

全自動カテコールアミン分析計 HLC-825CA の開発

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 相 | 沢 | 美 | 恵 | 子 |
| 杉 | 本 | 忠 | 則 | |
| 中 | 村 | 互 | 志 | |
| 林 | | 秀 | 知 | 佳 |
| 松 | 崎 | | | 充 |
| 宮 | 尾 | 英 | 幸 | |
| 山 | 崎 | 重 | 雄 | |

Materialization of Fully Automated Catecholamine Analyzer

Mieko AIZAWA
Tadanori SUGIMOTO
Hiroshi NAKAMURA
Hidechika HAYASHI
Mitsuru MATSUZAKI
Hideyuki MIYAO
Shigeo YAMAZAKI

A fully automated catecholamine analyzer, HLC-825CA, is described in this report. HLC-825CA is equipped with a double column system, a auto sampler, a fluorescence monitor, a THI reactor and a data processing/control micro computer. Ascribing to the double column system of "high-performance" liquid chromatography, the annoying hand-work required for sample pre-treatment is suppressed. So this HLC-825CA system is applicable to routine assay of plasma catecholamine in clinical laboratories.

1. はじめに

生体, 特に脊椎動物の体内では生体アミンとよばれる多種のアミン系化合物群が生理学的に重要な役割¹⁾をになっている。これらの生理活性な生体アミン群の中でも, カテコールアミン (CA) 類はセロトニンを始めとするインドールアミンと並んで特に重要な位置にある¹⁾。

CA 類は first chemical messenger であり, その分析は内分泌系や神経系の研究には必須の項目である。従来, 臨床検査の一つとして尿中 CA の分析も行われてきてはいるが, 最近では尿中よりも数段困難である血中 CA の測定の必要性が高まってきている。この理由としては, 近年 CA の研究が急速に進み, 多くの疾病との関連が明らかにされてきたことがあげられる²⁾。

