

重症肺結核患者尿中安息香酸非吸着性物質の研究

永島 暉也・早津 栄蔵

結核無菌化研究会

受付昭和37年11月7日

生体内における結核菌の増殖にともない、組織の炎症および壊死等が起こり、一方、生体では植物性防御反応や内分泌的防御反応が活発化し、その結果体内において異常代謝が起こることは周知のことである。

Winzler ら¹⁾は結核患者血漿中にムコ蛋白が増加することを認め、また Seibert ら²⁾は肺結核患者血清中に γ -グロブリン、組織崩壊に起因する組織蛋白であろうと推論している α_2 -グロブリンの著明な増加および β -グロブリンの軽度の増加を認めている。

このような事実よりみて、健康者と肺結核患者の尿成分においても、なんらかの差が生ずることは十分に考えられるところであり、かつ結核菌の代謝産物または結核菌自体の破壊産物等もなんらかの形で尿中に排泄されているのではないとも推察される。

人尿成分の研究は、Westall³⁾ および Stein⁴⁾ の正常人尿中アミノ酸成分の研究、Gabriel ら⁵⁾ の非透析性糖蛋白の物理化学的研究、Maxfield⁶⁾ のムコ蛋白の物理化学的研究、三好⁷⁾ または Steger⁸⁾ の濾紙電気泳動法による腎疾患患者の血清および尿成分の比較研究、癌患者を対象とした、中川ら⁹⁾ の安息香酸吸着性物質のカタラーゼ因子に関する研究、掛田¹⁰⁾、正宗ら¹¹⁾ によるムコ蛋白またはムコポリペプチッドに関する物理化学的研究等、その他数多くの研究がみられるのであるが、結核患者尿を対象とした研究報告はきわめて乏しいようである。

われわれはさきに結核症の病態生理学研究の基礎実験の一つとして、患者と健康者の尿成分の間に質的な差があるか否かを、Seibert の旧ツベルクリン分画法によつて得た粗製分画について検討し、報告¹²⁾ した。本報では重症肺結核患者と健康者の尿中安息香酸非吸着性物質および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによりさらに分画された7つの画分について、種々比較検討した。

実験方法

表1のごとき、中野療養所入所中の肺結核患者(患者)

および健康者おのおの8例(No. 1~8)の尿を各例とも約10~20l用いた。

1. 濃縮方法

No. 1~4 は限外濾過法によりまた No. 5~8 は氷室

Table 1. Cases of pulmonary Tuberculosis

No.	Age	Sex	Onset of the disease	GAKKEN's classification*	Gaf-fky	Drug resistance		
						SM (γ)	PAS (γ)	INH (γ)
1	27	♂	1961.	5 B ₂ Ka ₂	—	0	0	0
2	70	"	1954.	CB ₃ Kz	VIII	0	0	0
3	32	"	1958.	10 B ₂ Ka ₃	VIII	10	0	0
4	34	"	1960.	4 B ₃ KcKb ₂	VIII	1	0	0
5	24	"	1961.	6 CB ₂ KcKa	IX	0	0	0
6	41	"	1955.	6 CB ₂ Kz ₁	IX	10	1	0.1
7	24	"	1961.	7 C ₁ Kx ₂	X	0	0	0
8	26	"	1961.	6 B ₂ Kc	VII	0	0	0

* Classification by the Research Committee for Tuberculosis supported by the Ministry of Education, Japanese Government.

に入れてできた氷を除く操作を繰返すことにより約1/10量に濃縮した。

2. 分画方法

安息香酸吸着法⁹⁾¹⁰⁾により、濃縮尿中の吸着性物質を除去後、攪拌しながら限外濾過を行なう。次に限外濾過濃縮液をセロファン囊を用いて、流水(15~20°C)で4日、純水(5°C)で2日透析したのち、凍結乾燥を行なつた(S₃)。ただし安息香酸ソーダ溶液は10%苛性ソーダに安息香酸を17%の割合に溶解したものである。

3. S₃のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

DEAE-セルロースは、Peterson ら¹³⁾の方法に従い、2-クロロトリエチルアミン(東京化成工業製、特級)とウッドセルロース(東洋濾紙製)から合成した。

あらかじめ0.02M 磷酸緩衝液(pH 7.0)で平衡にした2本のカラムに、0.02M 磷酸緩衝液2mlで溶解し

た健康者の S_3 560 mg, 患者の S_3 855 mg (おのおの No. 5~8) を吸着させ, 次のごとく溶出した。I 液 150 ml を混合槽に入れ, 70 ml 流出後, II 液 200 ml を分液漏斗より混合槽に滴下しつつ溶出したが, 以後は III 液 200 ml, IV 液 200 ml, V 液 280 ml および VI 液 280 ml をそれぞれカラムに直接導いて溶出を行なつた。なお操作中の温度は $10\sim 14^\circ\text{C}$ である。

