H. NAGASAWA and T. IWANAGA: Studies on Fatigue
(1st Report) Studies on Donaggio Reaction by Photoelectric Colorimeter (1)

疲労に関する研究（第一報）

光電管比色計による Donaggio 反応の研究（其の一）

岐阜大学 長 沢 弘
岩 永 忠 勝

I 結 言

尿中にあらわれる尿コロイドの量を知るには Donaggio 反応（以下 D-反応と略す）が古くから行われてきた。この反応では 10% 硫酸銅溶液に 1.5~2% アンモニア水を加えて標準液を作り、標準列法により被検液の Donaggio 値（以下 D-値と略す）を点線であらわす方法が簡便法¹⁾として行われているが点数がすべて整数であらわされるため、D-値の低い尿では大きな誤差が入る。標準液の色と被検液に試薬を加えたものの色調は明かに異なり、点数を読み取るに甚だ困難であり、特にこの判読に熟練している者以外には正確な点数が求め難い。

1953 年中山²⁾はこの点に着目し、光電光度計を用いて、D-反応標準法の精密化と簡易化を計つておられるが点数の低い尿に Lambert-Beer の法則が厳密に適用出来ないのに、苦心して D-値を点数であらわす事に努力している。

我々はスポーツ選手の疲労判定上、D-反応が最も簡便であり、比較的正確な方法であることを認めるが、D-値を点数で求めなくても、稀釈状態を同一にして、運動前後の尿に D-反応を実施し、吸光度の変化を測定する事により、疲労判定が出来ると考え、種々なス

ポーツ選手の尿につき検討した。その結果、この方法がスポーツ選手の練習指導上、また健康管理上に、必要な知見を得るには十分と考えられるにいたつたのでここに報告する次第である。

II 実 験 法

試料尿は運動直前、直後のものを用い、まず東洋濾紙 pH 試験紙を用いて pH を測定し、醋酸、又はアンモニア水を用いて 5.4 に調節し、加熱して蛋白を除き、透明尿 2cc をピペットでとり、次の如く稀釈した。試験管数本を用意し、水 1cc 宛の系列を作り、1 番目の試験管に尿 2cc を加えてよく混和し、そのうちからさらに 2cc をピペットで取り、2 番目の試験管に入れてよく混和し、以下順次同様に稀釈したものに、佐藤氏標準法³⁾に従つて操作し、沈澱の全く生じないことを確かめ、吸光度測定を行つた。比色は AKA-5D 型光電比色計に、径 10mm のセル及び科研製 S₆₆ フィルターを装着して行つた。Blank 用として水 2cc 入れ、尿と同様に操作したものを用いた。

稀釈限界を定めるためには、著者自身の運動（庭球）前後の尿につき、吸光度を測定した。

第1表 稀釈度と反応吸光度

濃度	1	2	3	4	5
1	0.290	0.300	0.290	0.330	
1.5	0.290	0.285	0.290	0.295	
2.25	0.260	0.290	0.260	0.275	
3.63	0.280	0.285	0.275	0.290	
5.06	-	-	-	0.280	

第1表及び第1図に示すように、1時間運動した後のものは2.25倍、3時間後のものは3.63倍まで稀釈しても直線的関係にあることがわかった。

次に吸光度を測るのに最適な時間を知るため、試薬添加後5分、10分、15分、20分、30分、45分、60分経過後、吸光度を測つて、変化がなかつたので、本実験では、すべて試薬添加し終つて、約10分～15分放置後、吸光度測定を行つた。

III 実験結果

1) 駅伝選手合宿練習における D-値

起床直後 (A)、午前軽い練習後 (B)、午後約13軒の全力走破後 (C)、の三つの場合の尿につき D-反応を行い吸光度を測定したところ第2表の如き結果が得られた。

