

10・6 Ornithine transcarbamylase (OCT) の radiochemical assay の検討と培養細胞での測定

熊本大学医学部

松 田 一 郎
永 田 憲 行
赤 星 泉
山 本 治 郎

研 究 目 的

(1) 尿素サイクル代謝異常中OCT欠損症は比較的良くみられる疾患で、現在まで日本では約10例の報告があり、これの羊水診断はぜひ確立したいところである。これまで非培養羊水細胞では活性があるのに、培養羊水細胞では活性がないと云われて来ていた。また非培養羊水細胞は収量が少いのでこれまでの呈色反応では duplicate して測定したり、またKmなどの測定はほとんど不可能である。そこで我々は ^{14}C , carbamylphosphate を使用した radiochemical assay を検討した。

(2) 次に正常人及びOCT欠損患者由来の培養リンパ球での酵素活性値を測定した。また、リンパ球培養液中のアミノ酸組成を変えてその生長曲線をみて、酵素活性の結果と合せて考察した。

研 究 方 法

(1) 牛肝のOCTをMarshallらの方法によりしたOCT硫酸懸濁液を材料として使用した。 ^{14}C , carbamyl phosphate dilithium salt (New Eng Nuclen) を使用した。反応液はpH 8.5の50mMのdiethanolamine, 酢酸バッファー ornithine 5mM, ^{14}C , carbamylphosphate 85 μM で、この中に種々の濃度のOCTを加え、37 $^{\circ}\text{C}$, 20分間 incubate した。incubate 後、3NHCOOHを加えて反応を停止させた。未反応の ^{14}C carbamylphosphateは反応液を90 $^{\circ}\text{C}$, 5分間加熱、さらにdry iceを加えて ^{14}C , CO_2 として除き減圧乾燥させ、水0.3ml及び

Bray's solution 6 ml を加え、液体シンチレーションカウンターにより ^{14}C citrulline を測定した。

(2) 正常人及びOCT欠損症患者から採血し、リンパ球を分離し、EBウイルスを使用して株化した(多田班の報告を参考のこと)。この細胞 10^8 個を使用してOCTを測定した。また別に正常人から20 ml 採血し白血球を分け、これについてOCTを測定した。さらに株化したリンパ球については arginine 1 mM 入った標準培養液、及び arginine の代りに 1 mMol 及び 5 mMol の ornithine を加えた培養液で培養し、growth curve をみた。

結果及び考察

(1) これまでの呈色反応では $0.075 \mu\text{g} \sim 0.30 \mu\text{g}$ のOCT量の測定が出来たが、今回の radiochemical assay では $0.165 \text{ ng} \sim 1.65 \text{ ng}$ のOCT量を測定することが出来、その反応は比色法に比して50~1500倍であった。

(2) 正常人末梢白血球では $0.49 \sim 0.89 \text{ nmol/mg protein/hr}$ のOCT活性値を得たが、培養細胞では正常人及びOCT欠損症いずれの場合も測定出来なかった。また図に示すように arginine の存在する培養液ではよく発育するが、arginine の代りに ornithine を入れた場合の growth curve は平らであり、細胞の発育がみられない。このことは細胞が自分で ornithine から arginine を作っていないわけで、arginine dependent になっているためと思われる、正常人とOCT欠損患者の発育が同じパターンを示すこともこのことを証明している。羊水細胞の場合と同様のことが云えると思われる。

要 約

OCTの radiochemical assay を ^{14}C - carbamyl phosphate を使用して測定する方法を検討し、これを用いて正常人の白血球、及び正常人、OCT欠損症患者由来のリンパ球についてOCTを測定した。正常人白血球では測定出来たが培養細胞では測定出来なかった。

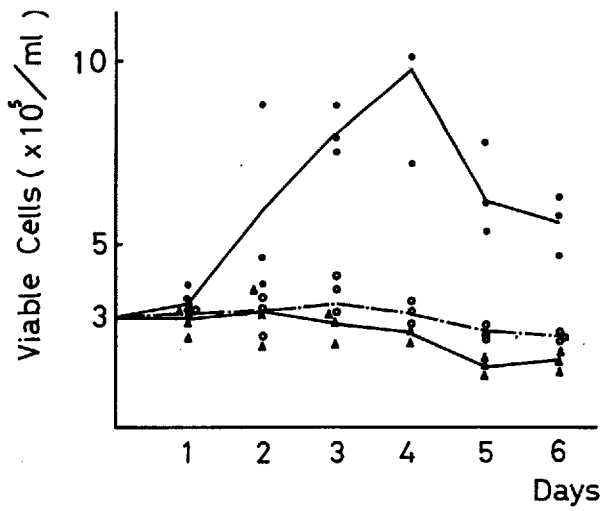
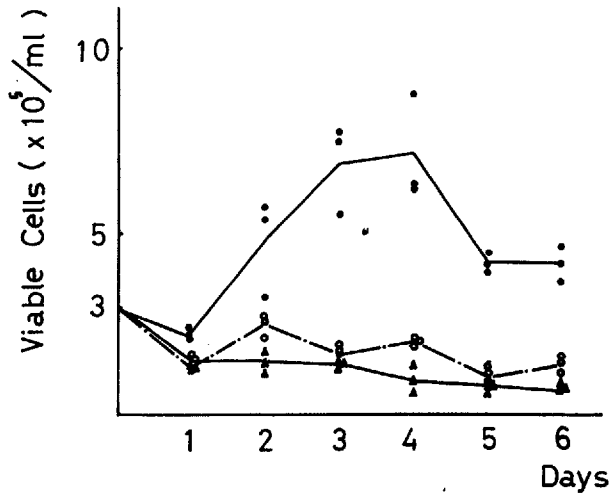
培養液に arginine を 1mM 入れた標準液では正常人由来、OCT欠損症由

来のリンパ球いずれも正常に発育するが、代りに ornithine を入れると双方とも発育は停止した。培養細胞は arginine dependent になっているため、羊水培養細胞についても同様のことが考えられる。

文 献

- 1) Matsuda, I., Yamamoto, J., Nagata, N., Ninomia, N., Akaboshi, I., Ohtsuka, H. and Katsuki, T. Lysosomal enzyme activities in cultured lymphoid cell line. *clin chim acta* 80, 483(1977)

図1 リンパ球の growth curve



上の図は正常人由来のリンパ球, 下の図はOCT欠損症の患者由来のリンパ球

- Arginine
- ▲——▲ Ornithine 1mM Arginine (-)
- Ornithine 5mM Arginine (-)

↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

研究目的

(1)尿素サイクル代謝異常中 OCT 欠損症は比較的良くみられる疾患で、現在まで日本では約 10 例の報告があり、これの羊水診断はぜひ確立したいところである。これまで非培養羊水細胞では活性があるのに、培養羊水細胞では活性がないと云われて来ていた。また非培養羊水細胞は収量が少いのでこれまでの呈色反応では duplicate して測定したり、また km などの測定はほとんど不可能である。そこで我々は ^{14}C , carbamylphosphate を使用した radiochemical assay を検討した。