

Donaggio 反應陽性物質の透析実験

金沢大学医学部生理学教室(主任 斎藤教授)

櫻井 昭 光

Akimitu Sakurai

(昭和27年11月5日受付)

緒 論

疲労の判定に用いられている Donaggio 反応(以下 D 反応と呼ぶ)の陽性物質(以下 D 物質と呼ぶ)が半透膜を通るか否かについて、従来多くの実験が試みられているが、その成績は報告者によつて区々である。即ち Donggio¹⁾, Rendel²⁾, 佐藤³⁾⁹⁾, 川崎⁴⁾等は、D物質は非透析性であるという。これに対し、増山⁵⁾は「コロヂウム膜による限外濾過法により、D物質の透析性を認め、その分子の大きさは Nachtblau 程度のものであるという。又山添⁶⁾, 荒木⁷⁾は Fish-skin を用いて尿を透析した結果、D物質

の一部が透析されることを認め、ことに山添は透析性の部分と非透析性の部分に分けて論じている。又吉川、石丸⁸⁾も牛膀胱膜を用いて尿を3日間透析すると、D物質の一部が透析されるという。以上のような実験成績の相違は、測定条件、就中使用する半透膜の透過性の相違に基因するものと考えられる。著者は透析膜の透過性を考慮に入れて、尿中の D物質及び本田¹⁰⁾の方法により抽出分離した D物質の透析実験を行い、二三の知見を得たから報告する。

実験方法

1) 透析膜・勝及びその門下^{13)~19)}の研究により、「コロヂウム膜は作製時の乾燥の程度により種々の透過性を有するものが得られ、且つその透過性は標準膜電位差によつて数的に表はされることが実証された。夫に依ると、「コロヂウム膜の標準膜電位差は、膜作製時の乾燥時間と平行して 0~55mV の間の値をとり、電位差の大きい程透過性低く、55mV では殆ど半透性を認める事は出来ないという。著者はこの方法¹⁴⁾にならつて容量15乃至20ccの「コロヂウム嚢を乾燥程度を変へて多数作製し、その各々について標準膜電位差を測定し¹⁴⁾、これを以て嚢の透過性を表はすことにした。「コロヂウム嚢作製法及び標準膜電位差測定に關しては原著を参照されたい。電気透析の実験では「セロファン紙(300番、400番、600番)を使用した。

2) D物質の資料としては、研究室勤務の健康男子

の尿、これより本田法¹⁰⁾によつて抽出分離した D物質溶液、及び更に酒精処理¹¹⁾により精製したもの等を用いた。

D 反応値は佐藤の標準法¹²⁾に依つて求めた。夫は本法で得られた値は陽性物質量に比例するからである。資料が尿色素で強く着色せる場合には、「コンパトール」を使用して、比色判定を行つた。

D物質の量を問題とする場合には、標準法で1点の尿 1cc 中に含まれる D物質量を1単位量(U)として表すことにした。

3) 透析方法:「コロヂウム嚢の場合、被検資料を透析嚢に入れ、之を流水中又は静水中に漬し、前者では室温(12~15°C)で3日間、後者では氷室内(0~3°C)で4日間放置した。予備実験に依り斯る条件下で透析は略平衡状態に達することを確めた。又、実

験毎に資料を容れた試験管を透析と同一条件に放置して対照となし、資料の D 反応値に腐敗等による変化のないことを確かめた。

「セロファン紙の場合、Stadie and Ross²⁰⁾(1926)の電気透析器に 2 枚の「セロファン紙を装着してその中

間に被検資料を容れ、その両側に流水を通じて透析した。流水中に立てた 2 枚の炭素板電極には 110volt の直流電源に連結し、抵抗により電流を 500~200mA の範囲に調節した。

実験成績

I 尿に就ての実験

1) 静水中の透析

予め標準膜電位差を測定した「コロヂウム嚢に 15cc の尿又は蒸餾皿上で濃縮した尿を入れ、これを 50cc の蒸餾水中に懸垂し、嚢内外の液面が同じ高さになるよう取付けた。氷室内に 4 日間放置した後、内液及び外液の量と D 反応値を測定した。外液の反応値は普通非常に低いから、屢々これを 5.0~7.5cc に濃縮して後 D 反応を実施した。液の容積 (cc) と D 反応値の積

