メチレン青増加法による Donaggio 値 定量法に関する研究

Studies on the New Quantitative Method of Donaggio Reaction by means of Changing the Concentration of Methylen Blue instead of Urine Dilution

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任 大田原一祥教授)

緒 方 正 名

Masana Ogata

Department of Public Health, School of Medicine, Okayama University

(Director: Prof. K. Ohtahara)

緒 言

Donaggio 反応¹⁾は尿による疲労判定法として広く用いられている反応であるが、本反応における Donaggio 値の測定法としては過去においては主として Donaggio-佐藤法^{2,3)}が用いられていた。しかしながら本法は Donaggio 反応陽性物質の量と比例しない点が指摘され、吉川氏らによつて稀釈法を加味した Donaggio-吉川-佐藤法^{4,10)}が発表され、その後学術研究会議疲労班において尿稀釈法による Donaggio 反応測定法を基本とし、かつ陽性物質の時間排泄量を考慮に入れた測定法を Donaggio 標準法⁵⁾として採択し佐藤氏によつて発表された。さらに標準法を精密化するために中山氏⁶⁾によつて稀釈法における残留メチレン青濃度を光電光度計で測定する方法が発表されている。なお山添氏⁷⁾は尿およびメチレン青濃度を一定とし残留メチレン青濃度より Donaggio 値を測定する方法を発表され、本法は学研簡便法として採択されている。しかしながら Donaggio 標準法では倍数稀釈法を用いるために多数例の尿の検定をおこなうには実験操作が煩雑であるという欠点を有する。1953年 Albeaux Fernet⁸⁾らは原尿に対シトルイジン青増加法によつて Donaggio 反応の定量化をおこない、これをムコ蛋白の半定量法として発表した。

著者は Albeaux Fernet 法におけるトルイジン青増加法の代りに、従来わが国で使用されてきたメチレン青を用いて研究をおこなつた。すなわち原尿に対してメチレ

ン青濃度を増加せしめてその際の反応限界より Donaggio 値を定め、さらに本法による Donaggio 値と Donaggio 標準法による点数との関係について比較検討をおこなつたのでここに発表する次第である。

実験材料ならびに実験方法

実験材料

1) メチレン青液

メルク製メチレン青の 1 : 1,250 倍, 1 : 2,500 倍, 1 : 5,000 倍, 1 : 10,000 倍液をつくり、これを反応液として用いた。

2) モリブデン酸安門液

pH 5.6, 4%液を反応液として使用した。

3) 被検尿

鉄道従業員の作業前、作業後尿を採集し、実験に使用した。

実験方法

1) Donaggio 反応

尿は 1 分間 2, 3, 4 ml 尿に補正して用いる。少なくとも原尿の 2 倍程度には稀釈した方がよい。補正尿 10 ml をとり蛋白陽性のときは加熱除蛋白をおこなつたのち実験に供する。

4 本の試験管をとり、第 1 の試験管に

10,000 倍メチレン青 1 ml, 第 2 の試験管に

5,000 倍のメチレン青 1 ml, 第 3 の試験管に

2,500 倍のメチレン青 1 ml, 第 4 の試験管に

1,250 倍のメチレン青 1 ml を入れる。ついて各試験

管に補正尿 2 ml を加えたのち、4%モリブデン酸安門 1 ml を添加する。1時間重湯煎に放置後遠心し判定に供する。

2) 検量曲線の作製

メチレン青増加量の Donaggio 反応に対する影響を検討し検量曲線を作成するために尿の 1.4倍稀釈系列をつくり、この 2 ml を第1表の縦列の方向に分注する。ついで 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍のメチレン青液 1 ml を第1表の横列の方向に分注する。

最後に各試験管に 4% モリブデン酸安門を 1 ml 分注し1時間重湯煎に放置後遠心し判定に供する。

実験結果

1. メチレン青濃度と反応限界の関係

A. 肉眼による判定 (第1表参照)

1) 強陽性限界

強陽性限界における稀釈度はメチレン青 10,000 倍濃度で 1.4^6 倍、5,000 倍濃度で 1.4^4 倍、2,500 倍濃度で 1.4^2 倍で示される。それ故強陽性反応限界濃度はメチレン青濃度に反比例する。

