

先天性高アンモニア血症の発症予防

松 田 一 郎

(熊本大学医学部小児科)

先天代謝異常の罹患予防は現在の医学では不可能であり、予防対策の主流は発症予防である。ここでいう発症予防は、遺伝相談、羊水診断、スクリーニング、栄養治療、遺伝工学などを含めた広いもので、これらを通じて障害児の発症予防対策がなされるものと思われる。

高アンモニア血症は、高乳酸血症と共に先天代謝異常症のなかでも比較的頻度が高いことが知られている。

高アンモニア血症をおこす疾患は、表1に示した如く、多彩であるが、特に先天性高アンモニア血症として問題になるのは、表1のⅠ-1、Ⅰ-2、Ⅰ-3、に記載された疾患群である。このうちⅠ-1の尿素サイクル異常症の発症予防については、現在かなり効果的な方法が開発されて

表1 高アンモニア血症

Ⅰ. 先天性代謝異常 1. 尿素サイクル異常症 a. N-アセチルグルタミン酸合成酵素欠損症 b. カルパミルリン酸合成酵素欠損症 c. オルニチントランスフェラーゼ欠損症 d. シトルリン血症 e. アルギニノコハク酸尿症 f. アルギニン血症 2. 他の先天代謝異常 a. 有機酸血症に合併するもの 1) メチルマロン酸血症 2) プロピオン酸血症 3) イソ吉草酸尿症 4) ビオチン依存性多カルボキシラーゼ欠損症 5) グルタル酸血症Ⅱ 6) ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症 b. リジン尿性蛋白不耐症 c. 高オルニチン, 高ホモシトルリン, 高アンモニア血症 (HHH syndrome) 3. 他の先天代謝異常——肝硬変がその原因となるもの a. Wilson 病	b. ガラクトース血症 c. チロジン血症 d. 果糖不耐症 e. 糖原病Ⅳ型 Ⅱ. 後天性 1. 肝障害によるもの a. 劇症肝炎 b. アルコール性肝炎 c. 妊娠性急性脂肪肝 d. 肝硬変 2. 短絡路によるもの a. 外科的短絡路 b. 自然短絡路 3. Reye 症候群 4. 新生児一過性高アンモニア血症 5. 栄養障害 a. 亜鉛欠乏症 b. vitamin E低下症 6. 薬剤副反応 Ⅲ. 先天性, 後天性不明のもの (おそらくは先天性尿素サイクル異常症に入るものも含まれる) 1. 肝脳疾患猪瀬型 2. 肝脳疾患類癰痕脳型
--	---

いる。

また、ガスリー法のために採取された乾燥ろ紙を用いて、*B. subtilis Auxotroph* を用い、アルギニン血症、シトルリン血症、アルギニノコハク酸尿症、高オルニチン血症などをスクリーニングする方法が Nuyler により開発され、わが国でもわれわれの処を含め 2～3 の施設で検討されているが、まだこの方法で発見された症例はわが国でアルギニノコハク酸尿症が 1 例あるのみである。

今回はアルギニノコハク酸尿症の例にアルギニン投与を行い治療効果を認めた症例報告と、同じく尿素サイクル異常症の 1 つであるシトルリン血症の変異酵素であるアルギニノコハク酸合成酵素の遺伝子解析についての途中経過報告の 2 つを行う。

1) アルギニノコハク酸尿症におけるアルギニン投与の 高アンモニア血症の発症予防効果

赤 星 泉 松 田 一 郎
(熊本大学医学部小児科)

症 例

生後 4 ヶ月男子で肝肥大を主訴として来院し、入院後高アンモニア血症 ($300 \mu\text{g}/\text{dl}$) を確認し、さらに尿中にアルギニノコハク酸の多量排出を尿アミノ酸薄層クロマトグラムと高速液体クロマトグラムによるアミノ酸分析法で確認した。赤血球のアルギニノコハク酸の分解酵素は表 2 に示す如く、患児では著しく低下し、ほとんど測定不能、両親は正常と患児の中間値であった。

表 2 赤血球アルギニノコハク酸分解酵素

対 照 1.	13.07 $\mu\text{mol}/\text{hr}/\text{g Hb}$
2.	10.27
3.	12.23
4.	15.24
	12.70 ± 1.78
父 親	5.30
母 親	5.56
患 者	0

アルギニン服用効果

本疾患ではアルギニノコハク酸からアルギニンへの代謝が障害されており、アルギニンは必須アミノ酸である。そこでアルギニンを投与するとアルギニンは尿素とオルニチンになり、オルニチンはミトコンドリア内に転送され、尿素サイクルで利用される。その結果、アンモニア

はアルギニノコハク酸まで合成される。幸い、アルギニノコハク酸は腎からのクリアランスが高いので容易に尿中に排泄されるので、このアルギニン投与により高アンモニア血症が改善されることになる。患児では投与前300 $\mu\text{g}/\text{dl}$ あったアンモニア値がアルギニン16 g/day 投与により、80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以下の正常値に改善し、3年を経た現在、正常の発育をとげている。

