

〈原著〉

イムノアッセイによるセラペプターゼの 定量法開発とバリデーション

田中 祥之、岡野 由貴、吉田 侑矢、辻 琢己、河野 武幸

Development of a highly sensitive enzyme immunoassay for serrapeptase and its accuracy

Yoshiyuki Tanaka, Yuki Okano, Yuya Yoshida, Takumi Tsuji and Takeyuki Kohno

Summary Serrapeptase is an anti-inflammatory, proteolytic enzyme, but nothing is yet known about its pharmacokinetic properties in relation to therapeutic efficacy. The present study describes the development and subsequent validation, by highly sensitive enzyme immunoassay of analytical procedures for serrapeptase in serum. The assay procedure consisted of the reaction of serrapeptase with 2,4-dinitrophenyl bovine serum albumin (DNP-BSA) plus anti-serrapeptase IgG and anti-serrapeptase Fab'-beta-D-galactosidase conjugate, trapping onto anti-DNP-BSA IgG coated polystyrene balls, and fluorometric measurements of beta-D-galactosidase activity using 4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside as a substrate. The calibration curve showed good reproducibility in the range of 0.1-30 ng/mL of serrapeptase, while the lower limit of quantification was 0.1 ng/mL. The accuracy and precision values were within $\pm 15\%$ of the theoretical values, and did not exceed 15% of the CV. Serrapeptase was stable in serum to freezing and thawing and to long-term storage (1 month). This assay was developed to provide us with a reliable and sensitive method by which to estimate the clinical bioavailability of serrapeptase applied to both animal and human serum.

Key words: Serrapeptase, Enzyme immunoassay, Validation of analytical procedures, Serum

I. 緒言

消炎酵素剤は、蛋白分解酵素および多糖体分解酵素に大別されるポリペプチドである。主に抗浮腫作用により炎症を抑制するものと考えられているが¹⁾、これら消炎酵素剤の作用機序につ

いては、ほとんど明らかにされていない。また、消炎酵素剤の多くは、腸溶化などの製剤工夫により経口投与されている²⁾が、その体内動態においても不明な点が多く、有効血中濃度についても明らかにされていない。したがって、薬物の生体における作用機序を解明するにあたり、

摂南大学薬学部病態医科学研究室
〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町45-1
受領日 平成22年2月16日
受理日 平成22年3月6日

Department of Clinical Sciences, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Setsunan University
45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

経口投与後の血中薬物濃度の推移を検討する意義は大きい。しかし、経口投与により吸収された消炎酵素剤は、腸管からほとんど吸収されない³⁾と考えられることから、その定量には高感度な分析方法が要求される。今回、セラペプターゼ製剤の血中濃度を測定することを目的とし、簡便かつ高感度な酵素免疫測定法を開発し、その分析バリデーションを実施したので報告する。

II. 実験方法及び実験材料

1. セラペプターゼ

セラペプターゼは合同酒精(株)より入手した。

2. イヌ血清

イヌ血清は、健康なビーグル犬(雄性、1歳1ヶ月齢、n=6、(株)ナルク)より得た血液から、遠心分離にて血清を分取して等量混和し、プール血清として使用まで-30℃に保存した。なお、採血は(株)ナルク動物福祉規定に従って実施した。

3. ジニトロフェニル化ウシ・血清アルブミン

1) メルカプトアセチル化ウシ・血清アルブミン

0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (1.0 mL) に溶解したウシ・血清アルブミン(BSA, Fraction V, Intergen Co., NY, U.S.A., 22 mg) にN,N-dimethylformamideに溶解した132 mmol/L N-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA, Research Organics Inc., Cleveland, OH, U.S.A.) (0.1 mL) を加え、30℃にて30分間保温した。続いて、0.1 mol/L EDTA, pH 6.0 (50 mL) および1 mol/L hydroxylamine·HCl, pH 7.0 (0.13 mL) を加え、30℃にて15分間保温した。次に、5 mmol/L EDTAを含む0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0 (緩衝液A) で平衡化したSephadex G-25 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) カラム (1.0 × 30 cm) を用いてゲル濾過を行い、メルカプトアセチル化BSAを得た。

