尿中ゲンチジン酸量に就て、附肝臓機能との関係

日本医科大学薬理学教室 (主任 西村菊次郎教授)

坂 本 親 行

Chikayuki Sakamoto

I) 緒 言

生体にサリチル酸 (サ酸) 又は其塩類を投与すると、尿中に 1 部は不変のまま遊離サ酸として、他はグルクロン酸、グリシン等と結合し複合サ酸として、又酸化せられて¹⁾ ゲンチジン酸 (ゲ酸) として排泄される事は多くの人々によつて認められた。²⁾⁻⁸⁾ 複合サ酸は解毒機能によつて生じたものであり、肝機能と大きな関係を有する事が明らかにされている。⁹⁾ 複合サ酸と同様にサ酸より変化したゲ酸も肝機能と関係を有するであろうと言う可能性は当然考えられてよい。ゲ酸の排泄と肝機能との関係に関する文献は私の知るところでは、黄燐及四塩化炭素肝障害ラットにサ酸塩を注射し、その尿中にゲ酸の出現を見ないか又は著明に減少せる事を認めたと言う Lutwak-mann⁷⁾ の報告があるのみである。氏の報告によるとサ酸をゲ酸に変化せしめる機能が肝と関係ある事を想わせるが、その採尿法及反応法はゲ酸の多寡を推定するに止まり定量的に検索したものではなかつた。

又 Roseman⁵⁾ はゲ酸投与人尿には複合ゲ酸が認められないのに反し、サ酸曹達 (サ曹) 投与人尿に酸を加え加水分解後のゲ酸量は加水分解前に比し全例に於て増加している、即ち複合ゲ酸を認めたと述べている。Quilley⁶⁾ はサ酸塩投与のラット尿より恐らくグルクロン酸結合によると思われる複合ゲ酸の少量を検出したと述べている。但し両者共其数量は明示していない。

これ等の報告によると、サ酸は体内に於て遊離ゲ酸に變じ、更に複合ゲ酸に變ずるものであり、その変化階梯は複合サ酸より一段複雑と考えられるが、複合ゲ酸と肝機能との関係に就て論及している文献はないようである。そこで私はサ酸投与後尿中遊離ゲ酸量及複合ゲ酸量を定量、比較検討し、肝機能との関係を検索せんとした。

先ず本実験に適当な動物を選定する為、サ酸投与動物よりのゲ酸の検出率に就て見るに、Alpen⁴⁾ は人にサ酸経口投与し、24—36 時間総尿採取し、投与量の 1% 以下のゲ酸を、又犬にサ酸 1g を重曹水に溶解し静注、30—36 時間総尿採取し、4—5% のゲ酸を、Roseman⁵⁾ は人にサ曹経口投与し、24 時間総尿採取し、2.5—2.7% のゲ酸を、又マウスにサ曹を腹腔内注射し、24 時間後動物をすりつぶし、8% のゲ酸を、Quilley⁶⁾ はラットにサ曹を胃カテーテルで投与し、48 時間総尿を採取し、18—33.5% のゲ酸を、Kapp⁸⁾ は人にサ曹経口投与し、尿中にゲ酸の排泄されなくなる迄定量し、4—8% のゲ酸を、夫々検出している。以上の成績を比較検討するに、ラット及マウス尿は豊富なゲ酸を含有するが、動物が小さい為尿量が少く、本実験の様に 2 時間毎に採尿し定量せんとする操作には不適當である。人尿に於けるゲ酸の投与サ酸に対する検出率は研究者によつてまちまちであるが、Kapp によれば相当な検出率を示している。然し他の動物に比し尿量が多い為、尿中ゲ酸の含有率は低いと思われるし、又本実験に於てはゲ酸と肝機能との関係を検索する時に、人工的肝障害及肝臓出をせねばならず、かくの如き事は人では不可能であるから、人尿についての実験は不適當である。犬尿は投与サ酸に対し相当なゲ酸検出率を示し、本実験の操作に対し尿量も適當であり、従つて尿中ゲ酸の含有率も不足は無いと思われるし、人工的肝障害及肝臓出も可能である為最適と考えられる。故に実験動物には犬を選んだ。

ゲ酸の定量法に就ては、Accoyer¹⁰⁾, Mendioroz¹¹⁾, Gerald¹²⁾, Lowenthal¹³⁾ のフェノール試薬による方法、Benati¹⁴⁾, Mainardi¹⁵⁾ のゲ酸の還元作用をモリブデン酸アンモンに應用した方法、Smith¹⁶⁾, Roseman⁵⁾ の Folin-Ciocalteu¹⁷⁾ 試薬を應用した方法、Ungar¹⁸⁾, Kleckner¹⁾ の Ultraviolet spectrophotometry による方法、Quilley⁶⁾, Nanninga¹⁹⁾ の paper-

chromatography による方法, Rutkowski²⁰⁾ の Iodometry による方法等があるが, 能勢²¹⁾ はこれ等の数種を検討し, いずれも高度の技術を要するか, 又は妨害物質の充分な除去が約束されない限り尿への応用は困難なる事を認め, ゲ酸の還元作用を隣モリブデン酸に応用した新方法を報告し, 人及家兎にこの方法を用いた。私は犬尿に就て能勢氏反応を検討したが, 妨害物質多量の為犬には応用が困難な事を知った。

Lutwak-mann⁷⁾ はサ酸塩注射後のラット尿に苛性曹達(苛曹)溶液を滴下すると褐色より黒色に変化する物質のある事に著目し, これを尿よりエーテルにて抽出し白色粉末を得, これがゲ酸なる事を認めた。更にゲ酸と苛曹溶液との呈色反応の色濃度により尿中ゲ酸量の多寡を推定する方法を用いた。

このゲ酸のアルカリ呈色反応(ゲ酸呈色反応)が犬尿中ゲ酸の定量に用い得るならば, 其操作の簡易である事の故に, 以後の実験に便であると考えたので, 私はゲ酸呈色反応に検討を加え, 犬尿中ゲ酸の定量に用い得る方法を見出し, 更に其定量法を用いて犬尿中ゲ酸量と肝機能との関係を検索した。

