

B. Subtilis 変異株を用いた Enzyme-Auxotrophs assay による尿素サイクル代謝異常症のスクリーニングの検討

日本大学医学部小児科 北川 照男
大和田 操
東京都予防医学協会 鈴木 健

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 Naylor らは B. Subtilis の変異株を用いた enzyme-auxotrophs assay を開発したが、我々はこの方法の実用化について検討し、東京地区で 8 万人の新生児を対象として pilot study を行ったのでその結果および本法の問題点について報告する。

方 法

1) 測定条件の検討

① 寒天の種類と濃度, ② B. Subtilis の芽胞の量, ③ ASA の濃度, ④ 至適 pH, ⑤ 反応温度について検討し, 更にこの菌が尿素サイクル関連アミノ酸で特異的に発育するか否かについては混雑培養により検討した。

2) 標準血液濾紙の室温放置による劣化の検討

L-Cit, L-Arg, L-Orn の標準血液濾紙を室温に放置し, 経時的に寒天平板と HPLC を用いてその濃度を測定して冷凍保存のスタンダードと比較した。

3) 新生児における pilot study

昭和55年10月から57年8月までに東京都で出生した約8万人の新生児を対象として, 本法を用いてスクリーニングを行った。L-Cit, L-Arg, L-Orn のいずれかが 6 mg/dl 以上を示した場合には同一検体で再検査を行い, 染色して判定した。再検査でも 6 mg/dl 以上を示した場合には同一濾紙から径 5 mm の disk 2 コを使用して HPLC による分析を行い, 尿素サイクル関連アミノ酸が 5 mg/dl 以上を示したものについては再採血を依頼した。

結 果

1) 測定条件の検討

① 使用する寒天は Oxoid No.4 でその濃度は 1.5 % が最も良く, ASA は $22 \mu\text{mal}/150 \text{ ml}$, 芽胞は $8.5 \times 10^8/150 \text{ ml}$, pH は 7.6~8.2 で 25-30°C で培養するのが最適であった。

② 上記条件下で培養した L-Cit, L-Arg, L-Orn の標準濾紙の発育環を島津クロマトスキャナーで分析したところ, その発育は dose dependent であり, しかも混雑培養では尿素サイクル関連アミノ酸以外のアミノ酸では菌の発育は全く認められず, 本法は尿素サイクル関連アミノ酸の特異的な測定法であることが示された。

2) 標準血液濾紙の室温放置による劣化はいずれのアミノ酸でもみられたが, とくに L-Orn の劣化が著しく, 室温放置 3 日後には 10 mg/dl の standard の L-Orn は HPLC で 7 mg/dl に低下していた。

3) スクリーニング成績

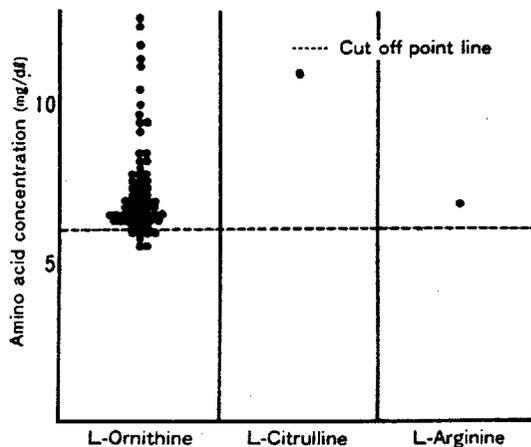
検査を行った8万例のうち400例(0.5%)が本法で陽性と判定されたので、その全例について同一検体でHPLCによるアミノ酸分析を行った。その結果65例(0.08%)において尿素サイクル関連アミノ酸が5mg/dl以上を示しており、オルチテンの上昇を認めたものが63例で、シトルリン、アルギニンの上昇を認めたものが各1例であった。65例全例に再採血、再検査を行ったが全例が陰性で、いずれも新生児期の一過性の異常と判定された。一過性高オルニチン血症を示した63例のHPLCによる血中オルニチン値は図のようで5.5~16.5mg/dlを示していた。

考 察

本法は、一つのplateでArg, Orn, Citの三種のアミノ酸の測定が可能で、更にASA lyaseの有無も判定できる利点があるが、次のような欠点もみられる。即ち、本法では発育環の大きさよりも発育環の密度で血中濃度を判定しなければならず、Guthrie法に比べて判定が困難である。特にcut off pointを6-8mg/dl以下とする判定が困難で偽陰性を生ずる危険がある。

従って上記のアミノ酸が10mg/dl以上を示す場合には本法は有用であり、また、ASA lyase欠損症の診断は容易であるが、血中尿素サイクル関連アミノ酸が8mg/dl以下の場合には本法によるスクリーニングは困難であり、今後培養条件について更に検討する必要があると思われた。

Concentration of Amino Acids in Blood from 65 Cases with Positive Results of the Screening for Inborn Errors of Urea Cycle Metabolism





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



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 Naylor らは *B. Subtilis* の変異株を用いた enzyme-auxotrops assay を開発したが,我々はこの方法の実用化について検討し,東京地区で8万人の新生児を対象として pilot study を行ったのでその結果および本法の問題点について報告する。