

of 1980 r, the repressive effect on the moving of foreign bodies to the parasternal lymphatic canal, when they were injected in the abdominal cavity, was recognized not only in a living condition but also after death of the animal. And it is assumed that the effect was probably caused from the organic change of the origin of the lymphatic fluid path.

In this study the histological changes were examined microscopically and electro-microscopi-

cally.

The results were as follows;

1) In the cribriform area no pathological change was noticed either microscopically or electro-microscopically.

2) In the endothel cells of diaphragm, in spite of the absence of any pathological change through the microscopic examination, destruction of nucleus and lack of clearness of joint region of cells were noticed in the electro-microscopic findings.

## ナフトレゾルチノール呈色反応による グルクロン酸定量法の検討

昭和32年6月27日受付

信州大学医学部松岡内科教室 (指導: 松岡 松三教授)

国立上田療養所 (所長: 伊藤富久衛博士)

島 村 富 郎

### 1. 緒 論

生体内解毒作用の一としてグルクロン酸(以下G酸と略す)による抱合機転が重要な役割を演ずることは古くから知られていたが、近年その大量授与が可能となるにつれてG酸に関する研究は各方面にわたって活発に行われる様になった。しかし乍ら一方G酸の定量法に関してはその示す反応機構の不明なるために未だ完全な方法が確立されておらず、反応条件を種々調節してその目的を達せんとする努力が払われている現状である。

G酸はガラクトロン酸、マンヌロン酸と共にヘキスロン酸に属し、その分子内に還元性基とカルボキシル基とを併有するため、糖としての性質と酸としての性質を有し、それらに基づいて定量され、又ウロン酸特有の反応が利用されることもある。

現在行われている定量法は

- 1) アルカリによる滴定
- 2) 銅還元力の測定
- 3) 次亜沃素酸塩による酸化
- 4) フルフラール発生率の測定
- 5) 炭酸ガス発生法
- 6) 呈色反応の利用

等であるが、このうち生体試料について最も広く利用され且つ比較的信頼の置けるものに呈色反応、就中ナフトレゾルチノール(以下総てNRと略す)とG酸と

の縮合によつて生ずる色素<sup>①</sup>を比色定量する方法がある。

NR呈色反応がG酸特有の反応であるとして之を初めて定量法に応用したのは B. Tollens<sup>②</sup>(1908)であり、その後 J. A. Mandel, C. Neuberg<sup>③</sup>(1910), Maughan, Evelyn<sup>④</sup>(1938)等により改良が加えられたが、現在では H. D. Ratish, J. G. M. Bullowa<sup>⑤</sup>(1943)の法を更に精密化した Fishman, Smith<sup>⑥</sup>(1951)の法が広く用いられている。しかしこの Fishman 法も試薬の入手難、調製、補正の煩雑、妨害物質等のため多数の生体試料を対象とした臨床的応用には供し難い欠点があり、現在ではNRによる定量法自体の限界さえ云々せられ、新しい試薬による新しい方法の発見が待望されている状態である。

著者はNRの各種化合物物を使用し、定量条件について若干の検討を試みたので茲に報告する。

### 2. 原理及び操作

G酸に強酸と少量のNRを加えて加熱すると沈澱を生じ、之をエーテルに溶解すると美しい紫色に発色する<sup>②</sup>が、Fishman は反応条件を色素形成が最大に達する様に調節し、又色素抽出を最有効に行うために溶媒としてトルエンを使用した<sup>⑥</sup>。然し乍らこの方法の最大の欠点は前述の如くNRが不安定な為測定の都度新調し従つて検量曲線をその度毎に作製しなければならない事である。著者は是等の点を考慮して、NR

の分子化合物であるNRカルボン酸バリウム(以下NRCBと略す), 之より再製したNRカルボン酸(NRC)及びNRピクラー特(NRP)を使用しFishman法に従つて種々検討を加えた。

