

イオン交換クロマトグラフィーによる尿中
5-Hydroxy-3-indole acetic acid, 5-Hydroxy-tryptophan
および 5-Hydroxytryptamine の分離定量

長尾 愛彦*

Determination of Urinary Serotonin, 5-Hydroxy-tryptophan
and 5-Hydroxy-3-indole Acetic Acid using Strong Cation-exchange Resin
with Colorimetric Detection

Naruhiko NAGAO*

Abstract

The author has examined the chromatographic method to measure urinary 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 5-hydroxytryptophan (5-HTP), and serotonin (5-HT) by using strong cation-exchange resin (Dowex 50 W-X4) with colorimetric detection. This method has been recognized to be superior in its reliability and to be able to remove the influence of unknown pigments which appear in the time of the condensation of urine and have their peak about 400 nm. And urinary serotonin and its derivatives have not been changed by urinary monoamine oxidase in the bladder.

Urinary 5-HIAA, 5-HTP, and 5-HT have been determined by that method with the following results; (1) Urinary 5-HIAA, 5-HTP, and 5-HT of the patients with progressive muscular dystrophy have shown a little lower levels; those of the patients with human growth hormone deficiency have shown lower levels than those of the healthy young male. (2) Urinary 5-HTP/5-HIAA ratio and 5-HT/5-HIAA ratio of the patients with progressive muscular dystrophy and human growth hormone deficiency have been respectively 60 - 70 % and about 80 % compared with the ratios of the healthy young males.

KEY WORDS : *Urine, 5-HIAA, 5-HTP, Serotonin*

Serotonin (5-HT) は tryptophan から生成される生体活性アミンの一種で、精神機能の保持に重要な役割を演じている。

Tryptophan は tryptophan-5-hydroxylase により 5-hydroxytryptophan (5-HTP), 更に 5-hydroxytryptophan decarboxylase により脱炭酸

され、5-HT を経て 5-hydroxy-3-indole acetic acid (5-HIAA) となり、最終代謝産物として尿中に排出される。¹⁵⁾

尿中の 5-HIAA は、高濃度の場合には FeCl₃ 溶液を用いる発色法があるが¹⁶⁾一般には尿を酢酸とエーテルで抽出し、1-nitroso-2-naphthol およ

* 鹿屋体育大学 National Institute of Fitness and Sports in Kanoya, Kagoshima, Japan.

び亜硝酸試薬を用いて定量する Pierce の方法¹³⁾が用いられる。しかし、中島ら¹¹⁾は濃縮尿の二次元クロマトグラフィーにより、尿中に 5-HT の存在することを認めており、また、Oates¹²⁾はアンバーライト IRC を用い、尿中の 5-HT を測定している。一方、Lindqvist⁸⁾は強イオン交換樹脂 Dowex 50W-X4 を用い、脳内の 5-HIAA、5-HTP の分離定量を行い、Atack ら¹⁾は Lindqvist の方法を改良し、5-HT をも定量できることを示している。一方、高速液体クロマトグラフィーの進歩により、前処理された体液試料の 5-HT ならびにその代謝

産物についての定量法が多数報告されている。^{2-7,9)}

5-HTP および 5-HT はいずれも 5-hydroxy-indole 化合物で、図 1 に示すとおり、Pierce の 5-HIAA 定量に用いる 1-nitroso-2-naphthol・亜硝酸試薬に反応し、5-HIAA とほぼ同じ分子吸光係数を有する発色反応を示す。そこで、著者は Atack らの強イオン交換樹脂を用いた血中 5-HIAA、5-HTP および 5-HT の分離定量法を尿に適用し、尿中の 5-HIAA、5-HTP ならびに 5-HT の分離定量をこころみた。

