

## 目 次

## 報 文

銀イオン滅菌装置通過水中の銀イオン量について……………山手 昇, 浦久保五郎	1
陰イオン交換平衡におよぼす非水溶媒の影響について (第1報) メタノール, エタノール, アセトン-水混合溶液中での硝酸 イオンとハロゲンイオンとの交換平衡について……………小川秀子, 辻 章夫	3
ある種の市販放射性薬品について……………長沢佳熊, 亀谷勝昭	9
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第8報) 魚類の放射能汚染 とその放射化学分析……………長沢佳熊, 亀谷勝昭, 城戸靖雅	11
有機性ハロゲン簡易定量法 (第1報)……………板井孝信, 中島利章	17
ビタミンCとピロールとの呈色反応……………小川俊太郎, 河内敬朝, 西村秀子	21
マーサリルのポーラログラフ定量法……………藤井正道, 佐藤 寿	29
有機化合物のポーラログラフによる研究 (第11報) p-ヒドロキシ プロピオフェノンのポーラログラフ(第12報) 3-ニトロ フタル酸のポーラログラフ……………佐藤 寿	33
有機化合物のポーラログラフによる研究 (第13報) 2,6-ジ置換 シクロヘキサノン類のポーラログラフ……………佐藤 寿	39
マレイン酸エルゴメトリン標準品について……………長沢佳熊, 鹿島 哲, 土屋雅一	45
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第5報) 補償法によるエチルアルコール中の少量のメチルアルコールの定量……………大場琢磨	53
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第6報) ブチルヒドロオキシアニゾール異性体の定量とその混合物の融点について……………大場琢磨	55
農業ゲサチオンの定量法について……………川城 巖, 竹内末久	59
エアゾール殺虫剤中のピレトリン定量に関する研究 (第1報) 効力増強剤の定量におよぼす影響について……………山口一孝, 西本和光	61
麻薬中に混入されたプロカインの検出……………朝比奈晴世, 志内賢彦	65
Sodium Tetraphenyl-boron によるアルカロイド類の定量……………中川雄三, 伊阪 博	69
食品中の繊維素グリコール酸ナトリウムの定量に関する研究 (第2報) ナフタレンジオール法によるアイスクリーム中の定量について……………藤井清次, 林 敏夫, 原田基夫	75
食品中の繊維素グリコール酸ナトリウムの定量に関する研究 (第3報) 置換度の測定によるアイスクリーム中の定量について……………藤井清次, 原田基夫, 林 敏夫	79
合成樹脂製容器の研究 (第4報) メラミン樹脂の溶出量について……………川城 巖, 岡田太郎, 細貝祐太郎	83
ロウオLFIA・アルカロイドの定量に関する研究 (第3報) 重量法による総アルカロイドの定量について……………山口一孝, 庄司初枝, 伊藤巳代子	87
ロウオLFIA・アルカロイドの定量に関する研究 (第4報) レセルピンの沓紙電気泳動による分離定量について……………山口一孝, 庄司初枝	91
ロウオLFIA・アルカロイドの定量に関する研究 (第5報) 円筒クロマトグラフ法によるレセルピンの分離定量の検討……………山口一孝, 福島清吾, 伊藤巳代子	95
ロウオLFIA・アルカロイドの定量に関する研究 (第6報) <i>Rauwolfia chinensis</i> のアルカロイドについて……………山口一孝, 庄司初枝	99
あへんの紫外線吸収スペクトルについて (第1報) 採汗回数別あへんの吸収スペクトルの異同および吸光度の比……………朝比奈晴世, 大野昌子	103
J.P. VI によるあへん中のモルヒネ定量用計算図表……………井上 勲	109
インド産大麻製品 "Charas" の紫外線吸収について……………朝比奈晴世, 水町彰吾	113

