

## Donaggio 反応標準法の一部改良について

金沢大学医学部生理学教室(主任 齋藤教授)

下 川 末 夫

*Matsuo Shimokawa*

萩 野 修

*Osamu Ogino*

(昭和29年3月15日受附)

### 緒 論

最近当教室の櫻井<sup>1)</sup>は Donaggio (以下Dと略す) 反応における pH の意義に関する研究を發表し, D 反応値は反応混合液の pH によつて変動するが, 又これとは別個に尿の pH によつても著しい影響を受けることを指摘した。

反応混合液の pH は主としてモリブデン酸アンモン (以下 MA と略す) 溶液の pH で決定される。それは D 反応に用うる 4% MA 溶液の緩衝価が尿のそれにくらべて極めて大きいからである。従つて反応混合液の pH を一定に規正することは, 4% MA 溶液の pH を常に一定にすることで容易に目的を達せられる。

然るに, これとは別個に尿の pH が D 反応値に影響する機序に関しては次のように考える。D 反応の本態は MA とメチレン青 (以下 MB と略す) との結合物の凝集沈澱に対する尿膠質 (D 反応陽性物質, Mucoprotein) の保護膠質反応である。この保護作用は Mucoprotein の電

離状態, 従つて保護膠質反応に参与する直前の溶液 (尿稀釈液) の pH によつて左右される。尿の pH の不同に基く D 反応値の誤差を少なくするには, 反応に用うる稀釈尿の pH を 1% MA 溶液の pH に等しくなるよう調整しなければならぬが, 実際の測定に當つて多数の尿試料を取扱う際に, その pH を一々正確に規正することは殆んど不可能である。吾々は D 反応標準法実施の際, 試薬混合の順序を変更し, 先ず尿に MA 溶液を加え, 尿中の D 反応陽性物質の保護膠質作用を MA 溶液の pH に平衡せしめ, 然る後 MB を加えて沈澱阻止反応を行うことにした。かかる操作で尿 pH の不同による誤差は著しく減殺され, 従つて尿 pH の嚴密な規正は不要となるものと推測される。

本研究はこれを実験によつて確めると共にこの変法の性格を明らかにする目的で行つた。

### 実験方法, 実験成績並びに考按

#### (1) D 反応術式及び採点法

試薬: 1万倍 MB 水溶液及び4% MA 水溶液 (pH 5.3)

尿量を測定後, 順次稀釈し, (稀釈系列については次節参照) 夫々 1cc 宛を小試験管にとり次の操作を行う。

#### 第 1 法

4% MA 0.5cc を加え, 充分混和し 37°C 孵卵器内に30分放置し, しかる後 1万倍 MB 0.5cc を加え更に 37°C の孵卵器内に60分放置後, 毎分 3000 回転20分間遠心する。上澄が 6 万倍 MB 溶液の濃度に近い試験管をとり, その上澄を光電光度計を使用して (日立製, Filter YB, Cell 2cc) その吸光度を求め, 予め作成した D 値と吸光度との標準グラフ (次節参照) からその

D値を求める。この値をdとすれば被検尿のD値は次式で示される。

$$D = d \times \frac{V}{t} \times n$$

V…尿量 cc., t…排尿時間 (分), n…比色に用いた尿の稀釈数値

第 2 法

測定時間を短くするため4% MA 0.5cc を加えた後の 37°C 孵卵器内に30分放置するのを省いて直ちに4万倍 MB 0.5cc 加える点が第1法と異なる。

(2) 採点に用いる標準グラフ及び尿稀釈系列について

採点に用いる標準グラフ即ちD値と上澄に残留する MB 濃度との関係を求めるのに中山<sup>2)</sup>が発表した方法を踏襲した。即ち種々の稀釈尿について前節の測定法を行い、上澄に丁度6万倍の濃度に MB を残留せしめるような尿の 1cc に含まれる陽性物質量を単位量としてD反応値を表わすこととした。従つて従来の標準法とは単位の反応陽性物質の絶対量は異なる。この検討は(4)で行う。

