

L-Methionine γ -lyase を用いる 乾燥濾紙血液メチオニンの微量ケイ光定量法の開発

山口 昭弘 福士 勝 清水 良夫 菊地由生子
津田 脩臣*1 江崎 信芳*2 左右田健次*2

要 旨

新生児先天性代謝異常症マス・スクリーニングの対象疾患の一つホモシスチン尿症の新しいスクリーニング法として、乾燥濾紙血液中のメチオニン (Met) を L-Methionine γ -lyase (Met-Lyase) を用いて酵素的に測定する微量ケイ光定量法の開発を試みた。最終的なケイ光検出反応として、酵素反応の生成物 2-オキシ酪酸 (2OB) をロイシン脱水素酵素 (LeuDH) との共役反応を利用して NADH のケイ光減少量として測定する系と、もう一方の反応生成物アンモニア (NH₃) をオルトフタルアルデヒド (OPA) と 2-メルカプトエタノール (2ME) の中性域での特異ケイ光を利用して測定する系につき、それぞれ基礎的条件検討を行った。

1. 緒 言

先天性代謝異常症 4 疾患 (フェニルケトン尿症, メイプルシロップ尿症, ガラクトース血症およびホモシスチン尿症) の新生児マス・スクリーニングは昭和 52 年の開始以来, 15 年を経過し, これら患児の早期発見・早期治療により, 心身障害の発生予防に貢献してきた。検査法としては, Guthrie¹⁾ により開発された微生物学的半定量法である Bacterial Inhibition Assay (BIA 法) がこれまで広く用いられてきた。しかし, 検査結果を肉眼で判定するため, 陽性検体の検出は個人の主観に頼らざるを得ず, 常に判定にあいまいさが残ることになる。このため, 検体処理能力に加え, 信頼性に優れ, 客観的な検査結果が得られる新しい検査法の開発が必要とされてきた。我々は, これらの条件を満たした新しいスクリーニング法の確立を目的として, 96 穴マイクロプレートスケールでの酵素的あるいは化学的発光反応とケイ光用マイクロプレートリーダーを組み合わせた微量ケイ光定量法を開発してきた^{2,3)}。

このうちホモシスチン尿症については, BIA 法では Met を測定することによりスクリーニングされてきたが, 本来, シスタチオニン β -シクターゼの欠損により一次的に上昇する代謝物はホモシステイン (HSH) であり, BIA 法での実際の見逃し例も知られていたことから, 微量ケイ光定量法においては, HSH を測定す

る系を開発した経緯がある。しかしながら, 元々 HSH の血中濃度レベルは, 極めて低い上に *in vitro* では容易に酸化され, タンパクとのジスルフィド結合として存在するが, 還元条件下の抽出でも回収率は約 50% と低値であること, また, 採用した発光反応はすべての SH 基と反応するため, 血中に大量に存在する SH 化合物グルタチオン (GSH) のマスキング処理が必須となる。従って, 濾紙血液 HSH の測定が可能な貴重な方法ではあるが, 原理的・操作的にかなり複雑となり, 感度・安定性にも問題が残されていた。

以上のことから本報では, Met-Lyase を用いて Met を酵素的に測定する方法⁴⁾に着目し, 濾紙血液を試料とした微量ケイ光定量法への応用を検討した。この際, Met-Lyase 反応の異なる生成物 2 種に対するケイ光検出反応について, それぞれ基礎的測定条件の比較検討を行った。

2. 方 法

2-1 測定原理

Met-Lyase により Met から等量生成する 2OB あるいは NH₃ をそれぞれのケイ反応系により測定する。2OB の場合は LeuDH と NADH との共役反応を利用して NADH のケイ光減少量により定量する。一方, NH₃ を測定する場合には, 佐藤ら⁵⁾により開発された OPA と 2ME の中性域での特異ケイ光を利用する

*1和光純薬工業大阪研究所 *2京都大学化学研究所

方法を用いた (Fig 1)。

2-2 酵素試薬

Met-Lyase は Tanaka ら⁶⁾ の方法により、*Pseudomonas ovalis* から精製して得られたものを、LeuDH は TOYOBO 製の市販品を用いた。

