

第 1 表

逆性石けんによる沈殿	親水性コロイド	KCl	KCl m. mol.	加熱	
—	ポリビニルピロリドン				
+	A				非イオン性 多糖類—OH
	デキストラン	+	12—34	+	
	可溶性デンプン	+	66—200	+	
	グリコゲン	+	2—200	+	
	ポリビニルアルコール	+	166	—	
B					—COOH
	アルギン酸	+	300—420	—	
	蛋白	+	200—2000	—	
	アラビヤゴム	+	150—240	—	—COOH —OSO ₃ H
	ヒアルuron酸	+	300	—	
	リボ核酸	+	480	—	
コンドロイチン硫酸	+	900	—		
C	かんてん	—	—	—	—OSO ₃ H
	リグニンスルホン酸	—	—	—	—OSO ₂ H
	ベントナイト	—	—	—	粘土

概要を述べてみたいと思う。

逆性石けんとして臭化セチルトリメチルアンモニウム（ライト社）を使用した。

一般に逆性石けんと親水性コロイドが沈殿するときは第1図の如く一定量のコロイドに対して逆性石けんの薄い所でも、濃い所でも沈殿量は少なく、1つの山型をなしている。換言すると相対濃度のある一定の所で最大の沈殿を生ずる。

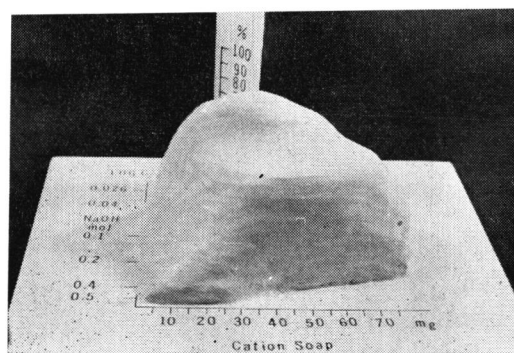
逆性石けんにより沈殿するものと沈殿しないものとに分ける（第1表参照）。沈殿する群は更に3つの群に分けられる。第1群は主として非イオン性多糖類であつて、この沈殿は加熱や中性塩添加により消失する（例外PVA）。第2群は弱アルカリ性、中性、弱酸性で沈殿し、主として—COOHを含むもので、中には蛋白のように等電点よりアルカリ側においてのみ沈殿するものもある。リン塩基、OSO₃Hと—COOHとをもつものも入る。この沈殿は加熱によつて消失しないが中性塩によつて沈殿は消失する。第3群は沈殿の仕方は第2群に似ているが、生成した沈殿は加熱によるも、中性塩添加によるも消えない。これに属するものは—SO₃H 又は—SO₂H 粘土類である。—OHをもつポリビニルアルコールだけが特別で強アルカリ性で沈殿するので非イオン性多糖類と似ているが、加熱により沈殿が消失しない点では第2のグループに入る特別な例である。

次に個々の場について少しく述べて見たい。ポ

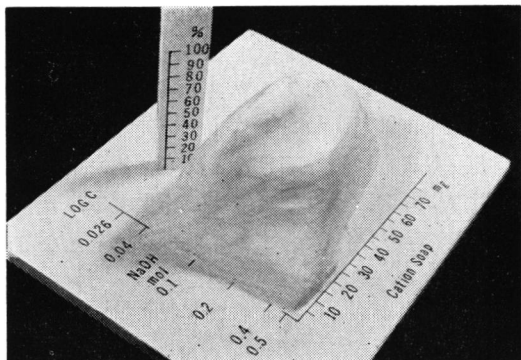
リビニルピロリドンは三塩化酢酸以外のものでは殆んど沈殿しないことは非常に安定なコロイドであることを意味し、しかも種々なる色素、毒素と結合することは血液、組織の洗滌作用がすぐれていることを物語るものである。

沈殿するクラスの中の第1グループにはデキストラン、可溶性澱粉、グリコゲンが属する。デキストランはその構造がグルコースの1-6'α結合による重合体でグリコゲン澱粉に似ているが、結合様式を異にしている。治療に輸液として広く使用されているものである。