第1表は上澄残留 MB 濃度とD値との関係を示した成績の一部である。これらの値を平均して両者の関係を一本の曲線で示したものが第1図である。図の実線は第1法、点線は第2法によるものである。この図に示す如く、第2法を用いた場合は中山が標準法について得た成績と同様に曲線の傾斜は急峻である。即ち單に試葉の混合順序を逆にしただけでは曲線の傾斜は変わらない。これに反して第1法で得た曲線は比較的なだらかである。これらの曲線の形から判断して比色定量に利用し得るD値の範囲は第2法では中山の標準法を取扱つた場合と同じく0.7~1.2点範囲であるが、第1法によれば同じ残留 MB 濃度の範囲で0.55~1.5点である。即ち比色可能の領域のD値の上下の両限界の比をとれば、第2法では 1 : 1.71, 第1法では 1 : 2.73 となる。この値より測定に必要な尿の稀釈系列は第2法では中山の場合と同様 1.5倍の尿の稀釈系列を作らねばならぬが、第1法では2~2.5倍の尿の稀釈系列で足りる。即ち

第 1 表

第 1 法

假D値	C × 10 <sup>-5</sup>	眞D値	假D値	C × 10 <sup>-5</sup>	眞D値
2.0	2.53	1.96	1.1	2.0	1.11
1.9	2.53	1.86	1.0	1.9	1.02
1.8	2.47	1.76	0.9	1.3	0.93
1.7	2.34	1.67	0.8	1.1	0.82
1.6	2.40	1.57	0.7	0.6	0.72
1.5	2.24	1.47	0.6	0.3	0.62
1.4	2.17	1.37	0.5	0.2	0.51
1.3	2.10	1.27	0.4	0.1	0.41
1.2	1.96	1.18			
1.1	1.80	1.08	1.9	2.38	1.64
1.0	1.60	0.98	1.8	2.25	1.55
0.9	1.37	0.88	1.7	2.20	1.46
0.8	1.18	0.78	1.6	2.12	1.38
0.7	0.90	0.69	1.5	1.91	1.29
0.5	0.50	0.49	1.4	1.96	1.21
			1.3	1.85	1.12
1.9	2.53	1.72	1.1	1.53	0.95
1.7	2.31	1.55	1.0	1.24	0.86
1.6	2.21	1.45	0.9	1.19	0.77
1.5	2.10	1.36	0.8	1.10	0.68
1.4	2.10	1.27	0.7	0.71	0.61
1.3	1.88	1.18	0.6	0.40	0.52
1.2	1.73	1.09			
1.1	1.60	0.99	1.7	2.44	1.73
1.0	1.58	0.91	1.6	2.41	1.63
0.8	0.91	0.73	1.5	2.35	1.53
0.7	0.61	0.64	1.4	2.27	1.43
0.6	0.53	0.55	1.3	2.18	1.33
0.5	0.35	0.45	1.2	2.09	1.22
0.4	0.34	0.36	1.0	1.74	1.02
			0.9	1.35	0.92
1.6	2.3	1.65	0.7	0.91	0.71
1.5	2.3	1.54	0.6	0.74	0.61
1.3	2.3	1.34	0.5	0.40	0.52
1.2	2.2	1.22			

第 2 法

假D値	C × 10 <sup>-5</sup>	眞D値	假D値	C × 10 <sup>-5</sup>	眞D値
1.7	2.42	1.45	1.0	0.95	0.91
1.5	2.32	1.36	0.9	0.59	0.82
1.3	2.11	1.18	0.8	0.52	0.72
1.2	1.80	1.09	0.7	0.47	0.64
1.1	1.57	0.99	0.6	0.46	0.54

第 2 法					
仮D値	$C \times 10^{-5}$	眞D値	仮D値	$C \times 10^{-5}$	眞D値
0.5	0.46	0.45	1.5	2.38	1.28
0.3	0.46	0.27	1.3	2.14	1.11
1.6	2.32	1.46	1.2	1.85	1.03
1.4	2.28	1.36	1.1	1.22	0.94
1.3	2.24	1.26	1.0	0.73	0.86
1.2	1.95	1.16	0.9	0.63	0.77
1.1	2.03	1.06	0.8	0.43	0.69
1.0	1.47	0.97	0.7	0.41	0.60
0.9	1.15	0.87	0.6	0.36	0.51
0.8	0.95	0.79	2.0	2.53	1.87
0.7	0.84	0.68	1.8	2.53	1.68
0.6	0.54	0.58	1.6	2.45	1.50
0.5	0.40	0.48	1.5	2.38	1.40
0.3	0.28	0.29	1.4	2.37	1.30
1.4	2.33	1.23	1.3	2.30	1.21
1.3	2.29	1.14	1.2	2.10	1.12
1.2	1.80	1.05	1.1	1.98	1.03
1.1	1.58	0.97	1.0	1.25	0.93
1.0	0.81	0.88	0.9	1.03	0.84
0.9	0.68	0.79	0.8	0.60	0.75
0.8	0.39	0.70	0.7	0.42	0.65
0.7	0.36	0.61	0.6	0.38	0.56
0.6	0.36	0.52	0.5	0.35	0.47
0.5	0.36	0.44	0.3	0.20	0.18

