

乳糖分解酵素製剤の品質比較 (1)\*<sup>1</sup>

井上良則, 大石輝雄, 橋口信彦, 清水捷宏

東洋工業株式会社東洋病院薬局\*<sup>2</sup>Qualitative Comparison between Lactase Preparations (1)\*<sup>1</sup>YOSHINORI INOUE, TERUO OOISHI, NOBUHIKO HASHIGUTHI,  
and KATSUHIRO SHIMIZUPharmacy Section, Toyo Hospital of Toyo Kogyo Co., Ltd.\*<sup>2</sup>

(Received January 29, 1981)

Physicochemical properties of four commercial lactase preparations (Galantase, Organase, Lactyme and Lamitase) and an investigational new drug (ORG-FG) were compared. Lactyme showed better results than any other drug in any study and Galantase was not suitable for dispensing. It is recommended that enzyme assay be carried out under the following conditions: reaction temperature 30° and reaction time 10 minutes; a sample concentration be measured at OD of 0.30–0.50.

現在, 乳糖不耐症の治療薬として乳糖分解酵素(ラクターゼ)製剤が使用されているが, その主成分であるβ-ガラクトシダーゼ(以下β-GLとする)は自然界に広くその存在を確認されている。特に微生物起源の酵素として多くの報告<sup>1-9)</sup>がなされ, β-D-ガラクトシド結合を加水分解してD-ガラクトースを遊離する分子量10数万(*Escherichia coli* 産生酵素は54万)<sup>5,6)</sup>の蛋白質として知られている。しかしこれらの中には, 合成ガラクトシド結合を良く分解するが天然ガラクトシド結合を有する乳糖を分解する能力の弱い酵素<sup>9)</sup>や, 酸に対して不安定な酵素<sup>1)</sup>も存在することから, 临床上では *Aspergillus oryzae* 産生の耐酸性β-GLがラクターゼとして使用されているにすぎない。<sup>6,9)</sup>

今回, 著者らは *Asp. oryzae* YNI-1777 産生のβ-GLを主成分とする治験薬を入手する機会を得たので, 市販ラクターゼ製剤4製品とともに若干の品質試験を行った。また力価比較のために測定条件の検索を試みたので併せて報告する。

## 実験方法

## 1. 試料

同一時期に製造された製品を試料とした(表1に示す)。なお市販品の有効期限は製造後2年とされている。

表1. 試料

試料名	Lot No.	有効期限
G-TT	MMO 1	S. 56.7
O-ON	W4002A	S. 56.6
L-WM	46DOB	S. 55.6
L-NK	000115A	S. 57.1
ORG	SO39YA	(治験薬)

## 2. 物性試験

- 1) 逃飛率: コニシ HK 型逃飛率測定器を用い, 青木らの方法<sup>10)</sup>に準じて測定した。
- 2) 安息角: コニシ FK 型安息角測定器を用い, 青木らの方法<sup>11)</sup>に準じて測定した。
- 3) 溶解性: 再分散性試験に用いられる倒立法<sup>12)</sup>を参考にして, 試料 0.1 g, 水 10 ml を共栓試験管 (25 ml) にとり, 5 秒間隔で正立, 倒立をくり返し, 肉眼的に完全溶解までの時間(秒)を測定し比較した。

\*<sup>1</sup> 本報を「酵素製剤の力価比較」第12報とする。昭和55年度中国四国薬学会で発表。

\*<sup>2</sup> 広島県安芸郡府中町青崎南 2-15; 2-15, Aosaki Minami, Fuchu-cho, Aki-gun, Hiroshima, 735 Japan

