

ノート

ガラクトース血症マススクリーニングにおけるマイクロプレート酵素法導入のための基礎的検討

丸山 励治・松井 利夫・川畑 光政

Basic Study for induction of Microplate Enzyme Assay in Neonatal Mass-screening for Galactosemia in Fukui Prefecture

Reiji MARUYAMA, Toshio MATSUI, Mitsumasa KAWABATA

1 はじめに

ガラクトース血症¹⁾はガラクトース代謝に関わる先天的な酵素欠損または活性低下によって、血中にガラクトース(GAL)またはガラクトース-1-リン酸(G1P)が蓄積し、肝機能の異常、白内障など種々の障害を引き起こす疾患の総称である。この疾患には、G1Pウリジルトランスフェラーゼ(以下、GALT)欠損症、ガラクトキナーゼ(以下、GALK)欠損症、ウリジン-2-リン酸ガラクトース-4-エピメラーゼ(以下、UDP-GALE)欠損症の3種類の酵素欠損症が知られており、それぞれI、II、III型に分類される。そして、それぞれの発見率²⁾はI型で1/920,000、II型で1/1,000,000、III型で1/20,000~1/160,000となっている。新生児ガラクトース血症マススクリーニングはこれらの疾患を早期に発見し、それに伴う障害発生を軽減することを目的として全国的に行われており、このスクリーニングにより発見されるガラクトース血症の発見率は1/35,400³⁾となっている。スクリーニングでは乾燥血液濾紙中のGAL濃度とGALT活性が主に測定され、前者には半定量的なペイゲン法⁴⁾かあるいは、定量的なガラクトース脱水素酵素・マイクロプレート法⁵⁾(以下、MP法)が用いられ、後者にはボイトラー法⁶⁾が用いられている。更に、確認検査や2次検査にはこれら方法のほかに薄層クロマトグラフィー法⁷⁾やUDP-GALE活性測定法⁸⁾が用いられる。2003年2月現在、スクリーニングを実施している全国51施設のうち、ペイゲン法が26施設、酵素法が26施設(1施設は2方法併用している)で用いられており、この内25施設ではボイトラー法が併用されている。

福井県のガラクトース血症のスクリーニングは1977年12月から始まり、ボイトラー法が用いられたが、1981年1月からペイゲン法が併用されるようになった。ペイゲン法では、抗生剤を含む検体は大腸菌の生育を阻害するため測定できない。また、同法はGAL以外にG1P、UDP-GAL、ラクトース等を同時に測定するため、検査結果はこれらの総量である。このため、スクリーニングの指標物質であるGALをより正確に定量できるMP法が全国の検査施設で広く用いられるようになってきている。本県でもMP法を導入し、より正確な検査を実施したいと考えている。そのためには

新生児の血中GAL濃度を把握し、適正なカットオフ値(陽性基準値)を定める必要がある。そこで、概ね2003年度4月の検体698例を用いて新生児の血中GAL濃度の正常範囲を推定した。更に、2003年1月から5月の検体のうち、ペイゲン法で2mg以上を示した検体に対する確認検査の結果を基に、カットオフ値を推察した。

2 方 法

2.1 検体

福井県内で出生し、当センターに検査依頼のあった新生児を対象とした。検体は医療機関で採血され作製された乾燥血液濾紙を用い、測定には主としてφ3mmディスク1枚を使用した。

2.2 試薬および測定キット

ペイゲン法には「血中ガラクトース測定試薬(吉田法)」(栄研科学)を用いた。操作は測定キットに付属されている操作法に従って寒天培地を作成し、パンチインデクサー(MODEL VII、ファンダメンタルプロダクツ)を用いて検体を並べた後、37度で培養して16時間後と40時間後に生長帯を観察した。MP法には全血中ガラクトース測定用キット「エンザプレート GAL-R」(バイエルメディカル)を用いた。MP法は操作法に従ってアルカリフォスファターゼ(G1Pを脱リン酸によりGALへ変換する、以下ALP)の添加なしでGALのみを測定した後、付属ALPの10倍希釈液を10μl添加し、更に1時間反応させGALとG1Pの総量を測定した。そして「式1」に従ってG1P量を求めた。

$$G1P = (\text{ALT添加での測定値} - \text{ALT無添加での測定値}) \times 1.44 \quad (\text{式1})$$

2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム塩は東京化成から購入した。また、その他試薬はすべて特級品を用いた。

