血清および尿中メタネフリンの直接ラジオイムノアッセイ

ダイナボット RI 研究所

*大阪大学医学部第四内科(老人科)

**横浜市立大学医学部第二内科

飯沼一茂, 池田勲夫, 高井 優
倉田邦夫, 荻原俊男*, 熊原雄一*
塩之入 洋**, 金子好宏**

A Simple and Direct Radioimmunoassay for Serum and Urinary Metanephrine

**Kazushige IINUMA, Isao IKEDA, Masaru TAKAI,
Kunio KURATA, Toshio OGIHARA*, Yuichi KUMAHARA*,
Hiroshi SHIONOIRI** and Yoshihiro KANEKO**

Dainabot Radioisotope Laboratories, Matsudo, Chiba, Japan

Department of Medicine and Geriatrics, Osaka University Medical School, Osaka, Japan*

The Second Department of Internal Medicine, Yokohama City University, Yokohama, Japan**

A simple, direct and specific radioimmunoassay for serum and urinary metanephrine was developed, in which we used ^{125}I -Synephrine and specific antiserum generated in rabbits by injecting with metanephrine conjugated with bovine serum albumin as described by Grota and Brown.

The sensitivity of the assay was 2 pg/tube. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.6 ~ 7.8% and 5.0 ~ 9.6%, respectively. The recoveries of metanephrine added at two levels of 250 pg/ml and 500 pg/ml to ten serum samples and ten urine samples (hydrolyzed and diluted) were 96.7 and 108% in serum, and 94.8 and 103% in urine, respectively.

Normal values of serum metanephrine were 40.3 ± 25.8 pg/ml (mean $\pm$ SD) from 20 normal subjects. Normal values of 24 hour urinary metanephrine excretion were 12.5 ± 6.7 ug/day from 24 normal subjects. Serum metanephrine values for 7 patients with pheochromocytoma were 210 ~ 628 pg/ml. Urinary metanephrine values for 9 patients with pheochromocytoma 8.7 ~ 302 ug/day.

I. 諸 言

メタネフリンはエピネフリンの主要代謝産物であり, メタネフリンの測定は褐色細胞腫の診断や

高血圧の病因解明に有用と考えられる。血中, および, 尿中のメタネフリンの測定方法としては, 比色法¹⁴⁾, 蛍光法²⁰⁾, ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー法²³⁾, および, 高速液体クロマトグラフィー法^{2) 5) 19)}などが挙げられる。いずれの方法も検体の前処理に長時間を要すること, および, 操作が類雑であるなどの問題があった。一方, 1977年, Lam⁷⁾ら, さらに, 1981年に Raum¹⁵⁾らが, シネフリン抗体を用いた尿中メタネフリンのラジオイムノアッセイ (RIA) を報告した。しかしながら, これらの方法もシネフリン抗体を用いているため, エピネフリンとの交叉反応の問題が含まれており, Raum らの方法では抽出操作を必要とする問題点があった。

また, 1978年に, 大森ら¹²⁾, 1979年に李ら¹⁷⁾は, 特異性の高いメタネフリンの抗体を作成し, 尿中メタネフリンのRIAを報告しているが, 実用的な臨床応用に関する報告は少ない。

今回, 著者らは, Grotaら⁴⁾の方法に従って, メタネフリンに特異的な抗体を作成し, さらに, ¹²⁵I-標識トレーサを用いて, 検体の前処理を全く必要としない血中, および, 尿中メタネフリンの同時測定可能なRIA系を開発し, 本RIA系で, 健常成人, 本態性高血圧患者および褐色細胞腫患者の血中, および尿中メタネフリンを測定し, その有用性を確認したので報告する。

