

各社 β -ガラクトシダーゼ製剤の比較試験

櫛田賢次, 唐沢幸之, 松田 直

国立相模原病院薬剤科*

Comparison of Various β -Galactosidase Preparations

KENZI KUSHIDA, SACHIYUKI KARASAWA, TADASHI MATUDA

Pharmacy, National Sagamihara Hospital*

(Received June 16, 1981)

Five β -galactosidase preparations (A, B, C, D and E) from different manufacturers were studied comparatively. Their pH stability, optimum pH of the enzyme preparations with 3 substrates (ONPG, lactose and milk) and change on standing were tested by ONPG (o-nitrophenyl- β -galactopyranoside) method and blood sugar GOD perid test. Protease activity and impurities were determined by Casein-Folin method and gel-filtration chromatography, respectively. While preparations B, C, D and E showed almost similar results of stability test, preparation A was most unstable and apt to undergo change in appearance. Further, preparation A showed protease activity 50-60 times higher than that of the others, and contained impurities. Based on these results, it was concluded that preparations B, C, D and E are better products than preparation A.

Keywords— β -galactosidase; ONPG method; blood sugar GOD perid test; Casein-Folin method; gel chromatography; stability; protease; impurity

β -ガラクトシダーゼ (以下 β -GTと略す) は, *Aspergillus oryzae* の産生する分子量約 10 万の乳糖分解酵素製剤で, 乳児の乳糖不耐症により生じる下痢の改善などに必須の薬剤である。

今回, 著者らは現在市販されている各社 β -GT 製剤について, pH 安定性, ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside), 乳糖および牛乳をそれぞれ基質とした場合の至適 pH, 異なる条件下で保存した場合の経時変化, 蛋白分解酵素であるプロテアーゼ活性, また β -GT 以外の夾雑物質の混在をゲルクロマトグラフィーでそれぞれ検討したので報告する。

実験の部

1. 試料

製剤 A; Lot No. AN 12, 製剤 B; Lot No. W-5017 J, 製剤 C; Lot No. 0009151, 製剤 D; Lot No. 914069, 製剤 E; Lot No. 4X-BOE

2. 力価測定法

1) ONPG 法¹⁾

上野ら²⁾の方法に準じて行った。

(a) ONPG 基質による至適 pH

ONPG は異なる pH の McIlvaine buffer³⁾ (pH 3.0~7.0) に溶解し, 一方 β -GT は 0.02mg/ml の水溶液を調製して酵素活性を測定した。

(b) pH 安定性

ONPG は McIlvaine buffer (pH 2.5~8.0), 炭酸ナトリウム—炭酸水素ナトリウム (pH 9.0~10.0) buffer で溶解し, 各 pH 基質液を調製した。 β -GT 25mg を精秤し, 上記 buffer (pH 2.5~10.0) で 10ml とし, 30°, 60 分間インキュベート後, その液 1ml を McIlvaine buffer (pH 4.5) で 100ml として試料液に用いた。

(c) 経時変化試験

保存条件は, 最良条件 (6°±1°, RH 60%), 中間条件 (19°±1°, RH 72%), 最悪条件 (30°±1°, RH 80%), 包装条件はパイルパッカーフィルム紙 (P 紙) またはグラシンポリエチレン紙 (G 紙) で試料約 2g を分包し, それぞれの条件における外観変化を肉眼的に観察し

*相模原市桜台 18-1; 18-1, Sakurada, Sagamihara-shi, 228 Japan

た. なお判定基準は日薬調剤技術委員会の配合変化試験法⁴⁾に従った. 残存力価は ONPG 法で測定した.

2) 乳糖および牛乳基質による至適 pH

各 pH の基質液 (4%乳糖溶液または市販無調整牛乳を等量の McIlvaine buffer pH 3.0~7.0 と混合) 4 ml を 30° の恒温槽で 5 分間加温後, 試料液 (0.25mg/ml 水溶液) 1 ml を加え, 10 分間インキュベート後ただちに沸騰水浴中で 5 分間加熱し反応を停止させる. 反応停止液, 牛乳基質の場合はトリクロル酢酸混液 (蛋白質沈澱試薬 B)⁵⁾ 5 ml を加えろ過した.

反応液 0.2 ml と 5 ml の血糖測定試薬 (blood sugar GOD perid test, Boehringer Mannheim 社) を 30°, 30 分間反応させ, 578 nm における吸光度を水を対照として測定した.

