リソゾーム病2次スクリーニングにおける診断的酵素測定の簡易化の試み

鈴木義之
（東京大学医学部小児科）
桃井隆
古屋達子
（国立武蔵療養所神経センター疾病研究第5部）

われわれは1972年以来，リソゾーム病2次スクリーニングの目的で，白血球その他の患者試料を用いたリソゾーム酵素測定をおこなってきた[1)2)]。初回の分析は主に血液を用い，必要があれば，尿，髄液，線維芽細胞，その他の生検組織についての検索をすることにしている。血液検体は年間150前後の数であるが，酵素測定までにかなりの臨床的吟味がなされており，実際の需要は，これまでわれわれの関係した施設だけでも，上記の数字よりもはるかに多いことが予想される。

これまでのところ，酵素活性測定の操作は，すべて手作業ですすめてきたため，処理能力は小さく，従って検査症例数もあまり多くないという結果となっている。このようなルーチン検査には，完全な自動分析装置を使うのが理想的であるが，この目的のための装置はまだつくられていないので，今回われわれは操作の簡易化，微量化を目的として，測定法の改良を試みた。

材料ならびに方法

酵素測定用の試料としては，正常人およびリソゾーム酵素欠損症患者から得られた末梢血白血球，および培養皮膚線維芽細胞を用いた。後者は胎児牛血清（10%）を加えたF-10培地中で培養し，トリプシン処理後，0.9%生理食塩水で洗浄した。細胞は水に浮遊させ，超音波処理して酵素源とした。

ルーチン検査の目的には，酵素源20 μl，基質液（4-メチルウンベリフェロン誘導体，4 mM）20 μl，およびクエン酸緩衝液（0.2 M, pH 4.5）40 μl を96穴の平底マイクロプレートに分注し，混和後，37℃で30～60分間インキュベートし，グリシン緩衝液（0.2 M, pH 10.7）で反応をとめ，螢光比色をおこなった。測定はコロナマイクロプレート重度計（MT-12）に螢光測定装置をとりつけ，マイクロプレートをそのまま測定できるようにした。励起波長365 nm，螢光波長450 nm の条件で測定した。測定データにNECパーソナルコンピュータ（PC 9801）で処理し，データバンクとして貯えるとともに，測定値はそのままプリントさせ，保存した

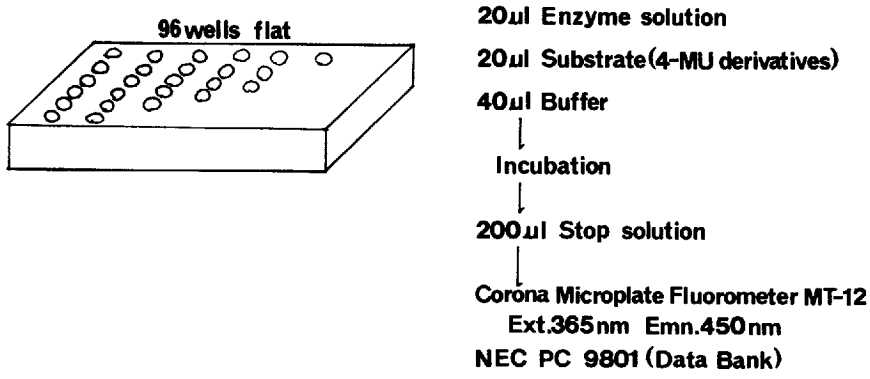

図1　測　定　操　作

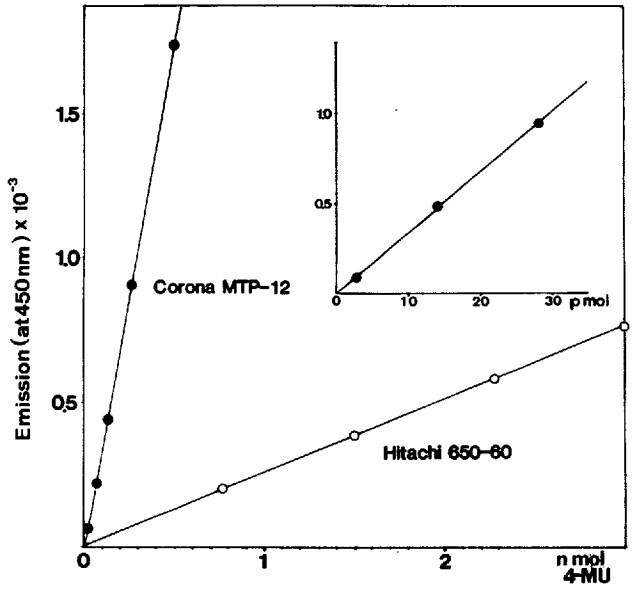

図2　4-メチルウンベリフェロンを用いた標準曲線

(図1)。

同時に4-メチルウンベリフェロンの螢光感度についての検討もおこなった。

結　　果

4-メチルウンベリフェロンの螢光強度を調べ，現在ルーチン測定に用いている日立650-60型螢光比色計の感度と比較してみた。後者を通常の試料量（3 *ml*）で測定した場合とくらべ，この化合物の螢光絶対量の検出は，計算上，はるかに高感度であった（図2)。マイクロプレートの素材が合成樹脂であり，それ自体螢光を発生する性質があるため，極微量の螢光検出にはやや不利な点があるが，1～10 pmol の量は検出可能であった。

