乾燥尿沪紙を用いた尿中オロット酸測定方法について

中島　博徳，高柳　正樹，小倉成美子
千葉大学医学部　小児科学教室

研　究　目　的

尿中オロット酸排泄量は，オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症・シトルリン血症・アルギニン血症などの尿素サイクル異常症の一部や，リジン尿性タンパク不耐症・オロット酸尿症などで増加する。[1),2)] 今回我々は尿中オロット酸測定を高アンモニア血症のマススクリーニングへ応用するため，乾燥尿濾紙より抽出した検体を，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて測定する方法を検討したので報告する。

研　究　方　法

尿濾紙は，千葉県下の神経芽細胞腫のマススクリーニングで用いられている，東洋濾紙63号を使用した。尿を充分に湿めらせ乾燥後，濾紙1cm×1cmを細切し脱イオン水2 mℓにて，50℃，1時間振盪抽出したあと，ミリポアフィルターを通して検体とした。HPLCへの法入量は20 μℓとした。HPLCのポンプシステムは日立635A型を用いた。カラムはC18逆相イオンカラム，ここではWaters社製μBonda pack C18を使用した。移動相はPH6.0，4mMのリン酸ナトリウムバッファーを速度2mℓ/minにて分析を行った。オロット酸，クレアチニンの各々の最大吸光度は270nm，250nm付近にある事と，ピークの同定を容易にするため，270nm，254nmの二波長で検出を行った。データ処理は外部標準法にて用手法で行った。

研　究　結　果

図1に，スタンダードのオロット酸とクレアチニンのピークを示した。オロット酸の保持時間は約2分，クレアチニンの保持時間は約3分であった。検量曲線はオロット酸は1000 μmoℓ/L クレアチニンは100mg/dℓまでほぼ直線性を示した。

図2は，8μmoℓ/Lの既知濃度のオロット酸を含んだ尿20μℓのクロマトグラムである。このシステムにおいては，5μmoℓ/L の濃度のオロット酸のピークは容易に判別できるものと考えられた。尿濾紙に吸着させたオロット酸，クレアチニンの回収率は各々50%，47%であった。

図3は，尿濾紙を室温に保存した時の，オロット酸とクレアチニンの比の変化を見たものである。8日間保存してもその比はほとんど変化なく，尿濾紙中のオロット酸は少なくとも1週間は安定と考えられた。

表1は，オロット酸．クレアチニン．オロット酸とクレアチニンの比の再現性を検討したものである。その変動係数はそれぞれ2.55%，4.01%，2.61%であり，再現性は良好であると考えられた。1検体は10分以内に分析する事が可能であった。

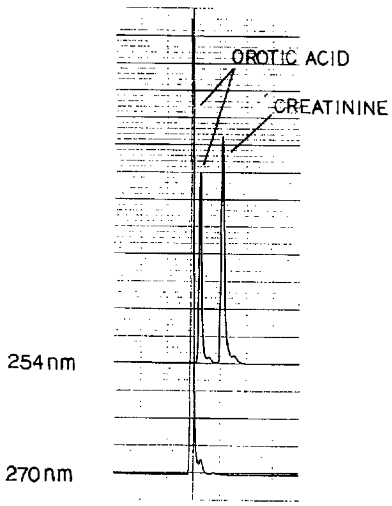

図1. 標準品のオロット酸およびクレアチニンのクロマトグラム

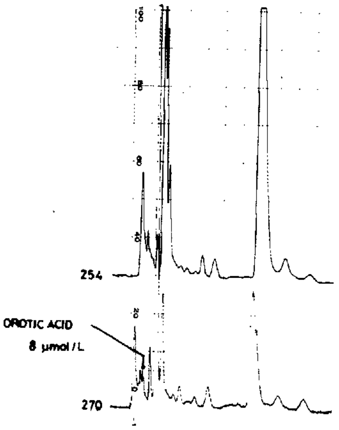

図2. オロット酸濃度8 μmoℓ/L含む尿のクロマトグラム

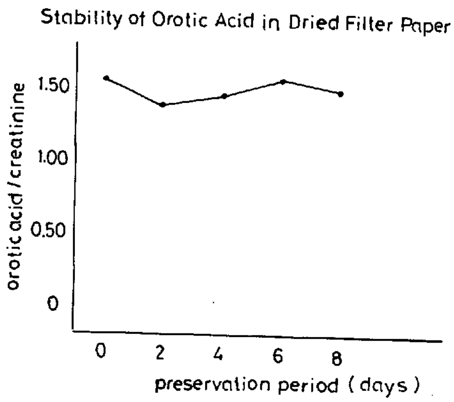

図3. 尿濾紙中のオロット酸の安定性の検討。たて軸はクロマトグラム上のオロット酸およびクレアチニンのピークの高さの比で表わした。

	orotic acid (mm)	creatinine (mm)	orotic acid / creatinine
1	83	50	1.66
2	84	54	1.56
3	88	56	1.57
4	84	55	1.52
5	88	57	1.54
6	89	57	1.56
7	87	56	1.55
8	89	57	1.53
9	85	55	1.54
10	85	56	1.52
mean	86.25	55.4	1.55
s.d.	2.20	2.22	0.04
C.V.	2.55%	4.01%	2.61%

表1. 測定法の再現性の検討。
おのおのの測定値はクロマトグラムのピークの高さを㎜単位で表わしたものである。
C.V.：Coefficient varience

考　　　　按

現在生後5日目の乾燥血液濾紙を用いた高アンモニア血症のスクリーニングが試みられているが，十分ではなく，今回の尿中オロット酸のスクリーニングは，従来の不足を補うことになる。スクリーニングの時期については，神経芽細胞腫のスクリーニングと同時に行える利点からも，生後6か月頃に行ったらよいのではと考える。今後正常値の検討を行い，カットオフポイントを決めたいと考えている。

又，尿濾紙を用いて尿中オロット酸を測定する方法は，その輸送方法が簡便である事から，ハイリスクスクリーニングで発見された高アンモニア血症の患児の敏速な鑑別疾患にも有用であると考えられた。

文　　　　献

1) Bachmann C. and Colombo J.P.: Diagnostic value of orotic acid excretion in heritable disorders of the urea cycle and in hyperammonemia due to organic acidurias. Eur. J. Pediatr. 134:109-113(1980)

2) Rajantie J. : Orotic aciduria in lysinuric protein intolerance: Dependence on the urea cycle intermediates. Pediatr. Res. 15:115-119(1981)

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

尿中オロット酸排泄量は,オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症・シトルリン血症・アルギニン血症などの尿素サイクル異常症の一部や,リジン尿性タンパク不耐症・オロット酸尿症などで増加する。今回我々は尿中オロ,ト酸測定を高アンモニア血症のマススクリーニングへ応用するため,乾燥尿濾紙より抽出した検体を,高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定する方法を検討したので報告する。