

報 文

先天性代謝異常症の新生児マススクリーニングを指向した
セミマイクロフローインジェクション法による血液濾紙中の
フェニルアラニン, ロイシン及びガラクトースの同時定量法

三留真珠美*, 伊藤 克敏*, 荒川 秀俊*, 前田 昌子®*

Simultaneous determination of phenylalanine, leucine and
galactose in a dried-blood disc by semi-micro FIA using
an enzyme-immobilized column and its application to
neonatal mass-screening for inborn errors of metabolism

Masumi MITOME, Katsutoshi ITO, Hidetoshi ARAKAWA and Masako MAEDA*

*School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa, Tokyo 142-8555

(Received 14 January 2000, Accepted 20 February 2000)

We have developed a simultaneous determination of phenylalanine (Phe), leucine (Leu) and galactose (Gal) by a semi-micro flow-injection analysis system using an enzyme-immobilized column. This method was applied to preliminary neonatal mass-screening for inborn errors of metabolism. Enzyme-immobilized gel was prepared with Phe, Leu or Gal dehydrogenase using a TSK-gel Tresyl 5PW (Tosoh Co., Tokyo), which was easily linked to the amino group of protein and packed into a column (1.5 i.d. × 100 mm). The enzyme-immobilized columns were connected to high-pressure 6-way valves. In the proposed method, the detection limits ($S/N = 3$) of Phe, Leu and Gal were 1.6×10^{-13} , 3.4×10^{-13} and 1.6×10^{-13} mol/assay, respectively. The measurable ranges for Phe, Leu and Gal were 0.3-19.6, 0.8-18.4 and 0.4-18.2 mg/dl on the standard dried-blood disc (3 mm i.d.) on filter paper, respectively. The accuracy of an intra-assay with each point of the standard disc ($n = 5$) was less than 2.4%. The mean recoveries ($n = 11$) of Phe, Leu and Gal from a dried-blood disc were 77.4, 78.5 and 97.4%, respectively. Further, we measured the Phe, Leu and Gal concentrations of neonatal blood-disc samples by the proposed method. The levels (mean \pm SD, $n = 30$) were 1.5 ± 2.1 (Phe), 2.4 ± 1.4 (Leu) and 2.6 ± 2.1 (Gal) mg/dl, respectively. The proposed method could quantitatively measure amino acids and galactose in one dried-blood disc on filter paper for 17 min.

Keywords : neonatal mass-screening; enzyme-immobilized column; phenylketonuria; maple syrup urine disease; galactosemia.

1 緒 言

フェニルアラニン (Phe), ロイシン (Leu), 及びガラクトース (Gal) は先天性代謝異常症であるフェニルケトン尿症 (PKU), メープルシロップ尿症 (MSUD) 及びガラクトース血症の診断の指標となる物質である。各疾患と

も代謝酵素の先天的欠損や活性低下により, 血液中の Phe, Leu 及び Gal が高値となり知能障害, 身体発育遅延などを引き起こす。しかし, いずれの疾病も新生児への早期からの食事療法により改善されるため, 新生児マススクリーニングによる早期発見が重要であり, 現在我が国では全出生児に対して血液濾紙を用いてスクリーニングが行われている。

1961年 Guthrie らは, 濾紙に血液を採取して血中 Phe

* 昭和大学薬学部薬品分析化学教室: 142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8

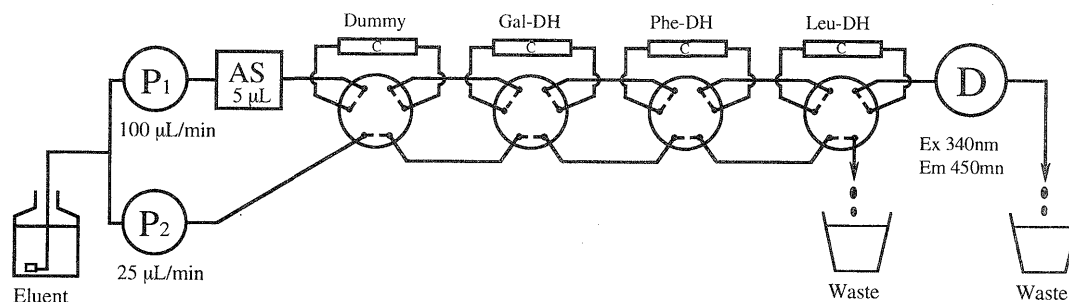


Fig. 1 Schematic diagram of semi-micro flow injection system for simultaneous determination of phenylalanine, leucine and galactose

