

岡山医学会雑誌

第70巻2号(748号)

昭和33年2月28日発行

546.284 : 541.183

珪酸の蛋白吸着に関する研究

岡山大学医学部公衆衛生学教室(主任・大田原一祥教授)

助手 井上武夫

[昭和32年12月23日受稿]

第1章 緒言

珪肺症病因に関して特に微細な遊離珪酸粉塵が珪肺症の発生に対し重大な意義を持つ所から、その表面積の大なる点が此の原因をなすのではないかと云う事が容易に推定される。表面積が大なる事はその表面に於ける化学的变化を受けやすく、溶解度が高められると云う点及びその表面に於ける蛋白の吸着量が大となる点に意義を有するものである。

此の点について King¹⁾ は珪酸粉塵表面に種々なる物質を吸着せしめその態度を研究している。

彼等は溶解説の見地より、酸化アルミニウム粉末を珪酸粉塵と共に吸入せしめるならば珪肺の発生が防止出来ると云う事実から種々の金属塩が珪酸粉塵表面に吸着された場合に珪酸の溶解度にどのような影響を与えるかを調べて、アルミニウムを吸着させた場合に溶出量が最も少ない事を見ている。

他方珪酸表面の蛋白吸着現象については古くより知られ、補体非働化にしばしば用いられているが²⁾ 濃度及び pH 変化の影響を系統的に研究した Holt³⁾ 及び Scheel⁴⁾ の報告に若干の差異が認められる。

筆者は此等を明らかにするために無水珪酸粉末及び石英粉末に吸着された卵白アルブミン及び海溟血清、海溟肝臓組織液についてネスレル法により測定し若干の知見を得たので此処に報告する。

第2章 測定器具、試薬、材料及びに

実験方法

A) 測定器具、試薬、材料

1) 測定器具

- Beckmann 型水晶光電分光光度計
- Cuvett
- 小試験管
- Kjeldahl 消化管
- ガラス球

2) 試薬

- クエン酸緩衝液
- 磷酸緩衝液
- ネスレル試薬
- 標準液

(NH₄)₂SO₄ 0.4716 g を蒸溜水に溶かして全量を 1 l にし H₂SO₄ 数滴を加えこれを標準液とした。

この溶液 1 cc は 0.1 mgN に相当する。

e) 消化液

HgO 0.8 g 及び K₂SO₄ 40 g に蒸溜水 40 cc を加え、H₂SO₄ 43.5 cc を滴下し冷却しない内に蒸溜水で総量 200 cc とし冷却後蒸溜水を加えて総量を 250 cc とする。

3) 実験材料

a) 結晶卵白アルブミン

7%生理的食塩水溶液を原液として用いた。

b) 海溟血清

c) 海溟肝臓エムルチオン

共に Biuret 反応により 7%の卵白アルブミンと同一蛋白量を含む如く調整しそれを原液として用いた。

d) 無水珪酸粉末(市販品)

e) 純結晶性石英粉末(日本光学)

B) 実験方法

小試験管にシリカ 200 mg を取り、最終濃度を M/30 になる如く緩衝液を加え一定の pH に調整した生理的食塩水により所定の濃度に希釈した蛋白液を 5 cc 加え、泡立てぬ様によく振盪して 37°C の孵卵器中に横たえる。

30分に1回の割で回転させ24時間乃至48時間後とり出し遠心分離して上清を除去し、夫々前に用いた緩衝液を加えた生理的食塩水で3回洗滌し、最後に遠心分離を行いその上清を除去する。

次いで少量の蒸留水で振盪して沈澱残渣を消化管に洗い込む。

消化液 0.7 cc を加えガラス球2個と共に残渣が白色になる迄注意しつつ徐々に充分加熱消化を行う。

消化が完全に行われたならば冷却後蒸留水 5 cc を加えて水浴中で振盪し完全に溶解したのちにその適当量を小試験管にとり遠心分離してその上清 1 cc を試験管に取り蒸留水 3 cc ネスレル試薬 1.5 cc を加えて発色せしめ10~15分後光電分光光度計により波長 460 m μ に於ける吸光度を測定する。

