

マイクロプレート法によるメイプルシロップ尿症のマス・スクリーニング

— フィールドサーベイ結果について —

(分担研究：マス・スクリーニングの精度管理に関する研究)

成瀬 浩¹ 長谷 豊² 大橋雄子¹ 山口昭弘³ 福士 勝³

要 約： メイプルシロップ尿症(MSUD)の新しいマス・スクリーニング法として、新たに開発されたマイクロプレートケイ光法および比色法「分枝鎖アミノ酸測定試薬」について、11スクリーニング施設におけるフィールドサーベイを行った。一般新生児乾燥濾紙血液中の分枝鎖アミノ酸濃度(BCA濃度: Leu, Ile, Valの総量)の平均値 \pm SD (mg/dl) は、ケイ光法：4.52 \pm 1.20 [n=12,933]、比色法：4.19 \pm 1.51 [n=9,807]であり、アッセイ間および施設間においても大きな変動はなく、安定した結果が得られた。カットオフ値の設定にあたり、新生児スクリーニング陽性患児のデータ解析も合わせて行った結果、日令10以下の患児11例すべてのBCA濃度は確実に検出できるレベルに上昇していた。本測定試薬は、現行のBIA法に比べ、簡便・迅速かつ客観的に検査結果を得ることができる信頼性の高い方法であり、とりわけ緊急を要するMSUDの新生児マス・スクリーニングにおいて有用な方法であると言える。

見出し語： マイクロプレート法, メイプルシロップ尿症, マス・スクリーニング

研究方法： 測定原理としては、これまで報告されてきたPhe, Galの脱水素酵素反応を用いた測定系^{1, 2)}と全く同じである。ロイシン脱水素酵素(LeuDH)がLeu, IleおよびValに対して同様に活性を有することから、酵素反応により生成するNADHを測定し、BCAの総量を測定する。ケイ光法がNADHを直接ケイ光測定するのに対し、比色法は、このNADHをさらに高感度なコバルト発色系へと導いた後に吸光度を測定する(図1)。BCAの中ではValの分子量が117.2

とLeu, Ileの131.2と異なるが、便宜的にすべてLeuと仮定してBCA濃度を表記した。測定試薬は、札幌IDL/チバ・コーニングにより開発された「分枝鎖アミノ酸測定試薬」ケイ光法および比色法を用い、取扱説明書に従いそれぞれの測定を行った。フィールドサーベイ参加11施設の内、9施設はケイ光法と比色法の併用、残り2施設はケイ光法のみでの測定である(表1)。また、MSUD患児のBCA値は、母子愛育会での追跡調査報告に照会して得られた、精査時の血清濃度値である(表2)。

