

# 先天性アミノ酸代謝異常児血液の薄層クロマトグラフィーによる検査法に関する研究

渡 辺 周 一

(家政学科・食物栄養)

## I. はじめに

先天性代謝異常は遺伝的な原因により、酵素の異常が生じ、そのために体内の代謝の異常を示す状態で、今世紀初頭Garrod (1908) は、アルカプトン尿症という家族性の疾患について観察し、先天性代謝異常の概念を、ある種の疾患は一つの代謝過程に参与する酵素の活性が欠損しているか、著しく低下することによりおこると考えた。この考えをさらに発展させたのはBeadle (1945) で、彼の一遺伝子一酵素説 (one gene one enzyme theory) が、現在の先天性代謝異常に対する考え方の基礎になっている。すなわち、すべての酵素の働きは遺伝子により規定され、その異常により対応する酵素蛋白の異常→酵素活性の低下、欠損がおこるというものである。<sup>1)2)</sup>

現在数多くの先天性代謝異常が知られているが、人体に及ぼす影響もさまざまである。ある種のものとは全く無害なものもあるが、その一部ものは脳の代謝を障害し、そのために脳発達が障害され、精神発達障害、けいれん、その他神経系の症状をひきおこすものである。このような代謝異常による精神薄弱の種類も多く、今まで原因不明の精神薄弱とされたものが、代謝異常によると判明したものも多い。脂質の代謝障害、アミノ酸の代謝障害、炭水化物の代謝障害等々の各種の代謝の障害により精神薄弱が発生しうるもので<sup>1)</sup>、このような代謝異常による精神薄弱の一部が、科学の発達に伴い、治療可能であることがわかり、その早期発見が必要となってきた。

先天性アミノ酸代謝異常については10種余が発見されている。<sup>3)4)5)</sup> このうちフェニールケトン尿症は10数年以上前から、尿による早期発見

が行われているため、病名は広く知られていると思われるが、1957年、カリフォルニア州で、尿による早期発見が実施された。<sup>1)</sup>本症はフェニールアラニンをチロジンに代謝するフェニールアラニン水酸化酵素が欠損しているために、フェニールアラニンはチロジンに分解されず、血中に上昇し、その一部はフェニールピルビン酸になって尿中に排泄される。すなわちフェニールアラニンの異常増加が2～12週間くらいつづくと、尿中にフェニールピルビン酸、その他のフェニールケトン体が排泄される。これを第二塩化鉄と反応させると、特別な色調を示す。<sup>1)6)</sup>そこでこの試薬を乳児のおむつにたらし、特別な色が出るかどうかをテストするという方法が考案され、一般乳児より、フェニールケトン尿症を探すマス・スクリーニングが行われた。この方法は、わが国でも1965年頃行政の場で、保健所あるいは助産婦により実施された。しかし尿によるスクリーニングでは、患者の $\frac{1}{2}$ あるいはそれ以上は、どうしても発見もれになることが明になり、尿によるスクリーニングにかわって、ガスリー法が行われるようになった。ガスリー法は細菌成長阻止法 (Bacterial Inhibition Assay)<sup>1)7)</sup>といわれるもので、枯草菌を用いて、菌がフェニールアラニンを利用するのを阻止するような阻止剤を培地に入れる。すると菌がフェニールアラニンを利用できないために、発育増殖しない。しかし、これにフェニールアラニンが加えられると、菌は阻害剤があっても外部から加えられたフェニールアラニンを利用して増殖する。菌の増殖は加えられたアミノ酸に比例するので、菌の発育域の大きさを知れば検体中のアミノ酸量を推定するというものである。

わが国では1977年から、母子保健行政に新し

く先天性代謝異常の早期発見のためにガスリー法の実施という項目が加わった。先天性代謝異常による精神薄弱の中で早期治療の効果のあるものを早期に発見するためのもので、フェニールケトン尿症、楓糖尿症、ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症、ガラクトース血症（炭水化物代謝異常）の5つの先天代謝異常について実施されることになった。1979年には先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）に対し、Radioimmunoassay法による血中甲状腺刺激ホルモン測定法がおこなわれるようになった。このように早期新生児よりごく微量の血液を乾燥濾紙に採取し、検査が行なわれるようになった。

1981年全国の検査実施状況<sup>8)</sup>は出生数1,525,641人、受診者数1,477,630人（実施率96.9%）、患者298人であり、上記5疾患平均では出生1万対2の割合で患者が発見されていることになる。

このような状況下で先天性代謝異常のマス・スクリーニングによる早期発見はつぎの点で重要である。すなわち先天性代謝異常のうちには、その代謝の過程における異常代謝物質により脳（知能）の障害を来すものが多く、この場合早期診断によって精神の荒廃を来す以前に特定の治療食餌や薬物を与えることによって、これを予防し治療が出来るものが多い。このための検査法としてのガスリー法ではかなりの設備や手技を必要とするので、一般病院の臨床検査あるいは行政試験としては実施し難いのみでなく、抗生物質の被投与歴をもつ新生児では発育円を認めないことがあるため陽性者を見おとす危険性をもっている。先天性アミノ酸代謝異常はその発生率が1万人につき、なん人という低率であるので、スクリーニングによって見おとされる危険性を防止するための検査手法を確立することは、きわめて重要な問題である。先天性アミノ酸代謝異常児の発見には、血液中のアミノ酸を定量することがその基本的操作であり、たとえばアミノ酸分析計を用いる機器分析も通用し得るが、機器の操作の繁雑さおよび所要時間の長いことなどから、スクリーニングとしては用いられない。又ペーパークロマトグラフィーによる血液の検査<sup>9)10)</sup>では血液の前処理、ある

いは二次展開など複雑な処理が要求される。そこで、フェニールケトン尿症、楓糖尿症、ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症の4症の検査のため簡便で確実な方法を開発する目的で、これらの患者血中に増量するアミノ酸（フェニールアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、バリン、ヒスチジン）を薄層クロマトグラフィーによって分離定性する方法について2つの実験、すなわち、1.直接血液を用いての実験（実験1）、2.ガスリー法の血液ろ紙を用いての実験（実験2）、について検討を行い良好な結果をえたので報告する。

## II. 実験

### A 実験1

#### 1. 器具

1)、薄層プレート：キーゼルゲル60F254（メルク）をあらかじめ110℃40分で活性化し、シリカゲル保管箱に保管しておく。

2)、薄層展開槽：矢沢科学（株）100-7A型

3)、キャピラーレ：ヘマトクリット検査用キャピラーレ（ヘパリン処理済）

#### 2. 試薬

##### 1)、展開溶媒

ブタノール（試薬特級）

酢酸（試薬特級）

フェノール（試薬特級）

##### 2)、除蛋白剤

(1) メタノール（試薬特級）

(2) Tsuchiya 試薬<sup>11)</sup>：リントングステン酸1.5gを95%エチルアルコール93.5mlに溶かし、完全に溶かしたのち濃塩酸5.0mlを混和しながら加える。