3) プロテアーゼ活性測定

pH 6.5 においてミルクカゼイン (Casein nach Hammarsten, E. Merck 社) を基質とし, Casein-Folin 比色法⁵⁾ に準じて測定した.

3. ゲルクロマトグラフィー

(a) 樹脂および操作条件

樹脂: Sephadex-G-100 Superfine (Pharmacia Fine Chemicals)

カラム: 1.5cmφ×100cm

展開液: 0.05M-リン酸緩衝液 (pH 8.0)

溶出速度: 5 ml/時間

分画液量: 4 ml/tube

試料液: 展開液で 100mg/ml とし 0.5ml を展開

(b) 分子量既知標準試料

ブルーデキストラン (B.D.); M.W. 200万

ウシ血清アルブミン (B.S.A.); M.W. 67,000

卵白アルブミン (O.V.A.); M.W. 45,000

キモトリプシノゲン-A (Chy-A); M.W. 25,000

ウマ心臓チトクロム-C (Cyt-C); M.W. 12,400

N-2,4,DNP-L-アラニン (DNP-Ala); M.W. 255

結果と考察

1. ONPG 基質による pH 安定性

試料 5 製剤の pH 2.5~10.0 における安定性を図 1 に示す. 各製剤とも pH 4.0~8.0 の範囲では安定であったが A は pH 4.0 より酸性側, pH 8.0 よりアルカリ性側において他製剤より著しく不安定であることがわかった.

2. ONPG, 乳糖, 牛乳各基質による至適 pH

ONPG, 乳糖, 牛乳各基質での pH による活性の変化を, それぞれ図 2, 図 3, および図 4 に示す. 基質にほとんど関係なく至適 pH は 4.5 であった. 各基質において, A が他製剤よりかなり低い活性値を示し, 特に牛乳を基質とした場合には他の製剤との間に著しい差がみられた.

3. 経時変化試験

(a) 外観変化

3 保存条件 (最良, 中間, 最悪), 2 包装条件 (P 紙, G 紙) における外観変化を表 1 に示す. 最良条件では, 各製剤とも包装紙によって差がなく変化を示さなかった. 中間条件では, G 紙包装で A が 14 日目で湿潤, 変色

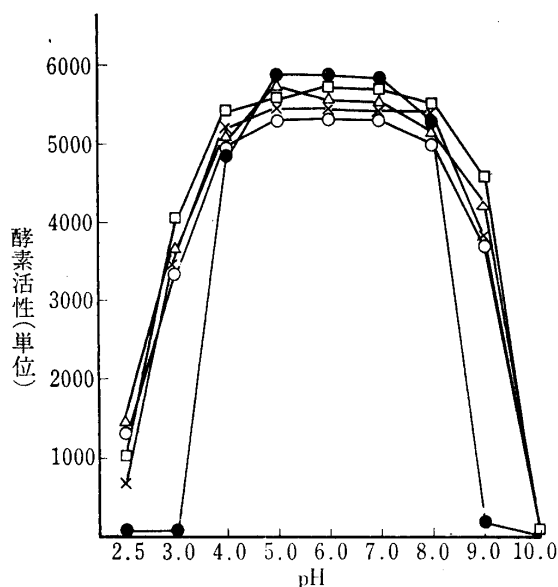


図 1. pH 安定性
(●A ○B ×C △D □E)

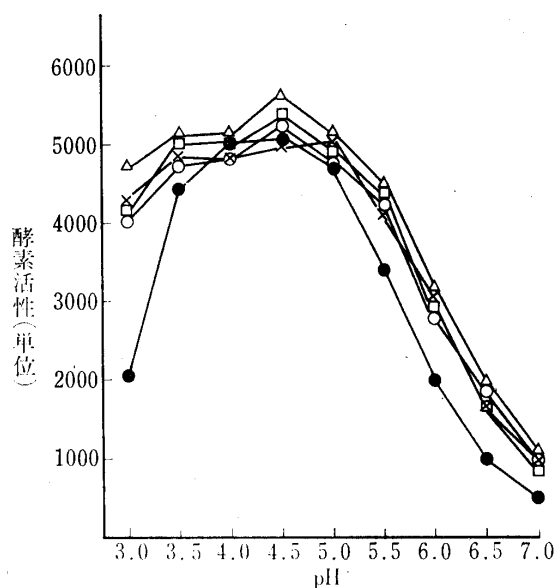


図 2. ONPG 基質による至適 pH
(●A ○B ×C △D □E)

