

共存による urokinase, thio-TEPA の薬剤安定性の検討

金沢大学医学部泌尿器科学教室（主任：黒田恭一教授）

久 住 治 男

三 崎 俊 光

CROSS EFFECTS OF UROKINASE AND
THIO-TEPA ON THEIR STABILITIES

Haruo HISAZUMI and Toshimitsu MISAKI

*From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University**(Director: Prof. K. Kuroda, M. D.)*

In order to obtain a more adequate therapeutic effect of thio-TEPA for the prevention of recurrence of bladder cancer, the authors have used the combined vesical instillation of urokinase.

Herein, cross effects of urokinase and thio-TEPA on their stabilities have been studied *in vitro*. Urokinase and thio-TEPA showed no deteriorating effect each other under some mixing conditions resembling closely the practical administration. Macrogol 400 which is contained in Tespamin®, a stabilizer for thio-TEPA, increased urokinase activity in a fibrin plate assay system.

緒 言

膀胱癌は多中心性再発の傾向が強く、したがってその再発率は5年以内に70%前後の高率におよび¹⁻⁴⁾、本症治療上再発防止対策の重要性がとくに強調されている。この目的に沿って従来より種々の方法、たとえば放射線照射、放射性物質の膀胱内注入、 β -glucuronidase inhibitorの投与、全身的癌化学療法、抗腫瘍剤の膀胱内注入などがおこなわれてきた。これらの方法によりかなりの再発防止効果が得られているが、なおいっそうこの方面の改善が望まれているのが現状である。すでに報告したごとく^{5,6)}、当教室においては1968年以来、thio-TEPA 40 mg (Tespamin® 注射液、住友化学工業株式会社、大阪)、urokinase 5,000 Ploug units (株式会社、ミドリ十字、大阪)の膀胱内併用注入療法により、膀胱腫瘍術後の再発防止効果の向上をはかり、従来当教室でおこなってきた thio-TEPA 単独注入療法に比して、36ヵ月間再発率7.3% (actuarial method による算定)と有意の低下をみる事ができた。

urokinase, thio-TEPA 併用注入療法の発想は、当教室における膀胱癌線溶系の研究成績に基づくもので、

その意義は前論文⁵⁾においてすでに述べたので、ここでは省略する。

この論文においては、この併用注入療法の実施に当って、urokinase と thio-TEPA の共存による両薬剤の安定性について検討した成績について報告する。

thio-TEPA は溶解した場合、酸性側で不安定であるため、商品としては安定剤として Macrogol 400 (polyethylene glycol 400) に溶解され、Tespamin® 注射液として発売されているので、われわれはこれを臨床的に用いるとともに、ここでは thio-TEPA 純末、Tespamin® の両者について検討した。なお臨床的には Macrogol 400 に溶解されている Tespamin® は使用時添付蒸留水にて4倍に希釈し、その40 mg (16 ml) に urokinase 5,000 Ploug units を蒸留水4 ml に溶解して混合し(計20 ml)、この混合液を膀胱内を空虚にした後、ネラトンカテーテルを用いて注入し、2時間後に排尿せしめた。後述の実験はこの薬剤配合の状態に準じて実施した。

実験方法および実験材料

1. fibrinogen: bovine plasminogen-rich fibrinogen (Armour Pharmaceutical Co., Kankakee,

III.) を 0.25% の濃度に borate saline buffer (pH 7.8) を用いて溶解し、後述の fibrin plate の作製に供した。

2. thrombin: bovine thrombin (Thrombin Topical®, Parke Davis and Co., Detroit, Mich.) を生理的食塩水にて 20 NIH units/ml の濃度に溶解して用いた。

3. thio-TEPA: 住友化学工業株式会社の厚意により提供された thio-TEPA 純末、および同社より商品として発売の Trespamin® をそれぞれ実験目的に応じて蒸留水に溶解して用いた。

4. urokinase: Urokinase® (株式会社, ミドリ十字, 大阪) 5,000 Ploug units を 4 ml の蒸留水, あるいは生理的食塩水に溶解して -20°C に保存し, 必要に応じて適宜希釈して用いた。

