

- 8) 石黒, 堀田ら: 生化学 **33**, 716 (1961)
- 9) Matsuoka Z. and Yoshimatsu N. : Z. Physiol. Chem. **143**, 206 (1925)
- 10) Hayashi O. : Biochem. Preps. **3**, 18 (1953)
- 11) 目, 徳山: 日本化学会誌 **63**, 1945 (1942)
- 12) Warnell J. L. and Berg C. P. : J. Am. Chem. Soc. **76**, 1708 (1954)
- 13) Hashimoto. A : J. Biochem. **46**, 1393 (1959)
- 14) Crammer, J. L. : Nature **191**, 349 (1948)

石黒伊三雄, 池野武行, 林 敏広: ウサギ尿中糖の定量における  
Somogyi-Nelson 法に対する  $\text{NH}_4^+$  阻害機作について

Isao Ishiguro, Takeyuki Ikeno and Toshihiro Hayashi :  
The Inhibition Mechanism of  $\text{NH}_4^+$  and on the Determination of  
Glucose in Rabbit Urine by Somogyi-Nelson's Method

(Received October 9, 1970)

Summary

As the quantitative methods of sugar in urine and blood, Hagedorn-Jensen's, Benedict's, Fujita-Iwatake's, Somogyi-Nelson's methods are used. Because of the existence of impediment, reductive substances except sugar in urine, Somogyi-Nelson's method dose not be used for determination of sugar in urine. We investigated to clear the impediment, inhibitive mechanism of it on the Somogyi-Nelson's method, and to remove it from urine.

Ion exchange resins Dowex-50, Amberlite IRA-400 were useful to remove impediment  $\text{NH}_3$ , and reductive substances except sugar from rabbit rine.

生体内における糖代謝は、主に血糖や尿糖などを測定することによって観察されている。従来から血糖の定量は一般に Hagedorn-Jensen 法<sup>1)</sup>が用いられていたが近年 Somogyi-Nelson 法<sup>2)</sup>による比色定量が繁用され、また尿糖は Bertrand 法<sup>3)</sup>, Benedict 法<sup>4)</sup>, Fujii の法<sup>5)</sup>, Fujita-Iwatake 法など各種の方法が用いられているけれども感度、操作法の難易、再現性、共存物質の影響などが問題となり、尿中の微量定量には優れた方法とは言い難い。

著者らはウサギ尿中糖の定量実験を行っていた際、普通尿糖の定量によく用いられる Bertrand 法や Fujii の方法を用いたが、何れも微量の糖濃度の変化を観察するには感度も悪く、再現性に乏しい事から十分な目的を達することが出来なかった。そこで操作が簡便で感度がよく、再現性に富み、血糖値の定量に用いられている Somogyi-Nelson 法の応用を試みた。しかし本法を尿糖の定量に用いる場合には尿に含まれる糖以外の還元性物質など多くの妨害物質の影響により正確な値が得られず、その原因が尿に含まれる  $\text{NH}_4^+$  による影響の大きい事を認めたので、 $\text{NH}_4^+$  の妨害作用機作について検討した。その結果、尿をイオン交換樹脂で前処理することにより、 $\text{NH}_4^+$  や糖以外の還元性物質が除去され十分に目的を達する事が分ったのでこれについて述べる。

### 実験材料及び方法

#### 1) 実験材料

糖は Glucose を用い、被検尿は、ウサギ 24 時間尿をトルエン重層下に採尿したものをを用いた。

#### 2) 実験方法

Somogyi-Nelson 法による糖の定量は常法の Somogyi-Nelson 法に従って実施した。すなわち検液 1.0 ml に、アルカリ性銅試薬 2.0 ml を加え、100°C で正確に 10 分煮沸後水中で冷し、これに Nelson 試薬 2.0 ml を加え、10 分後に 520 m $\mu$  の吸光度を測定した。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の阻害についての検討は各種濃度の NH<sub>4</sub>OH を操作過程の各段階に添加して糖定量値に及ぼす影響を調べた。なお、尿中妨害物質と還元性物質の除去には陽イオン交換樹脂 Dowex-50 と陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 を用いて検討した。別に尿中の還元性物質は、酢酸ブタノールの展開溶媒で、ペーパークロマトグラフィーにより分離後アンモニア性硝酸銀反応により検出した。