Eluent: 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5); P₁: pump (100 µL/min); P₂: pump (25 µL/min); AS: auto sampler (5 µL/injection); D: fluorescent detector (Ex 340 nm, Em 450 nm); C: dummy column and enzyme-immobilized column; Column temperature: 37°C

量を測定する方法（ガスリー法）を確立し、PKUのスクリーニングに応用した¹⁾²⁾。ガスリー法は、枯草菌及び一定量のPhe阻害剤を含む寒天培地に血液濾紙ディスクを置き、菌の生長帯を比較し定性する細菌生長阻止法（bacterial inhibition assay, BIA）である。更に1964年、Guthrieは同様の原理を用いるLeuの定量法、大腸菌を用いるGalの定量法を報告し、MSUD及びガラクトース血症のスクリーニング法を開発した。また、1970年にはPaigenらが、大腸菌とファージを用いるGal定量のバイオアッセイを確立し³⁾、新生児マススクリーニングに応用した。

しかし、これらのバイオアッセイではいずれも時間がかかること、技術を要すること、半定量的な方法であることなど欠点も少なくない。そこで今日までに、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー⁴⁾⁵⁾、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）⁶⁾やマイクロプレート酵素法⁷⁾⁸⁾など様々な方法が確立されている。しかし新生児マススクリーニングでアミノ酸とGalを同時に定量する方法はまだ開発されていない。そこで本研究では新生児マススクリーニングへの応用を考慮し、Phe、Leu及びGalを迅速かつ簡便に定量することを目的として、それぞれの脱水素酵素（DH）を固定化した酵素カラムを用いたセミマイクロフローインジェクション分析法（FIA）による、3成分同時定量法の検討を行った。

2 実験

2.1 試薬

フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ（Phe-DH, *Bacillus badius*, EC 1.4.1.20）及び現在新生児マススクリーニングに用いられているPhe、Leu、Gal含有標準血液濾紙は札幌IDLより恵与されたものを用いた。ロイシンデヒドロゲナーゼ（Leu-DH, *Bacillus sp.*, EC 1.4.1.9）は東洋紡製を、ガラクトースデヒドロゲナーゼ（Gal-DH, *Pseudo-*

monas fluorescens, EC 1.1.1.40）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）、還元型NAD（NADH）はBoehringer Mannheim製をそれぞれ購入した。固定化酵素カラムの支持体であるTSK-gel Tressyl 5PWは東ソー製を購入した。アミノ酸及び糖類は和光純薬製及びSigma製を購入した。96穴マイクロタイタープレートはNunc製を、トランスファープレートはDynatech Laboratories製をそれぞれ購入した。

その他の試薬はすべて特級品を用いた。

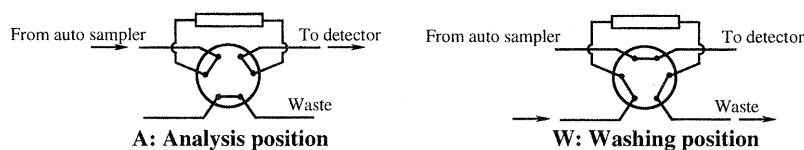
2.2 測定機器及び分析条件

測定機器は以下のものを用いた。

セミマイクロポンプ; SI-1/2001型2台、高圧切換六方バルブ; SI-1/2012型2台、オートサンプラー; SI-1/2003型、脱気装置; SI-1/2009型、カラム恒温槽; SI-1/2004型（以上、資生堂製）、蛍光検出器; FP-920型インテリジェント蛍光検出器（日本分光製）、データ処理装置; クロマトレコーダー21（システムインストルメンツ製）

Fig. 1に本研究に用いたセミマイクロFIA流路図を示す。

2台の二連高圧六方バルブに非固定化酵素カラム（ダミーカラム）、各DH固定化カラムをそれぞれ装着、連結した。移動相には0.1 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.5）を用い、測定用には100 µL/min、洗浄用には25 µL/minでそれぞれ送液した。バルブの位置は試料をカラムに導入するためのアナリシスポジション（Aポジション）及びカラムを洗浄するためのウォッシングポジション（Wポジション）とし、順次バルブを切り換えカラムに試料を導入した（Fig. 2）。すなわち、最初ダミーカラムのみAポジションの状態において、試料5 µLを注入し試料中の空試験蛍光を測定した。4.25分後ダミーカラムをWポジションに切り替え、同時にGal-DHカラムのバルブをAポジションとした。4.35分後試料5 µLを再注入し、試料中のGalから生じたNADHの蛍光（Ex 340 nm, Em 450 nm）を測定



