

微量ケイ光定量法によるメイプルシロップ尿症およびホモシスチン尿症のマス・スクリーニング法の検討

A Simple Microfluorometric Assay for Mass Screening of Maple Syrup Urine Disease and Homocystinuria

山口 昭弘 松田多加子 福原 智子 佐藤 稔
清水 良夫 岡田 隆幸 高杉 信夫 荒島真一郎*

Akihiro Yamaguchi, Takako Matsuda, Tomoko Fukuhara,
Minoru Sato, Yoshio Shimizu, Takayuki Okada,
Nobuo Takasugi and Shinichiro Arashima*

ケイ光用マイクロプレートリーダを用いた新生児乾燥血液ろ紙中の分枝鎖アミノ酸(BCA)およびホモシスチン(HSH)の微量ケイ光定量法を開発し、それぞれメイプルシロップ尿症、ホモシスチン尿症マス・スクリーニングへの応用を検討した。

1. 緒 言

先天性代謝異常症5疾患(フェニルケトン尿症、ヒスチジン血症、メイプルシロップ尿症、ホモシスチン尿症およびガラクトース血症)の新生児マススクリーニングは昭和52年の実施以来、これら患児の早期発見、早期治療を可能とし、心身障害の発生予防に大きな成果を上げている。検査法としては、微生物学的半定量法であるガスリー法¹⁾が当初より採用されているが、培地作成条件等の影響を受け易く、最適条件を維持し、確実に異常検体を検出するには、かなりの熟練を要する。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、これらの条件を全て満たした、新しいマススクリーニング法の確立を目的として、これまでに、ガラクトース血症、フェ

ニルケトン尿症、ヒスチジン血症の、ケイ光用マイクロプレートリーダを用いた、微量ケイ光定量法によるマススクリーニング法^{3),4)}を開発してきた。本報では、マススクリーニング対象5疾患の内、残る2疾患、メイプルシロップ尿症、ホモシスチン尿症について、微量ケイ光定量法によるマススクリーニング法を検討した。メイプルシロップ尿症については、ロイシン脱水素酵素(LeuDH)⁵⁾を用いたBCA[Val, Ile, Leuの合計]測定法をマイクロプレートレベルに改良し、また、ホモシスチン尿症については、ジチオエリトリトール(DTE)還元処理と、SH基の発ケイ光試薬7-フロロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-スルホネイト(SBD-F)⁶⁾誘導体化を組み合わせた総HSHのケイ光定量法をマイクロプレートレベルで新たに開発し、それぞれのマススクリーニングへの

* 北海道大学医学部附属病院小児科

応用を検討した。

2. 方 法

2-1 検体および標準

検体は、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BCA, HSHを添加した血液をスポットして調整し、BCAについては、アミノ酸分析計による定量値を、HSHについては、添加値をそのまま、標準濃度とした。なお、濃度表示は全て全血値とした。

2-2 試 薬

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)はベーリンガー製Li塩、LeuDHは東洋紡製、DTEは半井製、グルタチオンS-アルキルトランスフェラーゼ(GSA)はシグマ製、1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン(C1-DNB)は関東化学製、SBD-FおよびEDTA・2Naはドータイト製の試薬をそれぞれ用いた。

(1) BCAアッセイ

0.2M Gly-KCl緩衝液(pH 10.7): Gly 7.5 g, KCl 7.4 gを脱イオン水に溶かし500 mlとした溶液に2M KOHを加え、pH 10.7とする。

20mM NAD: NAD Li塩282 mgを脱イオン水に溶かし20 mlとする。

2 U/ml LeuDH: LeuDH 379 Uを0.01 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.2) 3.8 mlに溶かした保存原液(100 U/ml)を調製し、用時脱イオン水で50倍に希釈し、使用する。

(2) HSHアッセイ

0.1M Tris-50mM EDTA 緩衝液(pH 9.0): Tris 6 g, EDTA・2Na 9.3 gを脱イオン水に溶かし、1N NaOHでpH 9.0とした後、500 mlとする。

