

有機チオール化合物による砒素解毒に関する実験的研究

第 I 編

各種乳汁蛋白表在性 SH 基の定量及び之と
砒素との結合に関する研究

岡山大学医学部小児科教室 (主任: 浜本教授)

守 田 哲 朗

〔昭和 34 年 3 月 31 日受稿〕

I. 緒 言

第 I 編に於いて、私は、砒素が、乳汁蛋白活性 SH 基と結合するや否やを、ポーラログラフ的に検討し、これを証明し得なかつた。ここに私は、光電比色法による乳汁蛋白表在性 SH 基の定量法を用い、この点を追求してみた。光電比色法による蛋白表在性 SH 基の定量法は、Anson¹⁾、Barron²⁾、梶田氏³⁾等により報告されているが、未だ乳汁蛋白に応用された事はない。私は、梶田氏法を一部改良し、乳汁蛋白表在性 SH の定量法に成功し、次いで、種々濃度の砒素を、乳汁に添加し、蛋白表在性 SH 基と砒素との反応を実験的に検討する事を得たので、以下その成績に就いて報告する。

(ここに言う表在性 SH 基とは、Barron²⁾の提唱する Freely reacting SH group で、蛋白質表面に存在し、ニトロプルシッド反応陽性で、メルカプチッド形成剤のみならず各種の酸化剤と容易に反応する SH 基を意味している)。

II. 実 験 材 料

1. 試薬及び被験乳汁

(1) 標準亜砒酸溶液・砒素換算量 10^{-6} M/cc 溶液…… As_2O_3 (和光純薬、試薬特級) 19.78 mg を純水で 200 cc に溶解したもの。

(2) 1×10^{-5} M/cc フェリチアン化カリウム溶液: Potassium ferricyanide (関東化学製、試薬特級) 658.5 mg を純水で 200 cc に溶解したもの。

(3) pH 7.38 及び 5.29 磷酸緩衝液: $1/15$ MKH_2PO_4 20 cc と $1/15$ M Na_2HPO_4 80 cc を混じり pH 7.38 の緩衝液を、又、 $1/15$ M KH_2PO_4 97.5 cc と $1/15$ M Na_2HPO_4 2.5 cc を混じり pH 5.29 の緩衝液

を作製した。

(4) 硫酸アンモニア (片山化学製、試薬一級)

(5) 生人乳: 搾乳直後の新鮮乳を使用した。

(6) 調整粉乳: 明治ソフトカード L 粉乳を 18% に溶解し使用した。

(7) 市販牛乳

2. 装 置

(1) 光電比色計 Coleman Model 14 Universal Spectrophotometer.

(2) pH メーター Beckmann 製 (Model H-2).

III. 実験方法及び実験成績

A. 梶田氏法変法による各種乳汁蛋白表在性 SH 基の定量に就て。

1. 実験方法

梶田氏法の実験原理は、Potassium ferricyanide + R-SH \rightarrow Potassium ferrocyanide + R-S-S-R で、Ferricyanide が、Ferrocyanide に変るに従い褪色する事を利用したものである。

原法は、蛋白溶液にフェリチアンカリを作用させ、次いで、除蛋白の目的に、トリクロール醋酸を使用している。然るに、原法によれば、乳汁蛋白は、除蛋白後、尚、脂肪に帰因する白濁を残し、比色し得ない。この白濁は、エチルアルコール、エーテル、クロロホルムによつても消失し得なかつたので、硫酸アンモニアで除蛋白を行つた処、始めて、清澄な溶液を得、次の如く、梶田氏変法を試みた。

即ち、 1×10^{-5} M フェリチアンカリ液 1 cc に各種乳汁 (0, 1, 2, 3, ……7, 8 cc) と、磷酸緩衝液 (pH 7.38) 1 cc とを加えて、純水で全量 10 cc とし、次に、これをよく振盪混和、常温で 30 分間放置し、各々に硫酸アンモニア 7 gr 宛加え、混和振盪、20 分間放置、