CA には主に Fig.1 に示す如く Adrenalin (AD),

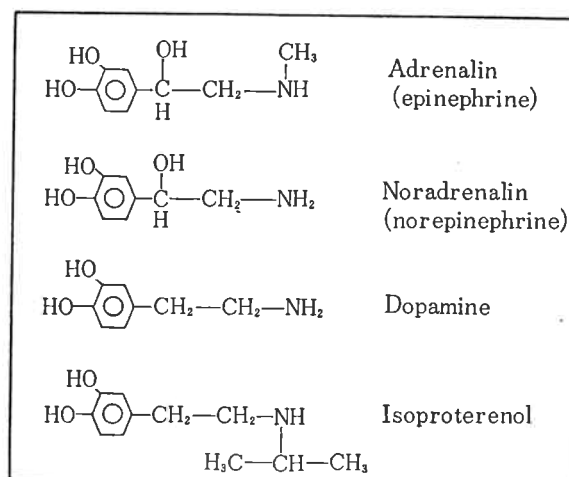


Fig. 1 Structures of catecholamines

検体前処理の省力化

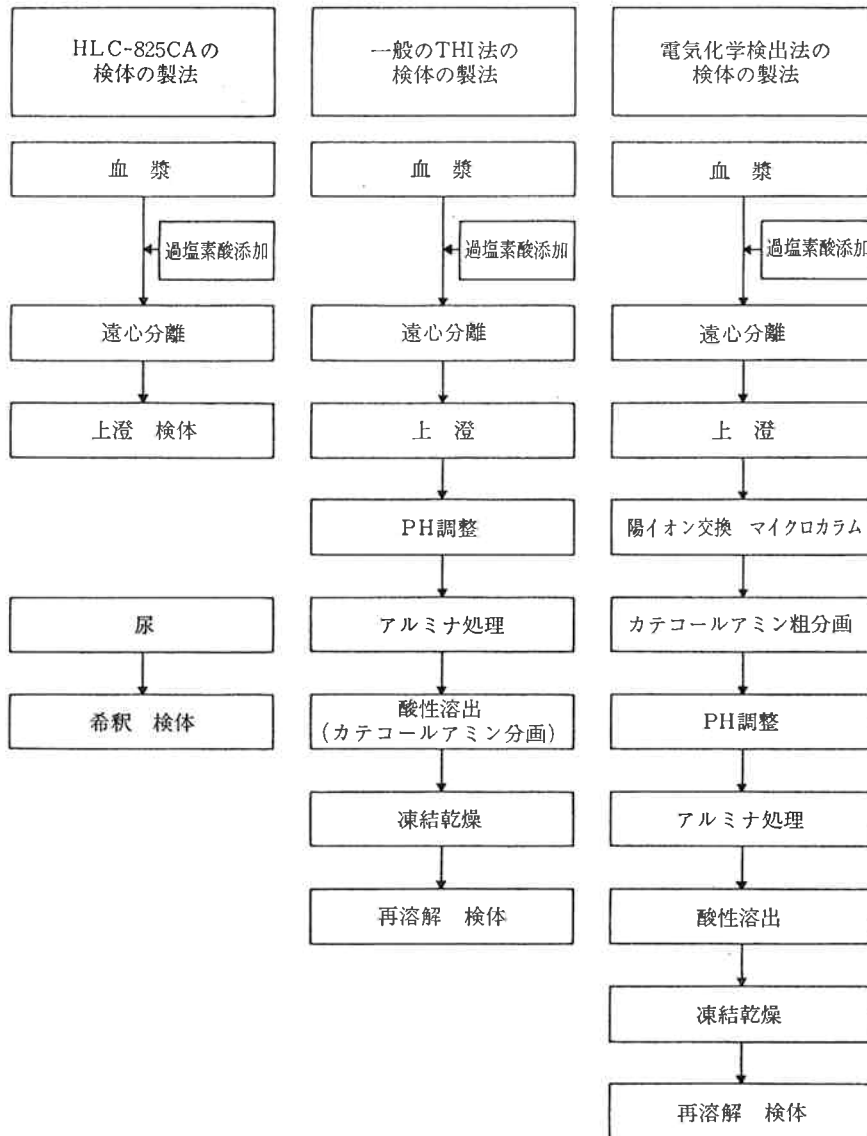


Fig.2 Comparison of pre-treatment methods for plasma catecholamine assay by HPLC

Noradrenalin (NA) および Dopamine (DA) の3つの成分が知られている。これら CA の中で、AD と NA の血中濃度は内分泌・循環器等との疾病と、また NA と DA の血中濃度は精神・神経系等との疾病との関連が深いため、CA の総量でなく CA の各成分ごとの測定が必要である。

CA 各成分の分離には従来より高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられてきているが、何分血中 CA は極めて希薄であり (数 pmol/ml 以下である)、また検出を妨害する物質も多種多量に存在するため、HPLC 用の試料とするには、試料血漿に粗分離・濃縮等の前処理をほどこす必要がある。HPLC の検出方法により若干異なっているが、いずれの前処理も極めて複雑で、長時間を要する手仕事である⁹⁾ (Fig.2)。また一定の再現性を得るためにはかなりの熟練も要求される。

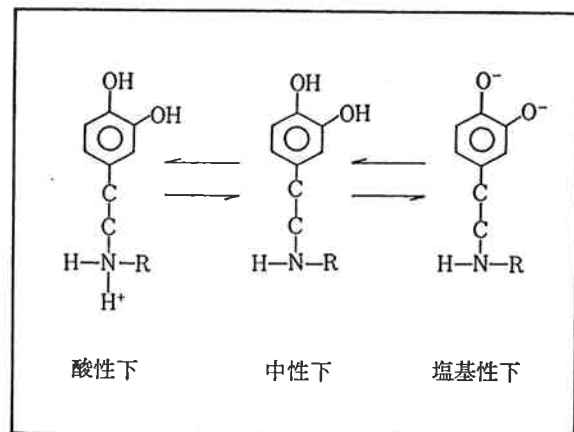


Fig.3 Valence of catecholamine in aqueous solution with various pH

これらのことは血中 CA の動態の研究の障害となり、血中 CA をルーチンで測定している施設は多くない。そこで我々は血中 CA を測定する際に大きな障害となっている前処理を出来る限り自動化し、測定省力化と再現性の改善を試みた。

