

## マルチECDを用いる神経伝達物質の測定

Detection of neuro transmitters with multi ECD

高井 信治\*・篠塚 則子\*・永田 佳子\*\*・松島 美一\*\*  
Nobuharu TAKAI, Noriko SHINOZUKA, Yoshiko NAGATA, Yoshikazu MATSUSHIMA

## 1. はじめに

1950年~1970年にガスクロマトグラフィー(以下GCと略す)は、当時新しい化学の領域である石油化学、高分子化学の発展に大いに寄与したことは、良く知られている。これと同じように1970~1990には、高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography:以下HPLCと略す)は、遺伝子操作を含むバイオテクノロジーの分野において研究面では、大きな武器となっている。

両者共、これらの分離分析機器なしに現在の発展はなかったと言っても決して過言ではない。

GCは、すでにほぼ確立された技術と考えられているが、HPLCは現在なお多くの新たな技術の発展により支えられている。

この理由の一つとして、GCに比較して、HPLCの対照となる物質が多いこと、すなわちHPLCの開発当初に予測されたように、GCは、既存の物質の20%がその対象であるのに対して、HPLCは、70%がその対象となるはずであるということに基因している。

これは、有機、無機を含めて溶液の形にすることができれば、すべて、HPLCで分離分析できるからである。そのほか、HPLCは、大型のカラムを用いると、即分取により物質を取り出せるということも大きな特徴である。

以上のようなことがらもあり、HPLCは現在でも新しい技術が開発されている。当面の目標は、極微量物質の検出と溶液に含まれている物質についてのすべての情報を把握することおよび、目的とする物質のみを認識するための検出法の開発である。

ここでは、上記のことからうち、極微量、高選択性の検出法についてマルチECD(電気化学検出器)について検討を行った。

ECD検出器は、作用電極の電位を参照電極に対して一

定の値を保つように、対極と作用電極の間に印加する電圧をコントロールして、作用電極に電気的に活性な物質が来たとき、この物質が電気化学的に酸化または還元され、このとき流れる電流値を求め、目的とする物質を検出する方法である。このとき、フロー電解セルを定電位電解装置(ポテンショostat)に接続し、電解電流を時間軸にプロットすると、クロマトグラムが得られる。

このクロマトグラムは、溶出時間で物質の定性が、また、面積で定量ができる。それらの関係は次式で与えられている。

$$i = KnFC(D/Sc)^{1/3}W(Rex)^{\alpha} \quad (1)$$

ここでK、 $\alpha$ は定数、n:電化還元電子数、F:ファラデー定数、D:拡散定数、Sc:シュミット数( $Sc = VD^{-1}$ )、Rex:レイノズル数( $Rex = \bar{V}l/r$ )このうち $\bar{V}$ :流体の平均線速度、 $l$ :電極の大きさ、 $r$ :動粘度)を表す。この式は、作用電極の構造が変わることにより、kの値が異なることが知られており、電極により固有の値をとることが知られている。したがって、電解電流*i*は、濃度*e*に比例するが、その値はセルごとに多少異なる。

セル間の異なりを少しでも解決する目的で、クーロメトリ法が知られている。これは電極表面で電気化学反応が化学量論的に行われると考え電極に流れる電流量を正確に測定し、ファラデーの法則から目的物質の量を算出する。計算は次式によって行われる。

$$W = \frac{QM}{nF} \quad (2)$$

ここでMは、検出しようとする物質の分子量、nは、酸化還元の電子数、Fはファラデー定数である。このとき流れる電流*i*は

$$i = \frac{dQ}{dt} = nFVe \quad (3)$$

ここでtは時間、Vは流速、eは目的物質の濃度である。このようにして、得られたHPLC用の検出器は、すでに多くの分野で繁用されており、特にカテコールアミンな

\*東京大学生産技術研究所 第4部

\*\*共立薬科大学

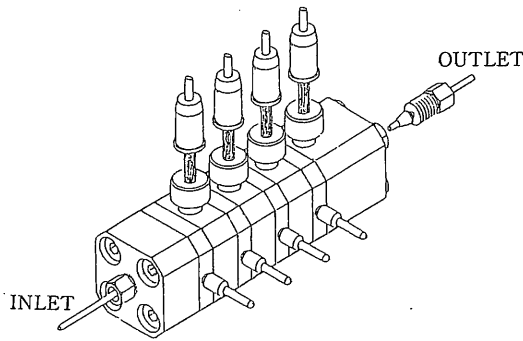


図1 セルの見取図

どの神経伝達に關する物質への応用は多い。

しかし、今までに述べた電気化学検出器は、HPLCのカラムで目的とする物質が完全に分離されているということを仮定した場合、目的とした物質がカラム内で完全に分離されていない場合は、別である。

