Determination of Putrescine and Cadaverine in the Serum from Lepromatous Leprosy Patients

YOSHINORI TANAKA and TATSUO MORI

(Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

In the previous paper, Ishikawa reported that putrescine is always observed in the blood of lepromatous leprosy patient with *M. leprae* in his skin (LA LEPRO 36, 238 (1967)). It is well known that putrescine is one of the ptomains and causes the ptomaine poisoning. So the Ishikawa's report presents a serious problem confronting the lepromatous leprosy patients. In this paper we described the method of determination of putrescine and cadaverine in serum and then the result of measuring these ptomaines in the serum from lepromatous leprosy patients.

The determination of putrescine and cadaverine is as follows ;

Serum was extracted with n-butanol by McIntire's method. Butanol layer was acidified with 1N-HCl and then butanol was removed by lyophilization. Lyophilized residue was applied to a small column of Amberlite CG-50 according to the method of D. R. Morris with some modification (cf. Fig. 1).

By the use of Amberlite CG-50 putrescine and cadaverine could not mutually be separated, but could be separated from lysine, histidine, arginine, histamine etc. Standard curve of ninhydrin reaction showed that the concentration of putrescine or cadaverine was in proportion to the rate of ninhydrin reaction. The recovery of putrescine in normal human serum after butanol extraction and column chromatography was about 90%.

About 2 ml (varying from 1.6 to 4.5 ml) of serum from lepromatous leprosy patient with bacilli in his skin was tested for detection of putrescine and/or cadaverine, but in no case out of seven we did find more than 0.05μ moles of putrescine and/or cadaverine in the serum.

Ishikawa obtained the serum from 5 ml of blood, so about 2 to 2.5 ml of serum was used for detection of putrescine. The quantity of serum used for determination of putrescine by Ishikawa is almost the same as used by us. We do not believe that the Ishikawa's method is far better than that used by us.

Putrescine and cadaverine are known to be formed by decarboxylation from ornithine and lysine respectively in living organisms. From our result we can not decide whether *M. leprae* has decarboxylase activity or not, because the products of this bacillus may be metabolized to non-toxic materials by human enzyme system to maintain the homeostasis. For example, even if the putrescine is produced, it will perhaps be oxidized by diamine oxidase in human liver. It seems to be necessary to measure directly decarboxylase activity in the bacillus.

癩腫癩患者血清中のプトレッシンおよび カダベリンの定量

田 中 吉 紀 森 竜 男

大阪大学微生物病研究所癩部門

(主任 伊藤利根太郎教授)

(受付 1971年 9月 21日)

緒 言

さきに、石川¹⁾は癩菌 (*Mycobacterium leprae*) 保有癩腫癩患者 (L-L 患者) 血清中にプトレッシンが存在すると報告している。

プトレッシンはカダベリン等と共にプトマインと呼ばれ、特に魚肉、獣肉等が腐敗菌によって分解されたときに現われる。おそらくは腐敗菌の持つ脱炭酸酵素活性によるものと考えられている。人がそのような食物を摂ったとき、プトマインは腸管から吸収されて食中毒 (プトマイン中毒) の原因となる。もし、L-L 患者血中にプトレッシンが存在するとすれば、一種の中毒症の状態に恒常化されていることになり、L-L 患者の病態生理学上重大な問題である。

一方、K. Prabhakaran 等²⁾は癩菌浮遊液、グルタミン酸、ピリドキサルリン酸、および酢酸緩衝液 (pH 5.0) を90分間、37°Cにおくと、 γ -アミノ酪酸が出現し、したがって、癩菌にはグルタミン酸を γ -アミノ酪酸にするグルタミン酸脱炭酸酵素が存在すると報告している。