前処理の自動化を企画するにあたり、CA の化学的性質を出来るかぎり利用することを意図し、その化学的性質を検討した。CA は酸性溶液中で陽イオンとなり (Fig. 3)、陽イオン交換樹脂上に吸着される (Fig. 4) こととホウ酸陰イオンと pH 6.5 以上の溶液中で極めて安定な錯体を形成し、一方 pH 4.0 以下ではほとんど完全に錯解離してよとの CA 陽イオンとなる (Fig. 5) 等のことが化学的性質として利用できると思われた。

これらの化学的性質、以前開発したダブルカラムシステム⁴⁾、および大和谷⁵⁾らによる前処理自動化方式を利用して、血中 CA をルーチンで測定できる装置として、全自動 CA 分析計、HLC-825CA を開発した。

2. HLC-825CA 本体について

流路系統図および外観図を Fig. 6 および 7 に示す。

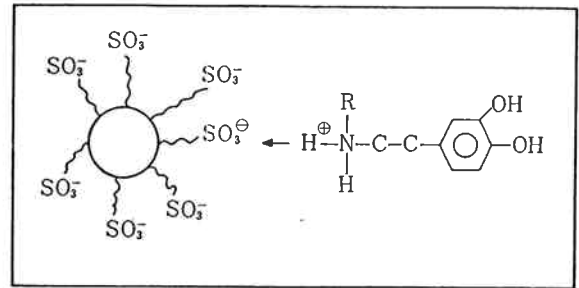


Fig. 4 Adsorption of catecholamine cation on a cation exchanger

また仕様を Table. 1 に示す。HLC-825CA には全自動測定に必要な以下の機能部品が組み込まれている。

[1] オートサンプラ AS-48

あらたに開発されたオートサンプラであり、吸引針 XY 移動方式を採っている。HLC-825AA と共通である。

[2] THI 反応器

アルミヒートブロックに内径 0.5 mm のテフロンチューブが 3 本、反作用として巻きつけてある。

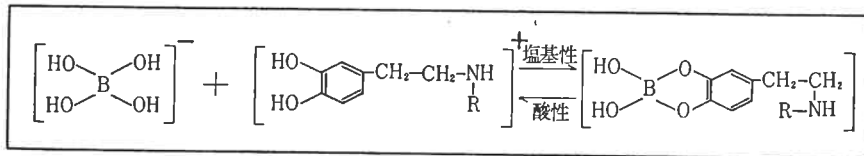


Fig. 5 Complex formation of catecholamine with borate anion in aqueous solution with various pH