4) 粒度分布: 日局9の細粒剤粒度試験に準じて調べた。

### 3. 力価測定法

#### 1) 試薬

a. ONPG 液: o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside [SIGMA Lot No. 19C-5009, または和光純薬 Lot No. CEL 6742] 172 mg を pH 4.5 マッキルベイン緩衝液 (以下 MV 液と略す) 100 ml に溶解。

b. 乳糖液: 乳糖 [和光純薬, 特級] 2 g を pH 4.7 MV 液 100ml に溶解。

c. 牛乳: 市販の「毎日牛乳」。

d. 過塩素酸液: 過塩素酸 [和光純薬, 特級] 28.5ml を水で 100 ml とする。

e. 糖測定試薬: ベーリンガー・マンハイム社の「新ブラッド・シュガーテスト」

f. ろ紙: 東洋ろ紙 No. 5C。

その他の試薬は和光純薬の特級規格品を用いた。

#### 2) 試料液調製

各試料を 0.1M NaCl 液で ONPG 法においては 0.02 mg/ml, 乳糖法は 1 mg/ml, 牛乳法は 2 mg/ml に希釈し試料液とした。

#### 3) ONPG 法

常法<sup>6)</sup>に準じた。すなわち共栓試験管に ONPG 液 7 ml をとり, 30 $\pm$ 1 $^{\circ}$ の恒温槽で5分間予熱した後に試料液 1 ml を混和, 30 $^{\circ}$ , 10分間加温後, 1M-炭酸ナトリウム液 2 ml を加え反応を停止する。この液を30分間室温に放置した後, ライツ光電比色計を用い, 水を対照液として層長 1 cm, 波長 415 nm での吸光度を測定し A<sub>1</sub> とする。別に ONPG 液 7 ml に 1M-炭酸ナトリウム液 2 ml, 次に試料 1 ml を混和, 上記と同様に操作して得られる吸光度を A<sub>2</sub> とする。

標準曲線<sup>注1)</sup>より (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) に相当する ONP 量 (AONP  $\mu$ M) を求め, 次式により試料 1 g 中の単位数 (力価) を算出する (U<sub>ONP/g</sub>)。 (ただし, 上記条件で1分間に ONPG 1  $\mu$ M を加水分解する酵素力を 1 単位とする。)

$$U_{ONP/g} = AONP \times 1 / \text{試料重量(g)} \times 1 / 10(\text{分}) \\ \times \text{希釈倍率}$$

注1) 標準曲線: P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で恒量まで乾燥した ONPG 301.26 mg を 0.1M NaCl 液 1000 ml に溶解, この液を pH 4.5 MV 液で希釈し, 4 ml 中 ONPG 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5  $\mu$ M 含有の溶液を調製する。それぞれに pH 4.5 MV 液を溶媒とした  $\beta$ -ガラクトシダーゼ液 (G-TT, または ORG 0.1 mg/ml) 4 ml を混和, 30 $^{\circ}$ , 20分加温し, 1M-炭酸ナトリウム液 2 ml を加えた液について波

長 415 nm での吸光度を測定する。空試験として pH 4.5 MV 液 4 ml,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ液 4 ml および 1M-炭酸ナトリウム液 2 ml を混和し, 同様に操作する。この結果は 10 ml 中の ONP 量と吸光度の関係としてプロットし, 標準曲線を作成した。

#### 4) 乳糖法

Sugiura らの方法<sup>9)</sup>に準じた。すなわち共栓試験管に乳糖液 4 ml をとり, 30 $\pm$ 1 $^{\circ}$ の恒温槽で10分間予熱した後に試料液 1 ml を混和, 30 $^{\circ}$ , 10分間加温, 直ちにその 1 ml を過塩素酸液 9 ml に混和し反応を停止, 室温で10分間放置後, その 0.2 ml を糖測定試薬の溶液 (II) 5 ml に混和, 室温 (26~27 $^{\circ}$ ) に30分間放置後, ライツ光電比色計 (層長 1 cm, 波長 640 nm) で吸光度を測定, B<sub>1</sub> とする。空試験として 30 $^{\circ}$  に加温された試料液 0.2 ml および乳糖液 0.8 ml を過塩素酸液 9 ml に混和後, 同様に操作し, その吸光度を B<sub>2</sub> とする。次式により試料 1 g 中の単位数 (ULACT/g) を算出する。 (ただし, 上記条件で1分間に 1  $\mu$ M のグルコースを遊離する酵素力を 1 単位とする。)

$$ULACT/g = 0.0505 \times (B_1 - B_2) / E_{std.} \text{注2)} \times 5 \times 10 / \\ 0.2 \times 1 / 10(\text{分}) \times 1 / \text{試料重量(g)} \times \text{希釈倍率}$$

