

目 次

報 文

オートアナライザーによる医薬品の分析 (第4報) 解熱鎮痛剤中のカフェインの定量  
 ..... 柴崎利雄・山本美代子.. 1

ガスクロマトグラフィーの医薬品試験への応用 (第1報) 混合製剤中の解熱鎮痛剤の分析のための  
 液相の研究 ..... 鯉淵昌信・柳沢清利.. 4

インシュリンの薬化学的研究 (第32報) CM-セルローズ・カラム・クロマトグラフィーにより精製  
 したカツオおよびマグロ, インシュリンの末端アミノ酸と化学構造について ..... 長沢佳熊・西崎笹夫.. 8

ウサギによるグルカゴン定量法 ..... 佐藤 浩.. 12

原子吸光分析法の応用に関する研究 (第1報) 原子吸光分析法を応用したポリビニルピロリドンの  
 重金属試験法の検討 ..... 吉村 淳・坪田悦子・岡田敏史・伊阪 博・伊賀宗一郎・  
 野口 衛・柴田 正・伊木信子・河内敬朝.. 14

加熱重合方法と義歯床用レジン of の性質 ..... 藤井正道・堀部 隆・菊池 寛.. 19

銀錫アマルガム合金の硬化膨縮について (第8報) 軸方向と径方向の膨縮の差異について ..... 堀部 隆.. 26

衛生材料の研究 (第12報) 加速電子線を照射した脱脂綿およびガーゼの品質について  
 ..... 伊賀宗一郎・伊木信子・吉村 淳.. 31

連続測光記録計による大気汚染の研究 (第2報) 大気中における汚染物間の相関関係について  
 ..... 外村正治・山手 昇・辻 楠雄.. 35

メタノール中毒の実験的研究 (第4報) <sup>14</sup>C メタノールを投与したウサギの肝アセトン乾燥粉末の  
 分画の放射能 (1) ..... 長沢佳熊・竹中祐典.. 40

*Escherichia coli* UKT-B の Lipopolysaccharide, その化学構造と発熱活性  
 ..... 金田吉男・小川義之・持田研秀.. 43

ヒゴタイの試作栽培とエヒノプシンの単離 ..... 川谷豊彦・大野忠郎・兼松明子.. 48

セクリニン原料ヒトツバハギの栽培試験 (第4報) ..... 川谷豊彦・大野忠郎・兼松明子・栗原孝吾.. 55

春日部における *Solanum aviculare* FORST. f. の試作栽培について  
 ..... 川谷豊彦・大野忠郎・逸見誠三郎・久保木憲人・真木義次・斎藤和子.. 63