2) シトルリン血症におけるアルギニノコハク酸合成酵素の遺伝子解析

陣 野 吉 広 野見山尚之

島 田 和 典

(熊本大学医学部第一生化学)

松 田 一 郎

(熊本大学医学部小児科)

シトルリン血症はアルギニノコハク酸合成酵素 (AS) の異常に基づく遺伝性疾患である。欧米の症例については、T.S. Su ら¹⁾ による遺伝子レベルでの詳細な研究があり、mRNA の構造異常が認められている。これに対し、わが国症例の多くは、1) 遅発性である、2) AS の性質は正常と区別することができず、単に全活性が低下している、3) 活性低下は肝臓においてのみ認められ、皮膚線維芽細胞では正常と差がない、などの特徴があって、欧米症例とは大きく性格を異にしている。このような特徴を有する日本人シトルリン血症の分子レベルでの病態解明を目的として、AS 遺伝子の研究を開始した²⁾。

方 法

a) DNA の抽出：フェノール抽出法により、正常男児および女児由来の胎盤より DNA 抽出した。

b) プローブ：T.S. Su ら³⁾ がクローン化した AS cDNA を pBR322 に組み込んだ pAS1 を ^{32}P で標識して用いた。また、cDNA 中には Hind III および Eco RI で切断される箇所がそれぞれ1ヵ所ずつあり、これらの制限酵素で切断して得られる断片を ^{32}P で標識して適宜利用した。

c) Southern プロット法による AS 遺伝子 DNA の解析：上記ヒト胎盤由来 DNA を Eco RI, Bam HI, Hind III, Pst I および Kpn I の5種の制限酵素により切断後、アガロースゲル電気泳動で DNA 断片を分離した。さらに Southern の方法を用いて、これらの DNA 断片をニトロセルロースフィルターにトランスファーし、 ^{32}P で標識した cDNA をプローブに、これと相同な構造をもつ DNA 断片をオートラジオグラフィによって検出した。

d) AS 遺伝子の単離と構造解析：ヒト胎盤由来 DNA を Eco RI で部分分解後、フェージ DNA に組み込ませて作成したヒト遺伝子のフェージライブラリーより、AS cDNA プローブによってスクリーニングし、これと相同な DNA を運ぶフェージを単離した。これらのフェージを大量培養後 DNA を抽出し、Eco RI, Bam HI および Hind III の制限酵素による切断と

AScDNA プローブとのハイブリダイゼーションによって、ファージクローン上に運ばれている AS 遺伝子 DNA の制限酵素地図を作成した。

e) ファージクローン上の AS 遺伝子とヒト染色体 DNA 上の AS 遺伝子との対応：正常ヒト胎盤由来 DNA およびファージクローン DNA を Eco RI で切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、Southern プロット法を用いてファージの運ぶ AS 遺伝子 DNA と染色体上のその対応を検討した。

f) 塩基配列決定：単離したファージクローン DNA の一部の塩基配列を Maxam and Gilbert 法により決定した。

結果および考察

a) 正常なヒト胎盤由来の DNA 上に存在する AS 遺伝子を Southern プロット法により解析した結果、AScDNA と相同な構造をもつ十数種の DNA 断片が存在することが明らかになった。これら DNA 断片のなかには、明瞭に男女差の認められるものがあつた。このことは AS 遺伝子様 DNA 構造が性染色体を含む複数個の染色体上に存在することを示唆する。なお、これはすでに報告されている欧米人のパターンとほとんど差異がなかった。

b) 5.5×10^5 個のヒト遺伝子のファージライブラリーより、AScDNA に相同な DNA 構造をもつファージクローンを39個単離した。このうち8個について構造解析を行った。これら8個のファージに運ばれる AScDNA に相同な DNA 構造は、AScDNA に相同な DNA 構造を含むヒト DNA Eco RI 断片18種類のうち11種類に対応することが確認された。

c) これら8個のクローンは、Eco RI, Hind III および Bam HI の3種の制限酵素による制限酵素地図の作成と AScDNA を用いた Southern プロット解析の結果、以下の三群に分類された。

I 群：AScDNA を Eco RI で切断した時得られる 5' 側および 3' 側の DNA 断片双方に相同な DNA 構造を運んでいるもの、5 個。

II 群：上記 DNA 断片の 3' 側の DNA 断片とのみ相同な DNA 構造を運んでいるもの、2 個。

III 群：5' 側の DNA 断片とのみ相同な DNA 構造を運んでいるもの、1 個。

I 群のうち3個のクローンは AScDNA 上に存在する Eco RI と Hind III の切断部位の両方が存在せず、また1個は Eco RI 切断部位が存在しないことから、偽遺伝子の可能性が示唆された。III 群に属するファージクローン、LmAS-8 が運ぶ AS 遺伝子様 DNA 構造にはイントロンの存在が明らかに認められた (図1)。さらにこのクローン上には AScDNA の Hind III 切断部位より 5' 側の DNA 断片に相同な DNA 構造が存在していた。

d) LmAS-8 DNA 上に存在する AS 遺伝子様 DNA 構造について、Hind III 切断部位より 5' 側の塩基配列を決定した結果、AScDNA の翻訳領域の 5' 端までの配列が存在することが明らかとなった。しかしこのクローン上には、それより上流の非翻訳領域の DNA 配列は存在しなかった。