2-3 操作

(1) 乾燥濾紙血液からの抽出

濾紙血から 5 mmφ のディスク 1 枚を平底マイクロプレートにパンチし、血色素固定液 (メタノール:アセトン:脱イオン水=35:35:10) 10 μl を加え、37°C で 30 分間放置する。脱イオン水 75 μl を加え 10 分間振とう抽出する。抽出液 50 μl をケイ光測定用ストリップウェル (1x8) に分取する。

(2) Met-Lyase 反応

1 検体あたり 0.5 M $\text{MKH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH 8.0) 20 μl, 0.5 mM Pyridoxal 5'-phosphate 溶液 10 μl, 3 U/ml Met-Lyase 溶液 2.5 μl および脱イオン水 17.5 μl を混合して調製した反応溶液 50 μl を抽出液に加え、37°C で 60 分間インキュベートする。ただし、OPA/2ME 反応を用いる場合にはブランク値を抑えるため、Met-Lyase 量を 2 倍とし、インキュベーションは室温で行うこととした。

(3) -a (2OB 測定系)

1 検体あたり 0.5 M $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$ 緩衝液 (pH 8.6) 40 μl, 1.35 mM NADH 2 μl, 100 U/ml LeuDH 3 μl および脱イオン水 55 μl を混合して調製した反応溶液 100 μl を、Met-Lyase 反応後の溶液に加え、30 分間インキュベートする。

(3) -b (NH_3 測定系)

1 検体あたり 0.1 M KH_2PO_4 80 μl, 200 mM OPA エタノール溶液 10 μl および 100 mM 2 ME エタノール溶液 10 μl を混合して調製した反応溶液 100 μl を、Met-Lyase 反応後の溶液に加え、プラスチックシールにより各ウェルを密封し室温で 30 分間放置後、

0.5 N HCl 50 μl を各ウェルに加える。

(4) ケイ光測定

ケイ光マイクロプレートリーダはコロナ電気製 MTP-100 F 型を用い、LeuDH 反応系の場合は Ex/Em 波長 360/450 nm, OPA/2ME 反応系の場合は 415/475 nm で測定する。

3. 結果

3-1 Met-Lyase 反応

(1) 精製 Met-Lyase の活性確認

Met 標準溶液および実際の試料となる新生児濾紙血液抽出液を用いて、Met-Lyase 反応を行った後、 HClO_4 除タンパク上清をアミノ酸分析計⁷⁾により測定した (Fig. 2)。酵素反応の結果、Met のピークは消失し脱アミノ反応を確認できた。濾紙血抽出液中の他のアミノ酸: Tau, Asp, Ser, Glu, Thr, Gly, Cit, Ala, Tyr, Val, Ile, Phe, Leu, Trp, His, Orn, Lys, Arg については反応前後で大きな変化は認められず、これらアミノ酸に対する活性は認められなかった。

(2) Met-Lyase 量

Met 標準溶液を用い、LeuDH 反応により Met-Lyase 反応を追跡したところ、7.5 mU/sample 以上で一定値を示した (Fig. 3)。

(3) Met-Lyase タイムコース

Met 標準溶液に対する LeuDH 反応を用いた Met-Lyase 反応のモニタリングでは、インキュベーション 60 分以上で一定となった (Fig. 4)。

3-2 LeuDH 反応 (2OB 測定系)

