

尿及び糞便内遊離アミノ酸のペーパー・クロマト グラフィによる分析

信州大学医学部小兒科学教室 (主任 高津教授)

加藤 英夫. 小井土宗平. 内藤 博行.
赤羽 太郎. 飯沼 秀雄. 山中 昭男.

Analysis of Free Amino Acids in Human Urine and Feces by Paper-Chromatography.

(Department of Pediatrics, Medical Faculty, Shinshu University,
Director, Prof. T. Takatsu)

Hideo Kato, Sohei Koïdo, Hiroyuki Naito,
Taro Akahane, Hideo Inuma, Akio Yamanaka

- (1) Free amino acids in urine and feces of the healthy were analysed by paper-chromatography, and the data were indicated in 1. and 2. tables. The individual difference and that in age were investigated.
- (2) The technique of paper-chromatography and the several factors in urine, which obstruct the flowing of amino acids on paper, were studied.

緒 言

人体の生理的或は病的な蛋白代謝を研究するに当り、今までは臨牀的には窒素の出納と言う量的な面だけを問題として來たが、個々のアミノ酸の動きと言う質的な面は適当な方法がなかつたために研究することが極めて困難であつた。しかし、最近ペーパー・クロマトグラフィによつて、正確に定量することは困難であるが、どうにか工夫すれば、各アミノ酸を半定量的に分析することが出来るようになった。尙この方法の利点は、僅かの材料で、比較的簡単な操作で、数ガンマーと言う微量まで、既知のアミノ酸のみならず未知のアミノ酸までも、一枚の紙の上によりて見ることが出来る点である。

・私達は先に、白鼠の臓器内の遊離アミノ酸をこの方法によつて分析して發表したが、① 今回は健康な人の尿及び糞便内の遊離アミノ酸を分析し、今後、人の病的な蛋白代謝を研究する時の規準を作りたいと思つて、この実験を行つた。

私達はこの尿及び糞便内の遊離アミノ酸の意義について、いささか考察し、又私達の方法で作つたペーパー・クロマトグラム上における各アミノ酸の位置を決定し、又尿中の遊離アミノ酸を分析する時に、アミノ酸の移動を妨げる 2,3 の因子について、其ペーパー・クロマトグラム上の位置を知ることが出来たのでこれを附記したい。

文献的考察

健康者の尿中②③④⑤⑥の遊離アミノ酸は比較的少ないが、妊婦⑦ではヒスタチンの排泄が増し、肝疾患⑧⑨⑩⑪⑫では排泄される遊離アミノ酸の量も、種類も増加すると言われている。又尿中の遊離アミノ酸は食餌の影響も受け⑬⑭⑮、個人差も著しいとされている。⑯⑰

尙尿中に遊離アミノ酸或は其簡単な誘導体が出る疾患として、アルカプトン(ホモゲンチヂン酸)尿症、メラニン尿症、クレアチン尿症、チスチン尿症、チロザノーザス(チロゲン及びp-オキシ・フェニル・乳酸尿症)等が成書⑱に挙げられている。しかし例えばチスチン尿症は尿中チスチンだけが多く排泄されるのでなくて他の多くのアミノ酸も同様に排泄され易いと言ふ。⑲

小兒科学領域においても最近乳兒の尿中遊離アミノ酸について、かつて私と共にペーパー・クロマトグラフィを研究し、今も協同研究を行つてゐる宮尾氏が詳細な成績を発表した。⑳

又濱田氏㉑等は乳兒下痢症の尿中遊離アミノ酸は疾患が重くなるに従つて、其種類が増すことを証明した。

私はこれ等の文献から、尿中に排泄される遊離アミノ酸は健康者でも個人個人によつて相等の差異があり又その中に共通したものもあつて、ペーパー・クロマトグラフィによつてこれを知ることが出来るのではないかと考えた。

糞便内の遊離アミノ酸については A. C. Ross㉒が乳兒について報告し、宮尾氏㉑はこれについて一層詳細な成績を発表した。これによれば牛乳栄養兒の糞便内の遊離アミノ酸は母乳栄養兒に比して著しく多く、これは其吸収と腸内細菌との関係が考えられると述べている。私はこれ等の文献から糞便内の遊離アミノ酸も亦栄養学的に興味深い研究課題であると考え、乳兒に限らず一般健康者について分析してみたいと考えた。

