

滷紙血液を用いたアルギナーゼ活性測定法の検討

北川 照 男^{*}, 大和田 操^{*}
鈴木 健^{**}

(* 日本大学医学部小児科)

(** 東京都予防医学協会)

研究目的

先天性尿素サイクル代謝異常症のスクリーニング法として、これまでにMurphy らのアルギニノコハク酸尿症のスクリーニング法, Naylor らの enzyme multiple auxotroph¹⁾ など種々の方法が報告されており, 我々もNaylor らの方法に関する検討を行い, 過去2年間に亘ってその適応と限界について報告した。昨年度も述べたようにNaylorらの方法による高アルギニン血症のスクリーニングは困難と考えられたため, 赤血球中に存在する arginase を直接測定することを試み, 本症のスクリーニング法を確立することを目的として以下の研究を行った。

研究方法

1. 反応の原理

正常人の赤血球中には多量の arginase が存在し, 高アルギニン血症, 即ち arginase 欠損症においては肝のみでなく赤血球 arginase 活性も著しく低下することが知られている。arginase は L-アルギニンを尿素とオルニチンに変換する働きをもっているが, 図1に示すように生じた尿素に urease を働かせてアンモニアと二酸化炭素を生成させ, アンモニアの発生による pH の変化を pH 指示薬の存在下で肉眼的に捕えることを試みた。

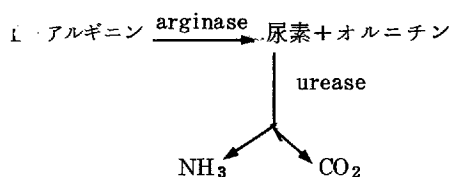


図1 反応の原理

2. 反応系の検討

1) 試薬: 用いた試薬とその製造会社は以下の通りである。

グリシン, 塩化マンガン (和光純薬), L-アルギニン, アルギナーゼ (シグマ社), アガロース (ドータイト試薬), フェノールレ

ッド, チモールブルー (PRおよびTB, 和光純薬), アリザリンイエロー (AZY, メルク社),

2) pH の検討

L-arginase の至適 pH は 9.2 付近であり, urease の至適 pH は 7.0 付近と云われているので, グリシン緩衝液を用い pH 6.5 から 9.5 まで, 0.5 づつの間隔で反応系を調整し, 至適条件を検討した。

3) pH 指示薬の選択

arginase の働きでL-アルギニンから尿素が生じ、更に urease の働きでアンモニアを生じた場合、反応系の pH が10以上に上昇すると考えられるため、アルカリ側で色調の変化を示す pH 指示薬 PR, TB, AZY を用いて反応系を作製し、何れの指示薬を用いた場合に変化を捕え易いかを検討した。

4) urease の濃度および urease 活性化剤の検討

一検体の反応液中に urease を 10, 20, 30 単位ずつ加えて、各々の反応について検討した。また、マンガンイオンは arginase を活性化する作用および安定化する作用を示すことが知られているので、反応系に種々の濃度の塩化マンガンを加えて、その反応を観察した。

5) 寒天濃度の検討

agarose の濃度を 1%, 1.5%, 2%, 3% と変化させ、至適濃度を検討した。

6) 酵素量(即ち濾紙血液の大きさ)の決定

直径 3 mm disk および 5 mm disk の濾紙血液を用いて、200 μ l の反応系に至適な血液量を検討した。

3. 反応の実施

1) L-アルギニン 25mM, 塩化マンガン 25mM を含む 25mM グリシン緩衝液 pH 8.0 にアガロースを加え沸騰水浴上で溶解させる。

2) pH 指示薬を加え(200-300 μ g/tube の濃度とする), よく攪拌し、穴あきトレー(Beutler 反応用) 3 箇所 に 350 μ l ずつ注入し, urease を含まない盲検とする。

3) 残りの溶液を 50 $^{\circ}$ C まで冷却し urease(10-30unit/tube)を加え, 350 μ l ずつ穴あきトレーに分注する。

4) 溶液が固まったら直径 3-5 mm の濾紙血液 1 枚をピンセットで表面に置き, 軽く抑えてからサララップで表面を被い, 37 $^{\circ}$ C の孵卵器で 24-48 時間反応させる。

