このペーパークロマトグラムから Ullmann 反応によつて得た非フェノール性塩基混合物には原料ブrom化合物 (XI) の他にそれよりも小さい Rf 値を示す fraction の存在することを知つた. ここに於いて上に得た非フェノール性塩基混合物を少量の無水ベンゼンに溶解し, 同じベンゼンを展開溶媒として Brockmann アルミナ (Merck) を用いてクロマトグラフィーを行つた. 先ず最初の部分から 1-(4-bromobenzyl)-2-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (XI) の Rf 値に相当する Rf 値を示す黄色油状物質約 30mg を得, 次いで第 1 及び第 2 の 2 種の spot を示す混合物約 170mg を得, 更に展開溶媒をベンゼンに少量の MeOH を加えた混液として第 2 の spot のみを示す部分を約 110mg 帯褐色油状物質として得.

第 1 の spot を示す部分は Beilstein test 陽性でハロゲン含有を示し, その picrate は再結晶すると mp 183~184° (decomp) で原料に用いた 1-(4-bromobenzyl)-2-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (XI) picrate と混融しても融点の降下を示さず回収塩基と考えられる.

第 2 の spot を示す部分も種々の溶媒と処理を行つたが結晶化させることが出来なかつた. この遊離塩基を MeOH に溶解し修酸を加えて溶解させ, Me₂CO を加えて析出する白色沈澱を濾取する. mp 120~128°. これを MeOH·Me₂CO から, 更に MeOH から再結晶数回を繰返えし, 真空中 P₂O₅ 上で 90° に加熱乾燥を長時間続けると mp 205° (decomp) になる. 無色微針状晶. C₃₈H₄₄O₆N₂·2(COOH)₂·H₂O. 計算値 C 62.52, H 6.25, 実験値 C 62.19, H 6.44 (文献⁸⁾ C₃₈H₄₄O₆N₂·2(COOH)₂·2H₂O mp 164° (decomp)).

またこの修酸塩から遊離させた塩基に MeOH 溶液中 styphnic acid をほぼ対応量加えて得る黄色沈澱を MeOH から再結晶し黄色小プリズム晶を得. mp 144~147° (decomp). C₃₈H₄₄O₆N₂·2(C₆H₃O₆N₃). 計算値 C 54.64, H 4.59, 実験値 C 54.73, H 4.88.

京都大学医学部薬学科

UDC 577.173.7

249. 石原義雄, 藤野政彦, 伊藤裕三, 斎藤恒行: 鯨膵臓中の血糖低下持続性物質に就いて

Yoshio Ishihara, Masahiko Fujino, Yasuzo Ito, and Tsuneyuki Saito:

Studies on the Protein in Whale Pancreas showing a Prolonged Hypoglycemic Effect.

(Fisheries Chemistry Department, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

During the purification of whale insulin, a substance was obtained by fractional precipitation at pH 5.9 and acetone concentration of 40%. This substance effected a lasting hypoglycemia and this effect was found to be caused by mixing of insulin and a special protein in the pancreas. The protein itself had no physiological action and only conferred lasting properties on being mixed with insulin, but no such activity was found in other protein fractions of the pancreas. The protein fraction in question may have some physiological activities. Animal test with rabbits indicated that this fraction can be used clinically.

(Received April 21, 1958)

インシュリンの皮下注射による血糖低下作用は一過性であり糖尿病の治療の目的にその作用を持続させようとの研究は多く試みられ, Hagedorn 等¹⁾ によるプロタミン・インシュリン, Reiner 等²⁾ のグロビン・インシュリン, Scott 等³⁾ のプロタミン・亜鉛・インシュリン, 更に Hallas-Møller 等⁴⁾ の Lente インシュリン (インシュリン亜鉛塩) などが一応その目的を達している. しかしその後も多くの研究者により自然な生理条件に於けるインシュリンの作用の持続化が試みられ, 最近 Mirsky, Perisutt⁵⁾ の insulinase-inhibitor 系の研究が一応

* Minato-machi, Hakodate, Hokkaido.

- 1) H. C. Hagedorn, B. N. Jensen, N. B. Krarup: J. Am. Med. Assoc. **106**, 177 (1936).
- 2) L. Reiner, D. S. Searle, E. H. Lang: J. Pharm. Exptl. Therap. **67**, 330 (1939).
- 3) D. A. Scott, A. M. Fisher: Ibid. **58**, 78 (1936).
- 4) K. Hallas-Møller, K. Peterson, J. Schlichtkrull: Science **116**, 394 (1952).
- 5) I. A. Mirsky, G. Perisutt: Ibid. **122**, 559 (1955).