後東洋濾紙 No. 7 で濾過し、濾液をキューベット (14-302 B, Round Cuvette 19×105 mm) で 420 mμ の波長で比色した。比色計に示された値から、残余フェリチアンカリモル数を求め、このモル数を10モ

ルから差引いた値を SH 基モル数とする。

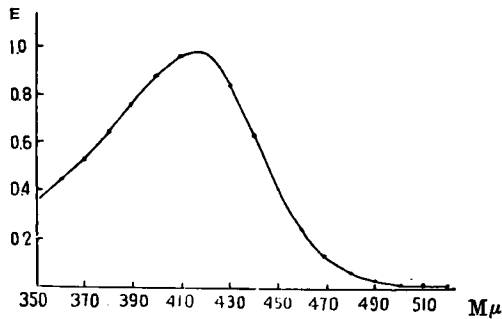
2. 実験成績

1×10⁻⁶ M フェリチアンカリの吸光曲線は、第1表、第1図の如く、吸光度は、420 mμ が最高であ

第 1 表

波 長	350mμ	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
透過度	42.0	35.5	29.3	22.5	17.0	13.2	11.0	10.8	14.2	23.2	39.3	57.8	75.0	88.0	95.0	97.0	99.0	99.5
吸光度	0.378	0.450	0.530	0.648	0.770	0.880	0.960	0.970	0.840	0.630	0.403	0.238	0.124	0.056	0.022	0.010	0.005	0.002

第 1 図



つた。従つて、爾後の実験は、420 mμ の波長で行つた。

次に、フェリチアンカリ (0, 2×10⁻⁶ M, 4×10⁻⁶ M, 6×10⁻⁶ M, 8×10⁻⁶ M, 10×10⁻⁶ M) の吸光度を調べ、検量曲線を描くと、第2表、第2図の如く、直線となり、定量法として充分使用出来る事が判つた。

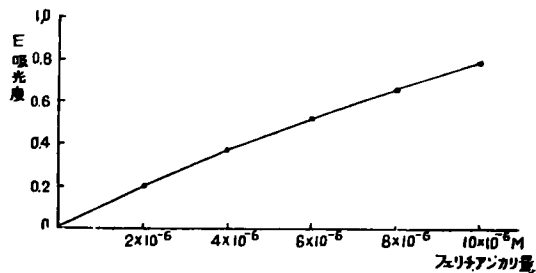
更に、これを用いた人乳、調整粉乳及び市販牛乳 (0, 1, 2……7, 8 cc) の表在性 SH 基量の測定値は、第3表、第3図の如くであつた。

即ち、人乳、調整粉乳及び市販牛乳の表在性 SH

第 2 表

フェリチアンカリ量		0	2×10 ⁻⁶ M	4×10 ⁻⁶	6×10 ⁻⁶	8×10 ⁻⁶	10×10 ⁻⁶
1	透過度 T	100.0	62.5	42.1	30.5	22.2	16.8
	(吸光度 E)	(0.000)	(0.203)	(0.374)	(0.515)	(0.655)	(0.775)
2	T	100.0	63.2	42.0	30.0	22.5	16.0
	(E)	(0.000)	(0.198)	(0.375)	(0.522)	(0.650)	(0.790)
3	T	100.0	64.0	43.1	30.8	22.2	16.0
	(E)	(0.000)	(0.193)	(0.365)	(0.512)	(0.655)	(0.790)
4	T	100.0	64.0	42.0	29.8	22.1	16.5
	(E)	(0.000)	(0.193)	(0.375)	(0.528)	(0.656)	(0.785)
5	T	100.0	63.2	43.0	30.6	22.0	17.0
	(E)	(0.000)	(0.198)	(0.367)	(0.513)	(0.658)	(0.770)
平均	T (E)	100.0 (0.000)	63.4 (0.197)	42.4 (0.371)	30.3 (0.518)	22.2 (0.655)	16.5 (0.785)

