ヒト羊水中の Catecholamines 測定法としての LC-EC 法

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：竹内正七教授）
西村　紀夫・佐藤　芳昭

Analysis of human amniotic fluid catecholamines by LC-EC method

Norio NISHIMURA and Yoshiaki SATO

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shoshichi TAKEUCHI)

We evaluated high-performance liquid chromatography with electrochemical detecter (LC-EC method) for simultaneous determination of norepinephrine (NE), epinephrine (E), and dopamine (DA) in human amniotic fluid.

Mean (±SD) recoveries were as follows: NE, 47.0±6.5%; E, 45.6±6.6%; DA, 47.4±5.4%; DIHBA, 48.2±5.6%. The CV was 13.8% for determination of NE, 14.4% for E, and 11.3% for DA.

There was a linear relation among each catecholamine level and detector responces, and there was a good linear correlation between CAs concentration in amniotic fluid by REA and by LC-EC method (r=0.81).

Key words: catecholamines in human amniotic fluid. LC-EC method
羊水中カテコラミン，LC-EC 法

I　緒　言

カテコールアミン（CAs）とは，カテコール catechol すなわちオルトフェニールのアミン amine を意味する．生体内では，ドーパミン dopamine（DA），ノルエピネフリン norepinephrine（NE），エピネフリン epinephrine（E）の3つが生物学的活性をもつと考えられている．

CAs の測定法には，古くは，バイオアッセイ[1)2)]があるが，技術上の難点や再現性に乏しく，現在では化学的測定法が広く用いられている．化学的測定法にはまず，吸光分析法[3)]があるが，感度が10～100 μg と低い欠点がある．次いで，蛍光法[4)]は 0.1 μg と感度が高く，比較的安定していることより，従来より広く用いられている．又，最近は，アイソトープを用いた radioenzymatic assay（REA）[5)]も開発され，さらに，ガスクロマトグラフィー[6)]，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）[7)]などが実用化されてきた．

しかし，それらの測定法には，操作が煩雑，アイソトープの使用，装置が高価など種々の難点があり，必ずしも臨床測定として有用とは言い難い．

今回我々は，羊水中 CAs を測定する必要性から，HPLC

Reprint requests to: Norio NISHIMURA,
Nagaoka Chuo-sogo Hospital,
Nagaoka City, 940, JAPAN.

別刷請求先：〒940 長岡市福住2-1-5
中央総合病院産婦人科　西村紀夫

と電気化学器 electro-chemical detecter (ECD) とを組み合わせた LC-EC 法を用いて，羊水中の CAs 濃度を測定することを試みたので，ここで報告する．

Ⅱ対象と方法・原理

妊娠16週から41週までの妊婦24名から，医学的適応または患者の同意を得て行った羊水穿刺あるいは帝王切開時に採取した羊水を試料とした．(表 1)

ECD の測定原理は図 1 のごとく，作用電極，比較電極，補助電極を含むセル内に分離液がカラムより流入すると，作用電極と比較電極間の定電位作用により薄層セル内の作用電極表面で電気化学的活性物質は酸化あるいは還元反応が起こる．この時生ずる電流変化をモニターすることにより濃度を知る方法である．

表 1　Material

Amniotic fluid obtained from 24 pregnant women undergoing amniocentesis

cases

1. hydroamnion (n=5)
2. isoimmunization (n=4)
3. severe toxemia of pregnancy (n=2)
4. cesarean section (n=2)
5. anencephalus (n=2)
6. others (n=9)

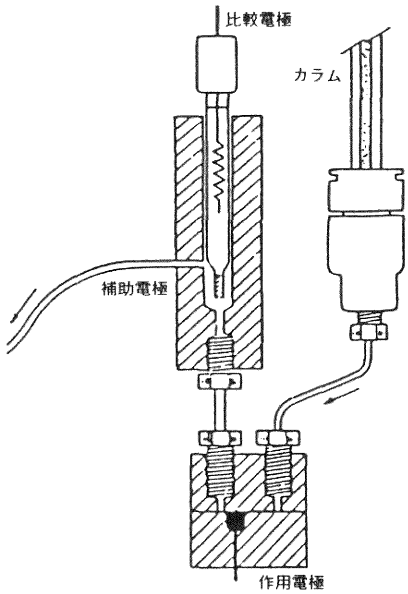


図 1　EC ディテクター測定原理

次に，試料としての羊水の前処理は，アルミナによる直接吸着法により行った．すなわち，acid-washed alminium oxide (AAO) 50mg を羊水 1ml に加え，内部標準としての dihydroxy benzlamine (DHBA) を 1ng，tris buffer を 1ml 加え，10分間振とうし，上澄を捨て，蒸留水で AAO を良く洗浄し，遠心分離 (3000 rpm) を10分間行い，0.1M HCl O_4 200 μl にて AAO より CAs を抽出し，そのうち 50 μl を HPLC に注入した．