"Charas" の呈色反応および汚紙クロマトグラフィー	朝比奈晴世, 志内賢彦	115
ケシ蒴果の切傷方法とあへんおよびモルヒネ収得量	川谷豊彦, 藤田早苗の助	119
ケシ <i>Papaver somniferum</i> L. の生育ならびに収量に及ぼす窒素質		
肥料の影響について	木下孝三	133
タマサキツヅラフジの試植栽培 (第3報) 塊茎栽培について (その1)	石原活磨	139
レモンガラスの系統の分類に関する研究 (予報) I. 生育上の		
一般特性, 収草量, ならびに生葉の含水率について	宮崎幸男	143
レモンガラスの系統の分類に関する研究 (予報) II. 生葉の		
含油量ならびに油のチトラル含量について	宮崎幸男	149
クラムヨモギ <i>Artemisia kurramensis</i> QAZILBASH の生育ならびに		
収量におよぼす肥料成分の影響について	木下孝三	155
種子島における印度蛇木の栽培試験 (第1報) 発芽試験について	高城正勝	159
プロタミンの生物学的定量法について	芹沢 淳	163
ヒスタミンの研究 (第1報) 麻酔ハトの血圧下降に基くヒスタミンの		
用量-反応線	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳	169
断頭ニワトリの血圧に対する脳下垂体後葉ホルモンの反応-附		
2, 3 薬剤の反応	中山豪一, 芹沢 淳	173
発熱性物質試験に関する研究 (第1報) 家兎体温に関する		
基礎的条件について	北川純男, 川崎浩之進	179
発熱性物質試験に関する研究 (第2報) 首枷式固定法の		
家兎体温におよぼす影響	北川純男, 川崎浩之進	185
菌株および培養条件と赤痢菌内毒素 (予報)	岩原繁雄, 石関令子	193
赤痢菌体の Rhamnose および Glucosamine について	越沼きみえ	197
ビルマ豆の青酸試験法について	川城 巖, 川田公平, 竹内末久, 漆畑喜子	201
輸出用サケおよびマス缶詰検査について	川城 巖, 川田公平, 細貝祐太郎	205
Casein-Folin 呈色B法によるパンクレアチンおよび結晶		
トリプシンの蛋白分解力測定について	朝比奈正人	209
インシュリンの薬化学的研究 (第22報) 粗まぐろインシュリンの精製過程において		
単離した結晶蛋白質 (Cryst. TC) および粗まぐろインシュリンからの無効		
結晶 (Cryst. TA) の構成アミノ酸について	長沢佳熊, 西崎笹夫	213
インシュリンの薬化学的研究 (第23報) かつおインシュリンの		
結晶化により得られた球形結晶について	長沢佳熊, 西崎笹夫, 竹中祐典, 本間輝武, 平岡 孝	217
インシュリンの薬化学的研究 (第24報) かつおインシュリンの		
抽出過程におけるpH8の無効の蛋白性沈でん物について	長沢佳熊, 西崎笹夫	221
性腺刺激ホルモンの研究 (第5報) 幼若マウスの卵巣重量増加		
および子宮重量増加による血清性腺刺激ホルモンの検定	長沢佳熊, 越村栄之助	225
性腺刺激ホルモンの研究 (第6報) 血清性腺刺激ホルモン		
日局標準品の製造およびその検定	長沢佳熊, 越村栄之助	235
性腺刺激ホルモンの研究 (第7報) 胎盤性性腺ホルモン		
日局標準品の製造およびその検定	長沢佳熊, 越村栄之助	241
歯科用線鈎材について (第1報) 歯科用ステンレス鈎用線の		
熱処理による機械的性質の変化について	藤井正道, 堀部 隆	249
銀錫アマルガム合金の硬化膨縮について (第4報) 銀錫アマルガムの		
異常膨脹の原因について	藤井正道, 堀部 隆	255

銀錫アマalgam合金の硬化膨縮について(第5報)合金粉末の		
比表面積の硬化膨脹におよぼす影響について	藤井正道, 堀部 隆	259
衛生材料の研究(第9報)最近の脱脂綿およびスフ綿	吉村 淳, 遠藤 勝, 五十川泰郎	265
資 料		
灯台の飲料用天水の放射能調査	長沢佳熊, 河村正一	275
輸入果汁缶詰中のスズ含量について	川城 巖, 川田公平, 細貝祐太郎	279
熊本県水俣地方の奇病に関する化学的毒物の検索成績	川城 巖, 福沢富美	281
中華麵中のカセアルカリの試験について(第1報)乾麵製造		
工程中の熱処理操作の影響	川城 巖, 川田公平, 割石浩市	285
中華麵中のカセアルカリの試験について(第2報)乾麵製造		
工程中の熱処理操作を行つた種々の製品についての検討	川城 巖, 川田公平, 割石浩市	287
比素含有粉ミルク添加飼料によつて飼育せる鶏の卵および		
組織中の比素	川城 巖, 江島 昭	289
モノフルオール酢酸アミドの残留試験(第3報)桃および林檎について	川城 巖, 竹内未久	293
輸入豆の青酸試験成績	川城 巖, 川田公平, 竹内未久, 漆畑喜子	295
国立衛生試験所パレイショでん粉標準品の製造	長沢佳熊, 中山豪一, 木村俊夫	297
昭和32年度日本産あへんのモルヒネ含量について	中川雄三, 伊阪 博, 吉川佐栄子	303
春日部における <i>Rauwolfia</i> 属植物特に印度蛇木の		
試作栽培について(第1報)	川谷豊彦, 石原活磨, 逸見誠三郎	307
<i>Shigella flexneri</i> 流行株のキノロン反応, サルファ剤		
感受性およびインドール反応について	岩原繁雄	315
速 報		
特殊クリームの試験法について(漂白クリーム)	市川重春, 南城 実, 林 悦子, 狩野静雄	319
Cryst. TAと結晶グルカゴンとの生理作用の比較	長沢佳熊, 西崎笹夫, 佐藤 浩, 白井浄二	321
牛, 鯨結晶インシュリンおよび魚インシュリンDNP化について	長沢佳熊, 西崎笹夫	323
輸入バターから分離した大腸菌群について	林 長男	325
<i>Rauwolfia</i> 属植物の染色体数(第2報)	川谷豊彦, 宮崎幸男, 大野忠郎, 逸見誠三郎	327
食品中の微量有害性金属に関する研究(第1報)市販牛乳の		
比素含量について	川城 巖, 岡田太郎, 近藤竜雄	329
米糠中のシアゾ色素形成物質	川城 巖, 福沢富美, 江島 昭	331
抄 録		333
講演要旨		343
業務報告		
国家検定, 国家検査等の試験成績報告	総務部	351
国立衛生試験所の標準品について	総務部	360
所内講演会		362
正誤表(第75号)		363

## インシュリンの薬化学的研究 (第22報)\*

粗まぐろインシュリンの精製過程において単離した結晶蛋白質 (Cryst. TC) および粗まぐろインシュリンからの無効結晶 (Cryst. TA) の構成アミノ酸について

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXII.