第 2 図



基量と乳汁量との関係は、殆ど直線となり、この梶田氏法変法が、乳汁蛋白表在性 SH 基定量に使用し得る事を知つた。

各乳汁の表在性 SH 基量は、人乳： 1.48×10⁻⁶ M/cc, 調整粉乳： 2.06×10⁻⁶ M/cc, 市販牛乳： 1.3×10⁻⁶ M/cc となり、調整粉乳が、最も多く、次いで、人乳、市販牛乳の順であつた。

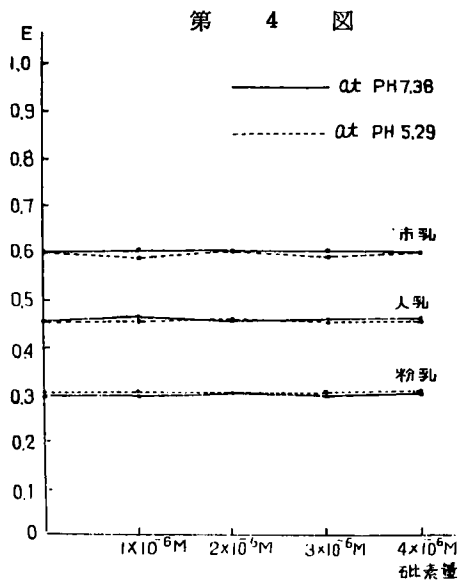
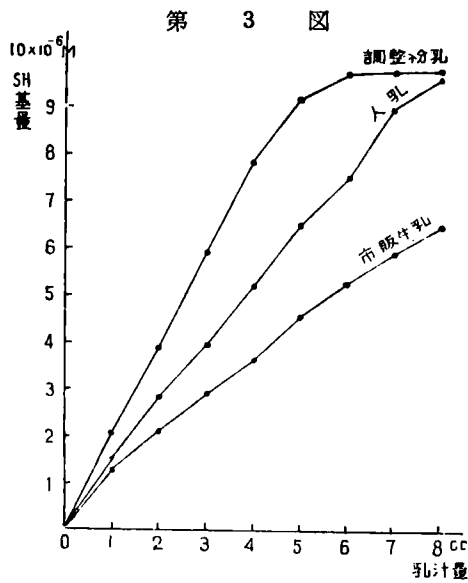
B. 乳汁蛋白表在性 SH 基と亜硫酸との反応に就て

1. 実験方法

乳汁 4 cc に、磷酸緩衝液 1 cc 及び亜硫酸溶液 (0, 1, 2, 3, 4 cc) を加え、純水で全量 9 cc とした。これを振盪混和、37°C 恒温槽中に30分間放置、フェリチアンカリを夫々 1 cc 加えて再び30分間放置、