なお蛋白量が多いと予想されるものについては消化液を適当に増加し、消化後の溶解蒸留水の量もそれに比例して増加せしめた。

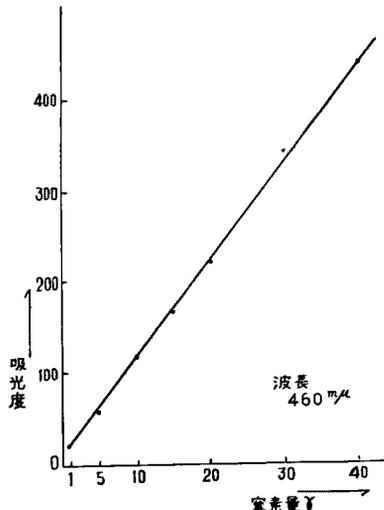
比色後検量曲線により測定値を得稀釈倍数を乗じて全量を求める事は云うまでもない。

第3章 実験結果

A) 検量曲線

1 cc 中 0.1 mgN を含む硫酸アンモン標準液を一

第1図 検量曲線



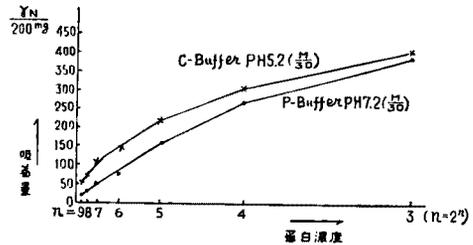
定量とり上述の如く発色せしめ波長 460 m μ に於ける吸光度を調べると第1図の如くなる。

即ち横軸には窒素量を γ で表わし縦軸には波長 460 m μ に於ける吸光度をとると図の如く検量曲線は 1 γ より 40 γ までは直線をなす。

B) pH 5.2 及び pH 7.2 に於ける卵白アルブミン吸着曲線

卵白アルブミン 7% 生理的食塩水溶液を原液として倍数希釈を行い pH 5.2 及び 7.2 における吸着量の変化を求め両者を比較したのが第2図である。

第2図 蛋白濃度と吸着量



横軸は蛋白濃度をその稀釈倍数で示し、縦軸は蛋白液 5 cc から無水珪酸粉末 200 mg に吸着された吸着蛋白量を窒素量で示す。単位は γ である。

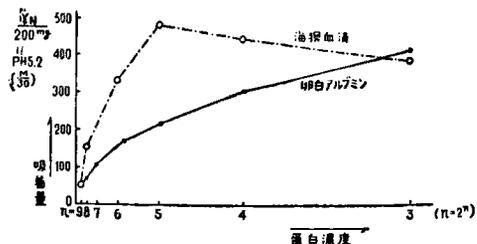
図に於て明らかな如く pH 5.2 の場合の方がすべての蛋白濃度に於て多量の吸着量を示しているがこのふたつの曲線は蛋白濃度と吸着量の関係から見るとほぼ同様の傾向を示していると云い得る。

pH 5.2 の方はクエン酸緩衝液を用い、pH 7.2 の方は磷酸緩衝液を用い共にその終末濃度は M/30 とした。吸着時間は24時間である。

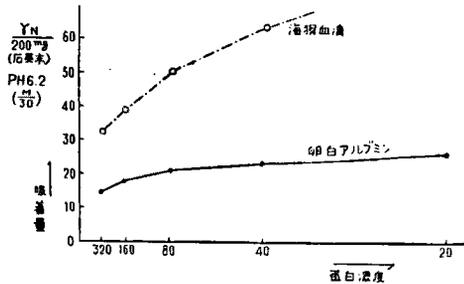
C) 同一 pH に於ける卵白アルブミンと海環血清との吸着曲線の比較

同一 pH に於てふたつの異つた蛋白即ち卵白アルブミンと海環血清の吸着にどの様な差が見られるかを調べた所第3図及び第4図に見る如く両者の吸着量を比較した場合海環血清のそれの方がはるかに多量である。

第3図 蛋白の種類と吸着曲線



第4図 蛋白の種類と吸着曲線

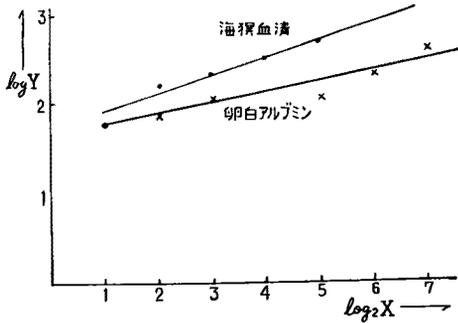


前述の如く卵白アルブミンは7%生理的食塩水溶液を用い海馬血清はビュレット法により7%卵白アルブミン溶液と同様の蛋白量を含有する如く調製し、吸着操作はすべて前述の如く行つた。

第3図に示したものは pH 5.2 に於て無水珪酸粉末 200 mg に吸着されたものを示し、第4図に示すものは pH 6.2 に於て石英末 200 mg に吸着されたものを示す。吸着時間は前者が24時間、後者が48時間である。

第3図に於ける両軸の対数を取ると、第5図に示す如く或る範囲内ではこのふたつの曲線が直線をなすことから Freundlich⁵⁾の恒温吸着式によりこの現象が吸着現象である事が推定される。

