哺乳動物原皮の化学的組成に関する研究

I 蛋白質各区分の定量条件について

佐 藤 泰

(東京大学農学部)

Studies on the chemical composition of raw stock of mammal's skin

I On the condition for determining protein fractions.

YASUSHI SATO

(Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

緒 言

皮革や膠の製造を目的とする場合、その原料皮について化学的組成の分析法及びその数値は最も基礎的な問題として必要であるにも拘らず、それらに関する報告は極めて少い。蛋白質各区分の分析については、僅かに ROSENTHAL¹⁾、Mc LAUGHLIN and THEIS²⁾、JACOBS³⁾、MARRIOR¹⁷⁾ の報告があるが分析された動物皮の種類が少く、またわが国における報告はサメ皮についての高橋等¹⁶⁾の報告以外には全くないといつてよい。

著者は皮革や膠の製造原料としての哺乳動物皮、即ち最も普及している塩蔵皮について、その成分分析値を知る目的をもつて、先づ前記研究者等の方法を実験検討し蛋白質各区分の定量条件を明かにした。次にその結果を報告する。

実 験

A 塩水可溶性蛋白質の定量

1 原料皮 東京近郊産の黒色又は赤色和種成牛の皮で屠殺後約3ヶ月塩蔵され製革工場に於て直ちに製革原料となし得る状態にあるもの。この実験にはその脚部を用いた。分析に用うる試料の大きさは2×2cm～3×6cmである。(水分：47%、食塩：17%)

2 物理的条件について (方法) 原料皮は3×6cmにきり、3枚を1組として1実験に用いた。但し外部に附着する食塩の結晶は出来るだけ除いた。この各1組(25～30g)につき水150ccづつ注加しトルオールを用いて防腐した。所定条件で所定時間経過してから夫々50ccをとり別に新しく水50ccを補充した。ここに得た50ccについて浮遊物を遠心分離して除いてから全窒素及び非蛋白態窒素を定量しその時間までに溶出した蛋白態窒素及び非蛋白態窒素を試料乾物量1gに対するmg数として算出した。蛋白質の沈澱方法は従来⁴⁾の方法によつた。(結果) 実験結果は第1表に示す通りである。

第1表 物理的条件の影響

	時間 条件	各時間毎の溶出量Nmg/1g乾塩皮							
		1/6	1	3	5	8	21	43	
蛋白質	15°C静置	0	0.2	0.3	0.4	0.4	0.6	0.5	
	30°C静置	0.4	0.4	0.6	0.6	0.7	0.9	0.9	
	15°C振盪	0.5	0.8	1.0	1.0	1.2	1.3	1.3	
非蛋白態	15°C静置	0.4	1.1	2.4	2.6	3.0	3.2	3.4	
	30°C静置	0.9	2.5	3.1	3.2	3.5	3.9	4.4	
	15°C振盪	1.1	1.9	2.5	2.7	2.8	2.9	3.1	

即ち温度をあげることなく振盪することによつて非蛋白態窒素量を増加することなく蛋白の抽出速度及其量を高めることが出来る。

3 抽出に要する水の量について (方法) 蛋白質の抽出量を測定する代りに共存するNaClの抽出量の測定を行つてその条件をきめた。試料は2×2cmにきり、1枚を1実験に用いた。但し毛は全部切り除き、表面のNaClを軽く洗つて濾紙で水をふきとつた。各試料に(重量1.87g) 夫々2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 21倍量の水を加え、室温(29～30°C)で2時間振盪してから、抽出液の一部をとり溶出したCl⁻を硝酸銀滴定法⁵⁾によつて定量し、毛を除いた試料乾物量1gに対するNaClの全溶出量mgを算出した。(結果) 実験結果は第1図に示す通りである。

