

血液濾紙のガラクトースの定量法

岡山県環境保健センター¹⁾

岡山大学医学部癌研生化学 (指導: 小田琢三教授)²⁾

美澄博雅^{1,2)} 末政恵子¹⁾・土居真人¹⁾

井上百合¹⁾・石田立夫¹⁾

(昭和53年12月26日受稿)

Key word: 全血中のガラクトース, 血液濾紙,
ガラクトースデヒドロゲナーゼ

要 約

新生児の血液を滲み込ませた濾紙中のガラクトースを2%過塩素酸で抽出してgalactoseを測定する方法について検討した。この方法は除蛋白操作が容易で、安定した結果が得られるので血中ガラクトースの定量方法として有用である。本法による新生児血中ガラクトースの平均値は0.14mg/dlであり、生後の日齢による変動は見られなかった。

結 言

新生児はラクトースを摂取しているので、血中ガラクトース値は哺乳の前後や、肝機能などの原因で変動し¹⁾、ガラクトース血症の変異型^{2,3,4,5)}、新生児期の一過性のガラクトースの上昇⁶⁾等を鑑別するために、ガラクトース血症のスクリーニングでガラクトースが高値を示す症例の追跡が必要である。本研究ではガラクトース血症等のスクリーニングの検体として使用されている濾紙に滲み込ませた微量の全血中のガラクトースの定量法について検討した。

材料および方法

血液を滲み込ませる濾紙は北里研究所製のPKU用採血濾紙を使用した。検体は生後4~7日目の新生児より採血され濾紙に吸着された。既知量のガラクトースを含む血液を滲み込ませた濾紙を標準として用いた。 β galactosedehydrogenase (5U/mg)はBoehringer Biochemica製を使用した。

抽出および測定、血液を滲み込ませた濾紙を直径

3mmに打ち抜き、これを75 μ lの2%過塩素酸で4 $^{\circ}$ Cで6時間抽出した後に、抽出液50 μ lに930 μ lの0.25M Tris-acetate, pH8.0 at 25 $^{\circ}$ C, 20 μ lの10mM NAD, 0.025U (5 μ g protein)のgalactose dehydrogenaseを加え37 $^{\circ}$ Cで1時間反応した。galactosedehydrogenaseを加えない反応液を対照とした。反応後に蒸留水2mlを加え励起波長365nm, 蛍光波長450nmで蛍光強度を測定した。既知量のガラクトースを含む血液を滲み込ませた標準濾紙を同様の方法で測定して検量線を求めた。

結 果

galactose dehydrogenaseによるガラクトースの定量の反応液の中に、血液濾紙抽出液に含まれる過塩素酸が持ち込まれる。反応液中の過塩素酸はFig 1のように0.1%まではgalactose dehydrogenaseの活性に影響がなかったがさらに高い過塩素酸濃度では、galactose dehydrogenaseの反応が阻害された。従って、反応液中の過塩素酸濃度が0.1%になるように濾紙の抽出液を反応液で希釈した。また対照とする反応液にもすべて同一濃度の過塩素酸を加えた。

濾紙からガラクトースの抽出に必要な時間はFig 2のように6時間で最大となり、さらに抽出するとgalactose量は減少した。

galactoseの定量に必要なgalactose dehydrogenaseの量はFig 3に示すように5 μ g protein(0.025U)以上である。37 $^{\circ}$ Cでの反応は1時間以上持続した(Fig 4)。1時間の反応での検量線はFig 5のように、測定した範囲でgalactose濃度とFluorescenceはほ

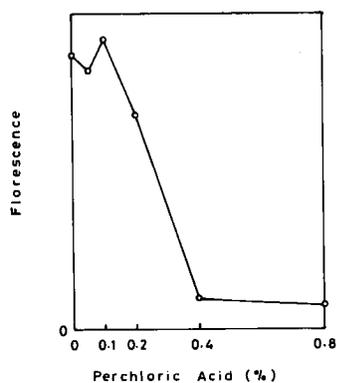


Fig. 1. Effect of perchloric acid on the activity of galactose dehydrogenase. Galactose ($0.4 \mu\text{g}$) was incubated in the reaction mixture (Materials and Methods) containing indicated amount of perchloric acid.

