

カリジノゲナーゼ製剤の品質試験 (第2報)
酵素免疫法による測定と臨床使用調査

鈴木吉成, 姉崎 健, 川影逸郎, 藤井喜一郎
浜松医科大学医学部附属病院薬剤部*

Quality Test of Kalligenogenase Preparations (II)
Enzyme Immunoassay and Investigation of its Clinical Use

YOSHINARI SUZUKI, KEN ANEZAKI, ITSURO KAWAKAGE
and KIICHIRO FUJII

Pharmacy, Hamamatsu University School of Medicine Hospital*

(Received November 12, 1987)

A quality test was examined on five kalligenogenase preparations and one of their raw materials. And clinical use of these preparations was investigated from the prescriptions of three months in the outpatients of this hospital.

Kinin-liberating activity and kininase activity were measured by the enzyme immunoassay (EIA) utilizing a bradykinin (BK). Kinin-liberating activity was 260-540ng BK/min/U, and kininase activity that was an indicator of impurity was less than 50ng BK/min/U in all preparations. The result by the enzymatic method (BAEE) that was already reported by us was related very well to the kinin-liberating activity by the EIA method.

Keywords—quality test; kalligenogenase; kinin-liberating activity; kininase activity; EIA; BAEE

緒 言

循環器系作用物質としてのカリジノゲナーゼは薬価基準収載品だけでも約25品目もある。その品質については、既に高杉ら¹⁾の報告からも問題にされていたが、まだその活性単位は統一されていない。しかし現在では国立衛生試験所の標準品を基準にして比較試験を実施することができる。したがって著者らは操作の簡便な N-2-benzoyl-L-arginine ethylesterを基質とした酵素反応法 (BAEE) を用いて品質試験を実施した²⁾。今回はブラジキニンを利用した酵素免疫法 (EIA) により品質試験を行い、BAEE法と比較した。さらに、前回の実験でカプセル剤からの抽出が問題になった製品の原体を入手し、その力価を EIA 法で測定した。

また、当院外来患者における昭和61年4月から6月までの処方せんからこれら製品の使用状況を調査した。

実 験 の 部

1. 試薬, 試料

使用したカリジノゲナーゼ製剤は、錠剤2検体、カプセル剤2検体、注射剤1検体及びD社の原体1検体の合計6検体である (Table 1)。錠剤はいずれも腸溶剤であり、A社の製剤はさらに糖衣層を有していたため、糖衣層を洗い落として試験に供した。

酵素阻害剤は前回の実験からカリジノゲナーゼに対し大豆トリプシンインヒビターと同様の活性を持つウリナスタチン (Lot No. 5B003, 持田製薬) 5万単位/Vを100mlの精製水に溶解して用いた。ブラジキニン (BK) は和光純薬工業株式会社から購入した (SIGMA Lot No. 84F-5885)。キニンノーゲンは生化学工業株式会社から購入した (Lot No. P85Z01)。その最大キニン遊離能は20

* 浜松市半田町 3600; 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, 431-31 Japan

Table 1. Kalliginogenase Preparations

Sample	Indicated Unit	Lot No.
A	40 U/Ample	0693S
B	10 U/Tablet	Y128
C	200 U/Tablet	W045
D	10 U/Capsule	601AB
E	50 U/Capsule	EE07B4
F	454 U/mg	F5001

μgBK/mg であった。ブラジキニン測定用 EIA キット (Lot No.281) 及び自動分析機マーセンティア MR24 は大日本製薬株式会社製を使用した。

2. キニン遊離活性の測定法

1) 試料溶液の調製法

錠剤またはカプセル剤の各10個に少量の20mMリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を加え、乳鉢中で粉碎、20mMリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を加え、1ml中に2.5製品表示単位を含む液とし、ろ紙を用いてろ過したものを試料原液とした。この試料原液1mlにウリナスタチン溶液1ml及び10mM 1,10-フェナントロリン液1mlを加え、さらに20mMリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を加え全量10mlとしたものを試料溶液とした。注射剤10アンプル及び原体1.4mgに20mMリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を加えて溶かし、1ml中に2.5製品表示単位を含む液を作成した。この場合はろ過せずに、以下、錠剤またはカプセル剤と同様にして試料溶液を作成した。

2) キニノーゲン溶液の作成

キニノーゲン2mgを20mMリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) に加えて溶かし、930ng BK/mlの濃度の溶液を作成した。

3) 測定操作法

操作法は谷本ら³⁾の方法に準拠して実施した。すなわち30±0.5°Cで5分間加温した試料溶液0.5mlに30±0.5°Cで5分間加温したキニノーゲン溶液0.5mlを加え、30±0.5°Cで正確に2分間反応させた後、3分間煮沸してキニン遊離活性を失活させた。20%トリクロル酢酸液0.2mlを加えて氷冷し、3000rpmで10分間遠心分離して上澄液を得た。この上澄液0.5mlにブラジキニン測定用キットの緩衝液B 0.5mlを加えて前処理検体とし、この0.2mlを自動反応装置のキューベットに移した。以下、抗原抗体反応、B/F分離、酵素反応のプロセスを自動的に行った。生成したカリジンの量をブラジキニン量 (B) とした。