即ち2～2cmの大きさに対しては速かに抽出するため

第1図 水の量の影響

に少くとも5倍量の水を用うることが必要であると考えられる。

4 抽出回数について 前記2, の実験に見られる如く, 抽出液の一部を更新しても抽出に21時間以上を要する。そこで毎回液を全部更新するか或いは試料の大きさを小さくすれば抽出時間を短縮できる筈である。試料の大きさを小さくすることは多くの試料を扱う場合には不適當であり, 乾燥して粉碎することは成分抽出条件の変化を伴い, しかも極めて非實際的である。そこで前実験における試料と同じ大きさで液を更新する場合について完全抽出に要する抽出回数を測定した。(方法) 原料皮は3×3cmの大きさにきり, 1枚を1実験に用いた。試料(約3.3g)に50ccの水或いは10% NaCl 溶液を加えて室温(15~18°C)で振盪し3時間後試料を取り出し遠心脱水し液を更新して同様操作し初めより7回抽出を行った。各抽出液について, その全窒素及び非蛋白態窒素を定量し, 試料を脱毛脱灰したものの乾物量1gに対する蛋白態窒素及び非蛋白態窒素のmg数を算出した。(結果) 実験結果は第2表の通りで少くとも2回の抽出を要する。

第2表 抽出回数と抽出蛋白質量

抽出液	各態窒素 mg	1	2	3	4	5	6	合計
水	全 窒 素	2.9	0.7	0.5	0.4	0.4	0.3	5.2
	蛋 白 態	1.1	0.3	0	0.2	0.0	0.0	1.6
	非 蛋 白 態	1.8	0.4	0.5	0.2	0.4	0.3	3.6
10% 食塩 水	全 窒 素	2.3	1.0	0.4	0.4	0.4	0.2	4.7
	蛋 白 態	0.7	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	1.0
	非 蛋 白 態	1.6	0.8	0.3	0.4	0.4	0.2	3.7

5 抽出液について 水で抽出する場合には皮中のNaClが溶出して1~2%のNaCl溶液となる。更にNaClを加え毎回10% NaCl 溶液で抽出する場合には蛋白質溶出量が多くなることが考えられる¹⁸⁾のでこれを検討した(方法) 山羊の塩乾皮を2×2cmにきり8枚を1組として1実験に用いた。各組試料(2.3g)に水或はNaCl溶液を25cc加え一夜充分吸水せしめてから3時間づつ振盪抽出した。NaCl溶液は試料中のNaCl量を考慮して加えた後10%となる様な濃度のNaCl溶液を用いた。2回目の抽出からは水或は10% NaCl 溶液を25cc加え3時間づつ振盪し毎回溶出蛋白質の存在を確かめ抽出しなくなるまで行つた。水の場合は3回, 10% NaCl 溶液の場合は4回抽出を要した。各抽出液は合せて蛋白態窒素を定量した。(結果) 第3表の通りで10% NaCl 溶液の方が抽出量が多い。

第3表 水及10% NaCl 溶液による抽出

抽 出 液	蛋白態窒素 mg
水	2.4
10% NaCl 溶液	3.7

6 沈澱方法による沈澱蛋白質量の差について 抽出した可溶性蛋白質は概ね変性したAlbumin, Globulinを含むものと考えられる。従つて沈澱方法によつて蛋白質量の変化することも考えられる。例えば新鮮血清蛋白の分別に用いられる硫酸ソーダ塩析法⁶⁾を抽出液に用いてみると第4表の如く分別性は19~20%濃度を境として僅ながら示されるが余り明瞭でない。そこで種々の沈澱方法によつて蛋白質量を比較した。(方法) 原料皮63

第4表 硫酸ソーダ塩析による分別性

Na ₂ SO ₄ 濃度%	14	16	18	20	22	25	28	33.5
濾液中のNmg	22.3	22.2	21.7	21.0	20.4	20.0	20.0	18.9

gより抽出した抽出液を用い第5表の如き方法で蛋白質を沈澱せしめ, 全窒素と濾液中の窒素との差より蛋白態窒素を求め比較した。(結果) 第5表の通りでトリクロル醋酸2.5%によつて沈澱するものをAlbumin—globulin fraction と考えて差支えない。但しタンニン酸,