On the Crystalline Protein (Cryst. TC) Isolated from the Crude Tunny Fish Insulin and the Amino Acid Composition of Cryst. TA

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがき 著者らは第20報<sup>1)</sup>において粗まぐろインシュリンから六面体結晶 (Cryst. TA) および球形結晶 (Cryst. TB) を単離したことを報告した。今回はなおクサビ型結晶を単離した (Fig. 1 参照)。この結晶 (Cryst. TC と称する) は収得量が少いため、種々の物理化学的の実験をおこなうに充分ではなかつたが、生物的には不活性で (実験2参照)、ペーパクロマトグラフィーの Rf 値は牛結晶インシュリンに比べ明らかに小さい (実験3参照)。またインシュリン希釈液に対して溶解度が比較的小さく、ブタノール: 酢酸: 水 (3: 1: 4) を展開溶剤とするペーパクロマトグラフィーでも原点に残る部分が少量あつた。

つぎに第20報に報告した六面体結晶 (Cryst. TA) 約 5 mg を第18報<sup>2)</sup>の方法に準じ塩酸加水分解をおこない、二次元ペーパクロマトグラフィーで構成アミノ酸の種類を検した結果、約 13 個のニンヒドリン呈色スポットを認めたが、プロリンの存在は認めなかつた (実験4参照)。

## 実 験 の 部

実験 1. クサビ型結晶蛋白質の単離: まぐろの Stannius 小体から抽出した粗製インシュリン (約 17 u/mg) 320mg を 0.01N-塩酸 2 cc に溶かし、N-塩酸 10 cc, リン酸緩衝液 (pH 7.15) 125 cc, 水 125 cc を加えてろ過し、0.5% 塩化亜鉛溶液 2.5 cc, アセトン 25 cc を加え、これに N-水酸化アンモニウム液を加えて pH を 6.2 に調節する。ガラス棒で器壁をこすり、4° の氷室に放置するとき約 1 週間を経過して一部分クサビ型結晶が集りイチョウ葉型結晶の生成を認めた。この結晶を第20報と全く同じ方法で単離し (Fig. 1 参照)、1.2 mg を得た (収量約 0.4%)。

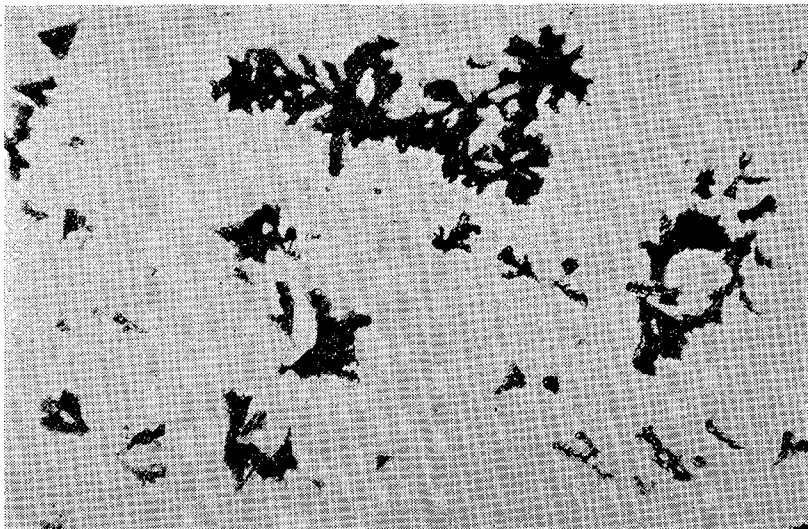


Fig. 1. Crystals Isolated from the Crude Tunny Fish Insulin. (Cryst. TC) (×600)

\* 第21報: 本誌, 75, 99 (1957)

実験 2. 生物試験 : Cryst. TC を日局記載のインシュリン溶剤に溶かし 1 mg/cc とする. この溶液 0.4 cc, 0.2 cc を 20 時間絶食した家兎の耳静脈に注射し, 注射後の血糖量の変化を検した. その結果を Fig. 2 に示す.

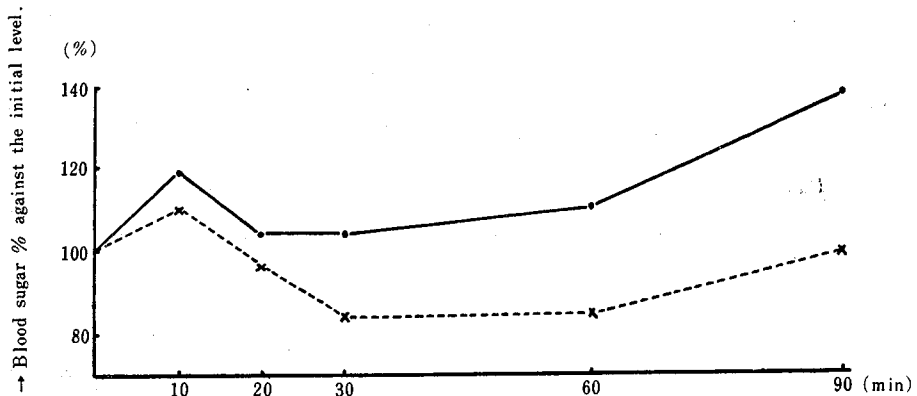


Fig. 2. Assay of Blood Sugar.

—•— injected 200g/1.7kg (Body weight).  
 .....×..... injected 400g/1.8kg (Body weight).

These rabbits were fasted for 20 hours before injection and injected Cryst. TC intravenously.

