

レサズリン-レゾルフィン反応を利用した尿素 サイクル代謝異常症のマス・スクリーニング法

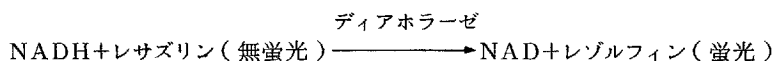
藤村有信¹、川村正彦²、土平一義¹

(¹名古屋市衛生研究所 ²名城病院)

はじめに

私達はこれまでに、共軛したいくつかの酵素、オルニチン転移酵素(OAT)、ピロリン5カルボン酸還元酵素(P5CR)、アルギナーゼ(AG)、アルギニノコハク酸(AS)分解酵素(ASL)を用いて、共存するNADHの酸化反応を行ない、試料中のオルニチン(Orn)、アルギニン(Arg)、アルギニノコハク酸(AS)を最少感度0.2 nmolレベルで、0~2, ~5, ~10 nmolの範囲で測定する微量定量法を開発してきた。また新しい血色素変性法の開発により、血液紙ディスク3 mm径1個中の微量測定を可能にした。しかし微量のNADH溶液は反応停止後も酸化還元を受けやすく、正確な測定にはその安定剤や増感剤の開発が望まれている。そこで私達はその機能をはたすものとして、レサズリン-レゾルフィン反応をこの反応系に応用出来ないか検討し、良い結果を得た。この反応はレゾルフィンの蛍光を利用して測定し、非常に安定でしかも蛍光強度が40倍近く強くなった。さらに蛍光を使わず可視部の比色によっても測定する新しい方法も検討した。また本法を使って新生児Orn血症のマス・スクリーニングを実施した。

原 理

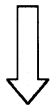


実 験 方 法

反応系：全容50 μ l中にトリスHCl (pH 8.0) 5 μ mol, α KG 0.25 μ mol, DTT 0.5 nmol, NADH 0~15 nmol, OAT, P5CRともに天野製薬製で0.5 mU, Orn 0~10 nmolを加える。対照系：上記反応系より酵素を除去する。上記反応系を37°C, 1時間反応後レサズリン10~50 nmol, ディアホラーゼ0~2 Uを加え5分後3 mlの蒸留水を加えて蛍光を励起光540 nm, 蛍光波長580 nmで測定した。また比色のときは稀釈しないでマイクロプレート方式のコロナ電気二波長光度計MTP-12で測定した。

実 験 結 果

1)至適ディアホラーゼ量の検討：レサズリン20 nmol以上にはディアホラーゼ200 mU以上必要であった。 2)レサズリン量とNADH量：NADH 7 nmol (70 μ l中)以下ではレサズリンは蛍光強度の大きい順に20, 30, 40, 50 nmolとなり、10 nmolは20 nmolの約 $\frac{1}{2}$ となる。NADH 14 nmolではレサズリン30~50 nmol必要である。 3)Ornの検量線：蛍光及び比色法でOrn 0~2, ~5, ~10 nmolの範囲で直線となった。 4)Orn血症のマス・スクリーニング：一般新生児約4100件実施し、Orn 0~2.4 mg% (42.3%), 2.4~4.8 mg% (30.9%), 4.8~7.3 mg% (20.8%), 7.3~9.7 mg% (5.8%), 9.7 mg%以上は(0%)でまた陽性者は見つかっていない。



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



はじめに

私達はこれまでに、共軛したいいくつかの酵素, オルニチン転移酵素(OAT), ピロリン 5 カルボン酸還元酵素(P5CR), アルギナーゼ(AG), アルギニノコハク酸(AS)分解酵素(ASL)を用いて, 共存する NADH の酸化反応を行ない, 試料中のオルニチン(Orn), アルギニン(Arg), アルギニノコハク酸(AS)を最少感度 0.2nmol レベルで, 0~2, ~5, ~10nmol の範囲で測定する微量定量法を開発してきた。また新しい血色素変性法の開発により, 血液濾紙ディスク 3mm 径 1 個中の微量測定を可能にした。しかし微量の NADH 溶液は反応停止後も酸化還元を受けやすく, 正確な測定にはその安定剤や増感剤の開発が望まれている。そこで私達はその機能をはたすものとして, レサズリン-レゾルフィン反応をこの反応系に応用出来ないか検討し, 良い結果を得た。この反応はレゾルフィンの蛍光を利用して測定し, 非常に安定でしかも蛍光強度が 40 倍近く強くなった。さらに蛍光を使わず可視部の比色によっても測定する新しい方法も検討した。また本法を使って新生児 Orn 血症のマス・スクリーニングを実施した。