

乾燥濾紙血液 Phe の微量ケイ光定量法： Phe 脱水素酵素法と Ninhydrine- Peptide 法の比較

山口 昭弘 福士 勝 清水 良夫 菊地由生子

要 旨

フェニルケトン尿症の新しい新生児マス・スクリーニング法として開発された Phe の微量ケイ光定量法につき、原理的に異なる 2 法を比較検討した。一方はフェニルアラニン脱水素酵素 (PheDH) を用い NADH のケイ光を測定する方法 (PheDH 法) で、他方は Phe がジペプチド; Leucyl-Alanine の存在下、Ninhydrine (Nin) と特異的な発ケイ光体を生成することを利用した方法 (Nin-Pep 法) である。いずれもスクリーニング法として実用的な優れた方法であるが、ルーチン検査への導入にあたっては、それぞれの特徴を十分理解した上での選択・運用が望まれる。

1. 緒 言

フェニルケトン尿症の新生児マス・スクリーニングは、Guthrie ら¹⁾による Bacterial Inhibition Assay (BIA 法)の開発により、今日、世界的に広く普及するにいたっている。その後、他のアミノ酸等に対する BIA 法も考案され²⁾、メイプルシロップ尿症、ホモシチン尿症およびガラクトース血症についても新生児マス・スクリーニングが可能となった。BIA 法は高価な測定機器・試薬を必要とせず、多項目・多数検体を簡便に処理できる点で非常に優れた方法であり、20 年以上の長きにわたりルーチン検査法として、現在も活躍している。しかしながら、検査結果は細菌発育帯の肉眼判定による判定量であるため、至適条件を維持し、確実に異常検体を検出するには、かなりの熟練を要する。このことから、我々は、検体処理能力に加え、客観的な検査結果が得られる新しいスクリーニング法として、上記 4 疾患に対する微量ケイ光定量法を開発してきた^{3,4)}。この中で、フェニルケトン尿症については、Nin-Pep 法を採用しているが、その後、Naruse ら⁵⁾により、汎用性の高い比色用マイクロプレートでの測定を目的とした PheDH 法が開発されている。この方法は、脱水素酵素反応により Phe から化学量論的に生成する NADH を、大きなモル吸光係数を有するコバルト (II) 錯体へと最終的に導くものであり、現在、同様の原理に基づくメイプルシロップ尿症およびガラクトース血症のスクリーニング法も開発されてきている。

本報では、この比色法の基となっている、PheDH により生成する NADH を直接ケイ光定量する方法; PheDH 法について、従来の Nin-Pep 法との比較的観点から、フェニルケトン尿症の新生児スクリーニング法としての評価を行った。

2. 方 法

PheDH 法は、札幌 IDL ㈱より供与された Phe ケイ光測定用のキット試作品を用いた。また、Nin-Pep 法は既報⁴⁾に従った。それぞれ反応原理および測定操作の概略を Fig 1, 2 に示した。

3. 結 果

同一の一般新生児検体に対して、両方法による連続した 6 アッセイの結果を比較した。

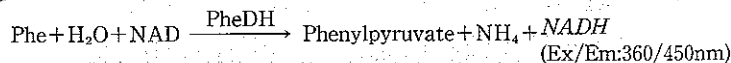
3-1 検量線

いずれの方法においても、Phe 濃度とケイ光強度の間には、少なくとも Phe 30 mg/dl までは良好な直線関係が得られ、カットオフ値 3 mg/dl 近傍の定量性は感度的に十分であった (Fig. 3)。ただ、ブランクレベルは Nin-Pep 法で低く、逆に測定間のケイ光強度の変動は PheDH 法が小さかった。

3-2 新生児濾紙血液の測定結果

1 アッセイ 368 検体の基礎統計値の変動 (Fig 4) および全測定データに対するヒストグラム (Fig 5) を比較した。基礎統計値の変動に大差はなく、ヒストグラ