(1) LeuDH 量

2OB 標準溶液を用い、LeuDH の必要量を求めたところ、0.2 U/sample 以上で一定値を示した (Fig. 5)。

(2) LeuDH タイムコース

2OB 標準溶液を用いた LeuDH 反応のモニタリングの結果、インキュベーション 30 分以上で一定となっ

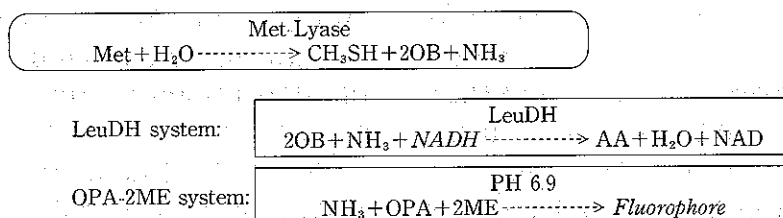


Fig. 1 Principle of Met assay using Met-Lyase with LeuDH or OPA/2ME systems

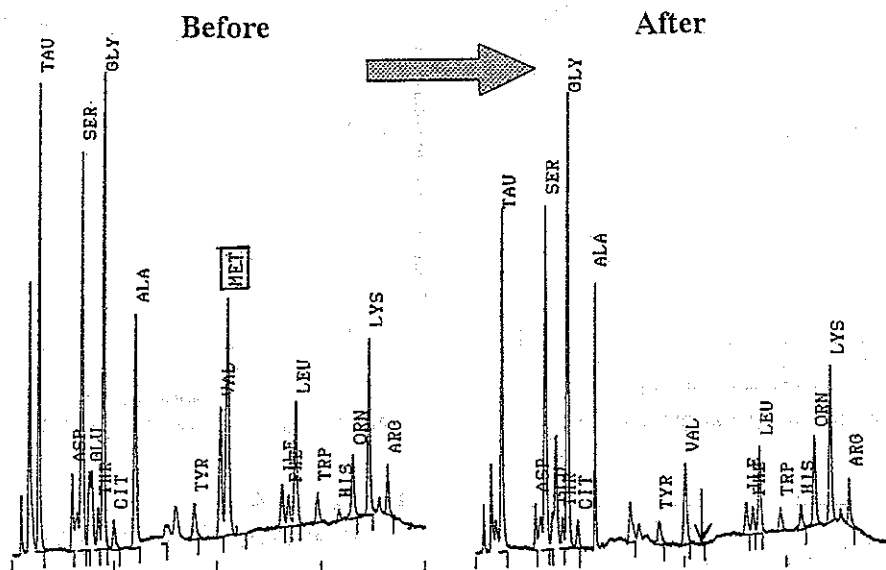


Fig. 2 Amino acids analysis for dried blood spots before and after Met-Lyase digestion

Aqueous Extract of DBS specimen from a hypermethioninemia (Met: 3.8mg/dℓ) was submitted to digestion with Met-Lyase. The deprotonized supernatant with perchloric acid was injected to an amino acid analyzer

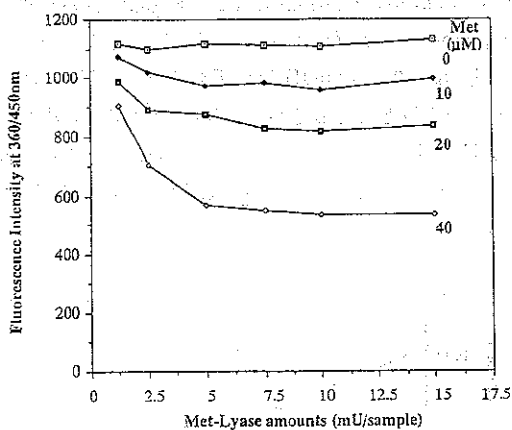


Fig. 3 Effect of Met-Lyase amounts using LeuDH system as a detection reaction

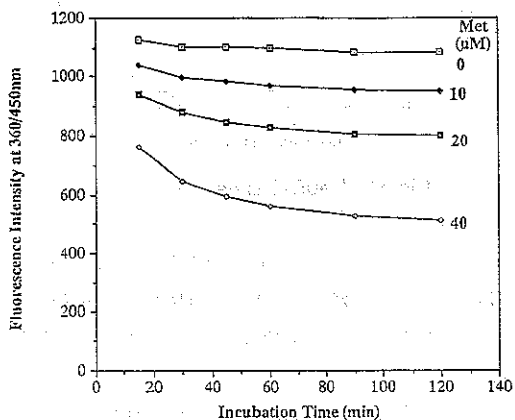


Fig. 4 Met-Lyase time course using LeuDH system as a detection reaction

た (Fig 6)。

3-3 OPA/2ME 反応 (NH₃測定系)