0.2M Tris-50mM NaAsO₂ 緩衝液(pH 8.0): Tris 12.1 g, NaAsO₂ 3.2 gを脱イオン水に溶かし、3N HClでpH

8.0に調製後、500 mlとする。

DTE抽出溶液: DTE 15.4 mg, Na₂SO₄ 4.3 gを脱イオン水に溶かし、Tris-EDTA緩衝液5 mlを加えた後、脱イオン水で50 mlとする。

0.1 mg/ml GSA溶液: GSA 10 mgを、0.01 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.2) 1 mlに溶かした保存原液(10 mg/ml)を調製し、脱イオン水で用時100倍に希釈して使用する。

1mM C1-DNB: C1-DNB 20 mgをエタノール10 mlに溶かし、脱イオン水で100 mlとする。

5mM SBD-F溶液: SBD-F 58.8 mgを脱イオン水に溶かし50 mlとする。

反応停止液: 85% H₃PO₄ 6.8 mlに10% (W/V) トリトンX-100 1 mlを加え、脱イオン水で500 mlとする。

2-3 装置および器具

ケイ光用マイクロプレートリーダー: コロナ電気製 MTP-100 F型

マイクロプレート: 血色素変性および抽出は、96穴、U底型マイクロタイタープレート(三光純薬製)で行い、反応およびケイ光測定にはストリップウェル(ラボシステム製、1×8ウェルタイプ)を専用ホルダーと共に使用する。

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 μl, 50~200 μl)

2-4 操 作

(1) パンチングおよび血色素変性

乾燥血液ろ紙から、3 mmディスク1枚を、U底型マイクロプレートウェルにパンチし、メタノール: アセトン: 脱イオン水(35: 35: 10)混合液10 μlを加えた後、BCAについては37℃で、HSHは60℃で30分間放置し、血色素を固定する。

(2) BCAアッセイ

各ウェルに脱イオン水50 μlを加え、10分間ミキシングを行なう。マルチチャンネルマイク

マイクロピペットで抽出液40 μ l をストリップウェルに分取し、0.2 M Gly-KCl 緩衝液 (pH 10.7) 10 μ l, 20 mM NAD 10 μ l, 2 U/ml LeuDH 10 μ l の反応混合液30 μ l を加える。アルミホイルで包み、37°C, 1時間インキュベート後、0.02% (W/V) トリトンX-100 溶液 130 μ l を加える。MTP-100 F の測定感度 (励起-ケイ光-レスポンス): 3-3-3, フォトマル: 4 50, 励起/ケイ光波長: 360 / 450 nm で NADH のケイ光を測定する。

(3) HSH アッセイ

各ウェルに DTE 抽出液 50 μ l を加え、10 分間ミキシング後、抽出液 40 μ l をストリップウェルに分取する。0.2 M Tris-50 mM NaAsO₂ (pH 8.0) 20 μ l, 0.1 mg/ml GSA 10 μ l, 1 mM Cl-DNB 10 μ l の反応混合液 40 μ l を加え、室温で 30 分間インキュベートし、大量に共存するグルタチオンの SH 基をマスクする。次に 5 mM SBD-F 20 μ l を加え、60°C で 1 時間反応させた後、10 分間放置し、反応停止液 100 μ l を加える。10 分後、MTP-100 F の測定感度: 4-4-3, フォトマル: 4 50, 励起/ケイ光波長: 410 / 530 nm で HSH の SBD-F 誘導体のケイ光を測定する。

(4) 測定値処理

MTP-100 F 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、標準偏差およびカットオフ値以上の検体とともに自動的に印字する。

