

鉤虫症における鉄出納に関する研究

(1) 尿内鉄定量法と尿内鉄分布形式

久津見 晴彦

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和35年5月20日受領)

まえがき

鉤虫症の著明な臨床症状は貧血であり、これは小腸壁に咬着する鉤虫が断えず吸血しているためとみられ、鉤虫のこのような習性により人体側の症状が失血に基く貧血、又は代謝産物による障害であろうということは既に知られているところである(小宮, 1956)。

著者らは鉤虫 Carrier の臨床研究により貧血を中心とした各種症状の出現を寄生虫数、寄生虫種などから検討してきたが、貧血に関する面では Carrier の血色素量は寄生虫数の増加に伴って低下することを認めた。しかしまた寄生虫数のみでは血色素量の変動を説明出来ない場合があり、これに対しては臨床的検査成績の解析により人体側における造血機能の増減、即ち貧血に対する抵抗力の存在を認めるに至った(石崎ら, 1959)。

一方、一般農村住民(鉤虫非感染者)の血色素量の測定を、鉤虫 Carrier の調査と同時にこなつたところ、血色素量が低下しているものの存在が認められた。これは鉤虫寄生者の中には鉤虫感染以前にすでに貧血状態に陥つていものがあることを示すものであろう(荻野, 1958)。鉤虫寄生者の貧血はこのような内因的或いは外因的な種々の要因により発現するものであり、その変動については未だ完全に明らかにされているとは言えない。

そこでこれらの問題をさらに明らかにするため、現在のところ鉤虫寄生者の尿内における出血量の測定と、同時に生体の鉄出納の測定を行なうことが最も必要であろうと考え、今回は生体における鉄出納をとりあげ、これを定量的に測定することにより、他の要因との関連を追求することにした。ここでは鉄出納を尿内鉄量によって求めるために尿内鉄定量法を考案し、あわせて尿内鉄の分布形式を検討したので報告する。

尿内鉄定量法

1. 尿材料及び灰化法

尿材料は清浄な紙製又はガラス製シャーレに採り鉄の

混入がないように保存し、灰化を行なうまで次の準備をした。まづ尿を攪拌することなく少量を妻楊子で30~50枚のカバーガラス上にのせ、夫々の重量を計つてから乾燥器に収めて約3日間乾燥する。尿は水分蒸発で $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{2}$ に減量するので、乾燥後の重量を計つて乾燥重量と水分含量を求める。定量には主としてこのような乾燥尿を使つたが、乾燥しない原材料を使用した場合との比較には、上記水分含量によつて換算した。

灰化法は磁製ルツボ内で焼く乾性灰化と、硫酸・過酸化水素による湿性灰化の2方法を行なつた。乾性灰化はルツボ内に入れた尿を弱火で煙の出なくなるまで熱し、それから蓋をしてブンゼン焰前端をルツボの底にあて強火で30分~2時間加熱した。加熱が済んだものは室温におき内容を6N塩酸に溶解し24時間放置、更に沸騰水上で1時間加熱して鉄の抽出を行なつた。

湿性灰化は予め6N硫酸2mlを入れた中試験管に尿を入れ、突沸を防ぐためにガラス球1コを入れてバーナー焰で管底を熱する。黒焰が出なくなつてから15分毎に過酸化水素液0.5mlを加え、過酸化水素液は合計2ml加える。以上のようにして灰化、抽出を行ない、何れも室温に放置して冷却し蒸溜水で総量10mlとし、この一部(この実験では2ml)を比色定量に用いた。

2. 発色試薬及び呈色法

鉄発色用試薬はNRME(O-nitroso-resorcin monomethyl ether, 鳥居, 1955)を用いた。これは若干の金属と着色化合物を作る。コバルト、3価鉄、パラジウムとは有機溶媒に移行する錯化合物を作り、2価鉄、ニッケル、銅とは有機溶媒に移行しない水溶性錯塩を作る。これらの呈色錯塩のうち2価鉄は緑色を呈する唯一のもので、波長360 μ m, 285 μ m, 700 μ mに最大吸収を有する。これは700 μ mにおいてLambert-Beerの法則に従い、共存するイオンの影響を受けることは極めて少ない。現在まで血清鉄を測定して良い結果を得ているので

尿内鉄に際してもこれを使用した。

呈色法は鳥居原法を若干改変し、以下の順序で行なつた。

- 1) 鉄抽出液 2.0 ml
- 2) 10% 塩酸ヒドロキシルアミン水溶液
0.5 ml 60分放置(溶解直後使用)
- 3) 1% パラニトロフェノール水溶液 1滴
- 4) 6 N アンモニア水 黄色まで
- 5) 醋酸・醋酸ソーダ緩衝液 (pH 4.5) 2.0 ml
(醋酸ソーダ 33.5 g を 200 ml の水に溶解し濾過する。27.2 ml の醋酸を加えて水で 250 ml とする)
- 6) NRME 飽和水溶液 1.0 ml 60分放置
(水 100 ml に 40.2 mg とける。濾過して使用する。20°C 以下で数週間保存出来る)
- 7) 水を加えて 10.0 ml とする。

