

APRT欠損症マススクリーニングに対する技術的検討

一色 玄 周山逸人 鄭 城子

(大阪市立大学医学部小児科学教室)

研 究 目 的

Adenine phosphoribosyl transferase (APRT) は adenine に作用して、AMP を生成する酵素である。本酵素欠損症は常染色体性劣性遺伝型式をとり、患者では adenine が血中に異常高値となり、過剰の adenine が、xanthine oxidase の作用を受けて、8-hydroxyadenine と 2,8-dihydroxyadenine を生じる。後者は不溶性物質であり腎毒性を示す。本症の症状は無症状のものから尿路結石、あるいは腎不全を来すものまでと多彩であるがヘテロ保因者においても尿路結石を示し、腎不全を示すことが知られている。本症では砂粒状の尿路結石がみられ、その結石の同定には、UV, IR, massspectrometry, X-ray crystallography などによる確認が用いられている。しかし本症の診断にあたっては、赤血球内の APRT 活性を測定することが最も適確であり、また迅速な方法である。われわれは、幼若発症 APRT 欠損症の一家系を本法によって診断し、allopurinol による治療を行って著効をみた。本症ヘテロ保因者の頻度は 0.4 ~ 1.0 % と言われており、他の先天性代謝異常症と比較して決して稀なものではなく、また本症が予後不良な事を考えるとマススクリーニングの対象になるのではないかと考えられる。今回、われわれは、ガスリーテスト用の乾燥血液ろ紙を用いて本酵素活性のスクリーニングの可能性について検討した。

研 究 方 法

試料

- 1 : ヘパリン加静脈血を生食水で 3 回洗浄した赤血球を凍結溶解して作製した溶血液。
- 2 : 全血をガスリーテスト用ろ紙にスポット、自然乾燥させたもの。
- 3 : 上記の洗浄赤血球だけをガスリーテスト用ろ紙にスポットし、自然乾燥させたもの。

方法

L, A, Johnson らの方法に従った。反応液は 0.25 mM adenine, 55 mM tris-chloride (pH 7.4), 5 mM $MgSO_4$, 1 mM phosphoribosyl pyrophosphate であった。50 μ l の溶血液を上記の反応液 4 ml に加え 37 °C で incubation し、0 分、30 分、60 分、に反応液それぞれ 1 ml を取り出し、0.12 M lanthanum 1 ml を加えて反応を停止し、さらに 2 ml の 0.04 M Na_3PO_4 を加え、lanthanum を沈殿させ、10,000 g, 5 分間の遠沈を行って得た上清を 260 nm で吸光度を測定した。残りの反応液で hemoglobin (Hb) の定量を行った。

その結果から酵素活性を算出して、 $\text{nmol}/\text{mgHb}/\text{hr}$ で表した。検体がろ紙の場合には $1/4$ インチ用パンチャーで disc 5枚を切り取り、水 1 ml で抽出した後、溶血液と同様の方法で測定した。

研 究 結 果

上述の試料 1 を用いた時は正常成人の APRT 活性は平均 $34.5 \pm 8.1 \text{ nmol}/\text{mgHb}/\text{hr}$ であった(図 1)。これは従来の文献とはほぼ一致する値であった。ヘテロ保因者の活性は正常者の約 20% であり患者は測定不能の低値であった。溶血液中の活性と、ろ紙上の活性の相関係数は 0.965 で強い正の相関がみられた。

図 1 :

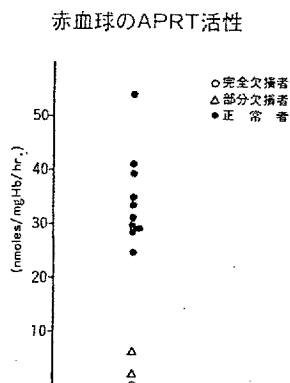
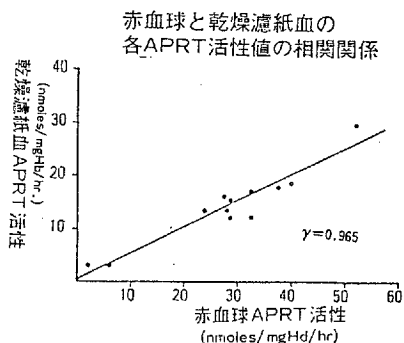


図 2 :



ガスリーテスト用ろ紙を用いる上記検体 3 について酵素活性の安定性を検討したところ、約 8 週間にわたって、ほぼ安定していた(図 3)。全血の乾燥血液ろ紙と、洗浄赤血球のみの乾燥血液ろ紙間には活性値に差がみられなかった(図 4)。

図 3 :

