

ペーパー・クロマトグラフィーの臨床的應用

—アミノ酸, アミン及びビタミンについて—

昭和27年12月26日受付

信州大学医学部小児科学教室 (主任 高津教授)

加藤 英夫・小林 恒雄・小井土宗平・川村 周光

The Clinical Application of Paper-Chromatography

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Shinshu University.

(Director : Prof. T. Takatsu)

Hideo Kato, Tsuneo Kobayashi, Sohei Koido and Kanemitsu Kawamura.

We have clinically applied the method of paper-chromatography and obtained the following results. (1) Urea shows yellow coloration by aldehydereagents. This color reaction can be used to confirm the existence of urea in the paper-chromatography. (2) We have tested each 1 cc. of blood plasma of healthy infants and children, and proved glutamic acid, aspartic acid, glycine, serine, ornithine, threonine, alanine, lysine-group, proline, tyrosine, leucine-group, phenylalanine and glutamine in the form of free amino acids and amides. (3) We have tested histamine and tyramine in the feces and urine from 17 cases of healthy infants and children, 3 cases of Ekiri, 2 cases of toxic diarrhea, and 5 cases of recurrent vomiting. Histamine and tyramine were found in the feces of each one case of healthy controls. Histamine was present both in feces and in urine of all 3 cases of Ekiri; tyramine was found both in feces and in urine of one of those 3 cases. In 2 cases of toxic diarrhea, these two amines were found in the feces of one case, and in the feces and urine of another. They were not found both in feces and in urine of all 5 cases of recurrent vomiting. (4) In table 5 were summarized the methods of coloring, the characteristics of color, and the values of Rf (the rate of flow) of vitamin B₁, B₂, B₆ and B₁₂, folic acid, cholin hydrochloride, niacin, vitamin A and vitamin C. These data will help us for the detection of these substances by this technique.

1. 緒 言

ペーパー・クロマトグラフィー (以下 P. Ch. と略記) は近時実験的にも、臨床的にも広く用いられようとしている。私達もさきに白鼠の臓器中の遊離アミノ酸①、健康な人の尿及び糞便内の遊離アミノ酸②、牛乳及び母乳が数種の腸内細菌によつて腐敗する時に生ずる遊離アミノ酸、ヒスタミン、チラミン及び揮発性アミン③、同様にペプトンが腐敗する時に生ずるアミン類④、又 *Candida albicans* がペプトンの中でビタミン類を産生するかどうかの検出⑤について、夫々 P. Ch. を応用し、その成績を発表したが、今回は更にこれを臨床的に用いて得た知見を報告する。即ち (1) 前回の報告⑥について、尿中の遊離アミノ酸のペーパー・クロマトグラム上の斑点を乱す成分の中で、最も重要な因子である尿素について、その呈色反応を工夫し、その位置を決定した。(2) 健康な乳幼児の血漿中

の遊離アミノ酸を検出した。(3) 乳幼児の中毒性疾患、即ち疫病、自家中毒症及び消化不良性中毒症の尿及び糞便中のヒスタミン及びチラミンを検出した。(4) 更に数種のビタミンの P. Ch. について、その臨床的応用への可能性について検討した。

