

原 著

「ヌクレイネミー」ニ關スル研究(第2報) Dische 氏「ヂフエニルアミン」反應ニ依ル血漿 「チモヌクレイン」酸ノ比色定量法ニ就テ 附. 組織壞疽ニ於ケル血漿「チモヌクレイン」酸ノ消長

(昭和16年1月6日受領)

有馬研究所(所長 有馬頼吉博士)

森 茂

(本論文要旨ハ第18回日本結核病學會總會ニ於テ發表セリ)

内容目次

第1章 緒言

第2章 「チモヌクレイン」酸比色定量法

第1節 試薬

第2節 波長ト吸光度

第3節 呈色反應ノ時間的經過

第4節 濃度ト吸光度

第5節 血漿盲驗

第6節 實施

第7節 誤差

第3章 組織壞疽ニ於ケル血漿「チモヌクレイン」 酸ノ消長

第1節 實驗方法

第2節 實驗成績

第4章 總括

文獻

第1章 緒言

細胞核物質ガ不完全抗原「ツベルクリン」ノ賦活物質トシテ結核過敏症成立ノタメニ必要ニシテ缺クベカラザルモノデアル事ハ青山敬二博士以下我等⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾ガ年來主張シテキル所デアル。而シテ此ノ物質ガ血流中ニ放出サレル現象ヲ我等⁽⁸⁾ハ「ヌクレイネミー」ト稱シテ居ル。「ヌクレイネミー」研究ノ初期ニ於テ我等ハ「ヌクレイネミー」ノ證明ニ「チモヌクレイン」酸證明法トシテ所謂 Feulgensche Nuclealfärbung⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ヲ援用シタ。其後余ハ本論第1報⁽¹²⁾ニ述

ベタル如ク、該法ヨリモ簡易ニシテ一層鋭敏安定ナル輪環反應ヲ考案シ森氏輪環反應ト稱ス。爾來主トシテ此ノ輪環反應ヲ用ヒテ研究ヲ進メタ。此ノ反應ハ確實デハアルガ、數字的ニ反應ノ程度ヲ表現スル事ガ出來ナイノガ唯一ノ缺點デアル。余ハ最近 Dische 氏「ヂフエニルアミン」反應⁽¹⁴⁾ヲ用ヒテ「ヌクレイネミー」即チ血漿「チモヌクレイン」酸ヲ定量セント試ミ、簡單確實ナル方法ヲ考案スル事ニ成功シタ。Dische 氏「ヂフエニルアミン」反應ハ元來臟器

