

## カリジノゲナーゼ製剤の品質試験

伊藤 譲, 鈴木時紀, 鈴木吉成, 二橋純一, 山田喜広, 古田知由, 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 Kalligenase Preparations

YUZURU ITO, TOKINORI SUZUKI, YOSHINARI SUZUKI, JUNICHI NIHASHI,  
YOSHIHIRO YAMADA, TOMOYOSHI FURUTA, ITSURO  
KAWAKAGE and KIICHIRO FUJII

Pharmacy, Hamamatsu University School of Medicine Hospital\*

(Received July 14, 1986)

Extractability from capsule or tablet preparations, and quality test were examined on 5 commercial kalligenase products. In extraction from tablet or capsule preparations, we ground them to powder with a small amount of water in a mortar. By this simple method, kalligenase could be extracted from each preparation.

The amounts of protein determined by Lowry method were 10 to 100 times more than that of the standard ( $1\mu/U$ ), but did not correspond to the esteolytic activity measured by BAEE method. Furthermore, one of them was contaminated with trypsin-like protein in the preparation because its esteolytic activity was repressed by a soybean trypsin inhibitor or urinastatin. Therefore, it seems that highly purified kalligenase was not used for all commercial products.

**Keywords**—quality test; kalligenase; protein contents; extraction method; esteolytic activity; trypsin inhibitor

## 緒 言

カリジノゲナーゼ製剤は、主に循環器用剤として広く用いられ多数の商品が市販されているが、その品質は一定ではなく不純物を含む製剤があることはすでに高杉ら<sup>1)</sup>により研究されている。また近年標準品が設定されたが、定量法は各社まちまちで、標準品との比較もなされていない。

今回著者らは、国立衛生試験所の標準品と当院で採用した4社5製剤の蛋白質量とエステラーゼ活性について比較し検討したので報告する。

## 実 験 の 部

## 1. 試 料

標準品及び各社製剤 (A~E) の剤形、表示単位とロ

ット番号を Table 1 に示す。

## 2. 試料溶液の調製

標準品とAは粉末であるため精製水に溶解し、Bは脱糖衣、C、Eは脱カプセル、Dはそのまま、それぞれ少量の精製水と共に乳鉢中で粉碎、ろ紙を用いてろ過し、ろ液を試料溶液とした。

## 3. 試 薬

フェノール試薬：市販 (Lot No. LTJ3181, 和光純薬) を2倍に希釈した(1N)。

アルカリ性銅溶液：1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  溶液 0.5ml に2% 酒石酸ナトリウム・カリウム溶液 0.5ml を加え、さらに2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -0.1N NaOH 50ml を加え調製した (用時調製)。

基質液：N-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル (BAEE) を 1.034mM になるように 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解して使用した (用時調製)。

酵素阻害剤：(1) GXT 液, (2) MR 液, (3) STI 液それ

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

Table 1. Kalliginogenase Preparations

Sample	Indicated Unit	Form	Lot No.
Standard	115 IU*	Powder	
A	40 U	Powder	0693S
B	10 U	Tablet	Y128
C	10 U	Capsule	601AB
D	200 U	Tablet	W045
E	50 U	Capsule	EE07B4

\* International Unit

それを2濃度作成し高濃度を(H),低濃度を(L)とした。(1)メシル酸ガベキセート(Lot No. 446FA,小野薬品製)100mg/Vを反応溶液中0.333mMになるように24mlの精製水に溶解,さらに10倍希釈して調製した。(2)ウリナスタチン(Lot No.5B003,持田製薬製)5万単位/Vを反応溶液中16.67U/mlになるように100mlの精製水に溶解,さらに10倍希釈して調製した。(3)ソイビートリプシンインヒビター(Lot No.114F8005, Sigma社製)を精製水に溶解し,4w/v%及び2w/v%溶液を調製した。

#### 4. 機器

分光光度計:日立モデル 200-20型

#### 5. 蛋白質量の測定

ウシアルブミンを標準品としたLowry法<sup>2)</sup>に従い,660nmにおける吸光度を測定した。ただし試料溶液には,カリジノゲナーゼ以外の物質を含有し測定に影響を与えると考えられるため,精製水をブランク値として測定し補正した。

#### 6. BAEE法による総エステラーゼ活性測定<sup>3,4)</sup>

基質液2.9mlに試料溶液0.1mlを加え,25°C30分間反応させて波長253nmにおける15秒ごとの吸光度を測定,それにより1分間当りの吸光度変化を求め,さらに次式から1分間の基質の分解濃度( $\mu$ mol)を求めた。

$$\text{EU/ml}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}) = \frac{4A_{253}/\text{min}}{0.0383}$$

#### 7. 各種エステラーゼ酵素阻害剤を用いたBAEE法

試料溶液0.1mlにGXT液,MR液,STI液それぞれ

0.1mlを加え30分間インキュベートした後,基質液2.8mlを加え25°C30分間反応させて,波長253nmにおける吸光度を測定した。ブランク値として0.1Mトリス-塩酸緩衝液0.1mlを用いて測定し補正した。

#### 結果および考察

##### 1. 蛋白質量の測定

高杉ら<sup>1)</sup>及び藤本<sup>5)</sup>の報告によれば,製剤の蛋白質量は表示単位当り少ないもので40~50 $\mu$ g,多いものでは1000 $\mu$ gを越えている点で一致している。これら両者は同様な抽出法で行っているため成績も似かよっていると思われるが,著者らの簡便化した抽出法により得られた値をTable 2に示す。

国立衛生試験所の標準品は1.3 $\mu$ g/Uを示した。試料A,E剤については標準品とほぼ同等の値が得られた。このことからA,E剤は標準品と同程度の純度であると考えられる。B,C及びD剤については高い値を示し