2. 実験方法及び成績

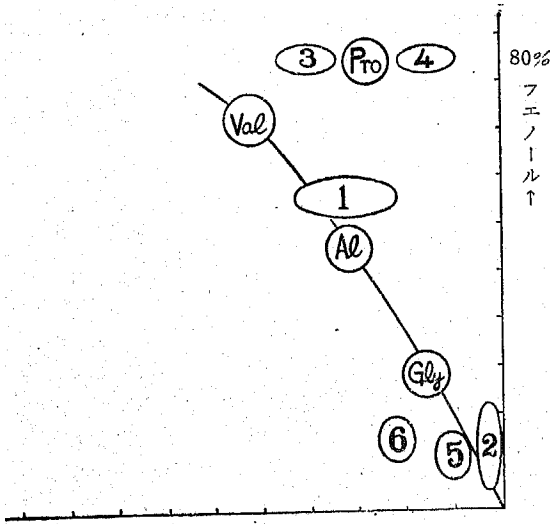
1) P. Ch. における尿素の呈色反応とその位置。溶媒としてブタノール・サクサン・水 (4:1:1) 及び 80% フェノールを用いた時に尿素は大休アラニンの位置にあることはすでに報告⑦したが、川村がアルデヒド試薬により、P. Ch. で尿素が美しい黄色を呈し、その位置と広がりが見つきりと容易に知ることができるとを見出したので、この方法によつて、尿中の遊離アミノ酸のペーパー・クロマトグラム上の斑点を尿素がいかにかき乱しているかを検討した。

その結果、尿素は図に示すようにアラニンとバリン

の中間にブタノール・サクサン・水の方向に長軸をとつた橢圓形にあり、尿を濃縮して用いた時はその量は著しく多くその附近のアミノ酸の斑点を著しく乱していることが分つた。更にブタノール・サクサン・水で作つた一次のペーパー・クロマトグラムでは尿素が多い時は殆んどその全面に拡がっている。尿中の遊離アミノ酸を鮮明に認めるためには尿素を除去することが先決問題である。

次に尿中のペーパー・クロマトグラム上の遊離アミノ酸の斑点を乱す主な成分は尿素、尿酸、クレアチニン、クレアチン、食塩及びブドウ糖であるので、私達が用いているそれらの呈色反応、色及びその方法を第1表に示した。

図 アミノ酸以外の数種尿中成分のペーパー・クロマトグラム



- ブタノール・サクサン・水 ←
1. 尿素 2. 尿酸 3. クレアチニン 4. クレアチン
5. 食塩 6. ブドウ糖

第1表 アミノ酸以外の尿中成分の呈色反応

成分	反応及び名色	方法
尿素	アルデヒド反応、黄色	10%パラジメチルアミノベンズアルデヒド稀塩酸溶液をスプレー
尿酸	黒褐色	5%炭酸ソーダスプレー加温後1%硝酸銀溶液をスプレー
クレアチニン	Jaffeの反応、橙色	1%ピクリン酸5%苛性ソーダ溶液をスプレー
クレアチン	橙色	100°Cで1時間加温後クレアチニンと同様に発色させる。
食塩	初め白色後黒褐色	1%硝酸銀10%アンモニア溶液をスプレー
ブドウ糖	黒褐色	同上

(2) 健康な乳幼児の血漿中の遊離アミノ酸の検出。

方法は酢酸塩を入れて採血して、遠沈し、1ccの血漿をとり、これをFolin-Wuの方法で除蛋白して、その濾液を湯煎上で殆んど乾燥させ、これに80%エタノール0.5ccを加えてかきまわし、その上清を全部用い、ブタノール・エタノール・水(4:1:1)及び80%フェニールを溶媒として、2次のペーパー・クロマトグラムを造つた。アミノ酸の同定は第2表に示す呈色反応を用いた。その成績は第3表に示した。

第2表 アミノ酸及びアミンの呈色反応

アミノ酸及びアミンの種類	反応及び名色	方法
αアミノ酸	(紫)	0.2%ニンヒドリン0.1%酢酸ブタノール溶液をスプレー後100°Cで数分加温
スレオニン、ゼリン	(黄褐色)	80%過沃度酸カリ0.01%酢酸溶液をスプレー後100°Cで乾燥後ネスレル試薬をスプレー
ヒスチジン、ヒスタミン、チロチン、チラミン	ジアゾ反応 (黄橙)	0.1%スルファニル酸N ₁₀ 塩酸溶液と4%亜硝酸ソーダの新鮮な等量混液をスプレー後10%アンモニアをスプレー
	ジアゾ反応 (黄橙)	0.3%パラニトロアニリンN ₁₀ 塩酸溶液と10%亜硝酸ソーダの新鮮な等量混液をスプレー後10%炭酸ソーダをスプレー
アルギニン	坂口反応 (紅)	0.1%αナフトール、アルコール溶液をスプレー後50%次亜塩素酸ソーダをスプレー
トリプトファン、インドール	アルデヒド反応 (紅)	10%パラジメチルアミノベンズアルデヒド稀塩酸溶液をスプレー
メチオニン、チスチン、チステイン	(脱色)	N ₁₀₀ 沃度沃度酸カリ液と5%窒化ソーダ液の等量混液をスプレー
タウリン、β-アラニン	(黒褐色)	二硫化炭素とブタノールの等量混液をスプレー乾燥後1%硝酸銀5%硝酸溶液をスプレー

