

実験的高アルギニン血症ウサギに関する研究

第 2 編

アルギニン大量負荷ウサギ尿中の guanidosuccinic acid について

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (主任: 森昭胤教授)

洲 脇 貞 吉

(昭和53年8月24日受稿)

第1章 緒 言

Guanidosuccinic acid (以下GSAと略記する) は1964年に Natelson, Stein および Bonas¹⁾ により尿毒症患者尿より分離された Guanidino 化合物であるが、その後、彼らの研究 group をはじめ多くの研究者により慢性腎不全の患者では血中および尿中 GSA 濃度が増加していること、すなわち体内生成の増加することが観察され、尿毒症の病因と関係ある物質の1つと考えられるに至っている^{2)~12)}

さて一般に、Guanidino 化合物の化学的分析は上述の諸研究にもみられるごとく、液体 chromatography によるものが主流であるが、先報¹³⁾の高アルギニン血症においてもみられたごとく、代謝異常のある場合には数多の未知 Guanidino 化合物が尿中に出現し、chromatogram の諸 peak が必ずしも単離しておらず、特に GSA など酸性 Guanidino 化合物の溶出する部分には、overlap するものも多く、chromatogram 上の溶出時間のみで、未知物質を同定することはかなりの危険が予想される。したがって本編においては、先報¹³⁾で高アルギニン血症ウサギの尿中に見出した GSA を、gas chromatography-mass spectrometry (以下 GC/MS と略記する) により確認するため、まず GSA を Mori ら¹⁴⁾の方法により acetylacetone と反応させ dimethylpyrimidyl 誘導体となし、GC/MS の測定を行い尿中 GSA の同定を行った。

つぎに、GSA の体内生成過程に関しては、aspartic acid から transamidination による方法や argininosuccinic acid の異常開裂による過程が想定さ

れている²⁾また、Takahara^{15),16)}らは肝による canavaninosuccinic acid の還元的開裂反応によって GSA が生成される過程を提示しているが、他方、Perez¹⁷⁾はラットに L-[guanidino-¹⁴C]-arginine を腹腔内投与して尿中に放射性 GSA を分離したが、D,L-[guanidino-¹⁴C] canavanine の投与後の尿中からは放射性 GSA は検出されなかったと報告しており、灌流実験の結果から、GSA は arginine の aspartic acid への transamidination によって肝において生成されると述べている。

したがって、私は先報¹³⁾において報告した高アルギニン血症ウサギに、さらに併せて aspartic acid を負荷することにより、guanidinoacetic acid, r-guanidinobutyric acid などの Guanidino 化合物について知られていると同様な transamidination 反応により、GSA が過剰に生成され尿中に排泄されるかどうかを検討することにした。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

体重 1 ~ 1.8 kg の幼若ウサギを雌雄をとわず使用した。飼料はウサギ・モルモット用固型飼料 (RC-4, オリエンタル酵母) を用い、水は自由に摂取させた。飼育室は室温 24°C、湿度 55% に保ち、12時間の明暗サイクルとなるように午前 1 時から午後 1 時までを明るくした。

第2節 アミノ酸負荷方法

Mono-sodium aspartic acid 及び arginine をそれぞれ 0.2M 濃度にした水溶液を自由に摂取せしめた。

第3節 試料の調整

尿は毎朝9時に24時間尿を採取した。グアニジノ化合物測定用試料の作成法は先報¹³⁾と同様である。

第4節 グアニジノ化合物定量方法

先報と同様に Matsumoto¹²⁾らの方法によった。

第5節 GC/MS 測定方法

GSA 標準試料: Mori らの方法¹⁴⁾に準拠して行った。すなわち, GSA (Sigma chemical Co. St. Louis, Mo., USA) 10mg に水1.0ml を加え, sodium bicarbonate によって pH を 8.0-9.0 に調整したのち, 100℃の温浴中で10時間 reflux した。この反応混液を減圧乾固し, ついで, 水10ml に溶解し, ethyl-ether にて2回洗浄後, 減圧乾固せしめ, HCl gas 飽和 n-butanol を加え3時間温浴上にて reflux した。ついで, この反応液を再び減圧乾固してえられる syrup 様物質を約2mg, pyridine-methanol (1:1) 0.2ml に溶解し, その1μl を GC/MS 用試料とした。