蒸気加熱法とγ線照射のケシおよび大麻の発芽におよぼす阻止的效果 (第1報)  
 ..... 藤田早苗之助・川谷豊彦・栗原孝吾.. 68

実験ノート

酢酸コバルト・イソプロピルアミンによる製剤中のバルビタールの比色定量法の改良  
 ..... 柴崎利雄・和田悠紀子.. 72

薬局方収載医薬品に混在するモルヒネの試験について ..... 朝比奈晴世・高橋一徳.. 75

テトラフェニルボロンナトリウムを用いたカリウムの双電極電流滴定について ..... 野口 衛.. 78

非イオン界面活性剤の物理的性状および生物活性について ..... 岩原繁雄・石関忠一・古瀬一麿.. 81

紙綿類のけい光について ..... 堀部 隆・伊東 宏・篠崎 正.. 84

アルコール含有化粧品中のメタノールの定量 ..... 横山 剛・金田吉男・吉川露子・持田研秀.. 87

染毛剤の薄層クロマトグラフィーによる簡易定性試験について  
 ..... 南城 実・五十畑悦子・狩野静雄・小林紀子.. 90

ヘアダイ処理毛髪のコールドパーマによる強度変化について ..... 南城 実・狩野静雄・小林紀子.. 92

Benzalkonium Chloride Tincture に関する実験 ..... 栗栖弘光・越沼きみゑ.. 93

ケシ (*Papaver somniferum* L.) の生育ならびに収量におよぼす加里質肥料配合の影響について  
 ..... 木下孝三.. 98

オウレンの栽培試験 (第1報) 光線の強さがオウレンの生育および収量におよぼす影響 ..... 大野忠郎.. 100

センキュウの栽培試験 (第1報) ..... 逸見誠三郎・本間尚治郎・畠山好雄.. 105

ミシマサイコの発芽に関する試験 (第2報) 播種時期	藤田早苗之助・川谷豊彦・栗原孝吾	108
放射線照射の <i>Ephedra altissima</i> DESF. および <i>Bupleurum falcatum</i> L. の発芽におよぼす影響	藤田早苗之助・川谷豊彦・栗原孝吾	110
麻黄の挿木繁殖 (第1報) <i>Ephedra altissima</i> DESF. と <i>Ephedra distachya</i> L. について	藤田早苗之助・栗原孝吾	112
<b>資 料</b>		
日本薬局方ヘパリン標準品 (粘性) について	長沢佳熊・木村俊夫	115
融点測定に関する知見	長沢佳熊・川村次良・木島敬三・太田美矢子	116
内服用プロメラインの試験法について	長沢佳熊・山羽 力・高橋昭江	121
大麻樹脂の鑑定について	朝比奈晴世・大野昌子・高橋一徳・大野幸雄	123
ポーラログラフによる血液バッグ用 PVC フィルム中のカドミウムの定量	佐藤 寿・島峯望彦	125
歯磨剤の物理的試験について	佐藤 寿・島峯望彦・藤井正道	127
歯ブラシに関する研究	藤井正道・堀部 隆・菊池 寛	130
内装生理用品について	伊東 宏・篠崎 正・原 明子・堀部 隆	136
注射針について (第1報) 市販品の試験	藤井正道・佐藤 寿・島峯望彦・篠崎 正・水町彰吾	137
食品中の有害金属の定量 (第5報) 調製粉乳中の微量金属について	辰濃 隆・中村昌子・細貝祐太郎・川城 巖	143
輸入食品中の <sup>90</sup> Sr および <sup>137</sup> Cs の定量 (第3報)	亀谷勝昭・池淵秀治	145
食品添加物としてのケイソウ土の規格に関する一考察	井上哲男・林 敏夫・斎藤良枝	148
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) オレンジ I 標準品およびボンソー R 標準品について	井上哲男・神蔵美枝子・村上信江	150
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) アズルピンエキストラ標準品・インジゴ標準品およびレーキレッド DBA 標準品について	井上哲男・神蔵美枝子・村上信江	152
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) エリスロシン標準品およびローズベンガル標準品について	井上哲男・神蔵美枝子・村上信江	154
コールドパーマにおける毛髪の前処理の影響について	南城 実・狩野静雄・小林紀子	156
わが国 11 都市の街路大気の大気汚染について	山手 昇・松村年郎・外村正治	158
皇居外苑内濠の水質について	小幡利勝・松井啓子	161
インシュリンに関する資料 (その7) 国家検定からみた最近 10 年間のインシュリン製剤の動向	長沢佳熊・佐藤 浩・白井浄二	164
昭和 38~41 年度におけるビタミン剤の一斉取締試験成績	ビタミン化学部・大阪支所薬品部	166
昭和 39~41 年度における輸入あへんの試験について	朝比奈晴世・高橋一徳	169
昭和 41 年度における市販粉末生薬の検査について	下村 孟・西村和光・佐竹元吉・坂東きみ子	171
昭和 38 年度下半期における注射針および注射筒の輸出検査成績について	藤井正道・佐藤 寿・島峯望彦・篠崎 正・菊池 寛	172
昭和 37~41 年度におけるタール色素の製品検査成績について	井上哲男・寺島敏雄・志村 博・神蔵美枝子・近盛玲子・村上信江	174
昭和 26~41 年度におけるブドウ糖注射液ならびにリンゲル液の発熱性物質試験成績	薬理部・大阪支所細菌薬理部	180
昭和 41 年度における特行試験について	池田良雄・堀内茂友・戸部満寿夫・吉本浜子・近岡昭典・鈴木康雄・小林和雄・北条正躬・降矢 強・川俣一也・鈴木幸子・金子豊蔵・川崎 靖	184
昭和 24 年より同 42 年の間における避妊薬の殺精試験, とくに経時変化について	石関忠一	185
昭和 40, 41 年度における輸入食肉中のサルモネラの検査結果について	鈴木 昭・河西 勉・鈴木君代・岩田夏江・高山澄江	188

抄 録 .....	196
学会講演 .....	215
衛試例会 .....	222
国家検定, 国家検査などの試験状況報告 .....	225
国立衛生試験所標準品 .....	235