II. 材料および方法

1. 試薬

メタネフリン, ノルメタネフリン, エピネフリン, ノルエピネフリン, オクトパミン, シネフリン, メトキシチラミン, L-ドーパ, 3-インドール酢酸, 5-ハイドロキシ-3-酢酸, 3-インドールアセトアルデヒド, インドール-2-カルボン酸, 3-インドールプロピオン酸, および, L-トリプトファンはSIGMA社製, クロラミンT, メタ重亜硫酸ナトリウム (SMBS), アジ化ナトリウム, リン酸一ナトリウム, リン酸二ナトリウムおよび, 塩酸は和光純薬社製を使用した。また, 家兎IgG, および, ウシ血清アルブミン (BSA) はMiles社製, Complete Freund's adjuvantはDifco社製, さらにNa¹²⁵I溶液は, Radio-Chemical Center (R.C.C) 社製を使用した。

2. 試薬の調製

a. メタネフリン標準液

メタネフリンを0.01NのHClにて溶解し, 1mg/mlのメタネフリン溶液を作成し, この溶液を0.01M-リン酸緩衝液, pH7.4 (含0.1%BSA, 0.2%SMBS, 0.1%NaN₃)を用いて希釈, 50, 100, 200, 400, 800および, 1600pg/mlの濃度の標準液を調製した。

b. メタネフリン・フリー血清

チャコールビーズを蒸留水を用いて, あらかじめ, 十分に洗浄後, カラムに充填し, そのチャコール量の3倍量のプール正常人血清を自然落下させ処理した。処理の状態を添加したメタネフリンの処理後の残存量で確認したところ, 血清中メタネフリンは, 95%以上除去可能であった。

3. 免疫および抗体液の調製

Grotaら⁴⁾の方法に従って, メタネフリンとBSAを結合させて免疫抗原を調製した。免疫はVaitukaitisら²²⁾の方法に従いメタネフリン量として約100μgを1羽の家兎に注射し, 6羽の家兎で行った。4週間間隔で免疫を行い5回免疫を行った後, 全採血を行った。全採血後, 力価検定により抗体を選択し, 0.01M-リン酸緩衝液, pH7.4 (含, 0.1%BSA, 0.01%家兎IgG, 0.1%NaN₃)を用いて, 4,500倍希釈し, RIAに使用した。また, 家兎IgGをやぎに感作して得られた第2抗体は0.01M-リン酸緩衝液, pH7.4 (含, 0.1%BSA, 0.1%NaN₃)を用いて, 65倍希釈してRIAに用いた。

4. 標識方法

シネフリンを0.01N-HClに溶解し、0.1mg/mlのシネフリン溶液を調製し、この溶液10 μ lと0.5M-リン酸緩衝液、pH7.4、および、1mCiのNa¹²⁵I溶液と十分に混合した後、クロラミンT法によりヨード標識を行った。標識後の精製はセルロースカラムを用いて行い、未反応の¹²⁵Iを除去した。精製後、0.01M-リン酸緩衝液、pH7.4(含、0.1%BSA、0.2%SMBS、0.1%NaN₃)を用いて、15,000cpm/0.1ml(8~12pg tracer/tube)の濃度に希釈し、RIAに使用した。

5. 尿の加水分解と尿検体の調製

24時間尿の一部100 μ lを試験管に採取し、0.2N-HClを200 μ l加え混和し、37℃で16~24時間加水分解を行った。加水分解後、0.01M-リン酸緩衝液、pH7.4(含、0.1%BSA、0.1%NaN₃)を用いて21倍希釈し、希釈加水分解尿として最終希釈63倍の尿検体、100 μ lをRIAに使用した。

6. RIAの操作法

標準曲線はメタネフリン・フリー血清を100 μ lと各濃度のメタネフリン標準液100 μ lを混和したものにより作成、血清サンプルは各々の血清100 μ lとメタネフリン濃度0標準液100 μ lを混和、さらに尿検体は希釈加水分解尿100 μ lとメタネフリン・フリー血清100 μ lを混和した。