尚私はサ酸が苛曹溶液と呈色反応を示さない事を実験により確めた。故に苛曹溶液によるサ酸投与犬尿中ゲ酸定量法は, 同時に尿中に出現する遊離サ酸によって妨害せられる事はない。

II) 基礎実験

Lutwak-mann はサ酸注射ラット尿数 cc に 10%塩酸を加えて酸性化し, 3 倍容のエーテルを加えて振盪, ゲ酸を抽出し, エーテル相に数 cc の苛曹溶液を加えて振盪, ゲ酸を再抽出と同時に呈色せしめて苛曹溶液相が赤色より褐色に変色してゆくゲ酸呈色反応の濃淡を観察し, 尿中ゲ酸量の多寡を推定した。

犬尿に於ても同様にエーテルにて抽出し, これに苛曹溶液を加え振盪, ゲ酸を再抽出と同時にゲ酸呈色反応を起さしめ, これを比色定量し得るならば其操作は簡易であろう事が想像される。然し Lutwak-mann の言う如く, ゲ酸反応は赤色より褐色に変色してゆく不安定なものであり, そのまゝでは比色定量に応用する事は出来ない。先ず色調を安定させなければならぬ。私はゲ酸呈色反応が各条件下に現わす色調変化の性質を検討し, その安定となるべき条件を見出さんとした。

A) 安定な色調を得る為の実験

1) 各種規定苛曹溶液内ゲ酸呈色反応の時間的変化

1/1000 M より 1 M 迄の苛曹溶液を作りこれにゲ酸を投入, 10 mg/dl とし, 混和呈色せしめて後時間を測定し乍ら比色測定した。比色には日立製光電比

第 1 図

各種規定苛曹溶液内ゲ酸呈色反応の時間的变化
 : 赤色反応, ——— : 褐色反応
 ゲ酸濃度: 10 mg/dl

色計を用いた。比色条件: フィルター: コバルト (波長 430-440 mμ), セル: 3 mm, 対照: 水, 室温: 24°C 成績は第 1 図に示す。

各種規定苛曹溶液内ゲ酸呈色反応はかなり多様な変化を示しているが, 先ず赤色が次第に濃くなり最高濃度に達すると次第に褐色してゆき, 次に褐色に変化しこれが又次第に濃くなり最高濃度に達すると次第に褐色してゆく。即ち初めの赤色反応と後の褐色反応とに分ける事が出来る。例えば第 1 図 1/50 M の曲線はこれを示す。

1/1000, 1/500, 1/100 M は総て赤色反応であり, アルカリ低濃度の為 50 分以内には褐色反応は出て来なかつた。1/1000, 1/500 M では色調は安定であるが色濃度が低く比色には不適である。1/100 M では色濃度は高いが不安定である。1/50 M では赤色, 褐色両反応が出ていて褐色反応は赤色反応より低濃度であるが安定度は高い。1 M では混和呈色後 2 分にして既に赤色反応は褐色し褐色反応が出て来ている。褐色反応は高濃度を示し安定度も比較的高い。

本実験及爾余の実験により, ゲ酸呈色反応は次の様な傾向を有する事を知り得た。これを仮構図として第 2 図に示す。

第 2 図

ゲ酸呈色反応の仮構図

-----: 赤色反応 —————: 褐色反応

A: アルカリ高濃度, B: アルカリ低濃度

i) 赤色反応は褐色反応より迅速に経過し、(比色に短所)、且つ高濃度である。(比色に長所)。

ii) アルカリ濃度が高い場合は低い場合より反応が迅速、(比色に短所)、且つ高濃度である。(比色に長所)。

iii) 赤色反応も褐色反応も発色期は迅速、(比色に短所)、褪色期は緩慢である。(比色に長所)。

ゲ酸呈色反応のこれ等の性質中、比色に長所を生かし、短所を除き、高濃度にして安定なる色調を得るとの方針のもとに以後の実験を進めた。

2) 苛曹濃粉溶液内ゲ酸呈色反応の時間的变化

赤色反応の高濃度を利し、反応経過時間を濃粉溶液にて遅延せしめ、比色に適当な色調を得る目的にて本

第 3 図

苛曹濃粉溶液内ゲ酸呈色反応の時間的变化

-----: 赤色反応, ○: 第 1 例, △: 第 2 例
溶液は苛曹 1/5 M, 濃粉 3%, ゲ酸 10 mg/dl を含有す
実験を試みた。

1/5 M 苛曹 3% 濃粉溶液を攪拌しつつ加熱煮沸し室温にて放冷、これにゲ酸を加え 10 mg/dl とし混和呈色せしめて後、時間を測定し乍ら比色測定した。本

実験は 2 例に就き行つた。比色条件：フィルター：コバルト，セル：3mm，対照：同様調製せる苛曹濃粉溶液，室温：30°C。成績は第 3 図に示す。

同一例に就ては色調の安定する時間を有するのであるが、各例の色濃度に可成の差があり比色定量には不適である。

3) 低温内ゲ酸呈色反応の時間的变化

2) と同様赤色反応の高濃度を利し、反応経過時間を低温にて遅延せしめ、比色に適当な色調を得んとして本実験を試みた。

1/500, 1/100, 1/50 M の苛曹溶液にゲ酸を投入、10 mg/dl とし混和呈色せしめ、直ちに冷蔵庫(9°C)に入れ、時間を測定しながら冷蔵庫より被検液を取出して直ちに比色測定した。比色条件：フィルター：コバルト，セル：3 mm，対照：水，室温：24°C。成績は

第 4 図

低温内 (9°C) ゲ酸呈色反応の時間的变化

-----: 赤色反応, ○: 1/50 M, □: 1/100 M, △: 1/500 M, ゲ酸濃度: 10 mg/dl

第 4 図に示す。

1/50 M 溶液は室温内ならば 20 分以内に褐色反応に移行すべきなのに本実験では 35 分後も尚赤色反応のまゝであつた。1/50 M は 1/100 M よりも色濃度が低い。これは低温の為常温時とは異つた反応態度を示す故と思われた。全例不安定にて比色定量には不適であつた。