溶出速度は毎時約 18 ml とし, 約 5 ml ずつフラクションコレクターで集めて, Lowry ら¹⁴⁾ および正宗ら¹⁵⁾¹⁶⁾ の方法に準じてそれぞれ Folin, Molisch および Elson-Morgan 反応を行なつた。なお Folin, Elson-Morgan 反応の溶出曲線は, 牛アルブミン (第一化学薬品製) およびグルコサミン塩酸塩 (東京化成工業製, 特級) より得られた標準曲線から作製した。

溶出された7つの画分 ($F_1\sim F_7$) は, セルロース・チューブ (Visking Co. 製) を用いて, 流水 ($7\sim 8^\circ\text{C}$) で3日, 純水 ($7\sim 8^\circ\text{C}$) で1日透析後, 凍結乾燥した (溶出画分)。

4. 濾紙電気泳動法

泳動条件: 濾紙は東洋濾紙 No. 51 ($2\times 40\text{ cm}$), 緩衝液はペロナール緩衝液 $\text{pH } 8.6$ $\mu=0.05$ (V.B.), S_3 および溶出画分の試料濃度はおのおの $12\text{ mg}/0.04\text{ ml}$ (V.B.) および $1\text{ mg}/0.02\text{ ml}$ (V.B.), 使用した試料液量は 0.01 ml , 電流および電圧はおのおの $0.4\text{ mA}/\text{cm}$ および $13\sim 11\text{ V}/\text{cm}$ で, $7\sim 8^\circ\text{C}$ 下 S_3 は4時間, 溶出画分は5時間泳動した。対照として人血清, 卵製アルブミン (小宗化学薬品製, 最純) および牛アルブミンを用いた。

染色および抽出法: Amidoschwarz 10 B 染色^{17)~19)} およびその抽出は次のごとく行なつた。10分間染色した後, 数回脱色液をとりかえながら5時間にわたつて洗浄を行なつた。乾燥後原点より 0.5 cm 間隔に切りとり, おのおの濾紙片を抽出液 (5% メタノール中 4% 苛性ソーダ) 3 ml で2時間抽出した後, $595\text{ m}\mu$ で測定した。HIO₄-Fuchsin sulfite 染色は Köiw ら²⁰⁾ および Björnesjö²¹⁾ の方法に従つて行ない, 抽出発色はわれわれの考案した方法²²⁾ によつて行なつた。すなわち以下のごとくである。染色乾燥後, 原点より 0.5 cm 間隔に切りとつた濾紙片をおのおの試験管に入れて, IN 塩酸 1.2 ml を加え, ゴム栓をして 100°C 水浴中で3分間加熱後, 水冷してからピリジンを 1.8 ml 加えて攪拌し約1時間放置したのち, $560\text{ m}\mu$ で測定した。

5. 血球凝集反応および凝集阻止反応

S_3 (No. 1~4) および溶出画分は血球凝集反応のみを行ない, S_3 (No. 5~8) は両反応を行なつた。

抗原: S_3 15 mg および溶出画分 2 mg に 0.15 M 磷酸緩衝液 ($\text{pH } 7.1$) をおのおの 0.4 ml および 0.2 ml 加え, その遠心上清を使用した。なお対照として国立予防衛生研究所製 ツベルクリン No. 14 を使用した。

免疫山羊血清: 既報²³⁾のごとく処理した国立千葉療養所製 No. 14 を使用した。

他の実験条件は既報²³⁾に準じた。ただし免疫山羊血清の希釈には, 0.15 M 磷酸緩衝液で溶解したカゼイン (小宗化学薬品製, 最純) 溶液 (血球凝集反応は 0.01% , 凝集阻止反応には 0.02%) を使用した。

6. 呈色反応

S_3 の定性: 試料を $1\text{ mg}/\text{ml}$ になるように純水に溶解し, Folin¹⁴⁾, Millon²⁴⁾, Xanthoprotein, Ninhydrin²⁵⁾, Molisch¹⁵⁾, Anthrone²⁶⁾, Elson-Morgan¹⁶⁾ および Direct Ehrlich²⁷⁾ の8反応を行なつた。なお対照は純水を用いた。

溶出画分の比色定量: 試料を $1\text{ mg}/\text{ml}$ になるように純水に溶解し, Folin¹⁴⁾, Molisch¹⁵⁾, Elson-Morgan¹⁶⁾ および Bial²⁹⁾ 反応 (および Direct Ehrlich 反応²⁷⁾) を行ない, Erma 光電分光光度計 (新4型) を用いておのおの $500, 565, 537$ および 575 と 680 (535) $\text{m}\mu$ で測定した。なお標準曲線の作製にはおのおの牛アルブミン, グルコース (純正化学製, 特級), グルコサミン塩酸塩および Yamakawa²⁸⁾ が赤血球より抽出精製した N-アセチルノイラミン酸を使用した。

実験成績

安息香酸非吸着性物質 (S_3)

1. 収量および呈色反応

健康者および患者おのおの8例の尿から分離された S_3 の原尿量 10 l 当りの最低収量値は 39 mg , 最高収量値は 260 mg および平均収量値は約 112 mg であり, 患者では平均収量値以上が3例, 以下は5例, 健康者ではおのおの4例であつた。このように各検体の収量値にかなりのばらつきが認められることは, 各人の生理状態や生活環境の相違等に起因するのではないかと思われる。