流路系統図

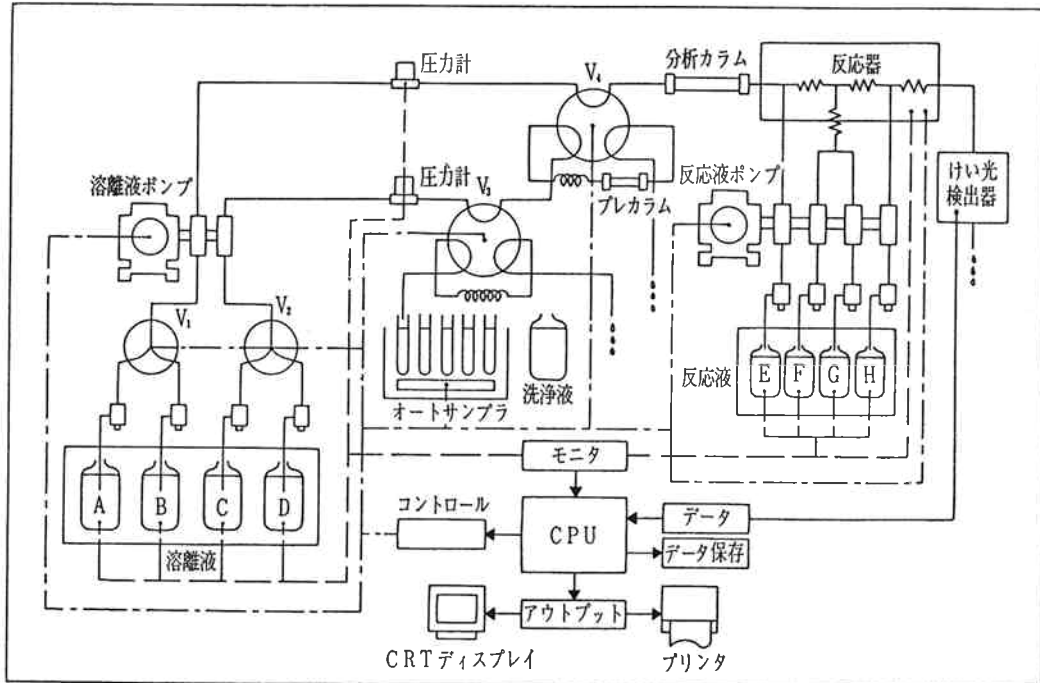


Fig. 6 Flow diagram of HLC-825CA

Table. 1 Specification of HLC-825CA

| 機能部品 | 内容 | 仕様 |
|---------|--------------------------|--|
| カラム系 | 分析カラム プレカラム | TSK-GEL IEX-510CA 6φ×150 mm TSK-GEL IEX-510CAP 4φ×60 mm (前処理用) |
| 送液系 | 溶離液ポンプ 反応液ポンプ | 2連プランジヤポンプ 溶離液流量 1.0 ml/min 前処理液流量 1.5 ml/min 圧力 ~200 kg/cm ² 圧力リミッタ付 4連プランジヤポンプ 流量 0.2 ml/min (各反応液) |
| タンク | 溶離液 A~D 反応液 E~H | 2 l, 4 l 各 2 l |
| 反応器 | 方式 温度 反応コイル | アルミブロック加熱方式 60°C テフロンチューブ |
| オートサンプラ | 方式 検体数 ループ容量 冷却 | ループ吸引方式 48点, 緊急試料用1点 10 μl~1,000 μl 電子冷却 10°C 以下 |
| 検出器 | けい光検出器 | 光源 キセノンランプ 150W λ _{ex} =395 nm λ _{em} ≥460 nm |
| データ処理 | マイクロコンピュータ | 最大ピーク処理数 10点 標準試料による係数自動作成 結果の打出し サーマルプリンタ (用紙巾 234 mm) クロマトグラム 定量結果 |
| 制御 | マイクロコンピュータ | データ入力 カセットテープおよびキーボード キーボード フルキーボード ファンクションキー付 英数字, 数字 ディスプレイ CRT |
| その他 | 寸法 重量 電源 | 1200(W)×700(D)×960(H)mm 250 kg AC 100 V 50/60 Hz 1.0 KVA |

〔3〕 螢光検出器 BF-4

あらたに開発された螢光検出器であり, 入射光分光にはグレーティングを, 螢光分光にはカットオフフィルターを用いている。

〔4〕 送液ポンプ

前処理・溶離液用ポンプと反応器用ポンプが用いられている。

〔5〕 マイクロコンピュータ

組み込まれたコンピュータは装置の制御とデータ処理を司っている。装置の制御の内容は, オートサンプラ制御, 各種バルブの作動等の他に, 各機能部品のモニタ

リングを行う。モニタに異常が感知されると, コンピュータは関連機能部品の作動を停止させ, その異常箇所をサーマルプリンタ上と CRT ディスプレイ上に示す。データ処理結果はサーマルプリンタにより打ち出される。打ち出し項目は, 測定日時, 試料, 各成分の溶出時間, ピーク高さ, ピーク面積, 定量結果, である。Fig.11~16を参照されたい。