2) マレイミド化ジニトロフェニル-L-リジン

N,N-Dimethylformamideに溶解した0.1 mol/Lジニトロフェニル-L-リジン・HCl (DNP、東京化成工業株式会社、東京) (0.5 mL) に0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (1.425 mL)、

0.1 mol/L EDTA, pH 6.0 (75 mL) およびN,N-dimethylformamideに溶解した20 mmol/L N-succinimidyl-6-maleimidohexanoate (EMCS、株式会社同人化学研究所、熊本) (0.5 mL) を加え、30℃にて30分間保温しマレイミド化DNPを得た。

3) DNP化BSA

緩衝液A (1.79 mL) に溶解したメルカプトアセチル化BSA (32 mg) に2.02 mLのマレイミド化DNP溶液を加え、30℃にて30分間保温した。次に、緩衝液Aに溶解した0.1 mol/L 2-mercaptoethylamine·HCl (0.423 mL) を加え、4℃にて終夜保温し、続いて、緩衝液Aに溶解した0.1 mol/L N-ethylmaleimide (0.8 mL) を加え37℃にて30分間保温した。最後に、0.5 mol/L NaClを含む0.1 mol/Lホウ酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0で平衡化したSephadex G-25カラム (1.0 × 30 cm) を用いてゲル濾過を行い、DNP化BSAを得た。

4. 抗体

1) 抗血清

抗DNP化BSA血清およびセラペプターゼ血清は、それぞれ、DNP化BSAおよびセラペプターゼで家兔を感作し調製した。

2) IgG, F(ab)₂およびFab'

IgGは血清から硫酸ナトリウム分画およびジエチルアミノエチル-セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。F(ab)₂はIgGをペプシン消化して調製した。Fab'はF(ab)₂を2-mercaptoethylamineを用いて還元して調製した。IgG, F(ab)₂およびFab'量は、280 nmの吸光度から算出した。

5. タンパク質不溶化セファロース4B

DNP化BSAおよびセラペプターゼは、GE Healthcare Bio-Sciences ABの添付文書に記載された方法に従ってCNBr活性化セファロース4Bに不溶化した。

6. アフィニティー精製抗体

家兔(抗-DNP化BSA) IgGはDNP化BSA不溶化セファロース4Bを用いて、DNP標識家兔(抗-セラペプターゼ) IgGおよび家兔(抗-セラペプターゼ) F(ab)₂はセラペプターゼ不溶化セファロース4Bカラムを用いてアフィニティー精製した。特異抗体はそれぞれのカラムから3.2

～3.5 mmol/L HCl, pH 2.5を用いて溶出させた後、1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0を加え中和した。

7. アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) Fab'- β -D-ガラクトシダーゼ複合体

1) マレイミド化 β -D-ガラクトシダーゼ

0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (1.0 mL) に溶解した大腸菌由来 β -D-ガラクトシダーゼ (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) (1.0 mg) にN,N-dimethylformamideに溶解した22 mmol/L o-phenylenedimaleimide (Aldrich Chemical Co., WI, U.S.A.) を加え、30℃にて30分間保温した。次に、緩衝液Aで平衡化したSephadex G-25カラム (1.0 × 30 cm) を用いてゲル濾過を行い、マレイミド化 β -D-ガラクトシダーゼを得た。

2) アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) Fab'- β -D-ガラクトシダーゼ複合体

緩衝液A (0.33 mL) に溶解したアフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) Fab' (0.20 mg) に緩衝液A (0.30 mL) に溶解したマレイミド化 β -D-ガラクトシダーゼ (0.68 mg) を加え、4℃にて終夜保温した。次に、緩衝液A (10 μ L) に溶解した100 mmol/L 2-mercaptoethylamine·HClを加え30℃にて30分間保温した。保温後、0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 g/L NaN₃および0.1 g/L BSAを含む0.01 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0で平衡化したUltrogel AcA22 (PALL BIOSEPPRA, Cergy-Saint-Christophe, France) カラム (1.5 × 45 cm) を用いてゲル濾過を行い、アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) Fab'- β -D-ガラクトシダーゼ複合体を得た。

