乳糖分解酵素製剤の比較研究

篠田雅人, 太田節子, 古川真知子, 山下三郎,*¹ 宇佐美英治*²星薬科大学生化学教室,*¹ 茅ヶ崎市立病院薬剤科*²

Comparative Studies on Lactase Preparations

MASATO SHINODA, SETSUKO OHTA, MACHIKO FURUKAWA,
and SABURO YAMASHITA,*¹ EIJI USAMI*²Department of Biochemistry, Hoshi College of Pharmacy*¹Department of Pharmacy, Chigasaki City Hospital*²

(Received July 10, 1981)

Comparisons of enzymatic activities of five commercial lactase preparations were made in terms of the sensory tests of such properties as appearance, smell and taste. β -Galactosidase activities were different among preparations, and the activity was found to be higher or lower than the labelled activity of the respective preparations. Stability of the enzyme activity at various temperatures and pH was also different among preparations. Marked characteristics of other enzymes contained were also shown in the potency test and sensory test.

Keywords— β -galactosidase ; lactase ; enzyme preparation ; curdling activity

近年, 乳糖分解酵素製剤は乳児下痢症の積極的な療法の一つとしてその効果が認められ, 特に下痢症の大部分を占める二次性乳糖不耐症の治療薬として一般に汎用されている。現在市販されている乳糖分解酵素製剤には5社の製品があり, いずれも *Aspergillus oryzae* の産生する耐酸性 β -ガラクトシダーゼを主成分とする粗抽出物である。しかし, 使用している株の差, 製造法の差により, β -ガラクトシダーゼ以外の酵素の混入が十分考えられ, サッカラーゼ, アミラーゼの存在が報告されている製剤もある。¹⁾ そこで, この5種類の乳糖分解酵素製剤について, 含有している酵素の力価ならびにそのpHおよび温度に対する安定性, 種々の混在する酵素の活性, さらに官能試験等を行い比較検討した。

実験方法

1. 試験製剤

検体として試験した製剤はいずれも白色の粉末であ

り, そのロット番号を表1に示した。

表1. 試験製剤

検 体	Lot No.
A	000404 E, 001503 L*, 000503 G*
B	M J 08, L T 05*, M F 04*
C	42 B 3 C, 36 B 9 A*, 3 Y B 3 A*
D	914036
E	W3006 A, W3002 A*, J 3005 A*

* は力価についてのみ測定

2. 酵素活性の測定

検体の調製: 各製剤は0.1%の濃度に再留水で用時調製し, 測定法に応じてさらに pH4.5 の McIlvaine buffer で適宜希釈した。

1) β -ガラクトシダーゼ活性

力価の測定: 正確に濃度 10 μ g/ml に希釈した検体 0.5ml を 5.0mM ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) 基質 (和光純薬) 3.5ml に加え, 30°, 10 分間保った後, 1 M 炭酸ナトリウム溶液 1ml により反応を停止させ, 生じた o-nitrophenol を波長 420 nm で

*¹ 東京都品川区荏原 2丁目 4-41; 4-41, Ebara 2-chome, Shinagawa-ku, Tokyo, 142 Japan

*² 茅ヶ崎市茅ヶ崎 50; 50, Chigasaki, Chigasaki-shi, Kanagawa, 253 Japan

測定することにより得られる ONPG 単位で表わした。²⁾ただし、ONPG 単位は30°, 1分間に1 μ mol の ONPG を水解する時の活性を1とした。

至適温度の測定: pH 4.5 の McIlvaine buffer で調製した ONPG 基質を用い、各検体(濃度5 μ g/ml)について、25—60°の間の種々の温度で10分間酵素反応を行い、比色定量した。

至適 pH の測定: ONPG 基質を McIlvaine buffer で pH 2.5—6.5 の間の種々の pH に調製し、各検体(濃度10 μ g/ml)を加え、30°, 10分間酵素反応を行い、比色定量した。

熱に対する安定性の測定: 検体(濃度10 μ g/ml)を35—70°で10分間加温した後、pH 4.5 の ONPG 基質と30°, 10分間酵素反応を行い求めた活性について、未処置の活性に対する残存率(%)を求めた。

pH の変化に対する安定性の測定: 検体(濃度20 μ g/ml)を pH 2.5—8.5 の McIlvaine buffer または pH 9.0—10.0 の Na₂CO₃—NaHCO₃ buffer で調製後、30°で1時間インキュベートした後、pH 4.5 の ONPG 基質を加え、30°, 10分間酵素反応させ、未処置の検体と比較して残存率(%)を求めた。

