

代謝異常症スクリーニングにおける微量ケイ光定量法の改良

山口 昭弘 石橋麻里子 中澤恵実理 荒井 修 福士 勝
佐藤 泰昌 菊地由生子 大竹 治美^{*1} 藤本 昭栄^{*1}
大浦 敏明^{*1} 長谷 豊^{*2}

要 旨

バイオアッセイに代りうる先天性代謝異常症4疾患のスクリーニング法として開発した、微量ケイ光定量法(MFL)の反応系と機器構成を改良し、システムの最適化を計った。反応系の改良としては、ガラクトース(Gal)と分枝鎖アミノ酸(BCA)のNADHケイ光測定系をresorfineケイ光測定系に、また、総ホモシステイン(HSH)の化学的測定法から、Methionine -lyase (Met-lyase)を用いたMetとの総量を測定する酵素法を新たに開発し、それぞれ、より信頼性の高いスクリーニング法となった。さらに、自動分注装置の導入とケイ光マイクロプレートリーダーをストリップウェルタイプからリジッドタイプのものへと変更したことにより、操作性に優れた半自動化システムを確立できた。

1. 緒 言

先天性代謝異常症の新生児マス・スクリーニングは、1963年Guthrieら¹⁾により微生物学的半定量法であるBIA法(bacterial inhibition assay)が開発されたことを受け、今日の世界的な普及を見ている。BIAは、高価な機器を必要とせず、大量検体の多項目スクリーニングが可能な優れた方法である。しかし、検査結果の判定は、細菌生育円の肉眼判定により得られることから、検査結果の客観性、記録化の問題が指摘されていた。我々は、これらの問題点を解決するために、96穴マイクロプレートスケールでの化学的/酵素的な反応の後、ケイ光マイクロプレートリーダーを用いて測定する、微量ケイ光定量法(MFL)を開発し、その有用性を報告してきた^{2,3)}。本報では、反応系の改良および機器構成の変更等、その後の改良点を中心に、現状での最適化システムについて報告する。

2. 方 法

反応系の改良として、GalとBCAについては、NADHのケイ光測定系にresazurine/diaphoraseを共役させたresorfineケイ光測定系とし、MetとHSHの総量については、Met-lyase反応の生成物NH₃とo-phthalaldehyde/2-mercaptoethanolとの中性域での特異ケイ光を利用した方法⁴⁾とした。なお、フェニルアラニン(Phe)については、従来と同じ、ninhydrine-peptide法を採用している。機器は、パンチャー：Punch Indexer model A Jr (Fundamental)、自動分注装置：MegaFlex (Tecan)、ケイ光プレートリーダー：Fluoroskan[†] (Labsystems)またはFluorolight 1000 (Dynatech)を使用した。また、ケイ光測定および測定値の処理にはパーソナルコンピュータ Quadra 650 (Apple)を用いた。改良MFLの一覧をTable1に、各アッセイの原理、試薬調製法および操作をFig.1から4に示した。

3. 結 果

実際のルーチンアッセイにおける各アッセイの典

^{*1} 大阪市環境保健協会

^{*2} 大阪市鶴見保健所

Table 1. Advanced Microfluorometry

Disease	Method	Measure at Ex/Em(nm)	Measured	Cut-off (mg/dl)
Phenylketonuria	Ninhydrine Peptide	355/538	Phe	2.5
Homocystinuria	Met-lyase/OPA-2ME	418/538	HSH, Met	2.5
Maple syrup urine disease	LeuDH/Resorufine	544/590	Leu, Ile, Val	8.5
Galactosemia	GalDH/Resorufine	544/590	Gal, Gal-1-P	6.0

Improvement of previous Microfluorometry

1. Reliable enzymatic assay for sum of Met and HSH is newly developed instead of a chemical method for HSH alone.
2. Nonspecific fluorescence is eliminated in Gal and BCA assays by adopting resorufine system in combination with NADH system.
3. Automated reagent delivery system and fluorometric microplate reader with rigid type are introduced.