ウサギ尿試料: Arginine 負荷ウサギ尿30ml を減圧濃縮したのち東洋汙紙No 526 (40×40cm) に spot し, n-butanol: acetic acid: 水 (12: 3: 5) にて展開し, GSA 合成標品と一致する Rf 値の部分を取り, 50% ethylalcohol にて抽出したのち, 減圧乾固した。これを水 1.0ml に溶解, pyridine 1.0ml, acetylacetone 1.0ml を加えたのち上記 GSA 標準試料を同様な操作を行って GC/MS 同試料を作成した。

GC/MS: 日立製 RMU-6MG 型質量分析計を使用した。測定条件は下記のごとくである。

Gas chromatography

Column length 50cm

Column packing OV-1 1%

Column temperature 190℃

Carrier gas 1.0kg/cm He

Mass spectrometry

Chamber voltage 40V

Target/total current 45μA/80μA

Ion source temperature 160℃

Selected Ion Recording (m/e) 250, 278, 351

を使用した。

第3章 実験成績および考按

第1節 高アルギニン血症ウサギ尿中 GSA の GC/MS による同定

(1) GSA の標準試料の mass spectrum

GSA の dimethylpyrimidyl 誘導体の butylester すなわち di-n-butyl 2-(2'-(4,6'-dimethylpyrimidyl))-aminosuccinate の mass-spectrum は Fig. 1 に示すごとく, m/e 176, 250, 278, 351 にそれぞれ比強度 514, 1000, 74, 174 の ion が観察された。それぞれの ion peak は下記のごとくと理解される。

m/e	176: M ⁺ -COOBu-BuOH
	250: M ⁺ -COOBu
	278: M ⁺ -Bu
	351: M ⁺

一般的にグアニジノ化合物は揮発性にとぼしいという guanidine 基の性質のため GC/MS の測定は不可能とされていたが, Vetter-Diechtle ら¹⁵⁾は arginine の amidine 基と acetylacetone を反応させ dimethylpyrimidyl 基となし, mass spectrometry を行い, つづいて Mori ら¹⁴⁾は arginine のほか, guanidinoacetic acid, β-guanidinopropionic

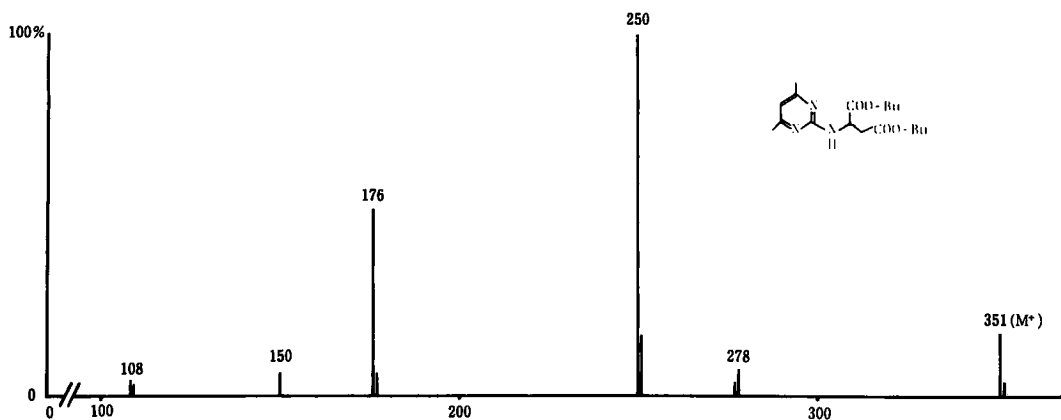


Fig. 1 Mass Spectrum of Dimethylpyrimidyl-GAS-butylester

acid, γ -guanidinobutyric acid にも同様な方法を適応し, di-methylpyrimidyl 誘導体となし, さらに butylester として GC/MS 測定を行うことに成功したが, 私はここに GSA にも同様な方法を適応して GC/MS 測定を行うことができた.