HPLCを用いて、カラムで分離を行うことについては、すでに非常に多くの研究例が知られているが、生体液等については、現在なお完全に各成分を分離した例は少ない。このことに関する理由として、生体液中には、きわめて多くの成分が含まれており、その構成比も、量の多いもの、また極微量のもののほか、分子量がきわめて大きいものから、小さいものまであり、このほか極性も小さいものから大きいものまで多岐にわたっていることが

あげられる。神経伝達に關するカテコールアミンについても、その代謝物まで含めると、かなりの数になるし、これらは、皆きわめて類似した化学構造を持っている。

このような物質群を分離するのは、容易ではない。そこで、ECDのような極微量の検出成度を持つ検出器に新たな機能を持たせた。ECDの機能化は、電極表面の化学修飾および、電位を変化させる方法が考えられるが、ここでは、後者の方法を選んだ。電極の電位を経時的連続的に変えて計測を行う、サイクリックボルタンメトリーは、種々の物質が含まれる系において、電気化学の分野では、良く行われる手法であるが、フローセルについては、短時間に電極表面が基底状態とならないので、この場合は、使用できないことが予備実験の結果から明らかとなった。

したがって、電極の電位を変える代わりに、複数個の電極を直列に並べ、おのおのの電極の電位を変えて、測定する方法について検討を行った。

複数個の電極を直列に並べて使用する方法はすでに Ladislav<sup>1)</sup>よりその有意性が明らかにされているが、詳細は不明であった。特にこの検出器の重要な部分である、電極については、不明な点が多かった。以上のことから、実験を行った結果、いくつかの興味ある知見が得られたので報告する。

