

# G6PD 活性を測定したい

## 使用製品

G6PD Assay Kit-WST

[G256]

## I はじめに

G6PD 異常症 (G6PD Deficiency) とは、グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD) の活性が著しく低いため、酸化作用を防御する還元型グルタチオン (GSH) の補充が不十分となり、ヘモグロビンの変性による Heinz 小体の形成、細胞膜の透過性異常の結果、主として血管内溶血をきたす疾患である。G6PD 異常症患者は、平素は無症状であるが、マラリア薬として使用されているプリマキンを服用すると、溶血性貧血を引き起こしてしまう。従って、マラリア流行地域における住民の G6PD 異常症診断は、大変重要な課題である<sup>1)</sup>。

G6PD 異常症の確認には、今日までに多くの方法が発表され、蛍光スポット法<sup>2, 3)</sup>、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) と phenazine methosulfate(PMS) を使ったホルマザン法<sup>4, 5, 6)</sup>などが知られている。しかし、いずれの方法でも種々の問題を抱えているのが実情である<sup>7, 8)</sup>。これらの問題を解決すべく、G6PD 異常症の確認に使用できる新たな酵素活性測定法を開発した。

G6PD Assay Kit-WST は、ホルマザン基質である 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-8) を用いている為、ヘモグロビンと反応せず、G6PD 活性を簡便に判定することが可能である。(図 1)。

また、WST-8 のホルマザンは水溶性で 460 nm に最大吸収

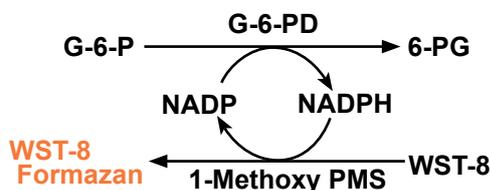


図 1 G6PD Assay Kit 発色の原理

を有し、強い橙色を呈するため目視で発色結果を確認できる。従って、マラリア流行地のような電気が供給されていない地域でも、電源や高価な機器類を一切必要とすることなく、その場で確認ができることになる<sup>9)</sup>。更に本法は、MTTホルマザン法では測定できなかった 20 ~ 50% 程度の欠損者に対しても確認できるようになり、少量の試薬で正確な酵素活性を測定することも可能である。

## II キット内容 (Code:G256)

(100 assays)

- Substrate mixture 2 ml×1
- Dye mixture 2 ml×1

(500 assays)

- Substrate mixture 2 ml×5
- Dye mixture 2 ml×5

### ※ 別途必要な器具・試薬

- 20 µl, 1,000 µl マイクロピペットとチップ
- 1.5 ml マイクロチューブ
- 蒸留水
- 1 mol/l HCl



- 1 ネガティブコントロール G6PD 活性 0%  
基質なし; 正常血液添加
- 2 男性異常症 G6PD 活性 0%
- 3 女性異常症 G6PD 活性 50%
- 4 正常血液 G6PD 活性 100%

図 2 発色画像: 25°C, 30 分発色。塩酸含まず。

## III 測定操作

- 1) 1.5 ml マイクロチューブに蒸留水 760 µl を入れ、これに Substrate mixture 20 µl と Dye mixture 20 µl をそれぞれ添加し、よく振り混ぜる。
- 2) 1) のチューブに被験者の血液を 5 µl 添加し、5 秒間よく振り混ぜる。
- 3) 25 ~ 37°C で 20 ~ 30 分間インキュベートし、目視で溶液の発色を、ポジティブコントロール溶液<sup>\*1</sup> 及び、ネガティブコントロール溶液<sup>\*2</sup> と比較し、活性を判定する。
- 4) 1 mol/l HCl を 10 µl 添加すると、反応の停止と測定結果の保存が可能である。

※ 1 ポジティブコントロール溶液は上記操作の中で操作 2) の血液に正常者 (G6PD の活性が正常値を有する者) の血液を使用して用時調製する。

※ 2 ネガティブコントロール溶液は上記操作の中で操作 1) で Substrate mixture は添加せずに用時調製する。操作 2) で使用する血液は正常者、被験者の何れでもよい。

## IV 注意事項

- 1) 本キットは、冷凍保存し、購入後 6 ヶ月以内に使用して下さい。品質の劣化を防ぐ為に、融解後は冷蔵の場合は 1 ヶ月以内に、常温の場合は 10 日以内に使用して下さい。
- 2) 多くの検体を測定する場合、操作 1) を簡略化するために Substrate mixture 2 ml と Dye mixture 2 ml を 76 ml の蒸留水で希釈し (Total 80 ml)、1.5 ml のマイクロチューブに 800 µl ずつ小分けして保存して下さい。希釈後は冷凍・遮光で保存して下さい。冷凍で 2 週間保存可能です。もし、冷蔵で保存する場合は、必ず遮光し、3 日以内に使用して下さい。
- 3) 本品は試験研究用です。診断や他の用途で使用しないで下さい。

## 参考文献

- 1) A. Ishii, *et al.*, *Japanese Journal of Parasitology*, **1994**, 43, 312.
- 2) E. Beutler, *Blood*, **1966**, 28, 553.
- 3) E. Beutler and M. Mitchell, *Blood*, **1968**, 32, 816.
- 4) V. Fairbanks and E. Beutler, *Blood*, **1962**, 20, 591.
- 5) H. Fujii, *et al.*, *Acta Haematologica Japonica*, **1984**, 47, 185.
- 6) A. Hirono, *et al.*, *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, **1998**, 26, 1.
- 7) I. S. Tantular, *et al.*, *Trop. Med. Int. Health*, **1999**, 4, 245.
- 8) A. Pujades, *et al.*, *Int. J. Hematol.*, **1999**, 69, 234.
- 9) A. Jalloh, I. S. Tantular, S. Puserawati, A. P. Kawilarang, H. Kerong, K. Lin, M. U. Ferreira, H. Matsuoka, M. Arai, K. Kita and F. Kawamoto, *Trop. Med. Int. Health*, **2004**, 9(5), 615.

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料