8. DNP標識アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) IgG

1) マレイミド化家兎 (抗-セラペプターゼ) IgG

0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (1.5 mL) に溶解した家兎 (抗-セラペプターゼ) IgG (5.7 mg) にN,N-dimethylformamideに溶解した8.25 mmol/L EMCS (0.15 mL) を加え、30℃にて30分間保温した。次に、緩衝液Aで平衡化したSephadex G-25カラム (1.0 × 30 cm) を用いてゲル濾過を行い、マレイミド化家兎 (抗-セラペプターゼ) IgGを得た。

2) メルカプトアセチル化DNP

N,N-Dimethylformamideに溶解した0.1 mol/L DNP·HCl (0.112 mL) に0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (0.448 mL) およびN,N-dimethylformamideに溶解した200 mmol/L SATA (11.2 μ L) を加え、30℃にて30分間保温した。続いて、0.1 mol/L EDTA, pH 6.0 (28.6 μ L) および、1 mol/L hydroxylamine·HCl, pH 7.0 (6 μ L) を加え、30℃にて30分間保温し、メルカプトアセチル化DNPを得た。

3) DNP標識家兎 (抗-セラペプターゼ) IgG

緩衝液A (3.24 mL) に溶解したマレイミド化家兎 (抗-セラペプターゼ) IgG (4.0 mg, 27 nmol) にメルカプトアセチル化DNP溶液 (95 μ L, SH基として270 nmol) を加え、30℃にて30分間保温した。次に、緩衝液Aに溶解した100 mmol/L 2-mercaptoethylamine·HCl (33 μ L) を加え、30℃にて30分間保温した。保温後、0.1 mol/L NaClを含む0.01 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0で平衡化したSephadex G-25カラム (1.0 × 30 cm) を用いてゲル濾過を行い、DNP標識家兎 (抗-セラペプターゼ) IgGを得た。

4) DNP標識アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) IgG

DNP標識家兎 (抗-セラペプターゼ) IgGをセラペプターゼ不溶化セファロース 4 Bカラムを用いてアフィニティー精製し、DNP標識アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) IgGを得た。

9. アフィニティー精製家兎 (抗-DNP化BSA) IgG不溶化ポリスチレン小球

直径3.2 mmのポリスチレン小球 (イムノケミカル株式会社、岡山) に、アフィニティー精製家兎 (抗-DNP化BSA) IgG (0.1 g/L) を物理的吸着により不溶化した。ポリスチレン小球は、0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 g/L NaN₃および1 g/L BSAを含む0.01 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0中で4℃にて保存した。

10. セラペプターゼの酵素免疫測定法

試験管 (10×75 mm) に0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 g/L NaN₃および0.1 g/L BSAを含む0.01 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (50 μ L) に溶解した0.6 mg/mL家兎非特異的IgG、

血清試料 (50 μ L) またはセラペプターゼ標準溶液、および、3 mmol/L 2-mercaptoethylamine-HCl、1.0 mol/L NaCl、1 mmol/L MgCl₂、1 g/L NaN₃および0.1 g/L BSAを含む0.01 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (50 μ L) に溶解した50 fmol DNP標識アフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) IgGおよび25 fmolアフィニティー精製家兎 (抗-セラペプターゼ) Fab'- β -D-ガラクトシダーゼ複合体を加え、20℃にて終夜保温した。保温後、アフィニティー精製家兎 (抗-DNP化BSA) IgG不溶化ポリスチレン小球を2個入れ、20℃にて4時間振盪 (120回/分) 保温した。保温後、ポリスチレン小球を0.1 mol/L NaCl、1 mmol/L MgCl₂、1 g/L NaN₃および0.1 g/L BSAを含む0.01 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (2 mL) で2回洗浄した。ポリスチレン小球を取り出し、予め、0.1 mol/L NaCl、1 mmol/L MgCl₂、1 g/L NaN₃および0.1 g/L BSAを含む0.01 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 (100 μ L) を添加しておいた新しい試験管 (10 \times 75 mm) に移した。蛍光基質0.3 mmol/L 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (4 MUG) (LAMBDA FLUORESZENZ-TECHNOLOGIE Gesellschaft m. b. H., Graz, Austria) 溶液 (50 μ L) を加え30℃にて60分間震盪保温した。保温後、2.5 mLの0.1 mol/Lグリシン-NaOH緩衝液、pH 10.3 (2.5 mL) を加え、酵素反応を停止し、酵素反応により生じる4-methylumbelliferoneの蛍光強度を測定した。蛍光強度は、0.1 mol/Lグリシン-NaOH緩衝液、pH 10.3および同緩衝液に溶解した10⁻⁸ mol/L 4-methylumbelliferone (ナカライテスク株式会社、京都) 溶液を、それぞれ、0および100%として、FP-750形分光蛍光光度計 (日本分光株式会社、東京) を用いて測定した。

