

尿中トリプシンインヒビター (UTI) に関する研究

—UTI の新定量法について—

広島大学医学部皮膚科学教室 (主任：矢村卓三教授)

土 岐 尚 親

広島大学医学部泌尿器科学教室 (主任：仁平寛巳教授)

林 睦 雄

前 原 進

浜松医科大学第二生理学教室 (主任：高田明和教授)

須 見 洋 行

STUDIES ON URINARY TRYPSIN INHIBITOR (UTI)

—A NEW DETERMINATION METHOD OF UTI—

Naotika TOKI

*From the Department of Dermatology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan**(Director: Prof. T. Yamura, M. D.)*

Mutsuo HAYASHI and Susumu MAEHARA

*From the Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan**(Director: Prof. H. Nihira, M. D.)*

Hiroyuki SUMI

*From the Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan**(Director: Prof. A. Takada, M. D.)*

A new determination of urinary trypsin inhibitor (UTI) was developed from casein-plate method. We studied the relationship between the activity level of UTI by the present method and the activity level of urokinase (UK) by fibrin agar-plate method in various renal diseases.

A sample of trypsin solution (Sigma, type II, 25 mM Ca^{2+}) was adsorbed to a filter paper (5.8 × 5.8 mm), and lyophilized to be fixed. Then 5 μl of urine was adsorbed to the above. It was applied on 0.05% casein-plate (10 mM Ca^{2+}), and incubated at 37°C. UTI activity level was determined in lysis area of trypsin.

The results were well correlated with those by the test-tube method already reported. The procedure of the present method made it possible to test more simply compared with conventional methods.

The amount to inhibit 1 μg of trypsin was assigned to be one unit, as for UTI activity. As for UK level in urine, UK was determined by fibrin agar-plate method with commercial UK (Green Cross Co. Ltd.) as the standard.

The results are as follows:

1. Normal human urine contains about 4.1 units of UTI and 11.1 IU of UK per ml. UTI/UK is approximately 0.4.

2. The urine of the patients with renal disease showed high activity level in UTI and low in UK.

If UTI originated in blood and UK in kidney, it would be clinically useful to study the correlation between those two for the clinical tests of various renal diseases.

In the present study, it was confirmed that UTI purified by the following methods corresponded with the antiplasmin activity in urine.

緒 言

尿中酵素としては, leusine aminopeptidase [EC 3.4.1.1]¹⁾, 乳酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.27]^{2,3)}, γ -glutamyl transpeptidase [EC 2.3.2.2]^{4,5)} あるいは alkaline phosphatase [EC 3.1.3.1]⁶⁾ など各種の酵素が臨床検査に応用されている。われわれは尿中の線溶系酵素の検討において, 正常ヒト尿中に多量の urinary trypsin inhibitor (UTI) が存在すること, および native UTI の分子量は 67,000 であるが, 尿を酸性条件におくと分子量 45,000 および 23,000 の 2 つの modified UTI を生じることなどについてはすでに報告した⁷⁻¹⁰⁾。また尿中には線溶系酵素である urokinase および plasmin inhibitor が存在し^{11,12)}, とくに urokinase についてはその抗原性が腎の組織 activator の抗原性と一致し, この酵素活性は血中線溶活性をよく反映することが最近報告されている¹³⁻¹⁵⁾。

尿中の線溶系酵素に関連して, われわれは trypsin-paper, カゼイン平板法を用いる新しい UTI 測定法を開発し, この方法は従来の測定法より簡便でかつ精度がよいことを確認した。そしてこの新定量法を用いて各種腎疾患患者の UTI を測定し, 尿中 urokinase 活性の動態とあわせ検討して興味ある知見を得たので報告する。さらに今回の実験において arginine-sepharose と trypsin-sepharose による affinity chromatography 法, および sephadex G-100 ゲルろ過法にて精製された UTI についてその抗プラスミン作用を検討した結果, UTI が urinary plasmin inhibitor (UPI) と一致することが確認されたのであわせて報告する。

実験方法ならびに検査対象

この実験に使用したウシ膵臓トリプシンは Sigma 社 (Type II) のものを購入, urokinase で活性化されたヒト・プラスミンはミドリ十字 (大阪) より提供された。

