***** 原 著 *****

経口ウロキナーゼ投与時における 生体内線溶系の動態

——二重盲検・交叉法による検討——

安部 英* 風間 睦美* 木下 忠俊* 内藤 巖*
大串 利弘* 吉村 祐一* 照屋 純* 清水 直容**

Shift of fibrinolysis system at oral administration of urokinase in human subjects ——Double blind cross over study——

Takeshi ABE*, Mutsuyoshi KAZAMA*, Tadatoshi KINOSHITA*,
Iwao NAITO*, Toshihiro OGUSHI*, Yuichi YOSHIMURA*,
Jun TERUYA* and Naokata SHIMIZU**

Key words: oral urokinase, absorption, double blind cross over
method, fibrinolytic activity, pharmacokinetic study

In order to investigate the dynamic state of blood fibrinolysis system at oral administration of urokinase (UK), double blind test was performed by a cross-over method. Twelve healthy adult male volunteers were divided into two groups of true drug and placebo.

Before and after single oral administration of 120,000 IU UK and placebo, their blood fibrinolytic activity and its inhibitors were measured until 24 hours thereafter and the statistical significance of the variation of these parameters and the absorption of UK through intestinal wall were also analysed. It was revealed that the blood fibrinolytic activity reached the maximal value between 3 to 6 hours and the highest absorption of UK was attained at 1 to 3 hours after the administration.

The blood fibrinolytic activity was then gradually decreased but its effect was continued at least until 9 hours after the administration. The level of fibrinolysis

* 帝京大学医学部第一内科 [〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1], The First Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan. (受付 1982.8.27, 受理 1982. 9.27)

** コントローラー

inhibitors (α_2 -AP, α_2 -M, α_1 -antitrypsin and AT-III) did not show significant change during this period.

From these data it was concluded that oral administration of UK could increase blood fibrinolytic activity much greater and more continuously than in the case of venous injection with the same dosage. The effective thrombolytic therapy could be expected by oral administration of UK.

はじめに

従来 urokinase (UK)¹⁾は、血栓症治療薬としてもっぱら静脈内注射により投与されてきたが、血中半減期が著しく短く、また線溶作用も急速に消失していくことから、経口投与に関する研究が続けられてきた。Sumi ら²⁾は、ビーグル犬に形成された静脈血栓を用い、腸溶剤の UK カプセルを経口的に投与したところ、その血中線溶活性が発現し、かつ、長時間持続するとともに、実験的血栓が完全に溶解することを報告した。一方、牧田ら³⁾は、¹²⁵I-UK をマウス、ラットの十二指腸内に投与して血液および各種臓器中の放射活性を測定したところ、その放射活性が上昇しさらに持続することから、UK が腸管から吸収されることを推論した。さらに安部ら⁴⁾は、健康人に経口投与された UK が、その組織、体液などに病的変化を招来しないことを臨床的に確かめた。

本研究では、これらの事実に基づき、健康成人男子に経口 UK 製剤を投与した後の血中線溶系の活性の変化を追求して、UK の腸管吸収とその動態を二重盲検・交叉法により検索したものである。

I. 実験材料および方法

1. 被験者

被験者には健康な成人男子で、特別の既往症がなく、さらに理学的所見や各種検査成績に異常の認められなかった年齢24~50歳の12名を選別し、6名を1群として、無作為に実薬群と偽薬群との2群に割付けた。

2. 被験薬剤

実薬としては、UK 30,000 国際単位 (I.U.) を含む腸溶性硬カプセル剤を、また偽薬としては、UK を除く他の全成分が共通で外観上識別不能なカプセル剤を使用した。被験薬剤は、二

重・盲検交叉法により、本試験に直接関与しないコントローラーが割付けを行い、そのキーコードは実験終了まで厳重に保管された。

3. 薬剤投与方法と採血方法

薬剤投与は、前記実薬および偽薬を各被験者につき4カプセル(実薬剤1回投与量 120,000 I.U.)を1度に内服させ、交叉法の washout の期間は2週間とした。また採血は、薬剤投与前および投与後 1, 3, 6, 9, 24 時間に、橈側正中皮静脈よりダブルシリンジにより行い、うっ滞血約 2 ml を廃棄した後の自然の循環血を3分以内に採取して被検血液とし、この血液9容に3.8%クエン酸ナトリウム1容を混和した後、4°C, 1860×G, 20分間遠心分離して被検血漿を得た。血清は、被検血液を37°C, 60分間保温して完全に凝固させ、1860×G, 20分間遠心分離して得た。さらに入院より最終採血の終了まで、被験者はすべて安静状態に保ち、食事は病院食とし、間食および喫煙など線溶活性に影響をおよぼすと思われるものは除外した(表1)。