後者では尿稀釈の操作が著しく簡略になる。  
(本法の第1の特徴)

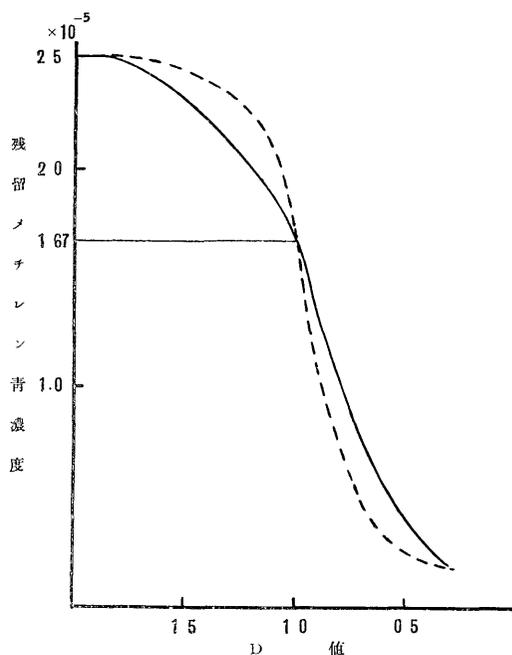
(3) 尿 pH が本法の測定値に及ぼす影響について

緒論で述べた如く従来の標準法は尿の pH によつて著しい影響を受けるが、果して本法による測定値が尿の pH によつて左右されないものか確かめるため次の実験を行つた。

尿の pH を塩酸又は苛性ソーダにて生理的な変動範囲即ち pH 4.8~8 の値にしたものについて、本法と前述の D 反応標準法中山改良法とで D 値を夫々測定した。尿 pH の測定には齋藤<sup>3)</sup>の微量用硝子電極を使用した。

成績の一部は第2図に示してあるが、中山改良法で得た D 値は、櫻井<sup>1)</sup>の成績と同様に pH 5 と 7 とでは相当な差が認められた。これに反

第 1 図



し本法により測定した値は変動は非常に少なく測定誤差と思われる程度である。即ち本法によれば標準法の如く予め尿の pH を正確に 5.6 に規正する必要がない。(本法の第2の特徴)