測定は日立光度計 FPO-B 型、波長 660 m μ 、層厚 16 mm にて行なつた。検量線は鉄標準液(第一製薬, 1cc = 1mg) を 0~20 μ g とつて以上の方法で測定し、Beer の法測に従うことを確かめた。

なおこのほか呈色法の精度の比較のために、従来から広く使用されている α - α' -dipyridyl と O-phenanthroline を用いた。前者は中和後 0.5M 亜硫酸ソーダ 1.0 ml, dipyridyl 0.2% 1M クエン酸溶液 2.0 ml, 100°C 15分加熱、冷却後 520 m μ で測定する。後者は中和後、O-phenanthroline 0.1% 2M 醋酸・醋酸ソーダ緩衝液 1.0 ml, 更に 2% 塩酸ヒドロキシルアミン液 0.5 ml を加え 37°C に 1夜置いて 500 m μ で測定する。

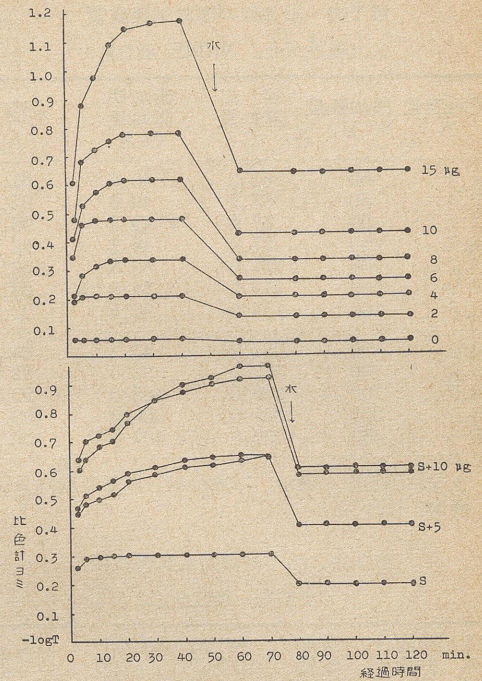
3. 実験成績

上述の方法により尿内鉄の定量を行ない、次のような結果を得た。

1) 灰化及び抽出時間

同一材料から得た等量の尿について灰化時間、抽出時間の差による発色値を比較してみると次の如くである。乾性灰化では灰化時間を 15分~2時間とすると発色値は次第に増加するが、60~90分で最も高くその間に殆んど差を認めない。従つて乾性灰化では 90分加熱として実験を行なつた。又この場合灰化後 6N 塩酸に溶解して 24時間放置したが、更に 100°C 1時間加熱した場合は加熱しない場合に比して発色値は高くなつた。しかし 30分加熱と 1時間加熱では差を認めなかつたので 1時間加熱することにした。

湿性灰化においては硫酸・過酸化水素液で加熱すると



第1図 NRME による発色の時間的経過
上：鉄標準液、下：Sample(s)+鉄標準液

約1時間で完全に灰化・抽出が行なわれる。これらは以下の添加鉄回収試験の結果と考え合わせて検討した結果に基くものである。

2) 呈色の時間的変動

塩酸又は硫酸による抽出後、上記方法の項に示すごとく NRME 試薬を加え、鉄を緑色錯塩として呈色させることが必要である。しかし NRME を加えた直後から呈色は時間的に変動するので、これを追究してみたのが第1図(上)である。

これによると鉄を含まない blank は NRME を加えると瞬間的に発色し、その後色の变化は認められない。一方鉄標準液では鉄量の増加に伴つて完全発色までの時間は延長し、最高濃度 15 μ g の場合 30~40分で一定となる。尿内鉄抽出液に既知量の鉄標準液を加えた場合は、第1図(下)の如く 60~70分で完全発色する。

以上の結果から NRME による鉄呈色には鉄量の多い場合を考慮し、完全発色のために 60分放置しその後測定した。ただしこれらは NRME 添加後の変動であつて、測定に当つては液量を一定するため水を加えて 10.0 ml とするが、図に見られるように各濃度の相互関係は水を加えた後も変化せず、24時間後に至つても変ら

第1表 添加鉄の回収試験成績
(乾性灰化, NRME 発色)

尿内鉄量 A	添加鉄量 B	検出 総鉄量 C	添加鉄 回収量 C-A	回収率 %
21.0	50	61.5	40.5	81.0
19.4	50	65.7	46.3	92.3
17.7	50	67.0	49.3	98.6
20.7	50	67.0	46.3	92.0
24.7	100	107.0	82.3	82.3
27.0	100	111.5	84.5	84.5
21.5	100	114.0	92.5	92.0
<hr/>				
15.0	50	57.2	42.2	84.4
15.0	100	107.0	92.0	92.0
15.0	200	200.0	185.0	92.5
15.0	300	321.0	306.0	100.2
15.0	400	422.0	407.0	100.2