1) Urinary trypsin inhibitor (UTI) の測定法

われわれが開発した UTI の新定量法は, 25 mM CaCl_2 を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4 に溶解したトリプシンを吸収, 凍結乾燥した円形ろ紙 (東

洋ろ紙 No. 50, 5.8×5.8 mm, $0.2 \sim 1.5 \mu\text{g}$ のトリプシンを含む) を酵素系に使用し, これに $5 \mu\text{l}$ の尿を吸収させ, ろ紙中の残存トリプシン活性をカゼイン平板を用いて測定する方法である。尿を吸収させたる紙をカゼイン平板上に密着静置し, 37°C の incubation 後, 生じた溶解窓の面積 (mm^2) から UTI の量を換算した。使用するカゼイン平板は, 1 g の寒天 (和光純薬) に蒸留水および 10 ml の 0.1 M CaCl_2 を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4 を加え, 70°C で加熱後, 攪拌しながら 5 ml の 1% カゼイン溶液 (三光純薬カゼインを蒸留水で溶かし, 1 N NaOH で pH 7.4 にあわす) を加え, 蒸留水にて最終量 100 ml とする (最終濃度は 0.05% カゼイン, 10 mM Ca^{2+} , 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 となる)。この溶液 20 ml を熱いうちに水平なプラスチック平板 (栄研 7.6×22.5 cm) に流しこみ, 使用時まで密閉し, 4°C にて保存した。このようにして作製されたカゼイン平板は一週間は使用に耐えた。カゼイン平板測定法の要領を Fig. 1 に示した。UTI の 1 単位 (U) は, $1 \mu\text{g}$ のトリプシン (Sigma, type II) のカゼイン分解活性を完全に阻害する活性とした。またすでに報告したカゼイン分解法 (試験管法) による UTI 測定法^{8,10,16)} を同時におこない, 上述の新定量法で得た値と比較検討した。

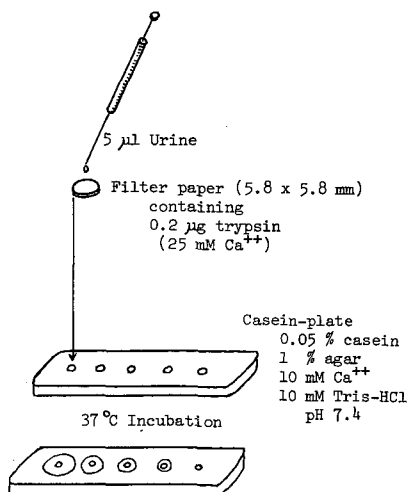


Fig. 1. A new determination method of UTI.

2) Urokinase (UK) の測定法

尿中の urokinase (UK) の定量は Ploug と Kjeldgaard¹⁸⁾ のフィブリン平板法を用い、市販 urokinase (持田製薬) を標準として溶解窓の面積より力価 (IU) を算出した。

3) Urinary plasmin inhibitor (UPI)

0.25 カゼイン単位 (CU) の活性を有するプラスミン 0.1 ml に試料を加え、20°C、5 分間の preincubation をおこなった後、残存するプラスミン活性をすでに報告したカゼイン分解法^{8,10,16)}で測定した。緩衝液は全て 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.4 を用い、1 CU のプラスミンのカゼイン分解能を完全に阻害する活性を UPI の 1 単位 (U) とした。

4) UTI の濃縮方法

われわれが開発し、すでに報告した arginine-sepharose 法^{8,10,16)}で UTI を濃縮精製した。すなわち 10 l の正常ヒト尿を 3.5 M NaOH で pH 8.5 とし、ろ紙にてろ過後 4 N HCl で pH 5.0 にあわせ、蒸留水で 5 倍に希釈し、arginine-sepharose カラム (10×60 cm) を用い UTI を濃縮した。4%アンモンニア液にて溶出後に凍結乾燥し、これを UTI を含む濃縮尿蛋白として使用した。この方法を 6 回おこなった結果は、10 l の尿から UTI の回収量は 27,500~36,000 U (平均 33,000 U) であり、この濃縮物の比活性は 230.4~310.0 (平均 265.8) U/mg 蛋白であった。

