

1963 No. 3

(通巻第 29 号)

CHEMICAL TIMES

目 次

(通巻ページ)

工業分析化学随説(Ⅲ)ジチゾン概想 (その2).....	東北大学 教授 理学博士 東北大学 助教授 理学博士	加 藤 多 喜 雄 武 井 信 典	 470
ヒトデの毒素とシダの蔵精器誘導物質.....	山形大学 助教授 理学博士	中 沢 信 午	 474
ケ イ 光 分 析(2).....	東 京 都 衛 生 局 技 師	坪 川 忠	 476
トランスアミナーゼ測定に関する問題点.....	札幌医科大学 (主任教授) 産婦人科学教室	明 石 勝 英) 道 免 聚 二 篠 原 護	 479
スタンホード大学の一隅から.....	理学博士	大 橋 守	 482

KANTO CHEMICAL CO., INC.

工業分析化学随説 (Ⅲ)

ジチゾンの概想 (その2)

東北大学教授 理学博士 加藤多喜雄

東北大学助教授 理学博士 武井 信 典

ジチゾン誘導体については Bubko 等, Irving 等, Busev 等及び武井の報告がある。

まず Bubko 等⁵⁾ はジチゾンにメチル基, メトキシ基等を1個及び2個導入した Aryl-Phenyl- 及び Arylthio-carbazone を Bamberger 法により合成し, 夫々のベンゼン溶液の吸収スペクトルを測定し, 非対称性のモノ置換体溶液の極大吸収点はジチゾン溶液のそれより長波長側に, 又, 対称性のジ置換体溶液のそれより短波長側にあることを認めている。同様の結果を Irving 等⁷⁾ は mono-p-Br-dithizone 及び di-p-Br-dithizone の四塩化炭素溶液について得ている。Busev 等¹⁰⁾ は種々のジチゾン誘導体の Bi^{3+} 塩の四塩化炭素, クロロホルム, ベンゼン溶液の極大吸収波長を Kuhn の理論²⁰⁾ を援用して計算し, 測定値とよく一致することを認めている。武井²¹⁾ はジチゾンのメチル, プロモ, ヨウド誘導体等10数種の対称性誘導体について, 誘導体及び金属塩の四塩化炭素溶液の吸収スペクトルを測定した。その結果の一部を第3表に示す。

第3表

Reagent	Absorption Peak ($\text{m}\mu$)								
	HR	Ag^+	Hg^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}		
dithizone	450	620	460	490	548	535	520	525	
di-p-I deriv.	472	650	insol	512	570	560	insol	530	
o-I	470	652	insol	490	546	532	535	516	
o- CH_3 -p-I	480	658	484	500	552	545	insol	512	
o-I-p- CH_3	478	660	insol	495	550	540	542	520	
o- CH_3	460	628	456	486	538	525	515	500	
p- CH_3	456	628	474	502	554	546	530	530	
p-Br	465	640	insol	502	565	552	insol	542	
o-Br	470	645	458	485	545	538	532	518	
o- CH_3 -p-Br	475	650	478	495	550	542	insol	510	
o-Br-p- CH_3	475	650	insol	490	540	542	538	520	
α -naphthyl	685	insol	525	560	560	insol	555		

第3表より武井は次の特徴を指摘した。

i 検討された誘導体溶液の極大吸収点は何れもジチゾン溶液のそれよりも長波長側にある。

ii メチル-ハロゲノ誘導体溶液とジチゾン溶液の極大吸収波長の差は, 関聯するメチル誘導体及びハロゲノ誘導体溶液と, ジチゾン溶液の極大吸収波長の差の和に等しい。即ち, 基の導入による極大吸収波長の移動には加成性が成立する。

iii α -ナフチル誘導体溶液はエノル型によるといわれる $450\text{m}\mu$ 附近の吸収を示さず, ケト型によるといわれる $620\text{m}\mu$ 附近の吸収が $685\text{m}\mu$ 附近へと著しく長波長側に移動し, β -ナフチル誘導体溶液の短波長側の吸収が著しく小さいことと共に特徴ある性質を示す。

iv メチル及びハロゲノ誘導体において, o-位誘導体の金属塩溶液の極大吸収点は, ジチゾン塩溶液のそれと殆んど変わらないが, p-位誘導体の金属塩溶液の極大吸収点はジチゾン塩溶液のそれより長波長側にある。

v メチル-ハロゲノ誘導体の金属塩溶液の極大吸収点は関聯する o-位及び p-位単一誘導体の金属塩溶液の極大吸収点の中間に位置する。

vi Cd^{2+} 及び Ag^+ は種々の誘導体と四塩化炭素に不溶性の塩を生成するが, Cd^{2+} は p-I, o- CH_3 -p-I, p-Br, o- CH_3 -p-Br 各誘導体と四塩化炭素に不溶性の塩を生成しており, これらは何れも共通して p-位に Br 又は I を導入した誘導体である。

vii 誘導体及び金属塩溶液の極大吸収点の移動に及ぼす影響は Br より I の方が大きい。

次にジチゾン誘導体及びその金属塩溶液のモル吸光係数については Grzhegorzheuskiy¹¹⁾ が β -ナフチル誘導体の, Irving 等⁷⁾ が Br 誘導体の, 又, 武井²¹⁾ が種々の誘導体の測定を行っているが, ここでは武井の結果を示す。

まず, その測定結果を第4表に示す。

第4表より, 武井はジチゾンのメチル, プロモ, ヨウド各誘導体及びその金属塩溶液の可視部最大吸収波長に

第 4 表

Reagent	Molar axtn coeff (×10 ⁴)			
	H ₂ Dz	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
Dithizone	3.09	7.0	4.5	9.26
di-o-I-deriv.	2.35	5.55	5.68	6.57
p-I	4.43	8.45	6.02	11.63
o-CH ₃ -p-I	5.02	6.37	5.61	
o-I-p-CH ₃	2.95	5.73	6.19	
o-CH ₃	3.81	5.22	4.55	
p-CH ₃	4.64	8.03	5.57	
o-Br	2.30	5.33	5.13	
p-Br	3.86	7.29	5.76	11.22
o-CH ₃ -p-Br	4.81	6.43	4.99	
o-Br-p-CH ₃	2.88	6.08	5.97	

おけるモル吸光係数の間に次のような共通性のあることを指摘した。

i メチル、プロモ、ヨウド誘導体において、o- 位誘導体及びその金属塩溶液のモル吸光係数は p- 位誘導体の示す値より小である。又、p- 位誘導体及びその金属塩溶液のモル吸光係数は、ジチゾンが示す値より大である。

ii メチル-プロモ、メチル-ヨウド誘導体及びその Hg²⁺, Cu²⁺ 塩溶液のモル吸光係数は、関聯する単一誘導体の示す値のいかににより次の何れかの傾向を示す。

a. 関聯する o- 位単一誘導体又はその Hg²⁺, Cu²⁺ 塩溶液のモル吸光係数がジチゾンの示す値よりも小なるときは、各導入基を夫々と同一の位置に併せ導入した誘導体又はその Hg²⁺, Cu²⁺ 塩溶液のモル吸光係数は関聯する o- 位及び p- 位単一誘導体が示す値の間に位する値を示す。

b. 関聯する o- 位単一誘導体又はその Hg²⁺, Cu²⁺ 塩溶液のモル吸光係数がジチゾンの示す値よりも大なるときは、各導入基を夫々と同一の位置に併せ、導入した誘導体又は、その Hg²⁺, Cu²⁺ 塩溶液のモル吸光係数は関聯する o- 位及び p- 位単一誘導体の示す値の何れよりも大である。

このようにして、ジチゾン及びその金属塩溶液の吸収スペクトルの種々の基の導入による変化については、ある程度の知見は得られているが、未だ測定されていない誘導体もあり、尚一層の検討を要するものと思われる。

V ジチゾン及びその誘導体と金属イオンとの反応

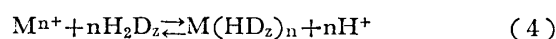
ジチゾンと反応する金属イオンはかなり多いが、その反応性には夫々差があるので、その差を利用するだけ

で選択的にジチゾン塩として抽出、定量し得る場合もある。例えば、Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ 等のジチゾンとの反応性は非常に高いのである程度 pH を下げても反応は定量的に進むが、Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ 等の反応性は余り高くはなく、中性ないし微酸性でないと定量的な反応は望めない。従って、Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ 等と共存する Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ のジチゾンによる抽出、定量は容易である。しかし、Hg²⁺ と共存する Cu²⁺, Cu²⁺ 中の Hg²⁺, 或は Zn²⁺~Cd²⁺~Pb²⁺ 系中の Cd²⁺ の定量等は単に水相の pH を調節するだけでは不可能であり、妨害イオンの隠蔽剤の添加等を必要とする。

従来、ジチゾンの金属イオンとの反応性を見るのに Wichman²²⁾ の示した結果がよく使われているが、これは余り正確なものではないように思われる。例えば、Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ の抽出曲線は著しく高 pH 側にずれている。従って、実際には対象とする試料の組成、更には共存する陰イオンの種類、濃度に応じ適当な分析法を定めなければならない。特に Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ 等比較的反応性の低い金属イオンの定量に当っては、共存陰イオンの影響が無視出来ない場合が多いので注意しなければならない。

ジチゾンと金属イオンの反応性の量論的表現については Kolthoff, Sandell²³⁾ が導入した抽出係数 (Extraction Constant) が一般の平衡定数に代るものとして用いられている。