3 結果と考察

3.1 新生児のガラクトース濃度の測定

概ね2003年4月に依頼された698例の初回検体（判定はいずれも正常）をペイゲン法とMP法で測定し、そのGAL濃度分布を図1に示した。ペイゲン法の測定範囲は4~20mg/dlであるが、16時間培養後の分布は図1(a)となり、4例を除くすべてが測定範囲以下であった。また、617例(88%)では生長帯を観察できなかった。40時間培養後の分布は図1(b)となり、測定範囲内の検体が13例となった。更に、抗生剤の影響による判定不能の検体が4例確認できた。これらは長時間の培養で生育阻止円の判定が明確になったためである。また、614例(88%)では16時間の場合と同様に生長帯が認められなかった。MP法の測定範囲は0.2~20mg/dlとペイゲン法よりも低濃度を測定できる。ALP無添加で測定したGAL濃度分布は図1(c)となり、平均±標準偏差: 0.57 ± 0.37 mg/dl、範囲(最小-最大): 0~3.9mg/dlであった。ALP添加によるGALとG1Pの総量の分布は図1(d)となり、平均 1.96 ± 1.43 mg/dl、範囲0~9.6mg/dlであった。更に両測定値から求めたG1P濃度分布は図1(e)となり、平均 1.99 ± 1.82 mg/dl、範囲0~12.1mg/dlであった。この結果は吉田ら⁹⁾(GAL: 0.96 ± 0.55 mg/dl, G1P: 2.62 ± 2.08 mg/dl, n=577)や高橋ら¹⁰⁾(GAL: 1.39 ± 0.97 mg/dl, n=19,630)の測定値と比較して低かった。しかし、林ら¹¹⁾(GAL: 0.60 ± 0.48 mg/dl, n=708)の結果と概ね一致した。これは、検体の問題として血液付着量のばらつきによる変動が考えられ、また、「正常範囲」

の定義や平均値の算出方法の相違による影響も考えられる。藤本ら¹²⁾は新生児検体のヒストグラムはALP無添加では正規分布を示し、ALP添加では対数正規分布を示すと報告している。しかし、著者らの示したそれぞれの分布には正規性は認められなかった(GAL: 正規性 $p=0.848$ 、対数正規性 $p=0.145$, GAL+: 正規性 $p=0.807$ 、対数正規性 $p=0.064$, G1P: 正規性 $p=0.795$ 、対数正規性 $p=0.052$)。測定はキット、コントロールともに同じLotを用いて約30~70検体毎に14回に分けて行った。ALP無添加でのコントロールの測定値を表1に示した。測定値は表示濃度と比較して各濃度で僅かに低かったが、酵素法は日差変動が小さく、安定した結果が得られ、それぞれの変動係数は6.1%、8.5%、7.2%と良好であった。

3.2 カットオフ値の推定

平成15年1月から5月までの期間中に3,323例の初回検査の依頼があった。この内、ペイゲン法で2mg以上の濃度を観察した検体(139例)について再度MP法で測定した。その相関を表2に示した。相関係数はALP無添加では0.465、ALP添加では0.565であった。ALP無添加によるGALの測定結果はペイゲン法と関連が弱かったが、ペイゲン法で高値を示した検体の多くはALP添加の結果でも高い値を示し、関連が認められた。全国的なカットオフ値は各施設で異なっており、例えばMP法利用施設のカットオフ値はALP無添加によるGALは3~8mg/dl(25施設)、ALP添加では3~16mg/dl(6施設)、G1Pは6~20mg/dl(18施設)と幅がある。当センターにおいて、ALP無添

