研究速報
特集 7
UDC 591.18.05：591.481：57.08

マルチECDを用いたHPLCによる神経伝達物質の分析

Determination of Neurotransmitters by HPLC with Multi-Electrochemical Detector

高井信治*・篠塚則子*・佐久間一郎**・真重文子***
大久保昭行***・和田博夫***・金沢秀子****
永田佳子****・松島美一****
Nobuharu TAKAI, Noriko SHINOZUKA, Ichirou SAKUMA, Fumiko MASHIGE,
Akiyuki OHKUBO, Hiroo WADA, Hideko KANAZAWA,
Yoshiko NAGATA and Yoshikazu MATSUSHIMA

1. はじめに

溶液中に含まれる物質のうち電極を用いて酸化または還元される物質の定性または定量が行えることは良く知られている．特に滴下水銀を電極とするポーラログラフィーや定電位で電解を行うクーロメトリーは，金属イオンのみならず多くの有機化合物にも応用されてきた．

その後高速液体クロマトグラフィー（HPLCと略す）が開発され複雑な組成の溶液から電気化学的に活性な物質のみを分離検出できる手法が提案され，特に生体液中のカテコールアミン等に応用されてきた．一方近時老化に伴う脳内の変化を臨床化学的にとらえてパーキンソン氏病やアルツハイマー氏病の病態を把握しようとすることについても多くの試みが行われるようになってきた．

脳内の疾患をみる手段として，現在までにX線CTやMRIのほかSQID等が知られているが，いずれの方法も物理的計測でこれだけでは十分でない．一方臨床化学的に行うためには試料を生体外に取り出す必要があるが，脳の一部をバイオプシーしたりすることは他の臓器ほど容易ではない．そこで脳の情報を間接的に最も多く持っていると考えられる脳脊髄液を精密に分離分析して判断する方法が考えられた．

しかし，脳脊髄液には電気化学的に活性なものに限っても，存在量が多いものから極微量なものまで，さらに安定性の良いものから，きわめて不安定なものまで，きわめて多くの物質が存在する．そしてこれらの重要性は存在量や安定性だけでは決められない場合が多い．このような物質を今まで普通に行われているHPLCのシステムを用いて分析するとおのおのの物質のピークが重なる場合もあり認識できないケースも知られている．

そこで分離をカラムだけに頼らず検出器においても選択性を持たせて，物質を個々に検出しようとする考えが出てきた．当初このような考えのものに多孔質の電極を複数個直列に配列し，おのおのの電極の電位を少しずつ変化させて選択性のある検出器が考えられた．マルチECDを用いたHPLCによる神経伝達物質の分析については，"NEUROCHEM"の装置によってこれまで多くの報告がなされている[1]．しかしこの検出器の材質，システム等は明らかにされない部分が多く，新しいソフトの開発を行うことは，現在のところ難しい．またこれらのECDは非常に高価であり，システムが完全にブラックボックス化されており，最適な分析条件に変化させることが容易ではない．

そこでわれわれは，ECDに用いる新しいタイプの電極を開発し検討を行ってきた[2)~4)]．

2. 実験

① 装置 この研究に使用したシステムをFig. 1に示す．送液ポンプ：日立655A-12，サンプルバルブ：レオダインNo. 7125，検出器：4極式ECDクーロメトリー，電極反応：酸化反応，作用電極：ファーネスカーボン，参照電極：Ag/AgCl，補助電極：ステンレススチール，記録計：4ペン式のYOKOGAWA LR4200パーソナルコンピューター-PC-9801UXである．

カラムはHitachi gel #3056（4mm I.D. ×250mm）を用い，溶離液は，50mMクエン酸，50mMクエン酸三ナトリウム溶液（pH 3）920ml，1.3mM 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム（HSA），メタノール80mlを混合

