

カテコールアミン代謝に関する 基礎的ならびに臨床的研究

第 I 編

ガスクロマトグラフィー (ECD) 法による組織、血液、尿および 髄液中のカテコールアミン類の測定法についての研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門 (主任：高坂睦年教授)

岸 川 秀 実

[昭和50年3月18日受稿]

第1章 緒 言

最近種々の中枢神経系および精神科領域の疾患に対しカテコールアミン代謝の面より病態生化学的に病因を追求する試みが多く、注目を集めているが、これはカテコールアミン測定技術の進歩に負うところが多い。

カテコールアミンの測定法としては、現在まで(1)生物学的定量法^{1) 2) 3) 4)}(2)比色定量法(これには沃度法⁵⁾、磷タングステン酸法⁶⁾、arsenomolybdate 法^{7) 8)}などがある)、(3)蛍光法 (THI 法^{9) 10) 11)} ED 法^{12) 13)} など)、(4)ガスクロマトグラフィー法^{14) 15) 16)}などが代表的な方法である。現在、生物学的定量法および比色定量法は、定量的方法としてはほとんど使われなく、蛍光法がもっぱら使われている。しかし蛍光法においても微量定量分析には限度があり、測定誤差が大きいなどの欠点があり、微量定量分析が正確にできる新しい方法が要求され、最近ガスクロマトグラフィー法による定量法が出現したわけである。なかでも電子捕獲検出器 (Electron Capture Detector : ECD) を用いる方法が注目されてきた。

ガスクロマトグラフィー (ECD) を用いると(1)試料の分析定量が0.1 nanogram 単位以下まで測定可能である、(2)代謝物および多成分系混合物を同時にグラフ分析的に表現できる、(3)適用される試料範囲が広い、(4)少量の試料でよい、などの利点があげられる。歴史的には、1962年 Fales ら¹⁷⁾によって tryptamine 系、phenethylamine 系、tyramine 系などの生理学的活性アミンのガスクロマトグラフィーによる測

定法が報告され、1963年 Sen ら¹⁸⁾によってカテコールアミンに関する分析方法が発表された。しかしカテコールアミンの分離、感度の点で充分期待できる結果がえられなかった。1966年 Kawai ら¹⁹⁾は、ECD を使用してカテコールアミンの標準試料を分析し、続いて牛副腎髄質中のカテコールアミンのガスクロマトグラフィーによる分析に成功した^{20) 21)}さらに1970年代に入り脳組織、血清および尿についての分析が試みられるに至った^{14) 15) 22)}しかし定量性および回収率などについて改良の余地が残され、また試料の処理および実験操作過程が困難なため一般的普及には至らなかった。

髄液中のカテコールアミンの測定は、1973年 Papavasiliou ら²³⁾がパーキンソン病患者に多量の L-DOPA を服用させ蛍光法で DOPA および dopamine 濃度を測定しているが、その他のカテコールアミン類の測定の報告は見られていない。また現在までガスクロマトグラフィー (ECD) によって髄液中のカテコールアミン類を系統的に測定した報告はない。中枢神経系および精神科領域の疾患を病態生化学的に研究するためには、試料として直接的に脳組織の変化を検査するのが不可能であるので、髄液中の生化学的变化を検討するのが望ましいと考えられる。

本論文では、組織、尿および血清中の生体試料におけるカテコールアミン類の測定を従来の方法に改良を加えてガスクロマトグラフィー (ECD) 法で行い、また髄液中のカテコールアミン類の測定も同様にガスクロマトグラフィー (ECD) 法を用いて行い、うよう考案したので報告する。

第2章 方 法

第1節 生体試料の採集および保存方法

1) 組 織

マウスおよびラットなどの小動物の場合は、部位別分離摘出の場合を除き、直接に動物を液体窒素に落とし込み瞬間固定を行った後、分析しようとする組織を取り出した。ネコなど比較的大きい動物の場合、特に脳組織の場合には、各部位別に分離摘出する機会が多く、著者は、摘出時のカテコールアミンの変動をできるだけ少なくするために冷却生理食塩水(0℃)で脳内を急速灌流した後、冷却固定された脳をすばやく分離摘出する方法をとった。²⁴⁾摘出した組織片は試料処理開始まで液体窒素につけ保存した。

2) 血 液

マウスおよびラットなどの小動物における採血は、心臓穿刺によって行った。ネコの場合は、股静脈より採血した。

ヒトよりの採血は、原則として空腹安静の状態で午前9～10時に行った。

採血量は、動物およびヒトともに約7～10 mlである。なお最低必要量は、血清にして2.5 mlであった。採集した血液は、ポリシリコン樹脂製の遠心管に移し、氷で30分間冷やした後、0℃、3000 g、8分で血清を分離した。血清は、次の処理実験を開始しない限り、血清分離後すぐに液体窒素固定をして保存した。

3) 尿

朝8時から翌朝8時までの24時間尿を1日尿とした。1日尿採集直後、塩酸で酸性(pH1～2)にし、必要量を-20℃以下に保存した。夏期などの尿の腐敗しやすい季節における蓄尿には、ペニシリン20万単位をあらかじめ蓄尿瓶に投入して防腐した。ペニシリン投入を行ってもカテコールアミン値には、影響を及ぼさなかった。

4) 髄 液

ヒトの髄液中のカテコールアミン類の測定を行った。髄液は、中枢神経系および精神神経科領域の疾患のない虫垂炎(38例)および下肢骨折(2例)の患者40例(男性23例、女性17例、年齢10～55才(平均33才))について協力を依頼し手術前の腰椎麻酔時における腰椎穿刺の時、採集した。