(2)高アルギニン血症ウサギ尿中 GSA の Selected ion recording による同定

Gaschromatography において GSA と同じ保持時間を示す peak について selected ion recording を行った. すなわち, 上記 GSA 標準試料について分析結果からえられた ion peak のうち m/e 250, m/e 278, m/e 351 (M^+) を用い, m/e 250 と m/e 278 及び m/e 278 と m/e 351 の ion 強度比を測定した. その結果, Fig. 2 のごとき記録がえられたので, Table 1 にそれらの成績を整理して示した. すなわち, Table 1 は標準 GSA とウサギ尿中の成分との m/e 351/278, m/e 278/250 はいずれも peak 強度比の良い一致を示しており, 高アルギニン血症ウサギ尿中に GSA の存在することが証明された.

第2節 Arginine 及び aspartic acid 同時負荷ウサギの尿中への GSA の異常排泄について

先報¹³⁾においては実験的高アルギニン血症ウサギを作成のため 5% arginine 水を自由に飲用せしめたのちのグアニジノ化合物の尿中排泄量について報告したが, その後の検索の結果 3% arginine を使用しても排泄される諸グアニジノ化合物の濃度には有意な変化が認められないことから, 本実験においては monosodium aspartic acid 及び arginine をそれぞれ 0.2M 溶液(monosodium aspartic acid: 約 3.1%, arginine: 約 3.5%) を自由に経口摂取せしめた. 負荷後1週間の経日的変化を Fig. 3 に示す. GSA 尿中への排泄は aspartic acid 及び arginine 投与の2日後に一過性に最高値をとり, 4, 5日後に一端対照値近くまで下降するが, 6, 7日後より再び上昇の傾向があることが認められた. この経過は先報¹³⁾の arginine のみの負荷実験とはほぼ同様な経過といえるが, 排泄量の絶対値は3日目と比較すると, arginine 単独負荷側では 18-44 μ moles/24hrs (平均 30 μ moles/24hrs) に対し, arginine と aspartic acid 併用負荷側では 16-72 μ moles/24hrs (平均 40 μ moles/24hrs) とやや高く, 7日後の値では前者 10-24 μ moles/24hrs (平均 17 μ moles/24hrs) に対し, 後者では 22-86 μ moles/24hrs (平均 54 μ moles/24hrs) と著明な増加を示している. 以上の成績は Perez ら¹⁷⁾が提唱しているごとく, GSA

は arginine の aspartic acid へのごとき transamidation によって生成されることを強く示唆するものといえよう.

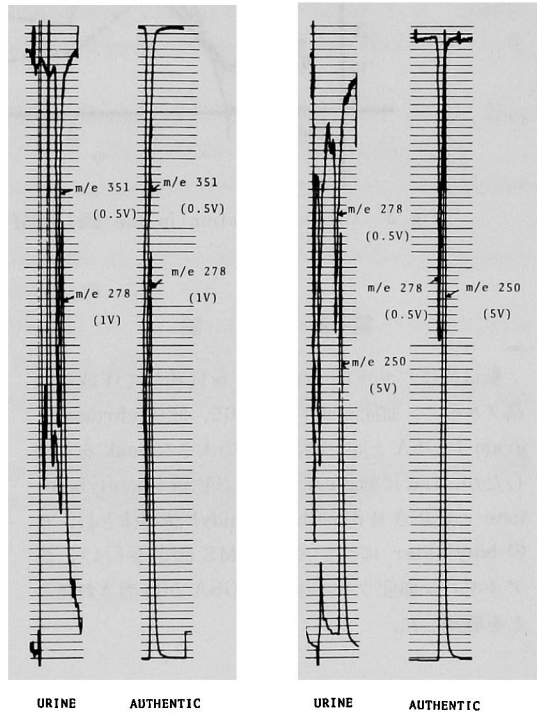
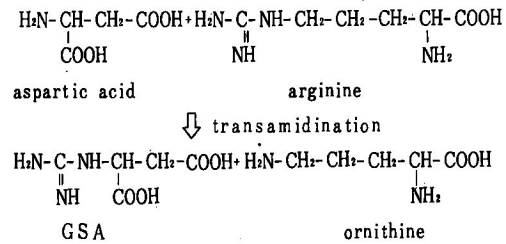