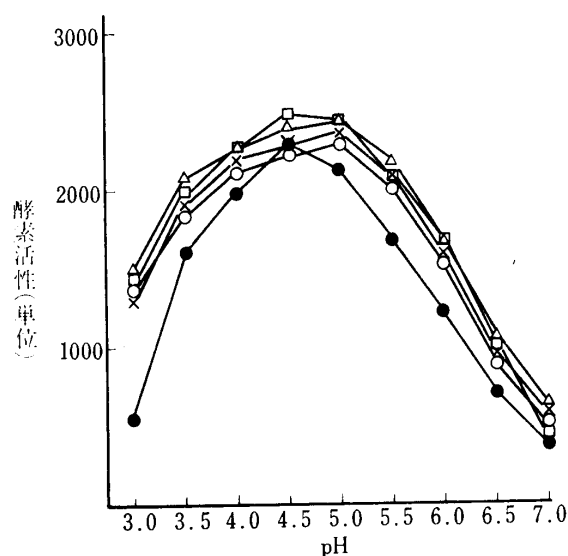


図3. 乳糖基質による至適 pH
(●A ○B ×C △D □E)

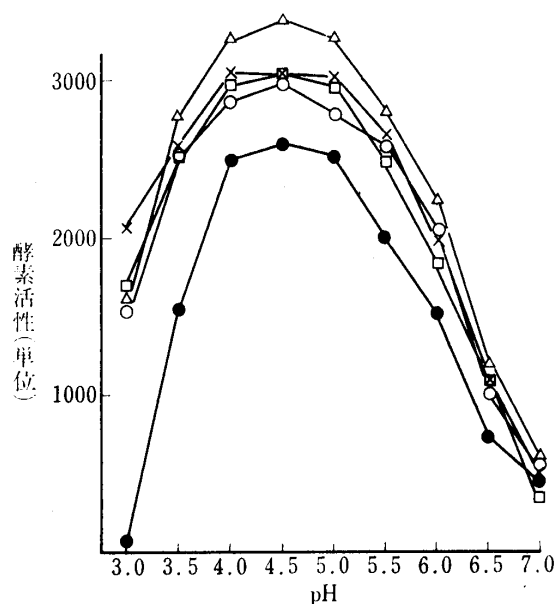


図4. 牛乳基質による至適 pH
(●A ○B ×C △D □E)

表1. 外 観 変 化

試料	保存条件	最良条件	中間条件				最悪条件				
	日数	直後 7 14 21 28	直後 7 14 21 28	直後 3 5 7 14							
A	P	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —					
	G	— — — — —	— ± (湿) + (湿変) + (湿変) + (湿変)	— + (湿変) + (湿変) + (湿変)							
B	P	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —						
	G	— — — — —	— — — — —	— ± + (湿) + (湿)							
C	P	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —						
	G	— — — — —	— — — ± (湿) + (湿)	— + (湿変) + (湿変) + (湿変)							
D	P	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —						
	G	— — — — —	— — — — —	— ± + (湿) + (湿)							
E	P	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —						
	G	— — — — —	— — — — —	— ± ± ±							

P: パイルパッカーフィルム紙, G: グラシンポリエチレン紙.

湿: 湿潤, 変: 変色

—: 変化の全く認められないもの

±: 変化の有無の疑いもの

+: 明らかに変化は認められるが実際の調剤投与に差支えないもの

#: 調剤投与に差支える程度の変化が認められるもの

表2. 残 存 力 価

試料	保存条件	最良条件					中間条件					最悪条件				
	日数	直後	7	14	21	28	直後	7	14	21	28	直後	3	5	7	14
A	P	100 [%]	100 [%]	98 [%]	98 [%]	99 [%]	100 [%]	98 [%]	92 [%]	93 [%]	90 [%]	100 [%]	100 [%]	92 [%]	82 [%]	73 [%]
	G	100	99	99	97	98	100	89	86	83	79	100	89	74	73	
B	P	100	100	97	98	99	100	99	98	100	98	100	100	99	97	83
	G	100	100	101	100	100	100	99	97	94	92	100	100	92	84	
C	P	100	100	100	99	99	100	100	100	98	100	100	100	97	93	81
	G	100	100	102	100	101	100	100	95	94	87	100	98	93	86	
D	P	100	100	99	99	100	100	96	97	99	95	100	98	98	93	86
	G	100	98	101	99	99	100	95	94	96	89	100	95	91	84	
E	P	100	100	97	98	100	100	98	97	99	96	100	100	99	92	83
	G	100	101	100	100	100	100	96	96	94	89	100	96	94	83	