2) $\frac{2}{3}$ 陽性限界

Donaggio 標準法は尿 1 ml、10,000 倍メチレン青 0.5 ml、モリブデン酸安門 0.5 ml の系であるから完全陽性限界のメチレン青濃度は 40,000 倍となる。標準法ではメチレン青濃度 60,000 倍以上の濃度のメチレン青の残

留する試験管を陽性とするわけであるから上清に完全陽性の濃度の $\frac{2}{3}$ の濃度のメチレン青の残留する部を陽性限界とするわけである。5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の場合も同様に考えて、 $\frac{2}{3}$ 濃度のメチレン青残留限界稀釈度はメチレン青 10,000 倍濃度で 1.4^7 倍、5,000 倍濃度で 1.4^5 倍、2,500 倍濃度で 1.4^3 倍、1,250 倍濃度で 1.4 倍であり、 $\frac{2}{3}$ 陽性限界濃度はメチレン青濃度に反比例する。

3) 陰性限界

陰性限界における稀釈度はメチレン青 10,000 倍濃度で 1.4^8 倍、5,000 倍濃度で 1.4^6 倍、2,500 倍濃度で 1.4^4 倍、1,250 倍濃度で 1.4^2 倍であり、陰性限界濃度はメチレン青濃度に反比例する。

B. 分光光度計による測定

第1図は第1表に示した Donaggio 反応において残留メチレン青濃度を分光光度計を用いて (波長 530 m μ)測定したものである。横軸は尿の濃度であり、縦軸は残留メチレン青濃度を示し、各曲線はそれぞれ添加メチレン青濃度 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の場合の残留メチレン青濃度曲線である。10,000 倍メチレン青濃度添加曲線上で残留メチレン青濃度が完全陽性の $\frac{2}{3}$ 、すなわち 6 万倍のところで相当する部が Do-

第1図 各種メチレン青濃度における尿 (ムコ蛋白) 濃度と残留メチレン青濃度との関係

第1表 各種尿稀釈液におけるメチレン青濃度と Donaggio 値との関係

メチレン青	尿稀釈度 1.4 ⁿ											
	n=0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 : 1250	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 2500	+++	+++	+++	+++	++	+	±	—	—	—	—	—
1 : 5000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
1 : 10000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—

.....完全陽性限界, ——— $\frac{2}{3}$ 陽性限界,陰性限界

反応系 尿稀釈液 2 ml

メチレン青 1 ml

モリブデン酸安門 (4%) 1 ml

註) +++ 強陽性……沈澱をほとんど認めず

++ 陽性……上清の残留メチレン青濃度が完全陽性の $\frac{2}{3}$ 以上を示す

± 弱陽性……上清にメチレン青が残留するが残留メチレン青濃度が $\frac{2}{3}$ 以下を示す

— 陰性……上清がほとんど清澄である

naggio 標準法において Donaggio 値 1 点に相当する濃度を示す。

残留メチレン青濃度曲線は完全陽性と完全陰性の間では尿ムコ蛋白濃度に対し S 字状曲線を示すようである。本曲線上で肉眼比色と同様にして反応限界とメチレン青濃度との関係を求めることとする。

1) 強陽性限界

残留メチレン青濃度が 90% 残留部と 100% 残留部との間の曲線の勾配が緩やかであるために、100% 残留限界では Donaggio 値の判定が不正確となるために 90% の部を強陽性限界とすれば、メチレン青濃度 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の 90% メチレン青残留尿の Donaggio 値は (図中下向実線矢印) 各 1.34 点、2.80 点、5.20 点、10.7 点であり、その濃度比は 1 : 2.1 : 3.9 : 8 であつて、メチレン青濃度と Donaggio 値は反比例する。

