Rivanol によるコンドロイチン硫酸改良比濁定量法

中 嶋 昭 正

(1968 年 1 月 26 日受理)

A Modified Turbidimetric Method for Determination of
Chondroitin Sulfate with Rivanol

Akimasa NAKASHIMA*

The turbidimetric method for determination of chondroitin sulfate (CSA) with rivanol has been proposed by NÉMETH-CSÓKA. When CSA in the extracts of the whale nasal cartilage with 5% Na_2CO_3 was determined by this original method, the values were lower than those obtained by carbazol method (Table 2). In this paper, the cause was elucidated and the author established a modified method.

Chondromucoprotein (CMP), in which CSA is combined with "protein core" and therefore could be regarded as "combined CSA", was prepared from the whale nasal cartilage by water extraction and "free CSA" from CMP. It was found that rivanol turbidity produced with "combined CSA" was much lower than that produced with "free CSA" (Fig. 1). As it is known that CMP is easily degraded into CSA and "protein core" by alkali treatment, the effect of NaOH treatment of CMP on rivanol turbidity was examined (Fig. 2).

As the results, in determining CSA in CMP by rivanol turbidity method, it is necessary to treat the sample with 1% NaOH for 3 hours at 25°C for degradation of CMP, as a pre-treatment. Determination of CSA in mixtures of "free CSA" and "combined CSA", which were prepared from CSA and CMP, by this modified rivanol method gave a satisfactory result (Table 3).

コンドロイチン硫酸 (CSA) の比濁定量法として, CSA 溶液に cetyltrimethylammonium chloride¹⁾, hexaminecobaltic chloride²⁾, rivanol³⁾ などを加えて生ずる濁度を測定する方法がある。著者はクジラ鼻軟骨からの CSA の抽出条件について検討中, NÉMETH-CSÓKA の rivanol による比濁定量原法⁴⁾を適用したところ, 抽出条件によつては DISCHE のカルバゾール法 (ウロン酸定量法)⁴⁾ による CSA 定量値よりも著しく低い値を示すことを見出したので, この原因について検討し, CSA が蛋白と結合している場合には, NaOH 前処理が必要であることを知り, rivanol 比濁定量法を結合 CSA の定量にも適用しうるように改良した。

実 験 方 法

改良定量法 検液に 10% NaOH を加えて NaOH 濃度を 1% とし, 25°C で 3 時間分解を行なう。中和後 rivanol 比濁原法³⁾ に従つて CSA を標準物質として CSA を定量する。すなわち, 10 ml の 0.1 M 酢酸—0.1 M クエン酸—0.067 M 塩化ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を注入した共栓試験管に 0.2 ml の前処理した検液ないしは標準液と 0.2 ml の 0.1 M の rivanol とを加え, 2~4 回静かに倒置し, 5 分後に生ずる濁度を光電光度計 (日立 EPO-B 型) で No. 53 のフィルターを用い測定する。

Chondromucoprotein (CMP) の調製 CMP の抽出は MALAWISTA ら⁵⁾の方法にもとづいた PARTRIDGE ら⁶⁾の方法に従つた。すなわち, 200 g の凍結クジラ鼻軟骨を細切し, その 10 g ずつを 300 ml の蒸溜水

* 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan).
玄洋工業株式会社 (Genyo Kogyo Co., Ltd., 1784, Tatara, Fukuoka, Japan).

(2°C) と 5 分間ホモジェナイズした。懸濁液は 2°C まで冷却した後、同一操作をさらに 4 回反復した。遠心分離後上澄液を合し、2 倍容量のエタノールを加え、200 g のセライトを混合後濾過し、濾液に 200 g の酢酸ナトリウムを加えて生ずる沈澱を常法により乾燥した (収量 6.6 g)。得られた粗 CMP (ハイドロキシプロリン含量 0.18%) を PARTRIDGE ら⁷⁾ の方法で精製した。すなわち、6.6 g の粗 CMP を 600 ml の 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、あらかじめバッファライズした 6 g の IRC-50 を加え、3 時間の攪拌後遠心分離し、さらにこの処理操作を反復し、セライト濾過後、濾液に 12 g の酢酸ナトリウムおよび 2 倍容量のエタノールを加えて生ずる沈澱を常法により乾燥した (収量 3.4 g)。得られた精製 CMP の分析値を Table 1 に示した。