このようにオルニチン脱炭酸酵素 (オルニチン→プトレッシン) およびグルタミン酸脱炭酸酵素 (グルタミン酸→ γ -アミノ酪酸) の活性が癩菌にみられるのであれば、他のアミノ酸脱炭酸酵素活性も癩菌にあるかもしれない。もしそうだとすると、オルニチンからできるプトレッシン以外にリジンからカダベリンもできるのではないだろうか。さらにこれらのプトマインと癩腫癩特有の臨床症状との関係はどのようにになっているのであろうか。これらの問題を考えるために、L-L 患者血清中のプトレッシン、カダベリンの分離、定量を試みた。

実験材料と方法

試薬：標準物質として、リジン、ヒスチジン、アルギニン (以上和光純薬) プトレッシン (Sigma)。カダベリ

ン (東京化成)、ヒスタミン (片山化学)、スベルミジン (東京化成) を用いた。エタノールは一級品を蒸留して用い、その他の試薬は市販特級品である。

L-L 患者血清：大島青松園、阪大微研癩部門外来の患者より採血、血清分離を行なった。

正常人血清：阪大附属病院皮膚科外来にて検査用に供せられた血清の一部をプールして用いた。

ブタノール抽出³⁾：血清 2 ml を生理食塩水で 4.5 ml に希釈し、アルカリ塩混合物 1.40 g (Na_2SO_4 , 1.05 g および $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g) を加え、振盪溶解後、n-ブタノール 5 ml を加えて 30 分振盪攪拌し、2000 rpm 15 分遠沈する。回収率を上げるためにブタノール抽出は 2 回行ない、ブタノール層を梨型フラスコに集めて、IN-HCl 1 ml を加えて酸性とし、温浴上で吸引蒸発させるか、あるいは凍結乾燥を行なった。

カラムクロマトグラフィー：Morris 等の方法⁴⁾を一部修正して用いた。ブタノールを除去した残渣を 0.5 ml の蒸留水に溶かし、カラムにかけろ。カラムは Amberlite CG-50 (type II) を出発緩衝液の 0.438M ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 5.7) で平衡化したものをつめておく。溶出は 0.438M ピリジン-酢酸緩衝液 pH 5.7 および 0.5M ピリジン-酢酸緩衝液 pH 4.4 で直線的濃度勾配溶出法によつた。重量式フラクションコレクターで 2 ml ずつ分画した。

ニンヒドリン反応：千谷等によつて修正された KCN 法⁵⁾にしたがって行ない、HITACHI-PERKIN-ELMER 139 分光光度計で、1 cm の吸収セルを用いて比色定量した。

ペーパークロマトグラフィー：フラクションコレクターで分取し、ニンヒドリン反応で得られた各ピークの均一性を見るために、各ピークに相当するフラクションをペーパークロマトグラフィーで調べた。東洋濾紙 No. 51 を用い、ブタノール-酢酸-ピリジン-水 (4:1:1:

Fig. 1 Column chromatography of the standard solution: resin; Amberlite CG-50 type II pyridinium-form, column; 0.9×11 cm, flow rate; 2 ml/1 fraction/20 min. at room temperature ($25-30^{\circ}\text{C}$)

start buffer; 0.438M pyridinium acetate buffer pH 5.7

linear gradient; 0.438M pyridinium-acetate buffer pH 5.7 100 ml

0.5M pyridinium-acetate buffer pH 4.4 100 ml

The concentration of pyridinium is shown by the dotted line. The arrow indicates the start point of linear gradient.

Fig. 2 Standard curve of the putrescine:

Ninhydrin reaction was performed with 0.5 ml of the various concentration of putrescine solution (control; 0.5 ml of distilled water), 0.5 ml of 0.2M citrate buffer and 1.0 ml of KCN-ninhydrin solution. The reaction mixture was incubated at 100°C for 15 min and then cooled in running water. 3.0 ml of 50% ethanol was added and the solution was measured optical density at the wave length of $570\text{m}\mu$ (HITACHI-PERKIN ELMER 139 spectrophotometer).

