The results can be summarized as follows.

- (1) Psoralene was identified by means of the ultraviolet absorption and chemical analysis.
- (2) On fractional distillation several substances have been isolated. Some of them were characterized as decomposed compounds of psoralene from the results of the ultraviolet absorption.

水産動物磷脂質に関する研究 (第1報)

アブラツノザメの卵レシチンについて

五十嵐久尙, 座間 宏一, 片田 宗男 (北海道大学水産学部水産化学教室)

昭和 30 年 2 月 28 日 受理

Studies on the Phosphatide of Aquatic Animals. Part 1. On the
Egg Lecithines of Shark (*Squalus sucklii* (GIRARD)).

By Hisanao IGARASHI, Kôichi ZAMA and Muneo KATADA (Faculty
of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

鰐卵黄レシチンに関しては古くから多くの研究者によつて報告されているが、他動物の卵のレシチンに関するものは少ない。なかんずく魚類の卵レシチンについては僅かに、横山、鈴木⁽¹⁾の数の子レシチン及び阿武⁽²⁾の鮭卵レシチンに関する研究があるのみである。著者等は水産動物植物磷脂質の系統的な検索を行うに当り、先ず軟骨魚類であるアブラツノザメ (*Squalus sucklii* (GIRARD)) の卵黄レシチンを、概ね M. C. PANGBORN⁽³⁾により報告された簡便法に従つて分離し、その性状を検索した結果をここに報告する。

実 験 の 部

(1) レシチンの調製

試料として 1954 年 1 月 10 日、北海道恵山沖にて漁獲されたアブラツノザメの卵を用いた。新鮮な卵黄約 60 箇を圧搾、卵膜を除去し、内容物 1630 g を得た。これにアセトン 4 l を加え、2 日間放置後吸引濾別し、残渣に更にアセトン 2 l を加えて時々振盪しつつ 1 昼夜浸出、この操作を計 5 回繰返す。得た残渣を真空デシケーター中で乾燥し、卵黄粉末約 850 g を得た。この卵黄粉末を 95% エタノール 2 l で 30 分間振盪抽出、抽出を更に数回繰返して得た抽出液を合し、この抽出液に沈澱のものはや生じなくなるまで、50% 塩化カドミウム水溶液を加え、レシチンと塩化カドミウムの複塩を生成せしめ、氷室中に 1 夜放置し吸引濾別、複塩 135 g を得た。このものを 300 cc のクロロホルムに溶解し、30 cc の 50% 塩化カドミウム水溶液を含むエタノール 2 l 中に注ぎ込み、室温に 10 分間放置後吸引濾別して沈澱を得た。この操作を更に 2 回繰返してレシチン塩化カドミウム複塩の精製を行つた。かくして精製した複塩を 500 cc の石油エーテルに懸濁し、2.5 倍容の 80% エタノール (0.1% の塩化カドミウムを含み、予め石油エーテルで飽和したもの) と共に数回振盪して、同複塩を 80% エタノール層に転溶せしめた。エタノール溶液は 40° 以下にて 2/3 容まで濃縮、寒剤中に 1 夜放置後吸引濾別し、純白なレシチン塩化カドミウム複塩 86 g (湿量) を得た。

次に塩化カドミウムを除去するために、この複塩を 400 cc のクロロホルムに溶解し、等容の 30% エタノールと 5 分間激しく振盪、この操作を数回繰返して塩化カドミウムを完全に除去し、クロロホルム溶液は減圧濃縮乾固、かくして得られた残渣を 200 cc のアセトンと激しく振盪してアセトン可溶物を除き、更に残渣に含まれたアセトンを完全に除いた後 500 cc の乾燥エーテルに溶解、100 cc の無水アセトンを加えて氷室中に 1 夜保ち、析出物を遠沈除去した後、溶媒を減圧溜去し、残留するレシチンを数倍容の無水エタノールに溶解、不溶物を遠沈除去後、エタノールを減圧溜去し精製レシチンを得た。収量 43.6 g。

