

G6PD 異常症スクリーニング法の検討

三 輪 史 朗

藤 井 寿 一

高 橋 圭 介

(東京大学医科学研究所
病態薬理学研究部)

1. は じ め に

G6PD 異常症は世界で最も頻度の高い赤血球酵素異常症であり¹⁾, われわれがすでに行った Beutler のスポットテスト²⁾, および電気泳動でのスクリーニングテストでは日本人(主に山口県下)の頻度は0.1~0.5%であることが明らかになっている³⁾。大半の G6PD 異常症は無症状であるが, 重症例(いわゆる WHO 分類¹⁾の class 1 および class 2) では酸化的薬剤の服用, 感染などにより急性溶血発作を起こす。従って手技が簡単で大量のサンプルが処理でき, しかも感度と精度の高い G6PD 異常症のスクリーニング法の開発は血液学的にも人類遺伝学的にも重要である。今回はこの目的にあう方法を確立するために 2, 3 の方法を検討したので報告する。

2. 方 法

サンプルは正常血液, 重症の慢性溶血性貧血を伴い, 活性が正常の数%と低下し, 電気泳動上 slow-moving な variant である G6PD Fukushima⁴⁾ と, 臨床的には無症状であるが, 活性が正常の約50%に低下し, 電気泳動上 fast-moving な variant である G6PD Ube⁵⁾ を用いた。

1) PKU 濾紙より G 6 P D を溶出し活性を測定する方法

PKU 濾紙に全血10 μ l を塗布し乾燥後, 室温放置と 4°C デシケーター保存の 2 種類に分け, それぞれの条件で1 ヶ月間保存し, その乾燥濾紙血液検体の安定性を検討した。濾紙から小片(3×4 mm)を切り取り, その小片を 270 μ M EDTA, 10 μ M NADP, 7 mM β -mercaptoethanol, 1 mM Epsilone を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 100 μ l を入れ, 0°C, 40 分間振盪し G6PD を溶出させその活性を測定した。

2) 電気泳動法

サンプルの処理は(1)と同じである。10%のデンブングルに 3×4 mm の小片をはさみ Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) で 10 Volt/cm, 8 時間泳動後ホルマザン染色を行った。

3) ホルマザンリング法

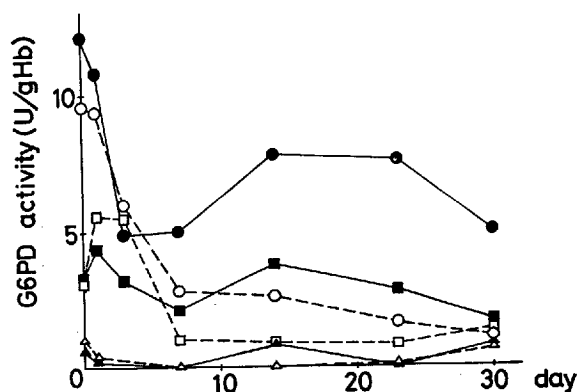
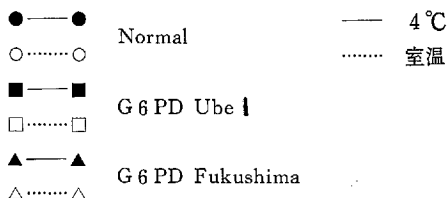


図1 PKU 汙紙より溶出した G 6 P D 活性



あらかじめ 10 mM $MgCl_2$ を含む 100 mM Tris-HCl (pH 6.5) を浸したイオン交換セルロースペーパー (Whatman P81) に 10 μl の血液を塗布し、同様に室温および 4℃デシケーターに 1 ヶ月間保存し検討した。先ず 8 ml の Tris-HCl buffer (pH 6.5) に 10 mg G6P, 2 mg NADP, 2 mg MTT, 2 mg phenazine methosulfate および 6 mg agar を加えた反応プレートを作製する。ゲルプレート表面に血液を塗布した汙紙ディスク検体 (直径 6 mm のパンチ片) を置き、暗所 37℃, 8 時間放置し 8 時間後に汙紙周囲の青色ホルマゼンリングの産生の有無とその大きさを測定した。

