

マイクロプレート酵素法によるホモシスチン尿症のマス・スクリーニング (分担研究：マス・スクリーニングの継続的精度管理に関する研究)

菊地由生子¹，山口昭弘¹，福士 勝¹，佐藤泰昌¹，大竹治美²，藤本昭栄²，
大浦敏明²，長谷 豊³，渡辺倫子⁴，成瀬 浩⁴

要 約：細菌抑制試験(BIA)による新生児先天性代謝異常症マス・スクリーニングにおいて、メチオニン(Met)を指標としたホモシスチン尿症(HCU)の場合、Met上昇の遅延による偽陰性例が存在することが知られている。我々は、HCU偽陰性例の発生防止に加え、Phe等、他の測定項目と同様、定量化によるスクリーニング精度の向上を目的に、乾燥濾紙血液(DBS)中の総ホモシステイン(HSH)あるいはMetのマイクロプレート蛍光法(MFL)の開発を行ってきた¹⁻⁴⁾。最終的にMFLによるシステム化を考慮した時、HSHとMetの総量を測定可能なメチオニン γ -リアーゼ(Met-Lyase)法が、一次スクリーニング法としては最も適した方法であること、さらにこの方法に基づく試薬キットを用いた、全国5スクリーニング施設での新生児10,947名に対するフィールドサーベイの結果からもルーチンスクリーニングへの実用化が十分可能であることを昨年度報告した³⁾。しかしこの中で、正常値付近の定量性に若干の改善の余地が残されていたことから、本年度はこの点における試薬の改良点を踏まえ、MFLによるHCUスクリーニング法の開発経過および特徴について、まとめて報告する。

見出し語：ホモシスチン尿症，新生児マス・スクリーニング，マイクロプレート酵素法，偽陰性例

研究方法：本法は、dithioerythritol(DTE)還元条件下、Met-Lyase(和光純薬工業)により、DBS中のMetおよびHSHから遊離されるアンモニアをo-phthalaldehyde(OPA)/2-mercaptoethanol(ME)との中性域での特異蛍光を利用することにより、MetとHSHの総量を測定するものである²⁻⁴⁾。この原理に基づき、操作面がさらに簡便化された試薬キット；マイクロプレート蛍光法HCU-F「全血中メチオニン測定試薬」(札幌IDL/CHIRON)の改良版(Met-Lyase量の増量)についても評価を行った。

結 果：HCU患児検体の測定結果を、BIA法あるいはHPLC法による結果と共に表にまとめて示した⁴⁾。全ての患児が新生児期のDBSを用いて、MFLによっても検出可能であったことがわかる。ただし、ここでのBIAのMet値は新生児スクリーニング

時に得られた値であるのに対して、MFLおよびHPLCの値は、いずれも1~10年間、冷凍保存されていたDBSについての測定結果である。HPLC⁵⁾によるDBS中のHSHの定量結果からは、HCU患児のHSH値はいずれも正常対照に対して5-10倍程度の明らかな上昇を示しているものの、MFLの測定値への寄与としては約10%と低いことがわかる。

HCU-Fキットについて、改良前後の検量線および再現性を図1および2に示した。昨年度のフィールドサーベイに用いた改良前試薬キットに比べ、酵素量の増量により検量線の高濃度域での直線性が保持されたことを受け、正常レベルにおける再現性の改善が認められた。

考 察：HCUの新生児マス・スクリーニングはBIAによりMetを測定して実施されてきた。そして

¹札幌市衛生研究所，²大阪市環境保健協会，³大阪市鶴見保健所，⁴杏林大学小児科・東京総合医学研究所

Table. Results of Microfluorometry (MFL) /Met for Dried blood Spots from Newborn Homocystinuria

HCU Patients	Age (day)	Met (BIA)	Met+HSH (MFL)	HSH (HPLC)*
Y	5	4-8	4.4	0.30
	9	16-20	11.2	0.73
H	5	2-4	3.2	0.24
	21	12	9.8	0.48
O	6	2-4	3.4	0.36
	18	8	9.4	0.47
Normal Control	Mean±SD	(<1)	1.5±0.3	<0.01
	Range	(<2)	0.1 - 2.2	<0.05

