

神経芽細胞腫マス・スクリーニング — 高速液体クロマトグラフィーによる VMA, HVAの直接測定法 —

Direct determination of VMA and HVA by high performance liquid chromatography and its application of mass-screening for neuroblastoma

花井 潤師 辻 慶子 関 千春
田口 武 佐藤 泰昌 青木 襄
富所 謙吉 高杉 信男 武田 武夫*

Junji Hanai, Keiko Tsuji, Chiharu Seki, Takeshi Taguchi, Yasumasa Sato, Mihoru Aoki, Kenkichi Tomidokoro, Nobuo Takasugi and Takeo Takeda

尿ろ紙中のVMA, HVAの直接測定法として, 高感度電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いることにより, 酢酸エチル抽出を行わず, 簡単な振とう抽出操作のみの測定法を開発したが, 従来の抽出法による測定値との相関も良好なことから, より迅速なスクリーニング法として有効であった。

1 緒 言

札幌市では, 昭和 56 年 4 月から神経芽細胞腫マス・スクリーニングを開始し, 59 年度あらたに発見した 4 例を加え, 現在まで合計 11 例の患児を発見し, 治療を行ってきた。

検査は, 59 年度から, 高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) に高感度な電気化学検出器を装着し, 全検体中の VMA, HVA 定量を, 試料の導入からデータ処理まですべて自動化するシステムで行っている^{1)~3)}。

それに対して, 従来の検査法は, 紫外外部吸光度計⁴⁾や蛍光光度計⁵⁾付き HPLC による VMA, HVA 定量に感度の増大や妨害物質除去のため, 複雑な酢酸エチル抽出などの操作が必要であり, 迅速なスクリーニングを行う上で障害となっていたが, 希

積尿を試料とした前処理を行わない測定法^{6),7)}の他には, 尿ろ紙を用いるスクリーニング法としては, 簡易な VMA, HVA 測定法がないのが現状であった。

そこで, 今回, 電気化学検出器付き HPLC により, 簡単な振とう抽出のみで尿ろ紙中の VMA, HVA を直接測定する方法 (以下直接法) を開発したので報告する。

2 方 法

2-1 採尿用ろ紙

30 × 56 mm サイズの東洋ろ紙 (No. 63) に幅 8 mm, 奥行 20 mm の切り込みを入れ, 採尿後, その 8 × 20 mm 相当分を試料とした。

* 国立札幌病院小児科

2-2 試薬

VMA, HVAはいずれも Sigma 製を, クレアチニンは東京化成製を, HPLC用アセトニトリルは関東化学製を, その他の試薬は特級品を用いた。

2-3 装置

- (1) 高速液体クロマトグラフ: 日立 638-50型, 協和精密 KHP-010型
- (2) 電気化学検出器: BAS LC-4B型
- (3) オートサンプラー: 協和精密 KSS T-60型
- (4) データ処理装置: システムインストルメント SIC 7000B型
- (5) マイクロプレートリーダー: インターメッドイムリーダー NJ-2000型
- (6) 振とう器: サーマル化学産業 TS-100型

2-4 測定方法

8 × 20 mm尿ろ紙に0.05M酒石酸塩緩衝液 (pH 3.3) 2.0 mlを加え, 10分間振とうし, 遠心分離後上清をとり, その10 μlをHPLCに導入してVMA, HVAを定量し, 同時にその100 μlをマイクロプレートに分取してクレアチニンを定量した(図1)。このクレアチニン定量は, 0.5%ピクリン酸と0.75 N NaOHの等量混液 150 μlを加え, 20分間室温放置後, マイクロプレートリーダーにより510 nmの吸光度を測定することで行った。