4) 沸騰温浴後ゲ酸呈色反応の時間的变化

呈色反応を高熱にて促進すれば、短時間内に反応の最終的段階に到達せしめ得て安定なる色調を得べしと考え、この実験を試みた。

1/5M 苛曹溶液にゲ酸を投入 20 mg/dl となし混和、呈色開始して各 10, 30, 60 分後より、20分間沸騰温浴し、室温にて放冷時間を測定しながら比色測定した。沸騰温浴は 20 分以上経続すると沈澱を生ずる為 20 分を適当とした。比色条件：フィルター：コバル

第 5 図

沸騰温浴後ゲ酸呈色反応の時間的変化

———：褐色反応，□：反応後 10 分で温浴，
△：反応後 30 分で温浴，○：反応後 60 分で温浴，
苛曹濃度：1/5 M，ゲ酸濃度：20mg/dl，沸騰温浴：20 分

ト，セル：10 mm；対照：水，室温：13°C。成績は第 5 図に示す。

呈色反応開始より沸騰温浴を始める迄の時間の相異によつて色濃度が異なり，又放冷する時間の経過に従つて色濃度が変化する。即ち二つの条件に關聯して不安定な色調となる為比色定量には一層不適と考えた。

5) 高濃度苛曹溶液内ゲ酸呈色反応の時間的変化

高濃度苛曹溶液内では赤色反応は速かに褪色し，高濃度の褐色反応現れ，その褪色時はゲ酸呈色反応系中最も安定度の高い傾向を有するので，この部を検討せんとして 1/5 M 及 1 M 苛曹溶液に就て試みた。

i) 1/5 M 苛曹溶液の場合

1/5 M 苛曹溶液にゲ酸を投入し 20 mg/dl となし，混和呈色せしめて後，時間を測定しながら比色測定し

第 6 図

1/5 M 苛曹溶液内ゲ酸呈色反応の時間的変化

———：褐色反応，□：第 1 例，○：第 2 例，
△：第 3 例，ゲ酸濃度：20mg/dl

た。本実験は 3 例に就き行つた。比色条件：フィルター：コバルト，セル：10 mm，対照：水，室温：13°C

成績は第 6 図に示す。

同一例の呈色反応の時間的変化に於ては褪色時安定度の高い色調を得たが，各例の色濃度には可成りの差があり，比色定量には不適であつた。この差は苛曹とゲ酸を混和する時の振盪回数及その強度にも原因するものと思われ，ゲ酸呈色反応は各条件に極めて鋭敏に影響を被るものと考えられた。

ii) 1 M 苛曹溶液の場合

この様にゲ酸呈色反応は各条件の僅かな変化に対しても鋭敏に影響を被るので，例え試験管内にて安定な色調の呈色反応を造り得ても，動物実験の場合は尿にエーテルを加え強振盪する等の影響が加わるので，単に試験管内の実験とは異つた色濃度を呈するのである。

これらの影響を顧慮して尿中実験の条件に近からしめんが為に，本実験に於てもゲ酸を苛曹溶液と混和呈色せしめる時にエーテルを加え，且つ分液漏斗を用い 200 回強振盪する事にした。

尙この操作による時はゲ酸苛曹溶液とエーテルの混合液を分液漏斗にて振盪している間に，エーテルが微量乍らゲ酸苛曹溶液に溶解し，ゲ酸苛曹溶液の液量がそれだけ増加するので，若し振盪前から予定量のゲ酸苛曹溶液を使用する時は，振盪後は予定量以上になり，任意の濃度のゲ酸苛曹溶液を比色測定する事が出来なくなる。

そこで振盪前はゲ酸苛曹液量を予定の量より少な目にした。然る時は振盪後エーテルの溶解によりゲ酸苛

第 7 図

1 M 苛曹溶液内ゲ酸呈色反応の時間的変化

———：褐色反応，△：第 1 例，×：第 2 例，
□：第 3 例，○：第 4 例，ゲ酸濃度：5 mg/dl

曹溶液の量が増加しても予定の量に達せぬので，振盪後の苛曹溶液を分液漏斗より出した後，これに水を加えて予定の量としたので任意の濃度のゲ酸苛曹溶液を比色測定する事が出来た。

5 M 苛曹溶液 10 cc に水を加えて 40 cc となし，これに 100 mg/dl ゲ酸 2.5 cc を加え，混和呈色後直ちに分液漏斗に入れエーテル 100 cc を加えて強く 200 回振盪，水相を取り水を加えて 50 cc とす。これを

5 mg/dl ゲ酸 1M 苛曹溶液とす。静かに混和、その後の時間を測定しながら比色測定した。本実験は4例に就き行つた。比色条件：フィルター：コバルト，セル：25 mm，対照：水，室温：20°C。成績は第7図に示す。

第8図の拡大図

90 cc とす。

iii) これを 500 cc の分液漏斗に入れエーテル 100 cc を加え約 200 回強振盪。

iv) 水相を取りメスチリンデルに入れ水を加え 100 cc とす。静かに混和。これを夫々 1, 2, 3, 5, 7, 10 mg/dl ゲ酸の 1M 苛曹溶液とす。

v) これを 16-20°C に保ち 40-50 分放置。比色し標準グラフを作る。

アルカリ強度の為呈色後 5 分にして既に褐色反応の褪色期であり、呈色後 40 分より 50 分の間が略一定の色濃度を示し、而も 4 例とも各期を通じ略同一色濃度を示している、40 分より 50 分の間が比色定量に应用可能なる部分と考えた。この様に各例共略一定色調が得られた理由は高濃度のアルカリで回数多く強振盪した為、略極限迄反応が進んだ事、振盪の回数及強度を一定した事により各例間の反応進行度の差が少くなつた事によるものと思われる。

