

石黒伊三雄, 高木克育, 内藤純子: 正常人の尿中に発現する蛍光物質について

Isao Ishiguro, Katsuyasu Takagi and (Miss) Junko Naitō:
Studies on the Fluorescent Substances in Human Urine

Observations were made of fluorescent substances in the human urine and the following results were obtained.

Experimental materials were extracted by several methods, and after concentration of extracts distribution by paper chromatography was carried out. The fluorescent spots were examined for color and strength of fluorescence and Rf values were estimated. Most fluorescent substances were found within Rf 0.3 to 0.7 and their colors were blue, violet, greenish blue, bluish violet and yellow. They were observed as clearly separate spots on the paper when a developer of methanol · butanol · benzene · H₂O (2 : 1 : 1 : 1) was used.

緒 言

尿が蛍光を有することは古くから知られているが、この蛍光が如何なる物質に由来するか、また体内代謝と尿中蛍光物質との関連性などについての全般的な研究は余り進んではいない。

さきに石黒¹⁾ はペーパークロマトグラフィーによる分離確認法で尿中に発現する蛍光物質の分布状態を調べ、その分布が疾病によりかなり特異性のあることを観察した。その後これに従って消化器疾患²⁾、悪性腫瘍³⁾、白血病⁴⁾、妊娠中毒症⁵⁾ など各種疾患時における尿中の蛍光物質と疾病との関連性についていくつかの報告がなされている。

また従来より人尿中のビタミン B₂ はルミフラビン蛍光法⁶⁾ により測定されているが、この際、B₂ 以外に数多くの蛍光物質が存在し、いわゆる盲蛍光物質として B₂ 測定時の蛍光を阻害する物質の除去法が種々工夫されている。しかし、このような盲蛍光物質の本態については石黒⁷⁾ がその一つとしてアントラニール酸およびその抱合体を指適しているが、その他の多くは未だ明らかにされていない。

このように尿中に発現する蛍光物質の検索は体内代謝の推移を考察し、病態に伴う代謝障害を知る有力な手懸りとなり、臨床上的診断の目的や生体内における代謝機構の解明に極めて興味ある問題と考えられる。

一般に尿中に発現する蛍光物質として知られているのは(1)トリプトファン系代謝産物、(2)ビタミン B₂ およびその関連物質、(3)葉酸の構成物質であるプテリジン系化合物、(4)ビタミン B₆ の代謝産物、(5)ポルフィリン系代謝産物など生化学的に極めて意義のある物質が多いが、この他にも多数の未知蛍光物質が存在するものと推察される。

しかし、これまでの多くの報告にみられる検出方法はペーパークロマトグラフィーにおける展開剤が *n*-Butanol · HAc · H₂O (4 : 1 : 5) の混合溶媒のみを用い、またこの前処置としての濃縮手段には Crammer

1) 堀田, 石黒, 加藤: ビタミン **8**, 98 (1955).

2) 小林: 名古屋医学 **75**, 181 (1958).

3) 友田: 名古屋医学 **75**, 283 (1958).

4) 藤田, 石黒, 塚本, 新井: 第71回名古屋医学会総会発表.

5) 三沢: 名古屋医学 **75**, 935 (1958).

6) Yagi, K: J. Biochem., **38**, 161 (1951).

7) 石黒, 田中, 木下: ビタミン, **8**, 452 (1955).

のフェノール抽出法⁸⁾が行われているが、このような方法の組合せは尿中に発現する蛍光物質が多元性であるためある特定の物質の検出に限極されるおそれがある。そこで著者はさきに述べたように尿中に発現する蛍光物質をできるだけ広範囲にわたって相対的な観察を試みる目的で正常人の尿中に発現する蛍光物質について、濃縮方法に対する検討とペーパークロマトにおける展開剤の吟味を行い、ペーパー上における蛍光物質の分離能と分布状態について比較したので以下に報告する。

本研究に際し、終始御鞭撻を賜った学長宮道悦男博士に厚く御礼申し上げます。

実 験 方 法

i) 実験材料

採尿は空腹時の人尿を用い、採尿直後の新鮮なものを実験に供した。もちろん健康と思われる男子の尿を対照とし、薬物等の服用をしていないことを確めた。

ii) ペーパークロマトグラフィー (P.P.C.)

