

- 102) Frick, P. G; Acta. haemat. Basel, **16**, 11 (1956)
- 103) Duchaine, P; Am. J. Obst, **73**, (6)1195 (1957)
- 104) Soullier, J. P; Rer. Haemat, **95**, 531 (1952)
- 105) Sherry, S; Tran. Assoc. Am. Physicians, **70**, 288 (1957)
- 106) Grossi, C; Blood, **9**, 310 (1954)
- 107) Rabe, F; Dtsch. Arch. Klin. Med, **132**, 240 (1920)
- 108) Opitz, H; Dtsch. Med. Wschr, **47**, 504 (1921)
- 109) Weiner, A. E; Am. J. Obestr & Gynec, **60**, 379 (1950)
- 110) Mutschler, L. E; Proc. Soc. Exp. Biol. Med, **115**, 1019 (1964)
- 111) 岡本; 日本皮膚科学会雑誌**73**, 474 (1963)
- 112) Copley, A. L; Arch interm Pharmacodyn, **99**, 426 (1954)
- 113) Duguid, J. B; Brit. M. Bull, II 36 (1955)
- 114) Mole, B; Brit. M. J, **1**, 1343 (1949)
- 115) Guest, M. M; J. Clin. Invest, **27**, 793 (1948)
- 116) 大根田; 日本臨床, **17**, 711 (1959)
- 117) Fearnley, C. R; Nature, **172**, 544 (1953)
- 118) Back, N; Circulation. Res, **4**, 440(1956)
- 119) Kline, D. L; Yale J. Biol & Med, **26**, 365 (1954)
- 120) Ambrus, C. M; Fed. Proc, **19**, 59 (1960)
- 121) MacFarlane, R. G; Fibrinolysis. Blood, **3**, 1167 (1948)
- 122) Ungar, G; J. Exp. Med, **90**, 39 (1949)
- 123) Rocha e silva, M; Am, J. Physiol, **156**, 261 (1949)
- 124) 北村; アレルギー **7**, 367 (1959)
- 125) Lewis, G. P; J. Physiol, **135**, 7 (1957)
- 126) Lewis, G. P; J. Physio, **140**, 285 (1958)
- 127) Lewis, G. P; J. Physiol, **147**, 458 (1959)
- 128) Okamoto, S; 最新医学, **16**, 1359 (1961)
- 129) 北村; 昭和35年文部省総合研究報告 (1961)
- 130) 太田; 医学のあゆみ, **51**, 453 (1964)
- 131) Astrup, T, 松岡; 興和医報, **7**, 6 (1963)
- 132) 山本, 佐々木; 臨床と研究, **43**, 377 (1966)

---

杉浦 衛, 市原嘉夫, 酒井利侑: 酵素剤の研究 (18)\*<sup>1</sup>

軟膏剤中の各種起源酵素の活性変化について\*<sup>2</sup>

Mamoru Sugiura, Yoshio Ichihara, Toshiyuki Sakai: Studies on Enzyme Preparations. (XVIII) on the Enzyme Activity of Various Origin Enzyme in Ointment Agents.

---

\*<sup>1</sup> (17)報は薬剤学投稿中

\*<sup>2</sup> 本研究は昭和40年11月東海薬学会総会において発表した。

Added various enzymes in ointment bases, and assayed by measuring enzymatic activity with conversion time.

Pancreatin showed more than 80% residual activity in white petrolatum, anhydrous lanolin and polyethylenglycol ointment after a year.

Semialkaline proteinase showed more than 75% residual activity in White petrolatum, Polyethylenglycol ointment and anhydrous lanolin after a year.

Then Pronase showed about 50% residual activity in polyethylenglycol ointment and Bacillus'subtilis alkalineproteinase showed about 50% residual activity in white petrolatum. Cellulase AP and Lipoprotein lipase showed about 50~60% residual activity in polyethylenglycol ointment.