3. 結 果

PKU 汙紙より G6PD を溶出し活性を測定する方法では図 1 に示す様に正常血液でも室温放置であれば数日で活性低下が起こり、4℃デシケーター保存の場合は活性低下の程度は少ないものの同様の傾向がみられた。しかも同じサンプルでも活性にバラツキがみられた。電気泳動では 4℃デシケーター保存であれば、7 日目までは図 2 に示す様に正常 G6PD と G6PD Ube の易動度の差は明らかであった。しかしその後活性低下のためにバンドが出にくくなると共に、酵素の酸化によるためか、正常酵素でも新鮮なサンプルより陽極に向かって速くなる傾向を示し、正常酵素と G6PD Ube の違いはあまり明確にならなくなった。図 3 は酵素反応液を含む寒天ゲル上での検体周囲の青色ホルマゼンの大きさを示すが、正常酵素、G6PD Ube, G6PD Fukushima の間の違いは明らかである。乾燥汙紙血液検体の安定性に関しては 4℃デシケーター保存であっても活性低下は当然起こるものの、相対的な差より G6PD 活性が正常の 50%

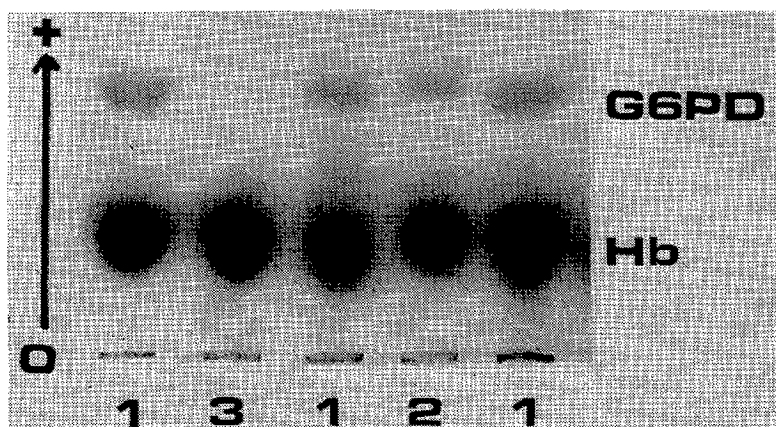


図2 デンプンゲル電気泳動

1: 正常対照, 2: G6PD Ube, 3: G6PD Fukushima

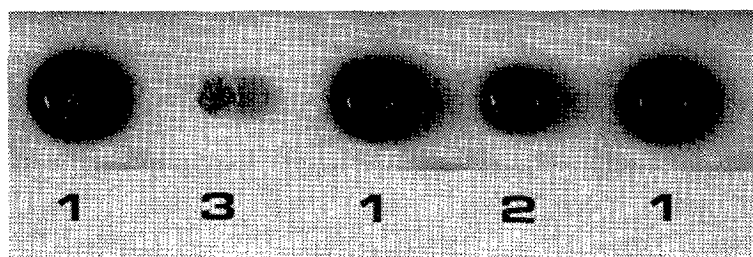


図3 ホルマザンリング法

1: 正常対照, 2: G6PD Ube, 3: G6PD Fukushima

以下であれば保存30日後でも判定は容易であった。

4. 考 察

沱紙より G6PD を溶出して活性を測定する方法は、血液塗布後数日以内に測定しなければならず、また多少手技が煩雑で沱紙よりヘモグロビンおよび酵素の溶出が一定でないため再現性に乏しくマススクリーニングには適さない事が判明した。電気泳動法は7日以内に検索を行わなければならない欠点は残るものの、Beutler の開発したスポットテストおよび今回検討したホルマザンリング法では検出できない活性は、正常で電気泳動上の variant (例えば黒人に非常に頻度の高い G6PD A (+) など) も検出できるので、population survey の目的には不可欠な方法と考えられる。寒天ゲル上でホルマザン色素の青色リングの大きさにて判定する方法は、ヘモグロビンの拡散による判定の困難さはあったが、これは血液を塗布する沱紙を陽イオン交換セルロースペーパーにする事により解決された。すなわち pH 6.5 ではヘモグロビンは正に帯電するので陽イオン交換セルロースに吸着し (多少の拡散はあるものの判定を妨害しない程度である) 沱紙および寒天ゲルの pH が G6PD の pI よりアルカリなので、G6PD は

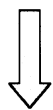
負に帯電し濾紙より容易に遊離しゲル表面を拡散する原理による。この方法はすでに Beutler の報告した陰イオン交換セルロースペーパー (Whatman DE-20) に G6PD を吸着させ濾紙上で染色する方法⁶⁾ よりはるかに簡単に判定が容易である。しかも G6PD 活性が 50%以下であれば決して見逃すことはなく, primaquine, nitrofurantoin, ambilhar などの酸化的薬剤の服用, 感染, 糖尿病性アチドーシス後, 急性溶血発作を起こす危険性のある G6PD 異常症は必ず検出できるので, 臨床的見地からはこの方法で十分である。この方法によれば一験者が一日に数百検体処理することも可能であり, さらに全く特殊な器具を必要とせず肉眼で判定できる点より field survey にも適していると考えられる。

5. ま と め