典型的なアウトプットをFig.5から8に示した。いずれも4濃度2重測定直線の直線が検量線(Regression curve)であり、その下の散布図が初回検体(Initial sample)と再測定検体(Retest sample)の濃度を測定順にプロットしたものである。この図には示されていないが、次のページにカットオフ値以上の検体番号が自動的にリストアップされてくる。これらのデータから、プレート間差等のアッセイ自体の評価、一般検体の分布、異常値の程度、コントロール検体との比較などを視覚的・総合的に把握でき、異常検体の検出を確実に行うことが可能となった。

ルーチンアッセイにおける測定間の変動についてFig. 9から11にまとめて示した。いずれも連続6アッセイにつき、一般新生児検体の平均値、標準偏差(S.D.), 最大値およびコントロール検体の動きを見たものである。PheおよびMetともに測定間でも非常に安定した結果が得られている(Fig. 9)。一方、Gal(Fig. 10)とBCA(Fig.11)については、それぞれ従来のNADH測定系と新たに導入したresorufine測定系の両方での結果を示した。両測定系を比較すると、平均値、コントロール検体の変動には大差は認められないものの、最大値については、NADH測定系における非特異ケイ光の影響のために、GalおよびBCA共

にいくつかのアッセイで、大きな違いが認められているのが分かる。

Met-lyase法はホモシスチン尿症の全く新しいマス・スクリーニング法となることから、実際の患児の新生児濾紙採血での測定結果が極めて重要となる。新生児マス・スクリーニングで見されたホモシスチン尿症患児3名の、初回および再採血時濾紙血についての測定結果をTable2に示した。BIAによるMet値、HPLCによるHSH値(HSHの濾紙血からの回収率は約50%

であるが、この補正は行っていない)も並記したが、新生児5ないし6日の初回採血時、BIAでのMetが3mg/dl程度の比較的軽度な上昇例(患児H, O)が、MFLにおいても確実に検出できることを確認できた。

4. 考 察

MFLはBIAなどのバイオアッセイに比べ、定量的な結果が得られる反面、試薬分注時のピペッティング操作の複雑さが、最大の欠点であった。今回の自動分注装置の導入により、反応試薬の分注(1min/plate)および濾紙血抽出液の分取(3min/plate)の各操作が、極めて簡便になり、ピペッティングの待ち時間に次の試薬溶液を調製するなど、余裕をもって検査を行うことができるようになった。さらに、ケイ光プレートリーダーも、従来のストリップウェルを用いるものから、リジッドタイプのマイクロプレートを用いても高感度に測定できるものへと変更したことにより、マイクロプレートの取り扱いが容易となった。

