

ホモシスチン尿症の診断・治療法の再検討
(分担研究：現行マススクリーニングにより発見された
患者の管理と長期予後に関する研究)

長谷 豊*1, 大竹治美*2, 酒本和也*2, 児玉裕敬*3

【要約】2-メルカプトエタノール(2-ME)で還元処理した検体を用いて、血中ホモシスチンを薄層クロマトグラフィー(TLC)法で検出する方法を検討した。

ニンヒドリン発色の薄層上で、2-MEで処理したホモシステイン、ホモシスチンは、一定のRFの位置に、一つの未知物質の発色スポットとして検出された。この未知物質は、LC-API-MS分析にて、分子量212のS-2-ヒドロキシエチルチオホモシステインと呼ぶ、非常に安定な新物質であることが明らかになった。

1/8インチ(3mm)乾燥血液濾紙3枚を用いると、ホモシスチン尿症患者においてはメチオニンと明確に区別できる上記物質の位置に明らかな発色スポットが認められた。ホモシスチン添加標準血液濾紙でも、40 μ Mすなわち1mg/dlからは十分に可視が可能であった。この方法は、ホモシスチンの検出法としては十分に使用が可能のものであり、今後新生児患児血液濾紙などの検体を検討したいと考えている。

【見出し語】ホモシスチン尿症、S-2-ヒドロキシエチルチオホモシステイン

【はじめに】ホモシスチン尿症のスクリーニング、診断および治療に関する最大の問題は、ホモシスチン尿症の鑑別診断の困難さである。この原因は、ホモシスチンの検出での問題にある。これは、

ホモシスチンが容易に血中、尿中の蛋白と結合するからであり、検体採取後の検査までの時間経過の過程でも、蛋白との結合がおこる¹⁾ために、実際量よりはるかに少ない量のホモシスチンしか検査の

*1 大阪市立小児保健センター 第一内科(1st Dep. of Pediatrics, Children's Medical Center of Osaka City), *2 大阪市環境保健協会(Association of Environmental Hygiene and Public Health, City of Osaka), *3 高知医科大学化学教室(Dep. of Chemistry, Kouchi Medical College Univ.)

対称にしていなかったからである。ために、シアンニトロプルシッド反応などを利用する実際面では、ホモシスチンが検出されずに、診断が遅れた例も多い。

以前には、ホモシスチン尿症であっても、血中ホモシスチンの増量は微量であるとされてきたが、これは微量の遊離型ホモシスチンしか検査の対称にしていなかったためである。血中ホモシスチンの簡便、確実な検出方法の確立は、ホモシスチン尿症の鑑別診断を確実、容易にするとともに、ホモシスチンを指標としたホモシスチン尿症のスクリーニングをも可能にすることになる。血中ホモシスチンの検出方法については、武田らが本研究班でも報告している²⁾。

【研究方法・結果】我々も、スクリーニングの再検査ルーチンに取り入れている薄層クロマトグラフィー (TLC) で検討し、興味ある知見を得たので、報告する。

ホモシスチンを還元条件下でホモシステインに変換して、全ホモシステインを TLC で検出する方法を用いた。

①還元剤の検討：2-メルカプトエタノール (2-ME)、ジチオエリトリオール (DTE) などの還元剤を用いて検討した。

ニンヒドリン発色の薄層上で、DTE 処理の場合には、RF値の違う2つの主なスポットに別れるが、2-MEで処理したホモシステイン、ホモシスチンは、ほとんどが一定のRFの位置に、一つの未知物質の発色スポットとして検出され、また濃度により未知物質質量に差のあることも明らかになった (図1；矢印)。メチオニンには、2-ME処理での変化はなかった。

②未知物質検索：高知医大化学教室の児玉教授にLC-API-MS での分析をお願いした。検体は、ホモシスチンと2-MEの混合液を薄層で展開して、未知物質部分を掻きとり、その再溶出液を用いた。

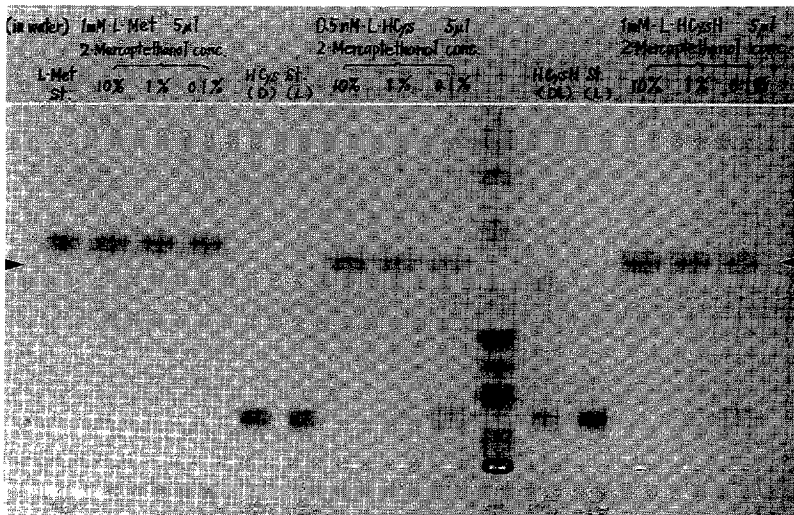


図1. 2-ME 処理後のホモシスチン、ホモシステインの薄層クロマトグラフィー (TLC)

