

微量ケイ光定量法による先天性代謝異常症 マス・スクリーニングについて

Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism by Microfluorometric Assay System

山口 昭弘 水嶋 好清 福士 勝 佐藤 稔
清水 良夫 菊地由生子 高杉 信男 荒島真一郎*

Akihiro Yamaguchi, Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi, Minoru Sato,
Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi, Nobuo Takasugi and Shin-ichiro Arashima*

1. 序 文

先天性代謝異常症5疾患, フェニルケトン尿症 (PKU), ヒスチジン血症 (HE), メイプルシロップ尿症 (MSUD), ホモシスチン尿症 (HCU) およびガラクトース血症 (GE) の新生児マススクリーニングは, わが国では昭和52年の実施以来, 多くの患児の早期発見, 早期治療を可能とし, 心身障害の発生子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⁾ (BIA法) は, 高価な機器を必要とせず大量検体を簡便に処理できるという点で非常に優れた方法である。しかし, バイオアッセイによるためアッセイ系自体が変動し易く, また検査判定は肉眼による半定量法であるため, 最適条件を維持し, 確実に陽性検体を検出するには, かなりの熟練を要する。さらに近年, 疑陰性例解析の必要性などから, 検体処理能力, 信頼性に加え記録化が可能な方法の開発が必要とされてきている。我々は, これらの条件を満たした新しいマススクリーニング法の確立を目的として, 先天性代謝異常症5疾患のケイ光マイクロプレートリーダを用いた微量ケイ光定量法 (MFL法) を開発し, その基礎的条件検討を報告してきた^{2,3,4)}。本報では, 操作性, 信頼性, 試薬コストなどの実際面において現行のBIA法との比較からMFL法の有用性につい

て検討を加えた。

2. 方 法

アッセイ条件は既報^{2,3,4)}のとうりであり, 操作の全体の流れと使用機器を図1に, ケイ光測定の原法を表1に示した。確認検査法については, 一次スクリーニングをBIA法で行う場合とほとんど変わらないが, PKU, MSUDは逆相イオンペアモードのアミノ酸分析計⁵⁾で, HEはウロカニン酸の薄相クロマトグラフィー⁶⁾, HCUはSBD-F誘導体の高速液体クロマトグラフィー⁷⁾, GEはGal, Gal-1-Pの分別定量⁸⁾とトランスフェラーゼ, エピメラゼのスポットテスト^{9,10)}を行った。

3. 結 果

3-1 操 作 性

各アッセイとも原理的にはそれぞれ異なるが, 操作的には同様の一連の処理であり, マイクロプレート関連機器の使用により, 大量検体をパンチングから異常検体の検出まで, 迅速, 簡便に処理することが可能であった (図1)。

3-2 信 頼 性

BIA法の弱点は, 検査結果の肉眼判定による非客観性と非保存性にあったが, MFL法においては

*北海道教育大学札幌分校

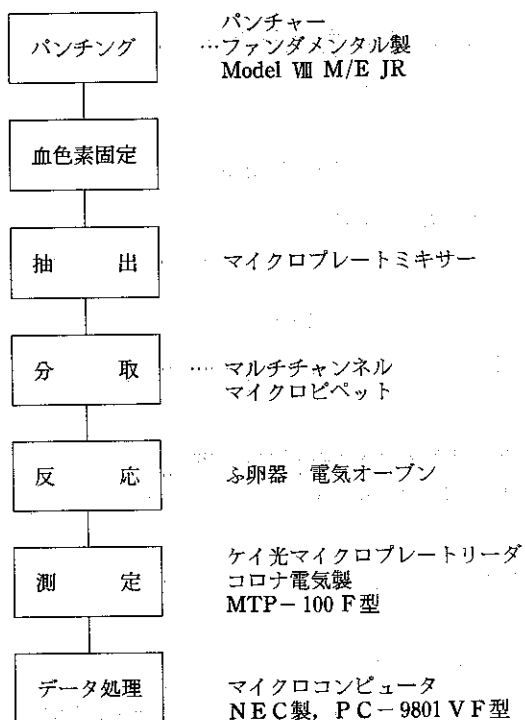


図1 微量ケイ光定量法の測定操作および使用機器

マイクロプレートリーダによる客観的な判定、オンラインで接続したマイクロコンピュータによる自動濃度計算および簡明な報告様式の出力、記録化が可能となった。

MFL法による、新生児の正常値、スクリーニング結果（カットオフ値、一次疑陽性率）を表2に示した。カットオフ値に関してはBIA法においては

表1 微量ケイ光定量法による代謝異常症マス・スクリーニング

対象疾患	原 法	測定物質
フェニルケトン尿症	ニンヒドリン-ペプチド法	Phe
ヒスチシン血症	オルトフタルアルデヒド法	His
メイプルシロップ尿症	ロイシン脱水素酵素法	BCA*
ホモシスチン尿症	SBD-F誘導体化法	HcySH**
ガラクトース血症	藤村法	Gal, Gal-1-P

