

Beutler 法における蛍光定量法の検討

(分担研究：マスキングの継続的制度化に関する研究)

藤本昭栄⁽¹⁾ 宮城富子⁽¹⁾ 岡野善行⁽²⁾ 一色玄⁽²⁾ 大谷隆三⁽¹⁾ 大浦敏明⁽¹⁾

要約：ポイトラー法は肉眼による主観的な定性検査である欠点と酵素活性が経日的に劣化する欠点がある。その改良法として、蛍光マイクロプレートによる抽出法の改善と半定量化と記録化を試みた。その結果、測定に要する時間は3時間から1時間半へと大幅に短縮し、蛍光強度のOD値はUT活性と正の相関を示し、正常者、ヘテロ保因者、患者を明確に区別し得た。マスキングのパイロットスタディでは初回検査のカットオフ値を保因者の+1.5SDとし、再採血要求のカットオフ値を正常OD値の20～25%以下とした。新生児総検査数15,233人中、初回再検率2.6%、再採血率0.32%、精検率0.0045%で、7人が要精検となった。精密検査の結果、6人がUTのヘテロ保因者で、1人が正常であった。また、G6PD欠損症患者を1例発見することができた。経日変化により生じる劣化の見逃しの危険も防げることが明らかとなり、改良ポイトラー法は実用性のあるよい方法であると考えられる。

見出し語：ガラクトース血症、ポイトラー法、

研究目的

ミルクの摂取如何にかかわらず赤血球中のGalactose-1-phosphate uridyltransferase (UT) 活性の有無を測定することができるポイトラー法はガラクトース血症I型のスクリーニング法として簡便、敏速で優

れた検査法である。しかしながら、肉眼による主観的な定性検査であり、また酵素活性が経日的に劣化する欠点がある。我々はその欠点を補う改良法として蛍光マイクロプレートによる抽出法の改善と半定量化と記録化を試みた。

(1) 大阪市環境保健協会 (2) 大阪市立大学医学部小児科学教室

試薬および方法

試薬：ガラクトーセミアテスト（ベーリン
ガーマンハイム山之内KK）

器具：Nunc Micro Well Plate V底 1 ウエル
容量 0.275ml、Cat. No.245128（Nunc）、
Microstrip Well, Cat. No.9502157、Combi
Frame, Cat. No.9503017、Strip Retainer, Cat.
No.9503047（Labosystem）、マイクロプレー
ト用シール（栄研化学KK）

装置：マイクロプレート遠心機（日立
CT5DL MP2バケットNo.S305173A）、
蛍光マイクロプレートリーダー（コロナ電
気MTP100F）

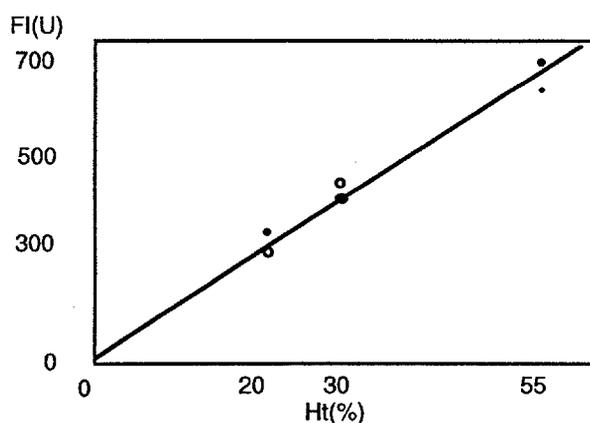
方法：V底 マイクロプレートに、1/8 イン
チ血液ろ紙1枚と100 μ lのポイトラー試薬
を加え、1分間遠心（2010xg）した。その
後、2分間振とうし、プレートシールを行
い、37度、1時間ふらん器に入れた。反応
終了後100 μ lのアセトン：メタノール混合
液（1：1）を加え、再びプレートシールを
行い、15分間遠心（2010xg）した。蒸留水
180 μ lを分注したマイクロストリップウエ
ルに上清50 μ lを加え、1分間振とした後、
Em=360 nm Ex=450 nm にて測定した。

結果

（1）改良ポイトラー法のOD値と酵素活
性（ヘマトクリット0%、20%、30%、55%）
との間には下図に示すように正の相関が認
められた。

（2）改良ポイトラー法におけるUT欠損
症患児、ヘテロ保因者、正常者の血液ろ紙
OD値の検討ではUT欠損症患児のろ紙（n=

ヘマトクリットと蛍光強度



47) のOD値は111.6 \pm 4.67、ヘテロ保因者
のろ紙（n=47）のOD値は247 \pm 21.9、ヘ
マトクリット値を55%に調整した正常者の
ろ紙（n=144）のOD値は765.98 \pm 68.05、
ヘマトクリット値を55%に調整した正常者
の血液1mlにアルカリホスファターゼ0.3U
を20 μ l添加したブランクのろ紙（n=114）
のOD値は112.05 \pm 5.83であった。また、こ
れまでに発見されているUT欠損症患児、
ヘテロ保因者、正常者の解析では表に示す
ように明確に区別することができた。