11. セラペプターゼ標準溶液

セラペプターゼを0.1 mol/L NaClを含む10 mmol/Lリン酸緩衝液、pH 7.0にて1 mg/mLとなるよう完全に溶解し、調製した。検量線用セラペプターゼ標準溶液は、これをプール血清にて0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 ng/mLとなるよう希釈して調製した。なお、日内変動、日間変動、安定性、添加回収率の検討では、セラペプターゼ標準溶液をプール血清で希釈し、0.5, 1.5, 5 ng/mLとした。

Ⅲ. 結果と考察

セラペプターゼは、*Serratia marcescens*が産生するプロテアーゼである。その経口製剤の吸収性についての検討は、ほとんど報告されてない。守谷ら⁴⁾はセラペプターゼの高感度測定法を開発し、さらにラットを用いて経口投与後の体内動態とその酵素活性を検討しており、炎症局所までセラペプターゼが移行し、かつ、酵素活性を有していることを示している。Moriyaら⁵⁾の定量方法は、アセトン処理により高感度測定を実現しているが、沈殿・再溶解操作により測定誤差が増加する可能性が考えられる。また、アセトン処理による沈殿物を回収するためには0.5 mL程度の血清試料が必要であると考えられ、小動物における同一個体からの頻回採血は、生体に対する負担が大きいと考えられる。今回我々は、50 μ Lの血清試料を用いて、アセトン処理を必要としない少ない操作ステップで、高感度かつ再現性のある酵素免疫測定法を開発したので報告する。

1. 検量線

検量線の検討は、検量線の各濃度における蛍光シグナル (T) から、検量線濃度「0」の非特異的蛍光シグナル (N) を差し引いた特異的蛍光シグナル (S, T-N=S) を算出した結果、添加したセラペプターゼ濃度に依存し、特異的蛍光シグナルの増強が認められた (Fig. 1)。また、データには示さなかったが、リン酸緩衝液で作

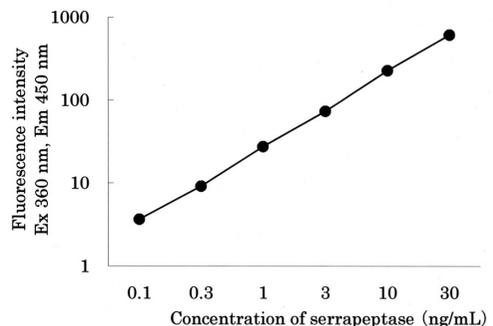


Fig. 1 Standard curve for serrapeptase by a highly sensitive enzyme immunoassay.

製した検量線に比して、イヌブール血清で作製した検量線は、1%程度の回収率であった。消化管から血中へ移行したセラペプターゼは、血中の α_2 -マクログロブリンと複合体を形成し、立体障害により抗原性がマスクングされることが報告されている^{6,7)}。したがって、血清中のセラペプターゼはDNP標識アフィニティー精製家兎(抗-セラペプターゼ) IgGおよびアフィニティー精製家兎(抗-セラペプターゼ) Fab'- β -D-ガラクトシダーゼとの結合が阻害され、回収率が低値を示したものと考えられた。しかし、ブール血清を用いて作製した検量線からMoriyara⁹⁾の定量方法と同程度の感度が得られており、本分析法では試料の精製ステップを省略し、以下の分析バリデーションを実施した。

