調査研究

新生児マススクリーニングにおけるOPAポストカラムHPLC法による血液濾紙中アミノ酸の測定

丸山　励治・川畑　光政・松井　利夫

Measurement of Amino Acids in Dry Blood Paper by OPA Post-Column HPLC for the Neonatal Massscreenning

Reiji MARUYAMA, Mitsumasa KAWABATA, Toshio MATSU

新生児マススクリーニングのアミノ酸代謝異常検査に定量的なHPLC法を導入するために新生児血液濾紙検体4,389件についてパイロットスタディーを行った。血液濾紙の測定では血液の付着量などから0－10%程度の変動が認められた。また、検査結果が正常であった新生児検体の各アミノ酸濃度の平均値はPhe 0.82±0.25mg/dl、Met 0.36±0.11mg/dl、Leu 1.45±0.37mg/dlであり、いずれの濃度もガスリー法の測定下限値以下であることがわかった。HPLC法の導入は測定値を数値として管理し，異常値の判別を容易にする有効な方法であることが示された。

1　はじめに

全国規模の新生児マススクリーニング検査は昭和52年に開始され、26年が経過した。本県でもアミノ酸代謝異常症である3疾患（フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症およびホモシスチン尿症）についてBacterial Inhibition Assay（BIA、通称：ガスリー法）を用い、これまで約24万人の新生児を対象に検査を行い、7人の患者が発見されている。ガスリー法は一回に多数の検体を処理できるが、半定量法であるため判定が難しく、また毎日の精度管理も容易でない。このためこれに代わるアミノ酸定量法として高速液体クロマトグラフィー（HPLC）[1]や酵素反応[2),3)]の適用が試みられてきた。厚生省は平成12年4月付の通知で「HPLC法」と「脱水素酵素・マイクロプレート法」をアミノ酸測定法として認可した。この結果、多くの検査施設はこれら二つの検査法の導入を積極的に進め、平成14年6月の時点で、1次検査あるいは2次検査のいずれかにHPLC法を利用している施設が20施設、マイクロプレート法を利用している施設が11施設あり、これらの定量的な測定法を利用する施設は増加傾向にある。

当センターにおいても、以前からプレカラム方式の6-Amionquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbonate (AQC)誘導体化法[4]やポストカラム方式のo-Phthalaldehyde（OPA)-イオン交換系を利用したHPLCによるアミノ酸測定法を検討してきた。前者はアミノ酸と非常に安定な誘導体を形成し、さらに測定条件の調整によりアイソクラティックな系を確立することで簡便な方法であるが、検体を蛍光ラベル化するための加熱操作など検体の調製にやや煩雑な作業を要する。これに対して後者はHPLC本体のシステムがやや複雑になり、蛍光ラベル化剤であるOPAの不安定性[5),6)]が問題視されているが、検体の前処理は容易であり、ポストカラム方式 とすることによりOPAの分解などによる検出の不具合等も軽減することができる。

著者らは、多数の検体の迅速な測定が必要とされるマススクリーニングにおいて検体処理操作の簡素化は不可欠と考え、実際のスクリーニング検査にOPA-ポストカラム方式によるHPLC法が導入できるかどうかを調べるためにパイロットスタディーを行った。

2　方　　法

2．1　分析装置

HPLC本体は日本分光社製であり、ポンプはPU-2080、蛍光検出器はFP-2020を用いた。また、装置の簡略図をFig. 1に示した。

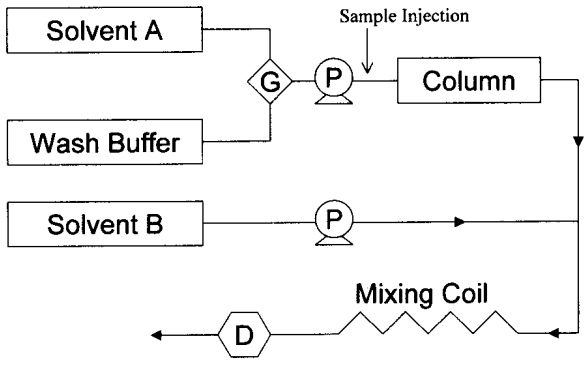

Fig. 1　OPA-post column HPLC system

Solvent A: mobile phase, Solvent B: reaction solution, D: fluorescence detector, G:gradient unit, P: pump