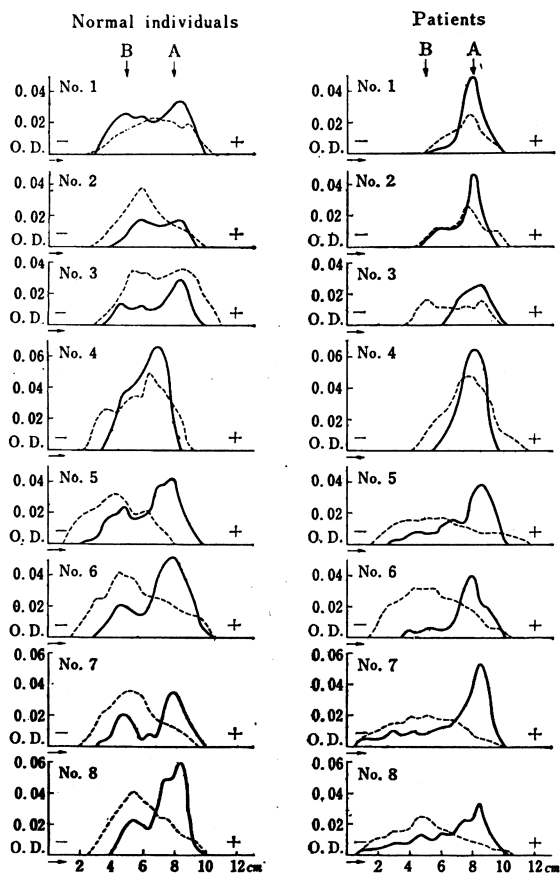
S_3 は概して白味をおびた褐色で, メタノール, エタノール, エーテル, アセトンおよび氷酢酸には溶解しない。 90% フェノールには, 健康者は 80% , 患者は 60% 程度溶解し, 60% エタノールおよび 60% メタノールにはほとんど溶解するが, 患者ではいく分白い濁りを認めた。磷酸緩衝液 (0.15 M , $\text{pH } 7.3$) にはほとんど溶解し, ペロナール緩衝液および純水には完全に溶解した。

健康者, 患者計16例の S_3 の水溶液は, Folin, Millon, Xanthoprotein, Ninhydrin, Molisch, Anthrone, Elson-Morgan および Direct Ehrlich の8反応に全例とも陽性の成績を示した。ただし Direct Ehrlich 反応においては, Ehrlich 試薬添加後1~2分経過すると (加熱前), 健康者は8例中7例が薄赤紫色に, 他の1例は黄色味がかつた薄赤紫色に, 患者は8例とも黄色に変化し, 1週間近く室温に放置しても両者の色調は同様の傾向を示した。

2. 濾紙電気泳動

Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色による蛋白および蛋白結合糖の分布は図 1 に示すとおりである。左側に健康者, 右側には患者の成績を示した。

Fig. 1. Paper Electrophoretic Patterns of S₃-Fractions



Note. ----: Amidoschwarz 10 B staining
 —: HIO₄-fuchsin sulfite staining

A 峰および B 峰はそれぞれ人血清アルブミンおよび β-グロブリンとほぼ等しい位置に認められ, A は Amidoschwarz 10 B 染色よりもむしろ HIO₄-Fuchsin sulfite 染色で強く発色し, 一方, B は HIO₄-Fuchsin sulfite 染色よりもむしろ Amidoschwarz 10 B 染色で強く発色する傾向がうかがわれた。

Amidoschwarz 10 B 染色: 健康者 No. 1, 3, 4 および患者 No. 1~4 においては B よりも A の定量値が高いかまたはほぼ等しく, また健康者 No. 2, No. 5~8 および患者 No. 5~8 では概して B の定量値は高いが, A の定量値は低く, しかも明確な凸状としては認められない傾向がある。

HIO₄-Fuchsin sulfite 染色: 健康者 No. 1, 2, 3, 5, 6, 7 および 8 には, A と B の 2 峰が認められ, その定

量値の比 (A/B) は 1.1~3.2 である。No. 4 は再度の泳動を行なつても A と B の分離は不良であり, 常に原点上に試料の変性または濾紙吸着性物質の存在によつて生じたのではないと思われる幅約 5 mm の紫色のバンドが認められた。一方, 患者では種々の泳動図が認められた。すなわち No. 1, 3 および 4 のごとく, B が認められないもの, No. 5~8 のごとく, A のすそから陰極側に向かって凹, 凸のドラダラのスロープを形成し, はつきりとは B が認められないもの, また No. 2 のごとく A と B が認められるものなどである。

濾紙電気泳動により以上のごとき結果を得たが, 明確なる解答はより多くの例数についての検討結果にまつべきと思われる。

なお両染色からみた No. 1~4 と No. 5~8 の泳動図はおのおの異なつた傾向を示しているようであるが, このことは別個に泳動を行なつたことによるよりも, むしろ尿濃縮法の差によるのではなからうかと思われる。

3. 血球凝集反応および凝集阻止反応

血球凝集反応: 表 2 に示すごとく, 健康者は No. 4 の 1 例のみが陽性, 一方, 患者は No. 1, 2, 3, 6, 7 およ

Table 2. Hemagglutination Test with S₃-Fractions

	No.	Serial dilution of immune sera													
		5 × 2 ⁿ n =	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Normal controls	1	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Patients	1	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Note. ?: Agglutination was observed while sensitizing.

