

全自動カテコールアミン分析計HLC-725CA IIの開発

広	渡	祐	史
伊	藤	義	正
笠	井	正	信
高	橋	裕	明
林		秀	知佳

Development of the Automatic Catecholamine Analyzer HLC-725CA II

Yuji HIROWATARI
Yoshimasa ITO
Masanobu KASAI
Hiroaki TAKAHASHI
Hidechika HAYASHI

The new automatic catecholamine analyzer HLC-725CA II has been developed, which can determine the amounts of three catecholamines (norepinephrine, epinephrine and dopamine) in plasma and urine samples. The instrument features a column-switching system composed of two pretreatment columns and one separation column and a high-sensitive detection unit based on a post-column reaction using a fluorogenic reagent, 1,2-diphenylethyleneamine. This system is not influenced by the presence of therapeutic drugs and their metabolites in plasma and urine samples. The detection limits of norepinephrine, epinephrine and dopamine were 14, 8 and 11 fmol/mL, respectively, under the conditions of a signal-to-noise ratio 2.

1. はじめに

カテコールアミンは、アミノ酸であるL-チロシンからL-ドーパを経てドーパミン (DA)、ノルエピネフリン (NE)、エピネフリン (E) と生体内で順次生合成される生理活性アミンである。Eは主として副腎にて生合成され放出されるホルモンであり、生体恒常性維持に働き、NEは化学神経伝達物質として神経末端から放出され、神経細胞間の刺激伝達に重要な働きをしている。DAもまた脳の一部に局在し、化学神経伝達物質としての役割をになっている。

血中、尿中のカテコールアミンの測定は、褐色芽細

胞腫、神経芽細胞腫の診断に重要であることが知られている^{1), 2)}。また、原発性アルドステロン症、本態性高血圧、腎血管性高血圧症、甲状腺疾患、糖尿病、うっ血性心不全などの各種疾患で病態生理上の知見が報告されている³⁾。腎機能⁴⁾、ストレス⁵⁾の指標としても用いられている。

従来、カテコールアミンの測定には、東ソー全自動カテコールアミン分析計HLC-725CA (以下HLC-725CA) が多く使用されているが、投与薬物が測定に影響を与えること^{6), 7)}、血中ドーパミンの測定については検出感度が十分ではないこと⁸⁾が報告されている。われわれは、これらの点を改良した東ソー全自動

カテコールアミン分析計HLC-725CA II（以下HLC-725CA II）を開発したので報告する。

2. 装置概要

装置構成をFig. 2に示す。構成は、オートサンプラ、送液部（溶離液、脱気装置、切替弁、ポンプ）、カラムスイッチング部（カラムオープン、モーターバルブユニット）、検出部（蛍光検出器、リアクタ）、コントローラからなる。

〔1〕 送液部、オートサンプラ

送液部としては、流量安定性の高い3台のポンプ

（1連ポンプ2台、2連ポンプ1台）を搭載した。流量安定性の高いポンプを用いることは、クロマトグラムのベースラインのノイズレベルが軽減され、高感度化に寄与する。溶離液、反応液は脱気装置により溶存する気体成分を除去し、それぞれのポンプに導く。1検体分析終了ごとに、切替弁によりポンプ1、2に流れる溶離液を溶離液A II、溶離液C IIから、カラム洗浄液である溶離液B IIに切り換え、自動的にすべてのカラムを洗浄する。1検体分析終了ごとにカラムを洗浄することにより、次の分析開始時にカラム中に夾雑物質が残存しないようにし、良好な測定を行えるよう

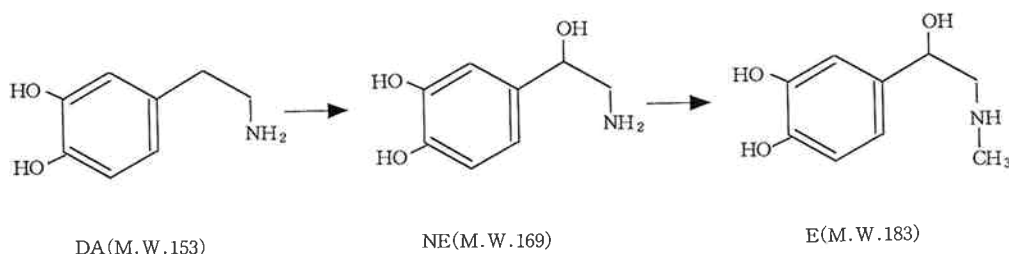


Fig. 1 Structures of catecholamines.