はその液中の D 物質量を表す。嚢内に残留する非透析性の D 物質の量を求める場合には、嚢内にも透析性の D 物質が外液と同じ濃度に存在するものとして、内液の全 D 物質量よりこれを差引いて算出した。

又透析後に内外両液の D 物質の全量が資料の夫より少なくなっている場合には、その差に相当する D 物質が「コロヂウム膜に吸着されているものと考えた。

実験成績は第 1 表となる。18 回の測定を、用

第 1 表 静水中透析実験

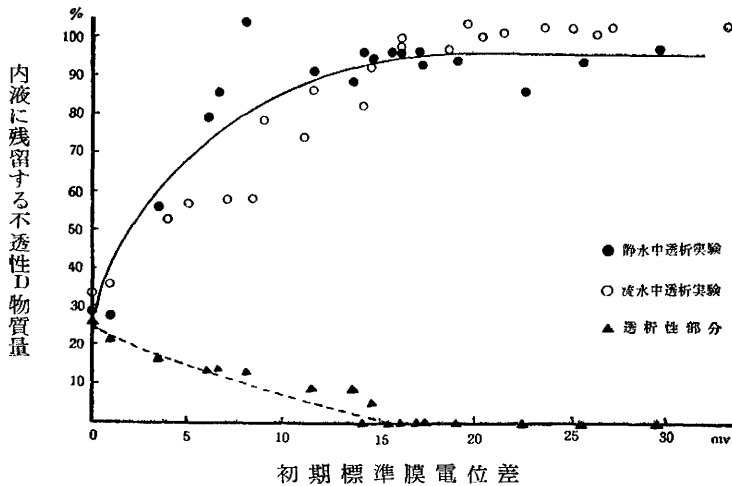
膜電位差		a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o
初	終	尿 D	15 × a	内液	内液	外液	外液	(c × d)	(e × f)	(c - e)	(d × j)	(k/b × 100)	(b - g - h)	(m/b × 100)	e(d + f) × 100
mV.	mV.	点数	D 物質全量 U.	点数	cc.	点数	cc.	内液 D 物質 U.	外液 D 物質 U.	内液不透 D 物質 U.	内液不透 D 物質 U.	内液不透 D 物質 %	吸着量 U.	吸着率 %	透析性 D 物質量 %
0	7.5	16	240	5	17.5	1	45	87.5	45	4	70	29.2	107.5	44.8	26.0
1.0	8.5	16	240	5	16	0.8	47	80	37.6	4.2	67.2	27.6	122.4	51.0	21.0
3.5	11.0	16	240	8	18	0.6	46	144	27.6	7.4	133.2	55.4	68.4	28.5	16.0
6.0	15.5	16	240	10	20	0.5	44.5	200	22.2	9.5	190	79.2	19.8	8.3	13.5
6.5	17.8	16	240	11	19.5	0.5	45	214.5	22.5	10.5	204.8	85.4	3	1.3	13.5
8.0	18.8	16	240	13	20	0.5	44	260	22	12.5	250	104.2	-32		13.3
11.5	16.5	10	150	8	17.5	0.2	47	140	9.4	7.8	136.5	91.1	0.6	0.4	8.6
13.5	18.6	10	150	9	15	0.2	49	135	9.8	8.8	132	88.0	5.2	3.9	8.5
14.0	17.5	10	150	9	16	0	48	144	0	9	144	96.0	6.2	4.0	0
14.5	19.5	16	240	10	23	0.2	40	230	8	9.8	225.4	94.0	2	0.8	5.3
15.5	17.5	10	150	8.5	17	0	48	144.5	0	8.5	144.5	96.4	5.5	3.7	0
16.0	17.7	10	150	8	18	0	45	144	0	8	144	96.0	6	4.0	0
17.0	19.0	30	450	23.5	18.5	0	45	434.8	0	23.5	434.8	96.6	15.2	3.4	0
17.2	24.1	10	150	8	17.5	0	47	140	0	8	140	93.3	10	6.7	0
19.0	22.1	26	390	21.5	17	0	46.5	365.5	0	21.5	365.5	93.7	24.5	6.3	0
22.5	28.5	10	150	8	16.1	0	48.5	128.8	0	8	128.8	85.9	21.2	14.1	0
25.5	26.3	29	435	19	21.5	0	41	408.5	0	19	408.5	93.9	26.5	6.1	0
29.5	29.0	23	345	21	16	0	47.5	336	0	21	336	97.4	9	2.6	0

