

マイクロプレートを用いるフェニルケトン尿症 マス・スクリーニング法の比較検討

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、96穴マイクロプレートスケールで反応・測定を行う方法がいくつか実用化されてきている。現在、化学的/酵素的反応さらにケイ光法/比色法の原理的に異なる4種類の方法があり、本報ではこれらの方法につき、実際のマス・スクリーニング応用面での比較検討を行った。

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、乾燥ろ紙血液中の微量のフェニルアラニン(Phe)を、一度に多数検体測定できるBacterial Inhibition Assay (BIA法)が開発されてはじめて実用化可能となった¹⁾。その後、他のアミノ酸あるいはガラクトースに対する同様なバイオアッセイも開発され²⁾、今日の多項目スクリーニングシステムが成り立っている。BIA法は、高価な測定機器を要せず、安定した結果の得られる優れた方法であり、30年以上にわたり世界的にも広くルーチン検査法として採用されてきた。しかし、検査結果は細菌成育円の肉眼判定による半定量のため、疑陰性例・見逃し例が発生した場合の問題等に関連して検査の質的向上に対する要求が高まっていた。これらのことから、我々は、バイオアッセイに代わりうる、検体処理能力に加え客観的な検査結果が得られる方法として、96穴マイクロプレートスケールの化学的/酵素的な発ケイ光反応とケイ光マイクロプレートリーダを組み合わせた微量ケイ光定量法(Microfluorometry; MFL)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PheとNinhydrineの化学的な発ケイ光反応を利用した方法(Ninhydrine-Peptide法; Nin-Pep法)を採用している

が、その後、フェニルアラニン脱水素酵素(PheDH)によりPheから化学両論的に生成するNADHを直接ケイ光測定する方法⁵⁾と発色系へと導く比色法が開発され、後者はさらに、コバルト錯体(Co-5BrPAPS)⁶⁾とformazan⁷⁾を生成する発色系に分けられる。

我々は前報⁵⁾でケイ光法2法の比較検討を行ったが、本報では、これら比色法2法を加えた4方法につき、実際の新生児あるいは患児ろ紙血液検体の測定を通し、フェニルケトン尿症のマス・スクリーニング法としての評価を行った。

2. 方 法

Nin-Pep法の測定試液は自家調整し、PheDHを利用した3法; NADH/ケイ光法(PKU-F), Co-5BrPAPS/比色法(N-PKU), formazan/比色法(Quantase)については、それぞれメーカーから供与された試薬キットを用いた。これらのキットの一覧を表1に、また、測定操作の比較を表2にまとめて示した。試料はすべて3mm径の血液ディスク1枚を用い、同一条件で測定感度を比較するため、QuantaseについてはTCA抽出液中のPhe濃度が他と等しくなるようにTCAの液量を調整した。Phe標準ろ紙血液はPKU-Fキットに添付のものを共通に使用し、測定にはケイ光プレートリーダ; Fluoroskan II (Labsystems, Finland)と比色プレー

Table 1. Reagent kits for newborn phenylketonuria screening

Kit or Method	Supplied	Principle	Measurement
Quantase	Porton Cambridge	PheDH/formazan	Colorimetry
N-PKU	Ciba-Corning	PheDH/Co-Complex	Colorimetry
PKU-F	Ciba-corning	PheDH/NADH	Fluorometry
Nin-Pep	(House prepared)	Ninhydrine/Leu-Ala	Fluorometry

Table 2. Comparison of outlined porcedures

Procedure	Kit or Method			
	Quantase	N-PKU	PKU-F	Nin-Pep
Punc 3mm disc x1				
Extract with TCA:	0.18N - 56 μ l	0.2N - 70 μ l	0.3N - 70 μ l	0.3N - 70 μ l
Stand for	60min	60min	60min	60min
Transfer Extract:	40 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Add Reagent 1	100 μ l	100 μ l	150 μ l	100 μ l
Stand for	RT - 30min	RT - 60min	RT - 60min	60°C - 120min
Add Reagent 2	100 μ l	50 μ l		100 μ l
Add Reagent 3		50 μ l		
Stand for	RT - 2min	RT - 10min		RT - 10min
Add Reagent 4		50 μ l		
Measure at	Abs. 575nm	ABS. 585nm	FL. 355/460nm	FL. 355/538nm
by	Emax (Molecular Devices)		Fluoroskan II (Labsystems)	

