

マスキリーニング施行中に新しく派生 した諸問題の検討

(分担研究;ガラクトース血症の鑑別診断)

川村正彦・藤村有信*

要約

ガラクトース血症のマスキリーニングでペイゲン法のみ異常高値を示す症例については、ガラクトカイネース欠損症か否かの鑑別を行う必要がある。このため本症のマスキリーニング法をアイソトープを用いず、ガラクトースをガラクトース脱水素酵素で Galactonolactone とし、このとき共転する NADH の蛍光を求めることでガラクトカイネース活性を測定する方法を考案した。現在実際の症例について実施中である。

見出し語：ガラクトース血症

ガラクトカイネース欠損症

蛍光測定法

研究方法

ガラクトカイネース (GK) 活性測定にはアイソトープを用いる方法があるが、マスキリーニングセンターでアイソトープの使用は不向である。蛍光法で多数の検体を短時間で処理できる方法が強く望まれるようになったのは、ガラクトース血症のマスキリーニング法としてペイゲン法が普及し、ガラクトースのみ高値を示し GK 欠損症を疑われ確定診断に困る症例が急増して来たことによる。我々は

血液ディスク 1~2 個でマイクロプレートを用い 300 検体を 4 時間で蛍光により GK 測定できる方法を考案した。

1. 測定原理

GK は Gal から gal-1-p への過程に働くが、この時 Aldose reductase も働くのでこれを阻害する α -ketoglutarate と Gal から galactonolactone へ行く経

・名城病院小児科 (Dept. of Pediatrics, Meijo Hospital)

* 名古屋市衛生研究所 (Nagoya City Health Research Institute)

路に働く galactose oxidase を H_2O_2 で阻害することにより GK だけの活性をみる ことができるようにし, gal を β -Gal. dehydrogenase で galactonolactone とし, このとき共転する NADH の蛍光を測定 することで GK の活性を求める。

2. 測定方法

血液濾紙のディスク 3 mm 径 1 個を Falcon の薄いディスパーザブルプレートに入れ, 有機 溶剤混合固定液 $10\mu l$ を加え $37^\circ C$ 15 分放 置, さらに固定液とエーテル比 3 : 1 の溶液 $10\mu l$ を加え $37^\circ C$ 30 分処理をして血色素 を変性固定させ, 抽出操作を行う。反応組成 液は Gal 1 mM, NaF 1 mM, $MgCl_2$ 8 mM, ATP 60 mM, サポニン 0.01%, Tris HCl, pH 7.4 200 mM, H_2O_2 0.1%, α -KG 1 mM でこの $100\mu l$ を用 いる。 $37^\circ C$ 60 ~ 90 分反応させ, さらに NAD 1 mM, β -Gal DH 1 2.5 mU の 合計 $120\mu l$ を加えて $37^\circ C$ 60 分反応。 その $60\mu l$ を Dynatec の測定用白色プレー

トに分注コロナ電気マイクロプレート用蛍光 光度計 MTP-32F で測定する。

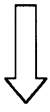
3. 結果

Gal 濃度は 0.1 mM まで直線となり 1 ~ 2 mM で飽和した。血液ディスクは 2 個まで GK 活性は比例した。time course は 2 時間迄 は直線で増加, 3 時間以上で最大速度に達し たので本法は十分実行になると考えられた。

実際に GK 欠損症の血液ディスクを用いて 測定を行うと症例 1 ではアイソトープで測定 したと同様 GK 活性ゼロを示したが, 症例 2 ではわずかではあるが活性を示した。

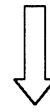
4. 考察

基礎検討では GK と競合する酵素 Aldose reductase, gal oxidase を十分阻害剤 で抑える条件を設定したはずであるが, 実際 の症例では不十分な時もあることが判明して いる。今後はさらに条件を検討し, 完全な方 法としたい。



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

ガラクトース血症のマス・スクリーニングでペイゲン法のみ異常高値を示す症例については、ガラクトカイネース欠損症か否かの鑑別を行う必要がある。このため本症のスクリーニング法をアイソトープを用いず、ガラクトースをガラクトース脱水素酵素で Galactonolactone とし、このとき共軛する NADH の蛍光を求めることでガラクトカイネース活性を測定する方法を考案した。現在実際の症例について実施中である。