

ホモシスチン尿症の簡易診断・スクリーニング法に関する研究

(分担研究：現行マスキング対象疾患の精査上の問題点に関する研究)

武田英二，伊藤道德，内藤悦雄，黒田泰弘

要約 薄層クロマトグラフィーを用いたホモシスチン尿症の診断・スクリーニング法を検討した。全血および血漿中の全ホモシスチンおよび蛋白結合ホモシスチン量を測定することにより，治療を行っていない患者を診断することが可能であった。また乾燥濾紙血中の全ホモシスチンの測定によってもベタイン投与中および無治療中の患者の診断が可能であった。したがって，この方法はホモシスチン尿症の簡易診断・スクリーニング法として有用と考えられる。

見出し語：ホモシスチン尿症，ホモシスチン，先天性代謝異常症，マスキング

緒言

ホモシスチン尿症のマスキングは血中メチオニンをガスリー法で測定することにより実施されている。しかし出生時血中メチオニン濃度が高値を示さない症例¹⁾や血中メチオニン濃度は高値を示してもホモシスチン濃度が低い症例も見られる²⁾ことから，血中メチオニン濃度の測定では診断・スクリーニング法として十分ではない。また患者でホモシスチンが血清除蛋白上清で高値を示さない理由として，ホモシスチンが血清蛋白と結合する³⁾と考えられる。そこで血清蛋白に結合したホモシスチンを測定することにより本症を診断・スクリーニングできるかについて検討した。

研究方法

対象：正常対照，治療中（食事療法およびベタイン投与）のホモシスチン尿症患者1名
徳島大学小児科

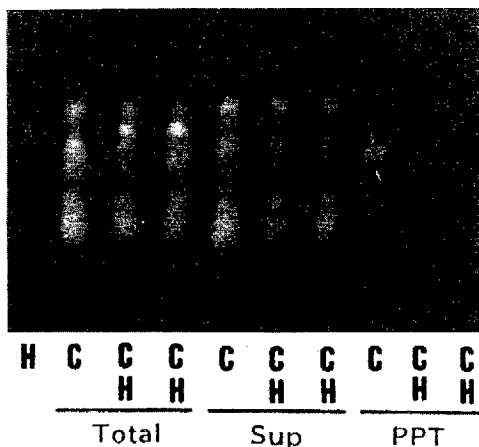
および無治療患者2名の全血，血漿および乾燥濾紙血を用いた。血液検体を0.06 volの6 N 過塩素酸（PCA）で除蛋白したのち1,000 xgで10分間遠沈して得た上清を2 N KOHで中和して遊離型ホモシスチンを含む検体とした。一方，蛋白の沈殿は2 mlの0.4 N PCAで浮遊させ遠沈することを2回繰り返して洗滌した。沈殿を水に浮遊させ2 N KOHで中和後，0.1 volの2-メルカプトエタノール（2-ME）を加え37℃で2時間インキュベートした。6 N PCAで除蛋白遠沈した上清を中和して蛋白結合型ホモシスチンを含む検体とした。また血液を直接0.1 volの2-MEで処理し全ホモシスチンを含む検体を得た。それぞれの検体をシリカゲルプレートにスポットし，ブタノール，酢酸，水（3：1：1）中で展開した。乾燥後，フルラン（15 mg/mlアセトン中）を50℃，10分間作用させた後，

長波長紫外線により可視化した。

結果

1. 正常血漿に加えたホモシスチンの検出
(図1)

図1 血漿の薄層クロマトグラフィー



ホモシスチン(H), 正常(C)およびホモシスチンを加えた正常血漿(CH)の全(Total), 上清(Sup)および蛋白結合(PPT)ホモシスチンの分析パターン

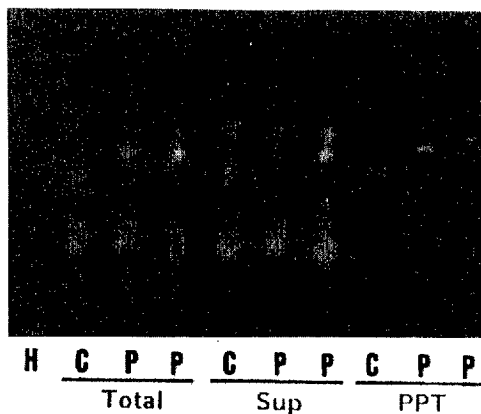
正常対照の血漿では全ホモシスチン, 遊離および蛋白結合型ホモシスチンとも検出できなかった。またホモシスチン濃度を125および250 μ Mに調整した血漿では全および蛋白結合ホモシスチンを検出することができた。