トリーダ ; Emax (Molecular devices, U.S.A.) を用いた。

3. 結 果

操作的には、比色法が試薬分注のステップ数が多くなるため、やや繁雑となるが、時間的には、いずれの方法とも3時間以内に測定結果が得られ、BIA法の16時間に比べ迅速な測定が可能であった。

Phe標準ろ紙血液による検量線は、Quantase, Nin-Pep, PKU-Fでは直線となり、N-PKUは3次曲線を示した(図1)。Quantaseは吸光度の絶対値が極めて低く、N-PKUは吸光度がバラツク傾向があった。さらに、これら比色法はケイ光法に比べバックグラ

ウンドレベルが高く感度的に不利であった。ケイ光法の比較では、Nin-PepのS/N比はPKU-Fの2倍以上と、最も感度的に優れていた。

一般新生児ろ紙血液62検体を測定した結果、平均値 \pm S.D.はQuantase, N-PKU, PKU-FおよびNin-Pepそれぞれ、 1.52 ± 0.66 , 0.84 ± 0.32 , 1.54 ± 0.31 および 1.43 ± 0.25 mg/dlとN-PKU以外は概ね一致した(図2)。このときのヒストグラムは、ケイ光法; PKU-F, Nin-Pepが正規分布に近いのに対して、比色法のQuantaseは個々の検体のバラツキが大きく、N-PKUは低濃度側に片寄せた分布を示した。これら62例の測定値の4方法間の相関を調べたところ、Nin-Pep, PKU-F, N-PKU間では比較的良好な相関が認められたが、