「チモヌクレイン」酸ノ定量法デアルガ、血漿「チモヌクレイン」酸ノ特殊ナ状態即チ細胞外ニ溶液トシテ存在スル事ヲ考慮ニ入レテ一部分改良

スルナラバ、Leifo 光度計ニ依リテ比較の僅少ノ誤差ヲ以ツテ比色定量スル事ガ可能デアル。

第2章 血漿「チモヌクレイン」酸比色定量法

第1節 試薬

試薬ハ Dische 氏ノモノヲ其儘用ヒタ。

Dische 氏「ヂフェニルアミン」試薬

「ヂフェニルアミン」 4g

氷醋酸 400cc

濃硫酸 11cc

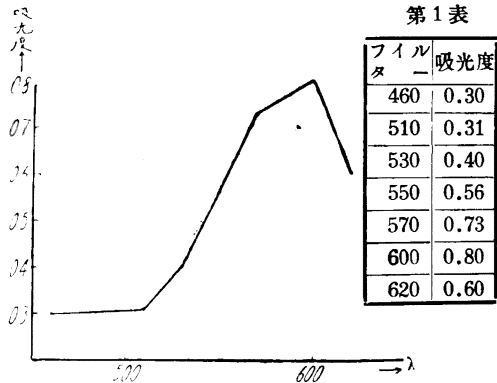
本試薬ハ時日ト共ニ多少著色スル故ニ實驗ノ都度新シク調製スル方ガヨイ。

第2節 波長ト吸光度

光度計ヲ用フル關係上、先ヅ本反應色素ガ光ノ波長ノ如何ナル部分ヲ最モ良ク吸收スルカタ知ラント欲シ、波長ト吸光度ノ關係ヲ求メタ。「チモヌクレイン」酸曹達 16.4mg ヲ蒸留水 5 ccニ溶解シタルモノ 1 ccヲ取りテ「ヂフェニルアミン」試薬 2 cc加ヘ重湯煎ニテ 3 分間煮沸シ、38°Cノ温室ニ 3 時間放置シテ後、Leifo 光度計ニテ「フィルター」ヲ種々ニ變化シテ各波長ニ於ケル其ノ吸光度ヲ求メ吸收曲線ヲ畫イタ。第1圖ニ示スヤウニ最大ノ吸光度ハ S 600 ヲ用ヒタ時デアルガ、其ノ兩視野ノ色調一致シ難ク、定量ニ不便デアルカラ S 570 ヲ以ツテ定量スル事

ニシタ。

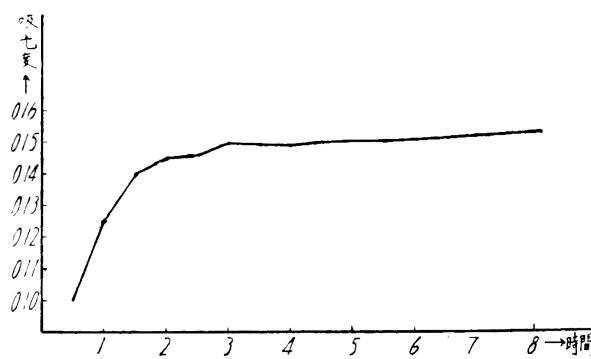
第1圖 呈色反應ノ吸收曲線



第3節 呈色反應ノ時間的經過

比色定量スル時期ハ呈色反應ノ最モ安定シタ時ガ望マシイ。本反應ノ時間的經過ヲ知ラントシテ、0.69 mg/ccノ「チモヌクレイン」酸曹達溶液 11 個ヲ用意シ、2 倍量ノ試薬ヲ加ヘ重湯煎ニテ 3 分間煮沸シ、38°Cノ温室ニ

第2圖 時間的經過ト吸光度



第2表

時間	吸光度
30分	0.100
1時間	0.125
1時間半	0.140
2時間	0.145
2時間半	0.146
3時間	0.150
3時間半	0.150
4時間	0.150
4時間半	0.151
5時間半	0.152
8時間	0.156

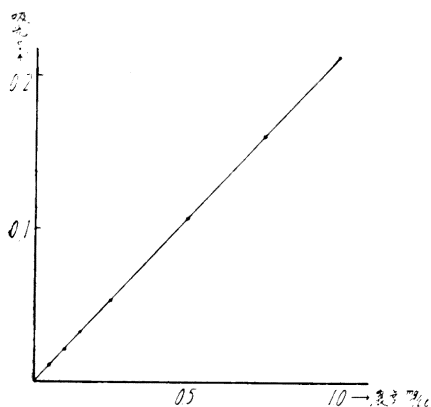
放置スル。以後逐次時間的ニ一個宛取出シテ Leifo 光度計ノ S 570 ノ「フィルター」ヲ用ヒテ吸光度ヲ檢シタ。但シ比色定量前ニ血漿蛋白質ノ分解産物ヲ除去スルタメニ、遠心沈澱スル必要カラ、3 時間目ニ室溫ニ移シタ。第 2 圖、第

2 表ニ示ス如ク、反應後 3 時間マデハ急激ニ呈色度ヲ増スガ、3 時間半ニ到レバ全く安定シ、4 時間マデ變化ナク、以後ノ呈色度ノ變化ハ極メテ緩慢デアアル。故ニ比色定量ノ時刻ハ反應後 3 時間半ヲ選ブ事トシタ。