## 2. 実験

すでにのべたようにこの研究に関しては、いくつかの未知のことがらがあるので、まず個々について、検討を

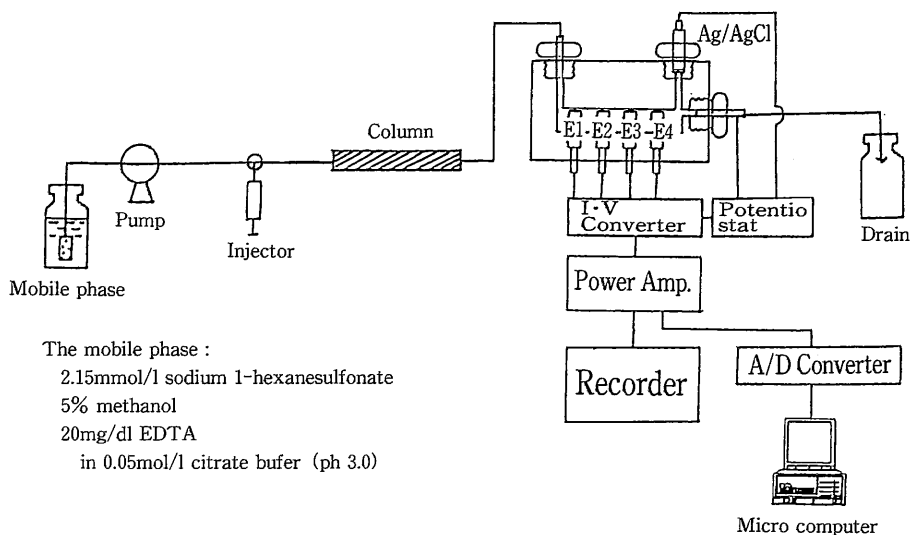


図2 フローダイアグラム

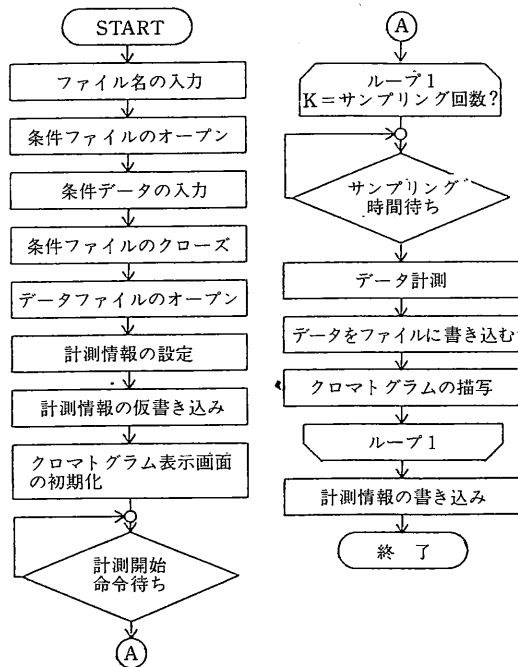


図 3 フローチャート

行った。

a) 多孔性炭素電極の開発

これは、この研究を行うにあたり重要なことであるが、未解決な問題が多い。まず、グラッシーカーボンを10 $\mu$ 程度にボールミルを用いて粉碎した。水篩法により粒子の小さいものを除き良く乾燥する。これに重量当り5%程度のフェノール樹脂をコーティングし、IRを測定するときの製錠器を用い各種の厚さの錠剤を作成する。

この錠剤を、1,000°Cまで加熱し、表面を炭化する。以上のようにして得られた多孔性炭素分極を、ポテンショスタットで測定したところ、実用上問題ないことが明らかになった。

b) セルの組み立て

上記のような炭素電極を陽極に、SUS32を陰極に用い、参照電極には、Ag/AgClを使用して、図1のように組み立てた。パッキン等の部分はすべてダイフローを使用し、セル全体をフィルタープレス型に固定した。組み立てた後、HPLC用の装置を用いて水およびアセトニトリルまたは、メタノールを流して、液漏れをチェックしたが、実用範囲で差し支えないことが明らかとなった。

c) システム

このシステムの概要を図2～図3に示す。リザーバーには、あらかじめ超音波とアスピレーターで脱気した溶液を用いた。溶液の組成は、次に示す組成のものを使

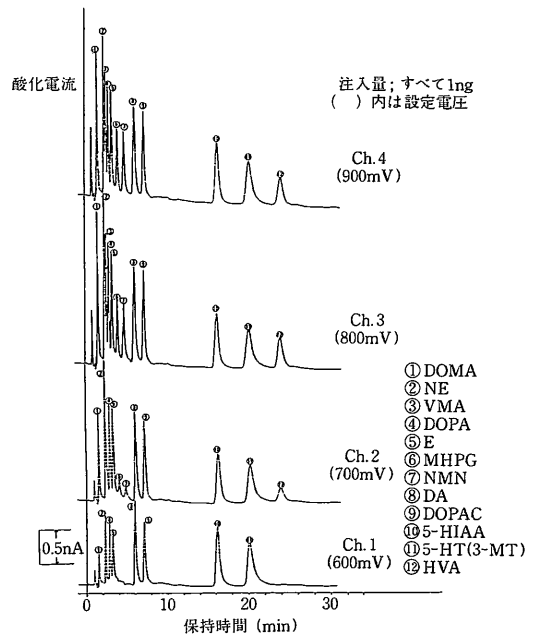


図 4 標準液のクロマトグラム

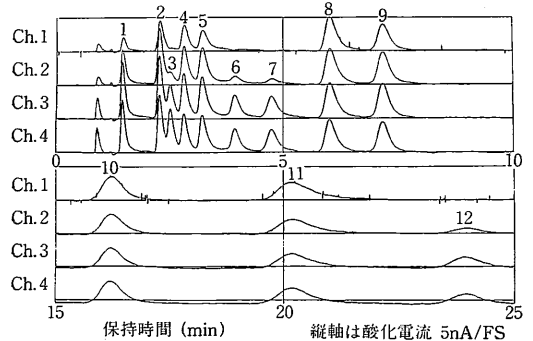


図 5 標準液のクロマトグラム

用した。[0.05Mクエン酸Na<sup>-</sup>(PH 3), EDTA20mg/ℓ, メタノール 5%, HSA21.5mM]このものは、クエン酸およびクエン酸3ナトリウムを用いるとかなり広い範囲にわたってPHの調節を行うことができる。