2. 全血および血漿を用いたホモシスチン尿症の診断・スクリーニング(図2-A, B, 図3-A, B)

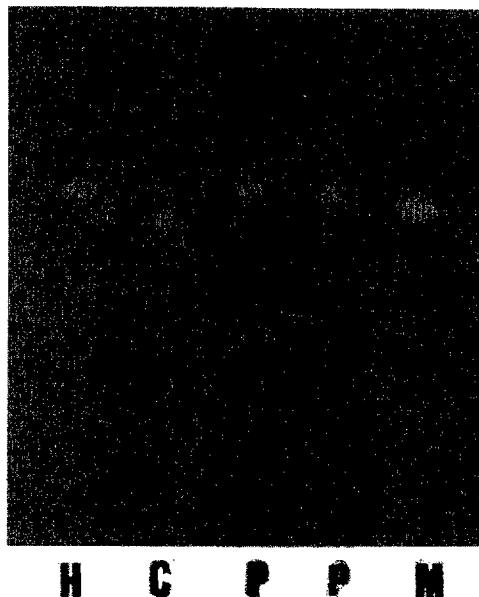
正常対照では全ホモシスチン, 遊離および蛋白結合型ホモシスチンとも検出されなかった。

しかし2名の無治療ホモシスチン尿症患者では全ホモシスチンおよび蛋白結合ホモシスチンの明らかなスポットが検出された。しかし1症例で遊離型ホモシスチンの検出は困難であった。

図2 A. 血漿の薄層クロマトグラフィー



B. 血漿蛋白結合ホモシスチンの分離

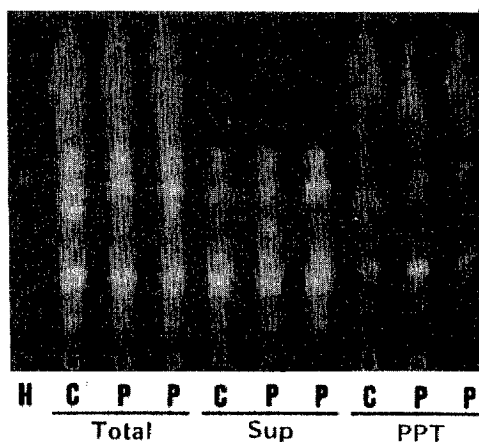


ホモシスチン(H), メチオニン(M), 正常(C)および無治療患者血漿(P)の全(Total), 上清(Sup)および蛋白結合(PPT)ホモシスチンの分析パターン

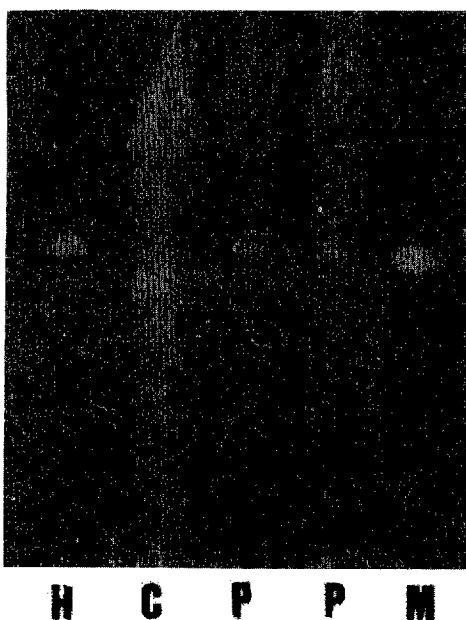
3. 濾紙血を用いたホモシスチン尿症の診断・スクリーニング(図4)

100 μ l 血液相当の濾紙血中の全ホモシスチンを測定した。正常ではホモシスチンのスポットは見られなかったが, ホモシスチン濃度を50 μ Mに調整した血液では明らかなスポ

図3 A. 全血の薄層クロマトグラフィー



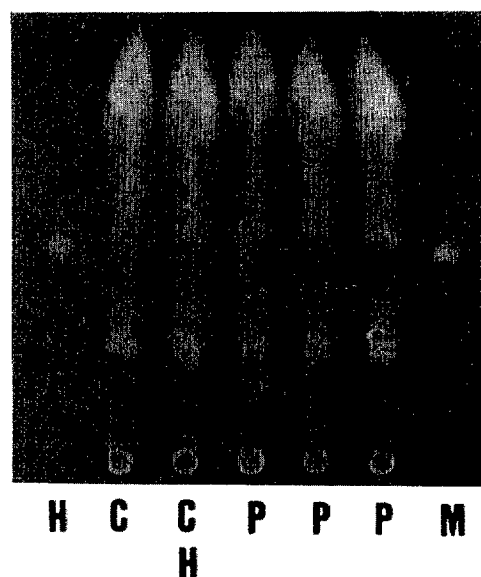
B. 全血蛋白結合ホモシステインの分離



ホモシステイン(H), メチオニン(M), 正常(C)および無治療患者全血(P)の全(Total), 上清(Sup)および蛋白結合(PPT)ホモシステインの分析パターン

