

尿及乳汁に含まれるアセトンの簡易検出法に就て

玉崎 幸二・久池井忠男

Simple Method Testifying Acetone in Urine and Milk

KOJI TAMASAKI and TADAO KUTII,

まえがき

血液、尿、乳汁中のアセトン定量法としては一般に拡散法が用いられ、尿、乳汁中のアセトン（アセト醋酸を含めて）定性法としては一般にニトロプルシッドソーダ試薬を使用する検出法が用いられている。ニトロプルシッドソーダ（爾後「ニトロ」と略称する）試薬は“S-”（例えば SH_2 ），“-SH”（例えばシステイン）のほか、アセトン、アセト醋酸の検出に用いられ、本試薬がクレアチニンにも亦呈色反応を示すことは周知の事である。「ニトロ」を用いる乳牛尿中のアセトン検出法としては Rothera 法を改良した Ross 法⁽¹⁾が主として用いられている現況である。Ross 法は尿に「ニトロ」と硫酸を混じ、更に之にアンモニアを重層し、重層面に現われる紫色の呈色反応によつて尿中アセトンの有無を判定する方法である。

今若し試薬を粉末の形状のものに改め之に尿（又は乳汁）を滴下して発現する呈色反応を以て尿中アセトンの有無を判定し得るとすれば、その検出法は非常に簡易であつて広く普遍的に応用することの出来る方法となり、此の方法は多数の乳牛の尿（又は乳汁）に対して短時間に容易に実施し得るものであると考える。

我々は乳牛の尿又は乳汁に含まれるアセトン（アセト醋酸を含めて）に対して「ニトロ」を使用し且つ前述の様な目的に適する簡易な検出法を検討し所期の目的に適した粉末試薬を調製し得たのでここに報告する。

I. 粉末試薬調製の為の実験

Ross 法は試薬として「ニトロ」、硫酸及びアンモニアを用いる。従つて硫酸と或るアルカリとを以て若しアンモニアを発生せしめ得るならば、「ニトロ」を用いる検出法にはアンモニアを試薬として用いるの必要はなくなる。しかも長期保存に適する粉末状のアルカリを使用すれば、被検体を滴下して判定し得る粉末試薬の調製も可能である。

「ニトロ」1、硫酸 50 に対し消石灰、生石灰及無水炭酸ソーダの各 50 宛を混和した 3 種の粉末試薬を調製し、各粉末試薬の約 0.1gr に対し被検尿（30mg アセトン：尿 100cc）1～2 滴を滴下し、その発色程度を判定した予備試験の成績に於て、無水炭酸ソーダを使用した

粉末試薬が 3 者の中で最も明瞭に発色したので我々は無水炭酸ソーダ、硫酸、「ニトロ」の各々の混合割合を検討し以て所期の目的に適する粉末試薬を調製することとして以下述べる様な実験を逐次実施した。

(イ) 供試硫酸

化学用薬品を使用し特に湿潤品の使用禁止に留意した。

(ロ) 供試アセトン

特級品を使用した。

(ハ) 供試無水炭酸ソーダ

化学用薬品であるが市販品を用いたのでその 1 分子は約 1/2 程度の H_2O 分子を含有していたものと実測の結果考へている。

(ニ) 供試尿

健康牝牛新鮮尿にアセトンの既知量を混和したものであり、アセトン mg：尿 dl を以て表す。

(ホ) 実 技

粉末試薬約 0.1 gr を白色板上に置きその中央部に凹部を作る。この試薬凹部に被検体である尿、又は乳汁 1～2 滴を滴下し、5 分後に於て赤紫色の発色程度を観察した。

1) 無水炭酸ソーダと硫酸との混合比率の検討

「ニトロ」1 に対し両試薬の各種比率混合物 100 を混じて粉末試薬とした。アセトン 30 mg/dl 尿を以て検査した成績は第 1 表の如く、無水炭酸ソーダ：硫酸が 40：60 を中心とした両者の混合物が最も明瞭な呈色反応を示した。