いた「コロチウム囊の透析前の標準膜電位差の順に配列した。透析後にも標準膜電位差を測定した所、殆ど凡ての実験例に於て電位差の上昇を認めた。その程度は、膜電位差の低いものに於て概してより著明である。恐らくこれは尿成分の吸着に基因する現象で、標準膜電位差の低い「コロチウム膜に於ては吸着性がより著しいもの」と考える。

透析を終つた時期に於て、D物質の透析性のもは大部分が外液に、一部は内液に残る。非透析のものは内液に残る。その外に「コロチウム膜に吸着されているものが若干存在する。

標準膜電位差が15mV以上の透過性の低い囊を用いた場合、D物質は外液に全く証明されない。D物質の90%以上は内液に残留し、他は恐らく膜に吸着されているものであろう。即ち15mV以上の膜はD物質を全く通さない。

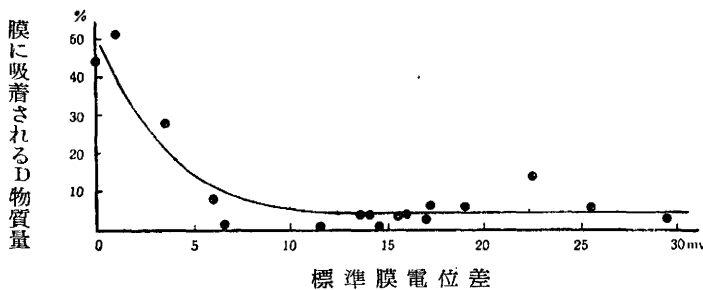
標準膜電位差が15mVより低くなるに従つて膜を通り得るD物質量は次第に増加するが、0mVの膜でも通り得ないで内液に残るD物質は全体の30%に当る。(第1図) 外液の着色の程度はそのD反応値と略々平行するから、D物質と尿色素は一般に相伴つて透析されるものと考えられる。



第1図 尿透析実験(初期標準膜電位差に関するもの)

膜に吸着されるD物質量は標準膜電位差8mV以上では全体の10%以下で略々一定であるが、8mV以下になると電位の低下と共に吸着され

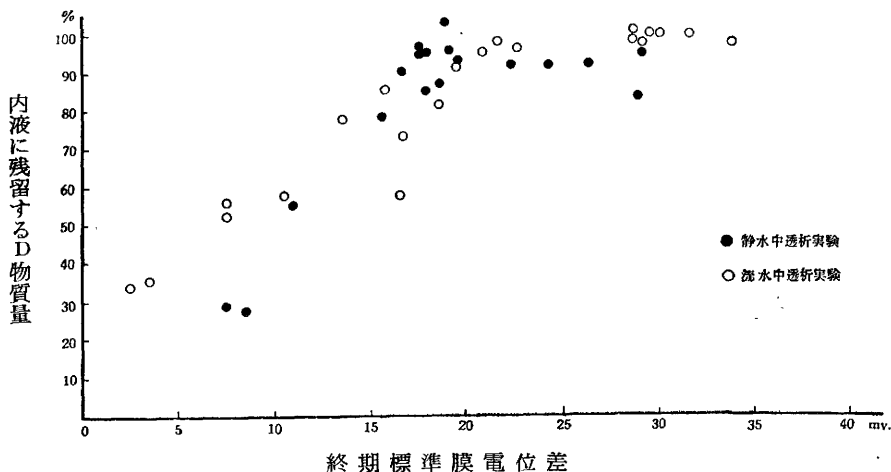
る量が増し、0mVの膜では全D物質の40~50%に達する。(第2図)



第2図 尿中D物質の吸着量

透析終了時の標準膜電位差と内液に残留する不透性D物質量(%)の関係は第3図で示される。茲に見られる関係は第1図の夫と同様であ

り、透析を全く起さない標準膜電位差が約20mV以上に偏位しているに過ぎない。(第1図では15mV以上)



第3図 尿透析実験(終期標準膜電位差に関するもの)

