

## APRT欠損症のマススクリーニングについて

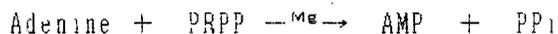
一色 玄 周山 逸人

(大阪市大 小児科)

### 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るが、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、腎不全に進行することが知られている。本症の治療には、早期に発見し、低adenine 食療法により血中adenineの濃度をさげ、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。従って早期発見が非常に重要な疾患である。我々はすでに血液ろ紙を用いてAPRT酵素を測定した。その測定原理は反応前後のadenineの差で酵素活性を表わしたものである。その測定過程に遠沈と比色の操作が行なわれているのでマススクリーニングとしては繁雑である。そこで今回我々はさらに簡便化すべく種々の方法を検討した結果、以下の方法を考案した。

測定に用いた原理は以下の式のようなものである。



- 1) 反応液中の  $\text{Pi}$  を  $\text{MF solution}$  により沈澱して、除く。
- 2) 産生した  $\text{PPi}$  を  $\text{CaCl}_2 + \text{KF}$  により沈澱し、除去する。
- 3)  $\text{PRPP}$  の量を調節し、正常検体が反応しきれぬ量にする。
- 4) 残留の  $\text{PRPP}$  を  $\text{Molybdate}$  と  $\text{Eikonogen solution}$  により定量する。

### 方 法

#### 試料と器材

- 1: マススクリーニング用ろ紙で採血したろ紙血

- 2 : 0.46  $\mu$ m micro-filter
- 3 : 2ml 注射用syringe
- 4 : Reaction mixture: 0.25mM adenine, 55mM tris-chloride buffer  
pH 7.4 5mM Mg sulfate, 1mM phospho-ribosyi-pyrophosphate (PRPP)
- 5 : MT solution: 40mM ammonium molybdate 4ml + 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1ml +  
triethylamine 50  $\mu$ l
- 6 : Eikonogen solution. NaHSO<sub>3</sub> 29gm + Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1gm + 1, 2, 4 aminonaph-  
tholsulfonic acid  
0.5gm in 200ml H<sub>2</sub>O

## 方 法

- 1 : 1/8sizeのdisc 2個にreaction mixture 0.1mlを加える
- 2 : 37°Cで30分振盪incubation with shaking
- 3 : MT solution 0.1mlを加えて5分間静置
- 4 : micro-filterで濾過
- 5 : 0.05ml 5N KOH、0.05ml 1mM CaCl<sub>2</sub>を順に加える
- 6 : micro-filterで濾過
- 7 : 0.05ml 0.3M KFを加える
- 8 : micro-filterで濾過
- 9 : 濾過液0.2mlに 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1ml, 40mM ammonium molybdate in 5N  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1ml, cysteine (0.1%) 0.1ml, Eikonogen solution 0.1mlを加  
える
- 10 : 37°Cで20分incubation後、その発色を目測する
- 11 : 薄い青色では正常で濃く発色するのはヘテロかホモである。

## 結

## 果

- 1 : PRPPの濃度別による発色は0.1mM以上になると目測出来るようになる。  
(写真 1) 0.02mM, 0.05mMは無色や極めてうすい青色に対し、  
0.1mM、0.2mM、0.3mMは濃度が増えるにつれ、発色も濃くなる。
- 2 : 前述の方法中のステップ9の発色後の総量は0.7mlであり、水で2mlに

なるようにし、吸光度 830nmに最高吸収を示した。

3：写真2に示すように両患児とその母親はともに発色を示す。

## 考 案

1964年 Suginoら<sup>1)</sup>が酸性下でmolybdateとtriethylamineの共同作用でPiが完全に沈澱されて溶液中から除去することが出来ると報告した。1981年Heinonenら<sup>2)</sup>がアルカリ性のもとでCaCl<sub>2</sub>とKFの共同作用でPPIがほとんど沈澱し除かれると発表した。PRPPはこの二つの方法のいずれも反応せず沈澱されなかった。1977年Johnsonら<sup>3)</sup>のAPRT活性測定法をmodifyして考案したが、その方法は反応液中のadenineの減少率によりAPRT活性を測定するものであった。しかし、adenineは無色でUV 260nmの吸光度を用いて測らなければならない。これに対し、反応に使われるPRPPの減少率を測定するか、生成して来るPPIを定量すれば同じくAPRT活性の測定が可能である。今回用いた方法ではMT solutionを用いて除蛋白と除Piを行われているのでPPIの様な酸性溶液中に極めて不安定なものは指標に用いられない。PRPPは ammonium molybdateを用い、Eikonogenとの共同作用で青色に発色し、肉眼的に判定可能となる。発色反応にH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を使用することにより、発色を調整し、異常検体を発見し易くすることが可能である。本法では5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を検体 0.2mlに対し、0.1ml使用している。図の示しているようにPRPP濃度が0.05mM以下の検体には発色が見られず、0.1mM以上の検体では青色を呈し、なお、発色の濃さも濃度に比例して増加する。しかし、0.3mM以上の検体ではPRPP濃度と比例しない。

本法のreaction mixtureはJohnsonらの原法に従ったもので、方法中adenineの消費率は正常成人の赤血球lysate 50  $\mu$ l (4ml中)を使う場合30分間で20%であった。