別に、20mMリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 0.5mlを用いて試料溶液と同様に操作しblank値 (B₀) とした。試料1製品表示単位あたりのキニン遊離活性は次式から計算した。

$$\begin{aligned} & \text{キニン遊離活性 (ng BK/min/U)} \\ & = (B - B_0) \times 24 / (2 \times a) \end{aligned}$$

a : 試料溶液1ml中のカリジノゲナーゼ単位
(この場合製品表示単位として0.25U)

3. キニナーゼ活性の測定法

1) 試料溶液の調製法

錠剤またはカプセル剤の各10個に少量の50mMリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) を加えて乳鉢ですりつぶし、同緩衝液で1ml中に2製品表示単位を含む溶液を調製した。この溶液をろ紙を用いてろ過し試料溶液とした。注射剤10アンプル及び原体1.4mgに50mMリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) を加えて溶解し、1ml中2製品表示単位を含む溶液を調製し、試料溶液とした。

2) ブラジキニン溶液の調製法

ブラジキニン1mgをポリエチレン製の試験管にとり、50mMリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) を加えて溶解し、200ng/mlのブラジキニン溶液を作成した。

3) 測定操作法

操作法は谷本ら³⁾の方法に準拠して実施した。すなわち32±0.5°Cで5分間加温した試料溶液0.5mlに32±0.5°Cで5分間加温したブラジキニン溶液0.5mlを加え、32±0.5°Cで正確に2.5分間反応させた後、20%トリクロル酢酸液0.2mlを加えて反応を停止させた。続いて、3000rpmで10分間遠心分離して上澄液を得た。この上澄液0.5mlにキットの緩衝液B 0.5mlを加えて前処理試料検体とし、この0.2mlを用いて自動反応装置によりEIAで残存ブラジキニン量 (B) を測定した。

また試料の代わりに50mMリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 0.5mlを用いて試料溶液の場合と同様に操作してblank値 (B₀) を得た。試料1製品表示単位あたりのキニナーゼ活性は次式により計算した。

$$\begin{aligned} & \text{キニナーゼ活性 (ng BK/min/U)} \\ & = (B_0 - B) \times 24 / (2.5 \times a) \end{aligned}$$

a : 試料溶液1ml中のカリジノゲナーゼ単位
(この場合製品表示単位として5U)

4. カリジノゲナーゼ製剤の使用状況の調査

昭和61年の4, 5, 6月の3カ月間の外来処方せんに基づいて、当院採用4社の製品の使用状況を調査した。

結果及び考察

1. キニン遊離活性及びキニナーゼ活性

A, Bは同一製薬会社で、キニン遊離活性はいずれも500ng BK/min/U 以上と最も高く、D社の原体 375ng BK/min/U より高値であった。Cは BAEE 法での結果でもその活性が低いことが示唆されたが、キニン遊離活性も 260ng BK/min/U と低い値を示した。またDのカプセルペレットからの抽出については、Fの原体と比較して約70%程度であった (Table 2)。キニン遊離活性の値は、3回の平均でまだバラツキがあるものの、全体と

しては谷本らの報告した 350~550ng BK/min/KU 程度であった。このキニン遊離活性と前回の BAEE 法で得られたエステラーゼ活性とは Fig. 1 に示したように良い相関関係にあった。

今回は特に国立衛生試験所の標準品の活性を EIA 法により測定しなかった。しかしその活性は BAEE 法の結果から A, B と同一であると推定される。したがってキニン遊離活性は 500ng BK/min/U が一つの目安になるであろう。また、不純物の混入を示すキニナーゼ活性は、いずれも谷本らの提案した基準値である 50ng BK/min/U より低かった。この結果については BAEE 法で

Table 2. Kininase Activity and Kinin-liberating Activity of Kalliginogenase Preparations

Sample	Kinin-liberating Activity (ng BK/min/U)		Kininase Activity (ng BK/min/U)	
	Mean	Min - Max	Mean	Min - Max
A	502	414 - 560	6.5	3.8 - 9.1
B	540	443 - 618	0	0
C	260	227 - 320	11.2	9.6 - 12.5
D	261	215 - 328	0	0
E	369	328 - 402	0	0
F	375	333 - 406	0	0