第5表 沈澱方法による蛋白態窒素の変化

沈 澱 方 法	沈澱蛋白 態窒素
微酸性で煮沸	1.6mg
最大析出 pH3.5 としたもの	1.6
トリクロル醋酸を溶液中で2.5%としたもの	1.7
タンニン酸醋酸アルコール溶液添加	2.4
Na ₂ SO ₄ を飽和したもの	2.7

或いはNa₂SO₄飽和によつて沈澱される部分が存在する。

B アルカリ可溶性蛋白質の抽出条件

支持組織中に存在する可溶性蛋白中, 特にアルカリによつて抽出しうるものはMucoidと考えられている。軟骨や角膜からの抽出法については2,3の報告⁷⁾⁸⁾があるが皮については少い。McLAUGHLIN等²⁾が半飽和石灰水で37°Cに於て抽出した例があるが, 完全に抽出されたかどうかについては記載されていない。

1 抽出回数について (方法) 前実験に用いた和牛皮を3×3cmにきり, これを3枚1組(10g)として前実験で得られた条件に従い塩水可溶性蛋白質を除去し, 更に毛及び表皮をできるだけ除き乾燥せぬまま試料とした。この試料に0.2% NaOH 溶液50ccを加え3時間室温(20~22°C)で振盪し抽出した。この抽出液を液を更新して8回繰返した。この抽出液は一度濾過し, トリクロル醋酸を液中濃度2.5%として蛋白質を沈澱せしめ蛋白態窒素を定量した。(結果) 第6表の通りで8回目に至つても猶完全でない。

第6表 アルカリ可溶性蛋白の抽出回数

抽 出 回 数	1	2	3	4	5	6	7	8
蛋白態窒素mg	1.6	1.2	1.2	1.0	1.0	0.7	0.3	0.2

2 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液と NaOH 溶液による抽出量の差

(方法) 原料皮としてザーネン種山羊或は白色在来種家兎の塩蔵皮を用いた。原料皮を $3 \times 3 \text{ cm}$ にきり夫々2枚 (2.4g) 或は4枚 (2.0g) を1組として1実験に用い2組づつ用意し前実験と同様処理し試料とした。各塩蔵皮1組の試料は 0.2% NaOH 溶液 25cc, 他の1組は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和溶液 25ccを加え2時間室温 ($22 \sim 23^\circ \text{C}$) で振盪抽出した。各回毎に液を更新し抽出量が少なくなつてから振盪抽出をやめ、液を更新して抽出を始めてから1週間後まで室温に静置し、更に液をかえて1週間静置抽出した。最後に1% Na_2CO_3 を含む30% KCl 溶液⁹⁾ 25ccをもつて3日間静置抽出した。抽出液については前記同様蛋白態窒素を定量した。(結果) 第7表の通りである。

第7表 アルカリによる抽出蛋白態窒素

原 料 皮			家 兎 皮		山 羊 皮		
ア ル カ リ			Ca(OH) ₂	NaOH	Ca(OH) ₂	NaOH	Ca(OH) ₂
蛋 白 態 窒 素 mg	抽 出 回 数	1	2.6	3.8	0.9	1.1	—
		2	1.0	4.6	0.3	2.3	—
		3	0.2	1.6	0.3	1.4	—
		4	0.1	0.6	0.1	0.7	—
		5	0.01	0.3	0.1	0.4	—
		6	—	0.2	0.03	0.2	—
		7	—	0.2	0.1	0.5	—
		8	—	0.2	—	0.1	—
		9	—	—	—	0.3	—
振盪抽出後静置抽出, 始めより1週間後		2.0	2.2	1.9	1.7	5.6	
静置抽出次の1週間後		2.0	1.4	2.9	1.5	1.8	
30%KCl) 溶 1%NaCO ₃ 液		0	1.0	0	1.7	2.4	
合 計		7.9	16.1	6.7	11.9	9.8	
試料の窒素100mgに 対する蛋白態窒素 mg			4.8	8.7	4.8	7.4	6.6

