報 文

オフラインリアクターとしてのミニカラムを用いる総遊離 カテコールアミン測定法の開発

河本 裕子*, 野 崎 修®**

Total free catecholamines assay by using a minicolumn as an off-line reactor

Hiroko KAWAMOTO* and Osamu NOZAKI**

*Department of Biological Regulation, School of Health Science, Faculty of Medicine, Tottori University, 86, Nishimachi, Yonago-shi, Tottori 683-8503

**Department of Clinical Laboratory Medicine, Kinki University School of Medicine, 377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama-shi, Osaka 589-8511

(Received 21 January 2002, Accepted 26 April 2002)

A rapid and highly sensitive determination method for a total free catecholamines assay using a minicolumn as an off-line reactor was developed. Although separation methods are widely used for the diagnosis and follow-up of diseases related to catecholamine disturbances, they have the problem of a time-consuming for assay. Therefore, a rapid and highly specific assay method for the total free catecholamines (free adrenaline + noradrenaline + dopamine) is needed to solve this problem. The newly developed method employed the principle of recognizing both the two functional groups of catecholamines (amino group and catechol group). The gels in of off-line reactor had a sulfuric acid group on the surface, and bound to amino groups of catecholamines. Then, the phenolic group of catecholamine on the gel reacted to produce hydrogen peroxide by heating at 60°C for 30 min. Glass beads or polystyrene beads were chosen as a gel support. The hydrogen peroxide produced in the off-line reactor was eluted with an imidazole solution (1.0 mol/l), and finally assayed by the micro-flow injection horseradish peroxidase catalyzed luminol chemiluminescence. The change in the rate of dopamine to hydrogen peroxide with the off-line reactor was 47~69% (average 56.8%). A calibration curve was produced by an external standard method with dopamine, and the regression formula was $Y = 2.04 X^2 + 12.4 X - 16.8$, where Y is the light intensity and X is dopamine (1.63~8.15 nmol). This is a rapid method applicable to clinical assays of total free catecholamines.

Keywords : total free catecholamine; off-line reactor; two functional group of catecholamine; hydrogen peroxide; chemiluminescence.

1 緒 言

カテコールアミン (CA) は神経伝達物質及び副じん (腎) 髄質ホルモンであり, その測定 (特に遊離 CA) は, 高血圧症¹⁾, 褐色細胞種²⁾, 精神神経疾患³⁾などの診断に臨

床でしばしば行われている. CA の測定方法には, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による三分画測定 (アドレナリン, ノルアドレナリン及びドーパミン) が臨床的には広く採用されている^{4)~6)}. しかし, これら HPLC を用いた CA の三分画法では, 生体試料 (尿・血清・髄液) の前抽出及び, HPLC カラム分離操作が煩雑で長時間 (1 検体当たり 30~40 分) を要するために, 1 日当たりに測定できる検体数が少なく, 日常臨床検査として適しているとは言えない. 更に, CA 関連疾患の臨床診断に CA の三分画

* 鳥取大学医学部保健学科生体制御学講座: 683-8503 米子市西町 86

** 近畿大学医学部臨床検査医学講座: 589-0014 大阪狭山市大野東 377-2

測定は常には必要でない。なぜなら、臨床では通常アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンの変動は同じ傾向の動きを示し、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンのいずれかの単独分泌異常が問題になることはまれであるためである。よって、臨床的には3分画測定でなく総遊離CA測定で十分である場合が多い。

総遊離CA測定法として、比色法⁷⁾・蛍光法⁹⁾及び免疫測定法⁹⁾の報告がある。しかし、これらのいずれの方法にも実用上の問題があるために、実用化されていない。すなわち、比色法・蛍光法での問題点は、CAの発色反応が検体中共存物質の影響を受けることである¹⁰⁾。免疫測定法の問題点は、アドレナリン、ノルアドレナリン及びドーパミンに対する特異性の高い抗体が得られないために、免疫交差反応が生じることである¹¹⁾。それらの原因のために偽陽性の測定結果を出して誤診に導くことがある。

CAの免疫測定法や比色法に見られた試料中共存物質の妨害を除去するために、ミニカラムを用いた固相抽出法(ミニカラム法)が用いられている。ミニカラム法は、通常は生体試料中目的物質の濃縮抽出に用いられているが、同時に生体試料中きょう雑物質の減少にも有効である。これまでに報告されたミニカラム充填剤の種類として、酸化アルミナ¹²⁾、コポリマー¹³⁾、スルホン酸ゲル¹⁴⁾、及びホウ酸ゲル¹⁵⁾がある。すなわち、これまでのミニカラム法の使用目的は、試料中目的物質の濃縮・クリーンアップに終始している。