金属イオン Mⁿ⁺ とジチゾン H₂Dz の水相における反応は



従ってその平衡定数 K は (5) 式で示される。

$$K = \frac{[M(HDz)_n]_w [H^+]^n}{[M^{n+}]_w [H_2Dz]_w^n} \quad (5)$$

又、ジチゾン及び金属塩の水、有機溶媒間の分配係数 P_o, P_c は (6), (7) 式で与えられる。

$$P_o = \frac{[H_2Dz]_w}{[H_2Dz]_o} \quad (6)$$

$$P_c = \frac{[M(HDz)_n]_w}{[M(HDz)_n]_o} \quad (7)$$

(5), (6), (7) 式より

$$K = \frac{P_c}{P_o^n} \frac{[M(HDz)_n]_o [H^+]_w^n}{[M^{n+}]_w [H_2Dz]_w^n} \quad (8)$$

ここで

$$K \cdot \frac{P_o^n}{P_c} = K_e \quad (9)$$

とおくと

$$K_e = \frac{[M(HD_z)_n]_o [H^+]_w^n}{[M^{n+}]_w [H_2D_z]_o^n} \quad (10)$$

従って、

$$\log K_e = \log \frac{[M(HD_z)_n]_o}{[M^{n+}]_w} - n(pH + \log [H_2D_z]_o) \quad (11)$$

となり、(11) 式右辺各項は測定可能であるから K_e は求めることが出来る。Kolthoff, Sandell²³⁾ は K_e を抽出係数 (Extraction Constant) とよんで Zn^{2+} ジチゾン塩—クロロホルム系について測定を行った。(8) 式において P_o , P_e が既知であれば平衡定数 K を求めることは出来る訳であり、 P_o の値は先に示したように求められているが、 P_e の値は Cu^{2+} 塩につて Sandell 等²⁴⁾ が求めている程度で他には測定されていないようである。

水—四塩化炭素系における K_e の値は、その後多くの金属ジチゾン塩について測定されているので、これを第 5 表に示す。

第 5 表

metal dithizonate	log K_e
Ag(HD _z)	7.6 ± 0.15 ^{a)} 8.94 ^{b)} 6.48 ^{c)}
Ag ₂ D _z	5.7 ± 0.3 ^{a)}
Hg(HD _z) ₂	26.85 ± 0.25 ^{d)} 26.79 ^{e)} 26.77 ^{b)}
HgD _z	— 3 ^{d)}
Cu(HD _z) ₂	10.4 ± 0.3 ^{a)} 9.57 ^{b)}
CuD _z	— 6.0 ± 0.2 ^{a)}
Zn(HD _z) ₂	2.11 ± 0.01 ^{f)} 1.70 ^{g)}
Co(HD _z) ₂	— 0.09 ^{b)}
Sn(HD _z) ₂	2.04 ^{b)}
Ni(HD _z) ₂	— 0.52 ^{b)}
Bi(HD _z) ₃	9.86 ^{b)} 9.67 ^{b)}

a) B. Tremillon: Bull. Soc. Chim. France, 9, 1156 (1954)

b) A. T. Pilipenko: I. Anal. Chim. U.S.S.R. 8 [5] 296 (1953)

c) G. K. Schweitzer, F. F. Dyer: Anal. Chim. Acta, 22, 172 (1960)

d) H. Breant: Bull. Soc. Chim. France, 948 (1956)

e) 加藤, 武井, 岡上: 分析化学 5, 689 (1956)

f) H. Irving et al., g. Chem. Soc., 357 (1952)

g) G. K. Schweitzer, C. B. Honaker: Anal. Chim. Acta, 19, 224 (1958)

h) A. I. Busev, L. A. Bazhanova: Zhur. Neorg. Khim., 6, 2210 (1961)

第 5 表に示した抽出係数を用いれば pH, 過剰ジチゾン濃度が既知であれば (11) 式より両相間の金属イオンの濃度比を計算し得る。

例えば、pH=1, $[H_2D_z]_o = 2 \times 10^{-4} M$ とすると、

$$\frac{[Hg(HD_z)_2]_o}{[Hg^{2+}]_w} = 10^{19.4} \quad \frac{[Cu(HD_z)_2]_o}{[Cu^{2+}]_w} = 10^{3.0}$$

$$\frac{[Zn(HD_z)_2]_o}{[Zn^{2+}]_w} = 10^{-5.3}$$

等となり、pH 調節だけで抽出分離の可能な場合のあることが理解出来る。又、所定の pH である金属イオンのジチゾンとの反応を完全にマスクするためには、どれ程の生成定数を示す試薬を加えればよいかも計算により求め得る。

次にジチゾン誘導体については Busev 等²⁵⁾ が p-CH₃, p-OCH₃ 誘導体等 6 種の誘導体の Bi³⁺ 塩の水—四塩化炭素系の抽出係数を、又、武井²¹⁾ がメチル、ハロゲノ誘導体等の Hg²⁺, Cu²⁺ 塩の水—四塩化炭素系における抽出係数を測定しているが、第 6 表に武井の得た結果を示す。

第 6 表

Reagent	log K_e	
	Hg(HD _z) ₂	Cu(HD _z) ₂
di-o-I deriv.	23.29	7.37
p-I	27.39	9.33
o-CH ₃ -p-I	23.54	8.40
o-I-p-CH ₃	25.78	7.18
o-CH ₃	22.58	7.72
p-CH ₃	26.10	9.78
o-Br	26.20	7.06
p-Br	26.91	9.00
o-CH ₃ -p-Br	22.73	8.54
o-Br-p-CH ₃	25.52	9.73
Dithizone	26.79	9.26

第 6 表より武井は次の諸点を指摘した。

i メチル、プロモ及びヨウド誘導体において、o- 位誘導体の Hg²⁺, Cu²⁺ 塩の抽出係数は何れも p- 位誘導体の示す値よりも小である。

ii o-CH₃-p-Br, o-CH₃-p-I 誘導体の Hg²⁺, Cu²⁺ 塩の抽出係数は夫々 p-Br, p-I 誘導体の示す値よりも小である。

iii o-Br-p-CH₃, o-I-p-CH₃ 誘導体の Hg²⁺ 塩の抽出係数は p-CH₃ 誘導体が示す値より小である。

以上を通じ、Hg²⁺, Cu²⁺ 塩の抽出係数に及ぼす導入基の影響は導入基の導入された位置によるものの方が、導入基の種類によるものより大なることを推定した。

以上のように、ジチゾン及びジチゾン誘導体の金属塩の抽出係数はかなり多く測定されているが、(9) 式に示したように、抽出係数には水相における金属イオン—ジチゾンの反応の平衡定数の外に、ジチゾン及び金属ジチゾン塩の分配係数 P_o , P_e を因子として含むために、水相における反応を更によく理解するためには P_o , P_e

の測定を必要とし、この方面における更に詳細なる検討が望まれる訳である。

尚、ジチゾンと金属イオンとの反応を検討したものに上記の外に P. 等ジチゾン塩の揮発性を検討した馬淵²⁶⁾の報告、ジチゾンと Ag^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} との反応をジチゾンの表面膜の表面圧力—表面積曲線を測定することにより検討した三井田、松浦²⁷⁾の報告等があり、何れも極めて興味ある結果を得ている。

VI ジチゾンを用いる分析法

ジチゾンを用いる定量法については極めて多数の報告があるが、それらを要約した成書も既に出版されており、ここに改めて述べる必要もないと思われるので、ここでは従来の定量法とは若干趣きを異にする Irving 等²⁸⁾の“Reversion Procedure”について簡単に紹介する。

ジチゾン H_2D_2 と金属イオン M^{n+} との反応は (4) 式で示される。

抽出液中の過剰ジチゾン濃度を Cr, 生成したジチゾン塩の濃度を Cc, その他の呈色不純物の濃度を Ci とし, 1cm セルを用い, ある波長で測定した吸光度を Em とすると,

$$Em = (\epsilon_r Cr + \epsilon_c Cc + \sum \epsilon_i Ci) l \quad (12)$$

(12) 式においては, ϵ_r , ϵ_c , ϵ_i 夫々ジチゾン, ジチゾン塩及び呈色不純物溶液の測定波長におけるモル吸光係数である。ここで呈色不純物とは, ジチゾンの酸化生成物, 目的とする金属イオンに随伴して抽出された金属イオンのジチゾン塩等を指すものである。

今, 抽出液を定量すべき金属イオンのジチゾン塩のみを分解する試薬水溶液と振るとジチゾン塩は分解され, 金属イオンは水相に移り, 有機相には nCc のジチゾンが遊離される。

従って, 抽出液の吸光度は Em より Er に変化する。

$$Er = (\epsilon_r Cr + n\epsilon_r Cc + \sum \epsilon_i Ci) l \quad (13)$$

よって両吸光度測定値の差 R は

$$R = Er - Em = l(n\epsilon_r - \epsilon_c)Cc \quad (14)$$

となり, R と抽出された金属イオンとは, 直線関係を示し, 用いたジチゾン溶液の濃度及び呈色不純物には無関係なことが知られる。従って, 本原理に基づけば未精製のジチゾン溶液を用い, しかも, ある程度共存金属イオンを共抽出した状態でも金属イオンの定量は可能となる。Irving 等²⁸⁾は本原理に基づく分析法を“Reversion Procedure”, ジチゾン塩分解試薬を“Reversion Reagent”両吸光度の差 R を“Reversion Value”とよんで, 本法により Pb^{2+} の定量を行い, Bi^{3+} の妨害を容易に除出し得

たと報告している。その後 Busev 等²⁹⁾は本法により Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} と共存する Bi^{3+} の定量を行っている。