第 3 表

乳汁量		0 cc	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc
人	1	T (E)	20.6 (0.685)	24.8 (0.605)	30.3 (0.518)	38.5 (0.415)	49.5 (0.305)	60.8 (0.218)	85.2 (0.068)	95.2 (0.021)
	2	T (E)	20.8 (0.682)	25.0 (0.600)	30.0 (0.521)	39.0 (0.409)	49.5 (0.305)	60.8 (0.218)	82.6 (0.083)	90.0 (0.045)
	3	T (E)	20.0 (0.775)	24.8 (0.605)	29.5 (0.530)	36.2 (0.440)	47.2 (0.325)	58.5 (0.232)	83.0 (0.081)	93.0 (0.032)
	4	T (E)	20.4 (0.690)	25.0 (0.600)	30.0 (0.521)	36.6 (0.438)	46.5 (0.332)	55.2 (0.258)	72.0 (0.143)	92.2 (0.035)
	5	T (E)	20.2 (0.695)	25.2 (0.598)	29.0 (0.535)	35.5 (0.450)	44.0 (0.367)	54.2 (0.265)	70.2 (0.152)	87.0 (0.060)
調整粉乳	平	T (E)	20.4 (0.690)	25.0 (0.600)	29.8 (0.525)	37.2 (0.430)	47.3 (0.327)	57.9 (0.238)	78.6 (0.105)	91.5 (0.038)
	1	T (E)	24.8 (0.605)	29.0 (0.535)	41.8 (0.378)	58.6 (0.230)	81.2 (0.089)	94.0 (0.026)	94.2 (0.025)	94.8 (0.023)
	2	T (E)	21.3 (0.670)	30.0 (0.522)	41.7 (0.380)	60.7 (0.217)	84.5 (0.072)	93.8 (0.028)	94.0 (0.026)	94.8 (0.023)
	3	T (E)	21.1 (0.671)	29.7 (0.528)	42.8 (0.368)	64.4 (0.190)	82.0 (0.086)	92.0 (0.035)	93.2 (0.030)	94.5 (0.024)
	4	T (E)	23.0 (0.638)	29.5 (0.530)	42.0 (0.385)	62.5 (0.203)	81.5 (0.088)	94.8 (0.023)	94.8 (0.023)	94.5 (0.024)
5	T (E)	20.1 (0.691)	29.2 (0.532)	42.4 (0.371)	61.0 (0.215)	85.5 (0.068)	92.2 (0.035)	93.2 (0.030)	94.2 (0.024)	
平	T (E)	22.1 (0.655)	29.5 (0.530)	42.1 (0.376)	61.4 (0.211)	82.9 (0.081)	93.4 (0.029)	93.9 (0.027)	94.6 (0.024)	
市販牛乳	1	T (E)	20.0 (0.700)	23.0 (0.638)	26.3 (0.580)	29.2 (0.532)	34.2 (0.465)	38.5 (0.415)	43.7 (0.360)	48.5 (0.313)
	2	T (E)	19.1 (0.720)	21.3 (0.670)	24.2 (0.615)	27.2 (0.565)	31.8 (0.497)	36.3 (0.440)	39.7 (0.400)	44.5 (0.360)
	3	T (E)	20.1 (0.691)	23.0 (0.638)	26.0 (0.582)	29.0 (0.538)	34.0 (0.469)	38.2 (0.418)	43.0 (0.365)	48.9 (0.310)
	4	T (E)	20.7 (0.685)	23.2 (0.632)	25.8 (0.588)	29.0 (0.538)	33.5 (0.476)	37.8 (0.422)	42.5 (0.370)	48.3 (0.315)
	5	T (E)	19.4 (0.715)	22.0 (0.660)	24.8 (0.605)	27.5 (0.560)	32.2 (0.490)	36.5 (0.438)	40.5 (0.393)	46.0 (0.338)
平	T (E)	19.9 (0.702)	22.5 (0.648)	25.4 (0.594)	28.4 (0.546)	33.2 (0.479)	37.5 (0.427)	41.9 (0.378)	47.2 (0.327)	
均	T (E)	10.0 × 10 ⁻⁶ M	7.9 × 10 ⁻⁶ M	7.1 × 10 ⁻⁶ M	6.37 × 10 ⁻⁶ M	5.45 × 10 ⁻⁶ M	4.75 × 10 ⁻⁶ M	4.1 × 10 ⁻⁶ M	3.51 × 10 ⁻⁶ M	
含有	T (E)	1.3 × 10 ⁻⁶ M	2.1 × 10 ⁻⁶ M	2.9 × 10 ⁻⁶ M	3.63 × 10 ⁻⁶ M	4.55 × 10 ⁻⁶ M	5.25 × 10 ⁻⁶ M	5.9 × 10 ⁻⁶ M	6.49 × 10 ⁻⁶ M	



