

逆相イオンペアクロマトグラフィを用いた 乾燥血液ろ紙中のアミノ酸分析

High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids Based on Reversed Phase Ion Pair Chromatography for Dried Blood on Filter Paper

浅野みね子 折登 朱美 辻森 恵子
前田 博之 青木 襄 高杉 信男

Mineko Asano, Akemi Orito, Keiko Tsujimori,
Hiroyuki Maeda, Minoru Aoki and Nobuo Takasugi

先天性代謝異常検査の公定法であるガスリー法は、マス・スクリーニングとして優れた方法であるが、抗生物質等によるいわゆる「抜け」検体や、検査に長時間を要するなどの問題点がある。そこで、我々は補助手段として、林ら^{1) 2)}により考案された逆相イオンペアクロマトグラフ装置を購入し、健常児108件とフェニルアラニン高値の患児3例について、各種のアミノ酸を測定したので報告する。

方 法

(1) 試 薬

緩衝液：① 0.05Mラウリル硫酸ナトリウム（30%モノクロル酢酸でPH 3.0）

② アセトニトリル1容に①を加えて2容としたもの）

発色液：0-フタルアルデヒド 200 mgをエタノール100 mlに溶解し、更に2-メルカプトエタノール0.5 mlならびに0.1Mほう酸緩衝液（PH 9.0）を加えて1 lとしたもの。

抽出液：内部標準物質γアミノ酪酸を含む70%エタノール溶液。

(2) 材 料

ガスリー法で陰性とされた生後5～7日の新生児の乾燥血液ろ紙。

(3) 分析装置

装 置：けい光検出器付アミノ酸自動分析計協和精密製K 202 G

オートサンプラー：協和精密製KSST-601

(4) 分析条件

カラムサイズ：4 mmφ × 250 mm

充てん剤：Kyowa μ pack C8 Gel

移動相およびグラジェント方式：緩衝液①と②による2液コンティニューアスグラジェント

流 速：1 ml/min

温 度：37℃

測定波長：励起 365 nm, 蛍光 450 nm

(5) 試料の前処理

直径1/8インチに打ち抜いた乾燥血液ろ紙5枚に抽出液500 μlを加えて攪拌し超音波で10分間振とう後、遠心分離した。

その上清をエバポレータで蒸発乾固し、緩衝液①を150 μl加え再溶解したものを試料とした。

結 果

標準混合試料の20回連続測定における変動係数は0.4～1.8%であった（表1）。

回収率は4.8 mg/dl添加で63.6～107.5%，平均回

表1 標準試料によるアミノ酸の20回自動分析測定結果 (蛍光強度)

(単位 $\frac{\text{アミノ酸蛍光強度}}{\text{内標蛍光強度}}$)

アミノ酸 統計値	タウリン (TA)	アスパラギン酸(AS) セリン (SE)	グルタミン酸 (GL)	スレオニン(TH) グリシン (GL)	シトルリン (CI)	アラニン (AL)	チロジン (TY)	バリン (VA)	メチオニン (ME)
平均値	13.77	1.95	0.54	5.67	1.08	2.14	0.75	1.13	1.36
標準偏差	0.25	0.03	0.01	0.07	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
変動係数%	1.8	1.5	1.5	1.1	0.6	0.5	0.4	0.4	0.7

アミノ酸 統計値	イソロイシン (IL)	フェニールアラニン (PH)	ロイシン (LE)	トリプトファン (TR)	ヒスチジン (HI)	オルニチン(OR) ホモシスチン(HO)	リジン (LY)	アルギニン (AR)
平均値	1.20	0.98	1.99	0.85	0.50	3.42	3.79	1.79
標準偏差	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.06	0.06	0.01
変動係数%	0.4	0.9	0.5	0.4	1.1	1.7	1.7	0.7

表2 乾燥血液ろ紙添加回収率

アミノ酸 統計値	タウリン (TA)	アスパラギン酸 (AS)	グルタミン酸 (GL)	スレオニン(TH) グリシン (GL)	シトルリン (CI)	アラニン (AL)	チロジン (TY)	バリン (VA)	メチオニン (ME)
4.8 mg/dl 添加血液	92.0	63.6	75.5	84.7	107.5	79.9	87.5	93.0	96.9

アミノ酸 統計値	イソロイシン (IL)	フェニールアラニン (PH)	ロイシン (LE)	トリプトファン (TR)	ヒスチジン (HI)	オルニチン(OR) ホモシスチン(HO)	リジン (LY)	アルギニン (AR)	セリン (SE)
4.8 mg/dl 添加血液	100.8	97.9	98.1	88.0	86.3	72.9	77.6	78.9	96.3