尙ペーパー・クロマトグラフィは Consden et al㉓(1944)によつて始められたものであるが、最近本邦においても多くの文献㉔㉕㉖㉗㉘㉙㉚㉛㉜㉝㉞がある。

又定量法として利用するためには (1)呈色した斑紋の大きさを標準液と比較したり㉟㊱㊲㊳、發色の強さを光電計で計つたり㊴㊵㊶㊷、(2)斑紋を切りとつて抽出して定量したり㊸㊹、(3)アミノ酸の銅塩を作つて定量したり㊺㊻、(4)放射性同位元素を用いたり㊼㊽㊾㊿いろいろ工夫されているが、私達臨床家が取扱う血液、尿、糞便、器官或は組織はアミノ酸以外に多くの物質を含んでいるので、この方法でアミノ酸を定量することは極めて困難である。それ故、私達

は一應、斑紋の大きさを標準液と比較すると言ふ最も簡単な方法によつて成績を記録することとした。

実験材料及び方法

尿及び糞便は年令の別なく健康な男女よりとり、これを直ちに実験に用いた。これを乳兒、幼兒、学童及び成人に分ければ、尿は夫々 8, 24, 13及び18例であり、糞便は夫々 22, 11, 7及び10例である。

方法は、尿は 10c.c. を湯煎上で濃縮し、殆んど乾燥させ、これに80%エタノール 3c.c. を加えて濾過し、これを再び湯煎上で 0.1c.c. まで濃縮して、これを 0.1 c.c. のメスピペットで吸ひ、これを No.50のペーパー・クロマトグラム用の東洋濾紙(20cm×20cm)の一隅に一辺より 2cmで、他辺より夫々 1cm及び4cmの二点に、加温し、乾燥させつゝ、直径が 5mm 以上にならぬように滴下した。

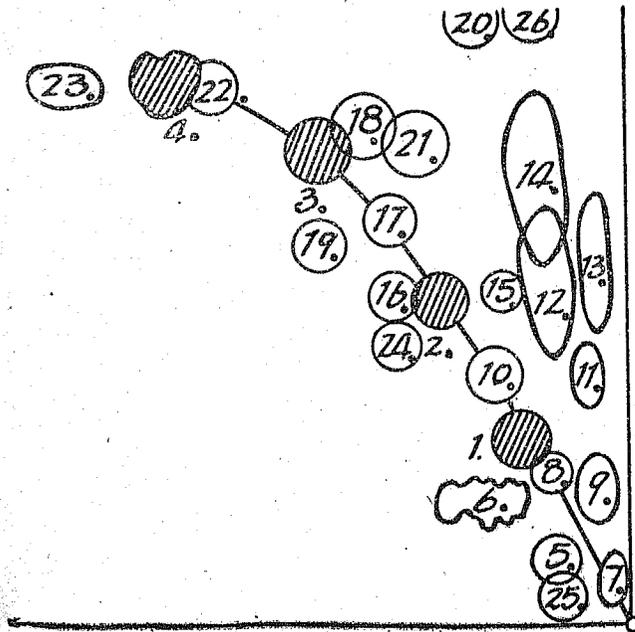
糞便は約 2g を 10c.c. の蒸留水に混和し、遠沈してその上澄をとつて尿と同様に處理した。

溶媒は一次には n-ブタノール:氷醋酸:水(4:1:1)を用いて展開し、出来た一次のクロマトグラムの外側の一方を切りはなし、他方は乾燥後更に80%フェノールで二次に展開した。発色には 0.2%ニンヒドリン、ブタノール(10%に氷醋酸を添加)溶液を噴霧し、600w の電気コンロの上方約 20cm の高さに金網をはり、其上で加温、乾燥し、各アミノ酸が発色して来るのを観察した。発色し終つてから、室温に約 3時間放置して後アミノ酸の同定を行つた。発色し終つてからはアミノ酸の同定が困難な場合も、発色する過程を見ると同定出来ることが多い。又室温に約 3時間放置するのは、その間に呈色が完全に終るからである。