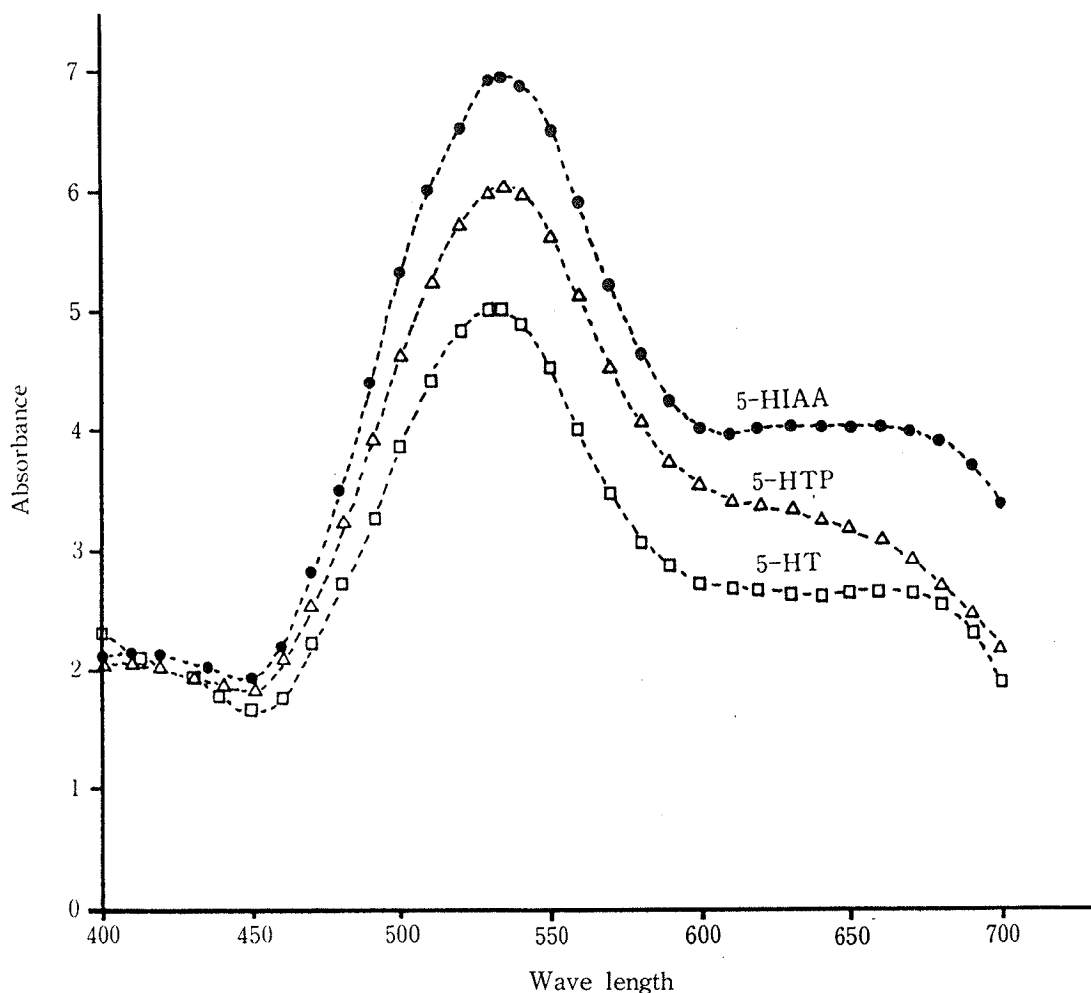


Fig. 1. Absorption spectra of 5-HIAA, 5-HTP and 5-HT by the use of 1-nitroso-2-naphthol-nitrite reagent.

実験方法

1. カラムによる分離

強イオン交換樹脂カラムによる分離操作は Atack らの¹⁾方法に準拠したが、その概要をつぎに示す。

Lindqvist の方法²⁾により調整した Dowex 50W-X4 5 ml をポリエチレン製カラムにつめ、適量の精製水でカラムを洗う。10 ml の被験尿を酢酸により pH2.5 に調整し、その遠心上清をカラムにかける。ついで、25 ml の 60%メタノールで 5-HIAA を溶出する。次に、20 ml の精製水、10 ml の 0.5M リン酸緩衝液、pH6.5 を流したのち、30 ml の同上緩衝液で 5-HTP を採取する。20 ml の精製水でカラムを洗い、25 ml の 2.5 N HCl 50%エタノールで 5-HT を溶出する。得られた 5-HIAA、5-HTP および、5-HT 溶出画分はただちにつぎの濃縮操作を行う。