ットが検出できた。さらに治療中および無治療の患者では明らかなスポットが認められ診断・スクリーニングすることができた。しかし濾紙血の蛋白結合ホモシステインの測定では患者の診断は困難であった。

図4 濾紙全血の薄層クロマトグラフィー



ホモシステイン(H)およびメチオニン(M), 正常(C)およびホモシステインを加えた正常濾紙血(CH), 無治療の患者(P:Lone4,5)および治療中患者(P:Lone6)濾紙血の分析パターン

考察

メチオニンから合成されたホモシステインの50%はシスタチオニン合成酵素によってシスタチオニンへ代謝され, あとの50%はメチオニンへ再メチル化される。したがってシスタチオニン合成酵素欠損によるホモシステイン尿症ではホモシステインが蓄積すると考えられる。しかし胎児から新生児期ではメチル化が強く, 新生児症例では成人の患者に比してメチオニンが高値でホモシステインは低値である²⁾。さらにホモシステインは血清蛋白に結合することや除蛋白しないで凍結保存すると, 本来, 除蛋白上清に存在する遊離型ホモシステインも時間とともに蛋白と結合する³⁾。一方, ホモシステイン尿症患者であっても新生児期はメチオニンが増加しない症例^{1) 4)}や, ビタミンB₆反応性のホモシステイン尿症では生後4週でメ

チオニン上昇が見いだされたこと、およびB₆反応性患者は見遇げされていることなどが知られている⁵⁾。したがってホモシスチン尿症の診断・スクリーニングには全ホモシスチンまたは蛋白結合ホモシスチンを測定することが必要である。

今回、我々が行った薄層クロマトグラフィーを用いた分離法ではホモシスチンおよびホモステインとメチオニンを完全には分離することはできなかった。したがって全ホモシスチンのスポットにはメチオニンも含まれる。

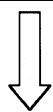
しかし蛋白結合型ホモシスチンを含む検体にはメチオニンは含まれない。

全血および血漿を用いて全ホモシスチンおよび蛋白結合型ホモシスチンのいずれを測定しても無治療のホモシスチン尿症患者2名を診断することができた。このことは無治療患者では全ホモシスチンとメチオニンの総和も蛋白結合ホモシスチンも正常対照に比して増加していることを示している。さらに濾紙血を用いて、全ホモシスチンを測定すると無治療患者だけではなく治療中の患者も正常対照と区別することができた。これはベタイン投与中の患者では増加したメチオニンを主に検出した結果であると考えられた。

以上より全血、血漿および濾紙血の全ホモシスチンとメチオニンを同時に測定することにより、種々の血中アミノ酸パターンを示すホモシスチン尿症のスクリーニングが可能であると思われた。そのうえで全血および血漿を用いた蛋白結合ホモシスチンのみを測定することによりホモシスチン尿症を診断できると思われる。したがって我々が検討した方法はホモシスチン尿症の簡易診断・スクリーニング法として有用と考えられた。今後、ホモシスチンとメチオニンを分離する方法を検討することが必要であろう。

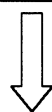
文献

- 1) 黒田泰弘, 武田英二, 厚生省心身障害研究, マスクリーニングに関する研究. 昭和63年度研究報告書, 111頁, 1989.
- 2) Watanabe, T., Kuroda, Y. et al., *Eur. J. Pediatr.* 146: 436, 1987.
- 3) 渡辺俊之, 黒田泰弘, 日児誌92: 1270, 1988.
- 4) Tada, K., Tateda, H. et al., *Eur. J. Pediatr.* 142: 204, 1984.
- 5) Mudd, S. H., Skovby, F. et al., *Am. J. Hum. Genet.* 37: 1, 1985.



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 薄層クロマトグラフィーを用いたホモシスチン尿症の診断・スクリーニング法を検討した。全血および血漿中の全ホモシスチンおよび蛋白結合ホモシスチン量を測定することにより、治療を行っていない患者を診断することが可能であった。また乾燥濾紙血中の全ホモシスチンの測定によってもベタイン投与中および無治療中の患者の診断が可能であった。したがって、この方法はホモシスチン尿症の簡易診断・スクリーニング法として有用と考えられる。