び 8 の 6 例が陽性であり, その中で患者 No. 1 のみは他の陽性例と異なる反応の場の形を示した。なお健康者の No. 4 が陽性であつたが, はたして抗結核菌免疫血清と特異的に反応したためなのか, または凍結乾燥中に起こつたと思われる変性のためなのかまだ不明である。患者 No. 4 は血球感作中に, すでに管底に凝集塊が認められたものである。

なお尿中“安息香酸吸着性物質”中には, 少なくとも抗結核菌免疫血清と反応する血球感作抗原の存在を認めえなかつたことを付記する。

凝集阻止反応：健康者は4例中2例にきわめて弱い凝集阻止能があることが認められ、他の2例には全く凝集阻止能はなく、患者は4例中3例がきわめて弱い凝集阻止能を示し、他の1例には全く凝集阻止能がないことが認められた。なお患者 No. 7 には、反応の途中で溶血が認められた。

本反応は試料の関係から、健康者および患者おのおの4例について施行されたが、本成績に関するかぎりにおいては、患者が健康者に比し一定の傾向をもつて相違す

るということは認められなかつた。

S₃ の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー溶出画分

図2, 3および4におのおの Folin, Molisch および Elson-Morgan 反応による溶出曲線を示した。Folin 反応では6つの画分 (F₁~F₆) を認め、Molisch および Elson-Morgan 反応では6つの画分以外に、溶媒Ⅵで溶出される F₇ が認められた。

上記3反応による溶出曲線より、とくに次のことが認められる。すなわち溶出画分 F₃ は、Folin 反応では健康者と患者の値はほぼ等しいが、Molisch 反応においては健康者に比して患者の値が高く、とくに Elson-Morgan 反応においてこの傾向は顕著であつた。

なお念のため、Folin 反応と Elson-Morgan 反応に及ぼす溶媒の食塩濃度の影響を検討してみたが、0.1~1.5 M ではなんらの影響も認められなかつた。

4. 濾紙電気泳動

溶出画分の Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色の結果は、図5のごとくである。左側に健康者、右側には患者の成績を示した。

両染色において、健康者、患者間に明らかな差が認められた画分は、F₅ とほぼ移動距離の等しい F₄ であつた。すなわち健康者に比し患者は Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色のいずれでもきわめて強く発色し、定量値は健康者の3倍程度であつた。

F₁, F₂ および F₆ では、健康者よりも患者が Amido-

DEAE-Cellulose Column Chromatograms of S₃-Fraction

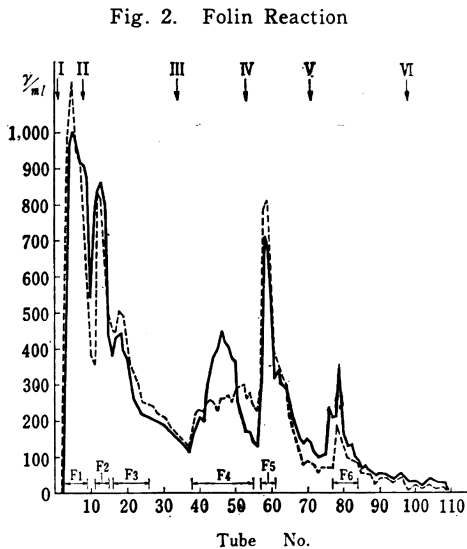
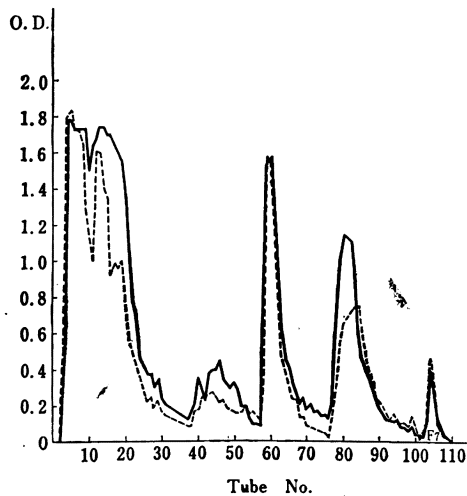


Fig. 3. Molisch Reaction



Notes.
Column: 1×31 cm
Buffers: I. 0.02 M NaPhosphate, pH 7.0. II. 0.02 M NaH₂PO₄-0.1 M NaCl III. 0.05 M NaH₂PO₄-0.1 M NaCl IV. 0.05 M NaH₂PO₄-0.3 M NaCl V. 0.05 M NaH₂PO₄-0.6 M NaCl VI. 0.05 M NaH₂PO₄-0.9 M NaCl
---: Normal control —: Patient