5. fibrin plate: すでに報告したごとく, 上記 0.25% fibrinogen 液 8 ml を直径 8.5 cm のシャー

レに分注し, 上記 thrombin 液 0.2 ml を手早く, 均等に混和して fibrin plate を作製した。

6. thio-TEPA 測定法: Tan and Cole (1965)⁸⁾ により報告された方法に準拠して, γ -(4-nitrobenzyl) pyridine を用いて測定をおこなった。

実験成績

1. urokinase 共存下における thio-TEPA の安定性
thio-TEPA 純末は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.6) にて $1\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解し, urokinase は蒸留水にて 20 Ploug units/ml の濃度とした。この urokinase 溶液の倍々希釈系列を 16 倍まで, 2 シリーズ作製し, この各溶液に上述の thio-TEPA 溶液を等量混和した。1 シリーズは混和直後に, 他のシリーズは 37°C , 30 分 incubation 後直ちに氷冷し, 各溶液の thio-TEPA 量を定量した。thio-TEPA 量は便宜上 OD 540 $m\mu$ で示し, 対照には urokinase の代りにリン

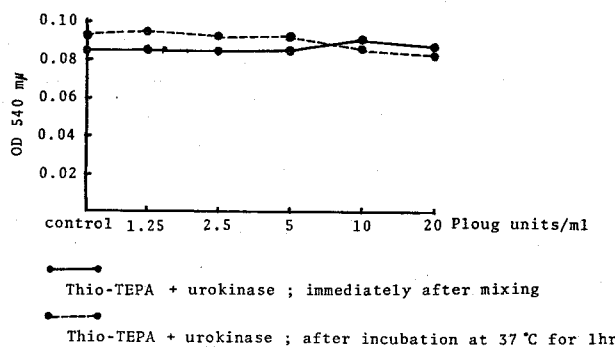


Fig. 1. Effect of urokinase on thio-TEPA stability.

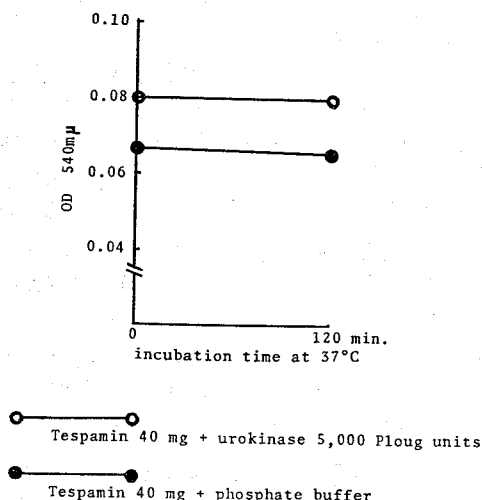


Fig. 2. Effect of urokinase on Trespamin® stability.

酸緩衝液を用いた。Fig. 1 に示すごとく, urokinase 濃度の変動に伴う thio-TEPA 値の変化は認められず, またいずれの測定値も対照に比して低下は認められなかった。また 37°C , 30 分 incubation の影響も認められなかった。ここで用いられた条件下では thio-TEPA はきわめて良好な安定性を示した。なおこの実験系で用いた urokinase 量は, われわれが臨床的に用いた urokinase 量の 160 倍に相当するもので, urokinase は thio-TEPA の安定性に影響を与えないものと考えられた。

2. urokinase 共存下における Trespamin® の安定性
安定剤 Macrogol 400 に溶解された Trespamin® の安定性に対する urokinase の影響は, 上記実験成績から当然予想されたが, 念のため実験 1 と同様の方法で検討された。われわれが臨床的に用いた Trespamin® 40 mg, Urokinase® 5,000 Ploug units の混

合液の pH は 7.6~7.8 の間にあり、urokinase に対しても望ましい pH で、対照には pH 7.8 の M/15 リン酸緩衝液を使用した。Fig. 2 のごとく urokinase 混合液、対照ともに 37°C、120 分 incubation による Tespamin® 値の変動は認められず、この実験系における urokinase は Tespamin® の安定性に影響をおよぼさないものと考えられた。