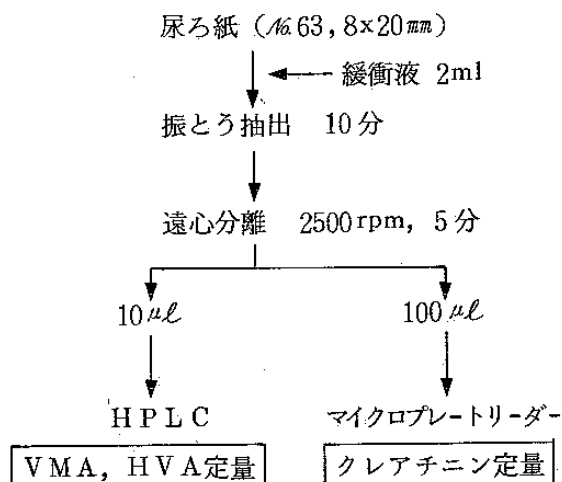


図1 直接法によるVMA, HVA, クレアチニンの測定法

2-5 HPLC条件

カラムに Hitachigel 3013-0 (4φ × 250 mm) を, 移動相に0.05M酒石酸塩緩衝液 (pH 3.3) とアセトニトリルの 500:65の混液を用い, 流速は1 ml/分, カラム温度は40°C, 検出器加電圧は900 mV (VS Ag/AgCl)に設定した。

3 結果および考察

3-1 HPLC条件の検討

直接法では, VMAの前後に多くの不明ピークが出現するために, VMAの保持時間をできるだけ長く, しかし, HVAは15分以内に溶出する条件に, 移動相の pHと溶媒の混合比を検討した結果, pH 3.3の0.05M酒石酸塩緩衝液とアセトニトリルの混合比 500:65の条件が最適であった。

そこで, この条件下で, 正常な乳児尿を, 直接法と従来の酢酸エチル抽出法 (以下抽出法) で前処理したときのクロマトグラムを比較すると, 直接法ではVMAの前後に不明ピークが多数出現しているが (図2), VMA, HVAともこれらの不明ピークとは完全に分離しており, 保持時間もそれぞれ4.2分, 13.5分であり, 短時間で精度の高い分析が可能であった。

