ORIGINAL (1)

人血清 catecholamine 高精度迅速定量法と
その応用 (第 II 報)

斎 藤 秀 哉*

(受付: 1971 年 4 月 20 日)

A Rapid and Sensitive Method for Simultaneous Determination of
Epinephrine and Norepinephrine in Human Plasma (Report II)

Hideya Saito

Department of Pharmacology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo

As previously reported, a preliminary experiment was set up in order to run a comparison among various methods using trihydroxyindole reaction with respect to the recovery, accuracy and rapidity. The present work deals with an improvement of Price's method for simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in human plasma. The improvements were as follows.

- 1) Purification of acid washed aluminum oxide (Merck #71695 acid washed)
- 2) Addition of a large amount of EDTA disodium.
- 3) Prevention of change in fluorescence intensity arising from progressive decay of fluorescence of trihydroxyindole compounds formed.

Thus, the determination method was considerably improved in accuracy and rapidity. Using this method, it was shown that while in normal subjects almost no plasma catecholamine was detected, in the patients investigated sporadic detection was made in some diseases, in which catecholamine detection hitherto may have been difficult.

緒 論

Trihydroxyindole 反応を応用した人血清 catecholamine (CA) 測定法に関し、従来種々の改良法が考案された¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。私は上記種々の改良法に関し、回収率、正常人血清 CA 量、測定時間等を比較検討した。これらの成績にもとづき、人血清

CA 量を高精度にかつ短時間で測定できる一改良法を考案した⁵⁾。次にこの改良法を応用して数種類の疾患時の患者血清 CA 量を測定した。

実験材料ならびに方法

(1) aluminum oxide の精製法

alumina (Merck 71695 acid washed) 300~500 g に 2N HCl 1 l を加え reflux condenser で 1

* 北海道大学医学部薬理学教室

時間煮沸した。煮沸終了後、室温にて冷却した。容量 1 l のクロマトグラフ用ガラス管 pyrex # 38450 に内容物を移した。クロマトグラフ用ガラス管の下部から再蒸溜水を環流し alumina を洗滌した。この alumina 洗滌に約 3 時間を要した。この間しばしば alumina をガラス棒で攪拌した。この攪拌後クロマトグラフ用ガラス管内の環流液が 2 分間以内に透明となつた。この環流液の迅速なる透明化が alumina 微細粒子の除去されたことを示す。alumina を吸引漏斗を用いて集め、Whatman No. 3 濾紙の間に alumina をはさみ、室温で一昼夜乾燥した。次に alumina を電気炉内に入れ 300°C 2 時間乾燥した。乾燥後、デシケーター中で保存した。

(2) 上膊静脈より血液 18 ml を採血した。0.9 % NaCl 溶液に溶解した EDTA 2Na (1 %) を 2 ml 加えて攪拌し、脱線維を行なつた。ただちに遠心沈澱 (9000r.p.m, 2°C 10 分間) を行ない血清を採取した。perchloric acid (60%) を採取血清の 10% だけ加え攪拌した。30 分間冷蔵庫 (2°C) 内に保存し、再び遠心沈澱 (9000r.p.m, 2°C, 10 分間) を行なつた。遠心沈澱後、除蛋白上清を採取した。容量を測定した。除蛋白上清に 5 N K_2CO_3 を 1 滴ずつ加え、攪拌し pH 4.0 まで中和した。この際 pH 試験紙を用いた。potassium perchlorate の沈澱を含有する中和物をポリエチレン製遠沈管に移し、遠心沈澱 (9000r.p.m. 10 分間) を行なつた。

(3) CA の吸着、精製および溶出

potassium perchlorate を除去した後上清を三角フラスコに移した。この三角フラスコ内には精製 alumina 0.5g, 0.2M EDTA 2Na 水溶液 1 ml および 1 % phenolphthalein ethanol 溶液 2 滴を滴下した。この三角フラスコ内容物の pH を 1 N NH_4OH で 8.2 ± 0.3 に調整し振盪機上で 5 分間振盪した。その間、三角フラスコ内容物が薄桃色を保つように 1 N NH_4OH を滴下した。振盪後、三角フラスコ内容物をクロマトグラフ用 column に移した。0.2M sodium acetate 溶液で充分三角フラスコを洗いクロマトグラフ用 column 上端の貯