オフラインリアクターとして従来からのミニカラム法に更にCA検出の特異性を持たすことができれば、新規に臨床検査に適する総遊離CA測定法の開発が可能である。そのための特異性の高いCA検出方法として、ミニカラム内でのCAの二つの官能基(アミノ基とカテコール基)を同時に認識する方法が考えられる。すなわち、試料中のCAのアミノ基をゲルの陽イオン交換基に固相抽出し、その固相上に結合したCAのカテコール基とイミダゾール溶液との固液反応から過酸化水素を生成させ、最後にその過酸化水素を化学発光法で測定する方法である^{16)~18)}。この方法は、迅速・高感度でCAに特異性が高い反応であるが、ミニカラム充填ゲルの性能が、CAの検出に大きな影響を与える。本研究では、そのミニカラム充填ゲルの至適条件を、官能基の種類・ゲル基材の材質及び細孔の有無の面から検討し、最適化されたゲルミニカラムを用いた総遊離CAの定量測定について検討したので、その結果を報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

アドレナリン、ノルアドレナリン及びドーパミンはシグマ製を用いた。ルミノール(生化学用)及びペルオキシダ

ーゼ(生化学用)は和光純薬、イミダゾールは片山化学より購入した。これらの試薬は、購入したまま更に純化することなく使用した。

カテコールアミン標準液: CAの保存液(0.1 mol/l塩酸溶液中)濃度は、アドレナリンで25.7 mmol/l, ノルアドレナリンで27.8 mmol/l, ドーパミンで32.6 mmol/lに調製し、4℃で暗所保存した。各CA使用溶液は、それぞれのCA保存液を用時希釈して作成した。

化学発光用試薬: ルミノール溶液(0.56 mmol/l)は、ルミノールをイミダゾール水溶液(0.05 mol/l, pH 7.8)に溶解して用時調製した。

2.2 オフラインリアクター用ミニカラム

陽イオン交換ゲル: カテコールアミンの固相抽出及び過酸化水素生成用に検討した陽イオン交換ゲル(計12種)は以下のである(Table 1)。すなわち、市販陽イオン交換ゲルは、SP-トヨパール650M(B-1)、SP-トヨパール650S(B-2)、CM-トヨパール650S(B-3)、及びCM-トヨパール650M(B-4; 以上東ソー製)であった。用いた陽イオン交換ゲルは、ゲル基材及び導入陽イオン交換基の種類によって、A、B、C、及びDタイプに分類した。自家製ゲルは、A-1、A-2、A-3、B-5、B-6、B-7、C及びDであった。自家製のガラス担体イオン交換体(A、Dタイプ)は、ガラス表面の水酸基の数を増やし、その水酸基にスルホン酸基を導入して作成した⁹⁾。Aタイプのゲルは無孔性のガラス基材で粒径が大きく(直径6.5 mm)、導入スルホン酸基は、それぞれ直鎖型(A-1)、分岐型(A-2)、ベンゼンスルホン酸型(A-3)であった(Table 1)。Bタイプのゲルは、基材が多孔性ポリマー(粒径5~100 µm)で、イオン交換基は直鎖型・ベンゼンスルホン酸型及びカルボン酸型であった。Cタイプのゲルは無孔性ポリマー基材(粒径は10 µm)で、イオン交換基は直鎖型スルホン酸基であった。Dタイプのゲルは無孔性ガラス基材(粒径100 µm)で、ベンゼンスルホン酸型イオン交換基を有していた。

ミニカラムの作製: 上記各種ゲル1.0 mlをミニカラム(プラスチックシリンジ; イウチ製, 2 ml用)に自家充填して作製した。

2.3 方 法

2.3.1 CAの2官能基認識化学発光測定法の原理 遊離カテコールアミンはカテコール基(フェノール性ジオール)とアミノ基の二つの官能基を有する。1級あるいは2級アミノ基とカテコール基を同時に有するものは、生体物質中では遊離カテコールアミン以外に存在しないので、同一分子中のアミノ基とフェノール性ジオールをとともに認識することにより、カテコールアミンの特異的な検出が可能

