

尿中カテコールアミン類及びその代謝物における 酸性蓄尿用添加剤「酸性ユリメジャー・T」の適用評価

Evaluation for adaptability of "Acid UriMeasure-T" as the additive agent for urine collection for measurement of urinary catecholamines and their metabolites.

株式会社エスアールエル 免疫化学部 機器分析1課 中浦 秀章、加藤 雅子

Hideaki Nakaura, Masako Kato

Instrumental Analysis Section 1, Immunochemistry Testing Department, SRL, Inc.

関東化学株式会社 試薬事業本部 ライフサイエンス部 粗 恭子、高笠 信之

Kyoko Hobo, Nobuyuki Takagasa

Diagnostics Development LifeScience Dept., Kanto Chemical Co., Inc.

要旨

臨床検査における尿中カテコールアミンおよびその代謝物の測定では、24時間蓄尿を検体として使用する。その際、内容成分の安定化の目的で、尿を酸性とする必要があり、添加剤として6N塩酸が使用されてきた。

しかしながら6N塩酸は劇物に該当するため、運用上における安全面および管理面の課題を抱えていた。

このたび、毒劇物に該当しない酸性蓄尿用添加剤「酸性ユリメジャー・T」(関東化学)が入手可能となったことから、「酸性ユリメジャー・T」の分析結果への影響の有無、カテコールアミンおよびその代謝物に対する安定化効果について評価を行った。

その結果、酸性ユリメジャー・Tを添加した尿は、分析結果に影響を与えず、目的成分の安定化においても6N塩酸添加と同等の効果が認められた。

よって、酸性ユリメジャー・Tは、6N塩酸に代わる酸性蓄尿用添加剤としての有用性が高い。

はじめに

尿は、非侵襲的であり患者への負担が少なく容易に採取できることから、日常検査において検体としてよく用いられるが、生理的日内変動を認める項目では、臨床的意義の高い結果を得るため24時間蓄尿が行なわれる。蓄尿を行う際、検査目的に応じて様々な添加剤が使用されるが、その1つに6N塩酸がある。6N塩酸を用いた蓄尿は酸性蓄尿と呼ばれ、代表的な酸性蓄尿項目として以下の項目が挙げられる。

カテコールアミン分画である尿中のアドレナリン(A)、ノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)、メタネフリン分画であるメタネフリン(MN)、ノルメタネフリン(NMN)およびバニリルマンデル酸(VMA)、ホモバニリン酸(HVA)等は、いずれも褐色細胞腫や神経芽細胞腫の診断目的で測定される。

褐色細胞腫とは、副腎髄質あるいは傍神経節の細胞で発生する腫瘍であり、腫瘍細胞から大量にカテコールアミン(A、NA、DAの総称)が分泌されることにより、交感神経の興奮状態が続く結果、高血圧、動悸、頭痛、発汗などを引き起こす疾患である。

一方、神経芽細胞腫とは、小児がんの一種であり、褐色細胞腫同様、神経堤細胞に由来した腫瘍の影響で多量のカテコールアミンが生成される疾患である。

これらの疾患ではカテコールアミンが大量に生成されるため、尿中に通常より多量のカテコールアミンが排泄される。したがって、尿中カテコールアミンおよびその代謝関連項目であるMN、NMN、VMA、HVAの測定は、上記疾患の診断や治療方針を決める上で重要な検査に位置づけられている。

この他に、同じように内分泌ホルモン過剰生成を引き起

こす腫瘍としてカルチノイド腫瘍(消化管腫瘍)が知られている。カルチノイド腫瘍は小腸のホルモン産生細胞やその他消化管細胞にできる腫瘍で、トリプトファンから多量のセロトニンを産生する。その結果、セロトニンおよびその代謝物が過剰となり尿中に排泄されてくるため、セロトニンの最終代謝物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)が診断に用いられている。この5-HIAAも酸性蓄尿項目の1つである。