今回我々はreaction mixture 0.1mlにろ紙血1/8のを2個(全血で約16  $\mu$ l)を使用している。Johnsonらの原法の約5倍の赤血球を使用していることになる。incubation時間は同じく30分であるので理論上正常成人は反応液中のPRPPが100%消費されることになっている。但し、正常成人のAPRT活性の変動範囲は $24.7 \pm 4.8$  nmoles/mgHb/hrでJohnsonらによると15

nmoles/mgHb/hr以下の活性を示す正常人は約10%もあると報告した。前々年度での研究ではろ紙血で測定した活性が血液lysateで測定したものの約60%になっていた。この様な条件を考慮し、 $H_2SO_4$ の濃度をPRPP 0.1mM以下では発色しないように調整した。これまでの経験では本法での測定では5%前後のfalse positiveがあり、なお不完全なところがある。今後とも検体数を重ねて検討することが必要である。また、全出生児に適用するにはなお簡便性に問題がある。腎疾患の家族歴のある出生児について行うなど対象を選択する必要があるであろう。本法の特点是 incubation 後3回のmicrofilterによる濾過を用いた操作性の極めて簡単な方法である。設備のない施設では臨床症状と相まって良いスクリーニング法であると思う。

## 文

## 献

- 1 : Sugino, Y. and Miyoshi, Y. , The specific precipitation of orthophosphate and some biochemical application . J. Biological Chemistry 239 2360-2364 1964
- 2 : Heinonen, J. K. , Honkasaio, S. H. and Kukko, E. I. ; A method for the concentration and for the colorimetric determination of nanomoles of inorganic pyrophosphate. Analytical Biochemistry 117 , 293-300 1981
- 3 : Johnson, L. A. , Gordon, R. E. and Emmerson, B. I. ; Adenine phosphoribosyltransferase: A simple spectrophotometric assay and the incidence of mutation in the normal population. Biochemical Genetics 15, 265-272 1967

写真1

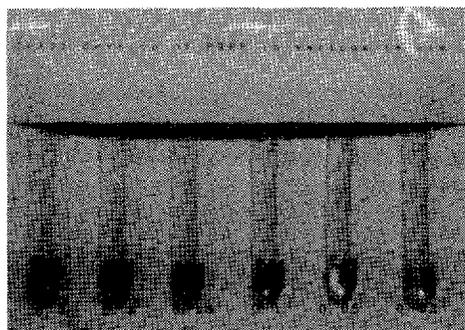
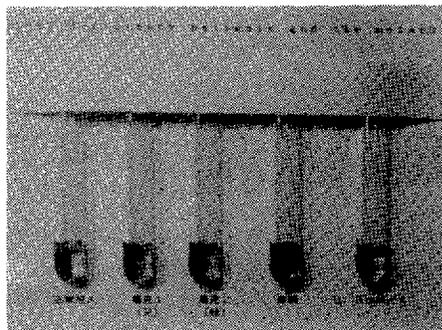


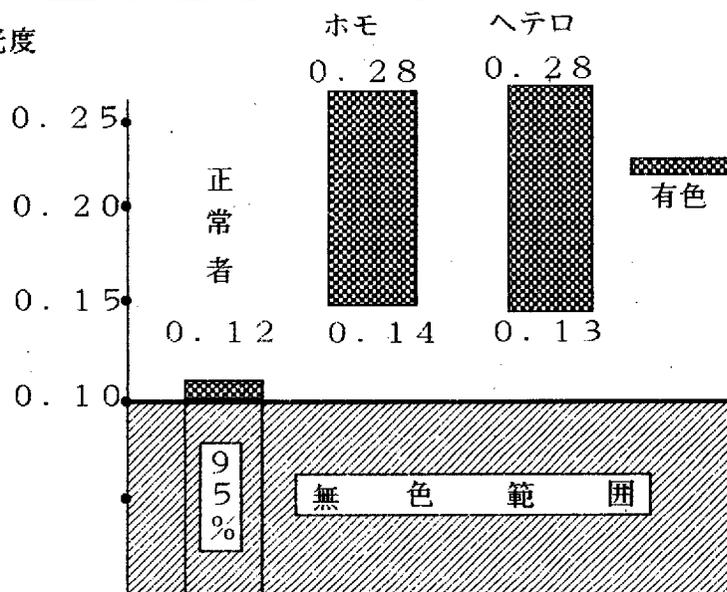
写真2



☒

### 正常者とホモ、ヘテロの分布

吸光度



N = 50回



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

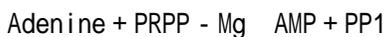
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 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るが、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-dihydroxy-adenine(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、腎不全に進行することが知られている。本症の治療には、早期に発見し、低 adenine 食療法により血中 adenine の濃度を下げ、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。従って早期発見が非常に重要な疾患である。我々はすでに血液ろ紙を用いて APRT 酵素を測定した。その測定原理は反応前後の adenine の差で酵素活性を表わしたものである。その測定過程に遠沈と比色の操作が行なわれているのでマススクリーニングとしては繁雑である。そこで今回我々はさらに簡便化すべく種々の方法を検討した結果、以下の方法を考案した。

測定に用いた原理は以下の式のようなものである。



- 1)反応液中の  $\text{P}_i$  を MT solution により沈澱して、除く。
- 2)産生した  $\text{PP}_1$  を  $\text{CaCl}_2 + \text{KF}$  により沈澱し、除去する。
- 3)PRPP の量を調節し、正常検体が反応しきれぬ量にする。
- 4)残留の PRPP を Molybdate と Eikonogen solution により定量する。