尚, (14) 式において, 検量線の勾配は $(n\epsilon_r - \epsilon_c)$ で与えられ, 差の大きい程感度は高いことになる。ここで例えばジチゾンの四塩化炭素溶液を用いる場合, ジチゾン溶液は 620m μ 附近に極大吸収を示すが, ジチゾン塩溶液はこの附近では殆んど吸収を示さない。従って, 吸光度の測定をこの波長で行うときは,

$$R = l(n\epsilon_r - \epsilon_c)Cc = n\epsilon_r l Cc \quad (15)$$

となり, 若し検量線を金属イオンの当量濃度と Reversion Value とで目盛れば, 検量線は金属イオンの種類には関係なく, すべての金属イオンに対し, 共通となる筈である。Irving 等²⁸⁾は Ag^+ , Hg^{2+} , Bi^{3+} , Pb^{2+} を用い, この関係の成立することを認め, 各ジチゾン塩が $\text{Ag}(\text{HD}_2)$, $\text{Hg}(\text{HD}_2)_2$, $\text{Bi}(\text{HD}_2)_3$, $\text{Pb}(\text{HD}_2)_2$ の組成を有することを再確認している。

従って, 本法は若し各金属イオンに対し適当な Reversion Reagent を見出すことが出来れば有力な分析法となり得るものであるが, Irving 等²⁸⁾は Reversion Reagent として 2,3-dimercaptopropanol が有望であると述べている。

以上, ジチゾン及びその誘導体に関する基礎的研究の一部を紹介したが, これらはジチゾン或はその誘導体の更に有効, 適切な利用の基礎となり, 或は分析試薬として更に優れた誘導体, 類似化合物の発見のための手引きともなるものであり, この方面に関する尚一層の検討が望まれる。

文 献

- 19) A.I. Busev, L.A. Bazhanova: Zhur, Anal. Khim., **16**, 399 (1961)
- 20) H. Kuhn: J. Elektrochem., **53**, 165 (1949)
J. Chem. Phys., **16**, 840 (1948)
Helv. Chim. Acta: **34**, 2371 (1951)
J. Elektrochem., **58**, 219 (1954)
- 21) 武井: 分析化学, **5**, 695 (1956)
6, 630 (1957)
9, 405 (1960)
10, 708 (1961)
10, 715 (1961)
- 22) H.J. Wichman: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **11**, 66 (1939)
- 23) I.M. Kolthoff, E.B. Sandell: J. Am. Chem. Soc., **63**, 1906 (1941)
- 24) R.W. Geiger, E.B. Sandell: Anal. Chim. Acta., **8**, 197 (1953)
- 25) A.I. Busev, L.A. Bazhanova: Zhur. Neorg. Khim., **6**, 2805 (1961)
- 26) 馬淵: 日化, **79**, 1259, 1262 (1958)
- 27) 三井田, 松浦: 日化, **82**, 1124 (1961)
- 28) H. Irving, et al: J. Chem. Soc., 537 (1949)
Analyst, **78**, 571 (1953)
- 29) A.I. Busev, L.A. Bazhanova: Bectnyk Mockovckobo Univercitet Seriya II **6**, 47 (1961)

ヒトデの毒素とシダの蔵精器誘導物質

山形大学助教授 理学博士 中 沢 信 午

動植物生物のなかには未知のものがたくさんあるが、近年ようやく研究されはじめなかなかその正体がまだ確定しない、といったものもいくつかある。そのうちからヒトデの毒素とシダ植物の蔵精器誘導物質とをとりあげて現今の研究を総説し、研究者の便に供したい。

1

海産動物ヒトデは生きた二枚貝の介殻をひらいてその肉を食う動物で、貝にとって天敵である。アサリやハマグリを増殖するときにしばしば大損害をあたえることがある。ところで、貝にはいわゆる貝柱があってしっかりと介をとじているにもかかわらず、ヒトデがどうやってこれを開くかは古くからのナゾであり、今日もお決定的メカニズムは知られていないが、大別して2つの説がある。第1はヒトデの管足のばく大な力で無理矢理に生きた貝をこじあけるのだという物理説で、これは化学と直接に関係ないから説明を省略する。第2はヒトデが口から一種の有毒物質を排出して貝に注入し、それによって貝柱の活動を弱らせてから簡単に介をひらくことができるという説である。この説は1826年 Eudes-Delongchamps によって提出されたのにはじまり、のちに Hesz (1878), Figuier (1891), Pieron (1913), Cahn (1950), Korringa (1953), Aldrich (1954) および Van der Heyde (1922) と沢野・三木 (1932) などの人々によって研究され支持されてきた。また、近年になって中沢 (1956, 1960, 1961) によってこの物質が原形質におよぼす毒作用がテストされ、橋本・安本両氏 (1960) によってその化学的正体は一応サポニンであると推定されるに至ったが、決定的な研究はまだ行なわれていないところに将来の問題が残っている。

古典的な研究として Van der Heyde は、ヒトデの胃から抽出した物質の溶液をカエルの肢の筋肉、ホタテ貝の心臓などに作用させて筋肉運動を不可逆的に阻害し、毒性をみとめた。沢野・三木両氏は、各種のヒトデからメタノールで抽出した物質をカキの心臓に作用させ、律動がただちにストップするのを確かめた。この場合に律動が停止したら直ちに正常海水で洗って当該物質をのぞけば再び律動が復帰する。各種のヒトデについて比較

してみると、もっとも毒性の大きいのがいわゆるヒトデ (*Asterias amurensis*) と *A. scoparius* の2種で、やや毒性の低いのが *Aphelasterias japonicus*、全く毒性のないのがイトマキヒトデ (*Patiria pectinifera*) およびアカヒトデ (*Certanardoa semiregularis*) であった。有毒物質は胃にもっとも多く、管足、幽門、盲囊などにも多少の毒性がみとめられた。ウサギに注射すると致死効果があることもちに判明した。

一方においてアメリカの Lavoie は他のヒトデ *Asterias forbesi* の胃から水、各種のリポイド溶剤などで浸出し、また凍結、透析などの方法で分離した物質についてテストの結果、二枚貝 *Mytilus edulis* に対して全く毒性がみとめられなかったことから、ヒトデの含毒素説には懐疑的な報告をしている。

中沢はヒトデ *Asterias amurensis* の胃からエタノール浸出した物質の 10^{-4} ~ 10^{-3} を含む海水でホンダワラの卵を処理するとただちに卵の崩壊がおこることからこの物質が原形質に対する毒性をみとめた。おなじ物質を輪薄類 *Chara* の細胞にあたえると原形質流動が止まり、腔腸動物 *Hydra* では組織がバラバラになって細胞が分散し、ウニの卵では細胞分裂の途中でこの物質 10^{-3} 濃度によって卵周の透明層がこわれ、きわめて不規則な分裂像が出現する。ウニの囊胚期にこの物質をあたえると通常は、卵割腔の内部に生ずべき間充細胞が外へ放出されるなどの異常がおこる。しかし、おなじ物質もこれを取りだした当のヒトデの卵および幼生に対しては全く毒効果がなく、上記の濃度ではもちろんのこと、 10^{-2} をふくむ海水中でも悠々と発育してゆく。このようにヒトデの胃にはたしかに或る毒素が存在する。

橋本・安本の両氏はイトマキヒトデからある物質を取りだした。その方法は(1)全体を破砕して85%エタノールで浸出、(2)ろ過してろ液にベンゼンを加えてリポイドをのぞく、(3)水液性の部分にNaClを加えHClでpH4.5にし、(4)ブタノールで浸出、(5)シロップに10倍量のアセトンを加えてpptをとって試料とする。以上の方法で原料ヒトデ500gから4gの試料を得た。

この試料は褐色の粉末、水および含水アルコールに可

溶、エーテルおよびベンゼン、クロロホルムに不溶。ステロイドおよび糖試薬に反応し、エタノールにとかしたケイタングステン酸、クロロホルムにとかした三塩化アンチモン、エタノールにとかしたケイ皮アルデヒド、アニリン、フタル酸水素カリウムおよび過マンガン酸カリウムにとかしたメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応する。加水分解した水溶液はフェーリングを還元する。試料 50mg を 5ml の 2N HCl と共に 3 時間煮沸し、ppt を生じてから上澄をとってイオン交換樹脂で Cl イオンを除き、ペーパークロマトにかけてみる。結果、4 種のスポットがあらわれ、その 3 つはグルコース、ラムノース、キシロースであり、他のひとつはサポニンであった。

動物試験の結果この物質は魚類の溶血をおこし、ウサギ血液を用いる西田・藤田の測定方法によって溶血示数約 7,000 が得られた。メルクのサポニンでは同示数 33,000 である。魚類に対する実験にはメダカを用いた。

この実験で橋本・安本両氏はヒトデの毒素をサポニンと推定しているが、なおいくつかの問題がある。第 1 はメルクのサポニンとヒトデ毒素とはメダカに対する致死効果に相当なズレがある点である。たとえば、蒸留水 50 ml に溶血示数 140 単位をふくむヒトデ毒素液のなかでメダカは約 30 分で死ぬが、おなじ示数単位をふくむサポニン液のなかではほとんど無限（170 分以上）に生存する。またメダカはサポニン 250 単位で 35 分で死ぬが、ヒトデ毒素では 25 分で死ぬ。つまり、サポニンよりもヒトデ毒素の方が致死効果が大きいのである。第 2 にこの物質をとりだしたのはイトマキヒトデであったが、沢野・三木氏らの研究ではイトマキヒトデに毒性がなかった点である。第 3 にこの研究ではイトマキヒトデの体全体を破碎して原料としたが、さきの諸実験でヒトデの毒素を浸出したのは胃からであった点である。第 4 に沢野・三木氏らによればイトマキヒトデに毒性がないというけれども、実際にはそのイトマキヒトデも貝を攻撃する事実をどう説明するかである。