尙定量条件検討の一般的操作としてはFishman法をやゝ改変して次の如く行つた。

- i) 共栓煮沸試験管に試料4.0c.c.とり, 発色試薬2.0c.c., 強酸2.0c.c.追加, 混和, 密栓して攪拌。
- ii) 沸騰水浴中で一定時間加熱后, 冷水にて15分間冷却。
- iii) 95%アルコール10.0c.c., トルエン8.0c.c.加え約1分間強振し色素を抽出, 一定時間暗所放置。
- iv) トルエン層を集め580m $\mu$ のフィルターで比色(Leitz型 Rouy Photometer 使用)。なおブランクは蒸留水4.0c.c.で同様操作抽出したトルエンを用いる。
- v) 試薬は原則として測定当日調製したものをを用いる。
- vi) G酸標準溶液は純グルクロノラクトン(中外製薬グロンサン末)よりG酸に換算して調製した。

### 3. 発色試薬調製法

次に記す6種の調製法による試薬について検討を加えた。

- ① NRCB 0.04gに濃塩酸1.0c.c.添加后, 蒸留水19.0c.c.を徐々に追加し, 5分間振盪, 小火焔上で徐熱するとバリウムが外れて透明微黄色の0.2% NR溶液が得られる<sup>⑦</sup>。
- ② NRCB 0.04gに蒸留水20.0c.c.を加えて懸濁液とする。用時充分振盪する。
- ③ NRCB 0.04gを95%アルコール, 蒸留水各10.0c.c.等液に溶解する。この場合は②と異り略々均質の溶液が得られる。
- ④ NRCB 0.04gに濃塩酸1.0c.c.添加后, 蒸留水9.0c.c.及び95%アルコール10.0c.c.を追加。
- ⑤ NRCBを緒方・山内<sup>⑧</sup>に従い, 再結晶させてNRCを得る。この0.04gをとり50%アルコール2.0c.c.及び蒸留水18.0c.c.に溶解させる。NRCはNRよりも安定であり, 加熱により容易に脱炭酸してNRになるといわれている<sup>⑨</sup>。
- ⑥ NRP 0.5gを無水アルコール50c.c.に溶解, 1%溶液とする<sup>⑩</sup>。

尙強酸としては発色試薬①乃至⑥使用時は濃塩酸を, ⑥使用時は濃硫酸により発色反応を起させる。

### 4. 定量条件の比較検討

#### 1) 最大吸収波長

従来<sup>⑦</sup>の報告では565m $\mu$ <sup>⑤⑥⑦</sup>或は570m $\mu$ <sup>⑩</sup>となつているが実験に使用したRouy Photometerにおい

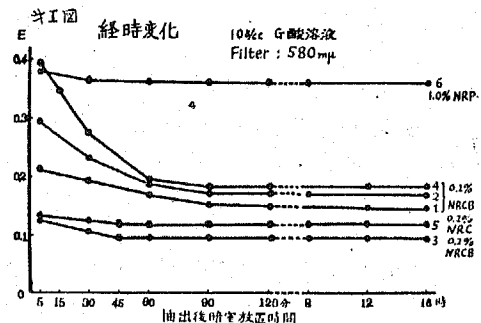
ては之に最も近接した580m $\mu$ において6種の試薬とも最大吸光を示した。

#### 2) 加熱時間・加熱温度

原法<sup>⑥</sup>では煮沸水浴中1時間となつているが6法とも1時間では可成り測定値の「ばらつき」があり1時間半にすると吸光度は増大し値も安定する。2時間の場合は更に吸光度が若干増大する。之は脱炭酸反応に或程度の時間を要する為と思われるので茲ではすべて1時間半を採用し, 発色の増大に努めた。次に加熱温度については65°C, 70°Cでは6時間加熱によつても充分な発色が見られなかつた。

#### 3) 経時変化

6種の試薬を用い, 10 $\gamma$ /c.c. G酸標準液について1時間半加熱, 抽出后580m $\mu$ で比色した場合の抽出后暗所放置時間と吸光度との関係を第I図に示す。各法共抽出后60乃至90分后迄は吸光度が落下して安定しない。落下は試薬④⑤⑥使用の場合が甚しく, ③⑤使用では比較的少い。特に⑥では大体30分以内に安定値になり, しかも安定後の終末吸光度が最も高い。