図2は再溶出液の分析結果であるが、分子量212に明らかなピークのみを認めた。しかし、ホモシスチンと2-MEの混合溶液をそのまま分析すると、ホモシスチンのところのみピークを認めた。すなわち、ホモシスチンは2-MEによってS-S結合がはずれ、全てホモシスチンに変化していた。その混合溶液を減圧乾燥して蒸発させた後に分析すると、未知物質と同じ分子量の一つのピークとして

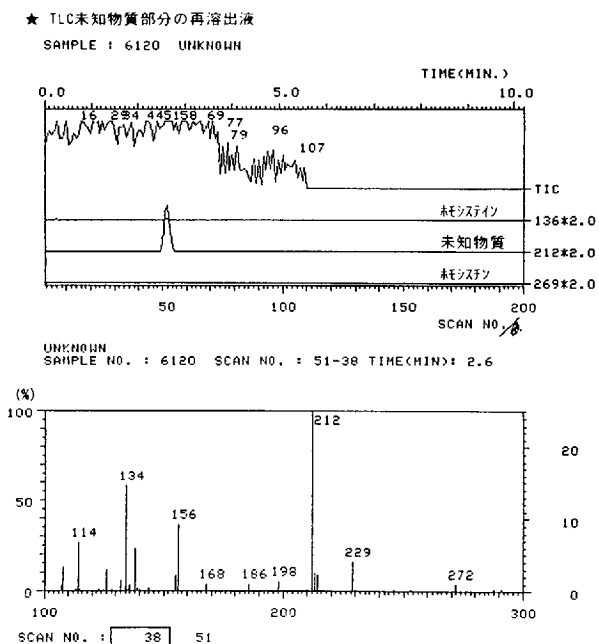


図2. TLC未知物質部分再溶出液のLC-API-MS分析結果

③乾燥血液濾紙中のホモシスチンの検索：以上の結果を踏まえて、図4のような手順にて、1/8インチ(3mm)乾燥血液濾紙3枚を用いると、ホモシスチン尿症患者においてはメチオニンと明確に区別できる位置に明らかな発色スポットが認められた(図5；矢印)。使用した検体の採取時の血清の高速液体クロマト(OPA発

みられた。この結果から、薄層上の未知物質は2-ME処理により、一度ホモシスチンに変化し、乾燥のために放置する間に空気酸化をうけて、ホモシスチンが2-MEと再結合して出来たものと判断出来た。分子量の計算上もLC-API-MSの分析結果と一致したものであり、S-2-ヒドロキシエチルチオホモシスチンと名称することにした(図3)。この物質は非常に安定であった。

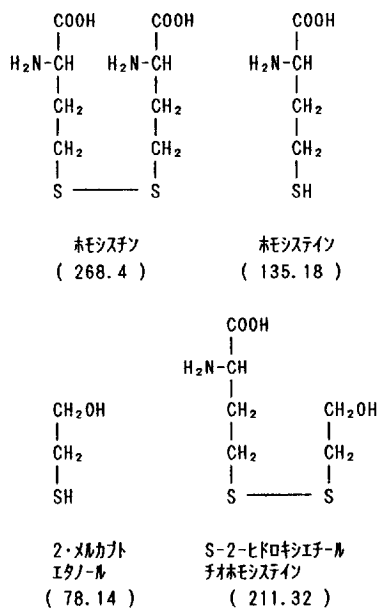


図3. 関連物質構造式および分子量

色)による分析では、ホモシスチンは検出されていないか痕跡の結果であった。

また、ホモシスチン添加標準血液濾紙のTLCでも、40μMすなわち1mg/dlからは十分に可視が可能であった。

【考案】我々はホモシスチン尿症の長期予後の検討を通して、スクリーニング、診断および治療に関する問題点について

検討し、報告してきた。³⁾

今年度は、血中ホモシチンの検出方法についての検討結果を報告した。このTLCを利用した方法は、簡便で、血液濾紙を利用するため、スクリーニング検査施設でも検査が可能であり、今後新生児患児血液濾紙などの検体を十分に検討しなければならないが、ホモシチンの検出法として十分に使用が可能なものであると考えている。