第 4 節 「チモヌクレイン」酸濃度ト吸光度

「チモヌクレイン」酸曹達ノ種々ナル濃度ノ溶液ヲ調製シ上記ノ方法ニ從ツテ反應セシメ、其ノ吸光度ヲ測定スルニ、次ニ示スヤウニ吸光度ト濃度トハ能ク正比例スルヲ知ツタ。尙此際盲驗トシテ蒸留水ヲ同様ニ處理スルト肉眼的ニハ

第 3 圖 濃度ト吸光度



無色透明デアアルガ、光度計デハ 0.017 ノ吸光度ヲ示ス。從ツテ以下ノ成績ハ實際得タル吸光度ヨリ盲驗値 0.017 ヲ引去ツタ數字デアアル。第 3 圖第 3 表ニ示ス如ク、濃度ト吸光度ハ能ク正比例シ夫ノ關係ハ略一直線ヲナス因子 f (「チモヌクレイン」酸 mg/吸光度) ハ 0.1 mg/cc 以上ノ濃度デハ殆ンド一致シ、其ノ平均値ハ 4.69 デアル。定量實施ニ當ツテハ計算ニ便ナルタメ因子 f トシテ 4.7 ヲ用フル事トシタ。0.05 mg/cc 以下ノ濃度ハ本法ニ於テハ正確ヲ期シ難イ。

第 3 表

濃度 mg/cc	吸光度	f = $\frac{\text{mg/cc}}{\text{吸光度}}$
1.00	0.213	4.69
0.75	0.161	4.65
0.50	0.107	4.67
0.25	0.053	4.71
0.15	0.032	4.68
0.10	0.021	4.76
0.05	0.011	4.54

} 平均 4.69

第 5 節 血漿盲驗

血漿ニテ本法ヲ行フニハ臟器ノ場合程著明デハナイガ其ノ固有色ガ残留シ、盲驗ヲ行フ必要ガアル。即チ血漿ハ「ヂフェニルアミン」ヲ加ヘナイ試藥(氷醋酸ト濃硫酸ノ混合物)ヲ以ツテ上述ノ通り反應セシメルト肉眼的ニ輕ク黃褐色ニ著色スルノガ認メラレル。健康海狸 9 頭ニ就テ光度計ニテ夫ノ吸光度ヲ檢スルニ次ノ如キ値ヲ示

シ各動物ニ殆ンド大差ナク平均値 0.009 デアッタ。海狸血漿盲驗値トシテ此ノ値ヲ用フル事ニシタ。

第 4 表 血漿盲驗値

0.009	0.008	0.010	平均 0.009
0.009	0.008	0.009	
0.009	0.010	0.009	

第 6 節 反應實施

血漿「チモヌクレイン」酸ハ細胞外ニ溶液ノ狀態デ存在スル故、臟器「チモヌクレイン」酸定量ノ

場合ノ如キ「ペプシン」鹽酸ニ依ル消化ハ不必要デアアル。又、蛋白質ノ含有量ガ臟器ニ比シテ著

シク少イタメ、「チモヌクレイン」酸ノ分解ヲ防グベク苛性曹達ノ量ヲ僅ニ減ジル事ニシタ。反應實施ノ順序ハ次ノ如クデアル。

海猿ノ枸櫞酸曹達血漿2ccヲ採リ、之ニ n-NaOH 1.5cc加へ、重湯煎ニテ2時間煮沸スル。氷醋酸0.1cc加へテ中和シ、冷却後純「アルコール」ヲ4倍量加へ、翌日マデ放置スル。翌日遠心沈澱シ、沈澱物ヲ温室ニテ乾燥セシメ、「アルコール」ヲ除キタル後蒸留水2ccニ溶解スル。本水溶液ニ試薬ヲ4cc加へ重湯煎ニテ3分間煮沸シ、38°Cノ温室ニ3時間放置スル。取出シテ輕