デキストランは酸性中性では逆性石けんと殆んど反応しないが、アルカリ性になると反応が起る。初めは混濁を生ずるが一定時間後に2層に分かれ、コアセルベーションが見られる。NaOHと逆性石けんの種々なる濃度についてコアセルパー



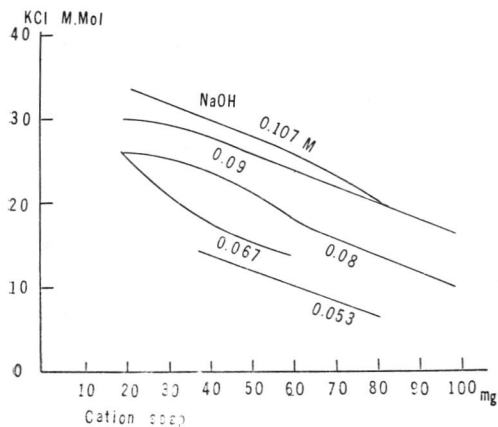
第 2 図



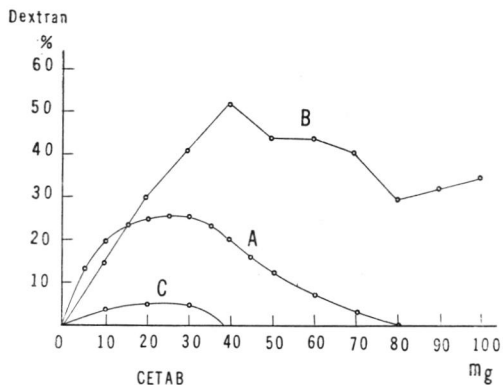
第3図 デキストランのコアセルバーション
逆性石けんと NaOH 濃度とコアセルバート
の関係

トの部分のデキストランの濃度を定量した結果は、第2図、第3図のようになる。これで見られるように NaOH のうすい濃度 0.026mol/L ではコアセルバーションは起らない。NaOH の高い濃度 0.668mol/L でも起らない。コアセルバーションの起る所では逆性石けんが濃度が低くすぎても高すぎても、コアセルバートの量は少ない。1つの山型のカーブをなすその最大値は NaOH濃度によつてきまる。

デキストランのコアセルバートは中性塩例えば NaCl, KCl, Na₂SO₄ を添加すると消失する。消失させるに必要な KCl の最小濃度は加えられた NaOH 濃度によつてきまる。また逆性石けんの量によつても異なる。同じ NaOH 濃度では逆性石



第 4 図



第5図 (註) デキストラン0.47% NaOH 0.05N
A : デキストラン—逆性石けんの反応
B : ベンゼン処理
C : 1 mM Na₂SO₄ 添加

けん濃度の高い程 KCl は少しですむ。同じ石けん濃度では NaOH の濃度の高い程 KCl 量は多くを要する (第4図)。

2,3の中性塩についてコアセルバート消失の条件をしらべた。1-1の中性塩では差がなく Ba⁺⁺, SO₄⁻, PO₄⁻⁻⁻ではやゝ相違があつた。

中性塩を添加したとき山の形は全体的に低くなる。コアセルバートに無極性溶媒、例えばベンゼン、石油エーテル、リグロイン等少量を加えて強く振盪するとコアセルバートは沈殿に変じ、その量は増加する。この場合ベンゼン水の系における逆性石けんの分配率は4.65であつて過剰の逆性石けんは解膠の傾向があるので、この過剰の逆性石けんをとり去ることに意味があるが、浮游選鉱における捕集剤の役割をしていることも否めない。

デキストラン—逆性石けんのコアセルバートは 100°C に加熱すると消失するが、冷却すると再びコアセルバートを生成する。デキストラン一定量に種々なる濃度に NaOH を加えて比粘度を測定する場合、アルカリ性が増加するに従つて比粘度が増加する。中性塩を添加すると粘度の低下をみる。以上のことを考えるとデキストランはアルカリ添加で分子表面の負の電荷が増加する。そのために粘度が高くなり塩溶液を加えると粘度が減少する。表面の電荷の増加により逆性石けんは特定

