

濾紙血液中の乳酸測定による高乳酸血症のスクリーニング法について

Measurement of Lactic Acid in Dried Blood Spot for Screening of Lactic Acidosis

水嶋 好清 山口 昭弘 福士 勝 荒井 修
佐藤 泰昌 清水 良夫 富所 謙吉 高杉 信男

Yoshikiyo Mizushima, Akihiro Yamaguchi, Masaru
Fukushi, Osamu Arai, Yasumasa Sato, Yoshio
Shimizu, Kenkichi Tomidokoro, Nobuo Takasugi

新生児濾紙血液中の乳酸をマイクロプレートを用いる酵素法により測定し、高値検体についてHPLCにより乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸を測定する方法について検討した。酵素法、HPLC法ともに再現性、簡便性等において優れており、高乳酸血症のマス・スクリーニング法としての有用性を認めた。

1 緒 言

近年、高乳酸血症を伴う有機酸代謝異常症が数多く報告され¹⁾、その多くは発育不全や精神運動発達遅延を伴い、代謝性アシドーシスや呼吸不全等で死亡する例も存在するため、早期に発見し、早期に治療を行うことが重要である。しかし、現在新生児期のマス・スクリーニングは技術的に困難とされ、代謝性アシドーシスなどの臨床症状を認めたのち、専門機関でガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC-MS)等による尿中有機酸分析により発見されている例がほとんどである。

先天性高乳酸血症は、多くの酵素欠損によって起ることが知られており、そのおもなものは、ピルビン酸の酸化経路の障害、糖新生経路の障害、電子伝達系の異常などであり、その他にメチルマロン酸血症やプロピオン酸血症などによっても二次的に乳酸が増加することが知られている。

本邦の有機酸代謝異常症は、昭和60年度の全国調査結果²⁾で148例が報告され、高乳酸血症が67例、

メチルマロン酸血症が47例、プロピオン酸血症が18例であり、大多数がこの3疾患で占められている。

また、高乳酸血症などの有機酸血症の治療法は、酵素欠損部位の違いや重症度などによって異なるが、解糖系やTCAサイクルなどの補酵素であるビタミンやジクロル酢酸の投与や、アシドーシスの緩和に重曹の投与、また食事療法として低炭水化物、高脂肪食が有効とされている。

以上のことから、新生児の濾紙血液を用いて血中乳酸を測定することによって、有機酸代謝異常症のうちで主要な疾患についてのスクリーニングが可能と思われる。そこで、一次検査として酵素法により乳酸を測定し、高値検体については、二次検査として高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による簡便な有機酸分析によって、乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸を検出する方法を検討したので報告する。

2 方法

2-1 対象

札幌市内で出生した新生児を対象に生後5~7日に採血された乾燥濾紙血液を試料とした。

2-2 試薬

酵素反応用のLDH(乳酸脱水素酵素, 550 U/mg, ブタ筋肉由来), ジアホラーゼ(Diaphorase, 15 U/mg, 微生物由来)はBMY社製を, INT(3-(p-Iodophenyl)-2-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-2H tetrazolium chloride)はドータイト製を, NAD(ニコチン酸アミドアデニンジスクレオチド酸化型リチウム塩)はBMY社製を使用した。その他の試薬は特級品を使用した。

2-3 装置

酵素反応測定用にはマイクロプレートリーダー NJ-2000型(インターメッド社製)を用い, 490 nm

での吸光度を測定し, オンラインによりPC-9800 VF型(NEC製)を用いてデータ処理を行った。

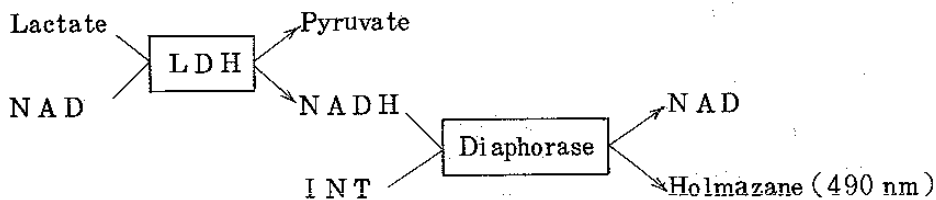
HPLCには, 日立655型液体クロマト用ポンプ, 検出器には島津SPD-6Aを, データ処理には日立655-60型を用いた。