Table 1 Beads studied for extraction of free catecholamines

Type	Subtype	Pore	Material	Ion exchanger	Seize/ μm	Product name	Producer
A	A-1	Non-porous	Glass	SP	6500		Home made
	A-2	Non-porous	Glass	SP	6500		Home made
	A-3	Non-porous	Glass	BZ-SP	6500		Home made
B	B-1	Porous	Metacrylic resin	SP	40~90	SP-Toyopearl 650M	Tosho
	B-2	Porous	Metacrylic resin	SP	20~40	SP-Toyopearl 650S	Tosho
	B-3	Porous	Metacrylic resin	CM	20~40	CM-Toyopearl 650M	Tosho
	B-4	Porous	Metacrylic resin	CM	40~90	CM-Toyopearl 650M	Tosho
	B-5	Porous	Metacrylic resin	CM	10		Home made
	B-6	Porous	Polystyrene	BZ-SP	5		Home made
	B-7	Porous	Metacrylic resin	SP	10		Home made
C	C	Non-porous	Metacrylic resin	SP	10		Home made
D	D	Non-porous	Glass	BZ-SP	100		Home made

SP: $-\text{CH}_2\text{CHRCH}_2\text{CHRCH}_2\text{SO}_3\text{H}$; CM: $-\text{CH}_2\text{COOH}$; BZ-SP: $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$

Fig. 1 Principle of the detection of free catecholamines by recognition of the two functional groups and following detection of hydrogen peroxide produced

Sulfuric acid base on the gels combines to amino group of catecholamines. The phenolic base of the catecholamines reacts to produce hydrogen peroxide on the gels. The hydrogen peroxide produced is eluted from the off-line reactor and assayed by micro-flow injection HRP catalyzed luminol chemiluminescence.

である。カテコールアミンのアミノ基を陽イオン交換ゲルに結合(イオン結合)して固相抽出し、次にその固相上でカテコールアミンのカテコール基とイミダゾールをアルカリ環境下で反応させて過酸化水素を生成する(Fig. 1)。その過酸化水素溶液をマイクロフローインジェクション(FI)-ペルオキシダーゼ触媒ルミノール化学発光法で検出

することにより、総遊離 CA が測定できる¹⁹⁾。

2.3.2 CA のミニカラム抽出及び過酸化水素生成 A-タイプの各陽イオン交換ビーズは、使用前に 0.1 mol/l 塩酸と水で順次洗浄して活性化し、ビーズ (A-1, A-2, A-3; それぞれ 3 個) を各試験管に入れた。CA 溶液 1.0 ml を加え、室温で 10 分間軽く振り混ぜた。このビーズを水洗後、イミダゾール溶液 (0.1 mol/l) 1.0 ml を添加して 60℃, 30 分間インキュベート(暗所)した。その反応液 50 μl をマイクロ-FI-化学発光システムで測定した。B, C, D-タイプゲルの充填ミニカラムは、それぞれ使用前に 0.1 mol/l 塩酸及び水で洗浄して活性化して使用した。CA 溶液 0.5 ml を陰圧でこのミニカラムに通して固相抽出した後、カラム下方に栓をして 0.1 mol/l イミダゾール溶液 0.5 ml を添加した。60℃, 30 分間反応(暗所)させた。このミニカラムにイミダゾール溶液 (1.0 mol/l) 1.0 ml を添加して引圧で反応液を溶出させた。この溶出液 (50 μl) をマイクロ FI-化学発光システムで測定した。

2.3.3 過酸化水素のマイクロフローインジェクション-化学発光測定 ミニカラム溶出液 (50 μl) をマイクロ FI-化学発光システムで測定した²⁰⁾。過酸化水素測定用マイクロ-FI システムのブロックダイヤグラムを Fig. 3 に示した。システムは HPLC 用送液ポンプ (PU-980, 2 台), オートサンプラー (AS-950), 化学発光検出器 (825-CL; スパイラルテフロンセル内蔵) 及びデータプロセッサ (LCSS-905) (以上いずれも日本分光製) で構成した。フローセルリアクター (FCR) は、ペルオキシダーゼ固定化ゲル (基材: キトパール, 粒径 74~210 μm , フジボー; 自家調製) を化学発光検出器のフローセル (テフロンチューブ, 内径 0.96 mm, 外径 1.56 mm, 長さ 30 cm) に自家充填(ゲル層の長さ約 3 cm)して作製し, 検出器の光電子増倍管の前面に取り付けた。移動相溶媒の水 (S1) とルミノール液 (S2; 0.56 mol/l イミダゾール溶液中, pH 7.8)