Fig. 2 Identification of Guanidosuccinic Acid in Urine by Selected Ion Recording

Table 1. Identification of Guanidosuccinic Acid (GSA) in Hyperargininemic Rabbit Urine by Selected Ion Recording

Sample	Ratio of ions (m/e)	
	351/278	278/250
Authentic GSA	1.22	0.51
Urine	1.24	0.49

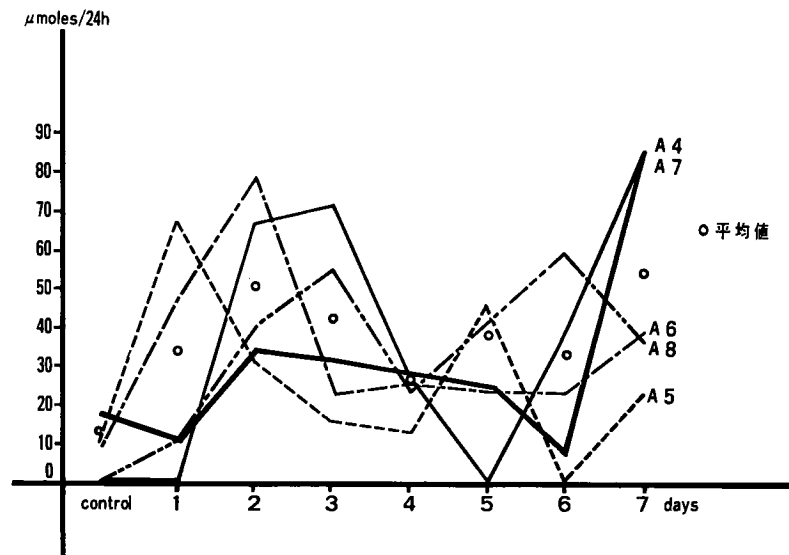


Fig. 3 GSA Excretion in the Urine of Rabbit Loaded Arginine and Aspartic Acid

第4章 結 論

私は先にウサギに arginine を負荷して作成した高アルギニン血症ウサギの尿中に、液体 chromatogram 上 GSA と同一溶出時間の大きな peak を見出したが、ここに確認のため、当該物質を acetylacetone と反応させ dimethylprimidyl 誘導体とし、その butylester について GC/MS 測定を行い、高アルギニン血症ウサギ尿中に GSA が排泄されることを確認した。

また、高アルギニン血症ウサギ作成の過程に arginine と同モルの aspartic acid を同時に負荷したのち尿中の GSA を測定し、GSA は体内で aspartic acid が arginine と transamidination を行うことによって生成されることを示唆する成績をえた。

終わりにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森昭胤教授に深く感謝の意を捧げます。また GC/MS の測定に御協力いただいた山之内製薬株式会社開発研究所測定室市村孝道氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Bonas, J. E., Cohen, B. D. and Natelson, S. Separation and estimation of certain guanidino compounds. Application to human urine. *Microchem. J.*, **7**, 63-77, 1963.
- 2) Cohen, B. D., Stein, I. M. and Bonas, J. E. Guanidinosuccinic aciduria in uremia. A possible alternate pathway for urea synthesis. *Amer. J. Med.* **45**, 63-68, 1968.
- 3) Natelson, S., Stein, I. and Bonas, J. E. Improvements in the method of separation of guanidino organic acids by column chromatography. Isolation and identification of guanidinosuccinic acid from human urine. *Microchem. J.*, **8**, 371-382, 1964.
- 4) Stein, I. M., Cohen, B. D. and Kornhauser, R. S. Guanibinosuccinic acid in renal failure, experimental azotemia and inborn errors of the urea cycle. *New Eng. J. Med.*, **280**, 926-930, 1969.
- 5) Cohen, B. D. Guanidinosuccinic acid in uremia. *Arch. Intern. Med.*, **126**, 846-850, 1970.

