

高速液体クロマトグラフィーによる 乾燥ろ紙血 APRT, HPRT 活性の測定

High-Performance Liquid Chromatographic Measurement of Adenine Phosphoribosyltransferase and Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase Activities in Dried Blood Spots

山口 昭弘 平田 久美 水嶋 好清 福士 勝
佐藤 稔 清水 良夫 菊地由生子 高杉 信男

Akihiro Yamaguchi, Kumi Hirata, Yoshikiyo Mizushima,
Masaru Fukushi, Minoru Sato, Yoshio Shimizu,
Yuko Kikuchi and Nobuo Takasugi

要 旨

乾燥ろ紙血 (DBS) 中のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) 活性およびヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 活性を簡便, 迅速に測定する方法を検討した。APRT 活性はアデニン (Ade) を, HPRT 活性はヒポキサンチン (Hyp) を基質として, それぞれ酵素反応により生成するアデノシン-リン酸 (AMP), イノシン-リン酸 (IMP) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し, シアンメトヘモグロビン法により測定したヘモグロビン (Hb) 値で補正し活性値を求めた。正常成人 ($n=7$) の DBS 中 APRT および HPRT 活性の平均値 \pm SD は, それぞれ 0.297 ± 0.030 および 2.16 ± 0.14 と赤血球を用いた報告値とはほぼ一致し, 赤血球との相関 ($n=9$) も $APRT \cdot Y = 0.939X - 0.0357$ ($r=0.968$), $HPRT \cdot Y = 1.04X - 0.015$ ($r=0.988$) と良好であった。また, APRT, HPRT 完全欠損症患者 DBS 中の酵素活性は認められなかった。

1. 緒 言

APRT, HPRT はプリンサルベージ経路の酵素で新生合成経路とともに, プリン代謝における重要な位置を占めている。APRT 欠損症は, Ade と 5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸 (PRPP) から AMP を生成する部位の障害であり, Ade の異常蓄積の結果, キサンチンオキシダーゼの働きで極めて難溶性の 2,8-ジヒドロキシアデニン (2,8-DHA) を生成し, 反復性の尿路結石, 腎不全を呈する^{1,2)}。

本症は常染色体劣性遺伝型式をとり, 酵素活性が全く認められない欧米型と, 残存活性約 25% の日本人型の 2 つの型が知られており, その発生頻度は数万人に 1 人と考えられている。本症はプリン体制限食とアロプリノールの使用により効果的な治療が可能である。一方, HPRT 欠損症は Hyp またはグアニンと PRPP から IMP またはグアノシン-1-リン酸を生成する経路の障害のため, プリン体の新生合成が亢進し, 高尿酸血症, 尿酸結石をきたす³⁾。

Lesch-Nyhan 症候群は HPRT の完全欠損症であり、精神遅滞、自傷行為などの神経症状を伴う。本症の遺伝形式は、X 染色体性遺伝であることから、男子にのみ発症し、その頻度は 10 万人に 1 人とされている。治療法としてはアロプリノール投与により尿酸値を低下させることはできるが、神経症状の発現後は多くの代謝異常症の場合と同様、その回復は困難である。

APRT, HPRT 活性の測定は、従来ラジオアイソトープを用いた方法⁴⁾が一般的に用いられてきたが、操作の複雑さと信頼性の点で問題があった。最近、小島ら⁵⁾により、赤血球透析液を試料として酵素反応生成物を HPLC により測定する簡便さ、正確性ともに優れた方法が開発された。そこで、我々は、新生児先天性代謝異常等検査に用いられている DBS を試料として、この HPLC による両酵素活性測定法が応用可能かどうかを検討した。

2. 方 法

2-1 試 料

正常成人 7 例、APRT 欠損症 4 例、HPRT 欠損症 4 例の全血を、新生児先天性代謝異常症等検査用紙にスポットして調製した DBS を試料とした。

2-2 試 薬

Ade, Hyp, AMP, IMP, アデノシン 5'-グリノ酸 (ADP) は生化学工業製、PRPP はシグマ社製、Tris, MgCl₂ は和光純薬工業製特級を用いた。Hb 測定試薬は日本商事製ネスコートヘモキット-N (シアメトヘモグロビン法) を用いた。PRPP 溶液のみは用時調製した。

2-3 操 作

(1) 抽出: DBS から直径 3mm の血液ディスク 2 枚を U 底型マイクロプレートにパンチし、脱イオン水 100 μ l を加え、30 分間ミキシング抽出を行う。抽出液 20 μ l を平底型 (Hb 測定用) あるいは、U 底型 (APRT, HPRT 反応用) マイクロプレートにそれぞれ分取する。