2. 濃縮

5-HIAA、5-HTP、および 5-HT の各溶出液

はただちに 56℃ 以下で減圧下に蒸発乾固させ、精製水を加えて 2.5 ml とし検液とする。

3. 比色定量

比色定量は Pierce の方法を一部改良した瀬川らの方法¹⁴⁾によった。すなわち、検液 2.5 ml に 1 g の NaCl、12.5 ml の氷酢酸、12.5 ml のエチルエーテルを加え、1 分以上かけてよく混和し、2000 rpm で 1 分間遠心する。エーテル層 10 ml をとり、56℃ で蒸発乾固させ、2 ml の精製水を加え、5 分間静置する。その 1 ml に 0.5 ml の 1-nitroso-2-naphthol 試薬、0.5 ml の亜硝酸試薬を加え、よく混和し、56℃ で 5 分間インキュベーション後水中に冷す。5 ml の酢酸エチルを加え、よく混和し、30 分間室温に置いた後、下層の吸光度を 650 nm で測定する。5-HIAA、5-HTP、および 5-HT の量は各標準液で作成した検量線から求める。

試薬はいずれも特級を用いる。

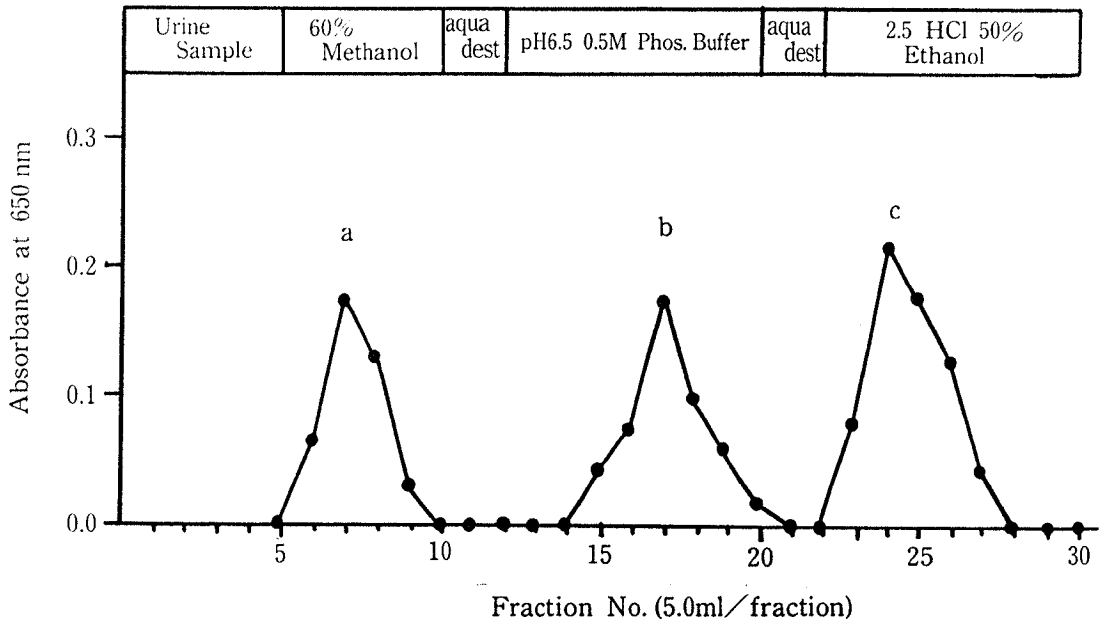


Fig. 2. Fractionation of the mixture of 5-HIAA, 5-HTP and 5-HT on Dowex 50 W-X4. Each fraction of 5.0 ml was collected and the absorbance was determined at 650 nm. Fraction a, b and c were 5-HIAA, 5-HTP and 5-HT, respectively.

結果ならびに考察

1. 分離操作の検討

瀬川ら¹⁴⁾は血液中の5-HIAA, 5-HTPおよび5-HTのDowex 50W-X4による分離定量に際しては、血液9mlに対しDowex 50W-X4樹脂を0.5ml用いている。しかし、尿中には種々の塩類が多く含まれているので、本研究では100~200メッシュの樹脂5mlを用い、尿量25mlでその回収率を求めた。すなわち、25mlの尿を氷酢酸でpH2.5とした後、これに5-HIAA, 5-HTP, 5-HTそれぞれの標準液を加え、5mlのDowex 50W-X4による吸着、溶出実験をこころみたところ図2に示すとおりそれぞれ満足すべき吸着、溶出が進んでいることが認められた。なお、各溶出液により溶出された画分を濃縮し、n-butanol: water = 5:1の展開溶媒でペーパークロマトグラフィーを行ったところ、5-HIAA, 5-HTおよび5-HTPのRf値、0.75, 0.41および0.12¹⁵⁾のそれぞれと一致して1-nitroso-2-naphthol・亜硝酸試薬による紫色の各単一スポットがみとめられた。