採集した髄液は、直ちにポリシリコン樹脂製の遠心管に移し、氷で冷却した。液体窒素による保存ができない場合は、直ちに0.4N過塩素酸を加え、処理

操作を開始した。測定可能な最低必要量は3.0 mlであった。

第2節 測定法

生体試料におけるカテコールアミン類の測定は、次に述べるように大きく分けて5段階の操作過程に分けられる。すなわち、第一の段階は試料の除蛋白、脱脂の過程および加水分解の過程である。第二の段階は、カテコールアミンのアルミナへの吸着である。カテコールアミンのメチル化合物である metanephrine, normetanephrine などについては、イオン交換樹脂を用いた。第三の段階は、カテコールアミンのアルミナからの溶出過程、第四の段階は、トリフルオロアセチル化(TFA化)である。最後に第五の段階としてガスクロマトグラフィーである。

1) 試料の除蛋白および脱脂

脳組織の場合、まず0～2℃に冷却した0.4N過塩素酸を脳組織1 gにつき20 ml加え、ガラスホモゲナイザーに入れ、コールドルーム(1～2℃)中でホモゲナイズした。その後、0℃、13,000 g、10分間遠心分離を行い、上清を別の試験管にとり、残渣を再度0.4N過塩素酸10 mlで洗い、0℃、12,000 g、5分間遠心分離を行った後、上清をとり、最初の上清と合せた。この除蛋白された上清に0℃に冷却した ether-benzene (溶積比で5:2)を上清液量と同容積量を加え振盪器(KM式万能シェーカー:KKイワキ、東京)で約300 rpm、1分間振盪すると、有機層と水層の境界面に不溶物を析出する。水層をカテラン針(#18)をつけた注射器で不溶物を吸引しないように注意して吸い取る。この脱脂まで終了した抽出液は、50 ml ビーカーに移し次の操作段階へ進める。

血清の場合、まず血清5.0 mlに対し0℃に冷却した0.4N過塩素酸10.0 mlを加え手で振ってよく攪拌した後、0℃、12,000 g、10分間遠心分離を行い上清液を別の試験管にとり、残渣を再度0.4N過塩素酸5.0 mlで洗い、0℃、12,000 g、5分間遠心分離を行った後、上清液をとり最初の上清液と合せる。脱脂は、ether-benzene を用いて脳組織の場合と同様な操作を行った。血漿の場合も、血清と同様な除蛋白および脱脂を行う。

髄液の場合、血清とほぼ同様な操作過程であるが、髄液5.0 mlに対し0.4N過塩素酸7.0 mlを加え遠心分離し、2回目の遠心分離には、0.4N過塩素酸5.0 mlで行った。

2) 加水分解

尿の場合は、加水分解を行う。すなわちろ紙（東洋ろ紙 No. 2）でろ過した尿30.0 mlを100℃、20分間、加水分解を行った後、次のカテコールアミン類のアルミナへの吸着過程に移る。

3) カテコールアミン類のアルミナへの吸着

脳組織、血清および髄液の除蛋白、脱脂の過程を終了した抽出液、尿の加水分解の過程を終了したものについて以下同様の操作を行う。

まず4 Nアンモニア水でpH5.5~6.0にした後すばやく酸性処理した活性アルミナを加え、ついで1 Nアンモニア水でpH8.4にし、7分間マグネティックスターラーで攪拌した。ついで5分間静かに放置するとアルミナは、底に沈澱する。上清液を捨て、沈澱したアルミナをガラスウールをつめたガラスカラム（内径9 mm、長さ30 cm）に冷却した約10 mlの蒸留水を流し3回洗う。なおアルミナの量は、組織および尿では2 g、血清および髄液では1.5 gを用いた。

4) カテコールアミン類のアルミナからの溶出過程

アルミナをガラスカラムにつめ込み洗滌した後0.2 N酢酸20.0 mlで溶出した。特に DOPA を選択的に溶出する場合は、0.25 N酢酸20.0 mlを用いた。溶出速度は、1.0 ml/分であった。この溶出液10.0 mlに0.1%アセチルアセトン（2~3滴加え、25 ml ナシ型コルベンに入れ、-50℃、約10時間、凍結乾燥（装置：ATMO-VAC. Refrigeration for Science Inc., Island, Park, N. Y.）した。

5) トリフルオロアセチル化（TFA化）

完全に凍結乾燥を行うと溶出液は、ナシ型コルベンの底に白色粉末となる。ついで酢酸エチル（クロマト用）0.05 mlを加えてこの試料を溶かした後、すばやくアンプル内に密封した無水トリフルオロ酢酸（trifluoroacetic anhydride）を1滴加えた。なお無水トリフルオロ酢酸を加えて発煙を生じた場合は、再度真空ポンプで吸引した後デシケーターに入れ、できる限り脱水を行い、再度酢酸エチルおよび無水トリフルオロ酢酸を加えた。その後ナシ型コルベンの口をパラフィルムで完全に密封し、45℃、10分間保温を行った。最後に内標準物質を含んだ n-hexane を1.0~3.0 ml加えた。内標準物質に関しては後述する。これらの前処理のうち溶出過程は、コールドルーム（1~2℃）で行い、トリフルオロアセチル化は、充分除湿のできた部屋で行った。またカテコールアミン類を含む液が接するすべてのガラス器具類

およびガラスウールなどは、シリコン処理を行った。

6) ガスクロマトグラフィー

内標準物質を含む n-hexane に溶かしたカテコールアミン類含有液の0.5~2.0 μlをガスクロマトグラフ装置に注入した。ガスクロマトグラフの装置は、ECDを用いた Yanaco G80（柳本製作所、京都）で記録計を付属している。ガスクロマトグラフィーの条件は表1に示した。充填剤の aging は、新しい充

表1

column	2% XF-1105 gas chrom P 225cm×3 mm glass column
column temperature	180℃
injection temperature	225℃
detector temperature	225℃
carrier gas	N ₂ 22.5ml/min N ₂ 1.4kg/cm ² N ₂ (purity: 99.999% over)
attenuation	1-1/1024
injection size	0.5-2.0 μl
instrument	Yanaco G 80-E (⁶³ Ni) (²⁸ Ni)