B) 犬尿中ゲ酸定量法を決定する為の実験

1) 標準グラフ作製方法

1M 苛曹溶液内ゲ酸呈色反応にて安定色を得たので、この方法に準拠して標準液を造つた。又この呈色反応は温度の影響も鋭敏に被るので、放置時の温度の範囲も規定した。

i) 2.5 M 苛曹溶液 40 cc をメスチリンデルに入れ水を加え約 80-90 cc とし混和す。

ii) これに 100 mg/dl ゲ酸溶液を夫々 1, 2, 3, 5, 7, 10 cc 加え静かに混和。この時の液量は約

第 8 図

ゲンチジン酸基礎曲線

● 平均値 ・ 箇々の比色値

vi) 比色条件：室温：フィルター：コバルト（波長 430-440 mμ），セル：25 mm，対照：1M 苛曹溶液。

この方法により測定せる比色値は第1表に示す。標準曲線は第8図に示す。各平均値を示す点は略直線上にある。

2) 犬尿中ゲ酸の定量法

第9図に示す如し。被検尿に尿の 1/10 量の 10% 塩酸を加え、妨害物質除去の目的を以て尿の 1/2 量の 10% 燐タングステン酸を加え混和し、生ぜる白色

第 1 表
ゲ酸濃度と比色値

		ゲ酸濃度：mg/dl					
		1	2	3	5	7	10
		比色値：-log					
実験番号	1	0.045	0.115	0.170	0.276	0.375	0.540
	2	0.050	0.105	0.158	0.250	0.390	0.540
	3	0.045	0.106	0.152	0.260	0.370	0.530
	4	0.048		0.156		0.375	0.500
	5					0.360	0.490
平均値		0.047	0.109	0.159	0.262	0.374	0.520

第 9 図

犬 尿 中 ゲ 酸 定 量 法

比色条件：室温，フィルター：コバルト（430-440 mμ），セル：25 mm，対照：1 M NaOH

沈澱を 2000 回転 5 分間遠心沈澱し，上清を取り尿の 1/2 量の 10% 醋酸鉛を加え混和し，生ぜる白色沈澱を同様に遠心沈澱し，上清を取り分液漏斗に入れエーテル 50 cc を加え，200 回強振盪抽出，これを 2 回繰り返す，静置してエーテル相と尿相とに分離す。溶媒による溶解度の差により，遊離ゲ酸はエーテル相に，複合ゲ酸は尿相に含まれている。

遊離ゲ酸：2.5 M 苛曹溶液 40 cc に水を加え約 90 cc となし混和す。これをエーテル相に加え 200 回強振盪抽出す。この時ゲ酸は苛曹溶液内に再抽出せられると同時に呈色反応を起し，赤色より速かに褐色に変化してゆく。この操作は 1 回にて充分である。静置してエーテル相と苛曹溶液相に分離す。苛曹溶液相を取り水を加え 100 cc となし静かに混和し，16-20°C に保ち 40-50 分放置す。これを比色測定し，ゲ酸標準グラフにより見掛遊離ゲ酸量を求め，これより妨害物質値（後述）を差引き絶対ゲ酸量を算定する。比色条件：室温：フィルター：コバルト（波長 430-440 mμ），セル：25 mm，対照：1 M 苛曹溶液。

複合ゲ酸：尿相（塩酸性）を 30 分沸騰温浴し，

これを放冷して加水分解を行い，複合ゲ酸を遊離ゲ酸にして後遊離ゲ酸と同様に定量する。

3) 犬尿に於ける妨害物質値

犬尿をそのままこの定量法によりゲ酸を定量する場合，尿中に橙色の呈色反応を起す物質，即ち妨害物質が出現する。私は種々の組合せにて麟タンゲステン酸，醋酸鉛，硝酸銀を用いて尿を脱色した後妨害物質を定量して，その除去力を検討し，最も強力と思われる方法を本定量法中に採用した。然しこの方法に於ても尚妨害物質を僅かながら認めたので，これに検討を加えた。妨害物質値は主に尿量に關係を有し，採尿迄の時間及尿色には關係が少いと思われたので，無処置正常犬より採尿し本定量法により妨害物質を定量し，尿量に対する妨害物質値を比較検討した。成績は第 2 表に示す。

平均値に於て尿量 10 cc 迄は遊離妨害物質値 0.04 mg，複合妨害物質値 0.15 mg，夫以上 20 cc 迄は遊離妨害物質値 0.08 mg，複合妨害物質値 0.12 mg を認めた。

本成績に就て考察すると，遊離妨害物質値は尿量に

比例するが、複合妨害物質値は尿量と関係を有せぬものと考えられ、尿量と複合妨害物質値の關係に就ては尙今後検討の余地がある。

定量に際しては正確を期する為、遊離に於ては見掛

第 2 表
犬尿に於ける妨害物質値

実験 番号	各例の 尿量 cc	尿量による分類			
		自 0 至 10 cc		自 10.1 至 20 cc	
		遊離	複合	遊離	複合
		妨害物質値 : mg			
1	20.0			0.20	0.04
2	20.0			0.—	0.04
3	20.0			0.04	0.36
4	20.0			0.16	0.12
5	8.5	0.—	0.10		
6	17.0			0.04	0.—
7	20.0			0.—	0.18
8	20.0			0.04	0.40
9	4.3	0.02	0.26		
10	20.0			0.10	0.06
11	20.0			0.20	0.20
12	5.6	0.—	0.20		
13	4.4	0.06	0.04		
14	10.0	0.10	0.—		
15	20.0			0.08	0.—
16	20.0			0.—	0.—
17	20.0			0.10	0.—
18	7.2	0.06	0.30		
総 量		0.24	0.90	0.96	1.40
平 均 値		0.04	0.15	0.08	0.12
最 大 値		0.10	0.30	0.20	0.40
最 小 値		0.—	0.—	0.—	0.—

実験期間 自 昭 29.10.1 至 29.12.23

ゲ酸量より、尿量 10 cc 迄は 0.04 mg 夫以上は尿量

10 cc を増す毎に 0.04 mg 加算した妨害物質値を差引き絶対ゲ酸量を求めた。複合ゲ酸に於ては尿量に關係なく見掛ゲ酸量より常に 0.15 mg の妨害物質値を差引き絶対ゲ酸量を求めた。