一次のクロマトグラムは特殊なアミノ酸の検出に用いた。即ち佐竹氏の御指導により、トリプトファンには Ehrlichのアルデヒド試薬(10%p-ジメチル・アミノ・ベンツアルデヒド稀硫酸溶液)にてバラ色になる反應を用いた。この場合インドールもこの反應でバラ色に呈色するが、熱処理によつて殆んど消失していると考えられるので、この反應が陽性の時はトリプトファンがあると判定した。ヒスタチン及びチロゲンはデアゾ試薬(0.1%スルファニル酸のN/10塩酸溶液と4%の亜硝酸ソーダ水溶液を新しく等量に混じた溶液)を噴霧し、更に10%アンモニアを噴霧して、橙色の發色をみた。チラミン及びヒスタミンもこの反應が陽性に出るが量的に少いものと考えて、一應考えないこととした。又メチオニン及びチスチンは N/50 沃度沃度カリ溶液と 2%窒化ソーダの等量混液を噴霧して、その脱色をみた。

アミノ酸の同定は、私達が各アミノ酸の結晶を用いて、この溶媒における個々のアミノ酸の Rf 値を決定して作つた附図によつて行い、その定量は、最も最少検出量の少いとされるグリシンと最も多いとされるヒスチジンについて、夫々 20 r, 10 r, 5 r, 2.5 r, 1.25 r を二次に展開して比較した結果、両アミノ酸の検出量に著しい差異がなかつたので、すべてのアミノ酸共にこの標準と比較して、5 r までを+, 10 r までを#, それ以上を卍とすれば大過ないことを知つた。依つて一應この標準に従つて成績を記録した。但しこの二種の溶媒ではチロジン及びチスチンの検出は殆んど不可能である。又ヒスチジンとアルギニン、チトルリンとグルタミン、アスパラギンとタウリン、リジンと低級ペプチドをニンヒドリン反応だけで鑑別することは極めて困難である。

附図 アミノ酸のペーパー・クロマトグラム



ブタノール・サクサン・水 (4:1:1) ←

- | | | |
|-------------------|------------|-----------|
| 1. グリシン | 2. アラニン | 3. バリン |
| 4. ロイシシ | 5. アスパラギン酸 | |
| 6. グルタミン酸 | 7. チスチン | 8. ゼリン |
| 9. オルニチン | 10. トレオニン | 11. タウリン |
| 12. ヒスチジン | 13. リジン | 14. アルギニン |
| 15. チトルリン | 16. β-アラニン | 17. アミノ酪酸 |
| 18. メチオニン | 19. チロジン | 20. プロリン |
| 21. トリプトファン | 22. イソロイシン | |
| 23. フェニル・アラニン | 24. 尿素 | 25. 食塩 |
| 26. クレアチン, クレアチニン | | |

実験成績

健康者の尿中遊離アミノ酸は第一表に示す如く、年齢に関係なく、グリミン、アラニン、バリン、グルタミン酸及びアスパラギン酸が殆んど常に存在する。其他ヒスチジン・アルギニン及びリジン等（リジンは低級ペプチドと重る）が見られるが、ニンヒドリン反応だけでは同定が困難である。又ロイシン・イソロイシンが認められる者が全例中五例あつた。濃縮した尿を 10% 塩酸で水解するとリジン群の呈色は著しく減少するので、これが低級ペプチドであることが分る。しかし時々ヒスチジン、アルギニン、リジン、チトルリン、グルタミン、アスパラギン、タウリン、オルニチン及び低級ペプチド等がはつきり分れて、大体ニンヒドリン反応だけで同定出来ることもある。尚一次のクロマトグラムで、ジアゾ反応によりヒスチジン或はチロジンがあると思はれるものもある。ヨード・アザイド反応は殆んど陽性に出るが、これはメチオニンによるものかチスチン或はチステインによるものか未だ同定出来ない。トリプトファンは一例も陽性のものはなかつた。

年齢的には尿中の遊離アミノ酸は乳児より幼児、学童及び成人の方がやゝ多い。この個人的な差異は殆んど鑑別出来ないが、幼児の一例（川口秀〇, 4j.）にメチル・ヒスチジンの排泄されるのを認めたので、一月後再び検査したが依然これを認めた。メチル・ヒスチジンは Rf が殆んどヒスチジンと一致し、(Phanol : 0.45, n-Butanol: 0.1 l), ニンヒドリンで緑色に呈色し、明らかに認められた。

