

[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
— 般 論 文 —
16(2) 86 — 93 (1990)

カリジノゲナーゼ製剤の薬剤学的研究 —ポストカラム法による品質評価の試み—

水口和生*, 久次米敏秀, 梅田貴文, 伏谷秀治, 吉坂恭一, 高杉益充
徳島大学医学部附属病院薬剤部†

Quality Testing for Kallidinogenase Preparations by HPLC-post-column Analysis

KAZUO MINAKUCHI*, TOSHIHIDE KUJIME, TAKABUMI UMEDA, SHUJI
FUSHITANI, TAKAICHI YOSHISAKA, and MASUMITSU TAKASUGI
Department of Pharmacy, Tokushima University Hospital†

(Received November 7, 1989)

In the present study, according to the standardized methods, we tried to evaluate the quality and efficacy of oral kallidinogenase preparations, which were manufactured under the new quality standard, and the stability and purity tests by using HPLC-post-column analysis. Results obtained by the standardized methods showed that all of the specimens were in compliance with standards. The purity test by HPLC-post-column analysis revealed that many specimens were found to have enzyme activities other than kallidinogenase. The stability test showed that most specimens were stable enough under the storage conditions at 50°C for 2 months, but one particular specimen reduced to 30% of the labeled activity under the same conditions. These results suggest that although the products have been manufactured and marketed under the standardized criteria, the qualities of kallidinogenase preparations are found considerably different among manufactures.

Keywords—kallidinogenase; HPLC-post-column analysis; quality test; stability test; purity test; kallidinogenase preparations

緒 言

カリジノゲナーゼはドイツの Frey により発見された血圧降下作用を有する酵素である。カリジノゲナーゼ製剤は現在、20数社から市販されており、高血圧症における末梢循環障害や脳循環障害の随伴症状の改善に繁用されている。市販製剤に使用されているカリジノゲナーゼは、ブタ脾臓由来の酵素であり、その抽出方法や精製技術の違い

によって製剤間に品質の差異が生じるものと考えられる。

著者らはすでに、このような観点からカリジノゲナーゼ製剤の力価測定や電気泳動法による夾雑酵素の検出等を行い、製剤によって品質にかなりの差があることを報告した^{1,2)}。それ以後にもカリジノゲナーゼ製剤の品質試験に関する報告^{3,4)}はみられるが、現在市販されているカリジノゲナーゼ製剤は厚生省の指導によって1988年に作成された新しい統一規格（アプロチニン阻害率による確認試験やマウスより摘出した子宮の収縮によるキ

† 徳島市蔵本町2-50; 2-50, Kuramoto-cho, Tokushima-shi, 770 Japan

ニン遊離活性試験などの試験法を含む)に適合したものであり、力価(単位)の表示方法も国際単位に統一されている。

今回、著者らは市販12製剤を対象としてHPLC-ポストカラム分析法を用いて、カリジノゲナーゼ活性及びカリジノゲナーゼ以外の夾雑酵素活性を検出することにより、カリジノゲナーゼ製剤の品質を更に詳しく検討した。また、統一規格試験、安定性試験も行ったので併せて報告する。

実験方法

1. 試料

Table 1に、試験に用いたカリジノゲナーゼ製剤12製品のロット番号を示した。試料11, 12の表示力価は10IU(国際単位)であり、他は25IUである。また試料11はカプセル剤、他は錠剤である。

Table 1. Specimens Examined

Specimen No.	Lot No.
1	HG21B
2	ZK19
3	Z001
4	80713
5	319008
6	2307
7	3GL1
8	B03G3
9	UGU02B
10	31507
11	805AA
12	Y006

2. 規格試験

カリジノゲナーゼ製剤の統一規格試験の方法に従って定量、アプロチニン阻害率による確認試験、マウスより摘出した子宮の収縮によるキニン遊離活性試験を行い、日本薬局方に準じて重量偏差試験、崩壊試験を行った。

