Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-24

電気化学検出器(ボルタンメトリー)を用いた血中カテコラミン測定について

河本, 英作 ; 玉田, 和彦 ; 佐々木, 順子 ; 宮崎, 都志幸 ; 久次米, 健市 ; 伊藤, 芳久 ; 上羽, 康之 ; 長井, 勇

(Citation)
神戸大学保健管理センター年報,9:48-52

(Issue Date)
1984

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/81001486

KOBE UNIVERSITY

電気化学検出器（ボルタンメトリー）を用いた血中カテコラミン測定について

神戸大学医学部第一内科
河本　英作，　玉田　和彦，　佐々木順子
宮崎都志幸，　久次米健市，　伊藤　芳久
神戸大学医療技術短期大学部
上羽　康之
神戸大学保健管理センター
長井　　勇

はじめに

近年，種々の分野において交感神経活動の指標として，血中カテコラミン濃度の測定が行われるようになってきたが，その測定法には未だ解決されるべき問題点が数多く残されている。従来，血漿中カテコラミン濃度の測定はエチレンジアミン法やトリハイドロオキシインドール法（ＴＨＩ法）による螢光法，ダブルアイソトープを用いた酵素法，およびガスクロマトグラフィー法などにより行われてきた。しかし，これら測定法には特異性，感度，簡便さの点で夫々問題があり，現在もなお種々の改良が試みられている。以上のべた測定法のうち，1968年にEngelman[1]らにより開発された酵素Comethyl－O－Methyl－Trausferase（ＣＯＭＴ）を用いたダブルアイソトープ法は微量の試料でカテコラミンの特異的測定が可能であることより特に高く評価されているが，検体処理の煩雑さや，一検体あたりの測定時間が従来の方法に比較して，著しく長く，通常の臨床的応用に不適当であることは否定しえない。また，近年，高速液体クロマトグラフィーと高感度螢光分光々度計を組み合わせたＴＨＩ法による血中カテコラミン測定が高感度で信頼性の高いものとされているが，装置が高価であり，試薬の管理等に未だ問題が残されている。一方，1950年にKemula[2]らが高速液体クロマトグラフィーと，構造が単純で，しかも安価な電気化学検出器（ＥＣＤ）を組み合わせることにより電気化学的物質を簡便，かつ高感度，正確に測定できることを報告して以来，1974年にはKissinger[3]がこのＥＣＤ法を用いた尿中カテコラミンの測定を，また，Refshauge[4]らは脳組織中カテコラミンの測定を報告している。しかし、本法による血中カテコラミン測定については未だ十分に検討されたとはいえない。このたびわれわれは高速液体クロマトグラフィーとＥＣＤを組み合わせ，血漿中カテコラミン濃度の簡便，かつ高感度の測定を可能にしたので以下に報告する。なお，これらＥＣＤ法を用いたカテコラミン測定に関しては梶原[5]らが詳細に比較検討を行っているので参照していただきたい。

方　法

分析機器として高速液体クロマトグラフィーと電気化学的検出器ボルタンメトリーを組み合わせた柳本製ＶＭＤ－101型機を用いた。高速液体クロマトグラフィー用のカラムには粒子径，10 μmのポーラス型シリカゲルの表面を，オクタデシールシラン（ＯＤＳ）で処理した化学結合型充塡剤を充塡した内径4㎜，長さ250㎜のYanapak

ODS－Tカラムを用いた。カラムの移動相には0.1Mリン酸緩衝液pH 3.1と液体クロマトグラフィー用メタノールを17：3の割合にて混合した溶液を用いた。移動相の流量は0.4 mℓ/minに設定したが，その際のカラム圧は40 kg/cm²～60 kg/cm²であった。

