

微量ケイ光定量法によるフェニルケトン 尿症およびヒスチジン血症のマススクリー ニング法の検討

A Simple Microfluorometric Assay for Mass Screening of Phenylketonuria and Histidinemia

山口 昭弘 西尾 明美 泉 朋枝 佐藤 泰昌
清水 良夫 富所 謙吉 高杉 信男 荒島真一郎*

Akihiro Yamaguchi, Akemi Nishio, Tomoe Izumi,
Yasumasa Sato, Yoshio Shimizu, Kenkichi Tomidokoro,
Nobuo Takasugi and Shinichiro Arashima*

フェニルケトン尿症(PKU), ヒスチジン血症(HE)のマススクリーニング法として, 乾燥血液ろ紙スポット中のフェニルアラニン(Phe), ヒスチジン(His)をケイ光マイクロプレートリーダーを用いて簡便に測定する方法について検討した。

1 緒 言

先天性代謝異常症の新生児マススクリーニングは, 昭和52年から全国的に実施され, 患児の早期発見, 早期治療により, 心身障害の発生予防に大きな成果を上げている。検査法として, 当初より採用されているガスリー法¹⁾は, 各疾患に特有な血中アミノ酸の増量を寒天培地上の細菌成育円の大きさから肉眼判定するもので, 大量検体の処理が可能な点で優れた方法である。しかし, 試薬のロット差, 培地作成条件等により, 影響を受け易く, 最適条件を維持し, 確実に異常検体を判定するにはかなりの熟練を要する。さらに, 近年, 検査結果の客観性の問題も重要視されてきており²⁾, 検体処理能力に加え, 信頼性に優れ, 記録化が可能な方法の開発が必要とされている。

我々は, ガラクトース血症(GE)については, 上記の条件を全て満たした, 微量ケイ光定量法³⁾を

開発し, 既にルーチン化しているが, この方法は, マイクロプレートとケイ光マイクロプレートリーダーを用いることにより大量検体の処理を操作性良く行うことができる方法である。本報では, この微量ケイ光定量法によるPKU, HEのマススクリーニング法の開発を目的として, PheはMaccamanら⁴⁾のニンヒドリン-ベブチド法, HisはPisanoら⁵⁾のオルトフタルアルデヒド(OPA)法をマイクロプレートレベルに改良し, それぞれのマススクリーニングへの応用を検討した。

2 方 法

2-1 試 料

ガスリー検査用の新生児乾燥血液ろ紙を用いた。標準血液ろ紙はPhe, Hisを添加した血液をスポットして調整し, アミノ酸分析計により定量した値を用いた。なお, 濃度はすべて全血表示とした。

* 北海道大学医学部小児科

2-2 試薬

トリクロロ酢酸 (TCA, 和光純薬特級), コハク酸ナトリウム (和光純薬一級), ニンヒドリン, ロイシルアラニン (半井化学特級) はそれぞれ所定濃度の水溶液を調整した。

0.6 mM 銅試薬: 硫酸銅五水塩 (和光純薬特級) 75 mg と 酒石酸ナトリウムカリウム四水塩 (和光純薬特級) 87 mg を水約 300 ml に溶かした後, 炭酸ナトリウム 3.2 g, 10% (W/V) トリトン X-100 を 1 ml 加え 500 ml とする。

1% OPA-メタノール溶液: OPA (和光純薬生化学用) 0.5 g をメタノールに溶かし 50 ml とする。

1 N 塩酸-0.02% トリトン X-100 溶液: 36% 塩酸, 43 ml と 10% トリトン X-100, 1 ml を水で 500 ml とする。

ロイシルアラニン溶液のみは冷凍, 他の溶液は冷蔵で保存し, 少なくとも一ヶ月は安定であった。

2-3 装置及び器具

ケイ光マイクロプレートリーダー: コロナ電気製 MTP-100 F 型, 本装置はストリップウェルと特殊な駆動部を組合せ, 垂直光測光方式による高感度, 迅速なケイ光測定を可能としたもので, 1 プレート 96 検体を, わずか, 2.5 分で測定できる。