### 実験結果及び考察

Somogyi-Nelson 法における糖の定量原理は、アルカリ性銅試薬中の Cu<sup>2+</sup> が加熱下で糖の還元作用により Cu<sub>2</sub>O に変化し、生成した Cu<sub>2</sub>O は Nelson 試薬中の隣モリデブン酸と反応し、安定な青色物質を形成する。この青色の 520 m $\mu$  における吸光度が Glucose の 100  $\mu$ g/ml までの濃度範囲において比例関係にあることから定量に利用される。従って本法を用いてウサギ尿中の糖定量を実施すると表 1 に示すような結果となった。即ち基準糖液 60  $\mu$ g/ml では、0.295 の吸光度に対してウサギの 20 倍稀釈尿における吸光度は、0.302 を示した。この際 20 倍稀釈尿に 60  $\mu$ g/ml Glucose 1.0 ml 添加した場合の吸光度は 0.439 で、Glucose の回収率は 65 % であった。この事は Glucose が本法操作中に尿成分により発色を阻害されるためと思われる。このように Somogyi-Nelson 法では尿糖定量時に、著しく妨害する物質が尿中に存在することが認められた。そこでウサギ尿中に存在するこの妨害物質の検索を行なった。この阻害作用は正常ウサギ尿についてみられる事より常尿成分のうち最も排泄量の多い尿素について、糖定量に対する阻害効果を見た。その結果は図 1 に示すように、糖溶液に尿素添加を 10 % まで増加させた場合の阻害は、尿素添加濃度に比例し阻害が増大した。この成績から尿中尿素量に相当する濃度では、殆んど阻害はみられなかった。従って尿中糖定量時における阻害物質は、尿素自身ではないことがわかった。しかし、実際にウサギ尿にみられる糖の阻害は、24 時間尿を用いている事より、採尿中に尿素がウレアーゼの作用でアンモニアに変化することが考えられ

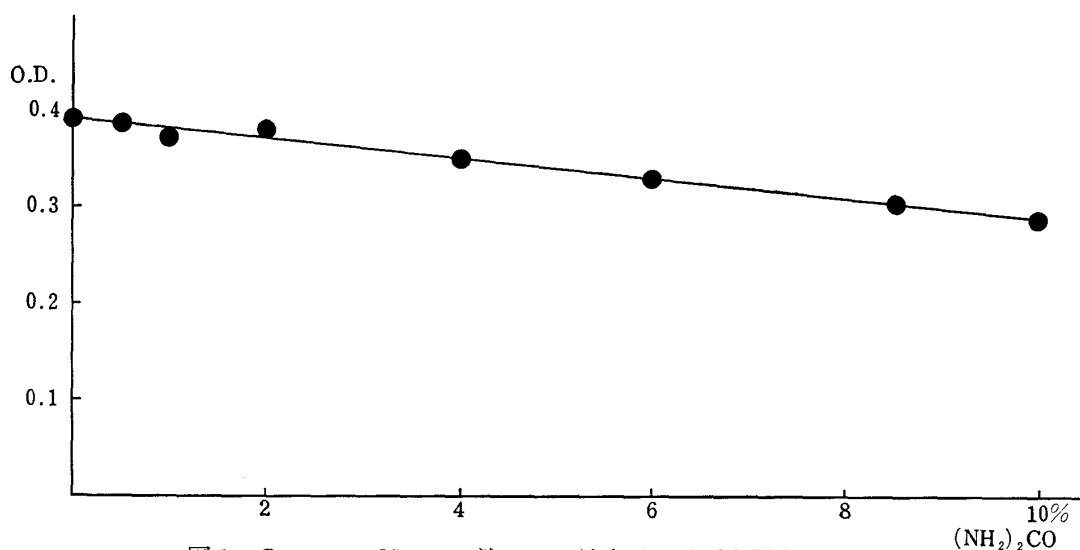


図 1 Somogyi-Nelson 法による糖定量に及ぼす尿素の影響

表1 Somogyi-Nelson 法による尿中糖定量と Glucose の回収率

	1	2	3
20倍希釈尿 (ml)	—	1.0	1.0
60μg/ml Glucose (ml)	1.0	—	1.0
H <sub>2</sub> O (ml)	1.0	1.0	—
銅 試 薬 (ml)	2.0	2.0	2.0
100°C 10分 加熱			
Nelson 試薬 (ml)	2.0	2.0	2.0
測 定 値 (OD)	0.295	0.302	0.439
回 収 率 (%)	—	—	65