3. thio-TEPA 共存下における urokinase 活性の安定性

thio-TEPA 純末を用いて 0.1 mg/ml 水溶液を作り、この 32 倍までの倍々希釈系列に対し、urokinase 6 Ploug units/ml の溶液を等量に混合し、これらを fibrin plate 上に 0.03 ml あて triplicate に滴下し、37°C、5 時間 incubation 後各検体の線溶活性を測定した。線溶活性は fibrin 膜の溶解窓の長径×短径 (mm²) にて表示した。Fig. 3 に示すごとく、対照 (M/15 リン酸緩衝液 pH 7.6) に比し、各検体の urokinase 活性には有意の変動は認められなかった。こ

の実験系で用いられた urokinase に対する thio-TEPA の量は、臨床的に使用した場合の約 2 倍に相当するもので、fibrin plate 法による検討では thio-TEPA は urokinase 活性に影響を与えないものと解釈された。

4. Tespamin® 共存下における urokinase 活性の安定性

前述のごとく臨床的には Tespamin® を用いており、本剤は添付蒸留水にて 4 倍に希釈のうえ urokinase 溶液と混合されたので、安定剤 Macrogol 400 は最終的に 5 倍に希釈されることになる。このような条件を考慮に入れて検討をおこなった。すなわち Tespamin® の 2.5 mg/ml 溶液を 8 倍まで倍々希釈し、これらに対し urokinase 1,250 Ploug units/ml を等量混合し、直ちに各検体 0.03 ml を triplicate に fibrin plate 上に滴下し、37°C、5 時間 incubation し、それぞれの線溶活性を測定した。Fig. 4 に示すごとく、Tespamin® 8~1 倍希釈まで、対照に比して線溶活

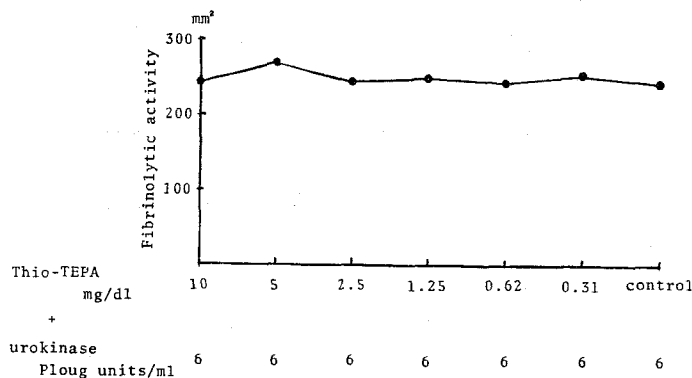
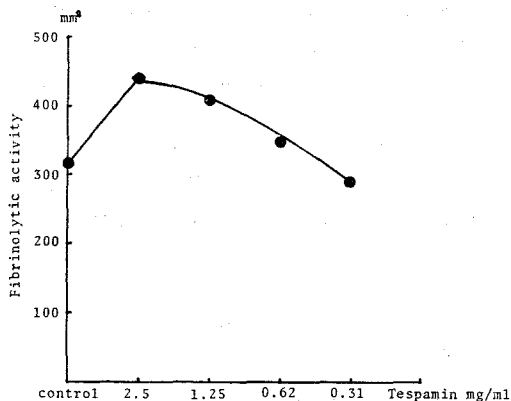


Fig. 3. Effect of thio-TEPA on urokinase activity.



Tespamin 1 ml + urokinase 0.25 ml (312 Ploug units)

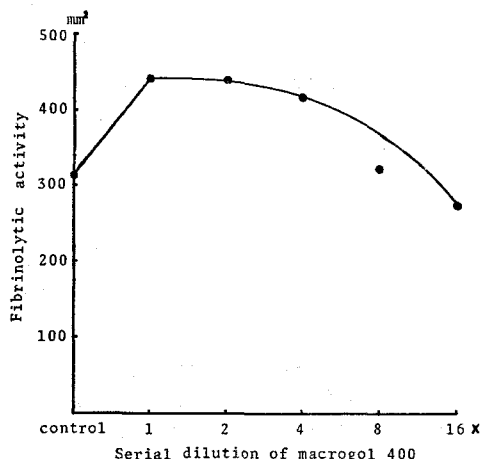
Fig. 4. Effect of Tespamin® on urokinase activity.

