

魚類インシュリンの研究：（第2報）インシュリン の精製について

立野，新光
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21334>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 14 (4), pp. 581-587, 1954-09. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



魚類インシュリンの研究

(第2報) インシュリンの精製について

立 野 新 光

Studies on the insulin of fishes. 2.
On the purification of insulin

Shinko Tachino

I. 緒 言

魚類のラ氏島よりインシュリンを製造するに当つては第1報の方法により、1 mg 当 8 ~ 10 IE の力価を有するインシュリン粉末が得られ、そのままでも臨床的に使用され得るが、なお種々の不純物を含有しているので良品を得るには更に精製しなければならない。

魚類より抽出製造した粗製インシュリンの精製については長沢の記載せるものを除いては他に全然文献がないが、家畜の膵臓より製造したインシュリンの精製については多くの研究がある。その理由は魚類のラ氏島よりは容易に比較的高単位のインシュリンが抽出されるが、家畜の膵臓からは低単位のものしか得られないので、これを臨床的に用いるためには精製によつて不純物を除去し力価を高めなければならないからである。魚類の粗製インシュリンと家畜の粗製インシュリンとでは含有している不純物に多少相違があるので、家畜インシュリンの精製法をそのまま魚類インシュリンの精製に応用することは種々の疑問があり未だ実験例がない。著者はその主なる方法について研究を行いその可否について検討を試みた。

家畜インシュリンの精製法に関しては一般に次の方法が用いられている。

(1) 等電点沈澱法, (2) 塩類として沈澱せしめる法, (3) 有機溶剤による法, (4) 磷酸緩衝液による法。

なおこれらの方法以外に Doisy, Somogyi, Shaffer¹⁾ の塩析法, Jensen and Evans,²⁾ Blatherwick³⁾ の塩酸水溶液のみによる方法, Moloney and Findlay,⁴⁾ Dingomanse and Laqueur⁵⁾ の活性炭素による吸着法等があるが実用的価値がないので省略する。

II. 実験及び考察

1. 等電点沈澱法

インシュリンの等電点は Blatherwick,³⁾ Abel,⁶⁾ Wintersteiner,⁷⁾ の研究によれば溶液中に共存する不純物質によつて多少の差はあるが大體 pH 5.0 前後とされている。即ちイ

ンシュリンは pH 5 内外に於て他の不純物から別れて沈澱するものである。この性質を利用して Somogyi, Doisy, Shaffer¹⁾ は等電点沈澱によるインシュリンの精製法を考案した。その方法は大略次の如くである。

50 mg の粗製インシュリンを N/10 醋酸 5 ~ 10 cc に溶解し、これに対応する苛性曹達量の 20 % を加える。そうすると 1/5 中和された醋酸溶液は pH 4 内外となり、インシュリン蛋白質は溶解しているが酸性蛋白質の大部分は析出する。濾液に前の醋酸を丁度半分だけ中和するに要する苛性曹達を加えて 7/10 中和すると pH 5 内外となる。この酸度ではインシュリンは直ちに沈澱するが、なお 1 ~ 2 日間氷室に放置して沈澱を完全ならしめた後遠心分離して沈澱を分つ。

著者は鯉のラ氏島より抽出製造した粗製インシュリンすなわち 5 IE/mg, 8 IE/mg, 10 IE/mg のものをそれぞれ 0.5 g を用いて上記の等電点法により精製を行い第 1 表の如き結果を得た。即ち等電点法では力価はかなり上昇するが、試料の力価の如何にかかわらず直に同程度の高単位のものとはならず、5 IE/mg のものは 8.0 IE/mg に、8 IE/mg のものは 11 IE/mg にと言う如く、用いた試料の力価に応じてそれぞれの異つた単位に上昇する。従つて精製粉末インシュリンの収量 (g) は試料インシュリンの力価の高いもの程少ないが、インシュリンの全収量 (IE) は試料インシュリンの力価の低いもの程少くない。しかしこの方法で精製する場合は高単位の試料程インシュリンの損失が大きい。

第 1 表. 等電点沈澱法によるインシュリンの精製.