上段は個別尿を使用, 下段は同一尿を脱脂均分
使用, 単位 μg

第2表 添加鉄の回収試験成績
(発色剤別, 乾性灰化)

発色 剤	尿内 鉄量 A	添加 鉄量 B	検出 総鉄量 C	添加鉄 回収量 C-A	回収率 %	
NRME	5.0	10.0	15.0	10.0	100	
	5.0	10.0	15.0	10.0	100	
	5.0	10.0	15.0	10.0	100	
	5.0	10.0	15.0	10.0	100	
	3.7	5.0	8.7	5.0	100	
	3.7	5.0	8.8	5.1	102	
	3.7	10.0	14.0	10.3	103	
	3.7	10.0	14.0	10.3	103	
	α - α' -dipyridyl	6.0	5.0	11.6	5.6	112
		6.3	5.0	11.3	5.0	100
8.8		5.0	13.8	5.0	100	
9.5		5.0	14.2	4.6	92	
10.4		5.0	15.2	4.8	96	
8.2		5.0	13.8	5.6	112	
8.2		5.0	13.5	5.3	106	
8.2		5.0	13.5	5.3	106	
8.2	10.0	19.0	10.8	108		
8.2	10.0	19.0	10.8	108		
8.2	10.0	19.0	10.8	108		

dipyridyl 上段のみ個別尿, 他は均分尿使用,
単位 μg

ない. 従つて NRME を加えてから 60 分間発色させ,
水を加えて 10.0 ml としてから直ちに測定した.

3) 添加鉄回収試験

以上の如く鉄定量に個々の条件を規定したが, 定量法
の精度の検討のため灰化前の尿に一定量の鉄標準液を添
加し回収率を調べた.

同一の尿を等分割し, これに鉄標準液を添加したもの

第3表 湿性灰化による添加鉄回収試験成績
(NRME 発色, 単位 μg)

実 測 値			理 論 値		添加 鉄回 収率	
尿 単独 A	鉄 単独 B	尿鉄 混合 C	尿鉄 混合 D	鉄回 収量 E		
26.2	9.5	35.8	35.7	9.5	100	
26.8	9.5	35.8	36.3	9.5	100	
26.0	9.5	35.8	35.5	9.5	100	
26.2	9.5	35.6	35.7	9.3	98	
26.2	9.5	35.6	35.7	9.3	98	
<hr/>						
平均	26.3	9.5	35.7	35.8	9.4	99

実測値 A,B,C はそれぞれ別に測定, 理論値 Dは実
測値 A+Bであり理論値 Eは実測値 Cの値からAの
平均値を引いたものである.

と無添加のものを作り, 上記の方法で灰化, 抽出, 発色
を行ない, 両者を比較して回収率を求めた. まづ乾性灰
化法では無乾燥の尿各 mg に鉄標準液を 50 μg , 100 μg
加えたもの, 等分割した尿に 50~400 μg 加えたものを
作り乾燥して用いた. 第1表に示すようにその鉄回収率
はそれぞれ 81.0~98.6%, 84.4~100.2%となった.

