

マイクロプレート法によるホモシスチン尿症のマス・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： スクリーニングの精度管理のあり方に関する研究)

菊地由生子¹, 山口昭弘¹, 福士 勝¹, 新井純理², 市原 侃², 木村浩男², 望月孝一³, 山口修一³,
武村佐智子⁴, 石黒 満⁴, 田崎隆二⁵, 梅橋豊蔵⁵, 大橋雄子⁶, 成瀬 浩⁶

要 約：ホモシスチン尿症(HCU)の新しいマス・スクリーニング法として開発されたマイクロプレートケイ光法「全血中メチオニン (Met)測定試薬」について、スクリーニングセンター5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Me測定結果は、各施設間で、平均値・再現性に若干系統差が認められたものの、いずれの施設もほぼ正規分布を示した。全体の平均値±SDは $0.66 \pm 0.35 \text{mg/dl}$ ($n=10,947$)であり、一次のカットオフ値を仮に 2mg/dl とすると、これ以上の検体は38例(0.35%)であった。本試薬は、測定操作がマス・スクリーニング用に簡便化されており、Metに加え総ホモシステイン(HSH)も測定できることから、信頼性の高いHCUの新生児スクリーニングが可能となることが期待される。また、本法の開発により、現行の代謝異常症4疾患についてのマイクロプレート法が全て揃い、本来のシステムを確立できることの意義は大きい。

見出し語： マイクロプレート法, ホモシスチン尿症, マス・スクリーニング

研究方法：フィールドサーベイ参加施設の一覧を表に示した。測定試薬は、札幌IDL/チバ・コーニングにより開発された、マイクロプレート蛍光法エンザプレートHCU-F「全血中メチオニン測定試薬」を用いた。本キットの測定原理としては、Met-Lyaseによって、MetあるいはHSHから遊離される NH_3 のo-phthalaldehyde(OPA)/2-mercaptoethanol(ME)との中性域での特異ケイ光を利用するものであり¹²⁾、実験環境からの NH_3 によるコンタミネーションに注意を払

う必要はあるが、操作的には、他のマイクロプレートケイ光法(MFL)と同様に、マス・スクリーニング用に十分簡便化された方法である。

結 果：本測定試薬によるMetの検量線は広い範囲で直線性を示した(図1)。各施設におけるコントロール検体の測定内変動(CV%)は、N=8で測定した21アッセイの結果では、コントロール1(Met 1.8mg/dl)は5.0-22.2%の範囲で平均12.0%、コントロール2(Met

表 フィールドサーベイ参加施設および測定条件

スクリーニング施設	試薬分注操作	プレートリーダー
A. 北海道立衛生研究所	マニュアル	Fluorolite1000 (Dynatech)
B. 札幌市衛生研究所	自動 / MegaFlex (Tecan)	Fluoroskan II (Labsystems)
C. 大宮小児保健センター	マニュアル	MTP-100F (Corona)
D. 静岡県予防医学協会	マニュアル	MTP-100F (Corona)
E. 化学及血清療法研究所	自動 / MegaFlex (Tecan)	MTP-100F (Corona)

¹札幌市衛生研究所, ²北海道立衛生研究所, ³大宮小児保健センター, ⁴静岡県予防医学協会, ⁵化学及血清療法研究所, ⁶杏林大学小児科・東京総合医学研究所

3.9mg/dl)は4.6-12.9%で平均8.2%およびコントロール3 (Met 12.8mg/dl)は2.5-9.7%で平均5.2%と良好な再現性が得られた。また、コントロール検体の測定間変動も測定内と同様に概ね良好であったが、正常上限濃度の

コントロール検体では、変動係数は10%を超えやや大きくなる傾向にあった(図2)。一般新生児検体の平均値は0.41-0.93mg/dlと施設間で若干系統差が認められたものの、ヒストグラムはいずれも、ほぼ正規分布を示し、イレギュラーな異常値も認められなかった(図3)。仮にカットオフ値を2mg/dl(平均+3.8SD)とすると、38例(0.35%)が一次疑陽性となるが、この値は、フェニルアラニン(Phe)や分枝鎖アミノ酸(BCA)のMFLと同様に十分低値であり、細菌抑制試験(BIA法)の抗生剤によるヌケ現象の頻度と同程度あるいはそれ以下の割合である。