E : epinephrine
NE : norepinephrine
DA : dopamine
M.W. : molecular weight

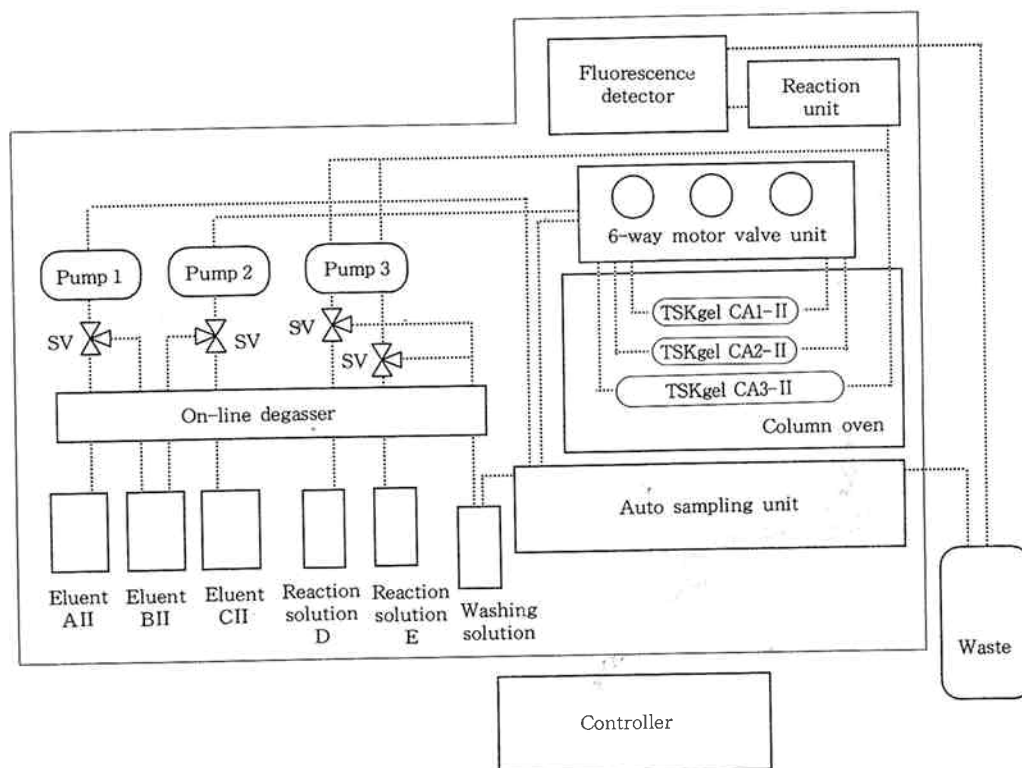


Fig. 2 Block diagram of HLC-725CA II.

SV : 3-way solenoid valve

にした。オートサンプラには、検体の劣化を防ぐための電子冷却機構を搭載した。

〔2〕 カラムスイッチング部

カラムスイッチング部は3本のカラム（前処理カラム2本、分析カラム1本）とモーターバルブ3個からなる。モーターバルブにより流路を切り替えながら、共雑物質を除去する前処理工程、分析カラムによる分離工程を自動的に進行。

〔3〕 検出部

分析カラムにより、各カテコールアミンを分離後、カテコールアミンに選択性の高いラベル試薬ジフェニルエチレンジアミン（DPE）を含んだ反応液と混合しリアクタで加熱することにより、カテコールアミンを蛍光誘導体化する。生成された蛍光物質を蛍光検出器により測定する。蛍光検出器の光源（キセノンランプ）のランプハウジングを2重構造にし、その間にキセノンランプを冷却するための空気を流すことにより、ランプ表面の雰囲気安定させ光源強度の揺らぎを最低限に押さえた（Fig. 3）。光源強度が安定することは、クロマトグラムのベースラインのノイズレベルを軽減させ、高感度化に寄与する。

〔4〕 コントローラ

コントローラとしては、パーソナルコンピュータを用いた。測定結果については、クロマトグラムだけでなく、ポンプの圧力変動、カラムオープン温度、リアクタ温度、すべてのデータが保存され、1検体ごと分

析時における各ユニットの状態が確認出来る。また、再検、再計算の必要性の診断をそのクロマトグラム形状の確認による場合があるが、1画面に12検体のクロマトグラムを同時に表示する機能を持ち、確認作業の効率化が計れる。外部送信の機能も有している。

3. 測定原理

3本のカラム（前処理カラム2本、分析カラム1本）を用いたカラムスイッチングシステムを用いている。分析カラムで各カテコールアミンを分離した後、DPEと反応させ、その反応生成物を蛍光検出により測定する^{6), 9)}。

まず、測定試料は弱逆相カラムである1番目の前処理カラム（TSKgel CA1-II）に導入され、カテコールアミンを含む疎水性成分が吸着され、水溶性成分が除去される（ステップ1）。次に、カテコールアミンなどの主成分が陽イオン交換カラムである2番目の前処理カラム（TSKgel CA2-II）に導入され、吸着される。カテコールアミンより疎水性の高い成分は、TSKgel CA1-IIに保持される（ステップ2）。カラムスイッチングにより流路を切り替え、TSKgel CA1-IIをポンプ1の流路からはずす。TSKgel CA2-IIを洗浄し、陰イオン成分を除去する（ステップ3）。さらに、TSKgel CA2-IIに吸着されたカテコールアミン成分を、逆相系の分析カラム（TSKgel CA3-II）に導入し、各カテコールアミンに分離する（ステップ