Fig. 2 Block diagram of the micro-flow injection-chemiluminescence detection for assay of hydrogen peroxide

S1: solvent (water); S2: luminol solution in imidazole solution (pH 7.8); P: HPLC pump; AS: autosampler; CLM: chemiluminometer; FCR: flow cell reactor; DP: data processor

を HPLC ポンプでそれぞれ流量 0.1 ml/min で送液した。CA とイミダゾールの反応液（過酸化水素含有，50 μ l）はオートサンプラー（AS）から 4 分ごとに S1 のラインに注入した。注入された過酸化水素液を化学発光検出器のフローセルリアクター内でミノール溶液及び固定化ペルオキシダーゼと混合し，その場（光電子増倍管の前面）で化学発光を発生させた。その光を化学発光検出器の光電子増倍管で検出し，データプロセッサで計算処理した。過酸化水素の化学発光強度（relative light intensity, RLU）は，その溶出曲線のピーク面積で表示した。

3 結果及び考察

3.1 ミニカラムゲルの官能基

ミニカラムを用いた CA の抽出には，その充填ゲルに導入した官能基の種類が大きく影響する。そこで，官能基としてスルホン酸基，ベンゼンスルホン酸基及びカルボキシル基を導入した陽イオン交換ゲルを充填した各ミニカラムを用い，負荷したドーパミン（20 nmol）からの過酸化水素生成量を検討した（Fig. 3）。その結果は，過酸化水素生成量の多いミニカラムの順に C = D（100%）> A3（93%）> B2（92%）> B7（90%）> A2（72%）> B1（55%）> B6（45%）> A1（38%）> B5（7%）> B3（5%）= B4（5%）であった。この結果は，負荷ドーパミンのゲル官能基での固相抽出効率と，ゲル固相上でのドーパミンのカテコール核とイミダゾールとの固液反応効率の合計した効果を示していると考えられる。ミニカラムゲル 12 種類のうち上位 5 種類のゲル官能基は，いずれもスルホン酸基あるいはベンゼンスルホン酸基であった。また，下位 3 種類の官能基はいずれもカルボキシル基であった。これは，CA のミニカラム抽出用ゲルの官能基には，スルホン酸基がカルボキシル基より優れていることを示している。この検討の結果より，本研究では以降の検討にスルホン酸基導入ゲルを充填したミニカラム（A3，C，D）を選

Fig. 3 Selection of the minicolumns for extraction of catecholamines and production of hydrogen peroxide with imidazole

The order of the minicolumns those produced hydrogen peroxide with dopamine was C = D（100%）> A3（93%）> B2（92%）> B7（90%）> A2（72%）> B1（55%）> B6（45%）> A1（38%）> B5（7%）> B3（5%）= B4（5%）。

Fig. 4 Comparison of A3, C and D minicolumns for the extraction capacity of dopamine loaded

A3 (○) showed the maximum capacity at dopamine of 2.6 nmol. C (▲) and D (□) correlated to the amount of dopamine ranging from 1.6 to 13 nmol.

んだ。

3.2 ミニカラムのドーパミン抽出容量

ミニカラムの CA 抽出容量の検討は，CA 測定可能域を知るうえで必要である。選択したミニカラム A3，C 及び D にドーパミン（1.6～13 nmol）を負荷して，そのミニカラム内での過酸化水素生成量を測定した（Fig. 4）。そ

Fig. 5 Selection of fluids for eluting hydrogen peroxide produced from the minicolumn

Alkaline solution of imidazole eluted hydrogen peroxide. ○: dopamine; □: adrenaline; △: noradrenaline

の結果, ミニカラム A3 では生成過酸化水素の化学発光強度は, ドーパミン量増加に比例せず一定の発光強度を示した。これは, A3 ミニカラムのドーパミン結合能力が, ドーパミン 2.6 nmol まです既に飽和していることを示している。ミニカラム C, D は検討したドーパミン量 (1.6 ~ 13 nmol) に正相関した化学発光強度を示した (ミニカラム C 用回帰式 $Y = 6.79 X^2 + 1.06 X + 10.5$, ミニカラム D 用回帰式 $Y = 8.25 X^2 - 12.4 X - 12.1$; Y は発光強度 RLU, X はドーパミン量 nmol)。特に, ミニカラム D は検量線作成用ドーパミン量全域で発光強度と正相関が見られた。よって, 以後の検討にはミニカラム D を用いた。