注2) E<sub>std.</sub>: 糖測定試薬の溶液 (I) の2倍希釈液 0.2 ml (グルコース 0.0505  $\mu$ M を含有) に溶液 (II) 5 ml を加えて得られる吸光度である。

#### 5) 牛乳法

Sugiura ら<sup>9)</sup>の方法に準じた。すなわち共栓試験管に牛乳 0.5 ml および pH 4.2 MV 液 0.5 ml をとり, 30 $\pm$ 1 $^{\circ}$ の恒温槽で5分間予熱した後に試料液 0.1 ml を試験管壁に付着しないように注意深く混和, 30 $^{\circ}$ , 10分間加温後, 過塩素酸液 9 ml を加え反応を停止する (空試験として, 試料液混和前に過塩素酸液を混和する。) ろ紙で自然ろ過後, ろ液 0.2 ml を用いて以下乳糖法と同様に操作し次式により試料 1 g 中の単位数 (UMILK/g) を算出した。

$$UMILK/g = 0.0505 \times (B_1 - B_2) / E_{std.} \times 1 / 0.1 \times \\ 10.1 / 0.2 \times 1 / 10(\text{分}) \times 1 / \text{試料重量(g)} \times \text{希釈倍率}$$

### 結果および考察

#### 1. 物性試験 (表2参照)

##### 1) 逃飛率

製剤間にかかなりの差が認められ, 特に G-TT と L-WM では10倍の差があった。また青木ら<sup>11)</sup>は30%以下であれば実際の調剤操作に支障をきたさないことを認めてい

るが、G-TTのみはその規定を超え、飛散性の大きい製剤であることがわかった。

## 2) 安息角

各試料とも福田ら<sup>13)</sup>が規定した 30~45° 以内であるが、L-WM は土師ら<sup>14)</sup>が上限とした 42° より大きく、流動性に問題があると思われる。

## 3) 溶解性

溶解時間は温度上昇により短縮されるが、相対的に水の浸透の悪い G-TT および O-ON の溶解は遅く、L-WM は溶解性が良好であった。なお溶解時に O-ON, L-WM, および L-NK で浮遊物が認められたが、これは製剤原料の不純物とも考えられ、今後の検討課題である。

## 4) 粒度分布

ORG は細粒剤、その他は散剤の規定に適合した。なお逃飛率の大きい G-TT は 74 μm 以下の粒子をほとんど含まず、最も小さい L-WM には多量に含まれていた。このことは 74 μm 以下の粒子が多い場合、飛散性に問題があるという報告<sup>14)</sup>に反した結果となっているが、飛散性は粒子径以外にも粒子密度が大きい要因となるためと考えられる。すなわち林ら<sup>15)</sup>のみかけ密度測定法によると、G-TT の L-WM に対する 1 cm<sup>3</sup> 当りの重量比は 0.55 であった。

## 2. 力価測定条件の検索

β-GL の活性測定法としては合成ガラクトンド結合分解能を求める方法が一般に試みられているが、その測定条件に関してはまちまちであるために活性測定条件を検索した。また基質に乳糖を用いる方法<sup>1,6,7,9)</sup>が最も臨床上で効果を検討するのに適していると考え、合成乳糖

を基質とする場合と牛乳中の天然乳糖を基質とする場合の二通りの方法も同時に検討した。

### 1) ONPG 法

ONPG 法においては一定濃度の ONP の吸光度を基準として力価を求めるのが常法であるが、著者らは吸光度に対する ONP 濃度を求め、相当する力価を算出するための標準曲線を作成した。その結果を図 1 に示したが、標準物質としてどれを採用するかによって同一吸光度でも得られる ONP 濃度が異なり、すなわち力価も異なることがわかった。従って著者らは最も理想的と考えられる ONPG に過剰の β-GL を作用させて得られる直線 A を標準曲線とした。なお ONP 発色体の測定波長は 420 nm が常法であるが、400 nm としている報告<sup>5)</sup>もあるため、島津分光光度計 D40 型で最大吸光波長を調べたところ、図 2 に示すように 415~425 nm 付近での測定が最適と考えられた。従ってライツ光電比色計(M型)で測定可能な波長 415 nm で測定することとした。

