

ウロキナーゼ製剤の人工血栓溶解効果について

—Chandler's Loop 法による検討—

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

渋谷 泰代

伊賀 善郎

(昭和47年11月20日受付)

近年血栓症に対する線維素溶解酵素療法の普及につれて血栓溶解剤であるウロキナーゼの臨床使用が増加の傾向にある。現在市販のウロキナーゼ製剤としてはA, B2種の製品があり, これら製剤の活性評価に関して酵素学的検討が種々行なわれ, いくつかの報告がすでになされている^{1)~6)}。これらの報告をまとめると表1に示すようになり, 測定法および基質の種類, 試料濃度などの測定条件の違いによって評価は必ずしも一致しないが, ヒトフィブリンを基質とする測定法においてはA製品がB製品より高い力価を示す報告が多いようである。

そこで私どもは *in vitro* の系における線溶活性と *in vivo* における血栓溶解効果の間隙をうめる試みとして Chandler's loop 法^{7)~9)} による人工血栓に対する溶解効果について, A, B両製剤の線溶活性を比較検討した。このことはウロキナーゼ製剤の臨床使用に当たって必要なことと思われる。

実験材料および実験方法

I. 実験材料

1. ウロキナーゼ製剤

A社製品のウロキナーゼ製剤は1バイアルの表示力価5,000Ploug単位のもの (LotNO.311RE) を用いた。B社製品は単位表示の名称が記載されていないので1バイアルの表示力価に従い5,000単位 (Lot NO.B-079) を使用した。両製品とも1バイアル当り指定の溶解液2.5mlを加えて溶かしたのち, 0.1M磷酸緩衝液 (pH7.2) で希釈し, 表示力価として800, 400, 200, 150および50単位/mlの各濃度液を調製した。

なお, 本実験に使用したA製品 (Lot NO311RE) の力価は1バイアル当りヒトフィブリンを基質とする試験管法¹⁰⁾ では $5,548 \pm 283$ Ploug単位であり, ヒトフィブリンを基質とする平板法¹⁰⁾ では $5,950 \pm 300$ Ploug

表1. 各報告におけるA製品とB製品の力価比 (A/B)

試験管法		平板法		報告者
ヒト・フィブリン 基質	ウシ・フィブリン 基質	ヒト・フィブリン 基質	ウシ・フィブリン 基質	
2.1		2.6		山田(外) ¹⁾
2.3 ~ 2.7				山田(常) ²⁾
2.4				長沢 ³⁾
	2.3		1.03	岩崎 ⁴⁾
3.4	1.9	2.8	1.5	浅田 ⁵⁾
2.38	2.18	2.95	1.54	森本 ⁶⁾

Lytic activities of urokinase preparations on artificial thrombi *in vitro*.
Yasuyo Shibuya and Yoshiro Iga, Department of Pathophysiology (Prof. Yoriaki Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

単位で表示力価5,000Ploug単位より若干高い力価を示した。

一方B製品 (Lot NOB-079) は同一条件で測定した結果, 1バイアル当り試験管法で $1,980 \pm 94$ Ploug単位, 平板法では $3,716 \pm 324$ Ploug単位でありA製品より低い値を示した。本実験に使用したウロキナーゼ量は Ploug 単位によらず表示力価によっている。従って上記の結果は同一表示力価ではA製品の方が線溶解性は高く出る可能性がある。

2. 0.1M磷酸緩衝液 (pH7.2)

3. 3%塩化カルシウム溶液

4. Bouin 氏液

5. ヒトクエン酸塩加血液: 血液は抗凝固剤として3.8%クエン酸ナトリウム溶液を採血量の1/10使用して正常健康人の肘動脈からカニューレを用いてシリコン処理容器に採血したものを実験に使用した。使用血液のシリコン全血凝固時間¹¹⁾は22~24分(正常値20~30分), カルシウム再加凝固時間¹¹⁾は 109 ± 2.8 秒(正常値90~120秒), フィブリノーゲン量¹²⁾は280mg/dl plasma (正常値170~410mg/dl plasma)であった。

II. 実験方法

1. 人工血栓形成法¹³⁾: 人工的に血栓を作るための装置は Connerら⁷⁾ によって一部修飾された Chandler⁸⁾ の装置を使用した。本装置は血液の入ったループを80°の傾斜で1分間に12回転するように設計されている。

