

Title	固定化Urokinaseの安定性と抗血栓性に関する研究
Author(s)	劉, 懋忠
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35242">https://hdl.handle.net/11094/35242</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【1】

氏名・(本籍)	りゅう 劉	ほう 懋	ちゅう 忠
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6 9 4 8	号
学位授与の日付	昭和 60 年 7 月 4 日		
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	固定化Urokinaseの安定性と抗血栓性に関する研究		
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 最上平太郎		

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

新しい抗血栓性材料として、ウロキナーゼ (Urokinase, UKと略す) を高分子材料に固定したUK固定化チューブが開発され、すでに臨床方面で利用されているが、その安定性および抗血栓性については未だ十分に検討されていない。そこで今回、私は固定化UKの酵素安定性に関する基礎実験を行い、併せて抗血栓性に関する基礎実験、ならびに臨床応用を行った。

(方 法)

1. UK固定方法：高分子材料にはpolyvinyl chloride (PVCと略す) およびEvatate<sup>®</sup> (EVAと略す) を用い、いずれもUKとはアミド結合にて固定した。UK固定化PVCドレーンの酵素活性は28Fr:  $10.5 \pm 0.3 \text{ IU/cm}^2$ , 24Fr:  $9.5 \pm 0.4 \text{ IU/cm}^2$ , 20Fr:  $8.3 \pm 0.5 \text{ IU/cm}^2$ であった。UK固定化EVAカテーテル (16ゲージ) の酵素活性は  $20.5 \pm 1.41 \text{ IU/10cm}$ であった。
2. UKの酵素活性測定法：標準フィブリン平板法およびpeptide-MCA法を用いた。後者では基質としてglutaryl-Gly-Arg-methylcoumarine-7-amideを用い、UKによりArg基のC末端が加水分解され生成された蛍光物質AMC (7-amino-4-methyl-coumarine) を蛍光分光光度計 (励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm) で測定した。そして得られた相対蛍光係数を標準曲線よりUK国際単位に換算した。
3. 固定化UK (immobilized urokinase, I-UKと略す) の安定性実験：実験にはUK固定化チューブと溶液性UK (soluble urokinase, S-UKと略す) を用い、各サンプルに対する保存、UKインヒビター、UK抗体および抗生物質の影響を検討した。UK固定化チューブと溶液性UK試料とは保存したのち、またはUKインヒビター、UK抗体、抗生物質とそれぞれ反応させたのち、その酵素活性peptide-MCA法

にて測定した。

#### 4. UK固定化チューブの抗血栓能実験：

1) Chandler's loop法実験：UK固定化PVCチューブと非固定化PVCチューブの2種類を用意し、各チューブに血液および各種薬剤を充填し、チューブをChandler's loop装置にて回転させて血栓形成時間(thrombus formation time, TFTと略す)を測定した。

2) 臨床応用：(1)UK固定化および非固定化PVCドレーンを開胸術、および開腹術施行症例の胸腔または腹腔内排液に用い、その抗血栓能を検討した。(2)UK固定化および非固定化EVAカテーテルを輸血、輸液などの注入路確保に用い、その抗血栓能を検討した。

#### (成績)

UKをPVCおよびEVAにアミド結合させたUK固定化材料を用い、I-UKの安定性とUK固定化チューブの抗血栓能を検討した結果、以下の成績を得た。

1) 保存の影響：4℃ではI-UKの酵素活性は保存後ほとんど減少せず、6ヶ月後においても86.2 ± 3.4%の活性を維持したが、S-UKの酵素活性は3ヶ月後には消失した。37℃では前者は6ヶ月後44.2 ± 3.1%の活性を維持したが、後者は20日後には消失した。

2) UKインヒビターの影響：I-UKまたはS-UK 50 IUに対しUKインヒビター100 IUを加えて反応させた。その結果、I-UKの酵素活性は反応10分後で85.2 ± 2.8%，30分後で75.0 ± 4.6%を保ち、その後180分までは70%台を維持したが、S-UKの酵素活性は反応10分後で20.8 ± 3.4%，30分後で5.2 ± 3.6%，60分後で1.8 ± 0.8%と著しく低下し、120分で消失した。

3) UK抗体の影響：I-UKまたはS-UK 50 IUに抗UK抗ウサギ血清0.1 Xを加え、反応させた。その結果、I-UKの酵素活性は反応10分後で98.2 ± 3.4%，30分後で95.4 ± 4.2%を保ち、その後180分までは80%台を維持したが、S-UKの酵素活性は反応10分後で79.8 ± 3.4%，30分後で70.2 ± 4.6%，60分後で40.4 ± 5.3%と明らかに低下した。ただしその後180分までは約35%を維持した。

4) 抗生物質の影響：I-UKまたはS-UK 50 IUにCER (20.9 mM)，CET (2.3 mM)，CTM (8.4 mM)，CFX (11.1 mM)，LMOX (8.8 mM)，CFS (9 mM)をそれぞれ1 mlずつ同様のサンプルに加え、反応させた。その結果、CET以外の抗生物質ではI-UKの酵素活性は反応3時間後で88.0-95.4%，6時間後で81.5 - 85.6%，24時間後で80.2 - 83.3%を維持したが、S-UKでは3時間後で78.3 - 85.2%，6時間後で45.6 - 50.3%，24時間後で30.5 ± 38.6%となり、6時間後より酵素活性の阻害を認めた。CETではI-UKの酵素活性の阻害を認めた。CETではI-UKの酵素活性は24時間後でも75.8 ± 4.8%を維持したが、S-UKでは10分後より酵素活性の低下を認め、24時間後では4.6 ± 2.3%しか維持しなかった。

5) Chandler's loop法実験：UK固定化PVCチューブと非固定化PVCチューブのTFTを測定したところ、TFT90分以上の延長は前者では、生理食塩水充填群5/10例、UKインヒビター充填群5/10例、UK抗体充填群7/10例、CET充填群5/10例にみられたが、後者では各充填群とも0例であった。すなわち、前者のTFTは後者のそれよりも大幅に延長した。

6) 臨床応用：UK固定化PVCドレーンは、非固定化PVCドレーンに比べ、血栓形成頻度は1/3に、

内腔閉塞は4／18に減少した。またUK固定化EVAカテーテルは、非固定化EVAカテーテルに比べ、血栓形成頻度は約1／6に減少した。

(総括)

1. I-UKは保存に対し、またUKインヒビター、UK抗体、抗生物質の処理に対し、S-UKよりも安定で良好な酵素活性を維持した。
2. Chandler's loop法実験においてUK固定化PVCチューブは非固定化PVCチューブよりも血栓形成に至るまでの時間が長く、抗血栓能にすぐれていた。
3. UK固定化材料を排液ドレーンおよび静脈内留置カテーテルとして臨床に応用したところ、非固定化材料よりも血栓形成頻度は減少し、生体内でも抗血栓能にすぐれていることが実証された。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、ウロキナーゼ（UK）固定化チューブの安定性および抗血栓性について検討したもので、以下の点を明らかにしている。すなわち(1)固定化UKは保存、UKインヒビター、抗UK抗体、抗生物質の各処理に対し、溶液性UKよりも安定で良好な酵素活性を維持した。(2)Chandler's loop法実験において、UK固定化PVCチューブは非固定化PVCチューブよりも血栓形成時間が長く、抗血栓能にすぐれていた。(3)UK固定化材料を排液ドレーンおよび静脈内留置カテーテルとして臨床に応用したところ、非固定化材料よりも血栓形成頻度が減少した。これらの知見は臨床医学に資するところ大であって、学位に価する。