3. 結果及び考察

3-1 ケイ光用マイクロプレートリーダ

微量ケイ光定量法は、血液ディスクのパンチング、抽出、反応、ケイ光測定の一連の操作をマイクロプレート内で行なうもので、マイクロプレート関連の

器具の使用で操作性良く、迅速、正確な測定を行なうことができる。マイクロプレート化を検討するにあたり、反射光測光方式による、数社のケイ光用マイクロプレートリーダを試用する機会を得たが、いずれも感度的に不十分であった。これに対し、コロナ電気製 MTP-100 F は、特殊な駆動部とストリップウェルの組合せにより垂直光測光方式を可能とした高感度かつ迅速なケイ光測定装置であり、従来の反射光測方式に比べ、約 1 オーダー感度が改善されている。ただ、新品のストリップウェルでは、包装段階での紙屑等の混入により、乱反射を受け、かなり高い値を示す場合があるため (1 ウェル/数プレート)、ストリップウェル内を脱イオン水で洗浄してから使用する必要があった。また、使用したストリップウェルは、中性洗剤、水道水、脱イオン水洗浄により再使用可能であった。

3-2 BCA 反応条件

LeuDH は NAD 共存下、Leu のみではなく Val, Ile も基質として、それぞれのケト酸に酸化することから、この際、共役して生成する NADH を測定し、これら 3 種のアミノ酸の合計である BCA の定量に用いられている⁵⁾。この原報を基に、高感度化、マイクロプレート化のための、基礎的反応条件を検討した。検討には、Leu 標準溶液および Leu を 2 mM 添加した全血から調製した、ろ紙血を用い、生成する NADH のケイ光をモニターした。なお、標準溶液については、その 40 μ l を抽出液の代わりに用いた。

(1) pH: Gly-KCl 緩衝液の pH を 7~12 の間で変化させたところ、pH 9 以上で一定となったので、pH は原報どおり 10.7 とした。

(2) NAD 濃度: NAD 1~40 mM の間で調べたところ、10 mM 以上で一定となった。

(3) LeuDH 濃度: LeuDH 1 U/ml 以上で一定となった (Fig. 1)。

(4) インキュベーション時間: 45 分以上のインキュベーション時間で、一定となった。

(5) ケイ光の安定性・NADHのケイ光は、最終溶液を加えた後、少なくとも2時間は安定であった。

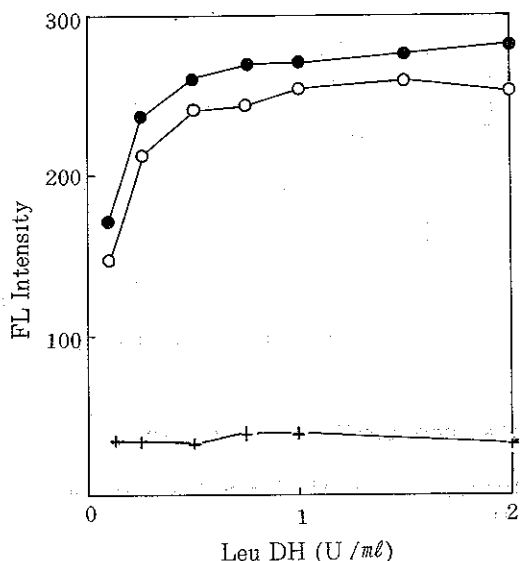


Fig. 1: Effect of LeuDH concentration on formation of NADH (+) blank value, (o) 200 μM Leu solution, (●) 2 mM Leu added blood disc

3-3 HSH反応条件

HSHは、そのSH基が酸化され易く、二量体のホモシスチン(HSSH)あるいはタンパク質SH基と結合したジスルフィドとして存在するため、総HSH(HSSH+遊離型HSH+タンパク結合型HSH)の測定には、何らかの還元処理が不可欠である。我々は、還元力に優れ取り扱いの簡単なDTEを還元剤として用いた。DTEは分子内に2つのSH基を持つジチオールであり、HSH同様SBD-Fと反応し発ケイ光するが、過剰のDTEは亜ヒ酸イオンとの安定な五員環錯体⁷⁾として、そのSH基をSBD-Fとの反応に対してマスクすることができる。また、全血中の主なSH化合物として、HSH以外にもシステイン(CSH); グルタチオン(GSH)が知られている⁸⁾。CSHの全血濃