填剤を用いる場合は、最低48時間ガラスカラムの一方を検出器側よりはずしカラム温度195℃、N₂流速35.0 ml/分、N₂圧1.8kg/cm²で行った。その後カラムを検出器側に連結させ、さらに同条件で24時間以上agingを行った。連日ガスクロマトグラフを使用する場合は、試料注入後、同条件でagingを持続して使用した。

第3章 実験成績

第1節 保持時間の決定

カテコールアミンおよびその類縁の標準物質にお

表2 Retention time of catecholamines

catecholamines	absolute retention time (relative retention time)
Tyramine	3.6 (0.69) min.
Synephrine	3.7 (0.71)
DOPA	4.3 (0.83)
Epinephrine	5.2 (1.00)
Octopamine	5.7 (1.10)
Metanephrine	6.2 (1.19)
Dopamine	7.0 (1.35)
Norepinephrine	10.2 (1.96)
Normetanephrine	10.3 (1.98)

ける保持時間の決定の結果を表2に示した。表の()内に epinephrine を 1.00として相対保持時間 (relative retention time) を示した。図1に dopamine についての1例を示した。注入後2分以内に現れるピークは、トリフルオロアセチル化に用いた trifluoroacetic acid である。

第2節 内標準物質の決定

ECD による検出に感受性をもつハロゲン化合物の中から高純度の農薬を選び検討した。有機溶媒である n-hexane に可溶で融点を考慮して drin 剤である aldrin および dieldrin, benzene hexachloride (BHC) の α, δ 異性体, p, p' - dichlorodiphenyl-dichloroethane (DDE) および heptachlor epoxide を n-hexane に溶解し保持時間をしらべた。その結果を図2に示した。その結果、分析対象の諸カテコールアミンとオーバーラップすることなく、かつこれらと最も近くにピークを示す heptachlor epoxide (表1の同条件で保持時間は13.6分) が最も適当であることがわかった。その他、保持時間はやゝ長い、カテコールアミン類の分析の妨げにならない dieldrin も内標準物質として使用可能であることがわかった。

第3節 生体試料におけるカテコールアミン類の分析

1) 脳組織中のカテコールアミン

Internal Standard Substance

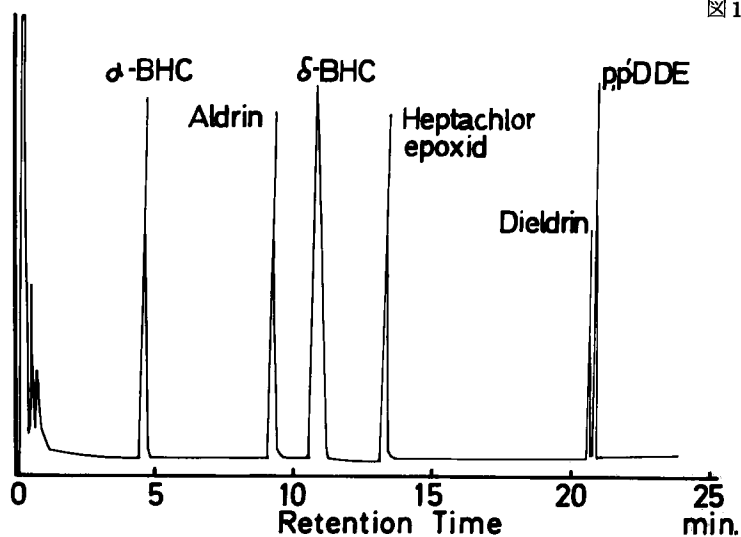


図2 Gas chromatography for several internal standard substances.

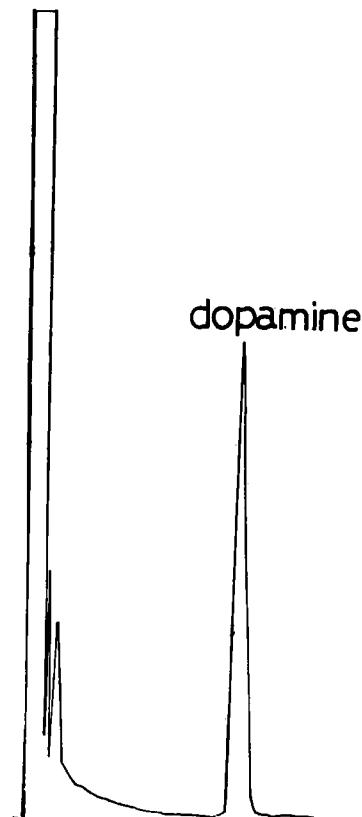


図1 Peak of dopamine. Absolute retention time of dopamine is 7.0 minutes. The conditions of gas chromatography are shown in table 1.

ラットおよびネコの脳組織の分析を行った。図3はラットの全脳 (whole brain) についての分析例であるが, dopamine および norepinephrine の明らかなピークが見られる。内標準物質は heptachlor epoxide で 1 ng 相当量である。なおラットの脳組織内には小ピークながら epinephrine (数 ng/g) も検出された。図4にネコの caudate nucleus における

クロマトグラフの1例を示した。norepinephrine のピークに比較して dopamine の高いピークが特徴的である。ラットの全脳およびネコの脳組織の各部位におけるカテコールアミンの測定結果を表3に示した。ラットの全脳におけると同様にネコの cortex にも epinephrine が検出された。ネコの全脳における dopamine 値と norepinephrine 値には有意の差を

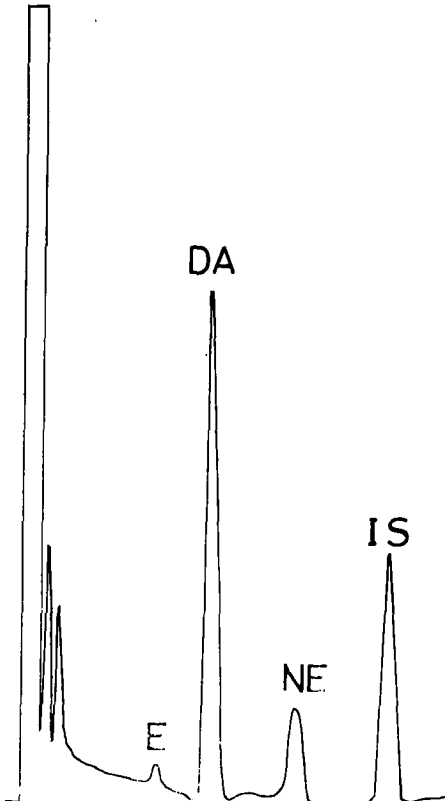


図3 Chromatography for catecholamines of rat brain tissues.

