

## イオンクロマトグラフによる血清及び尿分析の検討

星 加 安 之

信州大学医学部衛生学教室

## Study on Ion Chromatographic Analysis of Serum and Urine Specimens

Yasuyuki HOSHIKA

Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine

## 1. はじめに

血液は、生体内循環によって組織器官での新陳代謝に必要な物質を供給し、代謝老廃物を回収して生体のあらゆる細胞、臓器の実態を総合的に反映しているが、血液自体、生体の内部環境 (Claude Bernardによる) となって組織・細胞の生存、維持をつかさどっている。健康人ではこの内部環境は、内分泌系および自律神経系との複雑な協調機序によって、量的、質的に比較的せまい範囲に調節されている。この体液成分の厳しい恒常性 (Cannonのいわゆる恒常性…homeostasis) は、まさに生体を健康に維持する第一条件とされ、その乱れが病気であり、その崩壊が死であると考えられている。血液 (血清) の臨床分析は、その恒常性を原理として疾患時におこるわずかな変動を検知しようとするもので、現代の臨床化学的検査の主役となっている。現在までに濃度が明らかにされている血液中の化学成分は200種以上といわれ (たとえば、血清100ml中には、6~8gにおよぶタンパク質から4~5 $\mu$ g程度のProtein-bound iodineや酵素、ホルモン、ビタミンなどの生理活性の強い極微量成分まで多種多様のものがふくまれている) 約30種類が日常の検査として、その他100項目におよぶ血液成分が特殊の病態を探る情報として医療の第一線で分析されるようになってきている。また、血清 (血漿) の陰陽イオンの変動は、病態を素早く反映するもので「アニオンギャップ」 $[\text{Na}^+] - [\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-]$  (meq/l) として診断上大きな意義が認められている。Lolekhaは正常値を、19~28meq/lとし、これを上回る例として腎不全、心不全、癌、低値としてネフローゼ、肝硬変を指摘している。(Clin. Chem., 29, 279-283 (1983); 坂岸良克: ぶんせき, 1985, 618-625)。

一方、尿の組成 (化学成分情報) は、血漿その他の細胞外液の組成の変動を反映するとともに、腎の機能をも反映している。また、尿路の異常も、血液、膿、細菌、脱落上皮細胞などの尿中混入によって、尿の検査により明らかにされる。このため尿が血液に次いで最も広く臨床検査の対象とされている。

ところで、Smallらにより1975年に開発されたイオンクロマトグラフ分析法 (Anal-Chem., 47, 1801-1809 (1975)) は、無機、有機の陰陽イオンのみならず、イオン分析の全域に近づきつつあり、個人差がなく、ppt ( $10^{-12}$ ) レベルの極微量分析を十数分程度で、しかも極めて高分離のもとに測定が可能となってきており、多方面から注目されている。とくに陰イオンについては、他に有用な分析手法がなかったこともあって、今後広範囲の情報がえられることが期待されている。イオンクロマトグラフ分析法は開発直後より、臨床医学および薬学分野にもいち早く導入されている。Andersonは、4つの体液 (血清、組織抽出物、尿、脳脊髄液) 中ナトリウム、アンモニウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、亜硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩の各イオンを、40~100倍希釈後、ミリポアフィルターで濾過するのみで分析を可能とした (Clin.Chem., 22, 1424-1426 (1976))。RehfeldおよびLokenは血清カルシウムとマグネシウムイオンの迅速法を報告しており、原子吸光法よりも再現性のすぐれていることを明らかにした (Clin.Chem., 26, 1232-1233 (1980))。Richらは体液 (血漿および尿中の乳酸、ピルビン酸、パニリルマンデル酸などの有機酸分析法を確立した (Clin. Chem., 26, 1492-1498 (1980)). ; Liquid Chromatography Clinical Analysis, ed. by L. J. Marton and P. M. K-abra, The Humana Press, 1981, Chapter 17,

Organic Acids by Ion Chromatography, pp 393-407(1981)). またColeおよびScriberは、体液中(血漿、脳脊髄液、肝組織抽出液)中の無機硫酸塩の測定を行ない、バリウム沈澱法による測定結果と相関が高く、ヘパリン添加による妨害がなく、しかも新生児は成人に比較して硫酸イオンが高い傾向にあることを示した(J. Chromatogr., 225,359-367(1981)). 一方Robertsonらは、尿中尿酸塩と尿路結石との関連を究明している。(Clinica Chimica Acta 126,91-99(1982)). さらにLebelおよびYenは硫酸還元細菌の代謝パターンクロマトグラムを報告した(Anal. Chem., 56, 807-808(1984)).