## インシュリンの薬化学的研究 (第 32 報)\*

CM-セルローズ・カラム・クロマトグラフィーにより精製したカツオ\*\*および  
マグロ\*\*・インシュリンの末端アミノ酸と化学構造について

長 沢 佳 熊・西 崎 笹 夫

*Pharmaceutical and Chemical Studies on Insulin. XXXII*

*On Terminal Amino Acids and Chemical Structure of Bonito Fish and Tunny  
Fish Insulins Purified by CM-Cellulose Column Chromatography*

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

- 1) Partially purified bonito fish (16 u/mg) and tunny fish (12 u/mg) insulins were separated into three main fractions by CM-cellulose column chromatography (see Fig. 1, Exp. 1).
- 2) Sufficient insulin activities were found in the second and third fractions, tentatively assigning to  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$  (see Exp. 2).
- 3) N-terminal amino acids were determined by dinitrophenylation, and C-terminals, by hydrazinolysis and carboxypeptidase A (see Exp. 3). Their insulin activities and the assumed chemical structures were summarized in Scheme 1.
- 4) These insulins had given one spot by paper chromatography and paper electrophoresis, and Rf values were rather smaller than that of bovine insulin. Their isoelectric points were shown a little higher pHs. It could be explained that in the behavior of paper electrophoresis after performic acid oxydation, A chains were more alkaline than that of bovine one (Exp. 4).
- 5) The first fractions obtained in this chromatography, had no activities and they were heterogeneous by paper chromatography and paper electrophoresis. The N-terminal amino acids were similar to that of Cryst. TA, but serine residue found in C-terminals would be suggested significant difference from Cryst. TA (Exp. 5).

(Received May 31, 1967)

著者らは第 30 報において、等電点沈でん法による精製カツオおよびマグロ・インシュリンの末端アミノ酸を定量的に分析した結果、それらはそれぞれ 2 種類のインシュリンが存在することを推定した。

イオン交換体を用いるカツオ・インシュリンの精製については、佐竹ら<sup>3)</sup>の CM-セルローズ・カラムク

\* 第 31 報は衛生試験: 81, 34 (1963).

本報は昭和 36 年 12 月、西崎が「カツオおよびマグロ類インシュリンの精製と末端アミノ酸に関する研究」として提出した学位論文の一部であり、昭和 37 年 3 月、[厚生科学研究報告“高分子化合物製剤の物理化学的および化学的試験法に関する研究(第 2 報)”, 主任研究者: 長沢佳熊] にも掲載した。また昭和 37 年 9 月 15 日、日本薬学会関東支部例会において講演発表した。本報の要旨は竹中祐典技官によって“Sur l'insulin des poissons, notamment du scombres et du thon”: *Produits Pharmaceutiques* 17, 421 (1962) に紹介されている。本報に用いたアミノ酸略号は IUPAC-IUB によった、*Biochem.* 5, 1445 (1966)

\*\* カツオ: *Katsuwonnus vagans*; (K)  
マグロ: *Thynnus alalunga*; (T)

ロマトグラフィーの報告がある。

本報においては、カツオ・インシュリンについて佐竹らの方法を準用し、さらにマグロ・インシュリンについても、カツオの場合と同じ条件の CM-セルローズ・カラム・クロマトグラフィーを行ない(実験 1)、それぞれ不活性な第 1 区分およびそれに続く 2 個の活性区分に分離し得た(実験 2)。それぞれの活性区分を仮りに  $\alpha$ ,  $\beta$  と称することにし、第 30 報<sup>1)</sup>で述べた DNP-法によって N-末端アミノ酸を、第 31 報<sup>2)</sup>で述べたヒドラジン分解法およびカルボキシペプチダーゼ A を用いて C-末端アミノ酸を分析した(実験 3)。またそれらの沓紙クロマトグラフィー、沓紙電気泳動の挙動および過ギ酸酸化物の性質を述べ(実験 4)、さらに実験 1 によって得た不活性区分と、前報<sup>3~5)</sup>で述べた不活性たん白結晶 Crystal TA との比較についても論ずる(実験 5)。