ストリップウェル: ラボシステム & フローラボラトリー製 1×8 マイクロストリップウェル

マルチチャンネルマイクロピペット: タイターテック製 8 チャンネルマルチピペット (5~50 μ l, 50~200 μ l)

2-4 操作

- (1) 抽出: ろ紙血から 3 mm ディスク 1 枚を丸底型マイクロプレートの各ウェルにパンチし, 0.3 N TCA 50 μ l を分注する。シールした後, 10 分間ミキシングし, 抽出する。
- (2) Phe アッセイ: 抽出液 25 μ l をストリップウェルに分取し, 0.76 M コハク酸ナトリウム: 60 mM ニンヒドリン: 20 mM ロイシルアラ

ニン = 5 : 2 : 1 の混合溶液 80 μ l を加え, アルミホイルで包み, 電気オープン内で 60°C, 2 時間反応させる。10 分間室温で放置後, 0.6 mM 銅試薬 150 μ l を加える。10 分後に励起波長 360 nm, ケイ光波長 530 nm でケイ光を測定する。

- (3) His アッセイ: 抽出液 10 μ l をストリップウェルに分取し, 0.6 N 水酸化ナトリウム: 1% OPA-メタノール = 4 : 1 の混合溶液 125 μ l を加え, 1 分間ミキシングした後, 室温で 30 分反応させる。1 N 塩酸-0.02% トリトン X-100 溶液 100 μ l を加え, 1 分間ミキシングし, 10 分後に, 励起波長 360, ケイ光波長 450 nm でケイ光を測定する。

- (4) 測定値処理: ケイ光プレートリーダーとオンラインで接続したマイクロコンピュータにより各アッセイ毎に, 標準血液ろ紙の検量線から試料濃度を計算し, 最小値, 最大値, 平均値及びカットオフ以上の検体を自動的に印字する。

3 結果及び考察

3-1 測定原理

Maccaman ら⁴⁾ のニンヒドリン-ペプチド法は, Phe とニンヒドリンの pH 5.8, 60°C での反応生成物のケイ光強度が, ロイシルアラニンの共存により著しく増感されることを利用した方法であり, Pisano⁵⁾ らの OPA 法は, His と OPA の酸性域での特異ケイ光を利用した方法で, いずれも生体試料に対して選択性, 感度ともに優れた方法である。しかし, 3 mm 血液ディスク中の血液量は, 約 3 μ l と極めて微量であり, 試験管レベルの原報では, 感度面においても, さらに操作性のうえからもマスキング法としては, 用いることはできない。そこで, 反応液量を約 200 μ l と原報の十分の一のマイクロプレートレベルにおとし, 最近, コロナ電気によって開発されたストリップウェル-垂直光測光方式の高感度ケイ光マイクロプレートリーダー MTP-100 F 型を用いることにより, マイクロプレートで

の、ろ紙血Phe, Hisの測定が初めて可能となった。

3-2 抽出率

ろ紙血Phe, His 20 mg/dl濃度で抽出率は、それぞれミキシング時間2分, 10分以上で95%以上であったので抽出時間は10分とした。

3-3 Phe 反応条件

(1) pH: 反応液のpHによって、感度、選択性は影響を受け⁴⁾, pH 5.0では、pH 5.8の10%にケイ光強度は減少し、pH 6以上ではチロシン、グルタミン酸などのアミノ酸もケイ光を示めすようになるため、pHは 5.8 ± 0.1 に固定する必要があるが、0.3 N TCA抽出液25 μ lに0.76 Mコハク酸ナトリウム ($pK_2 = 5.6$) 溶液50 μ lを加えることにより、pHは5.8とすることができた。

