

尿素サイクル代謝異常症のマススクリーニング

大浦敏明（大阪市更生療育センター）
長谷 豊、山本裕子、鶴原常雄（大阪市立小児保健センター）
藤本昭栄、大竹治美（大阪市環境保健協会）

研 究 目 的

尿素サイクル代謝異常症に属する疾患は、それぞれが稀な疾患である。症状は中枢神経障害、高アンモニア血症を主体に重篤であることが多い。最近の診断技術の発達により、本症疾患の報告が散見され、低蛋白食を主体とした治療が症状の改善や発現防止に有効である可能性が示唆され、早期診断・早期治療の効果が期待されている。

マススクリーニング法として従来欧米で血清・尿のろ紙および薄層クロマトグラフィーなどが用いられている。最近、Talbot、Nailerらが乾燥血ろ紙を用いてオルニチン血症、シトルリン血症、アルギニココハク酸尿症とアルギニン血症の4疾患を同時にスクリーニングするenzyme-multiple auxotroph assay法を開発した。われわれは、この方法に魅力を感じ、プレート条件・標準血液ろ紙の作成・判定法などにつき種々検討した結果、マススクリーニングに応用可能と判断し得たので、昭和58年2月よりルーチン化している。

尿素サイクル代謝異常症のスクリーニング法としてのenzyme-multiple auxotroph assay法の適性を検討する資料として、われわれの行っている新生児マススクリーニングの集計結果を報告する。

研 究 方 法

昭和58年2月7日開始時より昭和60年12月31日までに大阪市環境保健協会内の先天性代謝異常スクリーニングセンターに送られてきた大阪市内出生の新生児採血乾燥血液ろ紙を対象に、BIA法によるガスリー検査と並行して、ルーチン・スクリーニングとして行った100,198検体について集計を行った。

スクリーニング法は、Enzyme-multiple auxotroph assay法、すなわち菌の発育にアルギニン(Arg)、シトルリン(Cit)、オルニチン(Orn)を必要とする枯草菌変異株 MB

1047/16と、赤血球中に存在するアルギニココハク酸分解酵素 (ASA Iyase)

を用いて、乾燥血液ろ紙中の尿素サイクル関連アミノ酸 (Arg, Cit, Orn)濃度増量とASA Iyaseの存在の有無を検査する方法、を使用した。

プレート作成条件は、表1に示す如くである。Arg標準血液ろ紙は、正常人の

表1

プレート作成条件

枯草菌 MB 1047/16 (10^5)	: 0.2 ml
0.1 M アルギニココハク酸 (Sigma)	: 0.23 ml
寒天 (BBL granulated)	: 2.5 g
ディメイン修正培地 (栄研)	: 15 ml
塩化カルシウム (0.8 g/dl)	: 0.2 ml
	(150 ml)

赤血球中のアルギナーゼにより Orn に変化してしまうため、作成が困難で、Cit と Orn のみの標準血液ろ紙を使用し、3, 6, 9 mg/dl をスタンダードに用いている。

カットオフポイントは 6 mg/dl とし、無染色で判定を行った。

研 究 結 果

昭和 58 年 2 月開始より昭和 60 年 12 月まで 2 年 10 月の尿素サイクル代謝異常症のマススクリーニングの集計結果を、表 2 に示す。

表 2 尿素サイクル代謝異常症のスクリーニング結果

期 間	S. 58. 2. 7 ~ S. 60. 12. 31			
総 検 査 数	1 0 0, 1 9 8			
	発育阻害のため TLC or HPLC	高値或は、dense-zone 小のため TLC or HPLC 再チェック		合 計
一次再検査数 (%)	1,556 (1.553)	146 (0.146)	905 (0.903)	2,607 (2.602)
再採血数 (%)	47 (0.047)	19 (0.019)	46 (0.046)	112 (0.112)
未回収数 (%)	14*1 (0.014)	4 (0.004)	11*2 (0.011)	29 (0.029)
患 児	0	0	2	2
肝 炎	0	0	1	1
正 常	33	15	32	80

TLC : 薄層クロマトグラフィー
HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

① アルギニノコハク酸尿症 1例
一過性高シトルリン血症 1例
*1. 内死亡 4 ; *2. 内転医 1

抗生剤などによる発育阻害のために薄層クロマトグラフィー (TLC) あるいは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で一次再検査を行ったものは 1,556 件 (1.553%)、うち再採血依頼数は 47 件 (0.047%) であった。また高値 (発育環が大) および正常では必ず見られる dense zone が小さいため、一次再検査を行ったものは 1,051 件 (1.049%)、うち再採血依頼数は 65 件 (0.065%) であった。高値および dense zone が極めて小さいと判定したものの一次再検査は、初期には加熱処理 (121°C、1 分) を、また一時全て HPLC を行った時期があったため表のように分類した。最近では、プレートも安定しているので、何も処理せずに再検査するか、時に TLC を行っている。再採血依頼数は合計 112 件 (0.112%) であったが、発育阻害のためのもの中に 4 例の死亡例があった。これらの検体の TLC や HPLC の結果は、尿素サイクル関連アミノ酸の増量はなく他の疾患を疑わせるものであった。現在までに、2 例の患者が発見された。1 例はアルギニノコハク酸尿症で、1 例は一過性の高シトルリン血症である。

