

国立医薬品食品衛生研究所ウリナスタチン標準品 (Control 971)

前川 京子・谷本 剛[#]・岡田 敏史

Ulinastatin Reference Standard (control 971) of the National Institute of Health Sciences

Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto[#] and Satoshi Okada

The "Ulinastatin Reference Standard (control 971)" of National Institute of Health Sciences was prepared. The standard material was evaluated in collaboration with one domestic laboratory, and the potency of trypsin inhibiting activity was determined to be 3, 100 units/vial by relative assay method against the Ulinastatin Reference Standard (control 942). Other analytical data obtained were as follows: UV maximum absorption was observed at 277 nm, and the molecular weight was estimated to be about 66, 300 by gel filtration method. Maximum variance of material contents in 10 vials was 2.29%.

Based on the above results, this standard material was authorized to be the "Ulinastatin Reference Standard (control 971)" of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: ulinastatin, NIHS Reference Standard, quality evaluation
(Received May 30, 1997)

ウリナスタチンは、ヒト尿からイオン交換クロマト法などで分離精製された分子量67,000の糖たん白質であり、トリプシン阻害活性を有し、急性及び慢性再発性膵炎や各種ショックによる急性循環不全の治療に点滴用静脈注射剤として用いられる。ウリナスタチン原薬とその製剤の定量用に用いる国立衛生試験所ウリナスタチン標準品 (control 971) を製造したので、その結果を報告する。

実験材料および実験方法

1. 候補標準品の作製

本標準品原料はヒト尿から分離精製し、比活性3,000単位/mg以上の画分を集めたものであり、ゼラチンを加え、バイアル中に約3,000単位ずつ小分け充填し、凍結乾燥品として調製した。この調整品を候補標準品とし、保存は-20℃で行った。本品の作製は持田製薬株式会社に依頼して行った。

2. 試薬・試液

N- α -ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩および結晶トリプシンはSigma社から購入した。その他の試薬類はJIS特級品または特級相当品を用いた。

3. 重量偏差試験

日周一般試験法、重量偏差試験法の注射剤の項に従って試験した。

4. 紫外吸収スペクトル

候補標準品1バイアルの内容物を水に溶かし、表示単位に従い、その1 ml中に約2,000単位を含むように調製し、紫外吸収スペクトルを測定した。

5. 分子量測定

リン酸緩衝液 (pH7.5) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.6 x 100 cm) を用いて、Andrewsの方法¹⁾に従って分子量を測定した。分子量標準にはウシ血清アルブミン (M.W.: 67,000)、卵白アルブミン (M.W.: 45,000)、キモトリプシノーゲンA (M.W.: 25,000)、ブルーデキストラン (M.W.: 2,000,000) を用いた。試料溶液は、候補標準品を1%塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶かし、その1 ml中に10,000単位を含むように調製した。

6. ウリナスタチンのトリプシン阻害活性 (力価) 測定法

候補標準品の力価をウリナスタチン標準品 (control 942)²⁾ を対照として測定した。

(1) 試料溶液 候補標準品1バイアルをとり、pH7.8のトリエタノールアミン (TEA) 緩衝液5 mlを正確に加えて溶かす。この液の適量を取り、TEA緩衝液を加えて2, 3, 4及び6倍に希釈した液をそれぞれ試料溶液1, 2, 3及び4とする。また、ウリナスタチンを含まないTEA緩衝液を試料溶液5とする。

(2) 標準溶液 ウリナスタチン標準品 (control 942) 1バイアルをとり、試料溶液と同様に操作し、標準溶液1,

[#] To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533 ext. 51; Fax: 06-942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

2, 3, 4とする。またウリナスタチンを含まない TEA 緩衝液を標準溶液 5 とする。

(3) トリプシン溶液 結晶トリプシン (比活性約 3400 ~ 3600 単位/mg) の適量を精密に量り, 1 mM 塩化カルシウムを含む 0.001 N 塩酸試液を加えて溶かし, 180 µg/ml となるよう調製する。用時調製し, 氷冷して保存する。

(4) 基質溶液 N-α-ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 0.1 g を水に溶かし, 100 ml とする。