## 実験の部

実験 1. カツオおよびマグロ・インシュリンの

## CM-セルローズ・カラム・クロマトグラフィー

## 1.1 実験試料:

カツオ・インシュリン: 16 u/mg

マグロ・インシュリン: 12 u/mg

これらのインシュリン粉末は清水製薬株式会社から提供された。

## 1.2 カラムの調製:

CM-セルローズ (0.68 meq/g, Serva 社製) 20 g をとり, 0.5 N-酢酸 (pH 2.9) に浸して 1 夜放置する。これを内径 2.8 cm のガラス・クロマト管に移したとき, カラムの高さは約 25 cm であった。

## 1.3 クロマト操作

各回に試料 400 mg ずつをとり, 0.5 N-酢酸に溶かして 1.2 で記したカラムに吸着させ, 溶離に際しては 0.5 N-酢酸 300 ml に 1.0 N-ギ酸を滴下する系の傾斜溶離を行なった。流出速度を 10~15 ml/hr に規制し, 流出液の吸光度 (275 m $\mu$ ) および pH を測定した。それらのクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

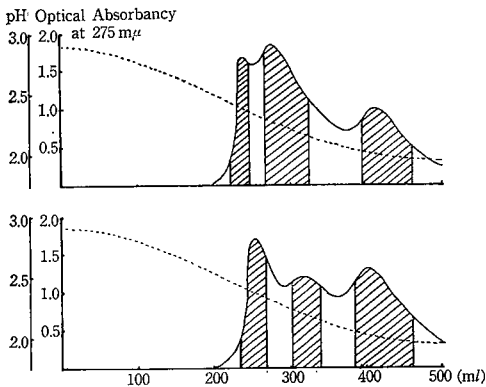


Fig. 1. Gradient elution chromatograms of bonito fish (upper) and tunny fish (lower) insulins through CM-cellulose column

Solvent system: 0.5N-acetic acid and 1.0N-formic acid

—: Optical absorbancy at 275 m $\mu$

.....: pH values

Fig. 1 に示した各斜線部分を集め, 同じ条件で再びクロマトグラフィーを行ない, それぞれの区分を凍結乾燥した試料を実験 2 に供した。

## 実験 2. 生理単位の検定

## 2.1 実験試料:

実験 1 によって分離されたカツオおよびマグロ・インシュリンの各 3 区分

## 2.2 生理単位の検定法

それぞれの第 2, 第 3 区分について, 日本薬局方イ

ンシュリン標準品を対照とする交代試験を行なった。24 時間絶食させた 1 群 3 匹の家兎を用い, 注射直前および注射後 1 時間 30 分, 3 時間, 5 時間後に採血し, 注射後 3 回の平均血糖値から注射直前の血糖値に対する降下率を求め, その力価を算出した。なお, 注射用量はインシュリン標準品および各試料の想定単位から換算して 0.9 u/(家兎体重 2 kg) ずつとした。

## 2.3 実験結果

カツオ第 2 区分は想定単位 24 u/mg に対して実測単位 24 u/mg を, 第 3 区分は想定単位 20 u/mg に対して実測単位 16 u/mg を得た。マグロ第 2 区分は想定単位 21 u/mg に対して実測単位 21 u/mg を, 第 3 区分は想定単位 17 u/mg に対して実測単位 17  $\mu$ mg を得た。個々の想定単位は各試料の予備試験から求めたものである。

カツオおよびマグロの第 1 区分については佐竹らの報告および沔紙クロマトグラフィー (実験 4.2) の結果からインシュリン作用がきわめて小さいことが予想されたので, 1 u/mg と想定し, 実験 2.2 に従って血糖量の変動をしらべた結果, カツオの場合は平均血糖降下率 23% を, マグロの場合のそれは 12% を与えたので, 通常この条件での血糖降下率は 25~30% を示すことからそれらの生理単位は 1 u/mg 以下であろうと推定された。なお, 両者の第 1 区分は, グルカゴン様作用を験するため注射後 20 分, 40 分の血糖値をも測定したが, 血糖上昇の現象は全く認められなかった。

この結果, 単離されたカツオ第 2 区分, 第 3 区分をそれぞれ  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ , マグロ第 2 区分, 第 3 区分をそれぞれ  $T_{\alpha}$ ,  $T_{\beta}$  と仮りに称することにし, 末端アミノ酸検定の試料とした。

## 実験 3. 末端アミノ酸の定量

## 3.1 実験試料:

$K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$ ,  $T_{\beta}$  および対照として用いたウシ・結晶インシュリン

