

酵素法による高オルニチン血症のマス・ スクリーニング法の検討

(分担研究：マス・スクリーニングに関する研究班)

多田 啓也*, 石沢 志信*

要約 藤村らが開発した酵素法の改良法を用いて高オルニチン血症のマス・スクリーニングの検討を行なった。本法とアミノ酸自動分析計で測定した血中オルニチン値には良好な相関関係 ($r = 0.97$) が認められた。さらに gyrate atrophy を伴った高オルニチン血症症例から得られた血液濾紙によるオルニチン測定値は本法とアミノ酸分析計とで近似の値を示し、本法が高オルニチン血症のマス・スクリーニングに有用であることを示した。

30,000例の新生児から得られた血液濾紙を用いて本法によるスクリーニングを行なった結果、5 mg/dl 以上のオルニチン値を示した例が42例見出されたが、再検の結果いずれも一過性の高オルニチン血症であった。

見出し語：高オルニチン血症，脳回転状網脈絡膜萎縮症，マス・スクリーニング

はじめに

血中オルニチンの特異的増量を来す疾患として脳回転状網脈絡膜萎縮症 (Gyrate atrophy of the choroid and retina) がある。本症は 6~10才頃から夜盲や近視で発症し漸次視力障害が進行し、最終的には 40~50才代で盲目となる疾患であり常染色体劣性の遺伝形式をとる。眼底所見は極めて特徴的であり、まず始めは周辺部に斑状、貝殻状、島状の萎縮巣が出現し進行するにつれてこれらは融合し地図状となり、あたかも脳表面を思わせるような像を呈する。1973年 Simell および Takki¹⁾により本症患者の血中にオルニチン

が増量していることが報告され、次いで Shih ら²⁾により ornithine aminotransferase (OAT) の欠損に基づくことが明らかにされた。

吾々は本症の病態生理を研究し^{3)~6)}、OKT が生理的に網膜色素上皮、毛様体、虹彩に高い活性を有すること、眼ではオルニチン→プロリンの一方交通的代謝経路が存在することから、本症の病変が眼組織におけるプロリン欠乏によるものであろうと推測した。この仮説に基づき吾々はプロリン補充療法を試みた。既に眼底に高度の変性像を来した例では効果が認められなかったが、偶々発見した幼若例 (4才) では 6年間のプロリン治療により病変

の進行が阻止されていると思われる成績が得られている。プロリン治療が有効か否かの判定はさらに長期観察が必要であるが、いずれにしる本症の治療は眼底の網脈絡膜萎縮が進行する以前に開始すべきであろうと思われる。

高オルニチン血症のマス・スクリーニング法として、Guthrieら⁷⁾のmicrobioassay法があるが、この方法ではシトルリン、アルギニン、オルニチンの総和として測定されるため、高オルニチン血症のスクリーニングには適当でない。

そこで本研究では藤村ら⁸⁾が開発した酵素法の改良法を用いて新生児マス・スクリーニングを試みた。

研究方法

測定原理：図1に示す如く、オルニチンはOATによりpyroline-5-carboxylateに転化し、P5CDによりグルタミン酸に転化する。P5CDの反応にはNADPが共転しており、NADPHの増加を蛍光光度計で測定する。藤村らの原法ではOATとP5C還元酵素を用いてNADHの減少を測定する方法であるが改良法はOATとP5C脱水素酵素(P5CD)を用いてNADPHの増加を測定する点が異なる。測定法：3mm ディスクの血液濾紙を試験管に入れ、血液固定化液(7%TCA溶液)10 μ lを濾紙に添加し十分に吸収させる。37°Cで約10分間放置後、酵素液100 μ l添加し混合、37°Cで20分間インキュベーション、蒸留水を2.8ml添加し蛍光強度を励起波長340nm、測定波長450nmで測定した。

試薬：(1) 蛍光強度調整液(蛍光強度調整液；22.5nM キニーネ硫酸溶液)、(2) 血液固定化液(7%TCA；2-メチル-2-プロパノ-

ル混液)、(3) 酵素試薬(オルニチン； α -ケトグルタル酸アミノ転移酵素、ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素、NADP⁺、 α -ケトグルタル酸)、(4) 酵素溶解液(0.2M PIPES緩衝液、pH 7.5)、(5) 標準液(40 μ M オルニチン)

成績並びに考察

図2はオルニチン標準液を使用した本法の検量曲線でありきれいな直線関係が得られ、図3はオルニチン標準液を濾紙にスポットし検討した結果、同様の直線関係が得られた。本法とアミノ酸分析計による測定値を比較した両者の相関係数は0.97であった。表1は高オルニチン血症症例(gyrate atrophy)から得られた血液濾紙を用いて本法とアミノ酸自動分析法の2つの方法でオルニチン濃度を測定した成績であり両者は近似の値を示した。

次いで新生児30,000例の血液濾紙を用いて本法による高オルニチン血症のスクリーニングを行なった。30,000例中5mg/dlを超えた例は42例、10mg/dlを超えた例は認められず、5~10mg/dlの値を示した42例は再検の結果いずれも一過性の高オルニチン血症であった。

文献

- (1) Simell, O. & Takki, K.: Raised plasma ornithine and gyrate atrophy of the choroid and retina. *Lancet* 1: 1030, 1973.
- (2) Shih, V. E., Berson, E. L., Mandell, R. & Schmidt, S. Y.: Ornithine ketoacid transaminase deficiency in gyrate atrophy of the choroid and retina.

