

Biotinidase 欠損症の新生児スクリーニング法の検討

高杉信男, 山口昭弘, 福士 勝, 荒井 修,
水嶋好清, 佐藤泰昌 (札幌市衛生研究所)
松浦信夫, 藤枝憲二 (北大医学部小児科)

研究目的

Heardら¹⁾により報告された Biotinidase 欠損症のスクリーニング法は, N-Biotinyl-*p*-aminobenzoate (B-PAB) を基質として, 濾紙血中の Biotinidase により遊離される *p*-aminobenzoate (PAB) のカップリング反応に基づく赤紫色の呈色から, Biotinidase 活性の有無を肉眼判定するもので, 簡便な優れた方法である。しかし, 肉眼による判定は, 疑陽性の判定が難しく, 見逃しの危険性も高いことから, Heardらの方法を一部改良し, マイクロプレート及びマイクロプレートリーダーを用いることにより, 迅速, かつ簡便に, 濾紙血 Biotinidase 活性を定量化する方法を検討し, スクリーニングへの応用を試みた。

研究方法

Heardらの方法の試験管の代わりに マイクロプレートを用い, TCA 溶液添加後の反応液を分取し, 発色後 Inter Med 社製 Immno Reader NJ-2000 型により, 吸光度測定を行った (Scheme)。検量線は, PAB 標準溶液 (25~100 μ M) 30 μ l を U 底型 マイクロプレートにとり, TCA 溶液添加以後の操作を試料と同様に行い作成した。

研究結果

1. 反応時間

反応時間を 37°C において 1~24 時間変化させて吸光度を測定したところ, 10 時間までは, ほぼ直線的な増加を示したので, 測定精度や実操作を考慮して 5 ないし 6 時間とした。

2. 測定法の再現性

PAB 標準溶液及び血液ディスクの発色の再現性はともに良好であった (Table)。また, 発色後 3 時間経過しても吸光度の変化はなかった。

3. 濾紙血と血漿の Biotinidase 活性の相関

正常成人 6 例の濾紙血 Biotinidase 活性の平均値は $5.95 \pm 0.82 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$ であり, 一方血漿 100 μ l について Wolfらの方法²⁾により測定した平均値は $5.59 \pm 0.93 \text{ nmole min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ serum}$ であった。相関係数 $r=0.964$ で両者に有意の相関 ($P<0.01$) を認めた。

4. 濾紙血 Biotinidase 活性の安定性

濾紙血を -20, 4, 25 及び 37°C に, 1~30 日間保存し, Biotinidase 活性の変化を調べたとこ

ろ、 -20°C では30日後の残存活性は88%とかなり安定であるが、 25 及び 37°C では7日後でそれぞれ64及び54%まで低下した。

5. スクリーニングへの応用

1) 測定間変動

検量線の測定間変動は良好であり〔Abs. = $(2.82 \pm 0.20) \times 10^{-2}$ Activity + $(0.34 \pm 0.96) \times 10^{-2}$, $n=12$ 〕, また, 一般新生児検体の各測定間における平均吸光度(0.100 ± 0.008 , $n=12$)及び平均活性($3.43 \pm 0.19 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$, $n=12$)ともに変動は小さかった。

2) 新生児と一カ月児の Biotinidase 活性の比較

正常新生児97例の平均活性は $3.63 \pm 0.59 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$ であり, 一カ月児68例では, $4.61 \pm 0.54 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$ であり, 両者の平均値には有意の差 ($p < 0.01$) が認められた。

3) スクリーニング結果

一般新生児3,750例の吸光度及び Biotinidase 活性の平均値はそれぞれ 0.099 ± 0.022 及び $3.49 \pm 0.76 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$ であり, そのヒストグラムは正規分布を示した (Fig.)。平均活性の2分の1 (Abs. < 0.05) 未満の検体は54例 (1.4%) であり, 肉眼において, ほとんど呈色の認められない (Abs. < 0.03) 検体は7例 (0.19%) であったが, 血液ディスク2枚を用いた再測定ではいずれも呈色が認められた。これらのうち9例について再採血による再検査を行ったところ, 全例, 一般新生児の平均活性以上であり, まだ陽性者は見つかっていない。

