

メチルマロン酸血症の新しい簡易酵素診断法

(分担研究：マススクリーニングの新しい対象疾患とその実施年齢およびスクリーニング法
に関する研究)

菊地正広、多田啓也、成澤邦明

要約：HPLCによるメチルマロン酸血症の迅速、簡便な酵素診断法を開発した。メチルマロン酸血症はその酵素学的原因により予後、治療法に多大な差異を生じるため本法を用いた早期の酵素学的診断は臨床的に非常に有用であると思われた。

メチルマロン酸血症 HPLC

研究方法：メチルマロン酸血症患児13例、正常対照15例の線維芽細胞を用いた。患児13例中、症例1から9は臨床的にビタミンB₁₂不応型、症例10から13はビタミンB₁₂反応型である。線維芽細胞はMEMまたはビタミンB₁₂を最終濃度1 µg/mlになるように加えたMEMで4日間培養したものをハーベスト後、水でsonicationしその遠心上清を酵素液として用いた。ムターゼ活性測定反応系はTotal 180 µlで0.2 M Tris-sulfate, pH7.5, 5 µM AdoCblにsonicate上清を加え、37°C, 10 分間preincubation後、2mM MMCoA 36 µl 加え反応開始した。37°C, 10 分間反応後、10 % TCA 70 µl で反応停止し12000 rpm, 10分間遠心、その上清を1 M Tris base で中和後HPLCに注入した。HPLCカラムはNOVA-PAK™C18を用い、移

動層は0.1 M Na₂P0₄.7.5 % MeOH, pH4.0で、流速1 ml/min.で流出、254 nmでサクシニルCoAを検出した。

結果：HPLCによるサクシニルCoAの検出感度は0.1 nmoleであった。本反応系における酵素反応は蛋白量250 µlまで、反応時間は15分まで直線性があった。本法で測定したメチルマロン酸血症患児13例、正常対照10例のメチルマロンCoA ムターゼ活性を表に示す。正常対照者線維芽細胞をビタミンB₁₂を添加しない培地で培養した場合、AdoCbl(-)系でのホロムターゼ活性は検出感度以下、AdoCbl(+)系での総ムターゼ活性は2019±434 pmoles/min./mg prot.であった。これに対しビタミンB₁₂添加培地で培養した場合、AdoCbl(-)系では309 ±119pmoles/min./mg prot.、AdoCbl(+)系では

1662 ± 376 pmoles/min./mg prot.であった。一方メチルマロン酸血症患児ではビタミンB₁₂非添加培地で培養した場合、症例1から9でAdoCbl(-)、(+)系とも検出感度以下であるのに対し、症例10から13ではAdoCbl添加により活性がそれぞれ、2079、1793、2046、2174と正常レベルまで回復し、AdoCblに対するK_mも症例10、11で0.06 μM,と正常対照K_m 0.07 μMと同程度であった。しかし症例10から13では正常対照と異なりビタミンB₁₂添加系でもAdoCbl(-)系での活性は依然検出感度以下であった。以上より症例1から9はムターゼアポ酵素の欠損、症例10から13は補酵素AdoCbl合成系の障害によるものと考えられた。さらに本法を用い末梢リンパ球ムターゼ活性を測定した。正常コントロールのムターゼ活性は線維芽細胞の活性と同程度であり、メチルマロン酸血症患者ムターゼ活性も線維芽細胞での結果と同様アポ酵素欠損である症例1でAdoCbl(-)、(+)いずれの系でも測定感度以下、AdoCbl合成障害である症例10で反応系へのAdoCbl添加による活性の回復が見られた。

考案

従来行われてきたメチルマロニルCoA ムターゼ活性測定法はいずれもアイソトープを使用するもので、product の分離にペーパークロマトグラフィ、高圧濾紙電気泳動などを必要とするものであった。近年DeBuysereらはHPLCを用いてCoA誘導体を短時間で分離定量する方法を開発した。我々はこの方法を応用し、メチルマロニルCoAとサクシニルCoAを感度よく短時間で分離することによりメチルマロニルCoA ムターゼ活性を簡便に測定する方法を開発した。本法を用いて測定した正常人総ムターゼ活性は約1400 - 3200 pmoles/min./mg prot.と従来

アイソトープによる方法で報告された値とほぼ一致した値が得られ、更にビタミンB₁₂を添加した培地で培養した線維芽細胞を酵素源として使用することによりムターゼアポ酵素の欠損か、補酵素AdoCbl合成系の異常によるものか鑑別可能であった。Matsuiらはメチルマロン酸血症患者のうち、ムターゼアポ酵素欠損によるものはAdoCbl合成障害によるものに比べより早期に症状の発現をみ、更にアポ酵素欠損による患者ではビタミンB₁₂の投与に対し反応を見ないのに対し、AdoCbl合成異常による患者では大部分が尿中メチルマロン酸の減少を見るのと同時に臨床症状の改善をみ、長期的にも予後良好と報告している。我々の症例でも酵素学的にAdoCblに反応する例では臨床的にビタミンB₁₂投与に反応し現在までの発達も良好である。このようにメチルマロン酸血症ではその原因がムターゼアポ酵素の欠損によるものか、補酵素AdoCbl合成障害によるものかによってその予後、及び治療法に多大な差異を生じる可能性があり、本法はその両者を簡便かつ短時間で鑑別診断でき有用であると考えられた。

文献

- 1) DeBuysere MS et al.: The analysis of acyl-coenzyme A derivatives by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, 133, 373, 1983
- 2) Matsui SM et al.: The natural history of the inherited methylmalonic acidemia. N Engl J Med, 308, 857, 1983

表 Methylmalonyl CoA mutase activity in fibroblasts

Patient	basal medium		supplementary medium (1 μ g/ml OH-Cbl)	
	Holo- ^b	Total ^c	Holo- ^b	Total ^c
1	n. d. ^a	n. d.	n. d.	n. d.
2	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
6	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
7	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
8	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
9	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
10	n. d.	2079	n. d.	182
11	n. d.	1793	n. d.	674
12	n. d.	2046	n. d.	482
13	n. d.	2174	n. d.	571
Control	n. d.	2019 \pm 434 ^d (8) ^e	309 \pm 119 ^d (4) ^e	1662 \pm 376 ^d (4) ^e

^a n. d. : not detected.

^b Holo-; holomutase activity measured in the absence of added AdoCbl.

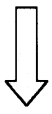
^c Total; Total mutase activity measured in the presence of 5 μ M AdoCbl.

^d Mean \pm SD

^e Number of observations.

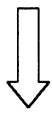
Enzyme activity is expressed as pmoles succinyl CoA formed/min./mg protein.

東北大学小児科、病態代謝 (Department of Pediatrics and Department of Biochemical Genetics)



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:HPLC によるメチルマロン酸血症の迅速、簡便な酵素診断法を開発した。メチルマロン酸血症はその酵素学的原因により予後、治療法に多大な差異を生じるため本法を用いた早期の酵素学的診断は臨床的に非常に有用であると思われた。