

## 傾斜培地を利用したガスリー法による血中フェニルアラニンの測定

河合 聡，壁谷なつ子，大野武男

（岐阜薬科大学薬品分析化学教室）

### Determination of Phenylalanine in the Blood by Guthrie's Method using Sloping Agar Medium

SATOSHI KAWAI, NATSUKO KABEYA, TAKEO OHNO

*Department of Pharmaceutical Analyses, Gifu College of Pharmacy*

Guthrie's method was modified to be able to determine normal levels of phenylalanine in the blood using sloping agar medium. The procedure is as follows: Dissolve 2g of BBL PKU Test Agar Base (Demain) in 50ml of water by heating in a boiling water bath. Cool the solution to about 60°C and add 0.08ml of  $\beta$ -2-thienylalanine solution and 0.05ml of BBL Spore Suspension, *B. subtilis*, origin ATCC #6633. Mix thoroughly, pour each 25ml of the mixture into two of 14cm plastic Petri dishes settled at the slope of about 5° and allow the agar to solidify at room temperature. Place some discs autoclaved at 120°C for 5 min with control disc along the slope of the prepared plate on it and incubate at 37°C for 17 hr. Compare zones of growth surrounding test discs with that surrounding the control disc.

#### 緒 言

アメリカの微生物学者ガスリーによって開発された血液による PKU (phenyl ketonuria) のスクリーニング法は、ガスリー法と呼ばれて今日広く普及している<sup>1~3)</sup>。この方法の確立によって今日では PKU の早期発見は容易となったが、問題はすべて解決したわけではない。PKU と診断された患者は、その後長期間にわたってフェニルアラニン含有量を調整したミルクで養育される必要がある。ところが、フェニルアラニンは必須アミノ酸であるため、フェニルアラニン摂取量が多ければ PKU 治療に不都合をきたし、少なければフェニルアラニン不足に起因する発育障害が心配される。そこで患者からしばしば採血して正常値附近の血中フェニルアラニン濃度を測定しながらフェニルアラニン摂取量をコントロールしなければならない、というかなり煩雑な問題がある。乳幼児に採血時の苦痛を与えず、少量の血液量で迅速簡便に血中フェニルアラニンを測定できる方法がのぞまれている。著者らは、従来のガスリー法に若干の工夫を加えるだけで正常値 (2 mg/dl) 近辺の血中フェニルアラニン量を測定できる方法を考案したので報告する。

#### 実 験

##### 1) 材 料

BBL PKU Test Agar Base (Demain), 三光純薬より購入。枯草菌 ATCC 6633 芽胞懸濁液, 北里研究所製。PKU 検査用発育阻止剤 ( $\beta$ -2-thienylalanine) 溶液, 北里研究所製, 第一化学薬品Ⅲより購入。PKU 用採血濾紙, 北里研究所製。

##### 2) 方 法

BBL PKU Test Agar Base 2.0g を 100ml の 3 角フラスコに秤取し, 水 50ml を加え, アルミ箔で口をおお

い、ときどきふりまぜながら沸騰水浴中で約10～15分加熱して均一の透明な溶液とする。約60°C位まで室温で放冷したのち、 $\beta$ -2-thienylalanine 溶液 0.08ml, 枯草菌芽胞懸濁液 0.05mlを加え、よく混合する。2個の内径14cmの円形シャーレをやや傾斜させた状態(約5°の角度)に置き、その中へ上記の溶液 25ml ずつ注ぎ込み、室温で放冷し固化させる。この傾斜培地の上に、図1のように、あらかじめ120°Cで5分加熱処理したそれぞれのディスク a, b, c, d を数枚傾斜方向に沿って配置する。37°Cで17時間インキュベートし、ディスクのまわりの枯草菌の発育環の直径を、濃度既知の標準ディスク s のそれと比較し定量を行う。