2．2　試薬

OPAおよび2-Mercaptoethanol（2ME）は和光純薬工業社製生化学用を、ホウ酸および水酸化ナトリウムは同社製アミノ酸分析用を用いた。また、アミノ酸標準液H型およびDL-ノルロイシン（N-Leu）を同様に和光純薬工業から購入した。標準血液濾紙Phe、Met、Leuはそれぞれ富士レビオから購入した。HPLC移動液はアミノ酸分析用移動液を日本分光から購入し、反応液および洗浄液は以下のように調整した。反応液はホウ酸12.37g、水酸化ナトリウム8.0gを蒸留水990mlに溶解した後、濾過および脱気を行い4℃で保存した。また、使用時にエタノール10mlに溶解したOPA0.5g、および2ME 2 mlを加え調製した。カラム洗浄液は水酸化ナトリウム8.0gを蒸留水1Lに溶解し調製した。オートサンプラー洗浄液はエタノールと水を1：1で混合し調製した。アミノ酸溶出液は「2.5nmol/mlノルロイシン/移動液」を調製し、4℃で保存した。アミノ酸標準液は2.5μmol/mlアミノ酸標準液H型をアミノ酸溶出液で1000倍希釈して用い、調製後は4℃で保存した。

2．3　検体の調製

96穴マイクロプレートの各セルにφ1/8 inchの血液濾紙片1枚をパンチし、アセトン-メタノール（1：1）を10μl加えた。30分間放置して溶媒を完全に蒸散させた後、アミノ酸溶出液200μlを加えてマイクロプレートをシールし、マイクロプレートミキサーにより室温で20分間振とうした。このマイクロプレートをそのままオートサンプラーにセットした。

2．4　測定条件

分析カラムはAminometaPak-EX　φ4.6mm i.d.×50 mmを用い、カラム温度60℃、移動相の流速は0.4ml/minとし、測定開始から11分までアミノ酸分析用移動液を、11−13分はカラム洗浄液を、13−16.5分はアミノ酸分析用移動液を流した。また、反応相流速は0.6ml/minとした。蛍光検出条件はEx 345nm, Em 455nmとし、試料注入量は10μlとした。なお、本装置による分析時間は1試料当たり16.5分とした。定量計算はクロマトデータ処理ソフトJasco-Borwinによりピーク高さを用いた内部標準法で行なった。

3　結　　果

3．1　アミノ酸標準液の測定

2.5nmol/mlのアミノ酸標準液を用いて、測定対象となるアミノ酸（Phe、Met、Leu）の測定を行い、その再現性を調べた。アミノ酸標準液のクロマトグラムをFig. 2に示した。測定開始から3.5分までにアンモニアや対象外のアミノ酸によると思われるピークが複数検出された後、単一のピークとして各アミノ酸がVal（3.6分）、Met（4.5分）、Ile（5.6分）、Leu（6.2分）、N-Leu（6.9分）、Tyr（7.7分）、Phe（9.2分）の順に検出された。また、同様のアミノ酸標準液を10回繰返し測定し、その再現性を調べた。その結果をTable 1に示した。3つのアミノ酸（Phe、Met、Leu）におけるピーク高さにより算出した変動係数は1.0-1.1%であり、いずれのアミノ酸においても良好な再現性が得られた。

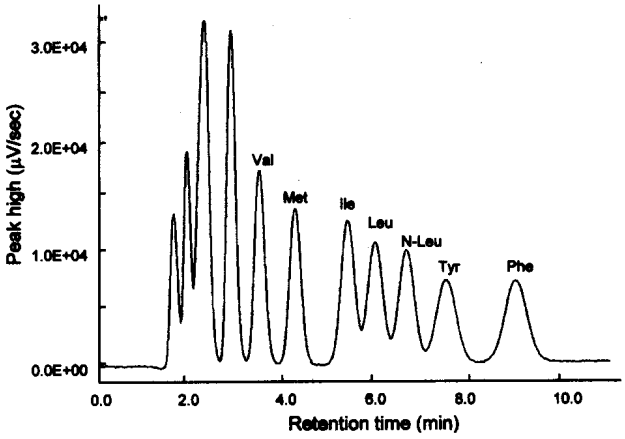

Fig. 2　Chromatogram of amino acids by standa
Val: 3.6 min, Met: 4.5 min, Ile: 5.6 min, Leu: 6.2 min, N-Leu: 6.9 min, Tyr: 7.7 min, Phe: 9.2 min.