血栓の形成には, 外径0.5cm内径0.3cm長さ25.7cmのビニール管を使用し, これにヒトクエン酸塩加血液0.8mlを注入後3%塩化カルシウム溶液0.1mlを加えて管の両端を内径0.5cm長さ1.4cmのシリコン管で

接続してループとし, 本装置上に固定して37°Cで15分間回転して血栓の形成を完成させた。

2. 人工血栓溶解方法: 血栓形成後ウロキナーゼ溶液0.1mlを加えて37°Cで4時間回転して溶解せしめたのち, 生理食塩水を入れたシャーレ中にループの内容を流し出し, 血栓は軽く洗滌後 Bouin 氏液中で一夜固定後その湿重量を秤量し, コントロール血栓の重量に対する各試料血栓の重量減少を百分率で表わした。ウロキナーゼはループ内血液の最終濃度0(コントロール), 5, 10, 20, 40および80U/ml blood の6濃度について検討した。

実 験 結 果

I. 血栓形成におよぼすビニールチューブの洗滌処理効果の検討

使用するビニールチューブは洗滌の必要があるか, さらにシリコンコーティングの必要があるかどうかについて検討するため, 1) 無処理, 2) 中性洗剤洗滌, 3) シリクラード(水溶性シリコン)処理, 4) シリコンKS-96(油性)25倍希釈液処理, 5) シリコンKS-96 10倍希釈液処理の5種のチューブについて, 同一条件で血栓を作成して血栓重量, チューブ壁の状態を観察した。その結果, 中性洗剤洗滌チューブとKS-96 25倍希釈処理チューブが血栓生成率も良好であり, チューブ壁に微小凝塊も特っておらず血栓重量のパラッキも小さく良好な結果であったので, 中性洗剤処理チューブを使用することにした。なお表2に示すように, チューブ全体が固ってしまったもののうち無処理チューブのものは特に黒味があった部分があり, ここに凝塊がまず生成し, これがチューブ全体に広がったものと推定される。シリクラード処理のものは, 気泡

表2 血栓形成におよぼすチューブの処理効果

チューブの種類	無処理	中性洗剤 洗滌処理	シリクラード 処 理	KS-96, 25倍 稀 釈 液 処 理	KS-96, 10倍 稀 釈 液 処 理
血 栓 生 成 率	1/5	5%	2%	5%	3%
血栓重量(mg.)±S. D.	36.9	38.2±2.8	34.9±8.8	39.8±3.6	37.8±4.5
チューブ壁に凝塊が残っているもの	1/1	0%	2/2	0%	1/3
チューブ全体が固っているもの	4/5	0%	3/5	0%	2/5
汚れてチューブ全体が固ったと思われるもの	4/4	0%	0/3	0%	1/2
気泡でチューブ全体が固ったと思われるもの	0/4	0%	3/3	0%	1/2

がかなり入っておりそのためにチューブ全体が固まったものと推定された。気泡の入った理由としてはシリクラードの撓水率が高いためにループの回転中に気泡をかかえ込んだものと推定される。シリコン KS-96 10倍希釈液処理のものはシリコン濃度が高いためチューブ表面にシリコンが多く付着しており、表面が湿っており、シリコン処理後の乾燥中にゴミが付着していたためと推定される。

II. 血栓形成におよぼすインキュベーション時間の影響

血栓形成法としては、同一条件で血液に塩化カルシウム溶液を加えたのち一定時間インキュベーションを行なうが、この場合インキュベーション時間によって血栓重量はどのように変化するかについて検討した。その結果インキュベーション10分で血栓重量は最大値に達し、それ以上30分までインキュベーションを行なっても血栓重量が増加する傾向はみられなかった。したがってインキュベーション時間は15分として以下の実験を行なった。

III. ウロキナーゼ製剤の人工血栓溶解効果

上述の最適条件下で血栓を形成させたのち各濃度の

ウロキナーゼを添加し、A, B両製品の血栓溶解効果を比較した。なおウロキナーゼと血栓とのインキュベーション時間は、C. M. Ogstonら¹⁴⁾の報告から4時間を最適条件として選んだ。

