

イソタコによるヒト尿所見の法医診断学的応用

新潟大学医学部法医学教室（主任：山内春夫教授）

小野政孝

Medico-Legal Application of Urinalysis
with Capillary Isotachopheresis

Masataka ONO

*Department of Legal Medicine, Niigata University
School of Medicine*

(Director: Prof. Haruo YAMANOUCHI)

Urine samples from 4 volunteers and 102 patients were analyzed using an apparatus for automated capillary isotachopheresis (IP-3A). Samples were mixed with a spacer solution (2% ampholine and amino acid mixture) at a volume ratio 1:3 and subjected to electrophoresis at alkaline pH. UV monitoring revealed more than 15 peaks with a prominent peak (B1), which were tentatively classified into three groups (A to C). The CITP pattern was reproducible and not affected by the difference between healthy and patient urine except for the B2 peak adjacent to B1. There was a tendency that the more protein a urine sample contained, the broader the B2 peak became. The pattern was distinct from that of serum, cerebrospinal fluid and vitreous humor. This suggests easy identification of forensic urine specimens by this method. The height of B1 peak varied and correlated with color intensity and specific gravity of urine. Importantly, increases of some of several minor peaks was noted in about a half of samples; a high peak of A2, A4, A5, C2, C3, C4, C5 or C6 was detected in some samples. This indicates that some individuals exhibit their specific CITP patterns. The time courses of changes in peaks was also examined for 4 fresh urine samples and their stains. Storage for at least 3 days at room temperature did not affect the pattern of individuals. Therefore, the CITP patterns analysis of urine may give some useful information of individual identification.

Key words: human urine, capillary isotachopheresis individual identification

Reprint requests to: Masataka ONO,
Department of Legal Medicine
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757番地
新潟大学医学部法医学教室 小野政孝

結 言

細管式等速電気泳動(以下「イソタコ」と略す)は、試料の前処理を殆ど必要とせず、かつ短時間で分析が可能であることから種々の分野での応用が試みられ^{1)~7)}、法医学の分野でも血液、血清及び各種の体液の検査での応用が考えられるが、実際に分析を行った報告は多くなく^{8)~13)}、ヒト尿についての報告はない。従来、法医学分野で尿はアルコール濃度測定¹⁴⁾、法中毒学的検査、犯罪鑑識学的な人獣鑑別、ABO式血液型検査等が行われている。今回、著者は、ヒト尿についてイソタコによる分析を行ない法医学の分野への応用について検討を行った。

材料及び試料

1. 尿試料

健康人尿は、健康成人4名(W, X, Y, Z)の尿を1月間にそれぞれ7~9回採取した。また、患者尿として新潟大学医学部附属病院の外来患者102例の尿を試料とした。これら尿については、イソタコによる分析と共に尿試験紙(N-マルティステックスSG, マイルス三共製)により比重, pH, 蛋白質, ウロビリノーゲン, 亜硝酸塩, 潜血反応, ビリルビン, ケトン体及びブドウ糖の9項目について検査した。

2. 試薬

泳動用の試薬は、日根⁴⁾や吉田ら⁸⁾の方法によって調整した。リーディング溶液として、5mM HCl-10mM Ammediol-0.1% HPMC 4000を調整した。塩酸は和光純薬社の容量分析用2N塩酸、Ammediolは同社の特級、HPMC 4000はシグマ社製を用いた。ターミナル溶液として、10mM Aminocaproic acid-10mM AmmediolをBa(OH)₂でpH10.8に調整した。6-Aminocaproic acidはシグマ社製、水酸化バリウムは和光純薬社の特級を用いた。スプレー溶液は6種類の0.2mM アミノ酸溶液にアンホライン(LKB: pH3.5~9.5)が最終濃度で2%となるように調整した。6種類のアミノ酸(D-アスパラギン, L-スレオニン, L-メチオニン, グリシン, L-バリン, L-ロイシン)は、和光純薬社の特級を用いた。

3. 細管式等速電気泳動(イソタコ)

細管式等速電気泳動装置(島津IP-3A)で内径0.5mmのFEP製の検出用キャピラリーを使用した。尿及び尿斑痕浸出液とスプレー溶液とをそれぞれ1:3の割合になるように混合し、そのうちの1μlをマイク

ロシリンジで注入した。陽極のターミナル電極(T)と陰極のリーディング電極(L)の2電極間で、最初の5分間は、150μAの定電流、次に、75μAの定電流で12~20分間泳動を行った。泳動パターンは、紫外部吸収(UV)、電位勾配(PGD)及び電位勾配の微分信号(PGD DIFF)の3種類記録し、このうちの紫外部吸収を泳動パターン(イソタコグラム)として検討を行った。UV検出は、280nmで行ったが、一部については、254nmでの検出も行った。UVの検出感度は、通常レンジ16を使用した。感度を下げてレンジ32で分析を行った場合には、ピークの高さを2倍したものをデーターとした。

結 果

1. 健康成人の尿のイソタコ

1) 尿のイソタコグラム(図1)

健康成人4名(W, X, Y, Z)の尿31例のイソタコグラムで、面積が最も高い高いピークをB1ピーク、そのやや高電位側で比較的シャープなピークをB2ピークとした。Bピークより低電位のピーク群をAピーク(A1~A5)、高電位のピーク群をCピーク(C1~C6)とした。リーディング溶液とターミナル溶液中の不純物(アジドイオン)による最初のピークをA0, C1~C6ピークに続いてみられる、比較的巾のある低い最後のピークをEピークとした。

2) ピークの出現時間について(表1)

健康成人の尿31例では、A0からEまでの泳動時間は、4.0~6.0分(平均4.8分)で、各ピークの出現時間をA0からEピークまでの時間を100とした相対時間(以下「RT」と略す)で表し、A0からの相対時間をRT(A0)とした。A0からA1までの時間は、0.43~0.88

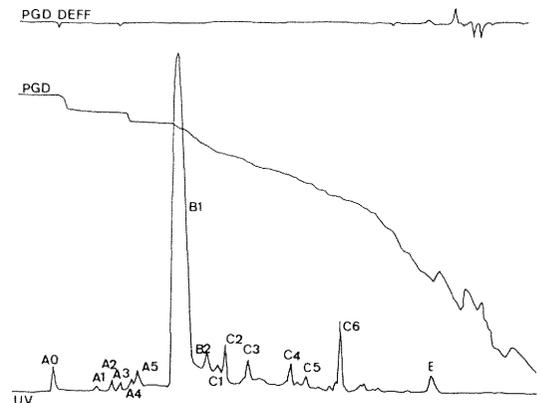


図1 健康成人の尿のイソタコグラム

分(平均0.62分)で、A1のRT(A0)は9.2~17.0(平均12.9)と差異がみられたが、A2ピーク以降の各ピークのA1からの相対時間RT(A1)で見ると、各ピークのRT(A1)はほぼ同じであった(表1)。

3) 各ピークの比較(表2)(図2)

(i) B1ピーク

B1ピークのRT(A1)の平均は、Wで21.2(20.2~22.4)、Xで22.5(20.6~24.4)、Yで22.8(19.8~26.2)。

表1 ピークの出現時間(健康人尿31例)