最近臨床方面において各種起源の Proteinase が消炎酵素として、しばしば使用されているが、これらはいづれも内用剤として用いられており、外用剤としての応用は殆ど行われていない現状である。そこで著者らは消炎酵素の利用開発の目的で各種起源を異にする酵素を各種軟膏剤に配合した場合の酵素活性の安定性について検討を行ったところ興味ある知見を得たのでその詳細について報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試酵素剤

Table 1. に示すように動物性酵素として Pancreatin, 糸状菌性酵素として Semialkaline proteinase, Cellulase<sup>1)</sup> AP, Lipoprotein lipase, そして細菌性酵素として Pronase, Bacillus subtilis alkaline Proteinase<sup>2)</sup> を使用した。<sup>3)</sup>

Table I Enzyme Preparation

Classification	Commercial Name
A. Animal enzyme	Pancreatin
B. Filamentous fungus enzyme	Semi-alkaline proteinase Lipoprotein lipase Cellulase-AP
C. Bacterial enzyme	Bacillus subtilis alkaline proteinase
D. Streptomyces enzyme	Pronase

Table II Ointment Bases

Classification	Name
Hydrophobic bases	White Petrolatum
Hydrophilic bases	Hydrophilic ointment
Emulsified ointment bases	Absorption ointment
Water-soluble bases	Anhydrous Lanolin
Lotion bases	Polyethylenglycol 1500 Polyethylenglycol ointment Sonne base

#### 2. 供試軟膏基剤

Table 2. に示すように軟膏剤を油脂性基剤, 乳剤性基剤, 水溶性基剤, ローション性基剤に分類し, 市販軟膏基剤として白色ワセリン (W. Petro), 親水軟膏 (Hydro oint), 精製ラノリン (An. Lanolin), 吸水軟膏 (A-

bsorp. oint). ポリエチレングリコール 1500 (P. E. G. 1500). ポリエチレングリコール軟膏 (P. E. G. oint). ゾンネベース (Sonne base) を用いた.

### 3. 試料の調製

軟膏剤は各種酵素剤の活性度に応じ, Semialkaline proteinase 30,000u/g の1%添加を基準とした. 即ち Semi-alkalineproteinase としては10mg, Pancreatin 160 mg, Pronase 6 mg, Bacillus subtilis alkalineproteinase 3mg, Cellulase AP については30,000u/g の1%添加で10mg, なお Lipoprotein lipase は60mgを使用した. 軟膏剤調製は研和法により調製し, 気密容器に充填して30°C 恒温室に保存したものを経時変化の試料とした.

### 4. 酵素の抽出

測定を行うにあたり, 各種酵素配合軟膏剤中より, 酵素の抽出回収率が問題となるので, 著者らは希釈酵素液に対し各種有機溶媒が如何なる影響を及ぼすかについて検討した.

Table III Influence of Various Solvents on Enzyme Solution

Solvents	Activity	Protease value in water	Protease value in solvent
Standard		100.0(%)	—(%)
Ethyl ether		95.9	0.0
Benzene		5.5	2.5
Chloroform		6.4	0.4
Petroleum ether		4.9	3.3
Butyl alcohol		55.5	0.8
Hexane		4.9	4.5
Xylene		4.7	4.1

Table 3. に示す如く酵素水溶液のみの活性率を100%とした場合, 各種有機溶媒において, エーテルはその抽出水層中には活性率が95.9%, 溶媒移行中には0で回収率がよく最も影響を受け難いことを認めた. エーテル以外の有機溶媒については回収率がいずれも不良であった. つぎに酵素含有軟膏剤について有機溶媒による酵素の影響を比較検討した結果, Table 4. に示す如くやはりエーテルが他の有機溶媒に比して, 95%以上の均一な回収率を示した. そこで著者らは, エーテルを抽出溶媒として選定した. すなわち, Pancreatin, Semialkaline

