

新しい先天代謝異常症スクリーニングの方法の開発

－脱水素酵素・マイクロプレート系（比色法）によるPKUその他のスクリーニング方法－
（分担研究：現行の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、大橋雄子、渡辺倫子¹⁾、辻 章夫、前田昌子²⁾、中村健治、藤井 正³⁾、山口昭弘、
福士 勝⁴⁾、大浦敏明、長谷 豊、大竹治美、酒本和也⁵⁾、市原 侃、新井純理⁶⁾、
柴田 実⁷⁾、松本 勝⁸⁾、高橋和代⁹⁾、浜中広健、工藤良子¹⁰⁾、山上祐次¹¹⁾、河地 豊、
村上美和¹²⁾、稲岡一孝、山田立身、美濃孝美¹³⁾、佐藤良樹、鎌田美穂、松岡 瑛¹⁴⁾、
梅橋豊蔵、田崎隆二¹⁵⁾

【要約】 昨年の報告において、新しいPKUスクリーニング法として、フェニールアラニン脱水素酵素（Phe-DH）を用い、マイクロプレート法で、蛍光測定による方法を述べた。これも、現実のスクリーニング法として使用可能であるが、今後の普及を考えると、通常の比色法によるマイクロプレート法を開発することがより望ましいのである。

このために、蛍光法を改良し、比色法による方法の開発研究を行い、マススクリーニングに必要な、感度、再現性、安定性を持つ方法を確立した。この方法による測定試薬を、全国のスクリーニングセンターの中で、比較的検体数の多い9ヶ所の施設に配布し、ガスリー法、HPLC法との比較を含め、有用性についての検討を依頼し、マススクリーニング法として使用可能であるという結果を得た。

さらに、この同じ試薬系で、酵素をPhe-DHの代わりに、ガラクトース脱水素酵素（Gal-DH）を使用することにより、ガラクトース血症スクリーニング法として使用可能であることを証明した。また、分枝アミノ酸脱水素酵素（BAA-DH）を用うることにより、メイプルシロップ尿症スクリーニング法としても使用可能であることを立証した。これらは全て、現在、全てのスクリーニングセンターに存在する、比色法マイクロプレートリーダーがあれば、容易に実行できる方法であり、今後の新生児マススクリーニングの中心となるものと考えられる。

見出し語：新しい代謝異常スクリーニング法、PKU、ガラクトース血症、MSUD

-
- 1) 杏林大学小児科、2) 昭和大学薬学部、3) 札幌IDL、4) 札幌市衛研、5) 大阪環保協
6) 北海道衛研、7) 東京都衛研、8) 東京予防疫、9) 埼玉県小児医療、10) 千葉県予防衛
11) 神奈川県予防疫、12) 愛知県健康づくり財団、13) 大阪府母子保健センター、
14) 兵庫医大中検、15) 化血研

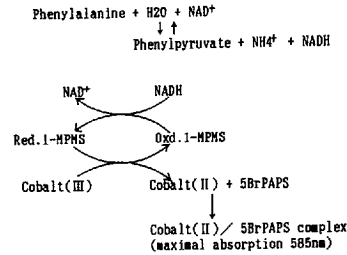
【はじめに】 現在は、PKUその他の先天代謝異常スクリーニングの中心的方法はガスリー法である。これは極めて優れた方法であるが、ただ技術的に特別な訓練を受けた技術者が必要であり、しかも、検査結果を客観的に記録することが困難という欠点がある。山口ら札幌市衛研グループが、蛍光法を用いたマイクロプレート法によるスクリーニング法を開発する研究を行い¹⁾、このガスリー法の欠点を克服することを目指した。ただ、その中のPKU法は、マッカーマン法を用いたが、これは、マススクリーニング法としては問題があるということ指摘されているし、また蛍光用マイクロプレートリーダーが必要のため、普及に難があるという欠点がある。

そこで、杏林大、昭和大、札幌IDLのグループが協力し、新しいPKUスクリーニングを開発し、札幌市衛研で彼らの行いつつある方法と比較する研究を行った。昨年度は²⁾、Phe-DHを用い、蛍光法によるPKUスクリーニングを完成させた。今年はこの方法を一歩進め、比色法による方法を完成させ、この有用性を多数の施設で検討することを目標とした。さらに、同じ原理で、ガラクトース血症、メイプルシロップ尿症のスクリーニング法を開発するための研究も行った。

【結果】 蛍光法から比色法に切り替える研究を、杏林大、昭和大、札幌IDLなどで行い、いくつかの方法を検討した。最終的には、図1に示すような原理で、図2のような手順で行う方法を採用した³⁾。原理を簡単に説明すると、Phe-DHにより、NAD→NADHとなる。このNADHと1-MPMSの存在により、コバルト3価が、コバルト2価に還元される。