続いて、¹²⁵I-シネフリン液およびメタネフリン抗体希釈液を各々100 μ lずつすべての試験管に加え、2~8℃で18~24時間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、第2抗体希釈液を加えて、さらに2~8℃で1時間インキュベーションを行ったのち、遠心分離を行い、沈殿の放射能をガンマカウンターを用いて測定した(Fig. 1)

尿中メタネフリン排泄量は次式により求めた。

$$X (\mu\text{g/day}) = A (\text{pg/ml}) \times 63 \times 24 \text{ hour urine volume (ml)} \times 10^{-6}$$

A: 標準曲線からの読み取り値 (pg/ml)

X: 24時間尿中メタネフリン排泄量 ($\mu\text{g/day}$)

Fig. 1. Assay procedures.

Fig. 2. Typical standard curve of metanephrine RIA.

III. 結 果

1. 標準曲線

4回測定におけるメタネフリン各濃度のB/T(%)のmean±SDにて, Fig.2に示すような標準曲線を得た。標準曲線は最小検出感度が2pg/tubeであり, 2~160pg/tubeの範囲で良好な曲線が得られた。メタネフリン濃度0から160pg/tubeまでのB/T(%)の減少は約50%であり, Bo%の50%阻害を起こすメタネフリン濃度は約24pg/tubeであった。

2. 抗体の特異性

抗体の特異性を Abraham ら¹⁾の方法に従って検討したところ, Table.1に示したように, シネフリンと7.3%の交叉反応性が認められたが, 他の物質では交叉反応性は認められなかった。また, カテコールアミンが酸化されインドール核を有する物質に変化することが知られているので, インドール核を有する物質との交叉反応性の検討を行ったが, いずれも認められなかった。

3. 稀釈テスト

メタネフリン濃度の異なる3種類の血清サンプルをメタネフリン・フリー血清で稀釈し, 各々のメタネフリン濃度を測定したところ, Fig.3に示したように, 稀釈倍率とメタネフリンの測定値の間には, 良好な直線関係が得られた。

Table 1. Specificity of anti-metanephrine antiserum.

Specificity of Anti-Metanephrine Antisera

compounds	cross-reactivity (%)
Metanephrine	100
Synephrine	7.3
Epinephrine	0.15
Normetanephrine	0.06
Norepinephrine	0.002
Octopamine	0.001
Methoxytyramine	<0.0008
L-DOPA	<0.0008
3-Indoleacetic acid	<0.0008
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	<0.0008
3-Indoleacetaldehyde	<0.0008
Indole-2-carbonic acid	<0.0008
3-Indole-propionic acid	<0.0008
L-Tryptophane	<0.0008

Fig. 3. Dilution study with metanephrine free serum.

●: serum A, ○: serum B, ■: serum C.

4. 回収試験

メタネフリン濃度の異なる10種類の血清, および, 稀釈加水分解尿に250pg/ml, および, 500pg/mlの2種類の濃度のメタネフリンを添加して, 各々の濃度を測定し, その回収試験を行ったところ, 血清に添加した回収率は各々96.7±5.7%および108±2.5%であった。一方, 稀釈加水分解尿に添加した回収率は, 各々94.8±9.4%および103±6.8%であり, いずれも良好であった (Table 2.3)。

5. 測定再現性

メタネフリン濃度の異なる5種類のプール血清を同時に10回測定し, 異なる日において3回測定した。同一測定内再現性はCV 2.6~7.8%であった。また, 測定間再現性は5.0~9.6%といずれもCV 10%以下で再現性は良好であった (Table 4)。

Table 2. Recovery test. Two levels of metanephrine were added to ten different serum samples, then each sample was measured.

Sample No.	Original concentration (pg/ml)	Metanephrine added (250pg/ml)		Metanephrine added (500pg/ml)	
		Observed (pg/ml)	Recovery (%)	Observed (pg/ml)	Recovery (%)
1.	86.5	318	92.6	620	107
2.	35.0	280	98.0	575	108
3.	58.0	295	94.8	585	105
4.	35.0	295	104	595	112
5.	19.0	255	94.4	555	107
6.	42.5	305	105	565	105
7.	38.0	295	103	570	106
8.	95.0	313	87.2	640	109
9.	85.0	318	93.2	610	105
10.	90.0	327	94.8	645	111
mean(%)			96.7		108

Table 3. Recovery test. Two levels of metanephrine were added to ten different urine samples, then each sample was measured.