4) 沸騰温浴時間と複合ゲ酸分解度との關係

複合ゲ酸を加水分解して遊離ゲ酸とする為に尿を酸性下に沸騰温浴するが、その所要時間短きときは複合ゲ酸を完全に分解し尽せず、長きに過ぎる時は時間の不経済のみならず妨害物質が増量してくる恐れがある。この為に沸騰温浴時間は最短にして充分である事が理想である。

正常犬にサ曹 500 mg 皮下注射後 4 時間総尿採取し、本定量法の操作により遊離ゲ酸を除去した尿を 3 等分し、沸騰温浴時間を夫々 15, 30, 60 分とし、其他は本定量法と同操作により複合ゲ酸量を求めこれを検討した。成績は第 3 表に示す。

複合ゲ酸は沸騰温浴時間 15 分より 30 分迄は増量し、30 分より 60 分迄は殆ど差を認めない。故に 30 分を以て最短にして充分なる沸騰温浴時間とし本定量法中に採用した。

5) 犬尿に於ける添加試験

以上を以て本定量法の操作上の検討を終了したが最後に本定量法の正確度を見る為にこの実験を行つた。

第 3 表

尿の沸騰温浴時間と複合ゲ酸分解度との關係

		分解せるゲ酸量 : mg				
実験番号		1	2	3	4	5
沸騰温浴時間	15 分	2.40	0.69	1.06	1.14	0.92
	30 分	2.75	1.43	1.38	1.39	1.01
	60 分	2.70	1.32	1.35	1.39	1.01

i) 遊離ゲ酸定量法の正確度を見る為に、無処置正常犬尿 10 cc にゲ酸を 4 mg 添加混合し、遊離ゲ酸定量法を用いて添加ゲ酸を定量した。

ii) 複合ゲ酸定量法の正確度を見る為に無処置正常犬尿 10 cc に予め遊離ゲ酸定量操作を施した後ゲ酸を 4 mg 添加混合し、複合ゲ酸定量法を用いて添加ゲ酸を定量した。成績は第 4 表に示す。

尿をそのままにて定量した場合、即ち i) の場合は最高検出率 102.0% 最低検出率 97.8% 平均検出率 99.2% であり、尿を 30 分沸騰温浴した場合、即ち

ii) の場合は最高検出率 96.8% 最低検出率 88.8%

平均検出率 94.7% である。依て本定量法は実用に供し得べき正確度を有するものと認めた。

III) 動物実験

1) 実験材料及方法

実験動物：10.0 kg 内外の牝犬を用いた。

サ曹投与：10% サ曹水溶液 5.0cc (サ曹 500 mg) を皮下注射す。

第 4 表

犬尿に於ける添加試験
添加ゲ酸 4 mg 尿量 10 cc

実験番号	尿をそのままにて定量		尿を 30 分沸騰温浴後定量	
	検出 mg	検出 %	検出 mg	検出 %
1	3.91	97.8	3.55	88.8
2	3.95	98.8	3.83	95.8
3	3.95	98.8	3.87	96.8
4	3.94	98.5	3.83	95.8
5	4.08	102.0	3.85	96.3
平均検出率				
99.2%		94.7%		

採尿：ネラトンカテーテル又は金属カテーテルにてサ曹投与後 4 時間迄 2 時間毎に行う。

尿の pH 測定：pH Test Paper (東洋濾紙製) を用う。

ゲ酸定量法：本定量法を用う。

2) 正常犬尿中ゲ酸量

a) 犬に加わる諸条件の尿中ゲ酸量に及ぼす影響

実験中犬に加わる諸条件の影響による尿中ゲ酸量の動揺範囲を知る為次の如く実験を行つた。

i) サ曹負荷回数の影響

同一犬にサ曹初回注射後一週間以上の間隔を置き、既に尿中ゲ酸が排泄せられていないのを確めた上再度サ曹を注射して初回及再度負荷時尿中ゲ酸量を定量し比較した。成績は第5, 6, 7 表に示す。

遊離ゲ酸のサ曹再度負荷時平均値は初回負荷時平均値に比し、夏季背位固定の場合は僅に減少、夏季非固定の場合は僅かに増加、秋季非固定の場合は著明に減少す。複合ゲ酸のサ曹再度負荷時平均値は初回負荷時平均値に比し、夏季背位固定、夏季非固定、秋季非固定の総てに於て著明に減少す。即ちサ曹再度負荷時に於ては遊離ゲ酸は減少の傾向を有し、複合ゲ酸は常に

減少す。斯様に再度負荷時には尿中ゲ酸量は既に減少の傾向を有しているのであるから、尿中ゲ酸量を研究するにはサ曹初回負荷尿に就て行くのが妥当と考える。

而しこの減少の原因はサ曹負荷回数の増加によるものとは限らず、初回負荷より再度負荷迄の大小屋に飼養する期間によるものか、犬の食料に關係するものかは検討を要する問題で、今後の研究に待つ。

ii) 固定の影響

犬を 4 時間も固定すると、かなり苦悶するのでその影響を知る為背位固定のまゝの実験と採尿時のみ固定しその他の時は非固定のまゝの実験を行い尿中ゲ酸量を定量し比較した。成績は第5, 6 表に示す。

