

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

HPLC短時間法の新生児スクリーニングへの応用

研究要旨

アミノ酸代謝異常症の新生児スクリーニングに使用されているGuthrie法は優れた方法ではあるが、定量性に欠けること、結果の記録が難しいこと、術者によって優劣を生ずることなどの欠点が指摘されている。そこで、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）短時間法によるスクリーニング法について、検査機関10施設で検討した。

使用機種およびカラムは異なるが、濾紙検体の固定法・抽出法を統一し、Phe, Leu, Metの濃度を一定に調整した検体について10施設で分析した。

その結果、各施設における3種のアミノ酸の分析値はよく一致し、再現性も良好で、本法による分析値とGuthrie法、酵素プレート法による分析結果とよく相関していた。また、本法では1回の操作で複数のアミノ酸を同時に速やかに分析することが可能なため、どのような検査施設にも適応可能であり、機器購入の費用は高価であるものの、新生児スクリーニングの一次検査法として有用と結論された。

研究協力者

大和田 操 (日本大学小児科)  
福士 勝 (札幌市衛生研究所)  
鈴木 健 (東京都予防医学協会)  
日本マス・スクリーニング学会技術部会  
液体クロマトグラフィー研究会

東京総合医学研究所において作成した標準濾紙検体を10施設で統一した方法で固定、抽出し、表1の方法で分析した。濾紙血液のアミノ酸濃度は、それぞれのcut off値付近 (Phe 3 mg/dl、Leu 4 mg/dl、Met 1.5 mg/dl) および高濃度域 (Phe 5 mg/dl、Leu 6 mg/dl、Met 3 mg/dl) の2種類とした。

研究目的

1977年から公費で行われるようになった先天性代謝異常症の新生児マス・スクリーニングの中で、アミノ酸代謝異常症に対するスクリーニング法としては枯草菌を用いるbioassay法、即ちGuthrie法が採用され、その後酵素を用いたプレート法も使用されるようになった。しかし、これら2法には後述するような短所も認められることから、第3の方法としてHPLC法の導入が各所で試みられるようになった。HPLC迅速法がアミノ酸代謝異常症の一次スクリーニングに使用可能か否かを多施設で検討するとともに従来法と比較することが本研究の目的である。

(2) アミノ酸標準溶液の分析

3種のアミノ酸の標準溶液 (和光純薬KK、H型) を20回連続して分析し、それぞれの変動計数について検討した。

(3) 一般正常検体の分析

それぞれの施設で行ったスクリーニングにおいて正常と判定された検体をHPLC法で分析し、現在各施設で使用している分析法における結果との相関についても検討した。

(4) 従来行われている方法との比較

今回の結果をGuthrie法、酵素プレート法の結果と比較して、各方法による分析値の相関、各方法の特徴、長所、短所の比較、更には費用便益について検討した。

研究方法

新生児マス・スクリーニングを担当している検査機関10施設において、同一の標準血液濾紙を用い、濾紙中のフェニルアラニン (Phe)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)濃度をHPLC法により分析した。

1 使用機種と分析条件

各施設で使用したHPLC機種および分析条件を表1に示す。

2 検討事項

(1) 標準血液濾紙検体の分析

研究結果

(1) 濾紙血検体の分析結果

10施設で行った標準濾紙血検体の分析結果を表2に示す。Phe、Leu、Metuに加え分枝鎖アミノ酸イソロイシン (lLeu)、バリン (Val) も同時に分析したが、いずれのアミノ酸の分析でも、各施設間におけるCVは10%以下であり、実際に添加した濃度に極めて近い値を示していた。

(2) 一般正常検体の分析結果と他法との比較

各施設で日常行っている検査で正常と判定された検体をHPLC法で分析した10施設での結果は、いずれのアミノ酸においても正規分布していた。また、従来各施設で行っている方法、即ちGuthrie法、あるいは酵素プレート法による分析結果と良く関連していた。

### (3) アミノ酸検準液の分析結果

いずれのアミノ酸においても、10施設におけるアミノ酸標準液分析値の変動係数は2%以下であった。

### 考察および結論

今回10施設で行ったHPLC短時間法の結果をGuthrie法および酵素プレート法と比較すると、以下のように要約される。

#### (1) 処理能力について

分析時間：プレート法では1日、Guthrie法では2日を要するのに対し、HPLC法では1検体の分析時間は10～15分と短い。検体数：個々の分析とともに連続分析が可能のため、少数の検体でも大量の検体でも対応できる。迅速性：アミノ酸3項目を1回で分析する点が他の2法と異なる（Guthrie法、プレート法では1項目毎に異なった分析系が必要となる）。

#### (2) 費用便益について

機器の費用：HPLCが最も高価であり、Guthrie

法は極めて廉価である。ランニングコスト：プレート法が高く、Guthrie法は極めて安価であり、HPLC法はその中間である。また、HPLC法と他の2法による分析結果は良く関連しており、いずれの方法も遜色がないことは前述のとおりである。

即ち、HPLC短時間法は、検査精度に優れており、3種のアミノ酸を同時に分析し、少数でも大量であっても対応可能な分析能力を具備している点が長所であるが、機器が高価な点が最大の欠点と言える。従って、処理検体の量および分析施設の規模によっては、本法はアミノ酸代謝異常症の新生児スクリーニングにおいて一次検査として充分使用可能であると結論される。

### 【HPLC短時間法検討協力施設】

札幌市衛生研究所  
 富山県衛生研究所  
 (財)東京都予防医学協会  
 東京都立衛生研究所  
 東京総合医学研究所  
 (財)愛知県健康づくり新興事業団  
 (財)大阪市環境保健協会  
 和歌山県衛生公害研究センター  
 (財)山口県予防保健協会  
 (財)化学及血清療法研究所

表1 使用機種および分析条件

分析方法	機種	溶出	使用施設
ポストイオン交換カラム法	日立	gradient	札幌、都衛、愛知、山口、化血研
ポストODSカラム法	日本分光・島津	isoclinal gradient	東予・大阪和歌山
AQCプレラベルODSカラム法	Waters 等	isoclinal gradient	富山 東京総合

表2 10施設における標準濾紙血分析結果

血液濾紙 I	Val	Met	Ileu	Leu	Phe
添加濃度	2.14	1.51	0.71	4.43	3.00
MEAN	2.07	1.51	0.71	4.23	3.01
SD	0.21	0.10	0.09	0.38	0.19
CV	10.0	6.9	12.1	9.1	6.4
MAX	2.43	1.73	0.90	5.21	3.67
MIN	1.64	1.3	0.60	3.41	2.74

血液濾紙 II	Val	Met	Ileu	Leu	Phe
添加濃度	4.27	2.98	2.13	6.24	5.08
MEAN	4.20	2.92	1.99	6.14	4.94
SD	0.29	0.17	0.13	0.44	0.39
CV	6.9	5.8	6.8	7.2	7.8
MAX	4.65	3.23	2.29	6.85	6.00
MIN	3.42	2.59	1.78	5.08	4.42