我が国においても、血清陰イオンの一斉分析においてBr中毒の例が加野により(日本臨床検査自動化学会第15回大会, p.201 (1983)), 尿中尿酸が小川により(同, p.202)、血清中陽イオンが新谷ら(分析化学, 33, 347-351(1984). ; 分析化学, 34, 109-113(1985))により、生体液中のチオシアニオンおよび人の歯のエナメル質(ハイドロキシアパタイト)処理液中のカルシウムとリンの分析が伊藤により(85Dionexイオンクロマトグラフセミナー, pp.37-40)すでに報告されている。また、亜硝酸製剤を投与した時の投与数時間経過後の血清中の亜硝酸イオンの測定において、投与前血清に比較して亜硝酸イオンが極めて高く検出されることが知られている。

我々は、衛生学的立場から、環境の諸因子と人の健康との相互関連について研究を行ってきているが、昭和58年より継続している長野県下須高地方における“硫黄廃鉱下流における水資源の保全と健康の保護に関する研究”の一環として生体試料(血清および尿)のイオンクロマトグラフ分析を検討している。ここでは、アニオンギャップ計測のためにえられた代表的なイオンクロマトグラムについて報告する。

## 2. 実験

イオンクロマトグラフ装置はDionex社製-2010i, 2000i, QICを、カラム及び溶離液は陰イオンについてはHPIC-AG4 50mm×4mm+HPIC-AS4 250mm×4mm. 2.8mMNaHCO<sub>3</sub>+2.25mMNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5ml/min) AFSシステム; 1価の陽イオンについてはHPIC-CG2 50mm×4mm+HPIC-CS2 250mm×4mm 8mMHCl (1.6ml/min) CFSシステム; 重炭酸(炭酸)イオンおよび有機酸については、HPIC-AS1 250mm×9mmサブプレッサーシステムは使用せず、イオン交換後蒸留水(脱イオン水)(0.8ml/min)。

UVモニター(波長可変UVモニター)は、伝導度検出器にシリーズ接続して測定を行った。

血清は、常法により約3,000rpmで分離したものを、脱イオン水で40倍に、尿は100倍希釈したものをそれぞれ0.45μmミリポアフィルターで濾過後、1~2mlを装置に導入した。

## 3. 結果及び考察

### イオンクロマトグラフ分析法による健常者血清のアニオンギャップ測定例

Fig.1には、アニオンギャップをイオンクロマトグラフによって測定した例をイオンクロマトグラムとともに示した。それぞれの測定条件は、2. 実験の項に示した通りである。

前述のように、アニオンギャップは陰陽イオンの変動から各種の病態を素早く知る上で、診断上極めて重視されているもので、イオンクロマトグラフによって迅速に測定が可能である。従来法としては、炎光光度法(またはイオン電極法)および超微量ガス分析器など複数の分析装置を用いる必要があり、前処理操作の複雑さ、妨害成分の影響さらには極めて熟練を要することなどが考えられていたが、今後イオンクロマトグラフ(単独)分析法で極めて容易に測定し、評価できるものと思われる。

体液の電解質組成のうち、細胞内液は主として、K<sup>+</sup>とHPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>により、また細胞外液は主としてNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>により酸・塩基平衡が保たれ、これらの電解質成分はまた細胞内外の浸透圧の調節にも関与している。そしてこれらの各成分が実地臨床において定量分析されている<sup>1)</sup>。