分析結果 N 1.79% (Micro-KJELDAHL 法) P 3.89% (BERENBLUM-CHAIN 法⁽⁴⁾)

N : P = 1.01 : 1

沃素価 (WIJS) 99.6

(2) レシチン加水分解物の検索

(i) グリセロ磷酸バリウム : レシチン 1.7 g を 1.5% 水酸化バリウム水溶液 120 cc 中に懸濁し、沸騰水浴上で 4 時間加水分解して、放冷後析出する脂肪酸バリウム塩を濾去し、濾液に炭酸ガスを通じ過剰のバリウムを除き、脱色炭処理後減圧下で濃縮、2 倍量の無水アルコールを加え、グリセロ磷酸バリウムを沈澱せしめた。

収量 0.4 g. この沈澱を少量の水に溶解した後無水アルコールを加え再沈澱すること数回にして、純白なグリセロリン酸バリウム 0.3 g を得た. 分析値 $C_3H_7O_6P\text{Ba}$ 計算値: P 10.10, Ba 44.69. 実験値: P 10.09, Ba 44.64.

(ii) コリン C. LEVINE-E. CHARGAFF⁽⁵⁾ の方法に従い検出, 定量を行つた. 即ちレシチンを 6 N 塩酸で 48 時間 100° で加水分解し, 分解液を pH 1 に調整し, 東洋濾紙 No. 50 を用い, *n*-ブタノール-ジエチレングリコール-水 (4:1:1) を展開剤として上昇法によりペーパークロマトグラフィを行つた. 発色剤としては 2.0% 磷モリブデン酸水溶液, 次いで 0.4% 塩化第一錫 3 N 塩酸溶液を用いた. 試料の R_F 値は用いた標準塩化コリンの $R_F=0.41$ と一致した. かくして得られたスポットの面積を測定し, 標準試料のスポットの面積から求めた標準曲線よりコリン量を決定した. 定量値は, レシチン 0.1287 g の加水分解物を 5 cc に稀釈したものの 0.01 cc 中に 37.6 γ を含み, これを換算すると 14.67% を含むことになる. Total N: Choline=1:0.95

(3) レシチン構成脂肪酸の検索

レシチン 35.0 g をアルコール性苛性カリで鹼化し, 混合脂肪酸 (中和価 203.1, 沃素価 153.8) 21.3 g を得た. このものを鉛塩アルコール法で固体及び液体脂肪酸に分別し, 後者を更にリチウム塩アセトン法により低度不飽和酸と高度不飽和酸に分別して Table 1 の結果を得た.

(i) 固体脂肪酸: 上記固体脂肪酸を常法によりメチルエステル (鹼化価 201.3, 沃素価 21.9) となし, その 8.2 g を分溜して Table 2 の結果を得た.

溜分 S-1 より得た脂肪酸をエタノールより再結晶し, 融点 62.1°, 中和価 219.1 なる脂肪酸を得た. このものはパルミチン酸 (融点 62.9°, 理論中和価 218.8) に該当する.

パルミチン酸及びステアリン酸を除いた部分より, 再結晶により融点 53.5~54.0°, 中和価 232.9 の脂肪酸を得たが, 微量のため精製不可能であつた. しかし

この値よりミリスチン酸の存在が推定される. 溜分 S-2 より得た脂肪酸をエタノールより再結晶, 融点 68.9°, 中和価 198.0 の脂肪酸を得た. このものはステアリン酸 (融点 69.6°, 理論中和価 197.2) に該当する.

(ii) 低度不飽和脂肪酸

前記の低度不飽和酸をメチルエステル (鹼化価 189.6, 沃素価 128.6) となし, この 2.8 g を分溜して Table 3 の結果を得た.

LU-2 より得た脂肪酸をリチ

ウム塩となし, 50%エタノールで処理, 不溶性のリチウム塩より中和価 198.0, 沃素価 87.2 の脂肪酸を分離, その HAZURA 酸化による生成物を石油エーテル, エタノールより再結晶し, 融点 133.5°, 中和価 176.2 なる脂肪酸を得た. 該酸はジオキシステアリン酸 (融点 136.5°, 理論中和価 177.4) に相当する.