(2) Hb 測定: 抽出液 20 μ l にヘモキット-N 呈色液 200 μ l を加え、5 分後にマイクロプレートリーダ (Inter Med 社製, NJ-2000 型) を用いて、540/620nm の 2 波長で吸光度を測定する。Hb 濃度の計算は、キットの Hb 標準溶液 (3mm 径血液ディスク 1 枚の血液量を 2.4 μ l として 14.6g/l の Hb 血液濃度に相当) 220 μ l を取り同様に測定した吸光度値から求める。

(3) APRT 活性測定: 抽出液 20 μ l に、反応混液 (0.2mole/l Tris 緩衝液 pH7.4 : 20mmole/l MgCl₂ : 12mmole/l PRPP : 1.6mmole/l Ade = 1 : 1 : 1 : 1) 40 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間、65 分間インキュベーションした時点で、それぞれ反応液 20 μ l を分取し、0.3mole/l HClO₄ 200 μ l を加える。10,000g で 5 分間遠沈後の上清を HPLC で測定する。

(4) HPRT 活性測定: 抽出液 20 μ l に、反応混液 (0.2mole/l Tris 緩衝液 pH7.4 : 20mmole/l MgCl₂ : 12mmole/l PRPP : 5mmole/l Hyp = 1 : 1 : 1 : 1) 40 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間、35 分間インキュベーションした時点で、それぞれ反応液 20 μ l を分取し、0.3mole/l HClO₄ 200 μ l を加える。10,000g で 5 分間遠沈後の上清を HPLC で測定する。

(5) HPLC 条件: カラムは Inertsil ODS-2 (150 \times 4.6mm i. d.), 溶離液は 0.01mole/l H₃PO₄-KH₂PO₄ 緩衝液 (pH 2.90) を用い流速 1ml/min, カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 紫外検出波長 260nm, 0.02 aufs, 注入量 50 μ l で行う。AMP, IMP の検量線用標準溶液は -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した 5mmole/l の原液から、AMP は 10 μ mole/l, IMP は 20 μ mole/l の溶液を用時調製する。

(6) 活性値の計算: HClO₄ 除タンパク液中の AMP 濃度を A μ mole/l, IMP 濃度を I μ mole/l および Hb 測定値を Hbg/l (血液換算濃度) とすると、

$$\Delta A = A_{65\text{min}} - A_{5\text{min}}$$

APRT 活性 ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$)

$$= 1.146 \times \Delta A/\text{Hb}$$

$$\Delta I = I_{35\text{min}} - I_{5\text{min}}$$

HPRT 活性 ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$)

$$= 2.292 \times \Delta I/\text{Hb}$$

の計算式よりそれぞれの活性値を求める。

3. 結 果

3-1 Ade, AMP, ADP 標準混合溶液, Hyp, IMP 標準混合溶液および DBS 試料の APRT; HPRT 反応液のクロマトグラムを図 1, 図 2 に示した。DBS 試料では ADP の近傍には不明ピークの重なりが認められたが, AMP, IMP は 5 分以内に良好な分類を示した。