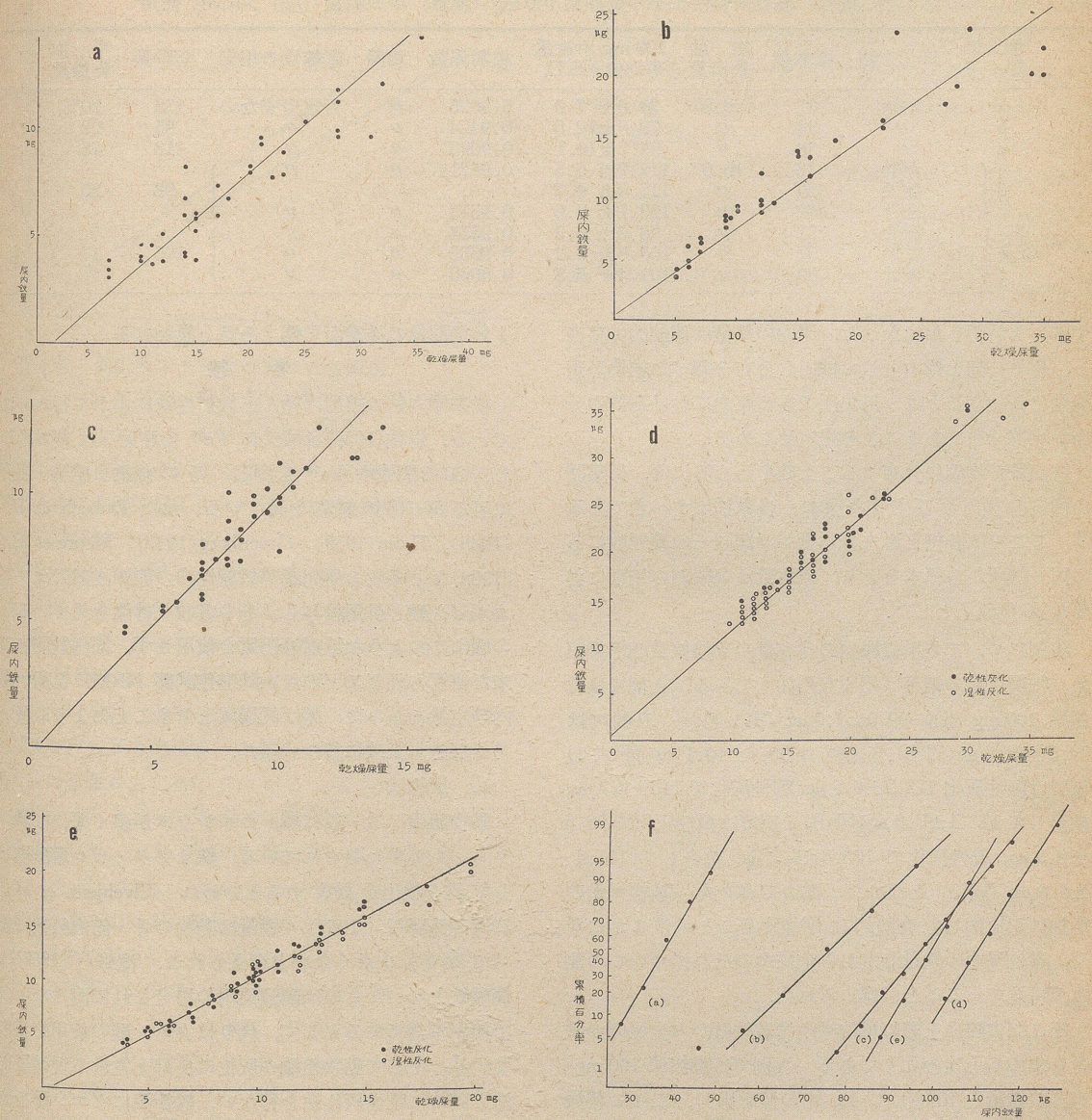
一方これとは別に灰化抽出を既に行なつたものを2分
し, 鉄無添加を対照とし, 他に 5~10 μg を添加した場
合の回収率を見ると, 第2表に示す如く NRME では
100.0~100.3%, α - α' -dipyridyl では 93.0~112.0%で
あつた.

以上の如き実験から NRME の場合をみると分る通
り, 添加後に灰化・抽出・発色を行なつた場合と添加後
に発色だけを行なつた場合について比較すると, 前者に
若干の回収率の減少が認められ, 灰化・抽出の操作がこ
れの原因とみられる結果が得られた.

湿性灰化法では, 予め硫酸中で尿を少し加熱して均
一な尿液とし, これから尿単独, 鉄標準液単独, 尿と鉄標
準液混合物を準備し, すべて同一条件の湿性灰化, 抽
出, 発色の操作を行つて, それぞれの値を調べた(第3
表). その結果, 尿平均 26.3 μg , 鉄標準液 9.5 μg (以
上の混合物の理論値は 35.8 μg となる), 実際の尿と鉄標
準液混合物では平均 35.8 μg となり, この値から明らか
なように尿と鉄標準液混合物の値は計算上両者を混合し
た値によく一致した. 即ちこの時の鉄標準液の回収率は
98.0~100.0%, 平均 99.0%であつた.

正常人尿内鉄量

上述の尿内含有鉄定量法により, 次の如く正常人(鉤
虫非感染者)の尿内鉄量とその分布形式を調べた. 用い



第2図 (a)~(e)は乾燥尿内鉄量測定値との関係、(f)は各例における尿内鉄量(尿 100 mg 単位)の正規確率紙上における累積百分率

尿は清浄カバーガラス上で乾燥した後、乾性灰化法、湿性灰化法により灰化し、抽出、発色を行ない鉄含有量を測定した。乾燥尿は予め 5~40 mg となるように作っておき、これら同一尿の各量と含有鉄量との関係を調べた。その結果は第2図(a)~(e)に示すように、縦軸に鉄量 mg、横軸に乾燥尿量 mg をとると両者の関係は正相関を示し、尿量の増加に伴い含有鉄量が直線的に増加した。

次にこれらの測定値を尿 100 mg 当りの量に換算すると、これは理論的に乾燥尿 100 mg 中の鉄量となり、尿内鉄量分布を 100 mg 単位で調べたことになる。そこで個々の例について換算によつて 100 mg 中の鉄量を求め累積百分率を出して正規確率紙上にプロットしてみた。その結果は第2図(f)に示す如く、各例とも一直線上にのることが認められ、即ち単位尿内の鉄量は正規分布を