電気化学的検出器Yanaco VMD 101型 Voltanmetry Detector（ポーラログラフ法）は作用電極のグラッシーカーボン，参照電極の銀塩化銀電極，そして補助電極（アース）の3つの電極を3 mℓ容量のマイクロフローセルに装備しており，測定原理は参照電極の電位を基準に作用電極と補助電極との間で定電位電解を行い，電解液に含まれる電気化学的活性物質が，作用電極において，酸化または還元される際に流れる電流を検出測定する。

検体処理，保存，およびカテコラミン抽出

(1) 採血，および試料の保存

被検者の肘静脈に翼状針を固定後，点滴セットにて生理的食塩水を滴下して血管確保の後に，30分以上被検者を安静に臥床させ，三方活栓を通じて，約6 mℓの血液をヘパリン採血した。試料はただちに，氷水中のメタ重チオ亜硫酸ソーダ添加試験管に移した。4℃ 3000回転/分にて5分間遠沈後，血漿分離を行ない，血漿3 mℓを－25℃で凍結保存した。

(2) 血漿中カテコラミン抽出

3 mℓの凍結検体を，氷水中にて融解後，試料に回収率計算用内部標準物質としてDehydroxy benzilamime（DHBA）を5 mg加え，ついで0.4 NHClO₃を添加，除蛋白後，4℃ 4500回転/分にて5分間遠沈し，その上澄に0.1M NaHSO₃を100 μℓ，0.1MEDTA－2Naを50 μℓ加えた。さらに10Nおよび1N NaOHにてpHを8.4に調整し，活生アルミナ(Merck製Al_2O_3）20 mgを加えて約5分間軽く振盪した。上清をアスピレーターにて除去後，アルミナを氷冷した0.001MNaHSO₃約10 mℓにて2回洗浄し，その後4℃ 2000回転/分にて5分間遠沈した。上澄を可及的に吸引し，水分を充分に除去後，アルミナに0.2 NHCl 100 μℓを加え，10分間軽く振盪後，4℃，2000回転/分にて5分間遠沈し，その上清を分離した。

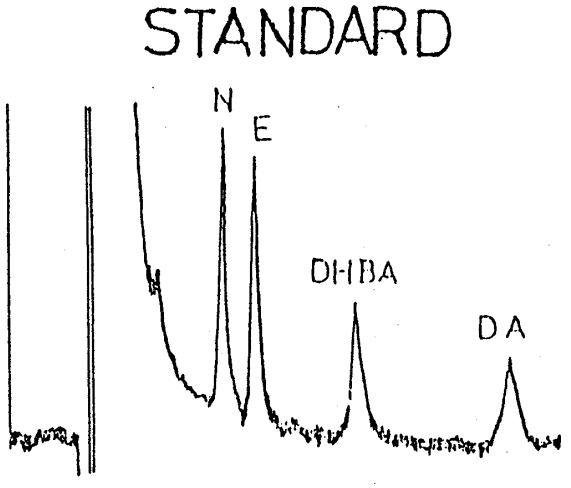
マイクロシリンジ（ハミルトンCR700—20）を用いて，得られた上清の25 μℓをVMD—101型に注入しカテコラミンの分離定量を行った。なおVoltanmetry Detectorは周囲の磁場の影響を受けやすいため測定器は金属ボックス内に設置されているが微量のカテコラミン測定時の最大感度では基線の振幅が大きく測定上の大きな支障となる。ことより、本研究では測定器の金属ボックスをさらに大きなシールドスペースに入れ二重シールドとした。

