

全自動 VMA/HVA 分析計 (HLC-726 VMA) による 尿中 VMA, HVA 測定の基礎的検討について

花井 潤師 米森 宏子 福士 勝 清水 良夫
菊地由生子

要 旨

神経芽細胞腫スクリーニング用に開発された VMA, HVA の全自動分析計 (HLC-726 VMA, 以下 HLC) を用い、尿ろ紙中の VMA, HVA を測定し、現行の HPLC 法と比較した結果、HLC はろ紙尿溶出液をセッドするだけで VMA, HVA 定量とともに、クレアチニンも同様に測定でき、さらに、結果の判定まで約 15 分であったことから、本症スクリーニングの測定システムとして、極めて有用であることが確認された。

1. 緒 言

現在、神経芽細胞腫マスキューニングは、全国ほとんどの自治体で、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた定量検査により実施されており、従来の定性検査に比べ、2~3 倍高頻度に患児を発見することが可能となった。

HPLC は数種類の物質を同時に分離分析でき、また、自動化により大量検体の処理が可能であるが、機器の操作が複雑で日常の保守及び性能の維持には、ある程度の熟練が必要であり、精度の高いスクリーニングを実施していく上からも、より簡便で保守の容易な HPLC システムの開発が望まれていた。

最近、VMA, HVA 測定専用の全自動分析計 (HLC-726 VMA) が開発され、使用する機会が得られたので、札幌市で実施している HPLC 法との測定値の比較からその有用性を検討したので報告する。

2. 方 法

2-1 機 器

全自動 VMA/HVA 分析計 (HLC-726 VMA, トーソー社、以下 HLC) は尿中 VMA, HVA 測定専用の HPLC として開発されたもので、3 種の異なったカラムを用い、カラムスイッチングにより VMA, HVA, 及びクレアチニン (以下 CRE) を分離し、VMA, HVA を蛍光検出器、CRE を紫外検出器で同時に測定可能なシステムである。

2-2 試料及び測定方法

対象は、スクリーニングでの正常検体 (189 検体) で、

東洋ろ紙 No 63 で採尿されたものを用いた。尿ろ紙 (8×20 mm) を 0.1 M NaH₂PO₄ 溶液 1.5 ml で 10 分間振とう抽出を行い、遠心分離後、上清を試料とした。HLC による VMA, HVA, CRE 測定は、試料 0.5 ml をカップにとり、マニュアルにしたがって行った。さらに、札幌市で行っている方法 (以下札幌法) として、同一の試料 100 μl を用いて、ヤッフェ法により CRE を、また、VMA, HVA を既報^{1,2)} により測定した。

3. 結 果

3-1 HPLC 測定と比較

HLC での測定においては、VMA, HVA と共に CRE が同時に同一の試料から測定され、同一のレポート上に出力される (図 1)。試料は 1 検体 15 分で測定され、それぞれの定量限界は VMA, HVA 0.1 μg/ml, CRE 0.01 mg/ml (仕様書) であった。今回の抽出条件においては、数%程度の試料で CRE が定量限界以下となった。

3-2 CRE の比較

HLC での CRE 測定値とルーチン検査で実施しているマイクロプレートによるヤッフェ法での値とを比較すると、紫外検出器を装備した HLC による測定値の方がやや低値を示したが、両者の値は極めて良好な相関性を示した (図 2)。

3-3 VMA, HVA 測定値の比較

同一の試料液について、HLC 及び札幌法により、VMA, HVA 値を測定した結果、濃度 (ng/ml) での回帰直線 (x: 札幌法, y: HLC) は、VMA $y = 1.025x$