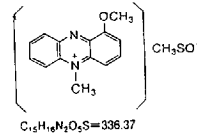
それが5-Br-PAPSとキレート結合し、発色する。これが589nmで吸収極大を持つので、比色測定し、Phe値を示すのである。

図1. 反応原理



1-Methoxy PMS

1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate



5-Br-PAPS

2-[5-Bromo-2-pyridylazo]-5-(N-propyl-N-sultopropylamino)phenol disodium salt

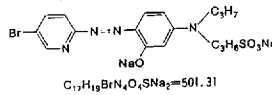
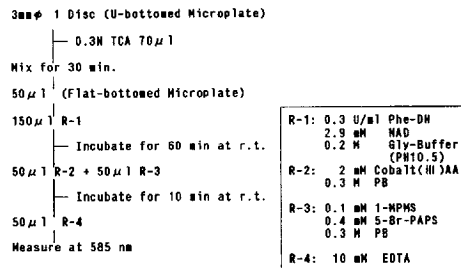


図2. 測定手順



昨年報告で示したように、乾燥濾紙血3mmディスク一枚で、蛍光法によるPhe-DH法で、Pheが測定でき、比色法でも感度を落さずに、定量が可能であった。図3に、この方法で、3mmディスク一枚のPheを測定した時の標準曲線と、そのバラツキの程

度を示した。感度、再現性とも、マススクリーニングの使用に耐えることがわかったので、ガスリー法で、PKUでない判断された一般新生児検体 8,245名につき、Phe値を測定した結果を図4に示した。これは、札幌市衛研、杏林大、東京都衛研、東京都予防医学協会的一般検体についての測定値である。分布もよく、平均値1.0 mg/dl、S.D.0.43mg/dlと、マススクリーニング法として十分使用可能である。

そこで、この方法の有用性について、日本の比較的検体数の多いスクリーニングセンターにおいて、検討する試みが実行された。これは、大浦が中心となり、北海道衛生研究所、千葉県予防衛生協会、埼玉県小児医療センター、神奈川県予防医学協会、愛知県健康づくり財団、大阪府母子保健センター、大阪市環境保健協会、兵庫医科大学中検、化血研などのスクリーニングセンターの協力で実施された。これらの施設で、7月～10月に 34,477名の一般新生児（ガスリー法で、PKUでない判断された者）について、濾紙血のPhe値が測定され、その分布図を図5に示した。平均値は 0.91mg/dlであり、カットオフ値を+2 S.D.とすれば 1.85mg/dl、+2.5 S.D.でも 2.08 mg/dlである。このカットオフ値ならば、現在問題となっているビオプテリン代謝異常症の発見のためにも、充分使用可能である。

これらの施設で、HPLC測定によるPhe値の相関を調べた結果が、図6である。非常によい相関が得られている。その他の各施設の研究においても、この方法を使用することは可能という結果が得られている。