2-4 酵素法による乳酸測定

3 mmディスク1枚をU型マイクロプレートにパンチし, メタノール・アセトン・水(35:35:10)10 μ lを加えて, 37°C 30分乾燥し, 色素の固定化を行う。水30 μ lで10分間溶出させ, その20 μ lを平底マイクロプレートに移す。2 mM NAD, 11 U LDH, 1.5 mM INT, 0.4 U ジアホラーゼ, 0.1% トリトンX-100 含有0.24 M グリシルグリシン緩衝液(pH 10.0)を50 μ l加え, 25°Cで30分間反応させ, 水150 μ lを加えて490 nmで吸光度を測定した。(図1)。

図1 酵素法による乳酸測定法

原理



操作法

3 mm濾紙血液1枚(U底プレート)
+アセトン:メタノール:水(35:35:10) 10 μ l

↓ 37°C 30 min

精製水 30 μ l

↓ 10 min vortex

分取 20 μ l (平底プレート)

+反応液 50 μ l

| | | |
|--------------------|--------------------------------|------------|
| 0.25% Triton X-100 | 0.6 M Gly-Gly Buffer (pH 10.0) | 20 μ l |
| 20 mM NAD | | 5 μ l |
| 110 U/ml LDH | | 5 μ l |
| 7.5 mM INT | | 10 μ l |
| 2 U/ml Diaphorase | | 10 μ l |

↓ 25°C 30 min

精製水 150 μ l

プレートリーダーで吸光度測定(490 nm)

2-5 HPLCによる有機酸分析

イナートシルODS-2, 4.6 × 250 mmカラム(ガスクロ工業製)を使用し, 移動相として10 mMリン酸緩衝液(pH 3.0)を用い, 流速1 ml/min, カラム温度40°C, 検出はUV 210 nmとした。

試料の調製は3 mmディスク1枚を酵素法と同様に固定化し, 内部標準としてp-アミノ安息香酸を1 μg/ml含有する移動相を100 μl加え, その10 μlを分析した。

3 結果

3-1 酵素法による乳酸測定

酵素法による乳酸測定におけるスタンダード直線は200 mg/dlまで直線性を示し, その相関係数は $r = 0.9999$ であった。

濃度の異なる3点のコントロール試料について, 同一測定内および異なる測定間における再現性を調べたところ, CV 6.8~8.0%と良好な再現性を示した(表1)。

表1 酵素法による測定内、測定間変動

| 測定内変動 (n=6) | | | |
|------------------|------|------|-----|
| 乳酸 (mg/dl blood) | | | |
| | mean | SD | CV% |
| S-1 | 15.5 | 1.22 | 7.9 |
| S-2 | 29.4 | 2.37 | 8.0 |
| S-3 | 56.7 | 4.05 | 7.1 |
| 測定間変動 (n=6) | | | |
| | mean | SD | CV% |
| S-4 | 16.4 | 1.20 | 7.3 |
| S-5 | 30.9 | 2.23 | 7.2 |
| S-6 | 55.1 | 3.75 | 6.8 |

保存試験として, モノヨウド酢酸処理の濾紙および従来の代謝異常検査用濾紙にスポットした濾紙血液は, いずれの濃度においても経時的な変化はなく, 1ヶ月まで安定であった(図2)。

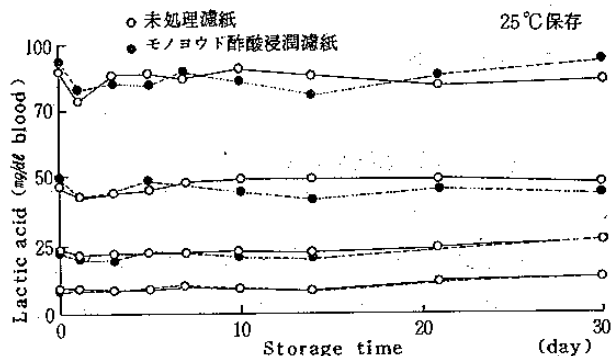


図2 濾紙血液の保存試験

また, -25°C, 4°C, 37°Cにおいても同様に変化は認められなかった。

採血後すみやかに過塩素酸除タンパクした全血上清の乳酸値と, 濾紙に全血をスポットして作製した濾紙血液中の乳酸値の相関は, $r = 0.983$, $Y = 0.877X + 11.2$ と濾紙血液でやや高値であった(図3)。