2) 流水中の透析

透析性D物質は内液には全く残留しないものとして、内液に残る不透性D物質量(%)と膜の透析前後の標準膜電位差との関係を求め図に示すと、第1, 3図となる。その成績は静水中の透析実験の成績と略々一致する。この実験では透析されたD物質と吸着されたD物質を区別することは出来ない。

第1, 3図に於て、標準膜電位差の高い囊を用いた場合、内液に残留する陽性物質量が実験当初の夫よりやゝ大きい値を示すのは、透析に依つて尿中の塩類が充分除去され、塩類の色素凝集を促進する作用が無くなつた結果と考えられる。本問題に就ては別報に於て論ずる。

3) 「コロジウム膜によるD物質の吸着

1) の実験で、透析操作前の資料のD物質量は操作後の内外両液に見出されるD物質より常に多い。この差はD物質が透析膜に吸着される量に相当するとして取扱つた。これを確認する為、次の実験を行つた。

いろんな標準膜電位差の「コロジウム囊を作

り、これを30ccの尿中に浸し、氷室内に保存して逐日D反応値を測定した。其成績は第2表である。標準膜電位差7mVを境とし、これ以

第2表 D物質コロジウム膜吸着実験

膜電位差 mV	尿D 点数	1日 後	2日 後	3日 後	4日 後	5日 後	8日 後
0	4	0					
0	4	0					
0	4	0					
0	10	6		3		2	1.5
1.0	23	20		17		16	15.5
1.0	12	9	7.5	6	6.5	5	
3.3	10	8.5		7		6.5	6
5.0	11			10		9.5	
6.0	23			22.5		20	
7.0	10			10		10	
9.0	14.5	14.5	14.5	14	14	14.5	12.5
11.5	14.5	13.5	14	14	14.5	14	12.5
18.0	14.5	14.5	14.5	14.5	13.5	14.5	12.5
18.0	4	4	4	4			
20.0	14.5	14.5	14.5	14	14	14	12
27.0	14.5	14	14	14	13	14.5	13
27.5	4	4	4	4			

上の膜電位差を示す囊を入れた尿の D 反応値は殆ど変化しないが、7mV 以下になると膜電位差の低いものほど急速に D 反応値が低下する。

即ち標準膜電位差が 7 mV 以上であれば、「コロチウム膜は D 物質を殆ど吸着しないが、これより低くなればなるほど強く吸着する事が実証された。この成績は第 2 図の結果とよく附合し、1) に於て吸着を仮定して誤りの無かつた事を実証する。

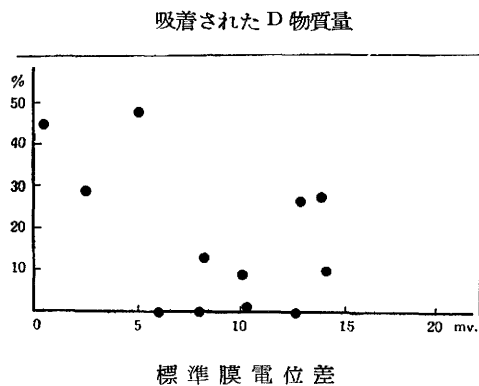
この際吸着される D 物質の量は、資料中の D 物質量や膜の大きさと平行することが認められた。

II 抽出した D 物質についての実験

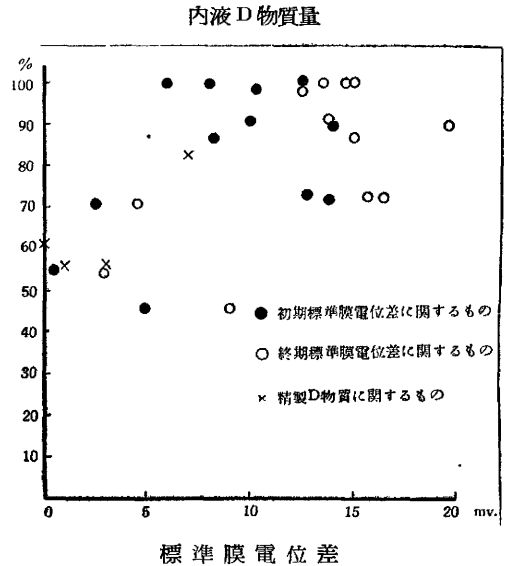
I に述べたと同様の実験を本田¹⁰⁾の方法で尿から抽出した D 物質及びこれを酒精で精製したものと下川¹¹⁾に就て行い、次の成績を得た。実験方法は I) と全く同じであるから記述は省略する。

