

沷紙血液を用いたガラクトキナーゼ活性測定法の検討

北川照男，大和田 操
崎山武志，渡辺千晶
(日本大学医学部小児科)

研究目的

高ガラクトース血症を呈する先天性代謝異常には，Gal-1-P-uridylyltransferase 欠損症 (I型)，galactokinase 欠損症 (II型)，4-epimerase 欠損症 (III型) があり，これらは乾燥沷紙血液を用いた Beutler 法，Paigen 法，藤村法，及び 4-epimerase 活性測定法を組み合わせることにより，各病型をスクリーニングすることが可能である。しかし，沷紙血を用いて galactokinase を直接測定する方法は確立されておらず，沷紙血のみで II 型を診断することは困難とされている。沷紙血液を用いてガラクトキナーゼ活性の測定方法を検討し，それが新生児スクリーニングに使用可能か否かを検討することが本研究の目的である。

研究方法

1) 沷紙血液を用いたガラクトキナーゼ活性測定の方法の検討：放射性同位元素で標識したガラクトースを基質とし，生じた ^{14}C -galactose-1-phosphate (以下 ^{14}C -gal-1-P) と未反応の ^{14}C -galactose とをリン酸化した DEAE セルロースカラムにて分離したのちに ^{14}C -gal-1-P の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定する Shin-Buhning らの方法¹⁾の一色らによる変法²⁾を参照して，以下の実験を行った。すなわち，直径 3 mm の沷紙血液 disk を反応混液 (1.6 μmol MgCl_2 ，0.8 μmol NaF ，40 μmol Tris-HCl pH 7.4，1.5 μmol ATP ，0.2% saponine，0.1 μCi galactose-1- ^{14}C) 中に加え，37°C で 1～12 時間反応後，100°C 2 分間の加熱により反応を停止させる。遠心後，この反応液上清を予めリン酸化した径 0.7 cm，高さ 0.3 cm の DEAE セルロースカラムに apply し，蒸留水 (1 回 2.5 ml で 5 回) で洗浄して，未反応の ^{14}C -galactose を除いた後，0.1N-HCl (1 回 2.5 ml \times 3 回) で， ^{14}C -galactose-1-phosphate を溶出させ，両者の放射能で測定した。沷紙血を用いた場合の本法における至適条件を決定するために使用する沷紙 disk の枚数，反応時間，沷紙の保存条件等による活性値の変化について，検討した。2) ガラクトキナーゼ欠損症の二次スクリーニング：新生児マス・スクリーニングにおいてガラクトキナーゼ欠損症が疑われた 1 例とその両親，4-エピメラーゼ欠損症を疑われた 7 例および正常対照 6 例の沷紙血液を用いて，上述の方法によりガラクトキナーゼ活性を測定して，本法によるガラクトキナーゼ欠損症の診断が可能か否かを検討した。

結果

1) 沷紙 disk 数と活性値：3 mm disk 5 枚までは，galactokinase 活性値は図 1 のように直線

的に増加した。2) 反応時間と活性値

: 1~18時間までの活性は図2のように時間と共に直線的に増加した。

3) 沓紙の保存条件と活性値: 血液沓紙を①乾燥後4°Cに保存したもの、②乾燥後室温に放置したもの、③未乾燥のまま4°Cに保存したものについて、galactokinase 活性を比較検討したところ、乾燥後放置した場合には、2週間でその活性はほとんど完全に失活したが、冷蔵保存した場合には、その活性はほぼ完全に保たれた。また、未乾燥のまま冷蔵保存した場合の活性は、乾燥させ、冷蔵保存した場合の50%に低下した。以上から、3 mm disk 3枚、反応時間2時間を沓紙血ガラクトキナーゼ測定の至適条件として以下の実験を行った。4) 沓紙血を用いたガラクトキナーゼ欠損症の二次スクリーニング: 沓紙血液中のガラクトキナーゼ活性は図3のようであり、正常対照の乳児と4エピメラゼ欠損症を疑われた7例の活性は0.15~0.60 n. mol Gal-1-P/disk/hrの間に分布し、両者に差が認められなかった。これに対して、ガラクトキナーゼ欠損症が疑われた1例の沓紙血では3回の測定のいずれにおいても、ガラクトキナーゼ活性はほとんど認められず、また、その両親の活性は、正常対照と患児の中間値を示していた。また、同時に洗滌赤血球のガラクトキナーゼ活性を測定したところ、沓紙血で活性が認められなかった症例においては、洗滌赤血球における活性も殆んど認められず、その両親の