考 察

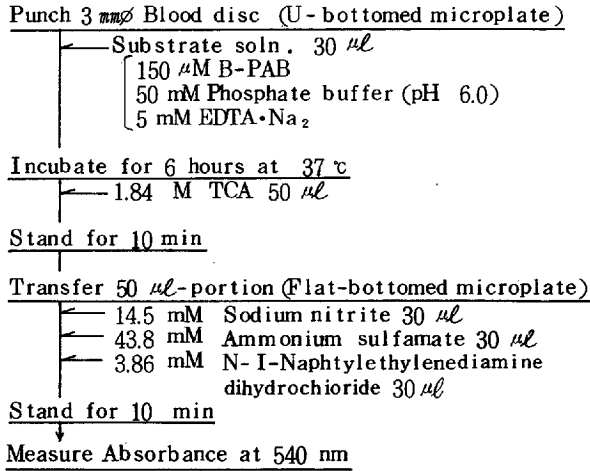
採血直後の正常成人の Biotinidase 平均活性に対し, 郵送検体による一般新生児及び一カ月児の平均活性はそれぞれ, 59及び77%と採血後の日数及び保存温度等の影響で活性が低下していると考えられるが, 新生児と一カ月児の平均活性には差が認められた。

一方, Biotinidase 欠損症の発生頻度は, アメリカにおいて1~4万人に1人であり, また, ヘテロ保因者の Biotinidase 活性は正常者の2分の1であることが, Wolf らにより報告されており, 活性定量値からヘテロ保因者の検索の可能性はあるが, 平均活性の2分の1未満の検体の中には, 前述の理由で活性が低下した正常検体が含まれてくるため, 初回検査のみでは困難である。

本法は, 操作性, 迅速性に優れ, さらに判定の自動化が可能なことから, Biotinidase 欠損症のスクリーニング法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) G. S. Heard, J. R. S. Mcvoy, B. Wolf : Clin. Chem., **30**, 125 (1984)
- 2) B. Wolf, R. E. Grier, R. J. Allen, S. I. Goodman, C. L. Kien : Clin. Chim. Acta, **131**, 273 (1983)



Scheme. Procedure of Biotinidase activity determination in filter paper blood

Table. Measurement Reproducibility

| | Abs. at 540 nm | |
|--------------------------|----------------|---------|
| | Mean (n=6) | RSD (%) |
| PAB STD Soln. (μ M) | | |
| 25 | 0.056 | 3.34 |
| 50 | 0.121 | 2.85 |
| 100 | 0.252 | 3.02 |
| Normal Sample *) | | |
| a | 0.133 | 6.16 |
| b | 0.126 | 6.15 |
| c | 0.125 | 6.11 |

*) Absorbance was measured for 6 hours incubation using a blood disc.

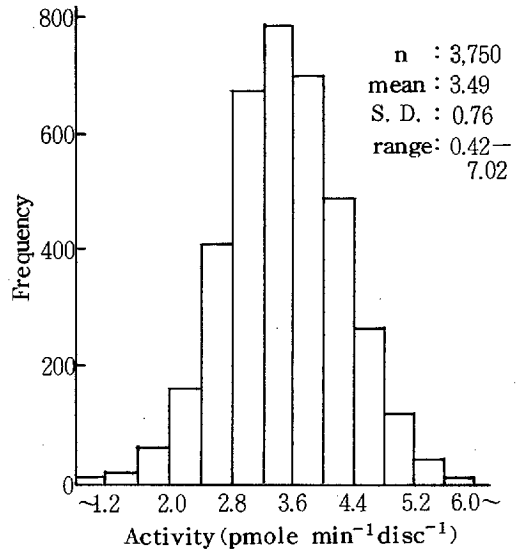


Fig. Histogram of Biotinidase activity in filter paper blood of neonates



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

Heard ら 1)により報告された Biotinidase 欠損症のスクリーニング法は、N-Biotinyl-aminobenzoate(B-PAB)を基質として、濾紙血中の Biotinidase により遊離される μ amino-benzoate(PAB)のカップリング反応に基づく赤紫色の呈色から、Biotinidase 活性の有無を肉眼判定するもので、簡便な優れた方法である。しかし、肉眼による判定は、疑陽性の判定が難しく、見逃しの危険性も高いことから、Heard らの方法を一部改良し、マイクロプレート及びマイクロプレートリーダーを用いることにより迅速、かつ簡便に、濾紙血 Biotinidase 活性を定量化する方法を検討し、スクリーニングへの応用を試みた。