2. 濃度化と定量範囲

血清試料の測定には血清で作製した検量線を用いることとした。濃度化(C)は、まず試料測定から得られた蛍光シグナル(T')からNを

差し引いた特異的蛍光シグナル(S', S'=T'-N)に対し、直近の上位および下位のSに相当する2つの検量線を選び、それぞれの1 ng/mL当たりの傾きaを算出し、その平均(a)を求めた。次に、得られたS'をaで除する(C=S'/a)ことで濃度(ng/mL)を算出した。定量範囲の検討では、0.01 ng/mLから特異的シグナルが認められ、N=5の検量線から求めた変動係数(C.V.)は、濃度に依存して小さくなる傾向にあった(Table 1)。0.1 ng/mL以上の濃度ではC.V.値が15%以下となり、30 ng/mLの濃度範囲まで良好な結果が得られた。これらの結果から、定量範囲を0.1~30 ng/mLとすることとした。

3. 再現性

1) 日内再現性

検量線1系列、0.5, 1.5, 5.0 ng/mLの3濃度の血清試料を、各濃度6回、定量法に従い分析し、検量線より定量値を算出した。精度、真度及び真度の95%信頼区間を確認した結果、変動係数すなわち精度は10%以内と良好であり、真度およびその95%信頼区間は±15%以内であった(Table 2)。

2) 日間再現性

検量線1系列、0.5, 1.5, 5.0 ng/mLの3濃度の血清試料を、各濃度2回、定量法に従い3日間分析し、検量線より定量値を算出した。精度、真度及び真度の95%信頼区間を確認した結果、変動係数すなわち精度は10%以内と良好であり、真度およびその95%信頼区間は±15%以内であった(Table 3)。

Table 1 Repeatability of calibration curve (N=5)

Concentration (ng/mL)	Mean (ng/mL)	S.D.	C.V.
0.00	0.00	0.00	
0.01	0.01	0.01	85.67
0.03	0.03	0.01	41.94
0.10	0.11	0.01	12.86
0.30	0.30	0.04	12.31
1.00	1.00	0.04	3.53
3.00	3.00	0.14	4.66
10.0	10.00	0.11	1.06
30.0	30.00	0.43	1.43

Table 2 Within-assay variation (N=6)

Theoretical values (ng/mL)	Mean (ng/mL)	S.D.	C.V.	Trueness (%)	95% Confidence Interval
0.50	0.49	0.03	6.2	-2.3	-8.9 ~ 4.3
1.50	1.38	0.07	4.9	-8.1	-13.2 ~ -3.0
5.00	4.62	0.21	4.6	-7.5	-12.3 ~ -2.8

Table 3 Between-assay variation(N=6)

Theoretical values (ng/mL)	Mean (ng/mL)	S.D.	C.V.	Trueness (%)	95% Confidence Interval
0.50	0.45	0.01	2.6	-10.3	-12.7 ~ -7.9
1.50	1.36	0.07	5.1	-9.2	-14.0 ~ -4.3
5.00	4.56	0.08	1.7	-8.9	-10.6 ~ -7.2

Table 4 Freeze and thaw stability

Theoretical values (ng/mL)	Measured value (ng/mL)	Residual Rate (%)
0.50	0.49	98.9
1.50	1.57	104.9
5.00	5.09	101.8

Table 5 Long-term stability (-30℃, 1 mon)

Theoretical values (ng/mL)	Measured value (ng/mL)	Residual Rate (%)
0.50	0.53	106.1
1.50	1.51	100.7
5.00	5.02	100.5

Table 6 Marginal recovery

Spiked concentration (ng/mL)	Measured value (ng/mL)	Recovery rate (%)
0.44	0.41	93.2
1.30	1.28	98.6
4.56	4.52	99.1

4. 安定性

1) 凍結融解時の安定性

0.5, 1.5, 5.0 ng/mLの3濃度の血清試料を調製し、24時間以上凍結後室温で融解した。以後、凍結、室温での融解サイクルを2回以上実施した後に分析し、検量線を用いて定量値を算出した結果、残存率は98%以上と良好な安定性が得られた (Table 4)。