2. 濃縮操作について

被験尿39検体を用いて56℃、減圧下で4倍に濃縮する操作における回収率を求めると、5-HTの平均回収率は86.4%で、その信頼限界($\alpha = 0.05$)

は90.0% $\geq m \geq 82.8\%$ という結果を得た。

Atackら¹⁾は分離定量に際しての5-HTの回収率は86.6%であるとしており、ほぼ同様の結果である。なお、本法における5-HIAA, 5-HTPの回収率はそれぞれ103.7%, 95.5%であった。これらの結果から、5-HIAA, 5-HTP, 5-HTは56℃以下での2回の濃縮、乾固の操作を加えてもほぼ満足できるつ回収率を示すものと考えられる。

3. 再現性について

本法の再現性を3検体尿について各2回づつ行った結果は表1に示すとおりで、いずれもよい再現性を示している。

Table 1. Reliability of the new method

Sample		5-HIAA	5-HTP	5-HT
a	I	0.200	0.140	0.120
	II	0.230	0.130	0.130
b	I	0.215	0.105	0.090
	II	0.215	0.100	0.090
c	I	0.185	0.080	0.080
	II	0.175	0.080	0.080

5-HIAA, 5-HTP and 5-HT in urine were determined twice for each sample. Details of the determination are given in "Experimental methods,,". Values represent the absorbance at 650 nm.

Table 2. Characteristics of the fractions by means of paper chromatography concerning with serotonin and its metabolites.

Substance	60%methanol fraction	pH6.5 phosphate buffer fraction
5-HTP	-	+
α -methyl-5-hydroxytryptophane	-	+
5-HT	-	-
α -methyl-5-hydroxytryptamine	-	-
N-acetyl-5-hydroxytryptamine	+	-
bufotenin	-	-
5-methoxytryptamine	-	-
N-acetyl-5-methoxytryptamine	+	-
5-HIAA	+	-
5-hydroxytryptophol	+	-

4. Indole 化合物について

Lindqvist⁸⁾は Dowex 樹脂による 5-HIAA, 5-HTP の分離定量に際しては表 2 に示すとおり 5-OH-indole および 5-OCH₃-indole 化合物が各溶出画分に溶出されると述べている。しかし、5-OCH₃-indole 類は 5-HIAA, 5-HTP らと同じく 295/545 nm で蛍光を発するが、1-nitroso-2-naphthol・亜硝酸試薬では発色しない。一方、 α -methyl-5-hydroxytryptamine, bufotenin はいずれも 5-HT からの生成物であり、5-hydroxytryptophol は 5-HIAA 生成の一段階前の 5-hydroxy-indoleacetaldehyde からの生成物で、それぞれ 5-HT, 5-HIAA と同様に発色することが考えられる。

N-acetyl-5-hydroxytryptamine は 5-HT からの代謝産物であるが、5-OH-indole 化合物で、本法においては 5-HIAA 溶出部に溶出する。しかし、60%メタノール溶出部を濃縮後、n-butanol-水系ペーパークロマトグラフィーでは N-acetyl-5-hydroxytryptamine の Rf 値、0.85 付近には発色は認められなかった。

5. 尿中 5-HIAA, 5-HTP および 5-HT

(1) 日間変動

3名の被験者の早朝第1尿中の5-HIAA, 5-HTP および 5-HT を本法により測定した結果は表3に示すとおりである。5-HIAA 排出量に対する 5-HTP の比率はいずれの場合も大きい変動はみとめられないが、5-HT は 5-HTP に比し

Table 3. Daily variation of urinary 5-HIAA, 5-HTP and 5-HT.