#### 4) ブランク

発色試薬自体が可成りの着色を示しているから, ブランクとしては試料の代りに蒸留水を用い同様操作して抽出したトルエンを用いた。従つて検量曲線は原点を通つている。

#### 5) 試薬の濃度

Fishmanは0.2% NR水溶液を用いているがNRは水溶液中では極めて不安定といわれ, 事実前述調製法①④の如くNRCBを塩酸によりバリウムを外してNRとしてから使用する場合の有効期間は何れも調製当日限りであつた。次に①乃至⑥はすべて0.2%溶液としたがNR, NRCB, NRCは夫々0.2%, 0.3%, 0.25%が等モル溶液に相当するので, 新に②及び③法で0.3%溶液を又⑥法で0.25%溶液を調製し夫々2.0c.c.宛使用すると各0.2%溶液使用の場合に比して吸光度は若干増加するに止まつた。更に濃度を2倍にし

て0.6%, 0.5%溶液とし夫々1.0c.c.宛使用すると発色は極めて弱く、何れにしてもNRを用いた原法に比して吸光度の値は半分以下を示すにすぎない。一方NR Pは0.5%が0.2% NR 溶液と等モルであり、0.5%液2.0c.c.を用いると発色は大きくなり、NR使用の原法に近い値を示す。この場合濃度を2倍の1.0%溶液として1.0c.c.使用すると「ばらつき」が少く吸光度も0.5%溶液2.0c.c.使用の場合よりは可成り増大する。

次に強酸の濃度については Mandel, Neuberg<sup>③</sup>はうすい酸の方が試料中に共存する糖類の影響を受け難いとしているので検討した。試薬①乃至⑥に於て塩酸の濃度を12N, 10N, 8N, とすると12Nの場合が発色最大でうすくなるにつれて「ばらつき」も多くなる。この場合塩酸を硫酸に代えると発色は極めて不良であった。一方⑥法によるNR P使用では硫酸濃度を18N, 21.6N, 24N, 28.8N, とすると吸光度も濃度と共に増大するが茲では石館・南原<sup>⑩</sup>に従い21.6Nを用いた。一般にNR反応に於ては反応温度を低くし且強酸の濃度をうすくすれば共存する糖類の影響も少くなる可能性があるがG酸の発色も弱くなり定量法としての精度が落ちて来るものと思われる。

6) 試薬の有効期間・精度

発色試薬を冷暗所に保存した際の有効期間を検討すると、試薬①乃至⑤は0.2%溶液2.0c.c., 濃塩酸使用、試薬⑥は1.0%溶液1.0c.c., 21.6N硫酸使用いずれも加熱1時間半、抽出后暗所放置90分で580m $\mu$ で比色した際、①1日、②7日、③5日、④1日、⑤5日、⑥5日となっている。この期間内では各法とも0乃至25r/c.c.濃度範囲内では再現性の良好な(誤差範囲 $\pm$ 5%以内)直線が得られ Beer の法則が成立する。第II図は各試薬による検量曲線を示す。30r/c.c.以上になると曲線は次第に下方にずれて来るが光度計を使用して波長を更に厳密に選べば、直線部分も更に増大するものと想像される。

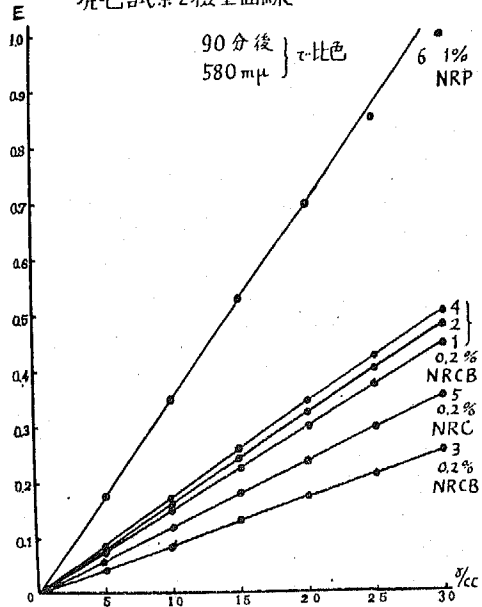
なお試薬⑥使用では直線の勾配も良好で5乃至20/c.c.の間は吸光度も0.2乃至0.7となり相対誤差( $\pm$ %)が極小(1.82 $\pm$ 0.42%)で精度も良好な範囲内に入る。