Sample No.	Original concentration (pg/ml)	Metanephrine added (250pg/ml)		Metanephrine added (500pg/ml)	
		Observed (pg/ml)	Recovery (%)	Observed (pg/ml)	Recovery (%)
1.	142	340	79.2	610	93.6
2.	149	386	94.8	675	105
3.	143	433	116	625	96.4
4.	142	392	100	655	103
5.	149	371	88.8	640	98.2
6.	225	472	98.8	790	113
7.	213	445	92.8	770	111
8.	129	362	93.2	665	107
9.	142	370	91.2	680	108
10.	184	418	93.6	720	107
mean(%)			94.8		103

Table 4. Reproducibility of metanephrine RIA.

Intra assay					
	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4	CS-5
Mean(pg/ml)	133	225	532	1060	1440
SD	10.4	5.8	18.2	64.7	68.0
CV (%)	7.8	2.6	3.4	6.1	4.7

Inter assay					
	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4	CS-5
Mean(pg/ml)	127	218	542	1030	1390
SD	12.3	16.0	26.9	52.3	110
CV (%)	9.6	7.3	5.0	5.1	7.9

Serum Metanephrine

Fig. 4. The values of serum metanephrine of normal, essential hypertension (E.H) and pheochromocytoma.

Urinary Metanephrine

Fig. 5. The values of urinary metanephrine of normal, essential hypertension (E.H) and pheochromocytoma.

6. 臨床成績

健常成人20例の安静臥位採血における血清メタネフリン値は 40.3 ± 25.8 pg/mlであった。また、健常成人24例の24時間尿中のメタネフリン排泄量は 12.5 ± 6.7 μg/dayであった。本態性高血圧患者38例の血清メタネフリン値および、7例の24時間尿中メタネフリン排泄量は各々 59.4 ± 40.6 pg/mlと 16.2 ± 5.5 μg/dayであった。褐色細胞腫患者7例の血清メタネフリン値は210~628 pg/ml、9例の尿中メタネフリン排泄量は8.7~302 μg/dayであった (Fig.4.5)。

IV. 考 察

カテコールアミン，および，関連物質の免疫抗原の合成に関する報告は数多く見られるが，カテコール核が非常に不安定であるためエピネフリン，ノルエピネフリン，および，ドーパミンに対する特異性の高い抗体が得られず，これらのRIA系の確立は非常に困難な状態である。

1972年に Peskar ら¹³⁾は，ノルメタネフリンの側鎖のアミノ基と人血清アルブミンのアミノ基をグルタルアルデヒドで結合させ免疫抗原を作成し，抗体を得たがメタネフリンとの交叉反応があり，各々を特異的に測定するためには使用に耐えられなかった。その後，カテコールアミンの免疫抗原の合成に関する報告が見られるが，大別すると以下の通りである。

- 1) カテコールアミンの側鎖に担体を結合させる方法^{13) 21)}。
- 2) 担体にアミノ馬尿酸を結合させ，ジアゾ化によりカテコールアミンを結合させる方法³⁾。
- 3) カテコール核に Mannich 反応により担体と結合させる方法⁴⁾。
- 4) カテコール核に Mannich 反応を利用して担体を結合させる際にカテコールアミンの側鎖のアミノ基を保護する方法^{8) 9) 10)}である。

本法に用いたメタネフリンの抗体はメタネフリンとBSAをGrotaら⁴⁾の方法によりMannich反応で結合させた免疫抗原を家兎に免疫して得られたもので，メタネフリンに対して非常に高い特異性を有している。

