

微量蛍光定量法による先天性代謝異常疾患のマス・スクリーニング
(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検討)

高杉信男¹⁾，山口昭弘²⁾，福士 勝²⁾，菊地由生子²⁾

要約： 先天性代謝異常症5疾患（フェニルケトン尿症，メイプルシロップ尿症，ホモシスチン尿症，ヒスチジン血症およびガラクトース血症）の新しいマス・スクリーニング法として，蛍光マイクロプレートリーダを用いる簡便，迅速かつ信頼性の高い方法を開発した。化学的あるいは酵素的な反応に基づき，3mm血液ディスク中のPhe [Ninhydrine-peptide]法，分枝鎖アミノ酸(BCA) [Leu dehydrogenase法]，総ホモシスチン(HcySH) [SBD-F法]，His [OPA法]，Gal [Gal dehydrogenase法]をそれぞれ，マイクロプレートレベルでケイ光測定するもので，安定した測定系による客観的な判定結果は，現行のバイオアッセイ（Guthrie法，Paigen法）に代わり得る一次スクリーニング法として有用と考えられる。

見出し語： 先天性代謝異常症，蛍光定量，マス・スクリーニング

研究方法

個々のアッセイの至適条件は既報¹⁻³⁾にて検討したが，操作を略述すると，Fundamental製パンチインデクサー-Model VIII Jr.を用い，血液濾紙から丸底マイクロプレートへの3mmディスクのパンチングを行う。血色素固定-抽出は，酵素反応を用いるBCA，HcySH，Galアッセイでは有機溶媒（MeOH: Acetone:H₂O=35:35:10）固定-脱イオン水抽出を，化学的な発ケイ光反応のPhe，Hisアッセイでは0.3N TCAにより血色素固定と

抽出を同時に行う。抽出液の一部をケイ光測定用のストリップウェルに分取し，各アッセイ用の反応試薬を加え，一定の温度条件下30分から2時間反応を行う。反応停止液を加え，総液量を200μl以上とし，コロナ電気製MTP-100Fによりケイ光を測定する。

パイロットスクリーニング： 新生児濾紙血約5,000検体について，Guthrie法，Paigen法と併行して本法によるパイロットスクリーニングを行った。患児検体の測定

¹⁾ 札幌市衛生局，²⁾ 札幌市衛生研究所

結果も考慮して、カットオフ値を設定し、操作性、疑陽性率などから、一次スクリーニング法としての評価を行った。

結果

測定法としての基礎データは、HcySHアッセイの回収率が60%と低値を示す以外は、再現性(CV<10%)、回収率(>90%)および他法との相関(アミノ酸はHPLC, GalはPaigen法)いずれも良好であった。また、HcySHの回収率は低値なものの、ほぼ一定の値を示し、患児検体の検出には問題なかった。

一般新生児約5,000例に対するパイロットスクリーニングの結果を表1に示したが、一次疑陽性率はアミノ酸で0.3-0.6%, Galでは1.5%であり、バイオアッセイの場合、抗生剤等による妨害(1%程度)を含め、通常2-3%であるのに比べかなり低値であった。これらの検体は、アミノ酸分析あるいは酵素活性などの確認検査により、いずれも正常となり再採血を行う必要はなかった。

バイオアッセイと微量ケイ光定量法の比較を表2にまとめた。測定物質としては、フェニルケトン尿症、ヒスチジン血症、ガラクトース血症はPhe, His, Galと全く同じであるが、メイプルシロップ尿症は、Leuと分枝鎖アミノ酸(Val, Ile, Leuの合計)、ホモシスチン尿症は、MetとHcySHの違いがある。アッセイ時間は、バイオアッセイでは、一晩のインキュベーションを要するのに対し、いずれの項目とも2-3時間で最終結果を得ることができた。一方、試薬コスト(試薬あるいは消耗品のみ)についても、当所での実費を基に算出した5疾患の合計はバイオアッセイが124.7円に対し、微量

ケイ光定量法では64.2円とむしろ、安価であった。

考察

現行のGuthrie法では、最も重要な最終結果の判定を検査者個人の主観に頼らねばならず、検査結果の記録ができないことが問題点として指摘されてきた。これらを克服するため、バイオアッセイの延長としてはGuthrieプレート用のレーザースキャナーあるいは乳酸菌法の開発が試みられ、一方、機器分析からのアプローチでは、HPLC、自動分析装置の応用が検討されてきた。しかし、いずれの方法も検査結果の不安定性あるいは多項目、多数検体に対する検体処理能力の限界から、ルーチン検査法として満足できるものではなかった。これに対して微量ケイ光定量法は、マイクロプレート関連機器の使用により、また、反応、測定を同じウェル内で行えることから、チューブレベルの操作に比べ、試薬分注、ケイ光測定の簡便さ、迅速性は格段に改善されている。また、採用した反応系も、HcySHアッセイ以外はチューブレベルで確立されていたものであり、この点からも信頼性は高いと言える。