P.P.C. は東洋濾紙 No. 51 (40×2cm) の一端から 7 cm の距離を原点とし展開はすべて上昇法によった。展開剤は (1) *n*-Butanol · HAc · H₂O (4 : 1 : 1), (2) *n*-Butanol · Ethanol · H₂O (2 : 2 : 1), (3) Methanol · *n*-Butanol · Benzene · H₂O (2 : 1 : 1 : 1), (4) 5% Citrate : Isoamyl alcohol の二相溶媒 (5) 5% Na₂HPO₄ の 5 種類について吟味した。

iii) 尿の濃縮操作について

尿をそのまま P.P.C. にかける場合に尿中の蛍光物質が微量なためその検出は極めて困難であり、何等かの方法により尿を濃縮することが望ましい。この場合尿中の有機、無機成分の共存は P.P.C. における蛍光物質の分離および確認にかなり支障をきたす場合がしばしばみられる。それ故に濃縮操作の過程でできるだけ共存物質を除去し、しかもなるべく能率よく多数の蛍光物質を抽出分離することが実験条件として必要なことと考えられる。そこで著者はこの実験条件を検討するために次の 6 種類の濃縮方法を撰び、それぞれについて蛍光スポットの分布を比較検討した。

a) 減圧濃縮

尿 100ml を取りこれが 1/10 容になるまで減圧濃縮する。ついでこれに 30ml のエタノールを加え、生ずる沈澱を遠心分離して除き、その上清を分取して再び減圧濃縮し、残渣に水 0.5ml を加えて濃縮液を調製した。

b) フェノール抽出

尿 100ml を直ちに硫酸で飽和、これを濾過し、濾液に水飽和のフェノール液 2 ml を加え、振盪後遠心分離し、そのフェノール層を分取し、これにエーテル 30ml と水 0.5ml を加えて振盪し、遠心分離して濃縮液を調製した。

c) エタノール抽出

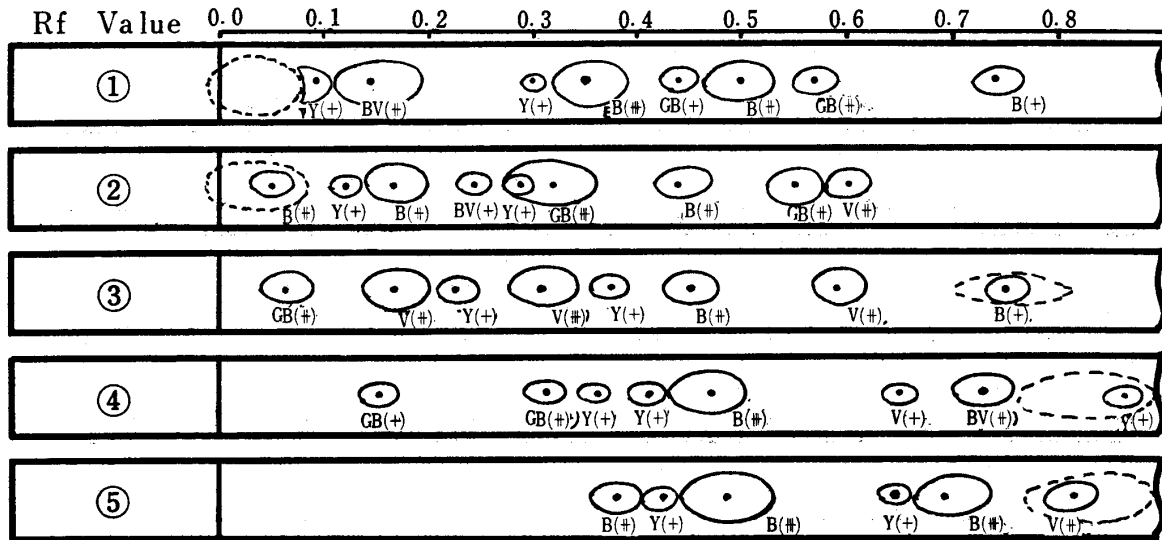
尿 100ml を炭酸カリウムで飽和、これを濾過し、濾液にエタノール 5 ml を加え、振盪混和後遠心分離してエタノール層を分取し、これにエーテル 30ml および水 0.5ml を加えて濃縮液を調製した。