(3) 10%トリクロル酢酸：トリクロル酢酸10gを蒸留水に溶かして100mlとする。

##### 3)、呈色試験

(1) ニンヒドリン試薬：ニンヒドリン0.3gをメタノール95mlに溶かしコリジン5mlを加える。

(2) ニンヒドリン—硝酸銅試薬<sup>12)</sup>

I液：ニンヒドリン0.124gをエタノール50mlに溶かし、氷酢酸10ml、コリジン2mlを加える。

II液：硝酸銅三水和物1gをエタノール100mlに溶かす。

使用直前にI液とII液を混合(25+1.5)して使用する。

#### 4)、アミノ酸水溶液

21種類のアミノ酸(和光純薬、試薬特級)をそれぞれ一定濃度の水溶液として使用した。検出限界に応じて12.5~600 $\mu$ g/mlとした。システインが塩酸塩となっているほかは、すべて遊離型である。

#### 3. 被検者

正常血清としては保健所成人男女職員の血清を用いた。フェニルケトン尿症患者血液は、名古屋市立大学医学部付属病院より提供をうけたものを用いた。この血清につき同病院において蛍光光度法で測定したフェニルアラニンの濃度を併記する。

A患者血清(7歳10か月、30.4mg/dl)

B患者血清(4歳4か月、Aの妹、21.6mg/dl)

C患者血清(5歳)

D患者血清(3か月、Eの妹、14.8mg/dl)

E患者血清(14歳、25.6mg/dl)

#### 4. 測定操作

新生児よりへマトクリット検査用キャピラーレに3~4cm量採血し、クリトシールにて封印し、11,000rpm 5分間遠心分離する。血漿部分が約1.5cm分離するので、その1cm(血漿5 $\mu$ lに相当)をナイフで切断し、スポイトキャップを装着してホールガラスに吹き出す。駒込ピペットを用いメタノール1~2滴を血漿上に滴下し、よく攪拌すると白濁を生ずる。新しいキャピラーレでこの液を白濁とともに吸いとり、薄層プレート(キーゼルゲル60F254、メルク)にスポットする。この操作を3~4回繰返して全液を薄層プレートへ積層させる。スポットはなるべく小さくまとめ、ドライヤーを使用して乾燥させる。検体をスポットするさい白濁が薄層の上で固まり、さらに重ねてスポットすることが難しくなるが、横に1cm程度細長くすると早く積層することができる。別に標準アミノ酸水溶液(フェニルアラニン、ロイシン、バリンは4mg/dl、メチオニン2mg/dl、ヒスチシンは

6mg/dl)をキャピラーレで1cm量(5 $\mu$ l)スポットする。薄層プレートを展開槽に入れ、展開溶媒ブタノール：酢酸：水(4:1:1)で約10cm展開したのち取り出し、展開溶媒を蒸散させニンヒドリン試薬を噴霧する。これを乾燥器に入れ100 $^{\circ}$ Cで3分間加熱し、同時に展開した標準アミノ酸に対応するスポットの存否を確認し、呈色が標準アミノ酸より強いものを陽性とする。

#### B. 実験2

##### 1. 器具および試薬

1)、薄層クロマトグラフィー(TLC)：使用した器具および試薬はすべて実験1と同じである。

##### 2)、アミノ酸抽出率の測定

###### (1) クエン酸緩衝液(0.2M、PH5)

クエン酸21.0gを水200mlに溶かし、1N-NaOH 200mlを加えた後、水を加えて500mlとする。

###### (2) シアン化カリウム-メチルセロソルブ溶液

0.01Mシアン化カリウム溶液5mlにメチルセロソルブを加えて250mlとする。

###### (3) シアン化カリウム-メチルセロソルブ-ニンヒドリン溶液

5W/V%ニンヒドリン-メチルセロソルブ溶液10mlにシアン化カリウム-メチルセロソルブ溶液50mlを加える。

(4) ろ紙：岐阜県がガスリー法に使用しているもの(東洋沱紙、代謝異常検査用採血沱紙-C)を用いた。

##### 2. 被検者

正常血液：健康な成人男女5人のプール血液を用いた。

患者の血液ろ紙：(i)フェニルケトン尿症-岐阜県衛生研究所で54年度8、9月に検出し、9か月余室温に保存したもの2例と55年6月に検出し、4か月余冷蔵庫に保存した1例を用いた。ガスリー法でのフェニルアラニン測定値はいずれも20mg/dl以上であった。

A患者 (54年7月26日生、8月11日採血)

B患者 (54年9月7日生、9月23日採血)

C患者 (55年6月7日生、6月18日採血)

(ii)ヒスチジン血症—岐阜県衛生研究所で55年10月に検出し、2～4週間冷蔵庫に保存した2例を用いた。ガスリー法でのヒスチジン測定値を併記する。

D患者 (55年9月28日生、D-1;10月3日採血、6 mg/dl、D-2;10月21日採血、10mg/dl以上)

E患者 (55年9月25日生、E-1;10月1日採血、6～8 mg/dl、E-2;10月21日採血、10 mg/dl以上)

### 3. 測定操作

被検者の血液を十分浸み込ませ、乾燥させた血液ろ紙(ガスリー法と同じ方法)を直径5mmのディスクにうちぬき、小試験管に入れ、90v/v%メタノール0.1mlを加える。密栓して室温で一晩放置してアミノ酸を抽出する。急ぐときにはガラス棒で約3分間、300回突いてもよい。薄層プレート(キーゼルゲル60 F 254、メルク)に抽出液全液をドライヤーで乾燥させながら、くり返し積層する。別に標準アミノ酸水溶液(フェニルアラニン、ロイシン、バリンは4 mg/dl、メチオニンは2 mg/dl、ヒスチジンは6 mg/dl)をヘマトクリット検査用キャピラーレで1.4 cm長(7 $\mu$ l)スポットする。展開溶媒ブタノール：酢酸：水(4：1：1)で約10cm展開した後、溶媒を蒸散させ、ニンヒドリン試薬を噴霧する。これを100°Cで3分間加熱し、同時に展開した標準アミノ酸に対応するスポットの存否を確認し、呈色が標準アミノ酸より強いものを陽性とする。

