

# マイクロフルオロメトリーによるガラクトース血症スクリーニング法の検討

## A Simple Microfluorometric Method for Screening of Galactosemia

山口昭弘 内田陽子 中野広美 佐藤泰昌  
清水良夫 富所謙吉 高杉信男

Akihiro Yamaguchi, Yoko Uchida, Hiromi Nakano,  
Yasumasa Sato, Yoshio Shimizu, Kenkichi Tomidokoro  
and Nobuo Takasugi

新生児ろ紙血中のガラクトース (Gal) 及びガラクトース-1-リン酸 (Gal-1-P) をケイ光用マイクロプレートリーダーを用いて、簡便に測定し、ガラクトース血症を全検体について一次からスクリーニングする方法を検討した。

### 1 緒言

ガラクトース血症は、ガラクトース代謝に関与する酵素の、先天的な欠損によって起こる疾患であり、生後数日頃より、嘔吐、黄疸、肝機能障害などの症状が現われ、治療せずに放置されると、死亡する危険性が非常に高い疾患である。本疾患のスクリーニング法としては、Gal-1-P uridylyltransferase の活性の有無を調べる Beutler 法<sup>1)</sup> 及び大腸菌とファージを用いて、ガラクトースを半定量する Paigen 法<sup>2)</sup> がある。しかし、Beutler 法のみでは、ガラクトース血症の他の2型、Galactokinase 及びUDP-Gal-4-epimerase欠損症を検出できないことから、Paigen 法を併用するスクリーニング施設がほとんどである。一方、ガラクトース血症の診断法の一つとして、GalとGal-1-Pを酵素的にケイ光分別定量する藤村法<sup>3, 4)</sup> があり、迅速で正確な測定が可能なることから、多くのスクリーニング施設で確認検査法として用いられている。

しかし、藤村法は反応容器に試験管を用い、1検体ずつマニュアルで測定するため、大量検体の処理は困難であり、一次スクリーニング法として、全検体につき行うのは実際には不可能である。そこで我々は、この藤村法を操作性、検体処理能力に優れた、ケイ光用マイクロプレートリーダーを用いて行うことにより、ガラクトース血症を一次から、全検体につきスクリーニングする方法について検討したので報告する。

### 2 方法

藤村法は、 $\beta$ -galactose dehydrogenase (GADH) により、Gal が galactonolactone に酸化されるとき、共役して NAD が還元され NADH を生成することを利用し、この NADH のケイ光強度を測定することによって Gal を定量する方法である。この際 alkaline phosphatase (AP) を共存させることにより、Gal と Gal-1-P の総量を求めることができ、

APを含まない系から求めたGal 量を差し引くことにより, Gal-1-P の定量を行うことができる (Fig. 1)。実際の操作を以下に示すが,

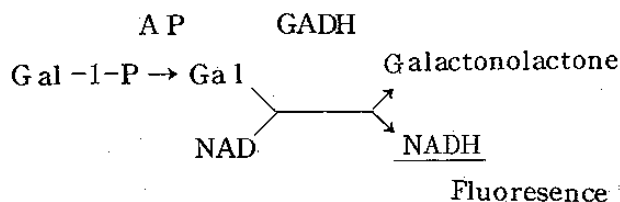


Fig. 1. Principle of Fujimura Method

反応液の組成は原報<sup>3)</sup>に準じ, 原報では, 測定段階で水2mlを加え, 通常のケイ光分光装置を用いてマニュアル測定するところを, 水の量は200 $\mu$ lとし, 反応液200 $\mu$ lをケイ光測定用のマイクロプレートウェルに分取した後, ケイ光用マイクロプレートリーダーを用いて自動測定するので, 測定妨害となるディスクの影響を全く受けずに, 操作性良く迅速に測定することができる。

新生児乾燥血液ろ紙から, 直径3mmディスク1枚をU底型マイクロプレートにとり, メタノール, アセトン, 水(35:35:10)混液10 $\mu$ lを加え, 37°Cで1時間または, 室温で一晩放置し, 血色素固定を行う。各ウェルに酵素反応液 (Table 1) 30 $\mu$ lを加え, ラップフィルムでプレートを包み, 1時間インキュベートした後, 水200 $\mu$ lを加える。

Table 1. Reagent Composition of Enzyme Reaction System

Reagent	Volume per a Disc ( $\mu$ l)	
	Without AP <sup>a)</sup>	With AP <sup>b)</sup>
1 M Tris HCl buffer (pH 8.0)	10	10
13 mM NAD	10	10
0.05 mg/ml GADH <sup>c)</sup>	9	9
0.1 mg/ml AP <sup>d)</sup>	0	1
deionized water	1	0

a) for Gal only

b) for sum of Gal and Gal-1-P

c) Stock (5 mg/ml, BMY)  $\times$  100 diluted

d) Stock (10 mg/ml, BMY)  $\times$  100 diluted

次に, 反応液200 $\mu$ lを8ウェルストリップタイプのマイクロプレート (Titertek社製)に分取し, コロナ電気社製マイクロプレートリーダーMT P-100 Fを用いて励起波長360 nm, ケイ光波長450 nmにおけるケイ光強度を測定する。検量線は, フジレビオ社製のGal標準血液ろ紙を用いて作成し, Gal-1-Pへの濃度変換はGal-1-P/Galの分子量比1.44を乗じて行う。

