

ポイトラー法における蛍光定量法の検討—まとめ—
(分担研究：効果的なマスキリングの施策に関する研究)

藤本昭栄⁽¹⁾ 宮城富子⁽¹⁾ 岡野善行⁽²⁾ 一色玄⁽²⁾ 大浦敏明⁽¹⁾

要約： ガラクトース血症1型のスクリーニング法としてポイトラー法は、簡便、迅速で優れた検査方法である。しかしながら、肉眼による定性検査であり、また酵素活性が経日的に劣化する欠点がある。我々は前回、ろ紙からの酵素抽出効率の均一化による信頼性の向上と、蛍光マイクロプレートリーダーによる半定量化と記録化を可能とする“改良ポイトラー法”を発表した。今回は、基礎的検討に加え、1997年4月から98年1月まで実際にマスキリングを行い、その結果を報告する。新生児総検査数23,957人中、確認検査率3.6%、再採血検査率0.7%、要精検率0.087% (21人)であった。改良ポイトラー法で得られる半定量galactose-1-phosphate uridyltransferase (UT) 活性値をヘモグロビン (Hb) で補正することで、より正確な値となった。採血日から検査日までの平均所用日数は3±1.8日で、前回の安定性を検討した結果から、十分測定が可能である1週間以内に97.5%の検体が測定されていた。しかし、温度と湿度によるUT活性の低下は避け難く、7～9月の再採血率は上昇した。

見出し語：ガラクトース血症、改良ポイトラー法、

【研究目的】

ミルクの摂取如何にかかわらず赤血球中のUT活性の有無を測定することができるポイトラー法はガラクトース血症I型のマスキリング法として簡便、敏速で優れた検査法である。しかしながら、判定が

肉眼による主観的な定性検査であり、また酵素活性が経日的に劣化する欠点がある。我々はその欠点を補う改良法として蛍光マイクロプレートによる抽出法の改善と半定量化と自動記録化を試み、“改良ポイトラー法”として発表した。今回は、その基礎的

(1) 大阪市環境保健協会 (2) 大阪市立大学医学部小児科学教室

検討に加え、1997年4月から98年1月まで実際にマススクリーニングを行い、その結果を報告する。

[方法]

方法：V底 マイクロプレートに、1/8 インチ血液ろ紙1枚と100 μ lのボイトラー試薬を加え、4分間遠心 (2010xg) した。その後、2分間振とうし、プレートシールを行い、37度、1時間ふらん器に入れた。反応終了後100 μ lのアセトン：メタノール混合液 (1：1) を加え、再びプレートシールを行い、15分間遠心 (2010xg) した。蒸留水200 μ lを分注したマイクロストリップウエルに上清50 μ lを加え、1分間振とした後、Em=360 nm Ex=450 nm にて測定した。

[結果]

(1) 1997年4月から1998年1月まで実際に施行したガラクトース血症の新生児マススクリーニング、総検査数23,957人中の17,596人の蛍光強度を、正常コントロールを100%としたヒストグラムでは図1に示したように正規分布を示した。初回検査のカットオフ値を保因者の+1.5 SDとし、再採血要求のカットオフ値を{Sample OD - Blank OD} / {Normal OD - Blank OD} \times 100 で正常の20%以下としたところ、確認検査率3.6%、再採血検査率0.7%、要精検率0.087% (21人) であつた。