## III. 実験結果

### A. 実験1

#### 1. 測定条件の検討

##### 1)、除蛋白剤と展開溶媒

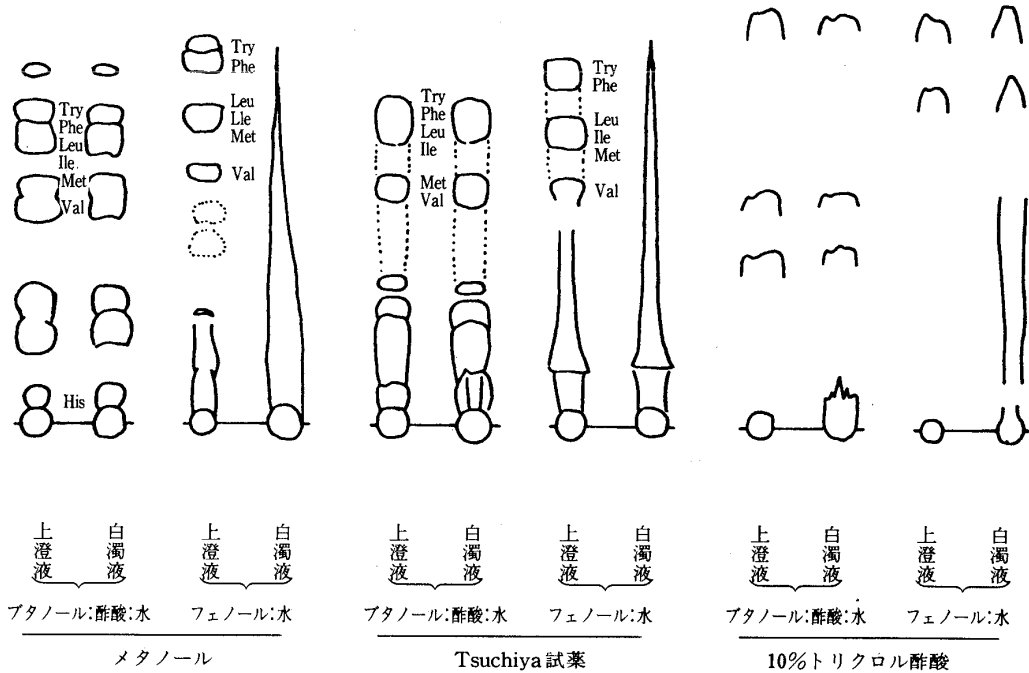
薄層クロマトグラフィーによって $\mu$ g単位のアミノ酸を分離検出することについては広く知られているが、除蛋白操作を行わない血清では

テーリングが著しく、アミノ酸を展開分離することができない。血液を用いるときには有効な除蛋白法が必要である。荒川ら<sup>13)</sup>はリンタングステン酸を用い血清の除蛋白を行なったのち、カラムによる脱塩を行なっているが、かなり多量(2 ml)の血清を必要とする欠点がある。著者はホールガラス上で除蛋白を行なう方法の検討を行なった。除蛋白剤としてメタノール、Tsuchiya試薬、10%トリクロル酢酸の3種類を用い、展開溶媒としてブタノール：酢酸：水(4：1：1)とフェノール：水(3：1)を使用して検討した。ブタノール：酢酸：水では(4：1：1)と(3：1：1)につき比較したが、アミノ酸のRf値に差がみられなかったので(4：1：1)を使用した。

血清1 mlに7種のアミノ酸(フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、バリン、ヒスチジン、トリプトファン)の混合水溶液(各200 $\mu$ g/ml)1 mlを加えた。この血清0.2 mlにメタノール0.6 ml、Tsuchiya試薬0.2 mlおよび10%トリクロル酢酸0.6 mlをそれぞれ加え、よく混合するといずれも白濁を生ずる。おのおの上澄液だけをスポットした場合と白濁液をそのままスポットした場合につき、分離効果を調べた。メタノールおよびトリクロル酢酸添加では40 $\mu$ l、Tsuchiya試薬添加では20 $\mu$ lをスポットした。展開溶媒は上記2種類を使用し、以下測定操作に従い展開発色させた。結果を図1に示す。

メタノール除蛋白血清では展開溶媒がブタノール：酢酸：水の場合、上澄液、白濁液のいずれもテーリングがなく小さくまとまったスポットが得られたが、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンの分離は不十分であった。フェノール：水では上澄液、白濁液ともに原点からテーリングがみられ、Rf値の小さいヒスチジンの確認が不可能であった。上澄液ではフェニルア

図1 除蛋白剤と展開溶媒



Try	Tryptophan	Met	Methionine
Phe	Phenylalanine	Val	Valine
Leu	Leucine	(各1 $\mu$ g添加)	
Ile	Isoleucine		

ラニンとロイシンの分離は良好であったが、フェニルアラニンとトリプトファンの分離、ロイシンとイソロイシンおよびメチオニンの分離は不十分であった。Tsuchiya試薬除蛋白血清ではブタノール：酢酸：水の場合、上澄液、白濁液ともに原点からのテーリングがみられ分離不十分で、ヒスチジンの確認は不可能であった。フェノール：水ではブタノール：酢酸：水より分離が悪く、とくに白濁液の場合に原点からのテーリングが著しく分離不十分であった。

10%トリクロル酢酸除蛋白血清では、どちらの溶媒でもアミノ酸を分離確認することはまったく不可能であった。

したがって、除蛋白剤としてはメタノール、展開溶媒としてはブタノール：酢酸：水(4:1:1)が適している。

また血清にアミノ酸を添加し、メタノールで

除蛋白したものとアミノ酸水溶液とでは、アミノ酸のRf値に差がなかった。したがって、アミノ酸の水溶液を対照標準としてスポットし同定すればよいことを認めた。

## 2)、呈色試薬と検出限界

血清0.1mlに各アミノ酸水溶液(12.5~600 $\mu$ g/ml)0.1mlをそれぞれ加えて混合する。これにメタノール0.6mlを加え除蛋白したものをキャピラーで8cm(血清5 $\mu$ l相当)とり薄層プレートにスポットし、以下、測定操作に従って展開発色させた。

呈色試薬としてニンヒドリン試薬とニンヒドリン-硝酸銅試薬の2種類を使用し、検出感度を比較した結果、両者には差がほとんど認められなかった。21種類のアミノ酸の検出限界を表1に示す。

表1 検出限界

アミノ酸	Rf 値	検出限界 ( $\mu\text{g}$ )
Phenylalanine	0.50	0.13
Leucine	0.50	0.13
Isoleucine	0.48	0.13
Methionine	0.43	0.07
Valine	0.39	0.13
Histidine	0.05	0.25
Tryptophan	0.54	0.38
Glycine	0.20	0.25
Alanine	0.25	0.25
Tyrosine	0.47	0.25
Proline	0.18	1.0
Hydroxyproline	0.18	1.0
Serine	0.18	0.5
Threonine	0.22	0.5
Cystine	0.05	0.75
Cysteine	0.05	0.5
Arginine	0.07	0.5
Lysine	0.05	0.5
Aspartic acid	0.14	0.5
Glutamic acid	0.21	0.5
Homocystine	0.10	0.38

展開溶媒 ブタノール：酢酸：水（4：1：1）

呈色試薬 ニンヒドリン試薬

アミノ酸量が多い場合には、ニンヒドリン試薬よりもニンヒドリン-硝酸銅試薬による呈色の方がアミノ酸による色調の差異が認められた。しかし、アミノ酸量の少ないところでは顕著でなく、検出感度にも両者の差は認められなかったため、使用直前に混合の必要のないニンヒドリン試薬を適当と認めた。

ニンヒドリン試薬ではほとんどのアミノ酸が暗赤紫色に発色したが、プロリン、ヒドロキシプロリンは黄色～橙色、システイン、シスチン、ホモシスチンは灰色がかった紫色、トリプトファンは暗黄緑色を呈した。また、今回検出を目的とした6種のアミノ酸では、ヒスチジンが紫色がかった茶褐色を呈したほかは、すべて暗赤紫色に発色した。