*東京大学生産技術研究所　第4部
**東京電機大学
***東京大学医学部
****共立薬科大学

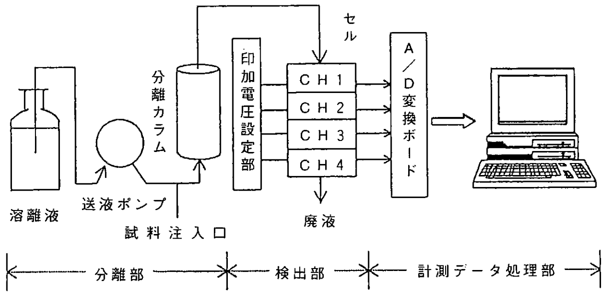

Fig. 1　フローダイアグラム

した後，0.22μmのメンブランフィルターで濾過したものを用いた．流速は，0.6ml/minで行った．

② 標準試薬の調製：0.1N HClまたは0.1N NaOHを用いて，それぞれの試料を1mg/mlになるように溶解し，1.5mlづつ分注後－80°Cで保存した．用時再溶解し，溶離液で適当な濃度に希釈して用いた．標準品試料は，おのおの5mgをHPLCに注入した．標準試薬は，以下のものを用いた．

Epinephrine (E), Norepinephrine (NE), Dopamine (DA), 3, 4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), Serotonin (5-HT), 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 3, 4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG) は，和光純薬工業製．

3, 4-Dihydroxybenzoic acid (DOBAC), 4-Hydroxymandelic acid (HMLA-4), Homogentisic acid (HGA), 3-Hydroxykynurenine (OHKY-3), Epinine (EPI) は，Sigma社製．

3, 4-Dihydroxymandelic acid (DOMA), Normetanephrine (NMN), 3, 4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) は，Aldrich社製．

Metanephrine (MN), 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid (VMA), 3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid (HVA) は，半井化学工業製．

③ 生体試料の調製：脳脊髄液は，ビーグル犬より全身麻酔下で採取したものを用いた．0.45μmのメンブランフィルターで濾過後，分注し，－80°Cで保存した．分析にはダイレクトに100μlを注入した．

尿は，ビーグル犬より尿道カテーテルを用いて膀胱から直接採取したものを用いた．0.45μmのメンブランフィルターで濾過後，分注し，－80°Cで保存した．分析にはダイレクトに1μl注入した．

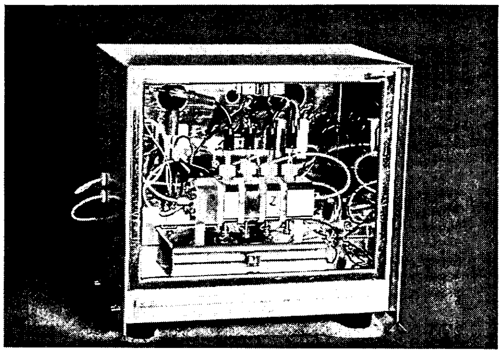

Fig. 2　マルチECD検出器

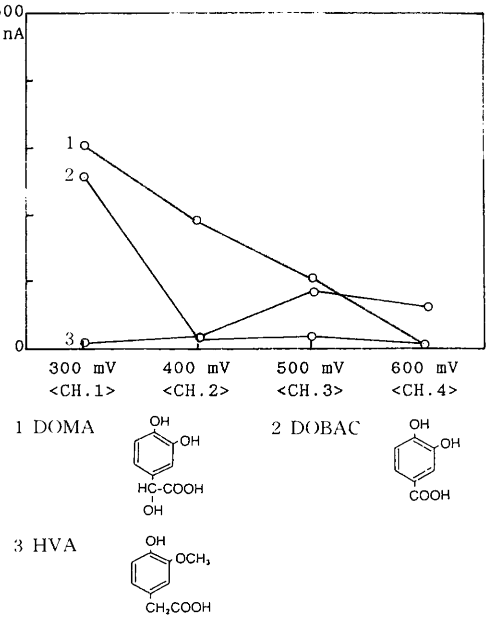

Fig. 3　ボルタングラム

3. 結果と考察

まずボルタングラムから不分離ピークの分離を行う目的で，4chのポーラス電極（Fig. 2）をもつECDを試作し，その性能を明らかにした．すなわち4chの電極の電位を少しずつ変化させることによって電気化学的に活性な非常に似かよった化学種をその酸化電位（あるい