蔵部分に注いだ。クロマトグラフ用 column の構造は内径 4 mm ガラス管 (25cm) とその上端の貯蔵部分 (容積 100ml) から成り立っている。200 mmHg 空気圧でこの溶液の溶出を行なつた。次に 2 回連続して 0.2M sodium acetate 5 ml を column に注ぎ、最後に再蒸溜水 10 ml で column を洗滌した。CA 溶出には 0.5N acetic acid 2 ml を用い、連続 2 回にわたつて CA 溶出を行なつた。CA 溶出液に 0.2M EDTA-2Na 水溶液 0.25 ml を加え、total volume を 4.25 ml とした。この CA 溶出液は deep freezer 中に保存した。CA の external standard および reagent blank の稀釈用として、sample と同様のイオン強度をもつ稀釈溶液 (“blank” 溶出液) が必要である。この目的のために、CA 溶出後の column にふたたび 0.5N acetic acid を通過させ “blank” 溶出液を作つた。すなわち、0.5N acetic acid 30 ml で column を通過させ、この溶出液に 0.2M EDTA-2Na 1.9 ml を加えた。この “blank” 溶出液の pH は 2.5N NaOH で 6.4 に合わせた。さらに、2 M acetate buffer (pH 7.8) の 1.5 ml を加えて、“blank” 溶出液の pH を 6.5 とした。この “blank” 溶出液を “Solvent I” を名付けた。

(4) **Trihydroxyindole 反応時の条件**：既に報告した通り⁵⁾、次の順序で行なつた。(1) CA の external standard および reagent blank の試験管に Solvent I をそれぞれ 1 ml および 2 ml 加えた。(2) 0.5 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ の 0.05 ml を全ての試験管に加えた。この時点で Sample (CA 含有溶出液) の中和を行なつた。Sample はガラス製遠沈管 (40 ml) にうつし、このガラス製遠沈管を ice bath のなかにつけた。sample の中和反応は sample 中に pH meter 用ガラス電極を挿入し、PE-50 tube で空気を sample 中に通気し sample の攪拌を行なつた。2.5N NaOH を一定時間間隔で滴下した。sample の pH が 6.4 に達したら、2 M acetate buffer (pH 7.8) を 0.3 ml 加えた。sample の最終 pH を 6.5 とした。CA の分解を防ぐために sample pH を 6.5 としたのち酸化反応終了までの時間をできるだけすみやかにこなう必要があ

る。本改良法において, sample の pH を 6.5 としたのち 10 分以内に酸化反応を終了した。(3) sample 中和物を sample および sample blank 用試験管に各々 2 ml ずつ移した。(4) および (5) epinephrine および norepinephrine を base に換算してそれぞれ $0.025\mu\text{g}$ を external standard 試験管に移した。(6) 2% ascorbic acid を 0.05ml ずつ sample blank 試験管に加えた。(7) 0.25% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の 0.05ml を試験管番号 1 番から順次 45 秒間隔で全試験管に加えた。(8) および (9), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を加えた時点から 5 分後に前回同様 45 秒間隔で試験管番号 1 番より順次全試験管に NaOH-ascorbic acid 混合物 (5 N NaOH と 2% ascorbic acid を 9 : 1 の割に加えたもの) および 5 N NaOH が加えられた。この際 sample blank 試験管には 5 N NaOH の 0.45ml を加えた。他の試験管は 0.5ml の NaOH-ascorbic acid 混合物を加えた。さらに 5 分後, 前回同様 45 秒間隔で 5 N acetic acid 1 ml を全試験管に加えた。試料の最終 pH は 5.5 となった。5 N acetic acid 1 ml を加えたのち 7 分 30 秒経過後に, 各試料の蛍光強度を Aminco-Bowman 蛍光分光光度計で測定した。各試料測定時の時間間隔は 45 秒とした。蛍光強度測定時の条件は activation wave length $395\text{m}\mu$ および $435\text{m}\mu$, fluorescence wave length $495\text{m}\mu$ で測定した。これらの波長はいずれも uncorrected instrumental value である。

(5) 試料中の CA 量の算出法

sample 中の catecholamine 量の算出は Vendsalu の方法¹⁾に準じた。詳細な算出法はすでに報

告した⁵⁾。

実験結果

1. 回収率

本改良法による回収率実験成績を表 1 に示す。すなわち, 人血清 10ml に norepinephrine および epinephrine を 1ng から 10ng までの範囲に加え, この附加した CA 量がどれだけ検出できるかを調べた。norepinephrine および epinephrine を両方一緒に加えた場合, total CA 濃度が 2ng のとき $108 \pm 58\%$ (S.D.) の回収率を示したが Total CA 濃度 20ng の場合 $70 \pm 13\%$ (S.D.) となった。