の原子団と交換的に結合するのではなくファン・デア・ワールス力による吸着をなす。それ故に加熱によりコアセルバートは消失する。

デキストランに類似の構造を有する可溶性澱粉、グリコゲンに類似の構造を有する可溶性澱粉、グリコゲンはデキストランとほぼ同様な結果を示すが、唯異なることはコアセルベーションでなく明瞭な沈殿がみられる。中性塩添加や加熱により沈殿は消失する。

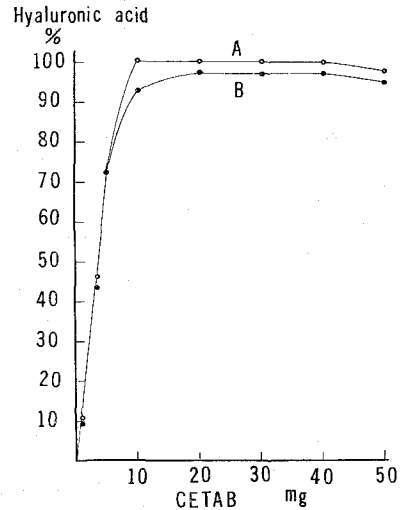
ポリビニールアルコールは大変にその様子が異なっていて 1 M/L NaOH で 10mg 逆性石けん (1 mg PVA) でやつと濁り、1.5 M/L NaOH でも同様の濁り、2.5 M/L NaOH で明瞭な沈殿を生ずる。この沈殿は KCl 166 mmol で消失する。加熱によつては沈殿は消失しないで、むしろ増加する。これは沈殿生成のメカニズムが根本的にデキストランのそれと異なることを示す。前者に比べて遙かに強度のアルカリ性で初めて沈殿することはアルコールの一OH基の強アルカリ性中での解離と考えるべきであろう。そのOH基と逆性石けんととの結合であつて、これは化学反応であり、前者は吸着現象と考えられる。ポリビニールアルコールはアルカリ性でのみ沈殿する点ではデキストラン等のA群に入るが、沈殿が加熱により消失しない点では次に述べるアルギン酸等の(B)群に入る。

(B) 中性、弱アルカリ性、弱酸性において逆性石けんにより沈殿させられるグループには、アルギン酸、アラビアゴム、ヒアルuron酸、リボ核酸、デオキシリボ核酸、コンドロイチン硫酸、蛋白等が入る。

アルギン酸の場合は中性、アルカリ性、酸性のいずれの側でも逆性石けんにより完全に沈殿する所がある。一定量のアルギン酸に対しては一定量の逆性石けんが対応し完全な沈殿をみる。逆性石けん一分子に対してアルギン酸は 180 なる値を得る。これはアルギン酸の単位骨格ウロン酸に相当する。沈殿消失に要する最小 KCl 値は 360 mmol- 420 mmol で、Aグループより遙かに多量を要する。加熱によつて沈殿を消失しない。アルギン酸はイオン交換性に逆性石けんと反応し、吸

着でなく化学的結合である。加熱による沈殿は消失しないで、むしろ促進させられる。

アラビアゴム、ヒアルuron酸、リボ核酸、デオキシリボ核酸、コンドロイチン硫酸はアルギン酸と同じように逆性石けんと反応する。蛋白質は等電点よりアルカリ側にて沈殿を生ずる。ヒアルuron酸のみ沈殿とならずコアセルバートとなる。これに少量の無極性溶媒、例えばベンゼンを加えて強く振盪すると沈殿となる(第6図)。



第 6 図

註：Aはベンゼン処理、Bは未処理

Bグループに属する他のものも大体アルギン酸と同じような沈殿の仕方をする。

(C) 寒天、リグニンスルホン酸、ペントナイト等がこのグループに属する。沈殿の仕方はBグループと同じであるが、中性塩によつて沈殿は消失しない。加熱によつて沈殿は消失しない。中性塩によつて沈殿は促進され SchulzeHardy の法則に従う。ペントナイトに関連し、カオリンも逆性石けんと強く結合し濃厚な中性塩溶液中でも分解しない。

以上述べたように沈殿の生成の条件が異なつたり、或は沈殿を種々なる濃度の中性塩によつたりして分割することができる。

次に特定の活性を有する蛋白、酵素について2、

3の観察を述べると、細菌性 α -アミラーゼの沈殿条件をpH 6.5, 7.5, 9.2, 9.5について調べた。その結果酵素と逆性石けんのある相対濃度の所で沈殿が生ずる。pHによつても最大沈殿量が異なる。中でもpH 7.5のときに一番多量の沈殿がみられた。