この結果から吸光度の増加率を求めると第3表及び第2図の如き結果が得られた。

この結果から見ると合宿練習第二日目に吸光度増加率平均値は急激に増大する。然るに第三日には逆に減少し爾後次第に大きくなつてくる。

過激な運動直後には尿コロイドが減少するという特異現象が報告(4)(5)(6)されているが、我々の実験に於ては第三日目にこの現象がほとんど全員に現れている。その後、再び次第に大きくなる傾向を示している。

次に合宿に入る日の起床直後の尿の D-反応吸光度をもとにして合宿に於ける毎朝の尿の吸光度の変化率を第2表から算出すると

第1図 稀釈度と D-反応吸光度

第2表 駅伝選手尿の D-反応吸光度

選手	1	2	3	4	5	6	7	8	9
第1日 A ₁	0.135	0.122	0.170	0.150	0.170	0.175	0.110	0.130	0.140
B ₁	0.135	0.122	0.170	0.150	0.170	0.175	0.180	0.173	0.180
C ₁	0.145	0.130	0.185	0.170	0.185	0.190	0.170	0.190	0.175
第2日 A ₂	0.145	0.138	0.180	0.158	0.170	0.175	0.123	0.137	0.150
B ₂	0.135	0.130	0.140	0.160	0.170	0.170	0.185	0.170	0.140
C ₂	0.185	0.185	0.190	0.195	0.185	0.256	0.220	0.196	0.195
第3日 A ₃	0.180	0.185	0.195	0.190	0.182	0.186	0.180	0.188	0.180
B ₃	0.185	0.200	0.195	0.188	0.185	0.190	0.188	0.190	0.200
C ₃	0.185	0.190	0.182	0.188	0.180	0.180	0.183	0.200	0.190
第4日 A ₄	0.190	0.186	0.190	0.188	0.182	0.190	0.185	0.188	0.192
B ₄	0.192	0.188	0.183	0.200	0.182	0.200	0.195	0.196	0.185
C ₄	0.188	0.184	0.190	0.183	0.180	0.186	0.185	0.192	0.195
第5日 A ₅	0.195	0.185	0.205	0.186	0.194	0.204	0.193	0.212	0.260
B ₅	0.202	0.195	0.196	0.190	0.190	0.220	0.190	0.180	0.240
C ₅	0.210	0.200	0.210	0.205	0.190	0.191	0.195	0.186	0.250
備考	2.25倍希釈尿、1) 起床直後の尿、2) 午前軽い練習後の尿、3) 午後約13軒の全力走破後の尿								

第3表 駅伝選手尿の D-反応吸光度増加率

選手	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均
第1日	7.0	6.0	8.0	12.0	8.0	8.0	-	9.0	-	8.0
第2日	24.0	30.0	24.0	18.0	8.0	34.0	20.0	13.0	28.0	22.0
第3日	0	-5.0	-7.0	0	-3.0	-5.0	-2.0	5.0	-	-2.0
第4日	-2.0	-2.0	3.0	-	-1.0	-8.0	-	-2.0	5.0	-1.0
第5日	-4.0	2.0	7.0	7.0	-	-	2.0	3.0	4.0	4.0

第4表の如くなる。

この数値を測定日及び個人間の差の有無を

第2図 駅伝選手尿の D-反応吸光度増加率日変化

分散分析法により検定した。その結果第5表の如き成績を得、測定日、個人間には共に有意の差がある。

次に測定日にはどの日に有意の差があるかを最小有意差 (I.S.D.) の検定によつてしらべてみると、危険率5%で $I.S.D. = 35.2132$ が求められた。故に第一日より第二日には増大し、第三、四日は第二日目と変化がない。このことから、本格的合宿練習は第3日目位が最も疲労すると言われている事柄とよく一致する。

No. 6 は長距離専門の選手で 13km をよい記録で走破し、大きな尿コロイド増加率を示すにかかわらず、翌朝は甚しく増加率が減少している。これは睡眠が疲労回復に大きな効果を与えることを示す。