Table IV Comparison of Extracting Protease in Ointment by Solvents

Ointment	Solvent	Ethylether	Pet. ether	Benzene	Hexane	Xylene	Butyl alcohol	Chloroform
White petrolatum		96.6	6.4	4.4	15.9	8.7	4.8	3.2
Hydrophilic ointment		97.8	14.7	10.3	31.4	24.3	53.7	10.3
Anhydrous lanolin		94.6	13.9	5.6	9.5	5.6	7.6	4.4
Absorption ointment		95.0	85.9	87.9	77.5	75.9	53.7	7.2
Polyethylenglycol ointment		97.0	95.0	94.4	95.0	93.6	54.5	85.9
Polyethylenglycol 1500		96.0	95.0	90.1	76.2	94.8	51.3	15.9
Sonne Base		96.6	10.7	69.2	40.2	42.1	56.1	4.4

Control; 100(%)

proteinase, Pronase, Bacillus subtilis alkalineProteinase を含む軟膏は試料として100mg を正確に量り, 分液ロートに入れ, PH8.0の0.1Mリン酸緩衝液50ml およびエーテル20mlを加え, よく振り混ぜて酵素を水層に抽出し, これを希釈酵素液として使用した. Cellulase AP を含む軟膏は試料として100mg を精製水30ml およびエーテル20mlで同様に操作し, Lipoprotein lipase を含む軟膏は試料として300mg を取り, 乳鉢に入れ精製水に溶かして50mlとし希釈酵素液とした.

### 5. 測定法

Pancreatin, Semialkalineproteinase, Pronase, Bacillus subtilis alkalineProteinase については, そのプロテアーゼ活性をミルクカゼインを基質とした Casein-Folin 法<sup>4)</sup>を用い, Cellulase AP については CMCase 活性を Somogii-Nelson 法<sup>5)</sup>にて測定した. Lipoprotein lipase についてはその活性を, Dole 法<sup>6)</sup>に従い測定した.

### 実験成績

調製時の測定値を100%とし, 残存活性率を毎月測定した.