試料	A0-E	A0-A1	RT (A0) A1	RT (A1)												RTB2
				A2	A3	A4	A5	B1	B2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
W1	205.0	21.0	10.2	3.4	5.9	8.8	10.2	22.0	26.8	29.3	34.1	38.5	51.2	59.0	65.4	4.2
W2	211.0	26.0	12.3	3.8	6.2	8.5	10.4	21.8	26.1	28.0	32.7	37.4	49.8	57.3	63.0	4.7
W3	174.0	19.0	10.9	2.9	5.2	8.0	9.8	20.7	25.3	27.6	32.2	37.9	50.6	57.5	63.2	4.9
W4	171.0	20.0	11.7	2.9	5.8	8.2	9.9	21.1	25.7	28.7	32.7	38.0	50.3	57.9	63.7	4.2
W5	170.0	19.0	11.2	3.5	5.3	8.2	9.4	21.2	25.9	28.2	32.9	38.2	50.6	57.6	64.1	5.9
W6	201.0	31.0	15.4	4.0	7.0	9.5	10.9	22.4	26.9	28.9	33.3	38.3	49.3	56.7	61.2	5.0
W7	183.0	17.0	9.3	2.7	4.9	7.7	9.3	20.2	27.3	32.2	36.6	41.0	53.6	57.9	67.2	7.0
W8	191.0	22.0	11.5	3.1	5.8	8.4	9.9	20.4	23.0	27.7	33.5	38.7	51.3	57.6	63.9	6.7
W9	242.0	26.0	10.7	4.1	6.6	9.5	10.7	21.1	28.1	30.6	34.3	39.3	51.7	58.7	64.5	4.1
平均	194.2	22.3	11.5	3.4	5.8	8.5	10.1	21.2	26.1	29.0	33.6	38.6	50.9	57.8	64.0	5.2
X1	206.0	22.0	10.7	4.9	7.3	10.2	11.7	23.3	27.7	29.1	33.5	39.3	50.5	54.9	63.6	3.4
X2	201.0	22.0	10.9	4.0	6.5	9.5	10.9	22.9	29.9	32.3	34.3	40.3	51.2	55.7	64.7	4.3
X3	175.0	25.0	14.3	2.9	5.1	8.0	9.1	20.6	26.9	29.7	33.1	38.3	49.7	53.1	62.3	3.7
X4	178.0	23.0	12.9	3.4	5.1	8.4	10.1	21.9	28.1	30.9	32.6	38.8	50.0	54.5	62.4	4.0
X5	186.0	27.0	14.5	4.3	7.0	9.7	10.8	22.0	28.5	30.6	32.8	38.7	50.0	54.3	62.4	2.3
X6	221.0	35.0	15.8	5.9	8.1	11.3	12.7	24.4	31.2	33.5	35.3	38.9	51.1	54.8	62.9	1.9
X7	195.0	25.0	12.8	3.6	6.2	9.2	11.3	22.6	27.7	29.7	33.3	37.9	50.8	57.9	63.1	4.4
平均	194.6	25.6	13.1	4.1	6.5	9.5	10.9	22.5	28.6	30.9	33.6	38.9	50.5	55.0	63.0	3.4
Y1	184.0	17.0	9.2	3.8	6.0	9.2	10.9	23.4	28.3	31.5	33.7	40.8	53.8	56.5	66.3	3.9
Y2	161.0	21.0	13.0	3.1	5.6	8.1	9.3	21.1	25.5	28.6	32.9	39.1	51.6	55.9	64.0	4.4
Y3	180.0	21.0	11.7	3.9	6.1	9.4	10.6	22.2	26.1	27.8	33.3	40.6	51.7	56.1	65.0	3.9
Y4	200.0	34.0	17.0	3.5	6.0	8.5	10.0	21.5	26.0	28.5	33.0	38.5	49.5	53.0	60.5	3.6
Y5	187.0	27.0	14.4	2.7	5.3	7.0	8.0	19.8	22.5	26.2	32.1	37.4	48.7	52.9	61.0	4.6
Y6	225.0	32.0	14.2	6.2	8.9	11.6	13.3	26.2	32.0	34.7	37.3	41.3	55.1	61.3	65.8	3.8
Y7	198.0	24.0	12.1	4.5	7.1	8.6	11.1	23.2	27.3	29.8	33.3	40.4	52.0	53.5	64.6	4.3
Y8	203.0	33.0	16.3	5.9	8.4	11.3	12.8	24.6	29.1	31.0	33.5	37.4	48.3	50.7	62.1	2.1
平均	192.3	26.1	13.5	4.2	6.7	9.2	10.8	22.8	27.1	29.8	33.6	39.4	51.3	55.0	63.7	3.8
Z1	176.0	20.0	11.4	3.4	5.1	8.0	9.7	21.6	26.1	29.5	31.3	38.6	51.1	54.5	63.6	4.0
Z2	188.0	21.0	11.2	4.3	6.4	9.6	11.2	23.9	27.7	32.4	34.0	37.2	50.0	55.9	64.4	3.8
Z3	177.0	21.0	11.9	3.4	5.6	8.5	10.2	22.6	27.1	29.4	32.8	40.1	52.0	55.9	64.4	4.0
Z4	178.0	25.0	14.0	3.9	6.2	9.0	10.7	22.5	26.4	28.1	32.0	38.2	49.4	57.3	62.4	2.4
Z5	184.0	30.0	16.3	3.8	6.0	8.7	9.8	21.2	25.0	26.6	31.0	34.8	47.3	54.3	59.2	3.9
Z6	181.0	28.0	15.5	2.8	5.5	8.3	9.4	21.0	24.3	26.5	30.4	36.5	48.6	52.5	60.2	2.4
Z7	204.0	31.0	15.2	5.4	7.8	10.8	12.3	24.5	28.9	31.9	33.8	39.7	50.5	54.4	63.2	3.5
平均	184.0	25.1	13.6	3.8	6.1	9.0	10.4	22.5	26.5	29.2	32.2	37.9	49.8	55.0	62.5	3.4
TOTAL	191.5	24.7	12.9	3.9	6.3	9.0	10.5	22.2	27.0	29.7	33.3	38.7	50.7	55.8	63.4	4.0

Zで22.5(21.0~24.5)であり, 31例の平均は22.2で, 26例(83.9%)のRT(A1)が20~24の範囲にあった.

B1ピークの高さの平均は, Wが147.6mm(106~200mm), Xが154.1mm(101~252mm), Yが157.3mm(92~188mm), Zが131.3mm(64~204mm)であり, WとXのB1はすべて100mm以上で, Yの7例, Zの4例も100mm以上であった.

B1ピークの面積(SB)をみると, 各人の平均は, Wが805.4mm²(477~1462mm²), Xが853.7mm²(404

~1512mm²), Yが794.6mm²(414~1071mm²), Zが565.9mm²(219~1020mm²)であった.

B1の高さが100mm以下の4例の比重が1.005~1.010であるのに対し, B1が200mm以上の4例中3例が1.015~1.020であった. また, SBが300mm²以下の2例の比重は1.005と低く, 30~500mm²の5例の比重も1.010であった. 一方, SBが1000mm²以上の7例の比重の平均は1.021で7例中5例が1.020~1.030で, SB800~999mm²(8例)の平均が1.018, SB500~699

表2 各ピークの高さ及びB1ピークの面積

試料	各ピークの高さ: mm														B1ピークの面積(SB): mm ²		尿検査紙	
	A1	A2	A3	A4	A5	B1	SB	B2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	比重	pH		
W1	4	16	6	8	14	178	890	38	32	82	22	22	6	28	1.020	6.5		
W2	2	12	4	4	6	120	600	20	20	66	12	20	4	18	1.020	6.0		
W3	4	20	6	6	10	152	608	34	22	96	16	22	4	18	1.020	6.5		
W4	2	18	4	5	14	152	608	38	26	96	14	22	4	20	1.015	6.5		
W5	2	16	8	6	12	200	800	40	34	102	24	22	4	36	1.015	6.0		
W6	2	10	5	6	12	106	477	24	24	66	10	30	2	14	1.010	7.0		
W7	10	20	14	14	22	172	1,462	40	40	190	42	34	6	44	1.025	6.0		
W8	12	44	16	16	15	142	638	50	46	154	40	46	6	32	1.030	5.0		
W9	4	12	10	4	6	106	1,166	34	30	136	28	38	4	28	1.020	6.0		
X1	1	5	2	2	6	134	670	8	6	8	6	8	2	12	1.020	6.5		
X2	2	6	5	6	10	166	996	20	12	22	16	14	8	34	1.025	5.0		
X3	2	6	4	8	26	252	1,512	21	14	20	10	16	2	32	1.010	7.5		
X4	2	6	4	4	18	174	870	10	14	26	10	16	6	22	1.010	6.0		
X5	1	2	2	3	5	101	404	6	6	7	7	6	1	10	1.010	6.5		
X6	1	2	4	2	30	132	924	12	16	24	6	10	4	24	1.010	6.0		
X7	2	10	4	4	42	120	600	18	20	32	6	10	4	24	1.020	6.0		
Y1	2	6	2	4	8	174	696	14	12	8	8	12	2	16	1.015	7.5		
Y2	2	4	4	4	8	184	1,012	10	8	18	18	12	8	40	1.030	5.0		
Y3	4	4	4	4	8	156	546	20	26	12	12	4	2	20	1.015	5.0		
Y4	4	4	6	6	8	174	870	18	14	14	10	10	8	32	1.025	5.0		
Y5	4	5	8	8	14	164	902	20	26	16	20	18	6	34	1.020	6.0		
Y6	2	3	3	4	4	188	846	20	14	8	16	16	4	26	1.020	6.0		
Y7	1	3	4	4	20	126	1,071	14	14	34	10	8	4	46	1.030	6.0		
Y8	0	1	1	4	3	92	414	6	5	4	4	4	6	10	1.010	7.0		
Z1	2	6	2	2	10	200	1,000	10	6	6	6	4	2	26	1.020	6.5		
Z2	1	4	1	1	12	144	648	8	4	4	3	3	2	18	1.015	6.0		
Z3	4	10	4	5	22	204	1,020	16	12	10	12	12	4	40	1.015	6.5		
Z4	2	3	1	2	12	73	219	4	3	4	5	5	3	5	1.005	6.5		
Z5	1	2	2	2	11	94	328	7	6	5	7	9	2	9	1.010	7.0		
Z6	3	6	2	3	9	140	490	6	8	6	6	6	2	12	1.010	7.0		
Z7	1	1	1	1	6	64	256	5	3	3	2	3	2	8	1.005	6.5		