## 2. 測定試料の検討

### 1)、血清と血漿の比較

正常な成人男子10名から採血し、それぞれ血清と血漿（ヘパリン処理キャピラーレ使用）を分離した。この血清および血漿をそれぞれに同量のフェニルアラニン水溶液（ $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加えたのち、メタノールで除蛋白し、以下、測定操作に従って展開発色させた。

血清と血漿のクロマトグラムに差異は認められず、またフェニルアラニンのRf値にも差は認められなかった。

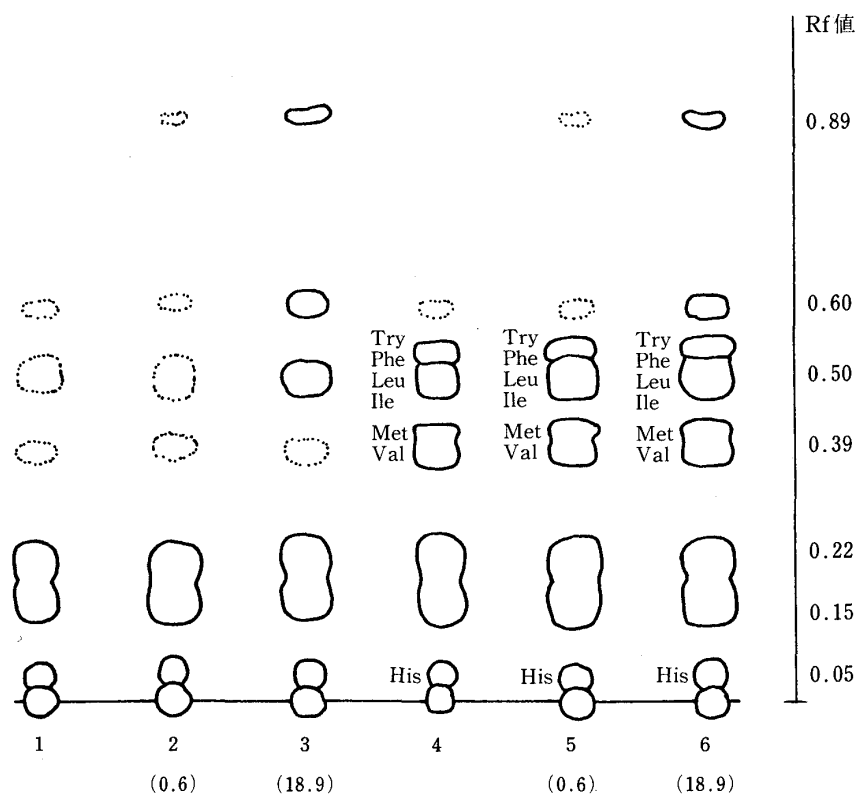
### 2)、正常血清と溶血血清

正常男子から採血し、その血清の半分から血清を分離した。残りの血液をさらに2分し、ガラス棒で攪拌してわずかに溶血させた血清と、凍血解凍し遠心分離して完全に溶血させた血清を得た。これらの血清およびそれぞれにフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、バリン、ヒスチジン、トリプトファンを添加した血清をメタノールで除蛋白し、測定操作に従って展開発色させた。結果を図2に示す。

正常血清には6個のスポットが認められた。スポット（Rf0.60）はトリプトファンのやや上の位置に薄い赤紫色で、ごくわずかに認められた。スポット（Rf0.50）はフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンとほぼ同じ位置に薄い赤紫色に発色し、わずかに認められた。スポット（Rf0.39）はバリンとほぼ同じ位置に薄い赤紫色で、やはりわずかに認められた。スポット（Rf0.22, 0.15）は濃い紫色で、はっきり認められた。スポット（Rf0.05）はヒスチジンとほぼ同じ位置に紫色がかった茶褐色で認められた。

わずかに溶血させた血清ではごく薄いスポット（Rf0.89）のほかは、正常血清とほとんど変わらなかった。

図2 正常血清および溶血血清



1. 正常血清
2. 軽度溶血血清
3. 完全溶血血清
4. 正常血清+アミノ酸
5. 軽度溶血血清+アミノ酸
6. 完全溶血血清+アミノ酸

( ) はヘモグロビン値 (g/dl)  
 展開溶媒 フタノール：酢酸：水  
 (4 : 1 : 1)  
 各アミノ酸 1 µg 添加

Try	Tryptophan	Met	Methionine
Phe	Phenylalanine	Val	Valine
Leu	Leucine	His	Histidine
Ile	Isoleucine		

完全に溶血させた血清に新たに出現したスポットは1つ (Rf0.89) であり、展開時にすでに淡黄色を呈していてニンヒドリン試薬によっても色調は変わらなかった。また、正常血清中に認められたスポットのうち2個 (Rf0.60, 0.50) は呈色がやや強くなったが、他はほとんど変わらなかった。

したがって、強い溶血は避けるのが望ましいが、軽度の溶血はさしつかえないと考えられた。なお、添加したアミノ酸のRf値は、溶血していない血清でも溶血血清でも変わりなかった。また、別に正常な成人男女20名の血清を展開したが、クロマトグラムはほとんど同じパターンを示した。

3)、フェニールケトン尿症患者血清の展開  
 フェニールケトン尿症患者5名および正常者

の血清を測定操作に従って展開発色させた。結果を図3に示す。

図3 フェニルケトン尿症患者血清のクロマトグラム



1. 正常血清      2. 正常血清+フェニルアラニン      3. 患者(A)血清+フェニルアラニン(0.63 $\mu$ g)  
 4. 患者(A)      5. 患者(B)      6. 患者(C)      7. 患者(D)  
 8. 患者(E)      9. フェニルアラニン水溶液(0.2 $\mu$ g)

展開溶媒    ブタノール：酢酸：水(4：1：1)

患者の血清にフェニルアラニン水溶液(250 $\mu$ g/ml)を等量混和した試料については、フェニルアラニンのスポットが重なり単一のスポットを与えた。5名の患者では、いずれもフェニルアラニンの著しい増量が明瞭に認められた。試料Dは採血時においては一時治療食を中止しており、フェニルアラニンの強い発色が認められた。

## B. 実験2

### 1. 抽出用メタノール濃度

乾燥血液ろ紙よりアミノ酸を抽出するためのメタノール水溶液の濃度を検討した。

メタノール(99.5v/v%)を水でうすめ、60、70、75、80、90v/v%溶液を調製し、各溶液および99.5v/v%メタノールを用い、測定操作にしたがって抽出、展開発色させた。99.5%メタノールでは原点のスポットはほとんど認められず、展開像は最もきれいであるが、スポットの発色がいくらか淡く、抽出が十分でないように思われた。90~60%の間では発色は濃くなり、

メタノール濃度による発色差はあまり認められなかった。ただし、水の量が多くなるにしたがい、肉眼的にも血色素の溶出が多くなり、展開像でも血色素と思われるRf0.89のスポットが濃くなった。さらに原点のスポットも濃くなり、Rf0.05のヒスチジンの判定が困難になった。