(2) 蛍光強度をHbで、すなわち酵素量にて補正したところ、より正規分布にちかいヒストグラムを得ることができた。また、半定量UT活性値は酵素活性の近似値を示

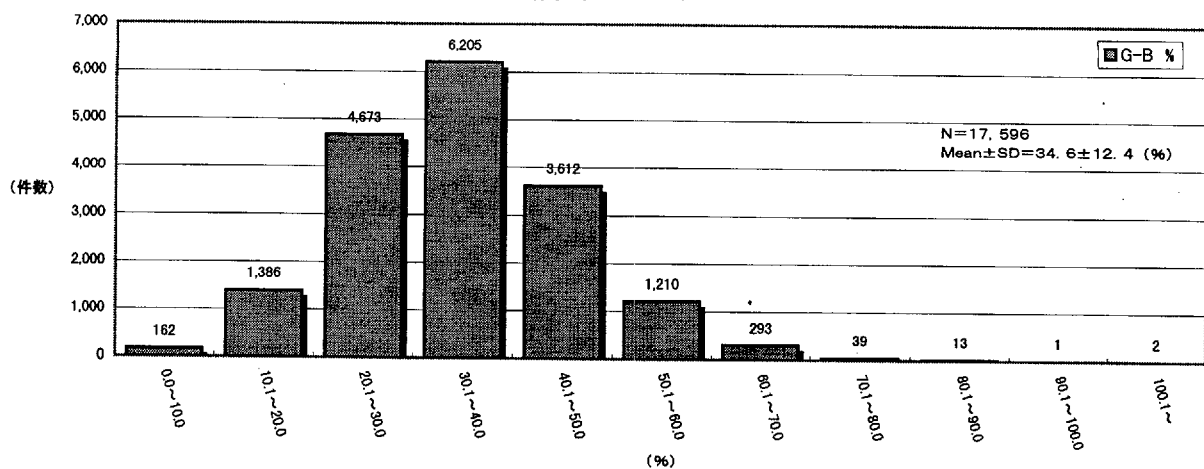
した。

(3) 実際の測定時におけるUT酵素の安定性を検討するために1)採血日から検査日までの所用日数について検討した(図2)。平均所用日数は3 \pm 1.8日で、昨年度の検討結果より、酵素が常温で比較的安定していると考えられる1週間以内に97.5%の検体が検査されていた。2)実際の気温、湿度による再採血率への影響を調べた(図3)。7~9月は気温、湿度ともに上昇しており、再採血率もそれにともない平均0.19%から0.84%へ上昇していた。尚、4~6月の再採血率が上昇しているのは試薬不良のためである。5、11、1月は長期に渡る休日および祭日のため、採血日から検査日まで5日以上経過している検体数がそれぞれ16.9、18.2、28.3%あつたが、再採血率に大きな影響は与えなかった。

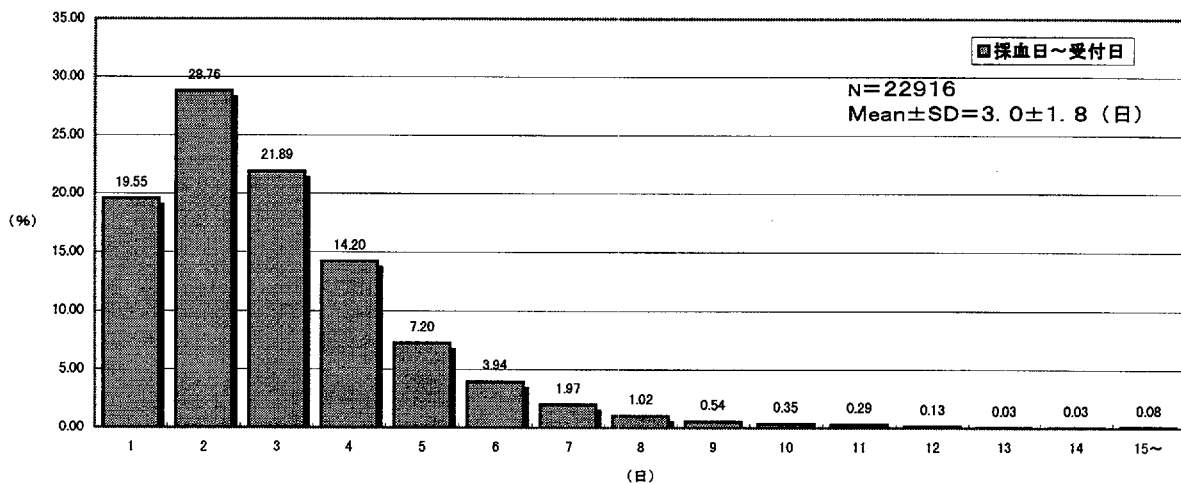
[考案]