即ち12種のアミノ酸とグルタミンが認められた。アミノ酸の内斑点のやゝ大きいものはアラニン、ロイシン群及びフェニールアラニンであり、グルタミンもやゝ大きな斑点であつた。グルタミンの同定は次のようにして決定した。即ち血漿のエタノール抽出液を20%塩酸で水解して、これを用いて造つたペーパー・クロマトグラムと水解せずして造つたものと比較するに、水解した時はグルタミンと思われる斑点が消失して、グルタミン酸の斑点が著明に大きくなることによつて、グルタミンは塩酸処理によつてアンモニアを離して、グルタミン酸になつたと考えられた。同時に血漿中の遊離アミノ酸窒素をβナフトキノンスルホン酸法で定量した。

血漿中の無機塩類とブドウ糖がアスパラギン酸の斑点を乱したが、Rf値の低い所であるので全般的には

著しい妨げにはならなかつた。

(3) 乳幼児の中毒性疾患の尿及び糞便内のヒスタミン及びチラミンの検出。

ヒスタミン及びチラミンは10%アンモニアを飽和させたブタノールを溶媒に用いると Rf が著しく大きくなつて、夫々0.55及び0.72となり、他のアミノ酸と明らかに判別することが出来る。即ちアミノ酸の中で最も Rf の大きいフェニルアラニンの Rf が 0.3 で

あるので、Rf 0.5 以上にはアミノ酸は上らないものと考えてよい。尚ヒスタミン及びチラミンはニンヒドリンで暗紫色に、デアゾ試薬及びパラニトロアニリンによつて黄橙色に呈色するので、他の物質との鑑別は比較的容易である。

小林はこの方法によつて健康乳幼児17例、疫痢3例、

第 4 表 乳幼児中毒性疾患における尿尿中のアミン(小林)

疾患	姓名	尿		尿	
		ヒスタミン	チラミン	ヒスタミン	チラミン
健康児	15名	(-)	(-)	(-)	(-)
	K.M.	(-)	(-)	(-)	(+)
	O.T.	(-)	(-)	(+)	(-)
疫痢	Y.T.	(±)	(-)	(+)	(-)
	I.T.	(+)	(-)	(+)	(-)
	H.K.	(+)	(+)	(+)	(+)
自家中毒症	T.M.	(±)	(-)	(-)	(-)
	N.Y.	(±)	(-)	(-)	(-)
	A.K.	(±)	(-)	(-)	(-)
	K.K.	(-)	(-)	(-)	(-)
消化不良	N.K.	(-)	(-)	(-)	(-)
	T.A.	(-)	(-)	(+)	(+)
	M.O.	(+)	(+)	(+)	(+)