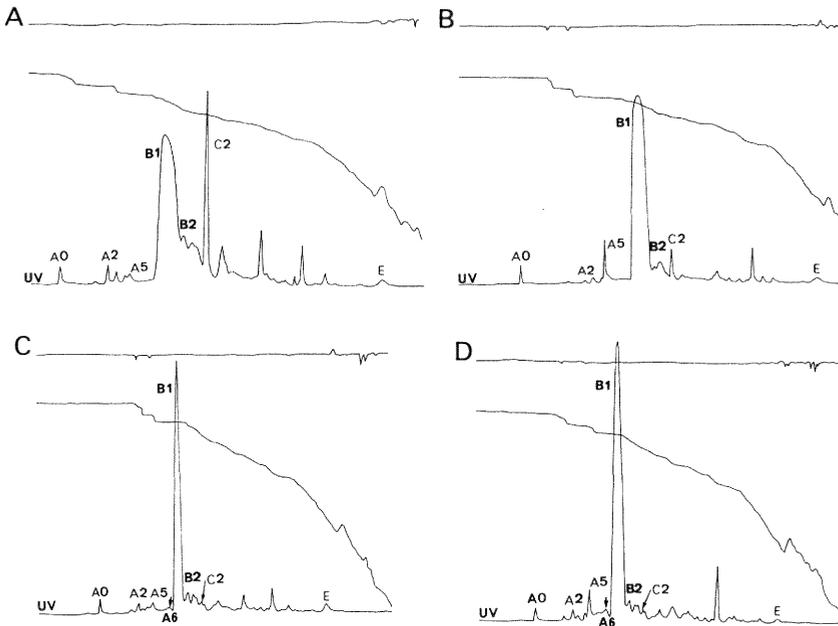


図2 健康成人の尿のイソタコグラム
A : W, B : X, C : Y, D : Z

mm² (9例) の平均が 1.019, SB500 mm² 以下 (7例) の平均が 1.009 であった. 全体として, 尿の比重が大きくなるほど B1 の高さが高く, SB が大きくなる傾向がみられた.

(ii) B2 ピーク

B2 ピークの高さは, Wの平均が 35.3 mm (20~50 mm) と高く, X, Y, Zの平均は 13.6 mm (6~21 mm), 15.3 mm (6~20 mm), 8.0 mm (5~16 mm) であった.

B2 ピークの巾を RT の平均でみると, Wが 5.2 (4.2~6.9), Xが 3.4 (2.0~4.4), Yが 3.8 (2.1~4.6), Zが 3.4 (2.4~4.0) で, 31例の平均は 4.0 であり, B2 ピークの巾が広いタイプ (W) と狭いタイプ (X, Y, Z) がみられた.

(iii) A ピーク

① Wは A2 ピークが平均 18.7 mm (10~44 mm) と高く, 次いで A5 ピークで平均 12.4 mm (6~22 mm) で, A2/A5 が 2.0~2.8 (4例), 1.1~1.3 (3例), 0.8~0.9 (2例) であった. A5 と B1 ピークとの間に, 1例でゆるやかな巾の広いピーク (A6) を認めた. A4 と A5 とで双峰性のピークを示し, A5 のほうが高い. 他の平均は, A4 が 7.7 mm (4~15 mm), A3 が 4.7 mm (4~16 mm), A1 が 4.4 mm (2~12 mm) であっ

た.

② Xは, A5 ピークが平均 19.6 mm (5~42 mm) と高く, A1~A4 のピークは低く (10 mm 以下), 平均は, A2 が 5.3 mm, A4 が 4.1 mm, A3 が 3.6 mm, A1 が 1.6 mm であった. A4 と A5 とで双峰性のピークを示す例が 5例, A4 が小さく A5 と重なって一つのピークのようにみえる 2例があり, 1例で A5 と B1 ピークとの間に A6 ピークを認めた.

③ Yは, 各ピークが低く, 各ピークの平均は, A1 が 2.4 mm, A2 が 3.8 mm, A3 が 4.0 mm, A4 が 4.8 mm, A5 が 9.1 mm であった. A4 と A5 ピークで双峰性のピークを示した 3例, A4 と A5 の間にもう 1本のピークがみられ 3峰性を示す 2例, A4 と A5 が重なって単峰性にみえる 2例, A4 と A5 が完全に独立した 1例があった. A5 と B1 の間に巾の広い A6 ピークを 8例中 7例に認めた.

④ Zは, A5 ピークが平均 11.7 mm (6~22 mm) で, A1~A4 ピークの平均は, A1 が 1.9 mm, A2 が 4.6 mm, A3 が 1.9 mm, A4 が 2.3 mm であった. A4 と A5 が双峰性を示す 4例, A4 が小さく単峰性にみえる 3例があった. 7例とも, A5 と B1 の間に巾の広い A6 ピークを認めた.

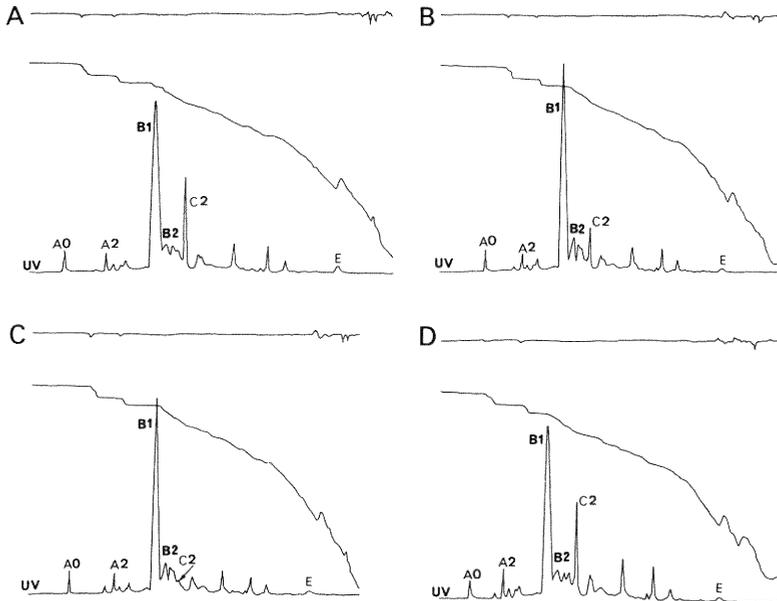


図3 尿の経時変化と尿斑痕 (W2)

A : 尿 B : 5日後
C : 29日後 D : 斑痕 (3日後)

(iv) Cピーク

① WのC2ピークの平均が109.8mm (66~190mm)で、3例ではC1ピークがB1ピークよりも高かった。他のCピークの平均は、C1が30.4mm (20~46mm)、C4が28.4mm (20~46mm)、C3が23.1mm (10~42mm)、C6が26.4mm (14~44mm)、C5が4.0mmであった。

② XのC2ピークの平均は19.9mm (7~32mm)、C6ピークの平均は22.6mm (10~34mm)で、20mm以上のピークが目立ち、他のピークの平均はC1が12.6mm (6~20mm)、C3が8.7mm (6~16mm)、C4が11.4mm (6~16mm)であった。

③ YのC2ピークの平均は、14.3mm (4~34mm)で、C6ピークの平均は28.0mm (10~46mm)で、20mm以上のピークが6例あり、C1ピークの平均は14.9mm (5~26mm)、C3の平均が12.3mm (4~20mm)、C4の平均が10.5mm (4~18mm)であった。

④ ZのC2ピークの平均は、5.4mm (3~10mm)で、C6ピークの平均が16.9mm (5~46mm)であった。1例(Z3)で、C1、C3、C4の各ピークが10mm以上であったが、他の6例の各ピークは、いずれも10mm以下で、平均はC1が6.0mm、C3が5.9mm、C4

が6.0mmであった。

2. 尿の経時変化と尿斑痕 (図3)

1) 経時的分析

健康成人の尿のうち、W2、X2、Y3、Z1について室温(約20℃)で29日後まで保存し、経時的にイソタコによる分析を行った。

(i) Bピークについて

採取直後の尿のイソタコグラムのB1の高さとSBとのそれぞれの比をみた。W2ではB1の高さが、1日、5日、9日、23日後で、1.20~1.28と大きくなっていったが、SBは0.67~1.03とむしろ小さくなっていった。X2では、B1の高さが0.69~0.89、SBが0.42~0.60で、SBは5日以降で最初の約1/2の大きさとなっていた。Y3では、B1の高さが0.81~1.04、SBが0.90~1.07で、両者とも殆ど変化がなかった。Z1では、B1の高さとSBが、19日までは殆ど変化しなかったが、23、27、29日で、高さが0.85、0.71、0.44となり、SBも0.77、0.64、0.31と急激に小さくなった。