さらに、杏林大、札幌IDL、札幌市衛研において、図1の原理の中で、Phe-DH

図3. 標準曲線例

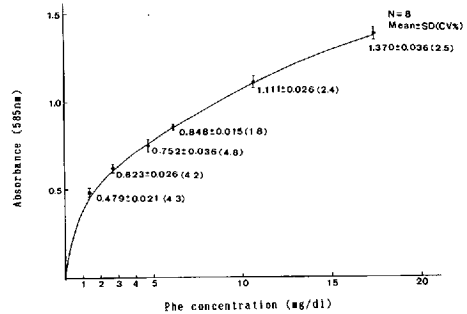


図4. 一般新生児のPhe値の濃度分布

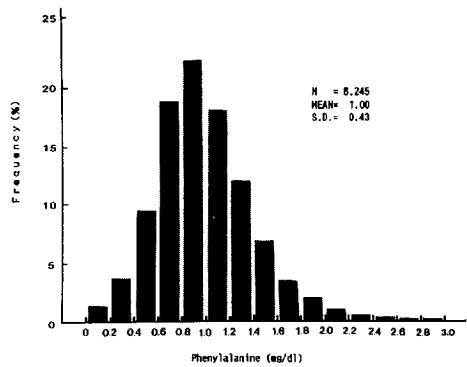


図5. 一般新生児のPhe値の濃度分布

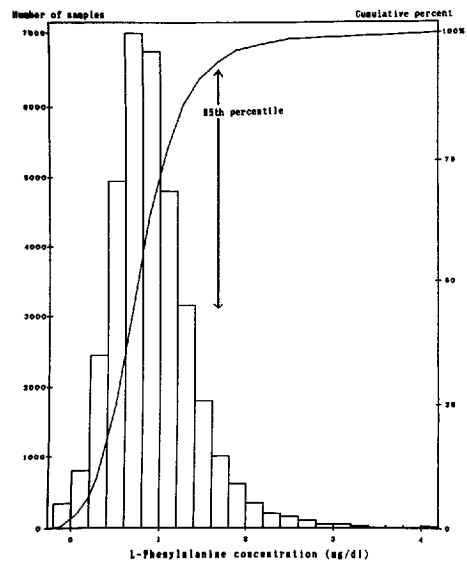
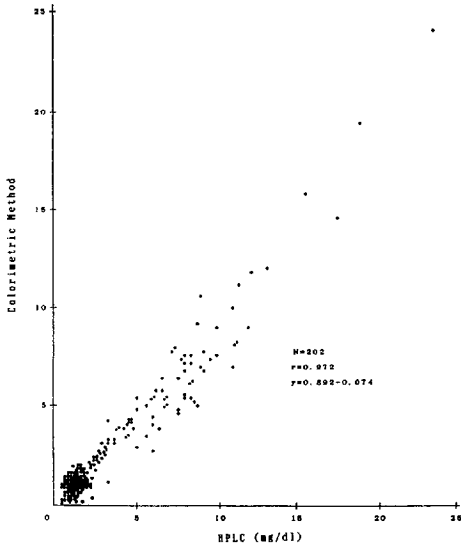


図6. 本方法とHPLC法との相関



の替わりに、Gal-DHを使用し、PH 8に調整することにより、ガラクトースの測定が可能であることを証明した。図7にその測定案と、それによるスタンダード曲線を示した。3mmディスク1枚で、2 mg/dl~20 mg/dl とスクリーニングに必要な領域をカバーしうることがわかった。

ガスリー法で、正常と判断された新生児223名につきガラクトース値の分布を測定したのが、図8の分布曲線である。この結果も、ガラクトースの測定に充分使用可能であることを示している。これらの測定値は、ペイゲンファージ法、あるいは藤村法などの既存の方法と充分よい相関を示している。

Phe-DHの替わりに、BAA-DHを用いると、ロイシン、イソロイシン、バリンなどの分枝アミノ酸の総和が測定しうることも証明し得た。図9に、その測定手順と、スタンダード曲線を示した。これら3つのアミノ酸の総和で、4mg/dl以上測定可能である。ガスリー法で、患者でないと考えられる新生

図7. Gal-DHを用いた手順と標準曲線

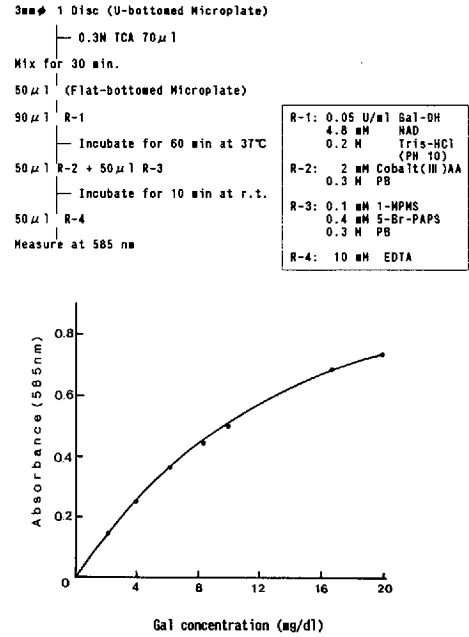
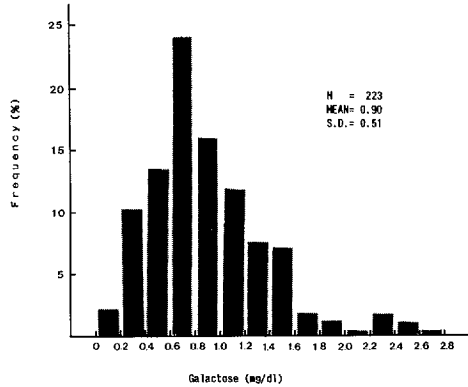


図8. 一般新生児のGal値の濃度分布



児 290名についてのこれらの3つのアミノ酸総和の分布図を図10に示した。ロイシン単独の場合のカットオフをそのまま採用することは出来ないが、今後、正常児の測定値を増やすことにより正確なスクリーニングが可能と思われる⁴⁾。