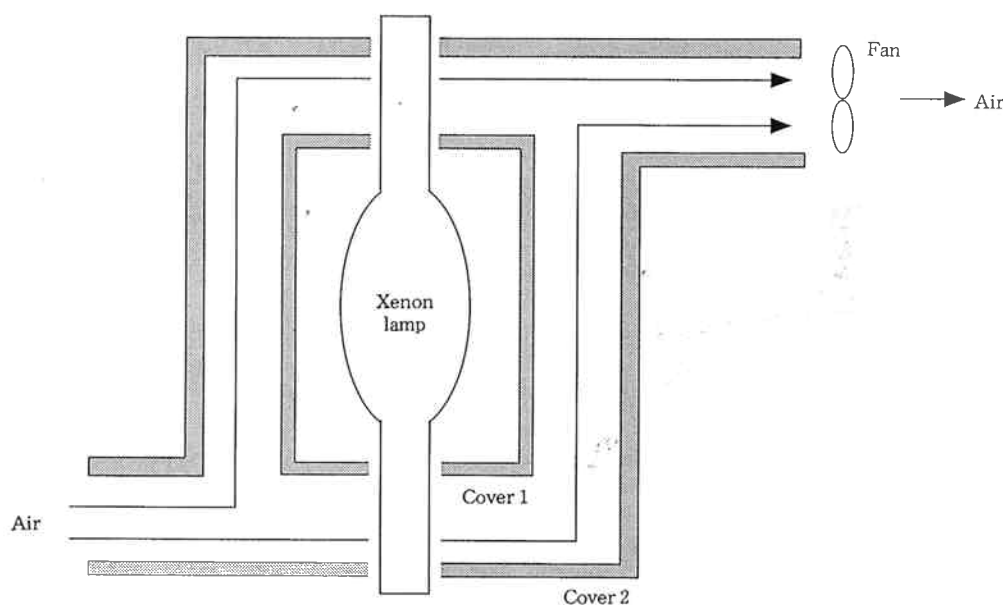


Fig. 3 Structure of the xenon lamp housing.

4)。TSKgel CA3-IIにより分離した後、DPEと酸化剤としてフェリシアネートイオンの存在化で加熱され、速やかにポストラベル化反応を行う（ステップ5）。反応生成物は励起極大波長340nm付近に、蛍光極大波長470nm付近に持つ蛍光物質であり^{10), 11)}、蛍光検出器により測定される。Fig. 4に測定原理の概要をステップごとに示した。

4. 結果

〔1〕 測定試料

標準試料は、カテコールアミン標準液A（片山化学工業株式会社）を希釈液で希釈し、各濃度に調整し用いた。カテコールアミン標準液Aは、NE、E、DAが各10mmol/L濃度含まれている。希釈液は、アスコ

