は蒸煮大豆に生育するとき、菌体外にフィブリンゲル溶解酵素(ナットウキナーゼ)を生産する。納豆を食べると、血液中の線溶系酵素活性が高まることから、血栓症の予防・治療に効果があると期待されている。既存のフィブリンゲル溶解活性測定法(fibrin 平板法)は、操作に高度の熟練を要し、一度に多数の検体を処理できないこと、反応時間とゲル溶解面積が比例関係にないなどの欠点がある。そこで、迅速、簡便で信頼性の高いフィブリンゲル溶解酵素活性測定法の開発を検討した。

【方法】 96 穴マイクロプレートの各穴にバルビタール塩酸緩衝液に溶解した 0.4%フィブリノーゲン溶液 200 μ l とトロンビン 0.13 単位を加え、フィブリンゲルを作製し、これを基質とした。一方、納豆に9倍容の生理食塩水を添加し、ホモジナイザーで磨砕し、遠心上清を納豆粗酵素溶液とした。37 $^{\circ}$ Cに保ったマイクロプレート中のフィブリンゲルに、納豆粗酵素溶液 100 μ l を重層して酵素反応を開始し、ゲル吸光度の変化を 630nm で 60 分間経時的に測定した。

【結果】 粗酵素溶液をフィブリンゲルに重層後、630nm におけるゲル吸光度は 60 分間直線的に低下したことから、ゲル吸光度の減少速度を酵素活性値として用いた。ゲル吸光度の減少速度は酵素濃度と比例関係にあった。また、マイクロプレートを用いたフィブリンゲル溶解酵素活性値は、既存のフィブリン寒天平板法や plasmin 活性測定用人工基質を用いた測定法で得られた値と高い相関を示し、信頼性の高い値と思われる。本法は、簡便な操作で多数の納豆中のフィブリンゲル溶解酵素活性を 60 分以内に測定できる点に特徴がある。