¹杏林大学小児科, ²大阪市立北市民病院小児科, ³札幌市衛生研究所,

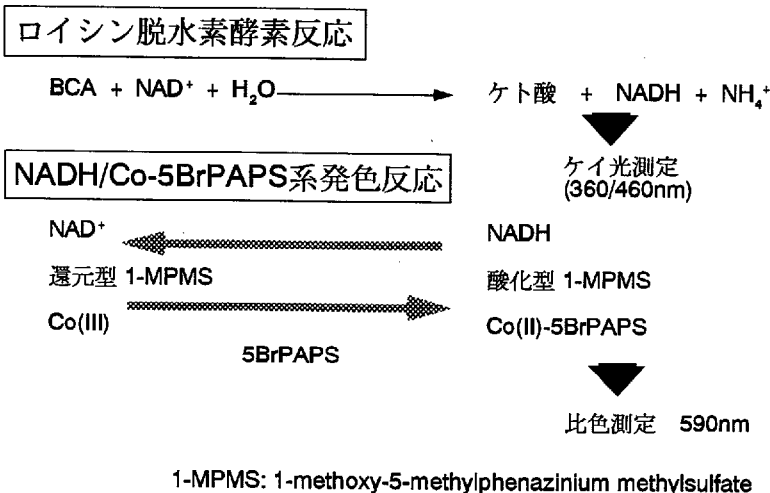


図1 測定原理

表1 フィールドサーベイ実施施設

スクリーニング施設	ケイ光法検査数	比色法検査数
北海道立衛生研究所	1,036	1,101
札幌市衛生研究所	1,332	-
千葉県予防医学協会	1,076	922
大宮小児保健センター	696	-
東京都立衛生研究所	1,035	1,028
神奈川県予防医学協会	1,186	1,186
愛知県健康づくり振興事業団	279	482
大阪府立母子保健総合医療センター	1,600	560
大阪市環境保健協会	1,104	1,054
兵庫医科大学	1,073	957
化学及血清療法研究所	2,516	2,517
計	12,933	9,807

結 果： 施設間のコントロール検体の測定値の動きを図2に、また、一般新生児検体の平均値、標準偏差、最小および最大値を図3に示した。ケイ光法および比色法いずれも測定結果における施設間の変動は小さく、非常に安定した結果となっている。これら一般新生児検体の測定値を合わせたBCAのヒストグラムは、ケイ光法・比色法いずれも正規分布を示し、平均値も両方法間でほぼ一致した(図4)。正常新生児

(N=36)の血液濾紙を用いてHPLCで測定したBCA各々の平均値の合計3.94mg/dlとも大差はなかった(表2)。ここでの総BCA値の算出に際しては、分子量の相違による補正としてValの値には131.2/117.2=1.12を乗じた後加算した。

カットオフ値を、平均値+2SD相当の7mg/dlとした場合、一次陽性(要確認検査)率は、ケイ光法が5.4%、比色法は7.0%であった。なお、高値検体について再測定できたものはすべて正常範囲内であった。カットオフ値を決めるに際し、新生児期のMSUD患児のBCA値が、非常に重要となるが、表2に、母子愛育会の追跡調査報告から得られたMSUDスクリーニング陽性者のBCA値を示した。精査時の血清測定値のため、厳密な比較ではないが、日令10以下の、典型的な患児の場合にはBCAとして20-104mg/dlと著明な上昇が認められ、本法によっても確実に検出可能であることがわかった。一方、Leuの値が3.4-5.5mg/dlと微妙な上昇例では、BCAの上昇も顕著ではなく、Leu単独の場合よりもむしろ正常レベルとの分離は不明瞭となっている。実際、今回のフィールドサーベイにおいても、BIA法でLeu 4-6mg/dlの陽性検体が、7.9-9.0mg/dl(比色法)程度のBCA値を示した例が存在した。

考 察： MSUDの新生児マス・スクリーニングは、Leuを指標として微生物学的半定量法であるBIA法により行われてきた。

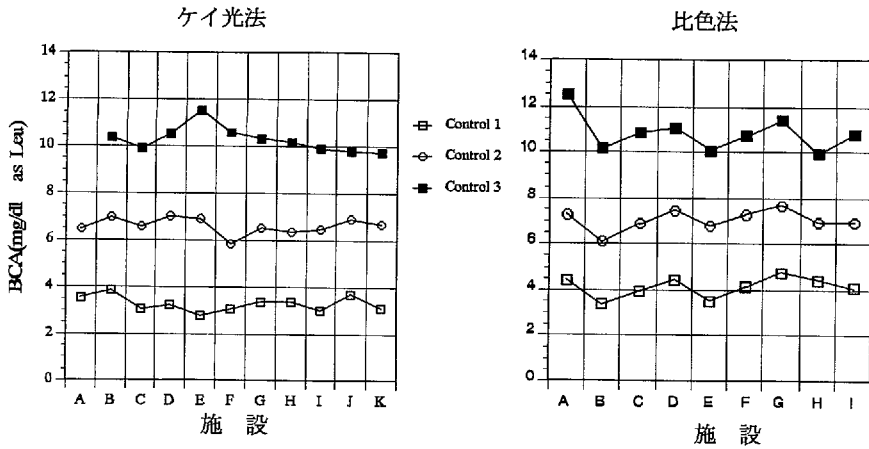


図2 BCAコントロール検体測定結果

MSUDについても、これらの試薬キットと同様、脱水素酵素反応を利用した測定試薬が開発され、今回、複数のスクリーニング施設で、実際のルーチン検体への応用として、その評価を行った訳である。BCAの血中濃度レベルが比較的高いせいもあるが、測定系としては、非常に安定しており、施設間でも非常に良く一致した測定結果が得られている(図2, 3)。