Table 2. Protein Measurement by Lowry Method

Sample	Protein Content $\mu$ g/U	
	Water	10mM $\text{CaCl}_2$ /saline
Standard	1.3	-
A	10.5	-
B	135.1	152.7
C	79.1	101.9
D	115.9	118.0
E	6.9	8.0

たが、これはカリジノゲナーゼ以外の蛋白、あるいは Lowry 法に影響をおよぼす因子の混入も考えられる。

抽出液として精製水を使用したか、別法として 10mM CaCl<sub>2</sub> 含有生理食塩水を用いて抽出を行った報告も見られるため比較検討したが、抽出液による差は認められなかった。

## 2. 総エステラーゼ活性の測定

BAEE 法によるエステラーゼ活性値を Table 3 に示す。これらの値は高杉ら<sup>1)</sup>、藤本<sup>5)</sup> の報告にある値と異なり、標準品の 40~116% の範囲であった。その中で低い値を示した C, E 剤はカプセル剤で内容がさらにミニベレットに加工されており、最大値/最小値の比率が錠剤である B, D 剤に比較して大きく、蛋白質量も C, E 剤は低い値であった。これらのことから、カプセル剤

からのカリジノゲナーゼの抽出性に問題があると考えられ、水による抽出は不適であると思われた。

## 3. 酵素阻害剤を用いたエステラーゼ活性の測定

1, 2 の結果から、カリジノゲナーゼの蛋白質量とエステラーゼ活性の間には相関がなく他の蛋白質の混在によると思われる影響が十分考えられた。また BAEE はカリジノゲナーゼ以外の酵素によっても分解され、特に混在しやすいのはトリプシンであるため、STI や MR を用いての活性の変化を検討した。またこのとき、BAEE のエステラーゼによる分解を広く阻害する GXT を用いた場合も合わせて測定し、Table 4 に示した。

GXT は濃度による差は見られるが、いずれもカリジノゲナーゼのエステラーゼ活性を阻害し、製剤による差異は認められなかった。STI では 2% の濃度で D のみ

Table 3. Esteolytic Activity Measurement with BAEE

Sample	Activity (pmol/min per U)	
	Mean	Min - Max
Standard	77.6 (100)	
A	88.4 (107)	73.8-93.0
B	90.4 (116)	88.4-92.5
C	31.0 (40)	19.1-45.3
D	47.9 (62)	37.4-58.0
E	31.5 (41)	13.1-58.1

Table 4. Inhibitory Effects of Gabexate, Soybean Trypsin Inhibitor and Urinastatin on Esteolytic Activity

Sample	Activity (pmol/min per U)						
	no addition	GXT		STI		MR	
		(H)	(L)	(H)	(L)	(H)	(L)
Standard	77.6	19.5	55.2	63.0	89.6	72.4	73.3
A	88.4	14.5	69.9	71.4	77.2	87.0	78.8
B	90.4	17.2	87.7	97.5	84.6	97.0	109.0
C	31.0	3.0	18.6	19.8	24.3	20.7	24.1
D	47.9	5.7	34.8	28.4	28.6	30.5	34.7
E	31.5	9.6	45.3	44.2	45.6	46.8	48.9

が活性の低下を示しており、これは4%の濃度においても同様であった。また、やはり選択性があるといわれるMRの使用によってもDのエステラーゼ活性の低下が見られ、Dにおいてはトリプシン様蛋白と思われるものの混在が考えられ、それが活性の30~40%を占めていることが明らかとなった。他の製剤については標準品と同様な挙動を示し、BAEE法によるエステラーゼ活性に影響を与えるような蛋白の混入は認められなかった。

### まとめ

標準品と各製剤との比較において、蛋白質量については明確な結果が得られなかったが、標準品に比べて高い値を示し、精製が十分されているとはいえないと思われる。標準品を対照としてトリプシンインヒビターを添加した簡便なエステラーゼ活性の測定を実施し、カプセル

剤からの主薬の抽出に問題があるものの、ほぼ標準品と同様な活性を示す製品が多かったが、トリプシンを含有しているのではないかと考えられるものがあることも明らかとなった。したがって今後、国立衛生試験所製の標準品を基準にした生物活性による表示が望まれる。

### 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) O.H.Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L.Farr, R.J.Randall: J.Biol.Chem., 193, 265 (1951).
- 3) 守屋寛, 阿部圭志編: “カリクレイン・キニン”, 講談社, 1982.
- 4) G.W. Schwert and Y.Takenaka: Biochim. Biophys. Acta, 16, 570 (1955).
- 5) 藤本幸男: 薬物療法, 3, 143 (1977).

— YAKUJI NIPPO'S PUBLICATIONS —

# 新しい薬物療法

— 臨床薬理から探る —

東京大学教授 宮本昭正 監修

日本大学講師 中山一誠 編集

- 第一線の臨床医家がわかりやすく語る最新の薬物療法!
- 医師・薬剤師等医療関係者が、薬物療法の現状を知る上で最適の書!
- 薬事日報紙上で連載し、好評を博した対談「臨床薬理から探る——新しい薬の使い方」を加筆・訂正し、その後の新知識を加え、1冊にまとめたもの。
- 疾患の病態生理から、治療薬の最近の進歩の状況とその使い方、治験の結果を平易に解説。

B5判  
総264ページ  
定価4,000円  
(〒300円)

〒101 東京都千代田区神田和泉町1-11  
☎(03)862-2141 振替東京5-80665

薬 事 日 報 社

〒541 大阪府東区道修町2-19 山口ビル  
☎(06)203-4191