原

著

尿中核酸量による腎炎の新診断法

名古屋大学医学部生化学教室

勝 沼 信 彦, 正 田 亨, 石 川 榮 治

A NEW DIAGNOSTIC METHOD OF NEPHRITIS BY THE
NUCLEIC ACID QUANTITY IN THE URINE

By

Nobuhiko Katsunuma, Tôru Schôda, Eiji Isikawa,

(Department of Biochemistry, School of Medicine,
Nagoya university.)

We could first discover that nephritis patients excreted a large amount of nucleic acid in their urine. By a modified Hammarsten method, we extracted the nucleic acid from the nephritis urine, which was identified by the following characterizations: the maximum absorption at 260mu, the minimum at 230mu, phosphate content 8.7%, RNA/DNA ratio 1.6, diphenylamine and orcin reaction positive, and such five bases released on hydrolysis as adenine, guanine, cytosine, thymine and uracil. We determined colorimetrically this urine nucleic acid amount by the use of diphenylamine reaction in the modified Schneider fraction. This nucleic acid appears to be derived from the destroyed renal cells, which was demonstrated to be connected closely with proteins, cylinders and renal epithelium excreted into the nephritis urine. Nucleic acid was not excreted in the urine of a healthy person, nor in the urine of cystitis and urethritis. The excretion of nucleic acid is specific to nephritis and increases in proportion to the disease.

腎炎の診断法はかなり色々の種類のもが行われている。機能検査の重要なことは言うまでもない。これとやらんで腎炎の診断法として望まれることは組織標本に見られる腎臓組織の障害度を、生体を損傷することなく定量的に測定出来ることである。この面から考察するとき、尿中蛋白量、尿中腎細胞量、尿円柱量、尿中赤血球量等から間接的には腎組織障害度を推察出来る。しかしもちろん直接的ではなく充分でもない。蛋白は腎細胞の崩壊の殆どない起立性蛋白尿とか食餌性蛋白尿とかの機能的なものにも出現するし、急性期の腎炎よりも慢性期に多く出現したりする。そこでこの目的を達するには腎細胞由来の物質を特異的に尿中から捕捉定量することであると考えた。先ず腎細胞蛋白であるが、これは抗腎血清を使用することにより尿中から或程度特異的に捕捉出来ることを細田、菅沼¹⁾は報告している。腎抗原を作る時に血清蛋白の混入をさけることが出来ないため、尿中血清由来の蛋白とも多少は沈降反応をするが、ある程度、腎細胞由来の蛋白量を推定出来ることをわれわれも見ている。次にわれわれは尿中から核酸の検出を試みた。これは細胞内にのみ存在し、腎臓は高分子のまゝでは通過せず、体細胞由来の核酸は正常では尿酸、又はそれ以下の低分子化合物として排出されることがわかっているからである。こゝでわれわれは Miescher が初めて核酸を発見したのが、白血球の崩壊産物である膿から抽出したのに始まることを思い起こした。

その結果、腎炎尿にのみ非常に多量の核酸が出ていることを知つたのである。腎炎尿中に核酸（恐らく核蛋白の型で）が出ていることを発見した最初の報告であるために、このものが核酸に間違いのないことの証明には、特に注意をはらつた。従つてこの腎炎尿中に出ている核酸は、腎細胞崩壊に由来すると考えるのが自然であり、この様に考えると尿中核酸量は腎組織障害度を最も直接

的に示すものと考え得る。又後述する如く、実験結果もこのことを支持していると思う。診断法としての臨床経過との関係はなお不充分であり、臨床諸家の御批判を得たく思つている。

