

人および家兎の血清の硫黄含有量について

生物学的試料の微量硫黄定量に関する研究 (その8)

金沢大学大学院医学研究科法医学講座 (前主任: 井上剛教授, 現主任: 何川涼教授)

中 田 理

(昭和47年12月19日受付)

当教室の八野は、強リン酸法によって、絹糸の蛋白質¹⁾および米糠油脂肪酸²⁾の微量硫黄を定量した上、齶蝕歯の象牙質³⁾、人歯牙の珐瑯質と象牙質⁴⁾および透明化歯牙⁵⁾の硫黄含量を定量しており、井波は、同じ方法によって、歯石中の硫黄⁶⁾を定量している。

八野および井波が採用している強リン酸法とは、塩化第一スズを強リン酸に溶解して造ったスズ(II)一強リン酸によって、 SO_4^{2-} を S^2 に還元し、発生する硫化水素を亜鉛の酢酸溶液に吸収させて、この硫化水素にP-アミノジメチルアニリンを作用させ、メチレンブルーにして比色定量する方法であって、1957年に発表された Kiba-Kishi 法⁷⁾を八野が多少改変したものである。この方法は、上記試薬の強力な還元作用と資料に対する強烈な解砕作用を応用するものであるから、これによれば、常に容易に正確な硫黄の定量成績が得られる。だが、この強リン酸法による硫黄の定量方法は、原著の公表後も日時があまり経っていない関係もあって、少くも生物学的試料を取扱う研究領域においては、まだ広く応用されていない。

著者にはたまたま、引き続き報告する予定である窒息屍血の流動性化に関する研究(その12)に関連し、上記の方法による硫黄定量を血清について行なう必要を生じた。血清硫黄の定量については、既にかなり多数の研究報告が発表されているが、強リン酸法によるその定量成績は、まだ全く報告されていないようである。

そこで、著者は、人および家兎の血清について行なったこの新しい方法による硫黄定量の成績を、独立した論文として、ここに報告する次第である。

研究材料および実験方法

本篇の研究においては、表題にも示されているよう

に、被検試料としては、人の血清と家兎の血清とが使われ、その硫黄定量には、強リン酸還元法が使われている。従って、研究材料については、人の血清と家兎の血清の2部門に分け、それぞれの説明をして行かなければならない。なお、本篇の研究においては、人血清の場合には、その総硫黄量が定量されたが、家兎血清の方は、それに除蛋白を施し、その上澄について硫黄が定量されている。従って、ここには、硫黄定量の実施法を説明するほかに、血清の取扱い特に除蛋白法の如何についても、説明しておく必要があると思われる。

そこで、以上の各項について、順次に説明をして行くと、次のようである。

I. 研究材料と前処置

1. 人の血清

健康人の5名から、血液を貰い受けた。この血液から、採血後直ちに、血清を分離し、実験の開始期まで冷蔵庫内に保管した。

この試料についての硫黄定量に当っては、被検血清の1滴を細い毛細管ピペットで反応管内に採り、化学天秤で試料の採取量を秤量した上、硫黄定量に供された。従って、人血清の場合の硫黄含量は、いわゆる総硫黄量に該当している。

2. 家兎の血清

成熟家兎の健康なもの11匹から採血し、直ちに血清を分離した。その採血には、研究の都合上、心臓穿刺法を採用した。

家兎の血清の場合には、冒頭に述べたように、除蛋白法が施されている。その除蛋白には、Folin-Wu法を著者が多少改変したものを、使っている。その改変の主要部分は、原法では H_2SO_4 を使うところを、塩酸で置き換えた点にあると、いえる。著者は、この改

The Sulfur Content of Human and Rabbit Serum (Studies on Microcolorimetric Determination of Sulfur in Biological Materials. Part 8.). Osamu Nakata, Department of Legal Medicine (Previous Director ; Prof. T. Inouye, Present Director ; Prof. R. Nanikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

変を決定するまでに、一連の予備実験を行ない、塩酸を使っても、除蛋白の目的を十分に果たし得ることを、確認した。除蛋白の実施方法は次のとおりである。

除蛋白法の実施: …………… オストワルドピペットを使い、血清の1.0mlを5ml容の太頸のメスコルペン内に入れ、オストワルドピペットの内壁の洗滌液を3回に亘って加注した上、10%のタングステン酸曹達溶液の0.5mlを加え、内容液を動揺混合させた後、2/3N塩酸の0.5mlを添加し、再び内容液を混和し、蒸留水をコルペンの目盛りまで注入する。ここで、メスコルペンの栓を閉じ、力強く振盪して内容液を十分に混和した後、約10分間放置する。