### 2) 乳糖法および牛乳法

乳糖分解能を求める方法としては、主として乳糖分解により遊離するグルコースを定量する方法<sup>6,7)</sup>とガラクトースを定量する方法<sup>1,3,9)</sup>があるが、著者らは最も簡便なグルコースを糖測定試薬により測定する方法を用いた。また酵素不活化に一般には沸騰浴中で 2~3 分加熱する方法<sup>2,6,7,14,16)</sup>がとられているが、本法は反応後加熱による失活までのロスタイムがあるために、Sugiura ら<sup>8)</sup>の報告している過塩素酸による失活法より 20% 程度の高い活性値が得られ、しかも測定値のバラツキが大きいことがわかった。従って種々の検討の結果、最も測定値に再現性が認められた過塩素酸による失活法を採用した。

表 2. 物性試験結果

項目	試料					
	G-TT	O-ON	L-WM	L-NK	ORG	
逃飛率 (%)	42.5	20.0	4.5	12.5	25.0	
安息角 (°)	33.0	39.0	44.5	37.5	34.5	
溶解時間 (秒)	5°	88	85	50	45	60
	25°	62	35	21	33	40
	40°	53	33	14	30	35
ふるい (μm)	~74	0.8	5.0	19.4	17.4	1.0
	~105	32.7	26.1	25.0	26.7	0.7
	(%) ~350	66.5	68.9	55.6	55.9	34.1
	~500	0	0	0	0	60.6
	500~	0	0	0	0	3.6

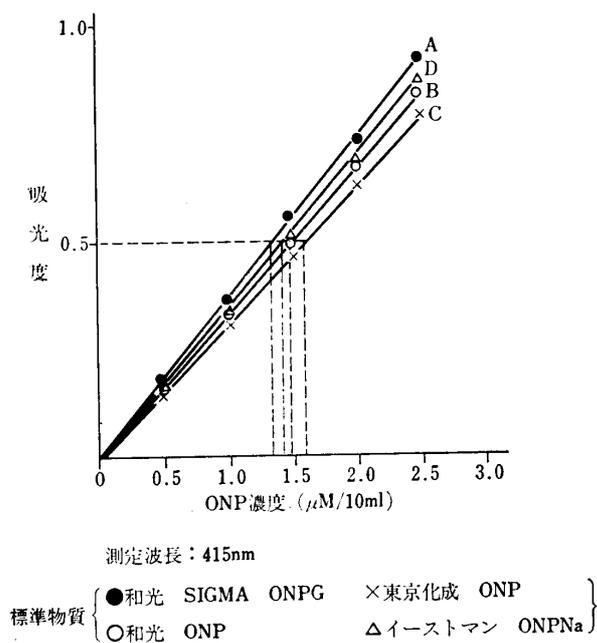


図 1. 標準曲線 (ONPG 法)

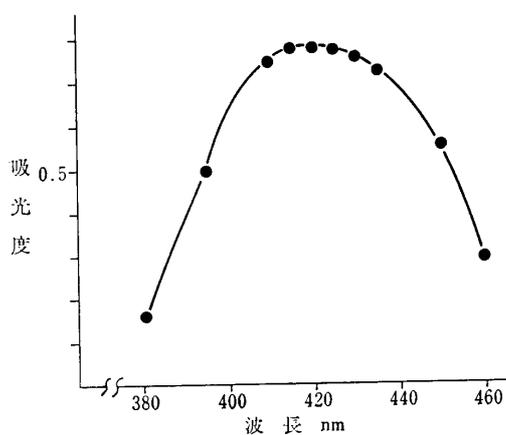


図 2. ONP の吸収曲線  
試料: ONP (和光) 0.2μM/ml

しかしこの方法は加熱失活法に比べて試料濃度を10倍にする必要があり、なお検討の余地があると考ええる。

3) 試料濃度と活性

図3に示したように3方法とも濃度と活性は広範囲で比例関係にあり、多数の報告<sup>1,3,6-8)</sup>に一致し、5試料ともこの関係が成立することを確認した。しかしライツ光電比色計を用いた場合は吸光度が0.3~0.5の間で誤差は小さいと思われたので、試料濃度はONPG法で0.002mg/ml、乳糖・牛乳法は0.2mg/mlとした。なお試料溶媒とした0.1M NaClについてはグリコンダーゼを賦活するという報告<sup>1,7)</sup>、耐酸性β-GLには影響しないとい