2)の溶媒で上昇法を用いた。発色はニンヒドリン溶液 (0.2% w/w 水飽和ブタノール) 噴霧, 室温一夜放置でみた。ペーパークロマトグラフィーの一部は n-プロパノール・トリエチルアミン・水 (85:3:15) で展開し, アルギニンを確認するためにフェナントレンキノン反応⁷⁾による蛍光をみた。

実験結果

標準物質のカラムクロマトグラフィー: 標準物質をカラムクロマトにかけた溶出位置は Fig. 1 の通りである。各ピークについてペーパークロマトを行ない, 標準物質のスポットと比較した結果, Fig. 1 中の I) はアルギニン, II) プトレッシンとカダベリン, III) ヒスタミン, IV) スペルミジンが確認できた。さらに別の試みでリジンおよびヒスチジンはアルギニンの直前に溶出された。

ニンヒドリン反応によるプトレッシンの標準曲線: ニンヒドリン反応の条件は Fig. 2 に記した通りである。反応は 100°C 15 分間加熱し, 流水中で急冷して希釈液 (50% エタノール) を加え, O. D. を測定する。実験は triplicate で行ない Fig. 2 の各点が測定値である。0.05 μmol から 0.5 μmol の範囲で直線を示し, 0.5 μmol のプトレッシンに対して吸収は, 1.80 であった。カダベリンに関してもほぼ同様の標準曲線が得られた。

Fig. 3 Column chromatography of the normal human serum :
resin ; Amberlite CG-50 type II pyridinium-form, column ; 0.9×11.5 cm
flow rate ; 2 ml/1 fraction/18 min. at room temperature ($20-23^{\circ}\text{C}$)
The elution procedure was the same as Fig. 1.

Fig. 4 Column chromatography of the putrescine in the human serum :
2.0 ml of the normal human serum and $2.0 \mu\text{moles}$ of putrescine (volume
of $200 \mu\text{l}$) were taken to the butanol extraction. The butanol was
lyophilized and then half of the residue was loaded on the column.
column ; 0.9×10 cm flow rate ; 2 ml/1 fraction/18 min. at room
temperature (about 15°C)

The resin and the elution procedures were as described in Fig. 1.
This elution pattern was shown in Fig. 4(a). We calculated the yield of
putrescine from the area with the oblique line. (Fig. 4(b)).

回収率：正常人血清 2 ml を用いて、ブタノール抽出、
カラムクロマトグラフィーを行なった溶出パターンは
Fig. 3 の通りである。素通り物質あるいは塩基性アミノ
酸以外に、プトレッシン、カダベリン、ヒスタミン等の
ピークは認められない。さらに 2 ml の正常人血清に 2.0
 μmol のプトレッシンを加え、ブタノール抽出後、半量

をカラムクロマトグラフィーにかけた。Fig. 4a はその
溶出パターンである。ベースラインより上の部分の面
積 (Fig. 4b の斜線部分) を計算し、標準曲線より得ら
れた $0.5 \mu\text{mol}$ のプトレッシンに対する $\text{O.D. } 570 \text{ m}\mu, 1.80$
を用いると、加えたプトレッシンの回収率は約 90% とな
った。

Fig. 5 Column chromatography of the serum from lepromatous leprosy patient: Sample extracted with n-butanol from the serum was loaded on the column; column; 0.9×10.5 cm flow rate; 2 ml/1 fraction/20 min. at room temperature ($15-20^{\circ}\text{C}$)

The resin and the elution procedure were as described in Fig. 1.

L-L 患者血清中のプトレッシン, カダベリン, ヒスタミンなど: L-L 患者血清 2 ml から出発したブタノール抽出, カラムクロマトグラフィーの結果は Fig. 3 と同様, 素通りに近い状態で溶出されてくる物質のほかに, ニンヒドリン陽性物質を認めることはできなかった。

用いた L-L 患者血清量が 1.6 ml から 4.5 ml までいろいろ変化しているが, 全 7 例の L-L 患者血清中にプトレッシンあるいはカダベリンが認められた症例はなかった。