第 1 表 無水炭酸ソーダと硫酸との混合比率の検討
（「ニトロ」1% アセトン 30 mg/dl 加尿使用）

無水炭酸 ソーダ：硫酸	0:10	1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1	10:0
反 応 度	-	±	+	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-

2) 「ニトロ」の混合割合の検討

無水炭酸ソーダ 40：硫酸 60 の混合物に「ニトロ」を 2～0.05 の割合に混合した各種の粉末試薬を製し、アセトンの各種濃度の被検尿を滴下した結果は第 2 表の如く 0.1 附近が最も明瞭に発色し且つアセトンの各種濃度を判別し得た。

第2表 「ニトロ」の量の検討

アセトン 加尿 ニトロ%	200	100	50	30	10	5	0
2.0	卍	卍	卍	卍	+	±	褐
1.0	卍	卍	卍	卍	+	±	褐
0.75	卍	卍	卍	卍	+	±	褐
0.50	卍	卍	卍	卍	±	干	褐
0.30	卍	卍	卍	卍	±	干	黄
0.20	卍	卍	卍	卍	±	干	-
0.175	卍	卍	卍	卍	±	干	-
0.150	卍	卍	卍	卍	±	干	-
0.125	卍	卍	卍	卍	±	干	-
0.100	卍	卍	卍	卍	±	干	-
0.075	卍	卍	卍	卍	±	干	-
0.050	卍	卍	卍	卍	±	干	-

内はアセトン濃度の判別困難である

3) 「ニトロ」 0.1 の場合に於ける無水炭酸ソーダと硫酸との割合の再検討

「ニトロ」 0.1 の場合に無水炭酸ソーダと硫酸との割合を再検討するため両者を各種割合に混合し、この混合物 100 に「ニトロ」 0.1 を加えて粉末試薬を調製し実験した結果は第3表の如く、無水炭酸ソーダ 40、硫酸 60 の割合の混合物が最も鮮明に呈色し、尿中アセトンの濃度の判定もこの場合の混合物に於て最も容易であつた。

第3表 「ニトロ」 0.1 の場合の無水炭酸ソーダと硫酸の比の再検討

無水炭酸 ソーダ : 硫酸	2 : 8	3 : 7	4 : 6	5 : 5	6 : 4
アセトン加尿					
10	-	干	±	干	-
30	干	±	卍	±	干
50	±	+	卍	卍	+
100	+	卍	卍	卍	+

4) 小括

以上の実験に基き、粉末試薬に尿を滴下して尿中アセトンを検出する方法に於ては、「ニトロ」 0.1、無水炭酸ソーダ 40、硫酸 60 を混合して調製した粉末試薬は目的に適するものと認めた。しかし本試薬の紫色の呈色程度の符号と供試健康牡牛新鮮尿に添加したアセトン量との関係は第2表及び第3表により5分後の判定の場合

干 5mg/dl附近、± 10mg/dl附近、+ 10mg/dl以上、卍 30mg/dl以上、卍 100mg/dl以上

と考えることが出来る。尙呈色の持続時間は約 30 分以上であつた。又乳汁に於ける紫色反応は尿色による障害なきため呈色の判定はむしろ尿の場合に比し容易であ

る。本試薬は、血液を被検体とする場合には血液の色により呈色反応不明瞭であるため、血液の検査には使用不能である。

II. 粉末試薬と他のアセトン検出法との比較検討

1) 梅津氏考案による拡散比色計による方法との比較検討

梅津氏考案によるサルチルアルデヒドを使用する拡散比色計⁽²⁾を用い新鮮牛乳尿中のフリーアセトン量を測定し、本試薬との成績を比較した成績は第4表の如く、±以上は概ね相関した。

第4表 尿中フリーアセトン量と本試薬との比較

フリーアセ トン量	0.00	0.31	0.51	1.01	2.01	3.01	5.01	計
本試薬	0.30	0.50	1.00	2.00	3.00	5.00	以上	
-	18	2						20
干	11		1					12
±	1	5						6
+		2	7					9
卍			2	8				10
卍					3		3	6
計	30	9	10	8	3		3	63