したがって、90v/v%メタノールが適当と認められた。

### 2. ろ紙抽出液のTLC

成人男女のプール血液(ヘパリン処理)2mlにアミノ酸水溶液(フェニルアラニン、ロイシン、バリン、メチオニンは20mg/10ml、ヒスチジンは30mg/10ml)をスクリーングレレベルおよび患者血液に見いだされている量(実験1)になるように二段階濃度に添加した。

すなわち、フェニルアラニン、ロイシンは0.04mlと0.16ml、バリンは0.04mlと0.14ml、メチオニンは0.02mlと0.2ml、ヒスチジンは0.04mlと0.08mlを順次加え、混合した。このとき血中濃度は、フェニルアラニン、ロイシンはそれぞれ



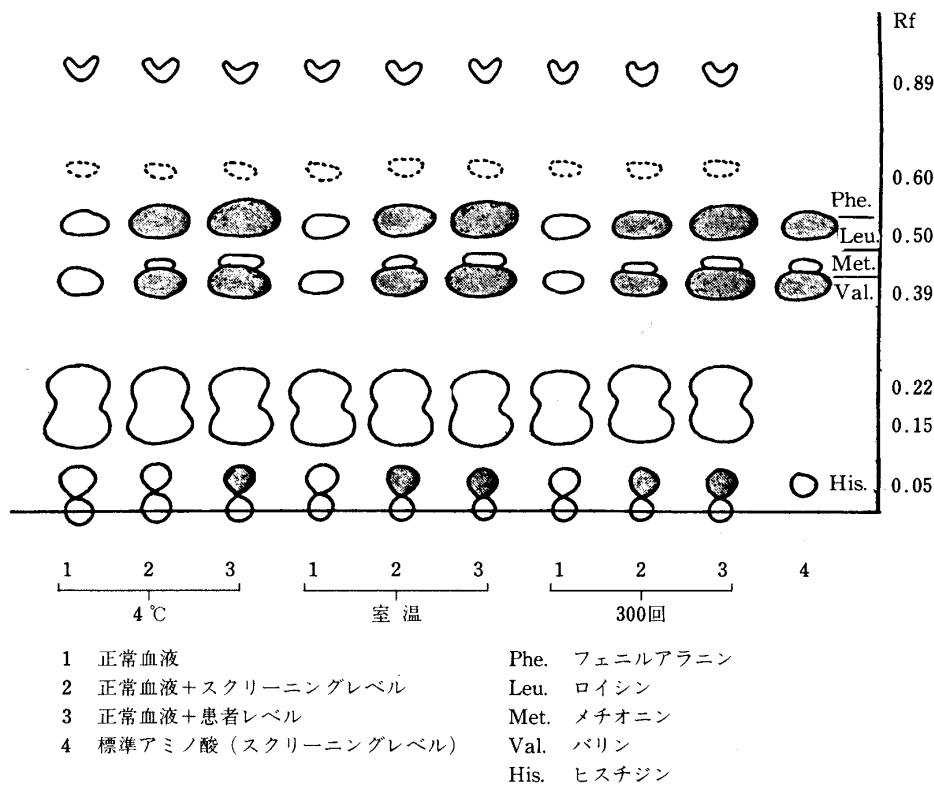
4 mg/dlと12mg/dl、バリンは4 mg/dlと11mg/dl、メチオニン<sup>2</sup>は2 mg/dlと16mg/dl、ヒスチジンは6 mg/dlと9 mg/dlとなる。1～2時間室温に放置した後、ガスリー法に用いるろ紙に浸み込ませ、冷蔵庫（4℃）で4～7日間乾燥させた。これは実際の試料の測定のさい、郵送などに要する日数を考慮して決定したものである。別にアミノ酸を加えない血液も同様に浸漬乾燥させた。それぞれを直径5 mmのディスクにうちぬき

小試験管に入れ、90%メタノールを0.1ml加え、密栓し、以下の3条件で抽出した。

- 1) 冷蔵庫（4℃）で一夜放置
- 2) 室温（10～20℃）で一夜放置
- 3) ガラス棒で約3分間に300回突く

それぞれの抽出液全液を薄層プレートにスポットし、以下測定操作にしたがい、展開、発色させた。結果を図4に示す。

図4 ろ紙抽出後のTLC



いずれの抽出条件でもクロマトグラムに差はほとんど認められなかった。300回突いた場合、Rf0.89のスポットがやや濃くなった。また、実験1で述べた血清のクロマトグラムと比較してもほとんど差はなかった。

アミノ酸をスクリーニングレベル量添加した場合には、対応するスポットの出現、増量が明らかに認められた。また、患者量添加の場合には著しい増量のはっきり認められた。

### 3. アミノ酸抽出率

成人男女から得たプール血液（ヘパリン加）2 mlに上記2のろ紙抽出液のTLCで用いたと同じアミノ酸水溶液を、患者血液に見いだされ

ている量（実験1）になるように添加した。

すなわち、フェニルアラニン、ロイシンは0.16 ml、バリンは0.14ml、メチオニンは0.2ml、ヒスチジンは0.08mlを個別に添加した。このときの濃度は、フェニルアラニン、ロイシンは15mg/dl、バリンは13mg/dl、メチオニンは18mg/dl、ヒスチジンは12mg/dlとなる。それぞれをよく混合し、1～2時間室温に放置した後、それぞれの0.07mlをろ紙片（18×10mm）に浸み込ませ、冷蔵庫（4℃）で4～15日間乾燥させた。各片をほぼ同じ大きさになるよう10片に細断してすべてを小試験管に入れ、90%メタノールを1 ml加え、密栓し、上記2に示したと同じ3条件で抽

出した。

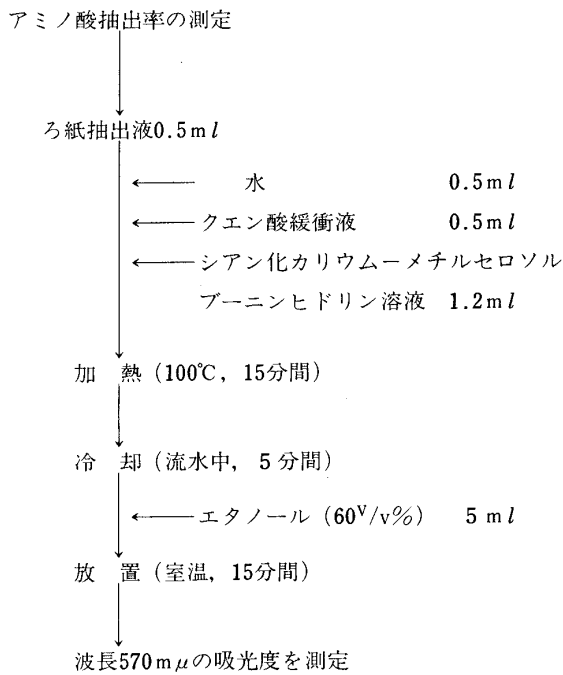
それぞれを遠心分離 (3,000rpm, 10分) して得た上清について Yemm<sup>14)</sup>らの方法に準じ、Chart 1 に示す方法によって得られた発色の波長570m $\mu$ における吸光度を測定した。別にアミノ酸を添加しない血液を同様に処理し、添加血液との吸光度の差と各アミノ酸水溶液の吸光度の比から回収率を求め、アミノ酸抽出率とした。結果を表 2 に示す。