Fig. 2 から Cryst. TC はインシュリン作用もグルカゴン作用もほとんど示さない.

実験 3. Cryst. TC のペーパクロマトグラフィー : 第 18 報の方法により同一沓紙を用い, 同一条件で牛インシュリンと Cryst. TC を各 3 個ずつ展開した結果を Table 1 に示す.

Table 1. Comparison of Rf Value

Sample	Rf value	Standard deviation
Ox Insulin	0.446	± 0.050
Cryst. TC	0.279	± 0.023

この結果から Cryst. TC は牛結晶インシュリンに比べ Rf 値が明らかに小さい. またこの Cryst. TC の溶液は溶解度が比較的小さいためか少量の不溶物を認め, ペーパクロマトグラフィーで原点に残るスポットも認めた.

実験 4. Cryst. TA の塩酸加水分解物のペーパクロマトグラフィー : Cryst. TA 約 5 mg をとり, 12 N-塩酸 2 cc を加えガラス管に密封し, 110° の恒温箱に入れ 6 時間保つ. 分解物を時計皿に移し, 水浴上で蒸発乾固する. さらに蒸留水を加え数回蒸発乾固をくり返し塩酸をほとんど完全に除くとき褐色残留物少量を得, これをペーパクロマトグラフィーの展開試料とした.

東洋沓紙 K.K. 製 No. 50 の角型 (40×40 cm) 沓紙で上昇法により最初 80%-フェノール, つぎに酢酸・水性ブタノール, ブタノール : 酢酸 : 水 (3 : 1 : 4) で展開し, ニンヒドリンで呈色した結果 Fig. 3 に示すスポットを得た.

またスポットの推定にはそれぞれのアミノ酸単体を加水分解物と同一の条件で展開してそれらの Rf 値と比較対照した結果を Table 2 に示す.

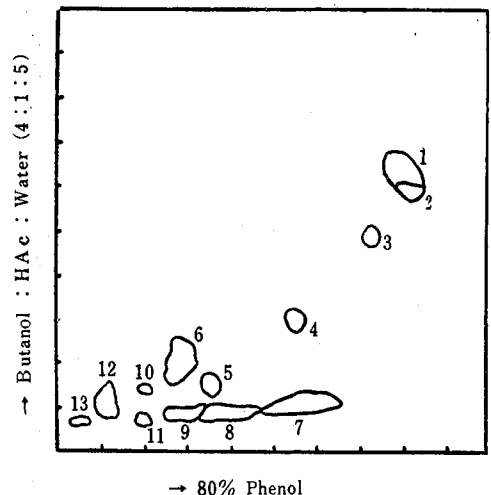


Fig. 3. Paperchromatography of Cryst. TA.

Table 2. Estimation of Amino Acids.

Spot No.	Color	Estimated amino acid
1	P	Leu+Ileu
2	PB	Phe
3	Pink	Val
4	Pink	Ala
5	BrR	Gly
6	Pink	Ser
7	G	His
8	P	Arg
9	P	Lys
10	PR	Glu
11	PR	Unknown
12	P	Asp
13	P	Cys

P : purple    B : blue    Br : brown    G : gray    R : red

Spot 1 は Leu と Ileu のスポットであるが、この展開溶媒ではよく分離できない。

Spot 2 は Spot 1 とほとんど隣接したが、色調が若干異なり、対照実験の Rf 値とよく一致するので Phe と推定した。

Spot 3 は Val, Spot 4 は Ala である。

Spot 5 はその Rf 値と呈色により Gly と推定する。

Spot 6 はかなり大きくしかも色調が一樣であつた。対照実験の Rf 値と色調から Ser と思われる。

Spot 7 はかなり大きいが対照実験の Rf 値と色調から His と推定した。

Spot 8 は Arg, Spot 9 は Lys である。

Spot 10 は小さいが対照実験の結果から Glu と推定した。

Spot 11 は対照実験の結果それに該当するものがないため不明である。

Spot 12 は Asp, Spot 13 は Cys と推定した。

このほか Tyr の存在は試料を多量に用いた場合微に呈色することもあるが、その存在は疑わしい。Try はこの加水分解の条件では破壊されるので存否は不明である。Thr と Pro のスポットは認められなかつたので存在しないと推定する。

### む す び

1) 粗まぐろインシュリンから Cryst. TC (Fig. 1 参照) を単離した。これはクサビ型結晶で生物的活性をほとんど示さず、ペーパクロマトグラフィーの Rf 値は牛結晶インシュリンより明らかに小さい(実験 1, 2, 3 参照)。

2) 第20報に記した Cryst. TA を塩酸加水分解して二次元ペーパクロマトグラフィーをおこない、構成アミノ酸の種類を推定した結果13個のニンヒドリン呈色スポットを検出した。構成アミノ酸は Leu, Ileu, Phe, Val, Ala, Gly, Ser, His, Arg, Lys, Glu, Asp, Cys で不明のスポットが1個ある。また Thr, Pro, Met は存在せず Tyr の存在も疑わしい(実験 4 参照)。

### 文 献

- 1) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 平岡 孝, 深沢真司: 本誌, 75, 95 (1957).
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 74, 179 (1956).

### Summary

- 1) The authors isolated a crystalline protein named Cryst. TC (see Fig. 1) from crude tunny fish

insulin powder, it has no activity and has smaller Rf value than that of ox insulin crystals, on the paperchromatography.