それ故原脂肪酸はその中和価及び沃素価より, 主としてオレイン酸 (理論中和価 198.8, 理論沃素価 88.9) よりなるものと考えられる.

Table 1. Fractionation of the Mixed Fatty Acids.

Fatty Acid	Yield		Neutr. Value	Iodine Value (WtIs)
	g	%		
Solid	9.5	51.6	211.5	24.1
Lowly unsaturated	3.3	17.9	199.2	140.1
Highly unsaturated	5.6	30.5	186.7	349.0

Table 2. Fractional Distillation of the Solid Fatty Acid Methyl Ester.

Fraction	Boiling Point °C/10 mm-Hg	Yield		Sapon. Value	Iodine Value (WtIs)
		g	%		
S-1	~165	5.4	65.9	208.0	6.0
S-2	178~185	1.7	20.7	188.7	26.5
S-3	180~	0.5	6.1	187.5	52.9
Residue	—	0.6	7.3	154.3	90.0

* Boiling point at 4 mm-Hg.

Table 3. Fractional Distillation of the Lowly Unsaturated Fatty Acid Methyl Ester.

Fraction	Boiling Point °C/2 mm-Hg	Yield		Sapon. Value	Iodine Value (WtIs)	Refractive Index (n_D^{20})
		g	%			
LU-1	~155	0.3	10.7	192.2	82.7	1.4520
LU-2	155~160	1.4	50.0	189.7	112.3	1.4548
LU-3	160~165	0.5	17.9	187.5	143.5	1.4606
LU-4	165~	0.3	10.7	185.9	191.5	1.4695
Residue	—	0.3	10.7	180.3	160.7	1.4927

Table 4. Fractional Distillation of the Highly Unsaturated Fatty Acid Methyl Ester.

Fraction	Boiling Point °C/1 mm-Hg	Yield		Sapon. Value	Iodine Value (WtIs)	Refractive Index (n_D^{20})
		g	%			
HU-1	~192	1.1	21.1	190.9	262.1	1.4752
HU-2	198~200	1.7	32.7	177.5	315.6	1.4807
HU-3	200~205	0.5	9.6	170.3	338.3	1.4886
HU-4	205~	1.2	23.1	164.9	362.1	1.4930
Residue	—	0.7	13.5	130.1	237.5	1.5005

(iii) 高度不飽和脂肪酸：前記高度不飽和酸をメチルエステル（鹼化価 176.5, 沃素化 328.9）となし、この 5.2 g を分溜して Table 4 の結果を得た。

溜分 HU-1 より中和価 199.9, 沃素価 280.1 の脂肪酸を得た。この脂肪酸をエーテル溶液中で臭素化し、融点 175.5°, 臭素含量 63.99% のエーテル不溶性臭化物を得た。これはリノレン酸 6 臭化物（理論臭素含量 63.28%）と考えられ、原脂肪酸の中和価及び沃素価からこの溜分はリノレン酸（理論中和価 201.7, 理論沃素価 273.7）が大部分を占めるものと推定される。

溜分 HU-2 より中和価 185.7, 沃素価 330.1 の脂肪酸を得た。これを臭素化し、融点 221.9°, 臭素含量 67.01% なるエーテル不溶性臭化物を得た。これはアラキドン酸と考えられる $C_{20}H_{32}O_2$ の 8 臭化物（理論臭素含量 67.76%）で、原脂肪酸は中和価及び沃素価より大部分 $C_{20}H_{32}O_2$ （理論中和価 184.4, 理論沃素価 333.7）よりなると考えられる。