遊離ゲ酸及複合ゲ酸の初回負荷平均値及再度負荷平均値は共に夏季非固定より夏季背位固定の方が僅に多

第 5 表

正常犬尿中ゲ酸量
夏季背位固定の場合

犬番号	注射回数	実験月日	室温 °C	投与後の時間 h	pH	尿量 cc	遊離ゲ酸 mg	複合ゲ酸 mg	全ゲ酸 mg
10	1	13/VII	21.0	2	8.4	6.5	0.36	0.85	1.21
	4			4	7.6	59.0	3.06	3.10	6.16
	合計					65.5	3.42	3.95	7.37
	2	7/VIII	30.1	2	6.6	13.0	1.32	0.15	1.47
14	4			4	6.0	12.5	3.75	0.37	4.12
	合計					25.5	5.07	0.52	5.59
	1	16/VII	24.0	2	7.0	7.5	1.37	0. —	1.37
	4			4	6.8	8.8	5.40	0.93	6.33
15	合計					16.3	6.77	0.93	7.70
	2	8/VIII	29.0	2	6.4	4.1	1.13	0.55	1.68
	4			4	6.6	8.5	1.71	0.27	1.98
	合計					12.6	2.84	0.82	3.66
15	1	30/VII	29.0	2	7.0	14.0	0.32	0.05	0.37
	4			4	6.8	25.0	1.41	2.05	3.46
	合計					39.0	1.73	2.10	3.83
	2	11/VIII	30.0	2	6.6	3.7	0.26	0.70	0.96
平均値	4			4	6.2	9.0	2.62	0.45	3.07
	合計					12.7	2.88	1.15	4.03
平均値	1		27.2	合計		40.3	3.97	2.33	6.30
	2			合計		16.9	3.60	0.83	4.43

投与サ曹：500 mg

第 6 表

正常犬尿中ゲ酸量
夏季非固定の場合

犬 番 号	注 射 回 数	実 験 月 日	室 温 ℃	投 与 後 の 時 間 h	pH	尿 量 cc	遊 離 ゲ 酸 mg	複 合 ゲ 酸 mg	全 ゲ 酸 mg
17	1	19/VIII	30.0	2	5.0	73.0	2.31	2.07	4.38
				4	6.4	54.0	3.27	1.88	5.15
				合計		127.0	5.58	3.95	9.53
	2	1/IX	26.0	2	8.4	11.0	0.80	0.25	1.05
				4	7.4	19.0	1.32	0.35	1.67
				合計		30.0	2.12	0.60	2.72
16	1	25/VIII	26.0	2	6.6	67.0	0.73	0.—	0.73
				4	6.6	28.4	1.44	0.28	1.72
				合計		95.4	2.17	0.28	2.45
	2	3/IX	25.0	2	6.4	20.0	3.00	0.—	3.00
				4	6.4	1.5	0.52	0.11	0.63
				合計		21.5	3.52	0.11	3.63
13	1	10/IX	30.0	2	7.6	26.4	0.28	0.62	0.90
				4	7.4	18.8	0.60	0.55	1.15
				合計		45.2	0.88	1.17	2.05
	2	22/IX	28.0	2	5.6	64.0	1.35	0.—	1.35
				4	6.4	23.8	2.74	0.42	3.16
				合計		87.8	4.09	0.42	4.51
12	1	1/X	23.0	2	4.8	22.0	0.74	0.29	1.03
				4	4.8	22.4	1.90	0.30	2.20
				合計		44.4	2.64	0.59	3.23
	2	8/X	18.0	2	6.0	24.2	0.36	0.17	0.53
				4	6.4	32.8	2.46	0.51	2.97
				合計		57.0	2.82	0.68	3.50
平均 値	1	25.8	合計		78.0	2.82	1.50	4.32	
	2		合計		49.1	3.14	0.45	3.59	

投与サ曹：500 mg

い。即ち固定は尿中遊離ゲ酸量及複合ゲ酸量に大なる影響を及ぼさない。然しなるべく自然の状態に於て動物を観察する目的を以て以後は肝別の場合を除き総て採尿時以外は非固定のまま実験を行つた。

iii) 気温の影響

夏季は高温の爲犬の元気が衰えている。これらの影響を知る爲夏季背位固定、夏季非固定及秋季非固定に就き比較検討した。成績は第 5, 6, 7 表の如し。

第 7 表

正常犬尿中ゲ酸量
秋季非固定の場合

犬 番 号	注 射 回 数	実 験 月 日	室 温 ℃	投 与 後 の 時 間 h	pH	尿 量 cc	遊 離 ゲ 酸 mg	複 合 ゲ 酸 mg	全 ゲ 酸 mg
18	1	6/X	20.0	2	5.8	12.5	3.12	0.29	3.41
				4	5.6	10.0	10.36	1.59	11.95
				合計		22.5	13.48	1.88	15.36
	2	19/X	20.0	2	7.6	15.0	1.77	0.35	2.12
				4	7.2	24.4	3.69	0.66	4.35
				合計		39.4	5.46	1.01	6.47
19	1	15/X	17.0	2	6.0	8.0	3.21	0.15	3.36
				4	5.6	10.0	5.54	0.83	6.37
				合計		18.0	8.75	0.98	9.73
	2	23/X	19.0	2	6.0	30.0	1.23	0.—	1.23
				4	5.6	14.6	3.04	0.—	3.04
				合計		44.6	4.27	0.—	4.27
20	1	27/X	18.0	2	6.4	24.2	3.03	0.67	3.70
				4	6.2	68.0	9.75	3.42	13.17
				合計		92.2	12.78	4.09	16.87
	2	3/XI	18.0	2	6.2	65.0	1.87	0.83	2.70
				4	6.2	78.0	5.92	2.78	8.70
				合計		143.0	7.79	3.61	11.40
21	1	29/X	20.0	2	7.2	8.5	1.64	0.15	1.79
				4	6.4	15.0	2.62	0.53	3.15
				合計		23.5	4.26	0.68	4.94
	2	4/XI	18.0	2	8.6	6.5	1.03	0.31	1.34
				4	8.0	8.5	2.55	0.35	2.90
				合計		15.0	3.58	0.66	4.24
22	1	30/X	19.0	2	7.6	28.0	2.44	0.55	2.99
				4	7.6	24.8	5.09	0.82	5.91
				合計		52.8	7.53	1.37	8.90
	2	5/XI	18.0	2	6.8	5.6	2.16	0.05	2.21
				4	6.2	9.8	1.64	1.10	2.74
				合計		15.4	3.80	1.15	4.95
平均 値	1 2		18.7	合計		41.8	9.36	1.80	11.16
				合計		51.5	4.98	1.29	6.27

