U. D. C. 661.185.4:577.153.204

327. 松村久吉, 井口定男, 西田守衛: 非イオン性界面活性剤により可溶化された物質のミセルに就いて (第2報*)

Pancreatic Lipase に対する非イオン性界面活性剤の影響 その1

Hisakichi Matsumura, Sadao Iguchi, and Morie Nishida: On Nonionic Surfactant Micelle Swollen by Solubilizate. II.

The Effect of Nonionic Surfactants on Pancreatic Lipase. (1).

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyushu**)

Effect of nonionic surface active agents on the olive-oil decomposition with pancreatic lipase was examined. Of the agents used, both Brij 35 and Tween 80 activated the olive-oil decomposition in low concentrations but obstructed the decomposition in higher concentrations. Span 80 and 85 showed reverse phenomena, obstructing the decomposition in lower concentrations and activating in higher concentrations. This is chiefly due to the hydrophile-lipophile balance and this was evident from the results obtained by mixing Tween 80 and Span 85 to prepare mixtures of various hydrophile-lipophile balance. Activation agents with large balance activates the enzyme in lower concentrations and inhibits in higher concentrations, while the reverse is true of those with small balance.

The same examination was made with anionic surface active agents, sodium dodecylsulfate, and carbowax, but all effected obstruction of decomposition and none showed any activation. The presence of calcium ion was found to make Brij 35 and Tween 80 inhibit enzymatic action even in lower concentrations, while the presence of dextrin and glucose had no effect on Brij 35 and Tween 80 in an amount five times that of the enzyme. The concentration of Tween 80 in activating pancreatic lipase was found to be affected by the amount of the enzyme rather than that of olive oil.

(Received September 3, 1956)

非イオン性界面活性剤は医薬品部門に於ても優れた乳化剤、可溶化剤として広範に用いられるようになり、これ等を使用した製剤も既に多数にのぼっている。そしてかかる活性剤の応用は乳化、分散、可溶化等の本来の目的以外に、或場合には薬物の腸内吸収を促進するという特徴を発揮して、薬剤学的に誠に興味ある問題を提供している。しかしながら一面また Tween 類は lipase に対して基質となり^{1,4)}、阻害作用もなすという報告もあつて^{5,6)}、なお検討を要する余地も多い。著者らはかかる非イオン性界面活性剤を使用した薬剤を摂取した場合に当然遭遇し、検討すべき問題の一つとして lipase との相関々係をとりあげ、その間の機構を明らかにする目的で本研究を行った。

そこで先ず基質としてオリブ油を用い、非イオン性界面活性剤の pancreatic lipase (PL) に対する阻害及び賦活作用を検討した次第である。その結果 PL のオリブ油の分解は非イオン性界面活性剤の濃度、HLB (hydrophile-lipophile balance) 及び添加 Ca^{++} に関係があり、また非イオン性界面活性剤の濃度はオリブ油の量よりむしろ酵素の量と密接に関係する事を先ず見出した。

実験に用いた非イオン性界面活性剤は Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monoöleate), Span 80 (sorbitan monoöleate), Span 85 (sorbitan trioleate) 等のエステル結合を有するもの、及びエーテル結合より成る Brij 35 (polyoxyethylene lauryl ether) で、Tween, Span は何れもガラスフィルター (No. 3) で濾過して使

* 第1報: 本誌 76, 515(1956).

** Katakasu, Fukuoka.

1) R. M. Archibald: J. Biol. Chem. 165, 443(1946).

2) G. Gomori: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 58, 362(1945).

3) R. A. Boissonnas: Helv. Chim. Acta 31, 1571(1948).

4) E. Bozzett: Boll. soc. ital. biol. sper. 28, 1087(1952) (C. A. 48, 12185(1954)).

5) F. N. Minard: J. Biol. Chem. 200, 657(1953).

6) E. D. Wills: Biochem. J. (London) 60, 529(1955).

用した。なお対照としては陰イオン性界面活性剤、市販ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) をエタノールから再結晶して使用し、またその他 Carbowax 1500 及び 4000 をも使用した。一方基質としては日局オリブ油[†]を用い、酵素液はパンクレアチン原末[‡]の懸濁水溶液を使用した。

実験結果 1) 非イオン性界面活性剤の影響 (Fig. 1) : Brij 35, Tween 80, Span 80 及び 85 の濃度を 0~12% (w/v) 迄変化させると、親水性の強い活性剤 Brij 35 は 0.06%迄は次第に分解割合を増し、それ以上では次第に低下し、0.13%以上になると Brij 35 の存在しない時よりも低下する。また Tween 80 も同様に 0.6% に極大が生じ、1.8%以上では阻害を現わし、Brij 型と Tween 型では構造による差は見られずむしろ類似した傾向を示す。しかし親油性の強い活性剤では逆の現象を示し、Span 80 及び 85 では低濃度で極小を生じ高濃度で賦活の方向に向う。

Fig. 1.

Effect of Nonionic Surfactant on Hydrolysis of Olive Oil by Pancreatic Lipase

Throughout the experiment, hydrolysis rates were represented as compared with standard (=100) containing no surfactants nor additions.