2) プロテアーゼ活性

カゼイン-フォリン呈色法³⁾に準じ、カゼイン(Merck)を0.6%になるように、0.05M リン酸二ナトリウム溶液に溶かし、pH 7.0 に調整して基質とした。検体(濃度50mg/ml, [B] は10mg/ml)は30°で10分間保ち、別に30°に予温した基質を加え、10分間反応させた後、0.44M トリクロル酢酸を混和し、30分後に上澄についてフォリン試液により呈色させ、660nm で定量した。プロテアーゼ力価はクロジン標準液(国立衛試)を用い、30°で1分間に1 μ gのクロジンに相当する非タンパク性物質を生成する酵素活性を1単位とした。

3) トリプシン活性

Kunitz⁴⁾の方法に準じ、カゼイン(Merck)を0.1M phosphate buffer (pH 7.6)に溶解し、1%として基質とした。検体(50mg/ml, [B]のみ5mg/ml)を基質に加えて35°, 20分間反応させた後、5%トリクロル酢酸溶液を加えて30分間放置する。その上澄を280nm で比色定量し、トリプシン標準品(Sigma T8253)により求めた検量線からトリプシン量を算出した。

4) 凝乳活性

Lundsteen の方法⁵⁾に準じ、カゼインを含む市販の粉乳(明治製菓 FM-S ソフトカード)26g に60°の温湯100ml を加えて溶解し、0.2N HCl を用いて pH 5.3 に調整後、さらに pH 5.3 の 0.1M citrate buffer 40ml を

加え、水で全量 200ml として基質とした。検体(200mg/ml, [B]のみ 20mg/ml)の0.1—1ml に再蒸留水を加えて全量1mlとしたものに基質10mlを加え、30°, 10分間反応させた後、黒い背景を用い、試験管の斜め上方から照明しつつ、試験管をゆるく回転し、管内壁に生ずるフィルム中のパラカゼインを白い凝固物の有無として肉眼的に観察した。凝乳活性値は30°において1分間に1mlのミルク(pH 5.3)を凝乳させる検体の濃度で示した。

5) アミラーゼ活性

Ceska⁶⁾の blue starch を用いる方法に準じ、検体(2mg/ml, [B]のみ 100mg/ml)0.5ml に再留水4.0mlを加え、37°で5分間加温した後、blue starch polymer 錠剤(第一化学薬品)を1錠加え、ミキサーで10秒間混和する。さらに37°, 30分間反応させた後、0.5N NaOH 溶液を加え、遠沈する。加水分解により生じた青色色素の結合したデンプン分解物を含む上澄を620nm で比色定量し、国際単位で示した。

6) カタラーゼ活性

過酸化水素水(30% W/V, 三菱瓦斯化学)0.16ml を pH 7.0 の 0.066M phosphate buffer で100ml に希釈した溶液3mlに検体(100mg/ml)0.05mlを加えた後、15秒後と30秒後の吸光度を240nm で測定し、Bergmeyer⁷⁾に従ってカタラーゼ単位を算出した。

7) ホスファターゼ活性

Bessey⁸⁾の方法に従い、アルカリホスファターゼ活性と酸ホスファターゼ活性を測定した。p-ニトロフェノールリン酸二ナトリウム0.4gを0.001N HCl に溶解して100mlとし、少量のクロホルムを加えて基質原液とする。アルカリホスファターゼの場合は基質原液に等量のアルカリホスファターゼ用 buffer を加えて pH 10.3 に調整した基質液1.0mlに検体(20mg/ml, [B]のみ10mg/ml)0.1mlを加え、37°, 30分間反応させた後、0.1N NaOH 4.0mlを加え、415nm で比色定量し、Bessey 単位で示した。酸ホスファターゼの場合は基質原液に酸ホスファターゼ用 buffer を等量加えて pH 4.8 に調整した基質1.0mlに検体(10mg/ml, [B]のみ1mg/ml)0.2mlを加え、37°, 30分間反応させた後、0.1N NaOH 4.0mlを加え、415nm で比色定量し、Bessey 単位で示した。検量線の作成には0.05mM p-ニトロフェノール基準液(和光純薬)を用いた。