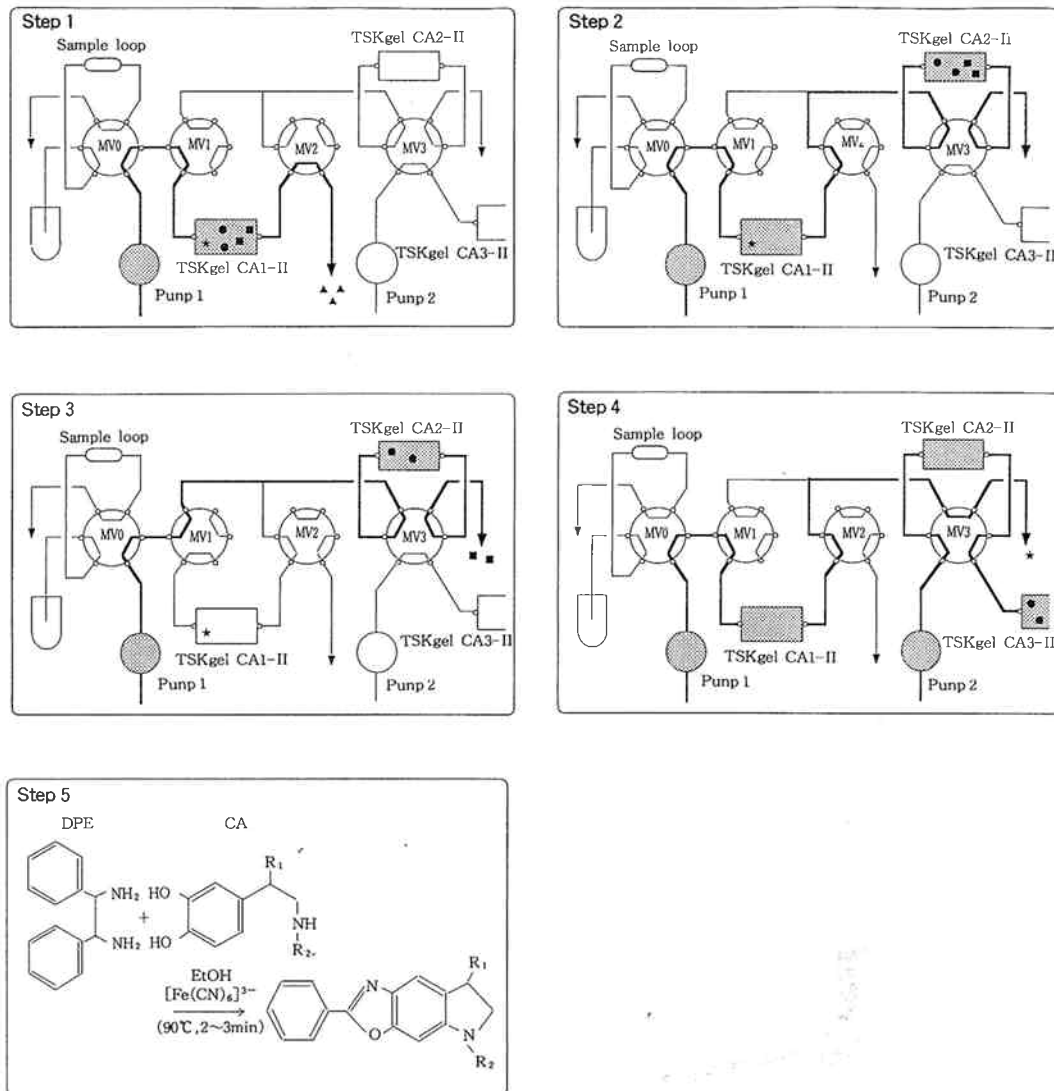


Fig. 4 Schematic diagram of the column-switching system of HLC-725CA II.

- : catecholamines
- ▲ : water soluble components
- : anionic components
- ★ : high hydrophobic components
- DPE : 1,2-diphenylethylenediamine
- CA : catecholamines
- MV : 6-way motor valve

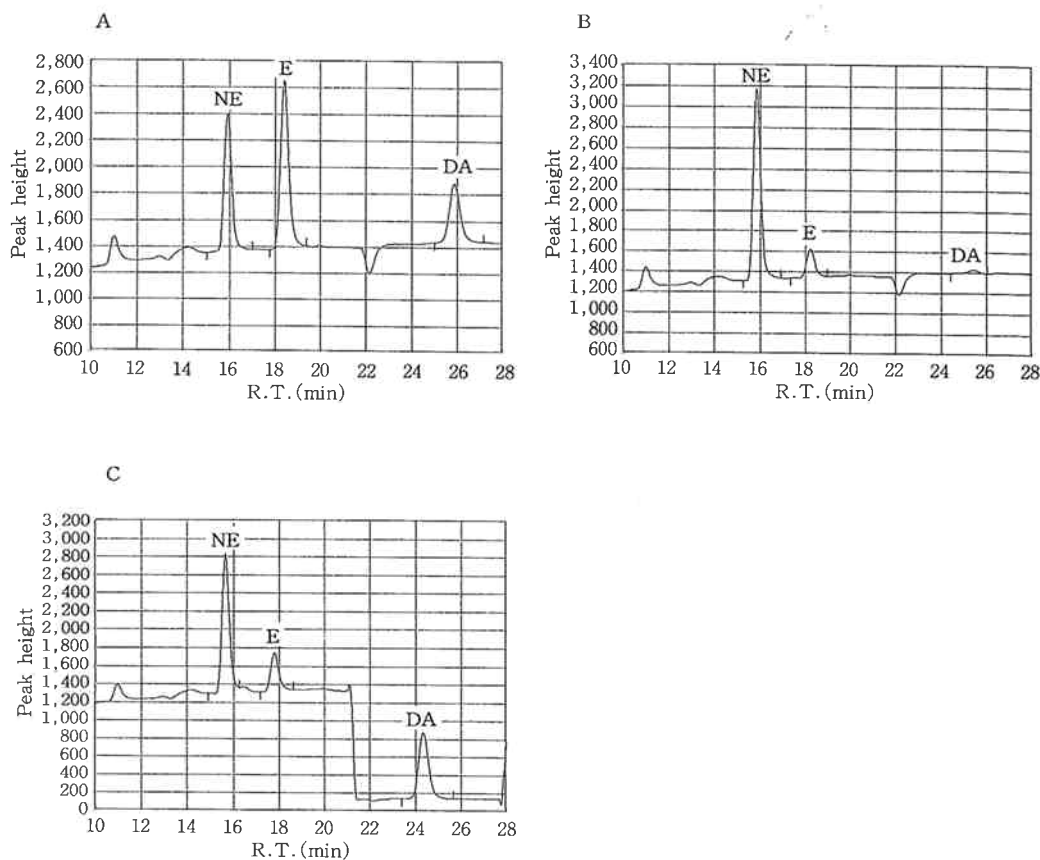


Fig. 5 Chromatograms produced by HLC-725CA II.