d) ステアリン酸処理活性炭による吸着

尿 100ml をステアリン酸処理活性炭 3 g を加え、放置後活性炭部を濾取し、これを 5% フェノール 30ml で抽出し、フェノール抽出液を硫酸飽和した後遠心分離してフェノール層を分取し、これにエーテル 30ml と水

8) Crammer, J. L.: Nature, 191, 349 (1948).

Fig. 1 Movement of fluorescent substances in human urine by means of developer for P.P.C.



- ① *n*-Butanol·HAc·H₂O (4 : 1 : 1)
- ② *n*-Butanol·Ethanol·H₂O (2 : 2 : 1)
- ③ Methanol·Butanol·Benzene·H₂O (2 : 1 : 1 : 1)
- ④ 5% Citrate/Isoamyl alcohol
- ⑤ 5% Na₂HPO₄

○ position of urochrome
 Y = yellow, B = Blue, V = Violet,
 GB = greenish-Blue, BV = Bluish-Violet
 (+) amount of fluorescence

Developer	Number of Spots
① <i>n</i> -Butanol·HAc·H ₂ O (4 : 1 : 1)	6 ~ 9
② <i>n</i> -Butanol·Ethanol·H ₂ O (2 : 2 : 1)	5 ~ 9
③ Methanol·Butanol·Benzene·H ₂ O (2 : 1 : 1 : 1)	6 ~ 8
④ 5% Citrate/Isoamyl alcohol	5 ~ 9
⑤ 5% Na ₂ HPO ₄	3 ~ 5