## 3.2 N-末端アミノ酸分析

第 30 報<sup>1)</sup> で述べた DNP-法を適用した。ただし, 塩酸加水分解は 105° で行ない, その時間を 10 時間および 15 時間とした。定量結果を Table 1 に示す。

## 3.3 C-末端アミノ酸分析

## 3.3.1 ヒドラジン分解法

第 31 報<sup>2)</sup> で述べた方法を適用した。実験結果を Table 2 に示す。

3.3.2 カルボキシペプチダーゼ A による方法<sup>3)</sup>

各試料約 3 mg を正確にはかり, 水 2.0 ml を加え, さらに適当量の 0.01 N-水酸化ナトリウム液を加

Table 1. N-terminal amino acid residues\* (mol/mol) of bovine,  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$ , determined by dinitrophenylation

Species of insulin		DNP-amino acids extracted from the paperchromatograms				
		DNP-Ile	DNP-Phe	DNP-Val	DNP-Ala	DNP-Gly
Bovine		— —	0.91 (1.02)	— —	— —	0.90 (1.05)
Bonito fish	$K_{\alpha}$	0.88 (0.92)	— —	— —	** **	0.95 (0.98)
	$K_{\beta}$	** **	— —	— —	0.98 (0.95)	1.04 (1.02)
Tunny fish	$T_{\alpha}$	0.95 (0.92)	— —	** **	— —	0.91 (0.95)
	$T_{\beta}$	** **	— —	0.82 (0.91)	— —	0.90 (0.99)

\* Molecular weights of  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$  were assumed to be 6000, and these values were corrected by the recovery coefficient shown in the following: DNP-Ile 0.63 (0.57), DNP-Phe 0.67 (0.62), DNP-Val 0.65 (0.60), DNP-Ala 0.59 (0.53), DNP-Gly 0.22 (0.14).

Acid hydrolysis was carried out at 105°, in sealed glass tubes with 5.7 N-HCl, 10 hr. The values in the parenthesis shows the results of hydrolysis for 15 hr.

\*\* Very faint spots were observed.

Table 2. C-terminal amino acid residues\* (mol/mol) of bovine,  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$ , determined by hydrazinolysis for 6 hr

Species of insulin		DNP-amino acids extracted from the paperchromatograms					
		di-DNP-Lys	di-DNP-Orn	DNP-Ala	DNP-Gly	DNP-Ser	DNP-Asp
Bovine		—	—	1.06	**	**	—
Bonito fish	$K_{\alpha}$	**	0.89	—	**	**	**
	$K_{\beta}$	0.85	**	—	**	**	**
Tunny fish	$T_{\alpha}$	**	0.79	*	**	**	**
	$T_{\beta}$	0.72	**	—	**	**	**

\* Molecular weight of  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$  were assumed to be 6000, and these values were corrected by the recovery coefficients shown in the following: di-DNP-Lys 0.25, di-DNP-Orn 0.22, DNP-Ala 0.27

\*\* Very faint spots were observed.

えて pH 8 に調節する。これにカルボキシペプチダーゼ A 懸濁液 (10 mg/ml) を 0.025 ml ずつ加えたのち、室温 (20°) に放置して、1 時間、5 時間および 24 時間経過ごとに 0.5 ml ずつをとり、それぞれの溶液中に存在する遊離アミノ酸に DNP 法を適用した結果、それらの試料液中から DNP-Asn のみを認めた。その定量結果を Fig. 2 に示す。

実験 4. 滷紙クロマトグラフィー, 滷紙電気泳動, 過キ酸化物の比較

4.1 実験試料: 3.1 と同じ

4.2 滷紙クロマトグラフィー

東洋滷紙 No. 51 A を用い、ブタノール:酢酸:水 (3:1:4) を展開溶媒として滷紙クロマトグラフィーを行ない、BCG 溶液で発色した結果、ウシ・結晶インシュリンの Rf 値は 0.55 を示し、他方  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  および  $T_{\beta}$  はいずれも Rf 値 0.45 を示し、各試料はそれぞれ 1 個のスポットのみを認めた。

#### 4.3 滷紙電気泳動

東洋滷紙 No. 51 A を用い、20% ギ酸 (pH 1.3) を泳動溶媒とし、7.5 V/cm の定電圧で 5 時間泳動を行ない、BCG 溶液で発色した結果、各試料の泳動距離は、ウシ・結晶インシュリンの場合 5.0 cm 負極へ、