即ち $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の場合と NaOH の場合の蛋白抽出量は凡そ 1 : 2 となり完全に抽出するには長時間を要し、2種のアルカリによつて抽出し得た蛋白が同質のものであるかどうか極めて疑問である。またかかる抽出状態からみて、これらの蛋白が Collagen 繊維の間に遊離して存在するものとも考えられない。従つてこれらについては更に詳細な研究を要するものと思われるので別の機会に検討することとした。

3 アルカリにより Keratin 質より生ずる Keratose の影響について 毛及表皮の一部は皮のアルカリ抽出に於て同時にアルカリの作用を受ける。而して生じた Keratose はトリクロル醋酸によつて沈澱するので定量値を高くする。この影響を知るため毛よりアルカリによつて生ずる Keratose を定量した。(方法) 前記実験に用

いたザーネン種山羊の塩乾皮より毛をかりとり、充分水洗して風乾し、その 0.9g ($3 \times 3 \text{ cm}$ の2枚分に着生すると考えられる量) に $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和溶液或いは 0.2% NaOH 溶液を夫々50cc 加え室温 ($22 \sim 23^\circ \text{C}$) におき1週間抽出した。その後液を更新して更に1週間抽出した、抽出液について前記同様トリクロル醋酸で沈澱する部分の窒素を定量した。(結果) 第8表の通りで第7表の

第8表 アルカリによる Keratose の生成

アルカリ	沈澱蛋白態窒素 mg/0.9g 毛	
	1 週間後	2 週間後
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0.32	0.64
NaOH	0.79	0.94

山羊皮より抽出される蛋白量に対し1週間後では約8%以下、2週間後では5%以下である。従つて試料の毛を出来る限り切る程度で結果に殆ど影響はなくなるものと考えられる。

C Elastin の定量

Elastin は1896年頃に頸の靱帯、大動脈を材料として調製された例が記載されている。その方法は①沸騰水、熱10%醋酸溶液及熱1% KOH 溶液で¹⁰⁾、或は更に5% HCl で¹¹⁾、②或ははじめに胃の浸出液で大凡そ Collagen を消化しておき次に水で煮沸し、冷5% HCl で、Elastin 以外の蛋白質を完全に溶解して除き、次に残渣を Alcohol, Ether で脱脂する¹²⁾のである。

その後これら調製法を皮中の Elastin 定量法として応用するために検討された報告は少く、Mc LAUGHLIN 等²⁾は脱毛皮を数日間水で煮沸し、JACOBS³⁾は0.1% HCl で 85°C に65分間たもち、Elastin 及び Keratin 以

外のものを溶解し Elastin 及び Keratin を定量し、Marriot は5%醋酸で5回繰返し煮沸し残渣として定量した例がある。その他の定量法として ROSENTHAL¹⁾は脱毛皮を Trypsin で96時間消化して溶出した全窒素に係数6を乗じて Elastin 量とした。

Rosenthal の方法は Trypsin の Elastin 消化力、並びに消化時間が不明であり、Elastin の量が少いの他の蛋白も同時に消化する危険があり正確を期し難いので相当の検討を要するものと考えられる。Mc LAUGHLIN 等の方法は非常に長時間を要し Jacobs の方法は試料の厚さを 50μ 位の薄片にしなければ不可能であるから多くの試料を処理するのには適していない。

そこで著者は皮に対し最も検討し易い方法として Collagen のみを速かに溶解せしめる方法を取り、先づ溶媒

として醋酸或いは KOH を用いて、それらの濃度と残渣量の関係を検討した。

1 原料皮 牛皮、犢皮、水牛皮、山羊皮等の塩蔵皮を用いた。

2 試料の調製 塩蔵皮を水洗した後、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和溶液に 5~7 日間浸漬して脱毛し、 NH_4Cl 及び醋酸によつて石灰を中和し、水洗した。ここに得た皮のなるべく厚度の一樣な部分を選び $5 \times 5 \text{ mm}$ 以上の大きさに切り、そのまま或いは風乾して試料とした。