性は漸次増強し、Tespamin® 濃度の上昇と線溶活性の上昇との間に有意の相関が認められた ($r=0.9224$)。

以上の成績を thio-TEPA 純末を用いた実験成績と比較すると、Tespamin® 中に含まれている Macrogol 400 の線溶活性に対する影響が推定されるので次の実験をおこなった。

5. Macrogol 400 共存下における urokinase 活性の安定性

Tespamin® 中に含有されている Macrogol 400 の濃度に一致するように、Macrogol 400 (和光純薬) を M/15 リン酸緩衝液、pH 7.6 にて 4 倍に希釈し、これをさらに 16 倍まで倍々希釈し、それぞれの希釈液 1 ml に対し、臨床的に用いた場合と同じ比率で urokinase 0.25 ml (312.5 Ploug units) を混和した。これらの混合液を直ちに 0.03 ml あて triplicate に



macroglol 400 solution 1 ml + urokinase 0.25 ml (312 Ploug units)

Fig. 5. Effect of Macroglol 400 on urokinase activity.

fibrin plate 上に滴下し、37°C、5時間 incubation し、線溶活性を測定した。対照にはリン酸緩衝液を用いた。Fig. 5 のごとく、各検体の線溶活性の変動は Tespamin® の場合と同様で、Macroglol 400 の濃度上昇とともに線溶活性は対照に比して上昇傾向が認められた。したがって Tespamin® 使用の場合の urokinase 活性の亢進は、Tespamin® 中に含まれる Macroglol 400 の影響と推定された。

Macroglol 400 単独では fibrin plate 上線溶活性は 37°C、6時間の incubation において認められなかった。

考 察

urokinase はヒトまたは動物の尿中に存在する plasminogen activator として Sobel et al. (1952)⁹⁾ により発見され、現在では医療薬品として用いられるまでに純化され、その性状も比較的明確にされた線溶系物質の1つである。urokinase は比較的安定性の高いもので、pH 1~10、50°C において安定で、酸性側ではさらに高温でも安定で、pH 7.25、80°C の加温でも50%が破壊されるのみである¹⁰⁾。

Sgouris et al. (1960)¹¹⁾ は pH 6.7、60°C、10時間の処理で、0.01Mリン酸緩衝液加0.3M食塩水中では25~35%が破壊されるにすぎないと報告している。

thio-TEPA は比較的不安定な薬剤で、商品としては Macroglol 400 に溶解し、溶液として安定な状態で発売されている。thio-TEPA は蒸留水に溶解された場合、0~4°C の低温で3週間安定とされている⁹⁾。thio-TEPA の安定性に対する尿 pH の影響は Cole

et al. (1965)¹²⁾ により検討されている。かれらは *in vitro* の実験において、尿の pH を5~7.5の間に調整し、37°C、20分間 incubation し、酸性側においてきわめて不安定であるが、pH 7.5 のアルカリ性尿中では約20%が破壊されたと述べている。またイヌに sodium lactate を投与して尿 pH を8.0までアルカリ化したうえで、thio-TEPA を膀胱内に注入すると、正常イヌ(尿 pH 6.0)に比してきわめて安定性が高く、一方、血中への移行量も高いことを認めている。したがって thio-TEPA 膀胱内注入前に、尿のアルカリ化をはかることは膀胱癌治療の目的からも重要な因子になることを提唱している。以上の thio-TEPA の安定性から考えて、安定剤に溶解されている Tespamin® の臨床的応用は、治療効果の面でも安定した結果が得られるものと考えられる。