表3 健常児のアミノ酸測定値

(単位 mg/dl)

アミノ酸 測定値	タウリン	グルタミン酸	スレオニン グリシン	アラニン	チロジン	バリン	メチオニン	イソロイシン	フェニールアラニン	ロイシン	トリプトファン	ヒスチジン	リジン
平均値	3.8	4.6	2.7	3.3	1.8	1.9	0.3	0.8	0.9	1.5	0.7	1.3	1.8
測定値	上	6.0	7.8	4.8	5.5	4.0	0.5	1.4	1.5	2.5	1.1	2.9	2.7
	下	2.4	2.7	1.5	2.0	0.8	痕跡	0.4	0.5	0.9	0.4	0.6	1.2

表4 フェニールアラニン高値患児の分析例

(単位 mg/dl)

患者	日令	タウリン	グルタミン酸	スレオニングリシン	アラニン	チロジン	バリン	メチオニン	イソロイシン	フェニールアラニン	ロイシン	トリプトファン	ヒスチジン	リジン
A	6	4.1	11.2	4.4	4.4	1.8	3.5	—	1.2	28.4	—	0.8	1.6	1.5
B	7	3.3	7.4	2.7	2.5	1.1	1.8	0.5	0.7	18.3	—	0.7	1.0	1.3
C	7	4.2	7.9	3.8	4.3	2.1	3.6	—	1.4	3.4	2.6	0.8	1.8	2.5

収率は、87.6%であった。

分析時間は約20分間のカラム再生処理も含めて約1時間であった。

健常児の乾燥血液ろ紙108検体について、17種のアミノ酸を測定した結果、その値はグラフ上で対数正規分布を示したので、測定値の範囲を平均値±2SDに設定した($P \leq 0.05$) (表3)。

これは沖村らの報告^{4) 5)}と同様な結果であった。

フェニールアラニン高値の患者3例について、各種アミノ酸の分析結果を示した(表4)。

フェニールケトン尿症(以下PKU)について、その検査結果をまとめた厚生省「小児慢性疾患に関する研究報告書」によると^{6) 7)}、生後7日以前に発見されたPKUのフェニールアラニン値は、最低が4日目の10mg/dl 1例のみであり、次いで18mg/dlが1例のほかはすべて20mg/dlを示し、また高フェニールアラニン血症では4~6mg/dlが最も低く、その他は8mg/dl以上と報告されている。表4の患児Aは生後6日目で28.4mg/dl、Bは7日目で18.3mg/dlで精密検査の結果、古典的PKUと診断され治療をうけた。また7日目で3.4mg/dlの患児Cは再採血の結果一過性の高フェニールアラニン血症と診断された。なおPKUの特徴とされているチロジン、トリプトファンの異常低値⁸⁾に関しては、患児Bにおいてチロジンがやや低値であった。

他の分析例^{4) 5)}ではイオン交換クロマトグラフ法(ニンヒドリン反応発色法)が用いられている

が、当所で用いた逆相イオンペアクロマトグラフ法は再現性も良く分析時間も約1時間で済むことなどから、先天性代謝異常検査に有効と考える。

最後に本装置作動開始にあたり、助言下さいました宮城県衛生研究所沖村氏、北海道衛生研究所加藤氏、市原氏、懇切丁寧な指導を賜りました国立神経センター林氏、増田氏ならびに成瀬氏の諸先生に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 林 時司, 小田島あゆみ, 土屋博紀, 成瀬浩 : 分析化学, 32, 692 ~ 697 (1983).
- 2) 林 時司, 小田島あゆみ, 土屋博紀, 成瀬浩 : 第6回生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集, 9 ~ 11 (1983).
- 3) 浅野みね子, 山田慶子, 佐藤敏雄, 林 英夫, 高杉信男, 荒島真一郎, 中田文輝 : 札幌市衛生研究所年報, 7, 79 ~ 82 (1979).
- 4) 沖村容子, 川野みち, 牛沢 勇 : 宮城衛研年報, 55, 41 ~ 43 (1980).
- 5) 沖村容子, 川野みち, 牛沢 勇 : 宮城衛研年報, 56, 38 ~ 40 (1980).
- 6) 厚生省心身障害研究小児慢性疾患研究班 : 小児慢性疾患に関する研究報告書, 135~147 (1980).
- 7) 厚生省心身障害研究小児慢性疾患研究班 : 小児慢性疾患に関する研究報告書, 85~101 (1981).
- 8) 高井俊夫, 荒川雅男, 国分義行監修 : 先天性代謝異常 P64~71 (1973) 診断と治療