表 2 アミノ酸抽出率

	4℃	室温	300回突く
フェニルアラニン	64	78	115
ロイシン	95	95	103
バリン	105	95	110
メチオニン	85	85	80
ヒスチジン	85	86	104

数値は%, 2回測定 of 平均値

Chart 1 アミノ酸抽出率の測定



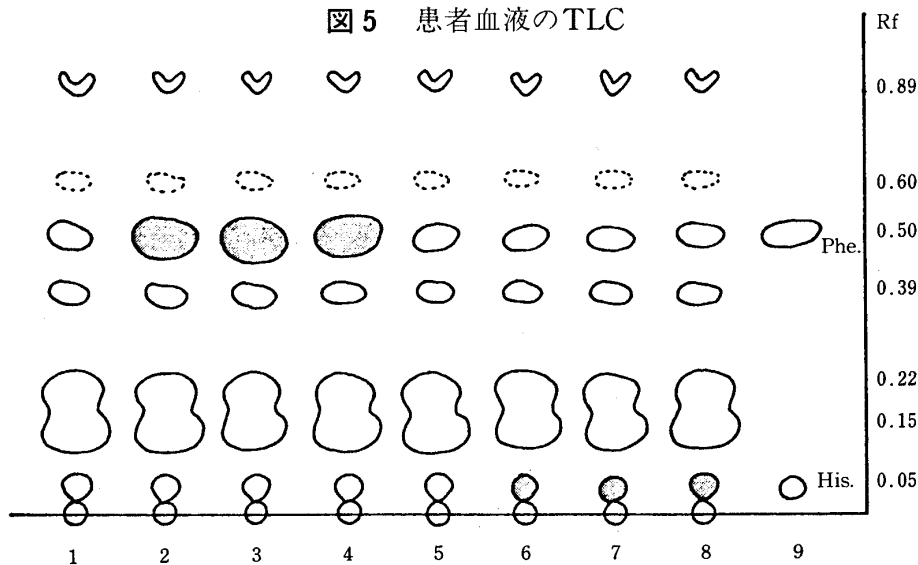
どの条件でも目的アミノ酸は十分抽出されてくるようであるが、フェニルアラニンは4℃でやや抽出不十分のようであった。

したがって抽出には室温で一夜放置するかガラス棒で300回突いて抽出する方法が適当と考えられた。

#### 4. 患者血液のTLC

フェニルケトン尿症患者3名、ヒスチジン血症患者2名の血液浸漬ろ紙を直径約5mmのディスクにうちぬき、小試験管に入れ、90%メタノールを0.1ml加えた。室温で一夜放置して抽出し、全液を薄層プレートにスポットし、以下測定操作にしたがい、展開発色させた。結果を図5に示す。

図 5 患者血液のTLC



- 1 正常血液 2 患者 A 3 患者 B 4 患者 C  
 5 患者D-1 6 患者D-2 7 患者E-1  
 8 患者E-2 9 アミノ酸(スクリーニングレベル)  
 Phe. フェニルアラニン, His. ヒスチジン

フェニルケトン尿症患者では、3名ともフェニルアラニンの著しい増量が明瞭に認められた。

ヒスチジン血症患者Dの場合、ガスリー法でヒスチジン量が6 mg/dlとされた生後5日の検体(D-1)では薄層クロマトグラフィーによる正常血との鑑別はやや難しく思われた。しかし、ガスリー法で10 mg/dl以上とされた生後23日の検体(D-2)では、ヒスチジンの明瞭な増量が認められた。患者Eでは、ガスリー法で6~8 mg/dlおよび10 mg/dl以上とされた2検体ともヒスチジンの増量がはっきり認められた。

#### IV 考 察

昭和52年度より、全国一斉にガスリー法により4種の先天性アミノ酸代謝異常の検索が実施されている。ガスリー法によるスクリーニングによると、ある種の抗生物質の被投与歴をもつ新生児では、発育円をまったく認めることのできない例がある<sup>26)</sup>が、先天性アミノ酸代謝異常児には原因追求の過程において、抗生物質が投与されている者の存在が考えられ、そのためガスリー法によって異常者の発見をみのがす危険性がある。しかも、先天性アミノ酸代謝異常児の発生率は1万人につき、なん人という低率であるので、こうした判定誤認はスクリーニング法としての問題を示すものである。そこで簡易で正確な方法を開発する目的で薄層クロマトグラフィーによる検出法について2つの実験を行ない、その検討を行なった。

1. アミノ酸を薄層クロマトグラフィーによって分離確認する方法は広く知られているが、血清あるいは血漿を用いる場合、除蛋白を行わないと良好な結果を得ることはできない。荒川<sup>13)</sup>らは除蛋白ののちカラムによる脱塩を行なっているが、血液量を多く要する欠点がある。著者はメタノールで除蛋白したのち、沈澱を分離せずにスポットして良好に展開、分離することができた。Katz<sup>15)</sup>らは血清中と血漿中のアミノ酸の量はほぼ等しいと述べている。そこで血清と血漿の両者について比較したが、クロマトグラムに差はなく、アミノ酸の検出には血清、血漿のどちらを使用しても良いと考えられた。

フェニルケトン尿症患者の血清中フェニルアラニン量は、15~63 mg/dl<sup>3)</sup>、15.4~44 mg/dl<sup>16)</sup>と報告されている。これら報告による患者血清を5  $\mu$ l スポットしたとすれば、フェニルアラニンのスポット量はそれぞれ0.75~3.15  $\mu$ g、0.77~2.2  $\mu$ gとなる。フェニルアラニンの検出限界量は0.13  $\mu$ gであるので、十分検出可能な量である。実際に患者血清(5名、フェニルアラニン含量14.8~30.4 mg/dl)を試験したところ、十分に検出することができた。

正常な新生児血清中のフェニルアラニン量は4 mg/dl以下であり<sup>3)7)</sup>フェニルアラニンの異常レベルより十分低い。しかし、血清5  $\mu$ l中の量は0.2  $\mu$ g以下となり検出限界量以上の場合があり、正常者でもわずかにスポットが認められる場合があることになる。事実、正常者の血清を展開したところ、通常6個のスポットが認められ、フェニルアラニン相当の位置にもわずかに呈色が認められた。しかし、アミノ酸の呈色の濃さはアミノ酸量と対応しているので、スクリーニングレベルとして現行のガスリー法にない、フェニルアラニン水溶液(4 mg/dl)を5  $\mu$ l スポットして同時に展開して得た呈色より濃いものを異常とすれば、正常と異常の区別は容易である。