5. 妨害物質

NR反応の妨害物質として Mandel, Neuberg<sup>③</sup>等はカルボニール基を含む酸、ウロン酸、糖類等をあげているが、このうち生体試料に於て問題となるのはアスコルビン酸及びブドウ糖である。

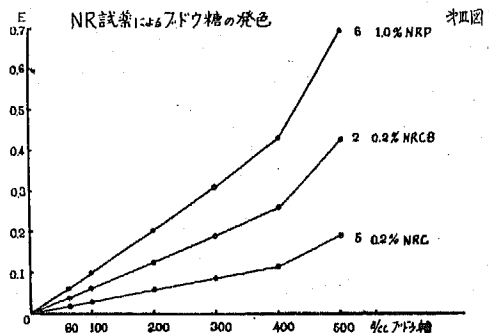
アスコルビン酸溶液を発色試薬⑥の法で定量操作を加えると2, 4, 10r/c.c.の1-アスコルビン酸が夫々0.7, 1.2, 3.1r/c.c.のG酸に相当する発色を示し両者

図II 発色試薬と検量曲線

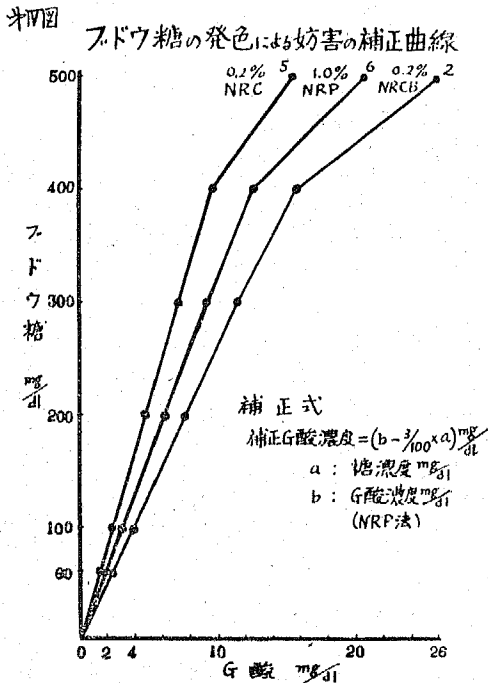


の間には略々直線的関係が成立している。しかしビタミンCは血中濃度が1mg/dl 前後で飽和に達しG酸に比し微量である点より見てビタミンCの共存によるG酸値への影響は実際は無視しても差支ないものと思われる。(一方ビタミンC定量法として現在最も信頼度が高いとされているDNP<sup>⑭</sup>法によつてG酸の発色を見ると、10, 20, 25, 40r/c.c. G酸が夫々0.032, 0.065, 0.08, 0.13r/c.c.の1-アスコルビン酸に相当する発色を示すにすぎなかつたが直線的関係は成立しG酸定量への応用の可能性が考えられる。)

糖類については前記 Mandel, Neuberg<sup>③</sup>は30倍量の糖類との共存の場合も影響を受けることが無いとしているが、発色試薬②⑤⑥を使用しブドウ糖標準液で定量操作すると第III図の如き発色を示した。即ち同一濃度ではG酸に比してブドウ糖の発色は僅少といえるが、血中では糖濃度がG酸濃度に比して遙かに大なる



