

高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸代謝異常スクリーニング

- 1. 検査法の変更にもなう基礎検討 -

田上泰子 野町祥介 花井潤師 日浦典子 水嶋好清 尾崎恒一 藤田晃三

要 旨

新生児マス・スクリーニングの検査項目における先天性アミノ酸代謝異常症 3 疾患の検査は、それぞれ指標物質であるアミノ酸を定量することによって行われている。札幌市では、2001 年 9 月からこれら 3 疾患の一次検査法を、微量ケイ光法から高速液体クロマトグラフィー法に移行した。今回、検査法の変更にもなう基礎検討を行った結果、HPLC 法は操作法が簡便で高い測定精度を有する有用な一次検査法であると考えられた。

1. 緒 言

本市における新生児マス・スクリーニングが実施され、25 年が経過した。その間、先天性アミノ酸代謝異常症 3 疾患、すなわちフェニルケトン尿症（以下 PKU と略す）、メイプルシロップ尿症（以下 MSUD）、およびホモシスチン尿症（以下 HCU）の新生児マス・スクリーニングの一次検査法は、バイオアッセイ（BIA 法）から、半自動化システムを構築した微量ケイ光法（以下、MFL 法）¹⁾を経て、現在に至っている。しかし、MFL 法は定量性よりも大量検体処理に重点をおいた方法であるため、二次検査としてより精度の高い高速液体クロマトグラフィー法（以下、HPLC 法）による確認が必要であった。一方で HPLC 法は、検体処理能力の限界からマススクリーニングへの導入には至っていないのが現状であった。

しかし、近年、新生児アミノ酸代謝異常症マス・スクリーニングの専用機として、短時間に分析可能な HPLC が各メーカーにより開発され^{2,5)}、2000 年 4 月には厚生省の通知において HPLC 法が先天性アミノ酸代謝異常症の一次検査法として認可された。

本市では、島津製作所製アミノ酸分析システムを導入し、MFL 法との比較、再現性の評価などの基

礎的検討を行い、2001 年 9 月に一次検査法を従来の MFL 法から HPLC 法に移行した。以下に、検査法の変更に関する基礎的検討についてまとめたので HPLC 法の概要とあわせて報告する。

2. 方 法

2-1 HPLC 法による分析

(1) 装置と試薬

島津アミノスクリーン・キットの試薬を用い、2 台の島津高速液体クロマトグラフ LC-VP 装置で分析を行った。それらの詳細を図 1 に示す。また、データ解析は専用の解析ソフトである島津 Class-VP を用いて行った。

(2) 測定原理

専用の逆相シリカゲルカラム上でアミノ基に対するペアーイオン法によってアミノ酸を分離し、カラム溶出後、オルトフタルアルデヒド(OPA)試薬によって蛍光誘導体に変換したアミノ化合物を検出した(励起波長 350nm, 測定波長 450nm)。本法では 1 件あたり 12 分でバリン(Val), メチオニン(Met), チロシン(Tyr), イソロイシン(Ile), ロイシン(Leu), フェニルアラニン(Phe)の 6 種のアミノ酸が定量可能である。

(3) ろ紙血液検体の前処理

1/8inch ディスクを有機溶媒により固定したのち、内部

標準物質であるノルロイシン(0.03 μg/dl)を含む移動相溶液(キットでの呼称:LS-AS)200 μl で溶出し,これを試料とした。

(4) 標準溶液

濃度既知のアミノ酸混合標準液タイプ H(和光純薬)を0.01N 塩酸で25倍希釈することで各アミノ酸濃度を100 μmol/l に調整した溶液5.0mlに,同様に0.01N 塩酸で希釈したアロイソロイシン溶液(100 μmol/l)2.5mlとノルロイシン溶液(30mg/dl)100 μl を加えたものを移動相LS-ASで100mlに定容し,標準溶液とした。なお,測定は内部標準法により行った。