度は約100 μMであるが、本測定条件下でのCSHの感度はHSHの10分の1であった。従って、HSHとして10 μM程度の正の誤差を与えることになるが、後述のように異常検体を検出する上では問題とはならなかった。一方、GSHは1~2 mMとHSHに比べ大量に存在するため、このままでは、HSHを定量することは不可能であった。そこで、GSAとCl-DNBを用いて、GSHのSH基を選択的にマスクすることを試みた。各反応条件の最適化を行なうため、HSH, HSSH, GSH標準溶液およびHSHを500 μM添加した全血から調製した、ろ紙血を用い、SBD-F誘導体のケイ光をモニターした。なお、標準溶液については、その20 μlに前述のDTE溶液の2倍濃度の溶液20 μlを加え、抽出液40 μlの代わりに用いた。

- (1) 還元条件: DTE抽出液中のDTE濃度は1.5 mM以上で、pHは8.5以上で、それぞれ一定となった(Fig. 2)。EDTAは、SH基の保護の目的で、またNa₂SO₄は、血液ディスクからのタンパク質溶出を塩析効果で防ぎ、バックグラウンドを抑えるために加えた。
- (2) 過剰DTEのマスク: Tri-s-As緩衝液中、NaAsO₂ 20 mM以上でDTEによるケイ光を一定に抑えることができた(Fig. 3)。
- (3) GSHのマスク: GSA 0.05 mg/dl以上、Cl-DNB 1 mM以上で、通常の血中レベルのGSHをマスクできた(Fig. 4)ただ、Cl-DNB濃度の増大に伴い、HSHのSH基に対しても反応が進むため、Cl-DNB濃度は必要最小限の1 mMとした。また、インキュベーション時間は室温、20分以上で一定となった。
- (4) SBD-Fケイ光誘導体化: 反応時間、SBD-F濃度およびpHの影響をFig. 5に示した。いずれの場合も、ブランク値の急激な増大を伴うため、ケイ光強度とS/N比を考慮し、反応時間は1時間、SBD-F濃度は5 mM、pHは8.0とした。

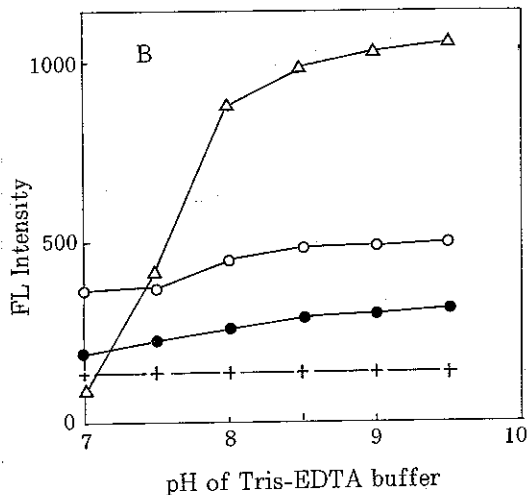
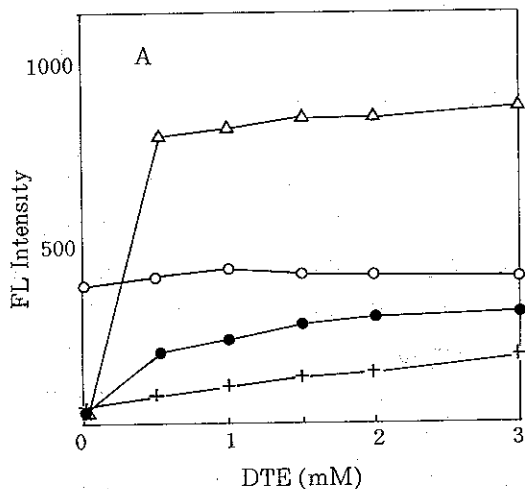


