

日本生理学会編
生理學講座

第12卷 1.B

臨床生化学微量定量法

東京大学教授 博士 三桂玉児

生理學講座刊行会

生理学講座

臨床生化学微量定量法

児玉桂三

江苏工业学院图书馆
藏书章

日本生理学会

1952年4月25日初版
1952年10月10日4版

生理学講座 第十六回配本 4

編集者 日本生理学会
発行者 中山三郎平
東京都千代田区神保町2の24
用紙 竹尾洋紙店
東京都千代田区錦町3の18
印刷 大和印刷株式会社
東京都新宿区山吹町198
製本 松岳社
東京都新宿区新小川町2の4
発行所

東京都神田局区内神保町2の24。
(神保町・水道橋間電車通り)

株式会社 中山書店

電話(調) 5146~8番
振替東京196f5番

目 次

臨床生化学における簡易微量定量法

緒 言	1
第1章 比色法および光電法	1
1. 比色法	2
2. 光電法	3
第2章 正常値	9
3. 正常値	9
第3章 全血液に関する分析操作	11
4. 採血法	11
5. 尿 素	11
6. 非蛋白性窒素（一名残余窒素）N. P. N.	13
7. 尿 酸	14
8. クレアチニン	16
9. アミノ酸	17
10. 無機磷酸塩	19
11. コレステリン	20
12. グルコース	21
13. 乳 酸	23
14. スルホンアミド	25
15. ヘモグロビン	26
16. 鉄	28
17. 硫酸銅法による血液比重の測定	29

第4章 血漿の分析操作	31
18. 血漿の採取方法	31
19. 血漿蛋白質	31
20. フィブリン	32
21. アルブミン	33
22. ナトリウム	33
23. ビリルビン	35
24. クロリッド (塩化物)	36
25. 炭酸ガス結合能	37
26. 燐	39
27. 血清又は血漿アルカリ性磷酸酵素	42
28. 酸性磷酸酵素	44
29. 血漿アミラーゼ	45
30. 血漿アスコルビン酸	46
1) テクロールフェノール—インドフェール法	46
2) 2, 4 デニトロフェニルヒドラジン法	47
第5章 血清分析操作	48
31. 血清の採取	48
32. 血清カルシウム	48
33. 血清カリウム	49
第6章 脳脊髄液 (C. S. F.) の分析	50
34. 脳脊髄液の分析	50
第7章 糞便の分析	54
35. 潜血反応	54
36. 糞便脂肪	55
第8章 尿の分析	56

37.	尿 糖	56
38.	尿アセトン体	58
39.	尿蛋白	59
40.	尿 素	59
41.	尿全窒素	61
42.	尿クレアチニンおよびクレアチン	62
43.	尿 酸	64
44.	尿クロリッド	64
45.	尿ナトリウム	65
46.	尿カリウム	66
47.	尿アミラーゼ	66
48.	尿アスコルビン酸	67
49.	ビタミンB ₁ , サイアミン	68
第9章	胃液の分析	69
50.	胃酸度	69
51.	胃液中の全クロリッド量	70
52.	ペプシン	70

臨床生化学における簡易微量定量法

児玉桂三

緒言

最近の生化学的分析法は次第に微量分析法が用いられる傾向にある。これは分析技術が急足な進歩をなしたことに帰因し、測定誤差が大量を用いるときとあまり、違わないまでになつたためである。したがつて貴重な血液を患者から多量にとることも不必要になり、一面また繰り返し検査を行うことも可能となつて、診断、病気の経過を精細に追究しうることとなつた。さらに少量の試薬ですむわけであるから経済的でもある。

かつてわが国に Bang の微量血糖定量法が紹介され、糖尿病の診断と治療に一大進歩をもたらしたことは顕著な事実である。今日は単に血糖のみならず、多くの血液成分について、ひとしく優秀なる微量定量法が究明せられたのであつて、医学の進歩に貢献しつつあることは、まことに慶賀にたえない。然し私が本書によつて紹介する方法はほんの基本的なものであつて、けつして完全なるものでない。基本的というのは操作についてであつて、ここに記載する方法を実施されるならば、定量法のコツを会得されることと信ずる。コツさえ身につければ、あとは新しい定量法に向つてもよく運びうるであらう。