4. 血液線溶活性およびインヒビター活性の測定

1) ACH-Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーによる血漿中の UK, およびプラスミノゲンアクチベーター (PLg-Act) の分離

アフィニティークロマトグラフィーは、Sumi ら⁵⁾の方法により、N^ε-(ε-aminocaproyl)-DL-homoarginine hexylester (ACH) をリガンドとして Sepharose 4B にカップリングさせて調製した ACH-Sepharose を用いて行った。被検血漿 4 ml と 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を等量混合して 2 ml の ACH-Sepharose カラムに通した後、2M NaCl 加 0.1M リン酸緩衝液で十分に洗浄し、2M NaCl, 6M urea 加 0.1M リン酸緩衝液で溶出した。この溶出成分を 4°C の多量の精製水で16時間透析し、凍結乾燥した

Table 1 Procedure of double blind and cross over tests for oral urokinase

	pre. day	1st. hospital day					2nd. hospital day	2 weeks wash out	pre. day	1st. hospital day					2nd. hospital day
time (o'clock)	18	11	12	14	17	20	11		18	11	12	14	17	20	11
admission and discharge of hospital	in ↓						out ↓		in ↓						out ↓
drug administration		↓							↓						
blood collection		↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
food uptake	↓	↓		↓		↓	↓		↓	↓		↓		↓	↓
elapsed time after drug administration (hrs.)		8	1	3	6	9	24			8	1	3	6	9	24

ものを PLg-Act 活性分画とした。

2) 血漿中の PLg-Act 活性 (PAA) と抗 UK 抗体を用いた中和反応 (neutralization) による UK 活性の測定

前記 ACH-Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーにより得られた PLg-Act 活性分画 (血漿 1 ml 相当) を 100 μ l の 0.2%ゼラチン加 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解した。この溶液を遠心して不溶物を除去した後、その上清 10 μ l を Wolton⁶⁾の方法によって作製した標準寒天フィブリン平板上に滴下し、37°C、24時間保温後、得られた溶解窓を測定した。

一方、中和反応に用いる抗 UK 抗体は、精製した UK (比活性 116,000 I.U./mg protein) を抗原として家兎の foot pad または背部皮下に Freund's complete adjuvant とともに注射し、2週間後に booster 感作をして4週目に得られた抗血清から、Rijken ら⁷⁾の方法により、抗 UK IgG を調製した。この IgG 100 μ g は、UK と免疫複合体を形成させると、UK 活性 20 I.U. を完全に阻害し、プラスミノゲン (PLg) の活性化能を消滅させた。したがって、中和反応の場合、IgG 2 mg/ml 溶液 5 μ l と前記 PLg-Act 活性分画 5 μ l とを混和後 0°C、30分間放置し、次いで、5 C.U./ml ヒト PLg 10 μ l を

添加、37°C、30分間保温後、その 10 μ l を標準寒天フィブリン平板上に滴下し、37°C、24時間保温後、その溶解窓の面積を測定して、前記の IgG-free 試料で得られた測定値から引いた値を UK 活性とした。

3) 合成基質 S-2444 による血漿中の UK 活性測定

被検血漿の PLg-Act 活性分画の UK 活性を Claesson ら⁸⁾の方法に準じ、S-2444 (Pyro-Glu-Gly-Arg-pNA; 第一化学) を基質として測定した。PLg-Act 活性分画の血漿 1 ml 相当量を 0.2%ゼラチンおよび 12.5 K.I.U./ml アプロチニン加 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) 0.5 ml に溶解し、この溶液中の不溶物を 6650 $\times$ G、10分間の遠心分離で除き、得られた上清 0.4 ml に同上緩衝液 50 μ l を加えて37°Cで保温した後、50 μ l の S-2444 (3 mM) を加えて37°Cにおける 405 nm の吸光度変化率を初速度法により測定した。

4) ユーグロブリン溶解時間 (ELT)