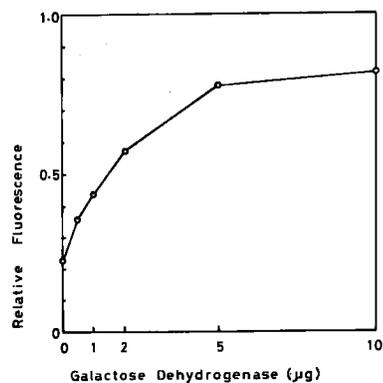


Fig. 3. Effect of galactose dehydrogenase concentration on fluorescence intensity. Galactose ($0.8 \mu\text{g}$) was assayed with indicated amounts of galactose dehydrogenase.

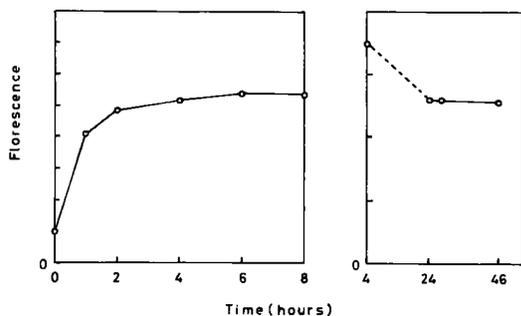


Fig. 2. Time course of extraction of galactose with 2% perchloric acid. Three blood spots (containing 20 mg/dl of galactose) of 3 mm diameter were extracted with $75 \mu\text{l}$ of 2% perchloric acid for indicated period of time and $50 \mu\text{l}$ aliquots of extract were assayed as described in Materials and Methods.

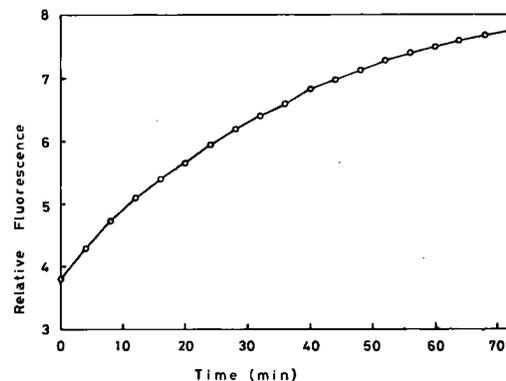


Fig. 4. Time course of galactose dehydrogenase activity. Galactose ($1 \mu\text{g}$) was assayed at indicated period of time at 37°C .

は直線関係にある。galactose 濃度は $1 \sim 2 \text{ mg/dl}$ で 2 枚の 3 mm disc、(血液量 $5 \sim 6 \mu\text{l}$) で十分測定できることが示された。同一濃度の抽出液の測定の標準偏差は 8% であり、血液濾紙の測定としては安定した結果であると考えられる。抽出には過塩素酸による抽出であるために、血色素は抽出されず、血色素による NADH の蛍光の吸収もみられなかった。

新生児 30 人のガラクトースの測定値は $0 \sim 1 \text{ mg}$ で平均 0.13 mg/dl で生後の日齢との相関は見られなかった。

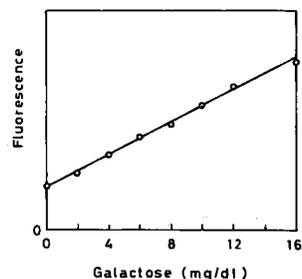


Fig. 5. Standard curve for galactose determination. Standard blood spots containing indicated amount of galactose (mg of galactose/ 100 ml of whole blood) were assayed as described in Materials and Methods.