一般的に尿検査では、一回の排泄で得られる部分尿を検体として用いることが多い。

部分尿では、水分摂取、発汗、運動等といった病態とは関係のない要因により、目的成分濃度が変動することがある。そのため部分尿を検体とする場合は、再吸収がなく一日排泄量が約1gと安定しているクレアチニンを利用し、目的成分濃度を尿中クレアチニン濃度で補正した値を代用する方法がある(CRE補正)。確かに、CRE補正は患者負担が少ない優れた方法ではあるが、代用の適否は項目により異なり、腎疾患患者や小児では24時間蓄尿の結果を反映しにくい等の問題もある。

先述のA、NA、DA、MN、NMN、VMA、HVA、5-HIAAといった内分泌ホルモンおよびその関連物質は、生理的日内変動を認めるためCRE補正での評価が難しいとされている。

カテコールアミンおよびその代謝物質では、24時間蓄尿における一般的な問題である細菌や真菌の繁殖による目的成分の分解、変性の抑制に加え、当該成分が中性～アルカリ性条件下で不安定となる問題を解決しなければならない。たとえ、排泄された尿がアルカリ尿ではなかったとしても、その後の細菌増殖に伴うアルカリ化により検査データが低下するケースが確認されている。このため、これまで臨床現場では6N塩酸を添加し蓄尿を行ってきたが、6N塩酸は劇物であるため、その取扱いと管理は容易ではなかった。

長年、6N塩酸に代わる安全な尿添加剤の市販が望まれていたものの、適当な代用添加剤はこれまでなかった。

この度、安全性の高い酸性蓄尿用添加剤「酸性ユリメジャー・T」(関東化学)が開発されたのを機会に、その日常検査への適用可否に関する評価を行った。

I 材料および方法

1. 試薬

尿添加剤には、6N塩酸、酸性ユリメジャー・T(酸性UMT;関東化学)を用いた。

2. 測定試料

酸性UMTの性能評価の各試験には、社内ボランティアの新鮮尿を用いた。

3. 検査項目

A、NA、DA、MN、NMN、VMA、HVA、5-HIAAを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定した。

4. 測定装置

各検査項目の測定には、HPLCシステム(島津製作所、日立製作所、日本分光)を用いた。また、カラムについては8項目共通でC18(和光純薬工業)を使用した。その他として、A、NA、DAに陽イオン交換カラム(東ソー)、MN、NMNにイオン交換カラム(和光純薬工業)、VMA、HVAに強酸性陽イオン交換カラム(ラボコーテック)を用いた。

5. 測定条件

社内試験法により測定を行った。

6. 酸性UMTの性能評価

1) 測定内再現性

ボランティア3名(a,b,c)の新鮮尿75 mLに酸性UMTを1/2包溶解した。なお、このときの酸性UMT濃度は、酸性UMT 1包を1500 mLの尿に添加したときの10倍濃度に相当する。次にボランティア3名(a, b, c)の新鮮尿45 mLに対し、それぞれの酸性UMT液を5 mL添加後転倒混和した後、25℃で24時間放置*した。この検体について、n=10で測定し、平均値(Ave.)±標準偏差(SD)、変動係数(CV)を求めた。

*25℃で24時間放置することで24時間蓄尿の扱いとした。

2) 測定間再現性

測定内再現性試験で調製した試料をそれぞれ5本の試験管に分け、-20℃で凍結させた。この試料を1日それぞれ1本ずつ融解し、n=2の平均値を求めた。この操作を5日間実施し、5日間のAve.±SD、CVを求めた。

3) 酸性 UMT 添加尿の 6N 塩酸添加尿との相関性

ボランティア 100 名の新鮮尿を用い、下記 2 種類の試料を調製した。

(1) 6N 塩酸添加尿

尿 9.9 mL に対し 6N 塩酸を 0.1 mL 添加した。

(2) 酸性 UMT 添加尿

尿 9 mL に対し酸性 UMT 液を 1 mL 添加した。

(1) および (2) で調製した試料を 25℃ で 24 時間放置後、

各項目を測定した。相関分析は、塩酸添加尿の値を X、酸性 UMT 添加尿の値を Y とし、線形回帰式 ($Y=aX+b$)、相関係数 (r) を求めた。

4) 各測定項目の保存安定性

a、b、c の 3 検体を用い、酸性 UMT 添加検体と塩酸添加検体を調製した。各調製試料の凍結 (-20℃、28 日間) 保存における各項目の酸性 UMT 添加検体と塩酸添加検体の変動について比較した。