〔定量法〕：カリジノゲナーゼ錠(カプセル)20個をとり粉末にして試料とした。表示国際単位に従い、試料の適量を精密に量り、0.05Mリン酸塩緩衝液を加えて抽出し、その抽出液1ml中に約

10国際単位を含む液を製し、これを試料原液とした。試料原液4mlを量り、これにトリプシンインヒビター溶液(10,000単位/mg以上の力価を有する大豆トリプシンインヒビターに0.05Mリン酸塩緩衝液pH7.0を加えて溶解し、その溶液1ml中にトリプシンインヒビター0.5mgを含むよう調製した溶液)1mlを加え、更に0.05Mリン酸塩緩衝液を加えて10mlとし、試料溶液とした。予め湯浴インキュベーターにより30±0.5°Cで5分間加温した基質溶液(D-バリルロイシルアルギニン-p-ニトロアニリド・二塩酸塩；第一化学薬品に0.1Mトリス塩酸緩衝液pH8.0を加えて溶解し、その溶液1ml中にD-バリルロイシルアルギニン-p-ニトロアニリド・二塩酸塩0.2mgを含むよう調製した溶液)2.5mlをガラスセルに入れ、これに30±0.5°Cで5分間加温した試料溶液0.5mlを加え、水を対照として2分及び6分後の波長405nmにおける吸光度 A_{T2} 及び A_{T6} を測定した。別に、カリジノゲナーゼ標準品(1アンプルに115国際単位を含む豚性カリジノゲナーゼ標準品；国立衛生試験所、ロットNo.841)1アンプルに0.05Mリン酸塩緩衝液を加えて、内容物全量を溶解し10mlに調製したものについて、前記の試料原液と同様に操作して、2分及び6分後の波長405nmにおける吸光度 A_{S2} 及び A_{S6} を測定した。次に、トリプシンインヒビター溶液1mlを量り、試料溶液と同様に操作して、2分及び6分後の波長405nmにおける吸光度 A_{O2} 及び A_{O6} を測定した。

これらの得られた値から、次式により試料1mg当たりの国際単位数を計算した。

試料1mg当たりの国際単位数

$$= \frac{(A_{T6} - A_{T2}) - (A_{O6} - A_{O2})}{(A_{S6} - A_{S2}) - (A_{O6} - A_{O2})} \times \frac{a}{10} \times \frac{1}{b}$$

a：標準品の採取量(国際単位)

b：試料原液1ml中の試料重量(mg)

3. 安定性試験

試料を50°C、2カ月間市販包装形態(紙箱を除く)にて保存した後、規格試験の定量法を用いて含量測定を行い、カリジノゲナーゼ製剤の長期保存における安定性を検討した。

4. HPLC-ポストカラム分析

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とポストカラム反応法を組み合わせた HPLC-ポストカラム分析⁵⁾を行い、試料中のカリジノゲナーゼ活性と夾雑酵素活性を測定した。酵素の HPLC-ポストカラム分析のメリットは、分析カラムと合成基質を種々組み合わせることによって多彩な定性解析が可能であると同時に、定量的解析も十分可能であるという点である。今回行った HPLC-ポストカラム分析の概要を Scheme 1 に示し、ポストカラム反応を Table 2 に示した。

抽出は、粉末化した試料に対して氷冷下に 0.05 M リン酸塩緩衝液 5 ml を加えて行った。抽出液は 4°C の条件下で 20,000rpm, 30分間の遠心分

離を行った後、上清をさらに孔径 0.45 μ m のセルロースアセテートメンブランフィルターでろ過し HPLC 用検体とした。検体の調製及びろ過は氷冷下で実施し、HPLC への注入量は、各製剤の表示単位相当量として 1 IU を用いた。