(ii) Aピークについて

4名のAピークのパターンにそれぞれの特徴を認めた。特に、W2のA2が高い傾向は29日目まで認められた。しかし、Y3のA2で最初は4mmであったも

のが、11日以降で、8~12mm と大きくなっており、最初から高いピークなのか、経時的に高くなったのかの判断が困難である。そのほかの、A1, A3, A4, A5 の各ピークは4名とも殆ど変化が見られなかった。

(iii) Cピークについて

W2 に特徴的と考えた、C2 の高いピーク (66 mm) は、1日後に 56 mm と多少低くなり、5日後には 30 mm となったが、他の3名に比べてまだ高いピークと言えた。それ以降では、8~18 mm となり、4名で差異を認めなくなった。他のCピークの高さは殆ど変化しなかった。

2) 尿斑痕の分析

W4, X5, Z6 の3例の尿で、ガーゼ上に尿斑痕を作成した。このうち、約 5×5mm の大きさの切片を切り取り、約 200 μl の蒸留水で約1時間浸出させ、イソタコで分析した。さらに、尿斑痕をWは22日後まで、XとYは8日後まで室温で保存して経時変化をみた。

(i) Bピークについて

B1 ピークの面積について、尿と尿斑痕 (放置0~1日) とを比較してみると、Wでは SB が 608, 220 mm²、

Xでも 512, 225 mm² と小さくなっていった。しかし、Zでは SB が 490, 612 mm² とむしろ大きくなっていった。尿斑痕の作成後の放置期間でみたが、B1 の高さとは、3名とも殆ど変化していなかった。

(ii) C2 ピークについて

Wにみられた特徴的な C2 ピーク (96 mm) は、尿斑痕で 44 mm, 3日後でも 66 mm と高く、尿斑痕でも明瞭に認められた。しかし、7日以降では 10~5 mm と低くなった。他の C1, C3~C6 の各ピークには変化が殆どなかった。

(iii) Aピークについて

尿で認められたAピークのパターンにおける各人の特徴は、尿斑でも認められ、特に、Wの A2 が高い傾向は、尿が 18 mm であったものが、尿斑で 12 mm となり、3日以降で、3, 7, 12, 16, 22日で、20, 10, 12, 9, 9 mm と22日目でも高いピークを示していた。

3. 各ピークの検討

1) 他の人体成分との比較 (図 4)

尿のイソタコグラムと他の人体成分のイソタコグラムを比較してみると、各イソタコグラムは、各試料毎に再

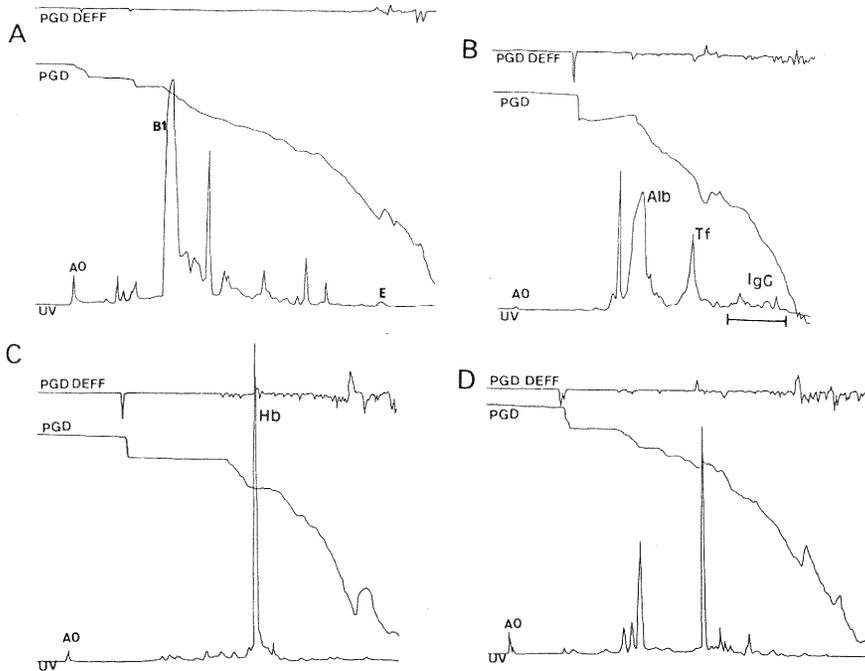


図 4 各人体成分のイソタコグラム

- A : 尿 (W)
- B : 血清
- C : 溶血液
- D : 眼球硝子体

現性を認め、イソタコにより鑑別が可能と考えた。

(i) 健康人の血清のイソタコでは、図4-Bのように、A0の約1.6分後にAlubminのピークを認め、続いて、Transferrin領域、 γ Globulin (IgG)領域の順に20本以上のピークが出現する。血清と尿とを混ぜて、イソタコで分析してみると、血清のAlubminピークと、尿のB2ピークとが重なって認められた。

(ii) 赤血球の溶血液では、図4-Cのように、A0の約3.2分後に、高さ250mmのHbと考えられる1本のピークと、それに隣接するショルダーピークが認められる。

(iii) 眼球硝子体のイソタコグラムでは、図4-DのようにA0の0.9~4.3分後の間に、高さ4~170mmのピークが10本以上認められた。

2) 尿の濃縮による変化

蛋白陰性の尿を、分子量5,000(ザルトリウス社)及び30,000(アミコン社)の遠心式メンブランフィルターを用い、約2倍及び約80倍に濃縮して、イソタコで分析した。2倍に濃縮した場合のパターンは、殆ど尿のパターンと同じであった。約80倍に濃縮した場合のパターンも各ピークの高さが1.2~3.7倍となっているが、全体のパターンは殆ど同じであった。また、尿に -20°C に冷却した4倍量のアセトンを加えそのアセトン沈査を室温で乾燥後、少量の蒸留水で溶かしたものをイソタコで分析すると、殆どのピークが消失し、B1ピークのみが残った。

3) UV 280 nm と 254 nm のイソタコグラムの比較

2例の尿で、UV 280 nm と 254 nm で検出したイソタコグラムを比較したところ、B1ピークは、280 nmの方が約2倍高かった。一方、A1, C1, C4, C5, C6の各ピークは254 nmで検出した方が高かった。このほかのA2, A4, B2, C2, C3の各ピークでは、両者で差異を認めなかった。

4) 尿中の成分

尿の主要成分である尿酸、尿素、クレアチニン及び馬尿酸についてイソタコで分析した。尿に尿酸を加えて分析してみると、B1ピークの高さや面積が著しく増した。B1ピーク以外の各ピークには変化がみられず、B1ピークが尿酸と関係するものと考えた。尿素及びクレアチニンをターミナル液に混ぜてイソタコで分析してみたが、UV 280 nm と 254 nm のいずれでも検出されなかった。馬尿酸は、UV 280 nm では小さなピークであったが、UV 254 nm では、約20倍の検出感度で大きなピークを示した。尿に馬尿酸を加えて分析してみると、いずれもB2ピークに重なっており、特に、UV 254 nm ではB2

ピークの高さが著しく増しており、B2ピークと馬尿酸との関係が窺えた。しかし、健康人尿の本来のB2ピークは、UV 280 nm と 254 nm のイソタコグラムで殆ど同じ高さを示すことから、馬尿酸以外の成分もB2ピークに関係していると考えられる。

4. 患者尿のイソタコグラム

1) 著しい異常ピークの3例(図5)

健康人尿のイソタコグラムで、面積が最も広いピークをB1ピークとして各ピークを確認したが、患者尿102例中99例でも、同様に面積が最も広いピークを容易にB1ピークと確認できた。下記の3例は、著しい異常ピーク例と考えたが、B1ピークの決定が困難であった。

(i) 症例3では、4本のピークが50 mm以上で、各ピークとRT(A1)をみると、130 mm (9.8), 84 mm (24.9), 55 mm (13.1), 92 mm (54.8)で、各ピークをA4, A5, B1, C4と考えた。A4とC4がB1よりも高かったが、B1ピーク的面積(SB)が600 mm²と最も広かった。尿蛋白量は24.9 mg/dl (-)で、比重1.020であった。(図5-A)

(ii) 症例20では、最も高いピーク(91 mm)のRT(A1)は10.1で、高さ30 mmのピークのRT(A1)が19.6であり、この30 mmのピークをB1, 91 mmのピークをA5と考えた。B1ピーク的面積(SB)は150 mm²と他の例にくらべると小さかったが、この例では一番広かった。B2ピーク(18 mm)のRTは10.3で、B2とC1ピーク(18 mm)が重なっており、B1とB2の異常と考えた。A5は鋭いピークで、B1との間に明瞭なピーク(A6ピーク)を認め、C2ピークも41 mmとやや高かった。黄色蛍光尿で、比重は1.010で、蛋白量が1480 mg/dl (3+)であった。(図5-B)