1) 静水中の透析

この場合、如何に標準膜電位差の低い囊を用いても、外液に D 物質を証明することが出来なかつた。即ち透析は全く行われぬ。膜に依る D 物質の吸着と膜電位差との関係は I) と同様に認められる(第 4 図)。又内液に残留する D 物質量と膜電位差の関係は第 5 図のようになり、I) と略々同様であるが、内液に残留する D 物質量が比較的多くなっている。



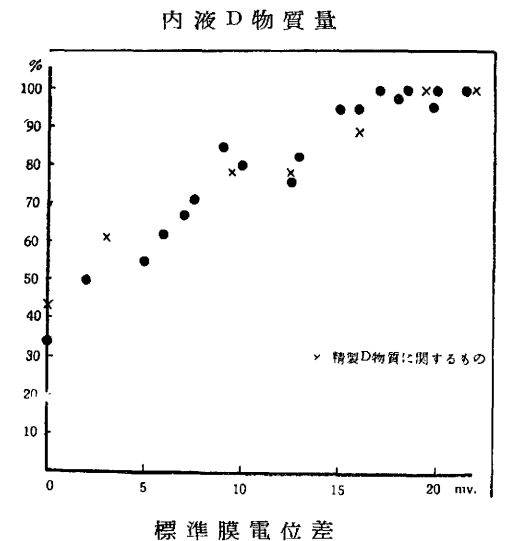
第 4 図



第 5 図 抽出 D 物質の静水中透析実験

2) 流水中の透析

I) と異り、流水中では D 物質は尿中に於けるものと同様よく透析される。内液に残留する D 物質と囊の膜電位差の関係は第 6 図となり、I) の場合の夫とよく一致する。膜電位差 16~17mV 以上の囊では透析も吸着も殆ど行われず、D 物質は殆ど全部内液に残留するが、膜電



第 6 図 抽出 D 物質の流水中透析実験

位差が低くなるに従つて内液に残留する D 物質は減少する。併し 0 mV の膜を用いても約 40% の D 物質は猶内液に残る。

3) 「コロヂウム膜による D 物質の吸着

抽出 D 物質及びその精製物について【3】と同様の実験を行い、これと殆ど全く符合する成績を得た(第 3 表)。即ち膜電位差が 7mV 以上の膜は D 物質を殆ど吸着しないのに対し、これ

第 3 表 抽出分離せる D 物質溶液の
コロヂウム膜吸着実験

膜電位差 mV	本田法抽出分離液 D 点数	1 日後	2 日後	3 日後	4 日後	5 日後
0	11	5	2	1	1	1
3	11	8	6.5	6	6	6
5	11	10	9.5	9	8.5	8.5
6	11	10.5	10	10	10	9.5
7	11	11	10.5	10.5	10.5	10
対照	11	11	11	11	11	11
酒精処理せる D 物質溶液						
0	9	5	4	3	3	2
4.5	9	8	7	7	7	6.5
7.5	9	9	8.5	8.5	8	7.5
対照	9	9	9	9	9	9

考 按

「コロヂウム膜を用いた透析実験に於て、透過性が高まるにつれて透析される D 物質が漸増することを見出した。さきに下川²¹⁾は D 物質が Proteose なる事を確めたが、上の事実は D 物質が分子の大きさの異なる様々の Proteose から成ることを推測させる。そして緒論に述べた諸家の透析実験の成績が一致しないのは、透析膜の透過性やその他の実験条件の相違に原因することと考えられる。

総 括

尿及びこれより抽出した Donaggio 反応陽性

より膜電位差が低くなるに従つて吸着が漸増する。

■ 電 気 透 析

Stadie and Ross²⁰⁾(1926) の電気透析器を用い、「セロファン紙を透析膜として尿を透析した。用いた「セロファン紙は No. 300, 400, 600 の三種で、「コロヂウム膜の標準膜電位差測定と同様の操作に依り、膜電位差を測定し、次の値を得た。

