

ビオチニデース欠損症の新生児スクリーニング法の検討

A Measurement of Biotinidase Activity and its Application for Screening of Biotinidase Deficiency in Newborns

山口 昭弘 福士 勝 荒井 修 水嶋 好清
鈴木 真理 清水花寿美 佐藤 泰昌 青木 襄
富所 謙吉 高杉 信男

Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Osamu
Arai, Yoshikiyo Mizushima, Mari Suzuki,
Kazumi Shimizu, Yasumasa Sato, Minoru
Aoki, Kenkichi Tomidokoro and Nobuo Takasugi

ビオチニデース欠損症のスクリーニングについて、ビオチニデース活性の定量をマイクロプレート及びマイクロプレートリーダー（以下、マイクロプレート法）を用いて行ったところ、迅速かつ簡便に測定することができた。新生児1,634例について、試行的に本法によるスクリーニングを行った結果、濾紙血ビオチニデース活性の平均値と標準偏差は $3.47 \pm 0.61 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$ であり、カットオフ値をその平均値の2分の1としたときの一次疑陽性率は1.2%であった。

なお、ビオチニデース活性のない検体は認められなかった。

1 緒 言

ビオチニデース欠損症は、最近 Wolf ら^{1),2)}によって明らかにされた疾患であるが、本症はビオチン（ビタミンH）代謝に深く関与する酵素であるビオチニデースの欠損によって引き起こされる常染色体性劣性遺伝の疾患である。ビオチニデース欠損により、カルボキシラーゼと結合したビオチンが遊離、再利用されず、従ってビオチンの欠乏状態に陥るために生後3週から数年目に皮ふ疾患、脱毛、運動失調、精神発達遅滞などの症状が現われるものである^{1)~3)}。

また、本疾患のスクリーニング法に関しては、Heard ら⁴⁾の報告があり、これはN-ビオチニル-

P-アミノ安息香酸 (B-PAB) を基質として、濾紙血中のビオチニデースによって遊離されるP-アミノ安息香酸 (PAB) のカップリング反応に基づく赤紫色の呈色からビオチニデース活性の有無を肉眼判定するもので、極めて簡便で優れた方法である。しかし、肉眼による判定は、疑陽性の際の判定が難しく、また、見逃しの危険性も高いことから、Heard らの方法を一部改良したマイクロプレート法を用いることにより、スクリーニングへの応用を検討した。

2 方 法

2-1 検 体

札幌市内の医療機関より送付された先天性代謝異常スクリーニング用新生児乾燥濾紙血液を用いた。

2-2 試 薬

1) B-PABの合成

Wolf ら¹⁾の方法により、N-ヒドロキシスクシニミドビオチン (Pierce chemical, U S A) と PAB (関東化学) とから B-PAB を合成し、薄層クロマトグラフィーにより、単一スポットの確認を行った。また、正常人の血液を用いて、ビオチニデースに対するミカエリス定数を測定したところ、 $10\mu\text{M}$ であり、Wolf らの値に一致した。

2) 基質溶液

B-PAB 5.5 mg に 0.5 M リン酸塩緩衝液 (PH 6.0) 10 ml , 0.05 M EDTA $\cdot\text{Na}_2$ 溶液 10 ml を加え脱イオン水に溶解後 100 ml とし、 $150\mu\text{M}$ B-PAB 溶液を調製した。

3) 反応停止液

トリクロロ酢酸 (TCA) 150 g を脱イオン水に溶かして 500 ml とし、 1.84 M TCA 溶液を調製した。

4) 発色溶液

亜硝酸ナトリウム、スルファミン酸アンモニウム及び N-1-ナフチルエチレンジアミン・二塩酸塩の 50 , 250 及び 50 mg を、それぞれ脱イオン水 50 ml に溶かし、 14.5 , 43.8 及び 3.86 mM の各溶液を調製した。なお、亜硝酸ナトリウム溶液は用時調製した。

5) PAB標準溶液

PAB の 68.6 mg を脱イオン水 50 ml に溶かした 10^{-2} M 原液のうち 25 , 50 及び $100\mu\text{L}$ に、 0.5 M リン酸塩緩衝液 (PH 6.0) 1 ml , 0.05 M EDTA $\cdot\text{Na}_2$ 溶液 1 ml をそれぞれ加えて 10 ml とし、 25 , 50 及び $100\mu\text{M}$ の各標準溶液を調製した。