バイオアッセイ法との比較の上で重要な他の事項は、一つは検査結果の迅速さであり、メイプルシロップ尿症、ガラクトース血症といった緊急性の高いスクリーニングにおいては、1日の短縮は大きな意味を持つと言える。さらに、指標代謝物として、メイプルシロップ尿症のスクリーニングをLeu単独から分枝鎖アミノ酸とすることにより、中間型、間欠型の検出率が高まるこ

と、ホモシスチン尿症についてはMetの測定では見逃される場合の知られているシステオニン合成酵素欠損症、さらにはMetの上昇を伴わない再メチル化障害の疾患の検出も期待できる。ただ、HcySHの血中レベルは、他のアミノ酸に比べて低いこと、SH基は反応性が高く、濾紙血からの回収率は60%と不完全であること、また、現HcySHアッセイは他の血中SH化合物;システイン、グルタチオンの影響を受けることから、メチオニン γ -リアーゼを用いて、MetとHcySHの合計量を測定するアッセイ系を現在検討中である。

この微量ケイ光定量法の将来的な発展と

しては、ケイ光法から比色法への応用により、汎用性の高い比色マイクロプレートリーダーでの測定を可能とする方向、あるいは最終目標とも言える、ルーチン検査の自動化を目指した機器の開発を進めて行く方向があると考えられる。

文 献

- 1) Yamaguchi, A. et al., Clin. Chem., 35, 1962-1964, 1989
- 2) 山口昭弘, 他, 札幌市衛研年報, 14, 56-61, 1986
- 3) 山口昭弘, 他, 札幌市衛研年報, 15, 50-58, 1987

表 1 微量ケイ光定量法による正常値およびカットオフ値

測定項目	正常値		カットオフ	一次疑陽性率 (%)	確認検査	
	単位	平均				SD
Phe	mg/dl	0.70	0.26	2.5	0.33	アミノ酸分析計
His	mg/dl	1.50	0.57	5.0	0.37	アミノ酸分析計
BCA*	mM	0.37	0.10	0.65	0.58	アミノ酸分析計
HcySH**	μ M	34	32	130	0.60	SBD-F 誘導体 HPLC
Gal	mg/dl	2.40	1.40	8.0	1.52	Gal, Gal-1-P 分別定量 Epimerase spot test

*BCA: 分枝鎖アミノ酸 (Leu, Ile, Val), **HcySH: 総ホモシステイン

表 2 微量ケイ光定量法(MFL) と ガスリー法(BIA) の比較

対象疾患	測定物質		アッセイ時間(h)		試薬コスト(円/1検体)	
	MFL	BIA	MFL	BIA	MFL	BIA
PKU	Phe	Phe	3	16	11.1	22.3
HE	His	His	2	16	10.0	27.2
MSUD	BCA*	Leu	2	16	12.2	22.8
HCU	HcySH**	Met	3	16	16.6	22.1
GE	Gal	Gal	2	16	14.3	30.3
[合計:					64.2	124.7]

*BCA: 分枝鎖アミノ酸 (Leu, Ile, Val), **HcySH: 総ホモシステイン



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:先天性代謝異常症 5 疾患(フェニルケトン尿症,メイプルシロップ尿症,ホモシスチン尿症,ヒスチジン血症およびガラクトース血症)の新しいマス・スクリーニング法として,蛍光マイクロプレートリーダを用いる簡便,迅速かつ信頼性の高い方法を開発した。化学的あるいは酵素的な反応に基づき,3 mm血液ディスク中の Phe [Ninhydrine-peptide1] 法,分枝鎖アミノ酸(BCA) [Leu dehydrogenase 法],総ホモシステイン(HcySH) [SBD-F 法],His[OPA 法],Gal [Gal dehydrogenase 法]をそれぞれ,マイクロプレートレベルでケイ光測定するもので,安定した測定系による客観的な判定結果は,現行のバイオアッセイ(Guthrie 法,Paigen 法)に代わり得る一次スクリーニング法として有用と考えられる。