

ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(GALT) 活性測定試薬の有用性の検証

湊山 亜未 九曜 雅子 福士 勝¹

Investigation of the Measuring Reagent for Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase
(GALT) Activity,
Using Dried Blood Specimen for Newborn Screening.

Ami MINATOYAMA, Masako KUYO, and Masaru FUKUSHI

目的：新生児マススクリーニング検査の対象疾患のひとつであるガラクトース血症は、欠損する酵素によって4つのタイプに分けられる[1]。そのうち、症状が重篤で緊急性の高いI型を確実に発見するために、ろ紙血液中のガラクトースを、マイクロプレートを使用して定量する酵素法[2]に加えて、ポイトラー法でガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(GALT)の活性の有無を判定している[3]。測定原理を図1に示す。GALT活性の判定は、酵素反応により生成するNADPHの蛍光を、判定用ろ紙にスポットして目視で確認する。ところが、これまで使用していた判定用ろ紙であるWhatman DE81が販売中止となり、これに代わる判定用ろ紙について検討されていたが、適当なろ紙は見つからなかった[4]。そのため、GALT活性の定量の検討が全国的に進められていた[5]。今回、株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリーにおいてGALT活性測定用の試薬が開発されたことから、この試薬キットを使用した測定について正確性及び再現性等を検討したので報告する。

材料と方法：

1. 検体：新生児ろ紙血液検体については、富山県の新児マススクリーニング検査申込書に記載されている『先天性代謝異常等検査を終えた血液ろ紙の使用について』の包括的同意が得られた検体を用いた[6]。いずれのろ紙血液検体も、乾燥剤とともにチャック付きビニール袋に入れ、4℃で保管した。
2. 試薬キット構成：反応試薬バイアル(UDP-Glu, Gal-1-P, NADPを含む凍結乾燥品)、試薬溶解液(EDTA, サポニン, トリス酢酸緩衝液,

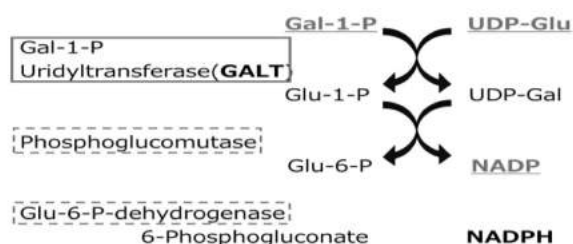


図1. 測定原理

下線が反応試薬に含まれるろ紙血液中のGALTの作用で生成するNADPHの蛍光強度を定量する



図2. GALT活性測定手順

- pH8.0), 標準バイアル(NADPH標準品), 5倍濃縮反応停止液(グリシン緩衝液, pH10.5), コントロールろ紙血液(4濃度+ブランク)からなる。
3. 検体の処理と測定：手順を図2に示した。日内変動, 日間変動の検討については試薬キットの構成であるコントロールろ紙血液を使用した。

1. 株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー

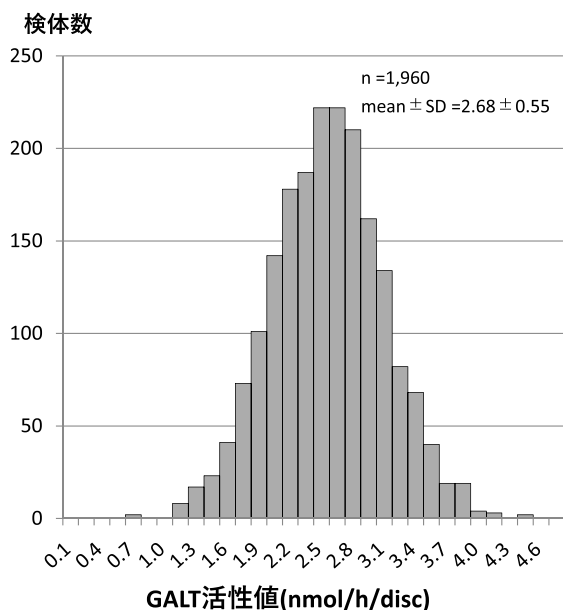


図 3. 新生児ろ紙血液検体の GALT 活性測定値分布

表 1. アッセイ内変動の検討結果 (GALT 活性値)

	Ctrl.1	Ctrl.2	Ctrl.3
平均 (nmol/h/disc)	0.411	0.770	2.153
SD	0.031	0.068	0.104
CV	7.5%	8.8%	4.8%

n=10

表 2. アッセイ間変動の検討結果 (GALT 活性値)

	Ctrl.1	Ctrl.2	Ctrl.3
平均 (nmol/h/disc)	0.426	0.784	2.259
SD	0.026	0.062	0.118
CV	6.0%	7.9%	5.2%

n=2 2重測定 6日間

結果：

1. 新生児ろ紙血液検体の測定値分布

新生児ろ紙血液検体 1,960 件について測定した結果を図 3 に示した. GALT 活性値の mean $\pm$ SD は 2.68 ± 0.55 nmol/h/disc であった. 酵素活性の有無の判定基準となりうる 99.95%ile 値は 0.677 nmol/h/disc であった.