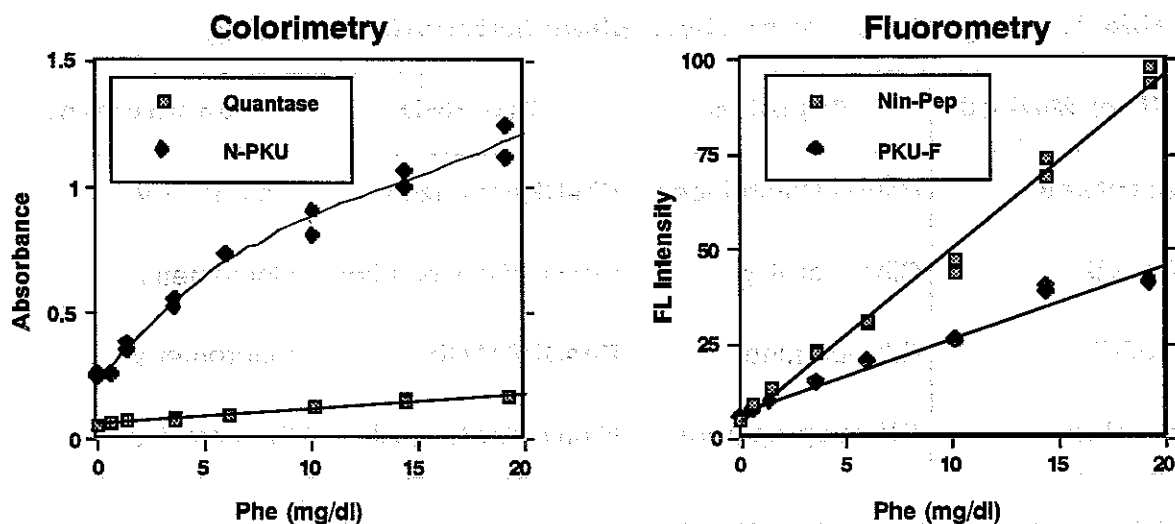


Fig. 1. Calibration curves of Phe in dried blood spots

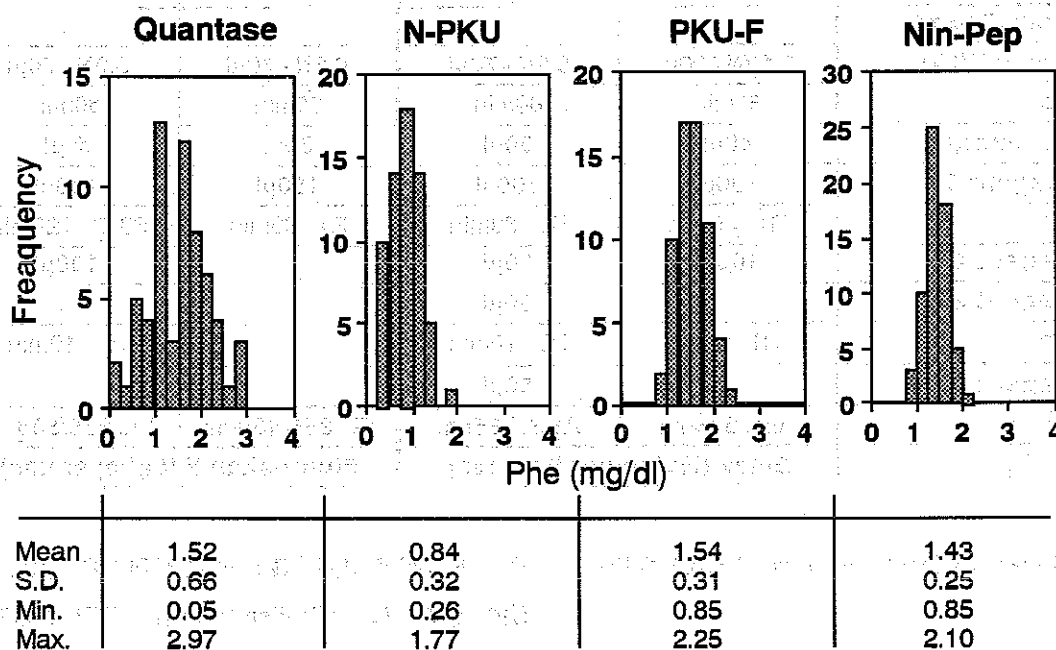


Fig. 2. Histograms of phe concentration in normal newborns

Quantaseはいずれの方法とも相関が低かった（図3）。

フェニルケトン尿症, dihydropteridine reductase 欠損による高Phe血症の治療管理下のろ紙血液および外部精度管理検体の測定結果を, 一般新生児検体62例の平均値, S.D.および範囲とともに図4に示した。Phe測定値としては各方法とも大きな違いはなく, HPLCでのPhe測定値4.1mg/dl(C1975)以上の検体はい

ずれも一般新生児検体から分離できているが, 2.5mg/dlの検体(C1974)はQuantaseでは検出できていないことがわかる。

フェニルケトン尿症の新生児マス・スクリーニング法としての評価を, 「測定操作の容易さ」, 「測定感度」, 「測定結果の信頼性」, 「試薬コスト」および「機器コスト」の5項目につき, 最も優れた方法を100として概念的に図5に示した。操作・感度・

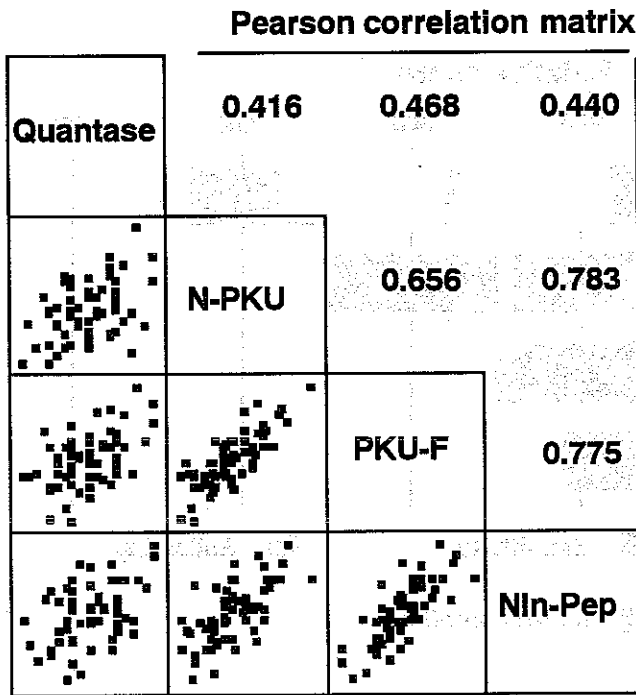


Fig. 3. Correlations of Phe concentration in each assay for normal newborns (n=62)