がみられた。最悪条件では、P紙包装でAは7日目で、Cは14日目で変化を示した。G紙包装ではEを除いて各製剤とも変化を示し、特にAおよびCは他製剤と比較して変化しやすい製剤であることがわかった。

(b) 残存力価

残存力価を表2に示す。最良条件では、各製剤とも包装紙に関係なく、ほとんど残存力価の低下をみなかった。中間条件では、AのみがP紙包装で、14日目に約90%、G紙包装で7日目に約90%、14日目に約85%に低下したが、他製剤では安定であった。最悪条件では、表2に示したとおり各製剤とも不安定で、特にAは他製剤よりも急速な残存力価の低下を認めた。

4. プロテアーゼ活性

β -GT製剤は細菌培養法により製造されるため、他の夾雑物質、シュクロース、マルトースなどの糖類、 α -アミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、アルカリホスファターゼ、セルラーゼなどの酵素が混入する可能性があるといわれているが、今回著者らは β -GTを分解する可能性のあるプロテアーゼ、および他の夾雑物質の混在について検討した。

表3は試料1g中のプロテアーゼ活性を示したものである。Aは他製剤より約50~60倍も多くプロテアーゼを含有する製剤であることがわかった。

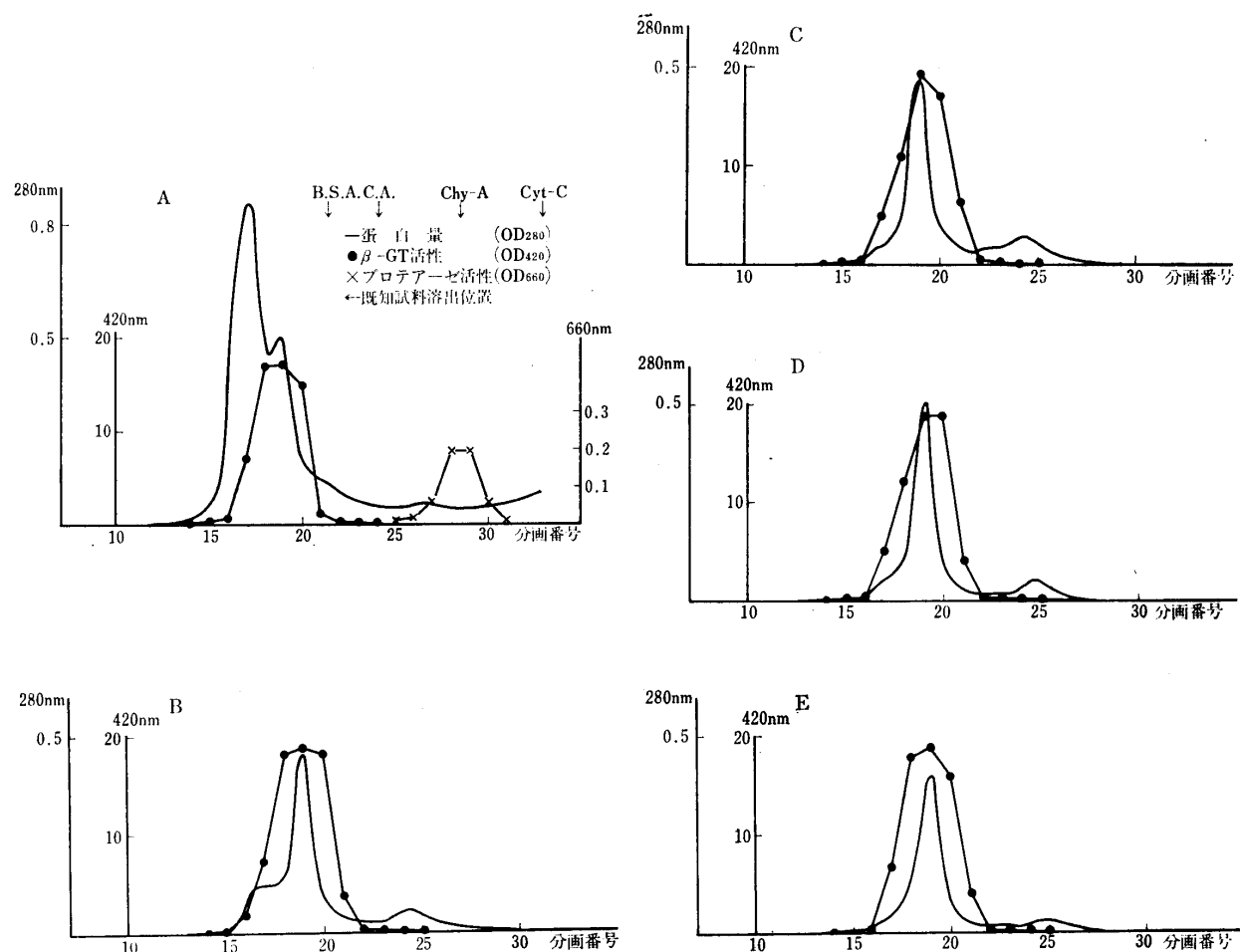
表3. プロテアーゼ活性 (単位/g)