2. アッセイ内変動

結果を表 1 に示した. いずれのコントロール検体も, GALT 活性値の変動係数 CV は 10% 以内であった.

3. アッセイ間変動

2 重測定 (n=2) を 6 日間行った. 結果を表 2 に示した. いずれの濃度も, GALT 活性値の CV は 10% 以内であった.

4. 検体の測定値の変動

それぞれ異なる病院で採血された, 正常検体のろ紙血液 4 検体を用いて, 1 か月間の GALT 活性値の変化を観察した. 結果を図 4 に示した. すべての検体で GALT 活性が徐々に低下したが, 変動は 5% 以内であった.

考察：今回の検討では新生児ろ紙血液検体の測定値分布, 日内変動, 日間変動について安定した結果が得られた. 測定は 4 月から 9 月までの 4 か月間に渡って行ったが, 測定値の分布に大きな変動は見受けられなかった. これらの結果から, GALT 活性測定試薬の有用性は検証されたと考える.

文 献

1. Yoichi Wada, Atsuo Kikuchi, Natsuko Arai-Ichinoi, et al. (2019) . Genetics in

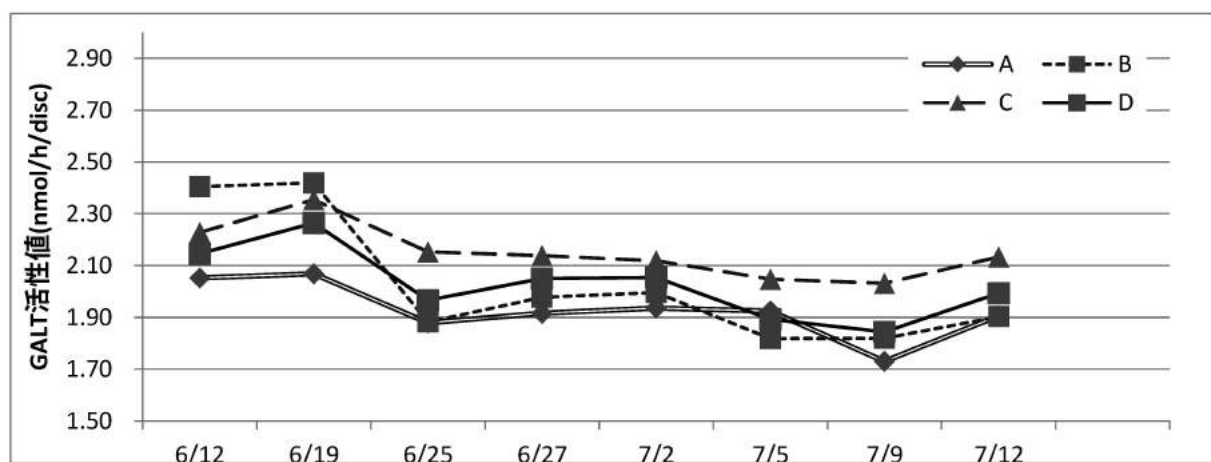


図 4. 正常ろ紙血液検体における GALT 活性値の経日変化

- medicine, Jun;21 (6) :1286-1294
2. 藤本昭栄, 大浦敏明, 長谷 豊 (1991). 日本マスキリーニング学会誌, 1 (1), 211-212
 3. 九曜雅子, 米田 豊, 加藤丈士, 他. (2005). 富山衛研年報, 28, 23-32.
 4. 間下充子, 渡辺和宏, 世良保美, 他. (2014). 日本マスキリーニング学会誌, 24 (2), 70
 5. 間下充子, 長谷川智美, 石毛信之, 他. (2017). 日本マスキリーニング学会誌, 27 (1), 83-89
 6. 九曜雅子, 米田 豊, 高森亮輔, 他. (2014). 富山衛研年報, 37, 25-37