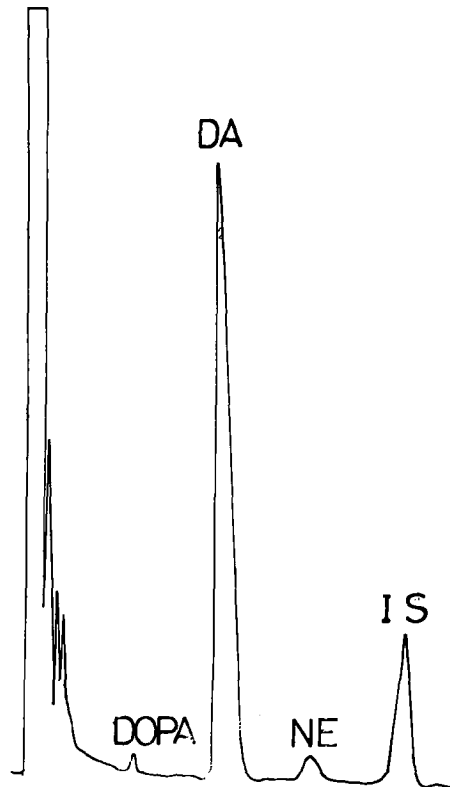


図4 Chromatography for catecholamines of cat caudate nucleus.

表3 Catecholamines in the brain (Rat, Cat)

	mean value $\pm$ S. D. ($\mu\text{g/g}$)		Epinephrine	No. of exp.
	Dopamine	Norepinephrine		
1. Rat (whole brain)	0.851 ± 0.197	0.163 ± 0.034	0.004 ± 0.002	n = 7
2. Cat whole brain	0.243 ± 0.081	0.254 ± 0.053	trace	n = 7
putamen	4.208 ± 0.855	0.164 ± 0.033	—	n = 7
pallidum	1.066 ± 0.247	0.082 ± 0.022	—	n = 7
thalamus	0.564 ± 0.167	0.181 ± 0.034	—	n = 7
caudate	4.359 ± 0.958	0.158 ± 0.055	—	n = 7
cortex	0.017 ± 0.002	0.021 ± 0.004	0.003 ± 0.002	n = 7

認めなかった。各部位別の測定によると putamen, pallidum, caudate nucleusでは cortex に比較し dopamine は明らかに高値を呈した。なお cortex では、他の部位と異って、norepinephrine の方が dopamine より高値を呈した。

脳組織中のガスクロマトグラフィーによるカテコ

ールアミン定量の回収率は、dopamine については 75~83%, norepinephrine については 70~79% であった。

2) 血清中のカテコールアミン

動物およびヒトについて測定した。ネコおよびヒトについての測定におけるクロマトグラフの 1 例を

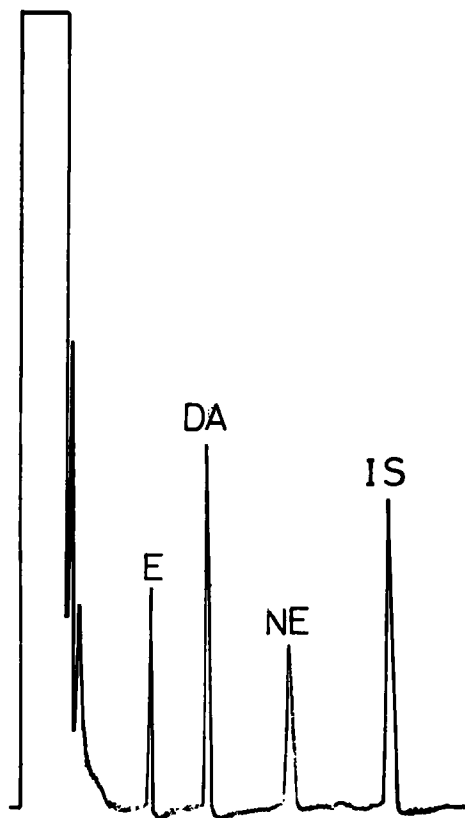


図5 Chromatography for catecholamines of cat serum.

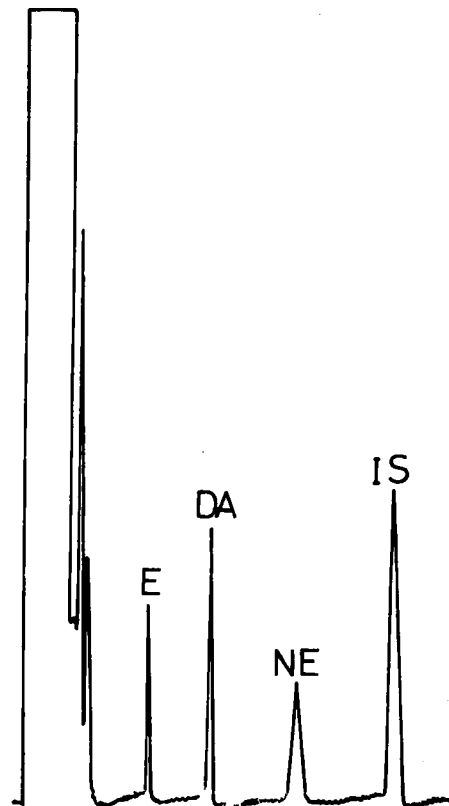


図6 Chromatography for catecholamines of human serum.