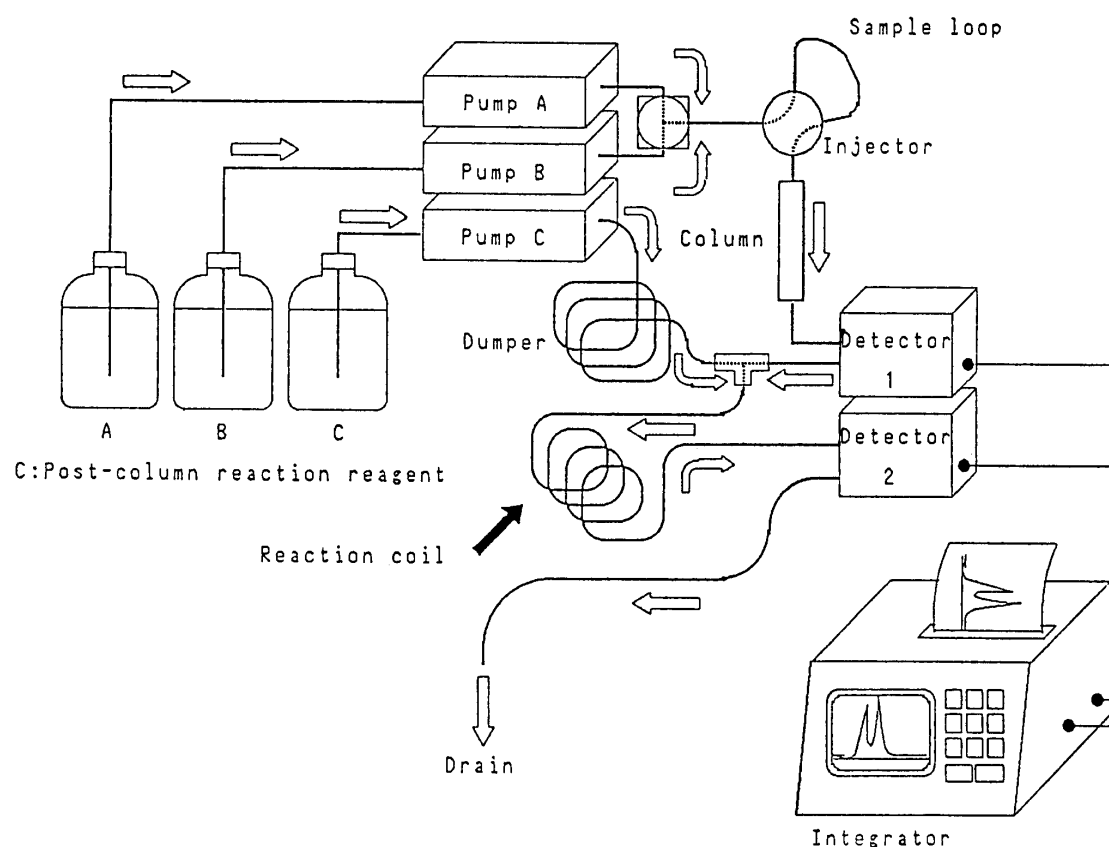
結果及び考察

1. 規格試験

定量、確認試験、キニン遊離活性試験、重量偏差試験、崩壊試験においてすべての製剤は統一規格試験に適合していた。

2. 安定性試験

Table 3 に安定性試験の結果を示した。安定性試験実施前の対表示活性が 92.9% と最も低い値を



Analytical conditions

Column : MonoQ HR5/5 (I.D. 5×50mm, Pharmacia)
System : HPLC system (Pharmacia)
Flow rate : 1 ml/min
Solvent A : 0.02M phosphate buffer pH 6.8

Solvent B : 0.02M phosphate buffer containing 1M NaCl pH 6.8
Gradient : solvent B 0→50% for 49 min
Injection : 100 μ l
Wash : solvent B 100%
Detection : 280nm