表2 ウサギ新鮮尿と放置尿における添加 Glucose の回収率について

	新鮮尿	24時間 放置尿	塩酸酸性 トルエン 重層下採 尿 24時間尿	新鮮尿 + Urease
Glucose 無添加 (OD)	0.224	0.192	0.199	0.180
25μg/ml Glucose 添加 (OD)	0.374	0.252	0.383	0.206
25μg/ml Glucose のみ (O.D)	0.170	0.173	0.179	0.176
尿中 NH <sub>3</sub> 量 (mg/dl)	27	83	43	159
回 収 率 (%)	95	71	91	58

表3 Glucose に Urea 及び Urease 添加による糖の回収率について

反 応 系	(1)	(2)	(3)
20μg/ml Glucose (ml)	1.0	1.0	1.0
5% Urea (ml)	—	2.0	2.0
1 mg/ml Urease (ml)	—	—	1.0
M/50 phosphate buffer (pH 7.0) (ml)	1.0	1.0	1.0
H <sub>2</sub> O (ml)	3.0	1.0	—
室温 24 時間放置後測定			
糖 測 定 値 (OD)	0.346	0.320	0.224
回 収 率 (%)	—	92	65

表4 Somogyi-Nelson 法による糖定量時に及ぼす各種アンモニウム塩の影響

50mM アンモニウム塩	阻 害 率 (%)			
	1	2	3	平 均
ア ン モ ニ ア	42	40	45	42.3
塩化アンモニウム	40	40	48	43.7
酢酸アンモニウム	44	49	33	42.0
硫酸アンモニウム	84	82	88	85.3
クエン酸アンモニ ウム	98	100	100	98.7

測定は反応系より 1 ml 分取して実施した。

たので、新鮮尿と 24 時間放置尿及び塩酸酸性トルエン重層下に採尿した 24 時間尿について、糖添加の回収率を比較した。又糖液に 5% 尿素及びウレアーゼ添加の影響について観察し、表 2、3 に示すような結果を得た。すなわち新鮮尿に Glucose を添加した場合の糖の回収率は 95% に対して、24 時間放置尿及び新鮮尿にウレアーゼを作用させた時には回収率が悪く 71% 及び 58% であり、塩酸酸性トルエン重層下採尿の 24 時間尿では 91% と新鮮尿に近い値を示し、これらの成績は尿中 NH<sub>3</sub> 量にほぼ比例している。また Glucose 溶液に尿素及びウレアーゼ添加の影響について見ると表 3 に示すように、尿素のみ添加例では 92% の回収率を示すが、これに予めウレアーゼを添加して作用させた場合には、65% の回収率を示した。これらの結果から Somogyi-Nelson 法における尿中糖の定量に対して、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> が阻害作用を示すことがわかった。そこでアンモニア濃度変化における Somogyi-Nelson 法による糖定量の阻害効果を観察した。その成績は、図 2 に示すようにアンモニアの 50 mM までは添加濃度に比例して阻害が見られ、50 mM 以上では、阻害率に変化なかった。以上のことより、尿中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> が Somogyi-Nelson 法に著しい阻害を示すことが明らかとなったので、各種アンモニウム塩について、その阻害効果をみると、表 4 の様に 50 mM 濃度にお