研　究　速　報

は還元電位）の順に各電極で検出し，Hydrodynami voltammogram（HDV）により定性することができる(Fig. 3)．このように電極電位を制御することにより必要な情報を得られるシステムを構築した．

電極材料には，電極面積が大きくフロースルー測定に適した多孔質炭素を新たに開発して用いた．この電極を用いたECDにより超微量分析が可能になり，また各成分の分離もさらに改善された．このようなマルチECDは，複数個の電極を直列に配置し，それぞれ異なった電位場において酸化した時の電流値をA/D変換することによりピークの高さから物質の存在量を求めるため，カラムで完全分離できない場合でも，溶出液中の複数の成分を区別して検出することが可能であった．

アルツハイマー型等痴呆症の研究には脳神経伝達物質の超微量，高選択分析法の確立が不可欠である．本システムでカテコールアミン類およびセロトニンとその関連物質等の神経伝達物質の溶離挙動の検討を行った．

Fig. 4に本システムを用いた神経伝達物質の分析例を示す．この方法で，これらの18種の検出が可能であった．

この条件で実際に生体液中の神経伝達物質の分析も可

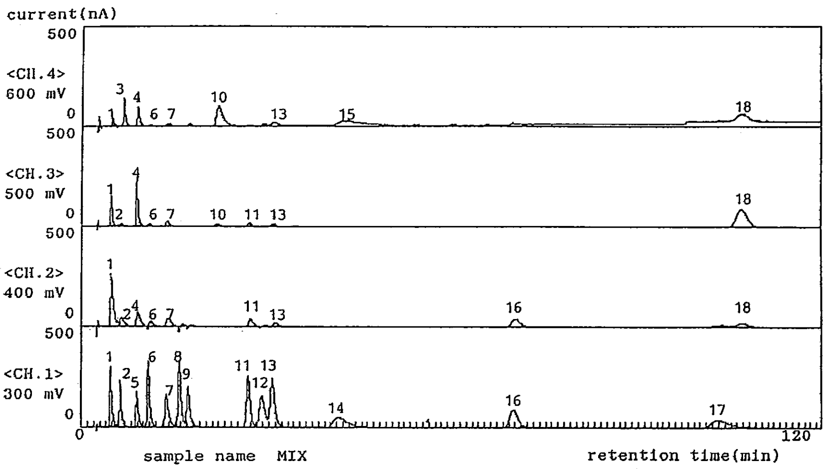

Fig. 4　標準物質のクロマトグラム　1; DOMA, 2; DOPEG, 3; HMLA-4, 4; VMA, 5; NE, 6; L-DOPA, 7; E, 8; HGA, 9; OHKY-3, 10; NMN, 11; DOBAG, 12; DA, 13; DOPAC, 14; EPI, 15; MN, 16; 5-HIAA, 17; 5-HT, 18; HVA