〔6〕 サーマルプリンタ S-200GP-M2

あらたに開発されたプリンタであり, HLC-825AAに共通である。

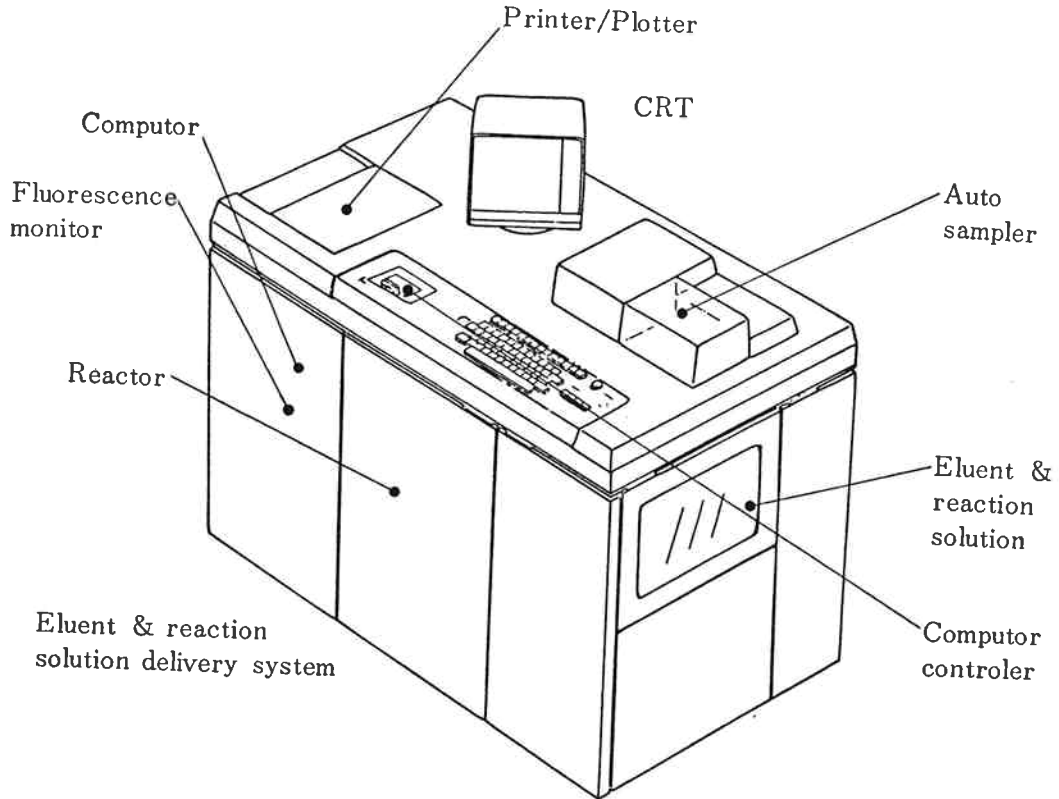


Fig. 7 Construction of HLC-825CA

3. HLC-825CAの作動原理

以下に本装置に組み込まれた自動前処理装置および測定原理の概要について述べる。Fig. 6を参照されたい。

オートサンプラ中のループにサンプルカップ中の除蛋白質血漿 1.1 ml が送りこまれたところでコンピュータ (CPU) の指令により6方バルブ V_3 が回転し、1 ml の試料が酸性溶液 (C) で前処理用プレカラムに送られる。これにより CA はプレカラム (陽イオン交換樹脂、

IEX510CAP が充填されている) に吸着される。このとき試料中に含まれていた中酸性物質はプレカラムから溶出されてしまう。その後3方バルブ V_2 が CPU の指令により切り替り、ホウ酸溶液 (D) がプレカラムに導入され、プレカラム中で形成されたホウ酸-CA 錯体がプレカラムから溶出される直前に6方バルブ V_4 が CPU 指令により切り替り、プレカラムと分析カラムを直列に接続する。このとき分析カラム中に前もってホウ酸-CA 錯体を解離さすに充分な酸性の溶液 (A) が満ちており、この中に導入された錯体は解離し、CA は再び陽イオンとなる。この CA 陽イオンは分析カラムに充填されている陽イオン交換樹脂 (IEX510CA) に吸着される。この後、CPU 指令により3方バルブ V_1 が切り替り、CA