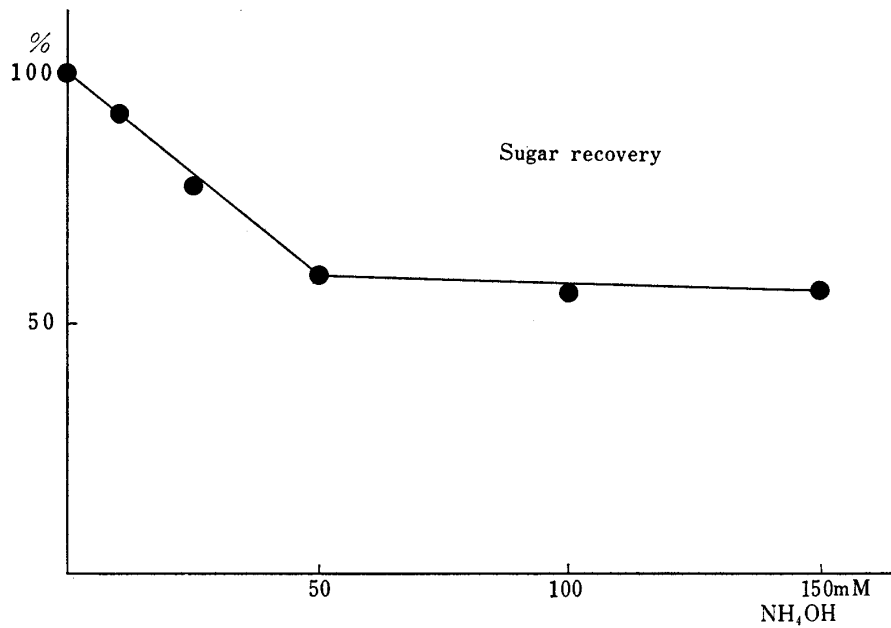


図2 Somogyi-Nelson 法による糖定量に及ぼす  $\text{NH}_4\text{OH}$  の影響

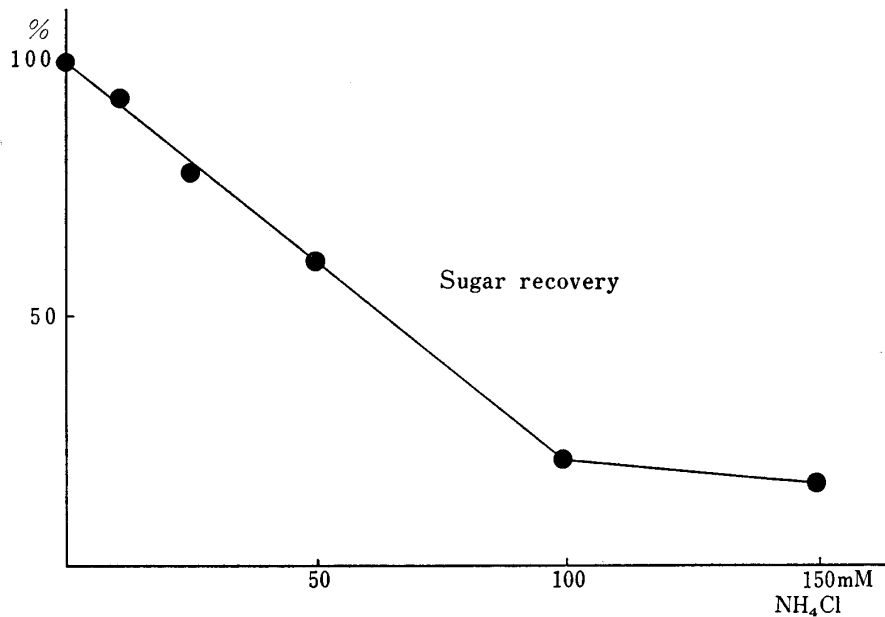


図3 Somogyi-Nelson 法による糖定量に及ぼす  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の影響

ける塩化アンモニウム、酢酸アンモニウムでは、アンモニアとほぼ同じ50%の阻害率であるのに対して、硫酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムでは85.3%及び98.7%と強い阻害率を示した。これは同じ50mM濃度のアンモニウム塩を用いたことによるもので、阻害率の違いは $\text{NH}_4^+$ 濃度によるものと思われた。しかしアンモニアでは100mM濃度における阻害も、50mMにおける阻害も、ほぼ同じ程度である事より塩化アンモニウムについて、更に、その濃度変化による阻害率を観察すると、図3のように、100mM添加まで阻害効果は比例的に増加した。

そこで、この $\text{NH}_4^+$ のSomogyi-Nelson法への阻害機作を明らかにする目的で、表5の様な各操作過程の段階に $\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加した場合の影響について、実験を行なった。即ち反応条件①をcontrolとして、② $\text{Cu}_2\text{O}$ 生成前と、③生成後及び④Nelson試薬添加後にそれぞれ $\text{NH}_4\text{Cl}$ を加えた場合、②では46%、③では16%、④では0.5