第1章 比色法および光電法

血液、尿およびその他の生物学的物質を定量するには、同一物質について

も種々な方法がある。そのどれを選ぶかは研究の都合によつて異なるが、私は本書においては、主として臨床家が簡単に迅速にしかも正確に施行しうる方法を紹介することにした。しかも多くの場合絶対値よりも比較的数値を論ずることが多い臨床検査には十分役に立つことと思う。

さて迅速かつ簡単をねらう方法としては、比色法または最近急速に発達した光電法である。したがつて本書においては、これらを利用する定量方法が多いからまずその原理について簡単に述べる。

1. 比色法 Colorimetry

比色法は測定せんとする物質を着色物質に変化し、その色調を、同様に処理してえた既知濃度の純粋物質の色調と比色して、その濃度を知る方法である。したがつて色調が濃度に正比例することが必要条件である。しかし色調は種々なる因子により影響される。加熱、冷却の時間、試薬を加える順序、速度および試薬が古いか新しいか、塩類があるかないか、反応液の容積などの条件により支配される。ゆえにできるだけ一定の条件のもとで実施されなければならない。

そして標準液としては、既知濃度の純粋物質を全く同一条件のもとに発色せしめたものであることが必要である。しかし純粋物質が高価であつたり、また容易に純粋に得難いばあい（たとえばビルリピン）には人工的標準液を用いることがある。多くのばあい色素、無機塩溶液、着色したガラス、ゼラチンなどがこれにあてられる。このばあいは、とくに前述の条件に注意することが大切である。かつ実験のたびごとに、使用する試薬を用いてチェックすることが必要である。

さて、比色には比色計 Colorimeter を用いる。これは Beer の法則に基づいている。本法則は“溶液における色の濃さは光が通過する間に存在する色素分子の数に正比例する”というのである。すなわち 20 mm の厚さの 1% の色素の色の濃さは 10 mm の厚さの 2% の色素と同じである。なん

となれば両方において色素分子の数が同じだからである。これを数学的に述べると、 D をある色素の色の強度、 c を濃度、 l を光が通過した距離、 k を比例恒数とすると

$$D = k \times c \times l$$

となる。今同一色素を c_1 および c_2 の濃度にとしたときの l を、それぞれ l_1 および l_2 とすれば

$$D_1 = k \times c_1 \times l_1$$

$$D_2 = k \times c_2 \times l_2$$

となる。もし $D_1 = D_2$ ならば

$$k \times c_1 \times l_1 = k \times c_2 \times l_2$$

$$\therefore c_1 \times l_1 = c_2 \times l_2$$

$$\therefore \frac{c_1}{c_2} = \frac{l_2}{l_1}$$

となり、濃度の比は光の通つた距離に逆比例する。ゆえに c_2 は標準溶液で濃度既知とし、この l_2 に対し同一の色の濃さを示す l_1 を求めれば

$$c_1 = c_2 \times \frac{l_2}{l_1}$$

より c_1 の濃度を求めることができる。

ただしこの際注意すべきことは l_1 と l_2 が、あまりかけ離れては Beer の法則は正確にあてはまらない。通常比色計の液層は 40~50 mm であつて、標準液を 20mm の高さにおき適度の色の濃さがあらわれるようにすべきで被検液の高さは、この際 10~30mm 以内になることが必要である。比色計として現今 Duboscq Colorimeter が用いられる。

2. 光電法

光電法は溶液による光の吸収度を電氣的に測定して定量する方法である。これは可視光線の範囲のみならず、紫外光線または赤外光線の吸収にもおよびものである。

溶液の光を通す力を透過率 Transmission, T といひ、入射光線の強さ I_0 と透過光線の強さ I との比で示される。

$$T = \frac{I}{I_0}$$

しかし実際に入射光線を測定しても、その一部がガラス器の表面から反射されたり、溶媒により吸収されたりして失われる。しかし同じ容器や溶媒を使うときは、この点は消しあう。そこで、むしろ透過率を吸光物質の濃度 c なる溶液の I_0 と入射光線の強さ、溶液の厚さ、温度等を同一にしたときの吸光物質を含まない溶媒だけの I_b との比で示す方が便利である。

$$T_c = \frac{I_c}{I_b}$$

したがつて T_c はつねに 1.0 よりは小である。そして通常 $-\log T^*$ であらわすことになつており、これを光密度 optical density (D) または吸光度 extinction (E) とよぶ。そして特定の波長の光線を用いたばあいは特種吸光度 Specific extinction または吸光係数 Extinction coefficient とよび、1% の溶液で液層が 1 cm のときは $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ とかく。もし濃度がモルであらわされるならば、分子吸光度 molar extinction という。