血漿のユーグロブリン分画は安部らの方法⁹⁾により得た。この分画に 50 U./ml bovine thrombin 0.5 ml を添加して凝固させて Automatic ELT Meter (東洋科学産業) に挿入し、完全溶解までの時間を測定した。また、溶解時間は Marsh¹⁰⁾の方法で算出して表わした。

5) Euglobulin fibrinolytic activity (EFA)

4) の方法で 0.5 ml の血漿から得られたユーグロブリン分画を 50 μ l の 1M NaCl 加 0.1M Veronal 緩衝液 (pH 7.3) で溶解した後、その 10 μ l を標準フィブリン平板に滴下して 37°C、16 時間保温後、得られた溶解窓を測定した。

6) 血漿プラスミン (pl-PL) 活性

被検血漿 10 μ l を PLg 除去寒天フィブリン平板 (第一化学) 上に滴下して 24 時間、37°C 保温した後、生じた溶解窓の面積を測定した。

一方、合成基質 S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA, 第一化学) を基質に用い、Friberger ら¹¹⁾の方法に準じて 300 μ l の 0.15M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に血漿 100 μ l を加え、37°C で保温後、S-2251 (3 mM) 100 μ l を加えて 37°C における 405 nm の吸光度変化を初速度法によって測定した。

7) 血清中の蛋白分解酵素阻害物質の測定

抗ヒト α_2 -antiplasmin (α_2 -AP) 家兎血清 (持田) を用いて一次元免疫拡散板を作製し、 α_2 -AP を定量した。また α_2 -macroglobulin (α_2 -M), α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), antithrombin III (AT-III) は、定量用免疫拡散板 (日本ヘキスト) を用いて一次元免疫拡散法により定量した。

5. 試験結果の解析

すべての試験データが得られた後、試験担当責任者とコントローラー立合いの上でキーコードを開封した。その結果に基づいて本試験の統計学的処理を行ったが、統計学的評価に関しては、1 st. treatment と 2 nd. treatment の実薬群を 1 群、偽薬群を他の 1 群として、それぞれ各群内での投与前値と測定時の値との比較を t 検定 (dependent) で、また、各測定時での実薬群と偽薬群の有意差検定をも t 検定 (independent) で処理した。

II. 実験成績

得られたすべての測定結果について有意差検定を行い、測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示するとともに、群内で有意差がありかつ群間においても有意差を有する値についてのみ有意差を表示した。

1. 血漿中の UK および PLg-Act 活性

PAA は、実薬群で投与後 1 時間から 6 時間まで、6.48, 7.37, 6.71 と活性が上昇し、最高を示した 3 時間値は 7.37 ± 0.49 (I.U./dl) となって、同時間の偽薬群の値 5.58 ± 0.37 に比べ有意 ($p < 0.01$) な活性の増加が認められた。その後、徐々に低下したが、実薬投与群および偽薬投与群のそれぞれの群間で有意な差はなく、9 時間以降では偽薬群とほぼ同様な値であった。また、偽薬群ではすべての測定時刻の検体群での有意の差は認められなかった (表 2)。

Neutralization test による UK 活性は、実薬群で投与後 9 時間まで UK 活性の有意な増加がみられ、群間でも 1 時間で 1.49 ± 0.24 (I.U./

Table 2 UK and UK like activities of ACH-Sepharose fraction from blood after oral administration of UK to human subjects

Elapsed time after drug administration (hrs.)	Before	1	3	6	9	24
PAA (T)	6.34 $\pm$ 0.43	6.84 $\pm$ 0.47	7.37 $\pm$ 0.49*	6.71 $\pm$ 0.33	6.04 $\pm$ 0.40	5.42 $\pm$ 0.40
(I.U./dl) (P)	5.90 $\pm$ 0.40	6.48 $\pm$ 0.49	5.58 $\pm$ 0.37	5.67 $\pm$ 0.47	5.74 $\pm$ 0.40	5.53 $\pm$ 0.43
Neutralization test (T)	0.43 $\pm$ 0.22	1.49 $\pm$ 0.24**	2.72 $\pm$ 0.16**	1.66 $\pm$ 0.11**	0.93 $\pm$ 0.14*	0.56 $\pm$ 0.18
(I.U./dl) (P)	0.53 $\pm$ 0.13	0.54 $\pm$ 0.14	0.67 $\pm$ 0.20	0.49 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.15	0.47 $\pm$ 0.12
Amidase activity S-2444 (T)	211.16 $\pm$ 16.41	259.00 $\pm$ 27.80	322.50 $\pm$ 32.02*	271.58 $\pm$ 26.18	256.16 $\pm$ 18.37	240.66 $\pm$ 22.36
(Δ A/min. $\times 10^5$) (P)	236.16 $\pm$ 18.22	206.16 $\pm$ 21.52	214.16 $\pm$ 22.38	211.00 $\pm$ 17.76	261.16 $\pm$ 17.14	229.50 $\pm$ 18.35