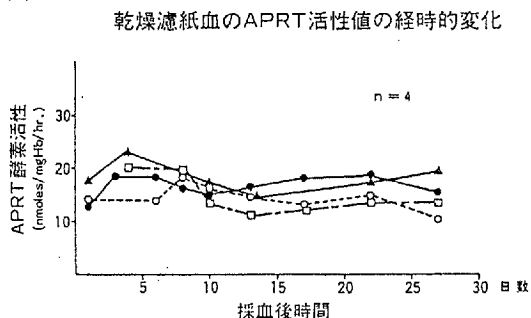
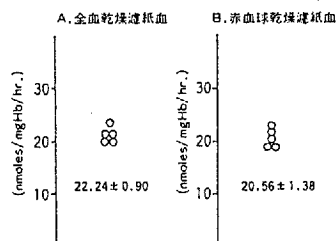


図 4 :

乾燥濾紙血における同一検体の
APRT活性測定値のばらつき



APRT 完全欠損者とヘテロ保因者と正常者の三者について乾燥血液ろ紙で測定した結果を表 1 に示した。

No.	RBC	DISC
1	0	1.3
2	6.2	4.4
3	2.0	4.0
4	39.3	24.4
5	34.2	23.0
6	29.5	16.8
7	30.1	21.0
8	28.8	21.9
9	34.0	16.8
10	29.1	18.3
11	41.1	25.2
12	54.3	40.8
13	24.9	18.3

No.	Hb吸光度	酵素活性
1	0.008	0
2	0.004	0
3	0.003	0
4	0.007	5.7
5	0.005	19.2
6	0.005	2.9
7	0.004	4.5
8	0.005	25.3
9	0.005	6.2
10	0.005	9.8

表 2：血液ろ紙 disc 2 枚を用いた時の
APRT 活性
(nmoles/mgHb/hr)

表 1：同検体における溶血液と乾燥ろ紙
血の APRT 活性
(nmoles/mgHb/hr)

赤血球溶血液で、ゼロ活性であったホモの患者の乾燥血液ろ紙による測定値は 1.35 nmoles/mgHb/hr で正常の 5% 値に相当した。表 1 中 No. 3 の患者は尿中に 2, 8-dihydroxyadenine の排出を認めた成人例で、溶血液による酵素活性は正常人の 6% であった。スクリーニング化を検討するためにマイクロ化の目的で、測定方法を以下の様に改変して実施した。すなわち、反応液の濃度を 8 倍にし、disc を 5 枚から 2 枚に減らし、以下上記の測定方法と同様に測定した。その結果、表 2 に示す様に、正常者 7 名について、その活性は、 25.3 ± 2.9 と変動した。患者及びその両親の活性は、測定不能の低値であった。

考

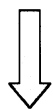
案

本疾患は、赤血球を用いて酵素学的に診断できる疾患であるが、一般の施設では測定が困難である。測定可能な施設への患者の血液の輸送と保存が問題となる。上述のように、ガスリーテスト用乾燥血液ろ紙でのAPRT活性値は溶血液による場合の約65%であって高い相関を示した。また、乾燥血液ろ紙のAPRT活性は、採取後8週間にわたって安定であった。本法のようにdisc 5枚を使用すれば、正常者では、その酵素活性の 22.6 ± 6.7 nmoles/mg Hb/hr に対しヘテロのそれは、5 nmoles/mg Hb/hr 以下であった。検体試料量をさらに減らして定量する場合は、Hbの吸光度は0.003~0.007となって、本酵素の定量に大きな変動を与える因子となっている。しかし、患児とヘテロ保因者を含めて一群とし、これを正常者と区別することのみを目的とするならば、もっと少量の検体によるスクリーニングも可能である。今後さらにマイクロ化を行って検討したい。

文

献

L. A. Johnson, R. B. Gordon, and B. T. Emmerson. (1977). Adenine phosphoribosyltransferase: A Simple Spectrophotometric Assay and the Incidence of Mutation in the Normal Population. Biochemical Genetics, Vol. 15, Nos. 3/4, 265-272.



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

Adenine phosphoribosyl transferase (APRT) は adenine に作用して, AMP を生成する酵素である。本酵素欠損症は常染色体性劣性遺伝型式をとり, 患者では adenine が血中に異常高値となり, 過剰の adenine が, xanthine oxidase の作用を受けて, 8-hydroxyadenine と 2,8-dihydroxyadenine を生じる。後者は不溶性物質であり腎毒性を示す。本症の症状は無症状のものから尿路結石, あるいは腎不全を来すものまでと多彩であるがヘテロ保因者においても尿路結石を示し, 腎不全を示すことが知られている。本症では砂粒状の尿路結石がみられ, その結石の同定には, UV, IR, mass spectrometry, X-ray crystallography などによる確認が用いられている。しかし本症の診断にあたっては, 赤血球内の APET 活性を測定することが最も適確であり, また迅速な方法である。われわれは, 幼若発症 APRT 欠損症の一家系を本法によって診断し, allopurinol による治療を行って著効をみた。本症ヘテロ保因者の頻度は 0.4 ~ 1.0% と言われており, 他の先天性代謝異常症と比較して決して稀なものではなく, また本症が予後不良な事を考えるとマススクリーニングの対象になるのではないかと考えられる。今回, われわれは, ガスリーチスト用の乾燥血液ろ紙を用いて本酵素活性のスクリーニングの可能性について検討した。