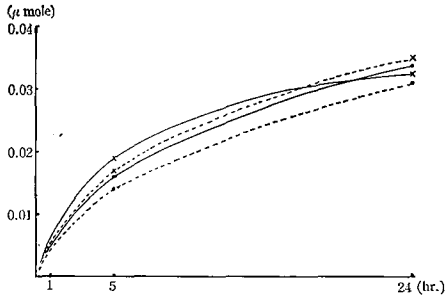


Fig. 2. Released asparagine from  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$  after carboxypeptidase A digestion

- × —: from 0.80 mg of  $K_{\alpha}$
- ... × ...: from 0.88 mg of  $K_{\beta}$
- • —: from 0.81 mg of  $T_{\alpha}$
- .....: from 0.80 mg of  $T_{\beta}$

他方  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  および  $T_{\beta}$  はいずれも約 6.5 cm 負極へ移動し, 各試料はそれぞれ 1 個のスポットと認められた。

4.4 過半酸化物の氫紙電気泳動

過半酸化の方法は前報<sup>7)</sup>に述べたものによった。それらの過半酸化物を 4.3 と同じ方法で氫紙電気泳動を行なった結果,  $K_{\alpha}$ ,  $T_{\alpha}$  の isoleucyl 鎖はウシ・結晶インシュリンの phenylalanyl 鎖と同じく 2.5 cm 負極に移動したが,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\beta}$  の glycyl 鎖はいずれも 1.0 cm 陽極に向かって移動し, これはウシ・結晶インシュリンの glycyl 鎖が 2.0 cm 陽極に移動するのと比較し, 明らかに小さい。

実験 5. 不活性区分の末端アミノ酸, 氫紙クロマトグラフィーおよび氫紙電気泳動

5.1 実験試料

実験 1 で得たカツオおよびマグロ・インシュリンの不活性区分

5.2 N-末端アミノ酸

3.2 の方法を適用して予試験的に N-末端アミノ酸分析を行なった結果, カツオの場合の N-末端アミノ酸は Gly, Ala, Ile のほかに少量の Ser, Asp を, マグロの場合のそれは Gly, Val, Ile のほかに少量の Ser, Asp を検出した。ただし, カツオの場合の Gly, Ala, Ile, マグロの場合の Gly, Val, Ile の定量値はいずれも活性区分のそれに比して 1/2 以下であった。

5.3 C-末端アミノ酸

3.3.1 に述べたヒドラジン分解法を適用した結果, カツオ, マグロの場合, とともに di-DNP-Orn, di-DNP-Lys, DNP-Gly, DNP-Ser および DNP-Asp のスポットを認めた。以上のスポットの定量値は, 活

性区分のそれに比してはるかに小さい値を示したが, 意外にも DNP-Ser のスポットが他の DNP-アミノ酸のスポットよりも強かった。

5.4 氫紙クロマトグラフィー

4.2 の方法を適用するとき, いずれも Rf 0.05 にスポットを認めるほか, Rf 0.45 にも微にスポットを認めた。

5.5 氫紙電気泳動

4.3 の方法を適用するとき, いずれも 8.5 cm 負極側に移動するスポットおよびさらに 12~14 cm 負極側に移動する微量のスポットを検出した。

考察とむすび

以上の実験を通じて次のことを結論する。

I) カツオ・インシュリン (16 u/mg), マグロ・インシュリン (12 u/mg) を CM-セルロース・カラム・クロマトグラフィーに適用することによって, それぞれ不活性区分ならびに第 30 報で推定した 2 種のインシュリンに分離し得た (実験 1)。それぞれの活性区分を  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  および  $T_{\beta}$  とかりに称することにし, それらの生理単位として, 24 u/mg, 16 u/mg, 21 u/mg および 17 u/mg を得た (実験 2)。

II)  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  および  $T_{\beta}$  について N-末端アミノ酸, C-末端アミノ酸を分析した結果から, それぞれ対応する末端アミノ酸の組合わせを考え, もっとも妥当と思われる構造式を Scheme 1 に示す。

Scheme 1. Assumed chemical structures of  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  and  $T_{\beta}$

Species of insulin	Activity u/mg	N-terminal	C-terminal
$K_{\alpha}$	24	Gly ———— / Asn Ile ———— / Arg	
$K_{\beta}$	16	Gly ———— / Asn Ala ———— / Lys	
$T_{\alpha}$	21	Gly ———— / Asn Ile ———— / Arg	
$T_{\beta}$	17	Gly ———— / Asn Val ———— / Lys	