(5) 操作法 試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 の 0.1 ml をそれぞれ試験管に正確に量り, あらかじめ 25 ± 0.1°C に保温した TEA 緩衝液 1.6 ml を正確に加えて振り混ぜ, 25 ± 0.1°C の恒温槽に入れる。1 分後, それぞれの試験管に氷冷していたトリプシン溶液 0.2 ml を正確に加えて振り混ぜ, 再び恒温槽に戻し, さらに 1 分後に基質溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜる。2 分後, それぞれの試験管に薄めた酢酸 (1 → 2) 0.1 ml を正確に加えて振り混ぜ, 試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 とする。別に, 試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 の 0.1 ml をそれぞれ試験管に正確に量り, あらかじめ 25 ± 0.1°C に保温した TEA 緩衝液 1.6 ml を正確に加えて振り混ぜ, 25 ± 0.1°C の恒温槽に入れる。1 分後に薄めた酢酸 (1 → 2) 0.1 ml を正確に加えて振り混ぜた後, 氷冷していたトリプシン溶液 0.2 ml を正確に加えて振り混ぜ, 再び恒温槽に戻し, さらに 1 分後に基質溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜ, 対照液 1, 2, 3, 4 及び 5 とする。試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 の波長 405 nm における吸光度 A1, A2, A3, A4 及び A5 をそれぞれの対照液を対照として測定する。試料溶液 1, 2, 3 及び 4 の希釈倍数の逆数を横軸に, 吸光度を縦軸にとり, 用量-反応直線を作成する。また標準溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 を用いて同様に操作し, 標準用量-反応直線を作成する。これらの直線から, ウリナスタチンを含まない溶液 5 の吸光度の 1/2 の吸光度を示す試料溶液および標準溶液の希釈倍数を求め, 次式²⁾により候補標準品およびウリナスタチン標準品 1 バイアル中の単位を算出する。

$$\text{1 バイアル中のウリナスタチン単位} = \frac{M \times 0.2 \times DN}{V \times 2 \times 0.1} \times 5 \times 1.68$$

M: 結晶トリプシンの採取量 (µg)

V: 結晶トリプシンの溶解液量 (ml)

DN: ウリナスタチンを含まない溶液の吸光度の 1/2 の吸光度を示す試料溶液または標準溶液の希釈倍数

結果および考察

1. 紫外吸収スペクトル

紫外吸収スペクトルの一例を Fig. 1 に示した。候補標準品は 277 nm に吸収の極大を示した。

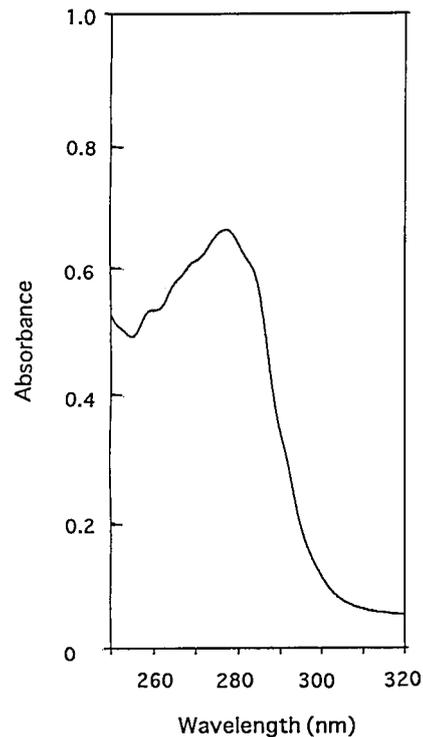


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of ulinastatin for NIHS Reference Standard

2. 分子量試験

ゲルろ過法で測定した候補標準品のウリナスタチンの分子量は約 66,300 であった。

3. 重量偏差試験

本品のバイアル中への充填の均一性が確保されていることを確認するために, 内容物の重量偏差試験を行った。10 バイアルの平均充填量は 0.00568 g で, 最大偏差は 2.29% であった。この結果から, バイアル中の内容物重量は十分に管理されているものと判断された。

4. 力価測定

ウリナスタチン標準品 (3,500 単位/バイアル) を対照として求めた候補標準品 1 バイアル当たりの力価を Table 1 に示した。2 機関での共同検定で測定した 17 回の力価の平均値は 3,088 ± 118 単位/バイアルであった。この結果から, ウリナスタチン候補標準品 1 バイアル中に含まれるウリナスタチン力価を 3,100 単位と決定した。

結 論

ヒト尿から精製したウリナスタチンをバイアル中に小分け・充填し, 凍結乾燥したものをウリナスタチン候補標準品とし, その含有力価を 2 機関で共同検定し, 1 バイアル中 3,100 単位のウリナスタチンを含有するものと認定した。また, 本候補標準品の充填変動は最大偏差が 2.29% であり, バイアル間の内容物重量は十分に管理されているも

Table 1. Determination of ulinastatin potency

Laboratory	Exp.	Potency of ulinastatin for NIHS Reference Standard (unit/vial)
A	1	3065
	2	2945
	3	2826
	4	3136
	5	3039
	6	2975
	7	2972
B	1	3133
	2	3297
	3	3080
	4	3073
	5	3247
	6	3133
	7	3043
	8	3150
	9	3187
	10	3203
mean ± SD		3088 ± 118

のと判断された。以上のことから、本候補標準品を国立医薬品食品衛生研究所ウリナスタチン標準品 (control 971) とした。

謝 辞

本候補標準品の調製並びに力価測定等の共同検定に参加していただきました持田製薬株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964)
- 2) 前川京子, 谷本 剛, 岡田敏史: 国立衛生試験所ウリナスタチン標準品 (control 941), 衛生試報, **113**, 127~130 (1995)