- Am. J. Hum. Genet. 29:98, 1977.
- (3) Hayasaka, S., Shino, T., Takaku, Y. & Mizuno, K.: Ornithine ketoacid aminotransferase in the bovine eye. Invest. Ophthalmol. 19:1457, 1980.
- (4) Tada, K., Saito, T., Hayasaka, S. & Mizuno, K.: Hyperornithinemia with gyrate atrophy: Pathophysiology and treatment. J. Inherit. Metab. Dis. 6: 105, 1983.
- (5) Saito, T., Omura, K., Hayasaka, S., Nakajima, H., Mizuno, K. & Tada, K.: Hyperornithinemia with gyrate atrophy of the choroid and retina. A disturbance in De Novo formation of proline. Tohoku J. exp. Med., 135: 395, 1981.
- (6) 多田啓也: 高オルニチン血症, 新内科学大系, 年刊版 '84-C (国分達郎他編) P76, 中山書店(東京) 1984.
- (7) Talbot, H. W., Sumlin, A. B., Naylor, E. W. & Guthrie, R.: A neonatal screening test for araginin succinic acid lyase deficiency and other urea cycle disorders. Pediatrics. 70: 526, 1982.
- (8) Fujimura, Y., Matsuzawa, T., Kawamura, M., Tada, K. and Mizuno, K.: Mass screening of urea cycle diseases: A new mass screening of hyperornithinemia by using two coupling enzymes. Tohoku J. exp. Med., 141: 257, 1983.

Abstract

Studies on Mass-screening of hyperornithinemia by Fujimura et al's enzyme method.

Availability of Fujimura et al's method (enzyme method) of hyperornithinemia was investigated for neonatal mass-screening.

A good correlation ($r=0.97$) was obtained in blood ornithine values between Fujimura et al's method and amino acid analyzer.

Blood specimen on filter paper from cases of hyperornithinemia with gyrate atrophy were found to be between 9.91 and 16.84 mg/dl by the present method. These findings indicate availability of the present method to mass-screening of hyperornithinemia.

Then blood specimens on filter paper from 30,000 newborns were checked for ornithine by the present method.

42 cases were found to be higher than 5mg/dl. But these cases were all transitory hyperornithinemia.

*東北大学小児科 (Dept. of Pediatrics,
Tohoku Univ.)

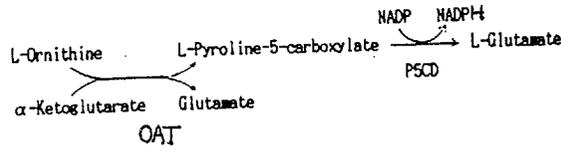


図1 スクリーニング法の原理

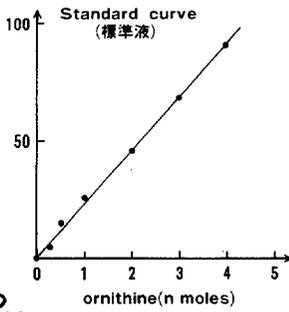


図2.

オルニチン標準液を使用

縦軸: Fluorecence intensity(22.5nM Quinine sulf=100)

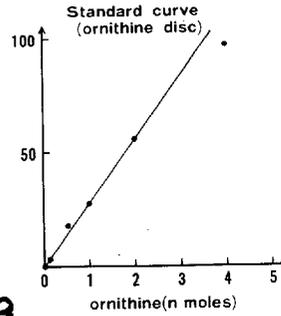


図3.

オルニチン標準液を濾紙にスポットしたものを使用

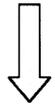
縦軸: 蛍光強度(22.5nM Quinine sulf=100)

表1. OAT欠損症々例の血中オルニチン値(mg/dl)

	Our method	Amino acid analyzer
Patient 1	9.92	8.60
2	16.84	12.95
3	9.51	7.15
4	13.65	13.25
5	13.20	11.60

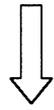
表2. 血液濾紙による血中オルニチンスクリーニング成績

検体数(血液濾紙)	30,000
5 mg/dl <	42
10 mg/dl <	0



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



要約 藤村らが開発した酵素法の改良法を用いて高オルニチン血症のマス・スクリーニングの検討を行なった。本法とアミノ酸自動分析計で測定した血中オルニチン値には良好な相関関係($r = 0.97$)が認められた。さらに gyrate atrophy を伴った高オルニチン血症症例から得られた血液濾紙によるオルニチン測定値は本法とアミノ酸分析計とで近似の値を示し、本法が高オルニチン血症のマス・スクリーニングに有用であることを示した。

30,000 例の新生児から得られた血液濾紙を用いて本法によるスクリーニングを行なった結果、5mg/dl 以上のオルニチン値を示した例が 42 例見出されたが、再検の結果いずれも一過性の高オルニチン血症であった。