メタネフリンのRIAに使用されている標識抗原はH³-メタネフリン⁷⁾，¹²⁵I-フェノール・メタネフリン¹⁶⁾，および，¹²⁵I-シネフリン¹⁵⁾の報告があるが，¹²⁵I標識トレーサを使用することは，血清および，尿中メタネフリンを直接測定するためには，不可欠であり，本法では，¹²⁵I-シネフリンを標識抗原として使用し，特異性の高い抗体を用いて直接法を可能にした。

尿中メタネフリンはPisanoら¹⁴⁾により比色法で尿中ノルメタネフリンとメタネフリンを総メタネフリンとして測定する方法が開発されて以来，蛍光法²⁰⁾，ガスクロマトグラフィー・スペクトロメトリ法²³⁾，および，高速液体クロマトグラフィー法^{2) 5) 19)}，による測定法が開発されている。しかしながら，いずれの方法も検体の前処理が煩雑で測定に長時間を要することから，臨床応用上広く普及することが困難であった。そこで，これらの前処理を必要とせず簡便で特異性の高いRIA法^{7) 12) 13)}¹⁷⁾が開発された。尿中メタネフリンは尿中ノルメタネフリン，尿中カテコールアミン，3-メトキシ-4-ハイドロキシ・マンデル酸（VMA）の測定とともに，褐色細胞腫の診断に重要な検査法である。

Remineら¹⁰⁾の報告によると，尿中総メタネフリンの測定により，96%の褐色細胞腫患者の診断が可能であった。この点では，Pisanoら¹⁴⁾の総メタネフリンの測定でも十分と考えられるが，本態性高血圧症などの病因解明のためには，尿中メタネフリンと尿中ノルメタネフリンの各々の値が重要な意味を持つと考えられている。さらに血清メタネフリンの測定は，血中レベルでのカテコールアミンの変動を知る上にさらに重要であり，また，血清ノルエピネフリン値，エピネフリン値を測定すると同時にこれら血清メタネフリン値，ノルメタネフリン値を測定することにより，生体内，特に血中内でのカテコールアミンの代謝等を知る上に一つのパラメータとなり，有用であると考えられる。

本測定系での健常成人の尿中メタネフリン排泄量，および，血清メタネフリン値は各々 $12.5 \pm 6.7 \mu\text{g/day}$ ， $40.3 \pm 25.8 \text{ pg/ml}$ であった。今までに報告されている健常者の尿中，および，血中メタネフリン値はTable 5に示したように必ずしも一致していないが，本法による尿中メタネフリンの測

定値は最も低く、Lamら⁷⁾のRIA測定値とほぼ一致した。また、血中メタネフリン値はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー法で測定した値の下限とほぼ一致した値であった。また、褐色細胞腫患者7例の血清メタネフリン値は210~628pg/mlと健常成人に比し、高値を示した。さらに、褐色細胞腫9例の尿中メタネフリン排泄量は8.7~302 μ g/dayと1例で健常成人と差の認められない値を示したが、他の8例では異常高値を示した。尿中メタネフリン排泄量低値を示した検体は尿中エピネフリン、および、ノルエピネフリンの高速液体クロマトグラフィー・THI法による測定値も同様に低値であった。このことは、本症例が発作型の褐色細胞腫であることから、非発作時に蓄尿した検体中のカテコールアミンが正常レベルを示したためと思われる。また、他のカテコールアミン、および、その代謝産物が高値を示す症例であるとも考えられる。

今回、本測定系で褐色細胞腫の血清、および、尿中メタネフリンを測定したところ、血清では7例中、7例で異常高値を示し、尿中では9例中、8例で異常高値を示した。以上のことから、本測定系による血中、および、尿中メタネフリンの測定は、他のカテコールアミンの測定と合わせて褐色細胞腫の診断に十分に役立つものと考えられる。