2-3 器具及び装置

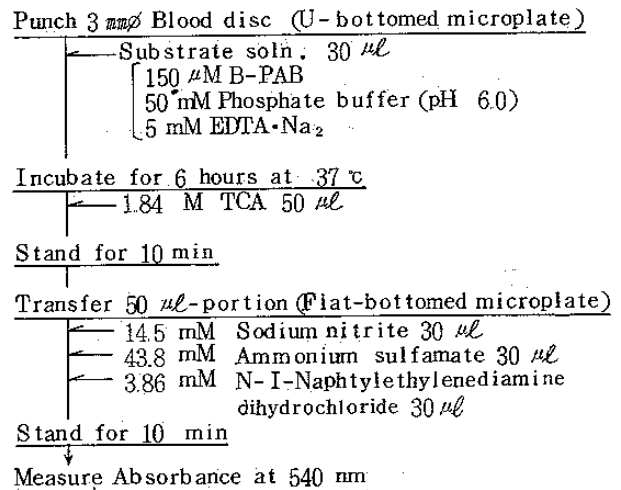
1) マイクロプレート: Titertek 社製マイクロタ

イトレーション用96穴U底及び平底型マイクロプレート。

2) マイクロプレートリーダー: Inter Med 社製 Immno Reader NJ-2000 型

2-4 測定法

直径 3 mm ディスク1枚をU底型マイクロプレートにとり、 $150\mu\text{M}$ B-PAB 溶液 $30\mu\text{L}$ を加え、包装用ラップフィルム及びアルミホイルで包み、 37°C 6時間反応させる。次いで、 1.84 M TCA 溶液 $50\mu\text{L}$ を加えて反応停止後、10分間静置し、血色素の変性を行う。更に、12チャンネルマルチピペットを用い、反応液 $50\mu\text{L}$ を平底型マイクロプレートに移し、発色溶液として、 14.5 mM 亜硝酸ナトリウム、 43.8 mM スルファミン酸アンモニウム及び 3.86 mM N-1-ナフチルエチレンジアミン・二塩酸塩溶液の各 $30\mu\text{L}$ を順次3分間隔で加え、10分間放置後、マイクロプレートリーダーを用い、 540 nm で PAB 標準溶液の試薬ブランクを対照として吸光度を測定する (Scheme 1)。



Scheme 1. Procedure

検量線は、 25 , 50 及び $100\mu\text{M}$ の PAB 標準溶液各 $30\mu\text{L}$ をU底型マイクロプレートにとり、TCA 溶液添加以後の操作を試料と同様に行い作成する。

3 結果及び考察

3-1 測定法の改良点

Heardら⁴⁾の方法を一部改良して、試験管の代わりにマイクロプレートを用い、TCA溶液の添加量を30 μ lから50 μ lとして反応液を分取し、吸光度測定を行った。

マイクロプレートリーダーによる吸光度測定の時間は1プレート、96検体あたり1分以内と極めて迅速な測定が可能であり、また、PAB標準溶液及び濾紙血についての再現性も良好であった。(Table 1)。

Table 1. Measurement Reproducibility

PAB STD Soln. (μ M)	Abs. at 540 nm	
	Mean (n=6)	RSD (%)
25	0.056	3.34
50	0.121	2.85
100	0.252	3.02
*)		
Normal Sample	Mean	RSD (%)
a	0.133	6.16
b	0.126	6.15
c	0.125	6.11

*) Absorbance was measured for 6 hours incubation using a blood disc.

TCA溶液の添加量を50 μ lとした理由は、分取の際の操作性を良くするためであり、これにより発色への影響は認められない。しかし、反応液にTCA溶液を加えて攪拌を行なうと白濁するので、そのまま10分間静置して反応液を分取した。

3-2 酵素反応時間

37 $^{\circ}$ Cにおいて、反応時間を1時間から24時間まで変化させて吸光度を測定したところ、10時間まではほぼ直線的な増加を示したが、それ以後はほとんど増加をみなかった (Fig 1)。そこで反応時間を酵素反応が直接範囲内にあり、かつ、測定精度や実操作の時間などを考慮して5ないし6時間に設定した。