0.5ml を加えて濃縮液を調製する。この方法は Dalglish⁹⁾ が初めて尿に適用したものでトリプトファンの代謝産物の吸着能が高いことを示唆している。

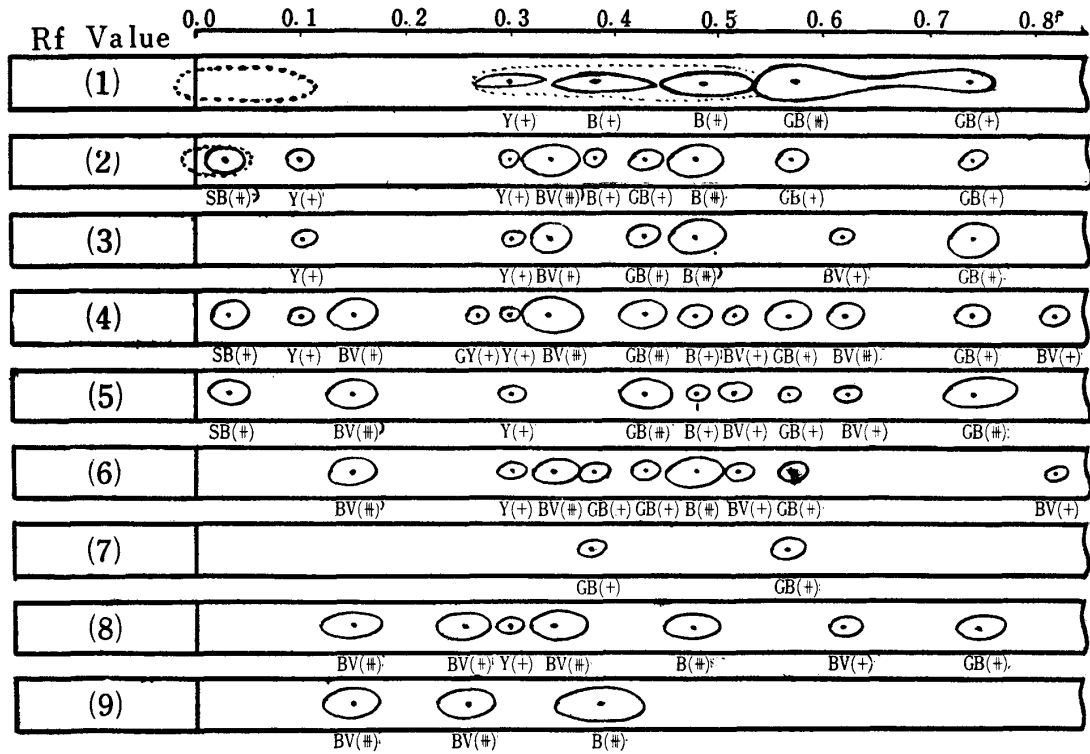
e) 硫酸第二水銀を沈澱剤として用いた場合

尿 100ml に硫酸々性 10% 硫酸第二水銀液を徐々に、もはや沈澱が生じなくなるまで加えてから一夜放置する。生じた沈澱を濾過し、濾液を減圧濃縮する。その残渣に水 0.5ml を加え、濃縮液を得る (A₁) またさきの沈澱物を水 50ml に浮遊せしめ、これに硫化水素を通じ、生じた沈澱を除去し、濾液を炭酸バリウムで中和し、再び濾過し、濾液をステアリン酸処理活性炭に吸着させ、その濾液を減圧濃縮し、残渣に水 0.5ml を加えて濃縮液とした。(A₂)。次いでこの沈澱物について d) の方法に従って濃縮液を調製する。

f) 酢酸第二水銀を沈澱剤として用いた場合

9) Dalglish, C. E.: Biochem. J., 52, 3 (1952).

Fig. 2 Comparison of paper chromatography of fluorescent substances in normal human urine prepared by various concentrations
developing solvent: *n*-Butanol/H₂O/HAc (4 : 1 : 1)



(1) Concentration in red. pressure (2) Crammer's method (3) Ethanol Method
(4) Absorption on act. C treated with s. acid (5) Mercury sulfate precipitation method
(6) Filtrate of(5) (7) Filtrate of(5)treated as(4) (8) Mercury acetate precipitation method
(9) Filtrate of(6)

尿 100ml を酢酸々性とし， 0°C で2時間放置後 20% 酢酸第二水銀 溶液の過剰を加え， 氷室に一夜放置する． 生じた沈澱を濾過し， 濾液を減圧濃縮し， 残渣に水 0.5ml を加えて濃縮液とした． (B₁)， 更にさきの沈澱物を水 50ml に浮遊させ， 硫化水素を通じ， 濾過し， 濾液を減圧濃縮し， 残渣に水 0.5ml を加えて， 濃縮液を調製する．

以上の各操作で得られた濃縮液を 0.02ml ずつペーパーに塗沫し， 風乾後 P.P.C. を行った．

iv) ペーパー上における蛍光物質の検出

以上の操作で得られに濃縮液を P.P.C. にかへ， その展開した濾紙を UV-DI フィルターを通した紫外線下におき， ペーパー上に認められる蛍光スポットの位置とその蛍光色調および蛍光量を記録し， 更にその Rf 値を測定した．

実験成績

1) P.P.C. の展開剤による尿中の蛍光物質の変動について

正常な成人男子の新鮮尿 30 例について Crammer のフェノール抽出⁸⁾を行い， さきに述べた 5 種類の展開剤に対する尿中蛍光物質の態度について比較観察した． 即ち同一被検尿における蛍光物質の分布についてその 1 例を示せば Fig. 1 の如く， 蛍光スポットがペーパー上に数多く分布するが， その各々において重複しているものは少ない． 展開剤 (1) においては原点から Rf 0.6 附近に 6~9 ヶの蛍光スポットが分布し， 展開剤 (2) に