3 醋酸或いは KOH の濃度と皮の溶解残渣量との関係 (方法) 細切し風乾した水牛皮、或いは犢皮試料を 1 g づつとり、種々の濃度の KOH 或いは醋酸の溶液 50cc を加え逆流冷却器をつけて 7 時間煮沸する。その後、食品の粗繊維定量法¹⁾に準じて 1 時あたり大約 45 糸位の目をもつたリンネル布をつけたアリーン氏管によつて溶液部分を吸出し残渣をのこす。残渣を数回水で洗つて洗液がアルカリ性或いは酸性を呈しなくなつたら、残渣を蒸発皿に入れて風乾し Alcohol 及び Ether で洗つて後、 100°C で乾燥秤量する。また必要に応じてはこの残渣中の窒素を定量する。(結果) 第 2 図は水牛皮を KOH 溶液で煮沸した時の KOH 濃度 (%) と残渣量及残渣中の窒素との関係を、第 3 図は犢皮を KOH 溶液で煮沸した時の KOH 濃度と残渣中の窒素との関係を第 4 図は水牛皮を醋酸溶液で煮沸した時の醋酸濃度と残渣量との関係を示す。

第 2 図 KOH 濃度と煮沸溶解残渣量 (試料、水牛皮)

以上の結果をみると KOH 濃度が 0.4~0.8% の間で残渣量が略一定となり、1% となると急激に残渣量が減少することが分る。また残渣中の窒素を定量しても大凡そのことが確認できる。また醋酸の場合には 10% 以上の濃度で残渣量が略一定する。水牛皮について 0.4~0.8%

第 3 図 KOH 濃度と煮沸溶解残渣 (試料、犢皮)

第 4 図 醋酸と煮沸濃度沸溶解残渣量 (試料、水牛皮)

KOH 溶液で煮沸して得られる残渣量は約 1.2% であり、10% 醋酸溶液で煮沸して得られる残渣量の約 1.2% と一致する。

これらの濃度の各溶液で煮沸して溶解せず残るものは後述の如く顕微鏡下に於て約 1μ の直径をもつ繊維であつて 1% KOH 溶液ではこのものも溶解するに至る。この点 Elastin を靱帯や大動脈より調製する時に用いられる KOH 溶液の濃度 (1%) とはやや異なるものと考えら

れる。また酸とアルカリの両方で煮沸溶解させる必要も認められず、醋酸を用うれば KOH を用うるより洗滌等の操作がしやすい。

4 醋酸による溶解残渣に及ぼす煮沸時間の影響

(方法) 残渣を定量する代りに溶解する窒素量を定量し測定した。即ち試料を約 1 g (乾物量) とし、これに 10% 醋酸 50cc を加え、逆流冷却器をつけて煮沸する。所定の時間毎に 3 cc の液をとり浮遊物を遠心分離し上澄液 1 cc をとって窒素を定量し、溶出全窒素量を算出した。(結果) 第 5 図の通り風乾試料では約 7 時間以上、吸水している試料では 3 時間以上を要する。

・第 5 図 醋酸による煮沸時間と溶解量

5 原皮に対するアルカリ脱毛処理が残渣量に及ぼす影響 原皮の Mucoid を抽出し、或いは Keratin 質を分離するためにアルカリを用う場合には、その作用が Collagen 或は Elastin にも及ぶことが考えられる。このうち Elastin の量は Collagen に比べ非常に少ないので、アルカリによつてもし Elastin が分解をうければその百分率に大きい影響を与える。従つてこの点につき実験検討した。