溜分 HU-4 より中和価 170.5, 沃素価 377.0 の脂肪酸を得た。この脂肪酸を臭素化し、235~233°で黒変し、臭素含量 69.92% のエーテル不溶性臭化物を得た。これは恐らくは鯊酸と思われる $C_{22}H_{34}O_2$ の 10 臭化物（理論臭素含量 70.76%）で原脂肪酸は中和価及び沃素価より、大部分 $C_{22}H_{34}O_2$ （理論中和価 169.8, 理論沃素価 384.2）よりなるものと考えられる。

考 察

レシチン構成脂肪酸の検索の結果、パルミチン酸、オレイン酸、リノレン酸、アラキドン酸と考えられる $C_{20}H_{32}O_2$, 鯊酸と考えられる $C_{22}H_{34}O_2$, 及び微量のミリスチン酸の存在が知られたが、これら以外の脂肪酸が構成脂肪酸として存在しないものとして、分溜区分毎に鹼化価と沃素価とよりその組成を概算することによって大約の組成を考察した。又著者等は同時に、鯊卵のアセトン抽出物より得た非磷脂質部脂肪物質（大部分がグリセ

Table 5. The Composition of the Component Fatty Acids of Glycerides and Lecithines of Shark Egg. (wt. in per cent)

Acids	Glycerides (6)	Lecithines
Myristic	3	small quant.
Palmitic	10	34
Stearic	7	10
Arachidic	4	—
Zoomaric	13	—
Oleic	21	20
Eicosenoic	10	—
Docosenoic	5	—
Linolenic	5	10
Eicosatetraenoic or Arachidonic	10	13
Clupanodonic	10	13
Tetracosapentaenoic	small quant.	—

リン=1:0.95 であつた。

レシチン構成脂肪酸として、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノレン酸、 $C_{20}H_{32}O_2$, $C_{22}H_{34}O_2$ が得られ、少量のミリスチン酸の存在を推測し、且つこれらの定量的考察を行うと共に、その組成が卵油脂肪の中で占める特定の脂肪酸から成立つていることを認めた。

試料を分譲された函館水産物株式会社黒川寛氏に厚く感謝の意を表する。又本研究は文部省科学研究助成補助金の交付を受けたものである。

- (1) 横山, 鈴木: *P. I. A. Japan*, 8, 183 (1932).
- (2) 阿武: 農化, 23, 162 (1949).
- (3) M. C. PANGBORN: *J. Biol. Chem.*, 188, 471 (1951).
- (4) I. BERENBLUM and E. CHAIN: *Biochem. J.*, 32, 295 (1938).

ライドを考えられる) の構成脂肪酸を検索し、定量的考察を行つた結果⁽⁶⁾と比較すると Table 5 の如くである。これは RIEMENSCHNEIDER⁽⁷⁾が鶏卵のグリセライド及び磷脂質について得た結果と幾分相似した傾向が見られ、レシチン構成脂肪酸は非磷脂質部脂肪の構成脂肪酸と同一ではなく、その中で幾らかの特定のものから成立つており、且つ高度不飽和脂肪酸が比較的多いという傾向を認めた。

総 括

アブラツノザメ卵よりレシチンを抽出、精製し、その加水分解物よりグリセロ磷酸を得、またコリンを定量した。レシチンは、沃素価 99.6, N 1.79%, P 3.89%, コリン 14.67%, N P=1.06 1, N: コ

- (5) C. LEVINE and E. CHARGAFF: *J. Biol. Chem.*, 192, 465 (1951).
- (6) 座間, 片田, 五十嵐: 日水誌, 21, 5 号 (1955).
- (7) R. W. RIEMENSCHNEIDER, N. R. ELLIS, and H. W. TITUS: *J. Biol. Chem.*, 126, 255 (1938).

Summary

1. Purified lecithines were obtained from the egg of shark (*Squalus sucklii* (GIRARD)). From the hydrolysate of the lecithine, glycerophosphoric acid and choline were identified.

The following characteristics of the lecithines were found; Iodine value 99.6, N 1.79%, P 3.89%, choline 14.67%, N : P = 1.01 : 1, N : Choline = 1 : 0.95.

