

Title	ウロキナーゼの固定化に関する研究
Author(s)	藪下, 安紀
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35862">https://hdl.handle.net/11094/35862</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">〈a href="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">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	やぶ 藪	した 下	やす 安	のり 紀
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	8026	号	
学位授与の日付	昭和63年	3月	9日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	ウロキナーゼの固定化に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授	岩田平太郎		
	(副査)			
	教授	近藤 雅臣	教授	三浦 喜温
			教授	佐々木喜男

### 論文内容の要旨

酵素は常温、常圧、中性付近のpHといった温和な反応条件下で作用し、基質に対する厳密な選択性を持ち生化学反応の触媒として、かかすことができない物質である。しかし酵素の最大の欠点は生体外で扱う場合、不安定であるということである。酵素を利用する場合、この不安定性を改良しなければならない。その一つの方法として酵素の固定化が考えられる。

一方、医療分野の急速な進歩に伴い今まであきらめられていた病気が治療できるようになってきた。それは偏に人工臓器に負うところが大きい。しかし人工臓器の大きな問題は十分な抗血栓性を持たすことが難しいということである。

そこで腎臓における抗血栓性を司っている酵素ウロキナーゼ(UK)を人工材料表面に固定化し、UKの酵素としての触媒作用を利用して、腎臓におけるのと同様な抗血栓性をもった、より生理的な抗血栓性材料が得られるのかどうか。またその固定化UKの安定性、耐久性および抗血栓性などについても研究を行った。

酵素を固定化する場合、固定化方法および使用する担体により酵素活性が大きく左右される。本研究に用いた担体はナイロンおよびエチレン酢酸ビニル共重合体(EVA)であり、担体とUKをアミド結合により固定化する共有結合法を採用した。担体の形状は、操作性がよくそのままの形状で使用でき応用範囲も広い管状のものをを用いた。

UKの固定化は、担体にUKを直接固定化するよりも無水マレイン酸メチルビニルエーテル共重合体(Gantrez)を介して固定化した方が、固定化UK量が多かった。これは結合基を増やすことによりUKがより多く固定化されたためであると考えられる。また固定化したUKの結合様式としては表面分析結

果から共有結合であると推定された。固定化U Kの至適pHはもとの遊離U Kよりも0.5pH単位アルカリ側に移動した。これはGantrezの酸無水物基の加水分解によるカルボキシル基によりU K近辺がポリアニオン性な状態になっているため、見かけ上至適pHがアルカリ側に移動したものと思われ、事実塩濃度を高くすれば至適pHは酸性側に移動し、もとの遊離U Kと同じ至適pH8.5になった。また固定化U Kの至適温度は遊離U Kのそれと同じ37°Cであった。

一方、U Kを固定化した材料が抗血栓性材料として臨床応用される場合においても、安定性は重要な問題であり、特に臨床使用上問題になるのは、熱安定性の問題、血液および組織中に多量に存在するインヒビターの影響、臨床に常用される薬物の影響等である。

まず熱安定性であるが、固定化U Kは45°C、8時間のインキュベーションにおいて50%の残存活性を示したが、遊離U Kは3時間で活性が消失した。固定化U Kの方が熱安定性が高いということは、固定化されることにより、U Kのrigidityが増大し、従ってコンホメーションの変化を受けにくくなったものと解釈される。次に阻害剤に対する安定性であるが生体内阻害物質であるhuman placental U K inhibitorおよびセリンプロテアーゼの合成阻害剤であるB A A、T L C K、Gabexate mesilate、U Kの活性中心に直接作用しないと考えられるN E Mを用いてその影響を調べた。その結果いずれの場合も固定化によりK<sub>m</sub>の値は変化せず、K<sub>i</sub>値が増大し、固定化した方が阻害を受けにくいという結果であった。このことからU K固定化材料を臨床の場で使用する場合においても生体内で遭遇する各種阻害物質に対しても同様に阻害されにくいと推定された。また臨床に常用される局所麻酔薬、抗生物質、抗腫瘍薬に対しても固定化U Kはほとんど影響を受けなかった。

固定化U Kの抗血栓性をin vitroおよびin vivoにおいて評価した。in vitroの評価においてはChandler法に従いループ状にしたチューブ内での血液凝固時間を測定したところ血栓形成時間は、未処理のコントロールが5~20分であるのに対し、固定化U Kは45分以上という優れた抗血栓性を示した。一方in vivoの評価として行ったU K固定化チューブのネコ静脈内留置実験では、留置前後のプロロンビン時間および線溶性に有意差は認められず、U K固定化材料を血管内に留置しても血液凝固系と線溶系のいずれにも全身的な影響を与えないと判断された。またU K固定化チューブは6例中全例が開存していたのに対し、未処理のコントロールチューブは6例中全例が閉塞した。このようにU K固定化材料はin vivoにおいても優れた抗血栓性を示すとともにその作用は局所的で安定性においても優れていることが明らかとなった。

## 論文の審査結果の要旨

本論文はウロキナーゼの線溶活性を利用して、本酵素を担体結合性により固定化し、実用可能な抗血栓性医療材料の作成に成功したもので薬学博士の称号を授与するに値するものである。