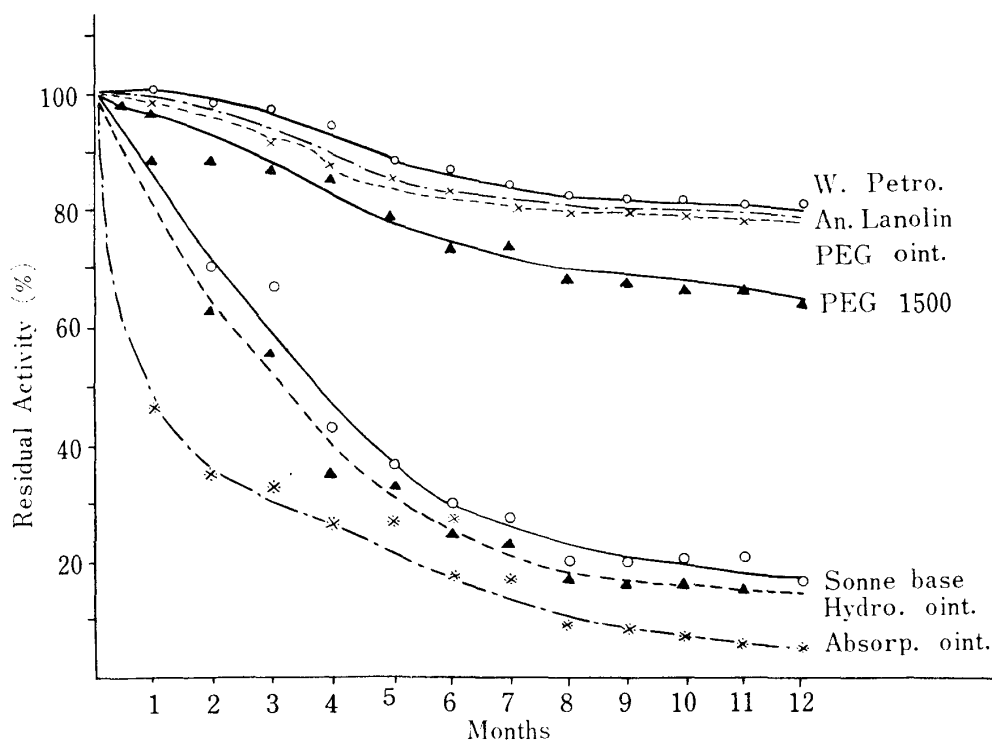


Fig. 1 Change of Pancreatic Proteinase Activity in Ointment Bases

Fig 1. は Pancreatin を配合した軟膏剤中のプロテアーゼ活性の経時的変化であるが, 軟膏白色ではワセリン, ポリエチレングリコール軟膏, 精製ラノリンがかなり安定で1ケ年後では80%以上の残存率を示した. これに対して, 親水軟膏, 吸水軟膏, ゾンネベースは経時的に急激に活性の低下をきたし影響が大であった.

Fig 2. は Semialkalineproteinase の場合で, これも同じく白色ワセリン, ポリエチレングリコール軟膏, 精製ラノリンにおいてかなり安定で1ケ年後で70%以上の残存率があった. 親水軟膏, 吸水軟膏, ゾンネベースにおいては影響力が大で, 3ヶ月後では20%以下の残存率になった.