Fig. 2. Effect of DTE concentration (A) and pH (B) on reduction of disulfide

(+) blank value, (○) 50 μM HSH solution, (△) 50 μM HSSH solution, (●) blood disc added HSH to 500 μM

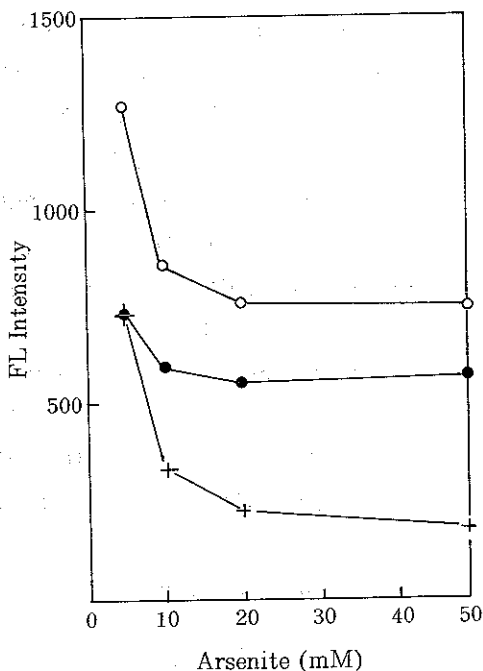


Fig. 3. Effect of arsenite concentration on masking of excess DTE

(+) blank value, (○) 50 μM HSH solution, (●) blood disc added HSH to 500 μM

(5) ケイ光の安定性: 反応停止液を加えた後も10分間は徐々に増大したが, それ以後2時間は一定であり, 一晩放置した後も, ほとんど変化せず, 非常に安定であった。

3-4 検査線

BCA, HSHとも, 標準血液ろ紙を用いた検量線は, 原点は通らないが, 直線関係は良好であった (Fig. 6)。一方, 標準溶液による検量線は, どちらも原点を通る比例関係が得られており, 血液成分によるバックグラウンドの影響が完全には除かれていないためと考えられる。

3-5 回収率および再現性

Leu, Ile, Valの単独あるいは混合溶液を添加して調整した乾燥血液ろ紙からのBCA回収率は, 83~104%, 変動係数も3.8~6.6%と良好であった (Table 1)。一方, HSHの乾燥血液ろ紙からの回収率は, 49~60%, 変動係数は5.0~9.6%と, 再現性は良好であったが, 添加したHSHの約半分は回収されなかった (Table 2)。HSH標準血液ろ紙の値は, 添加した値をそのまま用いてい