以上のように、ヒトデの毒素については決定的な研究がまだ行なわれていないようである。早急に新しい研究がなされることを希望する。研究結果によっては利用価値の高い物質がえられるかもしれないし、また生理学の問題としても重要な解決がなされるであろう。

2

シダ植物の胞子が適当な条件におかれると発芽してハート型の前葉体をつくり、その上に精子を生ずる蔵精器

と卵子を生ずる蔵卵器とができる。蔵精器ができるにはこれを誘発するある物質が必要であることが知られている。話は Döpp (1950) がワラビ (*Pteridium aquilium*) の前葉体の培養から得た浸出液がおなじく、ワラビまたは他のシダ *Dryopteris filix-mas* の前葉体に対して蔵精器の形成を誘導することを報告したのにはじまる。のちに Näf (1956 年以降) および菅井道三氏 (1962) らによって研究がすすめられている。

初期の研究によるとこの物質は一般にシダの前葉体にふくまれている、培養液中に浸出し、シダに対しては生長抑圧的にはたらく。生長が抑圧されると生殖器官が分化するという通例があるために蔵精器ができるのだ、と考えられた。ところが蔵卵器形成にはなんら作用しないことや、生長抑制なしにも蔵精器ができることから、この物質は蔵精器そのものを誘導するものと考えを改められるに至った。

Näf によると胞子が発芽して 7 週間目の浸出液をとると 1/30000 にうすめてもなお蔵精器誘導力があり、有効の限界はおおよそ 1.6×10^{-9} ぐらいの濃度にあるという。この浸出液は pH 2 で 10 分間煮沸しても作用力を失なわないが、pH 12 では 10 分間の煮沸で作用を失なう。化学正体はなお不明であるが、活性炭素に吸着しメタノールで抽出して有効成分をとりだすことができる。焼却して灰化すると有効性を失う。pH 5, 15 lb., 15 分間オートクレーブで加熱しても安定である。

コウヤワラビ (*Onoclea*) の前葉体は天然には決して蔵精器をつくらない。しかしこれをワラビの浸出液に培養すると蔵精器をつくる。この事実はワラビにふくまれている物質が他のシダにも有効に作用すること、いいかえれば、シダ類では一般に共通のある物質によって、生殖器官が生ずるのではあるまいか、ということを示す。しかし、他の実験によって、ワラビの物質には反応しないシダ、たとえば *Polypodium aureum*, などもあることから、シダの蔵精器誘導は単純なものではないことがわかる。つまり、いく種類かのちがった誘導物質があり、シダの種類に応じてそれが異なるらしい。

一方において、前葉体は生長の段階によってこの物質への反応をことにし、ワラビでは自分自身の中にこの誘導物質をつくりだすときは、すでにこの物質には反応しない状態になっている。同時に胞子をまいて発芽し、生長のそろった前葉体の一群は、それだけでは蔵精器をつくらない。しかし、そのまま生育をつづけて或る時期がくると蔵精器を誘導する物質をつくり、まわりに放出す

る。そのとき自分自身は、この物質に感受性のある時期をもはや過ぎてしまっているのである。しかし、その培養液をとって他の若いワのラビ前葉体にあたえれば、直ちに彼らは蔵精器を形成する。だから、自然界にはいろいろの発育段階のシダが混生することによってたがいに蔵精器形成への助力をあたえていることになる。パイオ

ニアとなるシダのみが蔵精器をつくらずに生涯を終えるわけである。

このように、シダの蔵精器形成にはある未知の物質がたしかに支配的役割を演じているが、この物質については今日これ以上のことが知られてはいない。生化学によっていずれは正体が判明することを期待して止まない。

ケ イ 光 分 析 (2)

東京都衛生局 技師 坪 川 忠

II. ケイ光発生分析

1. 発ケイ光定性および定量分析

ケイ光の発生により分析を行なおうとするのがこの方法であって、ほとんどのケイ光分析がこの方法である。刺激光としては、前述のように紫外線、可視光線が用いられるが、通常紫外線を用いる。ケイ光物質そのものを定性し、定量する場合のほか、目的物質を一定の前処理によってケイ光性の物質に変化せしめる方法もとることができる。前処理は試薬を単に加える場合や、加熱などの操作によって反応を行なわせる場合などがあるが、定量分析の場合は、無ケイ光性物質→ケイ光物質への変化が定量的に行われることが必須条件であって、これが一定条件のもとで定量的に進行することがわかれば、たとえばケイ光物質の収率の悪い反応であってもケイ光分析として応用できることが多い。しかしなるべく一定とすべき条件の少ない方が望ましいことは勿論である。オキシシン(3-hydroxyquinoline)による Zn^{2+} (緑色)³⁾, Cd^{2+} (黄緑色)⁴⁾ などの確認や、モリン(tetrahydroxyflavanol)による Al^{3+} (橙赤色)の確認⁵⁾ など、発ケイ光定性は斑点分析や P.P.C. (ペーパークロマトグラフィ) における濾紙上の反応など応用がひろい。特に微量物質の検出に有効で、ベルベリンの黄色ケイ光は P.P.C. 上 Rf 0.56, ($BuOH$, $HOAc$, $H_2O=100:10:10$; 飽和) の位置に鮮明に現われることから、オウレンの根に共存する黄色物質を P.P.C. で分離したのちベルベリンのみを確認することができ⁶⁾、更に濾紙上直接ケイ光定量も試みられている⁷⁾。種々の二塩基性酸をレゾルシンと濃硫酸中で

加熱したときの反応生成物を P.P.C. によって分離し、生成したケイ光性物質の数, Rf, 色などから、もとの二塩基性酸を推定することが行なわれているが⁸⁾、サッカリンなどではこれが有効な方法である⁹⁾。

葉緑素は紫外線下強い赤紫色のケイ光を発するので微量の葉緑素をも検出することができるが、これを応用すれば樹皮(緑皮層のあるもの)と根皮を区別することができ、また桃やあんずなどの果実の成熟度を葉緑素の減少の様子から判別することが可能であるという¹⁰⁾。

2. 混合物の分析

いくつかの物質の混合物の場合、その中にケイ光物質を一種しか含んでいないようなときは、共存物質による影響(後述)を無視し得る程度ならその特定のケイ光物質を検出したり、場合によっては定量したりすることは、他の分析法に比して簡単に行なえることが多い。抽出その他の精製操作によってこの方法の精度は更に上がることが期待できる。また、二種以上のケイ光物質が混在する時でも、そのケイ光の波長分布が著しく異なるときは、これを分離定量することができ、また、励起光の波長が全く異なるような場合にも定性、定量が可能である。例えば、葉緑素に富んだ試料中のビタミン B_2 をルミフラビン法で定量する場合、測定前に葉緑素の除去を出来るだけ行なってもどうしても除去できない痕跡の葉緑素のため溶液は紫赤色のケイ光を持つ。このときのケイ光分布は Fig 1 のようであって、この中からルミフラビンのケイ光をとり出す為には、570 mμ から長波長の方を完全に遮断するフィルターを用いるか、又は 500~

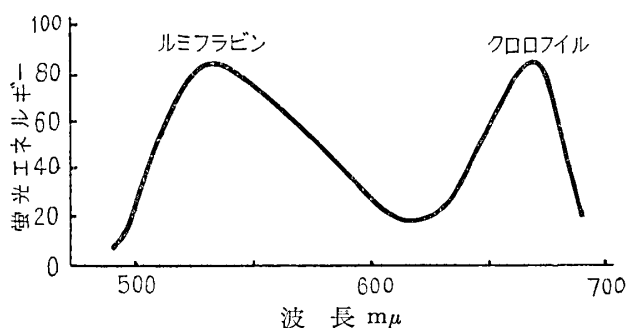


Fig 1 ルミフラビンとクロロフィル混合のケイ光スペクトル (クロロホルム溶液)

550m μ を透過するフィルターでケイ光を選択すればよい。またベルベリンを P. P. C. で展開して濾紙上で直接ケイ光定量するとき、励起紫外線として、水銀の輝線 365 m μ を用いると濾紙上の不純青色ケイ光も共に測定されるが、436 m μ の輝線を用いれば、ベルベリンのみを励起し定量することができる¹¹⁾。

3. ケイ光発生の際因子

ケイ光物質といわれるものは、無機物、有機物ともに存在するが、それがケイ光を生ずるときには必ず外部からの刺激によるエネルギーの吸収があり、これがケイ光として再び放出される事は、物性論的にその物質固有のエネルギー曲面より説明される。本稿でとり上げるのは主として有機ケイ光物質であって化学構造上からみれば、二重結合による共役系を持った化合物である。この事は当然 π 電子が関係することを示すが、これは必要条件ではあっても充分条件ではなく、発ケイ光の化学構造論的解釈は充分についてはいない。しかし、特殊な化合物の系列についてはよく論議されて居り、またいろいろな基がケイ光に及ぼす影響についても研究されている。一般に $-OR$ 、 $-NR_2$ 、 $-CN$ などの基はケイ光に関して、発色団に対する助色団のような関係にあり、 $-CH_3$ は超共役の場合は助ケイ光団として作用し、 $>C=O$ は通常ケイ光に悪い影響を及ぼすことが多いが、弱い助ケイ光団として作用する場合もある¹²⁾。また Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 $-C=N-$ 、 $-N=N-$ 、 $>C=S$ などもケイ光性を小にしたが無ケイ光性にしたりするが、共役系が大となるとこの負の効果はあまり著しく現われない。