2) Carbowax 及び SDS による阻害 (Table I) : Carbowax 1500 及び 4000 ともに高濃度に於て阻害作用を示す。即ち 12% (w/v) でそれぞれ 15%, 41%阻害するが、Brij 35 及び Tween 80 に於てみられるような低濃度での賦活は全く認められず、阻害の程度は重合度の大きい Carbowax 4000 の方が大である。また SDS は CMC (critical micelle concentration) よりも低い濃度で既に 100%の阻害をなす。

Table I. Inhibition of Carbowax and SDS on Hydrolysis of Olive Oil by Pancreatic Lipase

Concn. (%)	Carbowax		SDS	
	1500	4000	Concn. (10 ⁻² %)	Inhibition (%)
	Inhibition (%)			
1.2	2	2	0.6	55
2.4	2	10	1.2	71
3.6	8	15	1.8	81
6.0	12	31	2.4	91
8.4	14	35	3.0	94
12.0	15	41	3.6	100

3) HLB の影響 (Fig. 2) : Fig. 1 に於て非イオン性界面活性剤の親水性と親油性のバランスが PL のオリブ油分解に関係の有る事がうかがわれたので、Tween 80 と Span 85 の混合比を変えて種々の HLB の活性剤を作り、濃度の影響を検討すると HLB が 15.0 より 11.7, 8.4 と低下すると、即ち親水性が低下すると賦活の範囲は広くなり、5.1 では低濃度で阻害作用が現われて来る。更に低下して 3.3 になると、即ち親油性の増加では Span 80 の場合と同様な傾向がうかがわれる。

4) Ca⁺⁺ の影響 (Fig. 3, Table II) : オリブ油のみの時は Ca⁺⁺ の添加量に比例して PL は賦活されるが、Brij 35 の存在するときはその濃度により異なつた影響を受けるが、何れも Ca⁺⁺ の添加により先ず阻害され、

[†] 酸度 0.9, 鹼化価 191.

[‡] 大日本臓器研究所製品.

Fig. 2. Relation between HLB value of Nonionic Surfactant and Hydrolysis of Olive Oil by Pancreatic Lipase

Table II. Effect of Ca^{++} on Hydrolysis of Olive Oil by Pancreatic Lipase when Tween 80 is added

CaCl_2 (10^{-2} mM)	0	0.38	0.76	1.14	1.52	1.90	2.66	3.80
Tween 80 (%)	Rate of hydrolysis							
0	100	116	—	144	—	171	204	253
0.06	121	105	—	133	—	162	194	238
0.6	226	159	60	61	130	148	183	221
6.0	19	19	—	19	—	23	26	26

更に添加すると賦活の方向に向い極小を生ずる (Fig. 3). しかし Ca^{++} の添加は Brij 35 の存在しない場合の方が良好である. 即ち Ca^{++} の存在で Brij 35 は PL に対して阻害作用をなす. また Tween 80 でも同様な事が見られる (Table II).

5) 糖類の影響: デキストリン, 乳糖, ブドウ糖の添加は酵素の 5 倍量迄は Brij 35 及び Tween 80 に於ては影響は見られなかった.

6) Tween 80 とオリブ油, 及び酵素量との関係 (Table III): 先ず酵素の量を 20 mg としてオリブ油の量を変えて Tween 80 の各濃度に於ける PL の影響を見ると Tween 80 の同じ濃度に於て極大が現われるが, 次にオリブ油の量を 0.84 g として酵素の量を変化させると, 酵素の量が増すと次第に PL を最大に賦活する Tween 80 の濃度が増加して来る.

Table III. Effect of Tween 80 on Hydrolysis of Olive Oil by Pancreatic Lipase when Olive Oil/Tween 80 and Enzyme/Tween 80 Ratio are varied

Olive oil (g.)	Tween 80 (%)	0	0.2	0.5	1.0	1.5
Enzyme (mg.)	Rate of hydrolysis					
0.42	20	48	98	168	140	40
0.84	10	50	176	160	85	29
"	20	100	156	242	207	91
"	30	147	174	252	281	216
1.68	20	199	224	384	214	97

考 察 PL の非イオン性界面活性剤による賦活及び阻害をみると, Wills⁹⁾は Lubrol MO (fatty alcohol-ethylene oxide condensate) のみは僅かに賦活するが, 他の非イオン性界面活性剤は低濃度に於ては影響はな

Fig. 3. Effect of Ca^{++} on Hydrolysis of Olive Oil by Pancreatic Lipase when Brij 35 was added.

く、高濃度に於て阻害するといっているが、賦活は HLB の大きい Brij 35, Tween 80 では低濃度に於て現われ、極大は CMC (Brij 35 では 0.01%以下 (22°); Tween 80 では 0.05%以下 (19°)) よりも大きな濃度に現われ (Fig. 1), HLB の低下により極大は次第に高い濃度に移り賦活する濃度領域も広がるが、更に低下すると、即ち活性剤が o/w 型より w/o 乳化型に適当な如く変化すると、低濃度で阻害が現われてくる (Fig. 2). 川上⁷⁾によれば CMC が HLB と直線的関係にあるといわれているが、この賦活及び阻害は CMC よりもむしろ HLB に直接関係があるものと思われる。

陰イオン性界面活性剤である SDS は Wills^{8,9)}によれば triacetin 及び triolein の PL による分解は阻害されるが tributyrin は賦活されるといっているが、オリブ油の場合は CMC 以下の濃度で既に 100%の阻害をなす (Table I).