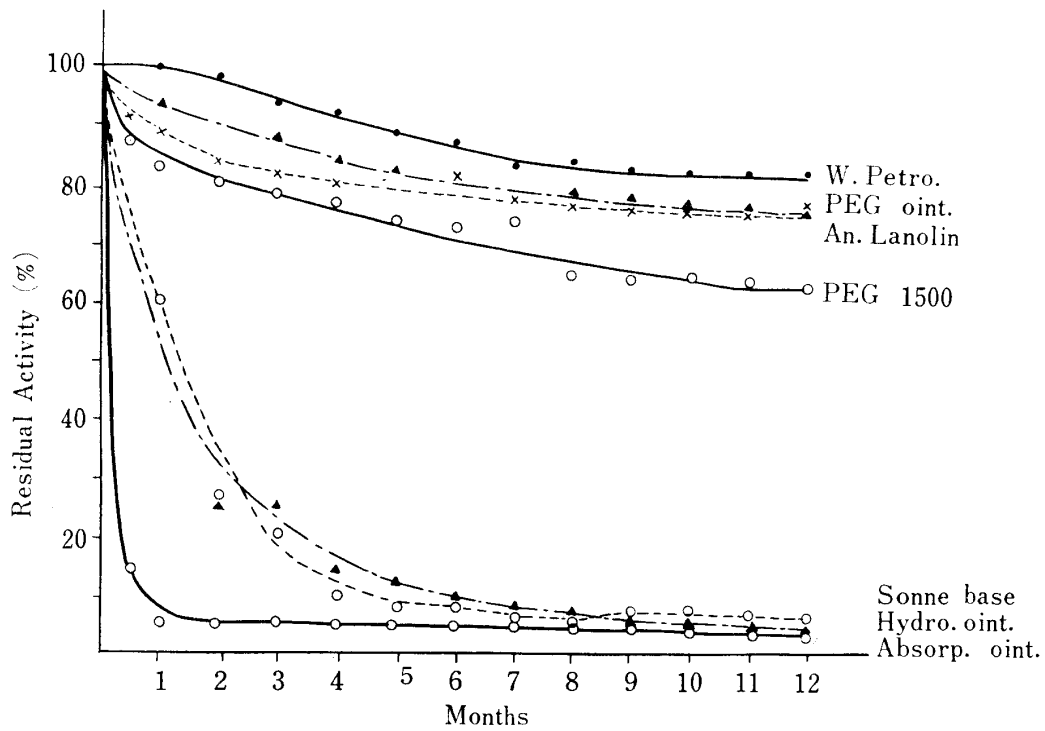


Fig. 2 Change of Semi-Alkaline Proteinase in Ointment Bases

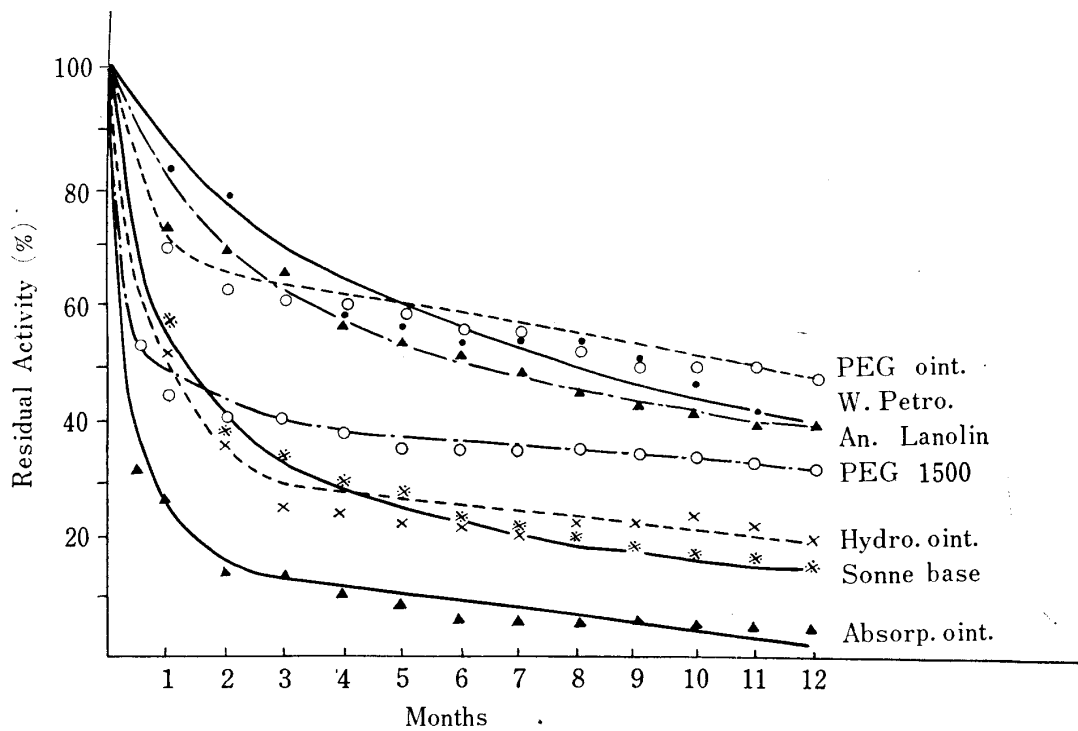


Fig. 3 Change of Pronase in Ointment Bases

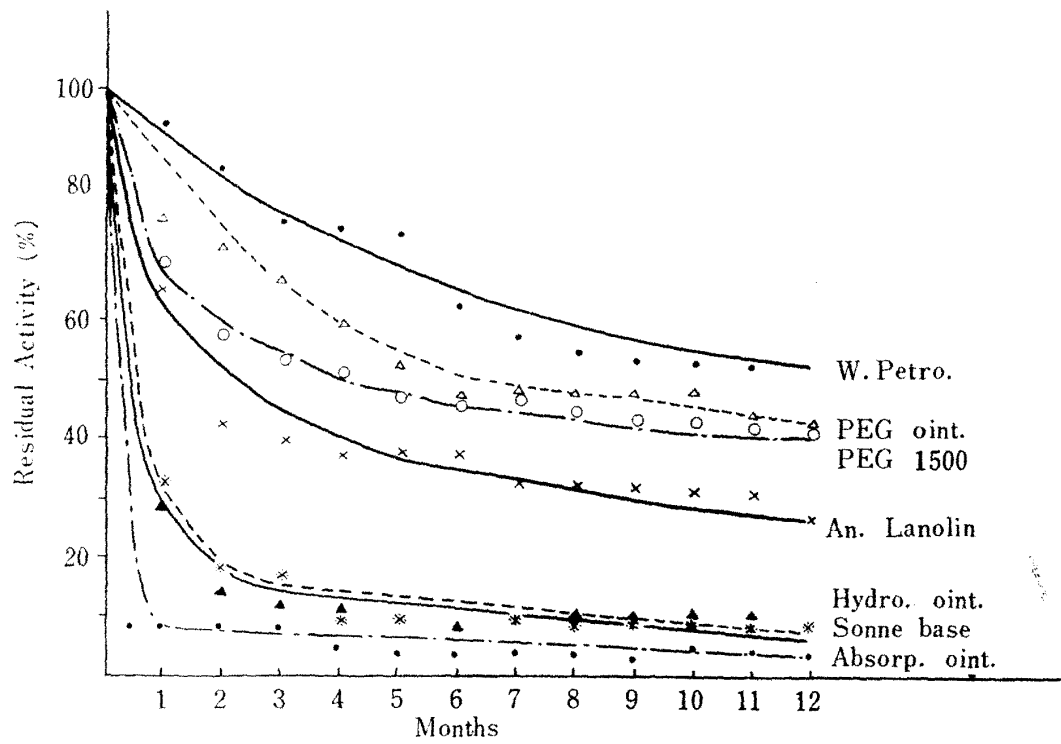


Fig. 4 Change of Bacillus subtilis Alkaline Proteinase in Ointment Bases