分子中に共役系を持っていて、ケイ光を発する化合物であっても、ベンゼンなどのように紫外部にケイ光があるものは通常ケイ光分析の対称とはならない。或る一群の化合物は、それが固体のときのみケイ光性であった

り、特定の溶媒による溶液のとき強いケイ光を発したりする。また金属などと錯化合物を作るときに強いケイ光性を持ったり、又その反対に金属と錯塩を作るとケイ光性を失い或はケイ光の色が変化したりする。特定の物質に吸着されたときに強いケイ光性となるものもある。

一般に適当な稀釈や、適合した溶媒の使用はケイ光強度を大にする。

4. 溶 媒

上のような事実は分析上いろいろ応用されて居り、溶媒の選択やその pH の調節はこの分析を精度よく行なうことができるかどうかひびいてくる。ケイ光分析上の溶媒としては完全に無ケイ光性 (紫外、可視とも) のものが望ましく、また紫外部の吸収も目的物質とは異った波長域にあることが望ましい。このような意味から芳香族の溶媒はあまり目的には適っていない。普通に用いられる溶媒を Table III にあげるが、これらは通例極く微

Table III 溶媒とその不純物によるケイ光

溶 媒	不純物によるケイ光
エーテル	紫 色
アルコール(エタノール)	くすんだ黄色、又は灰色
ブタノール	弱い 青色
酢酸エチルエステル	乳白黄色
アセトン	弱い灰褐色

量の不純物によってケイ光を持っている。この不純物は実験室的精製法によって除き得るが、除ききれないわずかのケイ光があるときはこの溶媒を用いた盲検を必ず行なわねばならず、またケイ光波長分布を示すときなどは各波長における溶媒のみのケイ光強度をバックグラウンドとして測定することが必要となる。

溶媒によってケイ光強度およびその波長分布(色)が変化する事は、特に注目すべきで例えばジメチルナフトユーロジン (I) は Table IV のように変化する¹³⁾。これ

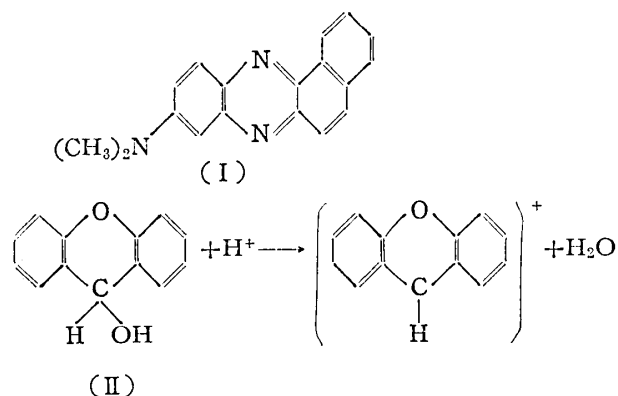
Table IV ジメチルナフトユーロジンのケイ光色

溶 媒	リグロ イ	エー テル	ピリ ジン	アセ トン	エタ ノール	メタ ノール
ケイ光色	緑	緑黄	黄	橙黄	橙	橙赤

はケイ光物質と溶媒の相互作用と考えられ、特に励起状態のケイ光物質と溶媒との作用によるものと思われる。

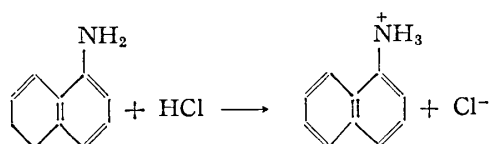
或る種のケイ光物質では濃硫酸のような強酸中で特に

ケイ光性を増し、またケイ光も長波長に移動する場合がある。これをハロクロミーといい、分子にプロトンが付加して生じたものが別の共軌系を作ってケイ光性を持つ場合であって、例えばキサントヒドロール (II) は次式の変化によって緑色のケイ光を持つようになる。したがって定性分析上、濃硫酸中のケイ光を検することはしばしば有効な手段となる。



5. pH

pH の変化によって電子構造が変化するような、ケイ光性の有機酸や塩基に対しては、pH はそのケイ光強度や色に大きな影響を与える。例えば α -ナフチルアミンのアルコール溶液は強い青色のケイ光を持つが、これに希塩酸溶液を滴下すると全くケイ光が消失する。これはナフチルアンモニウムイオンが無ケイ光性である為で、一般に pH 変化により生じたイオン型のものと非イオン型のものについては、ケイ光に関する限り別の化合物として扱うべきであろう。



またウンベリフェロン (7-hydroxycoumarin) の青色ケイ光は稀アルカリ性溶媒中でかなり速やかに消失する。これは光化学的加水分解の結果開環が起る為とされている。ケイ光の観察は一般に紫外線下で行なわれるので、酸化、加水分解、異性化、重合などの光化学変化を誘起することが少なくない。特に長時間の紫外線照射はさけるべきで、これによりケイ光強度が急速に減少するものが多い。このように不可逆的变化が起る可能性がある場合は特に注意しなければならない。

pH の変化によってケイ光の発生、消失が起ったりケイ光の色が変化したりすることが可逆的に行なわれると

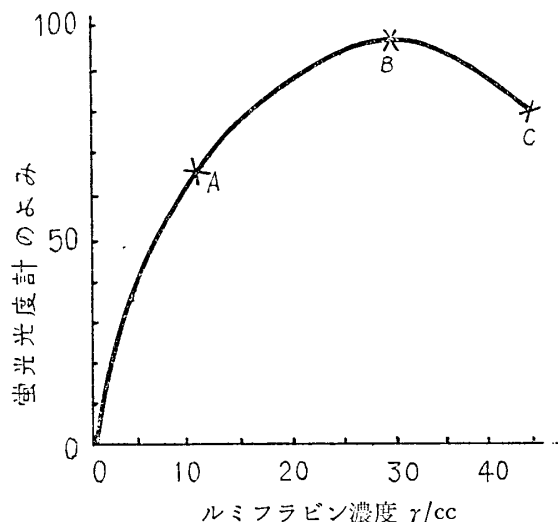
き、これを pH 指示薬として酸、塩基の滴定に用いることができる。このことについてはのちに述べよう。

6. 共存物質の影響

共存物質について特に考慮しなければならない事は、共存するものが消光作用を有するかどうかということ、ケイ光物質に化学的に作用してケイ光を消失させる場合は無論のこと。消光には単に共存するというだけでその物質のケイ光を失わせるようなものが多いので注意しなければならない。消光効果を及ぼす物質の種類及びその濃度は目的のケイ光物質によってそれぞれ異っている為、厳密には各ケイ光物質について確かめなければならないが、一般に、無機消光性物質には次の二三の系列のあることが知られている。すなわち、 I^- , Br^- , Cl^- , SCN^- , $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} などはキニーネ、フルオレッセイン、エオシンなどを消光し、 IO_3^- , BrO_3^- , NO_3^- などの一群はアントラニル酸、 α -ナフトールに対して消光能を有する¹⁴⁾。しかし、これらについてもそれぞれの組合わせによって効果が異なり、キニーネは上記 I^- などの一群のすべてのものに消光されるが、フルオレッセイン、エオシンは I^- に対してのみ著しく反応し、 Cl^- , Br^- に対しては I^- に比し弱い反応しか示さない¹⁵⁾。また金属イオンについては一般に Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} などの有色イオン (遷移金属イオン) は消光作用を示し、アルカリ金属、アルカリ土類金属イオンは消光能を有しない。消光の状態と消光物質の濃度とは比例するので、これを応用したのがケイ光消失分析である。ケイ光消失分析については後に述べるが、この消光作用を上手に利用すれば、混合ケイ光物質の場合のマスクングによる分離定性ができる。例えば、C. R. Chase ら¹⁶⁾ は生薬類のケイ光観察の際、葉緑素を含むもののアルコール抽出液を昇汞で処理してそのケイ光を除き、試験に供している。共存物質の影響のうちで特にケイ光強度を大にするものは、あまり知られていないが、アテブリンは安息香酸ナトリウムカフェインの共存で約 $\frac{1}{4}$ ケイ光強度が増大するという¹⁷⁾。

7. 濃度、温度、粘度

ケイ光物質の濃度によってケイ光強度がどのように変化するかを調べてみると、例えば、ルミフラビンでは Fig 2 のようである。O-A の間では濃度とケイ光強度はほぼ比例し直線とみなされるので、通常、定量分析ではこの濃度範囲を用いる。A-B においては濃度とケイ

Fig 2 ルミフラビン濃度とケイ光強度¹⁸⁾

光強度との間の比例関係はくずれ、B-C においてはかえってケイ光の減少がおこる。一般にケイ光物質が或る濃度をこえるとそのケイ光強度が低下する傾向を持ち、これは前にも述べた通り濃度消光によるものであるが、濃度消光の定量的な取扱いは非常にむずかしい。なぜなら濃度が大になるにしたがって励起光線の吸収が大きくて励起が不十分になること、すなわちケイ光収率の低下や、ケイ光の再吸収がかなり大きくひびいてくるからである。そのため、測定されたケイ光の強度が減少したり、ケイ光波長のうちの短波長の部分が除かれたりす

る。このようなことから、実際の測定にあたっては、それぞれの事例について充分な予備実験を行ない、目的とするケイ光物質の濃度とケイ光強度の関係をしらべてその比例する濃度範囲を知っておくことが望ましい。