2-2 再現性の検討

再現性の検討は,血球に自家製の添加試験用アミノ酸標準液を加えることで作製したコントロール

ろ紙血液を用いて行った。また,ろ紙血液からの溶出にともなう誤差を考慮して,以下の2通りの方法で検討を行った。

(1) 同一の試料(コントロールろ紙血液)を用いた方法(以下,方法1)

自家製コントロールろ紙血液を通常の検体と同様の手法で複数回測定し,測定値の安定性を評価した。

(2) 同一の溶液を用いた方法(以下,方法2)

ろ紙血液からの溶出過程における誤差を除き,分析機自体の再現性を評価するため,(1)と同様の方法で溶出した各コントロールろ紙血液由来抽出液を,いったん混合し均一な溶液を作製した上で,これを再分配して測定し,測定値の安定性を評価した。

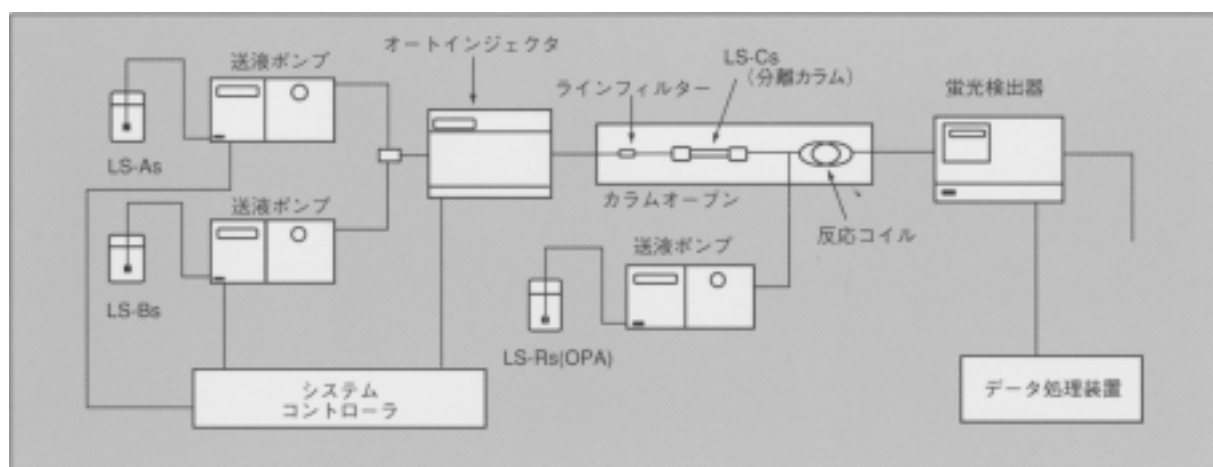


図1 島津高速液体クロマトグラフ LC-VP の装置構成

オートインジェクタ:SIL-10AVP

送液ポンプ:LC-10ADVP

システムコントローラ:SCL-10AVP

蛍光検出器:RF-10AXL

分離カラム:LC-Cs*逆相シリカゲル 4.6i, d. × 75mm

分離移動相:LS-As*(アセトニトリル, ペアードイオンを含む酸性溶液)

洗浄溶媒 LS-Bs*(メタノール, ペアードイオンを含む溶液)

反応液 LS-Rs*(OPA を含むアルカリ性緩衝液)