第 3 表 健康乳幼児の血漿中の遊離アミノ酸

姓名	年令	性	アミノ酸窒素 mg/dl	アスパラギン酸	グルタミン酸	グリシン	ゼリン	オルニチン(?)	スレオニン	アラニン	リジン群	グルタミン	プロリン	チロチン(?)	ロイシン群	フェニルアラニン
大山	1j7m	♀	6.5	+	+	+	+	+	±	卅	±	卅	±	+	卅	卅
大平	1j8m	♂	6.0	+	+	+	+	+	±	卅	±	卅	±	+	卅	卅
奥原	1j6m	♂	6.2	+	+	+	+	+	±	卅	-	卅	-	+	卅	卅
中田	1j7m	♂	5.5	+	+	+	+	+	±	卅	-	卅	-	+	卅	卅
坂井	7m	♂	4.4	+	+	+	+	+	+	卅	±	卅	+	+	卅	卅
二村	7m	♂	5.4	+	+	+	+	+	+	卅	+	卅	+	+	卅	卅
金子	7m	♀	5.0	+	+	+	+	-	-	卅	+	卅	+	+	卅	卅
下林	8m	♀	4.7	+	+	+	+	+	-	卅	+	卅	+	+	卅	卅
塩酸で処理すれば				+	卅	+	+	+	+	卅	+	-	+	+	卅	卅

自家中毒症 5 例及び消化不良性中毒症 2 例の尿及び糞便内のヒスタミン及びチラミンの検出を試み、第 4 表のような成績を得た。

(4) ビタミン類のペーパー・クロマトグラフィ。

ビタミン類のペーパー・クロマトグラフィにはいろいろの溶媒が用いられているが、臨床的に用いるには、なるべく 1 種類の溶媒が望ましく、又中性の溶媒がよいと考えられる。又用いる臨床的材料はアミノ酸が混在することが多いと思われるので、これ等も同時に検出できる溶媒がよいと考えて、ブタノール・エタノール・水 (4:1:1) を用いた。

第 5 表 ビタミンのペーパー・クロマトグラフィ
溶媒はブタノール・エタノール・水 (4:1:1)

ビタミン	Rf	発色法	色
B ₁	0.30	デアゾ反応	黄橙
B ₂	0.27	天然色	黄
B ₆	0.56	デアゾ反応	黄橙
B ₁₂	0.10	天然色	紅
ニコチン酸	0.76	沃度蒸気	黄
葉酸	0	天然色	黄
コリン	0.32	沃度蒸気	黄
※A	0.61	3 塩化アンチモン	青
C	0.02	硝酸酸性硝酸銀	黒褐

※ 溶媒は石油エーテルを用いた

この時の各ビタミンの Rf 発色試薬及び色調は第 5 表のようである。ビタミン A の溶媒は石油エーテルを用いた。ビタミン B₁, B₂ 及び葉酸は 80% フェノールを溶媒に用いると Rf が 0.9~0.95 となり、80% フェノールに対する溶解度が極めて高いことを知った。それ故これ等のビタミンは 80% フェノールによつて抽出することが出来る。

この方法によれば、最少検出量は B₁ は 1 r, B₂ は 0.5 r, B₆ は 1 r, ニコチン酸は 5 r である。ビタミンは極めて微量が問題となるので、この方法が臨床的に用いるためには尙検討を必要とするであろう。

3. 総括及び考按

(1) 尿中の遊離アミノ酸の分析が P. Ch. では困難であるが、それは組織、臓器、胆汁或いは糞便のような材料と異り、尿中には多量の尿素、尿酸、クレアチニン、クレアチン、無機塩類及びブドウ糖等がペーパー・クロマトグラム上でアミノ酸の斑点を著しく乱すからである。これ等の物質がどの程度に妨害するかを知るために、それらの呈色反応を工夫して、これを第 1 表に示した。殊に尿素の呈色反応にアルデヒド試薬を用いることを知つてから、尿素の妨害が最も著しく、アミノ酸の鮮明な斑点を得るためには、これを除くことが最も必要であると考えられた。それにはウレアーゼを用いることが合理的であるが未だ成功していない。