ケイ光は普通温度の上昇と共に減少する。しかしその減少の状態はケイ光物質それぞれに異って居り、しかもその溶媒によっても異なる。また温度による効果は消光性物質の共存によっても影響されるが、これは温度に対してケイ光物質と消光物質が相互に作用しあうとみてよいであろう。更に溶媒の粘度もこの相互作用に加わっている。通常のケイ光発生分析では盲検と標準のケイ光発生状態が測定されるので、上の消光作用にも関係する諸因子についてはここではあまりふれず、別項でのべることとする。

文 献

- 3) R. Berg : Z. anal. Chem., 71 171 (1927)
- 4) 後藤 : 日化, 55 265, 547 (1437)
- 5) Beck : Mikrochim. Acta, 2, 287 (1937)
- 6) 丸山, 林 : 第11回日本薬学会大会 (1958)
- 7) 市村, 太幡 : 分析化学 10 1097 (1961)
- 8) 刈米, 橋本 : 薬誌 71 439 (1951)
- 9) 丸山, 坪川 : 未発表
- 10) A. Kramer, H.R. Smith : Food Technology 1 527 (1947)
- 11) 太幡, 市村 : 第10回日本薬学会大会 (1957)
- 12) 吉田, 小田 : 有機合成 9 230 (1951)
- 13) 八木, 吉田, 太幡 : ケイ光 p. 47 (1958)
- 14) R.W. Stoughton, K.G. Rolléson ; Am. Chem. Soc. 61 2632 (1939)
- 15) J. Bouchard : J. Chim. Physique 33 325 (1936)
- 16) C.R. Chase, R. Pratt : J. Amer. Pharm. Assoc., 39 324 (1949)
- 17) 八木, 吉田, 太幡 : ケイ光 p 348 (1958)
- 18) ibid : p 201

トランスアミナーゼ測定に関する問題点

札幌医科大学産婦人科学教室 (主任教授 明 石 勝 英)

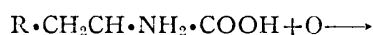
道 免 聚 二
篠 原 護

トランスアミナーゼは1954年 La Due, Wróblewski によって臨床医学に応用され、以後心及び肝疾患の診断及び予後判定に広く利用されているのであります。本日はテーマがトランスアミナーゼの測定の問題でありますので、臨床診断学的な詳細を省き、測定法の問題点を主眼に話を進めていきたいと思います。測定法に就いては雑誌に詳しく書かれており、その通りに操作すれば測定出来るわけですが、その意味を知っておく事も必要であると思います。まず、トランスアミナーゼ定量法の原理及び歴史等を振り返ってみたいと思います。

トランスアミナーゼとは何か、答はしごく簡単で、アミノ酸と α ケト酸の間で、アミノ基の移動を促進せし

める酵素を指すのであり、 $R_1CHNH_2COOH + R_2CO \cdot COOH \rightleftharpoons R_1CO \cdot COOH + R_2CHNH_2COOH$ 即ち、上式の如き、アミノ基の転移に触媒する酵素を意味するのであります。

トランスアミナーゼの歴史であります。アミノ酸又は蛋白質の代謝は、他の含水炭素や脂肪と異なり、窒素を含んでいるところに、特長があります。アラニンを例にとってみると、アラニンは生体内でアミノ基を脱してピルビン酸とアンモニアを生じ、生じたピルビン酸はkrebs cycle に入って燃えつきていく。この時の脱アミノには酸素が必要なので、酸化的脱アミノ反応といえます。一般式で示すと次の様であります。



α -Amino acid



α -Keto acid

そして、生じたアンモニアは肝臓で尿素となり、尿中に排泄されて行きます。 $2 NH_3 + CO_2 \longrightarrow O=C(NH_2)_2 + H_2O$ 以上がアミノ酸の代謝の一般的な形式とされていきました。

しかし乍ら1930年 Needham が鳩の胸筋のホモジネートにグルタミン酸を incubate したところ、アンモニア、尿素、などが一向に増加しないのに、グルタミン酸が消えてしまう事を見出した。そこで彼は、グルタミン酸から脱したアンモニアは、直ちに反応性に富んだ糖質に結合してしまうのであろうと想像したのであるが、これが transamination の現象発見の端緒となったのであります。1937年 Braunstein らは transamination を酵素学的に説明、この酵素に aminopherase なる語を冠し、この名称は最近の文献でも時折みられます。1940年 Cohen はブタの心筋中にグルタミン酸、オキサロ酢酸トランスアミナーゼを発見し glutamic oxaloacetic transaminase と命名し、以後、続々他のトランスアミナーゼが発見され、かつトランスアミナーゼが動物組織に広く存在する事が証明されました。そして現在迄に約20種類のアミノ酸のアミノ基が転移する事がわかって居り、又4~5種類の酵素が発見されているが、特に酵素活性の高いのはGO-T (グルタミン酸・オキサロ酢酸トランスアミナーゼ) 及びGP-T (グルタミン酸・ピルビン酸トランスアミナーゼ) で、これは奇しくも臨床的に意義が深く、この両者は電気泳動法で分離、精製する事ができるという事であります。尚、これ等トランスアミナーゼは1954年 La Due, Wróblewski, Karmen らによって心筋梗塞時に上昇する事が認められてから臨床医学に導入されたのであります。

トランスアミナーゼの酵素作用

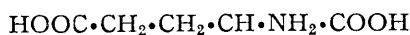
これは多くの段階に分れ、ビタミン B₆ の磷酸塩である pyridoxal phosphate が助酵素として複雑に働くのでありましたが、中間過程を省略すると、次式の如くなります。



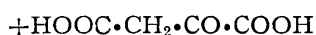
α -ケトグルタル酸



アスパラギン酸



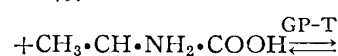
グルタミン酸



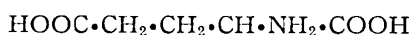
オキサロ酢酸



α -ケトグルタル酸



アラニン



グルタミン酸



ピルビン酸

以上の如くトランスアミナーゼの定量は実にこの原理に基いて行われる事をまず念頭に入れておく必要があります、即ちトランスアミナーゼの定量法とは、一口に云うと、アミノ酸と α -ケト酸を混じた液に、血清を混ぜ、適当な温度に保ち、新たに生じたアミノ酸又はケト酸の量を測定し、単位時間内での生成量を以って、活性値を現わすのであります。

トランスアミナーゼの単位

この活性値の表現は上式の(従って)生成された、グルタミン酸の量をペーパークロマトグラフィーで測定し $\mu M/ml/時$ で示す方法又は γ 数もあるが、現今では広く Karmen 単位で表示されています。Karmen 単位は $U/ml/min$. なる記号を用いるが、その意味は次の項で少し述べる事に致します。

トランスアミナーゼ測定法の種類

- 1) ペーパークロマトグラフィーによる方法 (Karmen)
- 2) 分光光度計を必要とする方法 (Karmen, Wróblewski, Steinberg)
- 3) 比色計による方法 (Cabaud, Reitman - Frankel, Sigma-Frankel)
- 4) 螢光光度計による方法 (Laursen)
- 5) マノメーターによる方法 (Green, 伊藤)

以上の如き各方法のうち、臨床検査として適当なのは3)の比色計による方法であります。今回は一般に広く使用されている Reitman-Frankel 及び Sigma-Frankel 法に就いて説明し、更に活性値表現に用いられる Karmen 単位を理解していただくために、Karmen 及び Wróblewski の方法について一言触れたい。

Karmen 及び Wróblewski 法

Karmen, A.: J. Clin. Invest., 34: 131, 1955. Wróblewski, F. & La Due, J. S.: Proc. Soc. Exp Biol. & Med., 91: 569, 1956

- A) 第1反応 アスパラギン酸 + α -ケトグルタル酸 $\xrightleftharpoons{GO-T}$ グルタミン酸 + オキサロ酢酸
- 第2反応 オキサロ酢酸 + $DPNH + H^+ \xrightleftharpoons{MDH}$ リンゴ酸 + DPN^+

B) 第1反応 アラニン + α -ケトグルタル酸 $\xrightleftharpoons{\text{GP-T}}$ グルタミン酸 + ピルビン酸

第2反応 ピルビン酸 + DPNH + H⁺ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ 乳酸 + DPN⁺

即ち第1反応は主反応でトランスアミネーション反応であり、ここで生じたオキサロ酢酸及びピルビン酸をDPNHで還元せしめ、換言すればDPNHの酸化速度を吸光度の変化より測定し、間接的に酵素活性値を求めるのであります。

GO-Tを例にとると血清、緩衝液、アスパラギン酸溶液MDH、DPNH₂を内径1cmのキュベットにとり、之をベックマンDU型分光光度計にかけ、室温(23°~26°C)で波長は紫外部の340m μ で測定すると、吸光度は徐々に落ちて来て10分後には平衡状態に達する。次に α -ケトグルタル酸溶液を加え、340m μ で吸光度減少を1分毎に5分間読みとり、その減少率を血清GO-T活性値とします。活性値は、このKarmenの条件下に、吸光度の減少が1分間当り0.001の時1単位と定める。即ちUnit/ml/min.で示される。尚ペーパークロマトグラフィーの場合のグルタミン酸の量に換算すれば 4.82×10^{-4} mM/min.に当たるといふ。GP-Tの場合はアスパラギン酸がL-アラニン、MDHがLDHに置換えられるのみで、操作も全く同様で、単位の表現も前者と同じであります。尚本法による正常値は

GO-T 5~40 平均 22.1 ± 6.8 U/ml/min.