試 料 (粗インシュリン)				精 製 イ ン シ ュ リ ン						
試料 番号	供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供 試 総単位 (IE)	粉 末 全収量 (g)	試料に 対する %	力価 (IE/mg)	試料に 対する 上昇 率 (%)	インシュ リン全収 量 (IE)	試料に 対する %	損失 (%)
1	0.5	5.0	2500	0.205	41.0	8.0	60.0	1640	65.6	34.4
2	0.5	8.0	4000	0.161	32.2	11.0	37.5	1771	44.2	55.8
3	0.5	10.0	5000	0.142	28.4	13.0	30.0	1846	36.8	63.2

2. 塩類として沈澱せしめる方法

インシュリンはその構成分子として多くの塩基性アミノ酸を有するので、酸と結合して塩を作る。この性質を利用して特殊の酸を用いてインシュリンを塩類として沈澱せしめ、これと共存する不純物から分離する方法が多くの学者によつて考案されている。その中で Dudley and Starling²⁾ はピクリン酸を用い、Funk³⁾ はフラビアン酸を用い、Dickens⁴⁾ はトリクロール醋酸を用いて家畜インシュリンの精製を行い注目すべき成績を挙げている。

著者は Dudley and Starling のピクリン酸法に準拠して次の方法で魚類の粗製インシュリンの精製を試みた。

粗インシュリン 1 g を塩酸酸性 pH 3.0 の水 200 cc に溶解し、不溶物質は遠心分離して棄て去り、上澄液は N/10 NaOH にて pH 4.8 とし、これにピクリン酸飽和溶液 100 cc を加えてよく攪拌し、1 ~ 2 日間氷室中に静置する。生ずる黄色の沈澱は遠心分離して集めてピーカーに移し、水 30 cc 及び飽和ピクリン酸液 20 cc を加え次に N/10 Na₂CO₃ を

少量加えてよく攪拌すると透明あるいは半透明な褐色の溶液となる。これを遠心分離して浮遊物質を除去し、水を加えて 50 cc に稀釈し、前に用いた $N/10 Na_2CO_3$ に相当する $N/10 HCl$ を加えるとインシュリンのピクリン酸塩が直ちに沈殿する。この液にピクリン酸飽和溶液 200 cc を加え 1~2 日間静置後上澄液を棄て沈殿を集めて遠心分離し、0.1 % ピクリン酸水溶液にて $NaCl$ がなくなるまでよく洗滌し、これにアセトン 80 分、1N HCl 20 分からなる酸性混液を加えて攪拌しながら溶解し、不溶部分は遠心分離して除去する。かくしてインシュリンのピクリン酸塩は塩酸塩となる。上澄液をアセトン 800 cc 中に徐々に注入しながらはげしく攪拌すると白色のインシュリンが沈殿する。沈殿を集めて遠心分離しアセトンにて洗滌後減圧乾燥する。

著者は力価 5 IE/mg, 8 IE/mg, 10 IE/mg の粗製魚類インシュリンをそれぞれ 1g ずつ秤取して上記の精製法を行い第 2 表の如き結果を得た。即ち 5 IE/mg の試料は精製の結果力価は上昇して 10 IE/mg となり、100 % の上昇率を示しインシュリンの全収量は 62.8 % である。8 IE/mg, 10 IE/mg の試料も夫々 12 IE/mg, 13 IE/mg となり、力価は上昇するが 5 IE/mg の試料に比し上昇率は少ない。然し精製操作によるインシュリンの損失は単位の高い試料程少く、5 IE/mg のものは 37.2 %, 8 IE/mg のものは 28.5 %, 10 IE/mg のものは 21.8 % である。以上は唯 1 回の精製である。Dudley and Starling はこのピクリン酸法によればインシュリンに含まれている不純物の 90 % までを除去し得ると主張しているが、著者は 12 IE/mg の試料を用い 3 回この操作を繰り返したが、16 IE/mg 以上には単位を高めることは出来なかつた。

第 2 表. ピクリン酸法によるインシュリンの精製.

試料(粗インシュリン)				精製インシュリン						
試料番号	供試量(g)	力価(IE/mg)	供試総単位(IE)	粉末全収量(g)	試料に対する %	力価(IE/mg)	試料に対する上昇率(%)	インシュリン全収量(IE)	試料に対する %	インシュリンの損失(%)
1	1.0	5.0	5000	0.314	31.4	10	100	3140	62.8	37.2
2	1.0	8.0	8000	0.477	47.7	12	50	5724	71.5	28.5
3	1.0	10.0	10000	0.602	60.2	13	30	7826	78.2	21.8