Fig. 4. Elson-Morgan Reaction

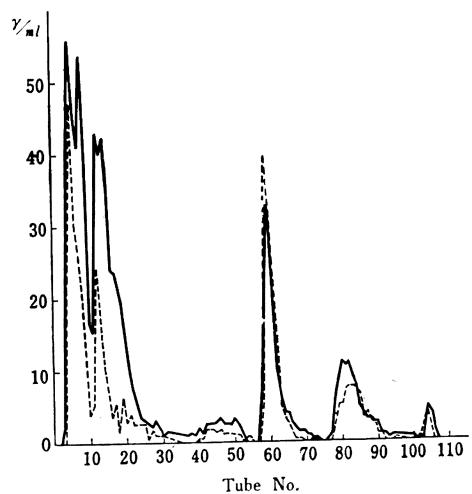
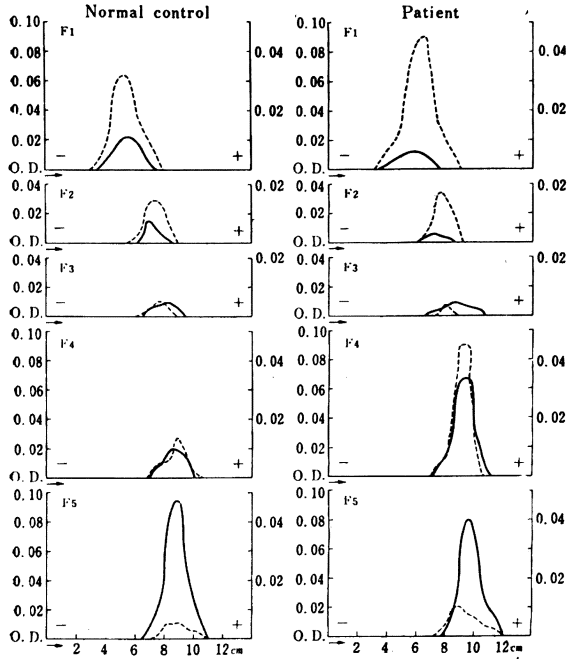


Fig. 5. Paper Electrophoretic Patterns of the Fractions Isolated from S₃-Fraction by DEAE-Cellulose Column Chromatography



Notes. 1. ----: Amidoschwarz 10B staining.
 —: HIO₄-fuchsin sulfite staining.
 2. Optical density at left: HIO₄-fuchsin sulfite staining. Optical density at right: Amidoschwarz 10B staining.

schwarz 10 B 染色では強く発色するにもかかわらず、HIO₄-Fuchsin sulfite 染色では弱く発色する傾向がうかがわれた。F₃ は Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色できわめて弱く発色し、F₆ および F₇ は、少なくとも本実験に用いた試料濃度では全く発色しないことが認められる。

なお F₁ および F₅ はおのおの S₃ の B および A とほぼ等しい位置に認められ、F₁ は主に Amidoschwarz 10 B 染色で、F₅ は主に HIO₄-Fuchsin sulfite 染色ではつきりと認められる画分である。

5. 血球凝集反応

S₃ の血球凝集反応および凝集阻止反応の結果より、溶出画分については血球凝集反応のみを行ない次のごとき結果を得た。

健康者および患者の F₁, F₂, F₅, F₆ および患者の F₃ はいずれも陰性であり、健康者の F₃ および両者の F₄, F₇ は非特異的凝集を示した。ただし F₇ には一緩衝液に完全には溶解せず白い濁りを生じたが、遠心上清は透明であつた—血球感作中にすでに凝集塊が認められていた。

以上のごとく、われわれの予想に反して今回の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー溶出画分中には、

Quantitative Color Reactions with the Fractions Isolated from S₃-Fraction by DEAE-Cellulose Column Chromatography

Fig. 6. Folin Reaction

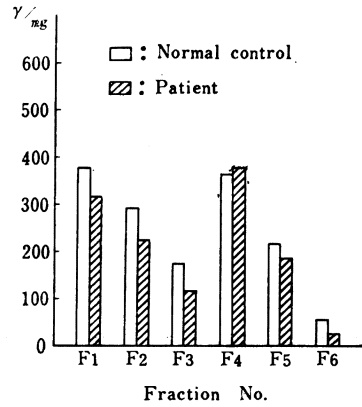


Fig. 7. Molisch Reaction

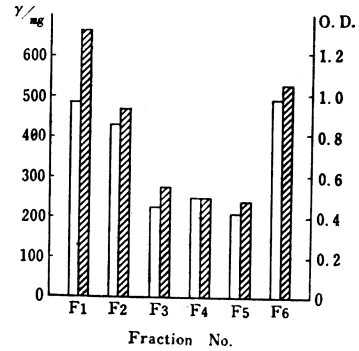


Fig. 8. Elson-Morgan Reaction

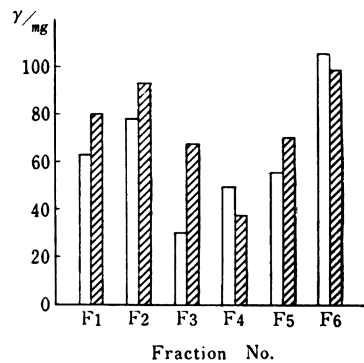
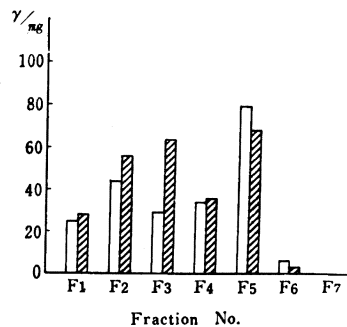