II 結果

1. 測定内再現性

各検査項目の Ave. ± SD および CV を表 1 にまとめた。

表 1 測定内再現性

	検体 a		検体 b		検体 c	
	Ave. ± SD	CV	Ave. ± SD	CV	Ave. ± SD	CV
A ¹⁾	7.03 ± 0.08	1.17%	12.64 ± 0.18	1.41%	14.71 ± 0.20	1.34%
NA ¹⁾	122.84 ± 2.73	2.22%	63.88 ± 1.02	1.59%	194.63 ± 3.53	1.81%
DA ¹⁾	194.63 ± 3.53	1.81%	14.71 ± 0.20	1.34%	589.15 ± 7.77	1.32%
MN ²⁾	0.072 ± 0.004	5.56%	0.057 ± 0.005	8.77%	0.101 ± 0.003	2.97%
NMN ²⁾	0.218 ± 0.004	1.83%	0.106 ± 0.005	4.72%	0.375 ± 0.011	2.93%
VMA ²⁾	3.44 ± 0.05	1.51%	1.87 ± 0.05	2.57%	4.64 ± 0.05	1.12%
HVA ²⁾	4.66 ± 0.05	1.12%	2.28 ± 0.04	1.84%	4.53 ± 0.07	1.48%
5-HIAA ²⁾	2.47 ± 0.07	2.71%	1.11 ± 0.03	2.88%	5.89 ± 0.13	2.19%

単位: 1) μg/L 2) mg/L

2. 測定間再現性

各検査項目の Ave. ± SD および CV を表 2 にまとめた。

表 2 測定間再現性

	検体 a		検体 b		検体 c	
	Ave. ± SD	CV	Ave. ± SD	CV	Ave. ± SD	CV
A ¹⁾	7.02 ± 0.10	1.38%	11.92 ± 0.41	3.46%	13.97 ± 0.67	4.77%
NA ¹⁾	124.36 ± 2.75	2.21%	60.75 ± 2.23	3.67%	186.41 ± 8.54	4.58%
DA ¹⁾	633.62 ± 30.29	4.78%	328.01 ± 14.52	4.43%	563.75 ± 21.29	3.78%
MN ²⁾	0.063 ± 0.004	6.35%	0.055 ± 0.005	9.09%	0.105 ± 0.004	3.81%
NMN ²⁾	0.211 ± 0.004	1.90%	0.103 ± 0.004	3.88%	0.367 ± 0.008	2.18%
VMA ²⁾	3.38 ± 0.10	2.87%	1.89 ± 0.02	1.16%	4.86 ± 0.17	3.44%
HVA ²⁾	4.74 ± 0.11	2.28%	2.36 ± 0.07	3.14%	4.60 ± 0.09	2.04%
5-HIAA ²⁾	2.39 ± 0.07	3.10%	1.12 ± 0.03	2.41%	5.98 ± 0.05	0.75%