A : standard solution (1pmol/mL)
 B : plasma for a healthy person
 C : urine for a healthy person
 R.T. : retention time

ルビン酸0.19g、EDTA2Na0.38g、60%過塩素酸溶液34mLを精製水1Lに溶解し作成した。

血漿は、600 μLに対して除蛋白液（6%過塩素酸溶液）を300 μL加え攪拌後、pH調整液（1.5mol/mL酢酸ナトリウム溶液）を120 μL加え、遠心分離し上清を測定試料とした。

尿は、塩酸を添加し酸性状態で加熱処理（100℃、30分）を行った後、標準試料調製時に用いたものと同じ希釈液により500倍希釈し測定試料とした。

〔2〕 カラム、試薬

カラム：TSK Catechol column Set II (TSKgel CA1-II、TSKgel CA2-II、TSKgel CA3-II各1本)
 試薬：溶離液A II、溶離液B II、溶離液C II、CAテスト「TOSOH」反応試薬D、CAテスト「TOSOH」反応液E

〔3〕 標準クロマトの測定例

1 pmol/mL標準試料、健常人の血漿、尿について、

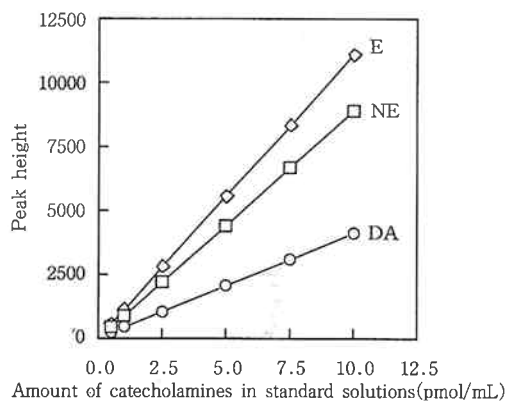


Fig. 6 Relationship between the peak height of the fluorescence intensity and the amount of catecholamines in standard solutions.

NE : norepinephrine
 E : epinephrine
 DA : dopamine

測定例をFig. 5に示す。すべてにおいて良好なクロマトグラムが得られた。尿については、DAの測定レンジを自動的に10分の1に切り替える機能が付いており、DAのレンジオーバーによる再測定を防ぐことが出来る。

〔4〕 検出感度

標準試料を段階的に希釈し測定を行い、各カテコールアミンピークのシグナルレベルとベースラインノイズレベル比SN=2の時の、NE, E, DAそれぞれの濃度を確認した。NE, E, DAそれぞれ、14fmol/mL、8fmol/mL、11fmol/mLであった。また、従来機種(HLC-725CA)におけるSN=2の時の、NE, E, DAそれぞれの濃度は、59fmol/mL、34fmol/mL、60fmol/mLであった。感度は約5倍向上したことになる。

〔5〕 再現性試験

1 pmol/mL標準試料、健常人の血漿、尿について、同時再現性試験を行った。変動係数(C.V.)は0.17~1.20%と良好な再現性が得られた(Table 1)。

〔6〕 希釈直線性試験

標準試料を0~10pmol/mLに調整し、直線性を調べた。良好な直線性を示した(Fig. 6)。

〔7〕 相関試験

従来機種(HLC-725CA)において投与薬剤の影響の確認されなかった血漿56検体、尿63検体について、相関試験を行った。血漿についての、NE, E, DAそれぞれの相関式、相関係数は、 $y=0.996x+0.006$ $r=0.999$, $y=0.991x-0.001$ $r=0.997$, $y=0.952x+0.002$ $r=0.962$ と良好な結果が得られた(Fig. 7)。尿についての、NE, E, DAそれぞれの相関式、相