Injection time / min	0	4.35	9.05	13.3	
Switching time / min	0	4.25	8.5	12.5	17 (0)
Dummy	A	W	W	W	A
Gal-DH	W	A	W	W	W
Phe-DH	W	W	A	W	W
Leu-DH	W	W	W	A	W

Fig. 2 Valve positions, schedule of column switching and injection time of the proposed method

A: analysis position; W: washing position

した。同様に Phe-DH カラム, Leu-DH カラムの順にバルブを切り替え試料を導入して測定を行い, 17 分後すべてのバルブは最初のポジションに戻り, 次の試料の測定に移るようプログラムを設定した。

得られたクロマトグラムで, 各 DH 固定化カラムより得られたピーク面積から, ダミーカラムより得られたピーク面積を差し引くことにより, それぞれの蛍光強度を計算した。一連の操作は全自動で行い試料量 20 μl , 分析時間 17 分で 3 成分を同時に定量することが可能であった。

2.3 固定化酵素カラムの調製

TSK-gel Tressyl 5PW 0.125 g (0.5 ml) を 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 3 ml に懸濁し, 酵素溶液を加え, 4°C で一晩かくはんした。遠心し上澄みを除去後, 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) 5 ml を加え, 室温で 60 分間かくはんし, 過剰の活性基のブロッキングを行った。更に 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) 5 ml で洗浄し, 同様の緩衝液 5 ml で懸濁させ, 充填時まで 4°C で保存した。調製したゲル 0.0625 g (0.25 ml) を, ステンレスカラム (1.5 i.d. \times 100 mm) に流量 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ で充填した。

酵素は Gal-DH 12.5U, Phe-DH 200U, Leu-DH 200U を使い, それぞれ 3 種のカラムを調製した。また, 空試験蛍光を測定するためのダミーカラムは, 酵素溶液を用いず同様の方法で調製した。

2.4 血液滲紙前処理法

96 穴マイクロタイタープレート上にトランスファープレート置き, 直径 3 mm の血液滲紙ディスクを 1 枚ずつ入れた。血色素の固定は Fujimura の方法⁹⁾に準じて行った。すなわち血色素固定液 (水: アセトン: メタノール,

30 : 35 : 35 混合液) 25 μl を各ウェルにそれぞれ加え, 37°C で 30 分放置して血色素を固定した。減圧乾燥後, 試料溶出液 [20 mM NAD^+ 含有 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)] を 50 μl ずつ加え, 室温で 60 分かくはんし Phe, Leu 及び Gal を溶出させた。次いで 2000 rpm で 5 分間遠心することにより, 血液滲紙ディスクのみトランスファープレート上に残し, マイクロタイタープレート上の溶出液を試料として測定に供した。

3 結果及び考察

3.1 固定化酵素カラムの調製

2.3 の方法で調製した Phe-DH 固定化カラムにおいて, 固定化直後の Phe から NADH への変換率は, 固定化酵素カラムにより Phe から変換された NADH 量と, 等モル量の NADH とを比較する方法で測定したところほぼ 100% であった。Phe-DH 固定化カラムは 37°C で注入回数で少なくとも 600 回以上, 使用期間で 1 年以上経ても NADH への変換率は 80% 以上を保ち良好に測定可能であった。

また, Leu-DH 固定化カラムは NADH に対する親和性が高く, ピークの形状がブロードであったため, 充填後 0.1% 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 溶液を流量 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 5 分間送液し, 酵素変性処理を行ってから使用した。この操作によりピークの形状は良好となった。同様に Leu-DH の固定化直後のカラムの Leu から NADH への変換率は 80% 程度であった。

一方, 溶液の状態においても Gal-DH は比活性が 5 U/mg と低く, また 6 か月で約 10% 活性が低下することが知られている。調製した Gal-DH の固定化直後のカラムでは 70% 程度の変換率であった。