測定時環境: トータル流量 1.400ml/min, LS-Rs* 0.300ml/min

*上記における,LS-As,LS-Bs,LS-Rs,LC-Csの各表記は,島津アミノスクリーンキットに依った

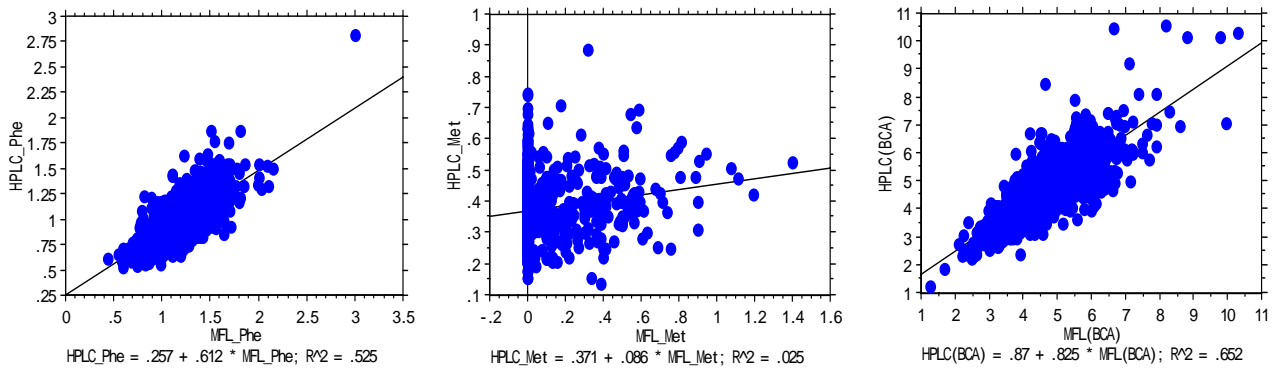


図 2. MFL/HPLC 相関図 n=1,131

表 1. 自家製コントロールろ紙血液を用いた同時再現性試験結果 (n=10)

方法 1		自家製コントロールろ紙血液 1			自家製コントロールろ紙血液 2		
項目		Phe	Leu	Met	Phe	Leu	Met
理論値(mg/dl)		1.24	1.74	0.50	2.49	3.49	1.00
分析装置 1	平均値	1.23	1.82	0.37	2.33	3.38	0.76
	標準偏差	0.09	0.12	0.02	0.06	0.08	0.02
	*CV(%)	7.1	6.6	6.1	2.4	2.4	2.7
分析装置 2	平均値	1.27	1.89	0.30	2.22	3.25	0.64
	標準偏差	0.10	0.14	0.02	0.11	0.15	0.03
	*CV(%)	7.9	7.5	6.5	4.9	4.8	4.7

方法 2		自家製コントロールろ紙血液 1			自家製コントロールろ紙血液 2		
項目		Phe	Leu	Met	Phe	Leu	Met
理論値(mg/dl)		1.24	1.74	0.50	2.49	3.49	1.00
分析装置 1	平均値	1.22	1.83	0.35	2.10	3.10	0.68
	標準偏差	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	*CV(%)	1.0	0.4	1.5	0.6	0.3	0.7
分析装置 2	平均値	1.27	1.84	0.27	2.10	3.11	0.57
	標準偏差	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
	*CV(%)	1.2	0.9	1.9	0.8	0.6	1.2

*CV : アッセイ内変動係数

3. 結果

3-1 MFL 法と HPLC 法の相関

1,131 件の新生児ろ紙血液検体を用いて行った MFL 法と HPLC 法の各アミノ酸測定値による比較検討結果を図 2 に示す。

PKU の指標である ,Phe においては HPLC 法による測定値がやや低い傾向にあるものの ,良い相関が得られた。HSU の指標である ,Met においては ,相関が認められなかった。また ,MSUD については MFL 法では Leu 単独の測定値が求められず ,分枝鎖アミノ酸 (Leu,Val,Ile) の総和のみが測定可能であるため ,この項目における HPLC 法との比較は ,3 つの分枝鎖アミノ酸(Leu , Val , Ile)の測定値の総和により行った。その結果 ,良い相関が得られた。

3-2 同時再現性 (表 1)

方法 2 により行った分析機自体の同時再現性は ,

アッセイ内変動係数 (以下 CV) が 0.3~1.9% と良好だった。一方 ,方法 1 に従い ,ろ紙の抽出から個別に処理をした場合 2.4~7.9% と高い CV を示した。