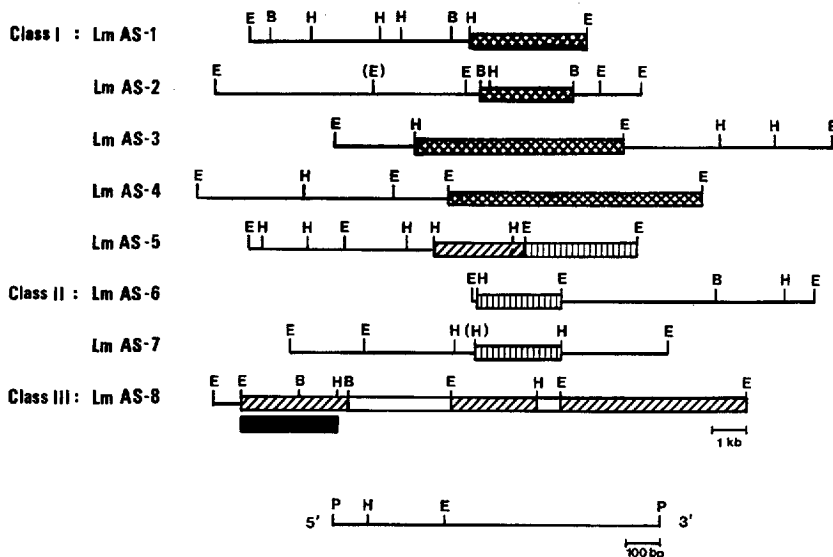


図1 Restriction endonuclease maps of human genomic DNAs containing argininosuccinate synthetase-like sequences.

Restriction fragments that hybridize with 5'-end probe (0.5 kb PstI-EcoRI cDNA fragment) or 3'-end probe (1.05 kb EcoRI-PstI cDNA fragment) are indicated by obliquely hatched boxes and vertically hatched boxes, respectively. Fragments that hybridize with both probes are indicated by cross-hatched boxes. Solid box below the Lm AS-8 indicates the fragment that hybridizes with the smaller 5'-end probe (0.16 kb PstI-HindIII cDNA fragment). Open boxes in the map of Lm AS-8 represent introns. The map of cDNA insert of pAS1 (Su et al., 1981) was shown below the phage clone maps. Restriction sites: EcoRI, E; BamHI, B; HindIII, H; PstI P.

遺伝子の発現とその調節には5'周辺領域のDNA配列が大きな役割を果たしていることが、これまでの研究結果から明らかにされている。さらに組織特異性にもこの部分の配列が関与していることを示す報告もある⁴⁾。日本人シトルリン血症の示す特徴のうち、量の異常および組織特異性などの発症機構を遺伝子レベルで解明するためには、患者AS遺伝子の5'周辺領域の単離と正常人との比較が必須である。

今後、さらにAS遺伝子上流のDNA配列を含むファージクローンを単離して構造を解析していく予定である。

文 献

- 1) Su, T.S., Beaudet, A.L. and O'Brien, W.E.: Abnormal mRNA for argininosuccinate synthetase in citrullinaemia. *Nature*, **301**: 533~534, 1983.
- 2) Jinno, Y., Nomiya, H., Wakasugi, S., Shimada, K., Matsuda, I. and Saheki, T.: Isolation and characterization of phage clones carrying the human argininosuccinate synthetase-like genes. *J. Inher. Metab. Dis.* (in press)
- 3) Su, T.S., Bock, H.G.O., O'Brien, W.E. and Beaudet, A.L.: Cloning of cDNA for ar-

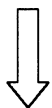
gininosuccinate synthetase mRNA and study of enzyme overproduction in a human cell line. J. Biol. Chem., **256** : 11826~11831, 1981.

- 4) Walker, M.D., Edlund, T., Boulet, A.M. and Rutter, W.J. : Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes. Nature, **306** : 557~561, 1983.



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



先天代謝異常の罹患予防は現在の医学では不可能であり,予防対策の主流は発症予防である。ここでいう発症予防は,遺伝相談,羊水診断,スクリーニング,栄養治療,遺伝工学などを含めた広いもので,これらを通じて障害児の発症予防対策がなされるものと思われる。高アンモニア血症は,高乳酸血症と共に先天代謝異常症のなかでも比較的頻度が高いことが知られている。