Subject	5-HIAA	5-HTP	5-HT
A	129*	11	39
	135	10	19
	148	16	21
B	95	7	7
	76	8	0
	79	11	11
C	50	5	10
	90	10	10

*Excretion rate ($\mu\text{g}/\text{hr}$)

日間変動が大きくあらわれる傾向がうかがわれる。

(2) 尿中排出量について

20歳代および30歳代の計7名の健康男子、7名の進行性筋ジストロフィ患者の早朝第1尿および成長ホルモン欠損児の1日畜尿中の尿中排出5-HIAA, 5-HTP および 5-HT 量は図3に示すとおりである。成長ホルモン欠損児では5-HIAA, 5-HTP, 5-HT いずれも尿中への排出量は少ない。5-HIAA 排出量に対する 5-HTP, 5-HT の排出量の割合は表4に示すとおりで、健康男子に比し、進行性筋ジストロフィ患者では60~70%、成長ホルモン欠損児では約80%であった。

(3) Pierce 法と本法との比較

5-HIAA の正常人の尿中排出量は 2~8 mg/day とされている。¹⁵⁾本法により測定した尿を Pierce の方法により求めると図4に示すとおりである。健康人、進行性筋ジストロフィ患者ではいずれも就寝中の尿で平均 190 $\mu\text{g}/\text{hr}$, 140 $\mu\text{g}/\text{hr}$ の排出量で、文献値とよく一致しているが、成長ホルモン欠損児では低値を示している

本法により 5-HIAA を分離定量すると、Udenfriend¹⁵⁾の正常値に比較し低値を示すが、尿のカラム溶出分画を 56℃以下で濃縮すると 400 nm 付近にピークを有する色素で、1-nitroso-2-naphthol および亜硝酸試薬には反応しないが、そのもの自体で 650nm 付近に吸収を示す物質が認められ、Pierce の方法ではこの物質をも含めて測定していたためであろうと考えられる。

本法を Pierce の方法と比較すると図5に示すとおりである。成長ホルモン欠損児、進行性筋ジストロフィ患者の場合はそれぞれ相関係数 0.926, 0.861 と正の相関を示した。

(4) 尿中 monoamine oxidase (MAO) の影響

著者はすでに尿は微量ではあるが MAO 活性を示すことを認めている。¹⁹⁾尿は就寝中では8時間以上膀胱内に貯留される。5-HT は MAO により酸化され、5-HIAA へと代謝される。そこで、健康成人尿を pH6.5 とし、5-HTP を添加し、37℃において1時間、2時間、4時間、6時間 incubate し、吸光度を求めたところ表5に示すとおりの結果を得た。6時間 incubate を続けても各成分の

