

新しい方法によるPKUスクリーニング法の開発
(分担研究：現行マススクリーニングシステムの問題点に関する研究)

成瀬 浩¹⁾、大橋雄子¹⁾、辻 章夫²⁾、前田昌子²⁾、高杉 信夫、山口昭弘³⁾、中村健治⁴⁾、
柴田 実⁵⁾

要約 先に高杉、山口ら¹⁾は、新生児代謝異常スクリーニングも、マイクロプレートを用いる試験を発表した。この構想は大切なものであるが、ただこの場合PKUスクリーニングは、McCaman-Robinsonの方法が使用されていた。しかし、この方法はアメリカなどの過去の歴史の中で、問題があることは知られている。そこで、マイクロプレートを用い、フェニールアラニン脱水素酵素を使用する方法がより適切と考え、その方法の確立のため共同で研究を行った。セントラル硝子KKの好意により、相模中研で作成されたフェニールアラニン脱水素酵素を用い、マイクロプレートを用いる方法で、蛍光測定により、3mmディスク1枚中のフェニールアラニンを測定する方法を確立した。そして、この方法を用いて、一般新生児の濾紙血中のフェニールアラニン値を測定し、妥当な結果を得た。ただ、現在は蛍光測定のため、蛍光用マイクロプレートリーダーを必要としている。次年度は、通常マイクロプレートリーダーを使用しうる様に、比色法に切替えることが必要であろう。

見出し語：新PKUスクリーニング、フェニールアラニン脱水素酵素、マイクロプレート利用

研究方法 相模中研・浅野らにより、遺伝子工学的手法を用いて作製されたフェニールアラニン脱水素酵素が、セントラル硝子KKの好意により分与され、これを使用した。この酵素は Bacillus badidus(B.B.) 由来のものとして Bacillus sphaericus(B.S.) 由来のものとして2種あり、この両者を検討した。マイクロプレートリーダーは、コロナ社製MTP-100Fを用いた。第1図の如き測定法を採用し、

最終的には、NADHの蛍光を励起波長 360 nm、測定波長 450nmにて測定した。濾紙血よりの抽出に関しては、種々の方法を検討したが、最終的には 0.3N TCA 溶液を用うることとした。血液サンプルとしては、新生児スクリーニング用の濾紙上血液を用いて、それから3mmディスクを打ち抜き、実験に共した。新生児検体中のフェニールアラニンに関しては、札幌市衛研にて、一般スクリーニングを

¹⁾ 杏林大東京総医研、²⁾ 昭和大薬学部、³⁾ 札幌市衛研、⁴⁾ 札幌IDL、⁵⁾ 東京都衛研

終了した正常児の検体を用い、ガスリー法、McCaman-Robinson 法などの値と比較した。
 結果：B.S.由来のものと、B.B.由来のものとを比較した結果、B.S.由来のものはチロジンをも有効な基質とすることがわかった。このため、フェニールアラニンの測定のみを目指す研究では、B.B.由来のものを使用した。濾紙血3mmディスクより、フェニールアラニンを抽出する方法としては、ガラクトース血症スクリーニング法用の藤村法と同様、メタノール・アセトン水溶液で、血液を固定した後、緩衝液などでフェニールアラニンを抽出する方法、エタノール(70%)で抽出する方法さらにはTCA(0.3N)抽出で、リカバリーもよく、特にその後の酵素測定にも特に悪影響のないことを確認した。

抽出、その後の酵素測定については、種々検討の結果、第1図に示すような操作を行うことに決定した。U型のマイクロプレートに血液ディスクを入れ、TCAで振盪抽出し、抽出液 40 μ lを平底マイクロプレートに移し必要な酵素試薬を加え酵素反応を行わせた。

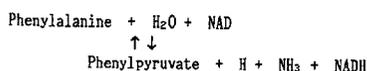
この方法の替わりに、トランスファープレートを利用しても定量可能であることも確認した。

第1図では、最終 pH 調整のため、pH 10.3の緩衝液を用いているが、反応 pH については、第2図の実験により、この pH がフェニールアラニンを基質とした時のNADHの生成率で最大で、且つチロジンの交叉反応も少ないことを確かめ、この pH を選んだ。この条件で、フェニールアラニン標準血液濾紙 2ng/dl \sim 20mg/dlのものは、定量可能である。定量性は試験あたり0.1ng \sim 60ngの間は完全に直線であり、定量可能範囲はかなり広いと思われる。

