

濾紙血液ホモシステイン測定 についての検討

(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)

大柳和彦¹⁾，山口昭弘²⁾，菊地由生子²⁾，高杉信男²⁾

要約： ホモシステイン尿症の新生児マススクリーニングを目的とした微量蛍光定量法(MFL)および確認検査，診断のための高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による乾燥濾紙血(DBS)中のホモシステイン(HSH)測定法について検討した。

見出し語： ホモシステイン尿症，総ホモシステイン，新生児スクリーニング

研究方法： 直径3mmの血液ディスクを試料として，ジチオエリトリトール(DTE)によるジスルフィド還元処理の後，チオール基の発ケイ光試薬 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD-F)を用い，HSHをケイ光誘導体としてマイクロプレートリーダー(コロナ電気製MTP-100F型)またはHPLCにより測定する。操作をFig. 1に示したが，還元を用いた過剰のDTEは分子内ジチオールであることから亜ヒ酸イオンにより7員環錯体としてマスクし，またMFLの場合，妨害となる血球中に大量に存在するグルタチオン(GSH)のSH基は，グルタチオン-S-アルキルトランスフェラーゼ(GSA)と1-Cl-2,4-ジニトロベンゼン(Cl-DNB)によりマスクした。HPLC

の条件は既報¹⁾に従った。

結果： ヘパリン血にHSHを添加し調製したDBSを用いてMFL，HPLCでの定量性を検討した。両測定法とも0-1000 μ Mの範囲で良好な直線性を示したが，MFLではHPLCよりも100 μ M程度高値を示した。再現性は両法とも測定内変動係数(HSH 200 μ M添加，n=5)が10%以下と良好であった。しかし，添加回収率(HSH 100，200 μ M)は，いずれの方法でも低値を示し，新鮮血に添加した場合は30-40%，37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした血液を用いた場合は約60%と差が認められ，インキュベーションによりHSH定量値はシステイン(CSH)値とともに増大した(Fig. 2)。一方，HSH添加DBS中のH

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)

SH関連代謝物を測定したが、シスタチオン、CSH、S-アデノシルホモシステインおよびMetの変動は認められなかった。

MFLによる新生児8,122例の測定結果は、ほぼ正規分布を示し、Mean±SD: 116±40, Range: 0-321μMであり、Mean+2SDの200μMを一次のカットオフとして、これ以上の検体についてはHPLCによる確認検査を行った。これまで、26,792例をMFLでスクリーニングし、163例(0.61%)をHPLCで確認したが、HSH増大例は認められていない。Fig.3に一般検体およびHSH添加DBSのクロマトグラムを示したが、3mmディスク1枚で正常レベルのHSH検出が可能であることが分かる。

考察：血液試料中のHSH測定においては、大部分のHSHがジスルフィド結合によりタンパクSH基と結合して存在することから、総量の測定にはチオールへの還元処理が不可欠であり、血清試料ではDTEによる還元処理により回収率は問題なく定量可能である¹⁾。DBS試料での回収率が低い点については、血球成分との強固な結合あるいは、添加後、酵素的に他の物質に変換されていることが考えられるが、全血のインキュベーションによりHSH定量値は増大すること(Fig.2)、HSH関連代謝物の動きは認められないことから、ジスルフィド結合以外の結合状態で血球成分に補足されているものと思われる。また、MFLでHPLCに比し高値を示す原因は、残存GSH、

CSHなど他のチオール化合物も測定されてくるためであるが、一次スクリーニング法としてはHSHの増大を確実に検出できれば、実用上問題はないと考えられる。カットオフについては、治療中の患児およびHSH200μMを添加したDBSの測定値が、Mean+3SD以上を示したことから、Mean+2SDとしたが、今後、新生児期の患児DBSを用いた測定データを蓄積した上で検討する必要がある。

ホモシスチン尿症の新生児スクリーニングは、測定法の制約により二次的に増大するMetを指標として行われてきた訳であるが、実際の患児見逃し例も報告されていることから²⁾、本報のDBS試料HSH測定法は定量値自体の信頼性には欠けるものの、一定の採血条件下では、一定の回収率が得られており、患児の検出、診断は十分可能であると考えられ、ホモシスチン尿症のスクリーニング法として検討を加えて行く価値は高いと言える。