測定条件として，HPLC は JASCO の Twincle を用い，column は Biophase ODS 5 μm を，移動相には 0.1M monochloroacetic acid (pH 3.3) に 2mM Na_2 EDTA を加え，1l 当り25~30mg の sodium octyl sulfate (SOS) を加えたものを用いた．ECD は LC-4B 17EC-detecter を用い，加電圧を+700mV とした．sensitivity 1nA FS，flow rate 1.0ml/min とした．

Ⅲ測定結果

① retntion time　本法によるクロマトグラムを図 2，図 3，に示した．図 2 は内部標準である DHBA からみた Standard CAs (NE，DOPA，E，DA) のクロマトグラムであり，図 3 は S-ample (羊水 1ml) に DHBA 1ng を加えて，各々の retention time (NE：3′ 10″，DOPA：4′ 30″，E：6′，DHBA：7′ 15″，DA：13′) からみたクロマトグラムである．このように各々の CAs のピークは重なり合うことはなく，Peak height と CAs の濃度は直線関係にあり (図 4)．DHBA の濃度から，他の CAs の濃度を十分に算出可能であった．

② 回収率と再現性　前処理を終えた検体 200 μl より 50 μl づつ3回に分けて，同一測定条件下で CAs 濃度を測定すると，回収率は NE：47.0%，E：45.6%，DA 47.4%，DHBA：48.2%で全体としては47.2%であった．又，変異係数は平均12.7%と測定間変動も比較的少なく，再現性は良好と考えられた．(表 2)

③ REA 法との相関　新しく開発された CAs 濃度の定量法である酵素アイソトープ法と今回使用した LC-EC 法との相関について検討を行うと，図 5 の如く，Y