第 4 表

pH			砒素量				
			$0 \times 10^{-6}M$	$1 \times 10^{-6}M$	$2 \times 10^{-6}M$	$3 \times 10^{-6}M$	$4 \times 10^{-6}M$
7.38	1	T	34.5	34.5	35.5	35.0	34.5
		(E)	(0.462)	(0.462)	(0.450)	(0.455)	(0.462)
		2	T	35.2	35.0	35.2	34.5
	(E)	(0.453)	(0.455)	(0.453)	(0.462)	(0.455)	
3	T	35.2	35.2	35.5	35.2	35.0	
	(E)	(0.453)	(0.453)	(0.450)	(0.453)	(0.455)	
	平均	T	35.0	34.9	35.4	34.9	34.8
(E)	(0.455)	(0.458)	(0.451)	(0.458)	(0.458)		
5.29	1	T	35.5	35.2	35.0	35.2	34.9
		(E)	(0.450)	(0.453)	(0.455)	(0.453)	(0.458)
		2	T	34.5	35.5	34.5	35.0
	(E)	(0.462)	(0.450)	(0.462)	(0.455)	(0.450)	
3	T	35.5	35.5	35.2	35.5	35.0	
	(E)	(0.450)	(0.450)	(0.453)	(0.450)	(0.455)	
	平均	T	35.2	35.4	34.9	35.2	35.1
(E)	(0.453)	(0.451)	(0.458)	(0.453)	(0.454)		

その後、硫酸アンモニアを夫々7 gr 加え、振盪混和、20分後に濾過して比色した。尚、磷酸緩衝液としては、pH 7.38 と pH 5.29 の2種類に就て行つた。

2. 実験成績

(1) 人乳

成績は、第4表、第4図に示す如く、pH 7.38 並びに、pH 5.29で、人乳に砒素を作用せしめても、人乳表在性 SH 基量の減少は全く認められなかつた。即ち、人乳の表在性 SH 基と砒素との結合は、生じない事が判る。

(2) 調整粉乳

成績は、第5表、第4図に示す如く、この場合も、

人乳と同様、表在性 SH 基と砒素との結合は生じなかつた。

(3) 市販牛乳

第6表、第4図に示す如く、この場合も、同様の成績であつた。

IV. 考 察

蛋白 SH 基の研究方法は、(1) Mercaptid 形成法、(2) 酸化法、及び、(3) アルキール化法に大別される²⁾。前編で報告したポーラログラフ法は、乳汁蛋白活性 SH 基に砒素を作用せしめ、Thioarsenite の形成の有無を調べたもので、Mercaptid 形成法に属するものである。然し、Anson¹⁾は、何れの SH 基定量法

第 5 表

pH	砒素量		0×10 ⁻⁶ M	1×10 ⁻⁶ M	2×10 ⁻⁶ M	3×10 ⁻⁶ M	4×10 ⁻⁶ M
			1	T (E)	51.0 (0.292)	50.2 (0.298)	50.0 (0.300)
7.38	2	T (E)	50.0 (0.300)	51.8 (0.286)	50.0 (0.300)	51.0 (0.292)	50.0 (0.300)
	3	T (E)	51.0 (0.292)	50.2 (0.298)	49.8 (0.302)	50.0 (0.300)	51.0 (0.292)
	平均	T (E)	50.7 (0.295)	50.7 (0.295)	49.9 (0.301)	50.6 (0.295)	50.3 (0.297)
5.29	1	T (E)	48.0 (0.318)	48.8 (0.310)	48.0 (0.318)	49.2 (0.305)	48.0 (0.318)
	2	T (E)	49.2 (0.305)	50.0 (0.300)	50.8 (0.294)	49.2 (0.305)	50.0 (0.300)
	3	T (E)	51.1 (0.294)	50.0 (0.300)	50.8 (0.294)	49.2 (0.305)	50.0 (0.300)
	平均	T (E)	49.4 (0.305)	49.6 (0.303)	49.6 (0.303)	49.8 (0.301)	49.3 (0.306)

