不飽和七員環化合物の實驗的および臨床的研究

第30報 Hinokitiol と血清蛋白の結合について

新潟大学医学部桂内科教室 (主任 桂 重鴻教授)

川 上 正, 長谷川 和夫

EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES ON UNSATURATED SEVEN-MEMBERED RING COMPOUNDS THE 30TH REPORT: OBSERVATIONS ON THE BINDING OF HINOKITIOLOL WITH SERUM PROTEIN

BY

Tadashi Kawakami & Kazuo Hasegawa

Department of Internal Medicine, Niigata University

School of Medicine, Niigata

(Prof.: S. Katsura)

Using dialysis and paper electrophoresis we have studied on the binding of Hinokitiol with serum protein.

On dialysis the optimum pH for the binding of Hinokitiol with serum protein was 7.5, and the optimum temperature was 37°C. Hinokitiol added to serum was found to be located in the albumin fraction.

But on the paper electrophoresis, Hi showed no binding with albumin.

This fact suggests us that the binding of Hinokitiol with albumin is unstable.

Hinokitiol (以下 Hi と称する) は1936年に野副教授により発見され、物理化学的性状は野副教授および共同研究者により、また臨床的応用にかんしては桂およびその一門により詳細に研究されている。すなわち臨床的には肺結核症、膿胸、褥瘡、熱帯潰瘍、肺壞疽等に有効であり、とくに試験管内においては諸種細菌、好蠟性菌、レプトスピラ、リケッチア、ビールス等広範囲の微生物にたいし強い発育阻止ならびに殺菌作用を呈する。

しかし真部²⁾によれば Hi は血液、血漿、血清、喀痰、膿等の体液あるいは排出物中に混入された場合に抗菌力の低下を見るが、この現象は Hi と体内成分との結合のみではなく、他の要因も加わ

っているのではないかと言明を避けている。

その後、寺田³⁾は透析法により、Hi がアルブミン (以下 Alb と称する) と結合している事実をつきとめ、真部の報告した現象はこのためと推定した。

なお蛋白は非蛋白物質と結合して比較的安定な化合物を形成するが、いずれの蛋白分層と結合するかは非蛋白物質の種類により異なる。また同一物質で同一条件で行なつても術者により必ずしも同一の成績を示していないものもある^{3) 4) 5) 6)}。

また抗菌剤は体液中で力価の低下を来すことは周知の事実であり、これは蛋白との結合によるものと解する学者もある。したがって近時この事

実を究明するため、種々の抗菌剤および抗生物質と、血清蛋白との結合にかんする研究が行われている。しかしこれらは一般に Alb と結合するものごとくであり、かつ結合の程度は吸着程度の極めて粗なるものから比較的安定なものまで種々である^{6) 7) 8) 9)}。

わたくしどもは濾紙電気泳動法ならびに透析法を用い、Hi と血清蛋白の結合状態を検すべく次の実験を行なった。

実験方法および成績

(1) 至適pH

pH 6, 7, 7.5, 8 の 燐酸緩衝液 10cc に M/10 燐酸緩衝液 (pH 7.5) あるいは、ペロナール緩衝

Fig. 1. Optimum pH for the Binding of Hinokitiol with Serum Protein 8°C, 2 h.

Fig. 2. Optimum Temperature for the Binding of Hinokitiol with Serum Protein pH 7.5, 2h.

Fig. 3. Paper Electrophoresis of Serum containing Hinokitiol.
5 V/cm, 0.2mA/cm, 6~7 h.
Color reaction: Protein...Bromphenol Blue
Hinokitiol...Ferric Ammonium Citrate, Green

液 (pH 8.6) を溶媒とした 0.5% Hi 1 cc, および血清 2 cc を加え、室温 (8°C) 2 時間の条件で作用させ、ついでこれをセロファンバックに入れ、0.85% 生理的食塩水で 4°C に保ち 4 日間透析し、蛋白と結合していない遊離の Hi を駆逐した後、血清中の Hi 濃度を光電比色計により測定した。至適 pH は第 1 図の如く pH 7.5 である。なおこの数値は血液中の Hi 濃度測定法が確立されていないので、血清に 5% 緑色クエン酸鉄アンモン (以下 F.A.C. と称する)¹⁰⁾ を加え呈色せしめ、Hi を加えない血清に F.A.C. を加えたものを盲検として測定したものである。

(2) 至適温度

pH 7.5 で 5°C, 10°C, 25°C, 37°C, 2 時間の条件で他は前述同様の方法で調べたところ第 2 図の如く 37°C が最も結合が大であつた。

(3) 濾紙電気泳動法

血清 2 cc に 0.5% Hi 1 cc を加え、pH 7.5, 37°C, 2 時間の条件で作用させた Hi 加血清を前述の方式で透析し、ついで Carbowax 1500¹¹⁾ で当初