試料	A	B	C	D	E
1	1456	20	32	30	32
2	1570	29	40	26	28
3	1413	22	24	21	30
平均	1480	24	32	26	30

5. ゲルクロマトグラフィー

プロテアーゼ以外の夾雑物質の混在について、ゲルクロマトグラフィーで分画し、 β -GT活性をONPG法で、プロテアーゼ活性をCasein-Folin比色法で、それぞれ測定した結果を図5に示す。Aを除いてほぼ同じゲルろ過パターンを示した。各製剤とも分画番号19のピークが分子量約10万の β -GTによるものであり、ONPG法による酵素活性値とはほぼ一致した。Aは分画番号17にピークを持つ分子量約12~13万の β -GT活性を示さない夾雑物質の混在が認められた。またAは分画番号29にピークを持つ分子量約35,000のプロテアーゼ活性が確認できた。

青木ら⁶⁾の報告によると、牛乳または母乳摂取後の胃内pHは4.5~6.0付近であり、pH安定性および至適pHに

図5. 各社 β -GT 製剤のゲルクロマトグラフィー

においては各製剤とも問題がないものと考えられる。しかし哺乳前の胃内pHが2.0~3.0ということから考えると、母乳の場合はあらかじめ母乳を授乳させ、胃内pHを高めてから β -GTを投与するか、ミルクの場合はあらかじめ β -GTと混合し投与することが効果的である。

つぎに経時変化試験に関しては、保存条件は冷所保存が望ましいが、Aを除き室温保存でも28日間安定であることが外観変化および残存力価の結果から裏付けられた。また包装紙の違いによって、吸湿しにくいP紙包装の方がG紙包装より安定であり、長期投薬の場合はP紙包装にすべきである。

また、夾雑物質の混在について検討した結果、Aのみが高いプロテアーゼ活性を示した。プロテアーゼの混在がpH安定性、至適pH試験および経時変化試験において、Aの安定性に何らかの影響をおよぼしているものと考えられる。さらにAは夾雑物質（分子量約12~13万）の混在が認められたことから使用菌株そのものか、または精製過程に問題があるものと推測される。

結 論

各社 β -GT 製剤について、各種安定性および夾雑物質の混在について検討した結果、安定性においてB, C, DおよびEはほぼ同じような結果を示したが、Aは他製剤より不安定で外観変化も示しやすかった。また、プロテアーゼ活性もAは他製剤より約50~60倍も高い値を示し、分子量約12~13万付近に夾雑物質の混在が認められた。

以上のことからAとB, C, DおよびEとの製剤では、安定性、夾雑物質の混在において明らかな差異が認められた。

文 献

- 1) Ruth G. Doell, N. Kretcher : Biochim. Biophys. Acta, 62, 353~362 (1962).
- 2) 上野和行, 福永敬三, 田中義一, 杉本欣司, 平野善信, 尾崎照美 : 病院薬学, 7, 210 (1981).
- 3) McIlvaine : J. Biol. Chem., 49, 183 (1921).