2) The amino acid composition of Cryst. TA, an inactive crystalline protein from tunny fish insulin powder, was preliminary reported; the result was shown in Table 2, from which Leu. Ileu. Phe. Val. Ala. Gly. Ser. His. Arg. Lys. Glu. Asp. and Cys. were found; Thr. Pro. Met. were not be found and the existence of Tyr. was doubtful.

Received May 31, 1958.

## インシュリンの薬化学的研究 (第 23報)\*

かつおインシュリンの結晶化により得られた球形結晶について

長沢佳熊, 西崎笹夫, 竹中祐典,

本間輝武\*\*, 平岡孝\*\*

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXIII.

On the Bead Insulins Obtained from Crude Bonito Insulin

Kakuma NAGASAWA, Sasao NISHIZAKI, Yusuke TAKENAKA,

Terutake HONMA and Takashi HIRAOKA

まえがき 著者らは第 20報<sup>1)</sup>でまぐろの粗インシュリンから少量の六面体結晶(Cryst. TA)および球形結晶(Cryst. TB)を分離し若干の検討をした。また第 22報<sup>2)</sup>で少量のクサビ形結晶(Cryst. TC)を単離した。

本間および平岡はかつおからの粗インシュリン(17 u/mg)をクエン酸溶液から結晶化して球形結晶を得た(これを Cryst. BA と称する)(実験 1 参照)。またリン酸カリウム溶液から結晶化して球形結晶を得た(これを Cryst. BB と称する)(実験 2 参照)。Cryst. BA, Cryst. BB は顕微鏡下の観察ではともに Cryst. TB にきわめてよく似ている。西崎, 竹中はこれらの結晶の検討をおこない, 生物検定では Cryst. BA……約 16u/mg, Cryst. BB……約 17 u/mg (実験 3 参照), 含有窒素量(N)は Cryst. BA……14.8%, Cryst. BB……13.0% (実験 4 参照), 含有亜鉛量(Zn)は Cryst. BA……0.53%, Cryst. BB……0.94%, (実験 5 参照), ペーパクロマトグラフィの Rf 値は Cryst. BA, Cryst. BB はほとんど同じであつたが, 対照に用いた牛結晶インシュリンのそれより明らかに小さい(実験 6 参照)。また pH 2.2 の塩酸-塩化カリウム緩衝液に対して Cryst. BA の方が Cryst. BB よりやや溶けやすく, その電気泳動図から Cryst. BB の方が不純成分を若干含むように観察され, それらの泳動速度は牛結晶インシュリンよりも速く, プロタミンより遅い(実験 7 参照)。

また紫外部の吸収曲線を測定した結果, Cryst. BA, Cryst. BB はいずれも 275~280m $\mu$  に吸収極大を示した(実験 8 参照)。Cryst. BA, Cryst. BB を第 20報と全く同じ操作で再結晶するとき, Cryst. TA とよく似た形状の六面体結晶少量を認めたが, その量は Cryst. BB の方が多かつた。しかし結晶部分と無晶系部分は実験に用いた試料が少量であり, しかも比重の差が明確でないためか結晶部分のみを単離することはできなかつた(実験 9 参照)。

## 実験の部

実験 1. Cryst. BA の結晶化操作を Table 1 に示す。

Table 1. Procedure of Crystalization.

1g of bonito crude insulin (17 u/mg)

Dissolved in 50 cc of water containing 1g of citric acid, 80 mg of zinc chloride and 16 cc of acetone.

Added water to make volume of 100 cc, adjusted to pH 6.1 with conc. sodium hydroxide solution, and warmed at below 50°.

Allowed to cool gradually at room temperature.

All protein materials formed a bead type.

Washed with water and acetone, and dried in vacuo.

Crystals..... named "Cryst. BA."

yield.....0.367 g

実験 2. Cryst. BB の結晶化操作を Table 2 に示す。

\* 第 22報: 本誌, 76, 213 (1958)

\*\* 所員外 清水製薬株式会社



Table 2. Procedure of Crystalization.

1g of bonito crude insulin (17 u/mg)

Dissolved in 0.05M-potassium phosphate containing 10% acetone and 1N-hydrochloric acid.  
Adjusted to pH 6.8 with 10N-sodium hydroxide solution, and filtered.

Clear solution

Added 10 cc of 0.5% zinc chloride solution, adjusted to pH 6.2 with hydrochloric acid, and warmed at below 50°.

Cooled very slowly in a refrigerator for several days.

Separated crystals by centrifugation.

Washed with water and acetone, and dried in vacuo.

Crystals.....named "Cryst. BB."

yield.....0.675 g

実験 3. 生物的単位の推定 標準品および Cryst. BA, Cryst. BB につき家兎 3 匹ずつを用いて交叉試験をおこない生理単位を予試験的に検定した<sup>3)</sup>. Cryst. BA は約 16 u/mg, Cryst. BB は約 17 u/mg であった.

実験 4. 含有窒素量(N)の測定 日局記載のセミマイクロゲル法<sup>4)</sup>により窒素量(N)を定量した. N含量は Cryst. BA.....14.8%, Cryst. BB.....13.0% であった.

実験 5. 含有亜鉛量(Zn)の測定 国際薬局方記載の亜鉛定量法<sup>5)</sup>により亜鉛量(Zn)を定量した. Zn含量は Cryst. BA.....0.53%, Cryst. BB.....0.94% であった.

