



SEPARATION REPORT

「TSK-GELによるウロキナーゼの分離」

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. ウロキナーゼ分離用HPLCシステム	1
3. ウロキナーゼの分離	2
(1) イオン交換クロマトグラフィによる分離	2
(2) ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィによる分離	3
(3) 疎水クロマトグラフィによる分離	3
4. おわりに	5

1. はじめに

ウロキナーゼ(UK)は血栓溶解酵素の1つであり、プラスミノゲンをプラスミンに変換します。そのためこの酵素は血栓症に対する臨床応用として使用されるほか、抗癌併用剤としても大量に使用されています。UKは分子量54,000の高分子量型(H-UK)および分子量33,000の低分子量型(L-UK)からなり、酵素活性が異なることが報告されています。またUK製剤の製造元により製剤中のH-UKとL-UKの混合比が異なり、薬効(酵素活性)が異なる可能性が示唆されています。したがってH-UKとL-UKの定量が重要な問題となっています。

UKのHPLCを用いた定量法としては、ゲルろ過クロマトグラフィ(GFC)を用いて良好な結果が得られています。^{1),2)}しかしGFCにおいてはH-UKがカラムから遅れて溶出し、L-UKとうまく分離ができないという知見もあります。また検出には紫外吸収(UV)検出法を用いているため感度が低く、クロマトグラフィに大量の試料を使用しなければならないこと、さらに夾雑タンパク質や製剤中に賦活剤として添加されるアルブミン(分子量67,000)によりUKの検出が困難になるという欠点があります。

本レポートでは、このような欠点を克服するため、より高い分離能をもつ分離モードとしてイオン交換クロマトグラフィ(IEC)、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ(HAC)、疎水クロマトグラフィ(HIC)を検討しましたので報告いたします。

2. ウロキナーゼ分離用HPLCシステム

ウロキナーゼ分離用HPLCシステムの概略図を図-1に示します。UKの検出には、照井³⁾のポストカラムリアクションによる検出法を用いました。カラムからの溶出液は、流速0.75ml/minでポンプから送液される基質溶液[0.02mM Glt-Gly-Arg-MCA in 20mM Tris-HCl (pH8.5) containing 0.5M NaCl]と混合され、リアクションコイル(内径0.25mm、長さ1.5m)中で、25°Cで反応させます。UKにより分解された基質は、7-アミノ-4-メチルクマリンを遊離し、これを蛍光検出(励起波長365nm、蛍光波長460nm)しました。

蛍光反応スキーム

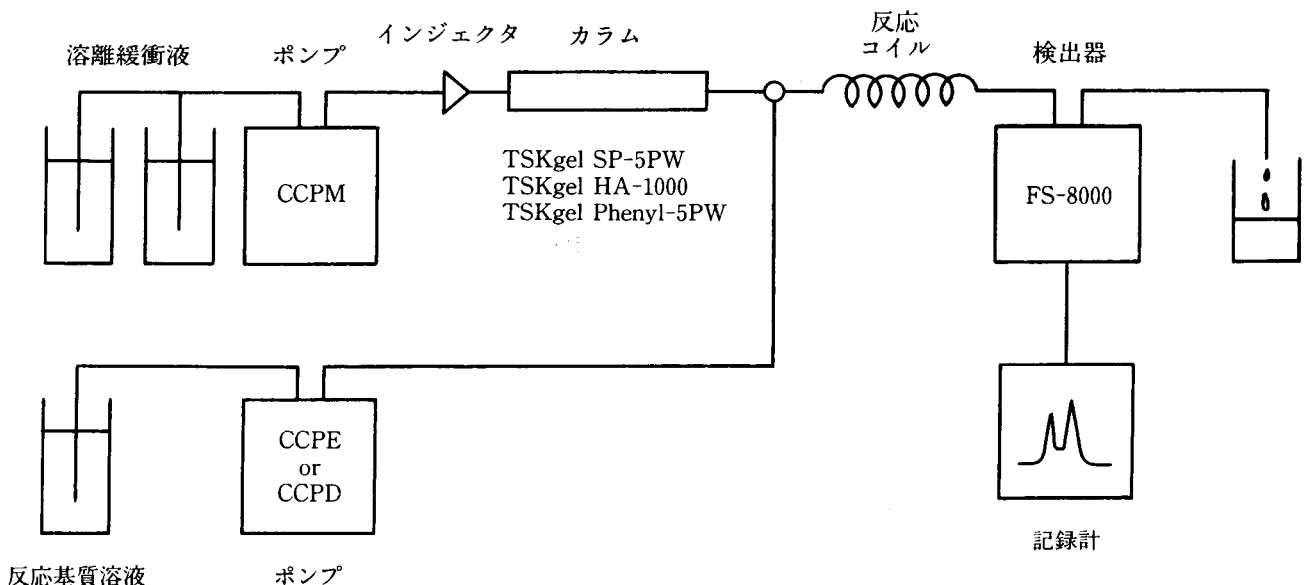
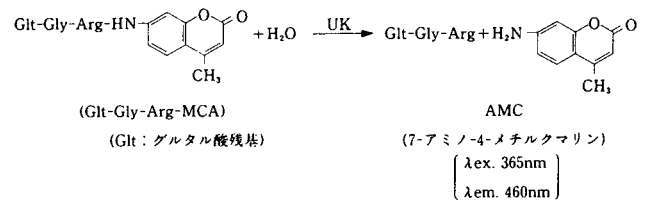