3.3 ミニカラムからの溶出液

生成した過酸化水素をミニカラム D から溶出するための溶離液の種類を検討した。溶離液の酸性度は, その化学発光検出に影響を与えるためである。検討した溶離液の種類はアルカリ液 (イミダゾール水溶液 0.1 及び 1 mol/l), 中性液 (水), 酸性液 (1% 酢酸水) であった。ミニカラム D 内で過酸化水素生成後, 吸引によるミニカラムからの反応液の溶出, 水 (1 ml) のミニカラムへ添加後吸引, 1% 酢酸水 (1 ml), イミダゾール溶液 (0.1 mol/l, 1 ml) あるいはイミダゾール溶液 (1 mol/l, 1 ml) の添加後吸引溶出を順次行い, それぞれの溶出液 (50 μ l) 中の含有過酸化水素量を化学発光法で測定した。その結果, 溶離液が酸性液のときには発光はなく, アルカリ液のイミダゾー

Fig. 6 Recovery rate of dopamine from the minicolumn (D)

○: extracted dopamine; ▲: original dopamine. Recovery rate of dopamine; 50% at dopamine 1.63 nmol, 47% (dopamine 3.26 nmol), 52% (4.89 nmol), 69% (6.52 nmol), 66% (8.15 nmol)

ル (1 mol/l) 溶離液では, 発光が見られた (Fig. 5)。カテコール核とイミダゾールとの反応から, カテコールセミキノン, カテコールキノン, スーパーオキシド陰イオン, 過酸化水素, ニトロラジカル等が生成される²¹⁾が, ペルオキシダーゼ 触媒ルミノール 化学発光法で検出されるのは, 過酸化水素である²²⁾。ミニカラムから過酸化水素を溶出させ, 化学発光検出を行うためには, 溶離液はアルカリ性であることが必要であった。

3.4 過酸化水素生成率

本法でのドーパミンからの過酸化水素生成率を検討した。すなわち, 検量線用濃度範囲 (1.63 ~ 8.15 nmol) のドーパミン液を用いて, ミニカラム D 内で生成した過酸化水素発光強度と, ミニカラム通過液中の過酸化水素発光強度, 及びミニカラムを通さないで直接イミダゾールと反応させて生成した過酸化水素の発光強度 (対照) との比較を行った。ミニカラムを通さないときのドーパミン検量線は, 回帰式 $Y = 1.26 X^2 + 34.0 X - 35.0$ で, 一方ミニカラムを通したときのドーパミン検量線は, 回帰式 $Y = 2.04 X^2 + 12.4 X - 16.8$ であった (Fig. 6)。ミニカラムを通したときのドーパミン値は直接測定時に比べて, ドーパミン 1.63 nmol で 50%, 3.26 nmol で 47%, 4.89 nmol で 52%, 6.52 nmol で 69%, 8.15 nmol で 66% であり, 平均 56.8% であった (Fig. 6)。また, ミニカラム通過液中には過酸化水素は検出されなかった。その結果, ドーパミンはミニカラムを通したときは 100% ミニカラムに抽出されているが, ミニカラム内でのドーパミンの過酸化水素へ

Fig. 7 Regression curve of catecholamines

Adrenaline (○): $Y = 1.51 X^3 - 7.14 X^2 - 3.82$; Norepinephrine (▲): $Y = 0.130 X^2 + 46.2 X - 7.25$; Dopamine (□): $Y = 7.07 X^2 - 10.8 X + 78.8$. Y: light intensity (RLU); X: amount of catecholamines (nmol)

の変換率が約 57% であることが判明した。この変換率の影響を避けるために、実際の CA 測定時には、CA 用検量線として、ドーパミンの検量線を外標準法で同時に作成して用いた。

3.5 検量線

本法でアドレナリン、ノルアドレナリン及びドーパミン (各 1.29～6.53 nmol) の検量線をそれぞれ作成した。それらの検量線の回帰式は、アドレナリンで $Y = 1.51 X^3 - 7.14 X^2 - 3.82$ 、ノルアドレナリンで $Y = 0.130 X^2 + 46.2 X - 7.25$ 、ドーパミンで $Y = 7.07 X^2 - 10.8 X + 78.8$ であった (Fig. 7)。その結果、これらの検量線は互いに近似していたために、このうちの一つの検量線 (ドーパミン用) で総遊離カテコールアミン測定に対応できることが判明した。