No. 300	3.5mV
No. 400	5.5mV
No. 600	6.7mV

電極にかけた電圧は 110 V、通じた電流は 500~200mA、透析は 3%硝酸銀で白濁を生じなくなる迄行い(3~9 時間)、氷点降下度測定により塩類の殆ど完全に除去されたことをたしかめた。

透析が進行するにつれ、褐色の濁濁沈澱を生じ、その一部は陽極側の膜に附着し、上澄には薄く着色した液を生ずる。上澄は D 反応を呈しないが、沈澱と混合すれば濁濁した褐色液となり D 反応陽性となる。

電気透析の後、内液に残留する D 物質は、何れの「セロファン紙を用うるも大差なく、初めの 70~80%に当る。

電気透析に於て沈澱の発生する理は、D 物質が陽イオンを奪われ等電状態になるため、溶解度が低下する結果であろう。陽極側の透析膜に多量の沈澱が附着する事実もこれを裏書きする。電気透析に於て内液に残留する陽性物質が比較的多いのは、陽イオンの透析が急速なる為、小粒子の D 物質まで速に等電状態になり、凝集沈澱する結果であろう。本法は D 物質の抽出や精製に利用し得る可能性がある。

物質溶液につき透過性を異にした(いろいろな標

準膜電位差を示す)「コロヂウム囊,「セロファン紙を用いて透析実験を行い,次の所見を得た.

1) D物質は,標準膜電位差が15mV以上の囊では透析も吸着もされず,殆ど全部内液に残る.之より透過性が高まる(標準膜電位差が低下する)に従い,透析されるD物質の量が増す.7mV以下になると更にD物質の一部は吸着される.併し透過性の極めて高い膜(標準膜電位差0mV)でもなほ多量のD物質が囊内に残留する.

2)「コロヂウム膜で透過性の大きい(標準膜

電位差7mV以下)ものでは,D物質が著明に吸着される.透過性が高まるほど吸着は強くなる.吸着が行われると標準膜電位差が大きくなる.

故にD物質は分子の大きさを異にする色々のProteoseから成るものと推測する.

3)尿から抽出されたD物質は囊に入れて静水中におくと透析されないが,流水中では透析されるという奇異な所見を得た.

4)尿の電気透析を行うと,D物質は大部分沈澱する.

擧筆するに臨み,終始御懇篤なる御指導,御校閲を賜りたる齋藤教授に深謝の意を表す.

文

- 1) A. Donaggio : II Internationaler Sportarzte Kongress, Berlin 81 (1936) 2) G. Rendel : Arbeitophysiologie 10 521 (1939) 3) 佐藤徳郎, 佐藤喜代子 : 医学と生物学 13 5 353 (昭23) 4) 川崎近太郎 : 科学 12 4 134 (昭17) 5) 増山元三郎, 細島千代子 : 医学と生物学 2 11 575 (昭17) 6) 山添三郎 : 医学と生物学 4 1 24 (昭18) 7) 荒木俊一 : 日本衛生学雑誌 2 3 1 (昭23) 8) 古川春寿, 石丸清子 : 科学 13 2 63 (昭18) 9) 佐藤徳郎 : 体育研究 8 5.6 496 (昭16) 10) 本田良行 : 体力科学 1 5 161 (昭26) 11) 下川末夫 : 医学と生物学 20 4 150 (昭26) 12) 佐藤徳郎 : 生体の科

献

- 学 1 1 37 (昭24) 13) 勝義孝 : 京都化学談話会講演要旨 (昭3) 14) 谷田重三郎 : 京都府立医科大学雑誌 4 5 1105 (昭5) 15) 正木清 : 京都府大雑誌 5 1 18 (昭5) 16) 松永徳之助, 村本昇三 : 京都府大雑誌 16 4 1103 (昭10) 17) 杉山金吾 : 京都府大雑誌 5 3 757 (昭6) 18) 日野要 : 京都府大雑誌 5 5 1885 (昭6) 5 6 1994 (昭6) 19) 相澤正男 : 京都府大雑誌 5 4 1131 (昭6) 20) W. C. Stadie, F. C. Ross : J. Biol. Chem. 68 229 (1926) 21) 下川末夫 : 医学と生物学 22 4 139 (昭27)