Table 1　Reproducibilites of Assay by Amino Acid Standard Solution

Amino acid	Peak high (μV/sec)	
	Mean ± S.D. *	C.V. (%)
Phe	7776 ± 81	1.0
Met	14691 ± 155	1.1
Leu	11586 ± 115	1.0

* The values were obtained from ten assays.
Injection volume was 10 μl. Peak high were caliculated by JASCO-Borwin.

3．2　標準血液濾紙の測定

ガスリー法で用いる標準血液濾紙の繰返し測定を行い、3つのアミノ酸の再現性と溶出率を調べ、その結果をTable 2に示した。なお、ガスリー法におけるカットオフ値（Phe 4 mg/dl、Met 2 mg/dl、Leu 4 mg/dl）と同じ濃度の血液濾紙を用い、φ1/8 inch血液濾紙片1枚の血液付着量を3μlとして血液濾紙中のアミノ酸濃度を算出した。10回の繰返し測定の結果、各血液濾紙の変動係数は5.6−6.3%となり、概ね良好な結果であった。また、値の平均は、Phe 3.9mg/dl（3.62(min)−4.37(max)mg/dl）、Leu 3.6mg/dl（3.42−4.03mg/dl）、Met 2.1mg/dl（1.94−2.35）であり、Phe、Leuは表示値よりやや低く、

Table 2 Reproducibilites of Assay by Standard Blood Paper

Amino acid	Added (mg/dl)	Found Mean ± S.D. (mg/dl) *	C.V. (%)	Recovery (%)
Phe	4.0	3.9 ± 0.3	6.3	91 - 109
Met	2.0	2.1 ± 0.1	6.3	97 - 118
Leu	4.0	3.7 ± 0.2	5.6	86 - 101

* The values were obtained from ten assays.
Injection volume was 10 µl. Concentrations were calibrated by 2.5 nM amino acid standard solution.
S.D.: Standard devision. C.V.: Coefficient variation.

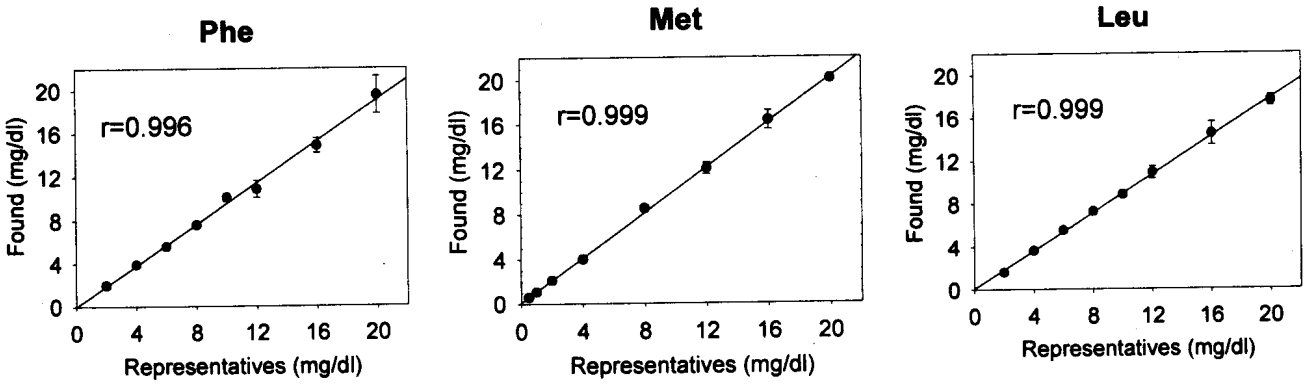

Fig. 3 Calibration curve of standard blood paper

Metはやや高い値を示した。以上のことからアミノ酸回収率はそれぞれPheが（91－109%）、Metが（97－118 %）、Leuが（86－101%）であった。

次に、先に示した測定条件に従って、標準液から求めた検量線から各濃度表示の血液濾紙中のアミノ酸濃度を推定した。この値と標準血液濾紙表示値との関係を調べた。PheおよびLeuは2－20mg/dl、Metは0.5－20mg/dlの各濃度の標準血液濾紙について測定を行い、その結果をFig. 3に示した。今回測定した濃度範囲内ではいずれのアミノ酸濃度においても0.996－0.999の相関係数が得られた。各濃度における変動係数はPheでは3.0－8.9%、Leuでは2.6－7.5%、Metでは0.2－5.2%であった。また、Leuでは全濃度で表示値よりもやや低い傾向（約11%程度）を示した。