送液ポンプには、日立655型、サンプルバルブには、レオダイン7125、カラムは、Hitachi Gel 3056(4 $\phi$ ×150mm) 検出器にはすでに述べた b) のシステム、レコーダーは、4チャンネルのペンレコーダーを使用し、併用して、シグナルを増幅後、A/D交換し、PC-9801で各種のデータの保存および各種の処理を行った。

3. 結果および考察

このHPLCのシステムは、すでにのべたように、生体中

## 研究速報

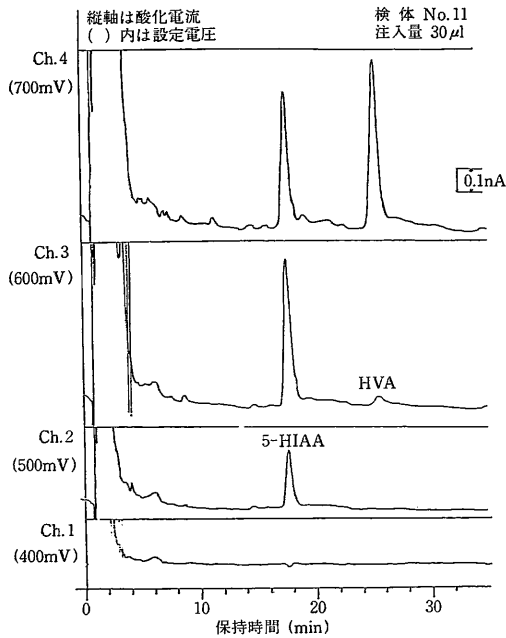


図6 髄液のクロマトグラム

に含まれる、神経伝達物質をできるだけ精密に分離分析し、得られた情報から、脳の老化に関する情報、将来は、現在未知のことがらが多いアルツハイマー氏病や、パーキンソン氏病などの診断または治療の経過をみる支援機器システムとして開発を行うことを目的としているので、まず基礎的な知見を得るためにも専らこれに関する物質について、検討を行った。

標準サンプルには次に示すものを選んだ。

- DOPA (3, 4-dihydroxy phenylalanine)
- NE (norepinephrine)
- VMA (vanillyl mandelic acid)
- DOMA (3, 4-dihydroxy mandelic acid)

- E (epinephrine)
- MHPG (3-methoxy 4-hydroxy phenyl ethylene glycol)
- NMN (normetanephrine)
- DA (dopamine)
- DOPAC (3,4-dihydroxy phenyl acetic acid)
- 5HIAA (5-hydroxy indoleacetic acid)
- 5HT (3-MT) (3-methoxy tyramine)
- HVA (chymo vanillic acid)

以上に示す、カテコールアミンおよびその代謝物は、生体液中に含まれるすべぎではないが、容易に入手できるものである。

次に、上記物質をHPLCでクロマトグラムおよびPC-9801で処理したときの結果を図4、5に示す。この結果のみで、すべてを推定するわけにはいかないが、マルチECDを用いたHPLCは、カラムで完全に分離できない場合でも検出器で選択的に検出することが出来、場合によってはおのおのの電極の値から得られたボルタングラムにより定性の行える可能性も出てきた。

将来このシステムが完成したときには、化学的に脳内情報を得る一つ的手段となると考えられる。

最後に1例のみであるが実サンプルについてクロマトグラフィーを行った(図6)。このクロマトグラムは、完全ではないが他の方法で求めた値と良く一致した。

なお本研究費の一部は本所平成元年度の選定研究費によるものである。(1990年8月20日受理)

## 参考文献

- 1) Ladislav Volicer, Philip. J. Langlais. Wayne R. Matson Konrad A Mark. Paul. H. Gamache. "Serotonergic System in Dementia of the Alzheimer Type" Arch Neural 42 (12) 1158 (1985).
- 2) Ishii I. Distribution of Alzheimer's neuro fibrillary changes in the brain stem and hypothalamus of senile dementia, Arch Neuropathol 1966 6 181-187.