Fig. 9. Bial's Reaction (Also direct ehrlich reaction)



血球感作抗原の存在を確認することはできなかつた。

6. 比色定量

Folin, Molisch, Elson-Morgan および Bial 反応 (および Direct Ehrlich 反応) による溶出画分の比色定量の結果は、おのおの図 6, 7, 8 および 9 に示すとおりである。横軸に溶出画分 No. および縦軸には試料 mg 当りの定量値 (7) を示す。

図より明らかなごとく、Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色ではきわめて弱い発色を示す F₃ は、Elson-Morgan および Bial 反応 (および Direct Ehrlich 反応) において健康者、患者間に顕著な差を示している。すなわち健康者に比して患者はアミノ糖およびシアル酸含量はいずれも高く、2倍以上の値であつた。一方、両染色において、健康者、患者間にきわめてはつきりと差が認められた F₄ は、上記 5 反応を通じて健康者、患者ともほぼ等しい値を示した。

次に健康者と患者の F₁~F₆ をおのおの一括した比色定量値をみると、健康者に比して患者は Folin 反応で低く、一方 Molisch, Elson-Morgan および Bial 反応 (および Direct Ehrlich 反応) において高い傾向がうかがわれた。

なお両染色において発色しなかつた F₆ は、5 反応中ことに Molisch, Elson-Morgan 反応できわめて高い値を示し、かつ F₇ は Bial 反応 (および Direct Ehrlich 反応) のみを行なつたが陰性の成績を示した。

Direct Ehrlich 反応において、溶出画分中健康者の F₁ は、Ehrlich 試薬を添加後 (加熱前) 1~2 分経過するときわめて薄い赤紫色を呈し、一方患者の F₁ を含めていずれの画分も色調は不変であつた。

総括および考察

重症肺結核患者および健康者尿から、安息香酸吸着法により分画した非吸着性物質 (S₃) および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでさらに分画した 7 つの溶出画分 (F₁~F₇) について検討した。

Folin, Millon, Xanthoprotein, Ninhydrin, Molisch, Anthrone, Elson-Morgan および Direct Ehrlich 反応にすべて陽性の成績を示す S₃ は、Ehrlich 試薬を添加したのみで健康者は薄赤紫色を、患者は黄色を呈した。また溶出画分中、濾紙電気泳動において S₃ の B に相当する位置に出現する F₁ (健康者) のみが、S₃ よりはきわめて弱いが、薄赤紫色を呈した。

Ehrlich 試薬と常温で反応して赤く発色する尿中物質としては、ピロール核をもつた一群の物質、たとえばウロピリン、ウロピリノーゲンおよびウロクロモゲン、またはある種の芳香族化合物等が考えられる。一方、Ehrlich 試薬と常温で反応して黄色を呈する物質としては、患者の S₃ が黄色を呈することからまず抗結核剤が

考えられる。事実 INH, PAS, SM および Sulfa 剤に Ehrlich 試薬を添加すると、SM では色調の変化は認められないが、INH, PAS, Sulfa 剤は黄色を呈した。上記薬剤以外に考えられる物質としては尿素もあげられようが、健康者の画分は薄赤紫色を呈することより、ここでは考慮する必要はないものと思われる。

以上のごとき非透析性のウロクロモゲンあるいは高分子物質と結合した状態にあると思われる透析性尿中物質の存在により、健康者の画分は薄赤紫色を呈し、一方患者においては高分子物質と結合状態にある INH, PAS, Sulfa 剤等が、薄赤紫発色を妨害して黄色を呈するのではないかと推察される。しかしまた健康者、患者尿特有の成分の差によるのではないかとも思われるので現在なお検討中である。

S₃ の濾紙電気泳動の結果、Amidoschwarz 10 B 染色では健康者と患者間に差は認められず、HIO₄-Fuchsin sulfite 染色では健康者には A と B の 2 峰が認められ、一方患者は一定した泳動図を示さず、概して B が認められないような傾向がうかがわれた。溶出画分においては、F₁~F₅ が Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色で発色し、ことに F₄ では患者が健康者のほぼ 3 倍程度の定量値を示すことが認められた。なお F₁ および F₅ はおのおの S₃ の B および A に相当する位置に出現し、かつ B および A と発色傾向は同様であつた。

F₁ において、患者に比して健康者が Amidoschwarz 10 B 染色の定量値は低いにもかかわらず、HIO₄-Fuchsin sulfite 染色の定量値が高いということは S₃ の HIO₄-Fuchsin sulfite の染色における健康者および患者間に認められる結果を、裏書きしているように思われる。