同様に Leu-DH 及び Gal-DH 固定化カラムの変換率は

徐々に低下したが、注入回数は400から500回、使用期間は3~4か月であった。また、変換率が30%以下まで低下したとき、測定不適と判断し新たなカラムに交換することとした。

3.2 標準溶液を用いる至適条件の検討

本測定法を最適化するために、試料溶出液中の NAD^+ 濃度、溶離液及び試料溶出液のpHの検討を行った。なお、カラム温度は 37°C 、測定用溶離液の流量は $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ に固定し検討した。

最初に基質となる試料溶出液中の補酵素 NAD^+ 濃度の検討を行ったところ、Phe、Galは $20\ \text{mM}$ まではピーク面積が増加したが、それ以降はほとんど変化が認められなかった。Leuは $40\ \text{mM}$ まで徐々にピーク面積が増加したが、実際の測定には $20\ \text{mM}$ で十分であった。したがって、以下の実験では $20\ \text{mM}$ NAD^+ を使用することとした (Fig. 3)。

次に溶離液及び試料溶出液のpHの検討を行った。 $2.5 \times 10^{-5}\ \text{M}$ 及び $1.25 \times 10^{-5}\ \text{M}$ のPhe、Leu及びGal標準溶液を用い検討を行ったところ、最適pHは酵素により異なり、pHの上昇に伴い空試験値が上昇することが観察された (Fig. 4)。Phe-DH、Leu-DH共に固定化しない状態で測定するとき、最適pHはそれぞれpH 10.3と11である。しかし本法における最適pHはそれぞれpH 8.0、8.5であり、最適pHは共に酸性側への傾きが観察された。また、Gal-DH固定化カラムはpH 9.5までpHの上昇に伴い、ピーク面積も増加した。固定化しない状態で測定するとき、Gal-DHの最適pHはpH 8.0~9.0であり、本法ではアルカリ性側へ傾いた。

3.1で述べたように、Leu-DH及びGal-DH固定化カ

ラムの NADH への変換率はそれぞれ80%、70%程度であったため感度の低下が考えられる。以上の理由と空試験値の影響を考えpH 8.5を最適とした。

最適条件下において各成分の標準溶液を用い検量線を作成した。3成分共に $1.6 \times 10^{-11} \sim 5.0 \times 10^{-10}\ \text{mol}/\text{assay}$ で直線性を示し、その相関係数はPhe、Leu、Galそれぞれ0.999、0.999、1.000と良好であった。またそれぞれの最小検出感度 ($S/N = 3$) はGal、Pheで $1.9 \times 10^{-13}\ \text{mol}/\text{assay}$ 、Leuでは $3.4 \times 10^{-13}\ \text{mol}/\text{assay}$ であった。FIAによる分岐鎖アミノ酸の定量法がKibaらにより既に報告され

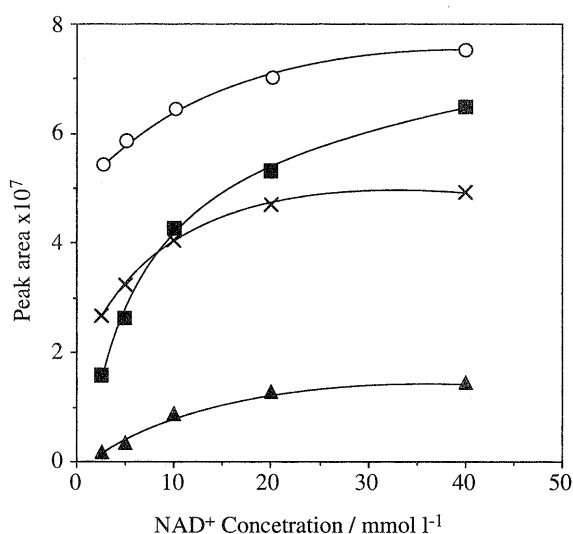


Fig. 3 Effect of NAD^+ concentration on the reactivities of phenylalanine, leucine and galactose dehydrogenase immobilized column

○: phenylalanine ($1.25 \times 10^{-5}\ \text{M}$); ■: leucine ($1.25 \times 10^{-5}\ \text{M}$); ×: galactose ($1.25 \times 10^{-5}\ \text{M}$); ▲: blank

