

SBD-F ケイ光誘導体化による血液中 総ホモシステインの定量について

大柳 和彦¹⁾, 山口 昭弘²⁾, 福士 勝²⁾, 水嶋 好清²⁾, 高杉 信男²⁾

要 約： ホモシスチン尿症の診断上、血清ホモシスチンの測定が極めて重要になるが、ホモシスチンは血清タンパクと容易に結合するため、結合型も含めた総ホモシステインの測定が不可欠である。そこで、我々は、ジチオエスリトール (DTE) 環元処理と 7-fluorobenzo-2-oxa-1, 3-diazole-4-sulfonate (SBD-F) ケイ光誘導体化¹⁾ を組み合わせて、HPLCにより、血液中総ホモシステインを簡便、正確に測定する方法を検討した。

見出し語： ホモシスチン尿症、総ホモシステイン、新生児スクリーニング

研究方法： 血清、全血は 2.5mMEDTA で 380, Em 525 nm) で行う。

5 倍希釈した溶液を、乾燥ろ紙血は、3mm disc

1 枚を 2mMEDTA 30 μ l で抽出 (30 分ミキシング) した溶液をそれぞれの試料溶液とする。

試料溶液 20 μ l に、4mM DTE, 1.2 M Na₂SO₄, 0.02M Tris-5mM EDTA (pH9) 溶液

20 μ l を加え、10 分後に、0.2M Tris-50 m M

Arsenite (pH8) 溶液 40 μ l, 20 mM SBD-F

20 μ l を加え、60 °C, 1 時間反応後、0.3N HClO₄

100 μ l で除タンパクした上清 20 μ l を HPLC

に注入する。カラムは Inertsil-ODS

(4.6 \times 150 mm, ガスクロ工業), 溶離液は

0.1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄, 2% CH₃CN (pH

6.5) を用い、流速 1 ml/min, ケイ光検出 (Ex:

結 果： 保持時間 10 分以内にシステイン、ホモシステイン、システアミン、グルタチオンの順に分離され、標準溶液による検量線の

直線性はホモシステイン、システインともに

良好であった (Fig. 1)。添加回収率は、ホ

モシステイン、システイン、いずれも血清に

おいては定量的な結果が得られたが、全血、

ろ紙血では約 50% と低値であった (Table 1)。

本法による血清総ホモシステイン、システイ

ンの正常平均 \pm SD (n=8) は、それぞれ 8.9

\pm 2.3 μ M, 250 \pm 17 μ M であり、ホモシスチ

ン尿症患者児では総ホモシステイン 138 μ M と

1) 札幌医科大学小児科 (Dept. of Pediatrics, Sapporo Medical College)

2) 札幌市衛生研究所 (Sapporo City Institute of Public Health)

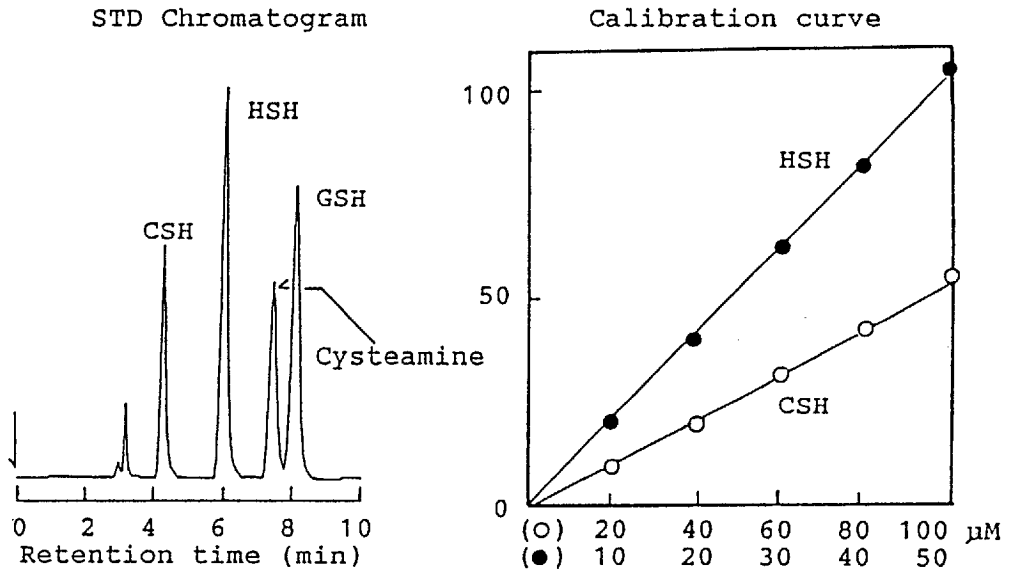


Fig. 1. Standard chromatogram and calibration curve.
 CSH: cysteine, HSH: homocysteine, GSH: glutathione

Table 1. Recovery of cysteine and homocysteine from blood specimens

	Added (µM)	Cysteine		Homocysteine	
		Found (µM)	Rec. (%)	Found (µM)	Rec. (%)
Serum	0	217	-	11.1	-
	100	328	111	110	99
	200	410	96	202	95
Blood	0	140	-	9.2	-
	100	196	56	66.9	58
	200	263	62	133	62
DBS*	0	54.6	-	nd	-
	100	88.2	34	59.5	60
	200	135	40	154	77

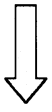
* Dried blood spot

考 察：ホモシステインは、採血後の室温放置、また凍結処理によっても血清タンパクと容易に結合するため、通常の操作による除タンパク上清を測定した場合には、患児においてさえ、検出されない場合も知られている²⁾。このため、除タンパク沈澱と結合したホモシステイン測定の重要性が注目されてきており^{2・3)}、除タンパク沈澱をメルカプトエタノール処理後、アミノ酸分析計によりホモシステインとして測定する方法³⁾が、一般的に用いられている。しかし、この方法は操作の繁雑さと測定に長時間を要することから、広く普及するにはいたっていない。本法は、DTE環元処理、SBD-F誘導体化後、除タンパクを行なう一連の簡便な操作で、血清総ホモシステインを総システインとともに迅速、正確に測定でき

る方法である。従って、ホモシステイン尿症の簡便かつ確実な診断法として非常に優れた方法であると言える。また、ろ紙血を用いても、回収率は50%ではあるが、ホモシステイン尿症患児の検出は十分可能であり、スクリーニング施設におけるメチオニン高値検体の確認検査としても有用である。

文 献

- 1) Toyo'oka T., Imai K., J. Chromatogr., **282**, 495 (1988)
- 2) 黒田泰弘, 武田英二, 「厚生省心身障害研究マス・スクリーニングに関する研究」昭和62年度研究報告書, p29 (1988)
- 3) Kang S. S., Wong P. W. K. Becker N., Pediat. Res., **13**, 1141 (1979)



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:ホモシスチン尿症の診断上,血清ホモシスチンの測定が極めて重要になるが,ホモシスチンは血清タンパクと容易に結合するため,結合型も含めた総ホモシステインの測定が不可欠である。そこで,我々は,ジチオエスリトール(DTE)環元処理と7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate(SBD-F)ケイ光誘導体化¹⁾を組み合わせ、HPLCにより,血液中総ホモシステインを簡便,正確に測定する方法を検討した。