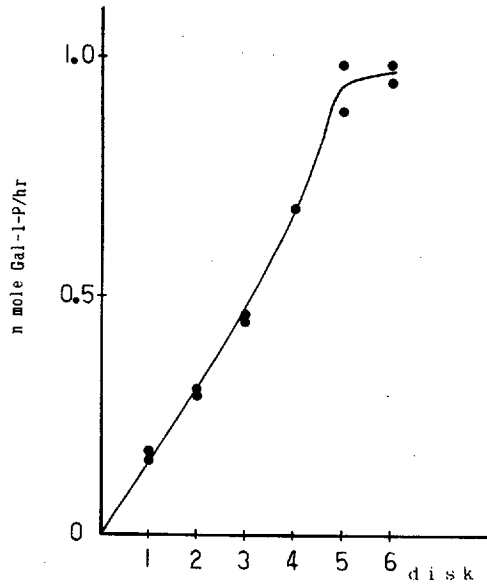


図1 血液沓紙ディスク枚数と活性

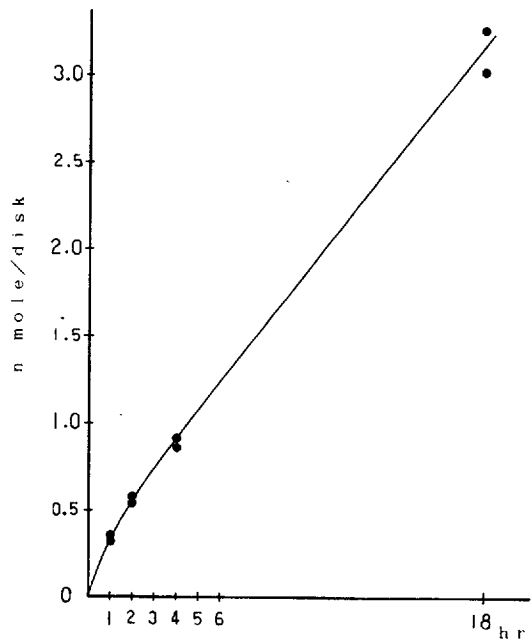


図2 反応時間と活性

活性は対照の約 $\frac{1}{2}$ を示しており、 H 紙血によるガラクトキナーゼ欠損症のスクリーニングは可能と考えられた。

なお、正常対照および4エビメラゼ欠損症の検体における活性にかなりのバラツキが認められたが、これは採血後の保存条件が検体によって異なり、低い活性値は室温保存が長かったためと考えられる。

考 察

従来、ガラクトキナーゼ欠損症は白内障を認める以外には無症状であり、予後良好な疾患とされてきたが、最近では知能障害を伴う症例も報告されており、その早期診断は重要である。現在、わが国で用いられているガラクトース血症のスクリーニング法、即ち、Beutler法とPaigen法が陽性を示した場合、多くの検査センターで藤村法や H 紙血の4-エビメラゼ測定などを組

み合わせてその鑑別診断を行っている。もちろん、新生児期に血中ガラクトースの上昇を示す症例の多くは、肝の未熟性による新生児一過性高ガラクトース血症や、乳児肝炎、その他に起因する肝機能障害のための二次性高ガラクトース血症であるが、中には上記の検査の結果、血中ガラクトースの高値のみが持続する場合がある。そのような場合には、ガラクトキナーゼ活性を測定して、その異常の有無を確認することが望ましく、その際、 H 紙血による測定が行えれば有用と考えて、上述の検討を行い、 H 紙血のガラクトキナーゼ活性測定が可能なことを明らかにした。もちろん、本法には、①放射性同位元素を必要とする点、②生成する物質をカラムによって分離しなければならないなど、手技が煩雑であること、③ H 紙を室温で保存した場合には約2週間でその活性が完全に失活するため、採血後速かな郵送と、冷所保存が必要なことなどの難点があり、現時点ではマス・スクリーニングに利用するには無理がある。しかし、一次スクリーニングでガラクトース代謝異常が疑われた場合の二次スクリーニングには充分使用可能であり、とくに上述のようにPaigen法でガラクトース高値に示し、Beutler法が正常な場合の再採血時に本法は有用と思われる。

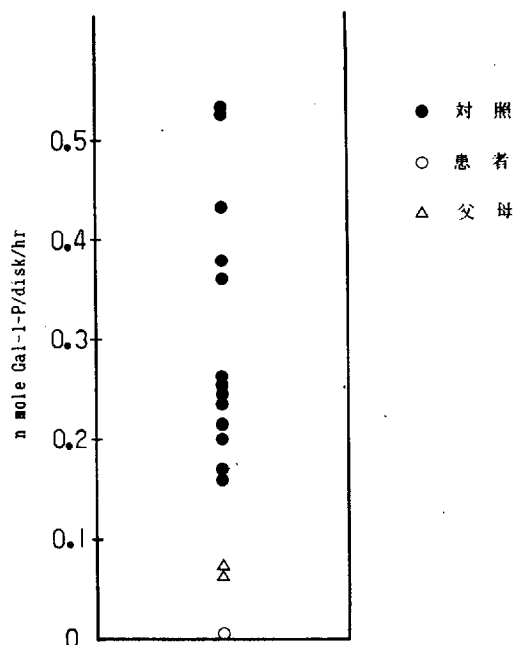


図3 乾燥 H 紙血液中のGalactokinase活性

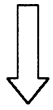
文 献

- 1) Shin-Buhning. Y et al : Clin Chim. Acta, 74 : 1 (1977)
- 2) 一色玄, 現代臨床機能検査. 日本臨床夏季増刊 : 325 (1979)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

高ガラクトース血症を呈する先天代謝異常には, Gal-1-P-uridyltransferase 欠損症(型), galactokinase 欠損症(型), 4-epimerase 欠損症(型)があり, これらは乾燥炉紙血液を用いた Beutler 法, Paigen 法, 藤村法, 及び 4-epimerase 活性測定法を組み合わせることにより, 各病型をスクリーニングすることが可能である。しかし, 炉紙血を用いて galactokinase を直接測定する方法は確立されておらず, 炉紙血のみで型を診断することは困難とされている。炉紙血液を用いてガラクトキナーゼ活性の測定方法を検討し, それが生児スクリーニングに使用可能か否かを検討することが本研究の目的である。