他のアミノ酸との交叉性についてのデータを第1表に示した。同一方法で、他のアミノ酸を基質とした時のNADHの生成率を見たものである。チロジンが、フェニールアラニンに比して0.7%、メチオニンが0.8%であり、他は分岐鎖アミノ酸が0.3 \sim 0.4%であった。

第1図 フェニールアラニン脱水素酵素を用いた血液ろ紙中フェニールアラニンの測定法

原理：



測定手順：

3 mm ϕ 1 Disc (U-bottomed microplate)

| 0.3 N TCA 50 μ l

| vibrate for 10 min.

| 40 μ l (flat-bottomed strip well)

| 160 μ l reagent - (0.2 M Gly-KCl-KOH (pH 10.3) 136 μ l

| 20 mM NAD 20 μ l

| 6 U/ml Phe-D.H. 4 μ l

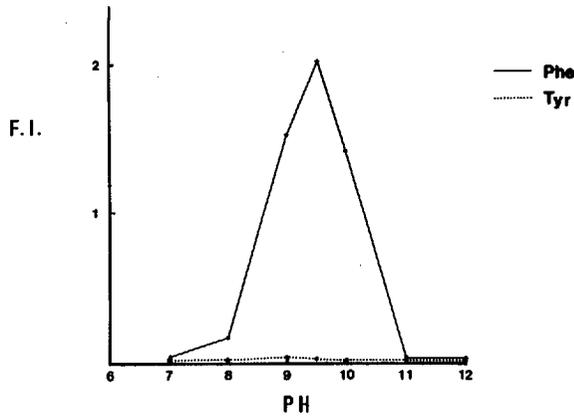
| incubate for 60 min at room temp.

| measure F. L. MTP-100F

| Ex 360nm, Em 450nm

| Ex sens 2, Em sens 3, Response 3

第2図 フェニルアラニン脱水素酵素活性のpHによる変化
(フェニルアラニン、チロジンを基質とした場合)



この方法を用いて、札幌市衛研で、一般スクリーニングテストが終了したのものについてフェニルアラニンを測定した。その値の分布を第3図に示した。平均 1.5mg/dl であり、正規分布である。これならば +2SD あるいは +2.5SD でカットオフ値を決めることが可能であることもわかった。

ただ、平均 1.5mg/dl という値は、アミノ酸分析器によるフェニルアラニン値よりも少し高く、McCaman 法のデータよりも少し高い。この点、この時用いたスタンダードに問題のある可能性もあり、今後さらに検討が必要であろう。

尚、蛍光測定でなく、比色法により測定を行う目的で検討を行っているが、まだ比色法は完全には確立されていないので、今回の報告からは除いた。

考察 現在PKUスクリーニングに広く用いられているいわゆるガスリー法は、きわめて優れた方法である。ガスリー法が発表されて以後、アメリカ厚生省はガスリー法によるスクリーニングと、McCaman-Robinson法による

ものと、2種のフィールドテストを10年以上続け、結局、種々の点で、ガスリー法が優れていたもので、この方法を広く普及することに決定したという歴史がある。

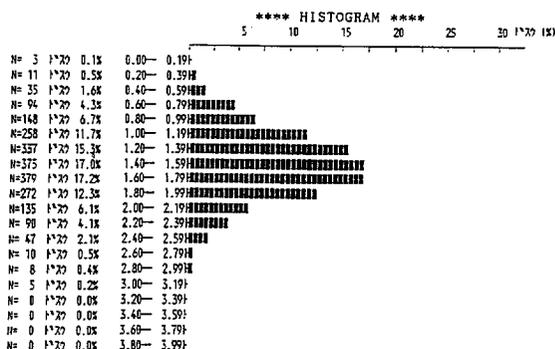
ただ、この方法を精度よく実施するためには、測定する者の高度の訓練が必要となり、慣れた技術者でも、一寸したことで培養条件が変わったりすると、思わぬ失敗をすることがあるのである。また、ガスリー法のプレー

