

### 新しい標準血液濾紙の品質管理の方法

(分担研究：マス・スクリーニングの精度管理に関する研究)

大橋雄子<sup>1)</sup>、成瀬 浩<sup>1)</sup>、上芝 元<sup>2)</sup>、入江 実<sup>2)</sup>

#### 【要約】

現在、フジレビオ製のフェニルアラニン基準血液濾紙の品質管理はHPLCによるアミノ酸分析やガスリー法によって行なわれている。両方法とも、濾紙血で2mg/dlの低濃度領域で正確な定量性を得ることが難しいので、新しい正確な方法を開発した。本法は酵素を用いて基質をNADと反応させ、生成したNADHを339nmの紫外部吸収で測定し、NADHのモル吸光係数が6,270であることに基づいて、基質濃度の絶対量を算定しようというものである。血液濾紙 3mmディスク10枚を0.2 Nトリクロロ酢酸で4°Cで一昼夜静置抽出して、除タンパクとアミノ酸抽出を同時に行い、それにNADとフェニルアラニン脱水素酵素を加え、室温で反応させた。その後、339nmの紫外部吸収を測定し、濃度を算出した。その結果、本方法は、HPLC法、及び脱水素酵素を用いた蛍光マイクロプレート法などで測定した値ともよい相関を持つこともわかった。この方法はガラクトース基準血液濾紙にも応用可能である。

見出し語：品質管理、Phe脱水素酵素、紫外部吸収測定法

#### 【緒言】

当研究室では、現在ガスリー法及びペイゲン法で使用されているフジレビオ製の血液濾紙の品質管理として、フェニルアラニンはHPLCによるアミノ酸分析によって、ガラクトースは藤村法による蛍光法によって、行なっている。両方法とも、スタンダードを立てることによりそこから検体を定量するという原理だが、本方法は、酵素を用いて基質をN

ADと反応させ、生成したNADHを339 nmの紫外部吸収で測定し、NADHのモル吸光係数が6,270ということから、基質濃度を算定しようというものである。

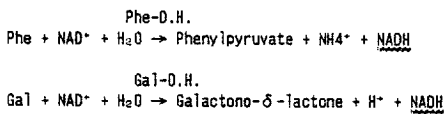
#### 【反応原理】

フェニルアラニンはフェニルアラニン脱水素酵素によって、ガラクトースはガラクトース脱水素酵素によって、それぞれ酸化されると同時にNADはNADHになる(図1)。

1) 杏林大学(財)東京総合医学研究所、2) 東邦大学・医学部・第一内科

このNADHは339nm付近に1モル当り6,270の吸収を持っているので、この反応後の吸光度を測定することにより、生成したNADHの濃度を直接算出することができる。この反応系では、基質と生成したNADHとの比は1:1であることから、上で算出されたNADHのモル濃度は、基質のモル濃度と等しくなるのである。

図1. 反応原理



NADHは339nm付近に1mol当たり、6,270の吸収があるので、この吸収の増減により基質の定量が可能である

図2. 測定手順

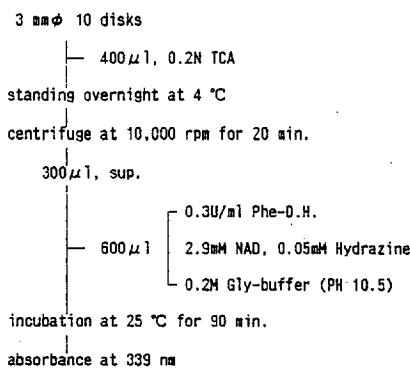


図3. 濃度計算式

$$\begin{array}{l} \text{基質濃度(mM)} = \\ \text{NADH濃度(mM)} = \frac{A_{339\text{nm}} \times 1000}{6270} \times \frac{\text{反応全容量}}{\text{加えた標準溶液の容量}} \end{array}$$

【測定手順】

フェニルアラニンの測定手順は次の通りである。血液濾紙直径3mmディスク10枚をエッペンドルフチューブに入れ、0.2Nトリクロロ酢酸を400μl加え、4°Cで一昼夜静置抽出して、除タンパクとアミノ酸抽出を同時に行う。次に、チューブを10,000rpmで20分間遠心して、その上清を300μlを試験管に取る。そこに、緩衝液(PH10.5)に溶解したNADとフェニルアラニン脱水素酵素を加え、室温で90分間反応させ、その後、339nmの紫外部吸収を測定する(図2)。その値を計算式に当てはめて濃度を算出する(図3)。一方、ガラクトース測定の場合は酵素を替えるのみで他は全く同様である。