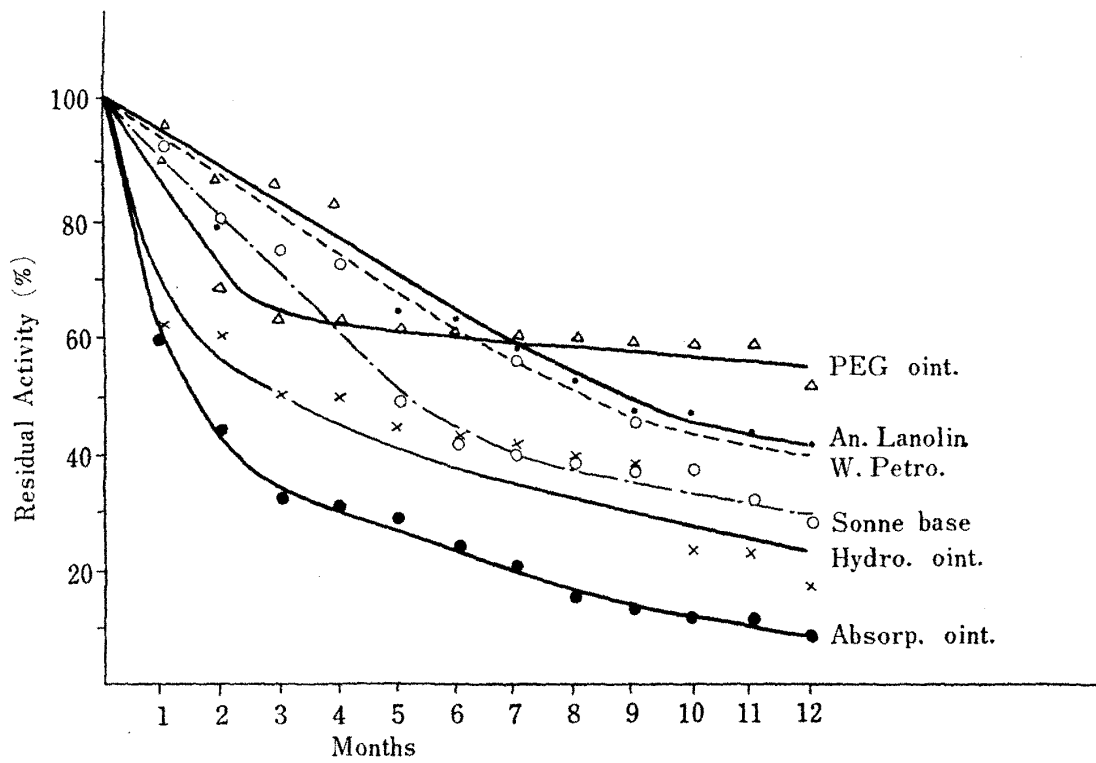


Fig. 5 Change of Cellulase AP in Ointment Bases

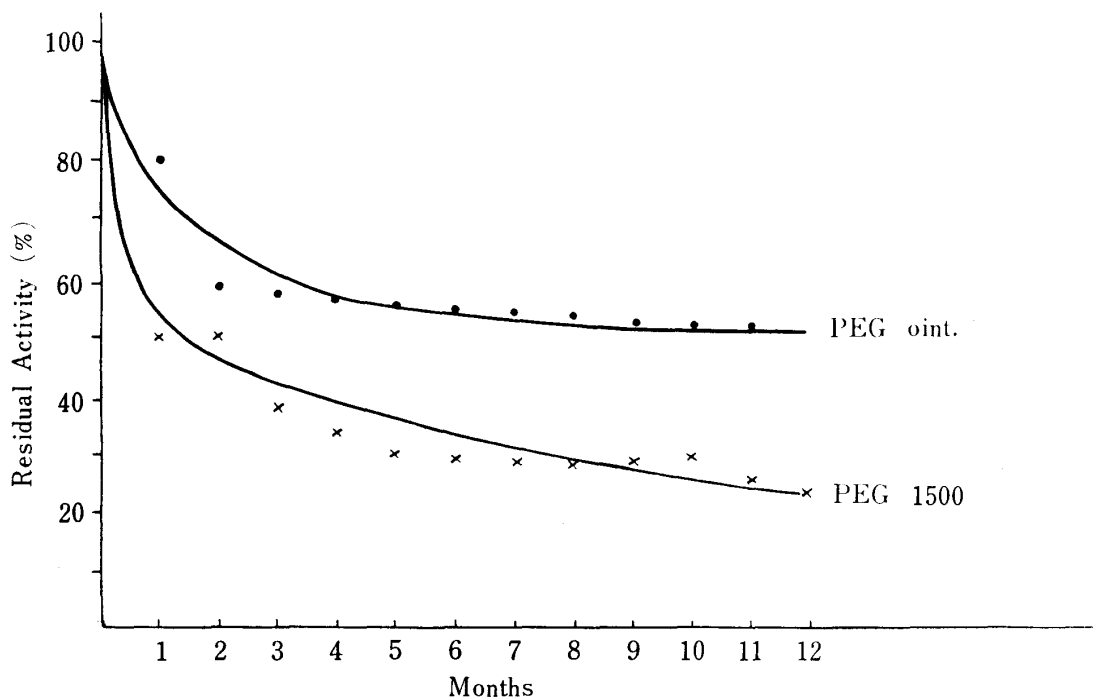


Fig. 6 Change of Lipoprotein Lipase in Ointment Bases

Fig 3. は Pranase で, ポリエチレングリコール軟膏, 精製ラノリン, 白色ワセリンは40%の残存率で, 他の軟膏基剤に比べて多少良好な傾向にあった。

Fig 4. は Bacillus subtilis alkalineproteinase で軟膏基剤中白色ワセリンが良く, 1ヶ年後では50%以上の残存率を示した。

次に軟膏剤中の Cellulase AP. Lipoprotein lipase について経時変化を測定した。著者らの研究室で開発した Cellulase AP に溶菌現象があることを共同研究者の高木が電顕像において考察した。即ち細菌の細胞壁にはある種の多糖類が存在しているので, 大腸菌(北里62)を材料としてこれに Cellulase AP を作用させて生ずる溶菌現象を電子顕微鏡で観察すると, 原形質膜の透過性に変性をきたし, 原形質の変性あるいは原形質分離の像が見られた。