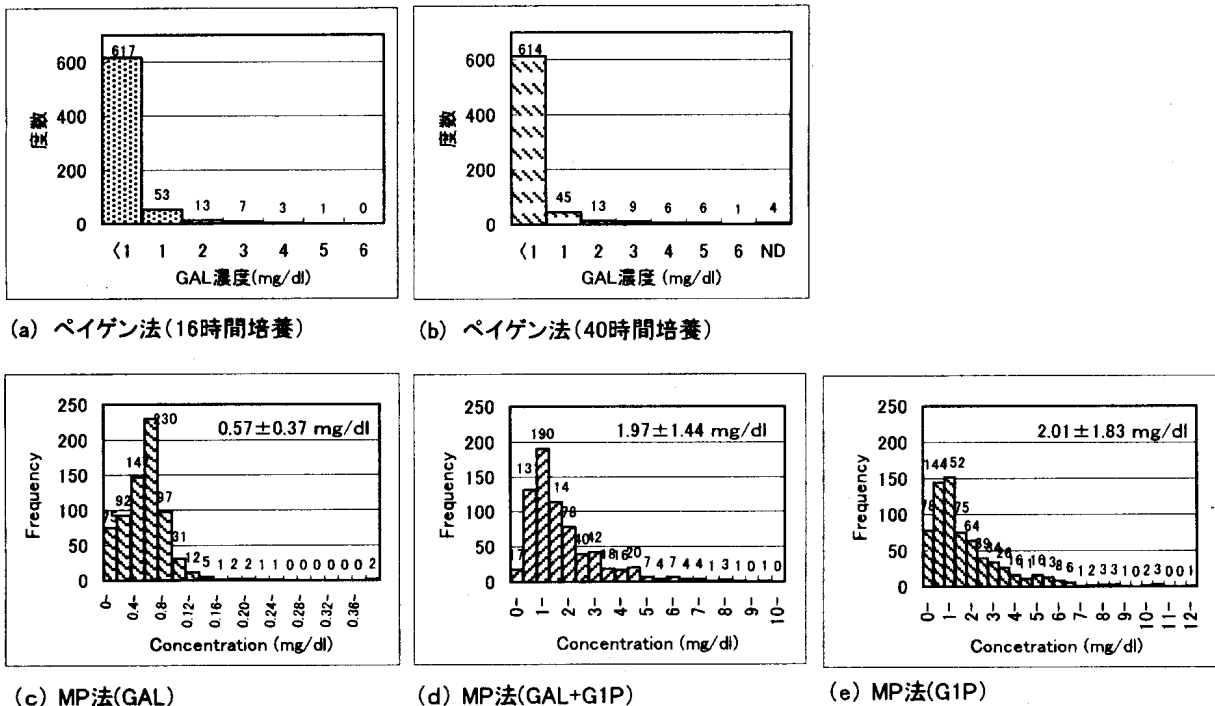


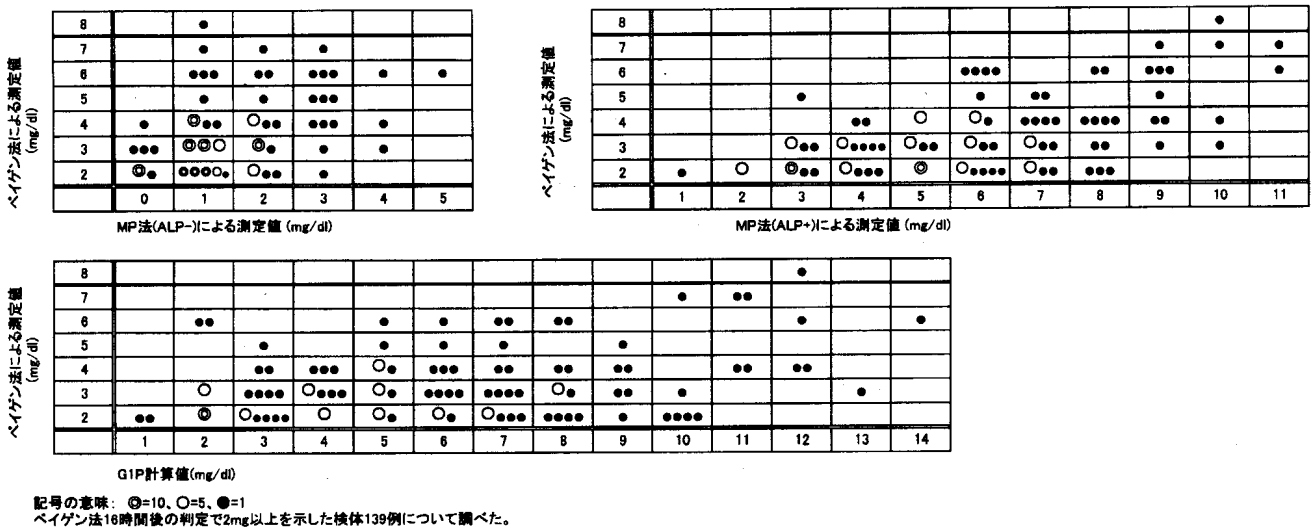
図1 新生児乾燥血液濾紙中のガラクトース濃度の分布

表1 コントロール血液濾紙の測定

	表示値 mg/dl	平均値±標準偏差 mg/dl	変動係数 %	n
コントロールⅠ	2.3±0.5	2.1±0.1	6.1	14
コントロールⅡ	4.4±0.9	4.2±0.4	8.5	14
コントロールⅢ	10.2±2.0	9.8±0.7	7.2	14

Lot No.: ZC14H21

表2 ペイゲン法とMP法の相関



加測定のカットオフ値を3 mg/dlとすると再採血要求数は16例に増加し、4 mg/dlとした場合には4例、5 mg/dlとした場合には1例であった。一方、ALP添加の場合のカットオフ値を6 mg/dlとすると再採血要求数は72例であり、8 mg/dlで25例、10mg/dlで6例であった。計算されたG1Pのカットオフ値を10mg/dlとすると16例、14mg/dlで1例であった。このように、いずれの場合でもカットオフ値を上げると再採血要求数が減少した。当センターのペイゲン法のカットオフ値は8 mg/dlであり、再採血を要求した1例はMP法の測定結果からG1Pが高値であったので、ALP無添加の測定では再採血と判定されなかった。また、この例はALP添加およびG1Pのカットオフ値がそれぞれ10mg/dl以上、12mg/dl以上の場合に再採血となった。しかし、この例の2次検査の結果は正常であったことから、ALP添加およびG1Pのカットオフ値を前述した値以下に設定すると偽陽性が増加することが予想される。