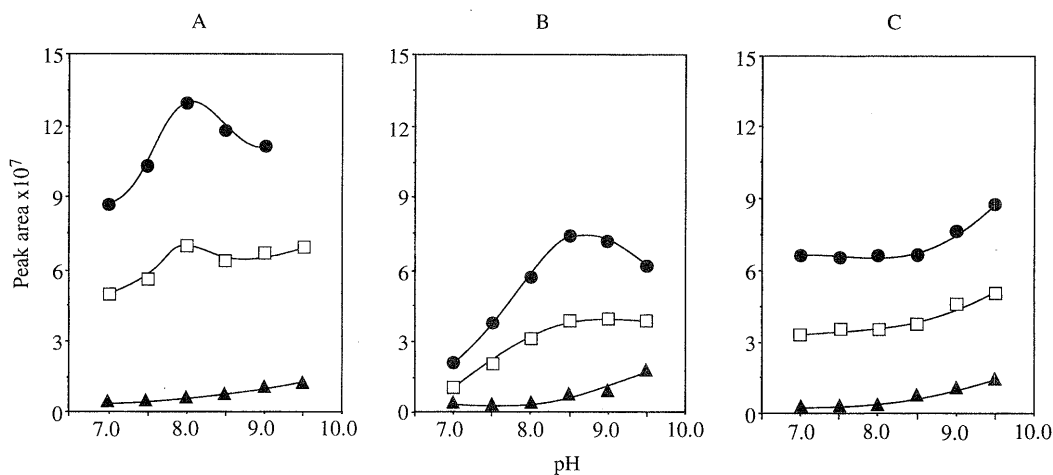


Fig. 4 Effect of pH for eluent and sample elution buffer on reactivities of phenylalanine (A), leucine (B) and galactose (C) dehydrogenase immobilized column

●: $2.5 \times 10^{-5}\ \text{M}$; □: $1.25 \times 10^{-5}\ \text{M}$; ▲: blank

Table 1 Cross reactivities of phenylalanine, leucine and galactose dehydrogenase immobilized column for the proposed method

L-Amino acid	Phe-DH	Leu-DH	Carbohydrate	Gal-DH
Phe	100.0	<0.1	D-Gal	100.0
Leu	8.5	100.0	L-Gal	<0.1
Ile	8.4	106.0	D-Glc	<0.1
Val	8.0	105.5	D-Fuc	71.5
Tyr	4.4	6.0	L-Fuc	0.1
Gly	<0.1	<0.1	D-Ara	<0.1
Ala	<0.1	<0.1	L-Ara	52.5
Ser	<0.1	0.1	D-Xyl	0.1
Thr	<0.1	0.2	D-Fru	<0.1
Glu	<0.1	<0.1	D-Rib	<0.1
Asp	<0.1	<0.1	GlcUA	<0.1
Arg	<0.1	<0.1	D-GalUA	<0.1
Lys	<0.1	<0.1	D-GlcN	<0.1
Met	0.9	1.2	GlcNAc	<0.1
Cys	0.1	1.4	GalNAc	<0.1
His	<0.1	<0.1	D-Gal-6-P	0.2
Trp	0.2	0.1		
Pro	<0.1	0.1		
Hyp	<0.1	<0.1		

reactivity (%)

reactivity (%)

ており⁹⁾¹⁰⁾, 標準血清の測定に応用されている. 本法は注入量当たりで Kiba らの蛍光検出法⁹⁾より 200 倍以上, 化学発光検出法¹⁰⁾より約 20 倍高感度であった.

3.3 交差反応性試験

各種アミノ酸溶液及び糖溶液を用い各固定化酵素カラムの交差反応性を検討した (Table 1). Phe-DH は L-Leu, L-Ile, L-Val にそれぞれ 8% 程度, L-Tyr に 4% 程度の交差反応性を示した. 固定化していない Phe-DH の特異性は L-Leu 及び L-Ile に 0.3%, L-Val に 0.4% の交差反応性を示しているのと比較して, 傾向は類似しているが若干の高値化傾向にあった. 一般に PKU では Phe の血中濃度は上昇し, Tyr の血中濃度は正常値より低下する傾向がある. したがって, スクリーニングを行う上で擬陽性が出現する危険性は少ないと思われる. また, 血中 Tyr 濃度が異常高値の場合, 本法により PKU 擬陽性となる可能性が考えられる. しかし血中 Tyr が高値となる一過性新生児高 Tyr 血症や遺伝性 Tyr 血症は, PKU と同様に新生児代謝異常症であるため, スクリーニングの後に精査が必要であると考えられ, 本法の有用性を否定するものではない.