3. 有機溶剤による方法

Scott and Parker,⁽¹¹⁾ Gerlough and Bates⁽¹²⁾ は家畜の膵臓より抽出したインシュリンの含水稀薄エタノール溶液に無水エタノールを加え、その濃度を 90~92 % まで上げることによつてインシュリンを精製している。著者は鯉のラ氏島より抽出した粗製インシュリンを 50 % 含水エタノールに溶解し、これに無水エタノールを加えてエタノールの濃度を 95 % 以上に上げてインシュリンの沈殿の生成を見なかつた。しかしアセトンにてはよく沈殿するので、アセトンの濃度を任意に変化せしめることによつてインシュリンの分別沈殿を行つたところ比較的良好な結果を得た。

実験(1) 8 IE/mg の粗インシュリン 2.0g を塩酸酸性 pH 2.5 の 70 % アセトン 50 cc に溶解せしめ、不溶物質は遠心分離して除去し、その上澄液に pH 2.5 の 95 % ア

セトンを注加してアセトンの濃度を 75% とし、このとき生ずる沈澱は遠心分離して分ち無水アセトンにて洗滌後減圧乾燥する。上澄液には更に上記の 95% アセトンを加えて 80% とし、生ずる沈澱を分ちて前の如く処理する。かくの如くしてアセトンの濃度を pH 2.5 に於て 85%, 90% とし、その度毎に生ずる沈澱を分別して、その沈澱の収量及び力価を測定し第 3 表の如き結果を得た。

第 3 表. アセトンによるインシュリンの精製 (その 1)。

試 料 (粗インシュリン)			アセトン の 濃度区別 (%)	各 区 の イ ン シ ュ リ ン				試料に 対する %
供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供 試 総単位 (IE)		粉 末 イ ン シュリンの 収 量 (g)	力価 (IE/mg)	全 単 位 (IE)		
2.0	8.0	16000	75	0.087	1	87	980	6.1
			80	0.446	2	893		
			85	0.524	11	5796	15089	94.3
			90	0.717	13	9320		

この結果によれば、アセトンの濃度の上昇するにつれインシュリンの沈澱が多くなり、90% アセトンにては概ね全部沈澱する。80% 以下にて沈澱するものは殆ど無効蛋白質であつて、75% アセトンにより沈澱するものの力価は 1 IE/mg, 80% にて沈澱するものでも 2 IE/mg に過ぎない。インシュリンの大部分は 80% 以上のアセトンにて沈澱し、80~85% では 11 IE/mg, 85~90% では 13 IE/mg の力価を有するインシュリンが沈澱する。従つて 80% 以下のアセトンにて沈澱するインシュリンは全試料の 6.0%, 80~90% のアセトンでは 94% である。

実験 (2) 8.0 IE/mg の粗インシュリン 1g を採り、0.25 N HCl 酸性の 70% アセトン 50 cc に溶解せしめ、これに無水アセトン 35 cc を加えて 82~83% とし、このとき生ずる沈澱を遠心分離し無水アセトンにて洗滌後減圧乾燥する。上澄液は 800 cc の 98% アセトンに注入してインシュリンを沈澱せしめる。このときのアセトンの濃度は約 96% となる。この白色沈澱を遠心分離して分ち前と同様に処理する。この前後 2 回の沈澱につきその収量と力価とを測定し第 4 表の如き結果を得た。

第 4 表. アセトンによるインシュリンの精製 (その 2)。

試 料 (粗インシュリン)			アセトン の 濃度区別 (%)	各 区 の イ ン シ ュ リ ン				
供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供 試 総単位 (IE)		粉 末 イ ン シュリンの 収 量 (g)	力価 (IE/mg)	全 単 位 (IE)	力 価 上 昇 率 (%)	試料に 対する %
1	8.0	8000	82~83	0.396	2.0	792		9.9
			96	0.583	12.0	6996	50	87.4

第 4 表によればアセトンの濃度が 82~83% にてはインシュリンは殆んど沈澱することではなく、無効蛋白質に吸着されて僅かばかり沈澱するだけである。即ち、粗インシュリン