その効果を示している。著者等⁶⁾は先に鯨インシュリンに就いて各種調製法の比較検討を行い柴田⁷⁾の亜鉛添加法の優れている点を認め更に結晶化を行つた際、アセトン濃度 40%, pH 5.9~6.0 で沈殿する物質のある事を知りその生理作用を観察したところインシュリンとは異なる型の長期低血糖を示したので、更にこの物質を検討し、この作用がインシュリンと脾臓中の或る種蛋白質との共存により惹起する事、またこれがインシュリン調製法の相異により粗製インシュリン中に混入して来る事を認めた。インシュリン製造の際本物質を利用する時は取量を増し、且つ低血糖持続性附加の利点が見込まれるので極めて有利と考える。

本実験に当り試料の一部は大洋漁業横須賀工場製鯨インシュリンを用いた。供与された柴田啓夫博士に厚く謝意を表す。

実 験 の 部

粗製鯨インシュリンより血糖低下持続性物質 (C-物質) の分離並びにその性質 1mg 当り 10 単位の粗製イワシ鯨インシュリン (前報⁶⁾ に於ける亜鉛添加法⁷⁾ により調製) を 10 倍量の AcOH 溶液 (pH 3) に溶解、これに Me_2CO を 40% 濃度に添加、更に $\text{dil NH}_4\text{OH}$ で pH 5.9~6.0 に調整して室温に 2 時間放置、析出する沈殿を遠心分離して集め Me_2CO で洗浄乾燥。収量は前記粗製インシュリンの約 10% である。ここに得られた C-物質を、常法に従つて 24 時間絶食せる体重 2kg 前後の雄家兎に、一定量を 0.01N HCl 1cc に溶解して皮下注射した後 1 時間毎に採血し Hagedorn-Jensen 法に準じて血糖の定量を行い各々 1 群 3 匹の家兎に対する平均血糖減少率を測定した。その結果は Fig. 1 に示す如く対照のインシュリンに比較して最低血糖量を示す迄の時間は遅く且つ長期に亘つて低血糖を示す。更に 0.7mg 以上の大量投与では静かに仮死状態を呈するのみで、これはグルコースの適当量投与により完全に回復し、その後 3 ヶ月間の観察に於いても病的障害を呈したものは全く無かつた。

Fig. 1. Blood Sugar decreasing Activity of C-Matter and Insulin

C-物質は酸性溶液中で安定、Seliwanoff 反応陰性、等電点が大略 pH 5.9~6.0 である点から Santenose 等⁸⁾の報告している vagotonin とは明らかに異なるものであるが当然インシュリンの含有が推定せられるので Robinson⁹⁾ 及び朝岡、東¹⁰⁾等の使用せる $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3:1:4) の展開剤で濾紙クロマトグラフィーを行つたところ、インシュリン区分と原点区分 (O-物質) の二ヶ所に B.C.G 染色スポットを認めた。

C-物質の精製 上記の如く C-物質中には相当量のインシュリンが混在しているのでこれを除く事を目的として Table I の如く処理した。

ここで得られた各沈殿区分を家兎に皮下注射して生理作用を測定した結果、Fig. 2 に示す如く透析を行わない P-2 は全く本来の C-物質と同一の生理作用を示し、透析処理を行つた P-1 は完全に生理作用を失っており、更に上澄液より得た P-3 はインシュリンと全く同一の生理作用を有している。P-3 からは更にインシュリン結

6) 斉藤、石原、伊藤、藤野：北大水産彙 7, 159 (1956).

7) 柴田：福岡医誌 43, 41 (1952).

8) D. Santenose, T. Brieu, E. Stankoff: Compt. rend. soc. biol. 124, 127 (1937).

9) E. A. Robinson: Biochem. J. 51, 298 (1952).

10) 朝岡、東：本誌 74, 788 (1954).

Table I. Purification of C-Matter

Fig. 2. Blood Sugar-decreasing Activity of each Fraction from Table I

晶が晶出しているので当然の結果である。次に P-1, P-2, P-3 をそれぞれ前記の濾紙クロマトグラフィーで検索した処, P-1 は原点区分 (O-物質) のみであり, P-2 は C-物質 と同様に原点区分とインシュリン区分更に P-3 はインシュリン区分のみであつた。この事はインシュリン調製が ZnSO_4 による沈澱法に従っている為に, 粗製インシュリン中には相当量の Zn が混在し, その為に pH 5.9, Me_2CO 濃度40%に於いて特に Zn を添加しないにも拘らずインシュリンが一部沈澱して O-物質 に混入し持続性血糖低下を惹起しているものと考えられる。即ち P-1 では透析により Zn が流出し去りその後の操作で沈澱物中にインシュリンが混入しなかつたものと推定される。