実験 6. ペーパークロマトグラフィの Rf 値 第15報<sup>6)</sup>の方法により同一濾紙を用い, 同一条件で牛結晶インシュリン, Cryst. BA および Cryst. BB を各 3 個ずつ展開した. それらの Rf 値は, 牛結晶インシュリン.....0.160 ± 0.010, Cryst. BA.....0.073 ± 0.021, Cryst. BB.....0.080 ± 0.025 であった. これらの Rf 値が著者らの今までの報告<sup>1)6)7)</sup>より小さいのは, 溶媒調整後の経過時間および展開時の濾紙の湿度が異なるためである.

実験 7. 電気泳動試験 第 21報<sup>8)</sup>と全く同じ方法により pH 2.2 の塩酸-塩化カリウム緩衝液で透析をおこなった. Cryst. BA は Cryst. BB に比しやや溶けやすい. これらの試料を 12.5 mA で電気泳動をするとき Fig.1 (A), (B) に示す泳動図を得た.



Fig. 1. Ascending and Descending Electrophoresis Patterns of Cryst. BA and Cryst. BB, (in 0.18 ionic strength hydrochloric acid-potassium chloride buffer of pH 2.2.)

above : Ascending, below : Descending.

(A) : Cryst. BA 150 min.

(B) : Cryst. BB 120 min.

これらの泳動速度を第 21報に記したプロタミンおよび牛結晶インシュリンの混合液とまぐろ粗インシュリン<sup>9)</sup>と比較対照して Fig. 2 に示す.

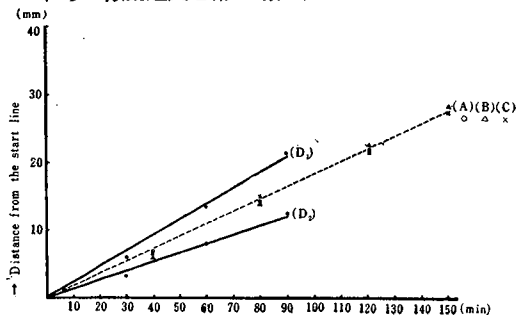


Fig. 2. Comparison of Mobility in Ascending Electrophoresis. (0.18 ionic strength hydrochloric acid-potassium chloride buffer of pH 2.2)

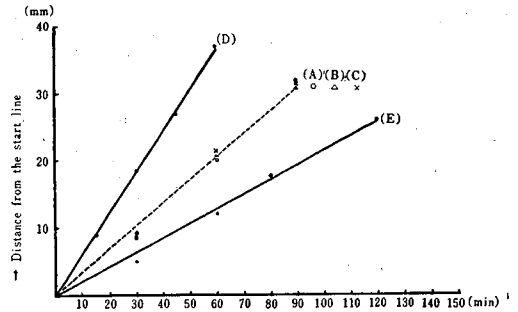
(A) : Cryst. BA, (B) : Cryst. BB, (C) : Tuna Insulin, (D)<sub>1</sub>(D)<sub>2</sub> : Mixture of Protamine and Ox Insulin : from the data in our previous report (XXI). (D)<sub>1</sub> : Protamine (D)<sub>2</sub> : Ox Insulin.

また pH 3.5 の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液で第 21 報と同じ方法で Cryst. BA, Cryst. BB, まぐろ粗インシュリン<sup>9)</sup>, 第 21 報と比較対照し, それらの泳動速度を Fig. 3 に示す.

Fig. 3. Comparison of Mobility in Ascending Electrophoresis.

(0.44 ionic strength acetic acid-sodium acetate buffer of pH 3.5)

(A) : Cryst. BA, (B) : Cryst. BB, (C) : Tunai Insulin, (D) : Protamine : from the data in our previous report (XXI), (E) : Ox Insulin : from the data in our previous report (XXI).



実験 8. 紫外外部吸収スペクトル 実験 7 の Cryst. BA, Cryst. BB の pH 2.2 緩衝液における透析後の試料の少量をとり適当にうすめて紫外部の吸収曲線をとった. Cryst. BA, Cryst. BB はいずれも 275~280 m $\mu$  に吸収極大を持つ. 紫外外部吸収曲線を Fig. 4, Fig. 5 に示す.

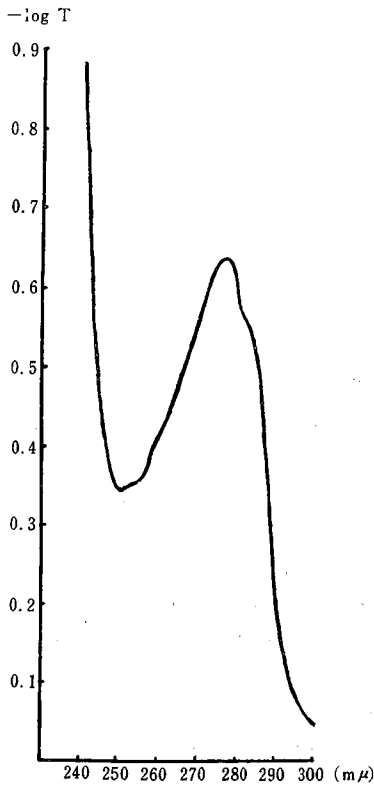


Fig. 4. Ultraviolet Absorption Curve of Cryst. BA (pH 2.2)