(方法) 洋牛塩蔵皮を 5 g づつとり、食塩及び塩水可溶性蛋白質を除去した。その後一方はそのまま 10% 醋酸にて Mucoid 及び Collagen を煮沸溶解し、残渣 (主として Keratin と Elastin) を洗滌し、pH 8.0 の緩衝溶液 ($H_3BO_3 \cdot KCl$) 50cc 中に入れた。これに Pancre-

atin 0.25g を入れ 37°C で 4 時間、完全に消化し Pancreatin により溶出した溶液中の全窒素を定量した。他方の試料は飽和石灰水に 10 日間浸漬し充分脱毛し石灰を中和し洗滌した。これに 10% 醋酸を加えて Collagen を煮沸溶解し、残渣を洗滌し前記同様 Pancreatin による消化を行い、溶出した全窒素量を定量した。ここに得られた両試料の残渣の消化全窒素を Elastin 態窒素とし塩蔵皮乾物に対する百分率を算出して比較した。(結果) アルカリ無処理区では 0.13%, 処理区では 0.14% で差はないものと考えられる。従つてアルカリ処理は残渣量に影響を及ぼさない。

6 残渣が Elastin であることの証明

a) 顕微鏡的所見 牛の脱毛皮の一部をとり、そのミクローム切片につき Weigert 氏試薬で染色される繊維が存在することを確認し、同じ試料について、pH 7.8 38°C で 8 時間 Pancreatin 処理を行った。処理皮の一部について 10% 醋酸による煮沸残渣がないことを確かめ、残りの部分につき Weigert 氏試薬により染色を行つたが染色された繊維は殆ど見出されなかつた。(附図 Fig1—Fig4)

また 10% 醋酸による煮沸残渣をガラス板上におき丁寧にのばし顕微鏡で観察したところ附図 Fig 5 の如き繊維が集合し Fig 6 の如く見られた。この繊維の直径は約 1 μ であつた。この残渣を銀染色するとこれらの繊維は染色されず、その中に極めて僅かながら、Fig 7, Fig 8 の如き太い繊維がみられたがこれが何であるかは不明であつた。

次に牛皮を第 6 図の如く中央部銀面下厚さ約 1 mm 位を円形にけづりとつた。而

第 6 図

してこれを醋酸で煮沸して残渣をガラス板上にのばしても中央部に穴を生ぜず鏡検しても中央部は他の部分と同じ繊維集合物で変化はなかつた。従つてこの繊維は銀面のみが存在するものでない。

b) 化学反応 残渣は Xanthoprotein 反応及び Millon 反応共に陽性で、Hopkins-Cole 反応は陰性であつた。これは Chittenden & Hart¹⁴⁾ によれば Elastin の特異性であるといわれる。

また残渣を HCl で加水分解し、これについて二次元ペーパークロマトグラフにより存在するアミノ酸の種類をしらべた結果、次の種類を認めた。グリシン、バリン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、アルギニン、ヒスチジン(?), リジン、グルタミン酸、アス

パラギン酸、これは Graham, 等の報告¹⁵⁾による Elastin の構成アミノ酸と同じである。

c) 酵素に対する消化性 (方法) 山羊皮より調製した脱毛皮を遠心脱水して細切せずに3.3g (乾物量として約1g) をきりと試料とし1枚をもつて1回の消化実験に用いた。試料に pH8 の緩衝溶液を50ccを加え、Merk 製 Trypsin 或は国産局方 Pancreatin を所定量加えた。また pH5 の緩衝溶液 50cc を加えたものには Merk 製 Papain 或は国産 Papain を所定量加えた。所定時間 38~39°C で消化し、処理皮は水洗し夫々10% 醋酸50ccを加えて6時間煮沸した。この時試料の溶解残渣は消化しないものでは元の形を保つて浮遊しているが消化をうけたものでは消化の程度によつて残渣の崩壊度が異なる。これを観察した。(結果) 結果は第9表、第10表、第11表の通りである。第12表は予め消化をうけない皮より調製した残渣について酵素の種類との関係をみたものである。表中の崩壊度の表示は次の通り。—……全く崩壊せず、±……やや分解をうけているが形は完全に保たれている、++++……部分的にちぎれているが半分以上は形をたもつている、++++……小部分にちぎれて大きい形はみとめられぬ、++++……全く崩壊して殆ど浮遊物を認めぬ。