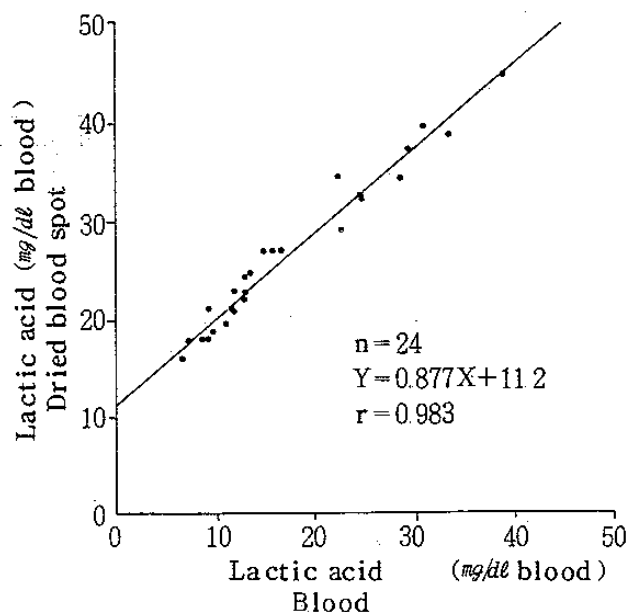


図3 全血と濾紙血液との相関

3-2 HPLCによる分析

乳酸, ピルビン酸, メチルマロン酸, プロピオン

酸、尿酸、フェニルアラニンの標準品を分析したところ、保持時間は3.9~14.8分で分離のよいピークがえられ、その検出限界は0.2~16.7 ngであった(表2)。

表2 HPLCによる保持時間と検出限界

| | 保持時間 (分) | 波高 ($\mu\text{V}/\text{ng}$) | 検出限界 (ng) |
|----------|-------------|-----------------------------------|--------------|
| ピルビン酸 | 3.9 | 21.6 | 1.4 |
| 乳酸 | 4.3 | 4.5 | 6.7 |
| 尿酸 | 5.6 | 168.8 | 0.2 |
| メチルマロン酸 | 7.5 | 5.4 | 5.6 |
| プロピオン酸 | 11.5 | 1.8 | 16.7 |
| フェニルアラニン | 14.8 | 93.2 | 0.3 |

正常新生児のクロマトグラムではピルビン酸、乳酸、尿酸、フェニルアラニンなどのピークが検出され、メチルマロン酸、プロピオン酸は検出されなかった。また分析時間はおよそ35分であった(図4)。

乳酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸をそれぞれ添加して作製した濾紙血液の測定内、測定間変動を調べた結果、乳酸でCV 3.3~6.9%、メチルマロン酸でCV 3.3~5.2%、プロピオン酸でCV 3.1~8.6%、尿酸でCV 1.3~4.9%とともに良好な再現性を示した(表3)。同時に行った添加回収試験では、乳酸、メチルマロン酸、プロピオン酸で90.3~109.0%の回収率となった(表4)。