図4. 乾燥血液濾紙使用時の操作手順

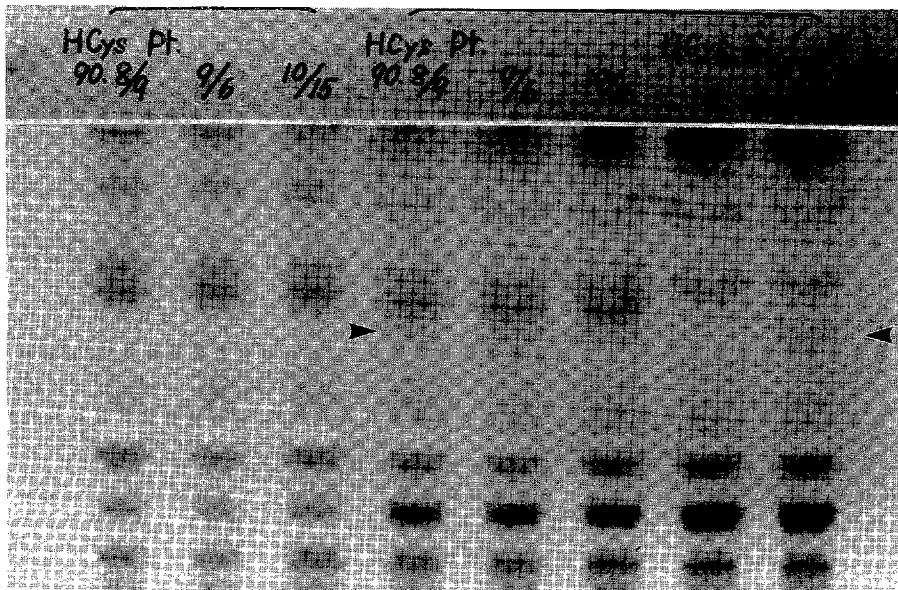
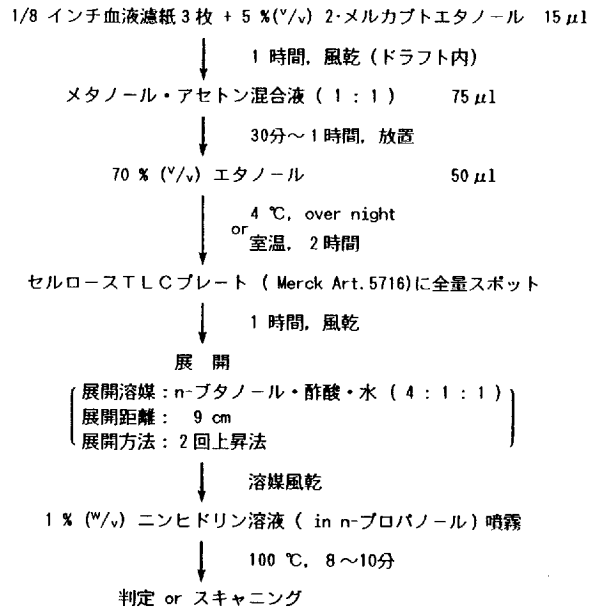
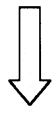


図5. ホモシチン尿症患児血液濾紙検体の2-ME処理後のTLC
(左より4, 5, 6番目検体でMetの下に発色スポットをみる)

- 【文献】 1. 渡辺俊之, 黒田泰弘: 日見誌, 92, 1988; 1270.
2. 武田英二, 他: 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. 平

成2年度研究報告書, 1991; 129.

3. 長谷 豊: 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」平成2年度研究報告書, 1991; 13.



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】2-メルカプトエタノール(2-ME)で還元処理した検体を用いて、血中ホモシスチンを薄層クロマトグラフィー(TLC)法で検出する方法を検討した。

ニンヒドリン発色の薄層上で、2-ME で処理したホモシステイン、ホモシスチンは、一定のRF の位置に、一つの未知物質の発色スポットとして検出された。この未知物質は、LC-MS/MS 分析にて、分子量 212 の S-2-ヒドロキシエチルチオホモシステインと呼ぶ、非常に安定な新物質であることが明らかになった。

1/8 インチ(3 mm)乾燥血液濾紙 3 枚を用いると、ホモシスチン尿症患児においてはメチオニンと明確に区別できる上記物質の位置に明らかな発色スポットが認められた。ホモシスチン添加標準血液濾紙でも、 $40\mu\text{M}$ すなわち 1mg/dl からは十分に可視が可能であった。この方法は、ホモシスチンの検出法としては十分に使用が可能なものであり、今後新生児患児血液濾紙などの検体を検討したいと考えている。