糞便内の遊離アミノ酸は尿の場合に比して、著しく鮮明なペーパー・クロマトグラムを作ることが出来る健康者では第二表の如く年齢の差なくグリシン、アラニン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン群、ゼリン及びリジン群があり、オルニチン、トレオニン、アミノ酪酸、トリプトファン及びメチオニン或はチスチンが全例の約半数に認められた。牛乳栄養児の糞便内の遊離アミノ酸は他のものに比して著しく多く、他のものでは殆んど認められないプロリンが常に認められた混合栄養児がこれに次ぎ、幼児、学童、母乳栄養児、成人の順に少くなつていた。この乳児における成績は先に發表された宮尾氏¹⁰⁾の成績とよく一致している。又個人差はかなり著しく、常に数種以上のアミノ酸が相等著明に認められるものと一方三種程のアミノ酸

第1表 健康者の尿中遊離アミノ酸

		例数	グリシニン	アラニン	バリン	グルタミン酸	アスパラギン酸	ゼリン	トレオニン	オルニチン	アミノ酪酸	チロジン	(ヒアスルチゲニン)	※リジン等	(ロイロイシン)	フェニル・アラニン	プロリン	(メチスチオン)	トリプトファン
乳	母乳栄養	0																	
	牛乳栄養	5	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	+	+	-	-	-	?	-
児	混合栄養	3	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	+	+	±	-	-	?	-
	幼児	24	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	+	+	±	-	-	?	-
学童	13	+	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	+	+	±	-	-	?	-
成人	8	+	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	+	+	±	-	-	?	-

※ リジン等と言うのはリジンは低級ペプチドと重なり、ヒスチジン、アルギニン、チトルリン、グルタミン及びアスパラギンと重なることがあると言う意味である。

第2表 健康者の糞便内遊離アミノ酸

		例数	グリシニン	アラニン	バリン	グルタミン酸	アスパラギン酸	ゼリン	トレオニン	オルニチン	アミノ酪酸	チロジン	(ヒアスルチゲニン)	リジン等	(ロイロイシン)	フェニル・アラニン	プロリン	(メチスチオン)	トリプトファン
乳	母乳栄養	13	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-	+	+	+	±	-	±	±
	牛乳栄養	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
児	混合栄養	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	±	±
	幼児	11	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	+	-	±	±
学童	7	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	-	-	±	±	
成人	10	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	-	+	+	+	±	-	±	±

がかすかに認められるものもあつた。尙同じ家族で同じ食餌をとつているものでこのような個人差があるものもあつた。この例については一日おきに三回検索したが毎回同様の成績を得た。

次に尿中の遊離アミノ酸のペーパー・クロマトグラムは糞便内或は組織内の遊離アミノ酸のペーパー・クロマトグラムに比して極めて判読しにくいので少しく其原因について検討した。尿中からのアミノ酸の抽出には80%エタノールを用いたので、これに可溶性のものは、すべて濾紙に滴下されることになる。従つて尿素、クレアチン、クレアチニン及び少量の食塩其他の

塩類は除き得ない。これ等がアミノ酸の移動を妨げる因子であらうと考えられるので、その濾紙上におけるRfを計つた。即ちクレアチン及びクレアチニンはMaw^⑧及び佐竹氏^⑨によれば二次でプロリンのやムアルギニンよりあり、一次の溶媒にブタノール・醋酸を用うる時は丁度最も多くのアミノ酸のあるグリシン附近にあるので、それ等の斑点を乱す。又尿素は殆んどアラニンと一緒に動くので、其斑点を乱し、しばしば其中心に位置して、アラニンを環状或は半月状におしける。尿素が多い時はα-アミノ酪酸、或はスレオニンをおし上げ或はおし下げる。食塩は殆んどアスパラ

ギン酸と一緒に動くので、其斑点を乱し、食塩が多い時はグルタミン酸をおし上げる。其他いろいろの塩化物が一次の溶媒にブタノール・醋酸を用いた時はペーパー・クロマトグラムの下半部に廣がり、多くのアミノ酸に重り、或はおしのけてゐることが硝酸銀によつて知ることが出来る。ブドウ糖はアラニン附近を中心として殆んど全面に廣がり、著しくアミノ酸の同定を妨げる。