表4 Catecholamines in serum (Rat, Cat and Human)

	mean value $\pm$ S.D. (ng/ml)			DOPA	No. of exp.
	Dopamine	Norepinephrine	Epinephrine		
1. Rat	1.36 $\pm$ 0.79	3.23 $\pm$ 1.73	1.82 $\pm$ 1.02	—	n = 12
2. Cat	2.52 $\pm$ 0.34	3.25 $\pm$ 0.54	1.00 $\pm$ 0.76	trace	n = 7
3. Human*	(m) 1.21 $\pm$ 0.22	1.68 $\pm$ 0.90	0.77 $\pm$ 0.49	—	n = 11
	(f) 1.10 $\pm$ 0.31	1.70 $\pm$ 0.93	0.77 $\pm$ 0.37	—	n = 9
total	1.16 $\pm$ 0.25	1.69 $\pm$ 0.89	0.77 $\pm$ 0.43	—	n = 20

* Age-----male : 24-60 years old (average 33.8)
 female : 19-50 years old (" 30.9)
 total : 19-60 years old (" 32.5)

図5および6に示した。ネコもヒトもほぼ同様なパターンを示すが、血清は脳組織と異って単位当りの含有量が微量のため、ガスクロマトグラフの検出器の感度を上げて測定する必要があった。ラット、ネコおよびヒトについての測定結果を表4に示した。

ラットおよびネコにおいては、norepinephrineおよびepinephrineはほぼ同様な値を示し、dopamineはネコの方が有意に高値を呈した。

ヒト血清についてdopamine, norepinephrineおよびepinephrineには男女差は認められなかった。他方、動物の場合と同様にヒト血清中にもdopamineを検出した。また、ヒト血清中のnorepinephrineおよびepinephrineは、他の動物に比較してやや低値を示した。

ヒト血清中におけるdopamine, norepinephrineおよびepinephrineの回収率は、各々68~75%, 65~75%および70~78%であった。

3) 尿中のカテコールアミン

正常人における尿中カテコールアミン測定のカロマトグラフの1例を図7に示した。すなわちそれらの含有量はdopamine, norepinephrine, epinephrineの順であることがわかった。なお尿中にoctopamineを検出した。

尿中のカテコールアミン測定回収率は80~87%であった。

4) 髄液中のカテコールアミン

髄液中カテコールアミン測定のカロマトグラフの分析結果の1例および定量値の結果について図8および表5に示した。

髄液中に微量のDOPAが検出された。ただ虫垂炎による腹痛および骨折による痛みは、少なからず認め、腰椎穿刺時のルンバール針の刺入による痛みも完全には除かれていない。腰椎穿刺時に出血した症例は除外した。

髄液中カテコールアミン測定における回収率は、

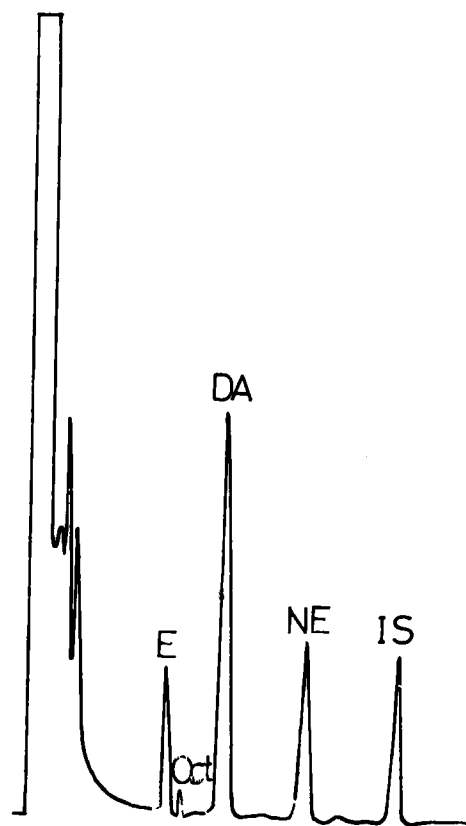


図7 Chromatography for catecholamines of human urine.

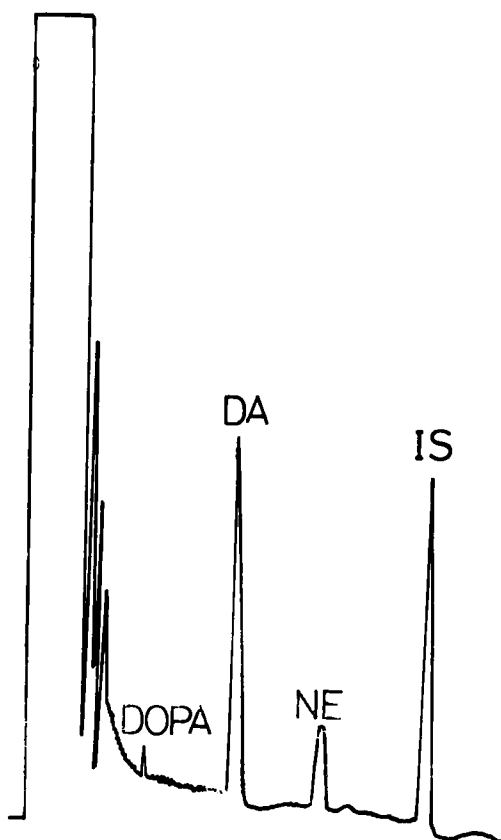


図8 Chromatography for catecholamines of human cerebrospinal fluid.

表5 Catecholamines in human cerebrospinal fluid.

	mean value $\pm$ S. D. (ng/ml)	
DOPA	dopamine	norepinephrine
control group (n=40)	1.03 $\pm$ 0.63	7.70 $\pm$ 3.26
		4.61 $\pm$ 2.52

Control group is the 38 patients with appendicitis and 2 patients with fracture of lower extremity. Sex: male 23, female 17. Age: 10-55 yrs (average 33).