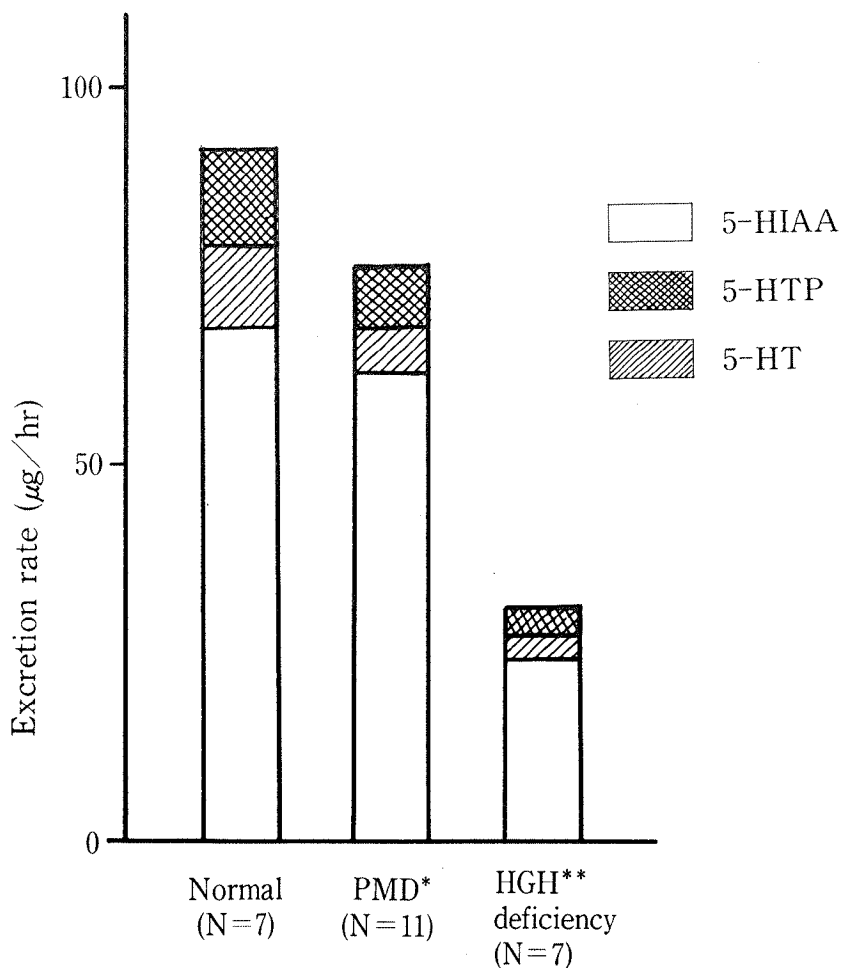


Fig. 3. Urinary 5-HIAA, 5-HTP and 5-HT by the method of this paper.

* PMD: Progressive muscular dystrophy

** HGH: Human growth hormone

Table 4. Ratio of urinary 5-HIAA, 5-HTP and 5-HT.

Subject	N	5-HIAA : 5-HTP : 5-HT
Normal male	7	100 : 15.6 : 17.6
Patient with PMD*	11	100 : 9.3 : 12.1
Patient with HGH** deficiency	7	100 : 12.5 : 14.6

* PMD: Progressive muscular dystrophy.

** HGH: Human growth hormone.

Table 5. Effect of urinary monoamine oxidase on 5-HTP, 5-HT and 5-HIAA.

		incubation time				
		0hr	1hr	2hr	4hr	6hr
absorbance*	5-HTP	0.0105	0.0105	0.0105	0.0095	0.0095
	5-HT	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035
	5-HIAA	0.0055	0.0050	0.0048	0.0045	0.0045

