126. 萩原武美雄： 沝紙微量電気泳動法の応用 (第2報*)

Jaffé 反応陽性物質の沝紙電気泳動

Fumio Hagihara: Paper Microionophoresis. II. Paper Microionophoresis of Jaffé Reaction-positive Substance.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

沝紙微量電気泳動法を応用して Jaffé 反応陽性物質 (以下 J 反応陽性物質) の検出を試みた。J 反応陽性物質即ちクレアチン、クレアチニンの微量検出法としては Maw¹⁾ 及び Ames, Rinsley²⁾ らによつて沝紙クロマトグラフィーを応用した方法が報告されているが、これらはいづれも検体の前処理を必要とし、又展開、分離に長時間を要する。著者の今回の方法によれば、J 反応陽性物質は短時間の泳動操作でよく分離検出できる。

先づクレアチン、クレアチニンの純品についてそれぞれ泳動させた結果は Table I に示す通りである。なお 0.5 N アンモニア水を緩衝液として泳動を行つた結果は泳動速度がきわめて遅く、クレアチン、クレアチニンの良好な分離を行うことが出来なかつた。従つてクレアチンとクレアチニンの分離には酸性緩衝液を用いる方がよい。又クレアチンはそのままでは J 反応を呈さないので、泳動後沝紙を 100° に 3 時間加熱して、クレアチンをクレアチニンに変化させてから試薬を噴きつけ呈色せしめた。数例の健康人の尿について試験した結果、クレアチニンは常に検出されたが、検体によつてはクレアチン及びその他の J 反応陽性物質も検出することが出来た。J 反応を呈する物質としては、 $-\text{CO}\cdot\text{CH}_2-$ 基をもつた化合物、例えばアセトン、 β -オキシ酪酸、グリコチアミジン、ヒダントインなどが知られている。又還元性の物質例えば硫化物、第 1 鉄塩、ブドウ糖、果糖、インシュリン、ペプトンなども熱時にはピクリン酸を還元してピクラミンとするので J 反応によつて同様に呈色することが報告されている。しかし著者の用いた反応条件ではアセトン、 β -オキシ酪酸などは加熱によつて揮散或は分解してしまふので、グリコチアミン、グリコチアミジン、ブドウ糖などについて検討を加えた。その結果は Table I に示した通りであつて、グリコチアミン、グリコチアミジンは陽性であるが、ブドウ糖、果糖は沝紙上ではピクラミンを生成し難く、J 反応陰性であつた。なお Table I に示すようにクレアチンとグリコチアミン、クレアチニンとグリコチアミジンは泳動距離が近似するので、それぞれ分離検出することは困難であつた。

又バンチ氏病、子宮癌、再生不能性貧血、悪液質、脈絡膜上皮腫、妊娠中毒などの患者の尿中に排泄される J 反応陽性物質の検索に応用した結果は Table II に示した通りである。バンチ氏病、脈絡膜上皮腫などに於ては著しいクレアチンの排泄を認めたが、疾患によつてはクレアチン、クレアチニン以外にも J 反応陽性物質が相当量認められ、このことは再生不能性貧血患者の尿に於て特に著しかつた。従つて臨床的にクレアチン、クレアチニンの排泄を検する場合には、これらの J 反応陽性物質の存在を考慮して、予め沝紙電気泳動法によつて尿中の成分の分離を行つて後に定性することが望ましい。

Table I. Electromigration of Various Jaffé Reaction-Positive Substances on Filter Paper

Substances	M. D. I (cm.)	M. D. II (cm.)	M. D. A.
Creatine	2.4	9.5	3 γ
Creatinine	9.2	17.0	2 γ
Glycocyamine	2.2	9.2	—
Glycocyamidine	9.0	17.0	—
Glucose	—	—	—
Fructose	—	—	—

I = Buffer: Acid phthalate buffer, pH 5.9; Volt.: 600 V, Cur.: 4~6 mA/8 cm, Dur.: 120 min.

II = Buffer: 0.25N Acetic acid; Volt.: 800 V, Cur.: 4 mA/8 cm, Dur.: 60 min.

* 鈴木: 電気泳動法の応用に関する研究 (第5報).

1) G. A. Maw: Nature **160**, 261 (1947); Biochem. J. **43**, 139 (1948).2) S. R. Ames, H. H. Rinsley: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **69**, 267 (1948).

Table II. Urinary Excretions of Jaffé Reaction-Positive Substances in Various Diseases

Diseases	Creatine 9.3*	Creatinine 17.0*	Unknown I 1.5*	Unknown II 9.0*	Unknown III 21.5*
1 Normal I	—	++	—	—	—
After heating	—	++	—	—	—
2 Normal II	—	++	+	—	—
After heating	—	++	+	—	—
3 Normal VI	—	++	+	—	—
After heating	+	++	+	—	—
4 Banti's disease	—	±	—	—	—
After heating	++	+	—	—	—
5 Uterine carcinoma	—	++	++	—	—
After heating	—	++	++	—	—
6 Aplastic anemia	?	++	+	++	++
After heating	?	++	+	++	++
7 Cachexia	—	+	—	—	—
After heating	—	+	—	—	—
8 Cholio epithelioma	—	++	—	—	—
After heating	++	++	—	—	—
9 Pregnancy intoxication	—	++	—	—	—
After heating	+	++	—	—	—

* Migration distance under same conditions as II in Table I.

本研究に際し終始御指導を賜った京都大学薬学科高木誠司教授に深く感謝する。なお本研究の費用の一部は文部省試験研究費によつたもので、ここに謝意を表する。

実 験 の 部

1) 沝紙微量電気泳動 鈴木、前川の装置³⁾により泳動させて後、沝紙を乾燥。次に1%ピクリン酸ナトリウム液を沝紙が黄色になる迄噴きつけ、次にN NaOH液を噴霧するとJ反応陽性物質は黄色の地に橙赤色の斑点として現われる。クレアチンを検出する場合には沝紙を100°に3時間加熱後上記試薬を噴きつけ呈色せしめる。

2) 試料の調製 トルエンを防腐剤として採取した尿を減圧下に濃縮後、80%アルコールで抽出し、アルコールをとばして少量の水にとかしたものを泳動用の試料とした。尙未処理の尿1滴をそのまま試料としても、クレアチン、クレアチニンのみの検出にはさしつかえない。

京都大学医学部薬学科

Summary

Paper electrophoresis was utilized for the detection of substances giving positive Jaffé reaction, and creatine and creatinine were separately detected by simple procedures. This method was applied for the urine analysis of normal persons in pregnancy, and in patients suffering from Banti's disease, uterine carcinoma, pernecious anemia, cachexia, and chlio epithelioma. Urine from such persons contained a fair amount of substance giving positive Jaffé reaction, besides creatine and creatinine, and the tendency was especially marked in the case with pernecious anemia. The separation of creatine and glycothiamine, and of creatinine and glycothiamidine was found difficult.

(Received March 6, 1954)

3) 鈴木、前川：本誌 71, 1298 (1951).