DOPA, dopamine および norepinephrine について各々80~85%, 65~75%および68~75%であった。

第4章 考 察

カテコールアミン類の測定技術の進歩により生体アミンに関する基礎的および臨床的研究が盛んになってきた。現在カテコールアミン類の測定は、通常蛍光法により行われている。組織および尿中の単位当りのカテコールアミン含有量は、血清および髄液中の含有量に比較して多量であるため、その測定は蛍光法でも差しつかえないが、組織における代謝的研究に際しては、同時に多成分系が系統的に分離できるガスクロマトグラフィー法が好ましい。また、血清および髄液中のカテコールアミン含有量は微量であるため、その測定は蛍光法では実際には非常に困難である。特に臨床的検索を行う場合、多量の血液および髄液の採集は好ましくないため、ガスクロマトグラフィーによる方法が推奨される。

ガスクロマトグラフィーの検出器には電子捕獲検出器 (ECD) を用いた。著者の使用した ECD は放射性ニッケルを使用しているが、これの β 線源を封じ込んだセル内に電極を置いて高純度の窒素ガスをキャリアーガスとして流しておく、ここに電子を捕捉して陰イオンになりやすい物質の蒸気が流入すると、電離電流が減少するので、この変化を増巾記録するものである。この ECD は、有機、無機、ハロゲン化合物に対して極めて高感度であり、それらを ng 以下の量で検出、定量することができる。²⁵⁾ 従って生体微量成分をハロゲン化合物に誘導して ECD により検出するわけである。

試料の処理操作上、特に注意する事項としてまず温度条件が重要である。すなわち、試料を採集してから TFA 化まで常に分析試料が 2℃ 以上に上昇しないように注意する必要がある。そのため、常時 1~2℃ のコールドルームで実験を行った。著者の経験では、カテコールアミンのうちでも特に dopamine は、不安定であり試料を採集後 25℃ に 30 分間放置し

ておくと約 50% が消失する。また、試料を過塩素酸で除蛋白後、4℃ 以下で脱脂、アルミナ吸着および溶出を連続的に行えば、温度による分解はほとんど考慮しなくてもよい。試料を採集後直ちに処理しないで保存しておく場合は、長、短期間にかかわらず液体窒素中に保存することが好ましい。

測定操作上の注意事項として、ガラス器具などは特に汚染のないものを用いることは、言うまでもないが、カテコールアミンがガラス面に接するとカテコール核の水酸基がガラス含有成分と反応する恐れがあるので、分析に使用する器具はすべてシリコン処理したものを用いた。

次に分析に用いる試薬については、ECD の検出感度が高いため試薬の不純物は、ガスクロマトグラム上異常ピークとして出現し、正常パターンを乱すため特に純度の高いものが用いられねばならない。従って、溶出に用いる酢酸、TFA 化過程における酢酸エチル、無水トリフルオロ酢酸は、いずれもガスクロマトグラフィー用の高純度のものを用いた。また無水トリフルオロ酢酸は、アシル化が完全に行われるために厳密な無水状態が必要であるのでデシケター中に保存することが必要であった。

除蛋白の過程で、河合ら²⁶⁾は、血清で塩酸アルコール、組織 (副腎髄質) でトリクロル酢酸を用いたが、著者は両試料ともに過塩素酸を用いた。特に回収率の点では、血清の場合過塩素酸の方が好ましかった。脱脂の過程では、ether-benzene の他に ether-chloroform も使用できた。脱脂が充分できていない場合は、カテコールアミンのアルミナへの吸着が不十分で回収率低下の原因となる。

カテコールアミンのアルミナへの吸着過程は、Imai ら¹⁶⁾の操作とほぼ同様である。カテコールアミンは、アルミナへ吸着されると比較的安定であるが、長時間アルカリ性にして放置するのは好ましくないため、アルミナは直ちにカラムにつめて次の溶出操作に移るべきである。溶出操作に使用する溶出液 (酸) の種類は、回収率にはほとんど影響を及ぼさないと

う報告²⁷⁾もあるが、著者の経験では dopamine, nor-epinephrine および epinephrine は 0.2 N 酢酸で、DOPA は 0.25 N 酢酸で溶出した場合に回収率が優れていた。

河合ら²⁶⁾は、溶出液の乾燥に際して溶出液をナシ型コルベンにとり、ロータリエバポレーターを用い 50℃以下の水浴中で蒸発乾固しており、これについて TFA 化を行っているが、著者は凍結乾燥法を導入した。この方法では、溶出液全部を -50℃まで冷却した後、減圧乾固せしめるので熱による分解を防ぎ充分乾固させることができる。また、かなり大量の試料を一度に濃縮しうるので、血清および髄液などの定量も安全かつ正確に行えるようになった。

次に TFA 化の問題であるが、この反応は技術的操作および種々の条件により非常に影響されやすいので、特に実験者は種々の条件が常に一定するように配慮しなければならない。また無水トリフルオロ酢酸以外に pentafluoropropionic anhydride (PFPA)²⁸⁾を用いてアシル化する方法も試みたが、回収率は TFA 化の場合とほぼ同様である。

さて、カテコールアミン標準試料についての分析結果は、河合ら²⁶⁾の報告とほぼ一致した結果を得た。本実験における標準試料および生体試料の分析に際し、ガスクロマトグラフに試料注入直後に trifluoroacetic acid のピークを認めたが、多量の n-hexane で希釈した場合には、このピークは認められない。