一方, Leu-DH は L-Ile, L-Val に L-Leu と同等の, L-Tyr に 6% 程度の交差反応性を示した. MSUD では L-Leu だけでなく他の分岐鎖アミノ酸である L-Ile, L-Val の血中濃度も上昇することが知られているため, この傾向はスクリーニングの際に有用であると考えられた. また, 固定化を行っていない Leu-DH の特異性は L-Ile に 74%, L-Val に 58% の交差反応性を示し, Phe-DH 同様傾向は類似しているが若干の高値化傾向にあった.

また, Gal-DH は D-フコースに 71.5%, L-アラビノースに 52.5% の交差反応性を示した. しかし, D-フコース及び L-アラビノースは血中にはほとんど存在しないため実際の測定では問題ないと考えられた. 固定化を行っていない Gal-DH においては D-フコースに 105%, L-アラビノースに 47%, ガラクトサミンに 2% であり, ほぼ同様の結果が得られた.

3.4 標準血液滌紙ディスクにおける測定条件の検討

本報告では新生児マススクリーニングへの応用を考慮し, 血液滌紙ディスクでの測定を行うことを目的とした. 一般に直径 3 mm の血液滌紙ディスク 1 枚中には約 3 μ l の血液が含まれていることが知られている¹¹⁾. 血液滌紙ディスク 1 枚を 50 μ l の試料溶出液で溶出させ, この 5 μ l を測定に用いたとき, 現在新生児マススクリーニングで使用されている各成分のカットオフ値 (Phe: 4, Leu: 4, Gal: 8 mg/dl) は, Phe, Leu, Gal それぞれ 7.26×10^{-11} , 9.15×10^{-11} , 1.33×10^{-10} mol/assay と概算される. したがって, 本法は 3.2 で述べた結果から分かるように, 血液滌紙ディスク 1 枚からのこれら 3 成分の測定が可能であると判断した. そこで本法を血液滌紙ディスク中の測定に応用するために, 血液滌紙ディスクの色素固定時間及び溶出時間の検討を行った.

色素の固定を行わずに抽出し測定した試料は, 色素が溶出し溶出液は赤色を発生し, 空試験値も高く測定不能であった. そこで内因性の蛍光物質を除去するために色素固定の検討を行った. 色素固定液を加え 37°C で 5 分から 120 分間まで変化させ色素を固定し, 室温で 60 分

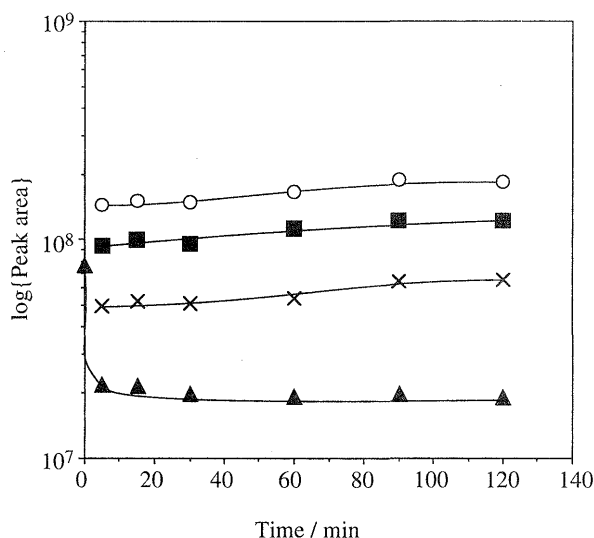


Fig. 5 Effect of immobilization time on peak area from dried blood disc by the proposed method

○: phenylalanine (12 mg/dl); ■: leucine (12 mg/dl); ×: galactose (12 mg/dl); ▲: blank

間抽出した試料の測定を行ったところ、固定時間 15 分以上で溶出液は無色になった。Fig. 5 に示すように固定時間 30 分から空試験蛍光の減少は認められなかった。したがって、最適固定時間を 30 分とした。なお、血色素を固定することによる 3 成分の定量値への影響は見られなかった。

更に血色素固定時間を 37°C, 30 分とし、溶出時間の検討を行った。血色素固定後、試料溶出液を加え、室温でかくはんし溶出時間を 5 分から 120 分まで変化させた。溶出時間は 5 分後からほぼ一定のピーク面積を示したが、短時間ではデータにばらつきが生じたため、最適溶出時間は 60 分とした。