反応系の改良は、NADH測定系の場合、非特異ケイ光により偽陽性の結果となる問題が、長波長側に強度の大きいケイ光を与えるresorufine測定系とする

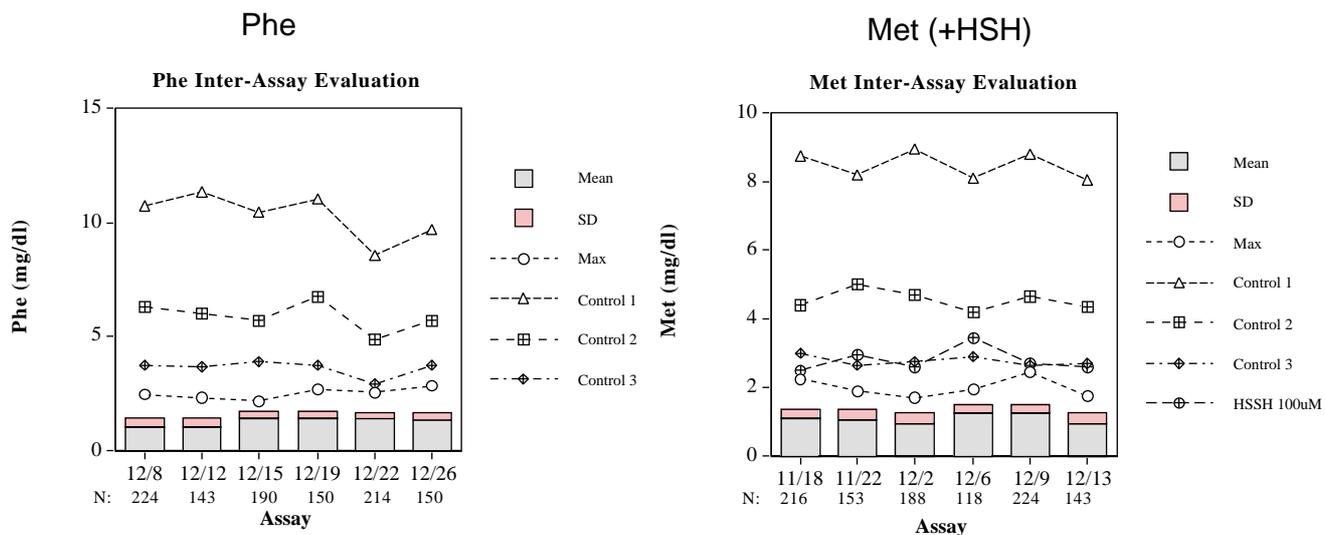


Fig. 9. Evaluation of inter-assays variations in Phe and Met assays

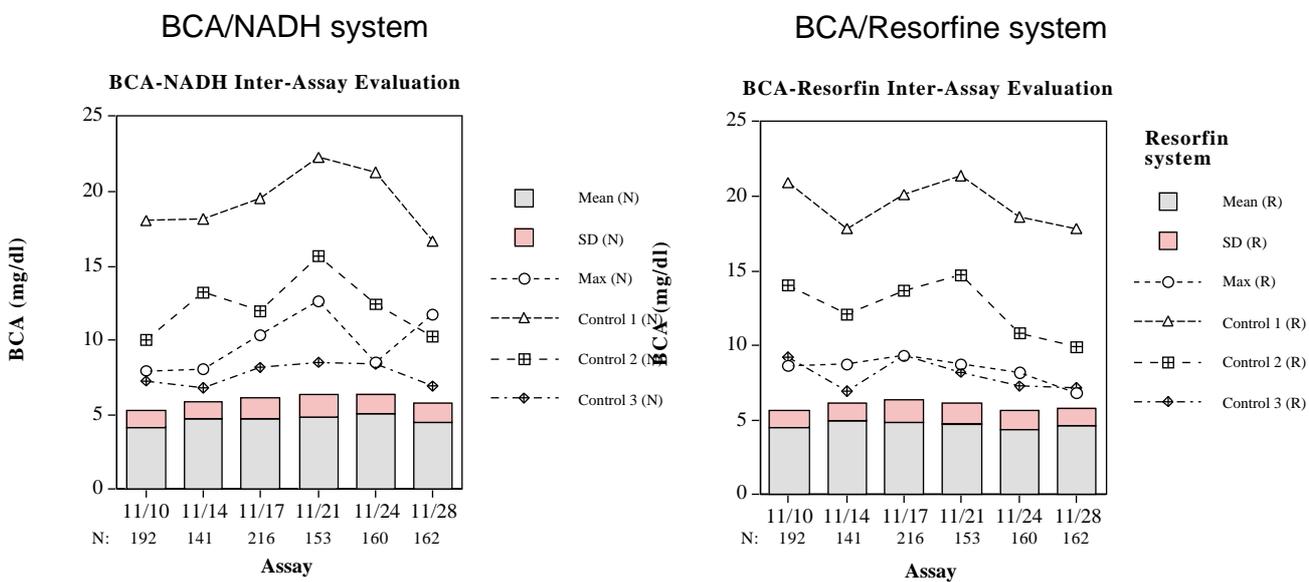
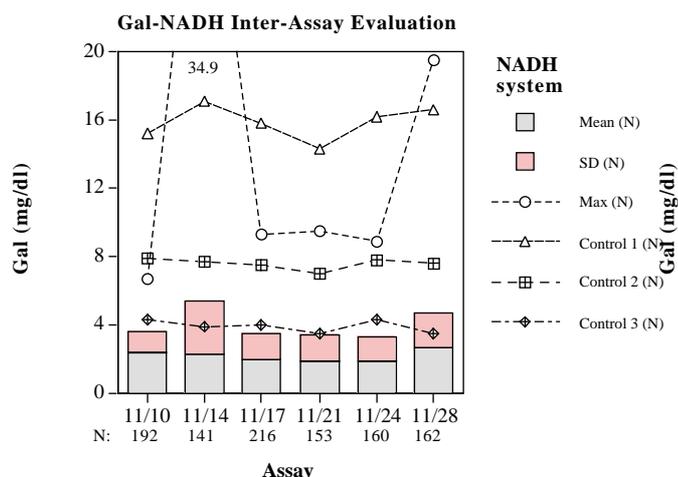


Fig. 10. Comparison of inter-assays variations for BCA assays between NADH and resorfine fluorometries