第4表 乾性、湿性灰化法による乾燥尿 100 mg (換算) 中の鉄量 (μg) NRME 使用

第2図 記号	灰化方法	標本数	塩酸 抽出量	100 mg 中鉄量 平均値+S.D.	相関係数	相関	直線性の検定	全尿量	平均 乾燥量
a	乾性	37	6.0	39.0 \pm 7.0	0.9025	有	否定出来ない	135	20%
b	"	34	"	79.5 \pm 12.5	0.9424	"	"	95	22
c	"	38	"	99.7 \pm 10.1	0.9093	"	"	113	18
d	湿性	42	10.0	112.2 \pm 6.5	0.9621	"	"	98	20
	乾性	20	"	115.0 \pm 9.2	"	"	"		
	合計	62	"	113.1 \pm 7.6	0.9513	"	"		
e	湿性	32	"	98.6 \pm 6.3	0.9574	"	"	105	17
	乾性	37	"	103.8 \pm 6.2	0.9555	"	"		
	合計	69	"	101.4 \pm 6.8	0.9660	"	"		

することが明らかになった。尿内の鉄量は連続的に存在し、その一部を標本として抽出し分布を調べた結果が正規型であったことは、母集団である尿内における鉄の分布が均等分布であることを推定せしめる。

尿内鉄が均等に分布すること確かめるには、母集団の性質の検討及び無作為標本を多数抽出すべきであるが、ここでは各例とも水分含量がほぼ同一の範囲内にある同一個所から標本をとり、標本数は少数例の処理に必要な30例以上とした。

各例についての単位尿内の含有量の平均値及び標準誤差、相関係数の結果は第4表の如くである。A例では乾燥尿 100 mg 当り 39.0 \pm 7.0 μg (第2図 a), B例では 79.5 \pm 12.5 μg (同 b), C例では 99.7 \pm 10.1 μg (同 c), D例では湿性灰化 112.2 \pm 6.5 μg , 乾性灰化で 115 \pm 9.2 μg , 総合して 113.1 \pm 7.6 μg (同 d), E例では湿性灰化で 98.6 \pm 6.3 μg , 乾性灰化で 103.8 \pm 6.2 μg , 総合して 101.4 \pm 6.8 μg (同 e) となった。従つて尿内鉄は被検尿量の増加に正比例して直線的に増加することが明らかになり、単位尿内の鉄量測定から全尿内のそれについての測定が可能であることが認められた。

そこで実際に上記の単位尿内含有鉄量から全尿内の鉄量を求めると次の如くである。A例では乾燥尿 100 mg 当りの鉄量を10倍して 1 g 中の値を出し、これに乾燥全尿量を乗ずればよく、 $39.5 \times 10 \times \frac{20}{100} \times 135 = 10665$ (μg), 即ち 10.7 mg となる。同様にして b 例では 16.6 mg, c 例では 20.1 mg, d 例では 22.0 mg, e 例では 18.0 mg となった。ここに得られた値をみるに、我が国における1日摂取鉄量といわれる 10 mg 前後と比較して a 例は等しく他はこれより若干高い値を示している。

そこで b~e 例について調べたところ総合ビタミン剤 1錠を内服(鉄量公称 5 mg)であり、従つて何れも1日摂取鉄のうち尿内に排泄されたそれを測定したと考えられ。このような方法により1日排泄尿内の鉄量ひいては

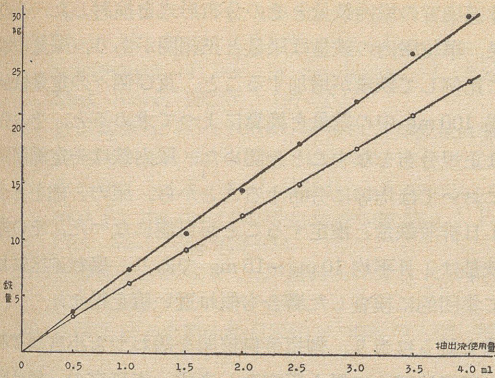
1日摂取量の推定が可能であると思われる。

考 按

従来尿内鉄の検討は殆んど放射性鉄によつて行なわれている。岩城(1956)は成犬に Fe^{59} を注射又は経口投与し、30日間尿内 Fe^{59} を測定、その後虫感染・駆虫に至る56日間の推移を見ている。また Dubach *et al.* (1946), Hahn (1939), Greenberg (1943), Moore *et al.* (1958) など多数の研究者が放射性鉄の静脈注射又はアスコルビン酸と併用投与し、その吸収・排泄を見ている。今回はこのような放射性物質を使用せず、尿内鉄測定に未だ使用されたことのない鉄発色試薬 NRME を用い尿内鉄定量を試みた。尿は乾燥尿とすることにより取扱い易く秤量も正確に行ない得た。