ついで、メスコルペンの内容を遠心沈澱管内に移した上、2,000回転15分間の遠心操作を行ない、その上澄液を分離する。この上澄液の1.0mlを、オストワルドピペットを以て反応管内に採取し、ピペットの内壁の洗滌液を追加注入した上、試料の硫黄含量を測定する。

II. 硫黄定量の実施方法

被検試料はまず最初に、反応管内に入れたまま乾燥される。それには、各試料を入れた反応管内に、塩化バリウム溶液の0.5mlをピペットで加えた後、105°Cの電気乾燥器内で、恒量となるまで乾固する。

ついで、この試料を入れた反応管内に、クロム—強リン酸の1mlを注加し、硫黄定量セットの電熱装置を利用して、徐徐に加熱して行き、試料の酸化分解を行なう。この酸化分解には、ほぼ5分を要するが、加熱は、反応管の内容物が完全に分解して緑色を呈するまで続け、そこで終了する。

ここで、反応管内に、スズ—強リン酸の5mlを加えて、分析装置の吸収管部分などを正しく接続する。装置のセット状況については、八野の論文¹⁾を参照されたい。吸収管には、酢酸亜鉛溶液の35mlを入れ、ガス導入管は、その先端が吸収管の底にほぼ接触するようにしておく。つぎに、炭酸ガスを約3分間激しく通じて、装置全域の空気を完全に除去する。

ついで、炭酸ガスを1秒間1気泡の割りで通じながら、反応管を電熱器で徐徐に加熱して行く。15~20分頃(多くは17分頃)には、反応管の内容物が灰黒色を呈し混濁するように、抵抗器で調節し、ここで、加熱を終了する。

以上の加熱処置を終了した後、炭酸ガスの通気をそのまま5分間位継続して、発生した硫化水素ガスを吸収液の中に完全に吸収捕捉させる。

つぎに、導入管の部分切り放し、吸収管の中に残

した上、吸収管に栓を施し、これを24°Cに調節しておいた恒温槽の中に漬けて、内容液を恒温となるよう温めた後、パラアミノジメチルアニリンの硫酸溶液の2mlを手早く加え栓をして、内容液を激しく振盪することによって混合させる。ここで、塩化鉄溶液の0.5mlを迅速に添加し、よく振盪した後、さきに記載した恒温槽の中に約15分間漬け、発色させる。

ここで、完全に発色した内容液に対して、蒸留水を加え、その全容を正確に50mlにした上、667m μ の波長における吸光度を測定する。この吸光度から、試料中の硫黄含量を算出する。

検量線の作成と硫黄含量の算出法: …………… 検量線の作成に当っては、和光純薬の特級試薬の硫酸銅を、標準液として使用した。上記の硫酸銅0.08045gを蒸留水に溶解して、全容を1 l とした。この標準液の1mlには、硫黄の10.32 γ が含まれる。

検量線は、標準液の0.5, 1.0, 1.5および2.0mlを反応管に採取した上、それぞれについて、強リン酸法による硫黄定量法を実施して、作成されたのであるが、硫黄の算出法を数式で表わせば、次式のようなる。

$$A = 61.4B - 0.921$$

Aは、標準液中の硫黄含量(γ)であって、Bは、波長667m μ における吸光度である。

研究成績および考察

まず最初に、人血清の硫黄含量について述べる。被検試料である血清は、細い毛管ピペットの1滴を反応管内に採取し、その秤量を行なう。毛管ピペットの1滴は、約20mgの血清に相当するので、実際の定量には、18.10~26.00mgの血清が使われている。個々の実験の試料の採取量および硫黄の定量成績は、表1として掲げるとおりである。

硫黄の定量は、同一被検試料について、念のために3回ずつ反覆された。個々のものの定量成績についてみると、表1の中に示されているように、同一試料について行なわれた3回の定量値の間にも多少の動揺が認められる。これは、硫黄定量法の誤差から生じた動揺であると看做すべきものであるが、その動揺の絶対値は、従来他の硫黄定量法、例えば、ベンチジン法の場合より、むしろ小さいようである。してみると、著者が採用した強リン酸法は、特に優れた微量法であると考えられて来たベンチジン法よりも、誤差の更に少ないものであると、いうことができる。