すなわち、Na<sup>+</sup>は細胞外液中の総陽イオンの90%を占め、水の分布および浸透圧の調整ならびに酸・塩基平衡の維持に関する最も重要な成分であって、その代謝は副腎皮質ホルモンによって調節されている。臨床的にNa測定が必要な場合は、水分および電解質代謝の失調を来すような場合、すなわち、飢餓・発汗・熱射病・下痢・下垂体副腎皮質機能障害・心不全・腎不全・ネフローゼ症候群・ステロイドホルモン投与時・利尿剤投与時・アシドーシスなどの場合であるといわれている。正常値135~147mq/l。

Cl<sup>-</sup>は、生体内にあってはNa<sup>+</sup>と共にNaClとして大部分細胞外液中に存在し、血漿総陰イオンの70%を占め、他の電解質と相互関係のもとに水分平衡・浸透圧の調節・酸・塩基平衡などに重要な役割を演じている。Cl<sup>-</sup>はNa<sup>+</sup>などと同様に、体内に貯蔵による余裕がない

が、 $\text{HCO}_3^-$ によってある程度機能的に代謝されるので、その損失の影響は、 $\text{Na}^+$ の欠乏ほど深刻ではないとされている。正常値98~108meq/l。

$\text{HCO}_3^-$ は、陰イオンの中では $\text{Cl}^-$ に次いで量的に多いもので、この両者で体液中の総陰イオンの約85%を占め、たがいにその増減を補って、体液の酸・塩基平衡の維持に当たっているといわれている。正常値24~31meq/l。

ここでは、アニオンギャップに対応する代表的イオ

ンクロマトグラムを示したにとどまる。分析時間は、試料準備を含め1検体あたり約1時間であった。

アニオンギャップを5~10meq/lとする文献(金井・金井・臨床検査法提要改訂第29版(1983)(金原出版), p.565)、また一般には測定しない硫酸イオン、有機酸イオン、蛋白イオンの総和をR(Reciduation)とするもの(正常値25meq/l,日野原重明:水と電解質の臨床第4版(1963)(医学書院) p.18~19)などがあり、これらを指標とした病的変化との関係が知られている。