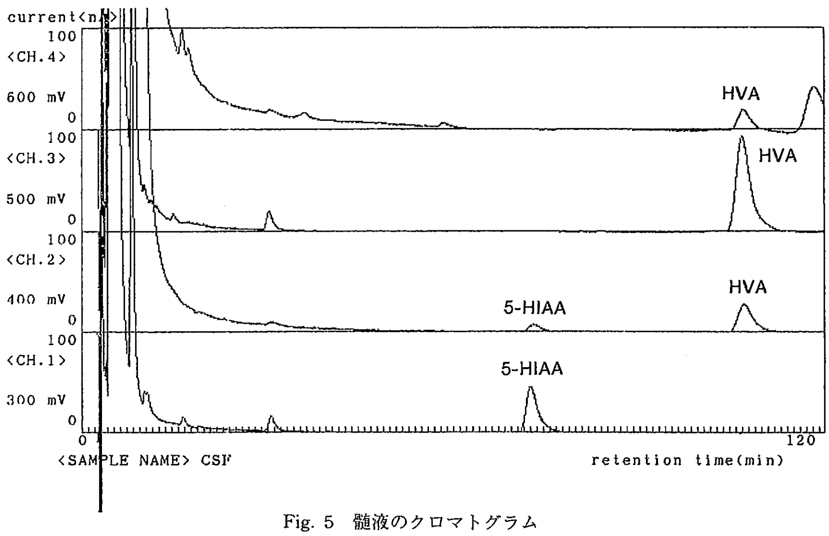

Fig. 5　髄液のクロマトグラム

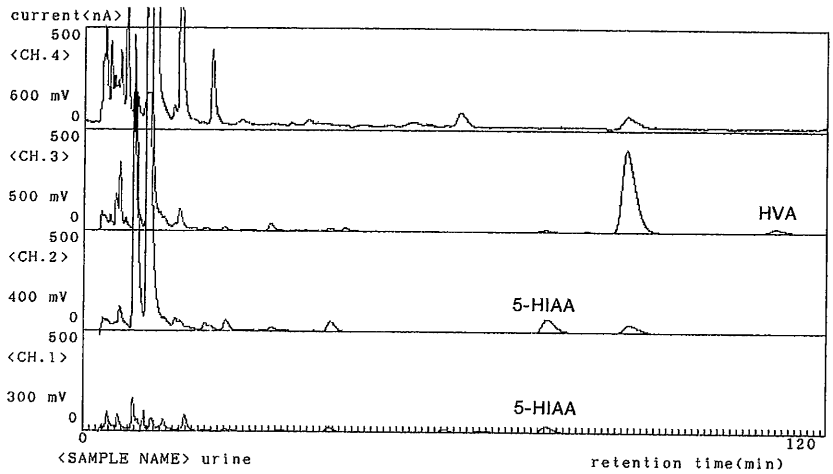

Fig. 6　尿のクロマトグラム

能であった．Fig. 5 と Fig. 6 にイヌの髄液および尿を前処理なしに直接注入した場合のクロマトグラムを示す．

以上われわれは比較的廉価で汎用性のある，高感度なマルチ ECD の開発を目指して電極系および測定システムの検討を行うと共に，臨床用のシステムも併せて開発してきた．その結果 4 -チャンネル ECD で，電極材料の開発，セル室の構造に工夫を凝らすことにより，より高感度で安定性のよい電極と，保守の容易な検出器の開発に成功した．

現在，本システムの臨床応用については，8 ch の ECD を用いたヒトの髄液中の神経伝達物質の高感度分析について検討を行っている．　(1992年 8 月 6 日受理)

参 考 文 献

1) W.R. Matson, P. Langlais, L. Volicer, P.H. Gamache, E. Bird and K.A. Mark, Clin. Chem., 30 (1984) 1477.

2) N. Takai, N. Phinozuka, F. Mashige, A. Ohkubo et al., Abstructs of "5th Asian Pacific Congress of Clinical Biochemistry", (Kobe, Japan), (1991) p 174.

3) 真重，高井，篠塚，佐久間，相沢，飯島，大久保，臨床化学，19，(1990)，161.

4) N. Shinozuka, N. Takai, F. Mashige, A. Ohkubo, N. Nukina, H. Wada, Y. Fukui, I. Sakuma, Y. Matsushima, H. Kanazawa, Y. Nagata, Abstructs of "THE 2ND ASIAN CONFERENCE OF CLINICAL PATHOLOGY", (Cheju, Korea), (1992) p 78.