

**MMP-8活性測定キット**

300テスト用(汎用タイプ)

**<使用説明書>**

コラーゲンは生体内に広く分布し、各々のコラーゲンの種類(型)に応じて組織構築骨格形成として重要な役割を担っている。それらの内II型コラーゲンは、プロテオグリカン、ラミニンとの協同で肝臓の脈管、動脈枝、肺臓等、及び特に関節の硝子軟骨に多量に存在している。II型コラーゲンは生体内で、血管の伸縮、関節可動の重要な役割を担っていることが知られている。又II型コラーゲンに異常を来すと、肺線維症や心臓の僧帽逸脱による心疾患等が報告されている。更には、関節軟骨に重大な障害が予測される。II型コラーゲンを分解する物質の一つとして、マトリックスメタロプロテイナーゼの一種であるMMP-1(I型コラゲナーゼ)が知られているが、その分解活性は弱い。一方MMP-8(コラゲナーゼ)はより強力にII型コラーゲンを分解する。この活性化されたコラーゲン分解酵素が生体内で、極度に多くなった場合過剰にII型コラーゲンの分解が促進され、各種組織、関節軟骨等の崩壊が誘発され各部位で重大な障害を引き起こすことが予測される。一方活性型が極度に減少する事により、過剰にII型コラーゲンが蓄積されると正常な代謝を阻害し、同様に疾病・疾患の原因になると考えられる。

それ故、この酵素活性を測定することは疾病・疾患の状況を把握するうえで重要である。

この度開発された、II型コラーゲン分解酵素測定キットは、これらの背景を考慮し、細胞培養液・生体組織・関節液、及びその他生体分泌液中の酵素活性、特にMMP-8をほぼ特異的に微量で、簡便かつ、1~4時間の短時間で測定出来るよう開発された製品です。

**[I]. <キットの内容>**

1. 蛍光標識II型コラーゲン溶液(1mg/ml) . . . . . 15ml 1本
2. II型コラーゲン中和溶液 . . . . . 35ml 1本
3. 蛍光測定調整液 . . . . . 20ml、60ml 各1本
4. 管理用酵素 [活性型MMP-8, 0.5unit/ml, ヒト細胞由来] . . . . . 1ml 1本
5. 使用説明書 . . . . . 1部

**[II]. <使用目的>**

正常な臓器・器官・皮膚等の組織、腫瘍等の疾患組織・体液・分泌液・体内細胞及び培養細胞等に含まれているII型コラーゲン分解酵素活性、MMP-8の定量測定。

**[III]. <測定原理>**

0.2M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>を含むトリス塩酸バツファーに溶解したFITC蛍光標識II型コラーゲン(牛硝子軟骨由来)にヒト細胞由來のII型コラーゲン分解酵素を反応することにより、II型コラーゲンが酵素分解される。分解されたコラーゲンに標識した蛍光強度を測定することによって、II型コラーゲン分解酵素活性を定量測定する。

**[IV]. <準備する機器々材>**

- |                                |                  |
|--------------------------------|------------------|
| 1. 蛍光強度測定機                     | 5. 蛍光強度測定用マイクロセル |
| 2. 遠心機(遠心加速度8,000xG以上)         | 6. ウオーターバス       |
| 3. 遠心管ミキサー(ボルテツクス)             | 7. 試験管又はマイクロチューブ |
| 4. マイクロピペット(5, 25, 50, 300μl等) |                  |

**[V]. <検体の活性化処理>**

組織及び培養細胞に含まれているII型コラーゲン分解酵素は前駆体(プロ体、潜在型)又はインヒビターと結合した不活性型と活性化された酵素が共存している。不活性型の潜在型活性を測定する場合には、測定に際し検体中の酵素を活性化する処理が必要である。下記に代表的な活性化の処理方法をしめした。

**1. トリプシン、プラスミン等のプロテアーゼによる活性化法**

使用する酵素の量、反応時間、反応温度は検体の種類により異なるが、一般的には検体溶液100μl当たり1μg~10μgの酵素をもついて、37°Cで処理する。反応後トリプシンインヒビターを加えてプロテアーゼ活性を失活させる。但しプロテアーゼで活性化する場合には、次の事に注意が必要である。

酵素の純度、比活性の違い等で反応が異なる為、活性化が不充分又は活性化の過剰による失活を招く事があるので、温度、時間をコントロールする必要があり、活性化の任意の条件設定が必要。

**2. 4-アミノフェニール水銀酢酸(APMA)による活性化(汎用的な推奨法)**

APMAの35.5mgに5mlの純水を加え、これに0.5N NaOHを完全に溶解するまで滴下し、保存APMA試薬溶液とする。使用時にこの保存試薬に0.1N 塩酸を加えて、pHを1.0~10.5に調整後純水で10mlに合わせる。この希釈APMA試薬の10μlを検体100μlに加え、37°Cで6時間反応し活性化を行う。尚、APMA法はプロテアーゼと異なり、安定的に確実に活性化される

**<例1> 細胞培養液中の潜在型酵素(ProMMP)の活性化処理**

細胞培養液を1,500xGで3分間遠心で細胞を除去し、その上清を上記の方法でII型コラーゲン分解酵素(MMP-8)を活性化し、酵素活性測定用に供する[血清含有培養液の場合には、II型コラーゲン分解酵素活性測定前処理キット(YU-33003)で前処理要]。培地に蛍光物質が含有する場合には培地のブランクが必要。

**<例2> 生体組織検体の活性化処理**

組織の1.0~5.0mg(湿重量)をハサミで細切後、0.15M NaClを含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バツファーで数回洗浄し血液を除去後、0.2M NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100を含むpH7.5の0.05Mトリス塩酸バツファーを検体1mg(湿重量)当たり100μl加え4°Cでホモジナイズ後、8000xG、4°Cで15分間遠心し不溶物のない上清を得る。この上清を上記の方法で酵素を活性化し、II型コラーゲン分解酵素活性測定用に供する。

**<例3> 活性型II型コラーゲン分解酵素の測定>**

上記例1・例2で検体を前処理後、プロテアーゼ又はAPMA処理なしで酵素活性測定用の検体に供する。

**[VI]. <II型コラーゲン分解酵素活性測定法>**

1. 氷冷した中和溶液の50μlを、マイクロチューブに入れる。
2. 氷冷した50μlのFITC蛍光標識II型コラーゲン溶液を加え攪拌。
3. 検体溶液100μlを各マイクロチューブに加え密栓し攪拌。尚Blank、Total用として純水で2倍希釈した中和溶液の100μlを、コラーゲンの入ったマイクロチューブに加え攪拌。
4. Totalを除き全ての検体を、37°Cで1~6時間(標準2時間)反応後氷水中で5分間冷却。Totalは3分間ボイル、その後5分間4°Cで冷却後室温に10分間放置。
5. 氷冷した200μlの蛍光測定調整液を加え、密栓後攪拌し5分間氷冷後、30分間室温放置。
6. Total以外の全てのチューブを、8000xGで10分間4°Cで遠心。
7. 遠心後直ちに上清液を沈殿物を入れないように(デカント)、新しい試験管に移し室温に10分間放置。
8. 上清液を0.5mlのマイクロセルに入れ、蛍光強度測定機にて蛍光520nm(励起光495nm)で蛍光強度を定量測定。
9. ミクロセルがない場合には、上清液の300μlに純水3mlを加え希釈後、4mlのセルを用いて測定。