ク遠心沈澱シテ血漿蛋白質ノ分解産物ニ依ル濁ヲ除去シ、上清ニ就テ30分後ニ Leifo 光度計 S 570 ノ「フィルター」ヲ用ヒテ吸光度ヲ檢ス。「チモヌクレイン」酸ハ次式ニ依リテ算出スル事ガ出來ル。

$$X \text{ mg/cc} = f(E - E_0) V$$

但シ f ハ「チモヌクレイン」酸 mg 吸光度デ此ノ場合 4.7 デアル。E₀ ハ實驗値、E₁ ハ血漿盲驗値デ 0.009 デアル。V ハ稀釋度デ此ノ場合ハ 1.25 デアル。

第7節 誤差

健常海猿血漿 2 ccニ既知量ノ「チモヌクレイン」酸曹達ヲ加へ、本法ニ依ツテ定量シタガ、次ノ成績ノ示ス如ク何レモ添加「チモヌクレイン」酸曹達量ノ 90%以上ヲ再檢出スル事ガ出來タ。

添加「チモヌクレイン」酸曹達量	再檢出「チモヌクレイン」酸曹達量	誤差
2 mg	1.842 mg	7.9%
1.3 mg	1.184 mg	8.9%
0.75 mg	0.676 mg	9.8%
0.5 mg	0.451 mg	9.8%

第3章 組織壞疽ニ於ケル血漿「チモヌクレイン」酸ノ消長

第1節 實驗方法

體重 500 g 前後ノ雄性海猿ニテ腹部皮下ニ 10% 食鹽水ヲ 20cc 注射シ、注射前 2 回、注射後 2 回心臟穿刺ニ依リテ採血シ、血漿 2 ccニ就キテ本法ヲ行ヒ血漿「チモヌクレイン」酸ノ消長ヲ測定シ、組織ノ變化ヲ血液ヲ通シテ觀察セント企テタ。注射セル局所ハ注射ノ翌日ハ浮腫及ビ脱毛ヲ起シ 2 日目ニハ壞疽ガ始マリ 4 日目ヨリ肉芽

組織ヲ生ジテ治癒ニ傾キ、7 日目ニハ痂皮下ニ完全ニ治癒スルノガ認メラレル。採血法ハ 3.8% 枸櫞酸曹達溶液ヲ 1 cc 入レタル注射器ニ心臟穿刺ニ依リテ 4 ccノ血液ヲ採リ、直ニ遠心沈澱シテ血漿ヲ分離スル。動物ニハ採血後 4 ccノ生理的食鹽水ヲ皮下ニ注射シテ水分ヲ補フ。

第2節 實驗成績

10 頭ノ海猿ニ上記ノ處置ヲ施シ 3 頭ヲ對照トシタ。第 5 表ニ示ス如ク處置前ノ血漿「チモヌクレイン」酸量ハ全動物ニ於テ略一定シテキル。其ノ變動率ハ海猿 Nr 6 ノ示ス 11.3%ガ最大デアル。所ガ注射後 3 日目即チ組織壞疽ノ著明ナル時期ニハ最高 Nr 7 ノ 252.3%最低 Nr 8

ノ 69.7%ト言フ著シイ増加率ヲ示ス。壞疽ノ治癒シタル 7 日日デハ處置群ノ全動物ガ注射前ノ値ニ還ルノガ認メラレル。對照群ニ於ケル血漿「チモヌクレイン」酸量ノ動搖ハ正常變動率ノ範圍ヲ越エナイ。