* absorbance was determined at 650 nm

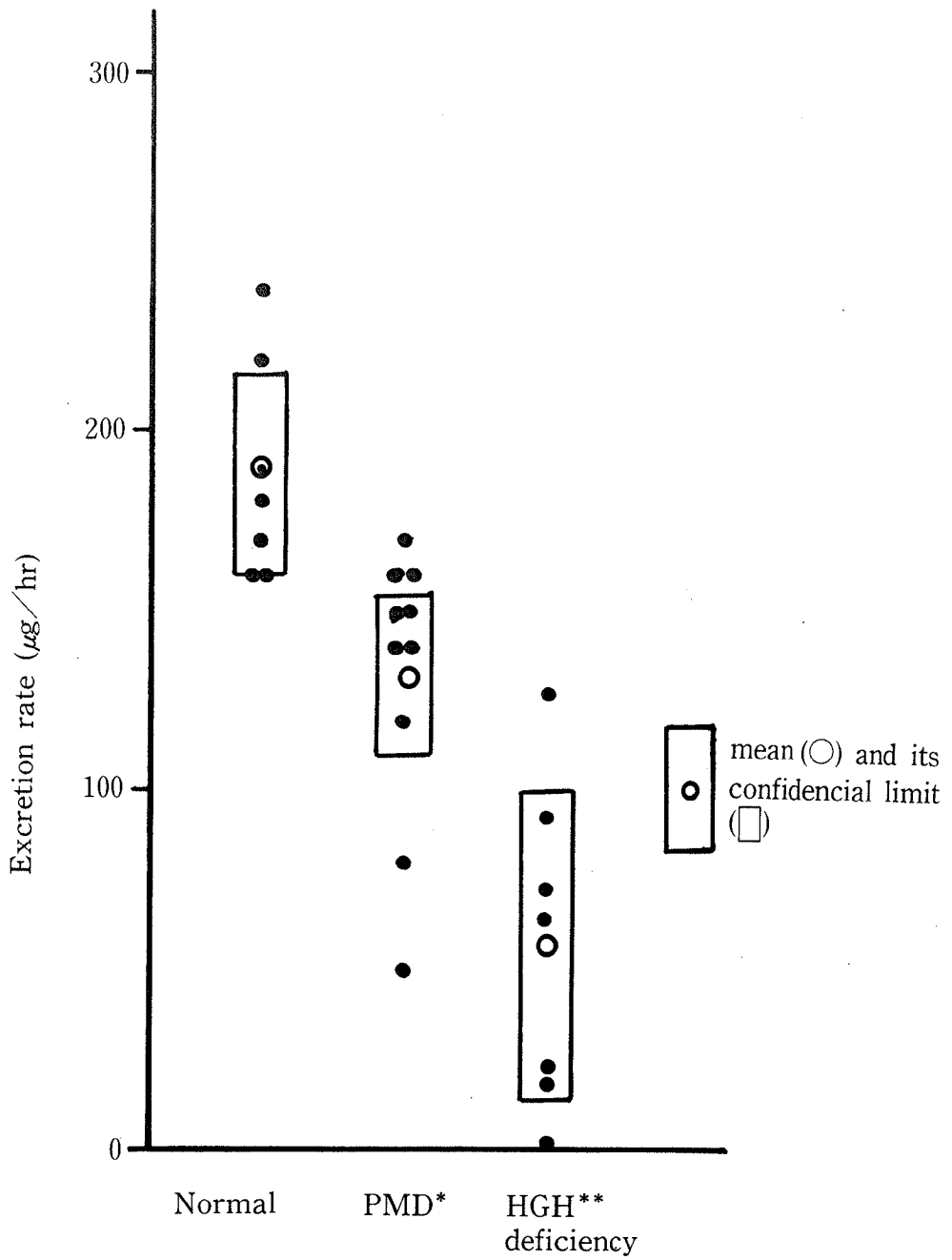


Fig. 4. Urinary 5-HIAA by the method of Pierce
* PMD: Progressive muscular dystrophy
** HGH: Human growth hormone

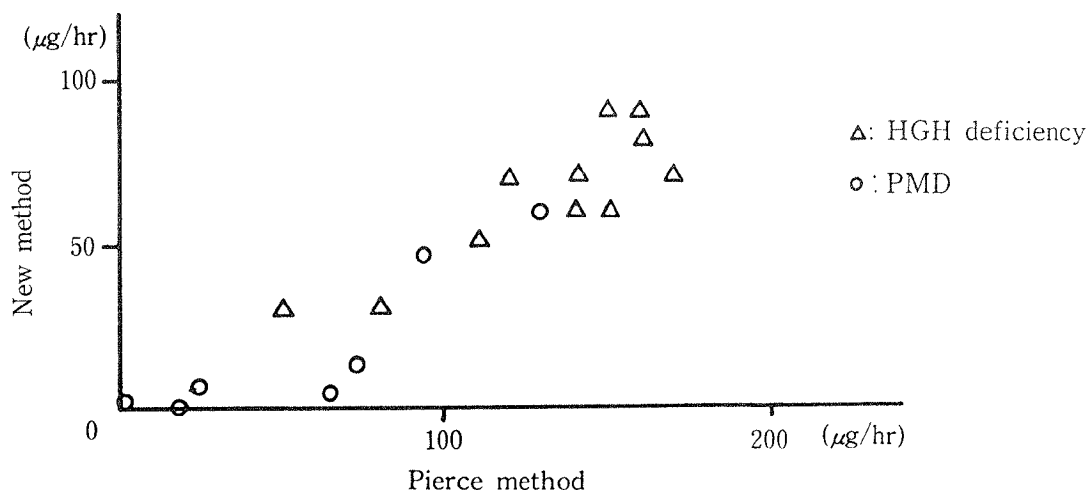


Fig. 5. Correlation between the new method and Pierce method in quantitative analysis of urinary 5-HIAA