最適条件下で標準血液濾紙を用いて検量線を作成した。Phe は 0.3~19.6 mg/dl, Leu は 0.8~18.4 mg/dl, Gal は 0.4~18.2 mg/dl の標準血液濾紙を用いたときそれぞれ直線性を示し、その相関係数は Phe, Leu, Gal それぞれ 0.999, 0.995, 0.994 であった。また日内変動は Phe は 0.7~2.3%, Leu は 1.0~2.2%, Gal は 0.4~2.4% ($n = 5$) と良好であった。

本法により得られた典型的なクロマトグラムを Fig. 6

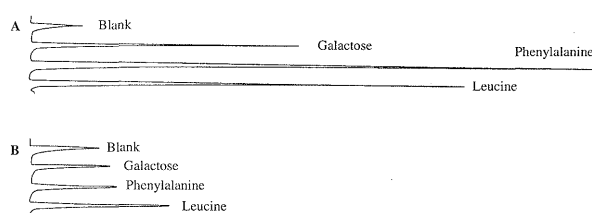


Fig. 6 Chromatograms of a standard dried blood disc (A) and a dried blood disc of normal adult sample (B) by the proposed method

Phenylalanine, leucine and galactose were contained 19.6, 18.4 and 18.2 mg/dl in standard dried blood disc, respectively.

に示す。A は Phe を 19.6 mg/dl, Leu を 18.4 mg/dl, Gal を 18.2 mg/dl 含む標準血液濾紙ディスク, B は健康人成人血液より調製した血液濾紙ディスクより得られたクロマトグラムである。各 DH 固定化カラムより得られたピーク面積から、ダミーカラムより得られたピーク面積を差し引くことによりそれぞれの蛍光強度を得、別に作成した検量線から読み取ることにより定量を行った。

また、ヒト成人血液を用いて添加回収試験を行った。ヘパリン採血した血液にリン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶解した Phe, Leu 及び Gal を 0~20 mg/dl となるようにそれぞれ添加した。調製した血液を 50 μ l ずつ代謝異常検査用採血濾紙に滴下し一晩室温で乾燥させた後、直径 3 mm の血液濾紙ディスク 1 個を用い本法により測定した。平均添加回収率 (mean \pm SD, $n = 11$) は Phe, Leu, Gal それぞれ 77.4 \pm 17.5, 78.5 \pm 18.0, 97.4 \pm 20.7% であった。

3.5 実試料の定量

(財)東京都予防医学協会より恵与された正常新生児血液濾紙 30 検体の測定結果を Table 2 に示す。Phe, Leu, Gal の平均血中濃度 (mean \pm SD) はそれぞれ 1.5 \pm 0.9, 2.4 \pm 1.4, 2.6 \pm 2.1 mg/dl であった。得られた値について統計学的検定を行ったところ、Phe 及び Leu はオルトフタルアルデヒドポストカラム蛍光検出 HPLC によるアミノ酸分析法と比較し有意差 ($p > 0.05$) が認められた。Leu の値については今回使用した Leu-DH 固定化カラムの、他の分岐鎖アミノ酸に対する交差反応性によるものと

Table 2 Comparison of phenylalanine, leucine and galactose levels on neonatal dried blood disc samples by the proposed method and conventional method

	Phenylalanine	Leucine	Galactose
Proposed method/mg dl ⁻¹	1.5 \pm 0.9	2.4 \pm 1.4	2.6 \pm 2.1
Conventional method/mg dl ⁻¹	0.7 \pm 0.2 ^{a)}	1.2 \pm 0.3 ^{b)}	1.9 \pm 1.0 ^{b)}

a) amino acid analysis; b) enzymatic analysis

mean \pm SD ($n = 30$)

思われた。同様に Phe の値についても今回使用した Phe-DH 固定化カラムの分岐鎖アミノ酸や L-Tyr への交差反応性によるものと考えられた。また, Gal については酵素法 (エンザプレート GAL-R キット, バイエルメディカル製) と比較して有意差は認められなかった。

新生児マススクリーニングへの応用を目的として, 固定化酵素カラムを組み合わせたセミマイクロ FIA による Phe, Leu 及び Gal の同時定量法の検討を行った。