CSA の調製 1.0 g の精製 CMP を 30 ml の 1% NaOH に溶解し、25°C で 48 時間放置した。中和、透析後 pH 3.0 で 3% の酸性白土で 2 回処理し、さらに Dowex 50 W-X 1 (H 型) に通した後中和し、1% の酢酸ナトリウムおよび 2.5 倍容量のエタノールを加えて生ずる沈澱を常法により乾燥して CSA を得た (収量 0.5 g)。その分析値を Table 1 に示した。

Table 1. Analytical data of CMP and CSA (%).

	N*	S*	Hexosamine*	Uronic acid*	Hexose*	Hydroxyproline**	Protein***
CMP	4.31	4.60	26.0	26.5	5.04	<0.06	20.0
CSA	2.30	6.15	32.0	37.5	2.44	0	0

Preparations were determined after drying in Abderhalden-apparatus (2 mm Hg, 64°C, 9 hours).

* By the methods reported in the previous paper⁸⁾.

** By Onizuka's method⁹⁾.

*** By the method of Lowry *et al*¹⁰⁾.

結果および考察

Rivanol 比濁原法とカルバゾール法とによるクジラ鼻軟骨抽出液の CSA 定量値の比較 100 g の細碎クジラ鼻軟骨から 1 l の 5% Na₂CO₃ で 20°C にて攪拌しながら CSA を抽出し、一定時間毎に抽出液をとり、遠心分離後その上澄液を中和、10 倍稀釈し、rivanol 比濁原法とカルバゾール法⁵⁾ とで CSA を標準物質として CSA 定量を行なった。その結果を Table 2 に示した。rivanol 比濁原法による定量値はカルバゾール法とほぼ一致した。

Table 2. Comparison of determined values of CSA in 5% Na₂CO₃ extracts of whale nasal cartilage at various extraction times by original and modified rivanol method and carbazol method.

Extraction time (hours)	Determined value of CSA (mg/ml)		
	Original rivanol method	Carbazol method	Modified rivanol method
0.5	0.55	1.3	1.1
1	0.70	1.7	1.6
3	1.3	2.3	2.3
6	1.8	3.2	3.4
9	2.3	3.8	3.9
24	4.3	5.1	5.4
48	5.8	6.3	6.2

ール法によるよりもかなり低く、とくに抽出時間の短いほど低い傾向が認められた。また、5% Na_2CO_3 の代りに、水で細砕軟骨から抽出すると、rivanol 比濁原法による CSA 定量値はカルバゾール法によるものの 1/2 以下であり、抽出時間に関係なくその比はほぼ一定であつた。ところが、細砕軟骨から 1% NaOH , 25°C で抽出した場合 3 時間以後では、rivanol 比濁原法による CSA 定量値はカルバゾール法によるものとほぼ等しくなつた。CSA は軟骨内で非コラーゲン性の“protein core”にその数十分子が結合した CMP として存在するといわれる⁶⁾。軟骨からの CSA の抽出に際し、抽出条件によつては、CSA は結合 CSA の形で抽出されることもあり得る。この結合 CSA すなわち CMP 中の CSA と遊離 CSA との rivanol によつて生ずる濁度が異なるために、抽出条件によつてカルバゾール法による定量値と差が生ずると考えられる。

遊離 CSA と結合 CSA との rivanol 濁度の相違 遊離 CSA、結合 CSA の濃度と rivanol によつて生ずる濁度との関係を Fig. 1 に示した。結合 CSA の濁度曲線は CMP の rivanol 濁度を基礎としたもので、CMP は 20% の蛋白を含んでいるので、80% を CSA とみなし CSA 量あたりに換算してプロットした。その結果、結合 CSA は遊離 CSA に比べて約 1/2 の rivanol 濁度を示した。また、CMP からブローナーゼ分解によつて調製した CSA でも標品の CSA とほぼ同一の rivanol 濁度を示した。かくして、CMP 中の結合 CSA の rivanol 濁度と遊離 CSA のそれと大差があることが明らかになった。

CMP の NaOH 前処理条件の決定 結合 CSA の rivanol 濁度は遊離の CSA のそれより低いの

Fig. 1. Difference between rivanol turbidity produced with “free CSA” and that produced with “combined CSA” in various concentrations. The turbidity produced with 1 mg/ml of CMP was plotted as that produced with 0.8 mg/ml of “combined CSA”, because 20% of CMP is protein (Table 1).