考 按

Enzyme-multiple auxotroph assay 法は、ガスリー法に比しプレートの安定

性や判定上での問題点が多いとされている。われわれは、これらの点に検討を加え、いままで以下のような幾つかの知見を得た。

- 1) プレートは、微細な調整を必要とするが現在行っている作成条件で、ほぼ安定したものが得られ、染色なしでも十分に判定可能である。
- 2) 標準血液ろ紙作成にあたって、Argは赤血球中のアルギナーゼによりOrnに変化するためArgの標準血液ろ紙の作成は困難である。
- 3) 新生児血液中のOrn, Cit, Arg濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定するとOrn濃度が高く、このことを考慮すると判定を行い易い。
- 4) Orn, Cit, Argそれぞれの濃度増量による発育環の生え方が違っており、判定する場合に考慮が必要である。しかし、慣れれば生え方により増量アミノ酸の推測が可能である。
- 5) 血液ろ紙中にアルギニノコハク酸分解酵素(ASA lyase)が正常に存在する場合には、プレート中のASAはアルギニン代謝され、ろ液周囲に小さな濃い発育環(dense zone)を形成する。ASA尿症では、この発育環がみられないか非常に小さい。抗生剤による発育阻害の場合にも同様な現象を認めるが、ASA尿症と違って、ろ紙の下にも菌の発育はない。
- 6) 尿素サイクル関連アミノ酸の増量により発見されたのは、一過性Cit血症と肝障害によるCit増量だけである。既知患者検体の検討では、OrnとCitの増量は判定が容易であることがわかったが、Argの判定は難しいと考えていた。しかし、生後5カ月でアルギニン血症と診断した患者の検体で、発育環の生え方は高濃度に作成した血液ろ紙検体の生え方と全く違っているのがわかった。Argの判定には注意を要するが十分に可能と考えられた。

われわれのスクリーニングで発見されたASA尿症の1例は、enzyme-multiple auxotroph assay 法マスキングで発見された最初の症例である。生後約2カ月の初診時、ごく軽度の発達遅滞と肝障害をみたが、軽度の蛋白摂取制限と生後4カ月から、Arg投与を行い、いずれも消失した。現在3歳になるが、発達は正常である。患児の尿、髄液中にASAの明らかな増量が証明され、赤血球中ASA lyase活性は患児は正常の5%以下、両親は30~50%であった。

一過性高Cit血症の患児は、生後7日、14日の血液ろ紙中Cit濃度は11.7、11.1 mg/dℓ 初診時(生後25日)6.3 mg/dℓであった。蛋白負荷でのNH₃上昇なく、普通の蛋白摂取量にて血中Citは低下、一過性と診断した。現在1歳になるが、発育・発達は順調で、血中Citも正常である。

Enzyme-multiple auxotroph assay 法は、魅力あるマスキング方法であり、さらに検体数を増やして検討を加えたい。

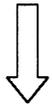
文 献

- 1) Talbot, H.W., et al. : Neonatal screening test for argininosuccinic acid lyase deficiency and other urea cycle disorders. Pediatrics, 70; 526-531 1982.



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

尿素サイクル代謝異常症に属する疾患は、それぞれが稀な疾患である。症状は中枢神経障害、高アンモニア血症を主体に重篤であることが多い。最近の診断技術の発達により、本症疾患の報告が散見され、低蛋白食を主体とした治療が症状の改善や発現防止に有効である可能性が示唆され、早期診断・早期治療の効果が期待されている。

マススクリーニング法として従来欧米で血清・尿のろ紙および薄層クロマトグラフィーなどが用いられている。最近、Talbot、Nailerらが乾燥血ろ紙を用いてオルニチン血症、シトルリン血症、アルギニノコハク酸尿症とアルギニン血症の4疾患を同時にスクリーニングする enzyme-multiple auxotroph assay 法を開発した。われわれは、この方法に魅力を感じ、プレート条件・標準血液ろ紙の作成・判定法などにつき種々検討した結果、マススクリーニングに応用可能と判断し得たので、昭和58年2月よりルーチン化している。

尿素サイクル代謝異常症のスクリーニング法としての enzymemultiple auxotroph assay 法の適性を検討する資料として、われわれの行っている新生児マススクリーニングの集計結果を報告する。