更に9人の選手のうちから比較的熱心に練習を励んだと思われる者 (A 群) と何等かの都合により練習を休んだ者 (B 群) とに分けて尿コロイド増加率平均値の検定を行つた。A 及び B 群の平均を求めると第6表の如く

第4表 駅伝選手起床直後尿の D-反応吸光度増加率

番号	1	2	5	6	8	9	合計
第1期 $(1 - \frac{A_1}{A_2}) \times 100$	7.0	12.0	0	0	5.0	7.0	31.0
第2期 $(1 - \frac{A_2}{A_3}) \times 100$	20.0	34.0	7.0	6.0	31.0	22.0	120.0
第3期 $(1 - \frac{A_3}{A_4}) \times 100$	29.0	34.0	8.0	8.0	30.0	27.0	136.0
第4期 $(1 - \frac{A_4}{A_5}) \times 100$	31.0	34.0	12.0	14.0	39.0	41.0	171.0

第5表 駅伝選手尿の D-反応吸光度増加率の測定日及び個人間変化

	平方和 (S.S.)	自由度 (N)	分散 (S.S./N)	分散比 (F)	危険率 (P)
日	1888	4-1 = 3	629.33	27.34	1% <
個人	1776	6-1 = 5	355.2	15.43	1% <
日・個人 (交互)	362	24-3-5 = 16	22.625		

第6表 駅伝選手起床直後尿の D-反応吸光度増加率変化

番号	A 群					番号	B 群				
	第1期	第2期	第3期	第4期	平均		第1期	第2期	第3期	第4期	平均
1	7.0	20.0	29.0	31.0	22.0	3	6.0	-	11.0	17.0	11.0
2	12.0	34.0	34.0	34.0	29.0	4	5.0	21.0	20.0	-	15.0
6	0	6.0	8.0	14.0	9.0	5	0	7.0	8.0	12.0	4.0
7	11.0	39.0	40.0	-	30.0						$\bar{x}_B = 12.0$
8	5.0	31.0	30.0	39.0	26.0						
9	7.0	22.0	27.0	41.0	25.0						
					$\bar{x}_A = 24.0$						

になる。

両群から分散 (S^2) を求めると $S_A^2 = 58.6$, $S_B^2 = 10$ となる。自由度 ($9-2=7$) の学生 t 分布をするから実際に計算を行つと $t = 2.242$ が得られる。これは t 分布表から危険率5%の場合の $t = 1.894$ より大きく、したがつて平均値に有意の差がある。即ち優秀な選手ほど尿コロイド量に大きな増加率を示すことが判る。従つて優秀でない選手は、疲労する迄に到つていないと言うことができる。

2) 十哩ロードレース選手の D-値

岐阜市に於て行われた、十哩ロードレース

に出場した13人の選手に依頼し、出発前及び決勝線に入つた後の尿を採取し、D-反応を行い吸光度を測定した。特にこの実験では前例に見られた、運動直後、吸光度が増加するものと減少するものがある点に注意し、尿中蛋白定量法(Exton 氏法)を同時に行つて両法の関係をもしらべた。

実験方法は Exton 試薬(変法)を使用する尿中蛋白の光電比色法に従つた^{7,8)}。D-反応を行う前の尿(未加熱尿)5cc をピペットを用いて大試験管にとり、水 5cc を加えてよく混和し、その中から 1cc をピペットで別の試験管にとり水 4cc を加えて、2% アラビヤゴム 1cc, Exton 試薬 5cc を加え、毎回よく混和し、室温に 10 分間放置後、5mm セル及びフィルター S₄₃ を用いて吸光度を測定した。Blank には水 5cc をとり、検液と同様に操作した。標準液を得ることができなかつたので吸光度の測定にとどまつた。そして第7表の如き結果を得た。表の中で D-反応は Donagio 反応、E-反応は蛋白反応を示す。