3．3　新生児血液濾紙検体の測定

平成14年に当センターに搬入された新生児血液濾紙検体4,389検体（概ね7～12月分、年間約8500検体）について測定を行い、血液濾紙の各アミノ酸濃度の分布をFig. 4に示し、その平均値および変動係数をTable 3に示した。（なお、各アミノ酸の高値検体（Phe 2 mg/dl以上, Met 1 mg/dl以上, Leu 3 mg/dl以上）については2重測定を行い、その平均値で示した）Pheでは1 mg/dl以下の検体が80%以上であり、2 mgを超えるものは5検体（1.1%）であった。Leuは他のアミノ酸と異なり幅広い頻度分布となったが、2 mg以下が全体の90%以上を占め、3 mgを超える検体は3検体（0.7%）であった。Metにおいてはほぼすべての検体が1 mg以下となったが1検体（0.2%）が2 mg以上の高値であった。また、各アミノ酸の血中濃度分布には対数正規性が認められた。（Phe p=0.0285, Met p=0.0454, Leu p=0.0270, Kolmogrov-Smirnov Lilliefors の検定）

4　考　　察

Fig. 2のアミノ酸標準液のクロマトグラムからも明らかなようにOPAポストカラム方式のHPLCは測定対象アミノ酸の測定において再現性もよく、ピークの分離も良好であった。しかしながら、カットオフ値周辺の標準血液濾紙の測定（Table 2）においては5.6－6.3%の変動が認められ、他の濃度（0.5－8 mg/dl）の濾紙においても同程度の変

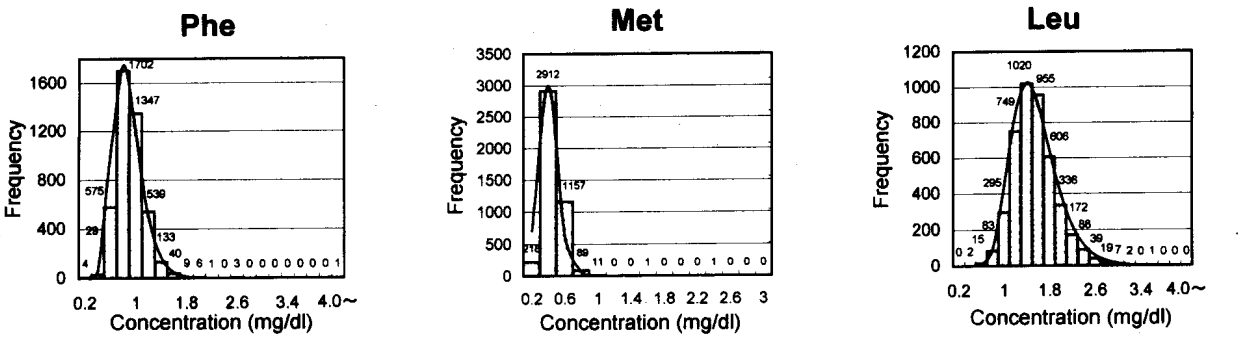

Fig. 4 Distribution of amino acids in neonatal dry blood paper

A line represented a probabilities of Log-Normal distribution. A Log-normality was examined in Kolmogrov-Smirnov Lilliefors, simulated by JMP. n = 4389.
Phe: p = 0.0285, Met: p = 0.0454, Leu: p = 0.0270.

Table 3 Assay of neonatal dry blood paper

Amino Acid	n	Concentration (mg/dl)*
Phe	4389	0.82 ± 0.25
Met	4389	0.36 ± 0.11
Leu	4389	1.45 ± 0.37

Injection volume was 10 ml. The values represent the mean ± S.D. obtained from 4389 samples. Concentrations were calibrated by 2.5 nmol/ml amino acid standard solution.