(2) 健康乳幼児(人工栄養) 8 例の血漿 1cc から 12 種のアミノ酸とグルタミンを P. Ch. によつて検出した。アミノ酸ではアラニン、ロイシン群及びフェニルアラニンが多かつた。グルタミンの同定は塩酸処理によつてグルタミン酸になることによつて確めた。グルタミンは組織内で産生されたアンモニアがグルタミン酸と結合したもので⑥肝で作られる尿素と同様にいわばアンモニアの解毒産物である。グルタミンの量を尿素と共に P. Ch. によつて大体知ることが出来るのは興味深い。又緑膿菌、変形菌、 α 及び β 大腸菌或いは一般大腸菌によつて牛乳、母乳或いはペプトンが腐敗する時にアンモニアが発生することを知つた③④⑤でアンモニアの解毒という点からも興味深い。

尙メチオニン、グリシン、ヒスチジン、チステイン、グルタミン酸等の単一アミノ酸を用いる時に、これらのアミノ酸が血漿中にどの位の時間遊離の状態にあるかをこの方法によつて知ることが出来る。又 ACTH ⑦男性ホルモン⑧手術⑨或は間脳に対する刺戟⑩が家兎の血清中の遊離アミノ酸に及ぼす影響について研究がなされているが、この方面におけるペーパー・クロマトグラムの利用は今後益々開けるものと思う。しかし P. Ch. は正確な定量法ではないので、別にアミノ酸窒素の定量をして、この成績を基準として考察す

べきであろう。

(3) 健康乳幼児の糞便中のヒスタミン及びチラミンは 17 例中 1 例にヒスタミン、他の 1 例にチラミンを検出したが、尿中には全例に検出されなかつた。疫病では 2 例に糞便及び尿中にヒスタミンを認め、又他の 1 例では糞便及び尿中にチラミンも認められた。自家中毒症では尿中にヒスタミンがあるかと思われたものが 3 例あつたが明らかではなかつた。消化不良性中毒症の 1 例では糞便及び尿中にヒスタミン及びチラミンが認められ、他の 1 例では糞便内にはヒスタミンとチラミンが認められたが尿中には両アミン共に認められなかつた。

長崎医大の平井金三郎名誉教授及び四熊氏は消化不良性中毒症の患児のみならず母乳栄養の健康児でもアミン産生菌があつたり、なかつたりで一定の傾向がない点より消化不良性中毒症のアミン中毒説を否定した⑩。一方泉教授は疫病の病因の最大因子としてヒスタミンを挙げておられる⑪。私達の上記の成績は例数が少いので結論を述べる事が出来ないが、従来の多くの権威者の業績に対して P. Ch. という方法で、或程度興味深い批判が得られるものと考えている。

(4) ビタミンの P. Ch. については、溶媒としてブタノール・エタノール・水(4:1:1)を用いた時の夫々のビタミンの発色法、色及びそれらの Rf を第 5 表に示したが、沃度蒸気を用いて、ニコチン酸、コリン及びビタミン B₁ が同時に検出できるのは興味ある事実であると思う。

但し最少検出量が 1—5 r であるので、微量が問題となるビタミンの場合はこの方法が臨床的にどの程度利用されるかは極めて疑問である。

従来ビタミン B₁, B₆, B₂, C 及び A ⑬⑭⑮⑯についで多くは多くの報告がある。

4. 結 語

ペーパー・クロマトグラフィーを臨床的に応用して、次のような知見を得た。

(1) 尿素はアルデヒド試薬で黄色となり、これが尿素のペーパー・クロマトグラム上の呈色反応として用い得られる。

(2) 健康乳幼児の血漿 1cc より遊離アミノ酸を検出し、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、セリン、オルニチン、スレオニン、アラニン、リジン群、プロリン、チロチン、ロイシン群、フェニルアラニン、及びグルタミンを証明した。

(3) 健康乳幼児の尿及び糞便中のヒスタミン及びチラミンの検出を行い、17 例中 1 例では糞便中にヒスタミン、他の 1 例では糞便中にチラミンを認めた。疫病では 2 例の尿及び糞便中にヒスタミンを認め、他の 1 例ではヒスタミン及びチラミンを認めた。消化不良性中