1. 灰化法

動物組織には一般に燐、カルシウムが多く尿には燐、クロールが多いとされている。燐はメタ・ピロ燐酸塩として鉄の検出を妨害するといわれ (Elvehjem *et al.*, 1927; 滝野ら, 1957), 燐量は動物の骨・筋肉組織に較べて尿でも少なくないと考えられる。滝野ら (1957) は燐酸鉄となったものは醋酸使用の場合これに溶けないので検出不良であるとして、代りにクエン酸の使用を奨めている。そこで動物組織の灰化に良好とされる湿性灰化法と同時に乾性灰化法を行ない、緩衝液にクエン酸を使用する α - α' -dipyridyl による発色と、醋酸・醋酸ソーダを用いる NRME による発色を比較した。その結果灰化法及び発色試薬による差は殆んど認めなかつた。灰化に際し燐などの鉄抽出阻害因子が多量にあるとすれば、尿量の増加につれて阻害物質も増量し未回収率が增大することになるが、この試験では定量的に増加している(第3図)。ピロ燐酸塩は塩酸と24時間加熱で加水分解し (Farrar, 1935), Neumann の硝酸・硫酸混液湿性灰化, Stolte-Kramer-Tisdall の乾性灰化(藤井, 1943) も尿の灰化を行ない得るとしている。今回の方法により充分



第3図 抽出液よりの使用量と含有鉄量
 ○—○— 6 N-HCl 抽出
 ●—●— 6 N-H₂SO₄ 抽出

注意を払って灰化を行なえば、鉄の定量的検出及び乾性灰化法は鉄の損失なく行ない得る結果を得た。

2. 測定法

鉄の回収は3価鉄を2価鉄に還元することが最も重要で、使用した NRME は2価鉄の発色剤であるから灰化後の鉄の還元に必要なことがある。一般に hydroxylamine, hydrazine, ascorbic acid, hydroquinon などが使用されているが、吉川(1956)はこの反応は磷酸塩、ピロ磷酸塩の存在下で遅延するから長く時間をかける必要があることを認めている。ここでは10% hydroxylamine hydrochloride 0.5 ml, 60分放置で行なつたところ良好な結果を得た。また NRME 飽和液は抽出液2 mlにつき1 mlを用いたが、これは0.5 mlから4.0 mlの範囲内で呈色値は変わらず、発色試薬固有の色は呈色に影響がない。過剰に加えることは差支えなく、むしろ安定性を増すことを認めたので、原法の4塩化炭素による過剰試薬の除去をはぶいたが、このことはその後矢野(1957)によつても認められている。

3. 回収試薬

野田(1957)は血清鉄に無機鉄を添加すると自然状態の血清鉄と同様になり、その添加回収試験は高く評価されると報告し、回収率については Elvehjem (1927) が鉄の還元は最も困難であると述べるとともに、肉類中の鉄に関し0.1 mg (100 μg) の鉄を加えて95~104%の回収率を得て、これが95~105%の範囲にあればその方法は良好であると述べている。松原(1958)は同一血清サンプルにつき本報と近似の61.4 μg の鉄を添加し98.5~100.8% (平均99.63%) の回収率、野田(1957)は43 μg を添加して92.5~109.2%の回収率を得ている。以上を参考

として今回の成績をみると(第2表 NRME), 乾性灰化の場合5~10 μg の鉄添加で100~103%の回収率, 50~100 μg の添加で81~98.6%の回収率(第1表上段), 100~400 μg の場合92.0~100.2%の回収率となつている(第1表下段)。

乾性灰化における回収率の検討に際し、一つの方法として鉄含有量の異なる各種の尿をそれぞれ同量とり、片方を無添加の対照とし他に鉄を加えて測定し対照の値を引いた場合(第1表上段)と、他の一つの方法としては同一尿を脱脂後均分して同様鉄添加値から対照値を引いて回収値を求めた場合(第1表下段)を比較すると、後者は当然のことながら成績の乱れが少ない。乾性灰化の場合これが顕著であるが、湿性灰化の場合は尿液を作つて分割することが容易で回収率の精度は良好となり、9.5 μg の鉄添加の場合98~100% (平均99%, 第3表)であった。また第4表について各標本とも抽出液を塩酸6 ml (a, b, c 例)と塩酸10 ml (d, e 例)に分けて比較すると、これも後者の平均値は誤差少なく抽出塩酸量10 ml から発色用に2 mlをとることが6 mlから2 mlをとるよりも当然誤差を少なくすることを示している。

鉄標準液単独の場合、灰化・抽出・発色の全過程を経た回収率は、その処理を行なわぬ発色のみの対照との間に全く差を認めず、発色までの操作によるその損失はなかつた。以上により今回の方法によれば良好な回収率をもつて尿内鉄の定量が行ない得ると考える。