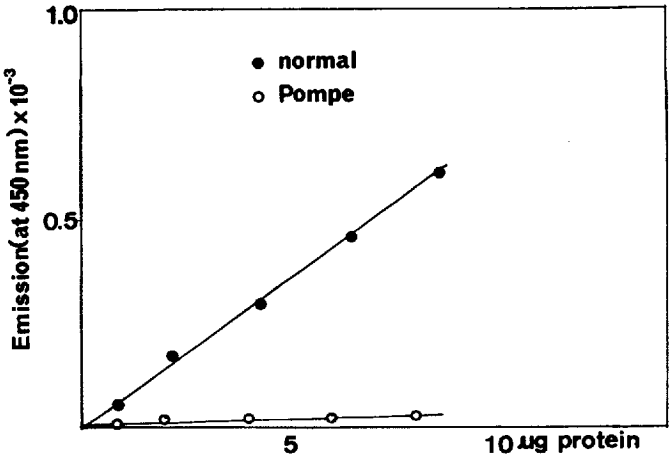

図3　Pompe 病における α-glucosidase 活性（線維芽細胞）

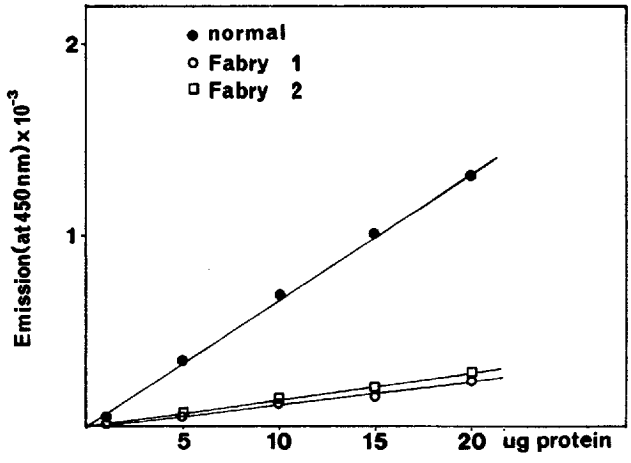

図4　Fabry 病における α-galactosidase 活性（線維芽細胞）

次にいくつかの酵素欠損細胞における測定をおこなった。Pompe 病（α-glucosidase 欠損症，図3），Fabry 病（α-galactosidase A 欠損症，図4），Sandhoff 病（N-acetyl-β-hexosaminidase 欠損症，図5）の線維芽細胞を用いての検討は，すべて対照細胞と酵素欠損細胞を明確に区別できることを示していた。

Gaucher 病（β-glucosidase 欠損症）および G_{M1}-gangliosidosis（β-galactosidase 欠損症）については，末梢血白血球中の酵素活性を測定してみた（図6）。Gaucher 病患者では20～30％程度の残余活性が検出されたが，対照群とは明らかに識別することができた。G_{M1}-gangliosidosis 患者はほぼ完全な酵素欠損を示し，患者両親も活性低下を示す obligate heterozygote としての診断が可能であると思われた。