第9表 濃度との関係
(酵素; Merk Trypsin,
作用時間3時間)

濃度 %	崩壊度
0	—
0.05	—
0.10	—
0.50	±
1.00	+

第10表 時間との関係
(酵素 Merk Trypsin)
(作用濃度 0.05%)

作用時間	崩壊度
3	—
5	—
7	—
9	±
16	±

第11表 酵素の種類との関係
(作用時間3時間) …その1

酵 素 名	濃 度 %	崩 壊 度
Trypsin (Merk 製)	0.1	—
Pancreatin (国産局方)	0.08	++
" (")	0.13	+++
Papain (Merk 製)	0.05	++
" (国産)	0.13	++

第12表 酵素の種類との関係
(作用時間3時間) その…2

酵 素 名	濃 度 %	崩 壊 度
Trypsin (Merk 製)	0.1	—
Pancreatin (国産局方)	0.08	+++
" (")	0.13	+++
Papain (Merk 製)	0.05	++
" (国産)	0.13	++

以上の結果から残渣が主として Elastin よりなるものと推定した。但し Reticulin の混在することについては否定できない。

考察及び要約

原皮の蛋白態組成を知る目的で、塩蔵皮につき特に製造工程に対する目安となるような分析方法の条件を検討して次の結果を得た。

1 塩水可溶性蛋白質の定量条件

原皮を2×2cm~3×6cm にきつて試料とする時、10% NaCl 溶液を1回に5倍量以上用いトルオールで防腐し室温で振盪し、少くとも1回2時間、2回抽出する必要がある。而して蛋白質はトリクロル醋酸を液中2.5%の濃度として沈澱せしめればよい。

2 アルカリ可溶性蛋白質の定量条件

試料の大きさは前と同様にし、毛は始めに出来る限り短かく切つて用うる。かくすれば Keratose の混入は殆ど無視できる。アルカリについては Ca(OH)₂ 飽和溶液 0.2%NaOH 溶液のいずれを用うべきかについてこの実験では結論が得られなかつた。即ち1回に2時間ずつ5~8回振盪抽出し、その後2週間繰返しても抽出蛋白質の存在が認められる。しかも全抽出量は Ca(OH)₂ 飽和溶液の場合は 0.2%NaOH 溶液の場合の約半量となり両液で抽出された蛋白質が同一のものであるかどうか不明かでない。従つて以後の実験においては Ca(OH)₂ 飽和溶液を用い表皮 Keratin が容易に剝離する迄の時間を標準とし、それまで毎日2時間ずつ振盪し抽出し得る蛋白量をアルカリ可溶性蛋白質とした。

3 Elastin の定量条件

Elastin はアルカリの影響を受けないから Ca(OH)₂ 飽和溶液によつて Keratin 質を除いてから定量しても差支えない。試料の大きさは細くなりすぎない方がよく前記の大きさの程度で充分である。乾物量として約1gの試料に10%醋酸50ccを加え逆流冷却器をつけて、未乾燥のものは約3時間、乾燥したものは約7時間煮沸し残渣をよく水洗し、Alcohol 及び Ether で脱脂し、その重量をはかればよい。この残渣は顕微鏡的所見、化学反応、酵素による消化性からみて殆ど Elastin であると推定した。但し Reticulin の混在については否定できない。

4 Collagen 及び Keratin の定量について

Collagen の定量は Elastin の定量における醋酸による溶解液中の全窒素を定量しこれに係数 5.62 を乗ずるか、Elastin 定量前の試料の乾物量より Elastin 量を差引いて定量値とすることが出来る。

Keratin はアルカリ抽出処理前の試料から切りとつた毛の重量と、Ca(OH)₂ 飽和溶液で抽出した溶液に混ざる表皮及び毛、機械的に除去した表皮及び毛を充分洗つて乾燥した重量とを合計して定量する。

終りに本実験を行うに当たり終始御懇篤な御指導を仰いだ恩師佐々木林治郎先生に厚く御礼申上げると共に実験の一部に御協力を得た富永太郎、斎藤歴史の両君に感謝いたします。