吸光度には変化がないことは、尿中に含まれる MAO 活性物質は膀胱内に貯留されている間、尿中に含まれる 5-HT には大きな影響をおよぼさないと推測される。

まとめ

Pierce は尿を氷酢酸およびエーテルで抽出し、5-HIAA を 1-nitroso-2-naphthol・亜硝酸試薬を用いて発色定量している。しかし、尿中には 5-HIAA の前駆物質である 5-HT および 5-HTP が含まれており、尿を濃縮処理後 Pierce の方法での測定はこれらの化合物をまとめて測定することになる。著者は、尿中の 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT を Dowex 50W-X4 強イオン交換樹脂を用いて分離定量する方法に検討を加え、(1)回収率にすぐれる、(2)再現性が良好、(3)尿濃縮時に出現する 400 nm 付近にピークを有する色素の影響を除くことができる、(4)尿中 MAO 活性は尿保存中に影響を与えない、ことを明らかにした。本法を用いて、尿中 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT の分離定量を試みたところ、進行性筋ジストロフィ患者の尿中排出 5-HIAA, 5-HTP, 5-HT は健常男子よりわずかに低値を示し、成長ホルモン欠損児で

は 3 成分はいずれも低値を示した。また、5-HIAA に対する 5-HTP, 5-HT 排出量の割合を健常男子と比較すると、進行性筋ジストロフィ患者では 60~70%, 成長ホルモン欠損児では約 80% であった。

参考文献

- 1) Atack C.V., and Magnusson, T.: Individual elution of noradrenaline (together with adrenaline), dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from a single, strong cation exchange column, by means of mineral acid-organic solvent mixtures. *J. Pharm. Pharmac.*, 22: 625-627, 1970.
- 2) De Jong, J., Tjaden, U.R., and Van Thof, W.: Analysis of serotonin and derivatives by reversed-phase ion-pair partition chromatography with fluorometric and electrochemical detection. *J. Chromatography*, 282: 443-456, 1983.
- 3) Flatmark, T., Jacobsen, S.W., and Haavik, J.: Fluorometric detection of tryptophan, 5-hydroxytryptophan, and 5-hydroxytryptamine (Serotonin) in high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochem.*, 107: 71-74, 1980.

- 4) Garnier, J. P., Bousquet, B., and Dreux, C.: Determination of 5-hydroxyindoleacetic acid in urine by high-performance liquid chromatography : A fully automated method. *J. Chromatography*, 204: 225 - 230, 1981.
- 5) Ghebregzabher, M., Rufini, S., Castellucci, M. G., and Lato, M.: Analysis of some tryptophan and phenylalanine metabolites in urine by a straight-phase high-performance liquid chromatographic technique. *J. Chromatography*, 222: 191 - 201, 1981.
- 6) Iwatani, A., and Nakamura, H.: Determination of urinary tryptophan, 5-hydroxy tryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in neonatal hyperbilirubinaemic infants using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography*, 309: 145 - 150, 1984.
- 7) Koch, D. D., and Kissinger, P. T.: Determination of tryptophan and several of its metabolites in physiological samples by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatography*, 164: 441 - 455, 1979.
- 8) Lindqvist, M.: Quantitative estimation of 5-hydroxy-3-indole acetic acid and 5-hydroxytryptophan in brain following isolation by means of a strong cation exchange column. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 29: 303 - 313, 1971.
- 9) Minegishi, A., and Ishizaki, T.: Rapid and simple method for the simultaneous determination of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatography*, 308: 55 - 63, 1984.
- 10) 長尾愛彦：コロジオンバッグによる尿中Monoamine Oxidase活性. *体質医研報*, 24: 246 - 250, 1978.
- 11) 中島照夫, 平井基陽, 祖父江憲治, 能登 直：L-5-ヒドロキシトリプトファン投与うつ病患者的尿中インドール化合物の分析. *精神薬療基金研究年報*, 8: 54 - 59, 1976.
- 12) Oates, J. A.: Measurement of urinary tryptophan, tyramine and serotonin. *Methods Med. Res.*, 9: 169 - 174, 1961.
- 13) Pierce, C.: Assay and importance of serotonin and its metabolites. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 30: 230 - 233, 1958.
- 14) 瀬川富朗, 岩田典子, 天本 貴：セロトニン測定. *臨床検査*, 21: 374 - 378, 1977.
- 15) Udenfriend, S., Titus, E., and Weissbach, H.: The identification of 5-hydroxy-3-indole acetic acid in normal urine and a method for its assay. *J. Biol. Chem.*, 216: 499 - 505, 1955.
- 16) Yamaguchi, Y., and Hayashi, C.: Simple determination of high urinary excretion of 5-hydroxyindole-3-acetic acid with ferric chloride. *Clin. Chem.*, 24: 149 - 150, 1978.