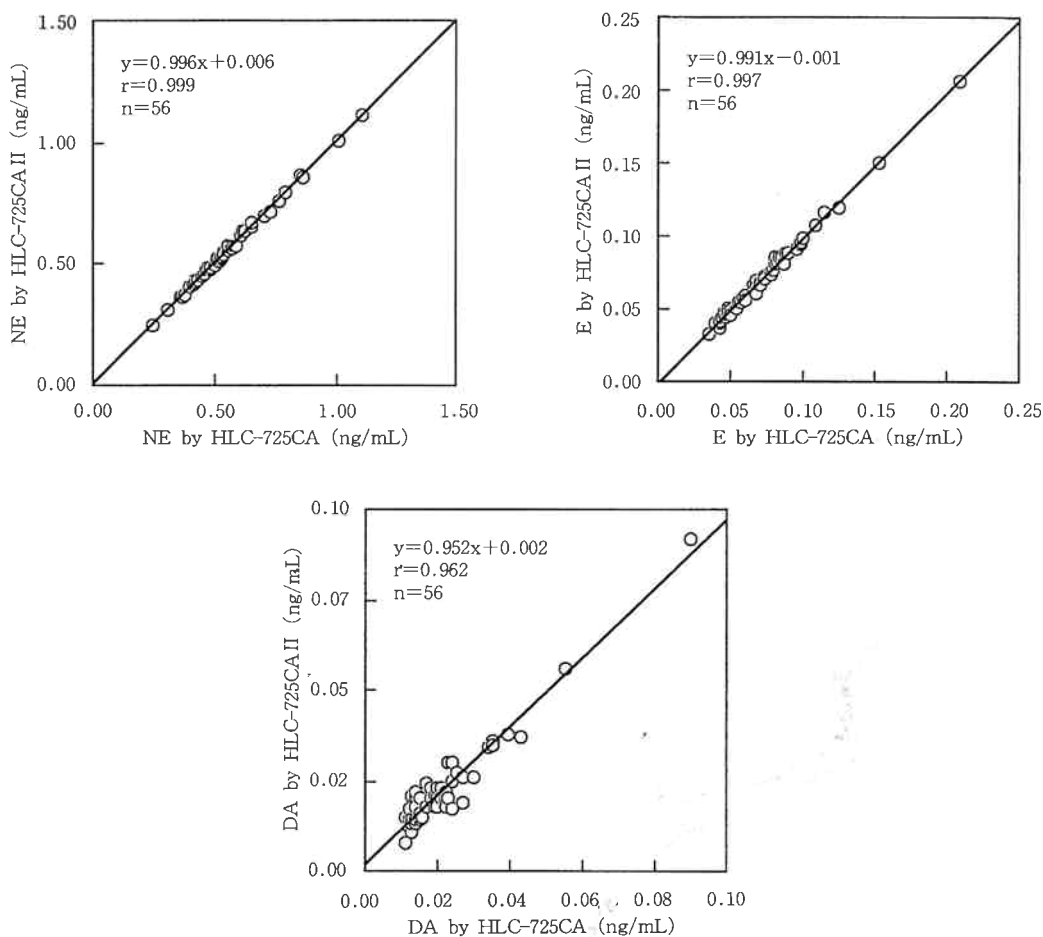


Fig. 7 Correlation of catecholamine concentrations measured by HLC-725CA and HLC-725CAII for 56 plasma samples.

NE : norepinephrine
E : epinephrine
DA : dopamine

Table 1 Reproducibility of 10 consecutive catecholamine measurements by HLC-725CAII

		N	Mean (pmol/mL)	S.D. (pmol/mL)	C.V. (%)
Norepinephrine	Standard solution	10	0.99	0.00	0.34
	Plasma	10	3.27	0.01	0.17
	Urine	10	81.65	0.31	0.38
Epinephrine	Standard solution	10	0.99	0.00	0.38
	Plasma	10	0.38	0.00	0.62
	Urine	10	15.16	0.11	0.71
Dopamine	Standard solution	10	0.99	0.01	0.66
	Plasma	10	0.16	0.00	1.20
	Urine	10	609.17	2.23	0.37

