ペーパグラフィーによる血液及び 尿中遊離アミノ酸の定量

Quantitative determination of free aminoacids in Blood and Urine by means of Papergraphy

(昭和 28 年 1 月 21 日受理)

福井 忠孝 保田 正人
(Tadataka Fukui) (Masato Yasuda)

緒 言

血液、尿中遊離アミノ酸の消長を知る事はアミノ酸代謝研究上重要であり Papergraphy の進展に伴い定性面では多くの報告がみられる。Consden 等が本法によるアミノ酸定量を試みて以来各種各様の操作による定量法が発表されたが、これ等を大別すると次の様になる。

- (1) 呈色斑比較法：⁽¹⁻⁸⁾ 呈色斑の長さ、面積等の比較又は既知濃度アミノ酸呈色斑との比較。
- (2) 呈色消滅限界濃度法：^(6, 9, 10) 試料稀釋による呈色消滅濃度により定量。
- (3) 銅鹽法：⁽¹¹⁻¹⁴⁾ 展開前後に銅鹽とし抽出定量する。
- (4) 抽出比色法：^(1, 4, 15-17) 呈色斑の抽出又は對照試験法で確

認したアミノ酸相當部分を抽出後呈色させ比色を行う。

然しこれ等は操作、精度の點で更に一考を要し、二次元展開においては困難を伴う場合が多い。著者等も Papergraphy による定量化を試みていたが血液、尿中遊離アミノ酸については多くの方法條件の中次の呈色斑抽出比色法によつて最も好成績が得られたので主としてその方法を述べ、併せて定量成績の一部を報告する。尙之等の條件に對し檢討については別に報告する豫定である。

實驗方法

1. 試料の採取、調製

試料は第 1 表及び第 1 圖 (A) に示す方法で調製した 4 種である。未處理血液は濾紙上で凝固し、又血漿は展

第 1 表 試料の採取・調製法

(試料は冷蔵庫中に保存する)
(*遠心分離の場合には有蓋容器を使用し液の蒸發を防止する)
(**蒸發乾固により鹽酸が完全に驅逐されている時は不要)

第 1 圖 濃縮蒸發裝置(A), 試料減圧濾紙採取裝置(B)

開時 Rf (0.90, 0.00) に生ずる青色の呈色斑 (不明物質) によつて分離能が著しく阻害される爲エタノールを用いてこれを除去した。これらの試料の原試料に対する濃度は、各試料 1 μ l に對し血漿除蛋白試料は 0.5 μ l, 血液除蛋白水解試料は 2.5 μ l, 尿試料は 1 μ l, 尿除蛋白水解試料は 2.5 μ l に相當する。

2. 定性定量操作

A. 試料の採取, 展開準備

(1) 試料の採取: 第 1 圖 (B) に示す様に小型濾紙をガラス圓筒にて挟み一定量の試料を濾紙面に減圧下常濃縮を行ひながら短型を一次元方向とする楕圓形に採取する。(同量 2 枚)

(2) 標準アミノ酸液添加: 2 枚の濾紙の試料上に夫夫酸性標準液 (加鹽酸, pH 1) の異つた量を吸收添加する。

(3) 5% 重曹水添加: 豫知量を添加して標準液を中和する。

(4) H_2O_2 添加: Cystine, Methionine 定量時酸化處理の爲 5 分間隔で 3 回添加する。

(5) 展開準備: 濾紙を圓筒形とする。

血液, 尿中の遊離又は peptide 狀アミノ酸量は極めて微量であるが, 尿素鹽類をかなり多量に含有する爲一定限界以上の濃縮時に加熱に定量に著しい影響を與える。然し本法によると短時間に從來の數十倍量の試料採取が出来, 分離能, 定量にも悪影響を認められない。Ninhydrin による呈色は變動しやすい故常に標準液を添加する事によつて誤差原因の除去をはかつた。展開時試料並に標準液は可及的中性である事が必要で, 酸, アルカリの残存は分離, 發色に著しい障害を與える。試料の展開使用量は各含有アミノ酸濃度が 6 γ 以下となる事が望ましい。定性の場合には 1 枚の濾紙により (2) (3) [時には (4)] を省略する。

B. 展開: 密閉容器中で上昇法により 2 枚の濾紙を同時に展開する。(展開劑約 10cc)

- (1) 一次元展開: 展開劑は 80% フェノール水。
- (2) 乾燥: 恒溫器中に釣り下げ, 70~75°C, 40~60 分。
- (3) 次元轉換
- (4) 二次元展開: 展開劑は醋酸-ブタノール-水 (1:4:1)
- (5) 乾燥: (2) に同じ