2) $\frac{1}{2}$ 陽性限界

メチレン青 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の $\frac{1}{2}$ 陽性限界は Donaggio 値 (図中上向実線矢印) 各 1.00 点、2.14 点、4.80 点、8.95 点であつてメチレン青濃度と反比例する。

3) 陰性限界

残留メチレン青濃度 0 と 5 % の間の勾配が非常に緩やかであるために残留メチレン青濃度 5 % の点を陰性限界とすれば、添加メチレン青濃度 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の Donaggio 値は (図中点線下向矢印) 各 0.666 点、1.27 点、2.66 点、5.86 点でその比は 1 : 1.9 : 4 : 8.8 であり添加メチレン青濃度に反比例する。

4) $\frac{1}{2}$ 陽性限界

残留メチレン青濃度が S 字状曲線を示す場合には補体溶血度における $\frac{1}{2}$ 溶血度単位、あるいは最小致死量における $\frac{1}{2}$ 致死単位と同様に $\frac{1}{2}$ 陽性限界を単位とするのが合理的である。この価は添加メチレン青濃度 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の場合に各 0.93 点、1.87 点、4.40 点、8.1 点であつて、その比は 1 : 2 : 4.7 : 8.7 であり、やはり添加メチレン青濃度に反比例する。

2. Donaggio 原法とメチレン青増加法による疲労測定例

鉄道従業員 10 名の朝昼晩尿について毎分 2 ml または 3 ml 尿に補正後、Donaggio 原法とメチレン青増加法を用いて測定した価を第 2 表に示した。メチレン青増加法では、残留メチレン青濃度 $\frac{1}{2}$ 陽性限界を 10,000 倍、1 点 (2°)、5,000 倍、2 点 (2°)、2,500 倍、4 点 (2°)、1,250 倍、8 点 (2°) として肉眼比色法で測定したも

のであつて、両法の値はよい一致を示している。

第 2 表 鉄道従業員尿における Donaggio 値 (標準法) およびメチレン青増加法定量値 (点数) の比較

氏名	採尿時	原法	本法	氏名	採尿時	原法	本法
Ki	朝	1	2	Ko	朝	2	2
	昼	2	4		昼	2	4
	晩	2	2		晩	4	4
F	朝	1	2	Mi	朝	2	4
	昼	2	2		昼	4	4
	晩	2	2		晩	4	4
FL	朝	2	2	O	朝	2	2
	昼	4	4		昼	2	2
	晩	4	4		晩	1	1
Ka	朝	1	1	T	朝	4	4
	昼	1	1		昼	2	4
	晩	1	1		晩	2	8
S	朝	2	2	Mo	朝	4	4
	昼	2	2		昼	2	4
	晩	4	4		晩	4	4

考 按

1. 本法の精密度

Donaggio 標準法以前におこなわれた Donaggio 原法はメチレン青増加法を加味した採点法であるが、その点数が稀釈法の価と比例した点数でないために正しい Donaggio 値を示さぬ欠点があつた。Albeaux Fernet 法を改良した本法では稀釈法との間に厳密な検量曲線を求め、添加メチレン青濃度 10,000 倍、5,000 倍、2,500 倍、1,250 倍の範囲では反応限界濃度が、メチレン青濃度と反比例する点を利用し、添加メチレン青の $\frac{1}{2}$ 濃度の上清残留限界より採点する方法、すなわちメチレン青濃度 10,000 倍の場合、上清に 60,000 倍メチレン青残留部を 1 点、5,000 倍の場合上清に 30,000 倍メチレン青残留部を 2 点、2,500 倍の場合上清に 15,000 倍メチレン青残留部を 4 点、1,250 倍の場合上清に 7,500 倍メチレン青残留部を 8 点とする採点法を用いれば、標準法と同じ点数を得ることができる。さらに 90% および 10% 陽性限界の点数を用いて評価すれば本法はさらに精密化される。また分光光度計を用いてメチレン青濃度、特に 10~90% 陽性の範囲のものを定量し、検量曲線より $\frac{1}{2}$ 陽性限界値を求めて標準法の点数に換算すれば、さらに正