考 察

Grinier らは galactose dehydrogenase による血中 galactose の自動分析の結果、新生児の血中には galactose は殆んど検出されないと報告している⁷⁾。また新生児の galactose の標準値は Paigen phage 法では negative であると報告されている⁸⁾。従って本研究で得られた新生児のガラクトースの値は、以上の報告と一致すると考えられる。galactose dehydrogenase の反応によって生成する NADH の蛍光の測定においては、正常血液中に非特異蛍光があるのでこれを対照として実測値から差引かなければ、異常に高いガラクトース値を与えることがある。これに関しては Grenier も同様の報告をしている⁷⁾。本法ではまた、galactose dehydrogenase による微少なバックグラウンドの上昇も測定値から差引いた。

血液中のガラクトースを藤村ら⁹⁾と同様にして血液濾紙を固定して galactose を測定した場合も殆ど

同一の galactose の測定結果が得られているが¹⁰⁾、過塩素酸固定の方が安定した結果が得られた。

病的な場合で、galactose の軽度上昇は次のように報告されている。galactokinase 欠損による galactosemia では空腹時の galactose が 3~6mg/dl であった²⁾。galactosemia の Duarte variant では血中 galactose は検出されなかった³⁾。Duarte variant と galactosemia の 2 重の heterozygote でも血中 galactose は検出されなかった⁴⁾。galactose-4-epimerase 欠損症では血中 galactose が 0~2 mg/dl で galactose-1-phosphate が 3~70mg であった⁵⁾。本研究で得られた正常新生児のガラクトースの上限は 1 mg/dl であり、2 mg/dl を越えることはまれであると考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み御指導、御校閲を賜った小田教授に深謝致します。

文 献

1. 森 道子, 長谷 豊, 鶴原常雄, 大浦敏明, 下山賢治, 前田紀夫, 佐竹律子, 久原良躬: 新生児期における血中ガラクトース値, 日本新生児学会誌, 14, 409-412, 1978.
2. Thalhammer O., Gizelmann, R., and Pantlitschko, M.: Hypergalactosemia and galactoseuria due to galactokinase deficiency in a newborn. *Pediatrics*, 42, 441-445, 1968.
3. Hammersen, G. and Levy, H.L.: New variant of galactosemia. *Pediatr. Res.* 8, 389, 1974.
4. Levy, H.L., Sepe, S.J., Walton, D.S., Shih, V.E., Hammersen, G., Houghton, S., and Beutler, C.: Galactose-1-phosphate uridylyl-transferase deficiency due to Duarte/galactosemia combined variation: Clinical and biochemical studies, *J. Pediatr.* 92, 390-393, 1978.
5. Gitzelman, R., Steinmann, B., Mitchell, B., and Haigis, E.: Uridine diphosphate galactose 4'-epimerase deficiency. *Helv. Paediatr. Acta* 31, 441-452, 1976.
6. 川村正彦: ガラクトース血症のマス・スクリーニング. 産婦人科の世界, 26, 1227-1332, 1974.
7. Grenier, A., and Laberge, G.: Rapid method for screening for galactosemia and galactokinase deficiency by measuring galactose in whole blood spotted on paper. *Clin. Chem.* 19, 463-465, 1973.
8. Hammersen, G., Houghton, S., and Levy, H.L.: Rennes-like variant of galactosemia: Clinical and biochemical studies. *J. Pediatr.* 87, 50-57, 1975.
9. 藤村有信, 米澤彰二, 佐藤月子: 先天性代謝異常のマススクリーニング (第7報) 名古屋市衛生研究所報, 23, 15-21, 1976.
10. 美登博雅, 土居真人, 末政恵子, 井上正直, 石田立夫, 市場洋三, 高坂陸年: 先天性代謝異常スクリーニング検査の問題点及び検査結果. 岡山県環境保健センター年報, 2, 228-241, 1978.

Fluorometric analysis of galactose in whole blood spotted on paper**Hiromasa MISUMI^(1,2), Keiko SUEMASA⁽¹⁾, Masato DOI⁽¹⁾,
Yuri INOUE⁽¹⁾ and Tatsuo ISHIDA⁽¹⁾****(1) Environment and Health Research Center of Okayama Prefecture****(2) Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University****Medical School (Director : Prof. Takuzo Oda)**

Galactose was measured in whole blood spotted on paper as a screening test for congenital metabolic disorders in the newborn. Two dried blood spots of 3 mm diameter were extracted with 2% perchloric acid and diluted with a buffer. Galactose was determined by galactose dehydrogenase. The normal range for galactose in the newborn by this method was 0 to 0.15 mg/dl.