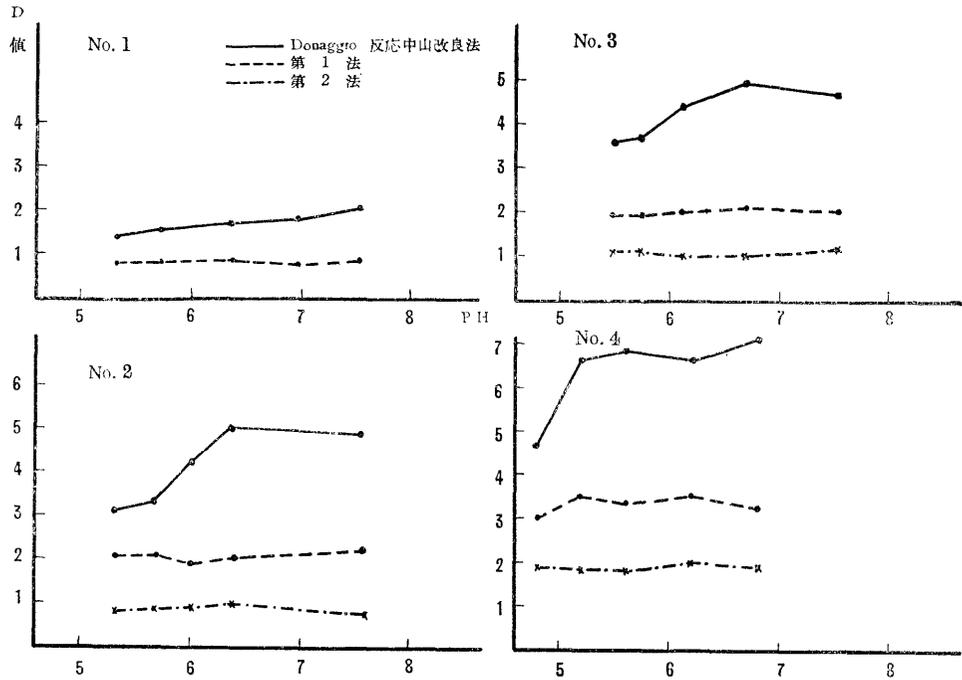
(4) D 反応標準法による測定値との比較

以上で実用性が確認されたので従来の標準法の点数と本法の点数の比較を行つた。本法並びに標準法で得た D 値は、何れも陽性物質の量に比例するから相互に換算出来る筈である。

硝子電極を用いて pH を 5.6 に正確に規正した尿につき、D 反応標準法中山改良法と第1法、第2法とで D 値を夫々測定比較した。その成績は第2表である。即ち第1法では標準法で得られた値の平均51%、第2法では平均38%と夫々低い成績を得た。従つて本法の D 値1点を示すに必要な陽性物質量は第1法では標準法の約1.9倍、第2法では約2.6倍になる。

(2)で述べた如く第1法、第2法の比色可能の最低値は0.55点及び0.7点であるから、これらは夫々標準法の約1.1点、1.7点に相当す

第 2 図



第 2 表

	A	B	C	B/A %	C/A %
	Donaggio 標準法 中山改良法	第 1 法	第 2 法		
1	1.49	0.82	0.74	55.0	49.6
2	1.63	0.86	0.71	52.7	43.6
3	1.89	1.00	0.97	52.8	51.2
4	2.01	0.93	0.55	46.2	27.3
5	2.23	1.18	0.97	53.0	43.5
6	2.25	1.20	0.94	53.3	41.8
7	2.41	1.13	0.82	48.1	34.0
8	2.41	1.16	0.96	46.8	39.8
9	2.42	1.52	1.00	62.0	41.4
10	2.90	1.58	1.38	54.5	47.6
11	3.02	1.24	0.71	41.1	23.6
12	3.08	1.39	1.08	45.1	32.9
13	3.14	1.52	1.22	48.4	38.9
14	3.20	1.34	0.98	42.0	30.6
15	3.35	1.82	1.49	54.3	44.4
16	3.26	1.62	0.94	49.7	28.8
17	3.55	2.20	1.00	62.0	28.2
18	6.75	3.45	2.94	52.6	43.5
19	7.29	3.62	3.38	48.7	46.4
20	7.78	3.72	2.65	47.9	21.2
平均				50.81	37.92

る。即ち本法による測定可能の最低値が高い。(本法の欠点)櫻井氏によればD 反応標準法で求めた成人男子及び成人女子の安静時の平均値は夫々3.4点, 2.5点であるから尿量が1分当り2cc以内であれば第1法により充分測定出来る。この標準法に対する点数の関係, 比色可能の最低値, 稀釈系列の諸点から第1法が第2法よりすぐれている。

結 論

中山が発表した光電光度計を用いたD 反応標準法において試薬混合順序を変え, 先ず尿に MA を加え 37°C 孵卵器内に30分放置後 MB を加えて行うことにより次のような結果を得た。

(1) 尿 pH の不同の D 値に及ぼす影響が除かれる。従つて測定に際し予め尿の pH を厳密に一定値に規正する必要がない。

(2) D 値と残留 MB 濃度との関係曲線はなだらかであり、従つて被検尿の稀釈操作が簡略になる。即ち 2 倍稀釈系列を調整すれば測定に

足りる。比色可能の最低値は 0.55 点である。

(3) 本法により測定した値は中山改良法で測定した値の平均 51% を示した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました 恩師齋藤教授に深甚なる謝意を表します。

## 文

1) 桜井昭光 : Donaggio 反応に於ける pH の問題と尿中の二三の酸の影響について. 十全医学会誌, **55**, (11), 1207, 昭29.      2) 中山達夫 : 光電比色計による Donaggio 反応標準法の精密化と簡易化について. 総合医学, **10**, (5),

## 献

255, 昭28.      3) 齋藤幸一郎 : 手製の微量用硝子電極. 十全医学会雑誌, **55**, (9), 1908, 昭28.      4) 桜井昭光 : Danaggio 反応に関する実験的研究 (1). 十全医学会誌, **55**, (9), 1011, 昭28.