動が認められた（変動係数0.8−6.8%）。これに対して、内部標準であるN-Leuは安定したピークを与え、変動も低く抑えられていた（変動係数：1.1−2.3%）。φ1/8 inchの血液濾紙片に含まれる血液量の推定は重要であるが、微量であることも影響して2.68−3.71μlの範囲の報告があり[3),5),7)]、その付着量は血液の粘性等で必ずしも一定とはならないと考えられる。また、新生児血液濾紙の4つのスポットからそれぞれ濾紙をパンチし測定を行なった結果からは、Pheは0.9−9.4%（平均濃度0.68mg/dl, n＝10, triplicate)、Metでは0−10.9%（平均濃度0.32mg/dl, n＝9, triplicate)、Leuでは2.8−10.5%（平均濃度1.31mg/dl, n＝10, triplicate）の変動が認められており、実際に搬入されてくる新生児の乾燥血液濾紙は各スポット間でも血液の付着量が異なっていることが予想される。このことから血液濾紙中のアミノ酸濃度の測定には測定機器の精度、正確性と同時に、濾紙に付着している血液量の不均一性についても充分注意を払う必要がある。

一方、標準血液濾紙の表示値と実測値の間に違いが見られており、特にLeuの測定値は各濃度（2−20mg/dl）の測定で表示値をやや下回っており、溶出効率による影響も示唆された。

本研究により測定した新生児検体（いずれもスクリーニング結果陰性）のアミノ酸濃度の平均値および標準偏差（Table 3）は、米田ら[8)]による報告（Phe 0.86±0.18mg/dl, Met 0.31±0.10mg/dl, Leu 1.42±0.34mg/dl）と近似した値が得られた。この結果から正常な新生児の血液中のアミノ酸濃度はPheで1mg前後、Metで0.5mg前後、Leuで1.5mg前後であることが推定されるが、この濃度はいずれもガスリー法の測定下限（PheおよびLeuは2mg/dl、Metは1mg/dl）を下回る値であった。著者らはこの下限値について更に検討を行った。つまり、HPLC法により測定した検体の一部（n=918）を、ガスリー法による測定値（ルーラーによる目測）と比較した。その結果、Fig. 5に示したようにPhe 0.28、Met 0.50、Leu 0.27という相関係数が得られ、両測定値は必ずしも一致していないことがわかった。しかし、標準血液濾紙をHPLC法で測定した場合には高い相関関係が認められており（Fig. 3）、また添加回収実験においても精度管理検体の測定値は記載された添加量に近い値を示し、回収率は高い値であった（添加量Phe 3.6mg/dl, Met 1.5mg/dl, Leu 3.9mg/dl、測定値平均Phe 3.7(3.42−4.15, n＝4)mg/dl, Met 1.5(1.48−1.58, n＝4)mg/dl, Leu 3.8(3.58−4.14, n＝5)mg/dl)。高濃度範囲を考慮した場合にはガスリー法とHPLC法の相関は良いが低濃度域（つまり正常児のアミノ酸濃度）ではガスリー法との比較はできないことがわかった。逆に言えばHPLC法はガスリー法では測定できない低い濃度の検体を測定することができ、その測定値から正常値と異常値を明確に区別することができるので、偽陽性による再採血依頼数が減少し、検査を受ける新生児の負担の軽減が期待できる。更に、測定値を数値として管理できるので精度管理が容易である。本システムの欠点としては、1点検量線法により濃度の算出を行なっているため、高濃度検体では実際の含有量と異なった値を示す可能性がある。異常高値を示した検体に対してより正確な定量が求められる場合には検量方法の変更が必要である。