考 察

試験管内の静止血液中で形成される血液塊は生体内の流動血液中で形成される血栓と構造的に異なっているが、Chandler's loop 法によって作成された人工血栓は in vivo で形成される血栓に構造が類似しているといわれている。

そこで今回ヒト血液を用いて Chandler's loop 法による人工血栓に対し、ウロキナーゼの溶解効果を比較検討した。この場合ウロキナーゼを作用させる血栓量にバラツキがなく、常に一定していることが溶解効果を判定する上で重要である。血栓生成条件を種々検討した結果、ループのビニールチューブを中性洗剤で十分洗滌することにより管壁に血液凝塊が付着することもなく満足すべき血栓が得られた。また10~30分の範囲でインキュベーション時間を一定にすることにより、かなり重さの均一な血栓が形成されることがわか

表3 血栓形成に及ぼすインキュベーション時間の影響 (3例実験)

インキュベーション時間	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	30
血栓重量平均値 (mg)	30.9	30.8	23.8	27.9	33.3	26.8	29.9	30.4
S. D.	5.3	6.8	6.8	4.0	4.5	1.8	3.9	4.2

図1 血栓形成に及ぼすインキュベーション時間の影響

(3例実験)

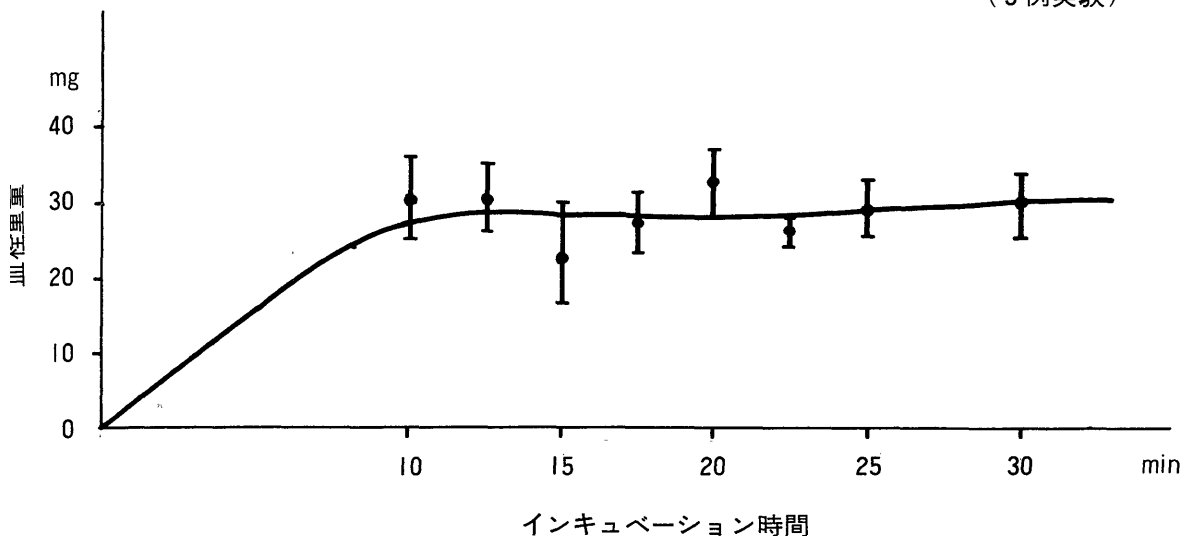
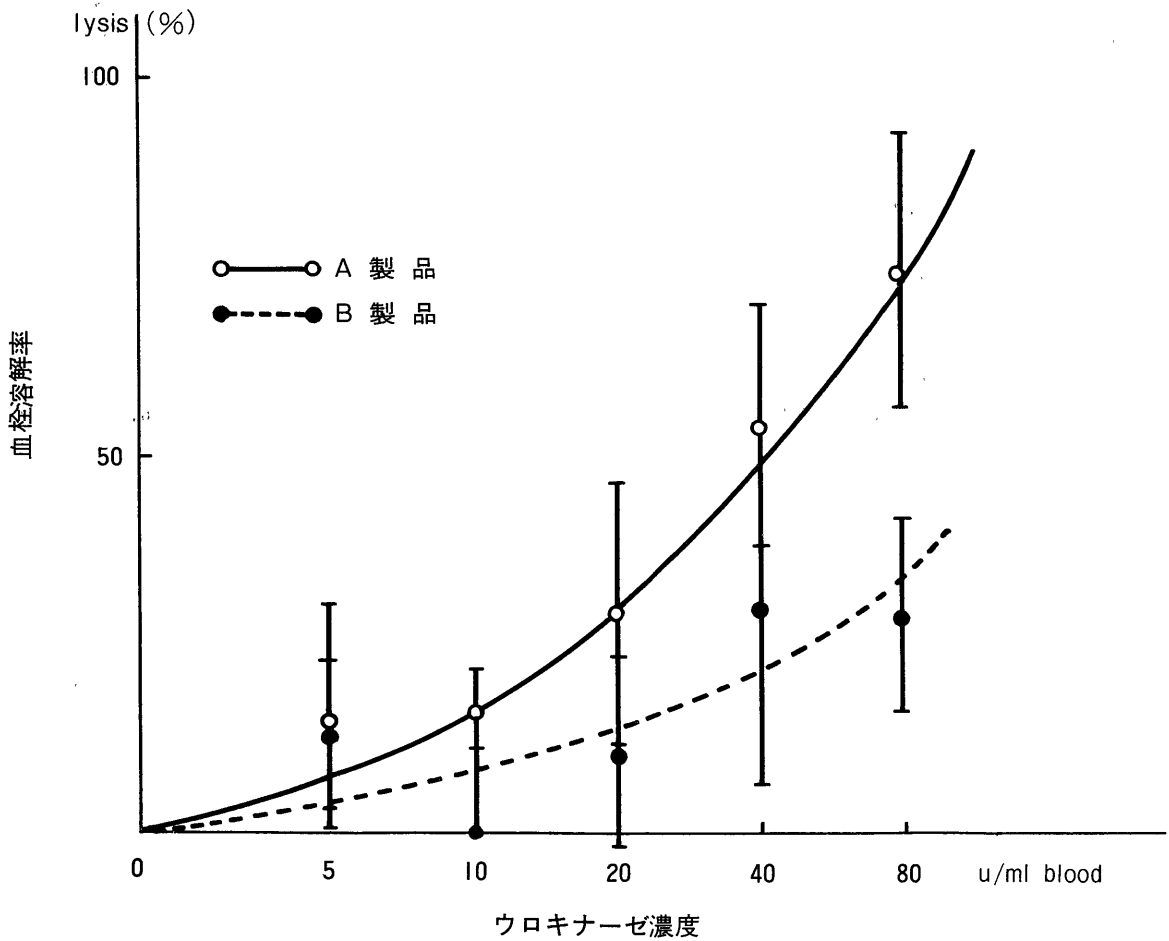