投与サ曹：500 mg

遊離ゲ酸の夏季背位固定及夏季非固定の平均値は秋季非固定平均値に比し初回負荷時及再度負荷時共に少い。複合ゲ酸の夏季背位固定及夏季非固定平均値は秋季非固定平均値に比し、夏季背位固定初回負荷時が僅に多い以外は初回負荷時及再度負荷時共に少い。即ち高温は尿中遊離ゲ酸量及複合ゲ酸量共に減少せしめる。因みに夏季背位固定の平均室温 27.2°C, 夏季非固定 25.8°C, 秋季非固定 18.7°C であった。

以上を総合して考按するに、実験はサ曹初回負荷時のみとし、高温時を避けて行うことが尿中ゲ酸量の研究には重要であると考ええる。

b) 尿中ゲ酸量の正常値

上記諸種のことがらから尿中ゲ酸量を研究せんとする時は条件を秋季サ曹初回負荷時と限定して実験するが便である。この場合の尿中ゲ酸量の正常範囲を実験時正常値と名付けた。又尿中ゲ酸量の定量を応用し臓

第 8 表
肝 障 碍 犬 尿 中 ゲ 酸 量
秋 及 初 冬 非 固 定 の 場 合

犬 番 号	室 温 °C	投 与 後 の 時 間 h	pH	尿 量 cc	遊 離 ゲ 酸 mg	複 合 ゲ 酸 mg	全 ゲ 酸 mg
26	14.0	2	8.4	21.0	0.41	0.38	0.79
		4	7.4	17.4	1.37	0.—	1.37
		合計		38.4	1.78	0.38	2.16
31	16.0	2	5.8	12.0	2.89	0.05	2.94
		4	5.8	12.0	2.97	0.15	3.12
		合計		24.0	5.86	0.20	6.06
32	14.0	2	6.6	25.2	2.02	0.28	2.30
		4	5.8	101.0	3.95	0.56	4.51
		合計		126.2	5.97	0.84	6.81
33	18.0	2	6.6	34.4	1.01	0.—	1.01
		4	7.0	11.4	0.54	0.—	0.54
		合計		45.8	1.55	0.—	1.55
34	18.0	2	5.6	12.6	1.40	0.15	1.55
		4	5.6	11.4	1.92	0.45	2.37
		合計		24.0	3.32	0.60	3.92
平均値	16.0	合計		51.7	3.70	0.40	4.10

実験月日：自 11 月 18 日 至 12 月 23 日
注射回数：全例 1 回、投与サ曹：500 mg
肝障害法：四塩化炭素 0.5 cc/kg 皮下注射
(肝障害後 24 時間に実験開始)

器の機能検査等に資せんとする時は動物の被る条件を規定出来ない事が多い。故にあらゆる場合を含んだ尿中ゲ酸量の正常範囲を応用時正常値と名付けた。

実験時正常値：(秋季非固定サ曹初回負荷) 4 時間総量に於て遊離ゲ酸量は 4.26-13.48 mg (負荷サ曹の 0.85-2.70%) 複合ゲ酸量は 0.68-4.09 mg (0.14-0.82%) である。

応用時正常値：(夏季背位固定, 夏季非固定及秋季非固定の初回負荷及再度負荷) 4 時間総量に於て遊離ゲ酸量は 0.88-13.48mg (0.18-2.70%) 複合ゲ酸量は 0-4.09 mg (0-0.82%) である。

実験時正常遊離ゲ酸量のみ略一定しているが其他は一定しない。

c) 尿の性状と尿中ゲ酸量との関係

i) サ曹注射後採尿迄の時間と尿中ゲ酸量

遊離ゲ酸は 24 例中 22 例, 複合ゲ酸は 24 例中 19 例に於て注射後最初の 2 時間尿よりも後の 2 時間尿の方が多量であった。

ii) 尿量及尿の pH と尿中ゲ酸量

遊離ゲ酸量及複合ゲ酸量共に尿量及尿の pH との間に一定の関係は得られなかつた。

3) 肝障害犬尿中ゲ酸量

四塩化炭素 0.5 cc/kg 皮下注射して肝障害し、24 時間後サ曹初回注射を行い採尿時以外は非固定のまゝにて実験を行つた。気温は秋季及初冬、平均温度 16.0°C の適温であつた。成績は第 8 表に示す。

このゲ酸量を秋季非固定初回負荷の場合と比較すると、平均値に於ては遊離ゲ酸量は 1/2 以下に、複合ゲ酸量は 1/4 以下に著明に減少している。各例についても例外はあるが大体この事が言える。

4) 肝剔除犬尿中ゲ酸量

一次的肝剔除法²²⁾ に依り肝臓を剔除し、直ちにサ曹初回注射し、後処置として 25% 葡萄糖溶液 20 cc を 1 時間毎に静脈注射し、技術上非固定のまゝ観察する事は不可能であり、且つ正常例の実験により固定は尿中ゲ酸量に影響を及ぼさぬものと考えられるので固定のまゝ実験を行つた。気温は秋季平均温度 15.4°C の適温であつた。成績は第 9 表に示す。

5 例中 4 例は遊離ゲ酸複合ゲ酸共に皆無で尙妨害物質をも認めなかつた。1 例に於て僅かに両者を認めた。然しこれとても遊離ゲ酸量は他の実験に於て認め得なかつた程の微量であり、複合ゲ酸量も平均値は他の実験より僅少であつた。

IV) 総括並に考按

能勢は従来のゲ酸定量法を検討し、これを尿に応用する為にはいずれも高度の技術を要するか又は妨害物質の充分な除去が必要なる事を認め、燐モリブデン酸を用いる新方法を報告し、これを人及家兎に就き応用した。私は犬尿に就きこの方法を検討したが妨害物質多量の為犬に於ては他の方法を用いねばならない事を知つた。Lutwak-mann はサ酸塩注射後のラット尿に苛曹溶液を滴下すると褐色より黒色に変化する物質のある事に著目し、これがゲ酸なる事を認めた。更に氏はこのゲ酸呈色反応の濃淡を観察する事により、尿中ゲ酸の多寡を推定した。而しこのゲ酸呈色反応は赤色より褐色に変色してゆく不安定なものであり、そのまゝでは比色定量に応用する事は出来ないで、私はこのゲ酸呈色反応が各条件下に現はす色調変化の性質を検討し、その安定となるべき条件を見出し、これを基として 1M 苛曹溶液による犬尿中ゲ酸定量法を考案