Gal/NADH system



Gal/Resorfine system

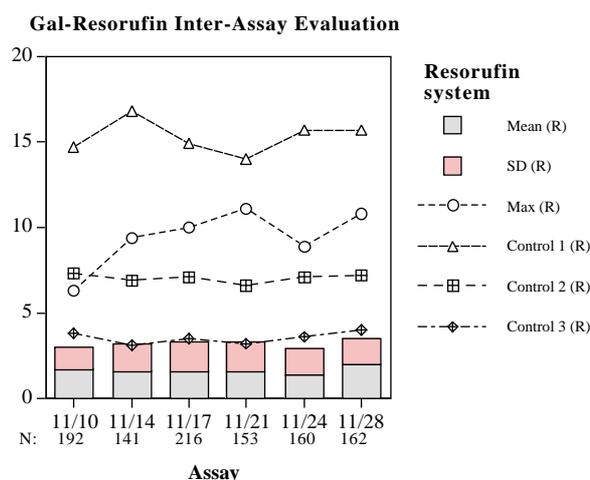


Fig. 11. Comparison of inter-assays variations for Gal assays between NADH and resorfine fluorometries

Table 2. Results of MFL for Met (plus HSH) for newborn homocystinuria

HCU Patients	Age (day)	Met (BIA)	Met+HSH (MFL)	HSH (HPLC)*
Y	5	4-8	4.4	0.30
	9	16-20	11.2	0.73
H	5	2-4	3.2	0.24
	21	12	9.8	0.48
O	6	2-4	3.4	0.36
	18	8	9.4	0.47
Normal Control	Mean±SD	(<1)	1.5±0.3	<0.01
	Range	(<2)	0.1 - 2.2	<0.05

unit: mg/dl-blood

* determined by solution standard without any correction of recovery

ことにより，感度と特異性が大きく改善された (Fig.10,11)。また，Met-lyase法は，NH₃測定系のためコンタミネーションが心配されたが，リジッドタイプのマイクロプレートを用いてプラスチックフィルムによりシーリングを完全に行うことにより，問題なく測定できることがわかった (Fig.3,9)。また，本法により，MetとHSHの総量を測定することで，より信頼性の高いホモシチン尿症のスクリーニングとなることが期待されているが，実際の患児のスクリーニング時の濾紙血液の測定結果 (Table2) から，少なくともMet 3mg/dl (BIA) 程度の患児については，確実に検出可能であることを確認できた。

5. 結 語

MFL関連機器への設備投資は，極めて高価であり，試薬コストもキットとして供給されれば，バイオアッセイに比べはるかに高価となる。しかし，代謝異常症4疾患の客観的・定量的なスクリーニングが，半日で最終判定まで可能となることによる質的向上のメリットは，これら疾患の緊急性を考慮したとき極めて大きいものと考えられる。

6. 文 献

1) Guthrie R. and Susi A.: Pediatrics, 32, 338-343,

1963.

2) Yamaguchi A., et al: Clin. Chem., 35, 1962-1964,
1989.

3) Yamaguchi A., et al: Screening, 1, 49-62, 1992.

4) 山口昭弘, 他: 札幌市衛生研究所年報, 20, 67-
74, 1993.

Advanced Microfluorometry for Newborn Metabolic Screening

Akihiro Yamaguchi, Mariko Ishibashi, Emiri Nakazawa, Osamu Arai,
Masaru Fukushi, Yasumasa Sato, Yuko Kikuchi, Harumi Ohtake^{*1}, Akie Fujimoto^{*1}, Toshiaki
Oura^{*1} and Yutaka Hase^{*2}

Advanced microfluorometry (MFL) for the measurements of phenylalanine (phe), methionine (Met) including total homocysteine (HSH), branched-chain amino acids (BCA) and galactose (Gal) in dried blood spots is developed for the newborn screening of phenylketonuria, homocystinuria, maple syrup urine disease and galactosemia, respectively, based on some modifications of reaction principles. NADH; a final enzymatic product in BCA and Gal assays is converted to resorfine by a conjugated reaction with resazurin and diaphorase. Resorfine fluorescence gives much higher intensity and emission light at longer wavelength than NADH fluorescence. This modification could eliminate a nonspecific fluorescence sometimes occurred in NADH fluorometry, then improved specificity of these assays. Concerning homocystinuria, a chemical assay for HSH alone was used previously, an enzyme methionine -lyase is adapted to measure sum of Met and HSH, and expected to detect the patients even with ambiguous increase of Met. In addition to these modifications, introducing an automated sample processor for dispensing/transferring reagents with a fluorometric microplate reader for rigid plate type, instead of strip well type, have led MFL to a much easier and more reliable screening system.

^{*1} Osaka City Environment and Public Health Association

^{*2} Osaka City Turumi Health Center