

イクロプレートリーダー：Fluoroskan II (Labsystems) により，Black plate を用いて Ex418/Em538 nm でのケイ光強度を測定する (Fig. 2)。

Extraction Punch a 5mm blood disc into a U-microplate well
 Hb denaturing soln. 10ul (MeOH:Acetone:H₂O=35:35:10)
 Dry at 37°C, 30min
 H₂O 70ul
 Vibrate 10min
 Transfer 50ul-portion to a Black plate well

Met-Lyase Enzyme soln. 50ul
 0.2M KPB (pH 8) / 0.1mM Pyr.5'-P / 0.3U/ml Met-Lyase
 Incubate at R.T., 60min (under tight sealing)

OPA/2ME OPA / 2ME soln. 100ul
 80mM KH₂PO₄ / 20mM OPA / 10mM 2ME / 20% EtOH
 Incubate at R.T., 30min (under tight sealing)

0.5 N HCl 50ul

Measure Fluorescence at Ex/Em: 418/538 nm by Fluoroskan II (Labsystems)

Fig. 2 Procedure

Massachusetts State Instituteおよび東京都予防医学協会から供与されたHCU患児7例 (このうち3例は新生児スクリーニング時の濾紙血液を回収)，コバラミン合成障害児および高メチオニン血症患児の濾紙血液試料を検討に用いた。

結 果：

[Met測定系] MetおよびNH₄Cl標準溶液の検量線は良い一致を示し，Met-Lyaseにより本条件下でほぼ定量的にMetからNH₃が遊離されていることが確認できた(Fig.3)。また，全血にMet標準溶液を適宜添加し，HPLCにより定量した標準乾燥濾紙血液を用いた検量線も良好な直線性を示し，濾紙血液試料への応用も可能であることがわかった(Fig.4)。高メチオニン血症患児の濾紙血液を用いたHPLCとの相関も良好あり (Fig.5)，一般新生児72例の本法によるMet値のヒストグラムおよび高メチオニン血症患児10例との濃度分布の比較では，これら2群は重なりなく明確に分離可能であった(Fig. 6)。

[Met・HSH測定系 (Total Assay)] Met-

LyaseはHSHに対しても活性を有し，Metと同様にNH₃を遊離することから，原理的にはこれらの総量を測定可能である。しかし，HSHは，*in vitro* ではそのほとんどが，SH基の自然酸化により，タンパクジスルフィド結合型として存在するため，通常の除タンパク抽出操作によっては抽出されてこない

Fluoroskan II (Labsystems) with Black plate

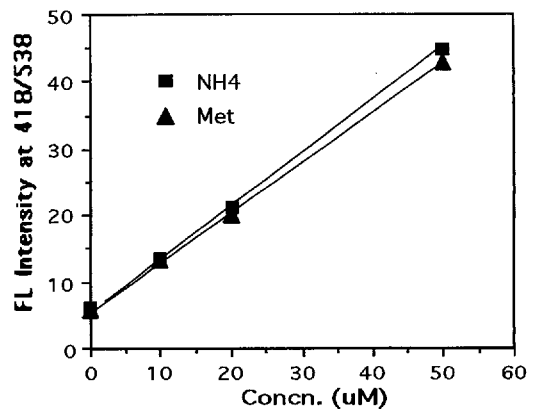


Fig. 3 Calibration curves for standard solutions

Fluoroskan II with Black plate

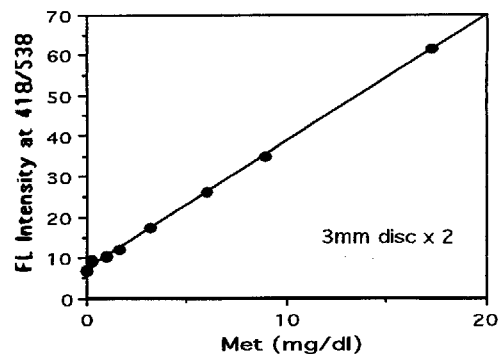


Fig. 4 Calibration curve for Met in dried blood spots

ことが知られている。そこで，有機溶媒による色素固定後の血液ディスクに，0.3U/ml Met-Lyase - 2mM DTE - 0.1mM Pyr 5'-P - 0.2M KPB (pH8.0) の酵素溶液120 μlを加え，室温で1時間，抽出と酵素反応を同時に行う方法を検討した。この後，酵素反応液100 μlをBlackプレートに分取し，以下，Fig.2と