(iii) 症例70は、巾の広いピーク(高さ100 mm)と鋭いピーク(102 mm)があり、RT(A1)が17.7と19.4で、この2峰性のピークをB1ピークと考えた。B2のRTも8.6と広く、B1とB2ピークの異常と考えた。A5とB1の間になだらかなピーク(A6)を認め、このほかに、RT(A1)が29.4, 31.7, 52.8のところ、C2(78 mm), C3(68 mm), C6(64 mm)の3本のピークを認めた。この尿は蛋白量が1392.0 mg/dl (4+)であった。(図5-C)

2) B1ピークの異常

102例のB1のRT(A1)は、17.7~25.6(平均20.9)で、50例(49.1%)が20~24の範囲にあった。

B1ピークの高さは、30~210 mm(平均126.4 mm)で、100 mm以上が76例(74.5%)で、200 mm以上

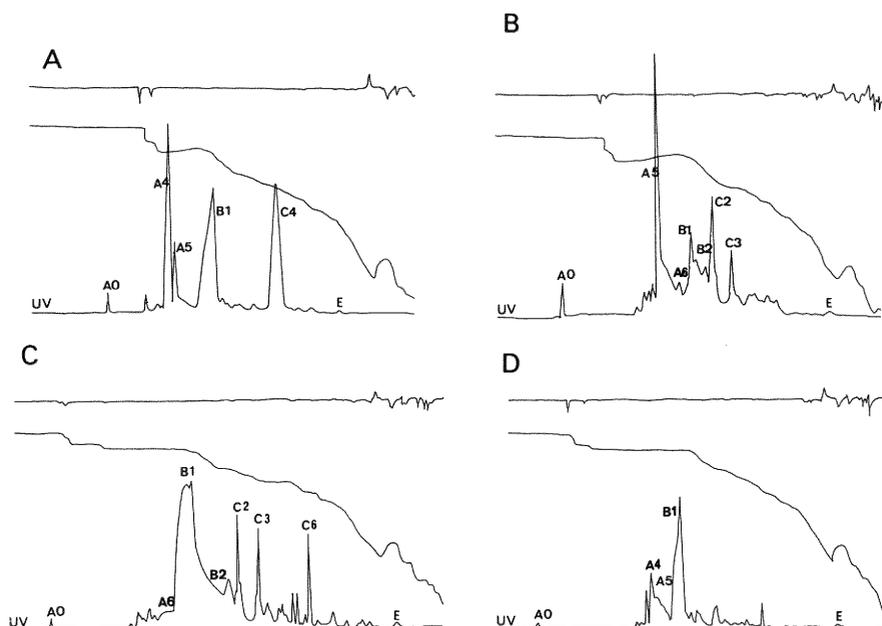


図5 異常を示すイソタコグラム
 著しい異常 (A: 症例3, B: 症例20, C: 症例70)
 Aの異常 (D: 症例72)

が4例含まれている。また、30~39mmと低いものが3例あった。前述の症例3, 20の2例でB1より高いピークを認めた。

B1ピークの面積(SB)の平均は728mm²で、200mm²以下が6例、200~299mm²が5例あり、これらSBが300mm²以下の11例では、無色の尿が7例と目立っており、このうち、比重1.005が4例、1.010が3例あり、7例の無色の尿のうち、6例のB1ピークを異常と考えた。また、比重が1.010で淡黄褐色の症例76のSBは116mm²、蛍光黄色で比重1.010の症例20のSBが150mm²であり、症例5(比重1.010)と症例6(比重1.020)のSBが119, 176mm²であった。SBが250mm²以下の8例のB1ピークはいずれも巾の狭い鋭利なピークで、健康人のB1ピークとは異なっていた。SBが260, 290mm²の2例のB1ピークも同様に健康人のB1と比べて異常ピークと考えたが、SBが280mm²の症例75のB1ピークは健康人のピークパターンと同じと考えた。SBが300~399mm²の12例のうち、3例(症例87, 41, 57)のB1ピークの形を異常と考えた。400~499mm²が9例、500~999mm²が46例、1000~1999mm²が21例、2000mm²以上が1

例であった。

(i) B1ピーク面積と尿の比重との関係

B1ピーク的面積と比重をみると、比重1.005の8例のSBはいずれも500mm²以下であった。一方、比重1.030の5例のSBは、4例で1000mm²以上で、他の1例も960mm²であり、尿の比重が高くなるほどB1ピーク的面積が大きくなる傾向が窺えた。

(ii) B1ピーク的面積と尿の色調との関係

患者尿82例のB1ピーク的面積と色調についてみると、無色の14例中10例が500mm²以下であり、平均は358.7mm²(148~730mm²)であった。黄褐色、淡褐色の尿のSBは468, 450mm²の2例以外は、いずれも600mm²以上であった。黄褐色の8例中5例が1000mm²以上で、平均は1055.1mm²(468~1702mm²)であった。淡褐色尿10例の平均は781.7mm²(450~1056mm²)で、淡黄褐色尿(45例)の平均は790.2mm²(116~2160mm²)であった。尿の色調は、無色から淡褐色及び黄褐色と色調が濃くなるほどB1ピーク的面積が大きくなる傾向が窺えた。その他に、黄色蛍光尿2例のSBは、150mm², 840mm²であった。

3) B2ピークの異常

(i) B2 ピークの中

102例の B2 ピーク巾を RT でみると、1.4~22.8 (平均4.7) であった。20例の RT が7.0以上であり、蛋白4+が7例、3+が7例、2+が4例で、±とーが各1例であった。RT が10.0以上の7例はすべて蛋白が4+又は3+で、蛋白が4+であった9例の RT の平均は10.2で、特に、症例10では、RT が22.8で著しく巾の広いピークを示しており、3例(症例14, 1, 55)の RT が12.2, 11.4, 10.5で、3例(症例70, 22, 13)の RT が7.4~8.6, 2例(症例19, 84)の RT が6.1, 4.8であった。蛋白3+の10例の RT の平均は8.1で、3例(症例2, 20, 4)の RT が10.1~10.5と大きく、4例(症例82, 93, 8, 49)の RT が7.2~9.9, 3例(症例39, 52, 29)の RT が、5.1~5.9であった。蛋白2+の10例では、RT が2.4~8.8 (平均6.3) で、4例(症例90, 78, 91, 77)の RT が7.0以上であり、蛋白1+の19例の RT は1.6~6.7 (平均3.9) であった。蛋白が±の3例のうち、症例23の RT が9.6であったが、他の2例の RT は2.4, 2.9と短く、蛋白(ー)の50例では、症例25で RT が8.4であったが、他の49例の RT は1.4~5.7 (平均2.9) であった。

(ii) B2 ピークの高さ

B2 ピークの高さが50mm以上のものは、5例(症例39, 42, 51, 52, 55)で、それぞれ58mm, 54mm, 90mm, 102mm, 59~43mm (双峰性) であり、4例(症例39, 42, 51, 52)では、B2 と C1 の一部が重なっており、B2 の RT が、5.2~5.9であった。また、症例51の C3 (62mm), 症例55の C2 (64mm) と C4 (58mm) が50mm以上であった。蛋白は、症例55が4+, 症例39が3+, 症例52が2+であった。症例51は蛋白が陰性、ケトン体1+であった。

(iii) B2 ピークの形

B2 ピークの RT が7.0以上の20例は、健康人のシャープな B2 の形に比べて著しくブロードな異常ピークとみることができる。これらの中に、B2 と C1 ピークが重なっていたものが5例(症例10, 14, 70, 82, 93), 2峰性であったものが2例(症例55, 23), ピークの頂点が平であったものなどがみられた。RT が7.0以下で B2 ピークの異常と考えたものは11例で、B2 と C1 ピークが重なっていたものが9例で、B2 の高さが50mm以上であった4例以外に、5例(症例19, 31, 80, 81)で異常を認め、それぞれの B2 の RT は5.5~6.1であった。また、2例(症例84, 96)で B2 ピークが双峰性を示し、症例96では、C6 (54mm) も高かった。

この2例の B2 の RT は、4.8, 4.4であった。

3) A ピーク

A ピークの高さが50mm以上であった4例(症例3, 20, 25, 85)のうち、2例(症例3, 20)は、前述の、著しい異常ピーク例であった。症例25は A5 (56mm) が高く、尿中の糖が2+であった。症例85は A2 (52mm) が高く、C2 (66mm) も50mm以上であり、淡褐色尿で、蛋白は1+であった。A ピークの高さが50mm以上の4例のうち3例(症例20, 25, 85)では、B2 ピークの異常を伴っていた。

このほか、症例72は、淡黄褐色尿で、比重1.010, 蛋白量1.2mg/dl (ー) であったが、A4 (36mm) が少し高く、A5 ピーク (20mm) と重なって RT 6.9 のブロードな異常ピークであった(図5-D)。