結　果

(1) 標準液の分析

ノルエピネフリン（NE），エピネフリン(E)，ドーパミン（DA），およびDHBAの混合標準液の分析結果は図1に示すように，検体注入後に

図1　標準液の分析



まず巨大なフロントピークが出現し，引き続きNE，E，DHBA，DAの順に尖鋭なピークが得られた。それぞれのピークの分離状態および再現性は良好であった。

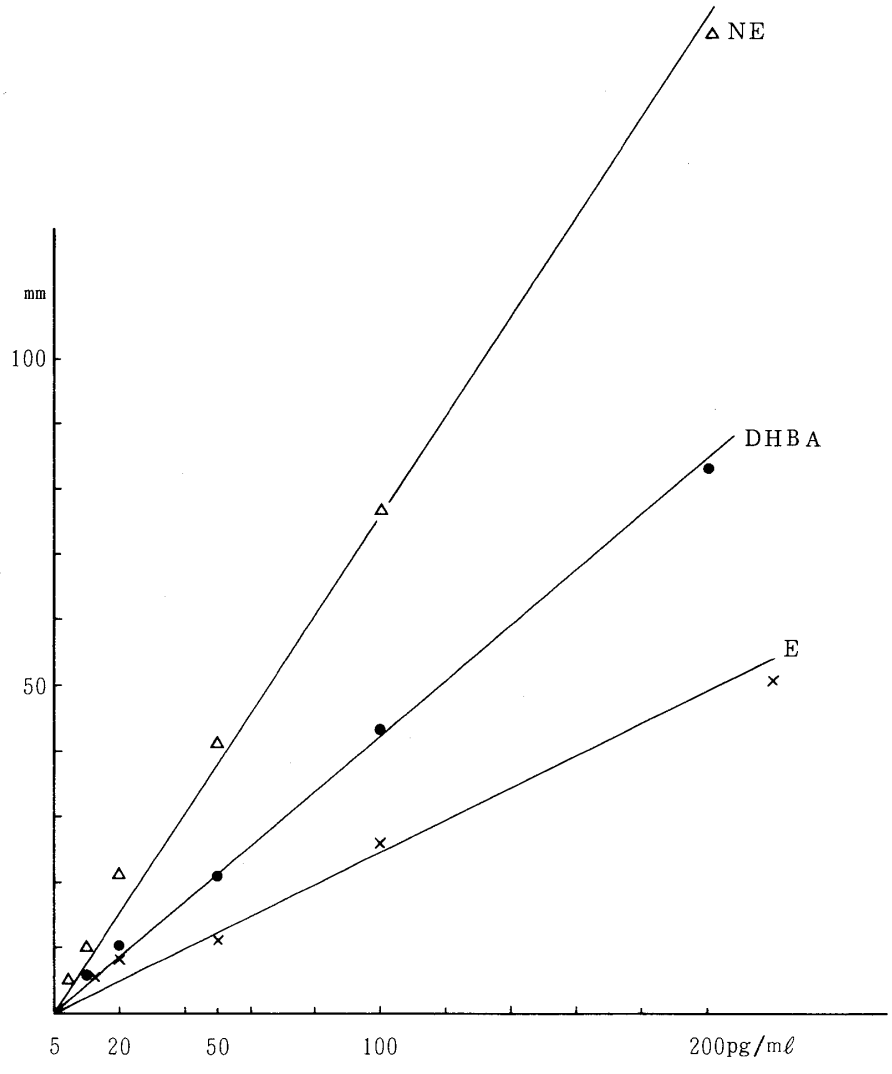
(2) 検出限界について（図2）

ECD検出器の二重シールドを行わない場合のNE，Eの標準液検量線は100 pg/mℓより10 μg/mℓまで良好な直線を示した。一方，二重シールドを行うと100 pg/mℓの検出限界はNE，Eとも50 pg/mℓにまで改善された。なお高速液体クロマトグラフィーによるカテコラミンの分離状態はカラム温度により容易に変化するため，カラム温度は定温灌流装置を用いて，25℃に保った。

(3) 回収率について

われわれは従来，THI法によるカテコラミン測定では，^{3}Hをラベルした NEを使用して，回収率を算出し，測定値の補正を行ってきたが，今回のECD法では，合成カテコラミン物質であるDHBAの一定既知量を予め検体に加えておくことにより，これを実測し，カテコラミン量を補正する方法をとった。DHBAの検量線は50pg/mℓより10μg/mℓまで直線関係を保った。またアルミナによるカテコラミン抽出処理においても，DHBAはNE，Eと同様の動態を示したことより，DHBAを内部標準物質として，利用することで回収率補正を行ない得ることが認められた。

図2　E，NE及びDHBAのCalibration Curve.