一方, Lipoprotein lipase が白癬菌に対して顕著な菌融解作用があることを榊原により発表されているので, 著者らは同様糸状菌から得られた Lipoprotein lipase を白癬菌に応用するにあたり, 先ず軟膏中の Lipoprotein lipase の安定性について実験を行った。

Fig 5. は Cellulase AP について CMC-ase 活性の経時的な残存活性の結果を示したものである。軟膏基剤ではポリエチレングリコール軟膏, 白色ワセリン, 精製ラノリンが1ヶ年後で40%以上の残存率を示している。

Fig 6. は Lipoprotein lipase 活性1ヶ年後における結果を示したものである。軟膏基剤としてポリエチレングリコール軟膏, ポリエチレングリコール1500を用いたが, 経時的失活が大で影響の大きいことが認められた。なお以上の経時変化による外観観察については, いずれの軟膏剤においても変化が認められなかった。

## 結 果

以上著者らは各種軟膏基剤に各種酵素剤を配合した場合の酵素活性の経時的安定性について実験した結果, プ

ロテアーゼ活性の効力について動物性基源の Pancreatin においては、白色ワセリン、精製ラノリン、ポリエチレングリコール軟膏等が1ヶ年後において80%以上の残存活性率を示した。糸状菌性基源の Semialkalineproteinase では白色ワセリン、ポリエチレングリコール軟膏、精製ラノリン等が1ヶ年後において75%以上の残存活性率を示した。Pronase ではポリエチレングリコール軟膏が50%附近、Bacillus subtilis alkalineproteinase では白色ワセリンが50%附近、Cellulase AP, Lipoproteinlipase ではポリエチレングリコール軟膏が50%附近の残存活性率を示した。

### 文 献

- 1) 杉浦, 加藤(精), 田中: 薬剤学 **24**, 206 (1964)
- 2) 杉浦, 田中: 薬剤学, **25**, 228 (1965)
- 3) 有馬, 杉浦, 仲: 東海薬学会総会発表 (1965)
- 4) 蔭山, 醸工: **33**, 28 (1955)
- 5) Somogyi, M: J. Biol. Chem, **195**, 19 (1952)
- 6) Dole, V. P: J. chin. I nuest, **35**, 150 (1956)
- 7) 高木: 未発表
- 8) 榎原: 寄生虫学雑誌, **14**, 47 (1965)

---

竹中英雄, 伊藤 元, 林 利樹, 大竹敏雄: 可溶化薬剤に関する研究 (第2報)\*

可溶化プロカインについて

**Hideo Takenaka, Hajime Itō, Toshiki Hayashi and Toshio Ōtake :**

Studies on solubilized Drug. II. On the Solubilized Procaine

In this study, we experimented the solubilization of procaine base by Tween 20 and the stability of this solubilized base. In addition, the physiological action of the procaine solution was observed.

These procaine solutions are as following; (A) is aqueous solution added benzylalcohol to aqueous solution of procaine hydrochloride. (B) is aqueous solution added benzylalcohol and distilled water to Tween 20 containing procaine base. (C) is aqueous solution added distilled water to Tween 20 containing benzylalcohol solution of procaine base. The solutions of (a), (b) and (c) contain 0.15 M phosphate buffer (pH 5.9) instead of distilled water in (A), (B) and (C) solutions. In these solutions, each concentration of the base, benzylalcohol and Tween 20 is 1w/v%, 1v/v%, and 10 w/v%.

These solutions were preserved at 30°C in a thermostat. The amount of procaine and PABA in these solutions were determined colorimetrically at several intervals. And it was found that the stability of procaine was little differed in the solution having proximate pH.

In the experiments using the spinal frog in order to examine the physiological action, the anesthetic duration of solubilized procaine, (B) and (C), showed about 1.7 times to the action of procaine hydrochloride (A). In the measuring of the required time for recovery of reflection of the cornea with guinea pig, the anesthetic duration of solubilized procaine (b) showed about 2.7 times to the action of procaine hydrochloride (a), and (c) was about 3 times.

---

\* 第1報 本誌 **8**, 43 (1958)