5) Trypsin-sepharose カラム・クロマトグラフィ

すでに報告した方法^{8,10)}で作製した trypsin-sepharose カラム (1.4×5 cm) を 0.2 M NaCl を含む 0.05 M Tris-HCl, pH 7.8 で平衡化し、これに上記の arginine-sepharose 溶出蛋白を上記の緩衝液にて透析後得られた粗 UTI 試料 5 ml (3,100~4,300 U) を apply した。30 ml の同緩衝液で洗浄後、0.2 M NaCl を含む 0.02 N HCl で UTI を溶出した。精製 UTI は、回収率は 75.7~93.2 (平均 88.0) % で、その比活性は 740~1,300 (平均 1,240) U/ml 蛋白であった。なお各段階の UTI 活性の測定は、試料を 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.4 で透析後にそれぞれおこなった。

6) 高純度 UTI の調整

上述の arginine-sepharose および trypsin-sepharose カラムを用いて濃縮精製した UTI は、0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.4 にて透析後に凍結乾燥して保存した。この凍結乾燥粉末 (全 UTI 活性 18,000 U, 比活性 1,070 U/mg 蛋白) を 2 ml の 1 M 尿素、1 M NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.4 に溶かし、同

緩衝液で平衡化した 2.5×40 cm の sephadex G-100 カラムに apply し、ゲルろ過した。この場合の流速は 14 ml/時間で、得られる液の 5 ml ずつを分画した。このゲルろ過においてウシ血漿アルブミン (BSA, Sigma 社製) の位置に相当する部分に溶出される tube No. 15~20 (分子量 67,000±3,000) の UTI 分画を集め、蒸留水で透析後に凍結乾燥し、これを等電点電気泳動および disc-電気泳動用試料に供した。ゲルろ過による活性回収は 11,000 U, 回収物の比活性は 1,380 U/mg 蛋白であった。

7) 等電点電気泳動

Ampholine 8100 (LKB Produkter AB) を用い、carrier ampholite (1%) は pH 範囲 3.5~10, 精製 UTI 3 mg (UTI 4,070 U, 比活性 1,380 U/mg 蛋白) を試料として 4°C で 700 V, 43 時間の泳動をおこなった¹⁷⁾。

8) Disk-電気泳動

Davis の方法¹⁹⁾に従い、ポリアクリルアミドゲル濃度は 7.5% で、0.05 M Tris-glycine 緩衝液、pH 8.6 を用い泳動した。

9) 検査対象

急性糸球体腎炎 9 例 (男 6 例, 女 3 例, 平均年齢 36.3 歳), 腎盂腎炎 6 例 (男 3 例, 女 3 例, 平均年齢 48.0 歳), ネフローゼ症候群 6 例 (男 2 例, 女 4 例, 平均年齢 25.8 歳), 慢性糸球体腎炎 18 例 (男 13 例, 女 5 例, 平均年齢 38.4 歳) および尿毒症 10 例 (男 6 例, 女 4 例, 平均年齢 42.3 歳) についてカゼイン平板を用いた新定量法で UTI 活性を測定するとともに、フィブリン平板法によって UK 活性を測定した。またこれらの腎疾患と比較検討するため 19 歳から 63 歳にわたる健康成人 19 人 (男 14 人, 女 5 人, 平均年齢 34.4 歳) を対照として選び、同様の方法で UTI および UK 活性を測定した。

結果および考察

1) 尿中 UTI の定量

トリプシンを含む円形ろ紙 (trypsin-paper) を酵素系に用い、カゼイン平板法を改良した UTI の新しい定量法の結果は以下のごとくである。Fig. 2 にみられるように直径 5.8 mm の円形ろ紙に micro-syringe で 5 μ l の尿を吸収させ、これを 0.05% カゼイン平板上に密着させて incubate すると、酵素により生じる平板上の円形溶解窓の面積 (mm²) は尿中に含まれる UTI の量に反比例するので、この面積を計測することにより UTI の測定が可能である。Fig. 3 は生理