(4) ＥＣＤ法による血漿中カテコラミン濃度の測定

神戸大学に在籍中の18才～30才の男子学生７名を被検者とした。その内３名は正常血圧者，４名はＷＨＯ基準による境界域高血圧者であり，血中カテコラミン濃度とその変動を観察することにより若年者の境界域高血圧と交感神経活動の関連性の解明の一環とした。

被検者を３０分安静臥床させ，負荷前の採血をした後に立位負荷を施行し，立位開始より１５分，３０分時に採血を行った。図３にその一分析例を示すが，フロントピークに引き続きＮＥ，Ｅ次いでＤＨＢＡのピークが認められた。各ピークは夫々尖鋭であり，分離状態，および再現性も良好であった。さて立位負荷での血中ＮＥ値の変化を図４に示すと，立位負荷前に118～236pg／mℓ（157 ± 15 pg／mℓ）であったＮＥ濃度は立位15分時には141～305 pg／mℓ（212±19 pg／mℓ），30分時には75～280 pg／mℓ（195 ± 23 pg／mℓ）と上昇傾向が認められた。これら血中カテコラミン濃度は，われわれが従来行ってきたＴＨＩ法による血中カテコラミン値と良好な相関を示した。

図３　検体の分析

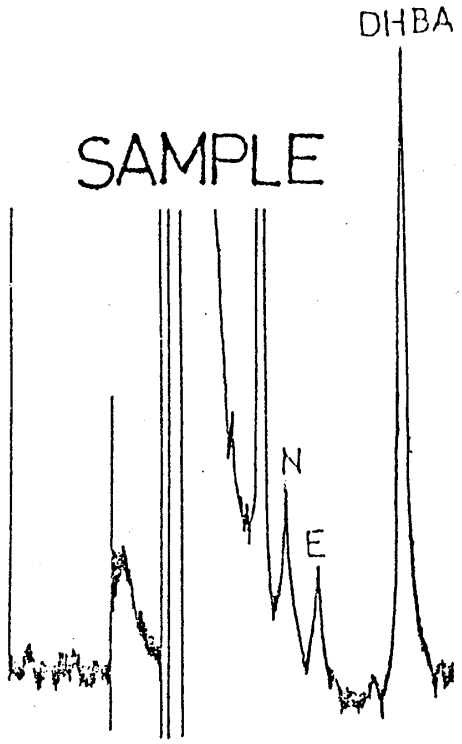
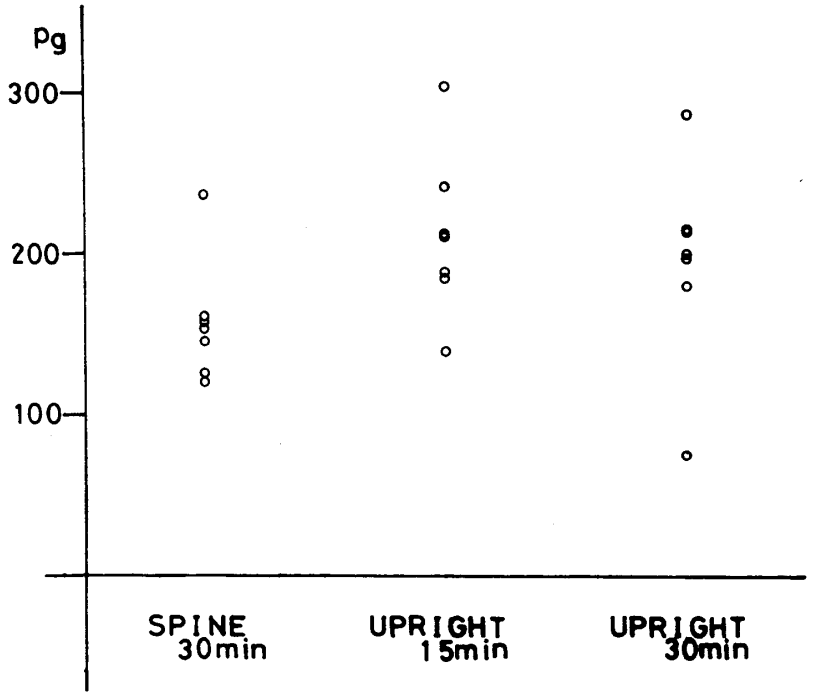