は信頼性・試薬コスト的にも優れた方法であり、PKU-Fは薬物あるいはウェル内の糸屑等による非特異ケイ光の影響を受け易く疑陽性例が多くなるものの、操作の簡便性に優れており、いずれの方法でもスクリーニングへの実際応用は可能なことを報告した。

一方、新生児スクリーニングの検査施設の内、クレチン症と副腎過形成のスクリーニング検査も実施しているところは多く、これらの施設では、酵素免疫測定法(ELISA)用に比色マイクロプレートリーダーを既に保有している。従って、先天性代謝異常症4疾患のスクリーニングも新たな設備投資を要しない比色マイクロプレートリーダーを用いて行えば理想的であるとの観点から、比色法のPhe測定キットが開発された経緯がある。しかしながら、

信頼性すべてにおいて、ケイ光法は比色法よりも優れており、なかでも一般的な化学薬品のみで測定可能な、Nin-Pepは試薬コストの面でも最も有利であった。

今回の比較検討からもわかるように、比色法キットは発色反応が加わるためにステップ数が多く、操作性・信頼性を損なう上に感度的にも十分とはいえない(表2、図1)。特にQuantaseについては、もともと血清用に開発された試薬であり、標準プロトコールでは4.5mmディスクを使用することになっているが、formazanの発色強度では、ろ紙血Phe測定の