カテコールアミン関連物質を測定する際には、患者に投与された薬物や検体中の色素等の影響が認められている⁶⁾。特に $\alpha_1\beta_1\beta_2$ 受容体の遮断薬であるラベタロールや降圧薬の α -メチルドーパを経口投与するとその代謝産物が測定系に影響を与え異常高値が得られることが知られている¹⁸⁾。しかし、本法においてもこの影響を検討したところ、血中前値が107pg/mlであったのに対して、ラベタロール投与後94pg/ml、尿中では前値が18.1 μ g/dayに対して投与後10.1 μ g/dayとラベタロール投与に対して異常高値を示さなかった。このことは、薬剤投与中の患者の血中、尿中メタネフリン値の測定にも本法は十分利用できることを示しており、これらのことから、本法が特異性の高いRIA系であることが示された。

Table 5. Normal values of serum and urinary metanephrine.

Reference	sample (No.)	Normal Values	Method
1962 Smith, E.R.B.	(20) urine (19)	72.1 $\pm$ 5.7 ug/day	Fluorometric
1975 Wang, Mei-Tai	plasma free (4)	35.3 - 490 pg/ml	GC - MS
	plasma total (5)	353 - 725 pg/ml	GC - MS
1977 Shoup, R.E.	(19) urine (15)	174 $\pm$ 79 ug/day	HPLC - EC
1977 Lam, R.W.	(7) urine free (15)	3.5 $\pm$ 1.0 ug/day	RIA
	urine total (15)	17 $\pm$ 11 ug/day	RIA
1979 Li, S.	(17) urine free (5)	7 - 12 ug/day	RIA
1979 Muskiet, F.A.J.	(11) urine (13)	71 $\pm$ 17 ug/g creat	GC
1981 Raum, W.J.	(15) urine (15)	92.4 $\pm$ 45.7 ug/day	RIA
1981 Bertani-Dziedzic, L.M.	(2) urine (7)	0.039 ug/mg creat	HPLC - EC
1982 Jackman, G.P.	(5) urine (35)	19 - 290 ug/day	HPLC - F1
1983 Present study	serum (20)	40.3 $\pm$ 25.8 pg/ml	RIA
	urine (24)	12.5 $\pm$ 6.7 ug/day	RIA

HPLC - EC : high performance liquid chromatography with electrochemical detection

HPLC - F1 : high performance liquid chromatography with fluorescence detection

GC - MS : gas chromatography-mass spectroscopy

V. 結 論

特異性の高いメタネフリン抗体, および, ^{125}I -シネフリンを用いることにより, 血清, および, 尿中メタネフリンの直接測定可能なRIA法を確立した。本法は, 従来の測定法のような煩雑な前処理を必要とせず, 簡便性, 多数検体を同時に処理できる点で, 優れた方法である。本法による健常成人の血清メタネフリン値は $40 \pm 26 \text{ pg/ml}$ であり, 尿中メタネフリン排泄量は $12.5 \pm 6.7 \mu\text{g/day}$ であった。本法は臨床的に広く応用可能である。