図４　臥位及び立位に於ける血中ＮＥ値



考　察

ＥＣＤ法ではＮＥ，Ｅ，ＤＡの検量線は50pgより１０ng／mℓまで直線関係が認められ，従来のＴＨＩ法による血中カテコラミン濃度と比較しても１００pg／mℓ以上の高濃度でのＥ，ＮＥの相関は極めて良好であった。一方１００pg／mℓ以下の微量の血中カテコラミンの測定においては，一重シールドの柳本製ボルタンメトリーでは基線の動揺が大きく安定したピークは得られなかった。この様な最大感度における基線の動揺は本法を用いた血中カテコラミン測定における最大の問題点であるが，今回われわれは検出器全体を電気的に二重にシールドすることにより基線の動揺を最小にし，さらにカラム温度を２５℃に保つことによりＥ，ＮＥの検出限界を50 pg／mℓにまで改善し得た。ＥＣＤ法はDouble Isotope を用いた酵素法に比して感度の点で劣るが，日常の血中カテコラミン測定に際して，操作が簡便であり，感度にも問題ないことより，本法は臨床検体の測定に極めて有用であると考えられた。次いで，回収率測定に用いたＤＨＢＡについてScratchley[6]らはカテコラミンおよび，ＤＨＢＡを含むカテコラミン誘導体の１９種類の分離において，相互干渉はなく，よく分離再現されることを示しており，Refschauge らの報告でも脳組織のカテコラミン測定で既に利用されている。

また，Moyer[7]および梶原らも，ＤＨＢＡの内部標準物質としての有効性を報告している。

本研究においても，血中カテコラミンのＥＣＤによる測定時にＤＨＢＡの分離状態，再現性は良好で，他物質との相互干渉がなく，ＤＨＢＡの検量線も直線関係にあったことより，ＤＨＢＡはＥＣＤ法による血中カテコラミン測定に際し，優れた内部標準物質であると考えられた。

まとめ

高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器（ＥＣＤ法）を用いた血中カテコラミンの測定について述べた。

(1) ＥＣＤ法により血中カテコラミンのＮＥ，Ｅ，およびＤＡの分離測定が可能である。

(2) 各カテコラミン濃度の検量線は 50 pg／mℓより１０ng／mℓまで直線であり，血中ＮＥおよびＥの測定限界は検出器の電気的二重シールド，およびカラム温度を２５℃に保つことにより，50 pg／mℓ血漿まで上昇させ得た。

(3) ＤＨＢＡは血中カテコラミン測定の際に内部標準物質として利用しうる。

(4) 本法は，正常健常人の安静時にも５mℓの採血量で，血中ＮＥ，およびＥの十分な測定が可能であり，今後一層の臨床応用が期待できる。

文　献

1) Engelman, K. et al；Am. J.Med. Sci., 255：259, 1968

2) Kemula, W. et al；Rocz. Chem., 26：281, 1952

3) Kissinger, P.T. et al；Biochem. Med. 13：299, 1975

4) Refshauge, C. et al；Life Sci. 14：311, 1974

5) 梶原長雄ら；ホルモンと臨床28：1205, 1980

6) Scratchley, G.A. et al；J. Chromatogr. 169：313, 1979

7) Moyer. T. et al；J.Chromatogr. 153：365, 1978