点よりすればこの発色は無視出来ないと考えられる。ブドウ糖溶液の示す発色をG酸濃度に換算すると第IV図の補正曲線が得られる。之を見るとブドウ糖は糖濃度400mg/dl以下では100mgについて夫々2.4, 3.0, 3.8mgのG酸に相当する比率で発色妨害を示すことが判る。定量条件の下に於てはブドウ糖とG酸との間に何らかの反応が起る可能性は無いものと考えられるので、生体試料に於てはG酸測定値から共存する糖濃度に対する妨害値を減じた値が真のG酸値と言えよう。例えば血糖値(Somogyi 比色法<sup>⑩</sup>) amg/dlで同時にG酸濃度 bmg/dl (NRP法)である血液の血中総G酸濃度補正值は  $(b - \frac{3}{100} \times a)$  mg/dlとなる。濃度既知のG酸に対する一定量のブドウ糖の添加実験では上記補正式によつて(90.2±5.1)%の回収率が得られた。血糖の同時測定は煩雑であるが少くとも糖尿病患者に於けるG酸測定の場、この補正は省略することは出来ないものと考えられる。



一方G酸の示す還元力は可成り大で、還元反応を利用した糖定量法に際してG酸が妨害を示すことは以前から知られているが、例えばG酸製剤連用時や抱合体の排泄が増加していると想像される時(PAS服用時等)には之が糖定量に及ぼす影響も一応考慮しなければならない。比較的還元性物質による妨害が少いとされているSomogyi比色法<sup>⑩</sup>(血糖)及びSodium Carbonate法<sup>⑪</sup>(尿糖)についてG酸の発色状態を見る

とG酸濃度300mg/dl以下ではG酸10mgがブドウ糖7mg前後に相当する比率で発色を示した。従つて精密な糖定量の際は補正式を求めて補正するか或はアンシロン試薬<sup>⑫</sup>による糖定量法等を行う必要も生じるが、通常この誤差は糖の値に比し僅少であり臨床的には補正を省略しても差支ないものと考えられる。

6. 抱合型G酸定量法

以上は総G酸定量法についてであるがFishman<sup>⑬</sup>は1955年新たに抱合型G酸の微量測定法を発表した。その原理とする所はpH10.1で遊離型G酸はC<sub>1</sub>の-COH基が次亜硝酸により酸化されて-COOHとなり糖酸を形成してNR反応を示さなくなるが、抱合型G酸ではC<sub>1</sub>の-COH基がAglykonと結合し保護されている為に酸化を受けず発色操作時に加水分解されて抱合を解きNRと縮合発色することを利用したものである。

原法に従い前処理した後、上述のNRP法で発色させると検量曲線は再現性良好な直線となり、又ビタミンC、ブドウ糖による妨害発色もほとんど見られない。たゞ総G酸の場合に比し吸光度は可成り低く従つて精度も劣るが、1.0% NRPを2.0c.c.用いて実施すると検量曲線の勾配も良好となり略々満足すべき精度が得られる。又NRPを2.0%として1.0c.c.使用すると吸光度は更に増大するが糖による影響も若干大きくなつてくる。総G酸値と抱合型G酸値との差から遊離型G酸値が該算される。

7. 除蛋白法の及ぼす影響

原法ではFolin-Wu氏法により除蛋白を行つているがHaden氏変法でも測定側に変わりはなく、且つ後者の方が10倍稀釈血液濃度の収量が若干多くなる利点がある。5, 10, 20, 30mg/dlのG酸溶液でFolin-Wu除蛋白操作後検量曲線を求めると、5, 10, 20, 30mg/dlのG酸溶液で直接求めた前記(第II図)の直線に良く一致した。従つて除蛋白操作による影響はほとんど無いものと考えられる。尚生体試料の場合、抽出せるトルエンを比色前に迅速に濾過して確実に澄明化しておいた方が安定した値が得られる様である。

8. 回収率

血液及び尿に一定量のG酸を添加してその回収率を検すると、試薬⑥の法では夫々(95.4±4.9)%及び(97.0±9.2)% (各10例平均)、又試薬⑦の法では夫々(96.0±5.2)%及び(95.8±7.9)% (各8例平均)となりいずれも良好であつた。(a=0.05)