Scheme 1 における  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$  は佐竹らの報告したカツオ・インシュリン I, II に対応するものと考え。ただし, 佐竹らは  $K_{\alpha}$  の N-末端アミノ酸を Leu と推定しているが, 著者らは第 30 報で述べた微生物学的検定法の結果から Ile とする。また佐竹らはその C-末端アミノ酸の Arg を検出していないが, 著者らはヒドラジン分解法によって di-DNP-Orn を検出し

ているので<sup>3)</sup> Arg が C-末端であることは確実と考える。

なお、C-末端アミノ酸として存在する Asn はカルボキシペプチダーゼ A による定量値が理論値よりもかなり小さい値を示したが (実験 3・3・2), Asn 以外の遊離アミノ酸を検出し得なかったこと、および著者らが第 29 報で述べたヒドロジン分解法によって Asn の可能性を論じたことから Asn が C-末端に存在することを認めることにした。同時にこれは他の C-末端アミノ酸が Arg または Lys であることを示唆しているものとする。

Ⅲ)  $K_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $T_{\alpha}$  および  $T_{\beta}$  とウン・結晶インシュリンとの物理化学的性質の差異として、沔紙クロマトグラフィーの Rf 値はウンの場合のそれより明らかに小さい (実験 4・2)。また沔紙電気泳動の結果から、これらのインシュリンの等電点は、いずれもウンのそれより塩基性側に存在する (実験 4・3)。さらに過ギ酸酸化物についての沔紙電気泳動の結果から、それぞれのインシュリンの glycylic 鎖がインシュリン分子の等電点が塩基性側に片寄る原因をなすと考える (実験 4・4)。なおこれは佐竹らがカツオ・インシュリンについて述べた報告とよく一致する。

Ⅳ) 実験 1 において得た第 1 区分は血糖に関しては下降または上昇作用を示さない (実験 2・2)。さらに沔紙クロマトグラフィー、沔紙電気泳動の結果、少なくとも 2 成分以上の混合物であり、とくに後者の結果から  $\alpha$ ,  $\beta$  インシュリンよりもさらに塩基性の強いたん白質であることが推定された。末端アミノ酸分析の結果

では、著者らが以前にマグロ・インシュリンから単離した無効の結晶性たん白質 (Cryst. TA) に相当するものとよく似るが、C-末端アミノ酸として比較的強い Ser スポットを得る点が Cryst. TA と異なる (実験 5)。

本研究の一部は昭和 36 年 1 月～6 月、大阪大学蛋白質研究所で行なったものである。その間、種々の有益な御助言を戴いた鈴木友二所長、ならびに成田耕造教授に謹謝の意を表す。また著者らの得たたん白質区分の生理検定は佐藤浩、白井浄二両技官の御協力を頂いた。

なお、本研究の一部は厚生省科学研究費によった。さらに試料を提供して頂いた清水製薬株式会社に併せて謝意を表す。

## 文 献

- 1) 西崎笹夫: 衛生試報, 81, 30 (1963).
- 2) M. Yamamoto, A. Kotaki, T. Okuyama and K. Satake: *J. Biochem.*, 48, 84 (1960).
- 3) 西崎笹夫: 衛生試報 81, 34 (1963).
- 4) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 平岡 孝, 深沢真司: *ibid.*, 75, 99 (1957).
- 5) 長沢佳熊, 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 209 (1959).
- 6) 実験化学講座, p. 222 No. 23 [丸善出版] (1957).
- 7) 西崎笹夫: 衛生試報, 77, 431 (1958).
- 8) 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 219 (1958).

## ウサギによるグルカゴン定量法

佐 藤 浩

### *The Glucagon Bioassay Using Rabbits*

Hiroshi SATO

The method of the glucagon bioassay depending mostly on the U. S. Pharmacopeia XVII but using rabbits instead of cats was described.

The confidence interval (L) calculated from this assay was almost within the limits (<0.1938), therefore this method is applicable to the glucagon bioassay.

(Received May 31, 1967)

公定書記載のグルカゴン定量法としては、米国薬局方 XVII 法がある。今回、ウサギを用いて同法に若干の改変を加えた結果、定量可能であることがわかつ

た。U. S. P. 法との主な差異は、実験動物としてネコの代りにウサギを使用した点と、血糖測定を日局 VII 法によった点とである。