【考察】 Phe-DH、Gal-DH、BAA-DHの酵素を用い現在全てのスクリー

図9. BAA-DHを用いた手順と標準曲線

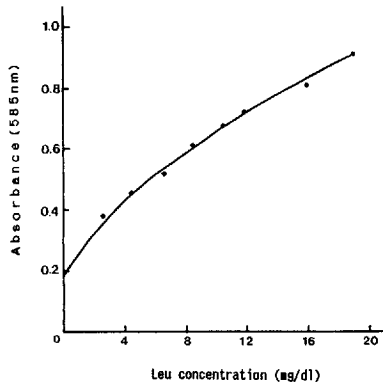
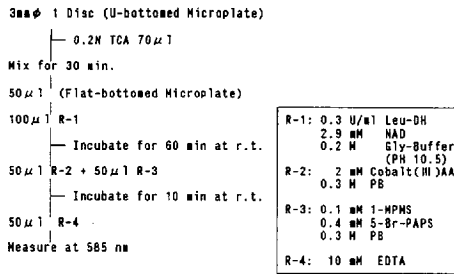
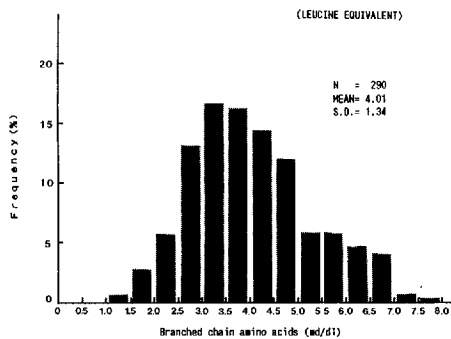


図10. 一般新生児の分枝アミノ酸濃度分布



ニング施設に存在する比色用マイクロプレートリーダーを用いて、定量的なPKU、ガラクトース血症、メイプルシロップ尿症のマスクリーニングを開発した。

メイプルシロップ尿症に関しては、今までロイシンのみを測定していたが、現方法は、ロイシン、イソロイシン、バリンの3つのアミノ酸の総和を測定している。この疾患では、

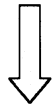
これら3つのアミノ酸が全て増加するので、現在の方法の方がより望ましいスクリーニングテストと言えよう。メイプルシロップ尿症については、今後、正常児の3つのアミノ酸の総和の分布を測定し続けることにより、カットオフが求められるであろう。

理論的には、この3方法とも、一般正常児の分布は、正規分布であるので、+2S.D.あるいは+2.5 S.D.以上を追求するということでスクリーニングが可能であろう。PKUについては、カットオフ値を2 mg/dl程度に設定してのスクリーニングが可能となった。この為、ビオプテリン異常症のスクリーニングも安心して出来るようになった。

しかも、これらの方法は、客観的データが残せるので、精度管理上にも好適である。ただ、多数の検体を扱う施設では、この方法の実施は多少困難であり、自動化機器の開発が必要であろう。いずれにせよ、この方法は、30年続いたガスリー法によるマスクリーニングに置き換えうるものと思われる。

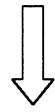
【参考文献】

- 1) Yamaguchi A. et al.: Screening 1, 49-62, 1992
- 2) 成瀬 浩、他: 厚生省心身障害研究、「代謝異常・内分泌疾患等のマスクリーニング進行阻止及び長期管理に関する研究」(班長: 黒田泰弘)平成2年度研究報告書 76-79頁
- 3) Naruse H. et al.: Screening 1, 63-66 1992
- 4) Naruse H. et al.: Proceedings of 8th International Symposium of Neonatal Screening, Sydney Nov. 11-15, 1991, (In press)



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】 昨年の報告において、新しいPKUスクリーニング法として、フェニールアラニン脱水素酵素(Phe-DH)を用い、マイクロプレート法で、蛍光測定による方法を述べた。これも、現実のスクリーニング法として使用可能であるが、今後の普及を考えると、通常の比色法によるマイクロプレート法を開発することがより望ましいのである。

このために、蛍光法を改良し、比色法による方法の開発研究を行い、マススクリーニングに必要な、感度、再現性、安定性を持つ方法を確立した。この方法による測定試薬を、全国のスクリーニングセンターの中で、比較的検体数の多い9ヶ所の施設に配布し、ガスリー法、HPLC法との比較を含め、有用性についての検討を依頼し、マススクリーニング法として使用可能であるという結果を得た。

さらに、この同じ試薬系で、酵素をPhe-DHの代わりに、ガラトース脱水素酵素(Ga1-DH)を使用することにより、ガラクトース血症スクリーニング法として使用可能であることを証明した。また、分枝アミノ酸脱水素酵素(BAA-DH)を用うることにより、メイプルシロップ尿症スクリーニング法としても使用可能であることを立証した。これらは全て、現在、全てのスクリーニングセンターに存在する、比色法マイクロプレートリーダーがあれば、容易に実行できる方法であり、今後の新生児マススクリーニングの中心となるものと考えられる。