るので、回収率の補正は行なわれていることになる。回収率が低い点については、現在、検討中であるが、原因としては添加したHSHがジスルフィド結合以

外の結合で血球成分に捕捉されていること、あるいは、速やかに異化作用を受けていることなどが考えられる。

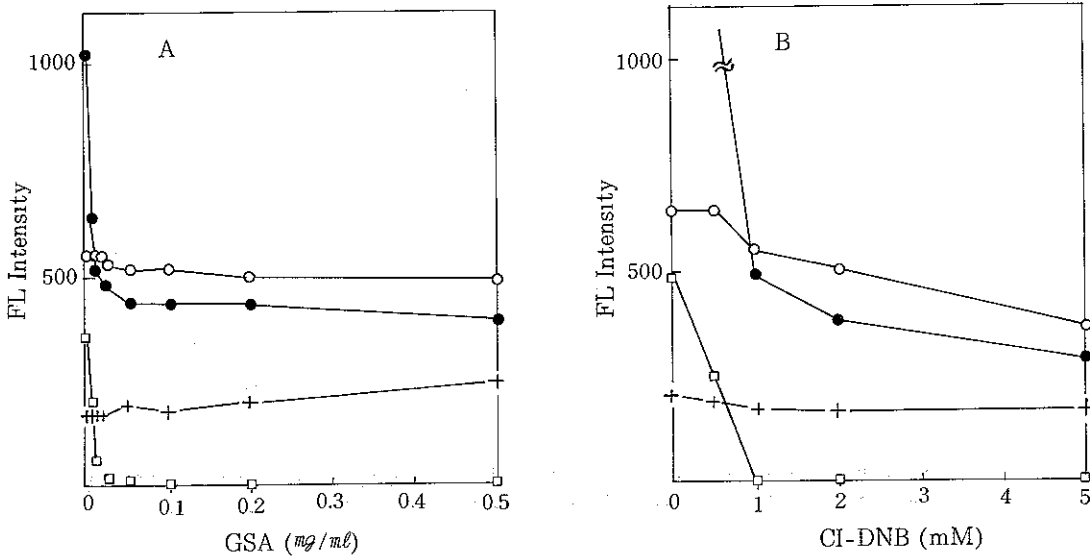


Fig. 4. Effect of GSA (A) and CI-DNB(B) concentrations on masking of GSH
 (+) blank value, (○) 50 μM HSH solution, (□) 50 μM GSH solution, (●) blood disc added HSH to 500 μM

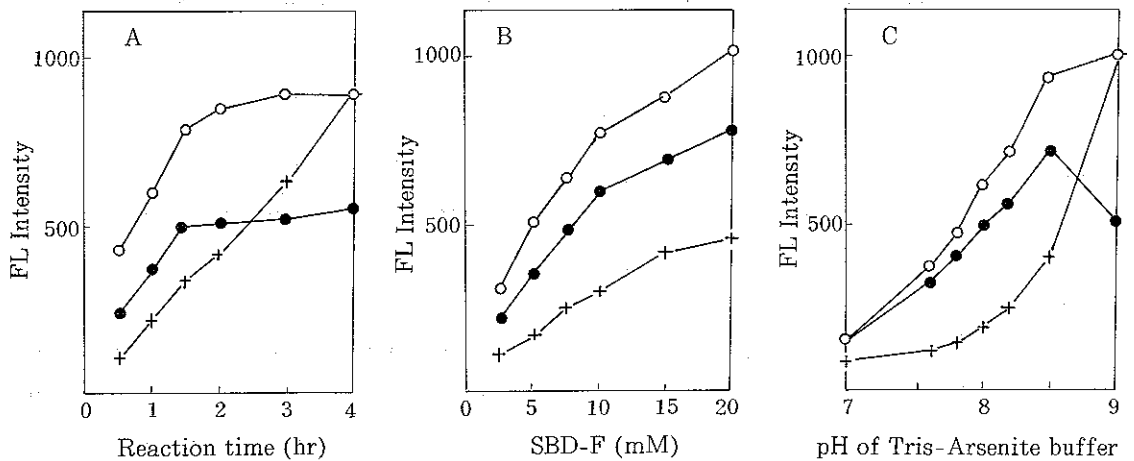


Fig 5. Effect of reaction time(A), SBD-F concentration(B) and pH(c) on formation of SBD-F derivative of HSH
 (+) blank value, (○) 50 μM HSH solution, (●) blood disc added HSH to 500 μM