この点を検討する為に P-1 と P-3 の混合物が持続効果を再現するか否かを観察した。即ち P-1 0.12 mg と P-3 0.15 mg 及び P-1 0.25 mg と P-3 0.15 mg を混合調製し 0.01N HCl 1 cc 中に溶解して家兎に皮下注射して生理作用を測定した所, Fig. 3 に示す如くこの混合物は C-物質 と同様の持続効果を再現する。

原点物質-O は B.C.G. で染色せられ, 又 ニヒドリン, ビュレット及び Cole の各反応が陽性である故蛋

Fig. 3. Activity of Mixture of P-1 and P-3

白質である事は明白であるが、更にこの蛋白質の塩酸加水分解物のアミノ酸組成を $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4:1:5 v/v 上層) 及び 80% フェノールを展開剤として二次元濾紙クロマトグラフィーで検索した処、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びプロリンの存在を認め、更に前記の如く Cole の反応が陽性である故トリプトファンも存在する。この組成を著者等¹¹⁾ の行つた鯨インシュリンのアミノ酸分析値と対比すると、インシュリン中に多量存在するシスチンが O-物質に存在せず、又インシュリンに存在せぬトリプトファンが O-物質中に存在するので、O-物質は製造過程にインシュリンより変化せるものではない。又組成及び等電点よりしてプロタミンやヒストン等とも類を異にしている事は明らかである。

C-物質の生理作用機作 以上の皮下注射に於ける観察に次いで C-物質を静脈投与した場合の血糖量変化を測定した結果、Fig. 4 に示す如く対照の結晶インシュリンと同様の血糖降下曲線を示し、これは C-物質の作用機作が insulinase-inhibitor 系に属するものではなく、プロタミン・インシュリンの如く細胞に於ける浸透性に於いて O-物質がインシュリンと拮抗的に阻害し合つてその効果を持続せしめるものと考えられる。

Fig. 4. Activity of C-Matter by Intravenous Injection

製造法及び種の相違による C-物質の存在 鯨粗製インシュリンより調製した O-物質の生理作用と同様の作用物質が牛脾臓中にも存在するか否かを検討する為、Scott 法¹²⁾ 及び Zn 添加の柴田法⁷⁾ によつて調製した牛粗製インシュリンより鯨の場合と同様に処理して pH 5.9 沈殿物を作りその生理作用を測定したところ、Scott 法によるものは持続効果は全く認められず、一方柴田法ではその効果が認められた。それ故 C-物質は鯨特有のものではなく牛脾臓中にも存在するが、インシュリン製造法の如何で、即ち EtOH 抽出-塩析では得られない物質が、 Me_2CO 抽出-ZnSO₄ 沈殿により粗製インシュリン区分に混入して来るものである。但し牛脾臓の C-物質は鯨のそれよりも遙かに持続作用は小さい傾向を示す。

脾臓中の他の蛋白区分とインシュリンの混合物の生理作用 鯨脾臓より Scott 法によりインシュリンを製造

11) 斉藤, 石原, 伊藤, 藤野: 北大水産彙 8, 54 (1957).

12) D. A. Scott, A. M. Fisher: Biochem. J. 29, 105 (1935).

する際得られる pH 8 沈澱の蛋白質区分, 及び柴田法で得られる Me_2CO 抽出液を $\text{Zn}(\text{OH})_2$ により沈澱せしめた上澄液に Me_2CO を 80% 濃度に添加して生ずる沈澱の蛋白質区分を精製して, これ等を 0.2mg 及び 0.4mg とインシュリン 0.2mg をそれぞれ 0.01N HCl 1cc に溶解したものの生理作用を測定したところ, それ等の蛋白質区分のみでは生理作用は全く無く, 又インシュリンとの混合物は共にインシュリン単独の場合と同様の一過性の低血糖を示すのみで何等持続効果は認められない。それ故 O-物質は何んらかの生理的活性を持つものと考えられ, 或いは脾臓中に於てインシュリンと共にホルモン作用に関与しているものであろう。

各種 Depot-insulin と C-物質 の作用の比較 今迄に知られている低血糖持続性インシュリンの中, プロタミン・亜鉛・インシュリン及びプロタミン・インシュリンの両者と C-物質 の作用を比較すると Fig. 5 の如く同等乃至これに優る持続効果を持つものである。

Fig. 5. Activity of Various Depot-insulin

更に前記の如く大量投与によつても病的障害は全く無く充分臨床的に応用可能と考えられる。

北海道大学水産学部