9. 定量法の選定

以上各法の検討の結果を第I表に一括表示した。総合的に見てNRP使用の石館・南原法が最も良好な方

第 I 表 検討結果一覽表

	発色試薬調製法	有効期間	抽出後の吸光度落下	終末吸光度	糖妨害
1	<u>NRCB</u> 0.04g → 濃 HCl 1.0c.c. 添加 → Aq. dest. 19.0c.c. 追加 → 徐熱	1 日	比較的大	低	/
2	<u>NRCH</u> 0.04g → Aq. dest. 20.0c.c. (懸濁液)	7 日	1) 中間 4) (大)	中間	3.8/100
3	<u>NRCB</u> 0.04g → {95% アルコール 10.0c.c. Aq. dest. 10.0c.c.}	5 日	比較的小	最低	/
4	<u>NRCB</u> 0.04g → 濃 HCl 1.0c.c. 添加 → {Aq. dest. 9.0c.c. 95% アルコール 10.0c.c.}	1 日	最大	中間	/
5	<u>NRC</u> 0.04g → {50% アルコール 2.0c.c. Aq. dest. 18.0c.c.}	5 日	最小	1) 中間 3) (低)	2.4/100
6	<u>NR P</u> 0.5g → 無水アルコール 50.0c.c.	5 日	3) 中間 5) (小)	最高	3.0/100

(但 1 → 5 は 0.2% 液 2c.c. 使用, 6 は 1.0% 液 1c.c. 使用)

法と言い得る。次に NR P による定量法手技を整理して記すと、

1) 10倍稀釈血液 (Folin-Wu 氏法又は Haden 氏法による) 或は稀釈尿 (50乃至250倍) 4.0c.c. を共栓煮沸試験管にとり、(抱合型 G 酸測定時は前処理した試料 4.0c.c.)

2) 1.0% NR P 無水アルコール溶液 1.0c.c. (抱合型測定時は 2.0c.c.) 及び 21.6N 硫酸 2.0c.c. 添加、混和、密栓、振盪。

3) 煮沸水浴中で90分間加熱後、水道水で15分間冷却、振盪。

4) 95% アルコール 10.0c.c., トルエン 8.0c.c. を順次加え一分間強く振盪し色素を転溶させる。

5) トルエン層を駒込ピペットで集めて軽く濾過後、暗所に静置、30乃至60分後、

6) 蒸留水 4.0c.c. で同様操作抽出したトルエンをプランクとして 580m $\mu$  で比色する。

7) NR P 液は調製後 5 日間は使用に耐える。試薬は調製の都度新たに検量曲線を作製しなければならない。

## 10. 結 論

NR による G 酸定量法は臨床的応用上に幾多の欠点を有するが、著者は NR の分子化合物を用いて定量条件に検討を加えた。

その結果 NR P を使用した石館・南原法が精度、試

薬有効期間、定量所要時間等の点より見て充分臨床的応用に供し得る定量法であるとの結論を得た。

然しブドウ糖による影響は避け難く、糖尿病等においては補正の必要がある。

稿を終るにあたり御指導御校閲を賜った松岡教授、伊藤所長、佐竹助教授及び種々御助言頂いた現北大薬学科南原利夫助教授に対して深甚の謝意を表する。

尙本論文の要旨は第43回日本消化機病学会総会において発表した。

## 文 献

- ①緒方・野崎; 薬誌, 63, 419 (1943). 64, 9, 14 (1944).
- ②B. Tollens, F. Rorive; Ber, 41, 1783 (1908).
- ③J. A. Mandel, C. Neuberg; Biochem. Z., 13, 148 (1908). 24, 436 (1910).
- ④G. B. Maughan, K. A. Evelyn, J. S. L. Brown; J. Biol. Chem. 126, 567 (1938).
- ⑤H. D. Ratish, J. G. M. Bullowa; Arch. Biochem. 2, 381 (1943).
- ⑥W. H. Fishman, M. Smith; J. Chin. Invest. 30, 685 (1951).
- ⑦小池・大橋; 中外医薬, 8, 2, 14 (1955).
- ⑧緒方・山内; 薬誌, 49, 553 (1929).
- ⑨朝比奈; 薬誌, 48, 484 (1928).
- ⑩石館・南原; グ酸研究会報告集 (1956).
- ⑪Roe & Kuether; J. Biol. Chem., 149, 399 (1943).
- ⑫Somogyi, M.; J. Biol. Chem., 195, 19 (1952).
- ⑬Somogyi, M.; J. Lab. Clin. Med., 26, 1220 (1941).
- ⑭北本・阿部; 日本医事新報, 1641, 3, (1955).
- ⑮W. H. Fishman, S. Green; J. Biol. Chem., 215, 527 (1955).