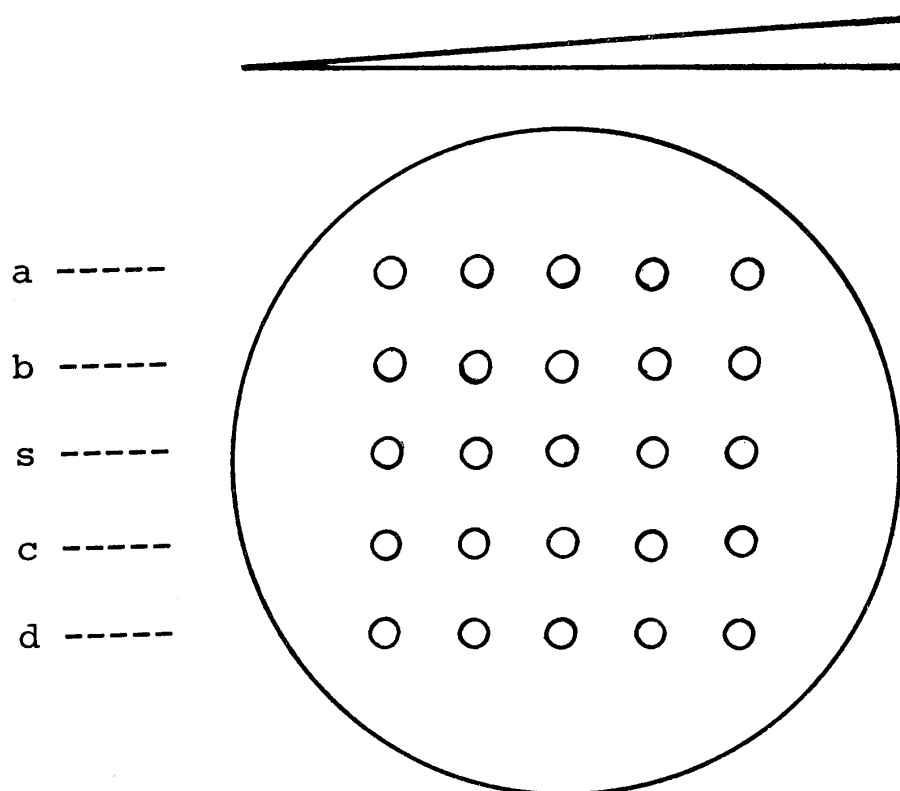


図1

### 結果と考察

一般に行われているガスリー法では寒天培地の層の厚さは 2.6mm 程度である。この層の厚さをうすくして行った場合、枯草菌の発育環形成はどのようになるかを検討したのが表1である。予想したように、培地の層の厚さがうすくなるに従って、発育環形成は大きくなる。勿論、発育環形成が大きくなるにつれて発育環の濁度はうすくなり判定しにくくなっていくが、相対的にみて培地の層をうすくすると測定のいちじるしい感度上昇が期待できることがわかった。

そこで、図1のように傾斜培地を作成し、培地の層の厚い部分とうすい部分とをつくり、この傾斜に沿って同一濃度のフェニルアラニンを含むディスクを一行に並べて配列すると、図2のように 0.25mg% から 1.0mg% まで定量性を示す発育環形成が観察された。判定には、培地層の厚さに対応した、いくつもの濃度系列の中から判定しやすい組をえらんで判定できる点も傾斜培地の利用の好都合なところである。PKU 患者の尿液についての測定結果を図2にあわせて表示したが、約0.50mg% のフェニルアラニンを含んでいることがわかる。

表1 枯草菌発育環の大きさに及ぼす寒天培地層の厚さの影響

PA (mg%)	寒天培地の層の厚さ		
	0.4mm	1.2mm	2.6mm
4	1.26cm*	0.84cm	0.40cm
6	1.46	0.91	0.70
8	1.67	1.08	0.78
10	1.80	1.19	0.92
12	1.85	1.38	1.07

PA : phenylalanine

\* : 枯草菌発育環の直径

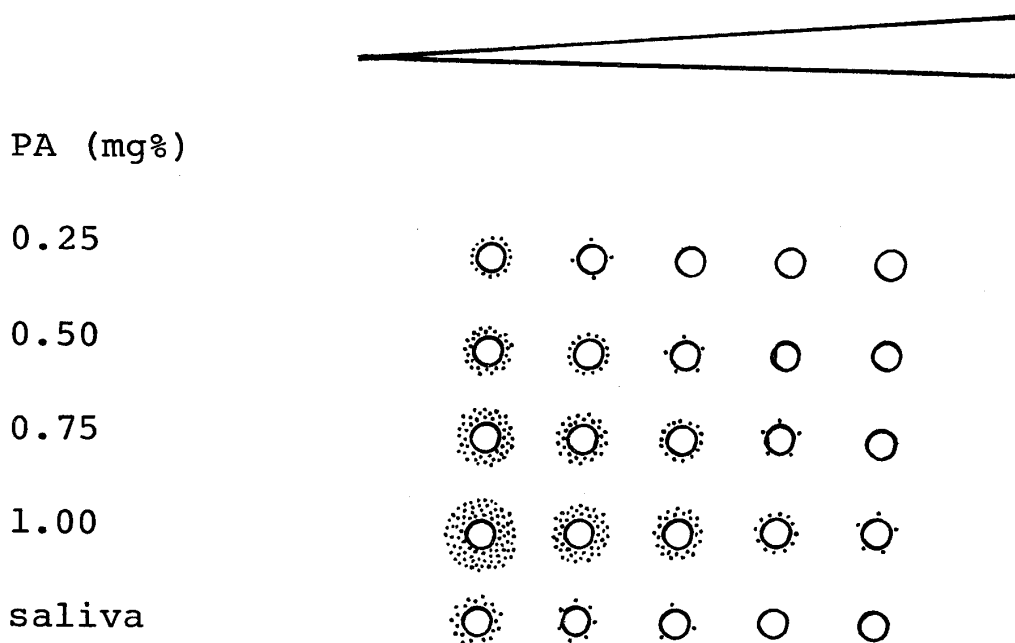


図2

この方法は、多数の検体の一斉測定には適さないが、PKU スクリーニングと違って、PKU と診断された患者数はそれほど多くはない。従って、限られた患者の治療上必要とする血中フェニルアラニン濃度の簡便なモニター法としては、この傾斜培地の利用は大いに役立つものと期待される。

本実験をすすめるに当り、愛知身心障害者コロニー中央病院岡田喜篤先生、名城病院川村正彦先生、名古屋衛生研究所佐藤月子先生の有益な御指導御協力を頂きましたことを感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 成瀬 浩：東京医学，83，300 (1975)
- 2) 成瀬 浩：ファルマシア，13，58 (1977)
- 3) 成瀬 浩：ぶんせき，413 (1977)