

APRT 欠損症のスクリーニングについての検討

一色 玄, 周山 逸人

(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 (DHOA) 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。本症の治療には早期に発見し, 低 adenine 食事療法により, 血中 adenine 濃度をさげ, allopurinol の投与により DHOA の生成を抑えることで著効が得られる。本症のヘテロ保因者の頻度は 0.4 ~ 1.0 % と言われ, 非常に稀な疾患ではない。患者の血中 adenine 濃度が早期診断, あるいは治療に関する良好な指標であるが, 従来の定量法は非常に繁雑で実用性に乏しい。前回の研究は血液濾紙を用いて APRT 酵素を測定した。今回われわれは過剰の adenine が排泄される患者の尿を濾紙に spot し, その adenine の簡易定量法を試み, その臨床上の有用性を検討した。

研究方法

試料

- 1 : APRT 欠損症の二人〔妹 (PT1), 兄 (PT2)〕とその両親の一日尿 : 毎回尿につき 5 N. HCl を 1 滴を加えて冷凍保存して, DHOA と adenine の測定用資料にした。但し, PT1 と PT2 は現在 allopurinol 7mg/kg を投与中であった。
- 2 : single urine とは HCl を加えないで, spotting method 用と adenine 測定用のものである。
- 3 : Whatman No. 1 filter paper

方法

1 : 尿中 adenine 定量

上述の方法により採取した尿を 3000 rpm. にて遠沈し, 上清を水で 21 倍希釈し, その 1 ml につき 2.1% glyoxal hydrate trimer solution 1 ml, glycolic acetic acid 3 ml を加え, 100°C 3 時間 incubation 後, fluorometer (excitation at 328 nm, emission at 382 nm) で測定した。

2 : 濾紙上の adenine 簡易定量

上述の尿を 5 μ l. Whatman 1 grade filter paper に spot してその濾紙を自然乾燥させた後, reagent 1 (3.0 g vanillin in 100 ml ether and 0.5 ml sulphuric acid) の中に dip して, 直ちに 90°C oven 内 4 分間乾燥した。oven から出し, reagent 2 (2.5% AgNO₃ with equal volume 0.5% bromphenol blue) の中に dip して, 空気乾燥, 約 10 分間後, oven 内 1.5 分間加熱乾燥した。

3 : 尿中 DHOA 測定

高速液クロマトグラム法により行った。島津社の ZORBAX COLUMN (4 級アミン) 2.5 × 4.6 cm I. D を使用した。条件は 60°C, chart speed 30 cm/h, 溶出用溶媒 : ammonium acetate buffer (pH 4.4), initial : 0.006 M, final : 4.2 M, stepwise gradient (0.6 M 毎に), flow-rate : 30 ml/h buffer 毎に 6 分間, 試料の前処理 : 0.45 - μ m microfilter で濾過した。検出 : UV spectrophotometer 305 nm にて検出した。

研 究 結 果

1 : glyoxal 法による尿中 adenine 濃度測定

表 1 に示すように, 正常成人の尿中 adenine は 72.0 と 74.0 μ mole/l, 父親の尿中は 38.0 ~ 80.0 μ mole/l, 母親の尿中は 34.6 ~ 408.6 μ mole/l に対し, PT1 つまり母乳とミルクが主な栄養源である患児の尿中に 133.3 から 286.6 μ mole/l の adenine が検出されてた。PT2 の尿中 adenine は 337.3 から 468.6 μ mole/l であった。なお, 患者の祖母の尿中 adenine は 381.3 μ mole/l であった。図 1 に示すように祖母はヘテロであると思われる。

2 : 濾紙上 spotting test による尿中 adenine のスクリーニング

図 2 に示したように 100 μ mole/l 以上の濃度は明確にレンガ色を発するため判定が可能であったが 50 μ mole/l 以下では発色せず, 判定不能であった。図 3 に示した様に PT1, PT2 と祖母の尿中 adenine は本法で 100 μ mole/l 以上であった。

3 : HPLC による尿中 DHOA の定量

図 4 に示す様に DHOA は 7 分間目に流出される。

定量した結果, 正常成人二人は 18 mg/dl と 6.5 mg/dl に対し PT1 は 3.0 mg/dl, PT2 は 7.9 mg/dl, 父は 16 mg/dl, 母は 3.9 mg/dl, 祖母は検出不能であった。なお PT1, PT2 は allopurinol 投与中である。

