平成元年度厚生省心身障害研究
「代謝疾患・内分泌疾患等のマス・スクリーニング，
進行阻止及び長期管理に関する研究」

ガラクトカイネース欠損症のスクリーニング法
（分担研究：現行マススクリーニング対象疾患の精査上の問題点に関する研究）

藤　村　有　信*　川　村　正　彦**

要約　アイソトープを使用しないで蛍光でもってガラクトカイネースの活性を精度よく，測定する方法を検討した。蛍光の感度を高めるためにresazurinとdiapliorase によるNAD cyclingを新しく導入検討して良い結果を得た。従来法は血液50μl 使用していたが，本法では乾燥沪紙血液が使用出来，わずか3㎜径disc　1～4個で測定可能であり，従来galactoseとgalactose－1－Pの分離にDEAE－Cellulose を用いられていたが溶出に時間がかかるため，新しく簡便迅速としてDE81のdisc Paper（2.3㎝）5枚を含む注射筒用ポリカーボネート沪過器やHPLCの前処理用のカラムのSeppak QMAカートリッジを用いて非常に速く処理出来るようになった。本法はアイソトープ施設のないスクリーニングセンターでもガラクトカイネースを測定することが出来る利点がある。

見出し語：Galactokinase，ガラクトース血症，蛍光法，NAD cycling，Gal－1－P

研究方法

方法はShin-Buehringらの方法[1)]を改良した。系1はGal 100nmol，$MgCl_2$ 1.6μmol，NaF 0.8μmol，ATP 1.5μmol，saponin 0.2％，血液沪紙disc（3㎜∅）4個を含む0.01MトリスHCI buffer（pH8.0）200μl，系2と系3はblankで予め95℃，2分血液のみ加熱失活させ，よく懸濁して他の組成を加える系2か，Galのみ系1より除いた系3のいづれかを使う，反応液37℃，2～4h間反応させ，系1と系3は95℃，2分加熱失活させ反応をとめ，ice bath 中にてよく懸濁させ，遠心分離（3,000r.p.m，10分）後上清の内100μlをDEAE－Sephacel カラム（0.8ml，∅1㎝×1㎝）か簡便迅速法としてはDE 81 disc paper（2.3㎝）を含む注射筒用ポリカーボネート沪過器（25㎜∅，ザルトリウス製SM165 17E）か，seppak accell

＊名古屋市衛生研究所（Nagoya City Puplic Health Research）
＊＊名城病院小児科（Dept. of Pediatrics，Meiio Hospital）

QMAカートリッジにチャージする。(これらの陰イオン反応基には蛍光の汚れがあるので使用直前にIMNaClと水さらに0.2 NHClと水さらに0.1 NNaOHと水により蛍光を0にしておくことが必要である。また試薬に使用する水は超純水を用い，ポリ容器からの蛍光溶出に注意を払うことは勿論のことである。)まず水10 mlでカラムからGalを洗い流し，次いで0.2 NHCl 6～10 mlでGal－1－Pを回収する。系3も同様にして行う。回収したHCl 4 mlに1.1 NNaOH200μlと水0.8 ml，0.2 MトリスHCl(pH8.0)1 ml計6 mlにする。標準物質はGal－1－P 10nmolを0.01 MトリスHCl(pH8)200μlに溶かし，その100μlを2.4 mlの水と0.2 Mbuffer 0.5 mlにまぜ3 mlとする。blankは5 mlの水と0.2 Mbuffer 1 ml計6 mlとする。さらに系1系3とblankの中に2 mM resazurin 20μlとdiaphorase 40 mUを，また標準系には10 μlと20 mUを加えよく混合した後，標準系以外の系はそれぞれ3 mlを別に分注し，それらと標準系にNAD 100nmol(10μl)とAP(アルカリホスファターゼ)4U(10μl)とβGal DH(ガラクトース脱水素酵素)50 mU(10μl)の計30μlを加えて37℃，1 h間反応させ95℃ 5分間放置後流水につける(NAD$^{\oplus}$とする)。残りの溶液はNADなどの反応液を加えず，そのまま蛍光を測定する(NAD$^{\ominus}$とする)。蛍光は日立蛍光光度計650－10S型でレンジN，感度0.3または1でEx 569 ㎜，Em 586 ㎜で測定する。ガラクトカイネースの活性mU(nmol／min／g Hb)＝10$^{\text{nmol}}$×5×{(系1－系3)$^{\text{NAD}\oplus}$－(系1－系3)$^{\text{NAD}\ominus}$}×{1／(staの蛍光－blankの蛍光)}×(1／240 min)×Hbfacter(Hbfacter：1,000,000／4 discのHbμg)