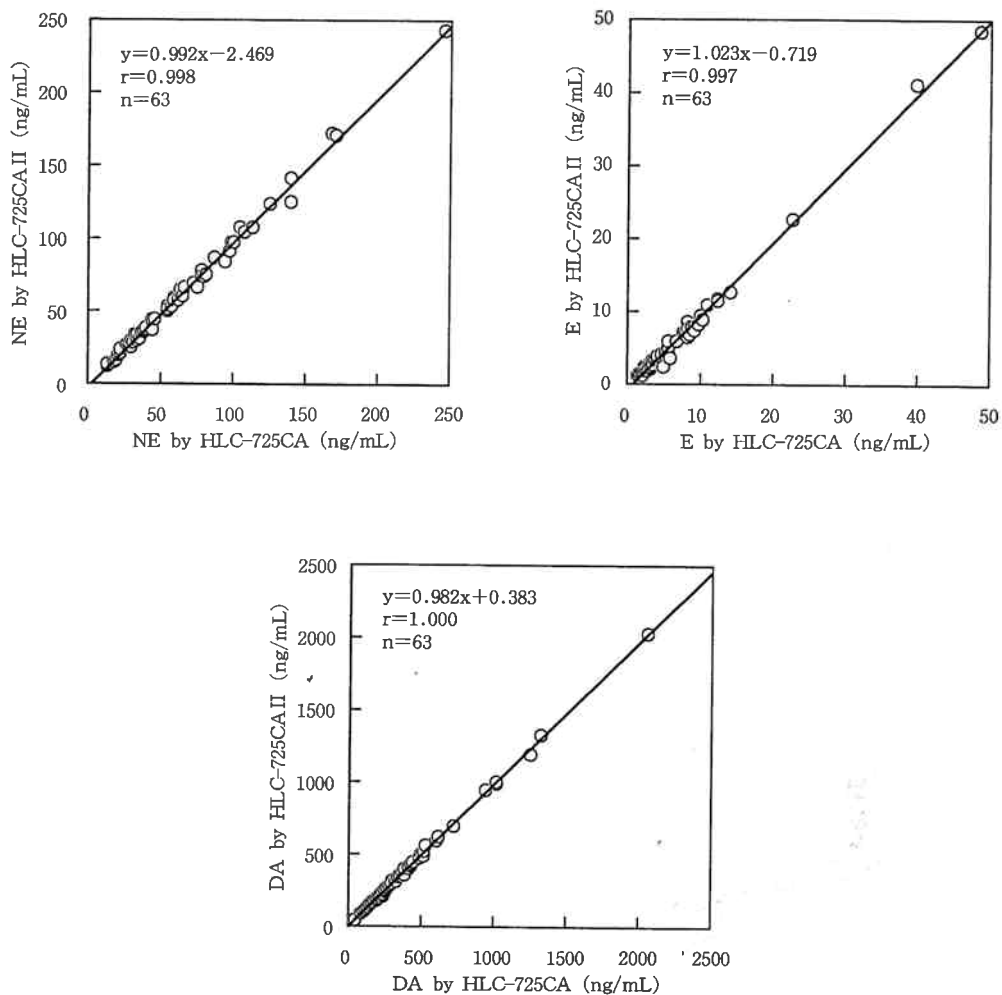


Fig. 8 Correlation of catecholamine concentrations measured by HLC-725CA and HLC-725CAII for 63 urine samples.

NE : norepinephrine
 E : epinephrine
 DA : dopamine

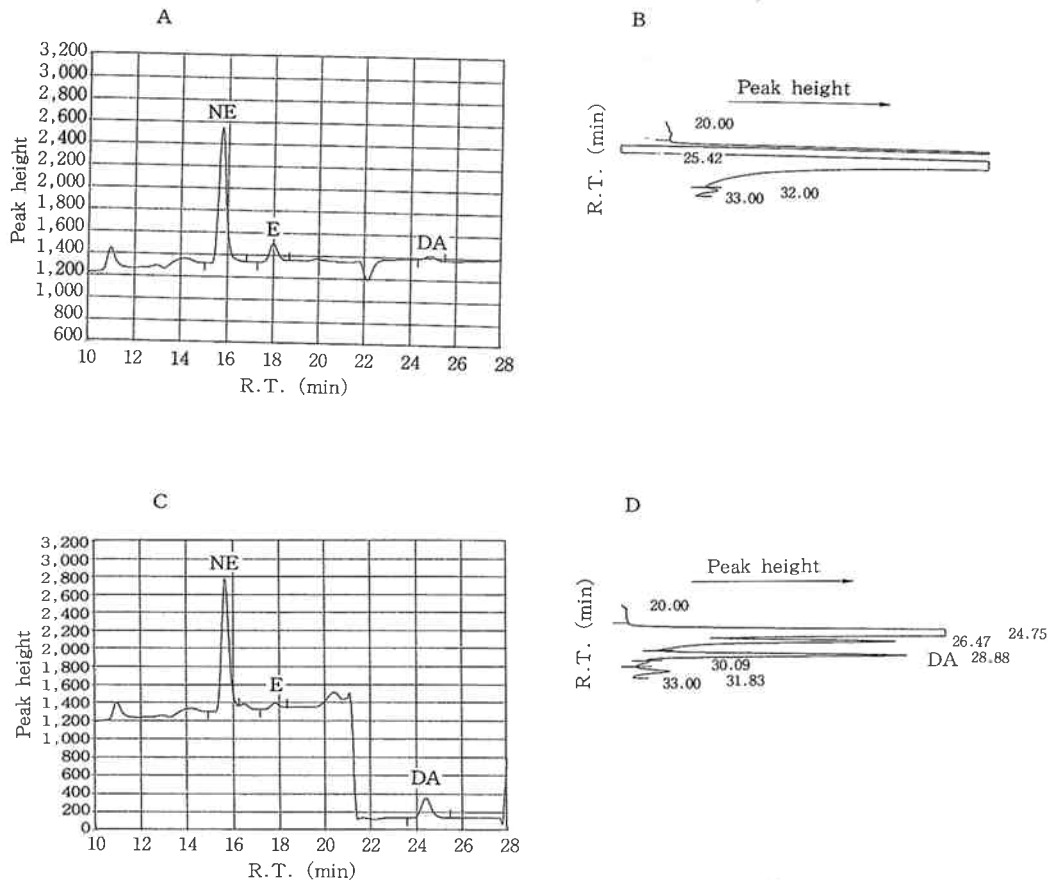


Fig. 9 Chromatograms of patient samples produced by HLC-725CA and HLC-725CA II.