単位: 1) μg/L 2) mg/L

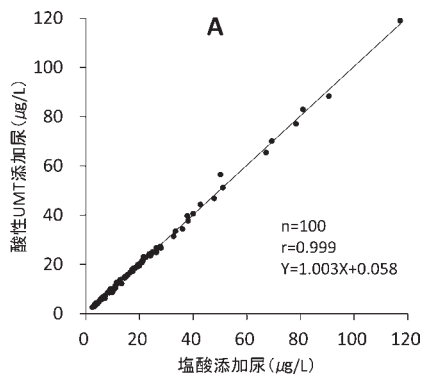


図1 アドレナリン(A) 相関図

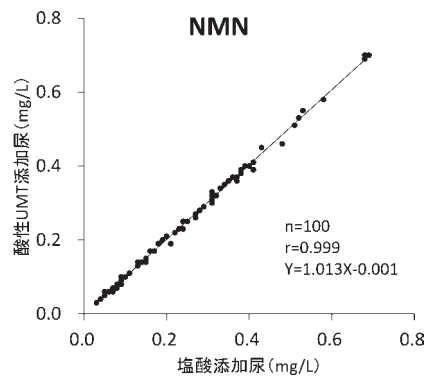


図5 ノルメタネフリン(NMN) 相関図

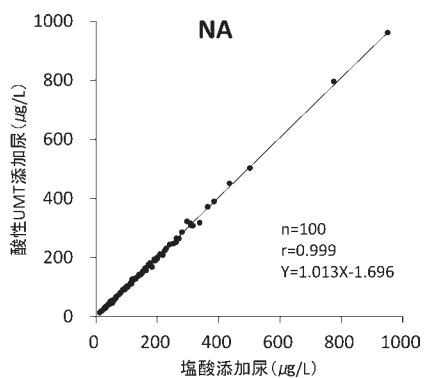


図2 ノルアドレナリン(NA) 相関図

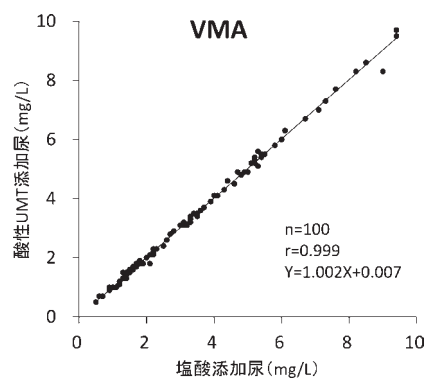


図6 バニルマンデル酸(VMA) 相関図

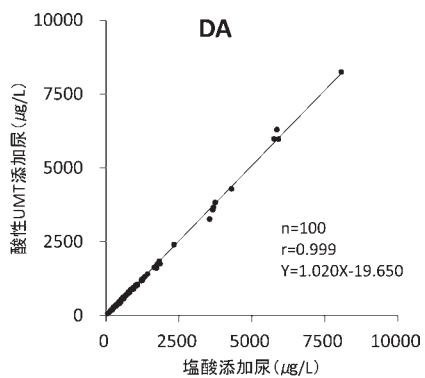


図3 ドーパミン(DA) 相関図

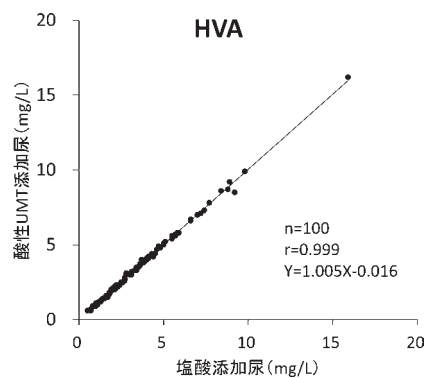


図7 ホモバニリン酸(HVA) 相関図

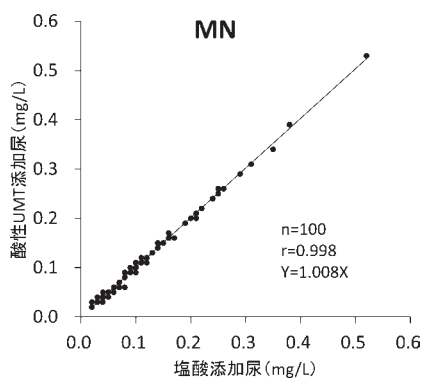


図4 メタネフリン(MN) 相関図

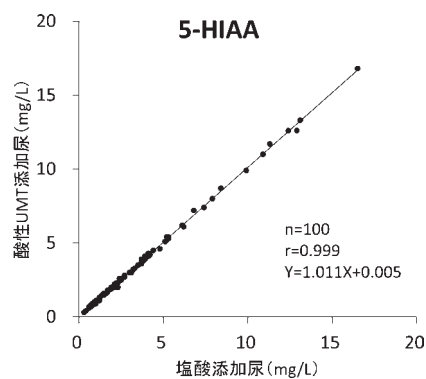


図8 5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA) 相関図

3. 酸性 UMT 添加尿の 6N 塩酸添加尿との相関性

A では $r = 0.999$ および $Y = 1.003X + 0.058$ 、NA では $r = 0.999$ および $Y = 1.013X - 1.696$ 、DA では $r = 0.999$ および $Y = 1.020X - 19.650$ 、MN では $r = 0.998$ および $Y = 1.008X$ 、NMN では $r = 0.999$ および $Y = 1.013X - 0.001$ 、VMA では $r = 0.999$ および $Y = 1.002X + 0.007$ 、HVA では $r = 0.999$ および $Y = 1.005X - 0.016$ 、5-HIAA では $r = 0.999$ および $Y = 1.011X + 0.005$ となった(図 1~8)。