Scheme 1. HPLC-post-column Analysis

Table 2. Enzyme Reactions in Post-column Analysis

Post-column reaction (1)	
Reaction	$\text{Pro-Phe-Arg-MCA} \xrightarrow{\text{Kallidinogenase and trypsin-like enzyme}} \text{Pro-Phe-Arg} + \text{AMC}$
Solvent C	0.05M Tris-HCl-0.1M NaCl pH 8.0 containing 0.025mM Pro-Phe-Arg-MCA
Conditions	30°C for 1 min with 1 ml/min (total flow rate 2ml/min)
Detection	fluorescence (Ex.380nm Em.460nm)
Post-column reaction (2)	
Reaction	$\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA} \xrightarrow{\text{chymotrypsin-like enzyme}} \text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe} + \text{AMC}$
Solvent C	0.05M Tris-HCl-0.1M NaCl pH 8.0 containing 0.025mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA
Conditions	30°C for 1 min with 1 ml/min (total flow rate 2ml/min)
Detection	fluorescence (Ex.380nm Em.460nm)

Table 3. The Stability of Kallidinogenase Specimens

Specimen No.	Before	After 2 months, 50°C
1	113.3±0.7	108.2±0.1
2	127.6±1.4	119.8±0.9
3	124.1±0.9	120.7±1.2
4	100.4±0.8	89.6±1.1
5	92.9±0.7	27.3±0.6
6	127.3±2.2	125.2±1.2
7	129.0±1.0	114.2±0.8
8	104.2±2.9	100.4±0.1
9	102.3±0.9	91.5±2.7
10	107.0±1.2	98.9±0.5
11	128.2±1.7	104.5±2.9
12	116.4±2.4	113.4±1.9
n=3 Mean±S.D.(%)		

示した製剤5は 50°C, 2カ月間保存によって対表示活性が27.3%, 対0日活性では29.4%となり著しい活性低下が認められ, 夏期の保存には十分な注意が必要と考えられる. 他の製剤の 50°C, 2

カ月間保存後の対表示活性は 89.6~125.2%, 対0日活性は81.5~98.3%と比較的安定であった.

3. HPLC-ポストカラム分析

規格試験の定量法(活性測定)は, トリプシンインヒビターのみによる分別である. そこで, 著者らは他の夾雑酵素による活性についても識別可能な HPLC-ポストカラム分析を行い, 製剤に使用されているカリジノゲナーゼ原体の純度をさらに詳しく検討した.

1) Pro-Phe-Arg-MCA 分解活性

規格試験の活性測定で用いた合成基質は, D-Val-Leu-Arg-pNA であるが, 本実験では, 蛍光検出による高感度の特徴とする Pro-Phe-Arg-MCA (株式会社ペプチド研究所)を使用した. この基質に対するブタ膵臓中の主要な分解活性は, 活性測定で用いた基質の場合と同じく, カリジノゲナーゼとトリプシンによるものである.

Fig. 1 に HPLC-ポストカラム分析の結果を示した. 図中 Authentic Kallidinogenase として示したものは, カリジノゲナーゼ標準品(国立衛