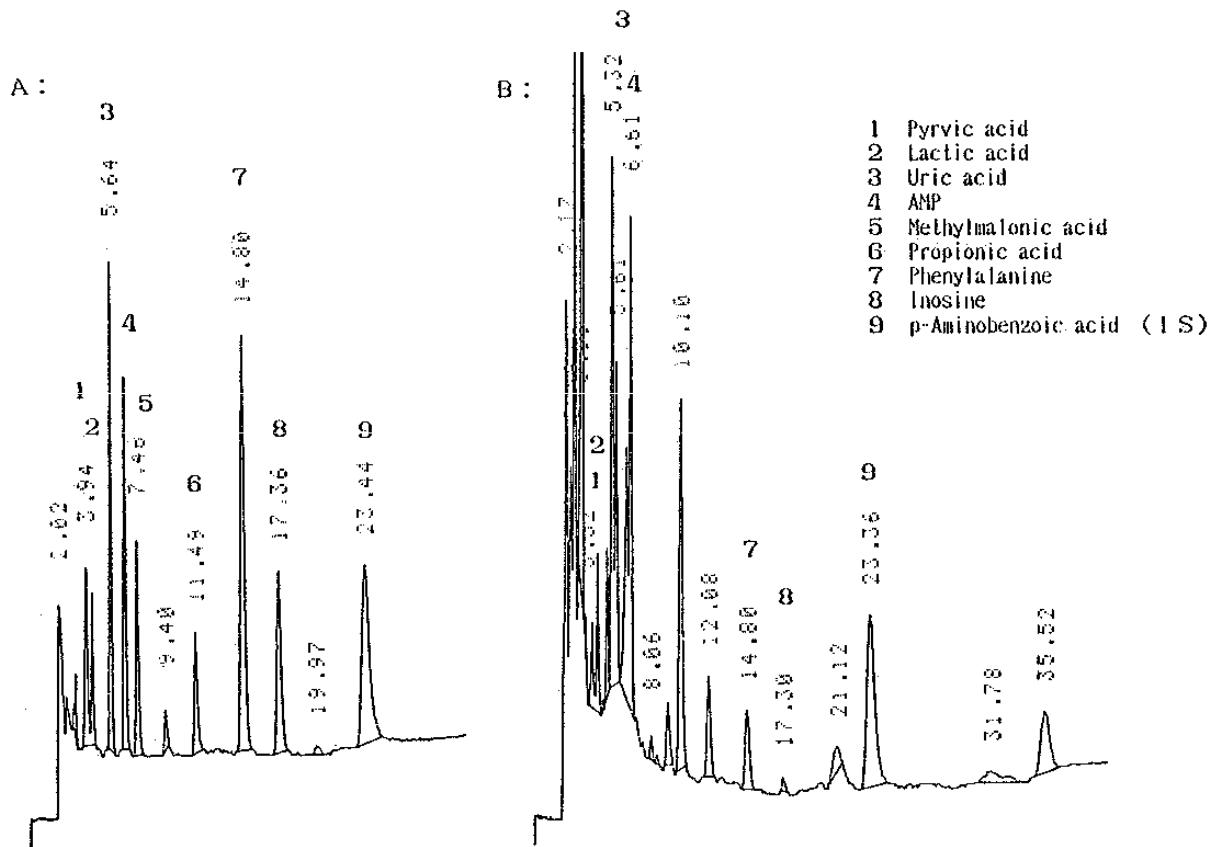


図4 HPLCクロマトグラム

A : スタンダード溶液 ピルビン酸: 20ng, 乳酸: 100ng, 尿酸: 10ng, AMP: 5ng,
メチルマロン酸: 100ng, プロピオン: 250ng, フェニルアラニン: 10ng, イノシン: 5ng,
p-アミノ安息香酸: 10ng,
B : 新生児濾紙血液

表3 HPLCによる測定内、測定間変動

| 測定内変動 (mean ± SD) (n = 5) | | | | |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| | 乳酸 (mg/dl blood) | メチルマロン酸 (mg/dl blood) | プロピオン酸 (mg/dl blood) | 尿酸 (mg/dl blood) |
| C-1 | 12.9±0.5 (3.7%) | — | — | 3.69±0.08 (2.2%) |
| C-2 | 36.9±1.9 (5.0%) | 30.0±1.2 (4.0%) | 34.1±1.8 (5.4%) | 6.28±0.17 (2.7%) |
| C-3 | 65.9±2.2 (3.3%) | 51.2±2.7 (5.2%) | 49.2±2.0 (4.0%) | 8.59±0.11 (1.3%) |
| 測定間変動 (mean ± SD) (n = 5) | | | | |
| | 乳酸 (mg/dl blood) | メチルマロン酸 (mg/dl blood) | プロピオン酸 (mg/dl blood) | 尿酸 (mg/dl blood) |
| C-4 | 15.1±1.1 (6.9%) | — | — | 3.69±0.17 (4.6%) |
| C-5 | 39.8±2.5 (6.2%) | 28.2±1.1 (3.8%) | 32.7±1.4 (3.1%) | 6.46±0.31 (4.9%) |
| C-6 | 64.3±4.0 (6.3%) | 49.5±1.6 (3.3%) | 48.0±4.1 (8.6%) | 8.63±0.38 (4.4%) |