G6PD 異常症は赤血球酵素異常症の中で最も頻度が高く臨床的にも重要な疾患であり, population study においても重要な遺伝子マーカーとなるので手技が簡単で精度と感度の高いスクリーニング法の開発は重要である。今回われわれが新たに開発したホルマザンリング法は手技は非常に簡単で, 特殊な器具を全く必要とせず, 多検体処理が可能であるのでマススクリーニング法としては非常に良い方法と考えられる。しかし G6PD 活性は正常で電気泳動上の変異酵素も検出する必要がある場合は電気泳動法も行う必要がある。

文 献

- 1) WHO Scientific Group : Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. WHO Tech. Rep. Ser., **366** : 1~53, 1967.
- 2) Beutler, E. and Mitchell, M. : Special modifications of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Blood., **32** : 816~818, 1968.
- 3) Nakatsuji, T. and Miwa, S. : Incidence and characteristics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Japan. Human Genet., **51** : 297~305,
- 4) Miwa, S., Fujii, H., Nakatsuji, T., Ishida, Y. and Oda, S. : Four new electrophoretically slow-moving glucose 6-phosphate dehydrogenase variants associated with congenital non-spherocytic hemolytic anemia found in Japan. Amer. J. Hemat., **5** : 131~138, 1978.
- 5) Nakashima, K., Ono, J., Abe, S., Miwa, S. and Yoshida, A. : G6PD Ube, a glucose-6-phosphate dehydrogenase variant found in four unrelated Japanese families. Amer. J. Human Genet., **24** : 475~484, 1977.
- 6) Fairbanks, V.F. and Beutler, E. : A simple method for detection of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G-6-PD spot test). Blood, **20** : 591~601, 1962.



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



1.はじめに

G6PD 異常症は世界で最も頻度の高い赤血球酵素異常症であり,われわれがすでに行った Beutler のスポットテスト,および電気泳動でのスクリーニングテストでは日本人(主に山口県下)の頻度は 0.1~0.5%であることが明らかになっている。大半の G6PD 異常症は無症状であるが,重症例(いわゆる WHO 分類の class 1 および class2)では酸化剤の服用,感染などにより急性溶血発作を起こす。従って手技が簡単で大量のサンプルが処理でき,しかも感度と精度の高い G6PD 異常症のスクリーニング法の開発は血液学的にも人類遺伝学的にも重要である。今回はこの目的にあう方法を確立するために 2,3 の方法を検討したので報告する。