表4 ウロキナーゼ製剤の人工血栓溶解効果

(3例実験)

final conc. (u/ml blood)	A 製 品		B 製 品	
	血栓重量 (mg) ± S. D.	lysis (%) ± S. D.	血栓重量 (mg) ± S. D.	lysis (%) ± S. D.
0 (control)	39.5±2.9	0	39.5± 2.9	0
5	33.0±3.7	15.7±14.9	34.5± 6.4	13.2± 9.8
10	34.4±1.6	16.6± 5.4	42.5± 3.0	0
20	28.2±8.5	29.4±17.5	34.5± 7.8	10.8±12.9
40	14.4±5.8	54.5±16.1	27.8±12.0	30.0±23.7
80	9.6±6.2	74.8±18.4	28.0± 5.3	28.9±13.1

図2 ウロキナーゼ製剤の人工血栓溶解効果



った。

このようにして得た血栓に対しA, B2種のウロキナーゼを各表示力価に基き0~80単位/ml blood量作用させた。その結果いずれの濃度においてもA製品がBのそれより、より高い血栓溶解率を示した。こゝで用いた2種ウロキナーゼの *in vitro* に於ける力価は、既述の様に、試験管法、平板法のいずれの測定においてもA製品がB製品より高い力価を示したが、人工血栓溶解効果に於てもA製品の方が大きく、*in vitro* の力価と人工血栓溶解効果との間に関連性がみとめられた。