表 2　Analytical recovery

	NE	E	DA	DHBA
mean±SD	47.0±6.5	45.6±6.6	47.4±5.4	48.2±5.6
C V	13.8	14.4	11.3	11.6

total　47.2±6.0　　CV　12.7

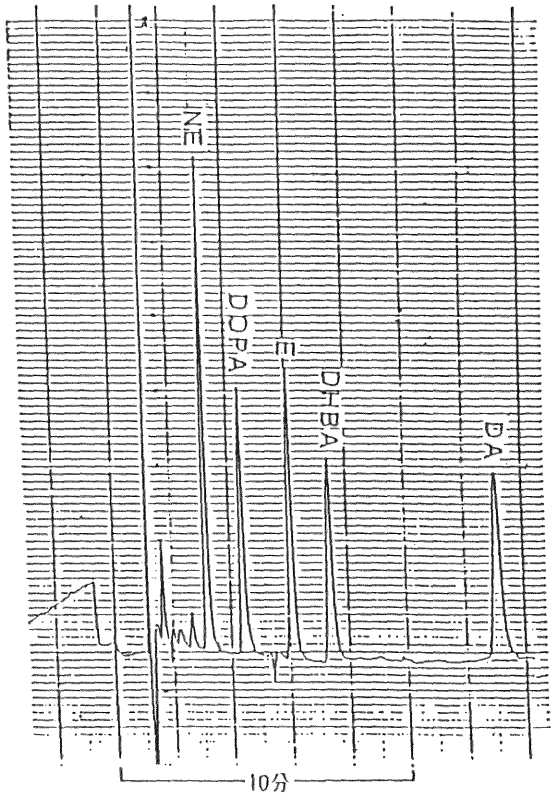


図 2 Standerd CAs

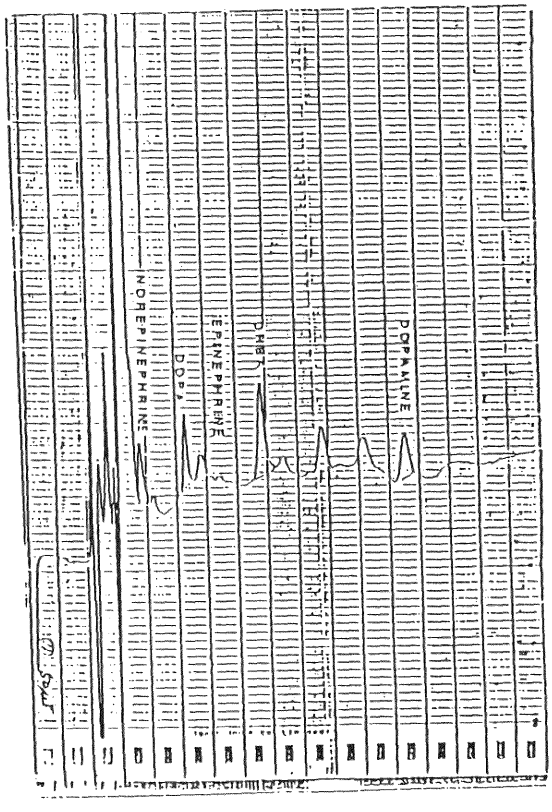


図 3 Sample CAs

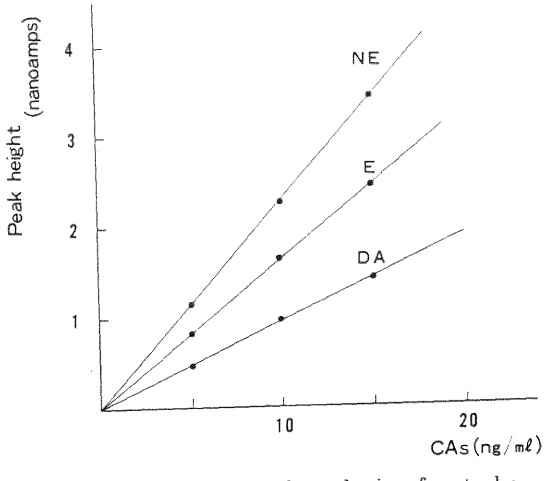


図 4 Standard curve of analysis of catecholamines with LC-EC method

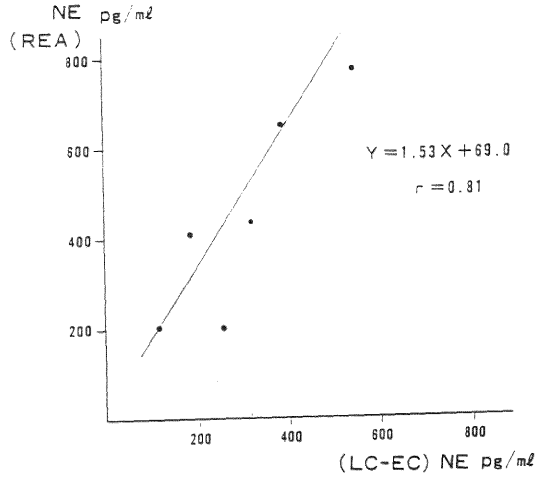


図 5 Correlation between REA and LC-EC method

1.53×＋69.0，r=0.81 と良好な直線関係が得られた．図からもわかるように，REA 法による CAs 値が LC-EC 法による値より高値傾向を示した．

Ⅳ　考　察

カテコールアミン（CAs）は活性アミンの一種であり，生体内に広く分布しており，種々の生物学的役割を有していることが判明しつつある．しかし，生体内においてはその量は微量であり，測定系として，かつてはバイオアッセイ法[1)2)]から蛍光法[4)]（感度 0.1 μg）吸光分析法[3)]（感度10～100 μg）が用いられ，最近は Pg の感度をもつアイソトープ法が用いられるようになった．これには double isotope derivative dilution assay と radio-enzymatic assay [5)] の2種類がある．又 GAS-chromatography [6)]，LC-EC 法[7)]も実用化されつつある．

この中で我々は，分析操作も比較的簡単でありアイソトープを用いないで済む LC-EC 法を用いて CAs の測定法とその臨床応用について検討を加えた．

LC-EC 法による CAs の分離定量は1973年 Kissnger [7)] らにより応用され，有用な検査法となってきた．CAs の測定には，まず前処理として，体液（今回は羊水を用いた）中から CAs を抽出する方法が必要である．すなわち，この抽出にはいくつかの方法論があるが，我々は最も標準的と考えられるアルミナによる吸着法を採用した．このアルミニウムを用いる吸着法は1938年 Shaw が水酸化アルミニウムを用い，次いで，1950年 Lund [4)] や1951年 Crawford が酸化アルミニウム（アルミナ）を用いた方法[8)]であり，活性アルミナ acid-washed alminium oxide（AAO）にカテコールアミン（CAs）がアルカリ側で結合し，酸性下で溶離する性質を利用したものである．羊水 1ml に DHBA 1ng，trisbuffer 1ml，AAO 50mg を加えた後，かく拌振とうし，アルミナに CAs を吸着させ，遠沈し，上澄を捨て，蒸留水にて良く洗浄し，遠心分離し水を十分に除き 0.1M HCl O_4 200 μl をアルミナに加えて CAs を溶離させ，そのうち 50 μl を HPLC に注入した．この全操作は約1時間半で終了し得た．