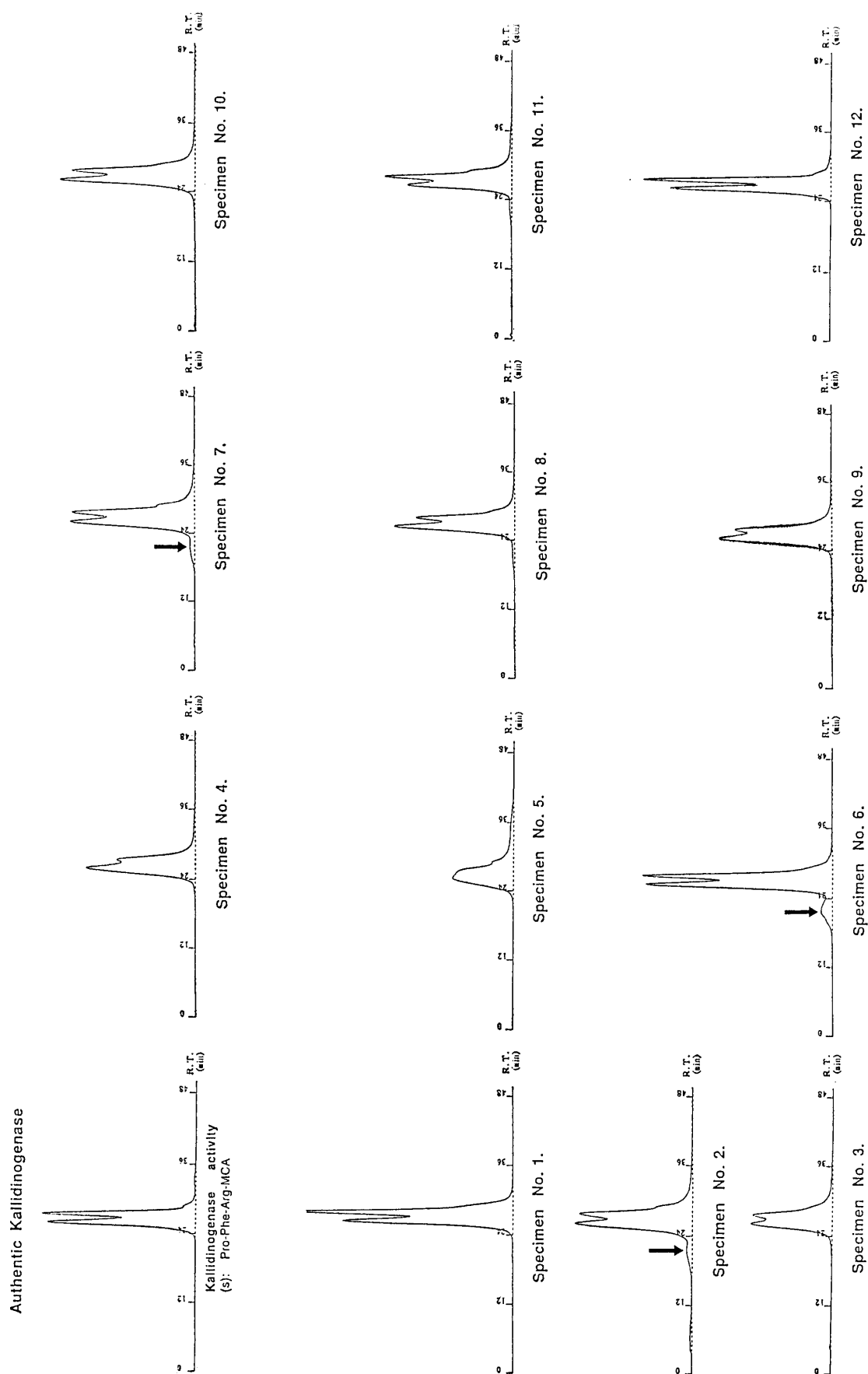


Fig. 1. Chromatograms of Kallidinogenase Specimens by HPLC-post-column Analysis Using Pro-Phe-Arg MCA as Substrate