第 5 表 組織壞疽ニ於ケル血漿「チモヌクレイン」酸ノ消長

動物番號	注 射 日 前	注射直前	注 射 後 3 日 目	注 射 後 7 日 目	注射後 3 日目ニ於ケル		正 常	
					增加量	增加率	變動量	變動率
No 1	mg/cc 0.097	mg/cc 0.091	mg/cc 0.279	mg/cc 0.091	mg/cc 0.188	206.5 %	mg/cc -0.006	- 6.1
.. 2	0.131	0.143	0.291	0.154	0.148	103.4	+0.012	+ 9.1
.. 3	0.120	0.108	0.268	0.097	0.160	148.1	-0.012	-10
.. 4	0.091	0.097	0.279	0.131	0.182	187.6	+0.006	+ 6.5
.. 5	0.120	0.131	0.291	0.131	0.160	122.1	+0.011	+ 9.1
.. 6	0.097	0.108	0.268	0.120	0.160	148.1	+0.011	+11.3
.. 7	0.068	0.063	0.222	0.063	0.159	252.3	-0.005	- 7.3
.. 8	0.165	0.165	0.280	0.154	0.115	69.7	0	0
.. 9	0.165	0.154	0.507	0.143	0.353	229.2	-0.011	- 6.6
.. 10	0.188	0.177	0.336	0.154	0.159	89.8	-0.011	- 5.8
對 照	0.108	0.108	0.144	0.108			0	0
..	0.108	0.103	0.068	0.097			-0.005	- 4.6
..	0.097	0.097	0.086	0.097			0	0

第 4 章 總 括

臓器「チモヌクレイン」酸定量法タル Dische 氏「デフエニルアミン」反應ヲ應用シ、Leifo 光度計ヲ用ヒテ血漿「チモヌクレイン」酸ヲ比色定量スル事ガ出來タ。血漿「チモヌクレイン」酸ハ臓器ノ夫ト異リ細胞外ニ溶液トシテ存在シ、且又血漿蛋白質ハ臓器ニ比シテ著シク僅少デア。故ニ此ノ場合ハ原法ノ操作ヲ次ノ如ク改良スル事ガ必要デア。

(1) 血漿ニテハ鹽酸「ペプシン」ニ依ル消化ヲ必要トセナイ。

(2) 「ヌクレイン」酸ノ分解ヲ防グタメ、加水分解ニ際シテ苛性曹達ノ濃度ヲ減ズル。即チ血漿 2 ccニ對シテ定規苛性曹達液 1.5ccヲ加フ。

(3) 光度計ニテ比色定量スル前ニ遠心沈澱シテ蛋白質ノ分解産物ニ依ル濁濁ヲ除去スル。

斯クシテ豫備實驗ヲ行クニ

(i) Leifo 光度計ニ於テハ本反應ニ「フィルター」ハ S 570 ガ適當デア。

(ii) 比色定量ノ時刻ハ室温 (38°C) ニ 3 時間、更ニ室温ニ 30 分放置シタル時ガ反應最モ安定シテ定量ニ好都合デア。

(iii) 濃度ト吸光度ノ關係ハ 1 mg/ccヨリ 0.1mg/ccニ至ル間ハ完全ニ正比例シテ一直線ヲナス。

(iv) 血漿ハ臓器ノ如ク著明デハナイガ、淡黄色ノ固有色ヲ呈ス。海狸血漿ニテハ其ノ吸光度ハ大略 0.009 デ、之ヲ血漿盲驗値トスル。

(v) 本反應ノ誤差ハ最大限 9.8%デア。

以上ノ實驗ニ依リテ血漿「チモヌクレイン」酸ハ次式ニ依リ簡單ニ算出スル事ガ出來ル。

$$X \text{ mg/cc} = f(E - E_0) \cdot V$$

但シ f = 「チモヌクレイン」酸 mg/吸光度 = 4.7

E = 實驗値

E₀ = 血漿盲驗値 (海狸デハ 0.009)