表5 Somogyi-Nelson 法による糖定量時の操作過程における  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加の影響

反 応 条 件	①	②	③	④
50 $\mu\text{g/ml}$ Glucose (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
100mM $\text{NH}_4\text{Cl}$ (ml)	—	1.0	—	—
銅 試 薬 (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0
100° C 10分 加熱				
100mM $\text{NH}_4\text{Cl}$ (ml)	—	—	1.0	—
Nelson 試薬 (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0
100mM $\text{NH}_4\text{Cl}$ (ml)	—	—	—	1.0
測 定 値 (OD)	0.378	0.204	0.317	0.376
阻 害 率 (%)	—	46	16	0.5

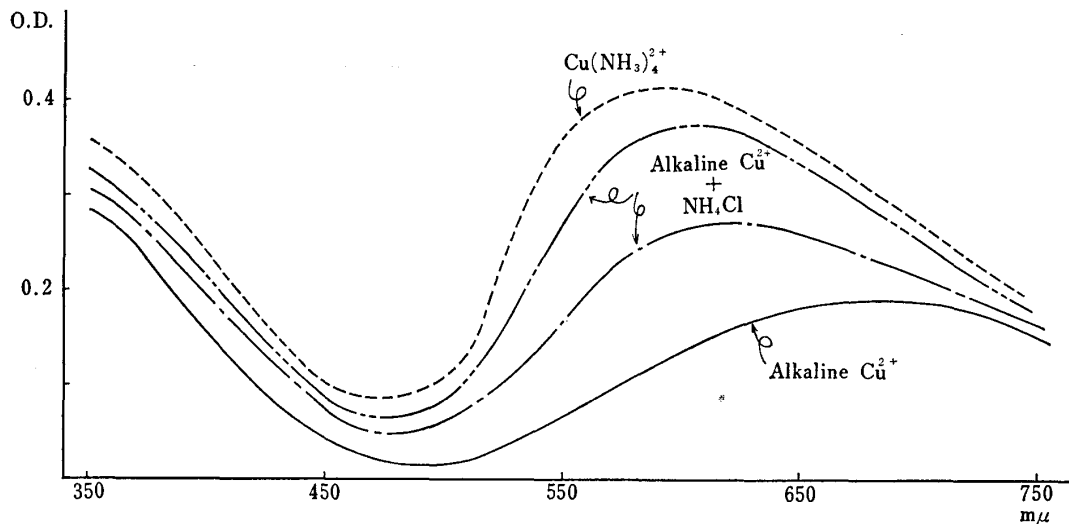


図4 アルカリ性銅試薬に及ぼす  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の影響

%の阻害率を示した。このことから、 $\text{NH}_4^+$ は  $\text{Cu}^{2+}$  が  $\text{Cu}^+$  ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) へと還元される時に著しい阻害を示しており、Nelson 試薬を加えて発色させてできた青色物質には、直接関与していないものと思われた。そしてこの事は、図4の可視部の吸収ピークが、アルカリ性銅試薬に  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を添加することにより、 $\text{Cu}^{2+}$  型から  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$  型へと移行する事からも支持されるが、アルカリ性銅試薬中の  $\text{Cu}^{2+}$  は大過剰に存在しており、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加で  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$  の生成が起り、それにより反応系中の  $\text{Cu}^{2+}$  を減少させ、共存する Glucose に対応する  $\text{Cu}^{2+}$  の不足による阻害とも考られるが、この場合はむしろ  $\text{NH}_4^+$  が、 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$  を生成させ  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+(\text{Cu}_2\text{O})$  への反応を阻害するものと思われる。そこで、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加による  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+(\text{Cu}_2\text{O})$  の過程を明らかにする目的で、60  $\mu\text{g/ml}$  Glucose を用い、加熱時間の変化に伴う生成  $\text{Cu}_2\text{O}$  量と 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加による  $\text{Cu}_2\text{O}$  生成量について観察し、図5の様な成績を得た。これによると図に示す加熱時間の範囲では、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加により著しく  $\text{Cu}_2\text{O}$  の生成が抑制されている事が明らかとなった。

