

PKUとガラクトース血症の新しい比色マススクリーニング法
(分担研究)

藤村有信* 川村正彦**

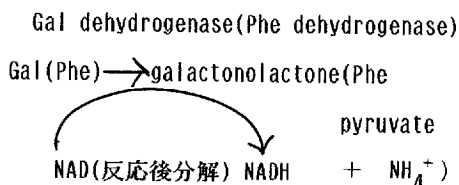
要約：血液disc 3mm径 1個でフェニルアラニン (Phe)やガラクトース (Gal)を簡便迅速に定量する高感度な比色マススクリーニング法を新しく開発した。原理はGal(Phe)をGal (Phe) dehydrogenase で分解し、共存するNAD をNADHに変える。ここで残存するNAD をpH12-13 で60°C、15分処理で完全に分解させてから、反応液のpHを 8にもどし、レサズリンまたはp-ヨードニトロテトラゾリウムバイオレット(INT) とデアフォラーゼ (DA) 系とエタノールとアルコール脱水素酵素(ADH) の系の共働によりNAD-NADHのサイクリングを行い増幅させ、形成されたINT フォルマザン(A490nm)の吸収が使われたレサズリン(A600-630nm)の吸収または形成されたレゾルフィン (A550nm) の吸収をマイクロプレートの中で簡便迅速測定する。INT を用いたとき Phe 0-20(30)mg/dl まで直線を示し0-6mg/dlで0.24のO. D. 差を、またGal では0-10mg/dl で 0.570 のO. D. 差を、さらにはレサズリンを用いると0.95-1.1のO. D. 差を示し高感度測定が可能で実用化に向け検討中である。

みだし語：ガラクトース、フェニルアラニン、比色法、マススクリーニング法

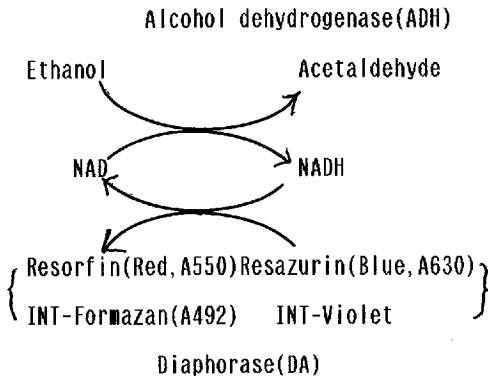
[緒言] WendelやCampbellらの phenylalanine(Phe) 比色法の発表により、いよいよ蛍光法から比色法の時代への推移を感じさせる。しかし血液disc 8mmを必要としまだ感度も低く、マススクリーニング化は難しい。我々はNADのサイクリング法とresazurin or INT色素との組合せで、血液disc 3

mm 1個でgalactose(Gal)や Pheを測定する簡便迅速で高感度なマススクリーニング法を開発したので報告する。

[方法] 1. Gal(Phe)の比色法の原理：



* 名古屋市衛生研究所 ** 名城病院



2. NAD のアルカリ分解: NAD はpH11.7-12.3附近ではほとんど蛍光物質をつくらない。温度を60°CにすればpH12.3での半減期は0.5 分なので10分以上ではほぼ100%分解する。

3. 反応液(a):Gal 測定: 標準血液や検体 disc 3mm 1個を薄いデイスポのマイクロプレート(住友)に入れ、常法による血色素固定後、10mMNAD 10ul, GalDH25U/mix1/100液10ul, 0.02M トリス(pH8)10ul の計30ul を入れる。Blank は酵素を除去するか失活させた系を用いた。37°C, 1h 間反応後 0.02M トリス(pH8)70ul を入れ混合し、その80ul を測定用プレート(住友)に分注し、1 N NaOH10ul 添加後60°C, 15 分反応させ 3NHCl と1Nトリス(70ul)でpH8 に調整する。その中にresazurin or INT色素20ul, ADH 10ul, DA 10-30ul を混合し最後にethanol 10ul で反応を開始し37°C, 10-60分後に停止液10ul を入れて測定する。resorfin(A550) or INT-formazan(A492)の増加かresazurin(A630)の減少をマイクロプレートリーダーで測定する。(b):Phe 測定: 札幌IDL社供試の蛍光測定用反応液(この内Phe dehydrogen

ase は相模中研の浅野らが精製し、セントラル硝子から成瀬浩博士に分与されたもの)を用いた。血液disc(標準及び検体) disc 3mm 径 1個をマイクロプレートに入れ、5% TCA 50ul 添加し10分mix, その中へNAD-Phe dehydrogenase(pH10.4) 液150ul を入れ、37°C1h 間反応させその半分の100ul を測定用プレートに分注し上記のNAD のアルカリ分解, 中和後INT 20nmol, ADH 16U, DA 0.2U, 8% ethanol 10ul を含む50ul を入れ、37°C, 10-30分反応後、停止液10mM Cu⁺⁺10ul を加えA792-415nmで測定した。

[結果] 1. Gal 測定における色素とDA濃度: resazurin 1-5mM で検討し100nmol, DA 2 U/ml30ul が最適であった。図1のようにGal 0-20(40)mg/dlまで測定可能である。