においては同位置に5~9ケの蛍光スポットが認められた。この両展開剤は蛍光スポットの分布が何れも類似した傾向を示し、尿色素が原点附近に散在した。また展開剤(3)においてはペーパー上の全域にわたって6~8ケの蛍光スポットが発現し、他の展開剤に比較して分離能のよい点で蛍光物質の分離精製に用いられる。次に展開剤(4)ではRf 0.3からフロント部分に5~9ケの蛍光スポットが散在する。これに対して展開剤(5)ではRf 0.4から0.8にかけて3~5ケの蛍光スポットが認められ、蛍光スポットの数において最も少なかった。また展開剤(4)(5)においては各蛍光スポットが多少 tailing する傾向がみられ、更に尿色素がフロント部分に分布する共通した傾向がみられ分離が悪かった。次にこのように分布する蛍光スポットの色調については青色が最も多く、次いで紫色、緑青色、青紫色、黄色の順に分布することが認められた。

2) 濃縮方法の相違による尿中蛍光物質の発現について

さきの成績から同一被検尿を Crammer によるフェノール抽出法⁸⁾で P.P.C. を行った場合にペーパー上に5~9ケの蛍光スポットが認められた。次ぎにこのような尿中蛍光物質が濃縮方法の相違によってどのような分布の変動をおこすかということについて検討した。その成績は Fig. 2 に示すように減圧濃縮法では各蛍光スポットの分離が最も悪く、tailing 現象が認められ共存物質の存在がこれらの原因と考えられる。これに反してステアリン酸処理活性炭吸着法では最も多数の蛍光スポットが分離され、その各々の分離も極めて良好で蛍光スポットの分離確認法として最も適当な方法と考えられる。一般に有機溶媒による抽出法では尿色素の分布が少く、蛍光物質の分離が良好である。これに反して沈澱剤による方法では尿色素の存在が著しいため蛍光物質の分離は前者に劣る結果であった。このように蛍光物質の分離は前処理の濃縮方法により影響され、尿中蛍光物質の検索はその目的により濃縮方法と展開溶媒の撰択に注意しなければならない。

総括および考察

以上の検討成績から人尿中に発現する蛍光物質の検出は、従来の方法によっては充分に行われず、未だ多くの蛍光物質の存在が暗示され、またペーパー上1個と考えられたスポットでも更に分離される可能性も考えられるが、これらはすべてその検出法により決定される。このような意味から濃縮操作の改良や展開溶媒の撰択は重要な要素となる。しかしながらこれらの操作の検討にあたってはすべてペーパー上の蛍光スポットの分布とその各々の分離能の良否によって判定されている。このような立場から著者の検討成績をみるに、ペーパー上における蛍光スポットの数ではステアリン酸処理活性炭による吸着法が最も多く、その分離が良好であった。また展開剤として Methanol・*n*-Butanol・Benzene・H₂O (2:1:1:1)の混合溶媒が最も適当と考えられた。しかし実験目的からある特定の蛍光物質のみを観察する場合にはそれによる濃縮操作と展開剤を撰択しなければならない。

結 語

正常人の尿中蛍光物質を検出する方法について尿の濃縮操作と P.P.C. における展開剤について検討し次の結果が得られた。

1) 濃縮操作の検討においては蛍光物質の検出度からすればステアリン酸処理活性炭吸着法が最もよく、次いで有機溶媒によるフェノール抽出法、エタノール抽出法がこれにつき、沈澱剤による方法は尿色素の共存により分離能が全般に悪かった。また減圧濃縮のみでは蛍光スポットの分離は困難で tailing 現象が認められた。

2) 正常人の尿中蛍光物質における蛍光色調は青色、紫色、緑青色が多く黄色は少なかった。

3) 展開剤としては Methanol・*n*-Butanol・Benzene・H₂O (2:1:1:1) が最も分離能がよく 5% Na₂HPO₄ 溶液が最も悪かった。