展開溫度は普通室温では影響は認められない様であるが, 著者等は恒溫室を使用した。

C. 發色: 第 2 圖に示す装置を用ひ遮光下にて可及的同一條件下で行う。

第 2 圖 發色裝置

(註 1) 發色裝置と乾燥裝置とは別個のものを使用する

(註 2) 第 1 回發色時には水 0.5ml, 第 2 回發色時には 0.5% アンモニア水 0.5ml を濾紙に滴下して容器の口を覆う。

但しこの條件は容器の大きさによつて影響をうける。

(1) 發色準備: 2 枚の濾紙を支持木の兩側にピンで止める。

(2) 第 1 回 Ninhydrin 液の噴霧: 1.5% 溶液 (水飽和ブタノール) を濾紙全面に薄く噴霧する。

(3) 第 1 回發色: 70 $\pm$ 1°C, 容器上部を覆う濾紙より發生する水蒸氣中で 7 分間加熱。

(4) 第 2 回 Ninhydrin 液の噴霧: 呈色部にのみ噴霧。

(5) 第 2 回發色: (3) と同様アンモニア氣流中で 8 分間加熱。

(6) 呈色部位の記入

呈色消滅限界濃度及び發色度は條件差が著しいが, 本法によると文献値よりかなり低濃度でも發色を認められ且つ一定に近い發色度が得られるが, 尙不明の原因によつて若干の變動の生ずる事は避けられない。

D. 含有アミノ酸の定性: Rf 値, 色調及び純アミノ酸添加等によつて確認する。

E. 含有アミノ酸の定量

(1) 抽出: 各アミノ酸の呈色部位を切り取り小試験管にて水飽和ブタノール 3cc にて抽出。

(2) 吸光度測定: Electrophotometer 又は Pulfrich Gradation Photometer により波長 568m μ の Filter を用い液層 10mm で測定。

(3) 含有量の算出: 同時展開・発色によりアミノ酸濃度が 6 γ 以下の場合には吸光度と濃度の間には Beer の法則が成立し且つ圖表上この直線は原點を通る故次式によつてアミノ酸含有量を算出する事が出来る。

$$X = k \left\{ (L - S) \frac{K_s}{Kl - K_s} - S \right\} m$$

X: 原試料中含有量 (mg/dl)

L: 標準液多量添加量 (μ l)

S: 標準液少量添加量 (μ l)

Kl: 添加量 L の場合の測定吸光度

Ks: 添加量 S の場合の測定吸光度

m: 標準液 1 μ l 中アミノ酸含有量 (γ)

k: 各展開試料に対する恒数

$$\text{除蛋白水解試料の場合 } k = \frac{100(a+b)d}{a \cdot c \cdot e}$$

$$\text{血漿除蛋白試料の場合 } k = \frac{100(b+f)}{e}$$

$$\text{尿試料の場合 } k = \frac{100}{e}$$

a: 原試料(血液, 尿) 液量 (ml)

b: 除蛋白劑使用量 (ml)

c: 加水分解使用量 (ml)

d: 蒸發残渣溶解量 (ml)

e: 展開使用液量 (μ l)

f: 除蛋白に使用した血漿量 (ml)

本法による添加アミノ酸の回収率は 90~105% を示したが、定量を行う場合同一試料について數回の實驗により平均値を求める。

實驗成績

本法によつて健康な成人男子について測定を行つた。

次にその一例を示すと、展開使用液量に第 2 表に示す様な量で何れも原試料の 25 μ l に相當する。標準液はその 1 μ l 中に各測定アミノ酸の 2 γ を含むものを 1.5 μ l 及び 0.5 μ l 添加使用した。

定性實驗により各試料共 15 種のアミノ酸を確認し、非水解試料では若干の peptide と想像される不明の呈色斑を見出したが、それ等の中所謂 under alanine (Seryl-glycyl-glycine) が特に著量に認められた。これ等の定量平均値は第 2 表に示す如くである。遊離アミノ酸量は採血採尿時の條件差による變動が想像されるが、Bioassay (19, 20) による文献値と比較すると血液ではかなり良く一致しているが尿では若干の變動が認められる。

第 2 表 血液及び尿中遊離アミノ酸含有量 (mg/dl) の 1 例

展開試料 アミノ酸	血 液		尿 (130ml/2hr)	
	血漿 除蛋白液	血液除蛋白 水解液	尿	尿除蛋白 水解液
			25	10
leucine & isoleucine	3.6	3.4	3.4	3.2
tyrosine	1.2	2.6	1.2	1.6
alanine	7.2	3.8	8.4	3.0
glycine	5.2	7.0	5.8	10.4
histidine	1.2	1.6	0.8	0.8
glutamic acid	3.2	9.0	3.6	9.2
phenylalanine	1.6	1.2	0.8	0.4
valine	3.2	3.6	3.6	3.6
arginine	2.4	2.8	3.2	2.8
methionine*	1.2	2.0	3.2	4.0
aspartic acid	2.8	7.2	3.2	14.4
cystine**	2.4	6.8	4.4	7.4

* methionine sulphoxide として定量

** cystic acid として定量

總 括

Papergraphy による血液、尿中遊離アミノ酸の定量操作の概略を述べたが、本法によると定量化の場合最も困難を胚胎する原因と考えられる Ninhydrin 反應による發色度の變動による誤差を除去する事が出来、又從來の呈色消滅限界濃度以下においても發色が認められ且つ低濃度において良く Beer の法則が成立する事を利用してかなりの定量成績を収める事が出来た。