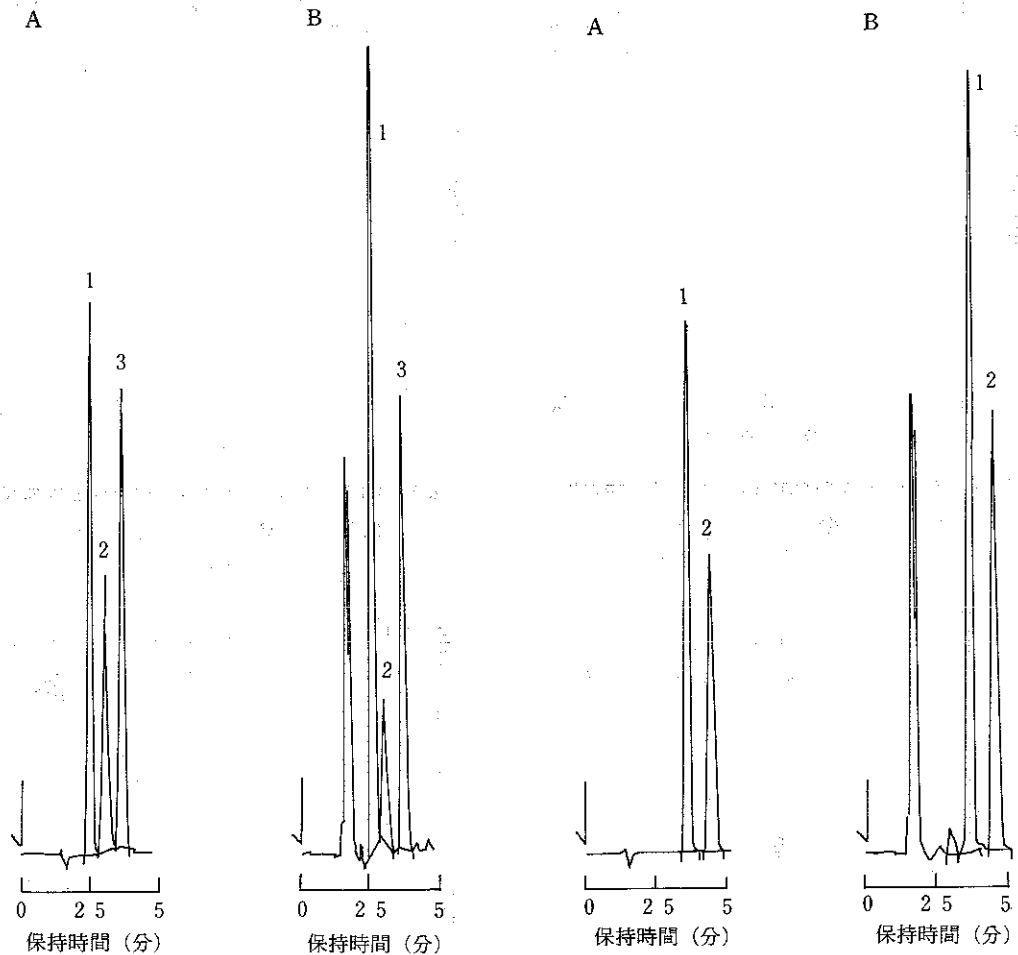


図 1 APRT 活性測定用標準溶液 (A) および DBS 反応液 (B) のクロマトグラム

1 : Ade, 2 : ADP, 3 : AMP

標準溶液濃度はそれぞれ $10\mu\text{mole}/\text{l}$

DBS 反応液は 65 分インキュベート時

図 2 HPRT 活性測定用標準溶液 (A) および DBS 反応液 (B) のクロマトグラム

1 : Hyp, 2 : IMP

標準溶液濃度はそれぞれ $20\mu\text{mole}/\text{l}$

DBS 反応液は 35 分インキュベート時

3-2 再現性

APRT 活性 $0.282 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$, HPRT 活性 $2.17 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$ の DBS 試料の繰り返し測定による変動係数 ($n = 6$) はそれぞれ 5.5, 5.4% と良好であった。

3-3 DBS 中の酵素活性安定性

ヘパリン血をスポットして調整した DBS を -20°C ,

4°C , 25°C , 37°C に 20 日間保存し, APRT 活性, HPRT 活性の安定性を調べた (図 3, 図 4)。両酵素活性とも, -15°C 保存下では 20 日後も活性値の低下は, ほとんど認められず 4°C で約 90%, 25°C で約 80%, 37°C で約 70% の残存活性が認められた。