(T): true drug group (P): placebo drug group Mean $\pm$ S.E. n=12

** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$

Table 3 Fibrinolytic activity level of euglobulin fraction after oral UK administration to human subjects

Elapsed time after administration (hrs.)	Before	1	3	6	9	24
ELT (T)	54.26±8.76	65.05±10.09	84.93±10.98	92.09±13.13	76.02±7.07	53.16±10.04
(10 ³ /min.) ² (P)	60.09±7.91	57.54±10.60	64.95± 7.78	67.12± 7.45	64.69±9.87	47.02± 7.53
EFA (T)	27.30±3.35	32.62± 3.40	44.86± 5.07	50.18± 4.25*	43.18±2.76	27.64± 3.73
(mm ²) (P)	32.42±4.21	27.14± 4.14	35.79± 4.74	37.08± 3.90	34.44±4.00	33.93± 4.03

(T): true drug group (P): placebo drug group Mean±S.E. n=12 *: p<0.05

Table 4 Plasma plasmin activity after oral UK administration to human subjects

Elapsed time after drug administration (hrs.)	Before	1	3	6	9	24
pl-PL (T)	98.75±17.99	109.66±15.48	128.58±12.39	116.83±16.63	126.58±12.29	90.75±20.24
(C.U./l)(P)	89.41±19.99	120.91±11.63	114.00±16.36	126.00±12.30	126.75±12.24	80.50±21.45
Amidase activity S-2251 (T)	106.66± 5.43	113.75± 8.03	126.66± 7.25*	148.75±10.19*	139.16± 5.92	116.66± 6.47
(ΔA/min.×10 ⁵) (P)	114.58± 4.56	97.08± 4.87	105.83± 4.63	123.75± 6.46	124.58± 6.14	107.50± 6.54

(T): true drug group (P): placebo drug group Mean±S.E. n=12 *: p<0.05

dL) (p<0.01), 3時間では 2.72 ± 0.16 (p<0.01) と最高値を示し, 6時間では 1.66 ± 0.11 (p<0.01), 9時間では 0.93 ± 0.14 (p<0.05) とおのおの同時刻における偽薬群の値と比較して有意な増加が認められたが, 24時間では偽薬群とほぼ同値であった. 一方, 偽薬群では群内での有意な差はなく, すべての時刻ではほぼ正常域内の変動を示したにすぎなかった (表 2).

血漿中の S-2444 アミド分解活性は, 実薬群で1時間から6時間まで活性が増加した. 群間で比較すると, 最高値を示した3時間での値は 322.5 ± 32.02 (ΔA/min.×10⁵) となり, 同時刻における偽薬群の値 214.16 ± 22.38 に対して有意 (p<0.05) な増加が認められた. その後, 9時間以降では偽薬群と同様な変動がみられた. また, 偽薬群では投与後1時間で, 投与前に対して有意な減少がみられたが, その他の時刻では有意な変動は認められなかった (表 2).

2. 血漿中の線溶活性

ELT は, 実薬群内で投与前と比較して1時間から9時間までの各時刻で有意な短縮がみられ, これは Marsh の変換式を用いると逆に有

意な増加が認められたこととなる. しかし, 最高値を示した6時間での値 92.09 ± 13.13 [(10³/min.)²] と同時刻における偽薬群の値 67.12 ± 7.45 との間では有意な差がなく, 他のすべての時刻でも群間の有意差は認められなかった. 一方, 偽薬群では24時間で投与前に対して有意な減少がみられたが, その他の時刻では有意な差は認められなかった (表 3).