の血清量迄濃縮し、これを東洋濾紙 No.51, ペロナール緩衝液 (pH 8.6, $\mu = 0.1$), 5 v/cm, 0.2 mA/cm, 6~7 時間の条件で水平法により電気泳動を行なつた。

一つは Bromphenol blue(B.P.B.) 染色により蛋白を Alb, α -, β -, γ -グロブリン (以下 Glb と称する) の各分層に分ち、一つは F.A.C. 染色を行なつた。また同時に Hi 単独の泳動も行なつた。

その結果、第 3 図に示す如く Hi と結合する蛋白は γ -Glb と思われる成績であるが、同時に行なつた Hi 単独の泳動距離も γ -Glb のそれに近似しているので、Hi は γ -Glb と結合しているものかどうかを吟味する必要がある。

なお血液型により結合部位に差は認められなかつた。

吟 味

市販 γ -Glb (「ニチャク」ガンマグロブリン) をそのまゝおよび生理的食塩水で透析し、防腐用

Fig. 4. Paper Electrophoresis of Albumin containing Hinokitiol
5V/cm, 0.2mA/cm, 6~7h.
Color reaction: Protein...Bromphenol Blue
Hinokitiol...Ferric Ammonium Citrate, Green

エチル水銀・チオサリチル酸ソーダを除去したものの 172mg に Hi を加え、pH 7.5, 37°C, 2 時間の条件で作用させたのち再び透析を行い、遊離の Hi を駆逐し、その内液について Hi の有無を調べたところ全く認められなかつた。すなわち Hi は γ -Glb と結合しないことを知つた。

つぎに亜硫酸ソーダ塩析法により得られた人血清 Alb および γ -Glb (生理的食塩水で 4°C に保ち、4 日間透析し亜硫酸ソーダを駆逐した) について行なつたところ、Hi は γ -Glb とは結合しないが、Alb とは結合することを知つた。しかし Hi 結合 Alb 溶液を濾紙電気泳動にかけると Hi は Alb と移動をとともにせず、Hi 単独の泳動距離と一致した成績を示した (第 4 図)。

すなわち電気泳動を行うことにより、Hi は Alb から遊離し Hi 単独の行動をなし、従つて Hi 加血清の場合 Hi の泳動距離と同じくする γ -Glb と結合しているかのごとき感を呈したものである。

また Hi 結合 Alb 溶液および Hi 結合血清にブタノールを加え振盪すると、Hi は蛋白より遊離しブタノール層に移行する。

考 案

蛋白と非蛋白性物質との結合には (1) イオン性基相互間の結合 (ion-ion bond), (2) 双極子-双極子結合 (dipole-dipole bond), (3) 無極性基相互間の結合の三つの方式およびこれらの中間型などがあり、比較的安定であるといわれている³⁾。

わたくしどもの行なつた Hi と蛋白の結合は、透析実験では Alb と結合しているが、電気泳動により遊離する。また Hi 結合 Alb 溶液および Hi 結合血清に、ブタノールを加え振盪することにより簡単にブタノール層に移行することなどから Hi と Alb の結合は極めて粗なるものと考えられる。

なお検定菌として枯草菌 MD15 を使い、カップ法および稀釈法で行なつた Hi-Na の抗菌力に及ぼす血液の影響に関する山作の実験¹²⁾では、血清および Alb 量の増加につれ Hi-Na の抗菌力は次第に低下したが、これとわたくしどもの実験成績との関係を案ずるに、抗菌力の低下は蛋白との

結合によつて起ることも考えられるが、Hi の結合は粗で可逆的のものであるから、むしろ細菌の栄養源となる蛋白の存在を考えた方が妥当であろう。もちろん生体内における Hi の態度と人工的結合を同一に論ずることは出来ないので、これは今後の研究にまたねばならない。

結 語

Hi は試験管内実験では Alb と結合し、しかも極めて不安定な状態にある。しかし生体内では如何なる形で存在するかは今後の研究にまたねばならぬ。

文 献

- 1) 真部雅：新潟医学会雑誌，67，27（昭和28年）。
- 2) 桂重鴻・他：日本内科学会雑誌，43，124，（昭和29年）。
- 3) Felix Haurowitz（広田猛夫訳）：生物物理化学の領域における蛋白，昭和27年10月1日，本田書店発行。
- 4) 佐橋佳一・他：ビタミン，7，921（1957）。
- 5) Pitney, W.R. et al.: J. Biol. Chem. 207, 143（1954）。
- 6) 齊藤達郎：ペニシリン，3，709（1950）。
- 7) 牛場大蔵・他：Chemotherapy 3, 87（1955）。
- 8) 緒方幸雄・他：Chemotherapy 4, 125（1956）。
- 9) 真下啓明・他：Chemotherapy 4, 126（1956）。
- 10) 寺田一郎：新潟医学会雑誌，66，546（昭和27年）。
- 11) 新井賢治：生物物理化学，3, 56（1956）。
- 12) 山作房之輔：新潟医学会雑誌，71，1261（昭和32年）。