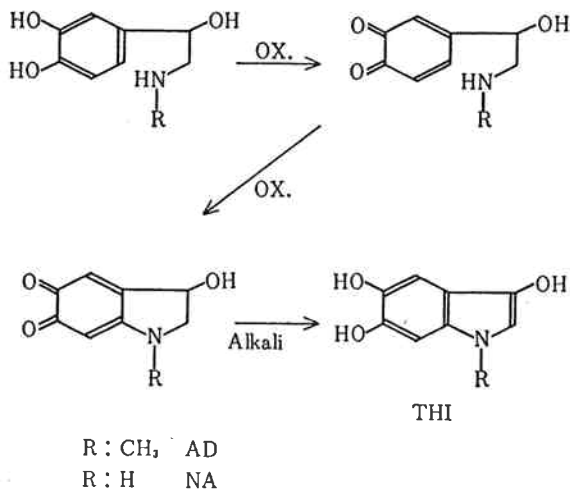


Fig. 8 Reaction process of catecholamine to THI

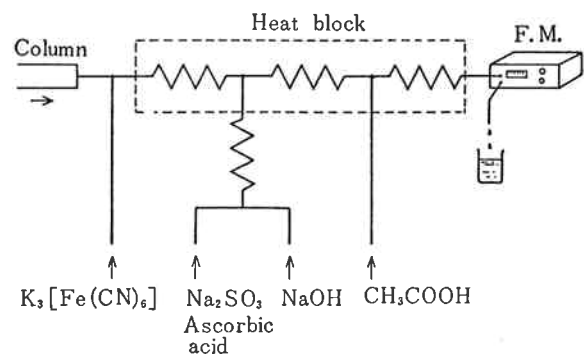


Fig. 9 Flow diagram of THI reactor

を成分に分離する溶液(B)が分析カラム中へ導入される。

こうしてCAは各成分に分離されて分析カラムから溶出され、ついでTHI反応器へと導かれる。反応器中でCAは酸化、転移、中和の各反応を経て、蛍光収量が最大であるトリヒドロキシインドール(THI)となる。Fig.8を参照されたい。また反応に要する試薬をFig.9に示しておく。形成されたTHIの濃度は蛍光検出器により検出され、電気信号に変換されて、データはCPUへと送られる。

HLC-825CAを用いて行う血中CAの測定方法などについて述べる。

◦血漿サンプルの製法⁶⁾

十分に注意して作った血漿に1/2体積の2.5%過塩素酸を加えて攪拌し、一昼夜冷凍保存(〜20°C)し、後に10,000g, 30分間で遠心解凍したものの上清を用いる。

◦データの定量

標準サンプルを測定すると、CPUはCA各成分のピークの面積を測定し記憶する。ついで実サンプルを測定すると、CPUは各成分のピークの面積を測定し、この面積と標準サンプルによる面積とを比較して、定量値として打ち出す。このときサンプルの希釈率を指定すると、数値には希釈率の補正が行われて打ち出される。CPUの指定により、ピーク高さ比較法でも以上のことは行い得る。

◦標準サンプル

標準サンプルは前述の目的に用いられるので、厳密に調整する必要がある。CAは化学的に不安定であり、中塩基性で、酸化されやすく、かつこの反応は短波長光下で、また重金属の存在で促進される。このため調整時には、しや光下、マスキング剤および還元剤の共存下で行う。また標準サンプルは毎日作り直す必要がある。固体の試薬としてフリーのアミンでなく、塩のものを用いる必要がある。

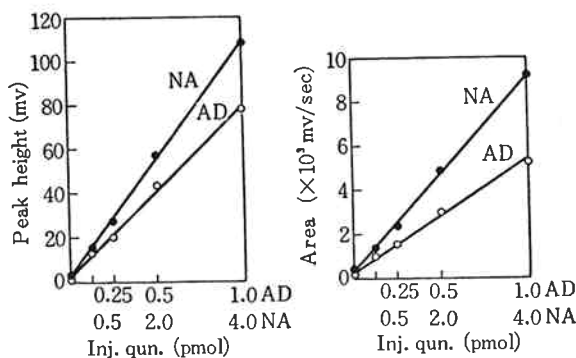


Fig.10 Calibration curves of catecholamine Comparison of peak height method and peak area method

◦標準検量曲線

人血中CA濃度附近におけるピーク高さ法とピーク面積法による標準検量曲線の比較をFig.10に示す。ADとNAの検出限界は各々0.05 pmol, 0.2 pmolである。また同一条件下ではDAのそれは25 pmol