同様にOPA/2ME反応を行う。まず標準溶液系の検討として、Met, HSHおよびHSSH

(ホモシスチン：HSHのジスルフィド二量体) 溶液の検量線を比較した (Fig. 7)。検量線の傾きはMetに対し、HSHは1/2、HSSHは2倍となっているが、HSHはDL体のためD体には酵素は作用せず、一方、HSSHはL-HSHの二量体であるため、倍のNH₂が遊離されたことを示している。Met標準濾紙血液を、このTotal assayで測定すると、バックグラウンドの上昇も伴うが、ケイ光強度の上昇が見られ、3mm径の血液disc1枚でも測定可能であった。

DBS specimens from hypermethioninemia

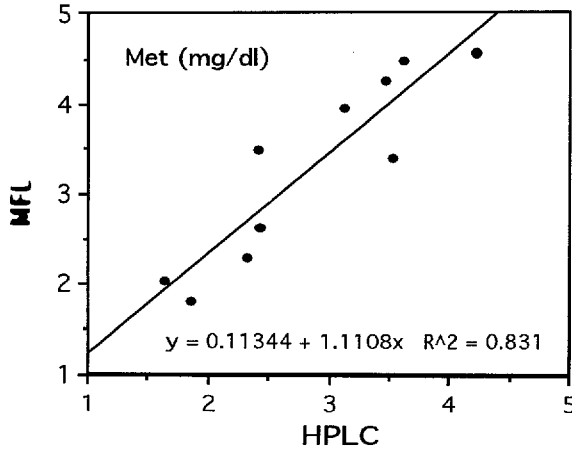


Fig. 5 Correlation to HPLC

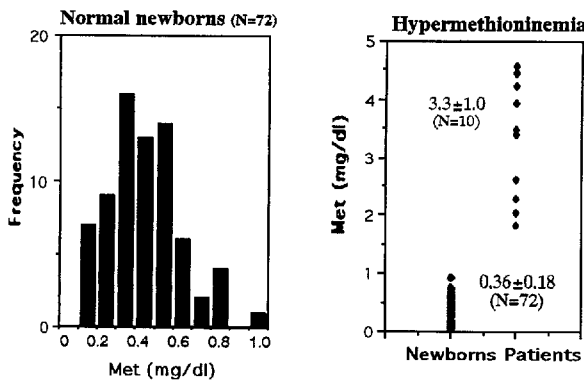


Fig. 6 Assay results for normal newborns and hypermethioninemia

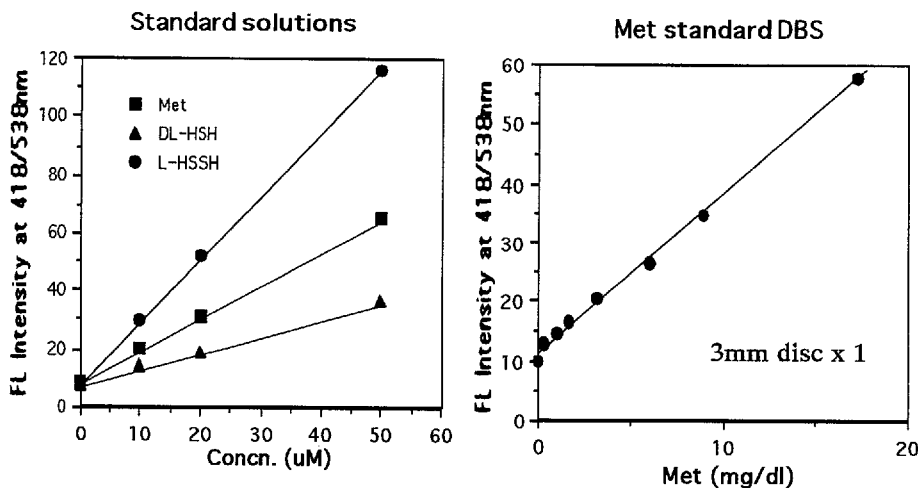


Fig. 7 Calibration curves for total assay

[患児濾紙血液の測定結果] 回収されたHCU患児の新生児スクリーニング時の濾紙血液は、室温で1-4年間保存されていたもので、測定値の正確性には問題があるが、HCU患児のLew, SosおよびSgoは2~3生日採血時のBIA法によるMetの値は、順に~1, <1および4mg/dlと報告されている。一方、当所でのHPLCによるMet測定値は、0.74, 0.12および1.06mg/dlであった。この中でLewとSosが偽陰性例であるが、MFLによるTotal assayでは、それぞれ、3.52, 4.24mg/dlと、いずれも正常コントロールから分離されている (Table)。また、他のMetの上昇が顕著なHCU患児の場合も、同様にTotal assayの測定値は明らかな高値となっている。さらに、HSHからの再メチル化の障害で、本質的にMetの上昇を伴わないホモシスチン尿症であるコバラミン合成障害児の場合でも、Total assayでは上昇が認められている。一方、HSH