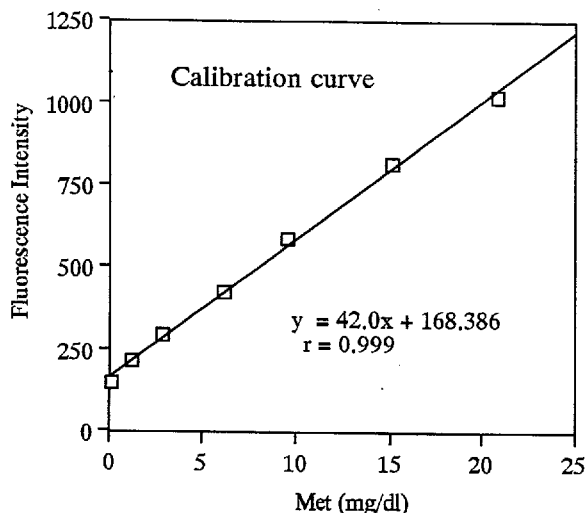


図1 Met標準濾紙血の検量線

考 察： HCUの新生児マス・スクリーニングは、開始以来、BIA法によりMetを測定して行われており、MetのプレートがBIA法の中では最も感度が高く、明瞭な細菌生育円を与えることも良く知られている。しかし、HCUの欠損酵素であるシスタチオン合成酵素の障害では、Metの上昇は二次的であるため、BIA法での見逃し例が報告されてきているのも事実である。