この様にA, B2種製品が異なる力価を示す原因について考察すると、両製品とも1バイアルの力価5,000と云う数値は等しいが、A製品はPloug単位、B製品は名称記載のない単位である点が相違しているの、両者の単位は等しい線溶活性を示すものではないと考えられ、それはまた両ウロキナーゼの純度や組成の相違、混在蛋白質などの質的相違や、安定剤などの添加物の影響によるものと考えられる。また、力価の差は試験管法と平板法と云う測定法の差によるよりも、基質の相違(ヒトまたはウシ)によってより大きく影響されることも(表1)、両製品の質的な相違を推定させる。ウロキナーゼの heterogeneity に関しても、いくつかの報告^{10) 15)} がなされており、これらのA, B両製品の力価の差が何に基づくものであるかを明らかにするためには、両製品の酵素蛋白質としての質的検討が行われる必要があると考えられる。

結 果

1. ウロキナーゼの人工血栓溶解作用を *in vitro* で測定する条件を検討し、A, B2種の製品について表示力価当りの血栓溶解率 (lysis %) を比較した。

2. A製品は20U/mlの濃度では29.4±17.5%, 80

U/mlでは74±18.4%であった。これに反しB製品では、それぞれ10.8±12.9%, 28.9±13.1%といずれも低値を示した。

3. これらの成績から、A製品20unitの血栓溶解効果は、B製品の80unitのそれとほぼ等しいことが示唆される。

文 献

- 1) 山田外春: Clin. Report, 5, 16 (1971).
- 2) 山田常雄: Clin. Report, 5, 1 (1971).
- 3) 長沢佳熊: 新薬と臨床, 20, 1307 (1971).
- 4) 岩崎由雄・沢井とし: 薬局, 23, 233 (1972).
- 5) 浅田 洸・掃部 巍・西村潤三: 月刊薬事, 14, 163 (1972).
- 6) 森本和郎: (直接通信)
- 7) Conner, W. E. & Poole, J. C. F.: Quart. J. Exp. Physiol., 46, 1 (1961).
- 8) Chandler, A. B.: Lab. Invest., 7, 110 (1958).
- 9) Suyama, T., Odashima, S., Iga, Y & Shibuya, Y.: Kobe J. Med. Sci., 15, 137 (1969).
- 10) Ploug, J. & Kjeldgaard, N. O.: Biochim. Biophys. Acta., 24, 278 (1957).
- 11) 金井 泉: 臨床検査法提要, VI-80, 東京, 金原出版, 1970.
- 12) Clauss, A.: Acta Haemat., 17, 237 (1957).
- 13) 伊賀善郎・北川 勉・小高洋平・渡辺正弘・須山忠和: 基礎と臨, 6, 163 (1972).
- 14) Ogston, C. M., Ogston, D. & Fullerton, H. W.: Thromb. Diath. Haemorrh., 19, 107 (1968).
- 15) White, W. F., Barlow, G. H. & Milton, M. M.: Biochemistry, 5, 2160 (1966).

Abstract

An attempt was made on urokinase preparations to determine the experimental condition of dissolving the artificial thrombi in vitro. Based on this defined condition, comparison was made on two different products of urokinase, "Product-A" and "Product-B", in their lytic activities on artificial thrombi.

For this purpose, artificial thrombi formed inside the "Chandler's loop" were incubated at 37°C for 4 hrs. in the circulating blood, to which each urokinase product was added in the concentration ranging from 5 to 80 unit/ml according to the label-indicated potency* of each product "A" or "B".

Result showed that the lysis of artificial thrombi by 20 unit/ml of urokinase was $29.4 \pm 17.5\%$ in "Product-A" and $10.8 \pm 12.9\%$ in "Product-B". When 80 unit/ml of each product was added, the lysis % was found to be $74.8 \pm 18.4\%$ in "Product-A" and $28.9 \pm 13.1\%$ in "Product-B", respectively.

It is suggested from these data that thrombolytic effect of 20 unit of "Product-A" is equivalent to that of 80 unit of "Product-B". This difference seems to be critically important when urokinase product is used in the treatment of thrombo-embolic disorder.