従つて尿中の尿素、クレアチン、クレアチニン、食塩其他の有機、無機の塩類及びもしあればブドウ糖を除いたならば、鮮明なペーパー・クロマトグラムを作ることが出来るであらう。

總括及び考按

(1) 健康者の尿中遊離アミノ酸としては年令に關係なくグリシン、アラニン、バリン、グルタミン酸及びアスパラギン酸があり、83例中5例にロイシン-イソロイシンがあつた。しかし乳児では年長児及び成人に比して、やゝ少いやうである。これは乳児のとつてゐる蛋白質が完全で、無駄なく利用されるためであらう。

(2) 尿中の遊離アミノ酸の個人的な差異は、現在この方法では見出しえない。今後尿中の遊離アミノ酸だけを抽出しうようになれば、これも可能であらう。

(3) 幼児の一例でメチル・ヒスチヂンが排泄される者を見出した。これは佐竹氏^⑥によれば、既に Dent^⑨ Searle^⑩、及び Datta^⑪、によつて研究され、食肉の中

の Anserine (β -alanyl-methylhistidine) の水解産物で多肉の人尿にみられると言う。

(4) 健康者の糞便内の遊離アミノ酸としては年令に關係なくグリシン、アラニン、バリン、グルタミン酸アスパラギン酸、ロイシン群、ゼリン及びリヂン群があり、オルニチン、トレオニン、 α -アミノ酪酸、トリプトファン及びメチオニン或はチスチンが全例の約半数に認められた。

(5) 牛乳栄養児の糞便内遊離アミノ酸はその種類も量も著しく多い。これはその食餌が比較的蛋白質を多く含んでいることが、其原因の一つであらう。又母乳栄養児及び成人では比較的少ないが、これは母乳栄養児の食餌の母乳は比較的蛋白質が少く、しかも消化吸収率が極めて良いためであらうし、成人は蛋白質をとる量が少く、又消化吸収力が強いためであらう。

(6) 個人的な差異が明らかに認められ、これは食餌の差異と、その人の消化吸収力の差異によるものと考えられる。

(7) 尿中の遊離アミノ酸をペーパー・クロマトグラフィで分析する時に、個々のアミノ酸の自由な移動を妨げると思われる尿素、クレアチン、クレアチニン、食塩其他の塩化物及びブドウ糖のペーパー・クロマトグラム上の位置を定めたが、今後これ等を除く方法を考えたい。

結 語

健康者の尿及び糞便内の遊離アミノ酸をペーパー・クロマトグラフィによつて分析して、その成績を表示し、其の年令的或は個人的な差異について考察した。又ペーパー・クロマトグラフィの実施法と殊に尿中の遊離アミノ酸を分析する時に、アミノ酸の自由な移動を妨げる2・3の因子について検討した。

筆をおくにあたり高津教授の御授閲と、千葉大学腐敗研究所の佐竹一夫氏の御援助を深謝します。

本研究は文部省科学試験研究費で行つた。尙本論文の一部は第四回中僑医学会で発表した。

引用文献

- ① 加藤等, 日本小児科学会雑誌, 56, 1: 42, 1952
- ② J. B. Kirsner, J. Clin. Invest., 28: 716, 1949
- ③ Dunn, Arch. Biochem., 13: 207, 1947
- ④ Woodson, J. B. C., 172: 613, 1948
- ⑤ Scheffner et al, J. B. C., 175: 107, 1949
- ⑥ 佐竹, 化学の領域, 4, 8: 36, 1950
- ⑦ 吉川, 臨床医化学, II: 152, 1949
- ⑧ Martin, & Dunn, Arch. Biochem., 13: 103, 1947

- ⑨ Dent, Lancet, 11: 637, 1947, Biochem. J., 41: 240, 1948
- ⑩ Dunn, Am. Rev. Tuberc., 60, 4: 439-454, 1940
- ⑪ 加藤等, 児科診療, 13, 5: 35, 1950
- ⑫ Nutrit. Rev., 7, 3-4-5, 1949
- ⑬ Eckhardt et al, J. B. C., 177: 689, 1949
- ⑭ Barry, Arch. Biochem., 24: 179, 1949
- ⑮ Nutrit. Rev., 7, 11, 1949
- ⑯ Thompson, Arch. Biochem., 21: 210, 1949