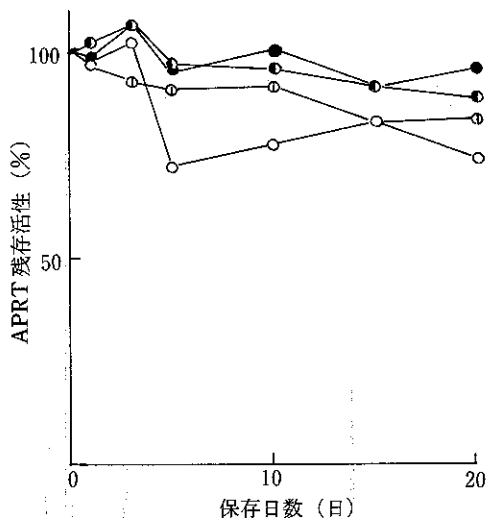


図 3 APRT 活性の DBS 保存における安定性

保存条件 ●: -15°C , ◐: 4°C ,
⊙: 室温, ○: 37°C

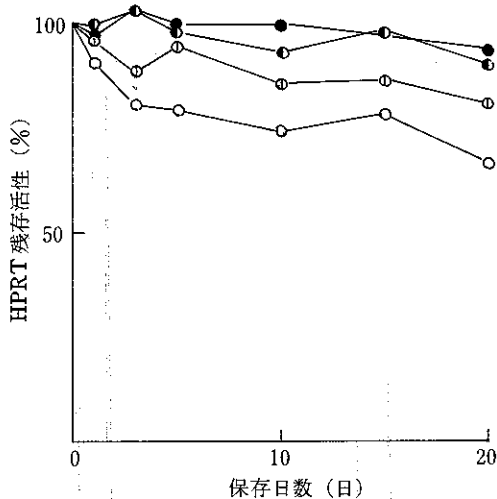


図 4 HPRT 活性の DBS 保存における安定性

保存条件 ●: -15°C , ◐: 4°C ,
⊙: 室温, ○: 37°C

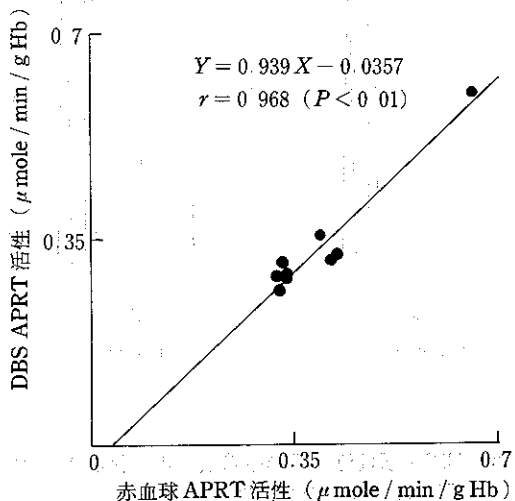


図 5 APRT 活性の赤血球と DBS を用いた測定値間の相関

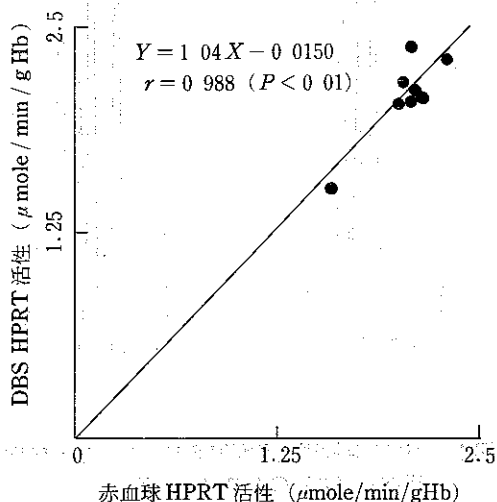


図 6 HPRT 活性の赤血球と DBS を用いた測定値間の相関

表1 患者DBS試料の
APRT, HPRT 活性測定結果

DBS 試料	APRT 活性*	HPRT 活性*
APRT 欠損症		
欧米型 1	<0.01	1.33
2	<0.01	1.79
日本人型 1	0.026	2.09
2	0.052	1.25
HPRT 欠損症		
1	0.599	<0.02
2	0.550	<0.02
3	0.803	<0.02
4	0.641	<0.02
コントロール(成人, n = 7) 平均 ± SD	0.297 ± 0.030	2.16 ± 0.14

* $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$

3-4 赤血球とDBSの酵素活性の相関

洗浄赤血球の溶血透析液⁵⁾を測定した値と、全血を、ろ紙にスポットして調整したDBSの測定値との相関を調べた(図5, 図6)。赤血球の測定結果をX, DBSをYとすると回帰式はAPRT: $Y = 0.939X - 0.0357$ ($r = 0.968$), HPRT: $Y = 1.04X - 0.0150$ ($r = 0.988$)と両者とも良好な相関を示した。

3-5 正常値および患者試料の測定結果

APRT欠損症, HPRT欠損症患者のDBS試料測定結果を正常値とともに表1に示した(表1)。APRT欠損症欧米型のAPRT活性は認められず, 日本人型では0.026, 0.052 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$ と, 10~20%の残存活性を示した。また, HPRT欠損症のHPRT活性も認められず, 従来の報告⁵⁾と同様にAPRT活性の亢進を示した。

4. 考 察

近年, HPLCの普及と著しい技術発展に伴い, 従来, 比色あるいはラジオアイソトープを用いて測定されてきた生体試料の酵素活性測定の分野においても, 反応生成物を正確に分離定量できるHPLC

を用いる方法が数多く開発されてきている。本報のAPRT, HPRT活性測定においてもシリカノールエンドキャッピングされた逆相カラムの使用により, AMP, IMPを迅速, 正確に測定できるようになり, その貢献は大きい。