う報告<sup>5,8)</sup>があるが、表3に示したように溶解後180分以内では経時の変化が認められないことから、何らの支障なく使用できると考える。

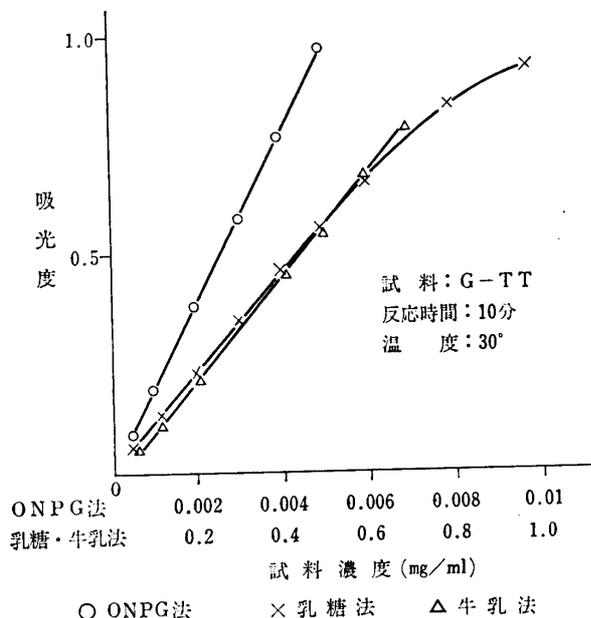


図 3. 試料濃度と活性

表 3. 試料溶媒と活性

希 釈 液	保存温度	放 置 時 間		
		30分	90分	180分
A. 水	5	100	103	102
B. 水	25	100	103	103
C. 0.1M NaCl	25	103	108	104
D. 緩衝液	25	104	107	104

試料は G-TT を用いる。  
A. の30分値を100とする。  
緩衝液は pH 4.5 マッキルベイン緩衝液

4) 反応時間と活性

反応時間と活性は図4に示したように比例関係<sup>1,2)</sup>にあり、5試料とも同様であった。また10~20分反応とした報告が多いことから、反応時間は10分とした。

5) 反応温度と活性

反応温度は30<sup>1,3,6)</sup>または37<sup>2,5,7,9)</sup>とした報告が多い。しかし反応温度と活性の関係は図5に示したように、3方法とも27°付近で勾配がゆるやかになり、ONPG法では32°、乳糖・牛乳法では35°から急に分解は加速することがわかった。従って測定適温は28~32°と考えられたので反応温度30°とした。