結　果

ガラクトカイネース活性に及ぼすATP濃度の影響を検討した。反応最終濃度で7.5～15mM(1.5～3μmol／200μl)が最適であった。45 mMで50％活性が低下した。DE 81 paper disc 5枚のGal－1－Pの吸着は約8.1nmolであった。つぎにNAD cyclingの反応条件を検討した。まずresazurinの最適濃度は20nmol／3.02 mlで，これ以上でも以下でも蛍光強度は減少した。この濃度のときのdiaphorase量検討したところ，400mU／3.02 ml で蛍光強度は最大になったがこの酵素ではGal－1－Pの低濃度域(0～5 nmol)で基質量と蛍光量は比例しないことが，また10 mU以下では基質5 nmol以上で比例しないことが明らかとなり，最適量の20～40mUで0～10nmolまで比例した。反応時間は37℃，1 h間が良い。図1(a)はDEAE－sephacelのカラムで血液disc 3 ㎜径の使用数と活性との関係を示している。血液50μlに相当する23個まで比例している。通常37℃，4 h間反応で4個のdiscが最良と思われる。図1－(b)は血液disc 4個を用いたとき，37℃4 h間までカイネース活性は比例している。またdisc 1個で37℃，17 h間反応でも測定出来るが，既して失活する傾向にあるので，4 h間以内の反応がよい。図2は名城病院から送付された新生児沪紙血で採血後2日目の63名のカイネース活性の分布を示している。平均活性22.5±10.1(51.7～6.1)mUであった。新生児期に発見された欠損症は0 mUで黒の星印で書かれている。0～7 mU

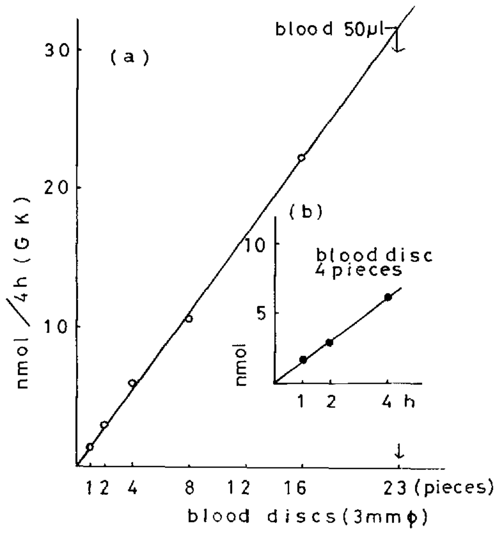
は一つ目安としてヘテロと考えられる。欠損症の一人の患児の両親はヘテロであった。

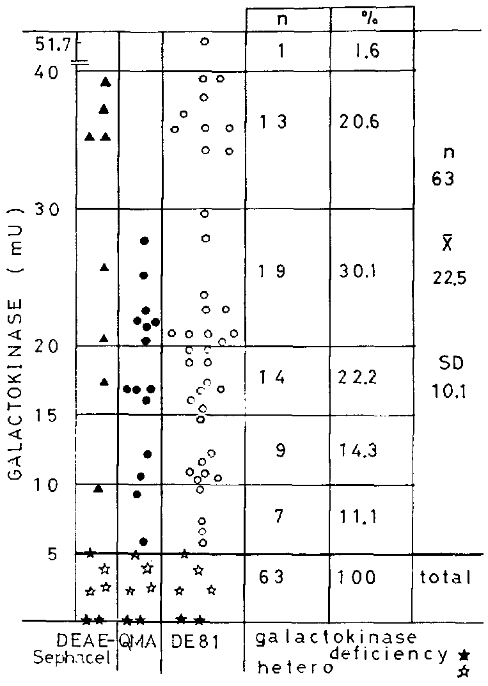
考　察

Shin-Buehringら[1)]のアイソトポプ法はカイネース測定の精度は高いがアイソトープの危険性と測定に労力と時間を要する。従来の蛍光法は共存する他の酵素や蛍光物質の影響で安定性に欠ける面があった。本法は蛍光でもって精度良く測定出来，乾燥沪紙血3㎜径1～4個で測定が出来，簡便迅速なDE81 paper disc沪過装置やQMAカートリッジを用いて測定が出来るのでアイソトープ施設のないスクリーニングセンターでガラクトース血症の型別診断が可能になった。

文　献

1) Shin-Buering, Y.S. et al. Clin, 74, 1(1977)





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 アイソトープを使用しないで蛍光でもってガラクトカイネースの活性を精度よく,測定する方法を検討した。蛍光の感度を高めるために resazurin と diapliorase による NAD cycling を新しく導入検討して良い結果を得た。従来法は血液 50μ1 使用していたが,本法では乾燥濾紙血液が使用出来,わずか 3 mm径 disc1～4 個で測定可能であり,従来 galactose と galactose-1-P の分離に DEAE-Cellulose を用いられていたが溶出に時間がかかるため,新しく簡便迅速として DE81 の disc Paper〔2.3 cm)5 枚を含む注射筒用ポワカーボネート濾過器や HPLC の前処理用のカラムの Seppak QMA カートリッジを用いて非常に速く処理出来るようになった。本法はアイソトープ施設のないスクリーニングセンターでもガラクトカイネースを測定することが出来る利点がある。