表4 HPLCによる添加回収率

| | 添加量 (mg/dl) | 測定値(mg/dl) mean ± SD | 回収率(%) mean ± SD |
|---------|----------------|-------------------------|---------------------|
| 乳酸 | 30 | 27.5 ± 2.6 | 91.5 ± 8.5 |
| | 50 | 49.5 ± 3.1 | 98.9 ± 6.2 |
| メチルマロン酸 | 30 | 27.1 ± 2.5 | 90.3 ± 8.4 |
| | 50 | 49.5 ± 1.6 | 99.0 ± 3.3 |
| プロピオン酸 | 30 | 32.7 ± 1.4 | 109.0 ± 4.7 |
| | 50 | 48.0 ± 4.1 | 96.0 ± 8.3 |

3-3 乳酸測定における酵素法とHPLC法との相関

乳酸値について、30例の試料を酵素法とHPLC法とで測定したときの相関は、相関係数 $r = 0.968$ 、回帰式 $Y = 1.004X + 1.95$ と良好な相関を示した(図5)

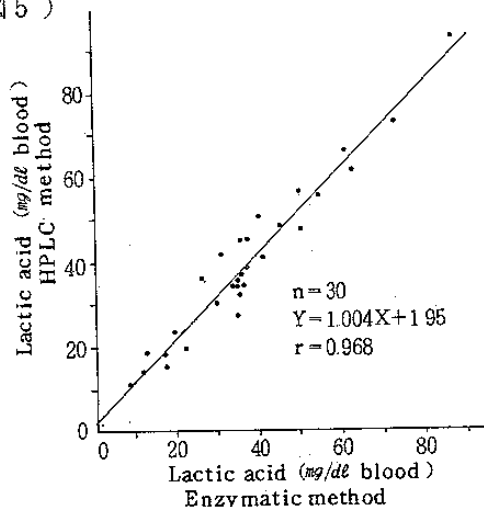


図5 酵素法とHPLC法による乳酸値の相関

3-4 新生児濾紙血液中の乳酸値

酵素法で測定した1151例の乳酸値は 27.4 ± 7.23 mg/dl blood となり、レンジは $12.9 \sim 63.6$ mg/dl blood であった(図6)。

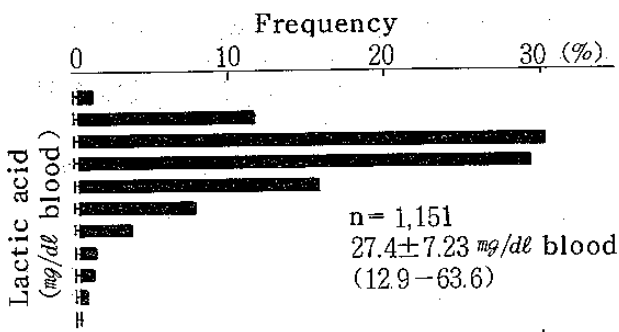


図6 酵素法による乳酸値のヒストグラム

4 考察

先天性高乳酸血症は、先天性有機酸代謝異常症のなかでも占める割合は大きく、メチルマロン酸血症はそれに次いで多い²⁾。現在まで、高乳酸血症のスクリーニングはほとんど行われていないが、尿中の種々の有機酸をGC³⁾またはGC-MS^{4,5)}などの分析法により検査が実施されている。一部でラクトアナライザーを用いた尿中乳酸の測定法⁶⁾、酵素法により尿中の乳酸を測定する方法⁷⁾、尿ケトン体などの測定により行う方法⁸⁾等が報告されているが、試料の調製法や、多量検体処理、簡便性などにおいてマス・スクリーニング化されず、一部の検体について検討されているのみである。

一方、メチルマロン酸血症については、Coulombeら⁹⁾はペーパークロマトグラフィーによって尿濾紙によるスクリーニングを実施しているが、一般にはGCやGC-MSによるハイリスク検体についての尿分析により行われている。また、田原ら¹⁰⁾はHPLCにより尿中のメチルマロン酸を測定する方法を報告している。

乳酸やその他の有機酸は血液中よりも尿中に多量に排泄されるといわれており、尿による検査が行われている。しかし、ある程度の血中レベル以上にな

ってはじめに尿中に出現するため、尿中に増量しない場合も存在する。一方、血液中の測定では、渡辺ら¹¹⁾が酵素法による乳酸測定を濾紙血液で検討しており、解糖系の阻害剤であるモノヨード酢酸で処理した濾紙を用いて実施可能であると考えられ、未処理の濾紙では室温保存によって乳酸が増加するため、代謝異常検査用の濾紙血液ではスクリーニングできないと考えられた。しかし、今回我々の検討では、濾紙血液の調製時、乾燥までに解糖系の酵素によって乳酸が約 10mg/dl 増量することが認められたが、未処理の濾紙でも、モノヨード酢酸処理の濾紙でも同様に1ヶ月までの保存試験で、ともに安定であったことから、乾燥条件により多少変動することが考えられるが、十分スクリーニング可能と思われた。