3-3 日差再現性 (表 2)

自家製コントロールろ紙血液を用いて日差再現性について検討した。その結果 ,Met で CV 7.1~12.1% , Leu で CV 4.9~8.7% , Phe で CV 4.6~7.6% であり ,Met における CV がやや高い傾向にあった。

3-4 標準液希釈試験

Phe 0.15~54 mg/dl , Leu 0.06~43 mg/dl , Met 0.08~50 mg/dl の濃度範囲で ,標準液希釈試験を行った結果 ,いずれも相関係数 $R^2=0.9998\sim0.9999$ と良好な直線性の相関を示した。

3-5 一般新生児検体を用いた測定の結果

2001 年 9 月から 2002 年 3 月までに新生児マス・スクリーニング検査を受検した 8,959 名の新生児ろ

表 2. 3 種類のコントロールろ紙血液を用いた日差再現性検討結果 n=8 (単位 mg/dl)

		分析装置 1			分析装置 2		
		Met	Leu	Phe	Met	Leu	Phe
コントロール 1	最小値	2.16	4.58	2.44	2.11	4.51	2.40
	最大値	3.58	6.78	3.58	2.75	5.87	3.13
	標準偏差	0.32	0.47	0.24	0.23	0.45	0.21
	平均	2.67	5.42	2.89	2.48	5.24	2.81
	CV	12.1	8.7	8.4	9.4	8.5	7.6
コントロール 2	最小値	4.40	9.86	5.14	4.45	9.50	4.98
	最大値	5.86	11.46	6.11	5.92	11.63	6.05
	標準偏差	0.36	0.47	0.29	0.39	0.54	0.26
	平均	5.43	10.69	5.61	5.27	10.74	5.63
	CV	6.7	4.4	5.3	7.3	5.0	4.7
コントロール 3	最小値	9.46	19.24	9.96	9.30	18.80	9.83
	最大値	12.21	22.95	11.95	12.33	22.54	11.56
	標準偏差	0.78	1.03	0.54	0.76	0.95	0.50
	平均	10.94	20.90	10.89	10.58	20.79	10.80
	CV	7.1	4.9	5.0	7.2	4.6	4.6

紙血液検体について HPLC 法での各アミノ酸値のヒストグラムを図 3 に示した。3 項目のアミノ酸の測定結果は、ほぼ正規分布を示し、各測定項目の平均値 ± 標準偏差は、Phe:1.00 ± 0.20(mg/dl) , Met:0.36 ± 0.13(mg/dl), Leu:1.66 ± 0.42(mg/dl)であった。

また、当初、本 HPLC 法によるアミノ酸代謝異常症検査のカットオフ値は、従来二次検査法として用いていた AccQ・TagHPLC アミノ酸分析⁶⁾におけるカットオフ値をそのまま使用可能か、一般新生児検体の測定値の分布に基づき検討した。その結果、MSUD の一次検査のカットオフ値を全血中 Leu 濃度 3.0mg/dl から 3.5mg/dl に変更した。他の Phe, Met のカットオフ値、それぞれ 2.5mg/dl, 1.0mg/dl については変更の必要性は認められなかった。

3-6 チロシンの取り扱い

本法の導入によって、チロシン血症の指標アミノ酸であるチロシン(Tyr)が、他の指標アミノ酸と同時に定量可能となった。本市では全血中 Tyr 濃度 15mg/dl 以上を再採血対象とした。

4. 考 察

HPLC 法と従来法(MFL)の比較において、Met の測

定値に相関が認められないが、これは MFL 法による Met 検出感度が低く、測定限界以下が多く出現するためであり、HPLC 法の導入によって低濃度域においても高精度のデータ収集が可能となった。