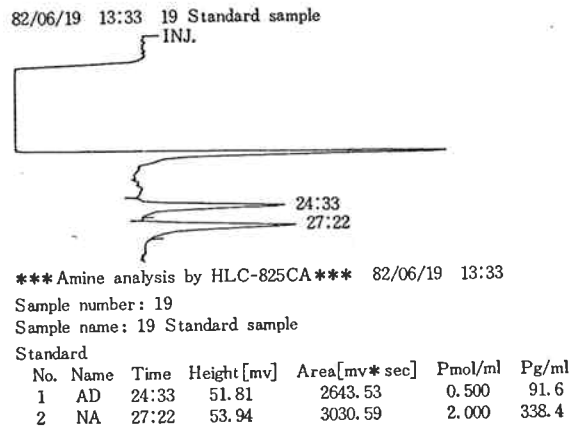


Fig.11 Chromatogram of standard sample

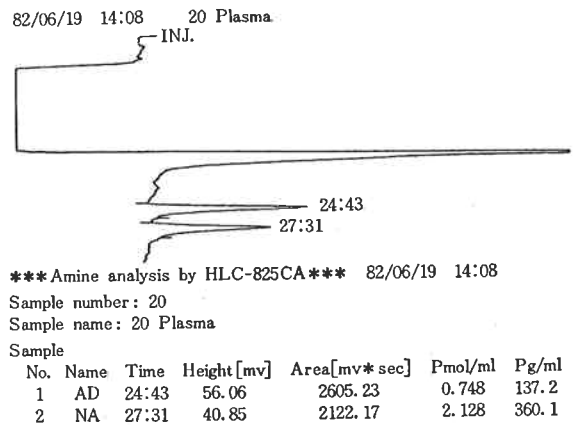


Fig.12 Chromatogram of catecholamine in deproteinized human plasma

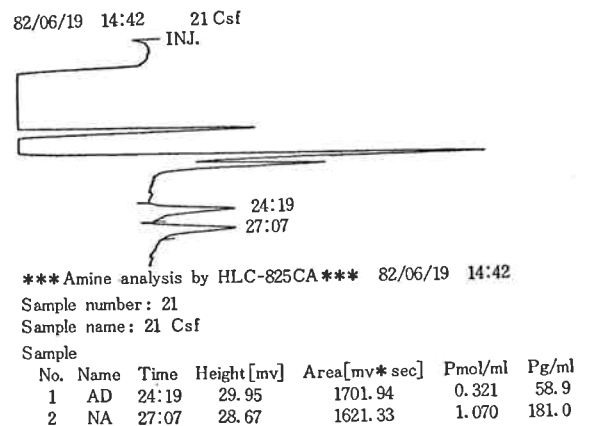


Fig.13 Chromatogram of catecholamine in human CSF

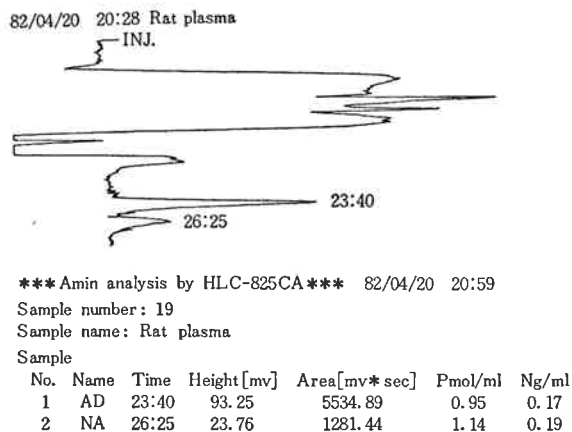


Fig.14 Chromatogram of catecholamine in deproteinized rat plasma (diluted 10 times)

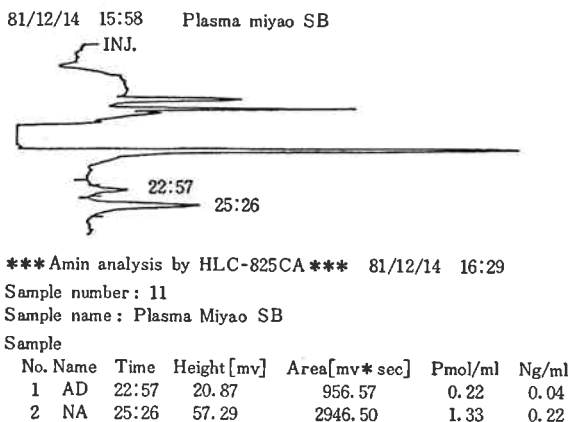
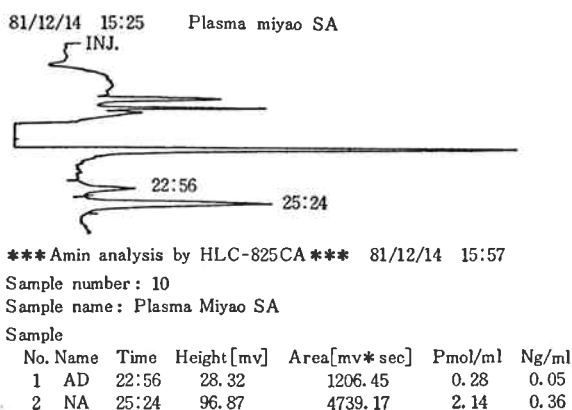