図-1 ウロキナーゼ分離用HPLCシステム

3. ウロキナーゼの分離

(1)イオン交換クロマトグラフィ(IEC)による分離

図-2にTSKgel SP-5PWによるUKの分離を示します。L-UK、H-UKともにカラムに吸着する成分と未吸着の成分が見られます。吸着成分についてはL-UKとH-UKは異なる位置に溶出され、ほぼ完全に分離することがわかります。吸着成分は単一成分ではなく複数の成分からなることがわかります。未吸着成分については詳しいことはわかりませんが、UKは陰イオン交換体TSKgel DEAE-5PWにも吸着されるので、酸性側に等電点をもつ成分があるのかもしれませんが。活性回収率はL-UK、H-UKともに90%以上でした。

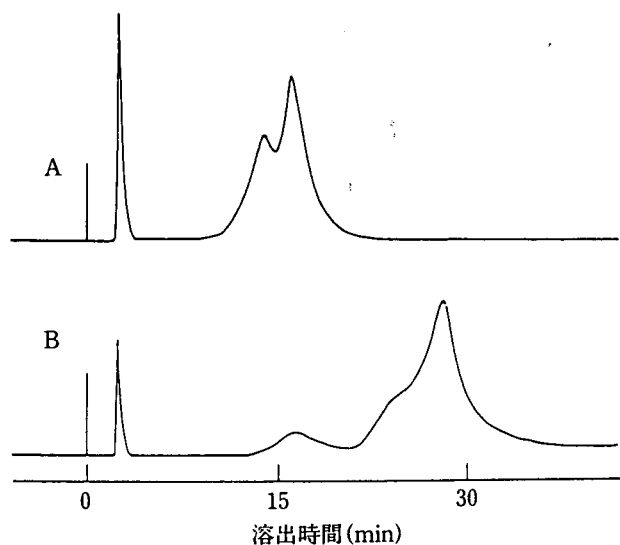


図-2 IECによるウロキナーゼの分離

カラム；TSKgel SP-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：20mM リン酸緩衝液(pH6)

B：A+0.5M NaCl

A→Bリニアグラジエント(30分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；ポストカラムリアクション、条件は本文中に記載

試料；A：低分子量型ウロキナーゼ

B：高分子量型ウロキナーゼ

(2)ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ(HAC)による分離

図-3にTSKgel HA-1000によるUKの分離を示します。L-UK、H-UKともにカラムに吸着し、ほぼ完全に異なる溶出位置に溶出しました。L-UKの溶出パターンはIECのものに似ていますが、HACでは鋭いピークが2本見られました。またH-UK試料中には微量のL-UKが含まれていることがわかります。L-UK、H-UKともに活性回収率は90%以上でした。

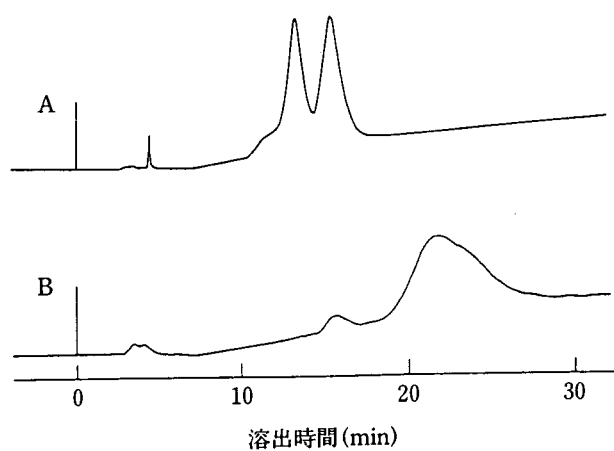


図-3 HACによるウロキナーゼの分離

カラム；TSKgel HA-1000

(6mmID×1.0cm+7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：10mM リン酸緩衝液(pH6.8)

B：500mM リン酸緩衝液(pH6.8)

A→Bリニアグラジエント(30分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；ポストカラムリアクション、条件は本文中に記載

試料；A：低分子量型ウロキナーゼ

B：高分子量型ウロキナーゼ

図-4にHACにおけるL-UKとH-UKの試料注入量とカラムからの溶出ピークのピーク高さの関係を示します。L-UKは2つの主ピークのピーク高さ、H-UKは溶出ピークのトップピークをピーク高さとしました。L-UK、H-UKともに試料の溶出ピークの高さは、試料注入量60から1,200I.U.の範囲で注入量に比例しました。注入量と溶出したピーク面積との間にも比例関係がありました。このようにポストカラムリアクションによるUKの検出は、定量性があり、UV検出法に比べ高感度であることがわかります。