EFA は, 実薬群で投与後3時間から9時間まで有意な上昇がみられ, 24時間では投与前とほぼ同じ値に復した. 最高値を示した6時間の値 50.18 ± 4.25 (mm²) は同時刻における偽薬群の値 37.08 ± 3.90 に対して有意 (p<0.05) な上昇が認められた. また, その他の時刻では群間の有意差はなかった. 偽薬群では群内の1時間で投与前に対して有意な減少がみられたが, その他の時刻では有意な差はなかった (表 3).

pl-PL 活性は, 実薬群, 偽薬群ともに投与後1時間から9時間までは増加がみられたが, 24時間で投与前とほぼ同値に復した. 実薬群では3時間から9時間まで投与前に対して有意な増加が, また偽薬群でも1時間および6時間で有意

Table 5 AT-III, α_2 -M, α_2 -AP and α_1 -AT levels in blood after oral UK administration to human subjects

Elapsed time after drug administration (hrs.)	Before	1	3	6	9	24
AT-III (T)	29.15± 0.46	28.00± 0.96	29.25± 0.57	27.33± 1.02	28.20± 1.12	28.68± 0.76
(mg/dl) (P)	29.13± 2.20	26.85± 0.80	28.58± 0.83	26.88± 0.95	26.53± 1.03	27.96± 0.64
α_2 -M (T)	164.16± 9.51	156.16±10.01	184.66± 9.97	167.50±13.81	183.33± 9.65	190.33±10.26
(mg/dl) (P)	178.66±26.55	173.16±11.10	172.00±12.76	167.00±13.49	164.66±12.52	193.33±12.65
α_2 -AP (T)	5.72± 0.19	5.59± 0.23	5.64± 0.23	5.40± 0.20	5.70± 0.17	5.80± 0.21
(mg/dl) (P)	5.79± 0.18	5.67± 0.18	5.99± 0.17	5.71± 0.20	5.76± 0.26	6.05± 0.18
α_1 -AT (T)	164.16± 8.99	174.58± 8.75	172.08± 9.71	156.66± 8.36	183.33±10.72	177.50± 5.87
(mg/dl) (P)	177.50±10.31	192.50±11.63	166.25±19.78	182.08±16.63	180.41±11.74	180.00±11.23

(T): true drug group (P): placebo drug group Mean±S.E. n=12

の増加がみられたが、群間ではすべての時刻で有意な差は認められなかった(表 3)。

血漿の S-2251 アミド分解活性は、実薬群で投与後 3 時間から 9 時間まで群内での有意な上昇がみられ、24 時間では投与前とはほぼ同じ値まで減少した。群間でも 3 時間で 126.66 ± 7.25 ($\Delta A/\text{min} \times 10^5$)、また最高値を示した 6 時間で 148.75 ± 10.19 とおのおの同時刻における偽薬群の値に対して有意 ($p < 0.05$) な上昇が認められた。偽薬群では 1 時間で投与前に対し有意に減少したが、その後は有意な差は認められなかった(表 4)。

3. 血清中の蛋白分解酵素阻害物質

AT-III は、実薬群、偽薬群とも投与前後の変動が少なく、すべての時刻で群内・群間の有意な差は認められなかった。

α_2 -M は、実薬群で平均値 $156.16 \sim 190.33$ (mg/dl) となり、また偽薬群で $164.66 \sim 193.33$ を示し、いずれも特異の変動傾向を示さず、群内・群間の有意な差も認められなかった。

α_2 -AP は、すべての時刻で実薬群・偽薬群の群内・群間での有意差は認められず、またその変動も小さかった。

α_1 -AT は、実薬群と偽薬群の差が最も大きかった 6 時間でも有意な差は認められず、群内・群間での有意な差はすべての時刻で認められなかった(表 5)。

III. 考 察

健康な成人男子 12 名を対象として、UK の腸

溶カプセルを経口投与した後の血中線溶活性の動態について、二重盲検・交叉法により検討した結果、PAA, neutralization による UK 活性および S-2444 のアミド分解活性において、有意な活性の上昇が投与後 1 時間から出現し、それが 9 時間まで持続した。血中の PAA は、実薬投与後 3 時間で最高値を示し、同時刻の偽薬群の約 1.3 倍の値を示し、統計学的に有意 ($p < 0.05$) な上昇がみられ、少なくとも 1 時間から 6 時間までその活性が持続した。neutralization による UK の定量は、抗原抗体反応を利用した方法である。この定量法によると、実薬群では投与後 1 時間で偽薬群の約 2.8 倍、3 時間で 4.1 倍、6 時間で 3.4 倍、そして、9 時間でも 2.2 倍と有意な増加が認められた。この結果から、UK が腸管吸収されていることが明らかとなった。また、UK の特異基質である S-2444 を用いたアミド分解活性では、投与後 3 時間で実薬群は偽薬群の約 1.5 倍と有意 ($p < 0.05$) な上昇が認められ、少なくとも投与後 1 時間から 3 時間まで活性の上昇が認められた。