他方, Vendsalu 法¹⁾による回収率実験成績を表 1 上段に示す。本改良法 (Saito's method) に比較して回収率は低値を示した。

2. 正常人血清 CA 量: 本改良法による正常人血清 CA 量の成績を表 2 に示す。年令 17 歳から 43 歳までの正常人 34 名につき 上膊静脈血清中 CA 量を測定すると, 34 名中 31 名に 静脈血清中 CA 量は検出不能であった。残りの 3 名のうち 1 名は norepinephrine は $0.19\mu\text{g/L}$ plasma を示したが, epinephrine は検出不能であった。他の 2 名は epinephrine が $0.07\mu\text{g/L}$ plasma および $0.06\mu\text{g/L}$ plasma であったが norepinephrine は検出できなかった。

他方, Vendsalu 法¹⁾による正常人血清 CA 量の測定をおこなった。その結果 6 例中 3 例は検出不能であるが, 残りの 3 例に 正常人血清 CA 量が検出された。そのうちとくに 2 例については norepinephrine が $0.54\mu\text{g/L}$ plasma および 0.56

表 1

Added norepinephrine (NE) and epinephrine (Ep) to 10 ml plasma	method	number of experiment	norepinephrine recovery (%)	epinephrine recovery (%)	total catecholamine recovery (%)
0.01~0.02 μg NE+0.01~0.02 μg Ep	Vendsalu	8	S.D. 48.6 $\pm$ 27.1	S.D. 38.8 $\pm$ 18.2	S.D. 44.6 $\pm$ 17.2
	Saito et al.	17	64.4 $\pm$ 26.5	75.8 $\pm$ 19.4	70.0 $\pm$ 12.6
0.005 μg NE+0.005 μg Ep	Saito et al.	6	93.43 $\pm$ 30.0	76.76 $\pm$ 29.96	85.0 $\pm$ 19.0
0.0025 μg NE+0.0025 μg Ep	Saito et al.	6	117.1 $\pm$ 55.4	101.2 $\pm$ 28.6	109.2 $\pm$ 34.6
0.001 μg NE+0.001 μg Ep	Saito et al.	9	99.6 $\pm$ 100.6	117.0 $\pm$ 76.3	108.3 $\pm$ 58.1

表 2 Blood plasma catecholamine in normal voluntary subjects

Method	Number of subjects	total catecholamine ($\mu\text{g/L}$ plasma)	norepinephrine ($\mu\text{g/L}$ plasma)	epinephrine ($\mu\text{g/L}$ plasma)
Vendsalu's method	3 cases	non-detectable	non-detectable	non-detectable
	case A	0.62	0.54	0.08
	case B	0.16	0.16	non-detectable
	case C	0.56	0.56	non-detectable
Saito's method	31cases	non-detectable	non-detectable	non-detectable
	case A	0.06	non-detectable	0.06
	case B	0.19	0.19	non-detectable
	case C	0.07	non-detectable	0.07

	Patient Initial	Disease
Sample I	C. R.	congestive heart failure pulmonary infarct
Sample II	A. B.	congestive heart failure

図 1

表 3

Patient Initial	Age	Disease	Norepinephrine	Epinephrine ($\mu\text{G/L}$ Plasma)	Total Catecholamine
**A. B.	64	CHF*	0.73	0.18	0.91
M.	55	CHF	n. d.	n. d.	n. d.
M. K.	70	CHF A. S. H. D.	0.56	n. d.	0.56
**C. R.	84	CHF Pulmonary Infarct	8.73	1.87	10.60
B. M.	62	CHF	n. d.	n. d.	n. d.

* CHF: Congestive Heart Failure n. d.: non-detectable

表 4

Patient Initial	Disease	Norepinephrine	Epinephrine ($\mu\text{g/L}$ plasma)	Total Catecholamine
P. S.	Rheumatic Fever	0.156	n. d.	0.156
I. O.	Rheumatic Fever	n. d.	n. d.	n. d.
D. S.	Rheumatic Fever	n. d.	n. d.	n. d.
M. W.	A. S. H. D.*	0.023	0.275	0.298
R. K.	A. S. H. D. Chronic Brain Syndrome	0.114	0.011	0.125
F. L.	Hepatic Coma	1.570	0.322	1.892
F. S.	Cerebral Artery Thrombosis	0.436	n. d.	0.436
P. C.	Neuroblastoma	n. d.	n. d.	n. d.