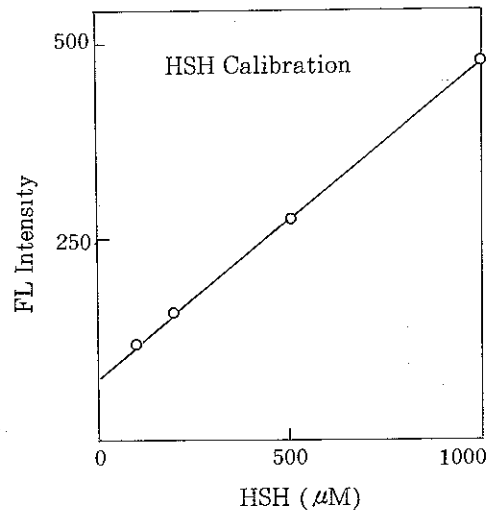
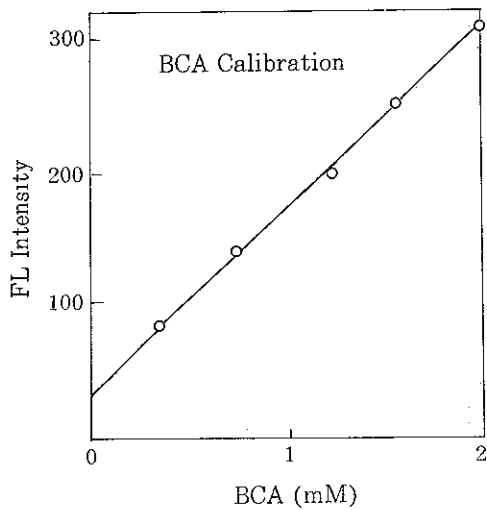


Fig.6. Calibration curves using standard blood discs prepared by addition of BCA or HSH solution series

Table 1 Recovery and reproducibility (n=8) in BCA assay using BCA added blood disc

	BCA (mM)		Rec (%)	CV (%)
	Added	Found		
Leu	0	0.392	—	4.9
	0.5	0.872	96	6.5
	1	1.27	88	6.6
	2	2.11	86	6.0
Ile	1	1.43	104	5.3
	2	2.13	87	4.0
Val	1	1.33	94	4.1
	2	2.06	83	3.8
Mix ^x	1.5	1.81	94	6.5

*Mixture of Leu, Ile Val each in 0.5mM

Table 2. Recovery and reproducibility (n=5) in HSH assay using HSH added blood disc

	HSH (μM)		Rec (%)	CV (%)
	Added	Found		
0	27	—	9.6	
100	76	49	6.9	
200	146	60	7.5	
500	319	58	5.0	
1,000	625	60	7.1	

3-6 スクリーニングへの応用

(1) メイプルシロップ尿症

一般新生児 1,151 例について、BCA 測定によるスクリーニングを行なった。BCA の平均値 ± SD は 0.344 ± 0.097 mM, 範囲は $0.053 \sim 0.744$ mM であり、カットオフ値を 0.6 mM (平均値 + 2.6 SD) とした場合 9 例 (0.78%) が一次擬陽性となった。メイプルシロップ尿症患児の本法による BCA 値は、アミノ酸分析計

による値と良い一致を示した (Table 3)。

Table 3. BCA assay results in maple syrup urine disease (MSUD) patients

MSUD	Age (Y)	BCA (mM)		Leu (mg/dl) AA**
		MFL*	AA**	
A	3	2.21	1.82	11.1
B	2	0.945	0.858	6.2
C	6	0.703	0.721	2.7

* Microfluorometry

** Amino acid analysis

メイプルシロップ尿症は分枝ケト酸デカルボキシラーゼの障害により, Leu とともに Val, Ile の増大も伴うことから, ガスリー法で Leu のみを測定する場合に比べ, 本法で BCA を測定すれば, 中間型等の微増例についても, その検出は確実にすることが期待できる。

(2) ホモシスチン尿症

一般新生児 1,007 例について, HSH 測定によるスクリーニングを行なった。HSH の平均値 \pm SD は $34 \pm 32 \mu\text{M}$, 範囲は $0 \sim 156 \mu\text{M}$ であり, カットオフ値を $130 \mu\text{M}$ (平均値 + 3 SD) とした場合, 6 例 (0.60%) が一次擬陽性であった。また, 治療中のホモシスチン尿症患児の HSH 値について, 本法による値と HSH の SBD-F 誘導体を HPLC で測定⁹⁾した値を Table 4 に示した。本法による値は, HPLC による値に比べかなり高値を示し, HSH 以外の SH 化合物によるバックグラウンドの影響を受けているものと考えられる。実際, 一般新生児乾燥血液ろ紙の HPLC による測定では, 擬陽性となった 6 例も含めて全て検出限界以下 ($< 20 \mu\text{M}$) であった。本法に於ける HSH 値は, 前述のように, CSH も含めた値