次に血球凝集反応および凝集阻止反応で検討したところ、S₃ の血球凝集反応では患者は 8 例中 6 例および健康者は 8 例中 1 例が陽性であり、一方凝集阻止反応においては健康者および患者とも凝集阻止能はほとんどなく、かつ両者間に明確な差は認められなかつた。このようなことは土屋ら³⁰⁾の“ツベルクリン画分 CFII-a に血球感作能は全くないのに凝集阻止能はある”という報告、登谷³¹⁾の“ツベルクリン画分によつては血球感作能と凝集阻止能とが必ずしも平行しない”という報告およびわれわれの“ツベルクリンを血球で吸収したのちの上清の血球感作能は明らかに低下するけれども、凝集阻止能は吸収の前後にほとんど変化しない”という成績²³⁾からみても考えられるところである。

S₃ には血球感作能があるにもかかわらず、いずれの溶出画分にも血球感作能があることを確認することはできなかつた。この理由としては、血球感作抗原がカラムに吸着されてしまうためか、またはカラムを通過中にある種の物理化学的变化を受けたことによるのか、あるいは S₃ には血球表面に抗原を吸着させるように働く物質

と抗原とが共存しているために、血球感作能があると仮定すれば、それらがカラムクロマトグラフィーによりおのおの別個の画分に分離されたことによるのではないかと考えられる。この点については、他の種々の分画方法を併用して検討する予定である。なお本実験においては抗結核菌免疫血清のみを用いたが、今後は抗肺組織免疫血清および肺結核患者血清等を併用してさらに検討を加える予定である。

次に溶出画分の比色定量の結果をみると、ことに F₃ において健康者と患者間に顕著な差が認められる。すなわち健康者に比して患者はアミノ糖およびシアル酸含量がきわめて高く、いずれも2倍以上の値を示した。

Amidoschwarz 10 B および HIO₄-Fuchsin sulfite 染色において、健康者と患者の定量値がきわめて異なっていた F₄ は、Folin, Molisch, Elson-Morgan および Bial 反応 (および Direct Ehrlich 反応) では健康者、患者ともほぼ等しい値を示した。このことは健康者および患者の F₄ の成分の質的な相違によるものとも推察される。とすれば、さらに分離精製を繰返すことにより、健康者または患者に特有な画分が得られるのではないかとと思われる。

各溶出画分の比色定量値を一括してみると、健康者に比して患者は Folin 反応で低く、Molisch 反応において高い値を示した。なおアミノ糖およびシアル酸含量はいずれも患者に高い傾向が認められる。このことは Tansini ら³²⁾の Rimington 法により測定した血清中のアミノ糖量、および諸木³³⁾の Diphenylamine 法により測定した血清中シアル酸量のいずれも、健康者に比して結核患者に高いという報告と考え合わせると興味深く思われる。

なお安息香酸吸着性物質の性状の検討結果については、おつて報告の予定である。

ご指導、ご校閲をいただいた田宮本学会会長、採尿にあたりご援助をいただいた国立中野療養所高橋竜之助氏に、ご教示をいただいた東北薬科大学箱守仙一郎教授に、また N-アセチルノイラミン酸の分与を受けた東京大学伝染病研究所山川民夫教授に深謝する。

文 献

- 1) Winzler, R. J., and Smith, I. M.: J. Clin. Invest., 26 : 617, 1948.
- 2) Seibert, F. B., Seibert, M. V., Atno, A. J., and Campbell, H. W.: J. Clin. Invest., 26 : 90, 1947.
- 3) Westall, R. G.: Biochem. J., 60 : 247, 1955.
- 4) Stein, W. H.: J. Biol. Chem., 201 : 45, 1953.
- 5) Gabriel, O., Dain, J., Zinsser, H. H., and Dische, Z.: Arch. Biochem. Biophys., 86 : 155, 1960.
- 6) Maxfield, M.: Biochem. et Biophys. Acta, 49 : 548, 1961.
- 7) 三好: 臨床, 5 : 729, 昭28.
- 8) Steger, J.: Münch. Med. Wochschr., 96 : 747, 1954.
- 9) 中川・笠井: 日本内科学会雑誌, 40 : 312, 昭26.
- 10) Kaketa, H.: Tohoku J. Exp. Med., 67 : 319, 1958.
- 11) Masamune, H. Hakomori, S., and Sugo, T.: Tohoku J. Exp. Med., 69 : 383, 1959.
- 12) 早津・永島・糟谷・萩谷: 医学と生物学, 62 : 29, 昭37.
- 13) Peterson, E. A., and Sober, H. A.: J. Am. Chem. Soc., 78 : 751, 1956.
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265, 1952.
- 15) Masamune, H., Kaketa, H., and Abe, S.: Tohoku J. Exp. Med., 67 : 329, 1958.
- 16) Masamune, H., and Yoshizawa, Z.: Tohoku J. Exp. Med. 65 : 169, 1957.
- 17) Grassmann, W., and Hannig, K.: Naturwiss., 37 : 496, 1950.
- 18) 小林・村井: 臨床検査, 2 : 139, 昭33.
- 19) 化学実験操作法, 結編 1 : 236, 南江堂, 昭34.
- 20) Köiw, E., and Gröwall, A.: Scand. J. Clin. & Lab. Invest., 4 : 244, 1952.
- 21) Björnesjö, K. B.: Scand. J. Clin. & Lab. Invest., 7 : 153, 1955.
- 22) 永島・早津: 医学と生物学, 65 : 167, 昭37.
- 23) 永島・早津・中村: 医学と生物学, 57 : 94, 昭35.
- 24) 実験化学講座, 23 : 142, 丸善, 昭34.
- 25) 実験化学講座, 23 : 126, 丸善, 昭34.
- 26) 実験化学講座, 23 : 419, 丸善, 昭34.
- 27) Werner, I., and Odin, L.: Acta Societ. Med. Upsaliensis, 57 : 230, 1952.
- 28) Yamakawa, T.: J. Biochem., 43 : 867, 1956.
- 29) 蛋白質・核酸・酵素, 5 : 680, 昭35.
- 30) 土屋・浅見・細井: 日本細菌学雑誌, 9 : 315, 昭30.
- 31) 登谷: 金大結研年報, 16 (上) : 31, 昭34.
- 32) Tansini, G., and Sacerdoti, C.: 結核文献の抄録速報, 11 : 1639, 昭35.
- 33) 諸木: 結核文献の抄録速報, 11 : 1210, 昭35.