3-2 溶出率の検討

VMA, HVA, クレアチニンのろ紙からの溶出率は, ろ紙に各標準溶液に添加して風乾し, 図1の方法で検討した。

その結果, VMA, HVAの溶出率は, 低濃度側ではそれぞれ92, 96%であったが, 高濃度側では83, 89%であった。

また, クレアチニンは, 各濃度についてすべて95%以上の溶出率であった (表1)。

以上の結果から, 実際の定量でも, 標準溶液は, 予めVMAとHVAを添加したろ紙を試料と同じ前処理を行って調製し, 検量線を作成した。

なお, 溶出液の pHを1~12に変え同様の検討を行ったが, 溶出率の差は認められなかった。

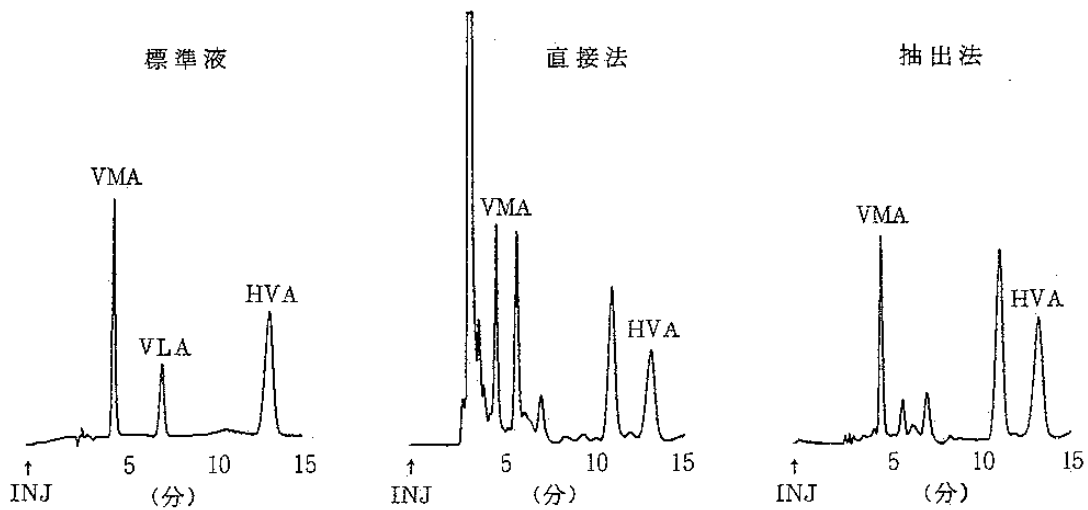


図2 直接法と抽出法によるVMA, HVAのクロマトグラム

表1 標準添加ろ紙からのVMA, HVA, クレアチニンの溶出率 (n=10)

成分	添加量 (μg)	測定値 (mean ±SD μg)	溶出率 (%)
VMA	0.5	0.46 ± 0.01	92.4
	1.0	0.83 ± 0.02	82.7
HVA	1.0	0.96 ± 0.03	96.1
	2.0	1.78 ± 0.04	88.9
クレアチニン	10	9.75 ± 0.13	97.5
	25	24.21 ± 0.16	96.8
	50	49.20 ± 0.59	98.4
	100	99.79 ± 1.12	99.8

3-3 従来法との比較

3-3-1 VMAおよびHVAについて

スクリーニングの結果、異常が認められなかった約100例のろ紙尿について、直接法と抽出法によるVMA, HVA値の比較を行った。

その結果、VMAは、回帰式 $y = 0.927x + 0.007$ 相関係数0.954であり、HVAでは $y = 0.974x + 0.003$, 0.968と、両者とも良好な相関が認められた(図3, 4)。また、回帰式がほぼ原点を通る傾き1の直線を示すことから、直接法による測定値に信頼性のあることが認められた。