T の測定 一定の容器 (Cuvette) にまず溶媒を入れ、適当な波長の光を通過せしめ、その通過した光の強さを電氣的に測定し、これを 100 とする。つぎに被検液を同一のクベットに入れ同様に測定する。

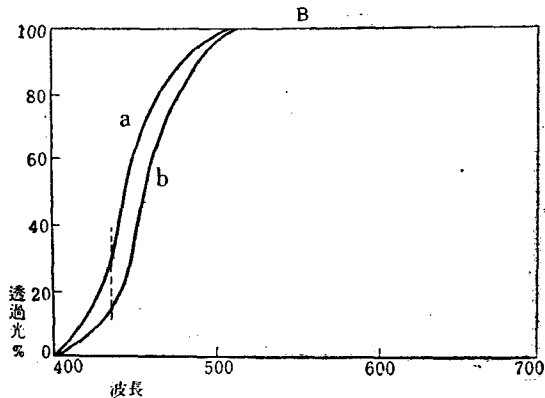
電氣的に測定する装置には 2 種類ある。1 は光電池式 (photovoltaic cell, plate type, rectifier, barrier layer cell), 他は光電管式 (photoemissive tube) である。前者は同光物質であるセレンウムまたは亜酸化銅でおおいさらにその上を金または銅の薄膜でおおつた金属板からなり、光があたると電子が一方方向に流れ電池の両極に電位差を生じる。これを電流計でよみ、光の強さを知る方法である。後者は真空或はガス入管でその中に装置した金属

* Beer 法則は $T = 10^{-k \cdot l \cdot c}$ である。∴ $-\log T = k \cdot l \cdot c$ となる。

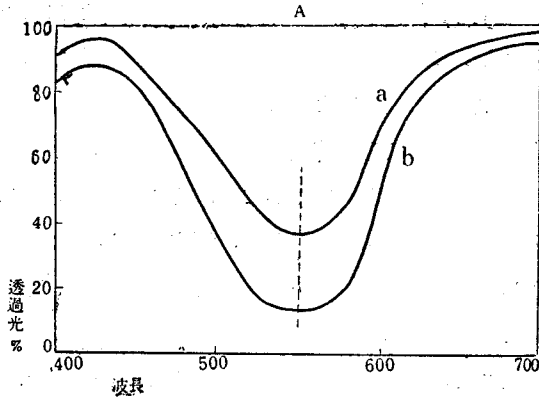
板に光があたると電子を発散し、電子は陽極に流れるようになっていて、その流れの強さによつて、ほかの回路を流れる電流が増減する。この電流はきわめて小であるが、増幅装置によつて適当に拡大される。紫外線や赤外線
の吸収を測定するばあいは光電管式の方が用いられる。

いずれの器械を用いるばあいにおいても、その器械の性能は、たとえ同一メーカーであつても違うものであるから、測定に際しては標準液と同時に
行うことが望ましい。しかしその都度標準液を用いず、あらかじめ標準液による曲線を求めておき、その後は単独に被検液のみについて実験し、上記曲線から濃度を求めることもやられている、しかもこのばあいは、けつして他人のつくつた曲線を用いてはいけ
ない。それは器械により性能を異にするからである。

(1) 透過率と波長の関係 吸光物質の溶液の光の透過率、または吸光度を赤外線、可視光線、紫外線の各波長について測定して図示したものは、いわゆる吸収スペクトルで、その形は各物質の特性をあらわすものと考えられる。吸収スペクトルの典型的なものとしては、第1図および第2図に示したA、Bの二つがある。吸光物質の色は可視部の吸光度が波長によつて異なるた



第1図 簡單なる吸収スペクトル



第2図

めに生ずる。

物質の濃度を光度測定によつて定めようとするときには、濃度が増減した際の吸光度の変化の大きい程測定感度がよくなるので、図のA型の物質では吸光度最大の波長の光を用いれば、感度が最大となる。一方第2図のB型の物質では、感度最大の波長は吸光度最大と最小の波長の間にあるので、ちがつた濃度の溶液で吸収スペクトルを測定して、感度最大の波長をもとめねばならない。