* A. S. H. D.: Arteriosclerotic Heart Disease n. d.: non-detectable

$\mu\text{g/L}$ plasma という異常に高い値を示した。(表 2 参照)

3. 数種疾患時の患者血清 CA 量

Cincinnati general hospital に入院中の患者 13 名につき人血清 CA 量を測定した。(Dr. Thomas E. Gaffney, Division of clinical pharmacology, University of Cincinnati と共同実験)。

疾患別に観察すると congestive heart failure 5 例中 3 例に血清 CA 量の増加が認められたが、5 例中 2 例は血清 CA 量は検出不能であった。血清 CA 量の増加の認められた C. R. および A. B. の蛍光スペクトルを図 1 に示す。次に rheumatic fever の 3 例中 1 例に血清 CA 量が検出されたが、3 例中 2 例は血清 CA 量は検出不能であった。その他、arteriosclerotic heart disease 2 例、hepatic coma 1 例、cerebral artery thrombosis 1 例にいずれも血清 CA 量の増加が認め

られた。しかし neuroblastoma 1 例では血清 CA 量は検出不能であった。(表 3, 表 4 参照)

討 論

trihydroxyindole 反応を応用した人血清 CA 定量に関する一改良法を考案した。主要な改良点は次の 3 点である。(1) 吸着剤として aluminum oxide (Merck 71695 acid washed) を使用し、これの微細粒子を除去する目的で完全な精製を行なった。(2) 従来より大量の EDTA・2Na を使用した。(3) 各試料中の CA 蛍光強度は時間の経過により変わることを避けるため、trihydroxyindole 反応時間を常に一定とし、反応終了から蛍光測定までの時間間隔を 7 分 30 秒とした。本改良法により安静時正常人静脈血清 CA 量は $0.1\mu\text{g/L}$ plasma 以下と見做し得た。なぜならば、回収率実験結果から本改良法の CA 定量限界は $0.1\mu\text{g/L}$ plasma

であり、さらに大多数の正常人静脈血液20ml 中の CA 量が検出できなかつたためである。本改良法の定量限界は、回収率実験成績から norepinephrine および epinephrine それぞれ 1 ng であつた。この成績は Dowex 50W X 4 [H⁺] の column chromatograph による Vendsalu 法¹⁾と比較すると、回収率、正常人血清 CA 量に関して、いずれも本改良法が優れた成績を示した。本改良法を用いると血液採血から CA 蛍光測定まで 3 時間30分で終了する。他方、Dowex 50W X-4 [H⁺] を用いる Vendsalu 法¹⁾は CA 測定に約10 時間を要した。したがつて、本改良法により測定時間は短縮された。この方法を用いて、数種疾患時の患者血清 CA 量を測定した。その結果(1) congestive heart failure の場合、血清 CA 量が増加しているものと、血清 CA 量が検出不能の症例とがあつた。(2) rheumatic fever の 3 例中 1 例に血清 CA 量が検出されたが、3 例中 2 例は血清 CA 量は検出不能であつた。その他 arteriosclerotic heart disease 2 例, hepatic coma 1 例, cerebral artery thrombosis 1 例で血清 CA 量の増加が認められた。しかし neuroblastoma 1 例では血清 CA 量は検出不能であつた。以上の実験

結果より、種々の疾患時に交感神経機能の亢進がおこり、種々の程度に血清 CA 量の変動をおこすものと考えられる。

結 語

1. trihydroxyindole 反応を応用した人血清 CA 定量に関する一改良法を考案した。
2. 本改良法を用いて数種疾患の患者血清 CA 量を測定した。その結果、congestive heart failure, rheumatic fever, arteriosclerotic heart disease, hepatic coma および cerebral artery thrombosis に散発的に血清 CA 量の増加が認められた。

文 献

- 1) Vendsalu, A.: Acta Physiol. Scand. **49**, Supp 173 (1960).
- 2) Bertler, A., Carlsson, A., Lindquist, M. and Magnusson, T.: Experientia **14**, 184(1958).
- 3) Price, H. L. and Price, M. L.: J. Lab. and Clin. Med. **50**, 769(1957).
- 4) Häggendal, J.: Acta Physiol. Scand. **59**, 242(1963).
- 5) Saito, H., Woronkow, S. and Myers, B.: Japanese Circulation Journal. **33**, 677(1969).