このように、UK を経口投与した後の血中の UK および PLg-Act 活性は、いずれも投与後 1 時間から上昇がみられ、その最高値は 3 時間で同時刻の偽薬群に比較して有意な上昇が認められた。したがって、経口投与された UK は腸管から吸収され、血中線溶系の活性化に作用していることが示唆された。一方、佐々木ら¹²⁾ は、 ^{14}C -UK の溶液をマウスおよびラットの十二指腸に直接投与し、その後の血中放射活性の最

高値がマウスで15分、ラットで30分であったことを報告している。さらに初岡ら¹³⁾は、 ^{14}C -UK をマウスの十二指腸投与後約30分から6時間で、腎、肝、脾および十二指腸粘膜上皮等に放射活性が分布していることを全身、および、マイクロオートラジオグラムで確認している。このことより、 ^{14}C -UK は腸管の吸収部位から速やかに血中へと吸収され、そして線溶系を活性化したと考えられ、本実験の実薬投与群の活性発現の成績とも良く一致した。この被験者によるUK経口投与、二重盲検・交叉試験の場合、投与前5時間より絶食を行ったので、UKカプセルの胃内通過は比較的速く、短時間で腸に達し、そのカプセルが腸内で溶解し、薬剤投与後の早い時刻からUKが吸収されたものと考察される。一方、Woodardら¹⁴⁾は、ラットに ^{125}I -UKを静注すると、2分後に血中放射活性の50%が消失すること、また、Backら¹⁵⁾は、実験的血栓を形成した犬に ^{131}I -UKを静注し、その後の血中放射活性を測定したところ、半減期が5分で血中から消失していることを報告している。したがって、UKが静注された場合、その血中濃度は投与後に最大となり、短時間で低下し、速やかに尿中に排泄されることが示唆されたが、一方、UKが経口投与された場合、上記の成績より、一定時間あたり吸収されるUKは低濃度ではあるが、長時間にわたり、さらに血中の線溶活性も投与後約9時間まで持続することが認められた。

血中の線溶活性測定法のうち、ELTは迅速で簡便な方法であるため、臨床においても活性測定法として多く用いられている。UKの経口投与後ELTのは、実薬群で投与後1時間から9時間までELTの短縮がみられ、血中線溶活性の上昇がうかがわれた。しかし、実薬、偽薬のそれぞれの群間で比較すると、最高値を示した6時間では同時刻における偽薬群の値に対して危険率5%での有意な差が認められなかったが、短縮傾向は認められた。また、ユーグロブリンを用いる線溶活性測定であるEFAでは、UKの経口投与後ELTとほぼ同じような活性の発現がみられ、実薬群では投与後6時間で最高値を示して、このEFA値は偽薬群の同時刻

の値と比較して有意な上昇が認められ($p < 0.05$)、この活性は投与後1時間で出現し、9時間まで持続することが明らかになった。このように、ELTおよびEFAの測定は、ユーグロブリン分画中に含まれるPLg-ActとPLもしくは、PLg-Actの作用により生ずるPLの活性を、特異基質であるフィブリンによって測定する方法であるが、UK経口投与により、ELT、EFAの活性の上昇が投与後6時間で認められたことから、この時間的経過の間に、UKの腸管吸収とともに血中でのUKによる線溶活性の発現の両機作が行われていると考えられる。また、UKおよびPLg-Actの活性が3時間で最高値となり、次いで、ELT、EFAの活性が6時間で最高値になったことは、生体における線溶活性の発現が経口投与されたUKによるものであることも強く示唆している。pl-PL活性では、すべての時間において、実薬群と偽薬群の間で有意な差は認められなかったにもかかわらず、PLに対して比較的高い基質特異性を持つS-2251のアミド分解活性では、投与後3時間および6時間で、偽薬群に対し有意な増加が認められた。これは、本試験では健康者を対象にしているため、ホメオスタシスなど生体内でのUKに対する緩衝作用が働き、無処理の血漿では、その中に存在するPLの活性が検出できなかったものと考えられる。

一方、血中の蛋白分解酵素阻害物質であるAT-III、 α_2 -M、 α_2 -APおよび α_1 -ATは、UKの経口投与ではその血中濃度にまったく変化は認められず、この投与方法によって発現する線溶活性は、血中のインヒビター系の低下によるものではないことが考察された。