第5図 蛋白の種類と吸着曲線

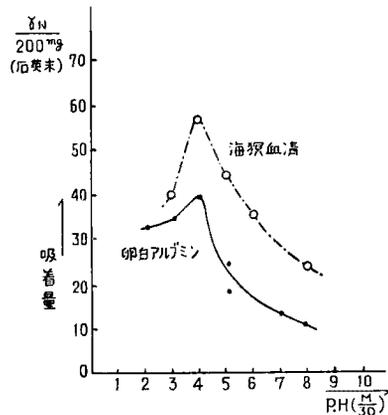


D) pH の変化が吸着量に及ぼす影響について pH の変化が吸着量に対してどのように影響するかを調べるために pH を2~8まで変化させて石英粉末 200 mg に吸着された卵白アルブミン並びに海馬血清の量を比較すると第6図に示す如き結果を得た。

pH 5 より酸性側はクエン酸緩衝液を、pH 5 よりアルカリ性側は磷酸緩衝液を用い、海馬血清、卵白アルブミン共に7%相当濃度の液を原液としその200倍稀釈液を用いた。

吸着時間は48時間である。横軸には pH を示し縦

第6図 各 pH に於ける吸着の変化



軸には 5 cc の蛋白溶液から石英粉末 200 mg に吸着された蛋白量を窒素量で示した。単位は7である。

本図に於て吸着量はいずれも pH 4 附近で最大であり酸性側にゆるくアルカリ性側に急激な減少を示している。

海馬血清は卵白アルブミンに比して各 pH に於いて多量の吸着量を示しており海馬肝臓エムルチオンは更に多量の吸着量を示したがこの点についてはなお今後の検討を要する様に思われるので表には示さなかつた。

第4章 総括並びに考按

前述の Holt 及び Scheel の結果と本論文に於ける結果を比較すると蛋白液濃度と吸着蛋白量との関係については Holt は吸着後の蛋白液について Langmuir-Alexander の単分子法を用いて測定し吸着前の蛋白液との差から吸着蛋白量を求め、或る点に達するまでは直線状に上昇し後一定になるとしておる。

他方 Scheel は Micro-Kjeldahl によつて直接珪酸に吸着された蛋白について測定を行い、横軸に蛋白液濃度を取り縦軸に吸着蛋白量を取りコンカーブに近い曲線を発表している。

然しながらこの現象が吸着現象であるならば Scheel の結果は理論的にもうなずき難く、筆者の得た結果もむしろ Holt の報告に近いと云いうる。

他方 pH の変化に伴う蛋白吸着量の変化について Holt は pH 5 と 6 の間に於て吸着量が最大で酸性側並びにアルカリ性側に減少した曲線を得ており、Scheel は酸性側に最大でアルカリ性側に急激な減少を示す曲線を得た。

筆者は卵白アルブミン及び海狼血清について測定を行い pH 4 附近に最大で酸性側にゆるやかにアルカリ性側に急激な減少を示す曲線を得た。

この結果は Holt の報告にはほぼ一致しているが最大の山の位置がやや酸性側にずれている。これは Holt が牛血清アルブミンを用いていることから材料による差かも知れない。

第5章 結 論

- 1) 珪酸粉末はその表面に蛋白を吸着する。
- 2) 吸着量は或る範囲内で濃度の濃い程増加する。
- 3) 吸着量は pH に影響されその作用は pH 4 附

近に於て最大であり酸性側に徐々にアルカリ性側に急激に減少する。

- 4) 卵白アルブミンよりも海狼血清の吸着量が多い。

稿を終るに臨み御指導御校閲を賜つた恩師大田原教授並びに緒方助教授に深謝すると共に石英粉末の御恵与を賜つた労働省研究所坂部弘之博士に感謝の意を表す。

(本論文要旨は昭和30年11月第65回岡山医学会総会及び昭和31年4月第26回日本衛生学会総会に於て発表した)

文 献

- 1) Dale and King: A. M. A. Arch. Indust. Hyg., Vol. 7, 484, 1953.
- 2) 坂部: 日本衛生学雑誌, Vol. 8, 29, 1953.
- 3) Holt and Bowcott: A. M. A. Arch. Indust. Hyg., Vol. 9, 503, 1954.
- 4) Scheel, Smith, Van Ripper and Fleisher: A. M. A. Arch. Indust. Hyg., Vol. 9, 27, 1954.
- 5) 化学実験学, 第1部, 第4巻, 物理化学Ⅲ, 河出書房, 昭和15年.

Studies on Adsorption of Protein on Silica

By

Takeo Inoue

Department of Public Health, Okayama University, Medical School
(Director: Prof. K. Ohtahara, M. D.)

Measuring the quantity of egg albumen and guinea pig's serum adsorbed on to silica gel and quartz powder by means of Nessler's Method, the author obtained the following results:

- 1) Silica adsorbs protein on to its surface.
 - 2) Within some limits, the higher concentration of the protein is, the more protein is absorbed.
 - 3) The quantity of adsorbed protein is affected by "pH" and reaches its maximum around "pH 4". The quantity decreases gradually in the acid side, while rapidly in the alkali side.
 - 4) Guinea pig's serum is adsorbed more than egg albumen.
-