本法は使用資料も比較的少く、溶劑等も入手しやすく且つ廉價なものであり、二次元展開においても從來みられる様な煩雜さや困難性は少いと考えられる。

本研究にあたり御指導を賜つた教室主任藤本薫喜教授に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) H. B. Bull, J. W. Hahn, V. H. Baptist: J. Am. Chem. Soc., 71, 550 (1945).
- 2) R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin: Biochem. J., 42, 443 (1946).
- 3) A. Polson, V. M. Mosely, R. W. G. Wyckoff: Science, 105, 603 (1947).
- 4) L. Naftalin: Nature, 161, 763, (1948)
- 5) R. B. Fischer et al.: Nature, 161, 764 (1948).
- 6) R. J. Block: Science, 108, 603 (1948).
- 7) L. S. Fordist, R. Q. Blockwell: Science, 109, 314 (1948).

- 8) R. B. Fischer: Science, 109, 469 (1949).
- 9) 武田, 山極, 紫谷: 栄養食糧會誌, 3, (1950).
- 10) 北條: 醫學と生物, 17, 235 (1950)
- 11) R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin: Biochem. J., 38, 224 (1944).
- 12) A. J. Woiwood: Nature, 161, 169 (1948).
- 13) Jones: Biochem. J., 42 (1948).
- 14) Fitzpathch: Science, 109, 469 (1949).
- 15) J. Awapara: J. Biol. chem., 178, 113 (1949).
- 16) 田村, 河田: 栄養食糧會誌, 3, 217 (1950).
- 17) 田中, 波多野, 香月: proteine, 12 (1951).
- 18) 谷久, 佐竹: 有機化學の進歩, 8, 116 & 372 (1949).
- 19) 田村: 醗酵學の進歩, 1, 154~156 (1950).
- 20) M. S. Dunn et al.: Am. Rev. Tuberculosis, 60, 439 (1949).
- 21) C. E. Dent: Biochem. J., 41, 240 (1947).

(長崎大・醫・衛生學教室)

カロチンよりビタミンAへの生體門轉換, アロキサン注射による糖尿病鼠を用いた實驗

糖尿病にかかった人間ではカロチンよりビタミンAへの變換が正常人に比較して遅い事が知られている。生後3週間の同腹の鼠を4週間ビタミンA缺乏食で豫備飼育した後、數群に分け、20mgのalloxan-monohydrateを皮下注射し、實驗的に糖尿病を發現させる。(血糖量對照群70~100mg/100mlに對し處理群で150mg/100ml以下のものはすべて實驗より除外する)。次にすべての鼠に對して2000 μ gのカロチンを胃腔中に注入する。36時間後に殺し肝臓中のビタミンA量を測定する。その結果、アロキサン處理鼠では未處理鼠に比較して $1/4$ 量のビタミンAしかカロチンより轉換出來なかつた、然しこ

れは處理鼠の方がビタミンA貯藏力が低いのも、又ビタミンAの異常分解でもなくカロチンよりビタミンAへの轉換能力が低下している爲である事はビタミンAを投與した時には兩群ほぼ同一量を貯藏していた事から知られる。

In vivo conversion of carotene to, vitamin A in alloxan diabetes. Albert Edward Sobel, Abraham Rosenberg and Harvey Adelson.

Arch. of Biochem. and Biophys., 44, 176-180 (1953)

(福 場)

ビタミンAの *in vitro* 加水分解及びエステル化。

著者等によつて小腸ではアルコールの形で存在するビタミンAが小腸上皮細胞によつて吸収され、エステルになつてから血液及び淋巴液中に移行する事は既に明かになつた所である。然しながら血液中にはエステル型よりもアルコール型のビタミンAが多いのは血清中のエステラーゼによつてエステル型が加水分解を受ける爲である。このエステラーゼが肝臓のホモゲネート中に存在する事は二三の人々によつて既に報告されているが、又その存在を疑う結果も著者等によつて得られた。著者は本報に於てこの點を再検討した。シュナイダーの方法によつて肝臓ホモゲネートより細胞核、ミトコンドリア、及び殘餘の細胞質の三劃分を分離し、ホモゲネート及び各

劃分について天然に存在するエステル型ビタミンA及びビタミンA- β -パルミテートを基質としてエステラーゼ作用を試験したがエステラーゼ作用は認められなかつた、然しビタミンAアセテートに對しては作用を有し殊にミトコンドリア及び細胞核が最もその作用が強力であつた。又小腸及び腎臓のホモゲネートはビタミンAをエステル化する事が出来るが同一反應を肝臓ホモゲネート及び各劃分について證明する事は出來なかつた。

The *in vitro* hydrolysis and esterification of vitamin A. R. F. Krause and L. T. Powell

Arch. of Biochem. and Biophys. 44, 57-62 (1953)

(福 場)