HPLC 法の同時再現性試験の結果は、分析機の再現性が非常に良好であることを示すと同時に、ろ紙血液を用いた検査法一般が、抽出の際に生じる誤差により再現性に限界があることを示した。そのため、コントロールろ紙血液を用いた日差再現性試験の結果も高い CV を示したと考えられる。今後も、これらの面を配慮し、内部精度管理を通じて測定精度の維持が必要であると考えられた。また、HPLC 法の同時再現性試験において、Met の回収率は約 70%と低かったが、これはクロマトグラフ上で近接する Val, Tyr のピークが Met のピークと狭雑することが一因として考えられる。このため、各検体の分析結果として得られるクロマトグラム(図 4)は、常に目視確認する必要があると考えられた。

先天性アミノ酸代謝異常症 3 疾患の新生児マスクリーニングでは、3 つの指標アミノ酸(Met, Leu, Phe)の全血中濃度を測定する必要がある。従来 MFL 法においては、各アミノ酸の測定をそれぞれ別個に行う必要があり、加えて測定の手法も煩雑であるため、週 2 回

Phe mean ± SD=1.00 ± 0.20 mg/dl

Met mean ± SD=0.36 ± 0.13 mg/dl

Leu mean ± SD=1.66 ± 0.42 mg/dl

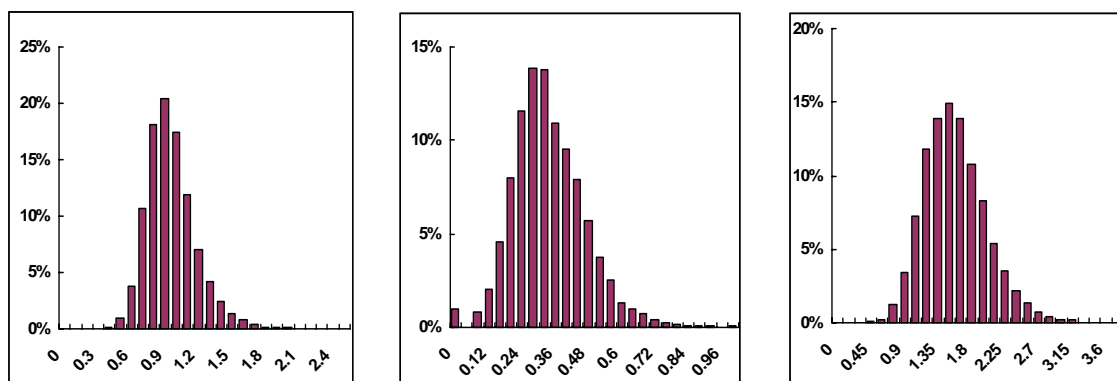


図 3. HPLC 検査結果ヒストグラム

N=8,959

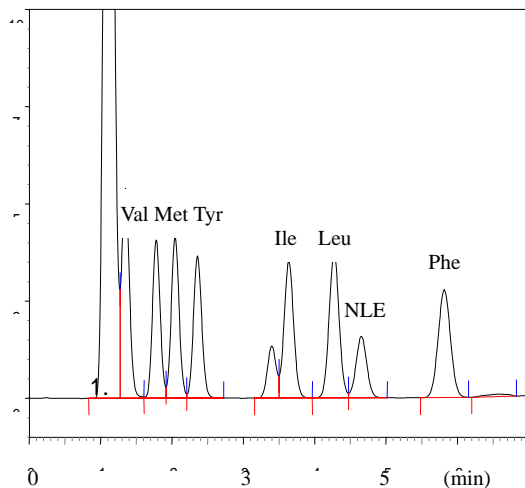


図4. 標準溶液によるクロマトグラム

のみの検査の実施にとどまっているのが実情であった。一方、HPLC法は、検体処理が簡便で、Met、Leu、Pheの3つの指標アミノ酸が同時に定量可能であり、測定も自動化されている。このため、本法を導入することで、毎日の検査の実施および異常検体に対する迅速な対応が可能となった。