Table Results of total assay for homocystinuric patients from Massachusetts and Tokyo Screening Laboratories

Patients		Age	Met (HPLC)	Total assay (MFL)
Homocystinuria	Lew	2 day	0.74	3.52
	Sos	23 day	13.2	28.0
	Sgo	3 day	0.12	4.24
	Tes	3 day	1.06	5.99
	Has	16 day	3.69	10.21
	Ric	-	7.87	12.5
Cobalamin defects	Och	-	8.67	12.1
	cbl C	-	6.96	10.0
	cbl G	-	<0.1	4.66
Hypermethioninemia	Yos	1 year	<0.1	7.60
	Hiw	1 month	1.56	2.07
Normal (4 -7 day)		Mean	0.35	1.31
		SD	0.08	0.39
		Min	0.21	0.62
		Max	0.51	1.95
		N	36	11

の上昇はない高メチオニン血症の場合には、比較的HPLCとTotal assayの測定値は近い値を示した。

考 察： HCUの新生児スクリーニングは、BIA法によりMetを測定して行われているが、BIA法の中では最も感度がよく明瞭な細菌生育円が得られる。しかし、HCUの欠損酵素であるシスタチオン合成酵素の障害では、Metの上昇は二次的であるため、現行のMetを指標としたスクリーニングでの見逃し例が実際に何例か報告されていた。このことから、我々は、酵素欠損で一次的に上昇するHSHを直接測定するMFLを開発し、そのスクリーニングへの応用を検討してきた²⁾。しかしながら、HSHは容易に酸化されタンパクとのジスルフィド結合として存在するため回収率が低値(約50%)であること、また、元々の血中レベルが、他のアミノ酸に比べかなり低いこと(～10 μM)に加え、測定操作面でもステップ数が多く、実用面での問題が残されていた。

そこで、原理的にも全く異なるMetおよびHSHに対する新しいMFLの開発を検討した訳である。このMet-Lyaseを用いる方法は、

最終的にはNH₃測定系のため、反応中はプレートのシーリングを厳密に行うなど周囲環境からのコンタミネーションに対する注意を払う必要はあるが、濾紙血液のMetがマイクロプレートレベルで初めて測定できるようになった。さらに、定量的には未検討であるが、HSHとの総量を測定することも可能であり、これにより、MetあるいはHSH単独の場合に比べ、より信頼性の高いHCUのスクリーニング

が可能となるものと期待される。今後、ルーチンスクリーニングに導入し、実用面での評価を行う必要がある。

一方、他の先天性代謝異常症の項目：フェニルケトン尿症、メイプルシロップ尿症およびガラクトース血症については、既にマイクロプレート法の開発が実用段階となっているが、このHCUに対する方法が開発されて、はじめて本来のマイクロプレートシステムと言えることから、この意味でも本測定法の確立が待たれるところである。

謝辞： 貴重な患児濾紙血液をご供与いただきましたMassachusetts State Institute; Dr. H. L. Levy, 東京都予防医学協会; 鈴木 健先生、またMet-Lyaseの単離精製に取り組んでいただきました和光純薬工業の皆様に深謝いたします。

文献

1. 山口昭弘, 他: 札幌市衛生研究所年報, 20,67,1993
2. Yamaguchi A, et al: Screening,1,49,1992



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



要約:ホモシスチン尿症(HCU)の新しいマス・スクリーニング法として,乾燥濾紙血液中のメチオニン(Met)を,L-Methionine γ -lyase(Met \cdot Lyase)を用いて酵素的に測定する微量ケイ光定量法(MFL)の開発を試みた。酵素反応により Met から遊離される NH₃ を,0-phthalaldehyde(OPA)と 2-mercapthoethanol(2ME)の中性域での特異ケイ光を利用して測定する系につき,基礎的条件検討を行った。その結果,濾紙血液 Met のマイクロプレートレベルでの定量が可能となり,さらに Met-Lyase が,ホモシステイン(HSH)に対しても活性を有することから,抽出条件を選択することにより,Met と HSH の総量測定も可能であった。HCU 患児 3 例(うち 2 例は Met 上昇を示さなかった偽陰性例)の新生児スクリーニング時の濾紙血液を回収し(Massachusetts State Institute より),本総量アッセイによって測定した結果,全例,正常レベルから分離可能な上昇を示していた。今後の課題として,実際のルーチンスクリーニングへの応用面での検討が残るが,本測定法の開発により,先天性代謝異常症 4 項目のすべてにつき,マイクロプレート法によるスクリーニングが可能となることから,その有用性は大きいものと考えられる。