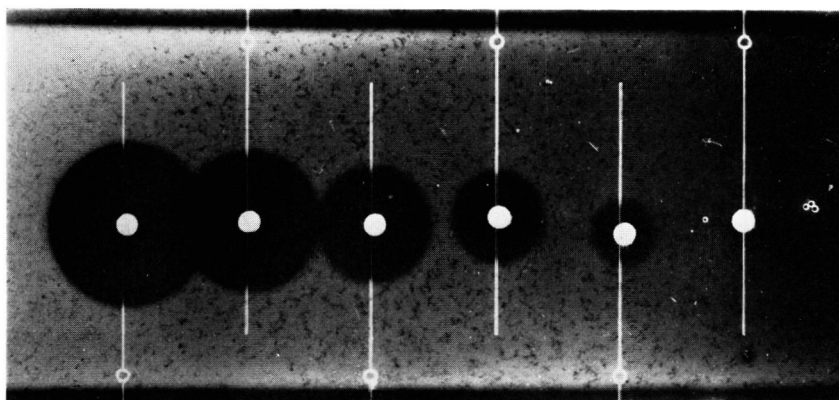


Fig. 2. Casein-plate showing the inhibition of trypsin activity by UTI. Trypsin-paper used contains $0.8 \mu\text{g}$ of trypsin, and incubation time was 10 hrs at 37°C .

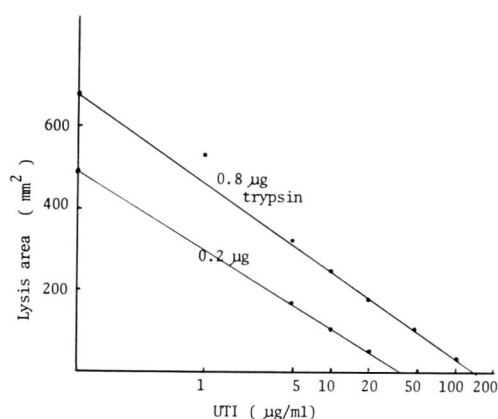


Fig. 3. Standard curve of UTI activity. Trypsin-paper contains 0.2 or $0.8 \mu\text{g}$ of trypsin. After the application of $5 \mu\text{l}$ of several units of UTI, incubated for 10 hrs at 37°C .

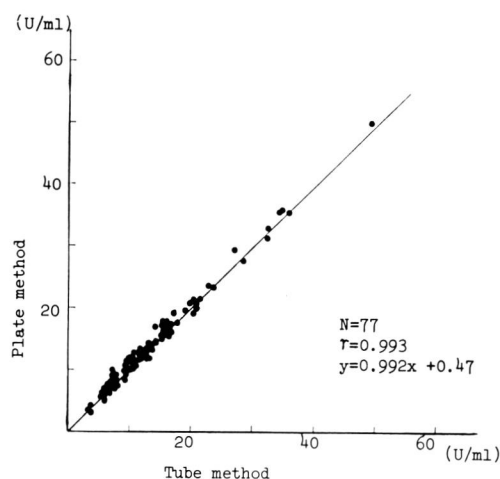


Fig. 4. Comparison of the UTI activity with tube method and new casein-plate method.

的食塩水で溶解した各種濃度の UTI 標品（比活性 $1,070 \text{ U/mg}$ 蛋白）を用いた検量線で、カゼイン平板上の溶解窓の面積と UTI 濃度との間に直線的な逆比例の関係を認めた。またこの UTI 測定法の値をすでに報告したカゼイン分解法（試験管法）の結果と比較すると、標準偏差 $r=0.993$ と両者はよく相関することが判明した (Fig. 4)。この“enzyme-paper”を平板法に用いる enzyme inhibitor の測定法は操作が簡単で精度がよく、酵素としてここに示したトリプシン以外にもキモトリプシン、コラーゲナーゼ、プラスミンなどを、また平板としてフィブリン、コラーゲンなどが応用でき、今後は各種 inhibitor の測定に広く使用されるものと思われた。われわれはこの UTI の新定量法を各種腎疾患の患者尿中酵素系の測定に応用し、尿中の UTI と UK の関係を検討した。Table 1 に示すごとく、同方法で測定した正常ヒト尿 (19 検体) の UTI は $4.08 \pm 1.06 \text{ U/ml}$ 、フィブリン平板法で測定した UK は $11.07 \pm 2.44 \text{ IU/ml}$ であり、 $\text{UTI/UK}=0.37$ となる。これに対して腎疾患では一般に UTI が高く UK が低く、UTI/UK 比は上昇する傾向が認められ、両者は逆相関することがわかった。これを疾患別に検

Table 1. UTI and UK activity in patients with various renal diseases.