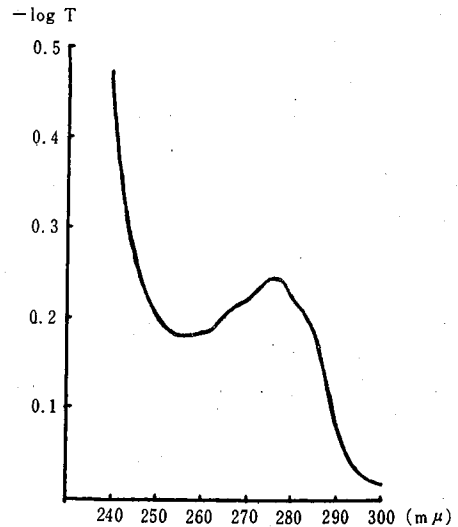


Fig. 5. Ultraviolet Absorption Curve of Cryst. BB (pH 2.2)

実験 9. 再結晶操作法 Cryst. BA および Cryst. BB 各 30 mg をとり第 20 報と全く同じ操作により再結晶をした. Cryst. BB は Cryst. BA よりも一部分, より完全な六面体結晶(Cryst. TA に全く似ている)を顕微鏡下に確認したが, 本実験に用いた試料が少量であり, 結晶部分と無晶部分の比重の差が少いためか, 結晶部分のみを単離することはできなかつた.

## 考察とむすび

著者らは粗かつおインシュリンの結晶化をおこない2種の球型の結晶 Cryst. BA および Cryst. BBを得た。この2種の結晶について比較検討した結果つぎの知見を得た。

- 1) Cryst. BBは Cryst. BAよりも得量が多い(実験1, 実験2参照)。
- 2) これらの結晶の生物学的効価は原料インシュリン(約17 u/mg)とはほぼ同じかむしろ低い(実験3参照)。
- 3) 窒素含量は Cryst. BA 14.8%, Cryst. BB 13.0%である(実験4参照)。
- 4) 亜鉛含量は Cryst. BA 0.53%, Cryst. BB 0.94%である。従つて Cryst. BA はほぼ牛インシュリン結晶に近いが Cryst. BBはその約2倍弱を含有することになる(実験5参照)。
- 5) ペーパークロマトグラフィの Rf値は Cryst. BA, Cryst. BB はほとんど同じであるが牛結晶インシュリンのそれより明らかに小さい(実験6参照)。
- 6) Cryst. BA は Cryst. BB に比べやや溶けやすい。これは亜鉛含量にも関係すると思われる。また泳動の際の peak の数は Cryst. BBの方が多く、多成分系をあらわす。これは Cryst. BBの方が再結晶により六面体結晶の生成が多いという事実と関係すると思う(実験7, 9参照)。魚インシュリンではその泳動速度が牛インシュリンより速いのはその特性の一つと考える。
- 7) 紫外部吸収は Cryst. BA, Cryst. BB いずれも 275~280 m $\mu$  に極大を有する(実験8参照)。

## 文 献

- 1) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 75, 95 (1957).
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 76, 213 (1958).
- 3) Marks, H. P : The Health Organization of the League of the Nations (1926).
- 4) 日本薬局方(厚生省版), 652 (1951).
- 5) International Pharmacopoeia : Vol. II, 274 (1955).
- 6) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 74, 171 (1956).
- 7) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 74, 179 (1956).
- 8) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 75, 99 (1957).
- 9) 未発表

## Summary

The authors obtained two kinds of bead type crystals which they named Cryst. BA and Cryst. BB from crude bonito insulin.

- 1) The yield of Cryst. BB was larger than that of Cryst. BA (see Exp. 1 and 2).
- 2) Biological activities of these crystals were about 16 u/mg (Cryst. BA) and about 17 u/mg (Cryst. BB).
- 3) Nitrogen contents of Cryst. BA and Cryst. BB were 14.8% and 13.0%, respectively.
- 4) Zinc contents of Cryst. BA and Cryst. BB were 0.53% and 0.94%, respectively.
- 5) On applying to a paper chromatography, Rf values of these crystals were almost equal, the values showed distinctly smaller than that of ox insulin crystals.
- 6) Cryst. BA is easier soluble than Cryst. BB. It may be due to content of zinc.
- 7) On the recrystallization, a little amount of crystals, having the same form as Cryst. BA [see our XX report, this Bulletin Vol. 75 page 95 (1957)] was obtained, but not able to be isolated.

Received May 31, 1958.

## インシュリンの薬化学的研究 (第24報)\*

かつおインシュリンの抽出過程における pH 8 の無効の蛋白性沈でん物について

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

## Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin XXIV

On the Inactive Protein Precipitated at pH 8 from Bonito Stannius Corpuscle

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがき かつお Stannius 小体からインシュリンの抽出過程に pH 8 の沈でんを除去するとき、その沈でん物は微灰褐色の粉末として得られる (通常アルカリ蛋白という人がある)。著者らはこの沈でん物\*\*を試料とし、若干の物理化学的および生物学的実験をした。

この沈でんはきわめて弱いインシュリン作用を認めるが (実験 1 参照), ペーパクロマトグラフィーによつてもインシュリンのみを単離することはできなかつた (実験 2 参照)。溶解度は小さく、その等電点様沈でんは大略 pH 8 で起るが、いかなる pH でも完全に澄明には溶けなかつた (実験 3 参照)。また pH 2.2 の塩酸-塩化カリウムの緩衝液で電気泳動をおこなうとき、その泳動図は 1 成分として泳動するが、泳動速度は牛結晶インシュリンよりも速く、プロタミンよりも遅く、まぐろインシュリン<sup>1)</sup>とほとんど同じである (実験 4 参照)。泳動試料の 1 部をとり紫外部の吸収曲線を検した結果 275~280 m $\mu$  に極大を有するが、魚インシュリン<sup>1)</sup>よりやや尖度がゆるやかである (実験 5 参照)。