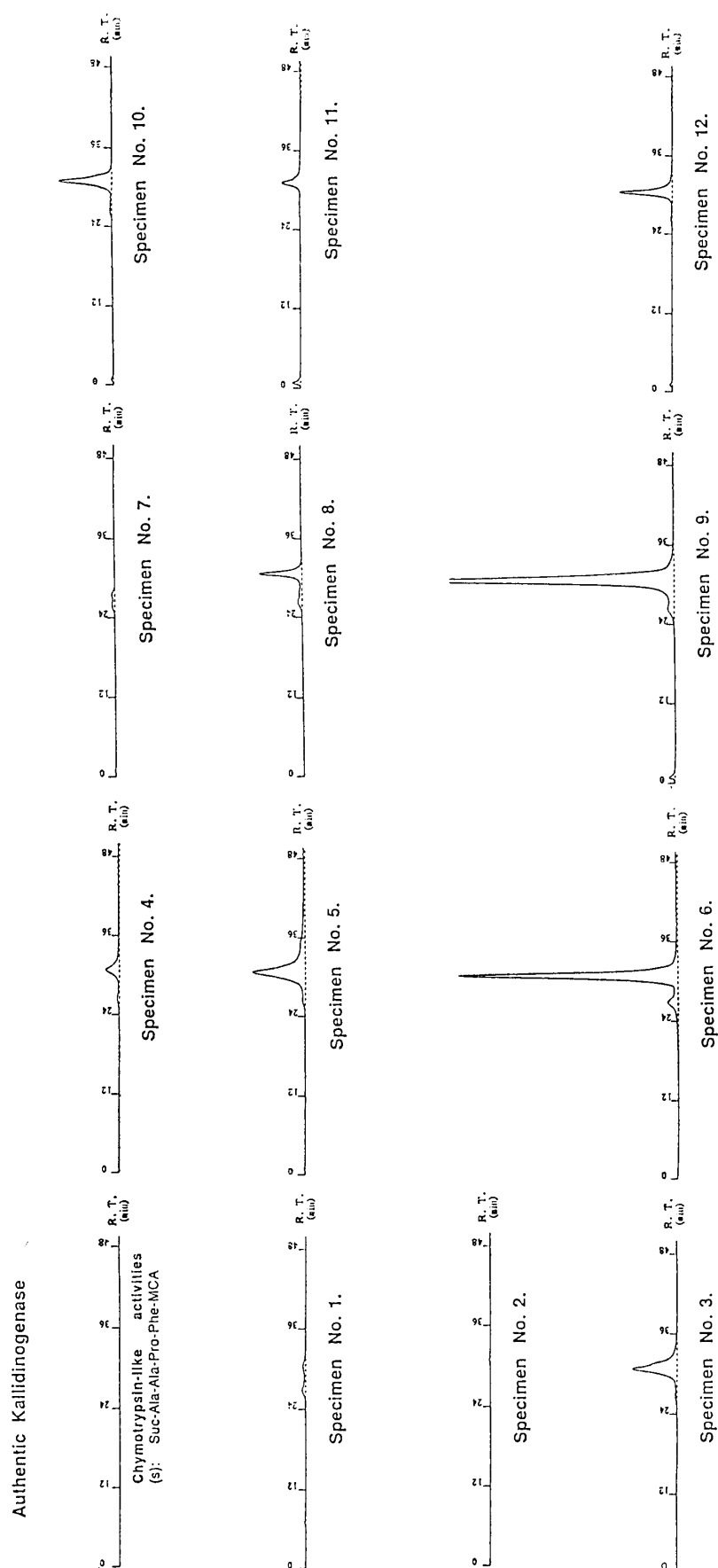


Fig. 2. Chromatograms of Kallidinogenase Specimens by HPLC-post-column Analysis Using Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA as Substrate

生試験所, ロット No. 841) のクロマトグラムである。カリジノゲナーゼ標準品の分解活性はリテンションタイム24~36分に存在し, それ以外の部分には全く検出されなかった。したがって, Fig. 1 に示す各製剤のクロマトグラム中, リテンションタイム24~36分に観察されるピークをカリジノゲナーゼ活性, それ以外の部分に存在する活性をカリジノゲナーゼ以外の夾雑酵素活性とみなすことができる。製剤2, 6, 7では矢印で示す部分に夾雑酵素による活性ピークが認められた。また, 製剤1, 6, 12のカリジノゲナーゼ活性は, カリジノゲナーゼ標準品と同等のシャープなピークパターンを示した。

ブタ脾臓由来のカリジノゲナーゼ (HPK) は, イオン交換クロマトグラフィー上では HPK-A, HPK-B という2つの主要なアイソザイムに分離することが知られており⁶⁾, これらのアイソザイムの含有比率が高ければシャープな2ピークが観察され, それ以外の活性が混入すれば主ピークの見かけのピーク幅が広がることになる。したがって, 製剤5のようなブロードな活性パターンを示すものでは, カリジノゲナーゼ原体の純度が低い可能性が示唆される。

2) Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA 分解活性

基質 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (ペプチド研究所) に対する分解活性は, 脾臓の場合ほとんどがキモトリプシンによると考えられる。この基質を用いて行った HPLC-ポストカラム分析の結果を Fig. 2 に示した。図中カリジノゲナーゼ標準品では, この基質に対する分解活性 (キモトリプシン様活性) は全く認められなかったが, 各製剤のクロマトグラム上では, それぞれにキモトリプシン様活性が観察された。各製剤のキモトリプシン様活性を比較すると, 製剤9, 6では特に高い活性を示したのに対し, 製剤2, 1, 7では痕跡程度であった。なお, これらのキモトリプシン様活性のほとんどはリテンションタイム30分前後に存在しており, 等電点の低い酸性蛋白であることが示唆されることから, ブタ脾臓中に存在すると報告されているキモトリプシンC^{7,8)}であろうと考えられる。

ま と め

現在市販されているカリジノゲナーゼ製剤は, 統一規格により一定の品質保証がなされている。今回著者らが行った試験結果においても, 試料として用いた12製剤すべてが, この規格に適合していた。しかし, これとは別に 50°C, 2 カ月間の保存条件で行った安定性試験においては, 定量値が表示活性の30%以下に低下する製剤もみられた。また, カリジノゲナーゼ製剤中の原体純度を規格とは少し異なる角度から分析することによって各製剤の品質の特徴を明らかにすることを目的として HPLC-ポストカラム分析を実施した。

守屋らは種々のカリジノゲナーゼ活性測定法について「カリクレイン・キニン」⁹⁾で解説しており, この中で合成基質を用いた測定法が数多く紹介されているが, 生体成分中には類似の酵素が存在することから, 単一で最適と評価し得る同定法, 分析法はなくケース・バイ・ケースで測定法を使い分け, できるだけ多角的に検討する必要があると述べている。HPLC-ポストカラム分析は, 分析カラムと合成基質を種々組み合わせることによって多彩な定性解析が可能であると同時に定量的解析も十分可能であるという点ですぐれているが, この場合も, どの酵素活性を指標とするかによって評価が変わることは十分に考えられる。今回著者らが選択した試験方法においては, カリジノゲナーゼの純度やキモトリプシン等の夾雑酵素の含有量は製剤間でかなり異なるという結果であった。

今回の試験結果から, 新しい統一規格により製造, 発売されたカリジノゲナーゼ製剤の品質は一定のレベルに達しているものの, 各製薬メーカーが何を指標として原体を精製しているかによって, カリジノゲナーゼの純度や安定性など品質にかなりの違いが生じているものと考えられる。

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, 56-61 (1978).
- 2) 宮田一好, 久次米敏秀, 二宮昌樹, 福岡憲泰, 水口和生, 高杉益充, 基礎と臨床, 17, 825-830

- (1983).
- 3) 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, 病院薬学, **13**, 168-171 (1987).
 - 4) 鈴木吉成, 姉崎 健, 川影逸郎, 藤井喜一郎, 病院薬学, **14**, 70-73 (1988).
 - 5) E.C.Toren, Jr. and D.N.Vacik, *Anal. Chim. Acta*, **152**, 1-11 (1983).
 - 6) V.F. Fiedler and E. Werle, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1087-1089 (1967).
 - 7) J.E. Folk and E.W. Schirmer, *J. Biol. Chem.*, **240**, 181-192 (1965).
 - 8) J.E. Folk and P.W. Cole, *J. Biol. Chem.*, **240**, 193-197 (1965).
 - 9) 守屋 寛, 阿部圭志編, “カリクレイン・キニン”, 講談社, 東京, 1982, pp.202-245.