Diagnosis	No. of Cases	UTI (U*) (Mean $\pm$ SD)	UK (IU*) (Mean $\pm$ SD)	UTI/UK
Acute glomerulonephritis	9	4.54 ± 0.98	12.67 ± 2.59	0.36
Pyelonephritis	6	4.10 ± 0.81	9.21 ± 2.83	0.45
Nephrotic syndrome	6	11.80 ± 7.23	7.02 ± 3.31	1.68
Chronic glomerulonephritis	18	14.30 ± 5.61	7.08 ± 2.35	2.02
Uremia	10	46.9 ± 12.90	0.67 ± 0.71	70.00
Normal persons	19	4.08 ± 1.06	11.07 ± 2.44	0.37

* U or IU of UTI or UK in 1.0 ml of urine which was collected for 24-hr.

討すると、急性糸球体腎炎および腎盂腎炎では UTI, UK および UTI/UK はいずれも正常人との間で有意の差をみとめなかった。しかし慢性糸球体腎炎およびネフローゼ症候群の UTI はそれぞれ 14.30 ± 5.61 および 11.80 ± 7.23 IU/ml と正常人に比しかなり高値で、UK はそれぞれ 7.08 ± 2.35 および 7.02 ± 3.31 と逆に低く、UTI/UK 比はそれぞれ 2.02 および 1.68 といずれも正常より高値を示した。とくに尿毒症では UK がきわめて低く、UTI が高値であるため UTI/UK 比は 70.0 と正常ヒト尿、あるいは他の腎疾患に比してきわめて高い値を示した。今回の測定結果より、腎疾患の症例のうちでも慢性化した症例、あるいは腎障害の強い症例ほど UK が低く、UTI が高値となり、UTI/UK 比の逆転が強くあらわれるものと推察

された。

2) 精製 UTI の抗プラスミン作用

Arginine-sepharose 法で濃縮した尿蛋白 (UTI 3,315 U, 比活性 273.5 U/mg 蛋白) を trypsin-sepharose カラム (1.4×5 cm) による affinity-chromatography にかけて UTI を吸着、洗浄後、0.2 M NaCl を含む 0.02 N HCl で溶出し、各段階における UTI 活性および抗プラスミン活性 (UPI) を測定した。Table 2 に示すように UTI とともに UPI のほぼ全活性が trypsin-sepharose に吸着され、また塩酸性で溶出されることがわかった。溶出液の両活性は pH 1~4 の酸性条件で 100°C, 15 分間の加熱により失活せず、きわめて熱安定性であった。また溶出液 2 ml を 1 M

Table 2. Affinity chromatography of UTI on trypsin-sepharose. 5 ml of the arg. sepharose eluate (3,315 U, S.A. = 273.5 U/mg protein) was applied on a column (1.4×5 cm) of the trypsin-sepharose at a flow rate of 1.8 ml per min at 4°C. After the column was washed with 30 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, containing 0.2 M NaCl (pH 7.8), the UTI adsorbed was eluted with 0.02 N HCl containing 0.2 M NaCl.

	Protein (mg)	UTI (U)	UPI (U)
Arg-Sepharese	12.12	3,315	1.15
Trypsin-Sepharese non-adsorbed	8.13	11	N.D.
HCl-eluate	2.37	2,830	0.85

N.D.; not detected

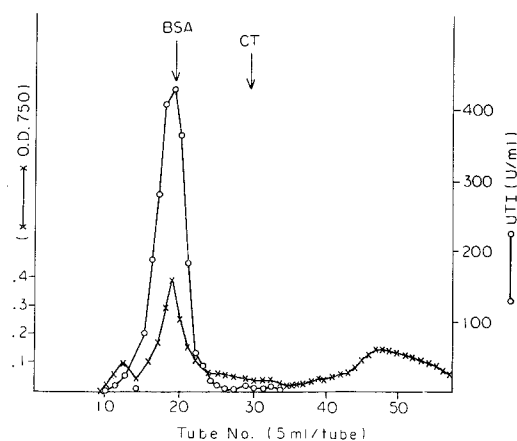


Fig. 5. Sephadex G-100 column chromatography of UTI. Column: 2.5×40 cm, 0.1 M Phosphate buffer at pH 7.4 containing 1 M urea and 1 M NaCl. Apply: Trypsin-sepharose eluate 2 ml (18,000 U).