2. The composition of the component fatty acids of the lecithines was found to be approximately as follows; palmitic acid 34%, stearic acid 9%, oleic acid 18%, linolenic acid 9%, $C_{20}H_{32}O_2$ 13%, $C_{22}H_{34}O_2$ 13%, and a small quantity of myristic acid.

血清による牛乳凝固酵素の阻害について

(牛乳凝固酵素に関する研究 IV)

津郷友吉, 山内邦男 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 29 年 12 月 1 日 受理

Inhibition of Milk Coagulating Enzymes by Blood Serum

(Studies on Milk Coagulating Enzymes IV)

By Tomokichi TSUGŌ and Kunio YAMAUCHI (Dept. of Agr.

Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

血清中に牛乳のレンニン凝固阻害物質が存在することは古くより知られているが⁽¹⁻⁴⁾, その作用についてはなお判然としない点が多い。FULD 等によれば⁽²⁾ それが血清中のブソイドグロブリンによるものといわれているが, その後これらの点に関し新しい知見はない。唯近年前野ら⁽⁶⁾が硫酸によるグロブリン沈澱除去後の濾液には抑制作用が殆んど失われ, アルブミン除去後は全く失われることを確認している。またその抑制作用については, レンニンそのものを不活性にするのか, 又は牛乳中のカゼインに対する保護膠質的な作用によるものか不明であるが, TAUBER⁽⁴⁾は前者の見解を, 前野ら⁽⁶⁾はむしろ後者の見解をとつているようである。又守山⁽⁵⁾によれば特にレンネットを抗原として得られた抗血清について, レンネットとの間に定量的な関係があるという。しかし動物によつては正常血清に既に強い抑制力が存在するのが常で, その本体は不明である。

著者等は動物臓器その他から凝乳酵素検索の途路, この血清によるレンニン凝固阻害作用 (以下アンチレンニン作用と呼ぶ) を確認したので, 主に正常馬血清を用いてその作用を更に細かく検討した。

実験材料及び方法

用いた血清は屠場において放血の際に採取した血液から遠心分離により血餅を除いたもので, 特に断りなき場合は馬血清である。抑制作用は次の如くして測定した。即ち全粉乳 12g を水に溶かし 1N の乳酸又は NaOH 溶液で酸度 2.0 cc に調整し 100 cc にしたものを 5 cc とり, 生理的食塩水で適当に稀釈した血清 0.2 cc 及びレンネット稀釈液 0.5 cc を加え, 35° で凝固時間を測定し対照と比較した。対照は血清の代りに 0.2 cc の生理的食塩水を加えた。使用したレンネット粉末は食塩塩析法により調製したもので⁽⁷⁾, 対照の凝固時間が 5 分内外となるように稀釈して用いた。このような条件では, 肉眼的に観察して凝固が開始してから完了するまでには 30 秒前後の時間を要するが, ここでは凝固時間として酵素液を添加してから凝固の開始するまでの時間をとり, 10 秒単位で表現した。

実験の成績

1. 各種動物血清のアンチレンニン作用の比較

各種動物血清のアンチレンニン作用を比較すると, 個体によつても若干の変動がみられるが, 一般に馬, 豚の血清は抑制作用大で, 牛, 兎, 人のものは微弱であった。各 1 例ずつを Table 1 に示した。

2. 貯蔵中における変化 アンチレンニン力は貯蔵中も比較的安定で冷蔵保存 (5°) した場合, 半月以

Table 1. Comparison of Antirennin Activities by Sera of Various Animals.

Animal	Control	Clotting time Serum added (15 times diluted)	
Cow	4' 20"	4' 50"	(5 times diluted) 6' 30"
Horse	"	12' 30"	
Pig	"	20'	
Rabbit	"	4' 20"	(not diluted) 7'
Man	6'	6' 30"	(") 8'

Mixture contains 5 cc of milk, 0.2 cc of diluted serum or saline solution (control), and 0.5 cc of enzyme solution. Clotting time is measured at 35°.