他のアミノ酸についても同様の考えで判断する。

楓糖尿症患者の血清中アミノ酸量は研究者によって幅があり、ロイシン14.5 mg/dl<sup>17)18)</sup>、52.4 mg/dl<sup>19)</sup>、イソロイシン2.2 mg/dl<sup>17)</sup>、8.5 mg/dl<sup>18)</sup>、17.9 mg/dl<sup>19)</sup>、バリン13.1 mg/dl<sup>17)</sup>、14.9 mg/dl<sup>18)</sup>、23.9 mg/dl<sup>19)</sup>、と報告されている。正常血清レベルはロイシン1.5~3.0 mg/dl、イソロイシン0.8~1.5 mg/dl、バリン2.0~3.0 mg/dlであり<sup>17)</sup>、イソロイシンは患者でも正常者に比べそれほど増量していない。したがって、ロイシン、バリンの検出を目標とすることが適当である。さらに、この患者のクロマトグラムではロイシンのスポットがフェニルアラニンと同じ位置に出現するが、バリンのスポットにより、フェニルケトン尿症との鑑別が可能と考えられる。これら報告の患者血清を5  $\mu$ l スポットするとロイシン

のスポット量は0.725~2.62 $\mu$ g、バリンは0.655~1.19 $\mu$ gである。ロイシン、バリンとも検出限界量は0.13 $\mu$ gであるので十分検出可能である。

ホモシスチン尿症患者の血清中メチオニン量は10.0~192.5 $\mu$ moles/dl (1.49~28.7mg/dl)<sup>20)</sup>という高濃度のものから0.7~1.7mg/dl<sup>21)</sup>、0.15~2.61mg/dl<sup>16)</sup>の低濃度まで報告されている。メチオニンの正常血清レベルは0.38mg/dl<sup>22)</sup>であるので高濃度患者でないとは検出は困難である。高濃度患者の血清5 $\mu$ l中のメチオニン量は0.07~1.43 $\mu$ gとなり、検出限界量は0.07 $\mu$ gであるので検出可能である。また、正常血清中にはメチオニンに相当する位置に発色をまったく認めないので、メチオニン増量の検出は容易である。

ヒスチジン血症患者の血清中ヒスチジン量は7.13~9.01mg/dl<sup>23)</sup>、13.4~17.3mg/dl<sup>24)</sup>、15.8mg/dl<sup>25)</sup>、正常血清レベルは0.4~1.8mg/dl<sup>23)</sup>、1.15mg/dl<sup>22)</sup>、2mg/dl<sup>24)</sup>と報告されている。血清5 $\mu$ l中のヒスチジン量は患者0.356~0.865 $\mu$ g、正常者0.02~0.1 $\mu$ gとなる。正常血清中にはヒスチジン相当の位置にスポットを認めるが、患者血清中のヒスチジン量は検出限界0.25 $\mu$ g以上であり、呈色が強く、明らかに患者を検出可能な呈色である。

4種の先天性アミノ酸代謝異常症のガスリー法によるスクリーニングレベルは、フェニルアラニン4mg/dl、ロイシン4mg/dl、メチオニン2mg/dl、ヒスチジン6mg/dlであるが<sup>26)</sup>、著者の薄層クロマトグラフィーでの検出能力もほぼ同程度である。ガスリー法のスクリーニング法としての欠点は、ある種の抗生物質を投与した経歴をもつ新生児では、発育円がまったくみられないために発生率の低い先天性アミノ酸代謝異常児を検出しおとす危険性があることにあるが、本法はこうした場合にも判定を誤まることはなく、有効な方法と考えられた。

Scriverら<sup>10)</sup>は、ペーパークロマトグラフィーによって先天性アミノ酸代謝異常の検出を行なうためキャピラーレ採血を行ない、これを金属製の小管に入れて郵送している。著者の方法を行なうにあたって、産院などのように検査設備のない機関や、集中検査体制をすすめるためには

Scriverらの方法に従って郵送することが考えられるが、著者は採血キャピラーレを綿にくるんで封筒に入れて搬入(非郵送)する方法を採用し、岐阜県下各保健所で実施した結果、支障のないことを認めた。

2. 実験1において、血漿、血清いずれを用いてもクロマトグラムに差は認められなかったが、今回のろ紙に浸漬させた血液より抽出する方法では、全血中のアミノ酸を測定することになるので、赤血球と血漿中のアミノ酸濃度が等しいことが望ましい。血液中の遊離アミノ酸量の報告はほとんどが血清、血漿についてのもので、血球中の報告は少ない。

McMenamyら<sup>27)</sup>は正常者15名の血漿、血球中のアミノ酸濃度を測定し、アラニン、グルタミン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、スレオニン、チロシン、バリン、ロイシン+イソロイシンは血漿と赤血球中の濃度はほぼ等しく、アルギニンは赤血球より血漿中に多く、グルタミン酸、オルチニン、ヒスチジン、セリン+グリシン、アスパラギン酸は赤血球中より血漿中に少なく、このうちヒスチジンは赤血球中濃度は血漿中の1.58倍であったと述べている。また、Levyら<sup>28)</sup>は6名の正常者と10名のアミノ酸代謝異常または腎の輸送異常の新生児について、血漿、赤血球中の20余種の遊離アミノ酸濃度を測定したところ、正常者では、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニンが血漿中より赤血球中に多く、シチス、メチオニン、アルギニンが赤血球中より血漿に多く、特定アミノ酸濃度が高くなる代謝異常者のうち、今回われわれが検索を目的としたフェニルアラニン、ロイシン、バリン、ヒスチジン濃度は血漿と赤血球でほぼ等しかったが、メチオニンは血漿中濃度は赤血球中の1.57倍であったと述べている。

この両報告から、フェニルアラニン、ロイシン、バリンについては、血漿中と全血中の濃度はほぼ同じとみなされる。さらに、血漿と血清の遊離アミノ酸の濃度は同じと考えられる<sup>29)</sup>ので、この3アミノ酸については、実験1で扱った血清(血漿)についてのスクリーニング

レベルは、そのまま全血についてもあてはめてよいと考えられる。McMenamyらが述べているように、ヒスチジンは血球/血漿=1.58とすると、全血の場合には血漿ひいては血清に比べ若干含量が高くなる。その程度は、ヘマトクリット50%として試算すると血漿の1.29倍量となる。また、メチオニンについては、血漿/血球=1.57とすると、全血の場合若干含量が低くなる。その程度は同様に試算すると血漿の0.82倍量となる。いずれも實際上判定を誤るほどの差ではないと考えられ、これら2アミノ酸についても実験1で扱った血清(血漿)の場合のスクリーニングレベルを、全血にあてはめてよいと考えられる。

ガスリーろ紙の直径5mmのディスクには、約7 $\mu$ lの血液が浸み込んでいると思われるので、スクリーニングレベル量としては、アミノ酸標準液を7 $\mu$ l(ヘマトクリット検査用キャピラール1.4cm長)スポットすることにした。

アミノ酸の抽出条件としては、90%メタノールを用い、冷蔵庫(4 $^{\circ}$ C)、室温(10~20 $^{\circ}$ C)で一夜放置する方法、およびガラス棒で300回突いて抽出する方法について検討したところ、クロマトグラムにはほとんど差は認められなかった。しかし、添加アミノ酸の回収率からは、4 $^{\circ}$ Cの場合、フェニルアラニンの抽出が不十分である心配が考えられた。したがって通常の場合は、室温で一夜放置する方法によって行ない、急ぐ場合は300回突いて抽出する方法によるのが適当と考えられた。