unit: mg/dl-blood

* determined by solution standard without any correction of recovery

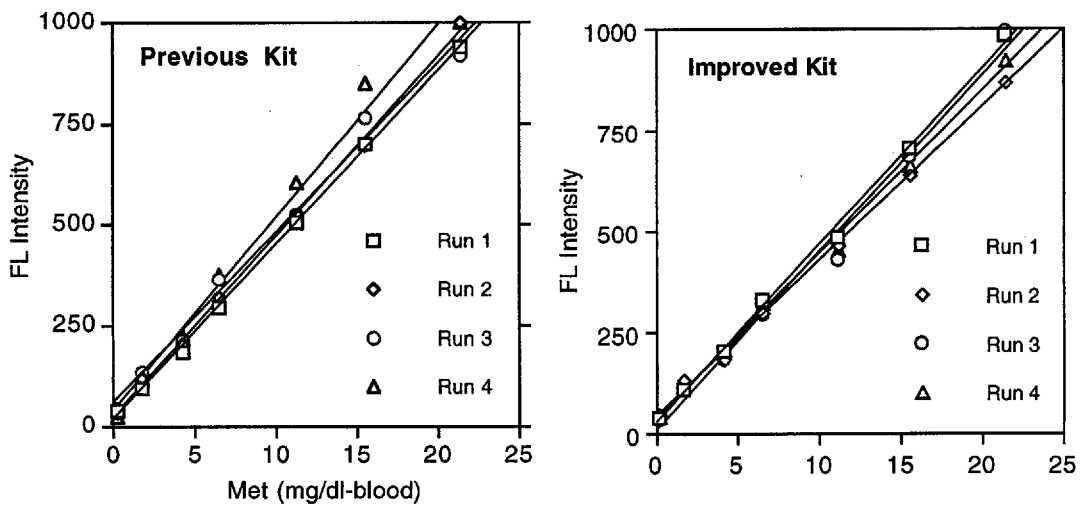


Fig. 1. Comparison of Calibration Curves between Previous and Improved Kits

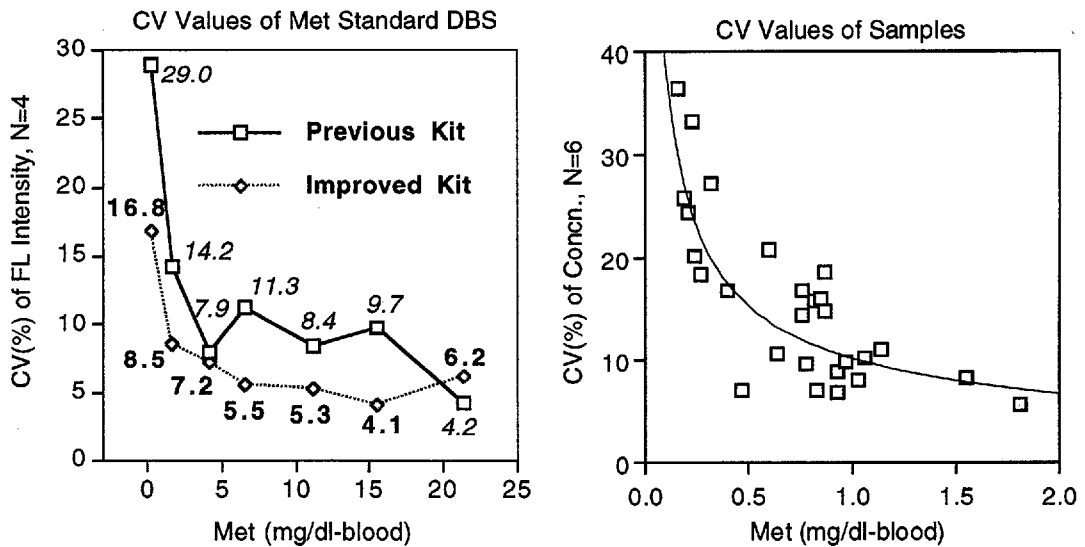


Fig. 2. Comparison of CV values between Previous and Improved Kits

MetのBIAプレートが、最も明瞭な細菌生育円を与え高感度な測定が可能であることも良く知られている。しかしながらHCUの欠損酵素であるシスタチオン合成酵素(CS)の障害では、Metの上昇は二次的であるため、新生児期にはMetが正常レベルであった偽陰性例が相当数存在することも事実である。我が国でも黒田ら⁶⁾による詳細な報告があり、特に、HCUの約半数を占めCS残存活性を有すると考えられる、治療効果の高いVB6反応性の患児が見逃しとなる危険性が指摘されている⁷⁾。