文献

- 1) 山口昭弘ら：高速液体クロマトグラフィーによる血中総ホモシステインおよび総システイン測定法の開発、臨床小児医学, 37, 1989, 1989
- 2) 黒田泰弘ら：新生児期に診断しえなかったホモシスチン尿症の兄弟例、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63年度研究報告書, p111, 1989

[Microassay]

3 mmø blood disc
 — Denature solvent 10 µl
 (MeOH:Acetone:H₂O)
 Dry for 30 min at 60°C
 — DTE soln. A 50 µl
 [2 mM DTE
 0.01 M Tris-5 mM EDTA (pH9)
 0.6 M Na₂SO₄]
 Vibrate for 10 min
 40 µl
 — [0.2 M Tris-50 mM As (pH8) 20 µl
 0.1 mg/ml GSA 10 µl
 1 mM Cl-DNB 10 µl]
 30 min, 25°C
 — 5 mM SBD-F 20 µl
 1 hr, 60°C
 — 0.2 M H₃PO₄-0.02% Triton 100 µl
 Stand for 10 min
 Measure FL 410-530 nm

[HPLC]

3 mmø blood disc
 — 2 mM EDTA 30 µl
 Vibrate for 30 min
 20 µl
 — DTE soln. B 20 µl
 (x 2 concn. of
 DTE soln. A)
 Stand for 10 min
 — 0.2 M Tris-As 40 µl
 — 20 mM SBD-F 20 µl
 1 hr, 60°C
 — 0.3 N HClO₄
 Centrifuge 10,000 rpm, 5 min
 Inject 20 µl

Fig. 1 Procedures for measurement of HSH in DBS samples

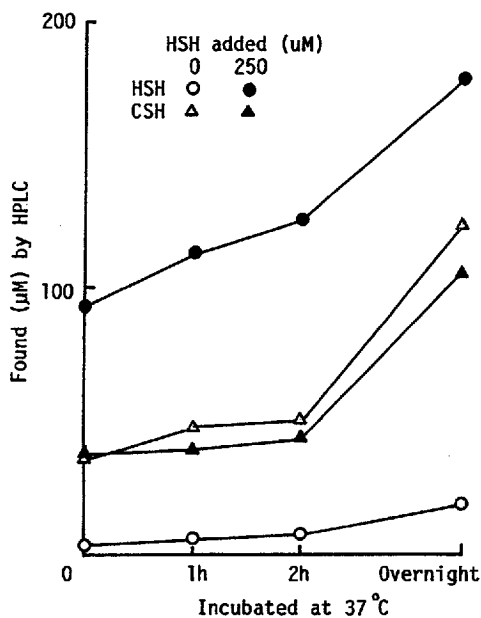


Fig. 2 Effect of blood incubation before spotting on filter paper

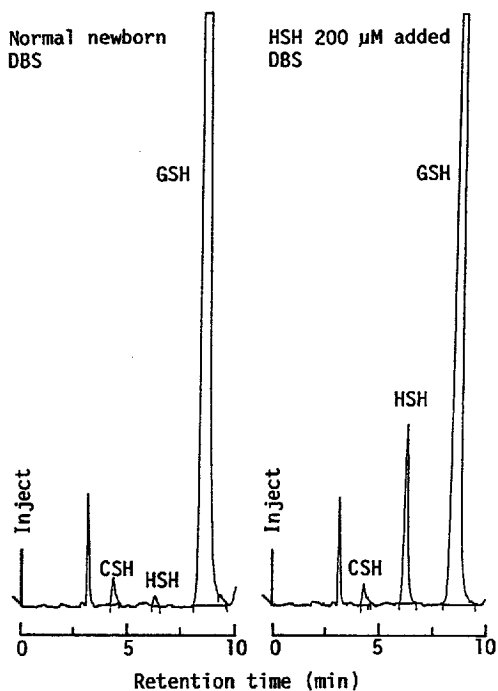


Fig. 3 Chromatograms of DBS samples



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新生児マススクリーニングを目的とした微量蛍光定量法(MFL)および確認検査, 診断のための高速液体クロマトグラフィー(HPCL)による乾燥濾紙血(DBS)中のホモシステイン(HSH)測定法について検討した。