ところで、その定量成績をみると、毎回の試料の採取量に動揺があるので、直接の硫黄定量値では、個個

表1 正常人血清の総硫黄量

試料番号	試料採取量 mg	吸光度 667m μ	定量値 γ	含有率 g %
1	22.63	0.460	27.32	0.121
	23.12	0.480	28.55	0.123
	18.10	0.390	23.03	0.127
2	19.10	0.358	21.06	0.110
	26.00	0.498	29.66	0.114
	23.11	0.445	26.40	0.114
3	20.43	0.398	23.52	0.115
	20.15	0.419	24.81	0.123
	22.40	0.438	25.97	0.116
4	18.55	0.289	16.82	0.091
	20.85	0.351	20.63	0.097
	21.20	0.338	19.83	0.094
5	20.94	0.390	23.03	0.110
	21.20	0.400	23.64	0.112
	22.20	0.412	24.38	0.110

の試料相互間の硫黄量を比較検討することが、むずかしい状態になっている。そこで、個々の定量値を硫黄含有率 (g%) に換算してみると、試料1は、0.121~0.127g%, その平均は0.124g%であり、試料2は、0.110~0.114g%, 平均0.113g%, 試料3は、0.115~0.123g%, 平均は0.118g%であって、試料4は、0.091~0.097g%, 平均は0.094g%で、試料5は、0.110~0.112g%, 平均は0.111g%である。

従って、著者が定量した人血清の硫黄含量は、試料別の平均値からみると、0.094~0.124g%であり、5例の平均は、0.112g%となっているのである。

さてここで、従来の文献を吟味すると、人血清については、緒言にも述べたように、かなり多数の硫黄定量に関する研究報告がある。しかし、その殆ど全部が非蛋白硫黄の定量に関するものであって、著者が調査した範囲内においては、ただ独り Révol⁹⁾ だけが、人血清の総硫黄量を定量しているに過ぎない。それ故、人血清の総硫黄量の定量は、十分な意義がある。Révol の研究成績によると、正常人血清の総硫黄量は、94~148mg/dlで、その平均は、119mg/dlであると、述べられている。これは、試料(血清)をピペットで採取している関係上、本篇の成績と直接に比較

検討することはできないが、あまり大きな相違のない数値であると、いってよいであろう。

いずれにしても、本篇の研究においては、人血清の総硫黄が0.112g%程度であることが、確かめられたのである。人体組織中の硫黄含量については、比較的近年になってかなり多数の研究報告が公表され、その組織の多くは0.1~0.4g%程度の硫黄を含んでおり、硫黄含量が最も少ないのは骨髄(約0.08g%)で、最も多いのは軟骨(約0.6g%)であると、されている。してみると、血清の硫黄含量は、組織や臓器別にみると、かなり少ないものの1つである、ということができる。

註:……………本篇の研究において、総硫黄量の定量に当り、試料(血清)の採取を定容ピペットによる容量としてではなく、毛细管ピペットの1滴を秤量する重量として記載したのは、他の組織および臓器の硫黄含量との比較検討を試みようとしたためであった。

ところで、上記した人血清の総硫黄の内容(由来)は如何との問題を生ずるが、この問題は、甚だ複雑でむずかしく、その説明は今後の研究に俟たなければならない。というのは、血清硫黄は、無機硫黄のほか、メチオニン、チスチン、チステインその他の含硫アミノ酸、酵素、或種のホルモン、グルタチオン、チアミン、牛胆酸、コンドロイチン硫酸などの多種雑多のものから構成されていると、考えなければならないからである。

次に、第2の試料すなわち家兎血清の硫黄定量の成績について、その内容の吟味検討しようと思う。この試料については、さきに述べたように、予め除蛋白が行なわれ、いわゆる非蛋白硫黄が定量されたのである。その定量成績は、表2に掲げるとおりである。

この実験においては、11匹の成熟家兎の血清を試料として使用し、その硫黄量の定量に当っては、除蛋白された上澄液の1.0mlが、被検液として使われているが、その定量成績をみると、個々のものの硫黄含量は、11.7~24.0 γ の間にあり、試みにその平均値を算出してみると、15.0 γ となっている。除蛋白液は、5倍に稀釈された形になっているから、これを原血清の1ml中の硫黄量に換算すると、58.5~120.0 γ で、平均は75.0 γ となる。

ところで、血液、血漿、血清や尿など、試料が液体の場合は、その中に含まれている各種物質の量はmg/dlの形として表現するのが、習慣になっている。そこで、従来の文献と対比する目的上、上記の定量成績をmg/dlの形に書き改めることにした。すると、表

表2 正常家兎血清の非蛋白硫黄量

試料番号	体重 kg	吸光度 667m μ	定量値 γ	硫黄含量 mg/dl
1	3.7	0.217	12.4	6.20
2	3.4	0.260	14.8	7.40
3	2.2	0.222	12.5	6.25
4	3.3	0.410	24.0	12.00
5	2.4	0.215	12.0	6.00
6	2.1	0.210	11.7	5.85
7	2.5	0.263	15.0	7.50
8	2.0	0.317	18.3	9.15
9	2.7	0.226	12.7	6.35
10	3.1	0.305	17.4	8.70
11	1.8	0.251	14.2	7.10