## Studies on the Quantitative Determinations of Glucuronic Acid

Tomio Shimamura

Department of Internal Medicine, Faculty of  
Medicine, Shinshu University  
(Director: Prof. M. Matsuoka)  
Ueda National Sanatorium  
(Chief: Dr. F. Itō)

Fishman's method is widely used for the determination of glucuronic acid, but it has some disadvantages for clinical use.

The author investigated the condition of determination by the modified Fishman's method, substituting some molecular compounds of naph-

thoresorcinol, such as barium naphthoresorcinol monocarbonate, naphthoresorcinol carboxylic acid and naphthoresorcinol picrate for naphthoresorcinol.

A good result was obtained with naphthoresorcinol picrate when heated in a boiling water bath for 90 minutes and measured its rate of absorption with a photometer at 580 m $\mu$ , 30 minutes after extracting.

The absolute ethanol solution of naphthoresorcinol picrate was stable for 5 days under the dark and cool condition.

The interference by glucose must be excluded from the glucuronic acid value obtained with naphthoresorcinol reaction, especially in diabetes mellitus.

## バセドウ氏病の糖代謝に関する研究

### 第1編 各種甲状腺疾患の血糖値に就いて

昭和32年7月2日受付

信州大学医学部丸田外科教室

草 間 次 郎

#### 緒 言

バセドウ氏病は未だ本態不明の疾患であるが、その主要症状には物質代謝障害と関係のあるものが多い。本症の糖代謝に関してはすでに古くから幾多の報告があり、1891年 Kraus 及び Ludwig<sup>①</sup>は甲状腺中毒症患者は食餌性糖尿のあることを報告し、更に Chvostek<sup>②</sup>はかかる患者は耐糖力が低下していることを指摘した。爾來本症の糖代謝に関する研究は数多くなされ、その報告は枚挙にいとまがないほどである<sup>③④⑤⑥⑦⑧⑨⑩⑪⑫⑬⑭⑮</sup>。なかでも Janney 及び Isaacson<sup>⑯</sup>はバセドウ氏病の症状の軽重は糖負荷後に現われる過血糖の強さと持続時間に平行するから、糖負荷試験はバセドウ氏病の診断と予後判定に重要な意義を有すると述べている。然しながら Popper 及び Hirschhorn<sup>⑰</sup>は糖代謝障害の程度と臨牀症状とは必ずしも平行的ではないと述べ、むしろ反対の見解をとつている。近年糖代謝に対する甲状腺ホルモンの作用方式はほとり明らかとなつたが、バセドウ氏病に於ける糖代謝については尙詳細不明の点が多い。

余はバセドウ氏病に於ける糖代謝、特に外科的治療

の糖代謝に及ぼす影響に就いて研究を行う目的から、まず本編に於てはバセドウ氏病の空腹時血糖値を測定し、更に外科的治療の血糖値に及ぼす影響を検討した。

#### 実験方法

血糖値は Hagedorn-Jensen 氏法により測定した。空腹時血糖値：バセドウ氏病では入院時、手術前(手術予定日の一週間以内)、退院時(術後約3~4週)の3期に分けて空腹時血糖値を測定した。採血は少くとも12時間以上摂食を禁じた早朝空腹時に肘静脈より行つた。単純性甲状腺腫及び悪性甲状腺腫では入院時にも測定した。

手術侵襲による血糖値の変動：手術後の血糖値の変動を追求するために手術に際しては基礎麻酔及び全身麻酔による麻酔過血糖を避ける目的からアドレナリンを加えない0.5%塩酸プロカインの局所麻酔のみによつて手術を行つた。バセドウ氏病に於ては手術施行直前の値を術前値、手術中甲状腺の一側亜全切除を終了した時の値を術中値、手術終了直後の値を術直後値、手術終了4時間後の値を4時間後値とし、それ以後は