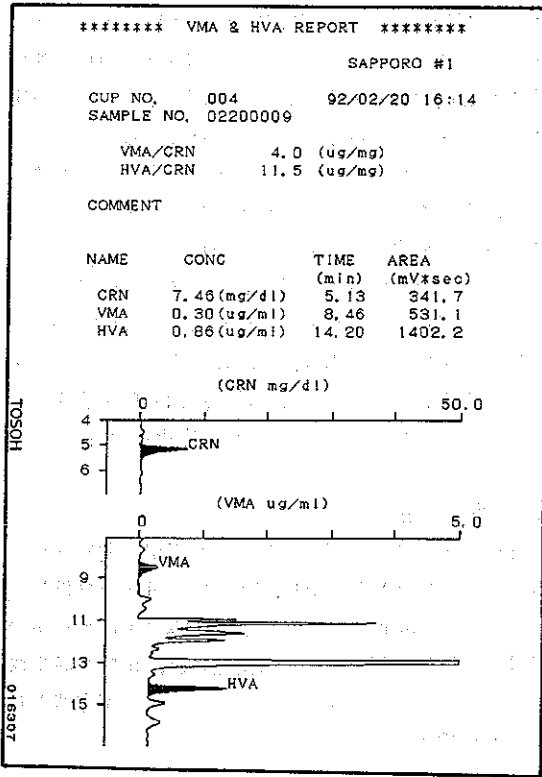


図1 HLCの測定結果レポート

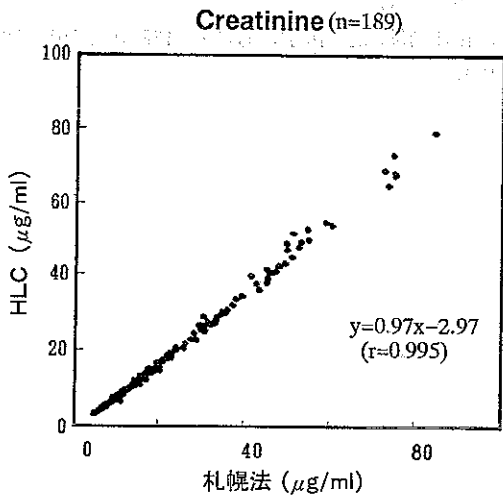


図2 HLCと札幌法におけるクレアチニン濃度の相関

$x+2.87$ ($r=0.996$), HVA $y=0.830x+40.8$ ($r=0.969$) と、両者とも極めて良好な相関関係を示した。

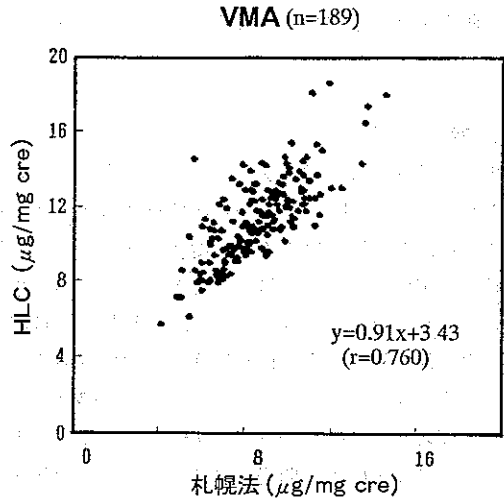


図3 HLCと札幌法におけるVMA値の相関

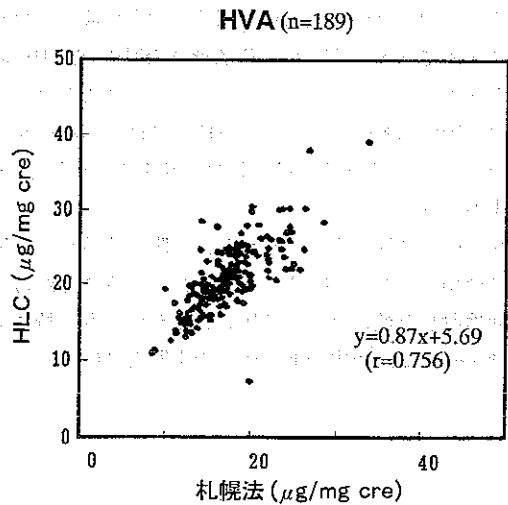


図4 HLCと札幌法におけるHVA値の相関

同様に、CRE補正值についても、VMA、HVAともに良好な相関関係を示した(図3、4)。また、189検体の平均値を比較すると、VMA、HVA値ともに、HLC

表1 VMA、HVA値 (mean±SD) の比較

	VMA	HVA
HLC	11.33±2.17	20.98±4.51
札幌法	8.65±1.80	17.54±3.91

(数値は ug/mg cre)

での測定値は札幌法での値に比べ、20%程度高値を示した(表1)。

4. 考 察

現在、神経芽細胞腫スクリーニングで実施しているHPLCによるVMA, HVAの定量検査においては、電気化学検出器の導入による高感度化に伴い、より少量の試料を用い、簡便な前処理による検査が可能となっており、検査技術者にとっては、安定したHPLCの測定条件を保ち、常に検査精度を一定に管理することが重要となっている。しかしながら、実際には、カラムのばらつき(ロット差)、検出器(セル等)やポンプのトラブル等による機器のメンテナンスの頻度は高く、より簡便で保守の容易なHPLCシステムの開発が望まれていた。

HLCは、神経芽細胞腫スクリーニング用として、試料中のVMA, HVA, CREを同時に測定可能な全自動システムである。VMA, HVA値の測定にはCRE測定が必須であり、これまでは、ヤッフエ法などにより別にCREを測定してきたが、HLCではその必要がなく、試料をセットするだけで結果の判定までが約15分で出力された。

さらに、3種の異なったカラム(陽、陰イオン交換及び逆相)を用いたHPLCシステムであることから、今回検討した数百例のろ紙尿試料においても、特に前処理をせずに、尿中の他の成分の影響も受けず、これ

までのHPLCと同等の測定結果を得ることが可能であった。また、HLCでの測定値(CRE補正值)が札幌法よりも高値を示したが、この原因の一つにはCRE測定法の違いによるものと考えられる。しかし、スクリーニングにおいては、個々の条件によりカットオフ値を設定することから、絶対値の高低がスクリーニングに及ぼす影響はないものと思われる。

なお、今回の検討の結果、このシステムのターゲットを生尿としているためか、測定レンジが高めであり、ろ紙尿を試料にした場合には、通常より、サンプル量を多くする必要があったことから、前処理を簡便にするためにも、今後、システムの高感度化を期待したい。

5. 結 語

今回、神経芽細胞腫スクリーニング用に開発されたHLC-726 VMAを使用し、実際に、ろ紙尿を分析した結果、前処理溶液をセットするだけで、CRE補正值の計算及び結果の判定までが自動化され、複雑な設定操作も不要であり、本症スクリーニング用の測定器としての有用性が確認された。

6. 文 献

- 1) Hanai, J, et al. Clin. Chem. 33(11), 2043-2246, 1987.
- 2) 花井潤師, 他: 医学のあゆみ, 156(10), 701-702, 1991.

Examination of Urinary VMA and HVA Measurement using an Autoanalyzer (HLC-726 VMA)

Junji Hanai, Hiroko Yonemori, Masaru Fukushi,
Yoshio Shimizu and Yuko Kikuchi

ABSTRACT

We describe some results of urinary VMA and HVA measurement in infants using a new autoanalyzer (HLC-726 VMA) for neuroblastoma screening, comparing with results obtained by our methods. Urinary creatinine values measured by HLC were correlated with those by Jaffe method. VMA and HVA values were also correlated with those by our HPLC method, although those values in HLC in the average were higher than those in our method. We can obtain a final result of a sample easily, only applying an eluate from the sample to the system. We conclude that this system is very useful to measure urinary VMA and HVA for a neuroblastoma screening.