

Title	血中carnosinase活性測定と，その臨床検査への応用に関する研究
Author(s)	阪東，慶一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35005
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	はん 阪	どう 東	けい 慶	いち 一
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7 1 1 1	号	
学位授与の日付	昭和 61 年 2 月 27 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	血中carnosinase活性測定と、その臨床検査への応用に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 宮井 潔			
	(副査) 教授 田中 武彦 教授 和田 博			

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

carnosineは β -alanineとL-histidineから成るdipeptideで、骨格筋や腎臓をはじめ、生体各臓器組織に広く分布しているが、その生理的役割や病態との関連については、未だ不明の点が多い。一方carnosine分解酵素であるcarnosinaseも古くから知られ、1967年Perryらによって、はじめてcarnosinase欠損症が報告されたが、臨床検査として充分満足できる測定法がなかったため、他の疾患に関する本酵素の臨床的意義は殆ど明らかにされていない。そこで本研究においては、酵素分解生成物であるL-histidineをo-phthalaldehydeと縮合させて、蛍光体を生成するとともに、種々の反応条件を検討することにより、臨床検査に適した、高感度でしかも短時間操作で実施できる血清carnosinase測定法を確立した。さらに本法の臨床的応用として、筋疾患、甲状腺疾患などの患者血清を対象として、本酵素活性の測定を行った。

(方法及び対象)

血清試料 150 μ l に等量の 50mmol/L Tris-HCl buffer を加えて希釈し、これから 100 μ l ずつ分取し、双方に Tris buffer 250 μ l と 20mmol/L $MnCl_2$, 50 μ l を加え、一方には基質として 50mmol/L carnosine を 100 μ l (本反応系)、他方には Tris buffer 100 μ l (ブランク系) を添加し、37°C で、1 時間 incubate した。次いで各系に 10% trichloroacetic acid 500 μ l を加えて反応を停止し、10 分間遠心した後、上清各 100 μ l をとり、これに 0.3 N NaOH 2ml を加えてアルカリ性とし、1% o-phthalaldehyde の dimethoxyethane 溶液 400 μ l を加えて転倒混和することにより、酵素分解生成物である histidine と o-phthalaldehyde の間に縮合結合を起こさせた。さらに 15 分間放置後、6 N HCl 400 μ l 加えて混合すると、

蛍光が発生するので、島津RF 500 U 蛍光分光計を用いて、励起波長 344 nm、蛍光波長 432 nm で測光した。これにより得られた生成histidine量からcarnosinase活性を求めた。なお変法として、 $MnCl_2$ 添加を除いた方法を検討したところ、carnosinase活性はやや増加したが、変法 (y) と原法 (x) との間には $r = 0.98$, $y = 1.40 x - 0.03$ の相関が得られた。

被検対象

- ① 対象：健康成人 146 名 (男74名, 女72名), 及び箕面市立病院において、軽微な症状で来院し、筋、内分泌, 代謝, 肝などの疾患のない小児 (0 歳~11歳) 80名を対象とした。
- ② 国立刀根山病院に入院中のprogressive muscular dystrophy患者14例 (Duchenne type 2例, Facio-Scapulo-Humeral type 2 例), 及び大阪大学病院来院の未治療バセドウ病14例, 橋本病による原発性甲状腺機能低下症14例, 亜急性甲状腺炎 4 例を対象とした。

(結果及び考察)

基礎検討

- ① 検量線：histidine標品で作成した標準系列での検量線は $0 \sim 30 \mu g / ml$ の範囲で、原点を通る直線性が認められた。
- ② 酵素反応：本反応における至適pHは 8.4 で、反応時間は 120 分まで直線関係がみられた。また本酵素のcarnosineに対するKm値をLineweaver-Burk plotで求めると、 $K_m 5.0 \text{ mmol}$ が得られた。
- ③ 正確度：histidine標品一定量を血清試料に添加し、histidine測定段階での回収試験を行ったところ、10検体での平均回収率は $98.6 \pm 6.6 \%$ であった。また患者血清と健康人血清を混合して、そのcarnosinase活性を測定したところ、それぞれの活性値の和から求めた理論値とよく一致したことから、本測定値に及ぼす血清中干渉因子の存在は否定的であった。
- ④ 安定性：血清を凍結保存して、本酵素活性を測定したところ、少なくとも 100 日までは安定であった。
- ⑤ 精度 (再現性)：血清中本酵素活性測定の際の精度を変動係数で表わすと、3.3 % (測定内), 4.8 % (測定間) という良好な結果であった。

臨床成績

- ① 正常値：対照例から求めた正常値は、原法では 1 歳以下 0.18 ± 0.10 , 1 ~ 5 歳 1.02 ± 0.65 , 6 ~ 11 歳 1.90 ± 0.71 , 成人 $1.96 \pm 0.61 \mu mol / ml / hr$ であった。
- ② 先天性筋疾患：progressive muscular dystrophy患者での血清carnosinase活性は、14例中 9 例において低値を示した。
- ③ 甲状腺疾患：甲状腺機能低下症におけるcarnosinase活性は、14例中 9 例において低値を示したが、甲状腺ホルモン投与により、euthyroidになると正常化した。

(総括)

従来のcarnosinase活性の測定法では、分解生成物であるhistidineかあるいはalanineを、主にアミノ酸アナライザーで測定していたため、感度が低く、反応時間も長時間を要し、到底臨床検査には不適であった。そこで本研究では、蛍光法を利用することにより、微量のhistidineを測定するとともに、反応条件を検討

することにより、高感度、短時間操作の可能な測定法を確立した。さらに添加回収試験、血清混合実験による正確度の検討や、良好な精度などから、臨床検査として利用できる血清carnosinase測定法であることを示した。

本法の臨床応用の一つとして、各種先天性筋疾患、甲状腺疾患患者の血清carnosinase活性を測定したところ、progressive muscular dystrophyや甲状腺機能低下症で低値であった。その機序については、種々の可能性が考えられるが、本法は今後、その検査診断的意義とあいまって臨床酵素分野で有用な検査法となるものと思われる。

論文の審査結果の要旨

Carnosinaseは筋・腎などの組織に広く分布しているが、その病態生理的意義は不明な点が多い。そこで本研究では、蛍光法を利用し、種々反応条件を検討することにより、臨床検査法として利用し得る高感度、短時間測定法を確立した。またその臨床応用を試み、各種先天性筋疾患、甲状腺機能低下症などで、低値となることを明らかにした。今後本法は臨床検査法の一つとして、有用になるものと考えられ、学位論文として価値あるものと思われる。