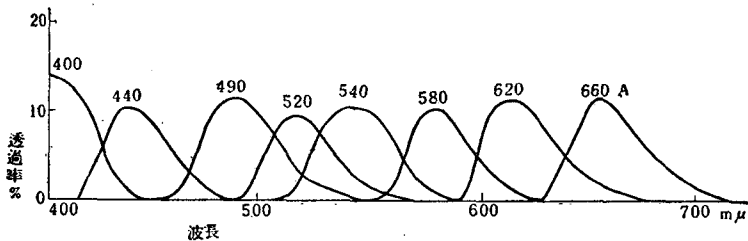
測定波長を決定する因子としては、上述の感度のみでなく、分析の際、もつとしばしば遭遇する被測定物質の濃度範囲に対して Beer の法則がよく成立し、かつ吸光度の測定値が精度のよい 0.05 ないし 1.00 の範囲に入るような波長を選ぶことが大切である。

吸光物質がある波長の光の照射に対して不安定であつたり、被検液中に2種以上の吸光物質のあるときには、注意が必要なことは勿論である。

(2) **フィルターとフィルター光度計** 種々の波長で光度を測定する装置として、フィルターを用いて特定の波長の光を取り出す方法を用いたものをフィルター光度計、プリズム、または回折格子によるスペクトルを用いて狭

い波長中の光をとり出す方法を用いたものを分光光度計という。

フィルターはせまい範囲の波長の光のみを透過せしめるように着色したガラスまたはゼラチン膜でつくられている。フィルターには透過率最大の波長と透過光線の波長巾により種々の種類がある。第3図にフィルターの透過率の例を示す。フィルターの透過光の波長巾がひろすぎると、Beerの法則が成立しなくなるので、30~50 m μ 以下の波長巾のフィルターを用いることが望ましい。この種のフィルターを単色フィルターという。



第3図 各種フィルターの透過度

フィルター光度計としては、市販のものが多数あるが、光電池1個を用いたものと、2個を用いたものに大別され、またメーターのよみも透過率で目盛つたものと、吸光度を直読できるものがある。光電池1個を使用したものは、構造、操作は簡単であるが、光源の光度が変動すると正確な測定が不可能であるに対して、光電池2個を用いたものでは平衡回路が使われているので光源の光度が変動しても正しい測定が可能である。

最近金属の定量分析に焰色分光光度計がつくられて、ナトリウム、カリウムなどの定量がすこぶる迅速かつ正確に行われるようになった。

(3) 分光光度計 分光光度計の代表的なものに水晶プリズムを用いたベックマン分光光度計と、回折格子を用いたコールマン分光光度計がある。これらの分光光度計では測定に用いる光の波長巾がせまいので、感度は大きい。フィルター光度計に比していちじるしく高価であり、かつ波長目盛の検

定など操作に多少の熟練を要する。したがって分光光度計は、フィルター光度計で測定することのできない赤外線、紫外線の吸光度の測定に多く用いられている。ビタミンA、ステロール、ある種のホルモンなどがその例である。

(4) **光度計の選択法** 可視光を用いて行う確立した方法のある定量分析には、フィルター光度計が適当である。被検液をいれる容器の厚さ、フィルターの特長、光源の安定度などを検討して、目的に合致したものをを用いるべきである。

赤外線、紫外線を用いる光度測定には水晶のプリズムを用いた分光光度計を必要とすることはいうまでもない。

(5) **濁濁度測定** 溶液の吸光度は純粹の吸収のみでなく、光の散乱にも依存する。光の散乱を測定する方法としては、透過光を測定する方法と、散乱光を測定する方法があるが、後者が遙に精度がよい。散乱光の強さは溶質の濃度のみでなく、その形や大きさにも依存するので、溶質の濃度と散乱光の強さの検量曲線をあらかじめつくっておいて定量分析に用いる。散乱光の強さは溶液が無色にみえても波長によつて異なり、短波長の光程強く散乱される。この事実と溶液が着色しているときは、その吸収を考慮して適当な波長の光を用いて散乱光の測定をするべきである。濁濁度の測定によつて、酵母、細菌などの懸濁粒子の数や大きさを決定することもできる。

(6) **螢光測定** ある種の物質は、特定の波長の光を吸収するとともに、他のきまつた波長の光を輻射する。この種の物質はいわゆる螢光物質で、螢光の強度を測定すれば該物質の濃度を決定することができる。螢光は種々の濃度の標準液の螢光と被検液の螢光の強さを目で比較する方法と、螢光の光度を光度計で測定する方法がある。螢光を発せしめるためには普通300ないし400m μ の紫外線が多く用いられ、発する螢光はおおむね可視光である。螢光の強さは螢光物質の濃度、測定波長のほかに、入射光の強さにもよるの