3.6 干渉物質

これまで CA 測定の干渉物質として挙げられている物質は、ラベタノール (トリヒドロキシインドール蛍光法)¹⁰⁾、ドーパ (トリヒドロキシインドール蛍光法)²²⁾、薬剤 (アムロデピン、アテノロール、ベンドロフラジッド、カプトリル、ドキサゾシン、エナラプリル、フルセミド、メチルドーパ、ニフェジピン、スタティス) 及び交差免疫反応性物質 (免疫測定法)²³⁾ などであり、それらの物質は、アルミナ及びホウ酸での前固相抽出で干渉を除去できたと報告されている。これらの物質のうち、ドーパは同一分子内に

カテコール核とアミノ基を同時に持つために本法に干渉する可能性はあるが、ほかの薬剤の干渉はそれらの化学構造式より受けないと考えられる。ドーパの本法への干渉の程度については今後の検討課題である。

3.7 臨床尿検体測定

臨床医より尿中 CA 測定の依頼があった患者の尿中総遊離 CA を本法で測定した。被検 CA 測定用酸性尿 (2.0 ml) を水酸化ナトリウム水溶液 (25 mmol/l) 添加で pH 8.5 に調整して、本法で総遊離 CA 測定を行った結果、被検尿中総遊離 CA 値は 34.3 µg/dl であった。しかし、患者尿中総遊離 CA を測定する日常の臨床検査法は存在しないので、他法との比較はできなかった。そこで、他法との比較のために、同患者被検尿を酸加水分解 (100℃, 20 分間) し、水酸化ナトリウム (25 mmol/l) 添加で pH を 8.5 にした試料を、本法と HPLC/蛍光検出 (FL) 法²⁴⁾ で尿中総 CA 値 (遊離 CA + 抱合 CA) を測定した。その結果、総 CA 値は本法では 44.0 µg/dl、HPLC/FL 法では 201 µg/dl (3 分画定量値の合計、すなわちアドレナリン 0.57 + ノルアドレナリン 29.9 + ドーパミン 171 µg/dl) であった。両法での総 CA 測定値に解離が見られたが、その原因として酸性被検尿を水酸化ナトリウム添加によるアルカリ性変換時に CA が酸化されたために、本法での過酸化水素生成が低下して CA としての値が低くでた可能性が推測された。

その可能性を検証するために、同被検尿を用いてドーパミン (50 µg/dl) の添加回収の検討を行った。その結果、同被検尿にドーパミンを添加後で酸加水分解しないときの総遊離 CA 値は 44.0 µg/dl で、予期値 (34.3 + 50) の 52% (添加回収率 20%) であった。同尿検体にドーパミンを添加 (50 µg/dl) 後に酸加水分解したとき (91.7 µg/dl) は、予期値 (44 + 50) の 85% (添加回収率 95%) であった。これらの検討より、本法では CA 値が低値側より高値側のほうでよりよい回収が得られているが、低値側では回収が不良であることが判明した。その原因として、酸性尿を水酸化ナトリウム添加でアルカリ側に pH 変換したときに、遊離 CA の酸化変性 (カテコール骨格のジオールの消失) による過酸化水素の生成低下が生じ、それが CA 低値側で顕著に影響したと推測された。よって測定直前での被検尿の pH 変換方法を、水酸化ナトリウム添加から別の方法 (例えばアルカリ性イミダゾール添加) へ変える必要があると考えられた。

CA 分泌異常症の診断及びモニタリング用迅速高感度測定法として、オフラインリアクターとしてのミニカラムを用いた総遊離カテコールアミン測定法を考案した。そのミニカラム充填ゲルには無孔性でスルホン酸基を有するガラスビーズが有用であった。