(1) OPA/2ME 濃度

OPA 濃度の増大, 逆に 2ME 濃度の減少によりケイ光強度は上昇した。また, 両者の比率および溶媒を変化させて調べたが, ブランク値を含めた全体のケイ光

強度は変化するものの, S/N 比には大きな影響はなく, 30 分間である程度のケイ光強度が得られる OPA/2ME=200/100 mM in ethanol の条件を選んだ。

(2) OPA/2ME タイムコース

Met 標準溶液を用い, OPA/2ME 反応の経時変化を調べた。ネットの反応は 20 分ではほぼ一定となるが, そ

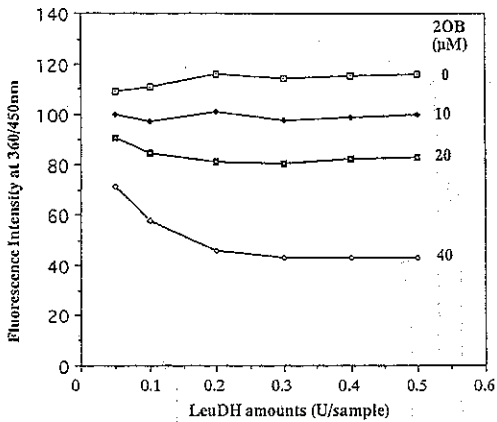


Fig. 5 Effect of LeuDh amounts

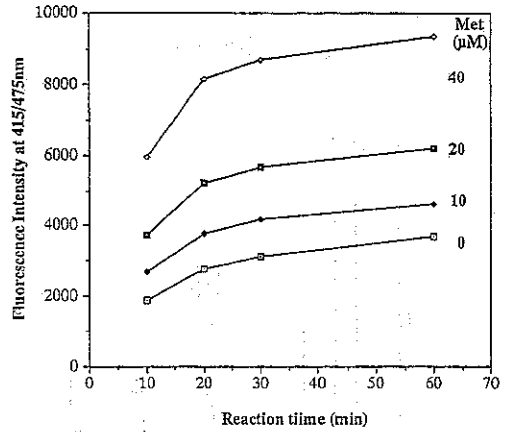


Fig. 7 Time course of OPA/2ME reaction

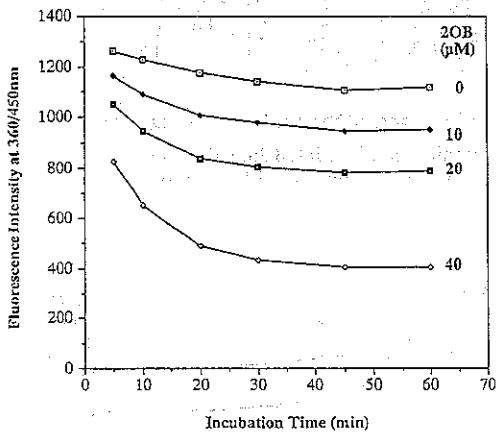


Fig. 6 LeuDh time course

3-4 検量線

Met 標準溶液およびアミノ酸分析計⁷⁾により定量値を求めた Met 添加濾紙血液を用いて検量線を作成した (Fig. 8-11)。標準溶液としては、Met の他に、LeuDh 反応 (2OB 測定系) に対しては 2OB、OPA/2ME 反応 (NH_3 測定系) に対しては、 NH_4Cl 標準溶液の検量線も作成し Met 標準溶液と比較した。その結果、いずれの場合も両標準溶液の検量線は良い一致を示し、Met-Lyase 反応が完結していることを確認できた (Fig. 8, 10)。LeuDh 反応系の場合は、NADH のケイ光減少量として測定され、Met が高濃度の場合、NADH がすべて消費されると、その後は濃度依存性を示さなかった (Fig. 9)。一方、OPA/2ME 反応 (NH_3

の後、バックグラウンドケイ光の漸増が認められた (Fig. 7)。しかし、最終的に 0.5 N HCl の添加後は、少なくとも 1 時間はケイ光強度に変化は見られず安定であった。

(3) ブランク値およびウェル間のケイ光強度差

OPA/2ME 反応は、 NH_3 測定系であるためブランク自体がかなり高い値を示し、また、マイクロプレートの周囲に位置するウェルでは高値傾向を示す現象が見られた。この対策として、プレートの洗浄・加熱処理等を検討したが効果はなく、結局、Met-Lyase および OPA/2ME 反応ともに、プラスチックシールを用いて反応液を密封状態に保ち、インキュベーションを室温で行うのが最善であった。