α -アミラーゼに対する逆性石けんの阻害をしらべたが沈殿の形のときのみ阻害がみられ、溶解状態では阻害はみられない。このことは酵素活性部分とは反応しないで他の部分と反応することが明らかとなつた。比較的濃いNaCl, KCl水溶液に沈殿をとかし、カリオンを加えると逆性石けんはカリオンと強く結合して酵素を遊離する。この酵素は電気泳動、溶解度より見て、もとの酵素と同じであることが判明した。

—SH酵素といわれるウレアーゼについて同様のことを調べたが、この場合沈殿の様子は他の親水性コロイドと似ている。たゞ不安定な酵素であるので広い範囲のpHについて調べることができない。pH 8.3, 0°Cについて行なつたが、ある相対濃度において沈殿の生ずることはアミラーゼの場合と同様であるが、この沈殿を溶解する場合、全操作を0°Cで行つたときと15°Cで行なつたときとで非常に相異があり、0°Cにて高濃度のNaCl水溶液によつて完全に溶解することができるが、15°Cでは不溶化が起る。不溶化は2次の変性であつて、15°, 23°, 30°, 36°Cについての反応速度を求め、変性の活性化エネルギーを概算すると10000~90000カロリーであつた。逆性石けんがウレアーゼに結合すると著しく不安定となり分子内で変化を起すと思われる。

0°Cで2N NaCl水溶液に沈殿を溶解し、カリオンを加えるとウレアーゼを遊離させることができる。活性、電気泳動、溶解度よりもとのウレアーゼであることが証明される。

Glassman ら²⁾はリゾチームが逆性石けんと化学量論的に結合して定量的に沈殿し、不活化されないことを認めている。

今まで実験されて来た酵素では、酵素の活性中心と逆性石けんの結合箇所とは異なるように思われ

る。

沈殿反応の応用

(1) リボ核酸とデオキシリボ核酸の分離³⁾
(Dutta Jones Stacey) セチルトリメチルアンモニウムと核酸の結合体は0.5M NaCl 0°Cで分割できる。リボ核酸は溶解し、デオキシリボ核酸は沈殿として残る。この方法により Myco: tuberculosis, Myco phlei, Sarcina lutea, Mouse Saccoma, 小麦の胚について測定された。

核酸の沈殿と逆性石けんの鎖の長さとの関係が研究された(Aubel-Sadron 等⁴⁾) C₁₀までは沈殿を生じないが、C₁₂でゆるやかに起り、それ以上だと直ちに起ることが認められた。この沈殿はジメチルフオルムアミド、無水アルコールに溶解濃厚NaCl溶液で核酸のみ沈殿し、もとのRNA, DNAの吸収スペクトルを与えることを認めた。同じ研究者達⁵⁾はタバコモザイクウイルスよりつたりリボ核酸は逆性石けんで沈殿し、チエチルフオルムアミド、又は無水アルコールにとかしNaClで再生すると感染性はそこわれない。エタノールの方は感染性は全くそこなわれないが、ジメチルフオルムアミドのとき活性の低下が認められた。

Guerritore は Rous sarcoma の水抽出液の感染性は臭化セチルトリメチルアンモニウムで何ら影響を受けないことを認めた。

(2) 酸基を有する多糖類の分割 (Scott 及び Scott 等⁶⁾) ヒアルuron酸, コンドロイチン硫酸につき、逆性石けんで沈殿させ濃い硝酸塩にとかし、更に沃化物を加え逆性石けんの大部分を沈殿させ、最後にクロロフォルムでのぞき、エタノールで多糖類を沈殿させ、エーテルで洗つてもとの多糖類を再生している。Scott は粗ヘパリンを逆性石けんで沈殿させ、1N, 0.6N NaClにより分割しその効力を比較した。

Schiller 等⁷⁾は塩化セチルピリジニウムを使用し、うさぎの皮膚よりヒアルuron酸, コンドロイチン硫酸ヘパリンの混合物を沈殿させ、0.4M, 1.2M, 2.1M, NaClの溶解度の差に分離定量した。