4. 尿内鉄量とその分布

尿内に排泄された物質についての絶対量を求めることは尿内水分量、固形成分の不均一な状態などから必ずしも容易ではない。従つて尿内鉄の測定に当つてまず鉄の分布状態を調べ、尿の一部をとつて試料とすることの適否を検討した。その結果採取尿量の増加に伴ない検出鉄量は増加し、この関係は直線的となることを見出した。一方個々の標本についての鉄量を尿100 mg 単位に換算したところ、100 mg 単位中の鉄量は正規分布をなすことを認めた。それは尿内に混在する鉄がほぼ均等な状態で分布することを示すものである。従つて尿の一部をとり含有鉄量を調べるにより全尿内又は1日排泄尿内鉄量を推定することが可能になる。実際にこれを1日排泄量について求めてみると10 mg 内外となり、平均的な1日摂取鉄量といわれる値に概ね一致する結果を得た。

更にこの方法により集団的に行なつた場合についてみると(石崎・久津見ら, 1960), 都下農村地区住民84名

の成績では乾燥尿 100 mg 内の鉄量は 5~45 μg の範囲にあった。またその頻度分布は概ね正規分布をなし最頻値は 15~20 μg にあった。この値は今回の値に比しかなり低い、これは一般に農村地区住民の粗食による鉄摂取量の低下がもたらすものと、その排泄尿量がかかなり大きく従つて単位当りの鉄量はかなり稀釈されることによるものと思われる。これを理論的に検討してみると尿 100 mg 当り 15 μg とし、尿量を 200 g, その乾燥量を 20% とすると $15 \times 10 \times 200 \times 20 / 100 = 6,000$ (μg) で約 6 mg となる。農村地区の食事では乾燥量が 20% よりは多く 30% 以上に及ぶので実際にはこの値より稍々高くなるものと推定される。これらの例は 1 日排泄尿量の測定が出来なかつたので、今後更に検討するつもりである。

以上が尿内鉄量の測定及びその分布であるが、寄生虫卵或いは虫卵類似物質を材料としてその排泄形式をみたものに石崎(1953), 佐藤(1953), 横川ら(1956)があり、石崎, 佐藤はそれぞれ回虫卵, 鉤虫卵の単位尿内検出数から、これら離散量がポアソン分布をなすことを明らかにした。横川らはメタアクリール球を定期的に服用すれば尿内に均等に分布して排泄されるとした。以上いづれも離散量である虫卵, 樹脂球がほぼ均等に分布することから、腸内容が充分攪拌混和されていると見做して差支えなく、従つて連続量である尿内鉄は単位尿をとつてみた場合正規分布をすることは当然予想される。本報の成績ではこの推論が正しいものであることが認められた。

しかし乍ら、以上の如く尿内鉄量とその分布を調べたが、現在では鉄が大腸から真の意味の排泄があるかどうか、これに加えるに遊離した白血球, 剝離した粘膜細胞, 胆汁液中の鉄などは尿に混在するものであり、これらを個々に区別することは不可能に近い。

今後は各種臨床検査結果, 血液系の諸成績と尿内鉄量との関係を検討するつもりである。

要 約

1. 鉤虫症における鉄出納を調べるため、まづ尿内鉄の定量法を試みた。尿は予め乾燥することにより取扱ひ易く秤量も正確に行ない得た。灰化は硫酸・過酸化水素による湿性灰化, 磁製ルツボによる乾性灰化法によつた。これを 6 N 塩酸によつて熱時抽出し発色試薬 NRME (o-nitroso-resorcin monomethyl-ether) を用いて 2 価鉄として呈色, 単位尿内の含有鉄量を良好な回収率をもつて定量することが出来た。また灰化法, 測定法, 回収試験に関する考察を行なつた。

2. 以上の如き新しく考案した尿内鉄定量法により鉤

虫非感染者の尿内鉄量とその分布形式を検討した。その結果, 単位尿内の鉄量は尿量と正相関があり, 尿量の増加に比例して鉄量が増加すること, 及び個々の定量値から尿 100 mg 中の鉄量を換算によつて求めると, その分布は正規分布をなすことを認めた。尿内鉄は一定範囲尿内においては均等に分布することから, 尿の一部をとつて 1 日排泄鉄量を推定することが可能になつた。その排泄鉄量は 1 日平均 10 mg~15 mg であり, 農村地区において集団的に検査した場合も概ね近い値を得た。

稿を終るに当り, 御指導御校閲を賜つた小宮義孝部長, 石崎達博士に厚く感謝致します。本研究の一部は昭和 32 年 9 月, 第 17 回日本寄生虫学会東日本支部大会で発表した。