これらのことからCS欠損症において、一次的に上昇する代謝物であるHSHを測定する方法の開発を行ってきたところであるが、HSHは他のアミノ酸に比べ血中濃度が低い($\sim 10 \mu\text{M}$)上に、遊離SH基を有するため反応性が高く、特にDBS試料の場合には回収率が約50%程度と正常レベルの定量は困難であった^{1,5)}。従って、より信頼性の高いHCUスクリーニング法とするために、MetとHSHの総量を測定できるMet-Lyase法の開発を行った経緯がある²⁻⁴⁾。この方法における正常レベルの測定値の意味合いとしては、Met、HSHに加えMet-Lyaseの基質となりアンモニアを放出する類縁物質の合計量となり、MFLとHPLCとの測定値の対比から、それぞれのおおよその寄与は、50,10および40%程度と考えられる。従ってMFL/Metの定量値そのものの『正確さ』には問題が残ることになるが、一次スクリーニング法としてより優先されることは患者群が正常群から明瞭に分離できることであり、現実にはこのことが偽陽性および偽陰性を決定する。表のHCU患児の測定結果を見ると、少なくとも新生児期Metが3mg/dl程度の患児はMFLにおいても確実に検出可能であることがわかる。ただし、MFLの値は長期保存後のDBSによる測定結果であり、MetおよびHSHともに劣下を受け易いアミノ酸であることを考慮すると、新生児採血時にBIAと同時に測定していれば、MFLではより明確に検出できた可能性が高い。今回の患児測定結果からは、BIAによる偽陰性例あるいはMet1.5mg/dl(正

常<1)程度の微増例において、MFLの値がどの程度の上昇を示すかは判断できないが、HSHあるいはMet-Lyaseの基質となる類縁物質の上昇の寄与により、正常群からの分離がより明瞭になることが期待される。また、二次スクリーニング法としてMetをより正確に測定するためには、HPLCあるいはTLCといった分離分析が他のアミノ酸項目と同様に不可欠であるが、DBS中のHSHについてもHPLC⁵⁾に加え、TLC⁸⁾が最近新たに開発されている。

一方、HCU-Fキットについては、昨年度のフィールドサーベイの段階でも十分に一次スクリーニングへの応用が可能であった訳であるが、今回の改良(Met-Lyase量の増量)により、正常レベルの定量値の『精密さ』についても一定の改善を見ており、他のMFL3項目と合わせて、客観的な判定基準に基づく迅速かつ信頼性の高い代謝異常症マス・スクリーニングシステムを構築することが可能となった。

文献

1. Yamaguchi A, et al.: Screening 1992, 1: 49-62.
2. 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 1994: 237-240.
3. 菊地由生子, 他: 厚生省心身障害研究「新しいスクリーニングのあり方に関する研究」平成7年度研究報告書 1996: 215-217.
4. 山口昭弘, 他: 札幌市衛生研究所年報 1995, 22: 72-80.
5. 山口昭弘, 他: 臨床小児医学 1989, 37: 109-113.
6. 黒田泰弘, 他: 厚生省心身障害研究「マススクリーニングに関する研究」昭和63年度研究報告書 1989: 111-113.
7. 長谷豊. ホモシスチン尿症. 松本勇, 坂元正一編. 臨床化学診断学. 東京, ソフトサイエンス, 1995, 230-234.
8. Ohtake H, et al.: Screening 1995, 4: 17-26



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:細菌抑制試験(BIA)による新生児先天性代謝異常症マス・スクリーニングにおいて、メチオニン(Met)を指標としたホモシチン尿症(HCU)の場合、Met 上昇の遅延による偽陰性例が存在することが知られている。我々は、HCU 偽陰性例の発生防止に加え、Phe 等、他の測定項目と同様、定量化によるスクリーニング精度の向上を目的に、乾燥濾紙血液(DBS)中の総ホモシチン(HSH)あるいは Met のマイクロプレート蛍光法(MFL)の開発を行ってきた。最終的に MFL によるシステム化を考慮した時、HSH と Met の総量を測定可能なメチオニン -リアーゼ(Met-Lyase)法が、一次スクリーニング法としては最も適した方法であること、さらにこの方法に基づく試薬キットを用いた、全国5スクリーニング施設での新生児 10,947 名に対するフィールドサーベイの結果からもルーチンスクリーニングへの実用化が十分可能であることを昨年度報告した。しかしこの中で、正常値付近の定量性に若干の改善の余地が残されていたことから、本年度はこの点における試薬の改良点を踏まえ、MFL による HCU スクリーニング法の開発経過および特徴について、まとめて報告する。