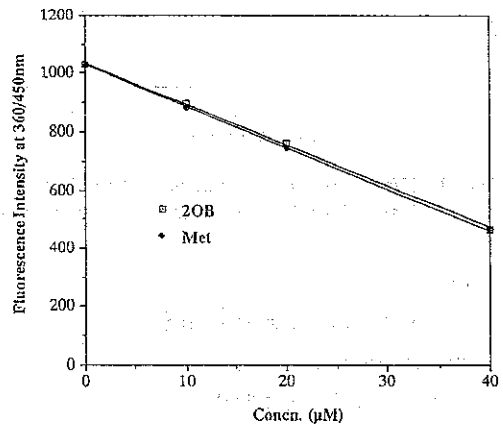


Fig. 8 Calibration curves with LeuDh system for standard solutions

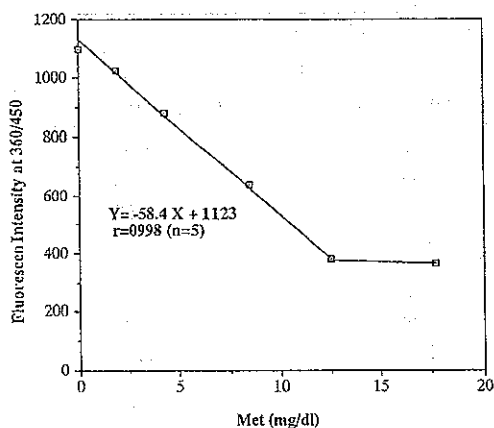


Fig. 9 Calibration curve with LeuDh system for dried blood spots of Met standard

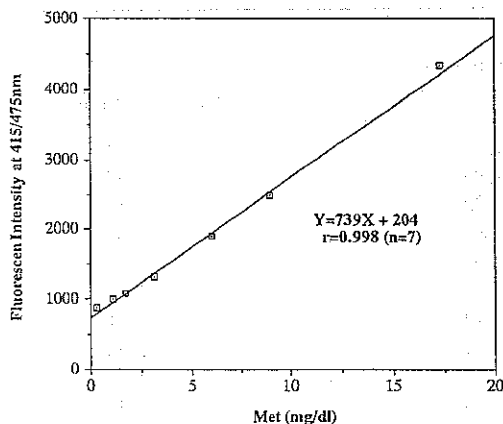


Fig. 11 Calibration curve with OPA/2ME system for dried blood spots of Met Standard

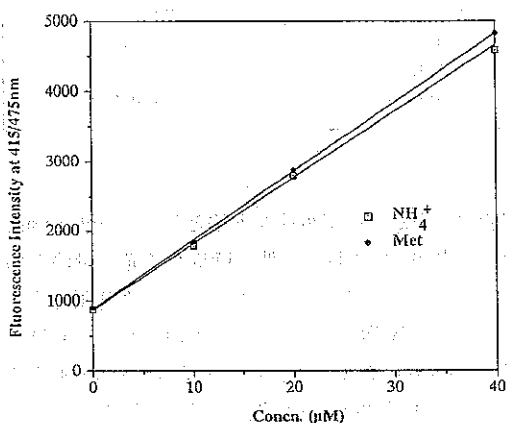


Fig. 10 Calibration curves with OPA/2ME system for standard solutions

測定系)では、高濃度領域においても良好な直線関係を示した。(Fig 11)。

3-5 濾紙血液試料の測定結果

新生児スクリーニングにより発見され、専門医療機関にてフォロー中の高Met血症患児3例から得られた濾紙血液試料10検体について、Met-Lyase法(LeuDh反応およびOPA/2ME反応)による測定値(濾紙血液スタンダード使用)とアミノ酸分析計による値とを比較した(Table 1)。また、正常コントロールとして、一般新生児検体の測定結果も示したが、いずれの方法においても、患児検体の測定値はアミノ酸分析結果と良い一致を示し、一般新生児検体との区別も