(2) 反応時間: 37°Cでは、ほとんど反応は進まなかったが、60°Cでは2時間の反応で最大のケイ光強度を示した (Fig. 1)。

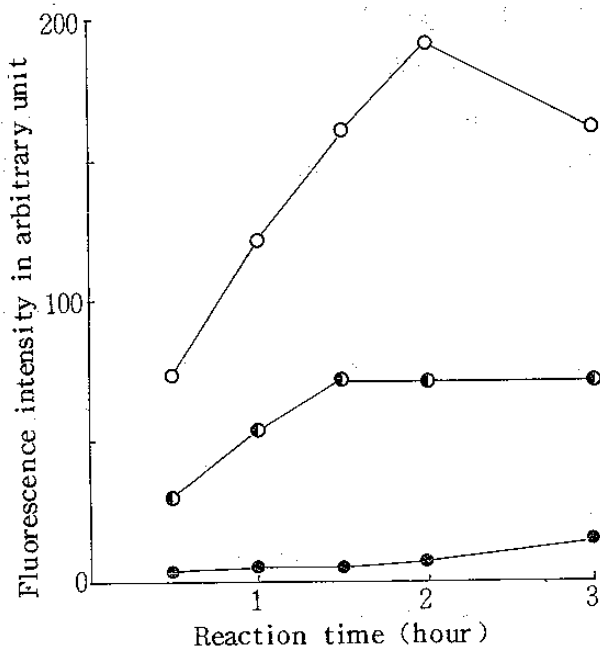


Fig. 1 Effect of the reaction time on fluorescence intensity of Phe-ninhydrine Product
A blood disc containing 8 (◐) or 20 (○) mg/dl of Phe and blank (●) were reacted at the described condition in the text.

(3) ニンヒドリン濃度: ニンヒドリン60mM以上でブランクおよび試料のケイ光強度は一定であった。

(4) ロイシルアラニン濃度: ロイシルアラニン濃度の増大に伴い、ケイ光強度は増大したが、20 mMを越えるとブランク値の増加も見られたので20 mMとした。

(5) 銅試薬濃度およびケイ光の安定性: 銅試薬中の炭酸ナトリウム濃度は60 mM以上でケイ光強度は一定であった。一方、銅-酒石酸錯体の濃度はケイ光の安定性に影響したが、0.6 mMで2時間は安定であった (Fig. 2)。

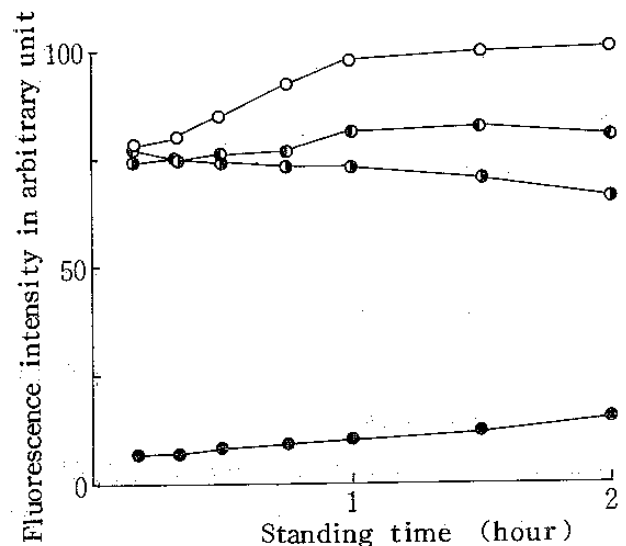


Fig. 2 Effect of the concentration of copper tartrate on fluorescence stability of Phe-ninhydrine Product
Fluorescence was measured standing after the addition of copper reagent using a 8mg/dl of phe blood disc at following concentration of copper-tartrate; 0.24 (○), 0.60 (◐) and 0.96 (●) mM. Blank values (●) had no significant difference with copper-tartrate concentration.

また、トリトンX-100の添加は、マイクロストリップウェル器壁の気泡発生を防ぐためであり、ケイ光強度への影響はなかった。

3-4 His 反応条件

(1) 水酸化ナトリウム濃度および反応時間: HisとOPAの反応生成物のケイ光強度は、反応時および測定時の液性の影響を受けるが、アルカ

り濃度の最適条件を決めるため、塩酸の代わりに水を用いて、水酸化ナトリウム各濃度での反応時間の影響を調べた (Fig. 3)。水酸化ナトリウム濃度が0.4から1.5 Nのとき、試料のケイ光強度は反応時間20分以上で一定となり、ブランク値は経時的に増大したが、0.6 N以上でかなり小さくなったので、水酸化ナトリウム濃度は0.8 N、反応時間は30分とした。