Resazurin(A630)の方がresorfin(A550)より吸光度差が大きい。INT は2mM(40nmol), DA 20U/ml10ul か2U/ml30ul が良好であった。

2. 本法のCV% と感度: 本法の測定内及び測定間変動(CV)は6.0-8.2%及び8.8%と良好で蛍光法よりやや高いが、感度はGal 10mg/dlでの吸収が約0.9-1.1あり、2mg と4mg の差が0.2 と高感度である。

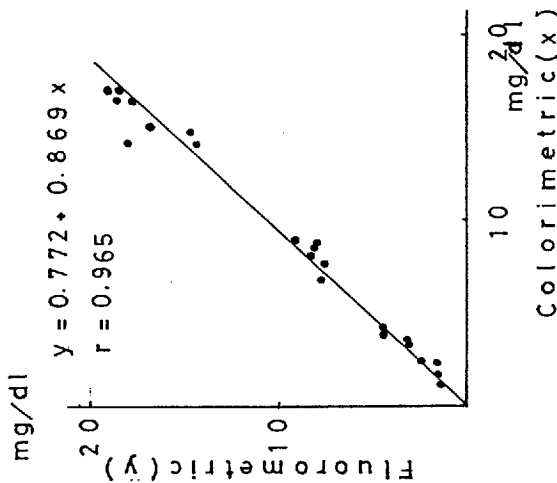
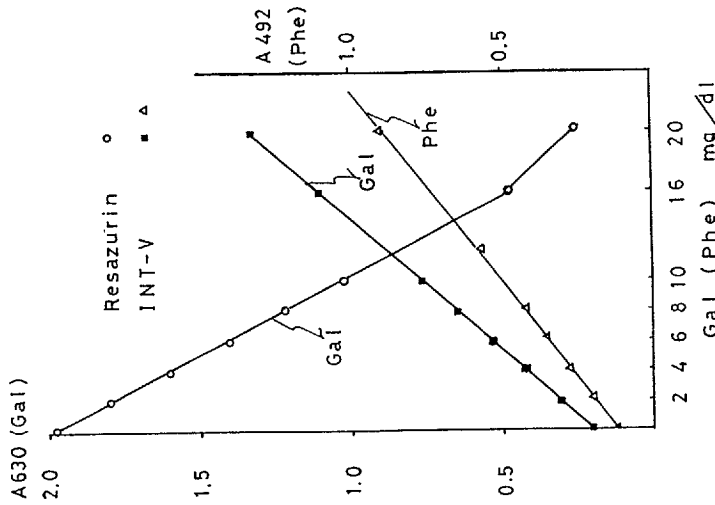
3. 蛍光法と本法(比色法)との相関: 41検体について蛍光法と本法とでGalを測定し相関性を調べた所、相関係数 $r=0.965$, 回帰直線 $y=0.869x+0.772$ であった(図2)。

4. 一般新生児のGal とGal-1-P の平均値と標準偏差: 一般新生児1000人のGal とGal-1-Pの平均値±標準偏差値はそれぞれ 1.88 ± 1.32 と 2.62 ± 1.77 であった。

5. Phe の検量線：図のようにPhe 0-20(30) mg/dl まで直線であった。0-6mg の吸光度差が0.24と高感度であった。また現在本法のマスキングへの応用化を検討中である。

[考察] Wendelらは8mm discを用いてPheの比色を行ったがINT とDiaphoraseを直接NADHと反応させているため感度が悪くどうしても8mm discが必要となり最低感度も低

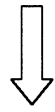
い。我々は3mm disc 1個で高感度に測定できる系を開発した。Phe についてはレザズリンを使えばもっと感度を上げることが出来るであろう。現在の我々の系で問題点是非特異的な色素の還元化が時として起こり、これがDiaphoraseの酵素の精製度に問題があるのかその他NAD の分解が完全でないためか、その他の原因なのか検討中である。また別の新しい系の開発も進めている。





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:血液disc3mm径1個でフェニルアラニン(Phe)やガラクトース(Gal)を簡便迅速に定量する高感度な比色マススクリーニング法を新しく開発した。原理は Gal(Phe)を Gal(Phe)drogenaseで分解し、共存するNADをNADHに変える。ここで残存するNADをPH12-13で60°C,15分処理で完全に分解させてから、反応液のPHを8にもどし、レサズリンまたはP-ヨードニトロテトラゾリウムバイオレット(INT)とデアフォラーゼ(DA)系とエタノールとアルコール脱水素酵素(ADH)の系の共転によりNAD-NADHのサイクリングを行い増幅させ、形成されたINTフォルマザン(A490nm)の吸収か使われたレサズリン(A600-630nm)の吸収または形成されたレゾルフィン(A550nm)の吸収をマイクロフロレートの中で簡便迅速測定する。INTを用いたときPhe 0-20(30)mg/dlまで直線を示し0-6mg/dlで0.24のO.D.差を、またGalでは0-10mg/dlで0.570のO.D.差を、さらにはレサズリンを用いると0.95-1.1のO.D.差を示し高感度測定が可能で実用化に向け検討中である。