第 9 表

肝 剔 犬 尿 中 ゲ 酸 量
秋 季 固 定 の 場 合

犬 番 号	室 温 ℃	投 与 後 の 時 間 h	pH	尿 量 cc	遊 離 ゲ 酸 mg	複 合 ゲ 酸 mg	全 ゲ 酸 mg
23	17.0	2	6.2	49.0	0.—	0.—	0.—
		4	6.2	14.2	0.—	0.—	0.—
		合計		63.2	0.—	0.—	0.—
24	18.0	2	6.8	17.9	0.—	0.—	0.—
		4	6.6	17.2	0.—	0.—	0.—
		合計		35.1	0.—	0.—	0.—
25	14.0	2	8.2	27.6	0.—	0.—	0.—
		4	7.4	14.2	0.—	0.—	0.—
		合計		41.8	0.—	0.—	0.—
28	12.0	2	6.6	74.0	0.—	0.—	0.—
		4	6.2	7.2	0.—	0.—	0.—
		合計		81.2	0.—	0.—	0.—
30	16.0	2	7.4	26.6	0.01	0.—	0.01
		4	6.8	41.0	0.01	0.26	0.27
		合計		67.6	0.02	0.26	0.28
平均値	15.4	合計		57.8	0.—	0.05	0.06

実験月日：自 11 月 11 日 至 12 月 2 日

注射回数：全例 1 回、投与サ曹：500 mg

した。即ち被検尿を酸性下に 10 % 燐タングステン酸及 10% 醋酸鉛にて妨害物質を除去し、上清をエーテルにて強振盪し、エーテル相及尿相に分つ。エーテル相より 1M 苛曹溶液にて遊離ゲ酸を振盪抽出同時に呈色せしめ、これを 16-20°C、40-50 分放置し色調安定となつた時に比色定量す。これより妨害物質値を差引き遊離ゲ酸量となす。複合ゲ酸は尿相を 30 分沸騰温浴、室温放置冷却後遊離ゲ酸と同様にして定量する。本定量法の検出率は実用に供し得る正確度を有する事を確かめた。本定量法を用いて犬に就き実験せるに次の如き結果を得た。

1) サ曹初回負荷時は再度負荷時より尿中遊離ゲ酸量、複合ゲ酸量共概して多量であつた。

2) 固定は尿中遊離ゲ酸量、複合ゲ酸量に大なる影響を及ぼさなかつた。

3) 適温時は高温時より尿中遊離ゲ酸量は著明に多量、複合ゲ酸量は概して多量であつた。即ち犬尿中ゲ酸量に関する研究を行うにはサ曹初回負荷時を選び高温時を避けて施行すべきである。

4) サ曹注射後最初の 2 時間尿よりも後の 2 時間尿の方が遊離ゲ酸量、複合ゲ酸量共に多かつた。

5) 肝障碍時は秋季非固定初回負荷平均値に比し遊離ゲ酸量、複合ゲ酸量共に著明に減少す。各例についても大体この事が言える。

6) 肝剔出時は遊離ゲ酸、複合ゲ酸共に殆ど消失した。即ちサ酸を遊離ゲ酸及複合ゲ酸に変化せしめる機能は肝の関与するところ極めて大である。

7) 尿中ゲ酸量は犬に対する条件が不適当な時、例えば高温時、サ曹再負荷時等には正常犬に於ても肝障碍犬と選ぶ所無き迄減少するものであるから、尿中ゲ酸量を定量して肝機能検査が常に可能なりとは言ひ難い。

V) 結 論

1) ゲ酸呈色反応を検討し、1M 苛曹溶液を用いて犬尿中ゲ酸を定量する方法を見出した。

2) 本定量法を用い、正常、肝障碍、肝剔出犬尿中ゲ酸を定量、比較検討し、尿中ゲ酸は肝の関与するところ極めて大であるが、この定量による肝機能検査は常に可能とは言ひ難い。

(本論文の要旨は第 10 回日本薬理学会関東部会で発表した。)

引用文献

- 1) Kleckner : J. Ann. Pharm. Assoc., **41**, 103 (1952)
- 2) Angelico : Arch. farm. sper., **31**, 8 (1921)
- 3) Neuberg : Berl. klin. Wschr., **38**, 798 (1911)
- 4) Alpen : J. Pharmacol. Exptl. Therap., **102**, 150 (1951)
- 5) Roseman : J. Biol. Chem., **192**, 105 (1951)
- 6) Quilley : J. Pharm. Pharmacol., **4**, 624 (1952)
- 7) Lutwak-mann : Biochem. J., **37**, 246 (1943)
- 8) Kapp : J. Biol. Chem., **145**, 549 (1942)
- 9) 稲垣成男 : 日医大誌, **19**, 977 (1952)
- 10) Accoyer : Ann. Pharm. franc., **7**, 746 (1949)
C.A. より
- 11) Mendioroz : Arch. soc. biol., **19**, 97 (1952)
C.A. より
- 12) Gerald : J. Biol. Chem., **189**, 467 (1951)
- 13) Lowenthal : J. Lob. Clin. Med., **38**, 916 (1951)
- 14) Benati : Farm. sci. e tec., **5**, 43 (1950) C.
A. より
- 15) Mainardi : Boll. soc. ital. biol. sper., **26**, 580 (1950) C.A. より
- 16) Smith : J. Pharm. Pharmacol., **2**, 439 (1950)
C.A. より
- 17) Folin : J. Biol. Chem., **73**, 627 (1927)
- 18) Ungar : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **80**, 45 (1952) C.A. より
- 19) Nanninga : Nature., **168**, 389 (1951)
- 20) Rutkowski : Arzneimittel-Forschung, **3**, 209 (1954)
- 21) 能勢勇一 : 生化学, **26**, 32 (1954)
- 22) 西村菊次郎 : 東京医会誌, **50**, 1035 (1936)