容易であった。しかし、LeuDh反応系の場合は、感度不足のため一般新生児検体の多くが検出限界以下であった。

4. 考 察

新生児スクリーニング実施以前は、ホモシスチン尿症の発生頻度は、フェニルケトン尿症に次いで高いアミノ酸代謝異常症と考えられていた。しかし、長年にわたる新生児スクリーニングの結果からは、数十万~百万人に一人と、予想よりもはるかに低い発生頻度が得られている。この原因の一つとして、現行のMetを指標としたBIA法によるスクリーニングでは、見逃し(疑陰性)例の存在が懸念されており、近年、実際に、多くの見逃し例が報告されてきている^{8,9)}。このことから、我々は、酵素欠損により二次的に上昇する代謝物Metではなく、一次的に上昇するHSHを測定するスクリーニング法を開発し、その実際応用を検討してきた。しかし、HSHは不安定なSH基アミノ酸であり、*in Vitro*では容易に酸化されタンパクとのジスルフィド結合として存在し、特に濾紙血液を試料とした場合には、このジスルフィドの還元処理によっても回収率は50%程度と低く、他の要因による非可逆的な変化を受けていると思われる⁸⁾。さらに、この方法においては、SH基の発ケイ光試薬は、HSHに選択的ではないため血球内に大量に存在するSH化合物;GSHに対するマスキング処理を要するという難点がある。このような技術的な問題に加え、新しくHSHのカット

Table 1 Results of the measurements of dried blood spots samples from hypermethioninemia

Sample ID	Met (mg/dl) determined by		
	Amino acid analyzer	Met-Lyase with	
		LeuDH system	OPA/2ME system
C-1864	1.64	1.98	2.04
C-1866	2.40	3.02	3.49
C-1883	3.12	3.05	3.95
C-1890	3.62	4.60	4.47
C-1898	1.86	1.82	1.81
C-1909	3.52	3.46	3.40
C-1910	2.31	2.39	2.29
C-1914	2.43	1.44	2.62
C-1941	4.22	4.78	4.56
C-1945	3.46	3.65	4.25
Mean	2.86	3.02	3.29
SD	0.85	1.14	1.03
Normal control			
N	36	*21	72
Mean	0.35	0.22	0.36
SD	0.08	0.16	0.18
Range	0.21-0.15	0.10-0.60	0.10-0.92

*51/72 samples showed no significant fluorescence intensity

オフ値を設定する必要がある、そのためには実際の患児を含めた新生児検体のデータを蓄積して行かねばならず、ホモシスチン尿症の発生頻度を考慮したとき、この点からも即座に BIA 法に変わり得る方法ではないのが現状である。

他方、フェニルケトン尿症、メイプルシロップ尿症およびガラクトース血症については、現在、脱水素酵素反応に基づいた微量ケイ光定量法あるいは比色定量法が、BIA 法に代わり得る新しいスクリーニング法として既に開発され、一部キット化も実現している。ここで重要なことは、BIA 法の大きな長所の一つが、簡便な共通の操作で多項目のスクリーニングが可能であることであり、これら 3 疾患について BIA 法をマイクロプレート法に置き換えたとしても、ホモシスチン尿症の BIA 法が残る以上、労力的にも経済的にも二重の負担となる。

これらの背景から、ホモシスチン尿症の実用的なマイクロプレート法の開発が急がれるところであり、従来の BIA 法の蓄積データを生かせる点で、より移行が容易な Met を測定するアッセイ系の開発を、今回試みた訳である。多数検体の濾紙血液試料に対して、感度・

処理能力の面から応用可能な方法として、Met-Lyase を用いる方法⁹⁾に着目し、他の微量ケイ光定量法と同様に、ケイ光マイクロプレートリーダにより測定する方法について基礎的条件を中心に検討した (Fig 1)。

Met-Lyase の精製調整および酵素活性の確認後 (Fig 2), まず最初は原法に従い、Met の脱アミノ生成物 2OB を LeuDH を用いて NADH の変化量として測定する系を Met-Lyase 反応の基礎条件も含めて検討した (Fig 3-7)。標準溶液系では安定した測定が可能であり、濾紙血液試料への応用も可能であったが、ケイ光減少量での測定のため、感度・測定レンジの上で不利であり (Fig 8, 9)、空気中のダスト等による非特異ケイ光を生じた場合、疑陰性の結果を招く恐れがある。