* BCA : 分枝鎖アミノ酸 (Leu, Ile, Val)

** HcySH : 総ホモシステイン

測定されていないHcySH以外はBIA法での値とほぼ同等とした。このときの一次疑陽性率はアミノ酸で0.33~0.60%、Galが1.52%とBIA法による値よりも低い値となっている。BIA法においては約1%近くが抗生剤による妨害を受けるが、MFL法においては、いずれの項目もその影響は認められなかった。

3-3 測定物質

PKU, HE, GEについては、BIA法と全く同一の物質を測定している。また、MSUDについてもLeuにVal, Ileを加えた分枝鎖アミノ酸(BCA)の合計量を測定しているが、Leuの増大を検出することに変わりはない。しかし、HCUについては、BIA法の場合二次的に増大するMetを指標としているのに対し、MFL法では酵素欠損で一次的に増大するHcySHを直接測定可能とした(表3)。

表2 微量ケイ光定量法による正常値およびカットオフ値

測定項目	正 常 値				スクリーニング結果		
	単 位	N	平 均	SD	カットオフ	N	一次疑陽性率(%)
Phe	mg/dl	157	0.70	0.26	2.5	4,538	0.33
His	mg/dl	153	1.50	0.57	5.0	4,538	0.37
BCA*	mM	155	0.37	0.10	0.65	4,104	0.58
HcySH**	μM	1,007	34	32	130	1,007	0.60
Gal Gal-1-P	mg/dl	264	2.40	1.40	8.0	18,018	1.52

* BCA : 分枝鎖アミノ酸 (Leu, Ile, Val)

** HcySH : 総ホモシステイン

表3 微量ケイ光定量法 (MFL) とガスリー法 (BIA) の比較

対象疾患	測定物質		アッセイ時間 (h)		試薬コスト(円/1検体)	
	MFL	BIA	MFL	BIA	MFL	BIA
フェニルケトン尿症	Phe	Phe	3	16	11.1	22.3
ヒスチジン血症	His	His	2	16	10.0	27.2
メイプルシロップ尿症	BCA*	Leu	2	16	12.2	22.8
ホモシスチン尿症	HcySH**	Met	3	16	16.6	22.1
ガラクトース血症	Gal	Gal	2	16	14.3	30.3
	Gal-1-P	Gal-1-P				
[合計:					64.2	124.7]

* BCA：分枝鎖アミノ酸 (Leu, Ile, Val)

** HcySH：総ホモシステイン

3-4 アッセイ時間

BIA法では、枯草菌の発育に一晚を要するのに比べ、MFL法においては、いずれの項目も2~3時間で最終結果を得ることができた(表3)。

3-5 試薬コスト

当所における1年間(約2万検体)の検査に要した実費を基に算出した、BIA法、MFL法それぞれの試薬コストを表3に示した。5疾患を合わせた1検体あたりの試薬コストは、BIA法で124.7円、MFL法が64.2円と極めて安価であるとされてきたBIA法の約2分の1であった。

4. 考 察

ガスリー¹⁾による、乾燥血液ろ紙を試料とした一度に数百検体の多項目アッセイを行うことができるBIA法の開発は、新生児先天性代謝異常症マスキングの発展に不可欠な要素であった。そして、BIA法が20年以上経過した現在においても、世界中で広く用いられているという事実は、何よりもBIA法の優秀さを示している。しかし、BIA法では最も重要な検査結果の判定を検査者個人の主観に頼らねばならず、また、検査結果が保存できないという欠点がある。このため、患児の見逃し例が生じた場合、常に人為的な検査ミスの可能性を否定できず、実際、米国では何件もの訴訟問題が発生して

いる。一方、今日の測定機器、データ処理装置の性能の向上は著しく、BIA法が開発された当時に比べ価格的にもかなり安価となってきており、さまざまな検査において機器分析が重要な位置を占めている。代謝異常症マスキングにおいても、客観的な検査結果を得るため、いくつかの測定機器を用いた方法の開発努力がなされてきている。その一つは、ガスリープレート上の枯草菌生育円の密度をレーザースキャナー¹¹⁾により定量化する方法であるが、本質的にバイオアッセイの変動要因を除くことはできず、プレートの傷など肉眼判定では妨害とならないものの影響も受けるなど、実用化は困難な状況であり、むしろ、BIA法における肉眼判定の重要性を示す結果となっている。次に、乳酸菌を用いて比濁あるいは比色により、アミノ酸を定量する方法¹²⁾が検討されている。しかし、この方法もバイオアッセイであるため、アッセイ系自体が不安定であること、それ以上に莫大な量の試験管が必要であり、操作的にもかなり繁雑となることから、やはり実用化には至っていない。現在、一部のスクリーニング施設で唯一実用化されている方法として、テクニコン社製のオートアナライザーを用いる、Gal、Pheのケイ光定量法¹³⁾がある。しかし、この装置は複雑な流路系より構成され、目詰り、液もれなどのトラブルが発生する可能性が高く、また、逐次処理によ