本研究は文部省科学研究費により行い、この報告の一部は日本畜産学会春季大会（昭和27年4月4日）に於て講演した。（1954.11.27受付）

文 献

- 1 ROSENTHAL, G. J. (1911): A. L. C. A., 11, 463.
- 2 Mc LAUGHLIN, G. D. and THEIS, E. R. (1924): A. L. C. A., 19, 428.
- 3 JACOBS, J. L. (1949): A. L. C. A., 44, 722.
- 4 東大農芸化学教室編 (1952): 実験農芸化学下巻, 623
- 5 西田伝五郎 (1941): 定量分析実習指針, 123
- 6 KEKWICK, R. A. (1938): Biochem. J. 32, 552.
- 7 MEYER, K. and SMITH, E. M. (1937): J. Biol.

Chem., 119, 507.

- 8 WOODIN, A. M. (1952): Biochem. J., 51, 319.
- 9 EINBINDER, J. and SCHUBERT, M. (1950): J. Biol. Chem., 185, 725.
- 10 ZOJA, L. (1897): Z. Physiol. chem., 23, 236.
- 11 BERGH, E. (1898): Z. Physiol. chem., 25, 337.
- 12 SCHWARZ, H. (1894): Z. Physiol. chem., 18, 487.
- 13 東大農芸化学教室編 (1948): 農芸化学分析書, 上巻, 165
- 14 CHITTENDEN and HART (1887): 文献(1)より引用
- 15 GRAHAM, C., WAITKOFF, H. and HIER, S. (1949): J. Biol. Chem., 177, 529.
- 16 高橋豊雄・横山和吉, (1954): 日水会誌, 20, 411.
- 17 MARRIOT, R. H. (1933): Allen's Commercial Organic Analysis, 10, 197.
- 18 Mc LAUGHLIN, G. D. and Theis, E. R. (1923): A. L. C. A., 18, 324.

Résumé

With the view of analysing compositions of protein fractions in raw stocks of mammal's skin, that condition of analysis in salt cured skin was investigated, which served as a reference to the leather manufacture.

And the following results was obtained in respect of the condition of analysis in the case that the size of sample was $2 \times 2 \text{ cm} \sim 3 \times 6 \text{ cm}$.

1. Saline soluble protein.

Five or more times as much 10% NaCl solution as weight of sample should be used, and extracted two or three times by shaking at room temperature for two hours. This protein may be precipitated by adding 2.5% of trichloroacetic acid.

2. Alkali soluble protein.

The conclusion could not be obtained.

3. Elastin and Reticulin

After sample unhaird with lime was washed, it was brought into 10% acetic acid and boiled. It is supposed experimentally that the residue obtained after boiling was almost elastin.

Accordingly, the residue was washed with alcohol and ether, and weighed as elastin and reticulin.

4. Collagen and keratin.

Nitrogen in the part dissolved by boiling with acetic acid was measured and multiplied by 5.62. The value obtained is collagen weight.

Hair cutted from the sample at the begining of the experiments, and residual hair and epidermis removed with lime were washed together and weighed as keratin.

Explanation of plate

- Fig. 1 Elastin fibers in thermostat layer before pancreatic digestion. $\times 150$
- Fig. 2 The partial disappearance of elastic fibers after digestion for 3 hours. $\times 150$
- Fig. 3 The almost perfect disappearance of elastic fibers after digestion for 5 hours. $\times 150$
- Fig. 4 The perfect disappearance of elastic fibers after digestion for 8 hours. $\times 150$
- Fig. 5 The fiber in the residue when the sample of goat's skin undigested was boiled with 10% acetic acid. $\times 400$
- Fig. 6 The aggregate of the fiber showed in Fig. 5. $\times 400$
- Fig. 7 The helical coiled unknown fiber stained with Ag. $\times 400$
- Fig. 8 Showing the state that the helicalcoiled fiber was untwisted $\times 400$

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8