Phenylalanine dehydrogenase (PheDH) method



Ninhydrine Peptide (Nin-Pep) method

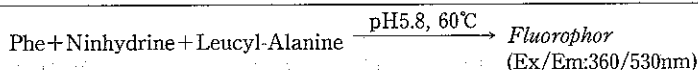


Fig. 1 Principle of microfluorometric assays for Phe

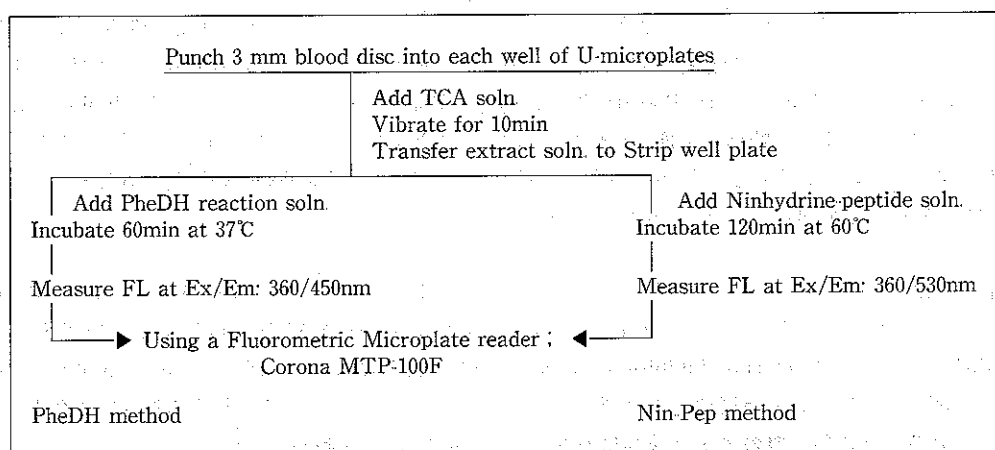


Fig. 2 Outlined procedures of microfluorometric assays for Phe

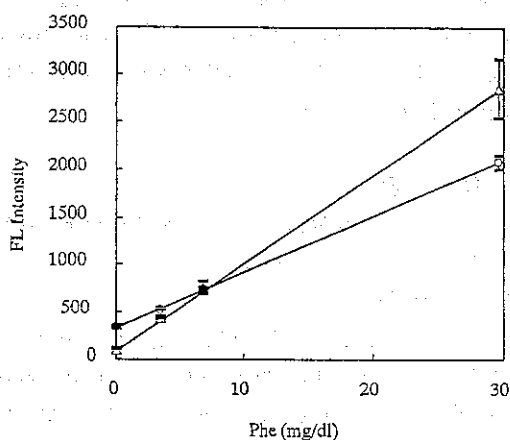


Fig. 3 Calibration curves of microfluorometric assays for Phe in dried blood specimens

○ Phe DH method
 △ Nin-Pep method
 Inter-assay variations in successive 6 assays. Error bar means SD values.

ムはいずれも正規分布に近い結果が得られた。しかし、PheDH法では1例が明らかな高値 (5.99 mg/dl) を示し、全体の平均値も 1.51 mg/dl と Nin-Pep法の 1.08 mg/dl に比べ、約 0.5 mg/dl 程度高値を示した。

3-3 非特異高値例の解析

PheDH法において、一例で 5.99 mg/dl とカットオフ値以上の明らかな異常高値を認めたと、Nin-Pep法およびアミノ酸分析計⁶⁾では、それぞれ、1.2 mg/dl、0.7 mg/dl とまったく正常であった。この検体は、腸閉塞術後、7 生日の抗生剤使用中に採血されており、同様に NADH のケイ光測定によるガラクトース (Gal) の値も 5.3 mg/dl と上昇を示していた。この非特異ケイ光の原因として、抗生剤の可能性が示唆される訳であるが、これを確認するため次の検討を行った。BIA法では枯草菌が抗生剤により発育阻害を受けるため(抜け現象)、抗生剤が実際に使用されている検体を同定できる。一方、ルーチン検査として BIA法と平行して Gal の測定を行っていることから、抜け検体と一般検体の間で Gal の値を比較した (Table 1)。その

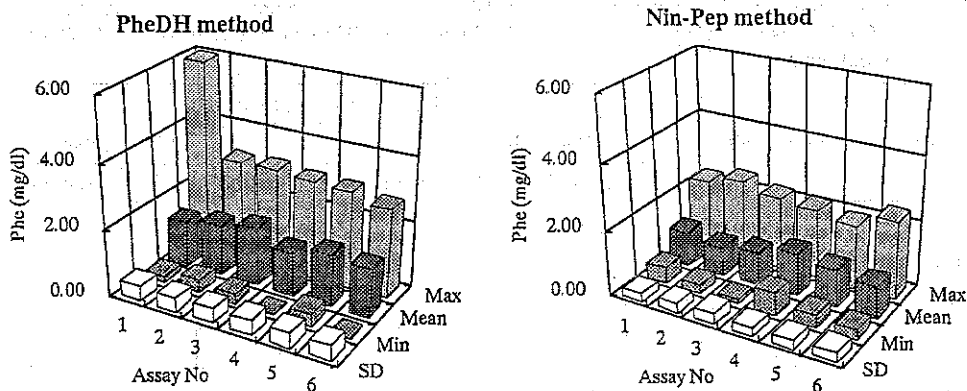


Fig. 4 Results of microfluorometric assays for Phe in newborn dried blood spots. Each assay contains 368 newborn specimens.