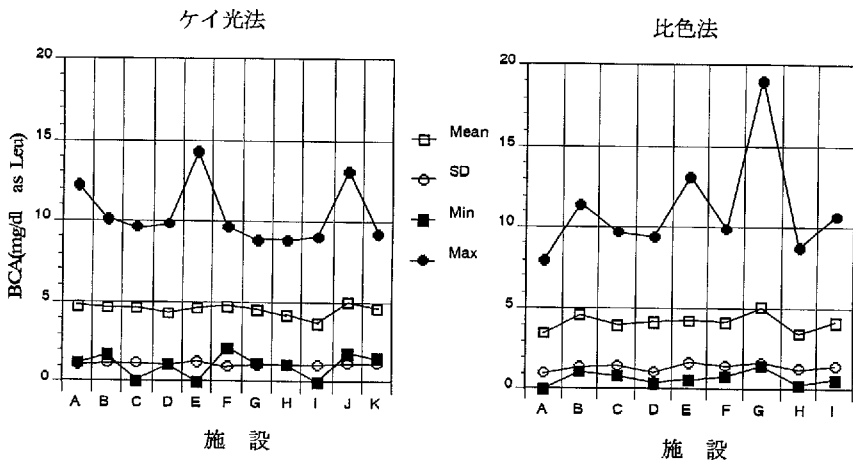


図3 新生児検体BCA測定結果

既に完成されているPhe, Gal測定系の場合は、従来の方法と基本的に同一の代謝物を測定しており、長年の蓄積データからカットオフ値の設定は比較的容易である。しかし、BCA測定系の場合には、従来のMSUDのスクリーニングがLeu単独を指標として行

しかし、肉眼による結果の判定には熟練と労力を要するため、定量的かつ客観的な方法が必要とされていた。最近、高感度マイクロプレートリーダーの開発や新しい酵素の単離精製がなされ、化学的あるいは酵素的に、代謝物を96穴マイクロプレートレベルで簡便に測定する方法の開発が可能となり^{1,3)}、既に、フェニルケトン尿症とガラクトース血症については、それぞれ濾紙血液Phe, Galの測定試薬キットとして実用・市販化されている。