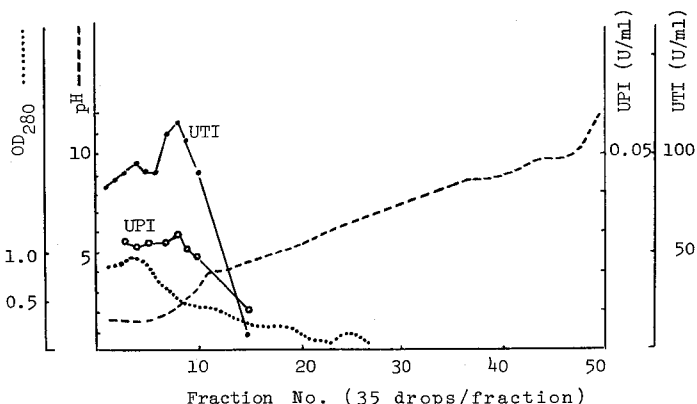


Fig. 6. Isoelectric focussing of UTI. 3.0 mg of UTI was submitted to electrophoresis using a 110 ml column of carrier ampholytes of pH 3.5~10, at 4°C for 43 hrs.

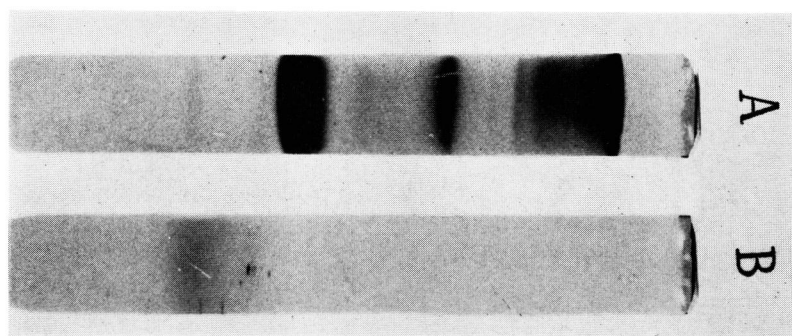


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of UTI. Highly purified UTI (ca. 200 μ g of protein) was subjected. A. Human serum; B. UTI, respectively.

尿素, 1 M NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4 で平衡化した 2.5×40 cm の G-100 カラムに apply し, ゲルろ過すると, UTI 活性はほぼ BSA の位置に溶出され, 分子量はほぼ $67,000 \pm 3,000$ であることがわかった (Fig. 5). 一方 trypsin-sepharose で精製した UTI をさらに sephadex G-100 によるゲルろ過で精製した高純度 UTI 3 mg (UTI 4,070 U, 比活性 1,380 U/mg 蛋白) を等電点電気泳動にかけたところ, Fig. 6 に示すように UTI 活性はきわめて酸性域に泳動されて約 pH 2.0 に主たるピークを示し, また UPI 活性も UTI ピークと一致することがわかった. また disc-電気泳動で同標品はほぼ単一の蛋白帯を示し, 血清 prealbumin に一致することがわかった (Fig. 7). 以上の結果より, 少なくとも尿中抗プラスミンの主活性は UTI によるものと思われた.