そこで、もう一つのアプローチとして NH₃ を OPA/2ME 反応により測定する方法⁹⁾の適用を検討した。(Fig 7, 10)。NH₃測定系のためブランク値は元々高いものの、心配されたアミノ酸の分解により生じる濾紙血液中の NH₃レベルは、測定環境のバックグラウンドレベルに比べ無視できる量であり、濾紙血液試料に対しても十分測定可能であった (Fig 11)。この

測定系の注意点は、マイクロプレートのシーリングが不完全な場合、インキュベーション中に空気中からのコンタミネーションによると思われる、マイクロプレート周辺部のケイ光強度が高値を示す点であり、シーリングを厳密に行う必要がある。しかし、この場合でも疑陰性の原因とはならないことから、一次スクリーニング法としてはより適した方法と考えられる。

高 Met 血症患児の濾紙血液検体の測定結果 (Table 1) は、LeuDH および OPA/2ME いずれの反応系においてもアミノ酸分析計と良い一致を示し、一般新生児との区別も明確であった。しかしながら、Met の血中濃度レベルは Phe の 1/2 および Leu の 1/4 程度とかなり低く、カットオフ値 1 mg/dl の検体を確実に検出するためには、感度の高い OPA/2ME 反応系の場合でも、通常の 3 mm ディスクでは測定困難であり、5 mm ディスクを必要とする。

一方、Met-Lyase は HSH に対しても同様の活性を有する⁹⁾ことから (HSH 標準溶液を用いて現条件での活性を確認済み)、濾紙血液の抽出条件を検討すれば理論的には Met と HSH の総量が測定可能である。Met を指標とした場合の疑陰性例の存在を考えたとき、次のステップとして、Met と HSH の総量を測定する理想的なホモシスチン尿症のスクリーニング法への発展が不可欠である。

5. 結 語

ホモシスチン尿症の新しいスクリーニング法として

Met の微量ケイ光定量法を開発した。Met-Lyase を用い、最終的なケイ光検出反応として LeuDH/NADH 反応と OPA/2ME 反応の組み合わせにつき比較検討した結果、OPA/2ME 反応を用いる系が総合的に優れ、5 mm ディスクを用いれば実際のスクリーニングに十分適用可能であった。

6. 文 献

- 1) Guthrie R: Hum. Genetics, The National Foundation, March of Dimes, 92, 1968
- 2) Yamaguchi A, et al: Clin. Chem., 35, 1962-1964, 1989
- 3) Yamaguchi A, et al: Screening, 1, 49-62, 1992
- 4) Tanaka H, et al: J. Appl Biochem., 2, 439-444, 1980
- 5) 佐藤稔, 他: 札幌市衛生研究所年報, 12, 60-63, 1985.
- 6) Tanaka H, et al: FEBS LETTERS, 66, 307-311, 1976.
- 7) Hayashi, T, et al: J Chromatogr, 274, 318-324, 1983.
- 8) Mudd S, et al: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th edn. 717, New York, McGraw-Hill, 1989
- 9) 武田英二, 他: 日本マス・スクリーニング学会誌, 2, 106-107, 1992.

Microfluorometric Assay for Methionine with Novel Enzyme L-Methionine γ -lyase

Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi,
Nobuo Tsuda*¹, Nobuyoshi Esaki*², and Kenji Souda*²

A microfluorometric assay for methionine in dried blood spots has been recently developed to improve the newborn screening of homocystinuria by using the novel enzyme L-methionine γ -lyase (Met-Lyase). We adopted two methods for the combined fluorometric detection of stoichiometric products of the Met-Lyase reaction. One is based on the measurement of 2-oxobutyrate by leucine dehydrogenase/NADH system, while the other measures the ammonium by an o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol system. The two methods were optimized in the basal condition and evaluated in terms of their efficiency as a screening method.

*¹Osaka Research Laboratory, Wako Pure Chemical Industries, LTD.

*²Institute of Chemical Research, Kyoto University