4) C ピーク

C ピークの高さが50mm以上のものは、C2 ピークで14例、C3 ピークで6例、C4 ピークで6例、C5 ピークで1例、C6 ピークで11例みられた。

C2 ピークが50mm以上であった14例のうち、C2 のほかに、C3 と C6 が高いものが2例あり、前述の症例70のほか、症例68で C2 (64mm), C3 (80mm), C6 (76mm) が高かった。症例102は C2 (96mm), C3 (74mm) と C4 (54mm) の3本が高かった。また、2例(症例26, 55)では、C2 と C3 ピークがそれぞれ50mm以上で、3例(症例47, 59, 83)では、C2 と C6 ピークが50mm以上であった。

このほかの6例(症例16, 23, 34, 35, 36, 85)では、C2 ピークのみが高く、それぞれ64mm, 69mm, 64mm, 96mm, 76mm, 66mm であった。C2 ピークのみが高い6例のうち3例で、尿中に糖を認め、4+が1例(症例34)で、1+が2例(症例35, 36)であった。

C2 ピークが50mm以上であった14例のうち、症例70以外に、症例23と83でも B2 ピークの異常を認めた。

C3 ピークが50mm以上であった7例のうち、B2 の異常を認めた2例(症例51, 70)のほか、4例(症例26, 68, 71, 102)で C3 以外にも、C2, C2 と C6, C6, C2 と C4, ピークが50mm以上であった。症例53は、C3 (56mm) ピークのみが高かった。

C4 ピークが50mm以上であった6例のうち、3例(症例49, 57, 87)では、C4 ピークのみが高く、それぞれ72mm, 62mm, 78mm であった。C5 ピークが50mm以上であった1例(症例78)は、C5 ピークのみが高く75mmで、蛋白が2+であり、B2 ピークの形にも異常を認めた。

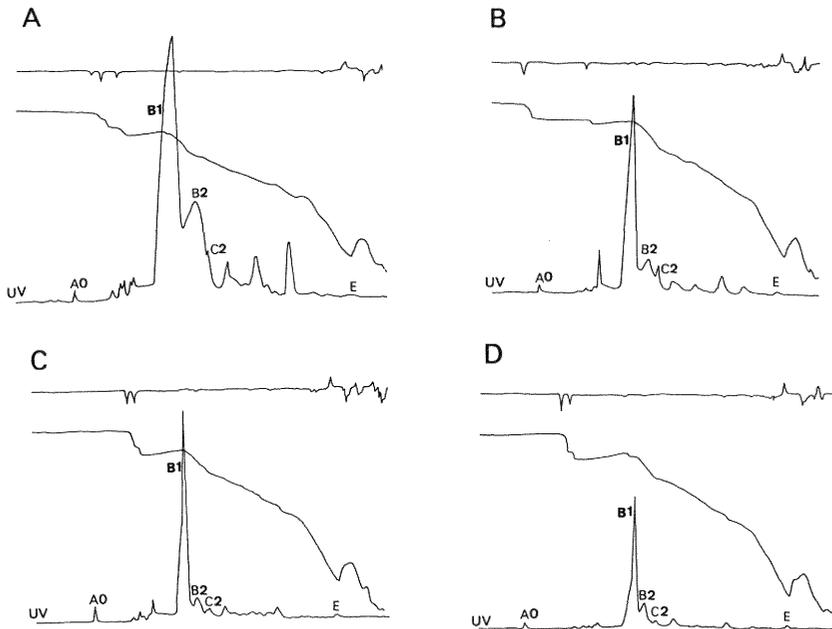


図 6 尿蛋白量とイソタコグラム

- A : 蛋白量 4605 mg/dl (症例10)
- B : 蛋白量 2237 mg/dl (症例14)
- C : 蛋白量 400 mg/dl (症例 8)
- D : 蛋白量 351 mg/dl (症例13)

C6 ピークが 50 mm 以上であった10例のうち5例(症例66, 74, 88, 94, 96)は, C6 ピークのみが高く, それぞれ 68~54 mm であった. このうち, 2例(症例88, 96)では, B2 ピークにも異常を認めた.

このほか, 症例69では, C4 ピーク (40 mm) がブロードで2峰性であり異常と考えた. この尿は, 薬黄色で比重が 1.010, 蛋白量 70.7 mg/dl (2+) であった.

5) 尿蛋白量とイソタコグラム (図 6)

附属病院中央検査部で測定した尿蛋白量が 1000 mg/dl 以上 (4+に相当) が4例(症例10, 14, 20, 70), 300~1000 mg/dl (3+) が5例(症例1, 4, 2, 8, 13), 100~300 mg/dl (2+) が4例(症例6, 19, 11, 9), 30~100 mg/dl (1+) は6例, 30 mg/dl 以下が21例であった.

症例10は蛋白量 4605 mg/dl (4+) で, B2 の RT は 22.8 と巾が広く, B2 ピークと C1 ピークが重なっていた. B1 ピークの高さは 92 mm, SB は 1150 mm² で, B1 の RT (A1) が 25.6 であった. Aピークはいずれも 10 mm 以下と小さく, Cピークも 20 mm 以下であった (図 6-A). 症例14は, 蛋白量 2237 mg/dl

(3+) で, B2 の RT は 12.2, B2 ピークと C1 ピークとが重なっていた. B1 ピークの高さは 138 mm, SB は 966 mm² で, B1 の RT (A1) が 21.7 であった. A5 が 32 mm, C2 が 21 mm であったが, 他は 20 mm 以下であった. この尿は淡褐色で, 比重は 1.025 であった (図 6-B). 蛋白量 1480 mg/dl (3+) の症例20及び蛋白量 1392 mg/dl (4+) の症例70は前述の著しい異常ピークと考えた例である.

蛋白量が 300~1000 mg/dl の5例の蛋白量は 804 mg/dl (4+), 706 mg/dl (4+), 555 mg/dl (3+), 400 mg/dl (3+), 351 mg/dl (4+) で, B2 の RT が, 11.4, 10.1, 10.5, 8.6, 7.4 と次第に短くなっており, いずれも, B2 と C1 ピークとが重なっていた. 症例1の C2 (48 mm) がやゝ高かった (図 6-C, D).

蛋白量 235 mg/dl (2+) の症例6の B2 の RT は 6.5 で, B2 と C1 ピークが重なっており, SB も 176 mm² と小さかった. 蛋白量 208 mg/dl (4+) の症例19の B2 の RT は 6.1 で2峰性のピークとなっていた. 蛋白量 127 mg/dl (2+) の症例11は, B2 ピークの RT が 5.5 であったが, B2 と C1 ピークの一部が重なって

いた。蛋白量 111 mg/dl (1+) の症例9の B2 の RT は 6.0 で、形にも異常を認めなかった。蛋白量 100 mg/dl 以下の27例では、いずれも B2 ピークの RT が 3.1 以下で、B2 ピークの形には異常を認めなかった。症例 69 (蛋白量 70.7 mg/dl) では C4 ピーク (40 mm) が双峰性で幅が広く、C6 (36 mm), C2 (22 mm), C3 (20 mm) も高かったが、B1, B2 ピークには異常を認めなかった。

B2 ピークの RT をみると、蛋白量が 4605 mg/dl の症例10が 22.8 であるのをはじめ、2237, 1480, 1392 mg/dl の3例の B2 の RT が、12.2, 10.3, 8.6 であり、300~1000 mg/dl の5例では、B2 の RT が、11.4, 10.1, 10.5, 8.6, 7.4 と次第に短くなっていった。さらに、100~300 mg/dl の4例では、6.5, 6.1, 5.5, 6.0 となり、100 mg/dl 以下の27例では、B2 の RT が 3.1 以下であった。

2例 (症例5, 76) の SB が 119, 116 mm² と小さく、症例16, 59 では C2 ピークの高さが、それぞれ 64

mm, 56 mm と高く、症例66, 74では C6 ピークの高さが、それぞれ 68 mm, 52 mm と高かった。症例57では、C4 ピーク (62 mm), 症例68では、C2 (62 mm), C3 (80 mm), C6 (76 mm) の各ピーク、症例71は C3 (64 mm) と C6 (56 mm) が高かった。

6. 二次元電気泳動とイソタコグラム (図7)

患者尿19例についてそれぞれ分子量 30,000 の遠心式メンブランフィルターを用いて約80倍に濃縮したものの各 5 μ l を、真鍋らの方法¹⁵⁾¹⁶⁾によりマイクロ二次元電気泳動を行った。すなわち、一次元目に pH 3.5~9.0 の等電点キャピラリーゲル、二次元目に 8~20%濃度勾配ゲルを用いた泳動を行い、ゲルをクマジー染色した。

大きな Albumin のスポットを認めた2例 (症例82, 93) では、B2 ピークの RT がいずれも 9.9 と広く、いずれも B2 ピークが C2 ピークと重なっていた。この2例の尿蛋白は 4+, 3+ であった。