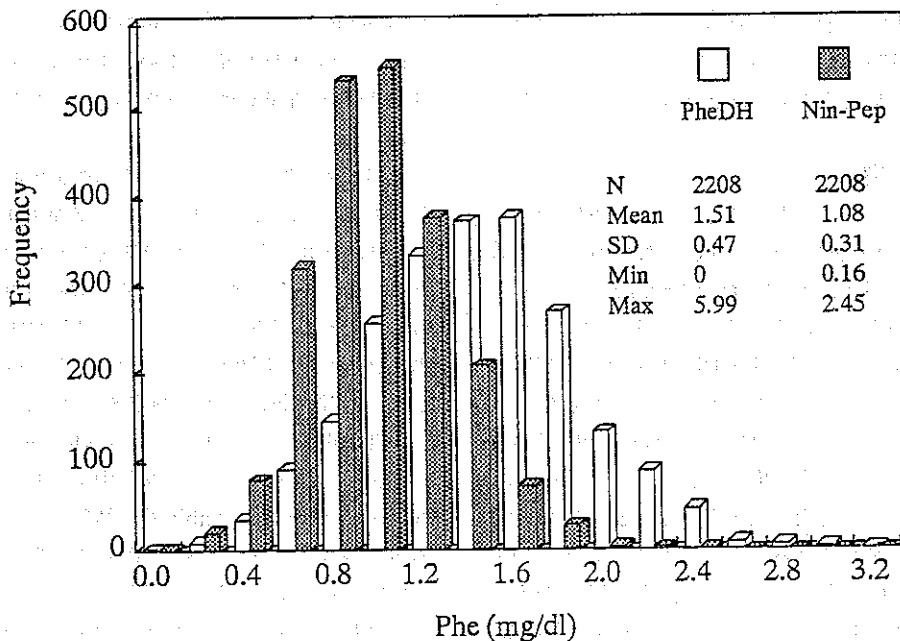


Fig. 5 Histogram for Phe in newborn dried blood specimens by microfluorometric assays

Table 1 Effect of antibiotics in dried blood spots from newborns on the value of galactose measured with the microfluorometry

Antibiotics*	N	Mean	SD	Min	Max
With	50	2.1	1.9	0	8.1
Without	55	2.4	1.5	0.3	5.8

* the presence of antibiotics was estimated from the abnormal inhibition of bacterial growth in BIA

結果, 14,767 検体から選んだ, BIA プレート 4 種すべてが抜け現象を示し, 確実に抗生剤を使用していると思われる 50 例の Gal 平均値は, 2.1 ± 1.9 mg/dl と正常コントロール 2.4 ± 1.5 mg/dl (N=50) との間に差は認められなかった。さらに, この中から Gal 5mg/dl 以上を示した 7 例について, PheDH 法による Phe の測定を, PheDH 存在および非存在下, また, 酵素反応のインキュベーション前後で行った (Table 2)。その

Table 2 Confirmation of interference with antibiotics in the specimens which showed increase of galactose by measurements of phe in the condition with and without PheDH and/or incubation

Identification	Gal (mg/dl)	Determined as phe (mg/dl)			
		Before Incubation		After Incubation	
		With PheDH	Without PheDH	With PheDH	Without PheDH
1123	5.5	0.28	0	1.34	0
6650	5.4	0	0	0.91	0
12378	8.1	0.44	0.10	2.18	0
14208	5.5	0	0	1.75	0
14616	7.0	0	0	0.53	0
9092*1	5.3	4.31	4.90	5.65	5.37
C1313*2	5.7	5.26	5.13	7.11	5.18

*1a 7 days old newborn after operation with ileus; phe level by amino acids analyzer was 0.7mg/dl

*2a 1 year old infant with acute gastroenteritis; phe level by amino acids analyzer was 1.29mg/dl

結果、前述の9092および急性胃腸炎の1歳児；C1313の2例で、PheDH非存在下でもまたインキュベーション前の段階でもPhe約5mg/dlと高値を示した。

4. 考 察

Pheの微量ケイ光定量法として、PheDH法およびNin-Pep法の2法を比較検討した訳であるが、Nin-Pep法は、BIA法が開発された当時、既にチューブレベルではあるが濾紙血液試料への応用が可能となっていた方法である⁷⁾。一方、PheDH法は、酵素の利用がごく最近可能となったことにより新たに開発された方法である。それぞれ、化学的あるいは酵素的に、Pheを化学量論的に発ケイ光反応へと導き、ケイ光用マイクロプレートリーダを用いて測定することにより、大量検体を迅速に処理できるように工夫されている (Fig 1, 2)。Nin-Pep法は60°C、2時間とPheDH法の37°C、1時間に比べ、反応条件がやや過酷となる以外は、操作的にはほとんど同様である。