(1) 定量法及びその検討

Schneider 核酸分割法²⁾を行い、これにデオキシリボ核酸 (DNA)、及びリボ核酸 (RNA) の特異的呈色反応である ジフェニールアミン反応³⁾及びオルシン塩酸反応⁴⁾を行う。このあとで検討する如く Schneider 分割法は全部行なつても次の如く簡易化したものでも、この場合には変りがないために Table 1 の如き方法によることにした。核酸分割 1.5ml にジフェニールアミン試薬を 3ml を加え正確に 100°C 5分間加熱する。(沸騰水に5分間でよい。) 直ちに流水で冷却し10分後に 580m μ で紫青色を測定する。磷含量のわかつた DNA で標準直線を作り、この DNA の γ/cc で表現する(注1)。ジフェニールアミン試薬は 40cc の氷醋酸に 1.1cc の濃硫酸を加えたものに 1% になる如くジフェニールアミンを溶解する(注2)。(RNAで定量する場合は上清 2cc にオルシン試薬を 2cc 加え 100°C 20分加熱し、直ちに蒸留水で2倍に稀釈して10分後に 620m μ で緑色を測定する。この場合は重症例では RNA が多過ぎるために沈澱が出たり、又ヘキソースが混入して褐色になる例があるので DNA を定量する方が実用的には便利である。) 次にこの定量法の検討をする。人尿の acid soluble fraction は腎炎であるとないとに拘らず diphenylamine 反応で極大吸収を 610m μ に有する green の呈色をする(本来の DNA によるものは紫青色)。この物質の本態は不明であるが 酸溶性で明かに核酸系化合物ではない。しかも表2の如く 5% トリクロール醋酸 (TCA) で3回洗う事により全くなくなる。従つて前もつて2回 5% TCA で洗えばこの物質の影響はのぞくことが出来る。次には表1によつて得られた核酸フラクションは明かに 260m μ の

注 1. $E=0.19$ は磷含量 8.4% の DNA 200 $\gamma/\text{cc-c}$ に相当する。

注 2. 試薬が不純であつたり、使用器具が洗滌不充分の場合には試薬が青色になるが、これは使用に耐えない。

極大吸収を持つし、更に後章に述べる如くこの大部分が確かに核酸であることを純粹の核酸を抽出しその性質をしらべることにより確かめた。(このフラクションにオルシン塩酸反応を行う時、ときどき汚褐色を呈する。

また時には sialic acid のパープルの呈色をするところから、この分割には sialic acid その他の多糖体を含むことがしばしばあるので、RNA の定量を行うのは不利である。) またその中で Sialic acid は diphenylamine 反応が DNA によるものと同色を呈するために、Table 1 の分割に diphenylamine 反応を行なった場合は、時には一部 sialic acid による呈色を含めた値と考えるべきである。

Table 1.

Quantitative fractionation of nucleic acid

Table 2.

Deminution of diphenylamine positive substance in the acid soluble fraction (5% cold TCA fraction).

the number of washing times	once	twice	three times
example			
nephritis No. 1	0.23	0.055	0
nephritis No. 2	0.13	0.02	0
normal No. 1	0.41	0.013	0
normal No. 2	0.74	0.02	0

(2) 病状との相関

本反応は健康者には全然出ない。腎炎及び混合腎炎のみ強くなる。下部尿路疾患でも全例出ない。蛋白は出ていても起立性蛋白尿等の機能性蛋白尿には出ない。

(a) 腎炎尿につき蛋白量との関係

蛋白量は末吉法によつた。

Table 3.

Correlation between DNA quantity in nephritis urine and urine-proteine quantity.

protein DNA r/cc	%	0~2	2~4	4~6	6~10
0 ~ 50		6	0	0	0
50 ~ 100		0	2	0	1
100 ~ 150		0	2	2	0
150 ~ 200		0	0	2	0
200 ~ 300		0	0	0	3

(b) 腎上皮及びZylinder との関係

表4に示す如き相関がある。

Table 4.

Correlation between DNA quantity in nephritis urine and both renal-epithel and renal-cylinder.

DNA r/cc	renal-epithel			renal-cylinder		
	+	++	+++	-	+	++
0~50	6	1	0	5	4	0
50~100	0	1	0	1	0	0
100~150	0	3	1	2	2	1
150~300	0	3	2	0	2	2

(c) 経過との関係

3, 4例しか行なつてないが、急性期に核酸反応が強いものは予後が悪いようである。腎組織の崩壊度が強いからではあるまいか、ある所から急上昇したもので死亡した者がある。治癒する時は蛋白より早目に核酸反応は減少する様である。この

面では例が少なく今後の研究により明かにしたい。

(d) 核酸反応の疾患特異性

健康人 12 名につき全例陰性であつた。起立性蛋白尿 2 名で陰性、下部尿路疾患、Urethritis 4 名、Cystitis 2 名で陰性、Epididymitis tuberculos 2 名、白血病 2 名、ポリオミエリテス 1 名、夜尿症 1 名で陰性であつた。従つて腎炎、混合腎炎以外の疾患には全然出ない事が明かである。但し非常に重要な事であるが、ネフローゼ尿が入手出来なかつたため、これについては不明である。