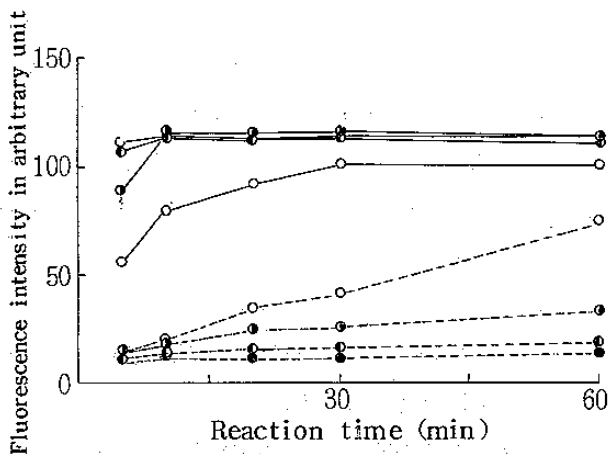


Fig. 3. Effect of the reaction time on fluorescence intensity of His-OPA Product at alkaline condition
A 6 mg/dl of His blood disc was assayed at following NaOH concentration; 0.2 (○), 0.4 (●), 0.8 (■), and 1.5 (◆) N. Solid line showed the net value of the blood disc and dashed line showed the blank value.

- (2) OPA濃度: OPA濃度は0.5%以上で試料のケイ光強度は一定となり、ブランク値は徐々に増大したので、1%とした。
- (3) 塩酸濃度: 塩酸性が強くなるに従い、試料およびブランクのケイ光強度はともに減少したが、0.8 N以上でブランク値が最小となったので、塩酸濃度は1 Nとした。塩酸添加後のケイ光は、非常に安定であり、少なくとも2時間は変化しなかった。また、トリトンX-100の添加により、Pheの場合と同様に、ケイ光強度への影響はなく、ウェル器壁への気泡の付着を防ぐことができた。

3-5 検量線

Yをケイ光強度、Xをmg/dlの全血濃度、rを相関係数とすると、検量線(3点標準ディスク、6回のアッセイの平均)は、それぞれ、Pheが $Y=8.04X+1.85$, $r=0.998$ であり、Hisは $Y=14.8X-1.34$, $r=0.999$ と、いずれも、ほぼ原点を通る直線回帰式が得られた。

3-6 再現性および回収率

Phe 2~20 mg/dl の添加で回収率は95~110%, 変動係数は、アッセイ内で4.9~9.0%, アッセイ間で5.1~9.9%と良好な結果であった (Table 1)。また、His 2~20 mg/dlの添加で回収率は100~115%, 変動係数はアッセイ内で3.2~4.6%, アッセイ間で6.0~9.6%とやはり、満足できる結果が得られた (Table 2)。

Table 1. Recovery and reproducibility for Phe assay

Phe added* (mg/dl)	Intra (n=8)			Inter (n=8)		
	Found (mg/dl)	Rec (%)	CV (%)	Found (mg/dl)	Rec (%)	CV (%)
2	2.7	95	7.0	3.0	110	9.9
4	4.7	98	9.0	4.8	100	5.4
8	8.9	101	5.2	9.0	102	7.3
20	21.4	103	4.9	21.7	104	5.1

* Original Phe concentration is 0.8 mg/dl.

Table 2. Recovery and reproducibility for His assay

His added* (mg/dl)	Intra (n=8)			Inter (n=8)		
	Found (mg/dl)	Rec (%)	CV (%)	Found (mg/dl)	Rec (%)	CV (%)
2	3.4	100	4.4	3.7	115	9.6
4	5.4	100	3.2	5.4	100	9.7
8	9.5	101	4.6	9.9	106	6.0
20	21.5	100	4.5	21.3	100	6.2

* Original His concentration is 1.4 mg/dl.