この方法により、5種のアミノ酸をスクリーニングレベル量添加した場合、明らかなアミノ酸の増量が認められた。またフェニルケトン尿症患者3名、ヒスチジン血症患者2名の血液ろ紙について検討したところ、フェニルアラニンの著しい増量およびヒスチジンの増量がはっきり認められた。

したがって本法はガスリー法に比べ、抗生物質投与児についての誤認防止と技術的簡便性という実験1のもつ利点に加え、ヘマトクリットキャピラールをろ紙に代えることにより、検体の簡便な輸送方法の応用を可能にした点で、先

天性アミノ酸代謝異常の検出に有用な方法であると考えられる。

## V. ま と め

先天性アミノ酸代謝異常児の早期発見のため、昭和52年から全国で実施されているフェニルケトン尿症、楓糖尿症、ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症の4症のスクリーニング法としてガスリー法が行なわれているが、抗生物質投与児についての誤認の危険性および簡便さの点で不十分である。著者は薄層クロマトグラフィーによる血液およびガスリー法に用いる血液ろ紙を用いるスクリーニング法を検討し、有効な方法を確立した。

1. 本法はメタノールにより簡単に除蛋白でき、短時間にしかも1枚の薄層プレート(20 $\times$ 20cm)で通常15名の検索が可能であることなど、スクリーニングに用いるに十分な条件を備えており、簡便な設備で公衆衛生の第一線機関の保健所で実施できる有用な方法と考えられる。

2. 薄層クロマトグラフィーによる先天性アミノ酸代謝異常児の早期発見法につき、検体の採取、輸送方法において、さらに簡便な方法を開発すべく検討し、ヘマトクリットキャピラールをろ紙に代えることにより、その利点を損うことなく目的を達し、応用可能な方法を確立した。

本法は、すでにガスリー法で広く用いられている血液ろ紙を検体とするもので、90v/v%メタノールで簡単、確実に抽出した後、薄層クロマトグラフィーによって検出する方法で、患者血液についてその実用性が確認され、スクリーニング法としての有用性をさらに高めたものとする。

\* \* \*

御指導をいただいた岐阜大学々長館正知先生、同医学部教授吉川博先生、ならびにご校閲を賜った岐阜薬科大学教授小瀬洋喜先生に深甚なる謝意を表します。また本実験に終始ご協力を戴いた岐阜県衛生研究所今井準三専門研究員、岐阜県関保健所山田均主任技師、岐阜県公害研究所中村哲夫部長研究員に心から感謝いたします。

尚、本論文要旨は第24回東海公衆衛生学会および日本公衆衛生雑誌26巻、10号、28巻、6号に発表した。

#### 文 献

- 1) 成瀬 浩：先天代謝異常の早期発見と治療，総合乳幼児研究，1(4)，3-9，1978
- 2) 厚生省児童家庭局母子衛生課監修：小児慢性特定疾患ハンドブック，137-147，社会保険出版社(東京)，1975
- 3) 中江亮一：先天性代謝異常，4-35，金原出版(東京)，1974
- 4) Stanbury, J.B., et al : The metabolic basis of inherited disease, 1972 ; 五島雄一郎，熊谷通夫：先天性代謝異常，309-651，広川書店(東京)，1978
- 5) 財団法人母子衛生研究会：小児慢性特定疾患の手引き，126-136，1976
- 6) 高井俊夫，他：先天性代謝障害症のスクリーニングについて，28(6)，634-642，1965
- 7) Guthrie, R., Susi, A. : A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, Pediatrics, 32, 338-343, 1963
- 8) 財団法人厚生統計協会：国民衛生の動向，29(9)，126-127，1982
- 9) Efron, M.L., et al. : A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of amino acid metabolism — A technique using whole blood or urine collected on filter paper, New Eng. J. Med., 270(26), 1378-1383, 1964
- 10) Scriver, C.R., et al. : Application of a simple micromethod to the screening of plasma for variety of aminoacidopathies, Lancet, 2, 230-232, 1 Aug., 1964
- 11) 環境庁：カドミウムによる環境汚染暫定対策要領の一部(住民健康調査方式)改正について、環保業通達58号，1976. 5. 10
- 12) Moffat, E.D., Lytle, R.I. : Polychromatic technique for the identification of amino acids on paper chromatograms, Anal Chem., 31(5), 926-928, 1959
- 13) 荒川雅男，吉田稔男：薄層クロマトグラフィーによる血清，尿中アミノ酸のスクリーニング法，小児科臨床，19，1366-1381，1966
- 14) Yemm, E.W., Cocking, E.C. : The determination of amino-acids with Ninhydrin, Analyst, 80, 209-213, 1955
- 15) Katz, N.R., Keck, M. : Vergleich von Aminosäuren in Menschlichem Serum und Plasma, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 89-91, 1977
- 16) 高井俊夫，他：先天性代謝異常，64-85，229-240，診断と治療社(東京)，1973
- 17) Dancis, J., et al. : Maple syrup urine disease : Branched-chain keto-aciduria, Pediatrics, 25, 72-79, 1960
- 18) Dent, C.E., et al. : Studies in maple syrup urine disease, Arch. Dis. Child., 36, 259-268, 1961
- 19) Westall, R.G., et al. : Dietary treatment of a child with maple syrup urine disease (branched chain keto-aciduria), Arch. Dis. Child, 38, 485-491, 1963
- 20) Perry, T.L., et al. : Sulfur-containing amino acids in the plasma and urine of homocystinurics, Clin. Chim. Acta., 15, 409-420, 1967
- 21) Carson, N.A.J., et al. : Homocystinuria : A new inborn error of metabolism associated with mental deficiency, Arch. Dis. Child, 38, 425-436, 1963
- 22) Stein, W.H., Moore, S. : The free amino acids of human blood plasma, J. Biol. Chem., 211, 915-926, 1954
- 23) Ghadimi, H., et al. : A familial disturbance of histidine metabolism, New Eng. J. Med., 265(5), 221-224, 1961
- 24) La Du, B.N., et al. : Clinical and biochemical studies on two cases of histidinemia, Pediatrics, 32, 216-227, 1963
- 25) Auerbach, V.H., et al. : Histidinemia—A deficiency in histidase resulting in the urinary excretion of histidine and of imidazole-pyruvic acid, J. Pediat., 60(4), 487-497, 1962
- 26) 松野久生(岐阜県衛生研究所)：私信
- 27) McMenemy, R.H., et al. : Studies of unbound amino acid distributions in plasma, erythrocytes, leucocytes and urine of normal human subjects, J. Clin. Invest., 39, 1675-1687, 1960
- 28) Levy, H.L., Barkin, E. : Comparison of amino acid concentrations between plasma and erythrocytes. Studies in normal human subjects and those with metabolic disorders, J. Lab. Clin. Med., 78(4), 517-523, 1971

- 29) Katz, N. R., Keck, M. : Vergleich von Aminosäuren in Menschlichem Serum und Plasma, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 89~91, 1977