また、MFL法においては、Leu単独の定量が不可能であったためMSUDの検査は分枝鎖アミノ酸の総和を測定することで行っていたこと、さらに、特にMetの測定精度が低かったことから、一次検査のみでは判別できない検体が多く、二次検査率は5.5%と高かった。しかし、HPLC法の導入によってこれは0.7%に改善され、本法の高い精度が確認された。以上のことから、HPLC法は先天性アミノ酸代謝異常症スクリーニングにおける1次検査法として、極めて有用な方法であると考えられた。

なお、本法の導入に際してチロシン(Tyr)の定量が可能となったことから、Tyr高値例の扱いについても検討した。Tyrが高値を示す先天性代謝異常疾患として、チロシン血症が存在する。しかし、その頻度は100万人に1人以下と低く、加えて一般に新生児においては全血中5mg/dl以上を示す一過性のTyr高値例が1%以上存在するため、新生児スクリーニングの一項目として実施するのは困難である⁷⁾。そこで、札幌市では全血

中Tyr濃度が15mg/dl以上を示す例についてのみ、医療機関と保護者の同意を前提に再採血を実施することとした。これまで、再採血率は0.03%である。

5. 結 語

HPLC法は操作法が簡便で同時に3つの指標アミノ酸が定量できること、また、高い測定精度を有している点で従来のMFL法より優れており、先天性アミノ酸代謝異常症スクリーニングの有用な一次検査法と考えられた。

6. 文 献

- 1) 山口昭弘, 石橋麻里子, 中澤恵美理, 他: スクリーニングにおける微量ケイ光定量法の改良, 札幌市衛生研究所年報, 19, 79-85, 1992.
- 2) 服部絹代: アミノ酸 HPLC 分析についての提案, 日本マス・スクリーニング学会技術部会第19回研修会資料集, p45-59.2000.
- 3) 大竹浩美, 酒本和也, 武井節子 他: 一次スクリーニング法としての HPLAC アミノ酸分析システムの検討, 日本マス・スクリーニング学会誌, 9(3), 65-74, 1999.
- 4) 米田豊, 九曜雅子: カラムスイッチング HPLC による乾燥ろ紙血液液中アミノ酸分析法の基礎検討と応用, 日本マス・スクリーニング学会誌, 9(3), 45-55, 1999.
- 5) 米田豊, 柴田實, 鈴木健, 他: 「アミノ酸分析 HPLAC 導入に当たっての問題点」に対する整理 日本マス・スクリーニング学会技術部会第19回研修会資料集, 41-44.2000 応用, 日本マス・スクリーニング学会誌, 9(3), 45-55, 1999.
- 6) 山口昭弘, 田上泰子, 福士勝, 他: AccQ/Tag アミノ酸 HPLC 分析先天性代謝異常スクリーニングへの応用, 日本マス・スクリーニング学会誌, 22, 66-71, 1995
- 7) 北川照男, 大和田操: チロシン血症, 新生児マススクリーニング ハンドブック, 68-77 : 成瀬浩 松田一郎編, 1989, 南江堂

Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism of Amino Acids using HPLC

1. Study on usefulness of HPLC measurement in mass screening of aminoacidopathies

Yasuko Tagami, Shosuke Nomachi, Junji Hanai, Noriko Hiura,
Yoshikiyo Mizushima, Tsuneichi Ozaki, and Kozo Fujita

In Sapporo City, mass screening for inborn errors of metabolism (IEM) has been performed by measuring amino acids quantitatively. High performance liquid chromatography (HPLC) system has been introduced in the primary test since September 2001, changing from microfluorometry (MFL).

We studied on correlation between data obtained from MFL and those from HPLC, reproducibility, and linearity of the standard solutions. All results obtained from HPLC were more reliable and precise than those from MFL. We concluded that HPLC is very useful in the primary test of mass screening for IEM.