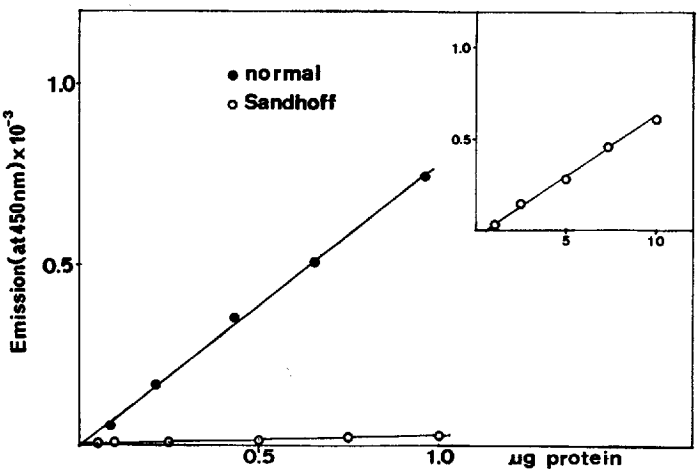

図5　Sandhoff 病における N-acetyl-β-hexosaminidase 活性
（線維芽細胞）

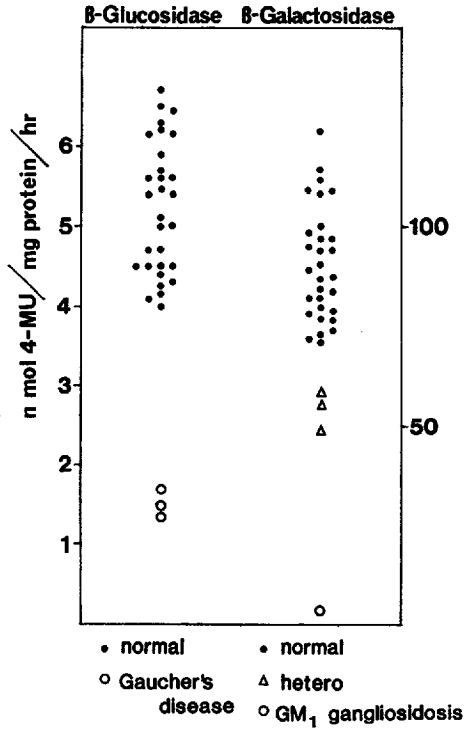

図6　白血球中における β-glucosidase
及び β-galactosidase 活性

考　　察

ある特定の化学分析法を臨床診断に応用するには，いくつかの技術的要求を満たす必要があるが，なかでも小児科領域においては，試料の量の制限という，極めて実際的な因子も考慮しなければならない。また，多数検体を扱うためには，測定操作の簡便化，自動化をすすめる必要がある。

リソゾーム酵素の測定は，リソゾーム病の診断に欠くことのできない検査であり，われわれの研究室では診断的酵素測定をおこなってきたが，検査需要は増加する一方である。そこで少量の検体を用い，多数を迅速に処理する方法の検討をおこなっているが，今日は，インキュベーション以後の操作を簡便化する目的で，免疫学的操作に用いるマイクロプレートの使用を試みた。

これにより，個々のチューブを扱う必要がなくなり，検体の多数処理が極めて容易になった。極めて微量の螢光物質を検出しようとする場合には，このプレート自体の螢光の存在が問題になるが，われわれのルーチン検査のレベルの螢光測定においては，バックグラウンドノイズは相対的に低く，数 pmol 程度の量が充分に測定可能であった。このプレートを用いることにより，最終的な反応液量を減らすことができ，従って相対的に検出感度を増加させることになった。今回の実験結果でみる限り，酵素液量と，反応速度は比例し，この点でも実用に供することが可能であることが示された。

検出感度をあげるという目的には，われわれはサイクリング法の採用[3)4)]，微量螢光検出法の工夫[5)]をおこない，成果をあげてきた。これらには特殊な技術，装置が必要であるが，今回の方法は広く用いることができるため，さらに自動化をすすめるべく，工夫をすすめたい。

文　　献

1) 柯　佑民，福岡和子，桜庭　均，林　和代，山中龍宏，鈴木義之：遺伝性リソゾーム病の生化学的診断—東大小児科における9年間の診断成績—．小児診療，**45**：772，1982.
2) Suzuki, Y.: Enzymatic diagnosis of lysosomal diseases. An experience in a clinical laboratory during the period 1972～1980. Acta Prediat. Jp., **24**: 25, 1982.
3) Kato, T. and Suzuki, Y.: Enzymatic micro-determination method for galactocerebrosidase (EC 3, 2, 1, 46) in tissue samples. Proc. Japan Acad., **55B**: 69, 1979.
4) Tsutsumi, O., Sato, K., Sakamoto, S., Suzuki, Y. and Kato, T.: Application of a galactosylceramidase microassay method to early prenatal diagnosis of Krabbe's disease. Clin. Chim. Acta, **125**: 265, 1982.
5) Suzuki, Y., Yokota, S., Kobayashi, N. and Kato, T.: Application of ultramicrotechnique for the diagnosis of hereditary metabolic diseases. Acta Pardiat. Jpn., **23**: 44, 1981.

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

われわれは1972年以来,リソゾーム病2次スクリーニングの目的で,白血球その他の患者試料を用いたりソゾーム酵素測定をおこなってきた。初回の分析は主に血液を用い,必要があれば,尿,髄液,線維芽細胞,その他の生検組織についての検索をすることにしている。血液検体は年間 150 前後の数であるが,酵素測定までにかなりの臨床的吟味がなされており・実際の需要は,これまでわれわれの関係した施設だけでも,上記の数字よりもはるかに多いことが予想される。

これまでのところ,酵素活性測定の操作は,すべて手作業ですすめてきたため,処理能力は小さく,従って検査症例数もあまり多くないという結果となっている。このようなルーチン検査には,完全な自動分析装置を使うのが理想的であるが,この目的のための装置はまだつくられていないので,今回われわれは操作の簡易化,微量化を目的として,測定法の改良を試みた。