最近 Prokusch ら²⁰⁾, Hochstrasser ら^{21,22)}あるいは著者^{9,10)}が報告しているように, 尿中の UTI は血中 inter- α -trypsin inhibitor あるいは気管支粘膜の trypsin inhibitor と抗原性を同じくし, UTI は血中あるいは組織 inhibitor の活性を反映するものと考えられている. また UTI およびその前駆物質と考えられる inter- α -trypsin inhibitor と腎疾患の関係については, Hochstrasser ら²³⁾は腎機能が低下すると血中 inter- α -trypsin inhibitor が増加すること, およびそれは腎が inter- α -trypsin inhibitor からさらに低分子の inhibitor, すなわち UTI への分解という機能をもっているためではないかと推測している. 一方 UK は腎組織の activator と抗原性が一致することが報告されており¹³⁻¹⁵⁾, また最近 Bernik と Oller²⁴⁾ はヒトの腎組織培養液により pre-UK を分離精製し, このものにプラスミンを作用させることによって活性型 UK を得ることに成功した. 以上のごとく両物質ともに腎との関係は強く, UTI および UK, さらに UTI/UK 比を測定することは腎の機能を診断する上に非常に有

効な手段となるものと予想される.

1955年に Schulman²⁵⁾は粗 UTI が抗プラスミン活性を有すると報告し, 以来多くの研究者により尿中抗プラスミン活性に関する研究がなされてきた. しかしながら UTI と UPI との関連性については今なお明確ではない. 今回の実験においてわれわれは, affinity chromatography 法とゲルろ過法にて UTI を精製し精製 UTI が UPI と一致することを確認した.

すでに述べたように UTI には各種の分子量のものがあ^{7-10, 25, 26)}, また UK にも少なくとも分子量の異なる3種以上のものが確認されている²⁷⁻²⁹⁾. 今後は腎疾患とこれら UTI および UK の multiple form との関係についてもさらに検討していきたいと考えている.

総 括

1) Urinary trypsin inhibitor (UTI) 活性の測定に酵素系として trypsin-paper を用い, 基質に0.05% カゼイン平板法を用いる新しい定量法を開発した. この方法は簡便かつ正確で, 定量値は従来の試験管法による測定値とよく相関した.

2) この定量法により各種腎疾患の尿中 UTI 活性を測定するとともに, 尿中 urokinase (UK) 活性をフィブリン平板法で測定し, 両者を比較した. その結果は正常ヒト尿の UTI は 4.08 ± 1.06 U, UK は 11.07 ± 2.44 IU, UTI/UK 比0.37に比較して, 腎疾患では UTI の増加と UK の減少, したがって UTI/UK 比の増加を認め, 尿毒症ではとくに UTI/UK が高値を示すことが判明した.

3) 正常ヒト尿中の UTI を arginine-sepharose および trypsin-sepharose を用いた affinity chromatography で精製し, さらに sephadex G-100 ゲルろ過により高純度に精製してその物理化学的性質を検討した. 精製 UTI は分子量 $67,000 \pm 3,000$, 等電点は約

2.0 で、電気泳動的に血清 prealbumin に一致し、かつ熱安定性がきわめて高い蛋白であることが判明した。そして UTI の活性は、urinary plasmin inhibitor の主要活性と一致することを認めた。