- A: pattern of plasma for patient produced by HLC-725CA II
 B: pattern of plasma for patient produced by HLC-725CA
 C: pattern of urine for patient produced by HLC-725CA II
 D: pattern of urine for patient produced by HLC-725CA
 R.T.: retention time

関係数も、 $y=0.992x-2.469$ $r=0.998$ 、 $y=1.023x-0.719$ $r=0.997$ 、 $y=0.982x+0.383$ $r=1.000$ と良好な結果が得られた (Fig. 8)。

〔8〕 薬物干渉検体の測定

従来機種 (HLC-725CA) で投与薬物の影響を受け良好に測定が出来なかった血漿190検体、尿40検体について、HLC-725CA IIで測定を行った。すべてについて、良好な測定結果が得られた。血漿、尿それぞれ1例をFig. 9に示す。血漿例では、HLC-725CA IIにおいては、NE、E、DAすべて良好な測定結果 (クロマトグラム) が得られたが、従来機種 (HLC-725CA) では、異常なピークが見られNE、E、DAすべてに影響をおよぼしている。尿例では、HLC-725CA IIにおいては、良好な測定結果 (クロマトグラム) が得られたが、従来機種 (HLC-725CA) では、E、NEの溶出位置に異常なピークが見られた。

5. まとめ

我々は、カラムスイッチングおよび高感度なラベル試薬DPEを用いた蛍光検出系を測定原理としたカテコールアミンを測定する専用装置HLC-725CA IIを開発した。流量安定性の高いポンプの採用、蛍光検出器のキセノンランプハウジング構造の改良による光源強度の安定化により、検出感度は従来機種 (HLC-725CA) と比較し約5倍向上した。従来機種では感度以下になる場合が多く見られた、健常人の安静時の血漿中DAについても十分定量出来ると考えられる。

カラムスイッチング条件については、1番目の弱逆相系前処理カラム (TSKgel CA1-II) で吸着したカテコールアミン成分より疎水性の強い成分を2番目の陽イオン交換系前処理カラム (TSKgel CA2-II) に導入しない工程を、従来機種の条件に追加した。また、

溶離液の組成、カラムサイズなどについても、試料中の投与薬物などの夾雑物質の影響が測定結果におよぼさないよう改良を加えた。これらの結果として、従来機種で投与薬物の影響を受けることが確認された血漿、尿ともに、本開発機種HLC-725CA IIでは良好な測定が可能となった。

また、データ処理、波形処理のプログラムも充実している。さらに、従来機種では、尿試料を測定する際の希釈率をDAに合わせるとNE, Eが感度不足となり、NE, Eに合わせるとDAがスケールオーバーとなる点が、ルーチン検査において問題となっていた。HLC-725CA IIでは尿試料測定においてドーパミン測定時間に感度を自動的に10分の1に下げる機能を追加することにより解決している。

本開発機種HLC-725CA IIは、大病院、検査センターだけでなく製薬会社などのさまざまな研究所で広く使用されると考えられる。

文 献

- 1) 中井利昭；臨床検査（増刊号）、38, 146-147 (1994)
- 2) 中井利昭、山田津爾；臨床検査、25, 1174-1176

(1981)

- 3) 大石誠一、梅田照久、佐藤辰男；総合臨床（増刊号）、27, 2364-2368 (1978)
- 4) 小森敏明、吉村 學、井上弘史、鈴木紘一、安村忠樹、森村武利；臨床病理、44, 477-482 (1996)
- 5) 藤原 晨；Reports of the Institute for Medical and Dental Engineering, 30, 31-36 (1996)
- 6) 辻潮、中西豊文、中井一吉、塩見寿太郎、船橋修之；臨床検査機器・試薬、11, 635-641 (1988)
- 7) 広渡祐史、坪井基宏、富樫理美；東ソー研究報告、40, 59-64 (1996)
- 8) 山中茂雄、雑賀光一、小松 豊、西森康悦、島巻みゆき、小倉克己、西田政明、影岡武士、佐々木匡秀；臨床検査機器・試薬、18, 665-674 (1995)
- 9) M.Yoshimura, T.Komori, T.Nakanishi and H.Takahashi；*Ann. Clin. Biochem.*, 30, 135-141 (1993)
- 10) H.Nohta, A.Mitsui and Y.Ohkura, *Analytica. Chimica. Acta.*, 165, 171-176 (1984)
- 11) H.Nohta, M.-K.Lee and Y.Ohkura；*Anal. Chim. Acta.*, 267, 137-139 (1992)



著 者

氏名 広 渡 祐 史
Yuji HIROWATARI
入社 昭和61年4月1日
所属 科学計測事業部
開発部



著 者

氏名 伊 藤 義 正
Yoshimasa ITO
入社 平成元年3月16日
所属 科学計測事業部
技術サービス部



著 者

氏名 笠 井 正 信
Masanobu KASAI
入社 平成元年4月1日
所属 科学計測事業部
開発部



著 者

氏名 高 橋 裕 明
Hiroaki TAKAHASHI
入社 昭和57年12月1日
所属 環境テクノ株式会社出向
営業本部



著 者

氏名 林 秀 知 佳
Hidechika HAYASHI
入社 昭和54年10月1日
所属 科学計測事業部
開発部