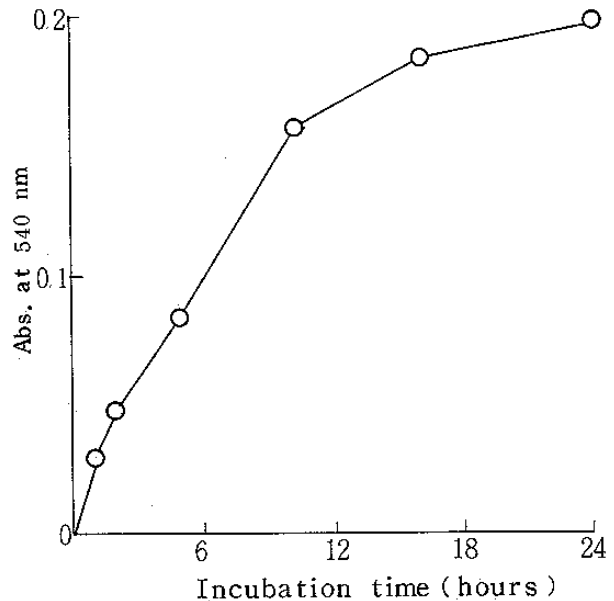


Fig. 1. Effect of incubation time
Absorbance was measured for various times of incubation at 37 $^{\circ}$ C using a blood disc (n=4).

3-3 濾紙血及び血漿のビオチニデース活性の比較

正常成人の全血を濾紙にスポットした濾紙血については、マイクロプレート法を用いて、また、その血漿100 μ lについてはWolfら¹⁾の方法により、それぞれビオチニデース活性を測定した (Table 2)。濾紙血の測定値は、血液ディスク1枚あたりの活性値並びに、ディスク1枚の血液量を3.3 μ lとして各ヘマトクリット値から換算した血漿1mlあたりの活

Table 2. Biotinidase Activities using a Blood Disc and Plasma

Normal Sample	Biotinidase Activity		
	Blood Disc ^a (pmole min ⁻¹ disc ⁻¹)	Blood Disc ^b (nmole min ⁻¹ ml ⁻¹)	Plasma ^c (nmole min ⁻¹ ml ⁻¹)
A	6.80	3.88	6.74
B	5.96	3.20	5.49
C	6.15	3.36	6.04
D	6.45	3.54	6.07
E	5.92	3.02	5.14
F	4.43	2.46	4.05
Mean	5.95	3.24	5.59
S.D.	0.82	0.48	0.93

a) Measured activity for 5 hours incubation using a blood disc (n=4)
b) Converted activity in plasma
c) Measured activity for 30 min incubation using 0.1 ml plasma (n=4)

性値を示してある。また、血漿による活性値は、文献値¹⁾ ($5.80 \pm 0.89 \text{ nmole min}^{-1}\text{ml}^{-1} \text{ Serum}$)と一致した。そこで、血漿 1 ml あたりの活性値を比較すると、濾紙血の値は血漿の値の約60%であり、これは濾紙血には乾燥による活性低下の可能性はあるが、両測定法の血漿量及び反応時間が大きく異なることなどを考慮すると、その影響は直ちに断定することができない。しかし、濾紙血の活性値と血漿のそれは良く反応していることから(相関係数0.964)、スクリーニングを行ううえでは濾紙血によるビオチニデースの活性を測定することで十分目的を達することができる。

3-4 保存条件による濾紙血のビオチニデース活性の安定度

濾紙血を -20°C 、 4°C 、 25°C 及び 37°C に、1~30日間保存し、ビオチニデース活性の変化を調べた

(Fig 2)。その結果、温度及び保存日数に大きな影響をうけ、 -20°C ではかなり長期間安定であったが、 25°C 及び 37°C では、活性が急激に減少して7日目で残存活性はそれぞれ67及び54%まで低下した。従って実際のスクリーニングにおいては、ほとんどの

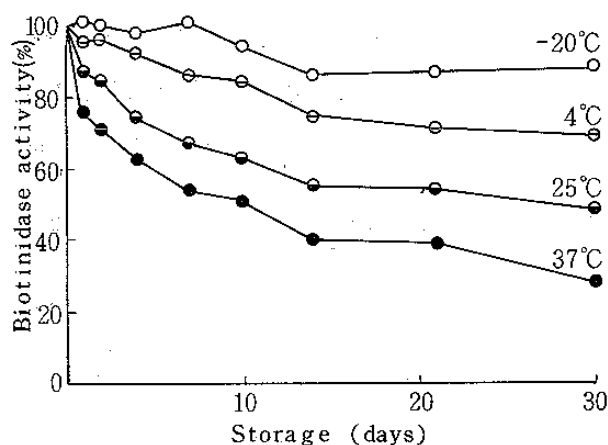


Fig. 2 Stability of biotinidase activity in a blood disc

Biotinidase activity in a blood disc stored in several conditions of temperature was measured for 5 hours incubation. Each point represents the mean of 6 normal samples ($n=4$). The activity for each day is plotted as the percentage of the initial activity.