全国ではスクリーニング開始から2001年度までに907例のガラクトース血症患者が発見されている³⁾。その内、12例のGALT欠損症患者および15例のGALE欠損症患者の初回検体でのGAL最低値は8 mg/dl¹³⁾と報告されている。

また、精度管理センターのアンケート結果から2002年7～12月の再採血率の平均は0.31±0.41%であり、範囲は0.00～2.10%であった。ALP無添加、すなわちGAL濃度のカットオフ値は4 mg/dlとした場合に再採血率が0.12%であった。また、算出されるG1Pのカットオフ値を12mg/dlとすると再採血率が0.18%であった。このときの全体の再採血率は、再採血と判定された検体のうちGAL、G1Pともに高値の検体がないので0.30%となる。これは全国的な平均とはほぼ一致する値である。ところで、福井県の発見頻度は1/118,000¹⁴⁾と全国の発見率1/35,400より低かったが、この疾患は遺伝的な疾患であるので、保因者の数に地域的な隔りがある可能性も考えられ、上記の検討からMP法のカットオフ値はGALで5 mg/dl、G1Pで14mg/dlが妥当であると推察される。

3.3 検査システム

ペイゲン法で用いられる大腸菌変異株はGALだけでなくG1PやUDP-GAL、ラクトースも栄養源とするが、これらを基に成長した菌の生長帯はGALのものと比較してその輪郭が不鮮明になり、このことが判定を難しくさせてい