GP-T 5~35 平均 16.0 ± 9 U

であります。しかし乍ら、本法は正確度及び迅速な点では優れているとはいえ、実験条件に難点があり、正確且つ簡便な方法が望まれていました。そしてそれに応える様にReitman-Frankelによる比色定量法が発表され、続いて本法を実用的に簡便化した、Sigma-Frankel法(Reitman-Frankel変法)が出るに及んで、近年はこの両法による測定が本邦に於ても行われる傾向になって来たのであります。

Reitman-Frankel 法

Reitman, S. & Frankel, S.: Am. J. Clin. Path. 28: 56, 1957.

原理は最初に述べた酵素作用で最終生成物である、オキサロ酢酸及びピルビン酸をそれぞれ2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとし、アルカリで呈色せしめて比色定量するのであります。

A) 試薬

- 1) 200 mM dl-Aspartate, 2 mM α -Ketoglutarate, pH 7.4 (GO-T 基質液)
- 2) 200 mM dl-Alanine, 2 mM α -Ketoglutarate, pH 7.4 (GP-T 基質液)

3) 1 mM, 2,4-Dinitrophenylhydrazine 1 N- 塩酸溶液 (発色剤)

4) 0.4 N- NaOH

5) 2 mM Pyruvate (検量曲線用標準液)

B) 操 作

- 1) 基質液 1ml を 40°C 水浴中で 10 分間加温
- 2) 血清 0.2ml を混和する
- 3) 40°C 60 分間 incubate する (GP-T は 30 分間)
- 4) 発色剤 1ml 混和, 室温 (25 $\pm$ 5°C) に 20 分間放置
- 5) 0.4 N- NaOH 10ml を加え転倒混和する
- 6) 30 分後蒸留水を対照に波長 505m μ で比色 (490~530m μ)
- 7) 別に作製した検量曲線より活性値を求める

C) 検量線の作製

原著による検量線の作製過程はその理解が非常に難解であるが、これをまとめてみると意外に簡単であり、関東化学製品の使用説明書の4ページの如き操作をすれば簡単に検量曲線が得られる。そして単位は Karmen 単位で示されます。

Sigma-Frankel 法

Sigma-Chemical Company: Technical Bulletin, No. 505, Feb. 1960

これは前法の変法であり、検量線用標準液がオキサロ酢酸である事、又 40°C でも 37°C でも incubate してよく、かつ、その場合の単位標示が数値で示されている事から、検量線作製に当り理解が容易な点、又試薬が既に調製済みで、手間の省ける事等が前法とやや異なる点であります。吾々の本法に対する2~3の基礎的実験成績を紹介すると、再現性試験は偏差も少く、二重測定による誤差も10%内外であり従って活性値の誤差の範囲は正常値で約4単位以内という事になり満足出来る結果であると思われました。アルカリ混和後の呈色は30分近辺がやや安定であり従って30分後に比色する事が適当でした。測定波長は出来るだけ α -ケトグルタル酸の影響の少い範囲を選ぶのでオキサロ酢酸、ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸の吸収曲線を描いてみると、490~520m μ の範囲が夫に当たり、吾々は505m μ を使用しました。

被検血清は0~5°Cの氷室では1~2週間保存に耐え、活性値は低下しない。又溶血血清は軽度の溶血ならば差支えないと一般に云われているが、機械的に溶血させてみると、軽度の溶血でも、稀に異常値を示すので、吾々は溶血血清は全て使用しない事にしています。

さてトランスアミナーゼ測定の隘路となっているものは云うまでもなく試薬の、就中基質の不安定な点であります。これは主として基質液の細菌汚染による変質のためであり、基質液を調製しても2~3日で変質し、使用に耐えなくなる事も稀でないのであります。Sigma社製試薬はこの点非常に安定しており優秀とは云え、入手が

若干面倒で非常に高価であります。吾々は自製試薬を使用してかなりの好結果を得たので紹介します。それは変質防止の目的で基質液にクロロホルムを飽和させてみると、同じ目的で使用したデハイドロ酢酸の場合はやや酵素阻害作用が見られるのでありますが、クロロホルムの場合は活性値は何も加えない基質液使用の場合と同じ値を示し、クロロホルムは変質防止に充分効果のある事を知りました。問題となる基質液の変質は吸光度の変化により検出して、逐目的に追って見ると、基質液の耐久性はかなり延びております。関東化学の試薬セットの説明書は Reitman-Frankel 法で実施の際の標準曲線の簡潔な表現に加えて、この基質液が安定であるという事実から Sigma 社製に劣らぬセットといえるのであり、吾々の基礎的研究及び東北大学山形内科の臨床研究を参考とした該社研究班の輝かしい成果であり、吾々も感激に堪えないのであります。因みに山形内科の成績を紹介すると Sigma 社製セットと関東化学セットの対照実験では相関係数 0.993, 0.997 で活性値の差は10%内外、又試薬の保存性は室温放置で4ヶ月、5ヶ月安定であったと驚異的な結果が出ております。しかし乍らトランスアミナーゼ測定の場合、優秀な試薬が出来たとはいえ特に頻繁に測定を行う場合は常に基質液の汚染を念頭におき、器具及び手指を清潔に保ち又基質液は凡その使用量を他の小ビーカー等に移しかえて行う等の慎重が必要であると思ひます。

臨床的意義

心及び肝疾患、その他の疾患に於ける GO-T 及び GP-T の報告は無数に上り、その詳細は省略致しますが代表的なものとして、急性心筋梗塞に於ける S-GOT、急性肝炎初期に GO-T 及び GP-T が時として数千単位に達する事がありますが、軽度上昇する場合には、その解釈は仲々難しいのであります。何故ならば、トランスアミナーゼ活性値の正常範囲が広いからであり、ここで正常値を各報告者の成績でみると、まづ Reitman-Frankel 法は

	GOT	GPT
正常値	8~40	5~30
境界値	41~50	
異常高値	50以上	30以上

であり、諸家の成績も略同様であるが GPT は低い値も見られます。吾々の成績も大体同様であり

GOT	23 例	9~39 (23.3±7.21)
GPT	19 例	2~23 (13.2±5.06)

でこれを越えた場合を異常値と見做しております。尚常に GOT>GPT であり、この比が逆転する事はある種の肝疾患に特有であるといわれます。その他トランスアミ

ナーゼは性及び年齢との関係は見られないとも云われて居り健康者ではあまり時間変動はみられず、食餌、運動、負荷等の影響もないのでいつでも採血出来る事になります。

産婦人科方面に於けるトランスアミナーゼ

最近の産婦人科に於けるトランスアミナーゼは主として妊娠中毒症及び後遺症に対する肝臓負荷の問題を中心に研究が進められております。吾々の成績ではトランスアミナーゼが高度上昇はみられないが軽度或いは中等度の上昇がみられる場合が認められます。トランスアミナーゼは手術侵襲時にも上昇致します。ある種の臓器に実質障害が起きると上昇します。これの説明として難しい問題が種々ある訳であります。比較的基本的な説明としてトランスアミナーゼの組織含有量の差によるというのがあります。吾々もこの手術で GOT が上昇するのは筋肉及び結合組織損傷のためであると解釈しておりますが下垂体、副腎皮質系の介在も考えられる事であり現在追求中であります。我田引水式になりましたが GOT, GPT 測定法を中心に吾々のデータを少し添えてお話ししました。

(札幌医大臨床検査集談会講演要旨より 1962年12月)

スタンホード大学の一隅から

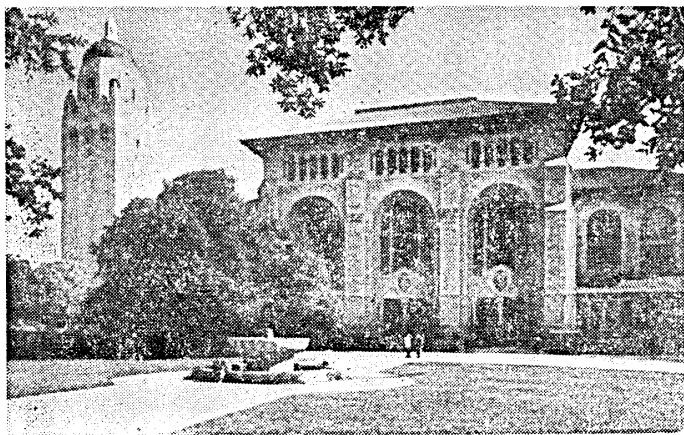
理学博士 大橋 守

執筆者紹介

昭和29年3月 名古屋大学理学部卒
昭和33年6月 名古屋大学助手(平田研究室)
昭和35年1月 東京教育大学助手(中西研究室)
昭和36年12月 マレー半島出張
昭和37年6月 理学博士「モノスコルプリンおよびモノスコフラビンの構造」
昭和37年9月 スタンホード大学(C. Djerassi 教授)の招聘研究員として赴任

I. Starting Time

二月中旬だというのに日本の盛夏を想わせるような日差し、大学を象徴する Hoover 塔が青雲の空を背にくっきりと眼に痛い。校門まで美しいしゅろの並木道が一哩近くも続いていようか。1900年に建てられたスペイン風の化学教室 Main Building の背後、二階建のしょう洒な Stauffer Building の一階全部が Djerassi 教授の研究室——この地での私の研究生活の場——である。二階は Johnson 教授の研究室、そして、地下は現在お向いの Leighton Building に仮住いをしている Tamelen 教授の研究室に変わろうとしている——アメリカの有機化学を代