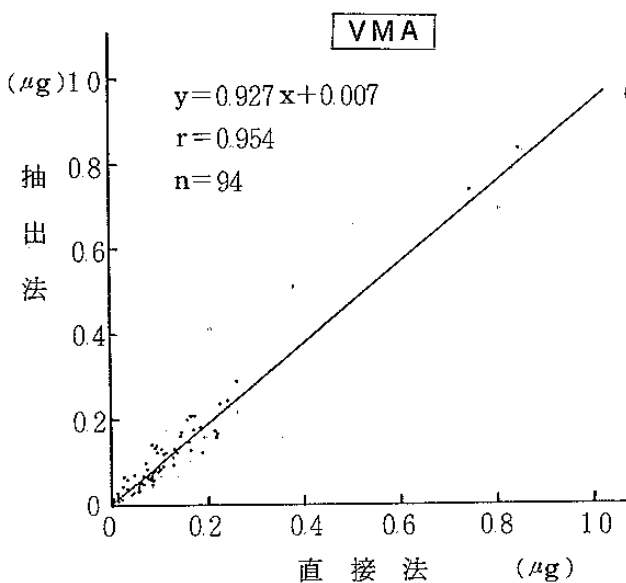


図3 直接法と抽出法による尿ろ紙中VMAの相関

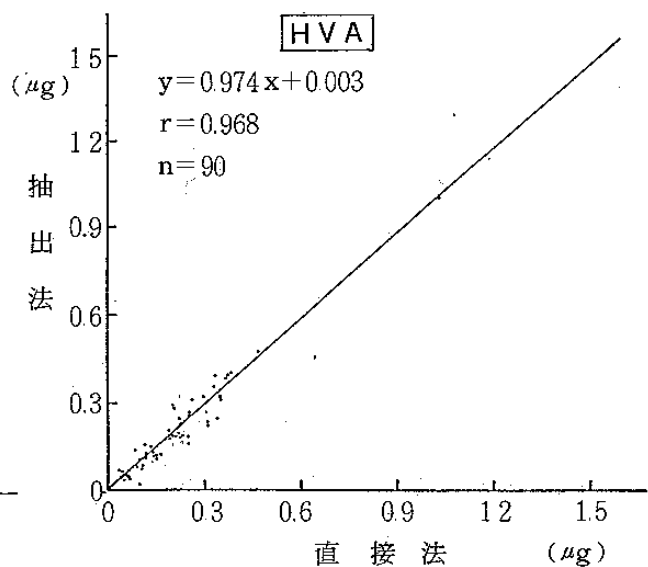


図4 直接法と抽出法による尿ろ紙中HVAの相関

3-3-2 クレアチニンについて

クレアチニン測定に、Jaffé 反応に基づく Folin-Wu 法をマイクロプレートを用いて行ったところ、迅速な測定が可能であった。

そこで、従来法によって測定した濃度既知の乳児尿をろ紙に添加し、直接法により測定したところ、その50検体について、相関係数は0.969、回帰式は $y = 0.96x + 3.3$ であり、従来法とマイクロプレートを使用した直接法との間に差が認められなかった(図5)。

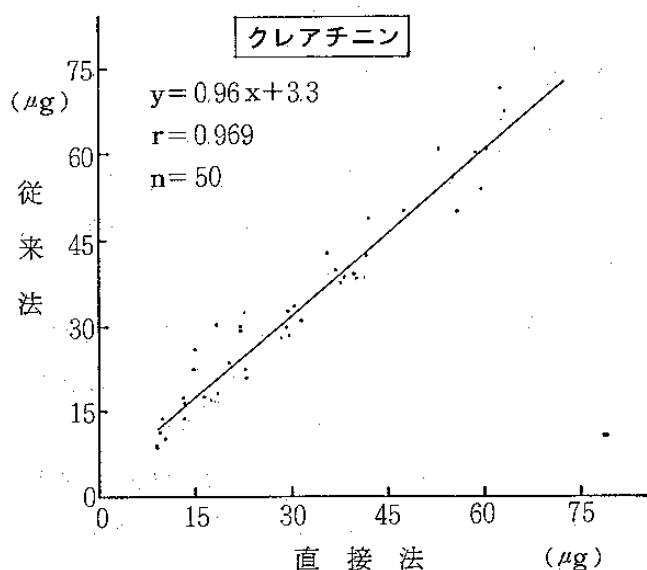


図5 直接法と従来法による尿中クレアチニン相関

4 結 語

- (1) 尿ろ紙中VMA, HVAの定量が、高感度な電気化学検出器を装着したHPLCを用いることによって、繁雑な酢酸エチル抽出が省略され、簡単な抽出操作のみで行うことが可能となった。
- (2) 振とう抽出による直接法で測定したVMA, HVAの値と抽出法での値との間には良好な相関があり、ほぼ傾き1の回帰式を示したことから、測定値に信頼性のあることが認められた。
- (3) 直接法の前処理時間が、抽出法の1/10程度なので、より迅速なスクリーニングの効果が期待される。

5 文 献

- 1) 佐藤泰昌, 佐藤勇次, 田口武, 辻慶子, 林英夫, 高杉信男, 武田武夫: 小児科. 24, 1133-1140 (1983).
- 2) 花井潤師, 辻慶子, 田口武, 落合玲子, 佐藤栄里子, 佐藤泰昌, 前田博之, 青木襄, 林英夫, 高杉信男, 武田武夫: 札幌市衛生研究所年報. 11, 41-47 (1984)
- 3) 佐藤泰昌, 福士勝, 高杉信男, 武田武夫: 日本小児科学会誌. 89(12), 2665-2671(1985).
- 4) Bertani-Dziedzic, L.M., Gitlow, S. E.: J. Chromatogr. 164, 345-353 (1979).
- 5) Yoshida, A., Yoshioka, M., Yamazaki, T., Sakai, T., Tamura, Z.: Clin. Chim. Acta. 73, 315-320 (1976).
- 6) Kodama, K., Nakata, T., Aoyama, M.: J. Chromatogr. 311, 369-374 (1984).
- 7) Fujita, K., Maruta, K., Ito, S., Nagatsu, T.: Clin. Chem. 29 (5), 876-878 (1983).