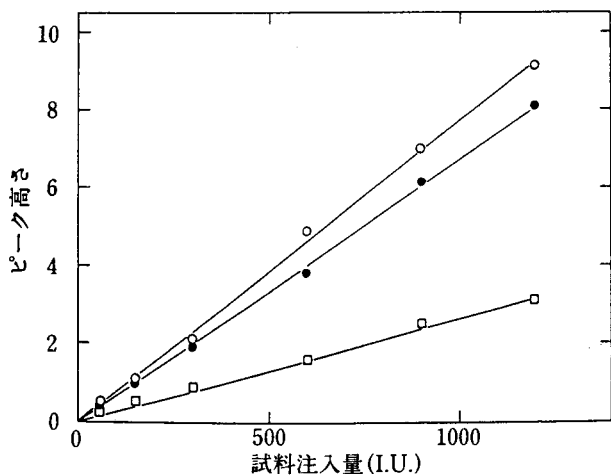


図-4 HACにおけるウロキナーゼ溶出ピークの高さの試料注入量依存性

- (●)：低分子量型ウロキナーゼ、第1ピーク
 - (○)：低分子量型ウロキナーゼ、第2ピーク
 - (□)：高分子量型ウロキナーゼ、トップピーク
- 溶離条件は図-3に同じ

(3)疎水クロマトグラフィ(HIC)による分離

図-5にTSKgel Phenyl-5PWによるUKの分離を示します。L-UK、H-UK自体の分離能はIECやHACの分離能に比べやや劣りますが、L-UKとH-UKはほぼ完全に分離されています。溶出ピークの高さがIECやHACに比べ相対的に低くなっていますが、これは溶離液中の塩による阻害かもしれません。回収率はL-UK、H-UKともに90%以上でした。

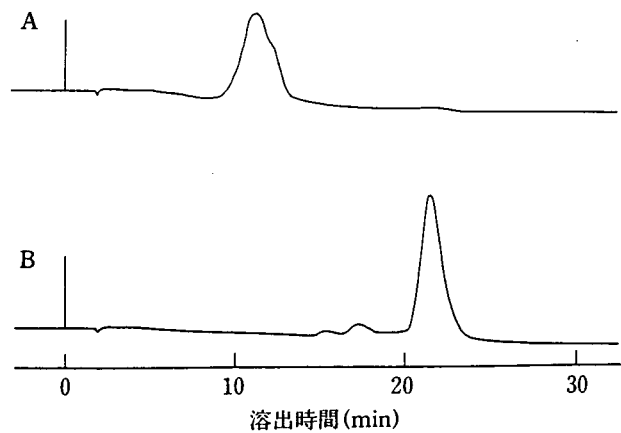


図-5 HICによるウロキナーゼの分離

カラム；TSKgel Phenyl-5PW (7.5mmID×7.5cm)

溶離液；A：0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)

+1.5M 硫酸アンモニウム

B：0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)

A→Bリアグレジエント(30分)

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；ポストカラムリアクション、条件は本文中に記載

試料；A：低分子量型ウロキナーゼ

B：高分子量型ウロキナーゼ

4. おわりに

低分子量型 (L-UK) および高分子量型ウロキナーゼ (H-UK) が、IEC、HAC、HICの3種の分離モードにおいて全て高回収率で再現性よく、しかもほぼ完全に分離されることがわかりました。2種類のUKは、ともに複数の成分が認められ、これらの成分はUKの電気泳動により認められているアイソザイムに対応するのかもしれませんが。

以上のようにUKの検出方法に合成基質を用いたポストカラムリアクションによる蛍光検出法を用いました。この方法は、UV検出法を用いた際に起こる、夾雑タンパク質や製剤中のアルブミンによる検出の妨害を受けません。またUV検出法では感度が低いために、大量の試料が必要となりますが、蛍光検出法ではわずか60IUのUK試料でも検出できます。この検出方法はUK試料中のL-UKとH-UKの重量に基づく定量法ではなく、活性量の定量法であることから、UK製剤においては薬効(活性)の分析が行え、より実用的であると言えます。GFCに比べ、高い分離能を持つIEC、HAC、HICと、高感度にUKの活性が検出できるポストカラムリアクションによる検出方法の組み合わせは、UKの分離分析に非常に有効であると考えられます。

References

- 1) T. Someno, K. Katoh, K. Nijima and H. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, 188(1980) 185
- 2) R. A. Cox, K. N. McFarland, P. H. Sackett and M. T. Short, *J. Chromatogr.*, 370(1987) 495
- 3) T. Terui, H. Shimizu, I. Hara and I. Sawada, 102nd Annual Meeting of the Japan Society of Pharmacology, Osaka, April, 1982, paper 3j5-1