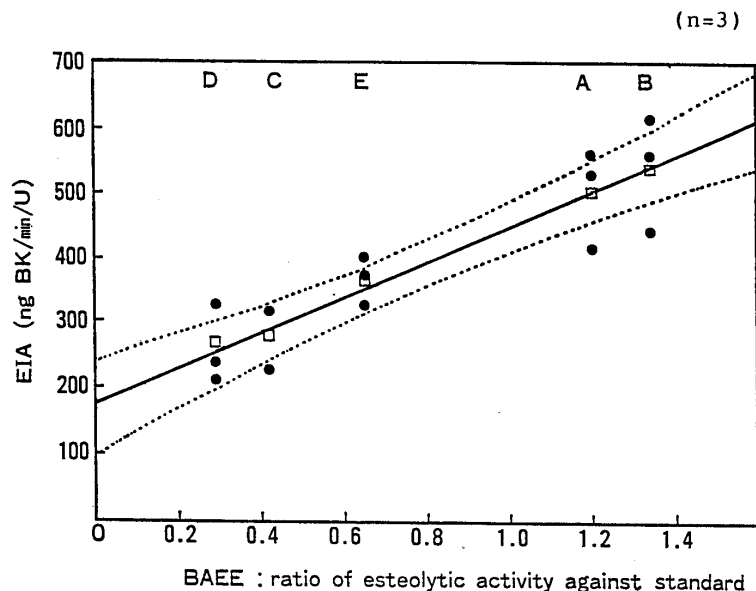


Fig. 1. Estolytic Activity in BAEE Method was Compared with the Activity in EIA Method

- ; linear regression line ($y=278x-170$, $R=0.902$, $N=15$)
- ; 95% confidence limits
- ; each activity of the preparation in EIA method
- ; mean activity of each preparation

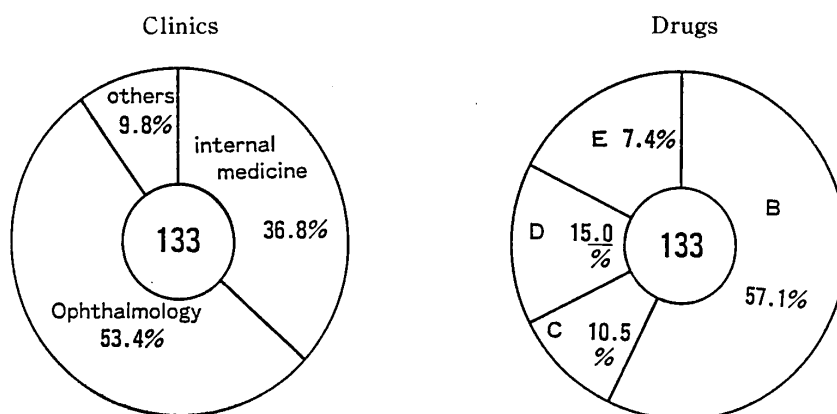


Fig. 2. Clinical Use of Kalligenase Preparations for Outpatients was Investigated during Three Months in 1986

の結果とやや異なっているが、合成基質であるBAEEがキナーゼにより分解され易いためと思われる。しかし簡便なBAEE法は多くの施設で実施でき、カリジノゲナーゼの活性を十分評価し得ると思われる。またトリプシン酵素阻害剤を用いて加水分解の程度の差から不純物の量を推定することには問題がある。

2. カリジノゲナーゼ製剤の使用状況

調査した患者133例の結果を円グラフにまとめたのがFig. 2で、診療科別に患者の例数で比較して、眼科53.4%、内科36.8%、その他の8科はほとんど使用していなかった。また製剤別にしてみると、EIA法で製品表示単位あたりの活性が最も高い製剤Bを内服している患者が57.1%であったが、活性の低いCを内服している患者も全体の約10%もあった。

この調査期間中に製剤を変更した患者は2例だけであった。それはAからDと、BからAであった。また活性の低いCからの変更を予想していたがこのような例はなかった。これはこれら製剤の臨床上的評価の難しさが原因の一つと考えられる。さらに、これら製剤間の活性の強さの順がはっきりしていないことも原因していると思

われる。

まとめ

カリジノゲナーゼの品質試験をブラジキニンを用いた酵素免疫法によって実施した結果、キニン遊離活性は260~540ng BK/min/Uであった。この結果は操作の簡便な酵素反応法(BAEE)の加水分解活性と良く相関した。しかし不純物の混入を示すキナーゼ活性は、50ng BK/min/U以下で問題なかった。この製剤は今もなお活性単位の統一がされていないことから、またキニン遊離活性の基準値を再確認する上でも多くの施設で品質試験をすることが望まれる。

引用文献

- 1) 高杉益充, 宮田一好, 水口和生, 篠田雅人: 病院薬学, 4, 56 (1978).
- 2) 伊藤譲, 鈴木時紀, 鈴木吉成, 二橋純一, 山田善広, 古田知由, 川影逸郎, 藤井喜一郎: 病院薬学, 13(3), 168 (1987).
- 3) 谷本剛, 福田秀男, 山羽務: 医薬品研究, 16, 839 (1985).