- 6) Horowitz, H. I. Uremic toxins and platelet function. *Arch. Intern. Med.*, **126**, 851-854, 1970.
- 7) Lonergan, E. T., Semar, M. and Lange, K. Transketolase activity in uremia. *Arch. Intern. Med.*, **126**, 851-854, 1970.
- 8) Giovannetti, S., Cioni, L., Balestri, P. L. and Biagini, M. Evidence that guanidines and some related compounds cause haemolysis in chronic uremia. *Clin. Sci. (Oxf.)*, **34**, 141-148, 1968.
- 9) Dobbstein, H., Edel, H. H., Schmid, M., Schubert, G. und Weinzierl, M. Guanidinbernsteinsäure und Urämie. I. Mitteilung: Klinische Untersuchungen *Klin. Wschr.*, **49**, 348-357, 1971.
- 10) Dobbstein, H., Grunst, J., Schuberts, G. und Edel, H. H. Guanidinbernsteinsäure und Urämie. II. Tierexperimentelle Befunde. *Klin. Wschr.*, **49**, 1077-1083, 1971.
- 11) Sasaki, M., Takahara, K. and Natelson, S. Urinary guanidinoacetate/guanidinosuccinate ratio: An indicator of Kidney dysfunction. *Clin. Chem.*, **19**, 315-321, 1973.
- 12) Matsumoto, M., Kishikawa, H. and Mori, A. Guanidino compounds in the sera of uremic patients and in the sera and brain of experimental uremic rabbits. *Biochem. Med.*, **16**, 1-8, 1976.
- 13) 洲脇貞吉: 実験的高アルギニン血症ウサギに関する研究, 第1編アルギニン大量負荷ウサギの血清, 尿および脳組織中のアミノ酸並びにグアニジノ化合物について, *岡山医学会誌*. **90**, 1093-1104, 1978.
- 14) Mori, A., Ichimura, T. and Matsumoto, H. Gas chromatography mass spectrometry of guanidino compounds in brain. *Anal. Biochem.*, **89**, 393-399, 1978.
- 15) Takahara, K., Nakanishi, S. and Natelson, S. Cleavage of canavaninosuccinic acid, a substance found in the urine of uremic patients. *Clin. Chem.*, **15**, 398, 1969.
- 16) Takahara, K., Nakanishi, S. and Natelson, S. Studies in the reductive cleavage of canavanine and canavaninosuccinic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 85-95, 1971.
- 17) Perez, G., Rey, A., and Schiff, E. The biosynthesis of guanidinosuccinic acid by perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, **57**, 807-809, 1976.
- 18) Vetter-Diechtle, H., Vetter, W., Richter, W., und Biemann, K. Ein für Massenspektrometrie und Gaschromatographie geeignetes Argininderivat. *Experientia*, **24**, 340-341, 1968.

Experimental model of hyperargininemia**II. Identification of guanidinosuccinic acid in urine
of the arginine loaded rabbit and a possible pathway of its formation****Sadayoshi SUWAKI**

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology

Okayama University Medical School

(Director : Prof. A.Mori)

Authentic guanidinosuccinic acid was converted into dimethylpyrimidyl derivative by reaction with acetylacetone, the carboxyl group was esterified by butylalcohol, and this derivative was analysed by the GC/MS technique. Then guanidinosuccinic acid was identified in urine of arginine loaded rabbit by means of selected ion recording. On the other hand, aspartic acid and isomolar of arginine was loaded simultaneously to rabbit, and a higher level of guanidinosuccinic acid was detected in the urine of 2 or 3 days and one week after. This fact suggest that guanidinosuccinic acid could be produced by transamidination of aspartic acid, receiving amidine group of arginine.