検体が採血後1~4日以内に送付されてくるのが通例であるが、この試験法はBeutler法、即ち、ガラクトース血症の酵素反応試験と同様にできるだけ新鮮な濾紙血が必要とされるわけである。

3-5 マス・スクリーニングへの応用

新生児1,634例について、本法によりスクリーニングを行ったところ、吸光度の平均値と標準偏差は 0.101 ± 0.022 であり、そのヒストグラムは正規分布を示した (Fig 3)。そして検量線から求めたビオチニデース活性の平均値と標準偏差は $3.47 \pm 0.061 \text{ pmole min}^{-1} \text{ disc}^{-1}$ であって、この値は正常成人の採血直後の約60%であり (Table 2)、また、 25°C における濾紙血保存日数の10日目前後の値に相当する (Fig 2)。従ってほとんどの検体が採血後1~4日以内に送付されてくることを勘案すると、新生

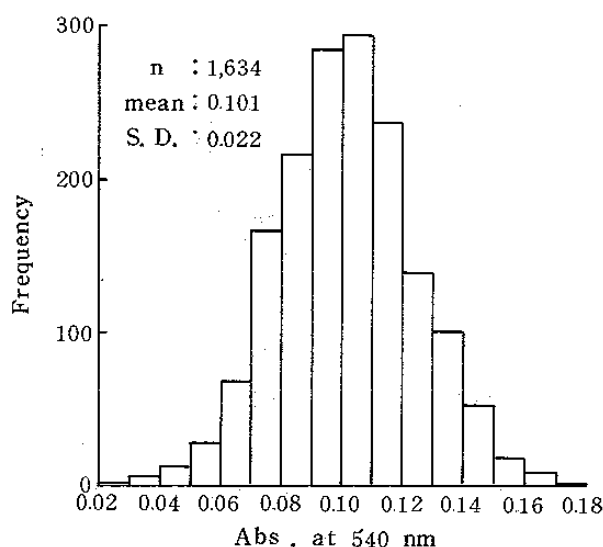


Fig. 3. Histogram of absorbance reading

児のビオチニデース活性は、成人のそれよりも幾分低い値になるものと予想される。

一方、Wolfら^{1),2)}によって、アメリカにおけるビオチニデース欠損症の発生頻度は1~4万人に1人であり、また、ヘテロ保因者のビオチニデース活性は正常者の約2分の1であることが報告されている。従って、ヘテロ保因者が相当数存在しているものと

予想して、カットオフ値を一般検体の平均活性値の2分の1に相当する吸光度0.05としたときに、カットオフ値以下の検体は1634例中19例(1.2%)であった。そこで、これらについて血液ディスク2枚を用い再測定を行ったところ、うち2例が吸光度0.05以下であったので、更に再採血による再検査を行った結果、ビオチニデース活性はそれぞれ、3.85, 3.37 pmole min⁻¹ disc⁻¹と正常範囲にあった。このように、活性低値の検体の中には、保存の温度や日数の影響で活性が低下した正常検体が含まれてくることがあるためにヘテロ保因者の判定を初回検査のみで行うことは困難である。

なお、まったくビオチニデース活性をもたない検体は認められなかった。

4 結 語

ビオチニデース欠損症のスクリーニングについて、迅速性及び操作性に優れているマイクロプレート及びマイクロプレートリーダーを用いる方法を検討した。本法は定量化が可能なことから、肉眼判定による場合よりも陽性者の検出がはるかに容易であり、見逃

しの危険性もより小さくできるものと期待できる。しかし、濾紙血ビオチニデース活性は、採血後の保存温度や日数により大きく影響されるため、ほとんどの検体がある程度の活性低下を起していると思われるので、今後さらに検体数を増やして、カットオフ値をはじめとして定量値と在胎週数や日令等との関係についても検討を加えて行く所存である。

5 文 献

- 1) B. Wolf, R. E. Grier, R. J. Allen, S. I. Goodman, C. L. Kien: Clin. Chin. Acta, 131, 273~281 (1983)
- 2) B. Wolf, G. S. Heard, L. G. Jefferson, V. K. Proud, W. E. Nance, K. A. Weissbecker: N. Eng. J. Med., 313, 16~19 (1985)
- 3) 鈴木恵美子, 花房和子, 熊田淳子, 成瀬浩, 浜中広健: 第13回代謝異常スクリーニング研究会講演抄録集,
- 4) G. S. Heard, J. R. S. Mcvoy, B. Wolf: Clin. Chem. 30, 125~127 (1984)