文 献

- 1) Abraham, G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta Endocrinologica, supplementum*, 183: 1, 1974.
- 2) Bertani-Dziedzic, L.M., Krstulovic, A.M., Dziedzic, S.W., Gitlow, S.E. and Cerqueira, S.: Analysis of urinary metanephrines by reversed-phase high performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Clin. Chim. Acta*, 110: 1-8, 1981.
- 3) Faraj, B.A., Camp, V.M., Pruitt, A.W., Isaacs, J.W. and Ali, F.M.: The measurement of 3-O-Methyldopamine in urine and plasma by a rapid and specific radioimmunoassay. *J. Nucl. Med.*, 18: 1025-1031, 1977.
- 4) Grota, L.J. and Brown, G.M.: Antibodies to catecholamines. *Endocrinology*, 98: 615-622, 1976.
- 5) Jackman, G.P.: A simple method for the assay of urinary metanephrines using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Clin. Chim. Acta*, 120: 137-142, 1982.
- 6) Kobayashi, K., Miura, Y., Tomioka, H., Sakuma, H., Adachi, M., Abe, K. and Yoshinaga, K.: Falsely high urinary catecholamines induced by labetalol. *Tohoku J. exp. Med.*, 127: 63-69, 1979.
- 7) Lam, R.W., Artal, R. and Fisher, D.A.: Radioimmunoassay for free and conjugated urinary metanephrine. *Clin. Chim.*, 23: 1264-1267, 1977.
- 8) Miwa, A., Yoshioka, M., Shirahata, A., Nakagawa, Y. and Tamura, Z.: Preparation of specific antibody to each one of catecholamines and L-DOPA. *Chem. Pharm. Bull.*, 24: 1422-1424, 1976.
- 9) Miwa, A., Yoshioka, M., Shirahata, A. and Tamura, Z.: Preparation of specific antibodies to catecholamines and L-3,4-dihydroxyphenylalanine I. Preparation of the conjugates. *Chem. Pharm. Bull.*, 25: 1094-1910, 1977.
- 10) Miwa, A., Yoshioka, M. and Tamura, Z.: Preparation of specific antibodies to catecholamines and L-3,4-dihydroxyphenylalanine. III. Preparation of antibody to epinephrine for radioimmunoassay. *Chem. Pharm. Bull.*, 26: 3347-3352, 1978.
- 11) Muskiet, F.A.J., Thomasson, C.G., Gerding, A.M., Fremouw-Ottevangers, D.C., Nagel, G.T. and Woltthers, B.G.: Determination of catecholamines and their 3-O-Methylated metabolites in urine by mass fragmentography with use of deuterated internal standards. *Clin. Chem.*, 25: 453-460, 1979.
- 12) 大森芳明, 中野龍一, 井村裕夫: Metanephrine Radioimmunoassay. *日内分泌会誌*, 54: 557, 1978.
- 13) Pesker, B.A., Pesker, B.M. and Levine, L.: Specificities of antibodies to normetanephrine. *Eur. J. Biochem.*, 26: 191-195, 1972.
- 14) Pisano, J.J.: A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine. *Clin. Chim. Acta*, 5: 406-414, 1960.
- 15) Raum, W.J. and Swerdloff, R.S.: Urinary metanephrine radioimmunoassay: Comparison with the colorimetric assay. *Clin. Chem.*, 27: 43-47, 1981.

- 16) Remine, W.H., Chong, G.C., Heerden, J.A.V., Sheps, S.G. and Harrison, E.G.: Current management of pheochromocytoma. *Ann. Surg.*, 179: 740–748, 1974.
- 17) 李 鍾三, 中野龍一, 大森芳明, 井村裕夫, 安田喜久男, 森 弘: Metanphrine の radioimmuno-assay. 日内分泌会誌, 55: 577, 1979.
- 18) 塩之入洋, 安田 元, 梅村 敏, 金子好宏: 副腎髓質-褐色細胞腫の診断と腫瘍局在部位診断法. 日本臨床, 41: (6), 1983.
- 19) Shoup, R.E. and Kissinger, P.T.: Determination of urinary normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine by liquid chromatography with amperometric detection. *Clin. Chem.*, 23: 1268–1274, 1977.
- 20) Smith, E.R.B. and Well-Malherbe, H.: Metanephrine and normetanephrine in human urine: Method and results. *J. Lab. & Clin. Med.* 60: 212–223, 1962.
- 21) Spector, S., Dalton, C. and Felix, A.M.: Development of antibodies against catecholamines. *Biochem. Pharmacolo. suppl.* 263–267, 1974.
- 22) Vitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieslag, I. and Ross, G.T.: A method for producing specific antisera with small dose of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 816–825, 1974.
- 23) Wang, Mei-Tai, Yoshioka, M., Imai, K. and Tamura, Z.: Gas-liquid chromatographic determination of 3-O-methylated catecholamines in human plasma. *Clin. Chim. Acta*, 63: 21–27, 1975.
- (受付日: 58. 5. 18)