現在まで、臨床的に疑われ、生後かなりおくらせて発見されている現状から、早期に発見し、早期に治療が可能となるには、先天性代謝異常症のスクリーニングと併せてスクリーニングすることが望ましい。

乳酸の酵素法は、簡便な操作法であり、多量検体処理が可能で、数百検体を約2時間で分析可能なことから、新生児全例についてスクリーニング可能であり、一次検査として酵素法により乳酸を測定し、 $\text{mean} + 2.0\text{SD}$ 以上の検体についてHPLCにより、乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸などを検出するマス・スクリーニングシステムにより、高乳酸血症ばかりでなく、メチルマロン酸やプロピオン酸の増加によるメチルマロン酸血症やプロピオン酸血症、ピルビン酸や尿酸の増加による糖原病I型などの多くの有機酸異常症を発見することが可能と思われる(図7)。なお、今後検査数を増し、患児の測定値やスクリーニング状況等について、今後さらに検討する必要があると考える。

5 結 語

新生児の濾紙血液を用いて乳酸を酵素法で測定し、高値例に対してHPLCにより乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸等を測定する

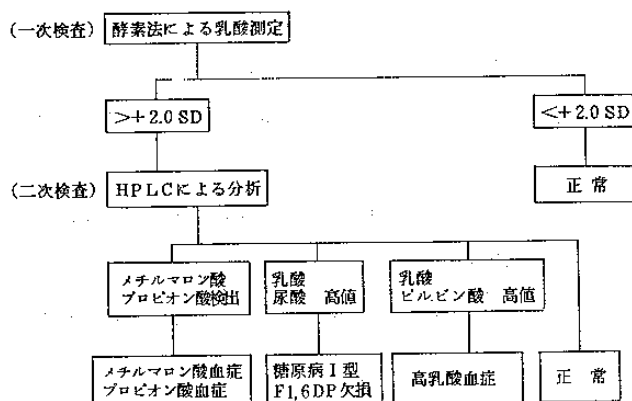


図7 高乳酸血症マススクリーニングシステム

方法について、新生児の先天性高乳酸血症に応用可能かどうか検討した。

本法による酵素法での乳酸測定は再現性、感度ともに良好であり、操作法もきわめて簡便で多量検体処理に優れ、一方HPLC法は簡便で再現性もよく、乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸などの測定によって乳酸高値例の疾患判別の一助となることから、高乳酸血症の一次スクリーニング法として有用であると考えられる。

6 文 献

- 1) 多田啓也：新臨床小児科全書4 先天性代謝異常 内分泌・代謝性疾患，145（1982）
- 2) 多田啓也，成沢邦明，石沢志信：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60年度研究報告書，62（1985）
- 3) 安田寛二，山口清次，可知章三，鈴木康之，河野芳功，小林裕子，折居忠夫：小児科臨床，38，164（1985）
- 4) 山口清次，安田寛二，折居忠夫：小児科，25，769（1984）
- 5) Kuhara, T., Shinka, T., Inoue, Y., Matsumoto, M., Yoshino, M., Sakaguchi, Y., and Matsumoto, I. : Clin. Chem. Acta, 133, 133（1983）
- 6) 小林正紀，森下秀子，杉山成司，鈴木孝一，堀江昌代，戸荻 創，和田義郎：厚生省 心身障害

研究 マスクリーニングに関する研究, 昭和59
年研究報告書, 72 (1984)

7) 伊藤道徳, 黒田泰弘: 日本小児科学会誌, **87**,
641 (1983)

8) Lehnert, W. and Niederhoff, H.: Eur.
J. Pediatr., **142**, 208 (1984)

9) Coulombe, J. T., Shih, V. E. and Levy,

H. L.: Pediatrics, **67**, 26 (1981)

10) 田原卓浩, 衛藤義勝: 日本小児科学会誌, **89**,
1371 (1985)

11) 渡辺俊之, 黒田泰弘, 伊藤道徳, 武田英二, 宮
尾益英: 第10回代謝異常スクリーニング研究会抄
録集, 37 (1983)