生体試料についての分析では前述のごとく種々の知見がみられたが、まずヒト血清中にラットおよびネコと同様に dopamine が検出されたことは注目すべきである。現在まで蛍光法による測定で正常人血清中の正確な dopamine 値の報告はない。すでに Imai ら²⁹⁾は、ガスクロマトグラフィー法によって正常人血清中に数 ng/ml の dopamine が存在すると報告している。このことはガスクロマトグラフィー法は、蛍光法と異り多成分系の物質をほぼ同一時間に測定できるためであろう。ガスクロマトグラフィー法によるヒト血清中の norepinephrine および epinephrine 値は、すでに報告されている蛍光法による測定値³⁰⁾より若干高値を示す傾向にある。また、ヒト血清中の norepinephrine および epinephrine は、ラットおよびネコの血清中のそれらより低値を示した。

尿中のカテコールアミン類の測定は試料が豊富であるのみならず単位当りの含有量が多いため蛍光法でも充分測定可能であるが、ガスクロマトグラフィー

法による測定値も諸氏^{30) 31)}の報告とほぼ一致した値がえられた。

次に脳組織中のカテコールアミンに関しては、ラットの全脳およびネコの cortex 中より数 ng/g の epinephrine が検出された。従来中枢神経系には epinephrine の存在は多くは否定的であったが、最近では脳内にも phenylethanolamine-N-methyltransferase が存在するという報告³²⁾もあり、今回の著者の結果は、中枢神経系における epinephrine の存在を証明している。蛍光法による測定値との比較ではラットの norepinephrine 値は諸氏^{33) 34) 35)}の測定結果よりやや低いようであるが、これはラットの発育過程および断頭してから試料処理までの操作の違いによるものかも知れない。ネコの全脳および脳各部位におけるカテコールアミンの蛍光法による測定値は、報告者³²⁾によってもかなりの差があるが、本法では約 20 mg あれば充分測定可能であるので 1 個体で脳諸部位の測定が可能であり、従って蛍光法により数個体を 1 試料とする場合と比較すると信頼度は高いと考える。

Papavasiliou ら³³⁾は L-DOPA および L-alpha-hydrazinomethyl dopa (MK 486) を投与すると髄液中の DOPA および dopamine が上昇することを蛍光法で測定したが、著者は髄液中のカテコールアミン類全般にわたってガスクロマトグラフィー (ECD) で定量分析した。中枢神経系疾患および精神科領域の疾患のないヒトの髄液中に微量ながら DOPA が検出されたことは興味深い。

脳における最も有力な神経伝達物質候補であるカテコールアミン類を髄液中レベルで測定可能になったことは、今後の種々の中枢神経系に関係する疾患の病因および病態を生化学的に研究する上で役立つであろう。

第5章 結 語

1) 組織、血清、尿および髄液中のカテコールアミンの定量分析をガスクロマトグラフィー (ECD) 法で行った。分析に要する試料は組織は 20 mg、血清は 2.5 ml、髄液は 3.0 ml であり、いずれも ng 以下の単位まで測定可能であった。

2) dopamine, norepinephrine および epinephrine の他に DOPA, tyramine, octopamine, metanephrine, normetanephrine, synephrine などと同時に系統的に定量分析できた。

3) 従来の蛍光法による定量法とガスクロマトグ

ラフィー法による分析との比較検討を行った。

4) 正常人および動物の血清中より dopamine を検出した。

5) ラットおよびネコの脳組織より epinephrine を検出し、中枢神経系における epinephrine の存在を確認した。

稿を終わるに臨み、御指導、御校閲を賜った岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門高坂睦年教授、同機能生化学部門森昭胤教授、ならびに御校閲を賜った岡山大学医学部脳神経外科教室西本詮教授に深く感謝の意を表します。また、本研究に多大の暖かい御援助を頂いた岡山大学医学部脳代謝研究施設の教室の皆様に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Låwen, A.: Quantitative Untersuchungen über die Gefasswirkung von Suprarenin. Arch. exper. path. Pharmacol., **51**: 415—441, 1904.
- 2) Trendelenburg, P.: Bestimmung des adrenalinhalt im normalen Blut sowie beim Abklingen der Wirkung einer einmaligen intravenösen Adrenalininjektion mittels physiologischer Massmethode. Arch. exper. path. Pharmacol., **60**: 161—176, 1910.
- 3) Gaddum, J.H. and Lembeck, F.: Assay of substances from adrenal medulla. Brit. J. Pharmacol., **4**: 401—408, 1949.
- 4) Vane, J.R.: The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. Brit. J. Pharmacol., **23**: 360—373, 1964.
- 5) Euler, U.S. and Hamberg, U.: Colorimetric estimation of noradrenaline in presence of adrenaline. Science, **110**: 561, 1949.
- 6) Folin, O. and Denis, W.: New methods for the determination of total new protein nitrogen, urea and ammonia in blood. J. Biol. Chem., **11**: 527—536, 1912.
- 7) Shaw, F.H.: Estimation of adrenaline. Biochem. J., **32**: 19—25, 1938.
- 8) Bloor, W.R. and Bullen, S.S.: Determination of adrenaline in blood. J. Biol. Chem., **138**: 727—739, 1941.
- 9) Udenfriend, S., Cooper, J.R., Clark, C.T. and Baer, J.E.: Rate of turnover of epinephrine in adrenal medulla. Science, **177**: 663—665, 1953.
- 10) O'Hanlon, J.F., Jr., Campuzano, H.C. and Harvath, S.M.: A fluorometric assay for subnanogram concentrations of adrenaline and noradrenaline in plasma. Anal. Biochem., **34**: 568—581, 1970.
- 11) Valori, C., Brunori, C.A., Renzini, V. and Corea, L.: Improved procedure for formation of epinephrine and norepinephrine fluorophors by the trihydroxyindole reaction. Anal. Biochem., **33**: 158—167, 1970.
- 12) Natelson, S., Lugovoy, J.K. and Pincus, J.B.: New fluorometric method for determination of epinephrine. Arch. Biochem., **23**: 157—158, 1949.
- 13) Weil-Malherbe, H. and Bone, A.D.: Chemical estimation of adrenaline-like substances in blood. Biochem. J., **51**: 311—318, 1952.
- 14) Kawai, S. and Tamura, Z.: Gas chromatography of catecholamines as their trifluoroacetates. Chem. Pharm. Bull., **16**: 699—701, 1968.
- 15) Bertani, L.M., Dziedzic, S.W., Clarke, D.D. and Gitlow, S.E.: A Gas-Liquid chromatographic method for the separation and quantation of normetanephrine and metanephrine in urine. Clin. Chim. Acta, **30**: 227—233, 1970.