2) 長期保存時の安定性

0.5, 1.5, 5.0 ng/mLの3濃度の血清試料を調製し、-30℃で1ヶ月凍結保存した後に分析し、検量線を用いて定量値を算出した結果、残存率は100%以上と良好な安定性が得られた (Table 5)。

5. 添加回収率

セラペプターゼを含有する血清にセラペプターゼ標準溶液を0.5, 1.5, 5.0 ng/mLとなるように添加し、検量線を用いて定量値を算出した。得られた定量値から添加したセラペプターゼの回収率を求めた結果、0.5 ng/mLの添加で93.2%、1.5 ng/mLの添加で98.6%、5.0 ng/mLの添加で99.1%と良好な回収率が得られた (Table 6)。

6. 従来法との相関

これまでに、Miyataら⁹⁾はRIA法で血中のセラペプターゼを測定しており、ラットに1 mg/kgの用量で静脈内投与した結果、投与直後から30分間でおおよそ3~30 μg/mLの範囲で血中セラペプターゼ濃度が変動することを報告している。また、Moriyaら⁹⁾は、アセトン処理した血漿試料を用いて酵素免疫測定法により血中セラペプターゼを測定しており、検出限界が50 pg/mLであること、ラットに100 mg/kgを経口投与した結果、投与後0.5~2時間で1.68~1.75 ng/mLの最高血中濃度を示すことを報告している。しかし、我々のこれまでの血中セラペプターゼ定量法の検討では、50 μL程度の少量の試料を用いてアセトン処理を行った場合、測定値のバラツキが非常に大きく、十分な精度が得られなかった。その原因として、アセトン処理による試料の損失および複雑な操作ステップによる測定誤差の増加が考えられた。アセトン処理による試料損失の影響を抑えるために、十分な血液試料を用いることも考えられたが、前述のように生体への負担を考慮すると、今回の我々の目的には適さない。従って、少量の同一試料を用い、アセトン処理を行う従来法および新たに開発した定量法における、相関性の検討は行っていない。今回確立した定量法は、少ない操作ステップで測定が可能であり、少量の試料においても高感度かつ精度の向上が期待されたため、定量法におけるバリデーションを実施することとした。なお、我々のイヌにおける検討では、血清中セラペプターゼの検出限界は10 pg/mLであり、2頭にセラペプターゼ50 mgを経口投与し、投与後2~4時間において3.2~7.0 ng/mLの濃度範囲を得ている。

IV. 結語

本研究では、血中セラペプターゼの測定に対する再現性および安定性において良好な結果が得られたことから、血中セラペプターゼの定量法として有用であると考えられる。開発した定量法は、簡便かつ、必要な血清量も50 μLであることから、小動物からヒトにおける血中セラペプターゼ濃度の経時的変化に応用できる可能

性があり、セラペプターゼの薬理作用における作用発現の解明の端緒となることが期待される。

文献

- 1) 大森 栄, 佐藤哲男: 消炎酵素剤, 薬局, 45: 2343-2347, 1994.
- 2) 杉浦 衛, 小木曾太郎他: 消炎酵素剤の製剤学的研究. 岐阜薬科大学紀要, 18: 54-66, 1968.
- 3) Poznansky MI and Cleland LG: Biological macromolecules as carriers and enzymes. Drug Delivery Systems, Oxford University Press, pp253-315, 1980.
- 4) 守谷教彦, 浅野正一 他: セラペプターゼのラットにおける腸管吸収性および炎症局所への移行性. 薬理と治療, 31: 659-666, 2003.
- 5) Moriya N, Mitsugu M et al.: Intestinal absorption of serrapeptase(TSP) in rats. Biotechnol Appl Biochem, 20: 101-108, 1994.
- 6) Miyata K, Tsuda M and Tomoda K: Determination of serratia protease by radio-immunoassay. Anal Biochem, 101: 332-338, 1980.
- 7) Tomoda K: Intestinal absorption and crystal structure of serrapeptase. Bull Pharma Res Technol Inst, 6: 9-14, 1997.