毒症の2例では糞便中にヒスタミン及びチラミンを認め、その中の1例では尿中にも両アミンを検出した。自家中毒症の5例ではアミンは検出されなかつた。
(4) ビタミン B₁, B₂, B₆, B₁₂, 葉酸, コリン, ニコチン酸, ビタミンA及びCのペーパー・クロマトグラフィにおける呈色反応, その時の色及びそれらのRf値を表示した。

(筆をおぐに当り高津教授の御指導, 御校閲を深謝し, 千葉大学腐敗研究所佐竹一夫助教授の御援助を感謝します。)

(本研究は一部文部省科学研究費によつた。)

(本論文の要旨は昭和27年11月15日東日本小児科学会で発表した。)

引用文献

- ① 加藤等, 日本小児科学会雑誌, 56, 1 : 42, 1952.
② 加藤等, 信州医誌, 1, 1 : 53, 1952. ③ 小井土,

信州医誌, 1, 1 : 96, 1952. 加藤等, 日本小児科学会雑誌, 56, 10 : 537, 1952. ④ 高津等, 第四回東日本小児科学会, 1952. ⑤ 加藤等, 治療, 34, 12 : 1092, 1952. ⑥ 市原, 蛋白質及びアミノ酸の生化学, 136. ⑦ Faiedberg, J. Biolog. Chem., 168 : 405, 1947. Bartlett, *ibid*, 180 : 1024, 1949. Li et al, *ibid*, 177 : 91, 1949. Borden et al, J. Clin. Investig. 31, 4 : 375, 1952. ⑧ 安田, 最新医学, 7, 7 : 101, 1952. 田村, *ibid*, 7, 11 : 85, 1952. ⑨ Nutrit. Rev., 10, 7 : 195, 1952. ⑩ 田附, Med. J. Osaka University, 2 : 609, 1951. ⑪ 平井, 細菌によるアミノ酸の分解, 146. ⑫ 泉, 日本臨床, 7, 6-7-8, 1949. ⑬ 藤岡, 薬学, 3, 2 : 125, 1949. ⑭ 佐竹, 化学の領域, 4, 8 : 35, 1950. ⑮ 佐竹, 化学実験学(一般操作法) 332, 1950. ⑯ 佐竹, クロマトグラフィ, 89, 1952.

馬蹄(鉄)腎に就て

昭和27年10月9日受付

長野赤十字病院 (院長 齋藤堯夫博士)

皮膚泌尿器科

奥井重敬 児玉和志

On the Horseshoe Kidney

Nagano Red Cross Hospital, Nagano.

(Director : Dr. Takao Saito)

Shigetaka Okui and Kazushi Kodama

We have recently observed 6 cases of horseshoe kidney. And the following conclusion were obtained from these 6 cases and other 88 cases already reported in Japan. The sex ratio is male 3 to female 1. Most of the clinical symptoms of this disease are caused by the complications. So-called Rovsing's syndrome, which is excited by the horseshoe kidney itself, is of less value, because it plays only little parts for the diagnosis of this disease, and in the majority of cases it is diagnosed from the complicative symptoms. Pyelography is of large value. Gottlieb's signs are very important. But it must further be recognized that the lateral pyelography often gives us important findings. Chief complication are lithiasis, tuberculosis, hydrups, abscess, trauma and encysted tumor. For treatment, isthomotomy and heminephrectomy are adopted.

緒言

馬蹄腎は病理解剖学的には0.1%~0.2%, 臨床上皮エログラフィー或いは腎手術例に対して0.2%~0.8%と其の頻度は必ずしも多くはないが, 腎臓の先天性奇型の内, 重複奇型に次いで多く而も融合腎の代表者と見做される程臨床的に頗る重要視されている。従つて

その臨床に関しては臨床医家の興味を引く所なるため, 吾々は自家経験例6例を報告すると共に, 1910年近藤氏が其の第1例を報告以来, 今日までに報告された本邦臨床報告例88例に就て臨床的観察を加え, 2, 3の考案を試みたいと思う。