## 実 験 の 部

実験 1. 本試料中のインシュリンの含量試験 試料 1 g をとり 0.01N-塩酸 30 cc を加えセロファン膜に入れ 0.01N-塩酸に対し 3 昼夜 4° の冷室で透析後 10 000 r.p.m. で 1 時間遠心分離すると、管中の約上半量はほとんど澄明褐色の液となる。この液 1.6 cc, 0.8 cc および 0.4 cc を 20 時間絶食した家兎に皮下注射し注射後 15 分, 30 分, 90 分, および 180 分後の血糖量を、また 0.4 cc, 0.2 cc, 0.1 cc および 0.05 cc を同じ条件の他の家兎の耳静脈に注射し、注射後 20 分, 40 分, 90 分, および 180 分後の血糖量を測定した結果を Fig. 1 に示す\*\*\*。

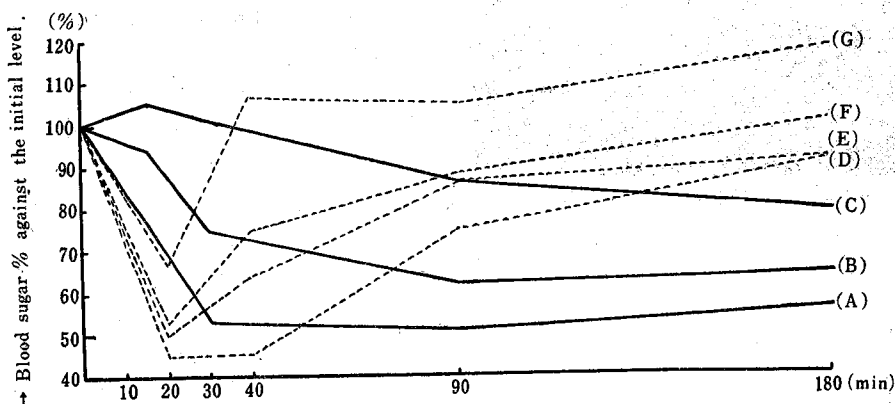


Fig. 1. Determination of Blood Sugar % against the Initial Level after Injection.

— : injected subcutaneously.      ..... : injected intravenously.

(A) : 1.6 cc (B) : 0.8 cc (C) : 0.4 cc (D) : 0.4 cc (E) : 0.2 cc (F) : 0.1 cc (G) : 0.05 cc

\* 第23報 : 本誌, 76, 217 (1958)

\*\* 日本栄養株式会社から提供されたもの、ここに謝意を表する。

\*\*\* この液は 1 cc 中大略 30 mg を含む。したがつて 1.6 cc では大略 50 mg を注射したことになる。これらの家兎は通常 1 匹 (体重 2 kg として) につき、インシュリン約 2 u を皮下注射すればケイレンを起す。実験 1 ではすべての家兎はケイレンを起さなかつた。



実験 5. 紫外外部吸収曲線 実験 4 の試料の一部をとり, 適当に希釈し紫外外部吸収曲線をとつた. その結果を Fig. 5 に示す.

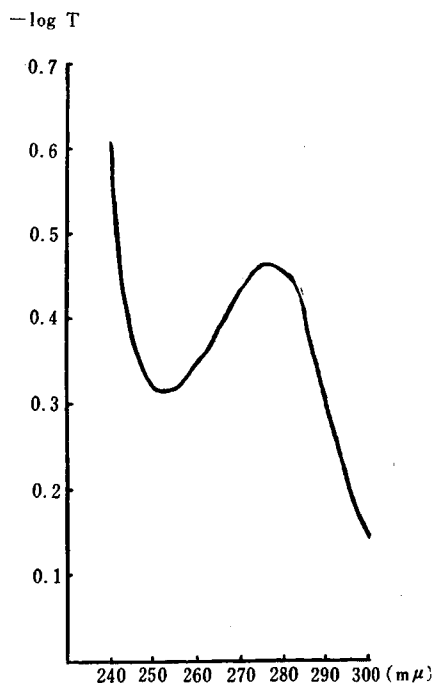


Fig. 5. Ultraviolet Absorption of pH 8 Precipitate.

この結果 275~280 mμ に極大吸収を持つ.

#### 文 献

- 1) 未発表
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 74, 171 (1956).
- 3) 西崎笹夫: 本誌, 75, 493 (1957).
- 4) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 74, 179 (1956).
- 5) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 本誌, 75, 99 (1957).

#### Summary

The inactive protein precipitated at pH 8 from bonito stannius corpuscle in preparing insulin was studied. As the results:

- 1) It showed very weak insulin activity.
- 2) By paperchromatography, most of the protein remains on start line, and small amount of it showed weak band around Rf: 0.4.

Isolated solution of that band with N/100-HCl was tested by rabbits, and it had no insulin activity.

- 3) Solubility of this protein in various pH was studied. Its isoelectric point seemed to be pH 8, and could not be found any pH to make the solution clear.

- 4) Electrophoresis pattern in pH 2.2 showed one component, and its mobility was faster than that of ox insulin and slower than that of protamine.

- 5) Maximum absorption in ultraviolet curve was approximately 275~280 mμ.

Received May 31, 1958.