考 察

血中プトレッシンの定量化を試みた。カラムクロマトグラフィーでは, 最初にリジン, ヒスチジン, アルギニン等の塩基性アミノ酸が溶出され, 続いてプトレッシン, カダベリン混合物, ヒスタミン, スペルミジンが順に現れる。今回われわれの条件では, プトレッシン, カダベリン相互の分離は不可能であった。D. R. Morris 等⁴⁾はカラムの温度を上げて, これら二者の相互分離に成功している。

われわれの方法では標準曲線から血清中 $0.05 \mu\text{mol/ml}$ の物質の検出が可能であるのだが, 今回, L-L 患者血清, 正常人血清中には共にヒスタミンさえも検出されなかった。

Biochemist's Handbook⁸⁾によると, ヒスタミンは血中に $2 \sim 8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 平均 $5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 存在するという。したがって, 血清中には平均 $5 \mu\text{g}/50 \text{ ml}$ と考えられる。ヒスタミンの分子量は 111.2 だから, $5 \mu\text{g}/50 \text{ ml}$ は $0.05 \mu\text{mol}/50 \text{ ml}$ に相当し, 普通, 出発材料を数十

ml にしないと, $0.05 \mu\text{mol}$ の検出は不可能である。今回の実験では数 ml の血清しか用いていないので, この量では正常レベルのヒスタミンを検出できなかったわけである。

石川は 5 ml の血液から血清分離しているので, 血清は $2 \sim 2.5 \text{ ml}$ と考えられ, われわれの用いた血清量とはほぼ同量といえるだろう。彼の行なったエーテル抽出, ペーパークロマトグラフィーなどでの損失を考えたとき, もし石川の言うように, L-L 患者血清中のプトレッシンがペーパークロマトグラム上でニンヒドリン発色陽性のスポットとして現われるのであれば, 当然われわれの用いた方法でも陽性になるはずである。

癩菌にオルニチンおよびリジン脱炭酸酵素活性が存在するか否かについては, 今回の実験からは不明である。たとえ, それらの酵素活性によって, プトレッシン, カダベリンが生成されたとしても, 生体の解毒機構, たとえば, 肝臓のジアミン酸化酵素活性などによって分解されてしまう可能性があるからである。癩菌の脱炭酸酵素活性を直接測定するか, L-L 患者の肝臓のジアミン酸化酵素活性を測定して間接的な証拠を集めることが望ましいと思われる。

結 論

1. ブタノール抽出および弱酸性陽イオン交換樹脂を用いて血中プトレッシン, カダベリンの定量化を行ない, プトレッシンについては約 90% の回収率を得た。

2. 癩腫癩患者血清中にプトレッシン, カダベリンを見出すことはできなかった。

謝辞：癩腫癩患者血清，正常人血清を供与された大島青松園，阪大微研癩部門外来，阪大附属病院皮膚科関係者に心から感謝いたします。

文 献

- 1) 石川正生：癩腫癩患者血液中のプトレッシンについて レプラ 80 238-241(1967)
- 2) K. Prabhakaran and B.M. Braganca: Glutamic acid decarboxylase activity of *M. leprae* and occurrence of γ -amino butyric acid in skin lesion of leprosy. *Nature* 196 589-590 (1962)
- 3) F. C. McIntire, L. W. Roth and J. L. Shaw: The purification of histamine for bioassay. *J. Biol. Chem.* 170 535-544(1947)
- 4) D.R. Morris, K.L. Koffron and C. Jokstein: An automated method for polyamine analysis. *Anal. Biochem.* 30 449-453(1969)
- 5) 千谷晃一，矢追義人：蛋白質・核酸・酵素臨時増刊，生物化学実験法IV. 70-130(1965)
- 6) D. Dubin and S.M. Rosenthal: The acetylation of polyamines in *E. coli*. *J. Biol. chem.* 235 776-782(1960)
- 7) Shigeki Yamada, Harvey A. Itano: Phenanthrenequinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines. *Biochem. Biophys. Acta* 130 538-540 (1966)
- 8) *Biochemist's Handbook* edited by Cyril Long 1961 page 852 E&F. N. SPON Ltd London