【結果】

同じロットのフジレビオ製標準血液濾紙を用いて、フェニルアラニンは、本方法、HPLC法、及び脱水素酵素を用いた蛍光マイクロプレート法と3法で各々測定値を出し(表1)、一方、ガラクトースは、本方法と藤村法での測定値を各々比較してみた(表2)。ここに記した本法での値は、1mg/dlの血液をスポットした濾紙血の3mmディスク1枚で30ng抽出されることを前提として計算した。フェニルアラニンで酵素法、HPLC法との間に差がみられるが、この2方法とも濾紙血スタンダード中のフェニルアラニン量の再検討が必要である。

一方、ガラクトースでは、かなり一致した値が得られた(表2)。

表1で示したフェニルアラニンの値には、本法及び酵素法共他に他のアミノ酸とのクロスリアクションによって生じたNADHが含まれているものと考えられる。そこでこの酵素

の基質特異性を調べた結果を表3に示した。

ロイシンで3.5%ほどのクロスがあることから、本方法、酵素法の値は、もう少し低くなると考えられた。

表1. 血液濾紙のPhe測定値の比較

表示値	A 339nm	酵素法	HPLC
2	2.5	2.3	2.6
4	4.0	4.2	4.4
6	5.3	5.8	6.5
8	7.2	7.6	7.9
10	8.7	9.6	10.0
12	10.0	11.4	11.9
16	12.8	15.1	15.8
20	16.8	18.8	19.9

単位: mg/dl

表2. 血液濾紙のGal測定値の比較

表示値	A 339nm	藤村法
2	1.6	2.4
4	4.4	4.4
6	5.7	6.2
8	6.9	7.6
10	9.2	9.8
16	14.9	15.8
20	18.9	19.2

単位: mg/dl

表3. Phe脱水素酵素の基質特異性

L-Phe	100 %
L-Leu	3.5
L-Tyr	1.7
L-Met	1.7
L-Ileu	0
L-Val	0
L-His	0

各種アミノ酸は0.2N TCAで  
1.2mg/dlに調整した。

### 【考察】

近年、フェニルアラニンのカットオフについては、ピオプテリン異常症を見逃さないために、2mg/dlにすべきであるとの意見がある。こういうこともあり、PKUスクリーニング用の酵素法も登場してきた。今後、フェニルアラニン基準濾紙の品質管理も、2mg/dl程度の低いものについても正確な結果を出すことが必要となる。このため既存の方法では不十分と考え、新しい方法を考案した。本法は十分な血液量を用いれば低濃度領域でも正確に測定可能であり、しかもこの測定のために基準となるスタンダードは必要としないという利点もある。

血液量は、3mmディスクなら10枚程度は必要だが、品質管理という目的を考えれば全く問題はないであろう。この方法の他の特色としては、340nm前後の紫外部吸収を正確に測定する機器があれば簡単に品質管理が可能なことである。さらに上述の様に、ガラクトース基準物質にも応用可能である。

ただ問題は、3mmディスク中の血液量であり、以前のデータから3μlという値を用いたが、濾紙も昔と異なるのでいまの濾紙で3mmディスク中に何μlの血液が含まれているか正確に知る必要がある。このために目下、放射性物質標識化合物を用いて3mm中に含まれる血液量の正確な定量を行いつつあり、またこの方法で血液濾紙からのアミノ酸などの完全な抽出率も計算できると思われる。



## 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】

現在、フジレビオ製のフェニルアラニン基準血液濾紙の品質管理は HPLC によるアミノ酸分析やガスリー法によって行なわれている。両方法とも、濾紙血で 2mg/dl の低濃度領域で正確な定量性を得ることが難しいので、新しい正確な方法を開発した。本法は酵素を用いて基質を NAD と反応させ、生成した NADH を 339nm の紫外外部吸収で測定し、NADH のモル吸光係数が 6,270 であることに基づいて、基質濃度の絶対量を算定しようというものである。血液濾紙 3 mm ディスク 10 枚を 0.2N トリクロロ酢酸で 4 で一昼夜静養抽出して、除タンパクとアミノ酸抽出を同時に行い、それに NAD とフェニルアラニン脱水素酵素を加え、室温で反応させた。その後、339nm の紫外外部吸収を測定し、濃度を算出した。その結果、本方法は、HPLC 法、及び脱水素酵素を用いた蛍光マイクロプレート法などで測定した値ともよい相関を持つこともわかった。この方法はガラクトース基準血液濾紙にも応用可能である。