4. 考 察

前報⁵⁾でPheケイ光法の比較検討を行い、Nin-Pep

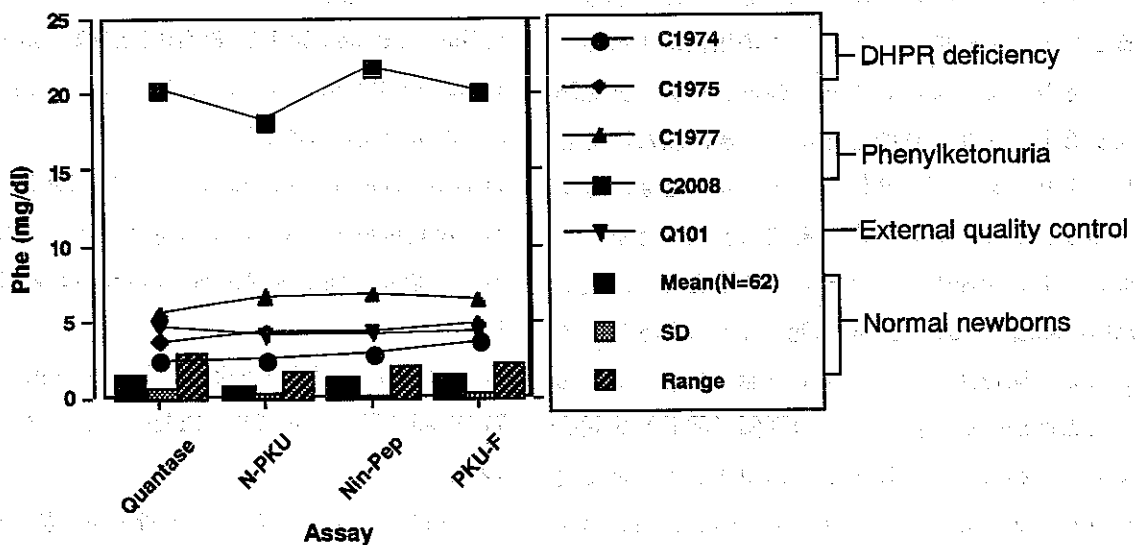


Fig. 4. Comparison of patients and normal Phe levels

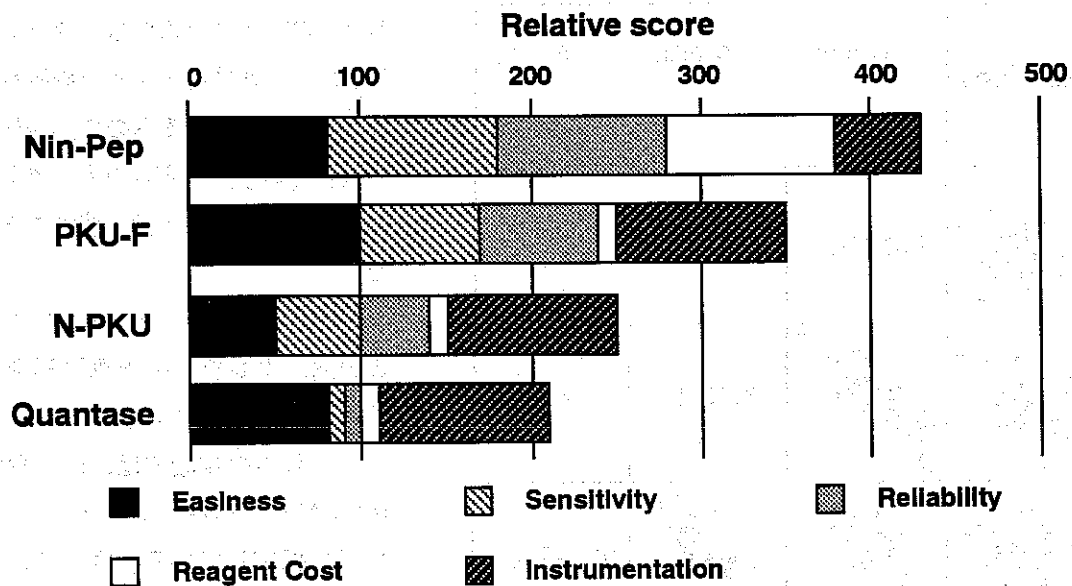


Fig. 5. Evaluations of microplate assays for newborn phenylketonuria screening

Relative scores to the best assay (100) were evaluated in each item and accumulated.

实用レベルにないことは明らかである。

ケイ光プレートリーダーは、比色プレートリーダーに比べ汎用性に乏しく、価格も数倍高価である。しかし、多数検体の多項目測定が要求されるマス・スクリーニング検査では、現実には測定機器は専用器として用いられることから、汎用性は重要な要素ではない。また、バイオアッセイ4項目を比色法に切り替えるとして、仮に既にクレチン症等用にELISAのシステムを有していたとしても、測定からデータ処理に要するトータルの時間を考えたとき、新たに比色プレートリーダー/データ処理装置一式が必要になるであろう。また、システム上重要な要素であるが、ホモシスチン尿症のスクリーニング法として開発されたMet測定法⁸⁾は、化学的な発ケイ光反応を用いているため、比色法への応用は不可能である。これらのことと前述の測定法としての評価(図5)を総合的に考え合わせると、比色法を採用する必然性は認められず、ケイ光プレートリーダーへの設備投資は十二分に価値があると考えられる。

5.

結 語

マイクロプレートベースのフェニルケトン尿症マス・スクリーニング法; 4法について比較検討を行った結果、化学的発ケイ光反応を用いたNin-Pep法が最も優れた方法であることがわかった。

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) 山口昭弘, 他: 札幌市衛生研究所年報, **20**, 75-79, 1993.
- 6) Naruse H., et al: *Screening*, **1**, 63-66, 1992.
- 7) Wendel U., et al: *Clin. Chim. Acta*, **192**, 165-170, 1990.
- 8) 山口昭弘, 他: 札幌市衛生研究所年報, **20**, 67-74, 1993.

A Comparative Study of Microplate-Based Assays for Newborn Phenylketonuria Screening

Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu and Yuko Kikuchi

Four microplate assays for phenylalanine in dried blood spots both with fluorometry or colorimetry were evaluated as a newborn screening method for phenylketonuria. Two of 4 were microfluorometric assay and one of these two was based on the formation of a fluorophore derived from phenylalanine and ninhydrine under the coexistence of a peptide (Nin-Pep), and the other was based on direct measurement of NADH; a stoichiometric product of phenylalanine by phenylalanine dehydrogenase (PKU-F). Microcolorimetric 2 assays were also adopted phenylalanine dehydrogenase and followed by coloration reactions for the NADH; one was based on a formation of cobalt-chelating complex with a highly absorption coefficient (N-PKU), and the other was based on a formation of formazan as a reductive products corresponding to NADH (Quantase). It was concluded that Nin-Pep was the best suitable method among these 4 assays under the criteria such as easiness in procedure, reliability of the results and low reagents cost.