### 3 結 果

全血にGal, Gal-1-Pを0.5 mM添加して調製したろ紙血を用いたときの, AP共存の有無の各アッセイにおける変動係数は, 約6%と良好な再現性が得られた (Table 2)。

全血にGal, Gal-1-Pを0.25~1 mM添加して調整したろ紙血について, 検量線から求めた回収率はGalが73~100%, Gal-1-Pが80~106%と良好であった (Table 3)。

一般新生児269例について, AP共存系で測定した結果, ヒストグラムは, ほぼ正規分布を示し, その平均値は2.7  $\pm$  1.7 mg/dl as Galであった。

Table 2. Reproducibility of Microfluorometric Measurement

(n=8) Disc added in 0.5 mM	Without AP		With AP	
	FL <sup>a)</sup>	CV(%)	FL <sup>a)</sup>	CV(%)
Gal	68.6	5.3	70.6	5.0
Gal-1-P	-b)	-b)	57.9	6.2
Gal+Gal-1-P	77.1	2.4	131	6.5

a) fluorescence intensity in arbitrary unit

b) no significant intensity

Table 3. Recovery of Gal and Gal-1-P from Blood Disc

Added (mM)	Gal			Gal-1-P		
	Theor. (mg/dL)	Found (mg/dL)	Rec. (%)	Theor. (mg/dL)	Found (mg/dL)	Rec. (%)
Gal 0.5	9	8.5	94	0	ND <sup>a)</sup>	—
Gal-1-P 0.5	0	ND <sup>a)</sup>	—	13	10.4	80
Mix <sup>b)</sup> 0.25	4.5	3.3	73	6.5	6.9	106
Mix <sup>b)</sup> 0.5	9	8.5	94	13	12.4	95
Mix <sup>b)</sup> 1.0	18.0	18	100	26	20.8	80

a) less than 1 mg/dL

b) Gal and Gal-1-P each in the concentration

#### 4 考 察

藤村らも、反射光測光方式のケイ光用マイクロプレートリーダーを用いて、GalとGal-1-Pのマイクロアッセイを試みており<sup>5)</sup>我々も、このタイプの数社の装置を試用したが、いずれも再現性、感度が、使用するマイクロプレートの影響を大きく受け、測定値の信頼性に乏しく、実際にスクリーニングに用いるのは、かなり難しいことが判った。これに対し、コロナ電気社により、最近開発されたMTP-100 Fは、特殊な駆動部とストリップウェルを用い、垂直測光方式を可能とした新しいタイプの装置で、従来の反射光測光方式に比べ、再現性、感度が著しく改善されており、測定時間も96検体あたり2.5分と従来のものと同様、非常に迅速な測定が可能である。また、藤村法の原理に基づいた自動分析装置<sup>3)</sup>も実用化されているが、検体処理能力(100検体/時間)、保守(複雑な流路系)の点でマイクロプレートリーダーの方がスクリーニングに適していると思われる。

ガラクトース血症の鑑別には、GalとGal-1-Pの値が重要であり、また、Paigen法ではGal-1-P、UDP-Galが不鮮明な成育円を示し、判定を困難にしているため、ディスクのAP処理などが検討されている。しかし、本法におい

ては、AP共存系で一次スクリーニングを行なえば、GalとGal-1-Pの総量を正確に測定でき、この点からも有利な方法であると言える。

#### 5 結 語

操作性、検体処理能力に優れたケイ光用マイクロプレートリーダーを用いて、藤村法により、ガラクトース血症の一次スクリーニングを行う方法について検討した。本法は、再現性、感度ともに良好であり、操作及び判定に熟練を要するPaigen法に比べ、簡便であり、しかも、GalとGal-1-Pを正確に測定できることから、ガラクトース血症の一次スクリーニング法として非常に有用であると考えられる。

#### 6 文 献

- 1) E. Beutler, M. C. Baluda : J. Lab. Clin. Med., **68**, 137 (1966)
- 2) R. Guthrie : Hospital practice, **7**, 93 (1972)
- 3) Y. Fujimura, S. Ishii, M. Kawamura, H. Naruse : Anal. Biochem, **117**, 187 (1981)
- 4) Y. Fujimura, M. Kawamura, H.

Naruse : Tohoku J. exp. Med. , 137,  
289 (1982)

- 5) Y. Fujimura : Methods of Enzy -  
matic Analysis 3rd edit. Vol. 6,  
Verlagchemie, Weinheim, PP228~  
296 (1984)