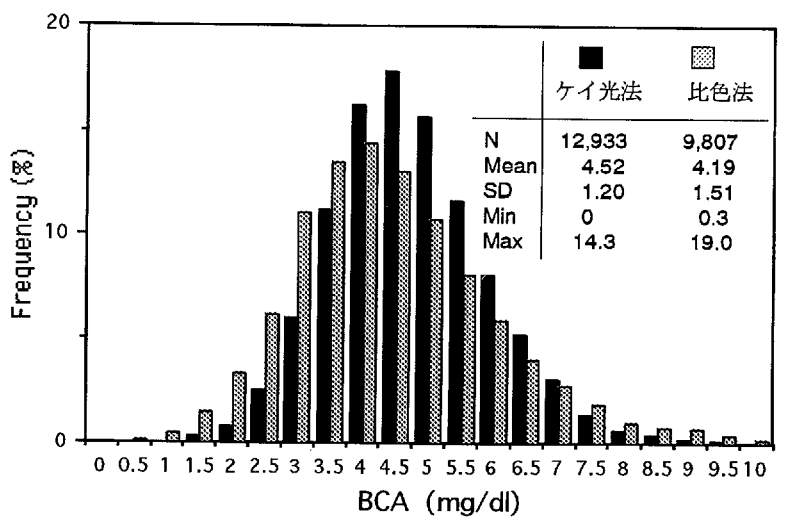


図4 新生児BCA値のヒストグラム

表2 MSUD患児の精査時血清BCA値

母子愛育会追跡調査結果より

		mg/dl-serum			
MSUD患児	日齢	Leu	Ile	Val	BCA
78-017	10	25.8	6.1	10.9	44.2
80-024	5	43.7	11.9	11.4	68.5
81-016	6	36.4	8.5	8.6	54.6
81-017	5	29.2	11.2	9.4	51.0
82-019	8	69.7	15.5	16.4	103.7
82-021	10	35.8	5.6	8.7	51.2
84-022	9	28.9	7.3	11.8	49.5
84-023	10	45.5	9.6	13.7	70.6
87-203	10	23.2	8.2	8.5	41.0
88-201	10	8.3	3.5	7.3	20.0
88-202	10	75.8	11.2	12.4	101.0
.....					
80-023	15	5.3	2.4	2.5	10.5
82-018	(1ヶ月)	4.0	1.5	5.5	11.7
83-022	12	3.4	1.3	2.8	7.9
91-204	16	5.5	2.2	4.5	12.8
.....					
正常新生児*	Mean	1.26	0.70	1.77	3.94
(N=36)	SD	0.28	0.23	0.44	1.00

* 正常新生児の値は血液濾紙のHPLCによる測定値 (mg/dl-blood)

われてきたことから、新たにBCAのカットオフ値を設定する必要がある。今回のフィールドサーベイで得られた、約10,000例の一般新生児BCA値の分布(図4)と、MSUD患児の新生児期のBCA値(表2)から、カットオフ値を8-10mg/dlに設定すれば、ほぼBIA法でのカットオフLeu 4mg/dlに相当するものと考えられる。一方、間歇型・中間型といったBCAの上昇があまり顕著ではないMSUD患児の検出率を向上させるために、カットオフ値を平均+2SD相当の7mg/dlとさらに下げることが可能であろう。しかし、この場合、HPLC等の確認検査を充実させ、いたずらに再採血要求率の上昇を招かないことが必要である。

LeuプレートはBIA法の中でも判定は難しく、実際、外部精度管理でもLeu陽性検体の見逃し例が最も多いことを考慮すると、ケイ光法・比色法いずれも信頼性の高い測定結果の得られる本マイクロプレート法は、MSUDの新しいスクリーニング法として非常に有用

であると考えられる。

謝辞： 本フィールドサーベイに参加頂きましたスクリーニング施設の方々、患児追跡調査結果のご提供を頂きました母子愛育会・青木菊麿先生に深謝いたします。

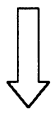
文献

- 1 Naruse H, et al: Neonatal screening in the nineties, 59, The Kevin Place, Manly Vale, 1991
- 2 Yamaguchi A, et al: Screening, 1, 49, 1992
- 3 成瀬 浩, 他: 平成3年度厚生省心身障害研究「代謝疾患・内分泌疾患等のマス・スクリーニング, 進行阻止及び長期管理に関する研究」報告書, 101, 1992



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:メイプルシロップ尿症(MSUD)の新しいマス・スクリーニング法として,新たに開発されたマイクロプレートケイ光法および比色法「分枝鎖アミノ酸測定試薬」について,11 スクリーニング施設におけるフィールドサーベイを行った。一般新生児乾燥濾紙血液中の分枝鎖アミノ酸濃度(BCA 濃度:Leu,Ile,Val の総量)の平均値 \pm SD(mg/dl)は,ケイ光法: 4.52 ± 1.20 [n=12,933],比色法: $4.19=1.51$ [n=9,807]であり,アッセイ間および施設間においても大きな変動はなく,安定した結果が得られた。カットオフ値の設定にあたり,新生児スクリーニング陽性患児のデータ解析も合わせて行った結果,日令 10 以下の患児 11 例すべての BCA 濃度は確実に検出できるレベルに上昇していた。本測定試薬は,現行の BIA 法に比べ,簡便・迅速かつ客観的に検査結果を得ることができる信頼性の高い方法であり,とりわけ緊急を要する MSUD の新生児マス・スクリーニングにおいて有用な方法であると言える。