

# 尿素サイクル代謝異常症の簡易判別

## スポット法に関する研究

藤村有信<sup>1</sup> 土平一義<sup>1</sup> 川村正彦<sup>2</sup>

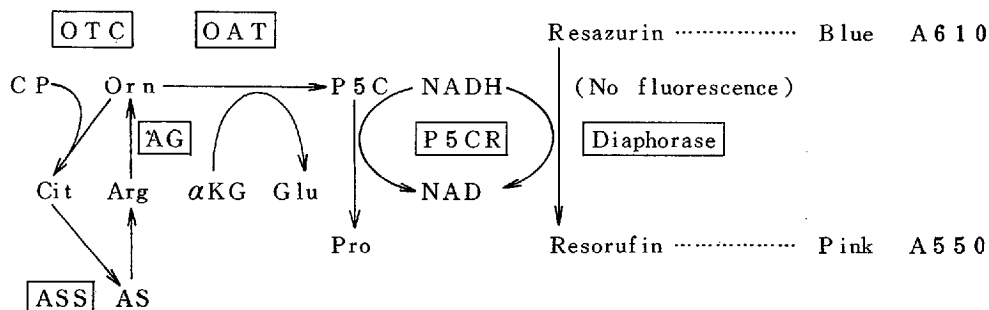
(<sup>1</sup>名古屋市衛生研究所, <sup>2</sup>名城病院)

### 研究目的

我々はこれまでに尿素サイクル代謝異常症のマス・スクリーニング法として、血中オルニチン(Orn)、アルギニン(Arg)、アルギニノコハク酸(AS)の微量蛍光測定法を開発し、発表してきた。<sup>1,2)</sup>しかし乾燥血液濾紙中のArgやASは0~4℃においてもこわれやすく、発見もれもありうるので、一応0~4℃や-20℃で安定と思われるオルニチンアミノ転移酵素(OAT)やアルギナーゼ(AG)、アルギニノコハク酸分解酵素(ASL)、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS)、それにオルニチンカルバミル転移酵素(OTC)活性の有無で検査出来ることが望ましい。そこで我々はこれまでに開発してきたシステム<sup>3)</sup>を使い、さらにNADHの蛍光を肉眼判定の容易な色素に変えて、酵素活性の有無を簡便なスポット法として開発した。

また条件を選ぶことにより、酵素活性が正常、正常活性の1/2のヘテロや1/4~5の酵素活性の少ないもの、Oの欠損症の判別が可能である。またマイクロプレートの蛍光迅速測定装置を用いて、器械的に自動測定し判別することも可能となった。今回はOATとAGの検査法について開発した。

### 原理



### 実験方法

血中AG活性測定系：全容50μl中にトリスHCl(pH8.0)5μmol, αKG0.25μmol, DTT

0.5 nmol, NADH 7~14 nmol, OAT, P5CRともに天野製薬製で3.7 mU, Arg 20 nmol, 血液濾紙ディスク(3 mm) 1個を加え, 37°C, 一夜(17時間)反応後, 1~2 mM Resazurin 10  $\mu$ l, Diaphorase 200 mU 10  $\mu$ lを加え, 総容70  $\mu$ lで測定する。血中OAT活性測定系:上記反応系からOATとArgを省き, 代わりにOrn 20 nmol, NADH 5~10 nmolで反応させる。この場合の対照系としてこのOAT活性測定系に天野製薬製Bacillusの精製OAT 3.7 mUを添加したものを使う。

測定法:(1)簡易スポット法:反応液を濾紙にスポットし, 風乾後, NADH量に応じて作成した標準カラーと比較して酵素の有無を見る。(2)反応系の入ったマイクロプレートをコロナ電気に波長光度計で550 nmまたは610 nmにて測定する。

## 実験結果

標準色識別表の作成: ResazurinのBlueとResorufinのPinkの比率とNADH濃度およびResazurin濃度との関係を検討し最適条件を得た。Resazurin最終濃度142  $\mu$ M全容70  $\mu$ lのときはNADH 0  $\mu$ MでBlue, 57~128  $\mu$ MでViolet, 200~428  $\mu$ MでPinkとなり, Resazurinが濃くなる程, 同一NADH濃度でBlueの比率が高くなり, Pinkになりにくいため, 判別しにくい。

OAT活性の簡易色判別法: Resazurin 142  $\mu$ MでNADH濃度0~360  $\mu$ Mまで作り, OAT活性が正常, 1/5活性, 0と対照系で色の比較をした。NADH濃度が高くなるとOAT活性正常のものでもPinkになるので使用出来ない。正常と1/5活性と0活性の欠損症の判別しやすいのはNADH 70~140  $\mu$ MでBlue, Violet, Pinkと対照はBlueとなります。マス・スクリーニングに適している。また濾紙にスポットせずマイクロプレート中でも判別がつき, コロナ二波長光度計を使えばわずか1~2分で98件の自動測定が出来大変便利である。AG活性の簡易色判別法: Resazurin 142  $\mu$ M, NADH 100~200  $\mu$ MでAG活性が正常, 1/2, 1/5, 0活性について色の比較をした。NADH 100~157  $\mu$ MまでよくBlue, Blue violet, Violet, Pinkと判別が容易でマス・スクリーニングしやすい。

## 考察

血液濾紙ディスク(3 mm) 1個でOATやAG活性の有無を簡単に判別出来るスポット法を開発したので一般検査のスクリーニングに応用したい。さらにASS, ASL, OTCについても今後検討してゆきたい。

## 文献

1. Y. Fujimura et al. Tohoku J. Exp. Med. 141, 257 (1983).
2. 藤村有信, 名市衛研報, 31, 37 (1985).
3. 藤村有信, 名市衛研報, 31, 43 (1985).



## 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

我々はこれまでに尿素サイクル代謝異常症のマス・スクリーニング法として、血中オルニチン(Orn), アルギニン(Arg), アルギニノコハク酸(AS)の微量蛍光測定法を開発し、発表してきた。1'2)しかし乾燥血液源紙中のArgやASは0~4 においてもこわれやすく、発見もれもありうるので、一応 0~4 やー 20 で安定と思われるオルニチンアミノ転移酵素(OAT)やアルギナーゼ(AG), アルギニノコハク酸分解酵素(ASL), アルギニノコハク酸合成酵素(ASS), それにオルニチンカルバミル転移酵素(OTC)活性の有無で検査. 出来ることが望ましい。そこで我々はこれまでに開発してきたシステム3)を使い, さらにNADHの蛍光を肉眼判定の容易な色素に変えて, 酵素活性の有無を簡便なスポット法として開発した。

また条件を選ぶことにより, 酵素活性が正常, 正常活性の1/2のヘテロや1/4~5の酵素活性の少ないもの, 0の欠損症の判別が可能である。またマイクロプレートの蛍光迅速測定装置を用いて. 器械的に自動測定し判別することも可能となった。今回はOATとAGの検査法について開発した。