第7表 十哩ロードレース選手尿の D-反応及び反応吸光度

実験番号	着順	PH	D-反応				E-反応				備考
			出尿前	判別後	出尿後(A)	判別後(B)	増加率 ($\frac{B-A}{A}$) (%)	出尿前	判別後	差 (B-A)	
1	不明	6.0	6.2	0.200	0.215	7.0	0.003	0.015	15		
2	17	5.0	5.7	0.192	0.190	-1.0	0.000	0.005	5		
3	1	6.6	5.6	0.230	0.540	59.0	0.020	0.065	45	疲労甚し	
4	16	4.8	6.6	0.300	0.430	30.0	0.015	0.045	30	同上	
5	不明	5.9	6.0	0.195	0.190	-3.0	0.000	0.005	5		
6	14	5.7	5.6	0.185	0.190	3.0	0.005	0.016	11		
7	9	5.7	6.4	0.200	0.220	9.0	0.000	0.010	10		
8	2	5.6	5.7	0.189	0.205	8.0	0.005	0.015	10		
9	18	5.4	5.7	0.200	0.210	5.0	0.000	0.010	10		
10	10	5.7	5.8	0.195	0.248	21.0	0.003	0.020	17		
11	5	5.6	6.6	0.320	0.290	-10.0	0.000	0.010	10		
12	不明	5.8	5.4	0.210	0.195	-8.0	0.000	0.000	0		
13	6	6.0	5.7	0.265	0.290	8.0	0.004	0.018	14		

(前夜遅くまで労働)

D-反応の吸光度は本例においても、減少することもあつたが、蛋白はすべて増加した。長距離競走においては D-反応の吸光度の変化は蛋白と大体比例するが、全く逆となる特異例も見られた。

次に着順 10 位迄の 6 名(I 群)とそれ以下及び着順不明の 7 名(II 群)に分ち、D-反応の吸光度増加率の平均値差異の検定を行つた結果を第8表にあげる。

第8表 十哩ロードレース選手尿の D-反応吸光度増加率

I 群 D-反応吸光度増加率	II 群 D-反応吸光度増加率
59.0	7.0
9.0	-1.0
8.0	30.0
21.0	-3.0
-10.0	3.0
8.0	5.0
	-8.0
合計.....95.0	合計.....33.0
平均($\bar{x}_1$)...16.0	平均($\bar{x}_2$)...5.0
分散(S_{x1}^2)...546	分散(S_{x2}^2)...150

すなわち危険率 1% において、有意の差があり、優秀な選手ほど尿コロイドが増加している結果が得られた。また No. 4 の選手は順位は悪かつたが前夜遅くまで労働し、かつ遠方から参加しており、甚だ大きい増加率及び吸光度を示している。

IV 総 括

1) 光電比色計による D-反応の判定は標準列法よりも判定容易であり、かつ、正確である。

2) 本法によれば D-値を求める事なく運動選手疲労度を測ることが出来る。

3) 極度に疲労した場合の吸光度を各人について測定しておけば、本法は選手の健康管理

と指導上に甚だ有効なものとなる。

4) 疲労が甚だしい場合に吸光度がむしろ減少するという特異現象があるが、これはさらに継続して研究すべき、興味ある問題である。

終りに本研究に御指導をいただいた黒田佐俊氏及び御協力をいただいた山添鉄彌、井藤佳美氏に厚く感謝する。

文 献

1) 山添三郎：医学と生物，**15** (No. 1) 5 (1949).

- 2) 中山達夫：総合医学，**10**，255 (1953).
- 3) 佐藤徳郎：生体の科学，**1**，37 (1949).
- 4) 山岡誠一，吉岡利治：体育学研究，**1**，No. 4，271 (昭27)
- 5) 越智逸男：京都府立医大誌，**48**，184 (昭25).
- 6) 佐藤宏，杉崎盛：体育研究，**9**，15 (昭16).
- 7) 斎藤正行：光電比色計による臨床化学検査法，(南山堂)
- 8) **Exton, W.G.**: J. Lab. Clin. Med., **10**, 722 (1925).