HPLC法のカットオフ値は新生児のアミノ酸濃度の測定値から「平均値＋2.5×標準偏差」を採用したと仮定する

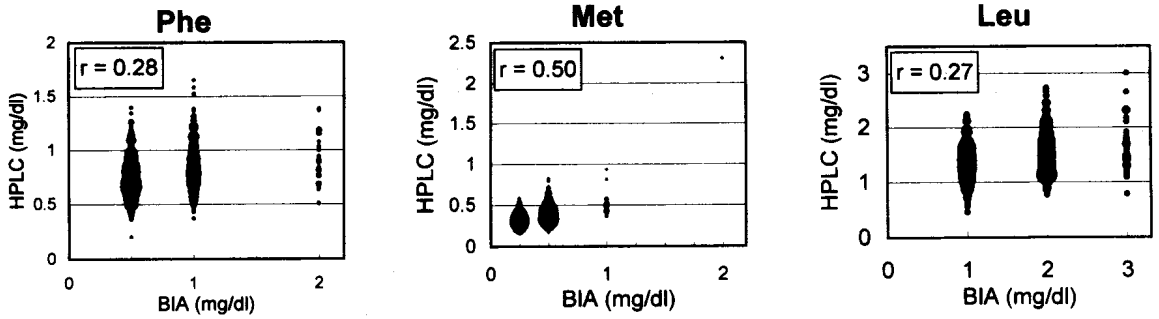

Fig. 5 Correlation amino acids values in neonatal dry blood paper between by HPLC and BIA method

n = 918. r: pearson correlation coefficient.

と、Phe 1.5mg/dl、Met 0.6mg/dl、Leu 2.4mg/dl、「平均値＋3×標準偏差」を採用したと仮定すると、Phe 1.6 mg/dl、Met 0.7mg/dl、Leu 2.6mg/dlとなる。

最後に近年は、スクリーニング対象の3疾患以外にも、高シトルリン血症のように血中アミノ酸濃度が上昇する先天性疾患[9]が見出されており、これらの疾患はマススクリーニングによって発見される例[10]もある。この場合には、間接的な影響でMetなどのアミノ酸がわずかしか上昇しないため、感度の低いガスリー法では正常と判断される。このことから、HPLC法により濾紙血中アミノ酸を定量することは先天性代謝異常のアミノ酸関連の対象疾患だけでなく、複数の疾患の発見に対しても有力な情報を提供でき、病気の早期発見、早期治療というマススクリーニング本来の目的達成に大きく貢献できるものと思われる。[11]

本研究ではアミノ酸代謝異常症マススクリーニングにHPLC法を導入するために、実際に当センターに依頼されている新生児血液濾紙検体を用いて検討を行った。OPAポストカラム方式のHPLCは新生児検体の測定において正常児のアミノ酸濃度を定量することができ、また測定値を数値として管理できる。このため、異常児を明確に区別し、再採血等の判断を容易に行なうことができるようになるので、HPLC法の導入効果は大きいと考える。

参　考　文　献

1）米田豊：新生児スクリーニングにおける高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析法の進歩，日本マス・スクリーニング学会誌，12，3，5－14（2002）

2）Yamaguchi A., Mizushima Y., Fukushi M. : Microasssay system for newborn screening for phenylketonuria, maple syrup urine disease, homocystinuria, histidinemia and galactosemia with use of fluorometric microplate reader, Screening, 1，49－62（1992）

3）山口昭弘，福士勝，清水良夫，菊池由生子，大橋雅子，成瀬浩：マイクロプレート比色法「分岐鎖アミノ酸測定試薬」によるメープルシロップ尿症のマス・スクリーニング，4，3，57－62（1994）

4）土坂孝明，松井利夫，正通寛治，杉浦正樹：先天性代謝異常症検査におけるろ紙血のアミノ酸分析の検討，福井県衛生研究所年報，38，45－52（1999）

5）Simons S. S. Jr., Johnson D. F. : The structure of the fluorescent adduct formed in the Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines, J. Am. Chem. Soc., 98, 7098－7099, （1976）

6）山口昭弘、田上泰子、福士勝、小田浩道、藤田晃三：AccQ-Tagアミノ酸HPLC分析の先天性代謝異常症スクリーニング，日本マス・スクリーニング学会誌，8，1，21－28，（1998）

7）鈴木恵美子：新生児マススクリーニングハンドブック，195－204，南江堂（1989）

8）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，9，3，43－55（1999）

9）大浦敏博：新生児マススクリーニングを契機に発見されたCitrin欠損による新生児肝内胆汁うっ帯症：9症例の臨床像の検討，日本マス・スクリーニング学会誌，11，3，23－28（2001）

10）大浦敏博：マススクリーニングを契機に発見される対象以外の疾患，日本小児科学会雑誌，105，1198－1201（2001）

11）重松陽介、平野聡子、畑郁江、藤澤和郎、中井昭夫、田中幸枝、須藤正克：タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常マススクリーニング－スクリーニング地域拡大と患者検体分析による知見の蓄積－，日本マス・スクリーニング学会誌，11，1，57－67（2001）