第1表 フェニルアラニン脱水素酵素の基質特異性

| AMINO ACID | B.badius |
|------------------|----------|
| L-Phenylalanine | 100 % |
| D-Phenylalanine | <0.1 |
| L-Asparagin | <0.1 |
| L-Asparatic Acid | <0.1 |
| L-Alanine | <0.1 |
| DL-α-Alanine | <0.1 |
| L-Arginine | <0.1 |
| L-Isoleucine | <0.1 |
| L-Ornithine | 0.3 |
| L-Ornithine | <0.1 |
| L-Glutamine | <0.1 |
| L-Glutamic Acid | <0.1 |
| L-Cystine | <0.1 |
| L-Cystein | <0.1 |
| L-Citrulline | <0.1 |
| L-Threonine | <0.1 |
| L-Serine | <0.1 |
| L-Tyrosine | 0.7 |
| L-Tryptophan | 0.2 |
| L-Valine | 0.4 |
| L-Histidine | <0.1 |
| L-Hydroxyproline | <0.1 |
| L-Proline | <0.1 |
| L-Methionine | 0.8 |
| L-Lysine | <0.1 |
| L-Leucine | 0.3 |
| D-Leucine | <0.1 |

第3回 正常新生児濃縮液中フェニールアラニン値の分布図

| N | MAX | MIN | MEAN | S.D |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 2208 | 5.988 | 0.000 | 1.511 | 0.470 |



トを、客観的に判定するための方法が、アメリカの2、3の会社で研究されたが、いずれも完全には成功しておらず、技術者の肉眼判定に頼っており、判定結果の客観的記録もまだ出来ていない。

この様な点から、ガスリー博士自身、よりよい方法への改善の必要性を訴えていた。この様な状況の中で、高杉、山口らにより検討されたマイクロプレートによるPKUスクリーニングの発想は大切である。同じ様な方法は外国でも試みられている²⁾。ただ、McCaman法は、必ずしもフェニールアラニンのみが蛍光を生ずるのではなく、特定できない物質による蛍光を生ずることもあり、前述のアメリカの経験からも、避けた法がよいと考えられる。

このため、われわれは共同して、フェニールアラニン脱水素酵素による新しいPKUスクリーニング法の開発研究を行ったのである。幸い、比較的簡単に、短時間で多数の検査を処理する方法を開発することが出来た。4施設で実施して、いずれも最終的には同じ様な結果を得ているのであり、再現性にも問題が

ない。

ただ現在は、蛍光マイクロプレートリーダーを必要とする点が欠点である。目下、比色法に替えることを検討中であり、いくつかの可能な方法について、予備的研究は終了しているのので、来年度は、比色法による、通常のマイクロプレートリーダーを用いるスクリーニングを行いたいと思っている。そうすれば、現在わが国の全てのスクリーニング実施機関は、比色用マイクロプレートリーダーを使用しているので、機器の面での障害はなくなるのである。

われわれの初期の目的のとおり、比色法マイクロプレートリーダーが使用可能な方法が確立されれば、わが国のみでなく、世界中のスクリーニング実施機関にとっても、大きなプラスになるであろう。

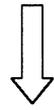
文献 1) 山口昭弘他：札幌市衛生研究所年報、第14号、56~61、1961年度

2) N.S.Garasimova, I.V.Steklova.&T. Tumminen: Clin.Chem.35,2112-2115, 1989



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 先に高杉、山口らは、新生児代謝異常スクリーニングも、マイクロプレートを用いる試験を発表した。この構想は大切なものであるが、ただこの場合 PKU スクリーニングは、McCaman-Robinson の方法が使用されていた。しかし、この方法はアメリカなどの過去の歴史の中で、問題があることは知られている。そこで、マイクロプレートを用い、フェニールアラニン脱水素酵素を使用する方法がより適切と考え、その方法の確立のため共同で研究を行った。セントラル硝子 KK の好意により、相模中研で作成されたフェニールアラニン脱水素酵素を用い、マイクロプレートを用いる方法で、蛍光測定により、3mm ディスク 1 枚中のフェニールアラニンを測定する方法を確立した。そして、この方法を用いて、一般新生児の濾紙血中のフェニールアラニン値を測定し、妥当な結果を得た。ただ、現在は蛍光測定のため、蛍光用マイクロプレートリーダーを必要としている。次年度は、通常のマ
イクロプレートリーダーを使用しうる様に、比色法に切替えることが必要であろう。