HPLCによるAPRT, HPRT活性測定の原法⁵⁾は, 洗浄赤血球溶血透析液を用いる方法であり, 血球中に存在するヌクレオチド類を透析除去した後, 酵素反応を行っている。しかしながら, APRT活性測定に関しては, 酵素反応により生成されるAMPの一部が, 透析によって除ききれていない微量のアデノシン三リン酸(ATP)あるいは試薬不純物としてのATPの存在下, 試料中のアデニル酸キナーゼの働きでADPに変換されることが確認されている。従って, AMPのみの測定では, APRT活性は本来の値よりも低値を示すこととなる。このため, 小島らは第二反応としてアルカリフォスファターゼ(ALP)とアデノシンデアミナーゼ(ADA)を用いADP, ATPなどもAMPと合わせて最終的にイノシン(Ino)に変換後, 測定する方法を採用している。我々もDBS試料について, このALP, ADAを用いる反応系を試みたが, DBS試料抽出液は, 全血溶血状態であるため, バックグラウンドからのInoレベルが非常に高値となり, 原法そのままの適用は不可能であった。そこで, ADPとAMPの合計量を測定することを試みたが, ADP近傍には妨害ピークの重なりが見られ(図1)定量性に欠けるため, 結局, DBS試料の場合, AMPのみを測定する方法が最も信頼性が高いと考えられた。実際, DBS試料のAPRT活性測定値は正常平均±SD($n = 7$)は0.297 ± 0.030 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$ と, 原報⁵⁾の報告値0.35 ± 0.14 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gHb}$ に比べ約85%の値であるが, 洗浄赤血球との相関は良好であること(図3), また, APRT欠損症患者試料の測定結果(表1)からも, 欧米型, 日本人型の検出は確実に実行できることから, AMPのみの測定で十分であると考えられる。

HPRT 活性測定に関しては、IMP 代謝に係わる酵素の存在がわずかであるため、原報⁵⁾においても生成した IMP をそのまま測定している。我々の、透析は行っていない DBS 試料の場合でも、HPRT 活性測定値の正常平均 \pm SD = $2.16 \pm 0.14 \mu\text{mole} / \text{min} / \text{gHb}$ と洗浄赤血球による報告値 $2.02 \pm 0.42 \mu\text{mole} / \text{min} / \text{gHb}$ と非常に良く一致を示している。また、洗浄赤血球測定値との相関 (図 6)、HPRT 欠損症患者の測定結果 (表 1) から、DBS を用いた場合でも HPRT 活性は、かなり正確に測定可能であることがわかる。HPRT 欠損症の部分欠損症の場合、残存活性が約 1% と低値にもかかわらず、高尿酸血症はきたすものの、神経症状は伴わない例が存在することが知られている⁶⁾。従って、残存活性の程度が重要となるが、今回測定した 4 例の患者はいずれも HPRT 活性は 1% 以下と全く認められず、臨床症状からも Lesch-Nyhan 症候群と診断されている。

一般的に、DBS 中酵素の安全性を決める最大の要因は、全血スポット後の乾燥状態にあり、乾燥不十分の状態ではビニール袋に密封された場合、酵素活性は速やかに失活されることになる。しかし、全血をスポット後、室温で 2 時間放置し、完全に乾燥させた状態においては、室温保存 20 日後においても APRT、HPRT 残存活性は約 80% (図 3、図 4) と、かなり安定であり、郵送に数日を要したとしても大きな問題とはならない。

以上のことから、本法は DBS を用いた APRT、HPRT 欠損症の診断法として、簡便性、信頼性と

共に優れた方法であり、今後、結石症、腎不全あるいは高尿酸血症患者に対するハイリクスクリーニングを行い、これら欠損症の早期発見と合わせて発生頻度を明らかにしていきたいと考えている。

5. 結 語

HPLC を用いた DBS 試料中 APRT、HPRT 活性の測定法を検討した結果、本法は、簡便さ、信頼性ともに優れ、両酵素欠損症に対する診断法、スクリーニング法としての有用性が確認された。

謝 辞

患者試料のご提供を頂いた、虎ノ門病院小島司先生、旭川医大楠祐一先生、高知県衛生研究所森山ゆり先生に深謝します。

6. 文 献

- 1) Scriver, C. R. et al : The Metabolic Basis of Inherited Disease (Sixth Ed.), 1029-1044, McGraw-Hill, Inc, 1989.
- 2) Kamatani, N. et al : Hum. Genet., **75**, 163-168, 1987.
- 3) Scriver, C. R. et al : The Metabolic Basis of Inherited Disease (Sixth Ed.), 1007-1028, McGraw-Hill, Inc, 1989.
- 4) Kelley, W. N. et al : Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 1735-1739, 1967.
- 5) 小島 司, 他 : 臨床化学, **13**(1), 15-22, 1984
- 6) Kelley, W. N. et al : Ann. Inter. Med., **70**(1), 155-206, 1969