第 6 表

pH	砒素量		0×10 ⁻⁶ M	1×10 ⁻⁶ M	2×10 ⁻⁶ M	3×10 ⁻⁶ M	4×10 ⁻⁶ M
			1	T (E)	24.8 (0.602)	25.2 (0.598)	25.2 (0.598)
7.38	2	T (E)	24.8 (0.602)	24.8 (0.602)	25.0 (0.600)	25.0 (0.600)	25.2 (0.598)
	3	T (E)	25.0 (0.600)	25.0 (0.600)	25.2 (0.598)	25.0 (0.600)	24.8 (0.602)
	平均	T (E)	24.9 (0.601)	25.0 (0.600)	25.1 (0.599)	25.1 (0.599)	25.1 (0.599)
5.29	1	T (E)	25.2 (0.598)	26.2 (0.580)	25.2 (0.598)	26.2 (0.580)	25.2 (0.580)
	2	T (E)	24.8 (0.602)	26.0 (0.582)	25.4 (0.595)	26.2 (0.580)	25.4 (0.595)
	3	T (E)	25.0 (0.600)	25.4 (0.595)	25.2 (0.598)	25.0 (0.600)	25.2 (0.598)
	平均	T (E)	25.0 (0.600)	25.9 (0.586)	25.3 (0.597)	25.8 (0.587)	25.3 (0.597)

も未だ完全とはいえず、従つて、測定原理の異つた場合の成績が一致する時に、初めてその値に信頼性を置きうると言つている。そこで、私は、乳汁蛋白SH基をフェチアンカリ還元法で測定し、その成績が、前編のそれに一致するか否かを検討してみた。このフェリチアンカリによる蛋白表在性SH基定量法は、古く Anson¹⁾ が、卵アルブミンに就て考案し、これを、Barron²⁾ が改良して普及したものである。この Anson, Barron の方法は、蛋白SH基がフェリチアンカリを還元して得られたフェロチアンカリに、硫酸第二鉄を加えて、プルシアン青を発

色し、これを比色定量するものである。然し近年、梶田氏³⁾は、SH基により褪色されずに残留したフェリチアンカリ其者を比色する簡便法を考えた。私は、本法を更に改良し、硫安除除蛋白漏液を用いて定量したが、その検量曲線は直線を呈し、本改良法を以て、一応簡便且つ正確な乳汁蛋白表在性SH基定量法と考える。

これによると、人乳、調整粉乳及び市販牛乳の中で表在性SH基量は、調整粉乳が一番多く、次いで、人乳、市販牛乳の順であり、調整粉乳は市販の約2倍を有していた。この成績は、近年の粉乳栄養児の

発育が良好である事と関連せしめると非常に興味ある知見である。

既に、第I編に報告した如く、ポーラログラフ的検索によつては、乳汁蛋白活性 SH 基と砒素との結合を証明する事は出来なかつた。比色定量法による本実験に於いても、乳汁蛋白表在性 SH 基と砒素は結合せず、これら両実験より砒素と乳汁蛋白 SH 基とは、試験管内で容易に結合しないものである事が判つた。かかる乳汁蛋白 SH 基と砒素との結合を検討した報告は、未だ存在しない。然し、システイン及びグルタチオンの SH⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾は、砒素と容易に結合すると報告されており、この事に就ては、編を改めて報告する。

以上、私の実験よりみれば、今回の粉乳砒素中毒事件に於いて、乳汁蛋白 SH 基と砒素との結合による砒素の弱毒化は期待出来なかつた様である。私は、第I編で、蛋白表面活性度が、砒素の陰極面に於ける拡散吸着を抑制する事を証明したが、果して、この乳汁蛋白の表面活性度が砒素の吸収をさまたげてその中毒を防止するに役立つであろうか。亜砒酸中毒に、膠状水酸化物である Fe(OH)₃を服用せるのは、砒素を Fe(OH)₃の表面に吸着させ吸収を防止するにある。然し、乳汁蛋白は、Fe(OH)₃と異つて、消化酵素により消化分解されるから、その暁には砒素の吸着吸収をさまたげえなくなり、引いては砒素の弱毒化に関して、大した意義を持ち得ないと思ふ。

次に、乳汁蛋白は、多量の硫黄化合物を含有し⁽⁷⁾⁽⁸⁾、乳児にとつて硫黄の唯一の給源となつている。従つて、乳児体内の代謝課程に重要な働きを有しているチオール酵素、その他のチオール化合物は、すべてこの乳汁蛋白硫黄に由来する。たまたま、この豊富なチオール化合物をもつ粉乳を砒素と同時に摂取した場合、この硫黄が、砒素により侵害された体内チオール酵素の補給源ともなり、同時に、砒素と結合したチオール蛋白から再び砒素を奪取解毒する上に