2中に掲げられているように、被検家兎の非蛋白硫黄の含量は、5.85~12.00mg/dlの範囲内にあり、平均7.5mg/dlであった。

この家兎血清の非蛋白硫黄の定量成績は、従来の文献、例えば、Brown・Lewis⁹⁾が6.0~8.3mg/dl、平均7.05mg/dlであると報告しているものと比較すると、平均値では僅かに高く、個性的動揺が非常に目立ったものになっている。これは、Brown・Lewisの研究を始め従来の殆どすべての研究報告において、除蛋白にトリクロール酢酸が使われているのに対して、著者の硫黄定量においては、Folin-Wuの原法に基づく改変法による除蛋白が行なわれたことが、大きく関与しているのではないと思われる。というのは、Folin-Wu法すなわちタングステン酸曹達を使う除蛋白の場合には、トリクロール酢酸による除蛋白の場合に較べて、分子のやや大きな含硫アミノ酸の類が沈澱せずに残るものと、考えられるからである。

トリクロール酢酸による除蛋白は、この酢酸が安定した強烈な除蛋白剤であることと、その使用操作が簡易である長所のあるために、近年では、甚だ広く使われている除蛋白法である。しかし、或る特殊な実験的研究、例えば、著者が引き続き報告する予定である、窒息屍血の流動性化に関する実験的研究(その12)においては、窒息に伴う異常代謝時の中間分解産物を特にとり上げて、その含量などを吟味検討して行かなければならない関係上、その被検動物の血液や血清の除蛋白に当っては、むしろFolin-Wu法を採用する方

が有利であると、考えられる。著者は、こうした意味合いを勘案して、本篇の研究にタングステン酸曹達による除蛋白法を採用したのである。

ところで、少なくとも著者が調査できた範囲内においては、従来の文献には、タングステン酸曹達による除蛋白を行なった血清の硫黄含量に関する研究報告は、全くないようである。してみると、上記した家兎血清の非蛋白硫黄の定量成績には、矢張りかなりの意義があると、いってよいであろう。

総 括

本篇の研究においては、健康人の血清の総硫黄の含量と、家兎血清の非蛋白硫黄の含量が、強リン酸による微量硫黄の迅速定量法によって、定量された。なお、家兎血清の除蛋白に当っては、Folin-Wuの原法を多少改変した除蛋白法が、行なわれている。その成績は次のとおりである。

1. 正常人の血清の総硫黄の含量は、0.094~0.124g%であり、その平均値は0.112g%であった。

2. 健康家兎の血清の非蛋白硫黄の含量は、5.85~12.00mg/dlの範囲内にあり、平均7.5mg/dlであった。

文 献

- 1) 八野耕明：法医・鑑識・社会医誌，6，18 (1968/69)。
- 2) 八野耕明：社会医誌，6，40 (1968/69)。
- 3) 八野耕明：社会医誌，6，79 (1968/69)。
- 4) 八野耕明：社会医誌，6，99 (1968/69)。
- 5) 八野耕明：社会医誌，6，126 (1968/69)。
- 6) 井波英二：社会医誌，6，133および161 (1968/69)。
- 7) Kiba, T., Akaza, I. & Taki, S. : Bull. Chem. Soc. Japan, 30, 482 (1957); 木羽敏泰：化学の領域，12，677 (1958)。
- 8) Révol, L. : Compt. Rend. Soc. Biol., 126, 22 (1937)。
- 9) Brown, B. H. & Lewis, H. B. : J. Biol. Chem., 138, 705 (1941)。

A b s t r a c t

In the present investigation, the total sulphur content of healthy human serum and the non-protein sulphur content of rabbit serum were estimated by rapid determination of sulphur by the Tin (II)-strong phosphoric acid reduction method. The deproteinization of rabbit serum, was made by the partially improved Folin-Wu method. The results obtained were summarized as follows.

1. According to microcolorimetric determination of sulphur by the Tin (II)-strong phosphoric acid reduction method, the total sulphur content of normal human serum was found ranging from 0.094 to 0.124 g%, the average being 0.112 g%.

2. As a result of rapid determination of sulphur by the Tin (II)-strong phosphoric acid reduction method after deproteinization with tungstic acid, it was found that the non-protein sulphur content of healthy rabbit serum lay between 5.85 and 12.00 mg/dl, the average being 7.5 mg/dl.