- 16) Imai, K., Sugiura, M. and Tamura, Z.: Catecholamines in rat tissues and serum determined by gas chromatographic method. *Chem. Pharm. Bull.*, **19**: 409—411, 1971.
- 17) Fales, H. M. and Pisano, J. J.: Gas chromatography of biologically important amines. *Anal. Biochem.*, **3**: 337—342, 1962.
- 18) Sen, N. P. and McGeer, P. L.: Gas chromatography of phenolic and catecholamines as the trimethylsilyl ethers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**: 390—393, 1963.
- 19) Kawai, S., Nagatsu, T., Imanari, T. and Tamura, Z.: Gas chromatography of catecholamines and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **14**: 618—621, 1966.
- 20) Kawai, S. and Tamura, Z.: Dimethyl sulfoxide as a suitable solvent for trimethylsilylation of catecholamine. *J. Chromatog.*, **25**: 471—472, 1966.
- 21) Kawai, S. and Tamura, Z.: Gas chromatography of catecholamines using dimethyl sulfoxide as an effective solvent for trimethylsilylation. *Chem. Pharm. Bull.*, **15**: 1493—1497, 1967.
- 22) Wong, K. P. and Sandler, M.: A gas chromatographic method for measuring DOPA decarboxylase activity in tissues. *Clin. Chim. Acta*, **50**: 119—128, 1974.
- 23) Papavasiliou, P. S., Cotzias, G. C. and Lawrence, W. H.: Levodopa and dopamine in cerebrospinal fluid. *Neurology*, **23**: 756—759, 1973.
- 24) 岸川秀実: カテコールアミン代謝に関する基礎的ならびに臨床的研究. 第三編 末梢性脱炭酸酵素抑制剤とカテコールアミン代謝に関する基礎的および臨床的研究. *岡山医誌*, **87**: 481—496, 1975.
- 25) 田村善蔵: 臨床化学領域におけるガスクロマトグラフィー (総論). *臨床化学*, **1**: 363—368, 1972.
- 26) 河合聡, 今井一洋: 生体試料の分析法 (V) —カテコールアミンおよび代謝物の分析(1)— (カテコールアミンの分析). *代謝*, **6**: 915—924, 1969.
- 27) 今泉礼治編: カテコールアミン, 医学書院, 東京, p. 190, 1968.
- 28) Koslow, S. H. and Green, A. R.: Analysis of pineal and brain indole alkylamines by gas chromatography—mass spectrometry. *Ad. Biochem. Psychopharm.*, Raven Press, New York, ed. by Costa, E. and Holmstedt, B. Vol. **7**, 33—43, 1973.
- 29) Imai, K., Sugiura, M. and Tamura, Z.: The presence of conjugated dopamine in normal human plasma. *Chem. Pharm. Bull.*, **18**: 2134, 1970.
- 30) Drujan, B. D., Sourkes, T. L., Layne, D. S. and Murphy, G. F.: The differential determination of catecholamines in urine. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 1153—1159, 1959.
- 31) 中野裕, 新保慎一郎, 永山洋一, 真鍋成, 菅野泰, 江崎正: 血中カテコラミンおよび尿中カテコラミンとその代謝物—その数値をどう読むか—. *日本臨床*, **31**: 1645—1656, 1973.
- 32) Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H.: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York London Toronto, P. 109, 1970.
- 33) Iversen, L. L.: *The uptake and storage of norepinephrine in sympathetic nerves*. Harvard University Press, Cambridge, Mass. p. 34, 1967.
- 34) 日高弘義: Dopamine- β -hydroxylase 阻害と脳内アミン. *神経化学*, **11**: 17—19, 1972.
- 35) Valzell, L. and Garattini, S.: Biochemical and behavioural changes induced by isolation in rats. *Neuropharmacology*, **11**: 17—22, 1972.

Experimental and clinical studies on the catecholamine metabolism

1. Studies on the determination of catecholamines in tissues, serum, urine and cerebrospinal fluid by gas chromatography (ECD).

by

Hidemi KISHIKAWA

Institute for Neurobiology, Okayama University Medical School.

(Director: Prof. Mutsutoshi Kohsaka)

Catecholamine in tissue, serum and urine has been determined by the fluorometric method. It still remains some problems, especially sensitivity in the measurement and purification of catecholamines according to this method. Therefore, I determined by a gas chromatographic method (using an Electron Capture Detector: ECD) modified from the method of Imai (1971). Catecholamines in cerebrospinal fluid (CSF) have not been determined by gas chromatographic method so far. A new technique for the determination of catecholamine in CSF of human will be presented in this paper.

The results are as follows,

1) According to the gas chromatography, 20mg of tissue, 2.5ml of serum and 3.0ml of CSF are enough to determine with the grade of one nanogram.

2) Dopamine, norepinephrine, epinephrine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), tyramine, octopamine, metanephrine, normetanephrine and synephrine were determined. Retention time of gas chromatography for these substances was decided. Heptachlor epoxide or dieldrin were available to the internal standard substances.

3) Dopamine was determined in serum of normal human subjects and in experimental animals (rat and cat).

4) Epinephrine was detected in brain tissue of rats and cats. This evidence will show that the central nervous system contains enough epinephrine to evaluate.

5) Micro-quantitative analysis of catecholamine and its derivatives in various samples will contribute to the neurochemical researches and to the clinical works in the central nervous system.