確な価が得られる。

2. 被検尿の稀釈度

本法に用いる被検尿はメチレン青濃度の範囲その他を考慮に入れて1分間2 ml, 3 ml, 4 ml 尿に稀釈後測定をおこなうのが適當のようである。また分間尿に補正しない場合は2倍稀釈尿を原液とする方が測定範囲が広い。Donaggio 値がメチレン青1,250 倍を越えた高い点数の場合はほとんど存在しないが、その際は尿をさらに2倍または4倍稀釈したのちにメチレン青1,250 倍で測定し、点数を2倍または4倍して測定値より換算した方が正確である。

3. 本法の利点

本法は多数例の Donaggio 反応をおこなう際には尿を倍数稀釈する煩雑さを除きうるために操作が簡便でありかつその正確度は標準法とほとんど等しいために、尿による疲労判定法として特に産業疲労の測定に有効な方法であると思われる。

結 論

Donaggio 反応における添加メチレン青濃度と反応限界との関係を肉眼および分光光度計を用いて検討し以下に示すとき結果を得た。

1) Donaggio 反応の限界値として、Ⓐ陽性限界値として残留メチレン青濃度が完全陽性の場合の90%以上、Ⓔ陰性限界値として10%以下、Ⓒ中間限界値として $\frac{2}{3}$ および $\frac{1}{2}$ メチレン青残留限界値を採用した場合において添加メチレン青濃度が 10,000 ~ 1,250 倍の範囲では添加メチレン青濃度と上述の各反応限界値は反比例する。

2) さらに上述の結果を用いて簡易 Donaggio 値定量法を考案した。すなわち1分間2 ~ 4 ml 尿の1 ml にメチレン青 0.5 ml, 4% モリブデン酸安門 0.5 ml を加える。その際のメチレン青濃度を 10,000 倍, 5,000 倍, 2,500 倍, 1,250 倍として添加し $\frac{2}{3}$ 陽性限界値, すなわ

ち10,000倍メチレン青添加の残留メチレン青濃度60,000倍, 5,000 倍メチレン青添加の残留メチレン青濃度30,000 倍, 2,500 倍メチレン青添加の残留メチレン青濃度15,000 倍, 1,250倍メチレン青添加の残留メチレン青濃度を7,500 倍に相当する尿稀釈濃度をそれぞれ1点, 2点, 4点, 8点として原尿の点数を計算する。以上の採点法を用いた場合は各点数は Donaggio 標準法による点数と一致する。

3) 鉄道従業員の作業前後尿の Donaggio 値を Donaggio 標準法および本法を用いて測定し両法による測定値の一致することを認めた。

終りに臨み本論文の御校閲を賜わった恩師大田原一祥教授に謹んで感謝の意を表す。

本論文の要旨は昭和32年7月第27回日本衛生学会総会¹⁾において発表した。

文 献

- 1) Donaggio, A. : Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 8, 1436, 1933.
- 2) 佐藤徳郎 : 体育研究, 8, 496, 1941.
- 3) 石川知福 : 疲労判定法 (学術研究会議疲労研究班編), 創元社, 78, 1947.
- 4) 石川知福 : 疲労判定法 (学術研究会議疲労研究班編), 創元社, 1947.
- 5) 佐藤徳郎 : 生体の科学, 1, 37, 1949.
- 6) 中山達夫 : 総合医学, 10, 255, 1953.
- 7) 山添三郎 : 学研プリント.
- 8) 山添三郎 : 疲労研究の共同実験 (学術研究会議疲労研究班編), 創元社, 1950.
- 9) Albeaux-Fernet, M., Bugard, P. & Romani, J. D. : Prees Médical, 63 (25) 509, 1955.
- 10) 吉川春寿・増田祥子・石丸清子 : 医学と生物学, 第2巻, p. 478.
- 11) 緒方正名 : 日本衛生学雑誌, Vol. 12, No. 2, p. 166, 1957.

(受付 : 1958年8月1日)