2) Thin and Robertson 氏⁽³⁾による拡散法との比較検討

Thin and Robertson 法に依る拡散法によつて尿、乳汁並に血液のアセトン・アセト醋酸・βヒドロキシ酪酸を定量した。その方法の概略は次の通りである。

イ) アセトンの場合

被検体を硫酸酸性としアセトンを拡散せしめた。

ロ) アセトン及アセト醋酸の合計

被検体に硫酸を混じ、加熱してアセトン化したものを拡散せしめた。

ハ) 三者の合計

被検体に硫酸及重クロム酸カリを加え、加熱してアセトン化したものを拡散せしめた。

ニ) 比色法

拡散せしめたアセトンをアルカリ性サルチルアルデヒドに吸収せしめ、その色調を光電比色計で比色定量した。

その結果は第5表の通りである。即ち本試薬符号陰性(-)尿は概ね尿中アセトン・アセト醋酸小計 1.0 mg/dl 以下を示し、符号卍尿は 20 mg/dl 尿以上を示す様であり、乳汁中アセトン・アセト醋酸小計 1.0 mg/dl 乳も亦本試薬に陰性を示す様である。又尿及乳陰性は多くとも血中アセトン 1.0mg/dl 以下、血中アセトン体 20 mg/dl 以下である様である。

第5表 本試薬反応とアセトン体量との比較

牛番号	尿						乳					血液					
	本試薬	アセトン体					本試薬	アセトン体					アセトン体				
		A	AA	小計	B	合計		A	AA	小計	B	合計	A	AA	小計	B	合計
1	卅	23.3	29.0	52.3	22.2	74.5	±	5.0	0.8	5.8	74.6	80.4	6.3	0.7	7.0	41.7	48.7
2	卅	2.7	19.5	22.2	40.4	62.6	干	1.8	0.1	1.9	69.7	71.6	3.0	1.9	4.9	49.2	54.1
3	+	0.7	0.4	1.1	8.2	9.3	-	0.5	0.1	0.6	38.6	39.2	0.7	2.2	2.9	51.0	53.9
4	干	0.9	0.2	1.1	9.3	10.4	-	0.5	0.4	0.9	22.9	23.8	0.7	3.6	4.3	6.5	10.8
5	-	0.3	0.4	0.7	5.2	5.9	-	0.2	0.2	0.4	69.1	69.5	1.0	0.5	1.5	7.3	8.8
6	-	0.5	0.2	0.7	3.1	3.8	-	0.1	0.1	0.2	14.4	14.6	0.8	0.5	1.3	17.9	19.2
7	-	0.2	0.1	0.3	2.6	2.9	-	0.1	0.1	0.2	17.5	17.7	0.3	0.3	0.6	11.6	12.2
8	-	0.3	0.1	0.4	8.4	8.8	-	0.1	0.1	0.2	13.0	13.2	0.5	0.6	1.1	7.3	8.4
9	-	0.4	痕跡	0.4	8.8	9.2	-	0.1	0.1	0.2	6.3	6.5	0.2	0.3	0.5	5.2	5.7
10	-	0.3	痕跡	0.3	2.2	2.5	-						0.3	痕跡	0.3	5.9	6.2

A アセトン, AA アセト酢酸, B βヒドロキシ酪酸

3) Ross 法との比較検討

Ross 法との比較は第6表の如くである。しかし土, 干, -, の判定は Ross 法では尿色その他にて相当困難であつたが本試薬ではその判定が容易であるという便利な点が認められた。

第6表 Ross 法と本試薬との比較

Ross 本試薬	-	干	±	+	卅	計	
-	12	14				26	
干	3	9	2			14	
±		2	6	1		9	
+				10	1	11	
卅					9	9	
計	15	25	8	11	10	5	74

III. 総括

1. 以下述べる方法は尿又は乳汁中のアセトン検出法として応用し得る方法であつてその操作は頗る簡易である。

イ) 粉末試薬はニトロプルシッドソーダ 0.1, 無水炭酸ソーダ 40, 硫酸 60 の混合薬とする。

ロ) 粉末試薬約 0.1gr に尿 (又は乳汁) 1~2 滴を試薬が全般的に均等に湿潤する程度に滴下する。実際実施の場合には試薬を直径 3~4mm の小匙を以て, 白色板上に盛り, 之に小匙の底部を以て凹部を作る。検尿または乳汁の 1~2 滴を試薬の凹部に静かに滴下する。