る測定のため検体処理能力としては60検体/1時間と、それほど大きくはない。さらに、オートアナライザーは1台1千万円以上と非常に高価であるため、原理的に、多項目スクリーニングには不向きである。これらの方法に対してMFL法は、マイクロプレート関連機器の使用により、また、反応、ケイ光測定を同一の96穴マイクロプレート内で行うことから、試験管レベルの操作に比べ試薬分注、測定操作の簡便さ、迅速性は格段に改善されている。また、ケイ光マイクロプレートリーダは1台270万円とオートアナライザーの4分の1であり、ケイ光測定に要する時間も96検体あたり2分と極めて迅速なことから1台で多項目スクリーニングにも十分対応できる。

BIA法の判定結果を得るのは、検査の翌日であったが、MFL法ではアッセイ時間2~3時間と迅速な測定が可能であり、特に緊急を要する、MSUD、GEのスクリーニングにとって検体到着日に結果が得られることの重要性は大きいと言える。また、MSUDについては、Leuの増大が著明ではない間欠型、中間型などの検出が、BIA法では困難な場合があると言われており、MFL法でVal、Ileの増大も含めて測定することにより、これらの微増例も容易に検出できるものと考えられる。また、HCUについても、BIA法においては、Metを測定してスクリーニングされて来た訳であるが、新生児期にMet増大が認められず、スクリーニングで実際に見逃がされた例が報告されてきている^{14,15)}。この点についてもMFL法では酵素欠損により一次的に増大するHcySHを指標としており、HCUの検出率が従来よりも高くなる可能性がある。ただし、紙血HcySHの測定は従来不可能であったことから、HcySHを指標としたスクリーニングデータの蓄積は皆無の状態であり、今後、MFL法によるスクリーニング数、患児測定例を増やし、カットオフ値など、慎重に決めていく必要がある。BIA法との比較においては、これらMFL法の有用性に加え、抗生剤

による妨害を受けないことも利点の1つである。さらに、試薬コストについてもMFL法の試薬はどれも安価な市販品を用いており、BIA法の2分の1と極めて安価である。

以上、MFL法の先天性代謝異常症一次スクリーニング法としての評価をBIA法との比較から述べてきたが、ケイ光マイクロプレートリーダへの設備投資が可能な多くのスクリーニング施設で、少なくとも数十万単位のパイロットスクリーニングが実施されれば、このMFL法の有用性は実証されるものと考えられる。

5. 文 献

- 1) Guthrie, R. and Susi, A.: *Pediatrics*, **32**, 338-343, 1963.
- 2) Yamaguchi, A. et al: *Clin. Chem.*, **35**, 1989 (in press).
- 3) 山口昭弘, 他: 札幌市衛研年報, **14**, 56-61, 1986.
- 4) 山口昭弘, 他: 札幌市衛研年報, **15**, 50-58, 1987.
- 5) Hayashi, T. et al: *J. Chromatogr.*, **274**, 318-324, 1983.
- 6) Levy, H. L. et al: *J. Pediat.*, **75**, 1056-1058, 1969.
- 7) 山口昭弘, 他: 臨床小児医学, **37**, 109-113, 1989.
- 8) Fujimura, Y. et al: *Tohoku J. exp. Med.*, **137**, 289-295, 1982.
- 9) Beutler, E. and Baluda, M. C.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **68**, 137-141, 1966.
- 10) Fujimura, Y. et al: *Tohoku J. exp. Med.*, **131**, 15-22, 1980.
- 11) Aldis, B. G. et al: *Advance in Neonatal Screening*, 507-510, Elsevier Science B. V., 1987.
- 12) 宮脇範行, 他: 第13回代謝異常スクリーニング研究会講演要旨集, p80, 1985.

13) Hoffman G. L. et al : Clin. Chem., 30, 287-290, 1984.

14) Scriver, C. R. et al : The Metabolic Basis of Inherited Disease (Sixth Ed.), 718, McGraw-

Hill, Inc., 1989.

15) 渡辺俊之, 他 : 第17回代謝異常スクリーニング研究会講演要旨集, p40, 1989.