3. 官能試験

女子学生20人を対象として、薬包紙上の各製剤について、外観および臭い、味を比較させ、順位をつけた。

4. 溶解性

検体 0.5 g に再留水 20 ml を加え、静かに振とうして一定の溶解状態になるまで観察した。

結 果

1. β -ガラクトシダーゼ活性の比較

各検体の力価を表 2 に示した。いずれの製剤も表示単位は 5000 ONPG 単位/g であるが、[A] は 3 ロットともに 10% 以上の増量を示し、[B] はいずれもわずかな低減がみられた。

pH 4.5 での至適温度を 25—60° の範囲で検討した結

表 2. β -ガラクトシダーゼ活性の比較

検体	Lot No.	β -ガラクトシダーゼ活性 (ONPG 単位/g)	
		測定値	平均±標準誤差
A	001503 L	5571	5590±57
	000503 G	5502	
	000404 E	5698	
B	L T 05	4592	4840±12
	M J 08	4951	
	M F 04	4977	
C	36 B 9 A	4714	5228±26
	42 B 3 C	5446	
	3 Y B 3 A	5525	
D	914036	5038	
E	W3002 A	4867	5069±32
	W3006 A	4890	
	J 3005 A	5451

図 1. 至適温度

果、図 1 に示すように [B] は 50° で、他はいずれも 55° で最高の活性を示した。

温度 30°, pH 2.5—6.5 の範囲での至適 pH を測定した結果、図 2 に示すように、[B] と [E] は pH 4.0 で最大、[A][C][D] は pH 4.8 付近で最大の活性を示した。また、[B] 以外はいずれも pH 2.5 でも約 60% の、また pH 6.5 では約 42% の相対活性率を示したのに対して、[B] はこれらの pH 付近ではまったく活性を認めなかった。

各検体を水溶液の状態 で 10 分間、種々の温度で加温して、熱に対する活性の安定性を測定した結果

を図 3 に示した。[A][C][D][E] は 55° ま で安定であり、60° で 15—30% の減少、65° ではほとんど活性が認められなくなった。しかし [B] のみは 55° で残存活性が約 50% となり、60° ですでに失活した。

種々の pH の溶液中に 30°, 1 時間保ったのちの残存活性を図 4 に示した。検体はすべて pH 4—8 の間では安定であったが、[B] のみは pH 3 以下、あるいは 9 以上で残存活性が 0 近くに激減し、他の検体と異なる傾向を示した。

2. 各種含有酵素活性の比較

検体中に含有されている β -ガラクトシダーゼ以外の各種酵素活性について測定し、図 5 に示す結果を得た。

プロテアーゼ活性、トリプシン活性、凝乳活性、酸ホスファターゼ活性については [B] に著しく強く認められ、他の検体には少量し

図 2. 至適 pH

図3. 熱に対する安定性

図4. 種々のpHでの安定性

図5. 各種含有酵素活性の比較

か含有していない。アルカリホスファターゼ活性は[B]と[D]に認められた。アミラーゼ活性とカタラーゼ活性は[A][C][D][E]に強く認められるのに対して、[B]にはごく微量しか認められなかった。

3. 官能試験および溶解性

外観, 臭い, 味についての官能試験の結果を図6に示した。また試験管内で水に溶解させた時の状態と, 口の中での溶け具合を表3に示した。

色については[A][B][C]が白く, 美観については[C]がきわめて良いことを示しており, 臭いについては[C][E]が少なく, [B]がきわめて強い。味は[C]がもっとも良いことを認めた。また, 溶解性については[A]

図6. 官能試験結果

表3. 製剤の溶解性

検体	溶解性	透明度	白色度	口中での感覚
A	+	++	+	やや甘く, 臭いが気になる, ザラザラしている
B	++	++	±	やや甘く, サラッとしている
C	++	+	++	甘みが強く, サラッとしている
D	±	±	++	味が無い, ダマになる
E	±	±	±	やや甘く, 臭いが少しある, ダマになる

++: より良い, +: 良い, ±: 普通

[B][C]が比較的良好であることを認めた。

考 察

乳児下痢症の大部分の主因は, 胃腸炎, 急性感染症, 各種抗生物質の菌交代現象などにより, 腸内の乳糖分解酵素が欠損または低下したために起こり, 慢性化した場合にも乳糖分解酵素の投与により症状が改善された臨床例が数多く報告されている。¹⁾ しかし乳糖分解酵素製剤の主成分であるβ-ガラクトシダーゼは酸性で不安定であり, 胃での失活が懸念されるので, できるだけ酸性側で安定な製剤が望まれる。大塚ら⁹⁾は, 乳児の哺乳前の胃液はpH 2-3, 授乳1時間後はpH 6を保ち, 2時間後はpH 4となり, 以後急激に低下すると述べている。本報の種々のpHでの安定性試験では[B]を除く4製剤がpH 3で60-80%以上の活性を示していることから, 授乳時にミルクに溶かして投与すれば, 大部分は乳汁とともに空腸へ移行し効力を発揮すると思われる。[B]はpH 3でほとんど失活することから, 長時間胃に滞在するならば効力は期待できない。いずれの製剤もpH 2.5では0-35%に残存活性が低下することから, 空腹時の投与は不可能で, 常にミルクと併用させることが必要である。