(3) 本核酸の由来 (出現機轉)

本物質が腎臓の細胞に由来するものであれば、腎炎尿中の腎細胞蛋白と一定の関係がある筈である。そこで家兎を使用して抗人腎血清を作り、これと腎炎尿との間に沈澱反応を行なつた所、細田、菅沼も見ているように重症腎炎尿は強い沈澱反応を起す。しかも核酸反応とは平行関係がある。(2 倍尿迄陽性のものが核酸反応 16 γ /cc, 16 倍尿迄のものが 57 γ /cc, 64 倍尿迄のものが 168 γ /cc, 128 倍尿迄のものが 98 γ /cc, 健康人尿 2 例で両反応共 0 であつた。抗人腎血清は抗血清を混合しているので正確を期しがたいが、ほど腎臓細胞由来の蛋白量と平行関係があると見る事が出来る。次に血清由来が如何かを見るために腎炎及び健康者の血清中の本反応値をしらべたが、尿核酸には著明な変動があるにも拘らず、血清核酸には変動が殆どなく、而も極めて少量しか血清中には存在しない事からも血清由来の核酸とは考えにくい事を知つた。この二つの実験と、腎細胞の崩壊の殆どないと思われる機能性蛋白尿には出現しない現象とを併せ考えると、この核酸は腎細胞の崩壊に由来するものと考えることが出来る。

(4) 核酸であることの確認

腎炎尿に出ている Schneider 分劃ジフェニールアミン陽性物質の大部分が核酸であることを次の如く多量の腎炎尿から核酸を抽出し、その性状をしらべ、五つの base を確認することにより決定した。方法は表 5 の如し。

Table 5.

Extraction method of nephritis urine nucleic acid

Table 6.

Nature of this nephritis urine nucleic acid	
maximum absorption	258m μ
minimum absorption	230m μ
phosphate content	8.7%
RNA: DNA ratio	60%: 40%
base composition	adenine, guanine cytosine, thymine, uracil.
diphenylamine reaction	violet-blue
orcine-HCl reaction	green

この方法で腎炎尿 2l 中から 磷含量 8.7% の核酸が 30~40mg 得られる。この核酸は DNA と RNA の混合物で、オルシン反応は全尿の時と異なり美しい green の呈色をする故 RNA である。多糖体は殆ど含まない。ジフェニールアミン反応とオルシン反応から RNA/DNA=1.6 の比に混合している。この値は普通の細胞に於ける RNA/DNA の含有比に略々一致する。次にこの核酸を 5N 塩酸で 24 時間 100°C で水解する。これを 2N 塩酸-プロパノール系 (35:65) で PPC により展開する⁵⁾。各 base をミネラルライトで見ると Rf. 0.34 guanine, 0.47 adenine, 0.54 cytosine, 0.74 uracil, 0.87 thymine と五つの base を確

認出来た。従つて腎炎尿に特異的に出現するこの物質が DNA と RNA の混合した核酸である事を確認した。この吸収は図 1 の如く 260m μ に極大吸収を有する核酸特有のものである。30 年 4 月内科学会の報告では未だ蛋白を多く含む未精製のものを少量しか得ていない段階であつた為めに base の確認が出来ず、核酸が如何か未だ不明であると報告したが、こゝでデーターによりこのように訂正する。

結 論

われわれは腎炎尿中にのみ Schneider 分割 ジフェニールアミン陽性物質が出現することを初めて報告した。次いで腎炎尿から核酸を抽出し、その性質をしらべ水解によりプリンとピリミジン塩基を確認して、このものが DNA と RNA が 40% と 60% の比に混合した核酸である事を確認すると同時に腎炎尿中の核酸の由来及び性質を明かにした。更に臨床的に腎炎中核酸量は病状とよく平行することを知つた為めにこれを腎炎の新診断法に使用出来ることを報告した。

(この一部は昭和30年4月5日日本内科学会総会で発表した。)

文 献

- 1) 細田孟, 丸本晋: 最新医学 7(6), 556, 1952.
- 2) W. C. Schneider: J. Biol. Chem. 161, 293, 1945.
- 3) Z. Dische: Mikrochemie: 2, 26, 1930.
- 4) S. E. Kerr, R. H. Seraidarian: J. Biol. Chem. 159, 211, 1945.
- 5) 谷 淳吉, 寺井武雄, 山村好弘: 結核生化学談話会 昭和30年3月

(受稿・昭和30年10月13日)