V = 稀野度

上記ノ方法ヲ用ヒテ組織壞疽ニ於ケル血漿「チモヌクレイン」酸ノ消長ヲ窺ハント欲シ、次ノ實驗ヲ行ツタ。即チ海狸ノ腹部皮下ニ 10%ノ食鹽水 20cc 注入シ局所ニ壞疽ヲ起サシメ、注射 3 日前、注射直前、注射後 3 日目、及ビ注射後 7 日目ノ 4 回採血シテ、本法ニ依リテ血漿「チモヌクレイン」酸ヲ定量シタ。注射後 3 日目ハ壞疽最モ著明デアツテ血漿「チモヌクレイン」酸ノ

増加モ亦甚ダシク、増加率ハ69.7%乃至252.3%ノ高率ニ達シタ。

(摺筆スルニ際シ所長有馬博士、副所長青山博

士、及ビ阪大微研大谷博士ノ研究指導竝ニ本論文校閲ニ對シ深甚ノ謝意ヲ表ス。)

主要文献

1) 青山敬二, 臨牀醫學. 第24年, 第4號. 2) 青山敬二, 同友雜誌. 第6號. 3) 青山敬二, 結核. 第18卷, 第5號. 4) 平林肇, 醫學研究. 第9卷, 第12號. 5) 谷口修一, 結核. 第16卷, 5號. 6) 樞田卓也, 結核. 第16卷, 5號. 7) 齋藤政信, 結核. 第16卷, 5號. 8) 青山敬二, 島崎楠, 平林肇, 谷口修一, 樞田卓也, 齋藤政信, 田

川彌, 岩崎滄, 森茂, 楠節子, 結核. 第16卷, 5號. 9) 田川彌, 森茂, 楠節子, 結核. 第16卷, 5號. 10) 森茂, 結核. 第17卷, 5號. 11) 楠節子, 結核. 第17卷, 5號. 12) 森茂, 結核. 第18卷, 11號. 13) R. Feulgen, Z. physiol chem. Bd. 135, H. 203(1924). 14) Z. Dische, Mikrochemie Bd. 2. H. 26(1930).

KEKKAKU

PUBLISHED

BY THE JAPANESE ASSOCIATION FOR TUBERCULOSIS

Studien über die Nukleinämie.

II. Mitteilung.

Über die kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der
Thyminukleinsäure im Blutplasma mit Hilfe der modifizierten
Diphenylamin-Reaktion nach Dische.

Von

Schigeru Mori.

(Aus dem Arima-Institut für experimentelle Medizin in Osaka, Direktor: Prof. Dr. R. Arima.)

In den zahlreichen Arbeiten unter Leitung von Dr. Aoyama ist festgestellt, dass die sog. „Nukleinämie“ für die Entwicklung der Tuberkuloseallergie eine unentbehrliche Rolle spielt, indem die Nukleinsubstanzen, insbesondere die Thymonukleinsäure auf die Tuberkelbazillengifte als Haptene aktivatorisch einwirken. In meiner I. Mitteilung zu dieser Arbeit habe ich berichtet, dass die Nukleinsäure für die Beschleunigung der Blutkörperchensenkung eine kausale Bedeutung hat, und dass sie mit Hilfe einer von mir selbst gefundenen Ringreaktion (sog. Mori'schen Ringreaktion) graduell sehr leicht bestimmt werden kann.

Da für die weitere Entwicklung diesbezüglicher Forschungen eine zahlenmässige Darstellung der Grade von Nukleinämie, d. h. eine quantitative Bestimmung der Thymonukleinsäure im Blutplasma erforderlich ist, so habe ich es diesmal unternommen, eine kolorimetrische Methode für diesen Zweck aufzufinden, und über die Diphenylamin-Methode nach Dische eine Modifikation verfügt. Im Prinzip besteht diese Modifikation darin, dass erstens, weil sich die Nukleinsubstanzen bei Nukleinämie bereits in einem gelösten Zustand im Blutplasma befinden, eine Digestion mit Pepsin-Salzsäure, wie bei der Originalmethode nach Dische, nicht notwendig und deshalb entbehrlich ist, dass zweitens, um die Zersetzung der Thyminukleinsäure möglichst zu verhüten, die Konzentration der Natronlauge bei Hydrolyse schwächer als bei der Originalmethode genommen werden muss und dass drittens eine sich im Verfahren entwickelnde Trübung durch Eiweissabbauprodukte stets vor der Kolorimetrie zum Klaren filtriert werden muss.