役立つとも考えられる。

又、粉乳砒素中毒事件の飲用粉乳並びに、加工に使用された磷酸ソーダ中から検出された砒素は、Na₃P O₄, Na₃As O₄, Na F の複塩であるといわれており⁹⁾、又松谷氏¹⁰⁾は、こはをポーラログラフ的に検討し、砒酸であつたと報じている。5価の砒素化合物が、生体に摂取されると、3価に還元されて始めて毒性を発する(Loew)¹¹⁾とされ、又、5価の化合物は、速かに排泄されるとも言われる¹²⁾。これらの点より、砒酸による中毒は、亜砒酸によるよりも、症状発現が、緩慢且つ軽度であると考えられ、今回の粉乳砒素中毒症の経過が緩慢で、症状が軽度であつたのもこれが砒酸中毒であつた為ではなからうか。

V. 結 論

1) 乳汁蛋白表在性 SH 基の梶田氏色定量法を脱蛋白脱脂肪操作に硫酸アンモニアを使用する如く改良した。

2) 乳汁蛋白表在性 SH 基量は全乳濃度に溶解した調整粉乳が最も多く、次いで、人乳、市販牛乳の順であつた。

3) 乳汁に亜砒酸を作用せしめても、その蛋白の表在性 SH 基量は減少しなかつた。即ち、砒素との結合は生じなかつた。

摺筆するに当り、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師浜本教授に衷心より深謝致します。又、実験に因し、有益な御助言を頂いた木本助教授、古谷講師、鳥場博士に謝意を表します。

(本論文の要旨は、浜本教授により、文部省総合研究「有機チオール化合物による解毒」研究班第5回協議会(昭和32和12月)及び、乳幼児栄養研究委員会第4回協議会(昭和33年5月)に報告された)。

文 献

- 1) Anson, L., J. Gen. Physiol. : 24 ; 399, 1941.
- 2) Barron, G., Advances in Enzymol. : 11 ; 223, 1951.
- 3) 梶田昭彦, 生化学 : 26 ; 547, 昭30.
- 4) Vogetlin, C. et al. : U.S. Publ. Hlth. Rep. 38 ; 1882, 1923. (Stocken et al. : Physiol. Revs., 29 ; 168, 1948より引用)
- 5) Eagle, H. : J. Pharmacol. Exptl. Therap., 66 ; 436, 1939.
- 6) Barron, G. et al. : J. B. C. 157 ; 221, 1945.
- 7) Holt : Pediatrics ; 220, 1953.
- 8) Williamson, M. : J. B. C. 156 ; 47, 1944.
- 9) 永井他 : 小児科紀要, 1 ; 248, 1955より引用.
- 10) 松谷衛他 : 広島衛研所報, No. 6 ; 31, 昭31.

- 11) Loew, 山崎英正：岡山県に於ける粉乳砒素中毒症発生記録, 238より引用. 12) 山口寿：臨床より見たる薬理学の実際, 347, 昭14.
-

**Experimental Studies on the Antidote of Arsenic Poisoning with
the Use of Organic Thiol-compounds**

**Part II. The estimation of freely reacting SH-group of various
milk proteins and the binding of the SH-group with arsenic**

By

Teturo Morita

Department of Pediatrics Okayama University Medical School
(Director: Prof, Eiji Hamamoto)

1. In the estimation of freely reacting SH-group of milk proteins by the electric photometer, the Kajita method is modified so as to use ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, in deproteinization-defatting processes.

2. The quantity of the freely reacting SH-group of milk proteins is greatest in regulated powdered milk dissolved to the concentration of the whole milk, followed by that in fresh human milk and milk on the market.

3. Even when the arsenic acid solution is made to act on liquid milk, no decrease in the freely reacting SH-group of milk protein can be recognized. In other words, no binding occurs between the freely reacting SH-group arsenic.