稿を終えるにあたり、御指導・御稿閲を賜った広島大学医学部泌尿器科学教室仁平寛已教授に深く感謝いたします。

文 献

- Behal, F. J. and Story, M.: Arylamidase of human kidney. *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**: 74~82, 1969.
- Klaud, D.: Renale Fermentausscheidung bei Proteinurie. *Klin. Wsch.*, **36**: 207~211, 1958.
- Wacher, W. E. C. and Dorfman, L. E.: Urinary lactic dehydrogenase activity. 1. Screening method for detection of cancer of kidneys and bladder. *J. A. M. A.*, **181**: 972~978, 1962.
- Orlowski, M.: *Arch. Immun. Therap. Exp.*, **11**: 1~611, 1963.
- Stokke, O.: Preservation of α -glutamyl transpeptidase activity in human urine. *Clin. Chim. Acta.*, **57**: 143~148, 1974.
- Hodson, A. W. and Latner, A. L.: Alkaline phosphatase isoenzymes of human kidney and urine. *Clin. Chim. Acta.*, **61**: 53~62, 1975.
- Sumi, H., Yamamoto, K., Takada, Y. and Takada, A.: Protease inhibitors in human urine. Abstracts of the 16th International Cong. of Hematol.: **342**, 1976.
- 須見洋行・南方かよ子・高田由美子・高田明和：ヒト尿中のトリプシンインヒビターおよびその性質。日本生理誌, **39**: 53~58, 1977.
- Takada, A., Takada, Y., Minakata, K. and Sumi, H.: Characterization of purified urinary trypsin inhibitors. *Thrombosis and Haemostasis*, **38**: 163, 1977.
- Sumi, H., Takada, Y. and Takada, A.: Studies on human urinary trypsin inhibitor. 1. Its modification on treatment of urine with acid. *Thrombosis Research*, in press, 1977.
- 須見洋行・南方かよ子・高田由美子・高田明和：尿中酵素および抑制物質の研究。6. ウロキナーゼおよびその阻害物質の研究：第16回プラスミン研究会報告集（神戸）：226~230, 1976.
- Sumi, H., Takada, Y. and Takada, A.: Plasmin inhibitors in human urine. *Thrombosis and Haemostasis*, **38**: 305, 1977.
- Bernik, M. B. and Kwaan, H. C.: Origin of fibrinolytic activity in culture of the human kidney. *J. Lab. Clin. Med.*, **70**: 650~661, 1967.
- Bernik, M. B. and Kwaan, H. C.: Plasminogen activator activity in culture from human tissues. An immunological and histochemical study. *J. Lab. Clin. Invest.*, **48**: 1740~1753, 1969.
- Astedt, B. and Holmberg, L.: Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature*, **261**: 595~597, 1976.
- Sumi, H., Toki, N., Takada, Y. and Takada, A.: Studies on human urinary enzymes and inhibitors: Concentrations method and characterization. *J. Biochem.*, **83**: 141~147, 1978.
- 松尾雄志・堀尾武一：蛋白質の電気泳動的等電点分画法。蛋白，核酸，酵素, **12**: 737~748, 1973.
- Ploug, J. and Kjeldgaard, N. O.: Urokinase. An activator of plasminogen from human urine. 1. Isolation and properties. *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**: 278~282, 1957.
- Davis, B. J., Lane, J. and Nordschow, C. D.: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**: 404~427, 1964.
- Proksch, G. J., Lane, J. and Nordschow, C. D.: Interrelation of the urinary trypsin inhibitor to human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor. *Clin. Biochem.*, **6**: 200~206, 1973.
- Hochstrasser, K., Bretzel, G., Feuth, H., Hilla, W. und Lempart, K.: The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid-stable proteinase inhibitors in human serum and urine. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**: 153~162, 1976.
- Hochstrasser, K., Reichert, R. und Heimbürger, N.: Antigenic relationship between the human bronchial mucus inhibitor and plasma inter- α -trypsin inhibitor. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**: 587~588, 1973.
- Hochstrasser, K., Niebel, J., Feuth, H. und Lempart, K.: Über Abbauprodukte des Inter-alpha-Trypsin Inhibitors im Serum. 1. Der Inter-alpha-Trypsin inhibitor als Prekursor des

- säurestabilen Serum-Trypsin-Inhibitoren. Klin. Wsch., 55: 337~342, 1977.
- 24) Bernk, M. B. and Oller, E. P.: Regulation of fibrinolysis through activation and inhibition of a plasminogen preactivator (preurokinase). Thrombosis and Haemostasis, 38: 136, 1977.
- 25) Schulman, N. R.: A Proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. J. Biol. Chem., 213: 655~671, 1955.
- 26) Astrup, T., Alkjaer, K. and Soardi, F.: Partial purification of the trypsin inhibitor in urine. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 11: 181~184, 1959.
- 27) White, W. F., Barlow, G. H. and Mozen, M. M.: The isolation and characterization of plasminogen activator (urokinase) from human urine. Biochemistry, 5: 2160~2169, 1966.
- 28) Doleschel, W.: Isolierung einer dritten humanen Urokinase (So-Typ). Wiener Klin. Wsch. 87: 282~284, 1975.
- 29) Soberano, M. E., Ong, E. B., Jhonson, A. J., Levy, M. and Schoellmann, G.: Purification and characterization of two forms of urokinase. Biochem. Biophys. Acta., 445: 763~773, 1976.

(1978年8月21日受付)