このように Somogyi-Nelson 法における尿中糖の定量は、尿成分として共存する  $\text{NH}_4^+$  や糖以外の還元性物質によって妨害されることが明らかとなったので、これら物質の除去法について検討した。

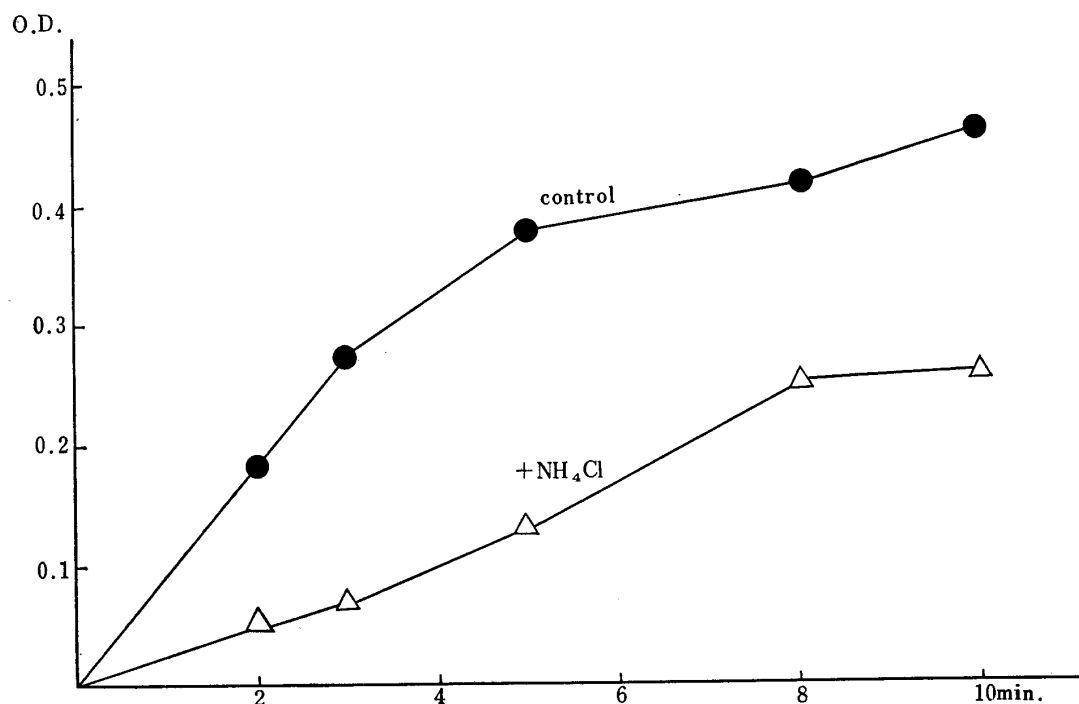


図5 Somogyi-Nelson 法における加熱時間に伴う  $\text{Cu}_2\text{O}$  の生成と  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の影響

表6 ウサギ尿及び標品グルコース, アンモニアのイオン交換樹脂処理による還元値とアンモニアの変動

	イオン交換樹脂	還元値				イオン交換樹脂	アンモニア量		
		樹脂処理前	樹脂処理後	減少率			樹脂処理前	樹脂処理後	減少率
ウサギ尿	Dowex-50	803 $\mu\text{g/ml}$	637 $\mu\text{g/ml}$	21%	ウ	Dowex-50	263 mM	0 mM	100%
	Amberlite IRA-400	803"	216"	73"	ウ	Amberlite IRA-400	263"	260"	1"
	Dowex-50 + Amberlite IRA-400	803"	62"	92"	ウ	Dowex-50 + Amberlite IRA-400	263"	0"	100"
	Dowex-50 + Amberlite IRA-400	200"	198"	1"	ウ	Dowex-50 + Amberlite IRA-400	200"	0"	100"
標品グルコース	Dowex-50 + Amberlite IRA-400	1,000"	975"	2"	標品	Dowex-50 + Amberlite IRA-400	1,000"	8"	99"
					アンモ				