4. 各項目の保存

全ての項目において、酸性 UMT 添加尿、塩酸添加尿ともに、凍結保存で 28 日間の変動は認められなかった。

III 考察

尿中の A、NA、DA、MN、NMN、VMA、HVA、5-HIAA の 8 項目の測定では、検体として 24 時間蓄尿を用いることが臨床上有意義である。これらの項目はアルカリ性条件下では不安定であり、蓄尿時に細菌繁殖による尿のアルカリ化が進行すると、濃度が低下する。このため現在は、尿に 6N 塩酸を添加し、尿を酸性に保つ方法がとられている。

しかし、6N 塩酸は劇物指定品であり、外来患者の自宅蓄尿用に譲渡することが困難であった。また入院患者の蓄尿であっても劇物管理が必要なため、検査科や薬剤科では負担となっていた経緯がある。

そこで、毒劇物に該当しない安全な尿防腐剤として酸性 UMT に注目し、日常検査への適用可否について評価を行った。尿添加剤としての要件は、分析法である HPLC に影響を与えないこと、6N 塩酸と同等の測定対象物質の安定性が得られることが挙げられる。

酸性 UMT 添加尿の測定精度への影響については、測定内および測定間再現性の結果、いずれの項目に対しても影響を与えないことが確認された。

また、酸性 UMT の 6N 塩酸に対する同等性評価を相関性試験により確認した結果、今回検討した項目の全てにおいて良好な相関性が得られ、かつ乖離検体も認められなかったことから、酸性 UMT は従来と同等の性能を有すると判断した。さらに、長期間の検体保存安定性(凍結)についても、A、NA、DA、NM、NMN、HVA、5-HIAA、VMA の 8 項目全てにおいて酸性 UMT は 6N 塩酸とほぼ同等の

成績が得られた。

このことから、酸性 UMT は 6N 塩酸に代わる尿添加剤として、日常検査に十分使用可能であり、さらに劇物に該当しない点については検査業務の効率化の観点から非常に有用である。特に安全確保の点において、医療従事者、患者ともにリスク管理における経済的、精神的負担の軽減につながると期待される。

IV 結語

これまで、酸性蓄尿において安全管理上の問題であった 6N 塩酸に代わる尿添加剤として、「酸性ユリメジャー・T」が入手可能となった意義は大きい。酸性蓄尿項目以外においても、防腐剤添加は必要不可欠であるが、特に精度保証と安全管理において同様の課題を抱えている。

蓄尿用防腐剤は経費増につながるの考えから、何も添加されていない蓄尿が検査に用いられることが少なくない。検査における精度保証および安全管理といった基本要件に対しては、経済事情のみを優先することなく、総合的に判断すべきである。

参考文献

- 1) 中井利昭. 検査と技術. 1992, 20(6), 218-220.
- 2) 山内穰滋, 大石誠一, 佐藤辰男. 検査と技術. 1992, 20(6), 221-223.
- 3) 吉村学. 検査と技術. 1992, 20(6), 224-225.
- 4) 重富秀一. 検査と技術. 1992, 20(6), 226-227.
- 5) 堀内裕次, 増渕純一, 田中一世, 屋代剛典, 今野幸浩, 鷹箸孝一, 及川信次, 菱沼昭. 医学検査. 2012, 61(6), 1002-1009.
- 6) 小寺恵美子, 戸松宏明, 松島佳子, 中村明子, 森口洋子, 高笠信之, 森下芳孝, 西岡淳二, 中谷中, 登勉. 日本臨床検査自動化学会会誌. 2010, 35(5), 880-883.