ハ) 5 分後の紫色の呈色反応により判定する場合の符号と滴下する被検体中のアセトン量との関係は

干 5mg/dl 附近, ± 10mg/dl 附近, + 10mg/dl 以上,

卅 30mg/dl 以上, 卅 100mg/dl 以上 である。但し被検尿中のアセトン量とは健康乳牛新鮮尿中に加えられたアセトン量のことである。

2) 本試薬の使用実施には, クレアチニン 50mg : 健康尿 dl, 300mg : 水 dl は陰性を, 500mg : 水 dl は干程度を, 1000mg : 水 dl は+程度を示す。即ち尿及乳汁に対する本検出法の実施に当つてはクレアチニンの存在は大きな障害を及ぼさないものと推量される。

3) 尿中アセトン量は保存経過によつて漸減するため本試薬の反応実施には新鮮尿の使用がのぞましい。然し採尿後 2 日後迄はその尿の示す反応は新鮮尿の反応に大差がない。又採尿後 10 日以後に於ても採尿時の反応の陽性或は陰性の区別のみの判定は可能である場合もある様である。

保存試験: 中試験管に尿を入れゴム栓をなし, 3~4 月の候, 室温 (茨城県阿見町, 最低 4°C 最高 10°C) に放置し, 本試薬にて測定した結果は第7表の如く, 採尿後約 2 日間 (採尿日を入れて 3 日目) には著しいアセト

第7表 尿の保存中に於けるアセトン体の含量の変化

経過 尿 番号	採尿時	2 日	4 日	6 日	8 日	10 日	12 日	14 日
1	卅	卅	+	+	+			
2	卅	卅	卅	卅	卅			
3	干	-	-	-	-			
4	+	+	±	±	±			
5	卅				卅	±	±	
6	卅				+	干	干	
7	卅							干
8	±							-
9	卅							±

ンの変動を認めなかつたが、それ以後には減少し、10日前後で本試薬に対する反応卅より土以下になつた。

4) 健康乳牛尿にアセトンを加えて試験した結果に基づき定めた本試薬の陰性符号(-)は概ねアセトン量 5mg/dl以下を示すものであるが、自然乳牛尿例に於てはアセトン・アセト醋酸計 1mg/dl以下を示すものの如くに考えられ、健康乳牛尿にアセトン 100mg/dl以上を加えた尿の示す本試薬の符号である卅は自然尿例ではアセトン・アセト醋酸計 20 mg/dl以上を示すものの如くである。又尿、乳の符号陰性のものの血中アセトンは多くとも約 1mg/dl以下、総トセトン体は 20mg/dl以下の様である。

5) 以上の成績から考察して、乳牛の尿及乳汁中のア

セトン(アセト醋酸を含めて)の簡易な本検出法は乳牛のケトーシスの1診断法として実用化の価値あるものと考えらる。

摺筆するに当り本研究費の一部は文部省科学研究費の援助によるものであることを附記し、併せて茲に謝意を表します。

引用文献

- 1) Kolmer J. A. et. al.: Approved Laboratory Technic 5th Ed, 158 (1951).
- 2) 船鉄医療機器製作所: 梅津式拡散比色計使用法.
- 3) Thin C. and A. Robertson: Biochem J., 52, 218 (1952).

Summary

We prepared the powder-reagent which could be easily used for a simple method testifying acetone in urine and milk of dairy cows.

Constituents of the powder-reagent: Sodium Nitroprusside 0.1, Sodium Carbonate Anhydrous 40, Ammonium Sulfate 60.

Technic: Put on a white plate ca. 0.1 gr of the reagent using a small Spoon (3~4 mm in diameter), and then make a concave part at the centre of the reagent by this spoon's bootom. Drop 1~2 drops of urine(or milk) into the concave part. Observe the violet color reaction after 5 minutes.