スタンフォード大学

表する中心地——否中心の建物の一つになることだろう——Stauffer Bd. を抜け出てカリホルニアの陽光を満喫する。ティー・タイム。やはり久振りの快晴に誘われたのだろうか、マイクが伸びをしながら近づく。Todd 教授の下で Ph.D. をとり Tamelen 研にやって来た男だ。“いよいよ春だね” “いやもう夏だ。カリホルニアっていう所は、” ヨーロッパから来た人間は誇り高い。そして Djerassi 研や Tamelen 研はヨーロッパからの Post Doc. が断然多い——英国、スイス、ドイツ、イスラエル、イタリア、オーストリア——。4時半から Medical School で開かれる Dr. Watson の講演にやはり出席する積りらしい。研究室へ引返すと、連中掲示板の前でコップをかかえて騒々しい。ヘルムート (Dr. V.) が “O さん Look!” と呼ぶ。 “Important LAB Meeting Here, Monday Feb. 18, 8 A.M.” と大書してある。またやるのかという顔付きで京都大学から留学している N 氏がにやにやしている。それにしても朝 8 時からとは、近頃連中の出勤がおそくなったので Djerassi 教授 “喝” を入れる気になったかなと。9 時出勤もおくれ勝ちな手前、いささか後ろめたい。この前の LAB Meeting, やはり朝 9 時から Djerassi 教授を中心にした円陣会議——野球場でみかけるベンチ前での円陣そっくり——では “Memorandum to Professor Djerassi's Research Group” なるパンフレットを片手に最後の頁を強調されたものだった。Djerassi 教授の人柄と研究室の雰囲気をしるばせる二三の文章を書抜いておこう。

CLEANING OF LABORATORY

Each Friday at 3.00 p.m., either Professor Johnson or I, together with Dr. Weinstein, will inspect the entire building, including my laboratories. At that time, every individual is expected to be at his bench and he is expected to have cleaned and waxed his entire bench top, as well as to have cleaned the sink. Those individuals who are in charge of the hoods are also expected to have cleaned them.

STARTING TIME

It is with some reluctance that I am discussing this subject, but I have found that in recent times a few individuals have been abusing our informality on this point. While you are perfectly free to work evenings or at any odd hours, it is obvious that the safest and most convenient time is during the day when the stockroom is open and when you are unlikely to be alone in the laboratory, in the case of an accident. From my standpoint, it is most important that I can see and consult with my collaborators during the time when I am normally in my office or laboratory; consequently, I expect my collaborators to be in the laboratory no later than 9.00 a.m., especially since I am usually in here no later than 8.00 a.m., and often the early morning is the most convenient time for me to discuss problems. If this request causes any hardship to any individual, then I would like to discuss this with him personally since I shall be glad to take into consideration any special circumstances. If I do not hear from you about this matter, I will take it for granted that you agree with my request about the starting time being no later than 9.00 a.m.

そろそろ時間だというので Medical School へ出かける。専門は違っていても “Protein Synthesis on Ribosome” となれば面白そうだし、ノーベル賞受賞者の肩書きにも好奇心が動く。満員の会場、うつむき加減に物静かに話しを進めながら時々ギョロリと眼をむく Watson 教授は一見奇人の風格がある。有機化学を専攻するものにとって局外者の立場は避けられなかったが、それでも S-RNA の役割をはっきりさせた話題は、蛋白質生合成解明という困難な問題に、一つの前進を与えたであろうことは想像できた。すこしでも生化学を呼吸したのにとって進歩の速度は実感するのであろう。しきりに家内は嘆息する。

夜 7 時、研究室から帰る際もう一度掲示板を眺めてみると 8 A.M. の下に大きく “People are busy” と雑誌の



紙 者 夫 妻

切抜きが貼られていた。

II. Surprised Seminar

“Feb. 19 (Tue.) at 7.30 p.m., must be attended by everybody, surprised Seminar” この掲示がでたのは、Winstein 教授 (University of Calif.) の Seminar が済んだ翌日だった。ここの化学教室では毎週月曜日の4時から教授クラスの visitor のゼミがある。最近では Rappaport 教授の chlorobium chlorophyll の構造決定の話、H. C. Brown 教授の nonclassical carbonium ion なんて存在しないんだとする卓見？そして Winstein 教授の Brown 説に対する激しい反論などを聞いたのもこの場であった。金曜日には大学院学生のゼミがある。これは日本の大学でもよく行なわれている雑誌の抄読会だが、教授・研究員からの質問の激しさは相当なもの、大学院の単位になるゼミだ。この他 Djerassi 研では、火曜日の夜7時半から10時過ぎまで Post Doc. による Seminar がもたれ、Ph.D. をとった仕事や、ここで論文にするような仕事がまとまると結果が発表され、激しい討論が沸騰する。Surprised Seminar は研究室ゼミだから、そんなに大物ではなからうと思いつつ Prof. Barton が来るのではないかなんていう話しも飛出して好奇心がわく。早目に夕飯を済ませて講義室に入ったとたん Djerassi, Johnson 教授と談笑している Dr. Lederburg (ノーベル受賞者、Medical School 遺伝学教授) の鋭い眼付にぶつかる。Biochemistry と Genetics の最近10年間の発展を話されながら、機械文明と人間の問題に話題は広がる。まさに Surprised であった。Djerassi 教授が有機化学者として、有機化学は如何にあるべきかを常に考えたい、としんみり話しを締められたのは印象深かった。くらい Campus drive を飛ばしながら“天然物有機化学の行方”そして“日本の大学での研究のあり方”を考えさせられる。日本の有機化学に関係のある大学なり研究所なりでこゝだけの研究施設をもっている所があるだろうか。既にそれらは天然物有機化学にとって不可欠のものになっているのだ。たとえば UV (Cary 14M), IR (Perkin-Elmer 421 grating, infracord), ORD (JASCO ORD-2), CD (Rousel-Jovan dichrograph), ガスクロマト (Megachrom, 他に分析用は五人に1台の aerograph), NMR (HR-60, A-60, 近く 100Mc.が入る予定), Mass spec. (CEC-21-103C, 近く ATLAS が入る予定) など、それぞれに Post. Doc. の責任者がついて完全に整備されて、これらの物理定数から得られる知見をフルに活用して、化学反応に費す時間は最少限となっているのだ。1週間に何回となく Djerassi 教授をかこんで研究グループの会議がもたれ、研究の進行方向が討論される。二週間に一篇の論文ができるのも誇張でなくなりつ

ゝあるのだ。たとえばブラジルの Dr. Gilbert から送られた新しい aspidospermin 系 alkaloid などサンプルを受取った日に Mass, NMR, IR, UV から構造が決定され電報が打たれたのだ。祖国の貧乏して研究施設と、雑用に追まぐられる教授研究者達、せめて総合研究所でもつくり、世界に比肩する施設を備えて利用できる場ができないものだろうか。このまゝだと、いくら優秀な研究者がいたとしても、日本では天然物の構造決定というような仕事はもう限界であろう。従来のまゝではこの仕事に従事しても自己満足に過ぎなくなる——19Cの研究のあり方に逆戻りする——のではなからうか、そんな想いがかけめぐる。

午前零時、ねむられぬまゝ Stanford の丘にドライブする。Hoover Tower の灯を中心に大学は不夜城だ。夜空にくっきりと大きな Red wood の木々、遙かに San Francisco の空は明るく Bay の彼方の灯がまたたく。眼下の Palo Alto の街、家庭の灯はつぎつぎに消えて、街灯の淡白く続く彼方、血の Bayshore free way を時速70哩位でとぼしているヘッドライトの波も静かだ。“うちの灯は日本と変らないわね”家内がそっとつぶやく。ハーバート (Dr. B.) がクリスマス休暇をウィーンに帰省した際に日本に立寄り“スチームの通っていた大学は一つもなかった”と笑ったけれどその寒い大学で生活の条件も恵まれないまま、天然物に情熱を燃して頑張っている若い仲間達の顔が浮ぶ。二年たったらやはり祖国へ帰ろう。研究条件や生活条件は悪くても、天然物有機化学からもやっぱり離れられそうもない。涙するような感傷がこみあげてきた。

編集後記 本誌No. 3 (通巻 29 号) は原稿も早く集り、予定通り7月1日の発行で、順調に運んでいる。山形大学の中沢信午先生の「ヒトデの毒素とシダ類蔵精器誘導物質」の原稿は、昨年12月既に送られたのであるが、先着の生化学方面のものがあつたので、本号に掲載することになったのです。中沢信午先生はフークス科藻類の発生力学の研究論文を日本植物学雑誌に20報発表され、ヒトデの毒素によるウニ卵の発生異変について、山形大学紀要 (自然科学) 第5巻第2号 (昭和36年3月) に、なおヒトデの毒と題して科学読売本年1月号に掲載された。また、ドイツの自然科学雑誌 Die Naturwissenschaften (1960) 14. 327—8に「ヒトデ毒素による動物組織の崩壊」Dissociation of animal tissues by a toxic substance obtained from starfish について発表されている。

スタンホード大学の一隅からの執筆者大橋守博士は研究で御多忙にもかかわらず、本誌のためにわざわざ原稿をお送りいただきました。おかげで、あちらの大学有機化学研究室の模様を知ることができ大いに参考になりました。博士は今後も続けて書いて下さることになっています。(編者)

昭和三十三年七月一日 発行

● 関東化学株式会社 ●

東京都中央区日本橋本町三ノ七 (241) 五二六(代表)

出張所 九州、札幌
連絡所 蒲田、国分寺、千葉、大宮