（3）血液ろ紙保存温度と検査までに要す
る日数の検討においては、保存温度（4 $^{\circ}$ C
、25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C）と保存日数（0、1、3、
5、7、10、14、20、30日）を正常者7人の
血液ろ紙（各人8スポット）を用いて検討
した。正常者7人のOD値の減少率を比較
すると、4 $^{\circ}$ C保存では5日目まで変化なく、
7日目では14%、20日目では30%の低下が
認められた。25 $^{\circ}$ C保存では3日目で23%、
5日目43%の低下し、37 $^{\circ}$ C保存では3日目
で34%、5日目で55%の蛍光強度の低下が
認められた。

ガラクトース血症 I 型患者と要精検者の改良Beutler法の結果

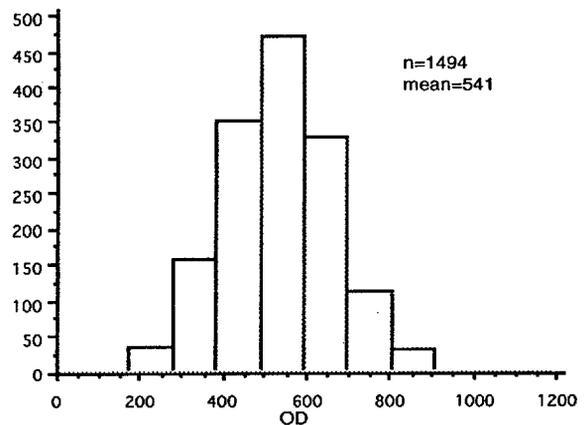
患者No.	Beutler法 (%)	Total Galactose値 (mg/dl)	GALT活性 (%)
N.H.	25.0	6.7	63.6
H.S.	19.3	6.1	44.6
M.U.	18.5	4.9	67.0
T.F.	15.6	10.9	56.7
K.K.	11.6	8.0	52.6
Y.H.	11.1	5.7	56.9
K.O.	6.6	7.5	61.5
K.K.	5.0	19.5	32.0
N.K.	0	21.5	5.2
H.M. (成人)	0	-	0
Y.T. (成人)	0	-	0

(4) 新生児マススクリーニングの第1次パイロットスタディの結果を下図のヒストグラムに示した。初回検査のカットオフ値を保因者の+1.5 ~ 2.0 SDとし、再採血要求のカットオフ値を $\{ \text{Sample OD} - \text{Blank OD} \} / \{ \text{Normal OD} - \text{Blank OD} \} \times 100$ で正常の20 ~ 25%以下とした。1996年5月24日から11月31日までに行なった第2次新生児マススクリーニングのパイロットスタディの結果、総検査数15,233人中、初回同一ろ紙での再検率は2.6%であった。改良ポイトラー法にて異常値を示し、酵素法にて総ガラクトース値の上昇していた者を再採血としたところ再採血率は0.32%であった。最終的に要精検者は7人(要精検率0.0045%)であった。精密検査の結果、6人がUTのヘテロ保因者で1人が正常であった。

考察

改良ポイトラー法は1) 測定に要する時間を1時間半へと大幅に短縮した。2) 遠心機による抽出を行うことで抽出率を均一化する事に成功したため、経日変化による酵素劣化の見逃しの危険を避けることができた。3) 経験を必要とせず、半定量化と記録化する事が可能となった。4) 検査に要する費用も同一であった。以上のことからこれまでのポイトラー法と比較して良い方法と考えられる。また、UT酵素活性量と得られるOD値の間には正の相関が得られ、正常者、ヘテロ保因者および患者を明確に区別することができ、診断の向上につながると考えられ、パイロットスタディではヘテロ保因者とG6PD欠損症患者を発見することができた。

ポイトラー法による新生児血液濾紙蛍光強度のヒストグラム



この検査をするにあたり御理解頂き血液を提供して下さいました患者(成人)、ご両親に謝意を申し上げます。



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: ボイトラー法は肉眼による主観的な定性検査である欠点と酵素活性が経日的に劣化する欠点がある。その改良法として、蛍光マイクロプレートによる抽出法の改善と半定量化と記録化を試みた。その結果、測定に要する時間は3時間から1時間半へと大幅に短縮し、蛍光強度のOD値はUT活性と正の相関を示し、正常者、ヘテロ保因者、患者を明確に区別し得た。マススクリーニングのパイロットスタディでは初回検査のカットオフ値を保因者の+1.5SDとし、再採血要求のカットオフ値を正常OD値の20~25%以下とした。新生児総検査数15,233人中、初回再検率2.6%、再採血率0.32%、精検率0.0045%で、7人が要精検となった。精密検査の結果、6人がUTのヘテロ保因者で、1人が正常であった。また、G6PD欠損症患者を1例発見することができた。経日変化により生じる劣化の見逃しの危険も防げることが明らかとなり、改良ボイトラー法は実用性のあるよい方法であると考えられる