であり, 感度的にも正常レベルの値は本来, 不検出とすべきである。しかし, 一次スクリーニング法として用いる場合, 絶対値の正確さは厳密には要求されず, むしろ異常値を正常レベルから確実に検出できることが必須となるわけである。この観点からは, Met 値が 3 mg/dl 程度にコントロールされているシスタチオン合成酵素欠損症患児 (Table 4 の症例 A), また Met 増大を伴わない葉酸あるいはコバラミンの代謝障害と考えられる患児 (Table 4 の症例 B) に於いても, 上記のカットオフ値を採用した場合, 検出可能であり, さらに HPLC による確認検査を併用すれば, 陽性か正常かの判定を確実にこなうことができる。

Table 4. HSH assay results in homocystinuric (HCU) patients

HCU	Age (Y)	HSH (μM)		Met (mg/dl) AA***
		MFL*	HPLC**	
A-1	17	215	93.8	4.3
-2	17	200	108	3.2
B	19	145	59.6	0.22

* Microfluorometry

** High performance liquid chromatography

*** Amino acid analysis

A Cystathionine β -synthase deficiency

B Enzyme defect is not identified

シスタチオン合成酵素の障害によるホモシスチン尿症は, HSH からシスタチオンへの変換が行なわれず, HSH あるいは HSSH が体内に蓄積する疾患である。しかし, 従来, HSH, HSSH の高感度, 大量検体処理が可能なマススクリーニング法が存在せず, 現行の

ガスリー法に於いても、HSHの前段階に位置するMetを指標としてスクリーニングされている。しかし、新生児期にMetの増大が著明でなく、患児が見逃された例が、かなり報告¹⁰⁾されてきており、この点からも完全に選択的ではないにしても、HSHを直接測定可能な本法が開発されたことの意義は大きいと言える。さらにMet増大を伴わない葉酸、コバラミン代謝障害によるホモシスチン尿症についても、本法によるスクリーニングを行なうことにより発見できるものと期待される。

4. 結 語

今回開発した、メイプルシロップ尿症およびホモシスチン尿症の微量ケイ光定量法によるマススクリーニング法は、市販の安価な試薬を用い、操作性、検体処理能力さらに信頼性にも優れた方法である。また、我国では、開始以来10年余り、メイプルシロップ尿症、ホモシスチン尿症はガスリー法により、それぞれLeu, Metを測定してスクリーニングされてきたわけであるが、BCA, HSHを測定し、スクリーニングすることにより、従来、見逃されている可能性のあるLeu, Metの微増例についても確実に検出できるものと期待される。

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 (1986)
- 4) 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: 札幌市衛生研究所年報, **14**, 56 (1987)
- 5) T. Ohshima, H. Misono, K. Soda: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1919 (1978)
- 6) K. Imai, T. Toyooka, Y. Watanabe: *Anal. Biochem.*, **128**, 471 (1983)
- 7) W. Zahler, W. Cleland: *J. Biol. Chem.*, **243**, 716 (1968)
- 8) T. Toyooka, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **282**, 495 (1983)
- 9) 山口昭弘, 福士 勝, 水嶋好清, 佐藤 稔, 清水良夫, 岡田隆幸, 高杉信男: 第28回臨床化学会年会要旨集 p.88
- 10) J. Stanbury, J. Wyngarden, D. Fredrickson, J. Goldstein, M. Brown: "The Metabolic Basis of Inherited Disease" 5th Ed., McGraw-Hill Inc., New York, p. 545 (1983)