(3) Nicola di Ferrante⁸⁾ はヒアルウロン酸又はコンドロイチン硫酸を醋酸緩衝液 (pH6) 中で臭化セチルトリメチルアンモニウムを作用させ、その混濁度より定量法を提案した。

(4) ヒアウロン酸およびコンドロイチン硫酸の定量法とヒアルウニダーゼの定量法 (佐藤等⁹⁾) として反応系に逆性石けんを作用させ、残留している未反応のヒアルウロン酸を沈殿し、分解生成物を糖の比色法を使用し定量した。

(5) リグニンスルホン酸を除去する法 (佐藤)¹⁰⁾ サルファイトパルプ廃液に逆性石けんを作用させ、リグニンスルホン酸を沈殿させ、その濾液にネルソンソモジの方法で糖を定量する法を提案した。

(6) 輸液としてアルギン酸ソーダの水溶液が使用されるが、血液中のアルギン酸の定量法として蛋白を加熱除去後、適当な濃度の食塩存在下で臭化セチルトリメチルアンモニウムを作用させ、その沈殿をアンスロンによる糖の定量法で定量する方法が報告された (佐藤ら¹¹⁾)。

(7) 神経と筋肉の刺激伝達に関してアセチルコリンおよびその類似物質が受容体と結合した結果、生物学的効果があらわれると考えられているが、この受容体の本体が如何なるものか、いろいろと分離が試みられているが、電気ウナギの発電器官より2個の4級アンモニウム基を有するクラレ (d-ツボクラリリ) と強く結合して沈殿する蛋白が分離された (Ehrenpreis ら¹²⁾)。受容体に作用すると考えられていた d-ツボクラリンがアセチルコリン受容体と特異的に沈殿し、その蛋白をヒアルウロン酸コンドロイチン硫酸等と種々なる点で比較すると、受容体は単に高分子の酸性多糖類ではなく蛋白質であることが判明した。

(8) Jacox の反応¹³⁾。臨床診断反応であつて、コリチン緩衝液 6.8 中で 0.1% 塩化オクタデシルジメチルベンチルアンモニウムを血清に添加し、その濁りの有無を検する。これはγグロブリン、アルブミン、ムコ蛋白によるのではなく、C-蛋白によるもので急性炎症、伝染性疾患 (リウマチ、肺炎) 癌によるとしている。

文 献

- 1) Sato, K.: Kolloid-Z 印刷中
- 2) Glassman, H.N. & McInar, D.M.: Arch Biochem 32 170 (1951)
- 3) Dutta, S.K., Jcnes, A.S. & Stacey, M.: Biochim Biophys Acta 10 613 (1953)
- 4) Aubel-Sadron, G., Beck, G., Ebel, J-P & Sadron, C.: Biochim Biophys Acta 42 542 (1960)
- 5) Hirth, L., Lebeurier, G., Aubel-Sadron, G., Beck, G., Ebel, J-P & Horn, P.: Nature 188 689 (1960)
- 6) Scott, J.E.: Chemistry and Industry: 168 (1955). Scott, J.E., Gardell, S. & Nilsson, I.M.: Biochem J 67 7p (1957). Scott, J.E.: Methods of Biochemical Analysis VIII (1960) (D. Glick ed.) 145
- 7) Schiller, S., Slover, G.A. & Dorfman, A.: J Biol Chem 236 983 (1961)
- 8) Ferrante, N.d.: J Biol Chem 220 303 (1956)
- 9) 佐藤弘一・松村義寛・宮川啓・藤野冷子: 第31回生化学総会 (札幌) 7月 (1958)
- 10) Sato, K., Matsumura, Y., Miyakawa, K. & Yoshimura, S.: Svensk Papperstidn 61 68 (1958)
- 11) 佐藤弘一・松村義寛・宮川啓: 第6回日本輸血学会総会 (福岡) 4月 (1958)
- 12) Ehrenpreis, S. & Fishman, M.M.: Biochim Biophys Acta 44 577 (1960). Ehrenpreis, S. & Kellock, M.G.: Biochim Biophys Acta 45 525 (1960)
- 13) Heepe, F.: Die unspezifischen Bluteiweisreaktionen. Darmstadt (1953)