イオンクロマトグラフ分析法によれば、この例のよ

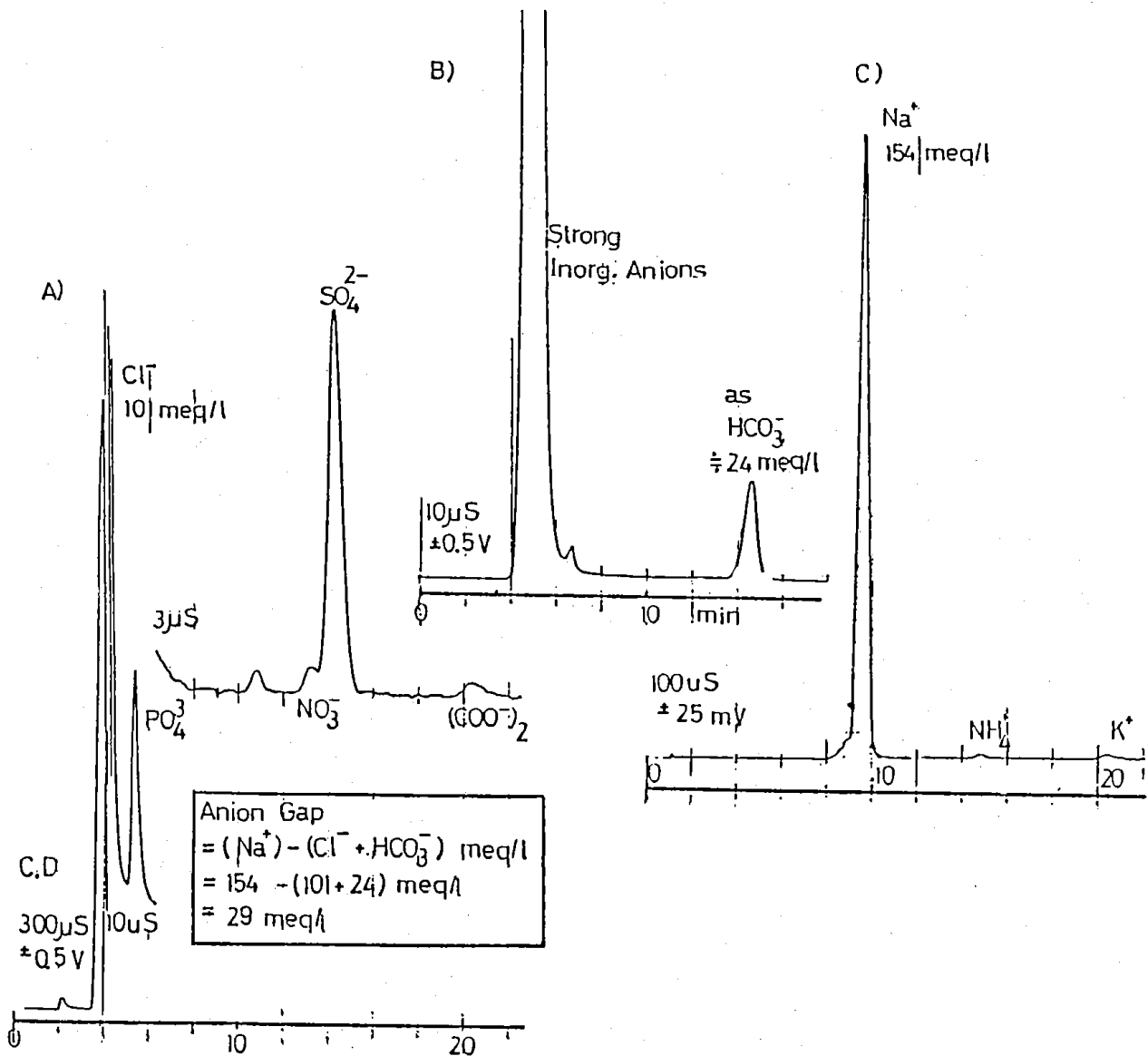


Fig. 1 Typical ion chromatograms of inorganic anions (A), carbonate (B), and alkali metals and ammonium (C) in serum of a normal female(62y. old)

Dilution (1/40) with deionized water

Filter out, 0.45 $\mu\text{m}$ .millipore filter

Instrument : Dionex Qic IC

うに各種疾病の診断・進行の程度の判定、合併症との関連、治療、外科的手術前後の変化および予後の判定などに極めて有用な情報が提供されるものと考えられる。これまでに内科疾患患者が合併症として肝・腎不全、糖尿病、胆石症を伴う場合は、極めて複雑であるが、UVモニターにより有機酸（乳酸、グリコール酸、酢酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸など）と考えられる著大ピークが検出されている。今後さらに、これらを詳細に検討していきたい。

本研究に要した経費の一部は、「財団法人日本生命財団」昭和58年、59年度研究助成金（助成番号C83110077；C84110247）および昭和63年度中富健康科学振

興財団研究助成金によってまかなわれたものであり記し謝意を表す。本研究にあたり試料採取・分析にご協力をいただいた関係各位に深謝致します。また、本稿は'86ダイオネックスイオンクロマトグラフセミナー（於東京）において発表された要旨に手を加えてとりまとめたものであり、講演の機会を与えられ投稿を許可していただいた安部商事株式会社ならびにイオンクロマトグラフ分析法に関する研究の道にご教導いただいた、恩師東京大学名誉教授埼玉工業大学学長武藤義一先生ならびに信州大学医学部衛生学教室主任教授村山忍三先生のご指導・ご厚情に深謝致します。

〈'86ダイオネックスイオンクロマトグラフセミナー1986年東京において一部講演発表〉

## 文 献

- 1) たとえば、藤井・小延編：臨床化学入門—病気の化学展望（1969）（広川書店）；金井・金井：臨床検査法提要、改訂第29版（1983）（金原出版）；カンタロウ・トランパー吉川春寿訳臨床生化学（1955）（朝倉書店）；日野原重明、水と電解質の臨床第4版（1963）（医学書院）などがある。  
最近の総説として、及川紀久雄、斎藤浩子：ぶんせき，1982，94—99；花岡 譲：同誌，1986，162—168；佐藤寿邦：同誌，1988，575—580；J—S. Fritz：Anal. Chem., 59, 335A—344A（1988）などがある。