次に実際のクロマトグラムを図 2，図 3 に示した．図 2 は内部標準 DHBA よりみた Standard CAs のクロマトグラムであり，図 3 は Sample CAs のクロマトグラムである．このように各 CAs の retention time（NE：3′ 10″，DOPA：4′ 30″，E：6′，DA13′）は，内標である DHBA の retention time 7′ 15″ と重なり合わず，各 CAs の濃度を算出することが出来た．かつ，その測定感度については，NE で約 80pg/ml であり，REA 法の約 20pg/ml よりは劣るが，臨床的には十分である．

回収率については，全体として47.2%とやや低いものの，変異係数は15%以下であり，本法は臨床上十分に有用な測定法になると思われた．他の報告[9)]でも回収率は尿中で35%程度，血漿中で66～70%程度であり，この回収率の低さが本法の欠点の一つである．これは，CAs を精製する際，Sample をアルカリ性にすることで CAs が分解され易く，その上アルミナに吸着し洗浄する際，失なわれ易い為であり，このことは分析法として，かならずしも良好なものとは言えないが，操作が短時間で済み，直ちに測定でき，臨床上可能な測定法と思われる．

又，最近開発された REA 法との相関も良い（r=0.81）が，LC-EC 法が感度ではやや劣る．LC-EC 法による CAs 濃度測定の問題として，より fine なカラムの使用，回収率向上の為のアルミナ吸着法以外の CAs 精製法の研究などがあげられる．

最後に，近年 CAs の微量測定法が研究され，HPLC 蛍光検出法，LC-EC 法，ガスクロマトグラフィー，REA 法など Pg order で検出が可能となってきた．しかし，これらの測定法がすべて臨床上有用とは言い難く，問題も残っている．現在のところ，REA 法より感度の点で劣るが，操作が比較的簡単で，維持も容易であり，アイソトープを用いないで済むこと，又，CAs の同時測定が可能であることの利点を持つ LC-EC 法が CAs 濃度測定に臨床上有用な検査法となることが示唆された．

本論文の一部については，第57回日本内分泌学会秋季学術大会（昭和59年11月）と第37回日本産科婦人科科学会（昭和60年4月）にて発表した．測定条件の設定に多大な協力をいただいた日本分光 KK に深謝致します．

参　考　文　献

1）**Von Euler, U.S., et al:** Colorimetric Determination of Noradrenaline, and Adrenaline Acta Phys-iol Scand, **19**: 207, 1950.
2）**Gaddum, J.H. and Lemberk, F.:** Brit. J. Pharmacol., **4**: 401, 1949.
3）**Von Euler, U.S. and Hamberg, U.:** Acta Physiol. Scand, **19**: 74, 1950.
4）**Lund, A.:** Simultaneous Fluorimetric Determinations of Adrenaline and Noradrenaline in Blood, Acta Pharmacol, **6**: 137, 1950.
5）**Engelman, K., et al:** A sensitive and Spec-

ific Double-Isotope Derivative Method for the Determination of Catecholamines in Biological Specimens, Am. J. Med. Sci., **225**: 259, 1968.

6) **森 昭胤, 岸川秀美**: ガスクロマトグラフィーによる血液, 尿および脳脊髄液中のカテコールアミンの測定法, 臨床化学, **4**: 34, 1975.

7) **Kissinger, P.T., et al.**: An Electrochemical Detector for Liquid Chromatography with Picogram Sensitivity: Ancl. Lett., **6**: 465, 1973.

8) **Crawford, T.B.B. and Outshoon, A.S.**: The Quantitative Separation of Adrenaline and Noradrenaline in Biological Fluids and Tissue Extracts: Brit. J. Pharmacol.: 618, 1951.

9) **山本和彦, ら**: HPLC によるカテコールアミンの測定−Electrochemical detection によるカテコールアミン測定法の検討, 産婦人科の世界, **35**: 1229, 1983.

〔特別掲載〕(昭和63年9月21日受付)