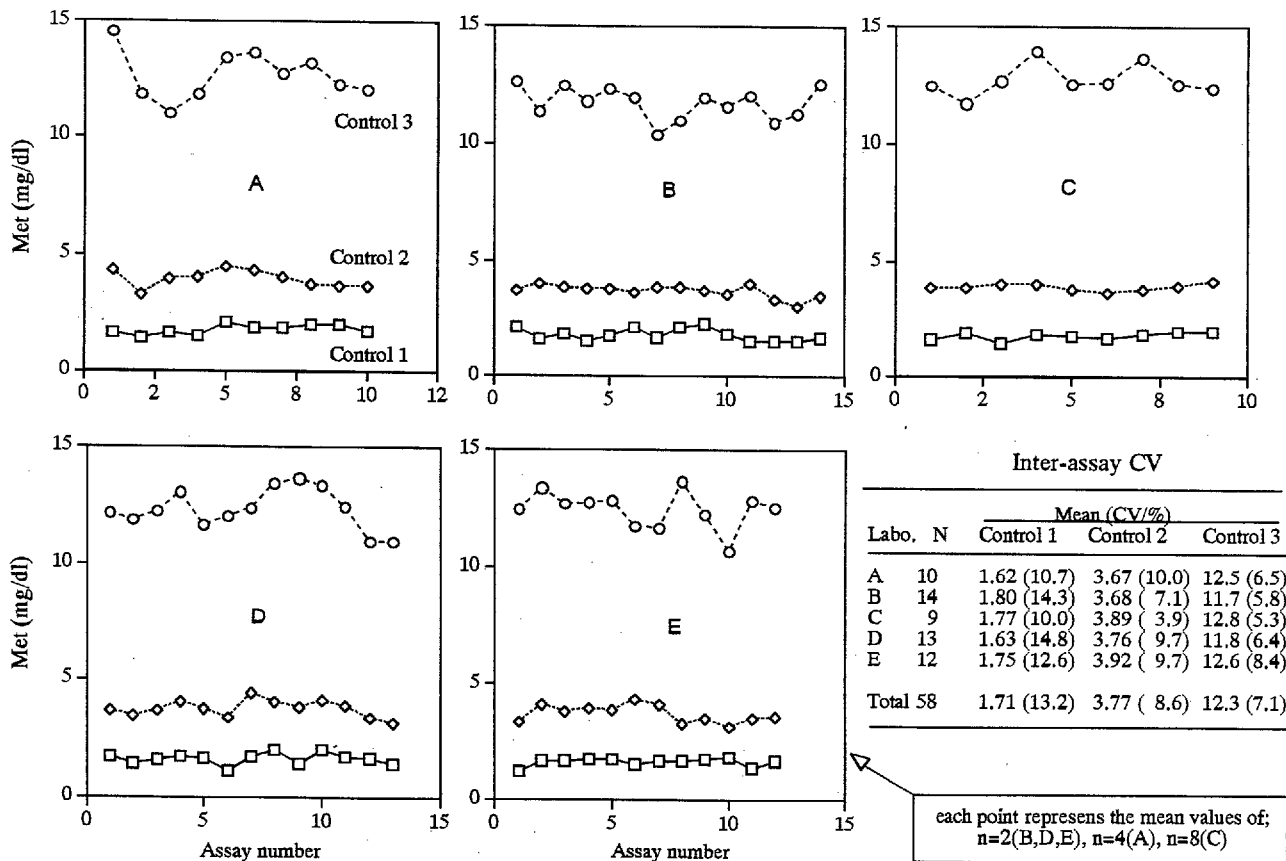


図2 各施設における測定間再現性

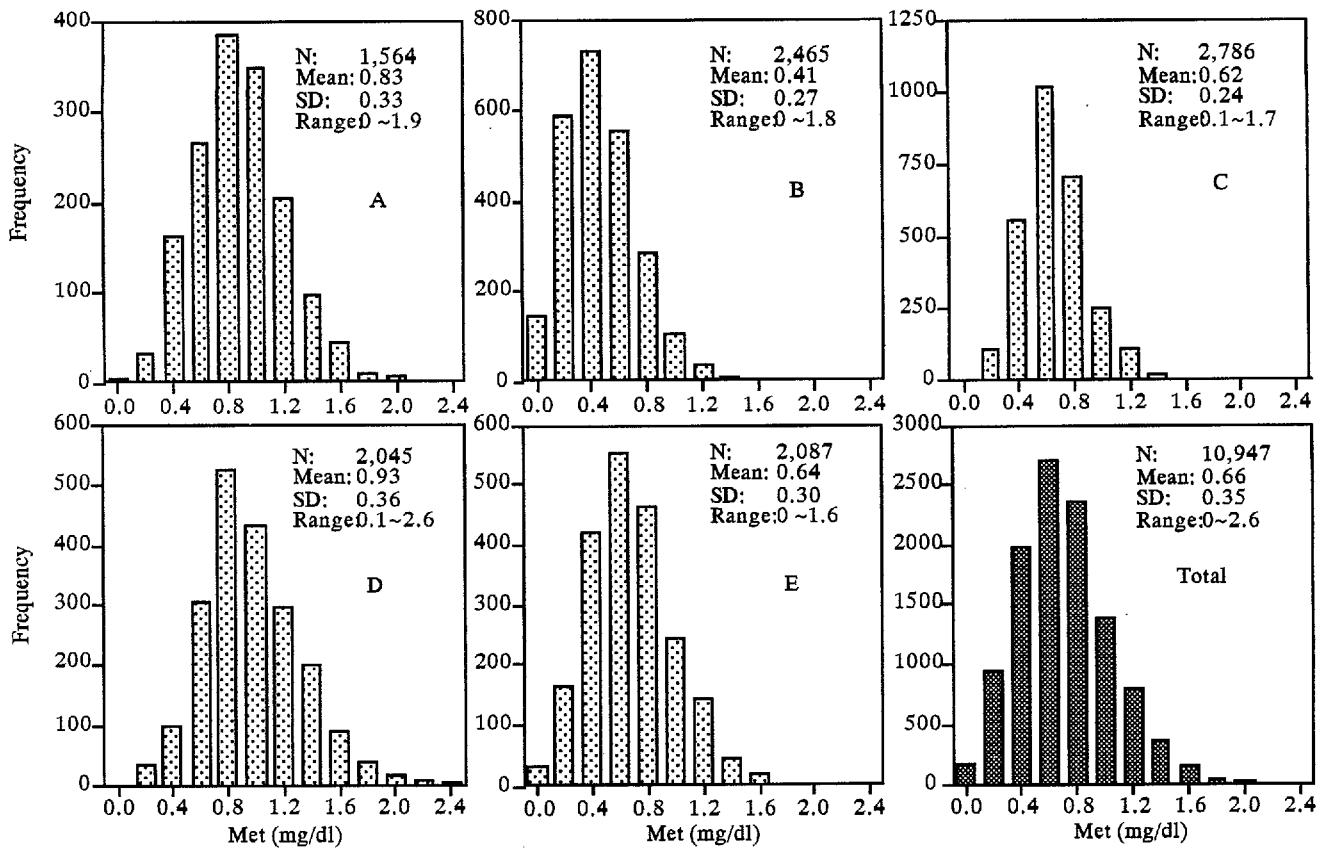


図3 各施設における一般新生児検体の測定結果

これに対して本キットは濾紙血液のMetがマイクロプレートレベルで初めて測定できるようになった方法であり、HSHとの総量が測定できることから、MetあるいはHSH単独の場合に比べ、より信頼性の高いHCUのスクリーニングが可能となることが期待できる。実際、3例のHCU患児の新生児スクリーニング時濾紙血を回収し、本方法により再測定した結果、いずれも確実に検出可能であったことが確認されている²⁾。ただし、本方法はNH₃測定系のため、手指や実験室環境からのNH₃のコンタミネーションに対して、手袋の着用、反応中はプレートのシーリングを厳密に行うなど、操作上の注意が必要である。また、MetおよびHSHの生理的血中レベルは極めて低く、本キットは正常値付近では十分な測定感度を有さないことも理解しておく必要がある。実際、一般新生児検体の測定結果において、施設Bの0.41mg/dlと施設Dの0.93mg/dlでは、2倍以上の差が認められていることになるが、前述の絶対的な感度不足に加え、測定機器の種類あるいは光学フィルターのロット差等による特性の影響が、このような系統誤差を与える原因と考えられる。

今回のフィールドサーベイの結果から、正常値近傍の定量性に関しては、改善の余地を残すが、カットオフ値以上の検体の検出には問題はなく、操作性、安定性および信頼性などのスクリーニング実際面での評価としても、本方法が、HCUのルーチンスクリーニングとして導入可能であると言える。これにより、既にMFLが実用段階となっている他の先天性代謝異常症の項目と合わせ、BIA法に発展的に代り得るMFL本来のシステムを構築することができる。

文献

1. 菊地由生子, 他: 厚生省心身障害研究「マス・スクリーニングシステムの評価方法に関する研究」平成5年度研究報告書, 237, 1994
2. 山口昭弘, 他: 日本マス・スクリーニング学会誌, 5(2), 84, 1995



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: ホモシスチン尿症(HCU)の新しいマス・スクリーニング法として開発されたマイクロプレートケイ光法「全血中メチオニン(Met)測定試薬」について、スクリーニングセンター 5 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 Me 測定結果は、各施設間で、平均値・再現性に若干系統差が認められたものの、いずれの施設もほぼ正規分布を示した。全体の平均値 \pm SD は 0.66 ± 0.35 mg/dl (n=10,947)であり、一次のカットオフ値を仮に 2mg/dl とすると、これ以上の検体は 38 例(0.35%)であった。本試薬は、測定操作がマス・スクリーニング用に簡便化されており、Met に加え総ホモシステイン(HSH)も測定できることから、信頼性の高い HCU の新生児スクリーニングが可能となることが期待される。また、本法の開発により、現行の代謝異常症 4 疾患についてのマイクロプレート法が全て揃い、本来のシステムを確立できることの意義は大きい。