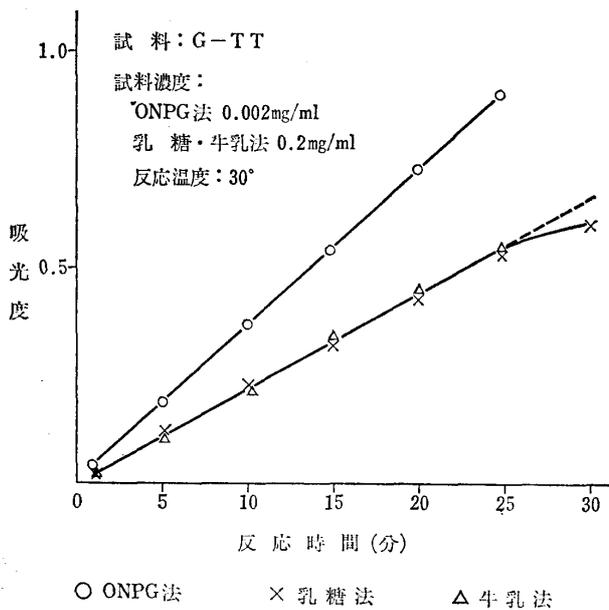


図 4. 反応時間と活性

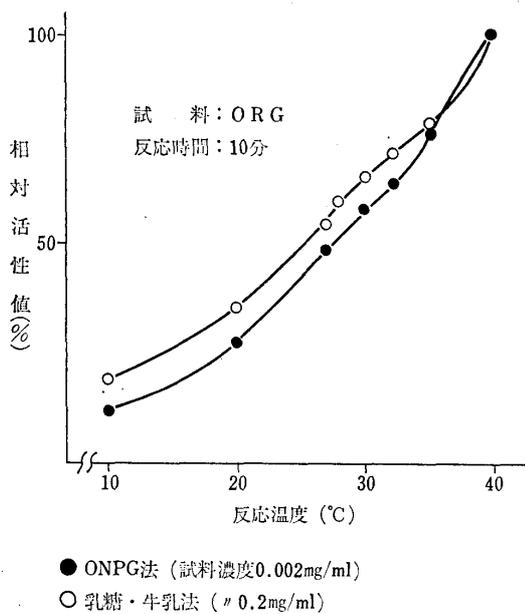


図 5. 反応温度と活性

## 結 論

1. 物性試験において, ORG は細粒剤であり, その他の製剤は散剤であったが, L-WM は最も逃飛率が小さく, 溶解性も良好な製剤であった. また G-TT は逃飛率が大きく調剤の際に支障があると考えられた. その

他の製剤では明らかな差異を認めなかった.

2. 力価測定条件は反応温度 30°, 反応時間 10分とし, 試料濃度は吸光度 0.3~0.5 を測定できるように調製するのが適当と思われた. また乳糖法および牛乳法における酵素失活に過塩素酸を用いる方法が測定値の再現性が良いことがわかった. なお, ONPG法における力価は標準物質の撰択に左右されるために, この規格化が望まれる.

## 文 献

- 1) S. A. Kuby and H. A. Lardy: J. Am. Chem. Soc., **75**, 890 (1952).
- 2) Om P. Bahl and K. M. L. Agrawal: J. Biol. Chem., **244**, 2970 (1969).
- 3) Akira Kaji, Masayuki Sato, Noboru Shinmyo, and Masaaki Yasuda: Agr. Biol. Chem., **36**, 1729 (1972).
- 4) Kengo Sakaguchi and Tsutomu Yamaguchi: J. Ferment. Technol., **51**, 750 (1973).
- 5) 坂口謙吾, 山口 務, 高田正樹: 公開特許公報, 117677 (1974).
- 6) Yuji Tanaka, Akihiro Kagamiishi, Akira Kiuchi, and Tadao Horiuchi: J. Biochem., **77**, 241 (1975).
- 7) Mamoru Sugiura, Mutsuko Suzuki, Masanori Sasaki, and Tokiko Shimomura: Chem. Pharm. Bull., **24**, 788 (1976).
- 8) Mamoru Sugiura, Mutsuko Suzuki, and Tokiko Shimomura: Chem. Pharm. Bull., **24**, 794 (1976).
- 9) Mamoru Sugiura, Mutsuko Suzuki, Tokiko Shimomura, and Masanori Sasaki: Chem. Pharm. Bull., **26**, 1 (1978).
- 10) 青木 大, 福田友昭, 笠原伸元, 中島秀和: 薬剤学, **27**, 103 (1967).
- 11) 青木 大, 福田友昭, 石田定広: 薬剤学, **27**, 266 (1967).
- 12) 小野田 俣: 薬局, **20**, 623 (1969).
- 13) 福田友昭: 第27回日本薬学会近畿支部総会講演要旨集 (1977).
- 14) 土師久幸, 東 敏夫, 三井節子, 鈴木芳郎, 伊奈秀和, 笠原伸元, 大西 昇, 平岡栄一: 病院薬学, **5**, 46 (1978).
- 15) 林 平三郎, 見奈美秀蔵: 薬学雑誌, **84**, 229 (1964).
- 16) Takashi Muramatsu and Fujio Egami: J. Biochem., **62**, 700 (1967).