文 献

- 1) D. S. Goldstein: *Hypertension*, **5**, 86 (1983).
- 2) E. A. Gerlo, C. Sevens: *Clin. Chem.*, **40**, 250 (1994).
- 3) A. P. Vanderas, M. Menenakou, T. Kouimtzis, L. Papagiannoulis: *J. Oral. Rehabil.*, **26**, 103 (1999).
- 4) H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura, H. Watanabe: *J. Chromatogr.*, **467**, 237 (1989).
- 5) K. Takezawa, M. Tsunoda, K. Murayama, T. Santa, K. Imai: *Analyst* (Cambridge), **125**, 293 (2000).
- 6) N. Marchese, S. Canini, L. Fabi, L. Famularo: *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **35**, 533 (1997).
- 7) W. J. Raum, R. S. Swerdolff: *Clin. Chem.*, **27**, 43 (1981).
- 8) Y. Miura, V. V. Campese de Quattro, D. Meijer: *J. Lab. Clin. Med.*, **89**, 421 (1977).
- 9) L. Davidson, R. Vandongen, L. J. Beilin, P. D. Arkwright: *J. Clin. Endocrinol. Medtab.*, **58**, 415 (1984).
- 10) L. Miano, R. Kolloch, V. De Quattro: *Clin. Chim. Acta*, **95**, 211 (1979).
- 11) N. Mons, M. Geffard: *J. Neurochem.*, **48**, 1826 (1987).
- 12) G. Alemany, M. Akaarir, C. Rossello, A. Gamundi: *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 225 (1996).
- 13) K. Vuorensola, H. Siren: *J. Chromatogr. A*, **895**, 317 (2000).
- 14) A. Mitsui, H. Nohta, A. Ohkura: *J. Chromatogr.*, **344**, 61 (1985).
- 15) S. Higa, T. Suzuki, Tsuge, Y. Yamamura: *Anal. Biochem.*, **77**, 18 (1977).
- 16) O. Nozaki, T. Iwaeda, H. Moriyama, Y. Kato: *Luminescence*, **14**, 123 (1999).
- 17) O. Nozaki, T. Iwaeda, Y. Kato: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 339 (1995).
- 18) O. Nozaki, T. Iwaeda, Y. Kato: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **11**, 309 (1996).
- 19) O. Nozaki, H. Kawamoto, H. Moriyama: *Luminescence*, **14**, 369 (1999).
- 20) O. Nozaki, H. Kawamoto: *Luminescence*, **15**, 137 (2000).
- 21) D. N. Rao, R. P. Mason: *J. Biol. Chem.*, **262**, 11731 (1987).
- 22) K. Oka, M. Sekiya, H. Osada, K. Fujita, T. Kato, T. Nagatsu: *Clin. Chem.*, **82**, 646 (1982).
- 23) J. Wassell, P. Reed, J. Kane, C. Weinkove: *Clin. Chem.*, **45**, 2216 (1999).
- 24) S. Honda, Y. Araki, M. Takahashi, K. Kakehi: *Anal. Chim. Acta*, **149**, 297 (1983).

要 旨

オフラインリアクターとしてのミニカラムを用いた総遊離カテコールアミン (CA: 遊離アドレナリン+ノルアドレナリン+ドーパミン) の迅速高感度測定法を開発した。臨床測定では CA 由来疾患の診断・経過観察用には CA 類の分離測定が一般的であるが、測定に時間がかかる問題がある。そこで、より迅速で、しかも特異性の高い総 CA 測定法が必要とされている。本法の原理は、CA の認識特異性を高めるために、CA の 2 官能基 (アミノ基とカテコール基) 同時認識法を用いた。すなわち、オフラインでのミニカラムの充填ゲル (スルホン酸基導入) に CA のアミノ基を結合し、次にゲルに結合した CA のカテコール基とイミダゾール (pH 7.8) の固液反応 (60℃, 30 分加熱) から、生成した過酸化水素を測定した。ミニカラムに充填するゲルは、CA の抽出及び過酸化水素の固相生成に影響を及ぼすので、そのゲルの官能基の種類と基材の組み合わせを検討したところ、官能基にはベンゼンスルホン酸基あるいはスルホン酸基を有し、基材はガラスあるいはポリスチレン製のものが適していた。固液反応で生成した過酸化水素のミニカラムからの迅速な溶出には、ゲルは無孔性で、溶離液にはイミダゾール溶液 (1.0 mol/l) が適していた。その溶出過酸化水素は、マイクロフローインジェクションーペルオキシダーゼ触媒ルミノール化学発光法で測定した。オフラインリアクター内での各ドーパミン量 (1.63~8.15 nmol) からの過酸化水素生成率は、それぞれ 47~69% (平均 56.8%) であった。CA の定量測定用の検量線は、ドーパミンの外標準法で作成した (回帰式 $Y = 2.04 X^2 + 12.4 X - 16.8$; Y: 発光強度, X: ドーパミン量, 1.63~8.15 nmol)。本法は迅速であり、臨床応用が可能である。