本法における Phe, Leu, Gal の検量域は共に $1.6 \times 10^{-11} \sim 5.0 \times 10^{-10}$ mol/assay であり, それぞれの最小検出感度 ($S/N=3$) は Phe, Gal で 1.6×10^{-13} mol/assay, Leu では 3.4×10^{-13} mol/assay であった。

また, 本法を血液濾紙ディスクの測定に応用したところ, 血液濾紙ディスク 1 枚から測定時間 17 分で 3 成分同時定量が可能であった。それぞれの検量域は, Phe は 0.3 ~ 19.6, Leu は 0.8 ~ 18.4, Gal は 0.4 ~ 18.2 mg/dl であり, 現在新生児マススクリーニングで用いられているカットオフ値をいずれも十分カバーした。

更に本法を正常新生児血液濾紙ディスクサンプル ($n=30$) の測定に応用したところ, Phe, Leu 及び Gal の平均血中濃度 (mean \pm SD) はそれぞれ 1.5 ± 0.9 , 2.4 ± 1.4 , 2.6 ± 2.1 mg/dl であった。

新生児血液濾紙サンプル及び代謝異常検査用採血濾紙の恵与並びに御指導, 御助言をいただいた, (財) 東京都予防医学協会の松本 勝氏に深く感謝致します。また標準血液濾紙ディスク及び Phe-DH を恵与いただいた札幌 IDL(株) の中村健治氏に深謝します。また, 本研究の一部は文部省科学研究費補助金奨励研究 A (11770203) によるものである。

文 献

- 1) Guthrie R: *J. Amer. Med. Assoc.*, **178**, 863 (1961).
- 2) Guthrie R, Susi A: *Pediatrics*, **32**, 338 (1963).
- 3) Paigen K, PachoLec F, Levy HL: *J. Lab. Clin. Med.*, **99**, 895 (1982).
- 4) 一色 玄, 藤本昭栄: “新生児マススクリーニングハンドブック”, 成瀬 浩, 松田一郎編, p. 205 (1989), (南江堂).
- 5) 藤本昭栄: “新生児マススクリーニングハンドブック”, 成瀬 浩, 松田一郎編, p. 254 (1989), (南江堂).
- 6) 鈴木 健, 市原 侃: 日本マス・スクリーニング学会誌, **8**, 58 (1998).
- 7) 山口昭弘, 福士 勝, 菊池由生子, 藤井 正, 中村健治: 医学と薬学, **37**, 1211 (1997).
- 8) Y. Fujimura: “*Methods of enzymatic analysis 3rd ed.*”, Edited by H. U. Bergmyer, vol 6, p. 288 (1984), (Verlag Chemie, Weinheim).
- 9) N. Kiba, S. Hori, M. Furusawa: *Anal. Chim. Acta*, **218**, 161 (1989).
- 10) N. Kiba, A. Kato, M. Furusawa: *Anal. Chim. Acta*, **311**, 71 (1995).
- 11) 鈴木恵美子: “新生児マススクリーニングハンドブック”, 成瀬 浩, 松田一郎編, p. 198 (1989), (南江堂).

要 旨

先天性代謝異常症であるフェニルケトン尿症, メイプルシロップ尿症及びガラクトース血症の診断の指標となる血液中フェニルアラニン (Phe), ロイシン (Leu) 及びガラクトース (Gal) を迅速かつ簡便に定量することを目的として, 固定化酵素カラムを用いるセミマイクロ FIA による 3 成分同時定量法の検討を行った。本法は試料量 20 μ l, 分析時間 17 分間で 3 成分同時に定量可能であった。本法を先天性代謝異常症スクリーニング用血液濾紙ディスクの測定に応用したところ, それぞれの検量域は 0.3 ~ 19.6 (Phe), 0.8 ~ 18.4 (Leu), 0.4 ~ 18.2 (Gal) mg/dl であり, 現在マススクリーニングで行われているカットオフレベルを十分カバーできた。日内変動は標準血液濾紙の各ポイントにおいていずれも 2.4% (RSD, $n=5$) 以下と良好であった。また, ヒト成人血液を用いて調製した血液濾紙からの平均添加回収率は Phe, Leu, Gal それぞれ, 77.4, 78.5, 97.4% ($n=11$) であった。本法を用い正常新生児血液濾紙の測定を行ったところ, その平均血中濃度 ($n=30$) はそれぞれ 1.5 (Phe), 2.4 (Leu), 2.6 (Gal) mg/dl であった。