正常値は検討不十分であるが患児については高値と思われるが治療中であり確認出来なかった。

考 案

尿中 adenine は正常人の場合、ほとんどが内因性のものであるのに対し APRT 欠損症の場合は食物中の adenine 量により尿中への排泄量が鋭敏に変動した。PT1 の DOHA 結石は低 adenine 食と allopurinol の 7 mg/kg 投与で消失した。兄の PT2 には低 adenine 食を指導していたがなかなか実行が難しく、allopurinol 7 mg/kg を投与した。現在 DOHA 結石は出現していない。表 1 に示した様に新生児の尿中 adenine は $50\ \mu\text{ mole/l}$ 以下であるのに対し APRT 欠損症の患児の尿は $100\ \mu\text{ mole/l}$ 以上であった。この事は尿中 adenine の測定が乳児期 APRT 欠損症の診断に役立つものと考えられる。濾紙に spot した adenine の半定量は図の standard に示したように $100\ \mu\text{ mole/l}$ 以上は明らかにレンガ色を呈し、簡易半定量に役に立つものだと考えられる。尿の pH により発色が多少消褪するので今後更に検討を要するものである。尿中 DHOA について、患児 2 人とも allopurinol 投与中であるので正常人より低値であった。また、未治療の父はヘテロと思われるが尿中 DHOA 量は正常検体と差がなく、尿中 DHOA 量の臨床的意味について今後の検討が必要である。なおヘテロの祖母は現在原因不明の腎不全のため透析中であった。

前回の研究は血液を spot した濾紙を用いて APRT 酵素を測定した。今回は濾紙に spot した adenine を簡易に半定量が出来た。APRT 欠損症の診断については尿を用いる方が、より迅速かつ正確に出来るものと考えられる。患者の日頃の食事のコントロールの良悪の簡易検査としても本法が役に立つだろうと思われる。

表 1

ADENINE CONCENTRATION OF
DAILY URINE IN $\mu\text{ mole/l}$

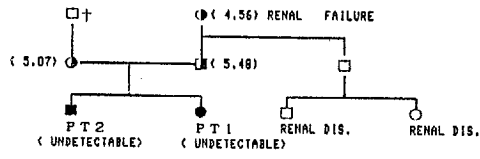
	NOVEMBER			DECEMBER		SINGLE URINE
	26	27	28	11	12	
父 精	57.3			42.0	38.0	80.0
母 精	74.0	34.6	68.0	44.0	38.0	108.6
PT1 (妹)	177.3	133.3	211.3	286.6	266.6	274.6
PT2 (兄)	416.6	336.0	337.3	468.6	370.3	254.0
祖 母	腎透析中					381.3
正常人 1						72.0
正常人 2						74.0
正常新生児 1	混合栄養					50.6
正常新生児 2	混合栄養					53.3
正常新生児 3	混合栄養					26.0

By GLYOXAL REACTION METHOD

PT1: 7-m-o female. PT2: 4-y-o male

图 1

APRT ACTIVITIES AND FAMILY HISTORY



() : APRT ACTIVITIES (nmoles/hr/mgHb)
Control: 9.56 ± 0.45

图 2

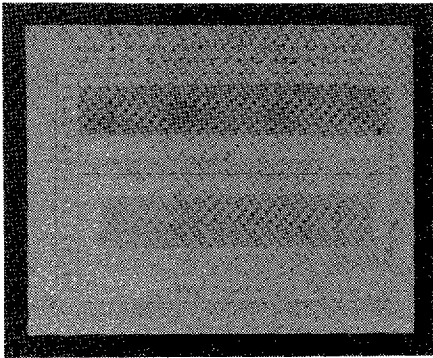


图 3

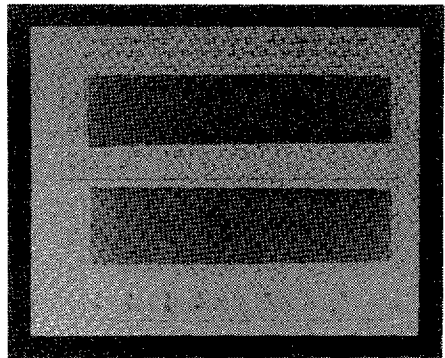
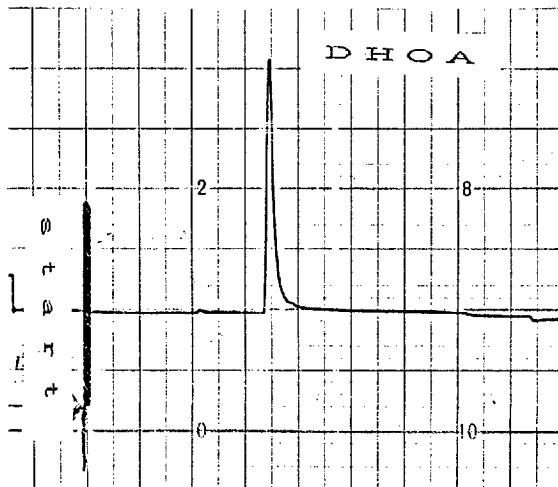


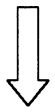
图 4





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(DHOA)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。本症の治療には早期に発見し,低 adenine 食事療法により,血中 adenine 濃度を下げ,allopurinol の投与により DHOA の生成を抑えることで著効が得られる。本症のヘテロ保因者の頻度は0.4~1.0%と言われ,非常に稀な疾患ではない。患者の血中 adenine 濃度が早期診断,あるいは治療に関する良好な指標であるが,従来の定量法は非常に繁雑で実用性に乏しい。前回の研究は血液炉紙を用いて APRT 酵素を測定した。今回われわれは過剰の adenine が排泄される患者の尿を濾紙に spot し,その adenine の簡易定量法を試み,その臨床上の有用性を検討した。