実験は  $\text{NH}_4^+$  と糖以外の還元性物質を除去する目的でイオン交換クロマトグラフィーを試みた。その成績は表6に示すように 803  $\mu\text{g/ml}$  の還元性物質を含む尿を陽イオン交換樹脂 Dowex-50 で処理すると、還元性物質の殆んどは吸着されず最初の流出液に移行し、その還元値は 637  $\mu\text{g/ml}$  を示した。これを還元値からみると減少率は 21% であった。また、この場合の  $\text{NH}_3$  は 263 mM 含む尿を同様に処理して得られた流出液には全く認められず、完全に  $\text{NH}_4^+$  は Dowex-50 に吸着された。次に同一尿を陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 で処理した場合は、流出液中の還元値が 216  $\mu\text{g/ml}$  で非常に低値を示し、その減少率は 73% であった。これに対して、尿中  $\text{NH}_3$  はこの樹脂には殆んど吸着されず、大部分流出液に認められた。このように尿中の  $\text{NH}_4^+$  は Dowex-50 によって完全に吸着されるが、還元性物質の多くは Dowex-50 および Amberlite IRA-400 のそれぞれに吸着され、この場合後者の方が効果

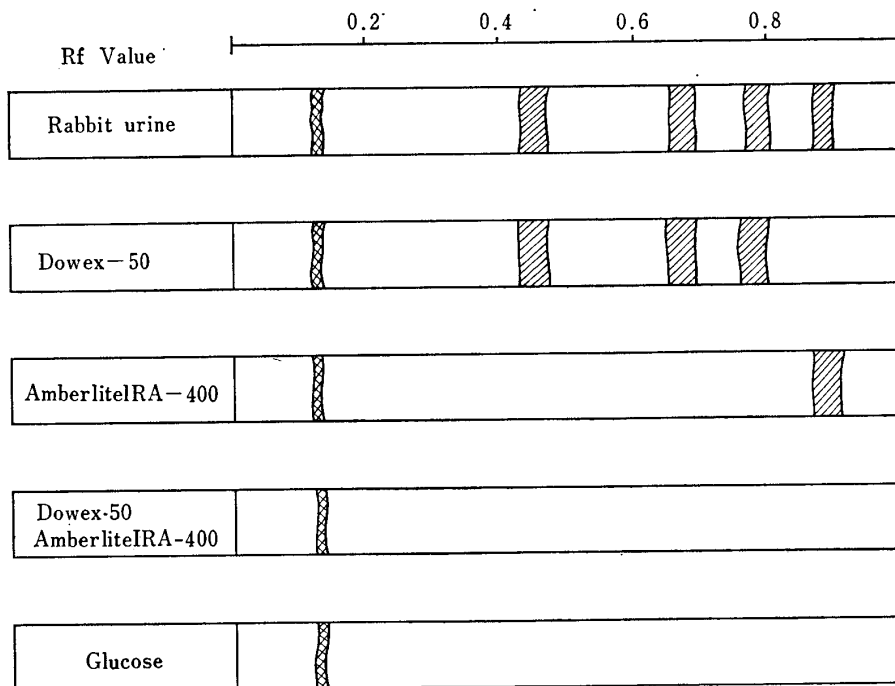


図6 イオン交換樹脂処理によるウサギ尿中還元物質のペーパークロマトグラフィーによる検出（アンモニア性硝酸銀反応による）

効果的であり、尿中還元性物質には種類の多いことを示している。従って尿中に含まれる  $\text{NH}_4^+$  と尿糖以外の還元性物質は尿を両イオン交換樹脂で処理すると可及的に除去されると思われたので、尿を Dowex-50 で処理した流出液を再び Amberlite IRA-400 で処理したものについて観察した。その成績は表中に示すように両イオン交換樹脂処理による流出液中の還元値は  $62\mu\text{g}/\text{ml}$  を示すのみとなり、還元性物質が殆んど吸着され、その減少率は 92% であった。また、この場合  $\text{NH}_3$  量は流出液中には全く吸着されないことが必要であるので、標品の Glucose と  $\text{NH}_3$  を用いて、その態度について検討した。すなわち、表6に示すように  $200\mu\text{g}/\text{ml}$  および  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度の標品 Glucose 溶液を Dowex-50 と Amberlite IRA-400 で処理した流出液中には糖が殆んど定量的に認められた。これに対して 200 mM および 1000 mM 濃度の  $\text{NH}_4\text{OH}$  は同様に処理した流出液には殆んど検出されず完全に吸着されることが分った。