る。実際の検査では40時間培養し、観察を2回とすることで、GALを多く含む生長帯のコントラストが高くなり、異常な検体が容易に判定できるようになる。加えて、抗生剤含有検体は40時間の培養で初めて鮮明な生育阻止円が形成されるので、判定不能と判断される。実際に2003年1月から5月までの間に11例(0.33%)が判定不能であった。また、ペイゲン法は結果判定までに3日間を要し、更に確認検査(+1日)で所要日数は4日となる。これに対して、MP法は抗生剤の影響がなく、ほぼ半日で結果を得ることができる。そこで著者らはガラクトース血症マススクリーニングには1次検査で経済的なペイゲン法を用い、40時間培養後2mg以上と判定された検体に対して精度が良く迅速測定が可能なMP法を適用し、GAL、G1Pを分別測定することが有効であると考え。更に、MP法はガラクトース血症の各病型の判別だけでなく、スクリーニングで同時に見つかる他の疾患²⁾の発見にも有力な情報を提供できる。また、発見率が低いマススクリーニング対象疾患は患者の測定データを数値として蓄積することが重要であり、このような点からもMP法は有用である。

参 考 文 献

- 1) 成瀬浩、松田一郎：新生児マススクリーニングハンドブック、南江堂、89-99 (1989)
- 2) 岡野善行：ガラクトース血症のスクリーニングで発見される疾患—ガラクトース血症Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型およびFanconi-Bickel症候群を中心にして—、先天性代謝異常症等検査技術者研修会資料、38-47 (2002)
- 3) 母子衛生研究会：母子保健の主なる統計—平成14年刊行—、母子保健事業団、101 (2002)
- 4) 成瀬浩、松田一郎：新生児マススクリーニングハンドブック、南工堂、233-239 (1989)
- 5) Yamaguchi A., Fukushi M., Mizushima Y. : Microassay for screening newborns for galactosemia with use of a fluorometric microplate reader, Clin. Chem., 35, 1962-1964 (1989)
- 6) 成瀬浩、松田一郎：新生児マススクリーニングハンドブック、南工堂、240-244 (1989)
- 7) Fujimoto A., Aono S., Oura T. : A simple new method for the diagnosis of galactosemia. In Naruse H., Irie M. eds., Neonatal Screening, Amsterdam, Elsevier Scientific Pub., 254-5 (1983)
- 8) Fujimura Y., Kawamura M., Naruse H. : A new mass screening method of detecting UDP-galactose-4-epimerase deficiency, Tohoku J. exp. Med., 131, 15-22 (1980)
- 9) 吉田加寿子、植田ヤイ子、小黒祐子、斎藤君恵、古関正意：正常新生児乾燥血液濾紙血液中のガラクトースおよびGal-1-Pの濃度について、日本マス・スクリーニング学会誌、2、69-70 (1992)
- 10) 高橋和代：酵素法導入の経験、先天性代謝異常検査技術者研修会資料、51-60 (1999)
- 11) 林隆義、小林正和、井上豊治、森忠繁：ガラクトースマイクロプレート比色定量法のルーチン導入のための検討、日本マス・スクリーニング学会誌、2、137-138 (1994)
- 12) 藤本昭栄、大谷隆三、大浦敏明、山口昭弘、中村健治、長谷豊：ガラクトース血症マススクリーニングに於けるマイクロプレートでの蛍光法と比色法との比較検討、日本マス・スクリーニング学会誌、2、139-140 (1994)
- 13) 青木菊麿：新生児マススクリーニングの手引—14. ガラクトース血症—、日本マス・スクリーニング学会誌、8、suppl. 2、73-81 (1998)
- 14) 佐澤恵美子、松井利夫、正通寛治、杉浦正樹、飯田和質：福井県における先天性代謝異常症等のマススクリーニングの実施状況について(平成13年度)、福井県衛生研究所年報、40、52-57 (2001)