なお Wills⁸⁾は陽イオン性界面活性剤 hexadecylpyridinium bromide は PL の triolein 分解には低濃度で賦活し高濃度で阻害するといひ、Brij 35 及び Tween 80 に於けると同様な結果を得ている。

Ca⁺⁺ は PL のオリブ油の分解を促進するが Brij 35 及び Tween 80 の存在により阻害をなす。Brij 35 及び Tween 80 の低濃度で賦活されたものが Ca⁺⁺ の添加量を増して行くと次第にオリブ油の分解量を減少して極小を生じ、更に添加量を増すと分解量を増加する。高濃度ではその変化が小である。しかしいずれの場合でも Ca⁺⁺ の存在で Brij 35 及び Tween 80 は阻害するようになる (Fig. 3, Table II). Wills^{8,9)}は PL の Ca⁺⁺ による賦活は SDS により calcium dodecylsulfate の生ずる事により無効になり、hexadecylpyridinium bromide の賦活も Ca⁺⁺ の存在では阻害を示すようになるという。また Atkins 等⁹⁾によれば非イオン性界面活性剤の polyethylene oxide chain に Ca⁺⁺ が結合するといつてゐる。故に Ca⁺⁺ の存在に於ける Brij 35 及び Tween 80 の阻害はかかる結合によるものであらうと考えられる。なお Minard⁹⁾が Tween 類が PL を 0.02~0.04%の低濃度で阻害するというのは Ca⁺⁺ の存在下での実験により阻害が現われたものであらう。

Tween 80 とオリブ油との量的関係では Tween 80 に対してこの実験の如く多量のオリブ油を用いる時には油の量を 1/2, 2 倍と変えても賦活する Tween 80 の濃度には変化がなく、一方酵素の量を 10, 20, 30 mg と変えて行くに従つて賦活する Tween 80 の濃度は次第に高い方に変つて行き、このような条件下では Tween 80 と酵素蛋白との間により一層関係が有るものと思われる。

結 論 非イオン性界面活性剤の PL のオリブ油分解に対する影響は活性剤の HLB に密接な関係があり、HLB の大きい Brij 35 及び Tween 80 では低濃度で賦活し高濃度では阻害をするが、HLB の小さい Span 80 及び 85 では低濃度で阻害し高濃度で賦活の方向に向う。

しかし Ca⁺⁺ の存在では Brij 35 及び Tween 80 はともに低濃度でも阻害するようになる。また Tween 80 の PL 賦活の濃度はオリブ油の量よりもむしろ酵素の量に一層影響される。

本実験を通じ種々御援助戴いた三生製菓株式会社林 勝三氏及び株式会社大日本臓器研究所に感謝する。

実 験 の 部

酵素の活性度の測定 M/15 磷酸塩緩衝液 (PH 8.1) 2 cc, オリブ油 0.84 g, 蒸留水 2 cc の混液に 20 mg/cc の懸濁酵素液 1 cc を加え 37° で 1 時間振盪し*, 後エタノール 20 cc 及びエーテル 10 cc を加え, 1%フェノールフタレイン溶液を指示薬として 0.05 N アルコール性 KOH で滴定する。対照としてオリブ油を加えない液について同様な操作を行い、この値及びオリブ油の KOH 消費量を差引く。分解の程度は活性剤及び添加物の存在しない時の値を 100 として比較した値で表わした。なお活性剤その他の添加物を使用する時は蒸留水の代りに加え、活性剤の濃度は水溶液部 5 cc 中の濃度で表わした。また Tween 80, Span 80 及び 85 はエステル型であり PL により分解を受けるがオリブ油の存在するときもしないときも同じ程度に分解されるものとみなした。

その他の値の測定 1) CMC の測定: CMC の測定は Du Noüy 表面張力計を使用し室温で測定した。2) pH の測定: 緩衝液の pH 測定には硝子電極 pH メーターを使用した。3) HLB の測定: Tween 80 及び Span 85 の HLB はそれぞれの鹼化価を測定しその値より計算し¹⁰⁾, (HLB=20 (1-S/A)), Tween 80 と Span 85 の混合物の HLB は混合割合より計算した⁷⁾。

九州大学医学部薬学科

7) 川上: 科学 23, 546(1953).

8) E. D. Wills: Biochem. J. (London) 57, 109(1954).

9) T. M. Doshier, G. E. Myers, D. C. Atkins: J. Colloid Science 6, 223(1951).

* この条件では PL は 1 時間に 0.2 mM の酸を遊離する。

10) Atlas Chemical Memos: Chem. Eng. News 33, 1976(1955).