で、光度計を用いた蛍光計では、入射光の強さを一定にしなければならない。また光電管に対する入射光の影響を除くために、入射光線の方向から蛍光の強さを測定する。標準液の蛍光と被検液の蛍光を目で比較するばあいには標準液のかわりにウラニウムガラスや硫酸キニンのような標準蛍光を用いることがある。入射紫外線によつて蛍光物質が破壊されるばあいには、時間とともに蛍光の減少をきたすので、手早く測定するなどの注意が必要となる。ある種のビタミン、薬物、色素などは蛍光測定により定量されている。

第2章 正常値

3. 正常値

正常値は健康なる人の体液および分泌物の中にある成分の量をいう。しかしこの値は人により、かなりの範囲の動揺があるから、求めた値が正常値かどうかは他の状況を参照する必要がある。またあるものは（たとえば血液中の尿酸）動揺がはなはだしくどこまでが正常値の範囲であるかをきめ難いばあいもある。ここに掲げる表はなるたけ食物の直接影響をさけたときの値である。

第1表 正常値

全血液 100 ml につき

尿 素	20~40 mg.
非蛋白性窒素	25~40 mg.
尿 酸	大略 2~ 4 mg.
クレアチニン	1~ 4 mg.
無機磷酸塩 (Pとして)	
成人	2~ 3 mg.
小児	4~ 5 mg.
コレステリン	120~250 mg.
血 糖	60~100 mg.

塩化物 (NaCl として)	450~510 mg.
血漿	
全蛋白質	6.0~8.0 g.
アルブミン	3.4~6.0 g.
グロブリン	1.5~3.0 g.
α -グロブリン	0.5~0.7
β -グロブリン	0.7~0.9
γ -グロブリン	1.1~1.3
フィブリン	0.2~0.4 g.
ビリルビン	0.3~0.8 mg.
塩化物 (NaCl として)	560~620 mg.
ナトリウム (Na として)	325~350 mg.
CO ₂ 結合能	55~75 ml.
磷酸塩 (P として)	
エステル	1 mg.
無機	2~3 mg.
磷脂質	4~7 mg.
フォスファターゼ酸性	1~3 単位
アルカリ性	5~10 単位
血清	
カルシウム	9~11 mg.
ナトリウム	325~350 mg.
カリウム	16~20 mg.
脳脊髄液	
蛋白質	20~40 mg
グロブリン	0
塩化物 (NaCl として)	700~740 mg.
糖	60~100 mg.
尿素	15~30 mg.
カルシウム	4~5 mg.
クレアチニン	0.7~1.5 mg.
CO ₂ 結合能	56~65 ml.

第3章 全血液に関する分析操作

4. 採 血 法

耳朶または指からとるが、毛細管血をとるもつとも便利な場所は母指の爪の上部である。まず局所をエーテルまたはアルコールで消毒し、母指の附根のところに軽くゴム管またはガーゼでしばり、針でさし、母指を屈伸すると血液が出る。もし出難いときはゴム管をゆるめ、手を下にさげると出る。そこでピペットを水平に保ち血液にふれ、正確に 0.2ml の線迄吸引する。ピペットの先をふきとり、水または等張の硫酸ソーダ液を、あらかじめ入れた尖端形の 15ml 内容の遠心管に注入する。なお数回同液でピペットを洗う。

数回定量を繰り返す必要上、大量の血液をとるばあいは、肘静脈よりとり尿酸カリ（30% の液を 1 滴とり乾燥せしめる）を入れた管に入れる。

5. 尿 素

尿素は健康なる人では血液の非蛋白性-Nの約半分をしめる。腎排泄機能が悪い疾患、たとえば急性および慢性腎炎、尿毒症前立腺肥大、心臓疾患等のばあいは増加する。

原理 血液にウレアーゼを加え、尿素をアンモニアに分解し、除蛋白後ネスレル試薬を加えて、発色せしめ、これを標準塩化アンモニウム溶液を同様処理してえた色とコロリメーターを用い比色する。

かくのごとき直接ネスレル化は溶血していない血液のばあいは、なんら潤濁をおこさないが、溶血しているときは潤濁を生ずる。これはグルタシオン、エルゴチオネインなどのSH-化合物が赤血球から溶出し、水銀と不溶性化合物を生ずるためである。なお溶血のばあいは、アルギナーゼも遊離し、ウレアーゼに含まれるアルギニンに作用してアンモニアを出し、誤差を生ずることがある。