図3に示すように, [B]を除く4製剤は55°まで安定, 60°でもかなり残存するが, [B]は55°ですでに50%が失活した。これらのことからいずれの製剤も添加する際のミルクの温度に十分注意する必要がある。最近では乳糖分解酵素製剤に成人の活動性潰瘍性大腸炎, 胃切除後の吸収不良, 経口制癌剤投与後の下痢症等に対する効果が期待されている。¹⁰⁾ 重篤な吸収障害では小腸のbrush borderに存在する種々の酵素の低下がみられることから,^{11,12)} 製剤中に存在する各種の酵素活性の変動はこの方面での応用の際の選択基準の1つとなり得ると考えられる。

図5の結果より[B]は他の4製剤と相い反する傾向を示し, 特徴が認められた。官能試験の結果も併せて考えると, [A][C][D][E]の4種は類似した性質であるが, [B]のみが異なることを認めた。また, β-ガラクトシダーゼの力価について, セロファン包装である[B]と[E]に表示単位を下回っているものがあり, これは吸湿などによる失活も考えられ, 包装材料あるいは方法による製剤の安定性の問題として留意しなければならないと思われる。また, [A]は表示単位をいずれのロットも10%以上上回っていたが, この場合も正確な投与量に影響を与えるという点で問題になると考える。

結 語

市販の乳糖分解酵素製剤5種について含有酵素活性および官能試験を行った結果、次のことを認めた。

1. β -ガラクトシダーゼ活性については、含有量がロットにより若干のバラツキを示すが、[B]は表示単位より低減が、また[A]には増量が認められた。

2. 熱およびpHの変化に対して[B]は他の検体と比較して不安定であった。

3. β -ガラクトシダーゼ以外の含有酵素について、[B]にタンパク分解酵素と酸ホスファターゼが、[B][D]にアルカリホスファターゼが、[A][C][D][E]にアミラーゼとカタラーゼの活性が認められた。

4. 官能試験の結果からは[C]がもっとも優れていることを認めた。

謝辞 本研究に協力していただいた佐藤信子、辻友代、内藤佐世子の諸氏に感謝します。

文 献

1) 青木継稔, 神坂 陽, 星野道雄: 小児科診療, 33,

994 (1970).

- 2) Y. Tanaka, A. Kagamiishi, A. Kiuchi: J. Biochem., 77, 241 (1975).
- 3) G. E. Perlmann, L. Lorand: "Methods in Enzymology", Academic Press, 19, 389 (1970).
- 4) M. Kunitz: J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947).
- 5) E. Lundsteen: Biochem. Z., 295, 191 (1938).
- 6) M. Ceska, K. Birath, B. Brown: Clin. Chim. Acta, 26, 437 (1969).
- 7) H. U. Bergmeyer: "Methods of Enzymatic Analysis" Academic Press, 885 (1965).
- 8) O. A. Bessey, O. H. Lowry, M. J. Brock: J. Biol. Chem., 164, 321 (1946).
- 9) 大塚親哉, 高橋系一, 吉川俊夫: 現代医療, 4, 97 (1970).
- 10) 下山 孝, 大野忠嗣, 西村正二, 堀 信治, 森沢英一, 里見匡迪, 田村和民, 福田能啓, 久本 卓, 西山洋周: 現代医療, 10, 689 (1978).
- 11) A. M. Ugolev, P. De Laey: Biochem. Biophys. Acta, 300, 105 (1973).
- 12) 下山 孝, 三川 清, 大野忠嗣, 佐々木義徳, 柳谷重利, 河田康一: 診断と治療, 61, 1609 (1973).

薬価基準収載品

肝機能賦活・催胆剤

(剤) **スルファレム[®]丸/錠**

効能・効果

☑胆のう症(胆のう炎, 胆石症, 胆道ジスキネジー), 急・慢性肝炎, 肝硬変における利胆

☑胆のう・胆道造影効果の増強

作 用

催胆/尿素サイクル賦活/解毒機能亢進/コレステロール量調整

*添付文書をよく読んでご使用下さい

提携 ラテマ社(フランス)

扶桑薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2丁目50番地