比較的大きな Albumin のスポットを認めた4例 (症例77, 78, 90, 91) では、B2 ピークの RT が 7.8

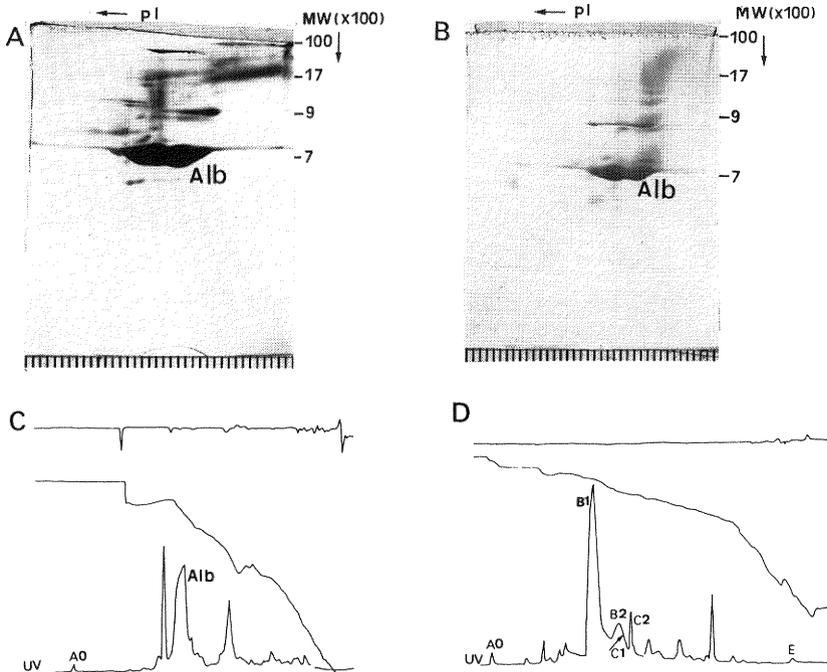


図7 二次元電気泳動とイソタコグラム

- A: 二次元泳動像 (血清)
- B: 二次元電気泳動像 (症例82)
- C: イソタコグラム (血清)
- D: イソタコグラム (症例82)

～8.8で、いずれも B2 ピークが C2 ピークと重なっていた。SB はそれぞれ、395～216 mm² と小さなピークで、症例78は C5 が 75 mm と高かった。これら4例は蛋白は2+であった。

小さな Albumin のスポットを認めた10例のうち、症例84 (4+) の B2 の RT は4.8で、双峰性であり、症例81 (3+) の RT は5.5で B2 ピークが C2 ピークと重なっていた。蛋白2+の2例 (症例89, 76) の B2 の RT は6.8, 3.6で、症例76では SB が 116 mm² と小さかった。蛋白1+の5例 (症例88, 85, 83, 97, 95) の B2 の RT は3.8～6.7で、症例97の SB が 202 mm² で、症例83では C2 (126 mm) と C6 (70 mm)、症例85では C2 (66 mm) と A2 (52 mm)、症例88では C6 (54 mm) ピークが高かった。症例86は蛋白陰性で、RT が3.1であった。

Albumin のスポットを認めない3例 (症例79, 94, 96) は蛋白陰性で、B2 の RT が5.5～4.4で、症例96の B2 ピークは双峰性で、C6 (54 mm) も C3 (42 mm) が高く、症例94では、C6 (56 mm) が高かった。

7. 糖やケトン体とイソタコ

尿試験紙で、20例で尿糖が陽性であった。蛋白陰性で糖が陽性であった12例をみると、症例25 (糖2+) で、B2 の RT が8.4、症例31 (糖3+) で、RT が5.7であり、何らかの相関を考えたが、糖が4+の5例の RT が、1.7～3.0であり、他の糖陽性例でも、B2, B1 のほか、A, Cピークでも特に一定の傾向を示していなかった。

ケトン体陽性は2例で1+で、症例59は、C2 と C6 が 50 mm 以上であったが、ケトン体のほか、糖 (1+)、ビリルビン (1+)、蛋白 76 mg/dl (1+) と多くの異常を伴っており、他の1例 (症例51) は、蛋白陰性で、B2 が 90 mm と高く、RT も5.2であったが、ケトン体による異常ピークとは断定できなかった。

考 察

1. ピークの出現時間と相対時間 (RT)

健康人尿のイソタコグラムのうち、面積が最も高い高いピークを B1 ピーク、そのやや高電位のピークを B2 ピークとし、Bピークより低電位のピーク群をAピーク (A1～A6)、高電位のピーク群をCピーク (C1～C6) とした。リーディング溶液及びターミナル溶液中の不純物であるアジドイオンのピークの A0 から、C1～C6 ピークに続いてみられる比較的巾のある低いEピークまでの泳動時間は日によって変動がみられた。泳動時間のバラツキは、試料に含まれている電解質成分量の差が考えら

れるほかに、山本ら¹⁷⁾ はリーディング溶液及びターミナル液中に溶け込んでいる炭酸イオンを指摘し、その影響は低電位のピークほど影響を受けやすいとしており、著者も、リーディング及びターミナル溶液の状態によるものと考えた。

各ピークの出現時間を A0 からEピークまでの時間に対する相対時間 (「RT」と略す) で表し、A0 ピークからの相対時間を RT (A0) とすると、A1 ピークの RT (A0) が症例により変動しているが、A2～C6 ピークの A1 ピークからの RT (A1) は、殆ど同じであった。そこで、各ピークの出現時間を RT (A1) でみると、健康人尿31例の B1 ピークの RT (A1) は、20.2～26.2 (平均22.2) で、20.0～24.0の範囲に26例 (83.9%) があり、患者尿102例の B1 ピークの RT (A1) は、17.7～25.5 (平均20.9) で20.0～24.0の範囲に50例 (49.1%) がみられた。

患者尿のうち著しい異常ピークを示す3例 (症例3, 20, 70) では、どのピークを B1 ピークとするのかの判断も困難であったが、RT (A1) の値から、B1 ピークを決めたところ、そのピーク的面積 (SB) が最も広く、ピークの同定にも RT (A1) が有用であると考えた。

2. 尿蛋白量と B2 ピーク

蛋白が4+ (蛋白量 1000 mg/dl 以上) の9例、3+ (300～1000 mg/dl) の11例、2+ (100～300 mg/dl) の10例、1+ (30～100 mg/dl) の19例、±の3例、－の50例の B2 ピークの RT の平均はそれぞれ、10.2, 8.1, 6.3, 3.9, 4.9, 2.9であり、蛋白量と B2 の RT との間に相関が窺われた。健康人31例の B2 の RT が2.0～6.9 (平均4.0) であることから、7.0以上を異常と考えてみると、蛋白が4+の7例 (77.8%)、3+の7例 (63.8%)、2+の4例 (40.0%) が7.0以上で、±と－の各1例で、RT が9.6, 8.4であった。蛋白量4605 mg/dl (4+) で、RT は22.8と著しく大きく、蛋白量が500 mg/dl 以上の7例中6例では RT が10.0以上であったが、1392 mg/dl (4+) の1例で RT が8.6であった。また、1480 mg/dl の1例が3+と判定されており、一方、蛋白量が804, 351 mg/dl の例が4+と判定され、必ずしも蛋白量と尿試験紙の結果とが一致していなかった。しかし、いずれにせよ、蛋白量が300 mg/dl 以上の9例の RT はいずれも7.0以上であり、明らかな B2 ピークの異常と考えられた。次に、RT が5.0～7.0の範囲の例についてみると、B2 が50 mm 以上の高い例が4例あり、蛋白3+の2例 (症例39, 52) の RT はそれぞれ5.9で、蛋白が陰性の2例 (症例42,

51) の RT がそれぞれ 5.2 で、いずれも、B2 と C1 ピークの一部が重なっていた。また、蛋白 4 +, 3 +, 1 + の各 1 例では低い B2 が C1 ピークと重なっている異常と考えた。このうち、蛋白 4 + の 1 例は蛋白量が 208 mg/dl, RT 6.1 であり、蛋白量が正しいとすれば、尿試験紙の結果が何らかのエラーとも考えられる。このほか、蛋白 3 + の 1 例、2 + の 3 例、1 + の 3 例、- の 1 例の計 15 例の RT が 5.0~7.0 であり、多くで B2 ピークの形の異常を伴っており、RT 5.0 以上の場合には、何らかの異常を認める可能性が高いと考える。しかし、これら、B2 が高いことや B2 と C1 ピークとが一部重なっている異常と、蛋白量とは必ずしも相関していない。B2 が双峰性を示した異常例は 4 例で、RT 7.0 以上の 2 例のほか、蛋白 4 + と 1 + で、RT が 4.8, 4.4 の 2 例で B2 が双峰性を示しており、RT が 5.0 以下であっても、形の異常を認めた場合には、尿中に蛋白を認めている可能性がある。