Fig.15 Comparison of catecholamine concentration in human plasma of "after a half mile running" and "before running"

程度である。しかし DA 最適条件にすると 5 pmol 程度である。

○測定例

Fig.11, 12 および13は各々、標準サンプル、除蛋白質血漿、脳脊髄液の測定例である。Fig.14 は10倍希釈した Rat の除蛋白質血漿の測定例である。Fig.15 は運動(800m 走)後と運動前に採取した血液による測定例であり、運動により血中の CA が増加したことを明確

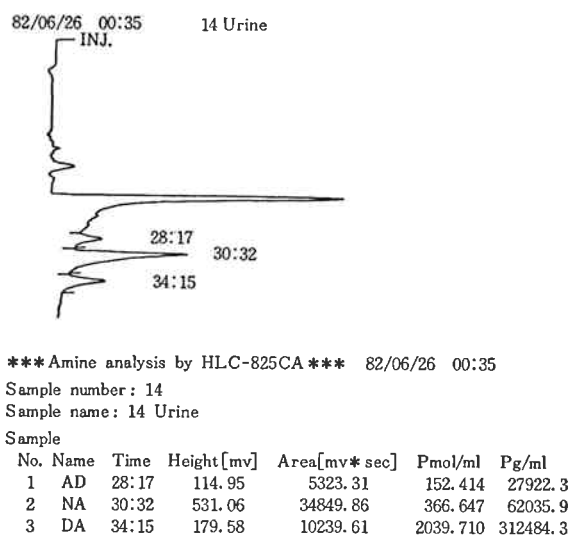
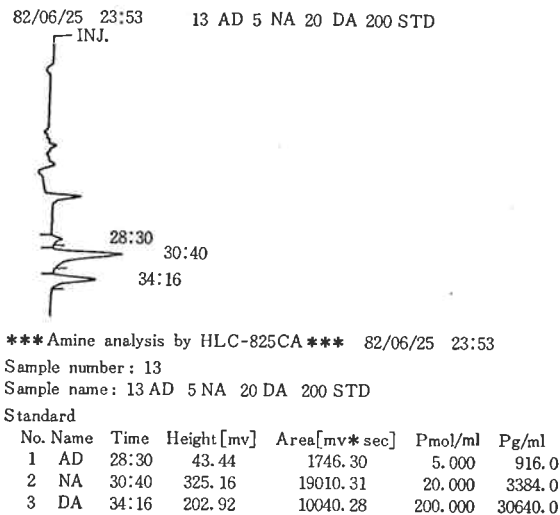


Fig.16 Chromatograms of catecholamine in standard sample and in human urine (diluted 10 times, 100 μl)

に示している。Fig.16 は10倍希釈した人尿 CA の測定例である。

4. 結 語

従来血中 CA の測定には試料の前処理が主な障害となっており、特にルーチン測定は困難であった。今回開発した HLC-825CA には、前処理を省略できるようにダブルカラムシステムを組み込み、さらに高感度蛍光検出器、オートサンプラ、データ処理・制御用 CPU も組み込んであり、DA を除く血中 CA のルーチン分析に極めて有効であり、生理学上および医学上意義あることと考えられる。

謝 辞

本装置の開発に際して、懇切なる指導をたまわった大

阪大学医学部, 大和谷厚博士並びに和田博教授に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) 西塚, 早石, 和田編; “アミノ酸代謝と生体アミン”, 生化学実験講座, 11(1977).
- 2) N. Kagihara, Y. Kobayashi; *Medicina*, 16, 1958 (1979).
- 3) 橋本, 丸山; “蛋白質・核酸・酵素”, 26, 1177(1981).
- 4) 中村, 杉本, 小宮, 山崎; *this journal*, 25, 43 (1981).
- 5) A. Yamatodani, H. Wada; *Clin. Chem.*, 27, 1983 (1981).
- 6) 大和田谷, 和田; “臨床医”, 8, 102 (1982).