1gの中、82~83% アセトンにて力価 2.0 IE/mg の沈澱が 0.396g 得られるが、この沈澱を再び 0.25 N HCl 酸性の 70% アセトンに溶解して精製すれば 10 IE/mg 程度のインシュリン粉末が得られ結局 80% 位のインシュリンが回収される。83% 以上の微酸性アセトンに溶存しているものは無効蛋白質よりもインシュリンが多い。即ちこの溶液を 98% のアセトンに注加してアセトンの濃度を 96% とした場合に沈降するインシュリン粉末は 0.583g, 12 IE/mg であつて、この精製法では力価の上昇率は 50%, 得られるインシュリンの量は 6996 IE で、試料に用いた粗インシュリンの 87.4% が精製インシュリンとして得られる。この精製法を 2 回以上繰り返して行つても 13~14 IE/mg 以上は著しい力価の上昇は認められないがインシュリンの損失は殆ど起らない。

4. 磷酸緩衝液による方法

1926 年 Abel¹³⁾ がピリデン法によつて初めてインシュリンの結晶を得たのであるが、その操作は複雑であり収量も極めて少なかつた。その後多くの研究者^{14, 15)}によつてインシュリンの結晶法が研究されたが技術的に種々の困難があり結晶の析出も充分とは言えない。それ故に著者は直に結晶化を行わず、彼等の方法を改良して魚類のインシュリンの精製に応用し第 5 表の如き結果を得た。

実験 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ の 16.75g と KH_2PO_4 の 2.75g とを 1000 cc の水に溶解し (pH 7.15), その 200 cc を 500 cc のビーカーに採り同容量の水を加えこれを N HCl で pH 2.3 とする。これに粗インシュリン 0.5g を含む溶液 20 cc, 次に 0.5% 醋酸亜鉛 5 cc とを加える。この溶液を N NH_4OH にて pH 6.2 に調整する。このときインシュリンは少しく沈澱して来るが、そのまま 2~3 日氷室に静置して沈澱の析出を完全ならしめて後沈澱を遠心分離して分ち減圧にて乾燥する。

第 5 表. 磷酸緩衝液によるインシュリンの精製.

試料 (粗インシュリン)				精製インシュリン					
番号	供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供試総単位 (IE)	粉末インシュリンの収量 (g)	試料に対する %	力価 (IE/mg)	上昇率 (%)	インシュリンの全収量 (IE)	試料に対する %
1	0.5	10.0	5000	0.201	40.2	14	40.0	2814	56.4
2	0.5	13.0	6500	0.148	29.6	18	38.4	2664	40.9

この実験に於て 10 IE/mg の試料は pH 6.2 に調節したとき多量の沈澱を生じたが、これは純粋なインシュリンの生成ではなく、無効蛋白質を多量に含んだものであつた。13 IE/mg のものは力価は 18 IE/mg まで上昇したが、インシュリンの収量は試料に対し 40% で比較的少なかつた。

5. アセトンの濃度とインシュリンの沈澱の生成状態

魚類のラ氏島よりインシュリンを抽出し塩酸インシュリンとして最後にアセトンにて沈澱せしめる場合、アセトン中に含まれている水分がインシュリンの生成状態に種々の影響

を与えるものである。インシュリンは 90 % 以上のアセトンにより殆ど完全に沈澱することは Dudley¹⁶⁾ や Dodds and Dickens¹⁷⁾ によつて明らかにされているが、90 % 以上のアセトンでも含有する水分によつてインシュリンの生成に難易があり、沈澱の性質に相違があるものである。此の問題については未だ研究がないが、魚類のラ氏島よりインシュリンを製造する場合に於てこの問題は特に重要である。

それ故に著者は 12 IE/mg の精製魚類インシュリンを 0.25 N HCl 酸性 80 % アセトン 10 cc 中に 1 g 含有するように溶解せしめ、予め 200 cc のフラスコに用意せる 99 %, 97 %, 95 %, 93 %, のアセトン 200 cc 中に各々 10 cc づつを注加してそのときのインシュリンの沈澱生成状態について精査した。

第 6 表. アセトン中の水分とインシュリンの析出状態.

試験番号	アセトン		10 % インシュ リン溶液 (cc)	沈澱生成 後のアセ トンの濃 度 (%)	インシュリンの沈澱状態		
	濃度 (%)	使用量 (cc)			粉末イン シュリンの 収量 (g)	色調及び状態	力価 (IE/mg)
1	99	200	10	98	0.992	白色軽微粉末	12
2	97	200	10	96	1.014	白色軽粉末	12
3	95	200	10	94	0.982	灰色軽粗粉末	12
4	93	200	10	92	0.945	褐色鈍重粉末	12

上表によればアセトン中の水分はインシュリンの力価には影響を及ぼさないがインシュリンの色沢、粉末状態に密接な関係がある。インシュリンの生成状態について略述すると大体次の如くである。