以上の成績から Somogyi-Nelson 法による尿中糖定量に際して妨害する尿中  $\text{NH}_4^+$  と糖以外の還元性物質は両イオン交換樹脂によって、完全に除去され、流出液中には定量的に Glucose のみが存在すると思われる。しかし、これを更に確かめるため、尿中還元性物質をペーパークロマトグラフィーで観察し、イオン交換樹脂における態度について検討した。その成績は図6に示すように、ウサギ尿、各イオン交換樹脂による流出液を濃縮したものと標品のグルコースを、酢酸ブタノールで展開後、ペーパーをアンモニア性硝酸銀反応を行い、還元性物質の検出を行ったところ、ウサギ尿では Glucose 以外に4個の陽性スポットがみられたが、この尿を Dowex-50, AmberliteIRA-400 の両樹脂で処理すると、Glucose 単一スポットとなり、他の還元性物質を完全に除去することが明らかとなった。

### 結 語

血糖の定量に繁用される Somogyi-Nelson 法は、微量糖の定量に適しているにもかかわらず、尿中糖定量には妨害物質の影響が大きく、利用されていない。そこで、尿中糖定量に Somogyi-Nelson 法を用いた場合の阻害物質について検討し、その阻害物質の存在を明らかにするとともに、それがイオン交換樹脂により処理すると除去されることが分った。その検討成績は次のようである。

- 1) ウサギ尿を, Somogyi-Nelson 法で糖を定量すると回収率が非常に悪く, 阻害物質の存在が認められた.
- 2) Somogyi-Nelson 法で尿糖を定量する際, 阻害する物質は  $\text{NH}_4^+$  および糖以外の還元物質であった.
- 3) Somogyi-Nelson 法に対する  $\text{NH}_4^+$  の阻害は, アルカリ性銅試薬中の  $\text{Cu}^{2+}$  と錯イオンを形成し  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$  となり, 還元糖による  $\text{Cu}_2\text{O}$  の生成を抑制することが分った.
- 4) 尿中  $\text{NH}_4^+$  および糖以外の還元性物質の除去には, 陽イオン交換樹脂 Dowex-50, 陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 で処理することが有効である. この際, 共存する糖は 100% 回収された.

### 文 献

- 1) Hagedorn-Jensen : Biochem. Z. ; **137**, 92 (1923)
- 2) Somogyi M : J. Biol. Chem. **160**, 61, 69 (1945)
- 3) Benedict. F. G. : J. Am. Med. Ass. **57**, 1193, (1911)
- 4) N. Fujii, N. Akutsu : J. Biochem. **25**, 237 (1937)
- 5) A. Fujita, D. Iwatake : Biochem. Z. **242**, 43 (1931)

江田昭英, 永井博弌, 渡辺茂勝, 鈴木良雄\*, 伊藤幹雄\* :  
 ビタミン B<sub>1</sub> およびその関連化合物の薬理作用

Akihide Koda, Hiroichi Nagai, Shigekatsu Watanabe  
 Yoshio Suzuki\* and Mikio Ito\* :

The Pharmacological Actions of Vitamin B<sub>1</sub> and the Related Compounds

(Received October 10, 1970)

### Summary

Following experiments were made mainly about the effects of VB<sub>1</sub> and its related compounds on the action and synthesis of ACh.

- 1) The ACh-induced contraction of isolated ileum of guinea pigs was increased by the pre-treatment of these examined substances.
- 2) Inhibitory effect of examined substances on ChE of horse's serum was found only in a high concentration.
- 3) The formation of free and total ACh in chopped tissue of frog's brain was increased with a low concentration of examined substances. The order of intensity was as follows: TPD > TPP > VB<sub>1</sub>.
- 4) In the contraction of rat's phrenic nerve-diaphragm preparation by indirect stimulation, these substances showed a decrease seems to be a curare-like action in a concentration of  $5 \times 10^{-9}\text{M}$ , but an increase in  $10^{-8}\text{M}$ . Their potentiation for the contraction was more remarkable by the pretreatment of DFP, one of potent cholinesterase inhibitors, or in the fatigued preparation. On the other hand, the effect of these substances was somewhat or little in the contraction by

\* 名城大学薬学部薬理学教室 : Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Meijo University.