参 考 文 献

- 1) 浅野清治ら(1956): 硫酸・過酸化水素混合液で酸化, デピリヂルで呈色す血液鉄の定量法について, 日血会誌, 19(3), 289.
- 2) Dubach, R. *et al.* (1955): The excretion of iron as measured by isotope technique. *J. Lab. & Clin. Med.* 45, 599-615.
- 3) Elvehjem, C. A. *et al.* (1927): The iron content of animal tissues. *J. B. C.* 74, 433-441.
- 4) 藤井暢三(1943): 生化学実験法, 定量篇, II 応用篇, 166-167, 南山堂, 東京.
- 5) Hahn, P. F. *et al.* (1939): Radioactive iron and its metabolism. Its absorption, transportation and utilization. *J. Exp. Med.* 69, 739-753.
- 6) 石上重行ら(1954): 放射性鉄 (Fe^{55}) による実験的鉤虫症の鉄代謝, 日血会誌, 17(5), 253.
- 7) 石崎達(1953): 直接塗抹標本による蛔虫卵数定量法とその応用, 寄生虫誌, 2(2), 137-142.
- 8) 岩城隆英(1956): 鉤虫性貧血の鉄代謝に関する実験的研究, 阪大医誌, 8(4), 345-363.
- 9) Jenkins, C. E. *et al.* (1937): The distribution of iron in blood. *Brit. Exp. Path.* 18(3), 175-190.
- 10) 小宮義孝(1956): 鉤虫と鉤虫症, 寄生虫誌, 5(2), 116-143.
- 11) 松原高賢(1955): 新たな血清定量法並に各種定量法の批判, 日血会誌, 18(2), 101-107.
- 12) 松原高賢(1957): 鉤虫性貧血の発生機序に関する諸問題, 臨床の日本, 8(7), 470-475.
- 13) 松原高賢ら(1958): 新たな血液鉄定量法, 医学と生物学, 42(2), 73-76.
- 14) 三沢敬義ら(1953): 臨床検査の実際, 800, 医学書院, 東京.
- 15) Mendelloff, A. I. (1953): Selection of a screening procedure for detecting occult blood in feces. *J.*

- Amer. Med. Assoc. 152(9), 798-801.
- 16) Moore, C. V. *et al.* (1956): Metabolism and requirement of iron in the human. J. Amer. Med. Assoc. 162(3), 197-204.
- 17) 野田真男 (1957): Nitroso-R 塩による微量血液鉄測定法, 生化学, 29(3), 199-204.
- 18) Positano, V. T. *et al.* (1958): A specific method for the determination of serum iron. J. Lab. Clin. Med. 52, 912-914.
- 19) 佐藤澄子 (1953): 人尿内鉤虫卵分布について, 寄生虫誌, 2(2), 146-150.
- 20) 高橋暁正・土肥一郎 (1956): 推計学入門, 医学書院, 東京.
- 21) 滝野義忠 (1957): 2-2'-デピリヂルによる組織鉄定量法に関する一知見, 日血会誌, 20(6), 446.
- 22) 鳥居鉄也 (1955): オルソ・ニトロソレゾルシン・モノメチールエーテル (NRME) による 2 価鉄の新比色定量法, 日化会誌, 76(3), 333-336.
- 23) 矢野圭司 (1957): 生化学領域における光電比色計, 化学の領域増刊, 33, 19.
- 24) 横川宗雄ら (1956): メタアクソール樹脂球による虫卵計算法, 日医新報, 1668, 28-31.
- 25) 吉川春寿 (1956): 臨床医化学, I 実験篇, 314, 協同医書出版社, 東京.

STUDIES ON IRON CLEARANCE IN HOOKWORM CARRIERS

(1) Determination and distribution of iron in feces

HARUHIKO KUTSUMI

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo*)

For the analysis of hookworm anemia the iron clearance of patients were studied by the quantitative determination of iron in the feces. In this report the procedure of the determination and the distribution of iron in feces were examined.

The procedure of incineration and extraction are the followings;

Before ashing feces are dried in the incubator for 3 days and 20-40 mg of dried feces are used. (1) Wet ashing; Add 2 ml of 6N sulfuric acid to the dried feces and boil for 15 minutes until white fumes appear, then reduce the flame add 0.5 ml of hydrogen peroxide every 15 minutes during one hour. Two ml of hydrogen peroxide will be sufficient to complete the ashing. (2) Dry ashing; Dried feces placed in a crucible are heated over a burner. After incineration iron is dissolved with 10 ml of 6N hydrochloric acid. Next place the crucible in a boiling water bath for one hour, then cool to room temperature.

Reduction and colorimetry of iron are the followings;

After centrifugation 2 ml of the supernatant is transferred to a tube and iron is reduced to the ferrous state with 0.5 ml of 10% hydroxylamine hydrochloride. Next 1 drop of p-nitrophenol solution is added and neutralized with 6N ammonia solution. Then 2 ml of an acetate buffer solution is added to adjust pH 4.5. The solution is made up to 10 ml with 1 ml of a saturated NRME solution and distilled water. The reading is made on the colorimeter with the filter of 660m μ .

On the above mentioned method the recovery rate of adding iron was examined. In this experiment 5-400 μ g of iron was added to the various amount of feces and the recovery rate was 81-108%.

By this method determination was carried out on the iron contained in the various amount of feces and the straight-line relationship was observed between both weight of feces and iron. Each of these values of iron was converted into the value of 100 mg of dried feces.

As the result it was clarified that these values gave the normal curve, from which iron was distributed equally in the feces.