(1) 99 % のアセトンにインシュリン溶液を攪拌しながら注加するとインシュリンは白色の軽い微粒子となつて生成し、アセトン中に懸垂して容易に沈降しない。

(2) 97 % のアセトンの場合は生ずるインシュリンの粒子は前のときよりもやや大きく沈降は緩慢であるが、20 ~ 30 分で完全に沈澱する。

(3) 95 % のアセトンの場合は生ずる粒子は前の場合よりも大きく沈降は速で攪拌が不充分のときは器底に附着することがある。

(4) 93 % のアセトンの場合は生ずるインシュリンは粉末状とならず、絮状となり粘着性が強く器底及び器壁に附着し取扱困難である。

沈澱の色調はアセトン中の水分が少ないもの程良好である。水分が多くなるにつれ沈澱は褐色の度を増す。

かくの如くアセトン中の少量の水分がインシュリンの生成状態、色調及び組織に影響するのは、魚類のインシュリンはアセトン溶液中に於ては強い吸湿性があるためと思われる。それ故にアセトンをインシュリンの沈澱剤として用いる場合には 95 % 以下のものはさけなければならない。無水のものもインシュリンの沈降が困難な場合があるので不便であり結局 98 % 程度のアセトンが最も便利である。実際の操作に於てはアセトンの濃度が 98 %, インシュリン注加後の濃度が 96 % の場合が沈澱の生成に最適である。

摘 要

インシュリンの精製法として（1）等電点沈澱法，（2）塩類として沈澱せしめる方法，（3）有機溶剤による方法，（4）磷酸緩衝液による方法の4つの方法について研究した。その結果ある程度収量を犠牲にして高単位のインシュリンを得るためには，磷酸緩衝液による方法がよく，力価の上昇よりも収量に重点を置く場合は，有機溶剤による方法が適当であつた。

アセトン中に含有する少量の水分がインシュリンの沈澱生成に特殊な影響を与えるので，この問題について実験的研究を行つた結果98%のアセトンがインシュリンの沈澱生成に理想的であつた。

参 考 文 献

- 1) Doisy, E. A., Somogyi, M. and P. A. Shaffer: J. Biol. Chem., **55**, Proc. XXXI (1923).
- 2) Jensen H. and E. A. Evans: Z. Physiol. Chem., **209**, 134 (1932).
- 3) Blatherwick, N. R. *et al*: J. Biol. Chem., **72**, 51 (1927).
- 4) Moloney, P.G. and D. M. Findlay: J. Biol. Chem., **57**, 359 (1923).
- 5) Dingemans, E. and E. Laqueur: Arch. Neerland Physiol, **12**, 259 (1927).
- 6) Abel, J. G. *et al*: J. Pharm. Exp. Ther., **31**, 65 (1929).
- 7) Wintersteiner, O. and H. A. Abramson: J. Biol. Chem., **99**, 741 (1933).
- 8) Dudley, H. W. and W. W. Starling: Biochem. J., **18**, 147 (1924).
- 9) Funk, C.: Science, **63**, 401 (1926).
- 10) Dickens, F. *et al*: Biochem. J., **21**, 562 (1927).
- 11) Scott, D. A. and Parker: Trans. Roy. Soc., Canada III 26, V. 311 (1932).
- 12) Gerlough, T. D. and R. W. Bates: J. Pharm. Exp. Therap., **45**, 27 (1932).
- 13) Abel, J. J.: Proc. Nat. Acad. Sci., **12**, 132 (1926).
- 14) Scott, D. A.: Biochem. J., **28**, 1595 (1934).
- 15) Fisher, A. M. and D. A. Scott: Biochem. J., **29**, 1055 (1935).
- 16) Dudley, H. W.: Biochem. J., **18**, 665 (1924).
- 17) Dodds, E. C. and F. Dickens: Brit. J. Exp. Path., **5**, 115 (1924).

Summary

As the method of purifying insulin several processes have been proposed, such as (1) isoelectric precipitation process, (2) sodium hydrochloride precipitation process, (3) organic solvent process, (4) phosphate buffer process. Studying on these processes, the author found that phosphate buffer process produced the highest potent insulin, while the best yield of insulin was given by organic solvent process.

The water content of acetone used as the precipitant had certain influences upon the precipitation of insulin, 98% acetone being the most favourable.