この論文では urokinase と thio-TEPA 併用における、両薬剤の安定性について相互作用を検討したが、*in vitro* の実験系ではいずれの活性も低下を示さなかった。なお urokinase 活性に関しては Tespamin® 中の Macroglol 400 がその活性増強効果を有すると思われる成績が得られたが、その詳細は不明である。

以上の成績に基づき、かつ両剤混合時の pH が7.6~7.8の間にあることは thio-TEPA の安定性のうえからも、urokinase 活性発揮の面からも望ましいもので、両剤併用時における薬剤の相殺効果は考えられないとの結論に達した。

結 語

膀胱癌再発防止法としてわれわれは urokinase と

thio-TEPA の膀胱内 併用 注入法 の 実施に 当り, *in vitro* において 両薬剤間に その 活性の 相殺作用の ない ことを 確認した. なお Tespamin® 中の 安定剤 Macrogol 400 には urokinase 活性 増強効果 を 有する の ではないかと 考えられる 結果を得た.

撰筆するに 当り 恩師 黒田 恭一 教授の 御指導, 御校閲を 深謝 します.

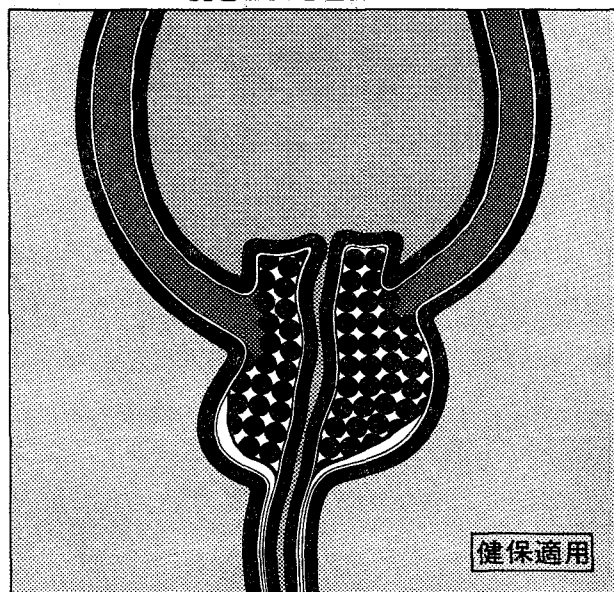
文 献

- 1) 市川 篤二: 日泌尿会誌, **49**: 602, 1958.
- 2) 武田 正雄: 日泌尿会誌, **48**: 325, 1957.
- 3) 楠 隆光: 日泌尿会誌, **49**: 591, 1958.
- 4) 尾関 全彦・ほか: 臨泌, **23**: 475, 1969.
- 5) Hisazumi, H. et al.: J. Urol., in press.

- 6) 久住 治男・ほか: 第63回日本泌尿器科学会総会予稿集, 37頁, 1965.
- 7) Hisazumi, H.: Invest. Urol., **7**: 410, 1970.
- 8) Tan, Y. L. and Cole, D. R.: Clin. Chem., **11**: 58, 1965.
- 9) Sobel, G. W. et al.: Am. J. Physiol., **171**: 768, 1952.
- 10) Celander, D. R. and Guest, M. M.: Am. J. Cardiol., **6**: 409, 1960.
- 11) Sgouris, J. T. et al.: Am. J. Cardiol., **6**: 406, 1960.
- 12) Cole, D. R. et al.: J. Urol., **94**: 556, 1965.

(1975年6月30日受付)

ROBAVERON®



前立腺肥大症に伴う排尿障害の
治療に!

ロバベロン

前立腺肥大症治療剤

ロバベロンは性ホルモンおよび蛋白質を含まない成熟豚前立腺抽出物の水溶性注射剤です。

適 応 症 前立腺肥大症による排尿困難、頻尿、尿線細少、排尿痛、残尿および残尿感。

包 装 1 ml×10 アンプル

使用上の注意 説明書を参照下さい。



輸入発売元

日本商事株式会社
大阪市東区石町2丁目30番地

製 造 元

ロバファルム社
(スイス・バーゼル)