3-7 アミノ酸分析計およびガスリー法との比較

患児と外部精度管理検体の本法，アミノ酸分析計およびガスリー法での測定結果をPheはTable 3に，HisはTable 4に示したが，本法においても，確実に陽性検体を検出できることがわかる。また，これらの検体を含めた，本法とアミノ酸分析計との相関 ($n=16$) はPhe $Y=1.104X+0.106$, $r=0.996$; His $Y=0.942X+0.301$, $r=0.942$ と非常に高く精度，正確さともに優れた方法であると言える。

Table 3. Phe assay results in PKU patient and quality control samples

Sample	Phe (mg/dl)		
	FL*	AA**	Guthrie
PKU patient			
1	6.2	5.5	6
2	8.5	7.1	8
3	10.4	9.1	9
4	24.8	23.8	>20
Quality control			
1	4.3	4.4	4
2	4.4	4.4	4

* Microfluorometry

** Amino acid analyzer

Table 4. His assay results in HE patient and quality control samples

Sample	His (mg/dl)		
	FL*	AA**	Guthrie
HE patient			
1	6.9	6.3	6
2	7.5	7.4	8
3	11.7	12.2	10
4	12.6	13.8	12
Quality control			
1	7.0	7.0	8
2	8.5	9.4	8

* Microfluorometry

** Amino acid analyzer

3-8 パイロットスクリーニング

一般新生児3,116例について，本法によるスクリーニングを行った。平均値±標準偏差，最小値および最大値は，Pheでそれぞれ， 0.7 ± 0.4 ，0および 2.7 mg/dl であり，Hisではそれぞれ， 1.3 ± 0.7 ，0および 8.2 mg/dl であり，いずれも，対数正規分布を示した。また，平均値の値はアミノ酸分析計による値Phe $0.80 \pm 0.14 \text{ mg/dl}$ ，His $1.23 \pm 0.44 \text{ mg/dl}$ ($n=55$) とほぼ一致した。カットオフ値をPhe 2.5 mg/dl ，His 5.0 mg/dl としたとき，これ以上の検体は，それぞれ，5例 (0.16%)，6例 (0.19%) であり，この内，ガスリー法においてはPheは2例が $2 \sim 3 \text{ mg/dl}$ ，Hisは4例が $5 \sim 8 \text{ mg/dl}$ で1次疑陽性となっていた。

このパイロットスクリーニングの中からは，患児は見つかっていないが，並行して行ったガスリー法においても陽性検体は検出されていない。しかし，患児および精度管理検体の測定結果 (Table 3, 4) も考慮して，本法におけるカットオフ値としては，Phe 2.5，His 5.0 mg/dl とすれば，ガスリー法のカットオフ値Phe 3，His 6 mg/dl 以上の検体は，確実に検出可能である。

4 結 語

PKU，HEの微量ケイ光定量法は，操作が簡便であり，試薬のコストは極めて低く，検体処理能力，信頼性にも優れ，マススクリーニング法として最も適した方法であると言える。また，ケイ光マイクロプレートリーダーの応用範囲は非常に広く，今回開発したPKU，HEおよび前報³⁾で報告したGEに加え，現行のマススクリーニング対象5疾患のうち，残る2疾患のメイプルシロップ尿症，ホモシスチン尿症についても微量ケイ光定量法の条件を現在検討中である。さらに，これらの先天性代謝異常症に対する微量ケイ光定量法の開発は，将来的に，マイクロプレート用のパンチャー，自動分注装置の併用により，既にマイクロプレート化が可能となっている

クレチン症，先天性副腎皮質過形成と共に，適切な新生児マススクリーニングの自動化を実現する上で大きな意義を持つものと考えられる。

5 文 献

- 1) R. Guthrie, A. Susie : *Pediatrics*, **32**, 338 (1963)
- 2) 成瀬 浩, 鈴木恵美子, 花房和子, 滝川早苗 : 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61年度研究報告書, P. 14

- 3) 山口昭弘, 内田陽子, 中野広美, 佐藤泰昌, 清水良夫, 富所謙吉, 高杉信男 : 札幌市衛生研究所年報, **13**, 44 (1987)
- 4) M. W. Maccaman, E. Robins : *J. Lab. & Clin. Med.*, **59**, 885 (1962)
- 5) J. J. Pisano, J. D. Wilson, L. Cohen, D. Abraham, S. Udenfriend : *J. Biol. Chem.*, **236**, 499 (1961)