Das ganze Verfahren nach dieser Methode besteht also in Folgendem:

Man versetzt 2 ccm zu prüfendes Blutplasma mit 1.5 ccm n-NaOH und hydrolysiert 2 Stunden lang im Wasserbad unter Ersatz verdampfenden Wassers und min öfterem Umrühren. Dann setzt man 0.1 ccm Eisessig zu, schüttelt gut, lässt einige Stunden stehen, filtriert durch trockenen Faltenfilter. Das Filtrat wird mit vielfachen Volumen 96%igem Alkohol gefällt, über Nacht stehen gelassen, zentrifugiert, und der Niederschlag wird in Wasser gelöst. Ein Teil dieser wässrigen Lösung wird nun mit 2 Teilen Diphenylamin-Reagens nach Dische vermischt, 3 Minuten lang im Wasserbad erhitzt,

dann 3 Studen lang im Brutschrank gelassen und filtriert. Die Blaufärbung wird im „Leifo“ mit Filter S 570 gemessen.

Die Formel für die Berechnung der Nukleinämiestärke ist folgende :

$$\text{Thymonukleinsäure mg/ccm} = f(E - E_0)v$$

Bemerkung :

f = Thymonukleinsäure mg/Extinktion	E = gefundene Extinktion
E_0 = Extinktion im Kontrollversuch (0.009 bei Meerschweinchen)	v = Verdünnung der Lösung

Es wurde in einem besonders für die Verwertung dieser neuen Methode angestellten Experimente nachgewiesen, dass im Blutplasma der Meerschweinchens bei einer durch subkutane Einspritzung 10%iger Kochsalzlösung hervorgerufenen lokalen Nekrose eine zeitlich beschränkte, aber starke Zunahme der Thymonukleinsäure zu konstatieren war.
(Autoreferat.)

Die reizbare Konstitution und die Tuberkulose.

3. Teil.

Klinisch-statistische Untersuchungen über die konstitutionelle Bedingtheit der Tuberkulinhautempfindlichkeit.

Von

Kazue Karibe und Sizuo Katube.

(Aus der städtischen Lungenheilstätte zu Osaka, Direktor: Dr. Daiziro Iwasu.)

Es ist offen, dass die Tuberkulinhautempfindlichkeit im Bezug auf die Tuberkelbazilleninfektion auftritt. Ob jedoch diese spezifische Hautempfindlichkeit auch besonders individuell konstitutionell bedingt ist, ist noch nicht wesentlich erklärt worden. Um dieses Problem zu lösen, haben Verff. eine Reihe der klinisch-statistischen Untersuchungen bei ca. 200 tuberkulös infizierten gesunden Menschen und ca. 800 tuberkulös erkrankten gemacht.

Wie Verff. schon in 1. Mitteilung erwähnt haben, kann man die reizbare Konstitution an ihren Attributen, d. h. Familienanamnese von allergischen Erkrankungen, Eigenanamnese von denselben, Dermographie und Hyperämie der Schleimhäute erkennen. Zwischen den positiven Ausfällen von diesen Attributen, insbesondere von der Eigenanamnese von den allergischen Erkrankungen und der Tuberkulinhautüberempfindlichkeit stellten Verff. in dieser Arbeit innige Beziehungen fest.

Aus diesem Ergebnis kann man sagen, dass die starke Tuberkulinhautempfindlichkeit durch die reizbare Konstitution individuell bedingt ist.
(Autoreferat.)