本実験では、被験者の全試験中の管理を安静状態に保つことに留意し、飲水、飲食等も線溶系に対して作用することから、できる限り除外した。さらに採血に際しダブルシリンジ法により、できる限り流血を自然の状態で採取し、被検血清、血漿も迅速に処理して定量に供し、非特異的な線溶系の活性化や失活などの因子をできる限り減らすことにより、正確な測定を実施した。このような条件下で健康男子に経口的に投与されたUKは、比較的短時間で腸管より吸

収され、その活性を血中に現わした。その後3時間で最高値を示し、少なくとも6時間から9時間まで活性の持続が認められた。

結論として、UKを経口投与した場合、その一部は活性を保持したまま腸管より緩やかではあるが吸収され、さらにその吸収が持続するため、血中には長時間その活性が維持されることが明らかとなった。

文 献

- 1) Sobel, G.W., Mohler, S.R., Jones, N.W., Dowdy, A.B.C. and Guest, M.M.: Urokinase: An activator of plasma profibrinolysin extracted from urine. *Amer. J. Physiol.*, **171**; 768~769, 1952.
- 2) Sumi, H., Sasaki, K., Toki, N. and Robbins, K.C.: Oral administration of urokinase. *Thrombos. Res.*, **20**; 711~714, 1980.
- 3) 牧田登之, 初岡政典, 米良幸典, 石川幹夫, 梅本安長, 佐々木耕治: 経口 Urokinase の生体内動態に関する研究. 第1報: マウス, ラットにおける ^{125}I -UK の吸収, 分布ならびに排泄. 血液と脈管, **12**; 305~312, 1981.
- 4) 安部 英, 他: 経口ウロキナーゼ (ZP-201) の第I相試験. 臨床評価, 投稿中.
- 5) Sumi, H., Sasaki, K. and Muramatsu, M.: A simple and rapid purification method of urokinase using a $[\text{N}^{\alpha}-(\epsilon\text{-aminocaproyl})\text{-DL-homoarginine hexylester}]\text{-Sephadex}$ column. *Acta Haematol. Japonica*, **41**; 766~770, 1978.
- 6) Wolton, P.L.: An improved fibrin plate method for the assay of plasminogen activators. *Clin. Chim. Acta*, **13**; 680~684, 1966.
- 7) Rijken, D.C. and Collen, D.: Purification and characterization of plasminogen activator secreted by human melanoma cell in culture. *J. Biol. Chem.*, **256**; 7035~7041, 1981.
- 8) Claesson, G., Friberger, P., Knös, M. and Eriksson, E.: Methods for determination of prekallikrein in plasma, glandular kallikrein and urokinase. *Haemostasis*, **7**; 76~78, 1978.
- 9) 安部 英: ユーグロブリン溶解時間法 (新版日本血液学全書刊行委員会: 日本血液学全書13. 血液学的検査・正常値), 丸善, 東京, 1979, p. 451~453.
- 10) Marsh, N.A.: Measurement of fibrinolytic capacity by the euglobulin lysis time method-A problem of "Units". *Thrombos. Res.*, **12**; 197~200, 1977.
- 11) Friberger, P., Knös, M., Gustavsson, S., Aurell, L. and Claesson, G.: Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251. *Haemostasis*, **7**; 138~145, 1978.
- 12) 佐々木耕治, 田中芳明, 田中雅明, 森山 茂, 初岡政典, 牧田登之: 経口 Urokinase の生体内動態に関する研究. 第2報: マウス, ラットにおける ^{14}C -UK の吸収・分布ならびに排泄. 血液と脈管, **12**; 313~319, 1981.
- 13) 初岡政典, 牧田登之, 清木雅雄, 田鍋雅子, 佐々木耕治: 経口 Urokinase の生体内動態に関する研究. 第3報: マウスにおける ^{14}C -UK のオートラジオグラフィ. 血液と脈管, **12**; 474~482, 1981.
- 14) Woodard, W.T., Jr., Day, E.D. and Silver, D.: The fate of infused urokinase. *Surgery*, **68**; 692~697, 1970.
- 15) Back, N., Ambrus, J.L. and Mink, I.B.: Distribution and fate of ^{125}I -labeled components of the fibrinolysin system. *Circul. Res.*, **9**; 1208~1216, 1961.