アッセイ系の基本となる検量線は、いずれも良好な直線性を示し、広い濃度範囲で定量性が確保されている (Fig 3)。フェニルセトン尿症の場合、酵素障害の部位・程度により、カットオフ近傍の3mg/dlから30mg/dl程度まで分布することを考えたとき、広い範囲の定量性は重要な要素の一つである。Nin-Pep法のブランク値は非常に低く、検量線の傾きも大きい。ケイ光強度自体の測定間変動も大きい。総合的な感度は両方法間でほとんど変わらず、定量下限として

0.5mg/dl程度である。PheDH法のブランク値が高いのは、PheDH反応の至適pH10.7では、NADのNADHへの非酵素的な変換が優位となるためと思われる。

実際の新生児スクリーニングへの応用面では、いずれの方法とも、各アッセイごとの基礎統計値は安定しており、ヒストグラムもほぼ正規分布を示していることから、ルーチン検査法として、信頼性の高い優れた方法といえる (Fig 4, 5)。ただ、PheDH法において異常高値例が一例認められており、Nin-Pep法あるいはアミノ酸分析計による測定値はまったく正常なこと、PheDH非存在下あるいは酵素反応前の状態でも、ケイ光を有することから、試料由来の発ケイ光物質の存在が示唆された (Table 2)。結局、この例は腸閉塞術後の特殊なケースであり、BIAの結果からも抗生剤の使用が確認されており、影響を示した抗生剤を同定できたわけではないが、抗生剤使用の有無での比較測定データからは、その使用頻度はきわめて稀であろうと思われる (Table 1)。この抗生剤による非特異ケイ光の存在は、Galあるいは分枝鎖アミノ酸といったNADHのケイ光を測定する同様のアッセイ系においても、共通した問題であるが、これらのアッセイではカットオフ値のレベルがはるかに高いため、表面上大きな影響を受けないと考えられる。いずれにしても、疑陽性の一因とはなるが、すでに多くのスクリーニングセンターで導入されているアミノ酸のクロマトグラフィによる確認検査を行えば解決できる問題である。

最後に、ルーチン検査法としての重要な要素の一つに、試薬のランニングコストが上げられる。我々のセンターでの実費を基に算出したフェニルケトン尿症の1検体あたりの試薬コスト⁸⁾は、BIA法の22.3円に対して、Nin-Pep法は11.1円と極めて安価であり、一般的な化学薬品のみでアッセイ系を組める点も大きな魅力である。PheDH法の場合、現在酵素の単品販売はなされておらず、キットの形で供給となるため、少なくともNin-Pep法の数倍以上の単価となるであろう。しかし、PheDH法の長所として、酵素法による簡便な操作性のため安定した測定が可能となる点と、前述のNADH比色測定系への応用が可能となる点が注目される。

5. 結 語

フェニルケトン尿症のマス・スクリーニング法として、新たに開発されたPheDH法およびNin-Pep法の2法を検討した結果、いずれも実用的な方法であることを確認できた。測定操作的には酵素法である

PheDH法が優れ、試薬のコスト面では純粋に化学的な方法であるNin-Pep法が有利であった。

6. 文 献

- 1) Guthrie R and Susi A: Pediatrics, 32, 338-343, 1963.
- 2) Guthrie R: Hum. Genetics, The National Foundation, March of Dimes, 92, 1968.
- 3) Yamaguchi A, et al: Clin. Chem., 35, 1962-1964, 1989.
- 4) Yamaguchi A, et al: Screening, 1, 49-62, 1992.
- 5) Naruse H, et al: Screening, 1, 63-66, 1992.
- 6) Hayashi T, et al: J Chromatogr, 274, 318-324, 1983.
- 7) Maccaman MW and Robins E: J Lab Clin Med, 59, 885-890, 1962.
- 8) 山口昭弘, 他: 札幌市衛生研究所年報, 16, 173-177, 1988.

Comparison of 2 Microfluorometric Assays Using Phenylalanine Dehydrogenase and Ninhydrine Peptide Reaction

Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi

A comparative study of 2 microfluorometric assays of phenylalanine in dried blood spots is described. One assay is based on the measurement of NADH using phenylalanine dehydrogenase/NADH system, while the other uses a specific ninhydrine/peptide reaction. The two methods were compared at the fundamental level and also in terms of efficiency as a screening method for phenylketonuria. Both methods were appropriate for routine newborn screenings, however it was considered important to select and introduce them while understanding their features.