改良ボイトラー法は1)測定時間の大幅な短縮、2)抽出率の均一化、3)結果の半定量化と自動記録化、4)検査費用は不変、5)信頼性の向上などの利点があつた。今回、改良ボイトラー法を新生児マススクリーニングに施行したところ、その検査結果は正規分布を示し、再採血率の低下をもたらした。また、その半定量UT活性値から患者、ヘテロ保因者を推測しえた。気温と湿度の影響と検査日までの所用日数の検討結果ではその実用性には大きな影響をあたえず、これまでのボイトラー法と比較して極めて良い方法と考えられる。

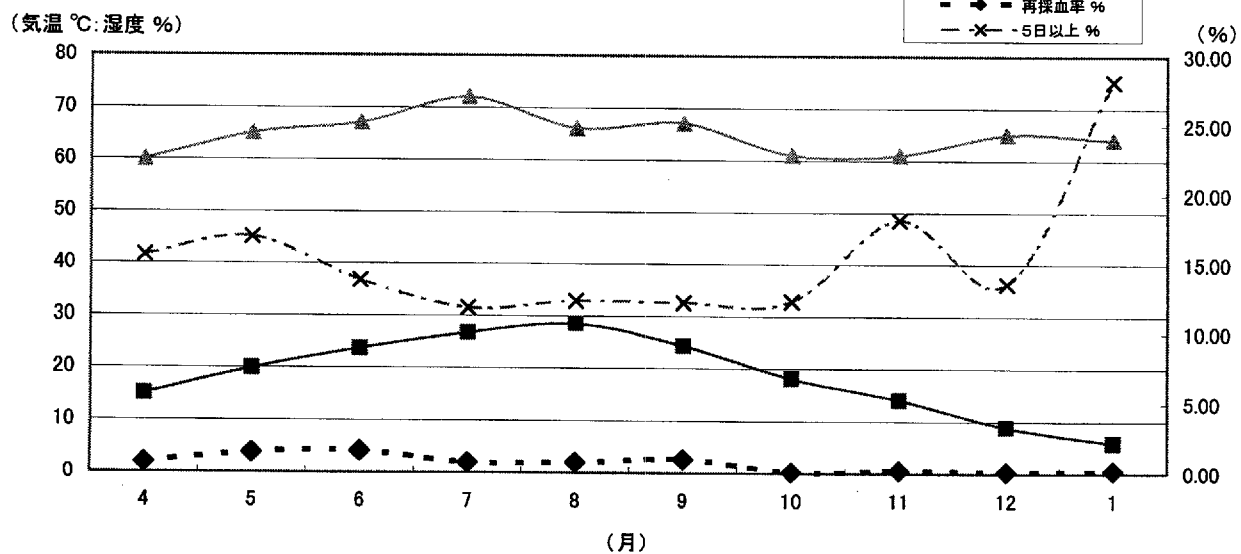
(图 1) G-B %



(图 2) 採血日~受付日



(图 3) 再採血率: 気温: 湿度





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: ガラクトース血症1型のスクリーニング法としてポイトラー法は、簡便、迅速で優れた検査方法である。しかしながら、肉眼による定性検査であり、また酵素活性が経日的に劣化する欠点がある。我々は前回、ろ紙からの酵素抽出効率の均一化による信頼性の向上と、蛍光マイクロプレートリーダーによる半定量化と記録化を可能とする“改良ポイトラー法”を発表した。今回は、基礎的検討に加え、1997年4月から98年1月まで実際にマススクリーニングを行い、その結果を報告する。新生児総検査数23,957人中、確認検査率3.6%、再採血検査率0.7%、要精検率0.087%(21人)であつた。改良ポイトラー法で得られる半定量 galactose-1-phosphate uridylyltransferase(UT)活性値をヘモグロビン(Hb)で補正することで、より正確な値となった。採血日から検査日までの平均所用日数は 3 ± 1.8 日で、前回の安定性を検討した結果から、十分測定が可能である。1週間以内に97.5%の検体が測定されていた。しかし、温度と湿度によるUT活性の低下は避け難く、7~9月の再採血率は上昇した。