5) 反応後, urease を除いた反応系を盲検として色調の変化を肉眼で判定する。

研 究 結 果

1) pH 指示薬の選択

前述のように arginase の至適 pH は 9.0 であるのに対し, urease のそれは pH 7.0 附近と云われているが, 我々の用いた反応系で最終的にアンモニアを生じた場合, 反応系の pH がよりアルカリ側に移動するはずであり, アンモニアの発生の有無で明確に色調が変化する pH 指示薬が必要と考えられた。そこで, 反応系の pH を 6.5 から 9.5 まで変化させ, AZY, PR, TB を加えて, 各々に 2 N アンモニアを滴下し, その色調の変化を観察したところ, pH 6.5 と 7.0 の系にアンモニアを加えても色調は殆んど変化しなかった。ところが, pH 7.5 以上の系ではアンモニア滴下によりその色調が著しく変化した。そして, その変化は, TB を用いた場合に最も著しかったため, 以下の実験には TB を指示薬として使用した。

2) 反応系の pH の検討

T B を指示薬とした反応系を用いて、pH 6.5-9.5 で滷紙血中の arginase 活性を測定したところ、pH 8.0-9.0の間で urease を除いた盲検とは明らかに異なる色調を呈したことから、urease は pH 9.0 でも作用していると考えられた。しかし、文献による urease の至適 pH は 7.0 であり、また、反応系の pH を 9.0 以上にすると盲検の色調が濃くなったため、反応系の pH を 8.0 に設定した。

3) urease 濃度とマンガンイオンの影響

1 assay あたりを用いる urease は 10-30 単位の範囲では、その反応速度が量に比例して増大した。また、Mn⁺⁺ の至適濃度は 25mM で、50mM 以上を加えると反応は阻害された。

4) 滷紙血および洗滌赤血球中の arginase 活性

健康人 10 名より採取した滷紙血中の arginase について上記の方法で測定したところ、何れも urease 無添加の盲検は淡黄褐色を呈したのに対し、アルギニンと urease を加えた系では黒褐色を呈し、アルギニン→尿素→アンモニアの反応が行われていることが示唆された。また、2 例の対照および 1 例の高アルギニン血症については、洗滌赤血球を用いて arginase により生成する尿素を比色定量する方法²⁾と、滷紙血を用いる方法の両者を行って比較した。その結果は表 1 のようであり、患者では正常人の濃厚赤血球を輸注し 2 週後に採血を行ったため、赤血球を用いた測定で正常対照の約 10% の活性が認められた。それを反映して、患者の滷紙血を用いた方法でも、盲検に比べて色調が僅かに変化したが、対照の色調とは明らかに異っていた。

表 1 赤血球 arginase 活性

	Hemolysate *	Blood paper
対 照 1.	1,922	卅
2.	1,522	卅
高アルギニン血症	{ 172 209	土 土

* μmol Urea/gHb/hr

考 察

高アルギニン血症は、先天性尿素サイクル代謝異常症の中でも稀な病型で、本邦では数例の報告があるにすぎない。しかし、我々の経験からも、本症に対しては赤血球交換などかなり有効な治療法が存在すると考えられ³⁾、本症の早期診断は必要と思われる。その一つの試みとして、一昨年から我々は Naylor らの方法によるスクリーニング

を行ってきたが、昨年度の報告に述べたように Naylor らの方法による本症のスクリーニングは困難と思われる。そこで、今年度は赤血球中に存在する arginase を、滷紙血を用いて測定することを試みた。そして正常人では本法による赤血球 arginase 測定は充分可能であり、更に、高アルギニン血症患者を鑑別することが可能なことを明らかにした。今後、改良すべき点があるものの、本法はスクリーニングに使用可能と思われる。

文 献

- 1) Henry, W, et al : A neonatal screening test for argininosuccinic acid lyase deficiency and other urea cycle disorders. Pediatrics. 70;526, 1982.
- 2) Marshall, M, et al : Physical and kinetic properties of carbamyl phosphate synthetase from frog liver. J. Biol. Chem. 236; 2229, 1961.
- 3) Sakiyama, T. et al : A successful trial of enzyme replacement therapy in a case of argininemia. Tohoku J. Exp. Med. 142; 239, 1984.



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

先天性尿素サイクル代謝異常症のスクリーニング法として、これまでに Murphy らのアルギニノコハク酸尿症のスクリーニング法, Naylor らの enzyme multiple auxotroph 法など種々の方法が報告されており, 我々も Naylor らの方法に関する検討を行い, 過去2年間に亘ってその適応と限界について報告した。昨年度も述べたように Naylor らの方法による高アルギニン血症のスクリーニングは困難と考えられたため, 赤血球中に存在する arginase を直接測定することを試み, 本症のスクリーニング法を確立することを目的として以下の研究を行った。