Studies on the Fractions of Urine, Unadsorbable by Benzoic Acid, in Normal and far Advanced Cases of Pulmonary Tuberculosis.

So far as we are aware, little is known of the works dealing with the higher molecular substance in tuberculous urine, while a number of studies on urines of healthy persons, nephro-patients or patients with cancer have been extensively made from biological, physical and chemical points of view by a number of authors, as Westall, Stein, Steger, Nakagawa, Masamune, Maxfield, Gabriel and many others.

Hence the present work was undertaken to study both the material (S_3 -fraction) unadsorbable by benzoic acid, obtained from urine of far advanced pulmonary tuberculous cases as well as normal controls, and the seven effluent fractions ($F_1 \sim F_7$) further isolated from the above S_3 -fraction by DEAE-cellulose column chromatography.

1. All of S_3 -fractions are found to give the color reactions of protein, carbohydrate, hexosamine, sialic acid and so on. It is of interest that S_3 -fractions of patients give a reaction yellow in color but the normal F_1 and S_3 -fractions obtained from healthy persons become light reddish-violet in color, even without heating in a water bath after adding the Ehrlich's p-dimethylaminobenzaldehyde reagent. Further investigations are now carried out to elucidate whether it is due to the influence of some anti-tuberculosis drugs or to the difference between the urinary components of normals and patients.

2. In the case of paper electrophoresis, the protein and protein bound-carbohydrate content was estimated by means of photoelectric spectrophotometer after amidoschwarz 10 B staining and HIO_4 -fuchsin sulfite staining.

Results obtained by paper electrophoresis of S_3 -fractions are as follows: Little difference was found between the electrophoretic patterns of normals and patients in amidoschwarz 10 B staining. After HIO_4 -fuchsin sulfite staining, both A and B peaks are recognized in case of normals, but in case of patients there are a few kinds of electrophoretic patterns, having a common tendency towards showing no B peak distinctly.

Results of paper electrophoresis of the effluent fractions are as follows: It should be pointed out that the protein and protein bound-carbohydrate

content of F_4 in case of the patient is about three times as high as that of the normal. In addition, both F_6 and F_7 peaks are not observed even after the staining by both methods, irrespective of whether the material is derived from normal or from diseased cases.

Each of F_1 and F_5 is observed at the spot corresponding to each of B and A in the electrophoretic pattern of S_3 -fraction, in every respect F_1 corresponding to B and F_5 to A respectively.

3. Six cases out of 8 in case of patients show the positive results but in case of normals only one case out of 8 is positive in hemagglutination test with S_3 -fraction. On the contrary, there seems to be little difference between patients and normals in inhibition test with S_3 -fraction.

All fractions isolated by DEAE-cellulose column chromatography are negative in hemagglutination test even in case of the patient. The reason for this is supposed either to come from the antigen sensitizing red cells which might be too adsorbable on the DEAE-cellulose to be eluted by the eluant used or to the fact that its nature might probably be changed physically or chemically by the adsorbent.

4. The following results were obtained in quantitative color reactions with the effluent fractions. Of seven fractions, a difference was detected between F_3 of the patient and the normal. That is, the former contains about twice as much hexosamine and sialic acid as the latter does. The F_4 which indicates a great difference in quantitative values estimated after the staining in paper electrophoresis between the normal and the patient, makes little difference between them in the quantitative Folin and Molisch color reactions.

It has also been found that the sum of quantitative values of all fractions of the normal is higher than that of the patient in Folin reaction, but the former is lower than the latter in Molisch reaction, Elson-Morgan reaction and Bial's reaction (also direct Ehrlich reaction). The fact that the hexosamine and sialic acid content in case of the patient is higher than that in the normal may reflect the following fact, that the serum in tuberculosis contains a higher percentage of hexosamine and sialic acid than does the normal serum.