Fig. 2. Effect of NaOH treatment of CMP on rivanol turbidity. 5% CMP solution was used.

Table 3. Determination of CSA in “free CSA”—“combined CSA” mixtures by original and modified rivanol method.

Mixture taken (mg/100 ml)		CSA found (mg/100 ml)	
Free CSA	Combined CSA	Original method	Modified method
200	0	200	202
160	40	182	202
100	100	140	210
40	160	118	206
0	200	96	204

で, rivanol 比濁法により CMP 中の CSA を定量するには CSA を遊離させることが必要である。CSA と“protein core”の結合はアルカリにより容易に切断されることが認められているので^{6,7)}, この分解条件を検討した。すなわち, 1% CMP 溶液に NaOH を加えて 1% NaOH 溶液および 0.4% NaOH 溶液とし, 25°C に放置し, 一定時間毎にその一部を採取し, 中和, 10 倍稀釈後 rivanol 濁度を測定し, その結果を Fig. 2 に示した。1% NaOH, 0.4% NaOH とともに 3 時間で最高に達し, その後 48 時間まではほぼ一定であつたので, 1% NaOH, 25°C, 3 時間処理を最適の前処理操作と認めた。

CSA と CMP を用い, 遊離 CSA と結合 CSA との混合溶液を調製し, 上記 NaOH 分解条件での前処理操作を加えた rivanol 比濁改良法および原法で CSA を定量したところ, Table 3 の満足しうる結果を得た。また, クジラ鼻軟骨の 5% Na_2CO_3 抽出において, 抽出液中の CSA を rivanol 比濁改良法で定量すると Table 2 に示したようにカルバゾール法とほぼ一致した。DISCHE のカルバゾール法による CSA の定量は構成成分であるウロン酸の定量に基づくが, 本改良法は CSA そのものを定量し得る簡易な方法である。

要 約

1. NÉMETH-CSÓKA の rivanol 比濁原法によつて, 軟骨の 5% Na_2CO_3 抽出液中の CSA を定量したところ, カルバゾール法による定量値よりも著しく低い値を示すことを見出した。
2. CMP 中の CSA すなわち結合 CSA の rivanol による濁度は遊離 CSA のそれより著しく低い。
3. 1% NaOH, 25°C, 3 時間の前処理操作を加えることによつて, 結合 CSA が混在する場合でも, rivanol 比濁法で CSA の定量が出来る。

本研究を行なうに当り, 終始懇切な御指導と御鞭撻とを賜つた恩師富安行雄先生ならびに豊水正道先生に謹んで謝意を表し, また実験に協力された大櫛富美子嬢に感謝する。

文 献

- 1) N. DI FERRANTE: *J. Biol. Chem.*, **220**, 303~306 (1956).
- 2) G. WEISSMANN, J. L. POTTER, R. T. MCCLUSKEY, and M. SCHUBERT: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **102**, 584~587 (1959).
- 3) M. NÉMETH-CSÓKA: *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 585~588 (1961).
- 4) Z. DISCHE: *J. Biol. Chem.*, **167**, 189~198 (1947).
- 5) I. MALAWISTA and M. SCHUBERT: *J. Biol. Chem.*, **230**, 535~544 (1958).
- 6) S. M. PARTRIDGE, H. F. DAVIS, and G. S. ADAIR: *Biochem. J.*, **79**, 15~26 (1961).
- 7) S. M. PARTRIDGE and H. F. DAVIS: *Biochem. J.*, **68**, 298~305 (1958).
- 8) 中嶋昭正・田中晴夫: 本誌, **32**, 1054~1058 (1966).
- 9) 鬼塚卓弥: 生化学, **32**, 857~863 (1960).
- 10) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275 (1951).