- ⑮ B. F. Steele, J. Nutrit., 40, 1: 145, 1950
 ⑯ 市原, 蛋白質及びアミノ酸の生化学, 252-257, 1948
 ⑰ 宮尾, 臨床内科小児科, 6, 7: 304, 1951
 ⑱ 濱田等, 児科診療, 14, 2: 60, 1951
 ㉑ A. C. Ross, Lancet, 15: 15, 1950
 ㉒ Consden et al, Biochem. J., 38: 224, 1944
 ㉓ 柔田, 有機化学の進歩, 1: 26, 1942
 ㉔ 柴谷, 生体の科学, 1, 4: 177, 1949
 ㉕ 佐竹, 化学の領域, 3, 7: 264, 1949
 ㉖ 田中, 薬学研究, 21, 5-6: 79, 1949
 ㉗ 蕨岡, アメリカ医学, 4, 4: 165, 1949
 ㉘ 蕨岡, 薬学, 3, 2: 115, 1949
 ㉙ 谷, 佐竹, 有機化学の進歩, 8, 1949
 ㉚ 佐竹, 化学実験学一般操作法(改編) 1: 306, 1950
 ㉛ 宮木, 佐竹, 林, 日新医学, 37, 7: 256, 1950
 ㉜ 加藤, 児科雑誌, 54, 1: 56, 1950
 ㉝ Fischer, Nature, 161: 764, 1948
 ㉞ Consden et al, Biochem. J., 42: 443, 1948
 ㉟ Polson et al, Science, 105: 603, 1947
 ㊱ 武田, 第五回栄養食糧学会, 1951
 ㊲ 北條, 医学と生物学, 17, 2: 85, 1950
 ㊳ 田村等, 第五回栄養食糧学会, 1951
 ㊴ J. Block, Science, 108: 603, 1948
 ㊵ H. P. Bull, J. Am. Chem. Soc., 71: 550, 1949
 ㊶ R. H. Müller, 化学の領域, 5, 8: 6, 1951
 ㊷ Naftalin, Nature, 161: 763, 1948
 ㊸ s. ㊶
 ㊹ Woiwood, Nature, 161: 169, 1948
 ㊺ Rope et al, Biochem. J., 33: 1070, 1947
 ㊻ Fink et al, Science, 107: 253, 1947
 ㊼ Koston, J. Am. Chem. Soc., 69: 3151, 1947
 ㊽ Tomarelli et al, Science, 107: 130, 1948
 ㊾ Martin, Ann. New York Acad. Sci., 49: 141, 1948
 ㊿ Consden, Nature, 162: 359, 1949
 ① Fink et al, Nature, 160: 801, 1947
 ② Maw, Nature, 160: 261, 1947
 ③ 佐竹, Protein(蛋白質シンポジウム) 1, 6: 1, 1950
 ④ 佐竹, 私信
 ⑤ Dent, Biochem. J., 43: 169, 1948
 ⑥ Searle, Biochem. J. 48: 1, 1951
 ⑦ Datta et al, Nature, 168: 296, 1951

穿孔性虫垂炎

Avent C. H., Love C., Newman R. and Tendler M. T. : Surg., 27, 862, 1950.

著者等は最近10年間の穿孔性虫垂炎541例の治療成績を述べ、化学療法に進歩、抗生物質の発見、大量の輸血輸液の使用、麻酔法の改良等々によりその成績が著しく良好となつた事を指摘している。1929年から1938年の10年間に於ける穿孔性虫垂炎の死亡率は30.3%であつたが、1939年から1943年の10年間の夫れは11.27%と向上している。殊にペニシリン・ストレプトマイシンを使用し得る様になつてから極めてよい成績をあげている。

著者等は虫垂穿孔による腹膜炎の術后療法は大要次の通り行つている。

1. 酸素の持続的吸入
2. 胃腸管内容の持続的吸引
3. ストレプトマイシン0.5g, ペニシリン10万単位3時間毎筋注
4. 5%葡萄糖液(食塩水に溶解)1000c.c.毎朝8時静注
5. アミノ酸1000c.c.毎日午後4時静注(3日毎500c.c.の血液又は血漿を代用)
6. 10%葡萄糖液1000c.c.夜12時静注

(信大丸田外科 降旗抄)