さらに、二次元電気泳動を行った 19 例のうち大きな Albumin のスポットを認めた 2 例の B2 の RT はいずれも 9.9 であり、比較的大きな Albumin のスポットを認めた 4 例の B2 の RT も、7.8~8.6 といずれも、7.0 以上であった。また、血清と尿とを混ぜてイソタコで分析すると血清の Albumin のピークと尿の B2 ピークとが重なった。以上から、B2 ピークの巾が広がることと、蛋白量とが相関しており、特に、Albumin 量と相関している可能性が高かった。しかし、蛋白量を測定していない例で、蛋白が 2 + や ±, - の例でも、B2 の RT が 7.0 以上となることがあり、蛋白以外でも B2 が広がる可能性も考えられる。

3. ピークの分析

蛋白が陰性である尿の各ピークは、分子量 5,000 のメンブランフィルターで濃縮を行っても高さの変化が殆どみられず、B2 ピーク以外はいずれも分子量 5,000 以下の物質と考えられた。また、各ピークは尿の主要低分子成分のうち尿素、クレアチニンではないことを確認した。尿酸と尿とを混ぜてイソタコで分析すると尿酸のピークと B1 ピークとが重なり、B1 ピークは尿酸に関係するピークと考えられた。また、同様に馬尿酸のピークと B2 ピークとが重なり、両者の関係が窺えた。

4. B1 ピークと尿の比重、色調との科係

SB が 300 mm² 以下の 11 例のうち 10 例の B1 ピークはいずれも巾の狭い鋭利なピークで、異常ピークと考えたが、このうち、6 例が無色の尿で比重が 1.005 又は 1.010 と低かった。尿中の蛋白をみると、3 + が 2 例、2 + が

3 例、1 + が 3 例、- が 3 例であった。健康人尿及び患者尿のいずれでも、尿の比重が大きくなるほど B1 ピークの高さが高く面積 (SB) が大きくなる傾向がみられた。無色尿の SB は小さく、また、色調が濃くなるほど SB が大きくなっていった。SB と蛋白量の間には相関を認めず、他の検査所見と B1 ピークとの間にも、相関を認めなかった。

5. 尿からの個人の識別の可能性

C ピークのうちで W の C2 ピークがいずれも 50 mm 以上と高く、他の 3 人では C2 ピークは 50 mm 以下であり、W に特徴的なものと考えた。この C2 ピークの高い特徴は、室温で 5 日後まで保存しても、その高さは大きく減少せず他の 3 名に比べて高いピークであることが確認でき、尿斑痕としても、C2 ピークが高い特徴が認められた。この高い C2 ピークの特徴は、患者尿の 102 例中 12 例 (11.8%) で 50 mm 以上のピークとして認められ、蛋白が 4 + が 2 例、1 + が 4 例、- が 6 例で、蛋白量とは相関がなく、他の高いピークとの関連は不明であるが、個人識別に应用可能と考えた。他の C ピークで 50 mm 以上の高いピークを示すものも、同様に、検査所見との間に特別な傾向がなく、個人に特有な高いピークである可能性を考えている。

また、健康人 4 人について、A ピークを比較すると、W では A2 ピークが高く、Y と Z では A5 と B1 の間に巾の広い A6 ピークがみられるなど、A ピークのパターンが各個人で特徴があるように窺われた。この特徴は、経時的に変化せず、尿斑痕でも再現性があり、特に、A2 ピークが高いという W にみられた特徴は、個人識別に应用できると考えるが、経時的に低い A2 が高くなる例もあり、新鮮な場合以外には、注意が必要である。

これまでヒト尿からの個人の識別については、岸らによる GPT の多型など¹⁸⁾¹⁹⁾ や長井らによる DNA 型が報告されているが、イソタコでも個人識別が可能であり、これらの方法と合わせて尿からの個人識別の可能性が増すものとする。

結 語

蛋白の分析と同じ泳動条件を用いてヒト尿について細管式等速電気泳動法による分析を行った。この方法の利点は、同一の泳動条件で、尿以外の各種人体成分について分析でき、試料が微量でもよく、殆ど前処理を必要とせず、短時間で分析できることから極めて実用であると言える。ヒト尿の分析では、再現性の良い多くのピークが認められたが、これらの各ピークを、A0, A1~A6、

B1, B2, C1~C6, Eピークと呼び、各ピークを A0~Eピークの泳動時間に対する相対時間 (RT), 特に A1ピークからの RT (A1) により各ピークを決め、その高さやパターンを検討することにより、各ピークの異常の有無を確認することができた。

B2 ピークは、蛋白、特に Alubumin 量によりその巾が広くなり、B2 ピークの異常から尿蛋白量の推定も可能と考えた。B1 ピークは、尿酸に関係し、尿の比重と色調とも関係していると考えた。その他のピークがどのような成分なのかははっきりしなかったが、いずれも低分子の物質と考えた。

健康成人4名の各ピークのうちで C2 ピークの高さやAピークのパターンにおいて、各個人に特徴がみられ、患者尿からもそれ以外の特徴を示唆する高いピークを認め、尿のイソタクogramによって、個人識別できる可能性が考えられた。

稿を終わるにあたり、本研究に御指導と御校閲を賜りました山内春夫教授に深謝致します。また、貴重な患者さんの尿試料の検査に協力頂きました、新潟大学医学部附属病院中央検査部の方々に感謝致します。二次元電気泳動法をはじめ多くのことを教えて頂いた、帝京大学医学部吉田宏博士並びに新潟大学医学部法医学教室の皆様へ深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Delmotte, P.: Biochemical and Biological Application of Isotachopheresis. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam p 259~265, 1980.
- 2) Delmott, P.: Separation of proteins and other compounds by capillary isotachopheresis. Sep Purif Methods, 10, 29~52, 1981.
- 3) 坂岸良克: 等速電気泳動法による血液成分の分析, 蛋白質・核酸・酵素 (別冊), 9: 161~172, 1978.
- 4) Hine, T.: Study of isotachopheresis conditions for serum protein analysis. Electrophoresis, Water de Gruyter and Co., Berlin, New York, pp 541~545, 1984.
- 5) 石澤不二雄, 三澤章吾: 細管式等速電気泳動による潤滑油等重質油の識別. 日法医誌, 43: 251~256, 1989.
- 6) 山本秀子, 真鍋 敬, 奥山典生: モノクロナール IgG 血症血清の等速電気泳動法による分析. 生物物理化学, 32: 295~301, 1988.
- 7) 室井一男, 佐々木龍平, 三浦恭定, 吉田治弘, 池本 卯典: 細管式等速電気泳動による正常ヒト白血球及び白血病細胞抽出液の分析. 生物物理化学, 29: 267~270, 1985.
- 8) 吉田治弘, 池本卯典: 細管式等速電気泳動法を用いたヒト血清 Tf 型の検出. 生物物理化学, 30: 179~183, 1986.
- 9) Takahama, K., Seo Y., Tomono, S. and Yukawa, N.: Capillary tube isotachopheresis of proteins in early postmortem serum, cerebrospinal fluid and pericardial fluid. Jpn Legal Med, 43: 246~250, 1989.
- 10) 山内春夫, 小野政孝, 福田祐明, 出羽厚二, 本間尚子: 等速電気泳動法による人体成分の分析 (第2報). 日法医誌, 41: 620, 1987.
- 11) 小野政孝, 山内春夫: 細管式等速電気泳動法によるヒト血清分析. 日法医誌, 44: 455~462, 1990.
- 12) Tsutumi, T.: Assay of seminal spermine by isotachopheresis and its application to forensic practice. Jpn Legal, 41: 294~307, 1987.
- 13) 中村茂基: 細管式等速電気泳動による血液 (ヘモグロビン) の種族鑑別. 東女医大誌, 53: 29~39, 1983.
- 14) 何川 涼, 古徳 迪: Gas Chromatography による生物試料中の Alcohol の迅速定量法. アルコール研究, 4: 27~33, 1969.
- 15) 真鍋 敬, 奥山典生: ポリアクリルアミドゲルによる二次元電気泳動. 生物物理化学, 26: 199~204, 1982.
- 16) 吉田 宏, 小野政孝, 真鍋 敬, 奥山典生: ヒト精漿蛋白の二次元電気泳動法による分析 (第2報). 生物物理化学, 33: 119~124, 1989.
- 17) 山本秀子, 小島清嗣, 真鍋 敬, 奥山典生: タンパク質の高性能等速電気泳動. 生物物理化学, 32: 33~38, 1988.
- 18) 岸紘一郎, 笹原菜穂子, 澤崎一三: 等電点電気泳動によって認められるヒト尿の GPT (glutamic-pyruvic transaminase) の多型. 科警研報告, 38: 148~150, 1985.
- 19) Kishi, K. and Iseki, S.: Young age-related glycoproteins related in normal human urine by isoelectric focusing. Proc. Japan Acad. 58 B: 229~231, 1982.

(平成4年3月17日受付)