

尿中オロト酸のマイクロアッセイ： オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 アロプリノール負荷試験への応用

山口 昭弘 三上 篤 福士 勝 清水 良夫
菊地由生子 高橋 徹男*1 日向 平明*1 荒島真一郎*2

要 旨

オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症の診断上重要な尿中オロト酸について、臭素化後、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (DABA) による発色を測定する試験管レベルの原法¹⁾を改良し、マイクロプレートリーダを用いる、簡便かつ多数検体処理が可能なマイクロアッセイを開発した。また、実際に、4例の OTC 欠損症患児へのアロプリノール負荷試験への応用を行った結果、新生児期より治療管理されていた1例を除き、著名なオロト酸の排泄増加が認められ、有用な診断法であることが確認された。

1. 緒 言

OTC は尿素合成により、アンモニアを解毒する働きを持つ尿素サイクル内の重要な酵素である。この酵素の先天的な障害による OTC 欠損症は、嘔吐、昏眠、痙攣などの症状を呈する予後不良の重篤な疾患であり、X染色体遺伝形式をとることから、一般に男児では症状が重く、また、新生児期発症型と乳児期以降発症型の2つの型が知られている。生化学的な異常としては、高アンモニア血症をはじめ血中グルタミンの増加、シトルリンの低下が認められ、尿中にはオロト酸、ウラシルなどピリミジン代謝物の排泄増加を伴う。しかし、本症は、障害部位、程度にかなりの多様性が認められることから、前述の臨床症状、生化学検査ならびに肝酵素活性の測定などにより総合的に診断を行う必要がある²⁾。この内、タンパク負荷による尿中オロト酸の排泄増加を測定する方法は、簡便であり信頼性も高いことから汎用されているが、患児の場合、タンパク負荷により、高アンモニア血症、全体状態の悪化をきたす場合が多く、慎重を要する難点があった。これに対し、最近、Elizabeth³⁾らは、アロプリノール負荷により、*in vivo* で生成するオキシプリノールリボヌクレオチドのオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ活性の阻害作用が、オロチジン 5'-リン酸 (OMP)、オロチジンおよびオロト酸の排泄増大を誘起することを見だし、これら代謝物の測定がヘテロ保因者の診

断に有用であることを報告している。

一方、尿中オロト酸の測定は、臭素化-DABA 反応による比色法¹⁾が、最も広く用いられているが、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法も近年報告されてきている⁴⁾。実際、Elizabeth³⁾のアロプリノール負荷試験においては、オロチジンおよびオロト酸を HPLC において測定し、それぞれにつき、診断上の有用性を検討している。今回、我々は、従来用いられてきた尿中オロト酸の比色定量法¹⁾の改良により、簡便、迅速なマイクロアッセイを開発し、OTC 欠損症患児へのアロプリノール負荷試験への応用を試みた。また、比色法の OMP に対する反応性など、HPLC 法との比較検討も行った。

2. 方 法

2-1 試 薬

オロト酸、OMP はシグマ社 (U. S. A.) 製を用い、それぞれ脱イオン水に溶かし 1mM の標準原液を調整し、32-320 μ M (オロト酸 5-50 μ g/ml 相当) 検量線用標準液を希釈調整した。オロト酸溶液は 4 $^{\circ}$ C、OMP は -30 $^{\circ}$ C で保存した。

0.2M クエン酸緩衝溶液 (pH2.5)・0.2M クエン酸溶液と 0.2M クエン酸カリウム溶液を混合し、pH2.5 に調整した。

飽和臭素水・脱イオン水に臭素を加え混合後、密封

*1 北海道大学医学部小児科学教室 *2 北海道教育大学札幌分校

保存した上層の水層を使用した。

5%アスコルビン酸溶液：アスコルビン酸 0.5g を脱イオン水に溶かし 10ml とし、用時調整とした。

5% DABA-プロパノール溶液：DABA 5g を 1-プロパノールに溶かし 10ml とし、用時調整とした。

2-2 装置

マイクロプレートリーダー：モレキュラデバイス (U.S.A.) 製, Emax を用い 490nm の吸光度を 650nm で対照に測定した。

マルチチャンネルマイクロピペット：ラボシステム社 (Finland) 製, Titertek デジタル 8 チャンネル (5-50 μ l, 50-200 μ l) を用いた。

2-3 対象

北海道大学医学部附属病院にて、治療管理中の OTC 欠損患児 4 例 (2 例は同胞例) および母親 1 例のアロプリノール負荷試験尿を用いた。

2-4 操作

尿 40 μ l を 96 穴平底マイクロプレートに取り、0.2 N HCl 10 μ l、0.2M クエン酸緩衝溶液 80 μ l および飽和臭素水 20 μ l を順次加え、シール後、ドラフト内で 1 分間放置する。5%アスコルビン酸溶液 40 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートし、過剰の臭素を分解する。5% DABA-プロパノール溶液 80 μ l を加え、4-5 回のポンピング操作を行い、完全に溶液を混合後、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応を行う。マイクロプレートリーダーを用い 490-650nm で吸光度を測定する (Abs N)。検体ブランクとして、飽和臭素水を脱イオン水で置換する

以外、上記と同じ操作を別のマイクロプレートを用いて個々の尿試料につき行う (Abs B)。標準溶液も含め、各試料につき Δ Abs = Abs N - Abs B を計算し、検量線作成、尿試料濃度の算出を行う。

3. 結果

3-1 検量線

オロット酸、OMP とともに、32-320 μ M の濃度範囲で良好な直線性を示し、原点を通る比例関係が得られた (Fig. 1)。また、オロット酸の 5'-リボースリン酸化体である OMP の反応性は、検量線の傾きからオロット酸の 84% であった。

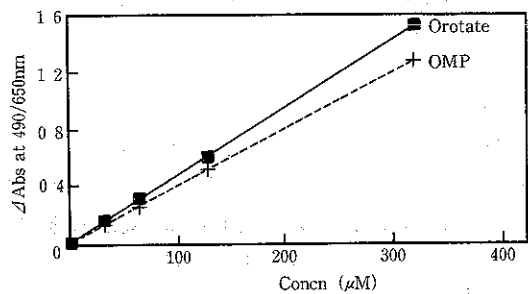


Fig. 1 Calibration curves for Orotate (■) and OMP (+)

Regression lines and correlation coefficients are as follows;

$$\text{Orotate: } Y = 4.75X + 0.005, r = 0.999$$

$$\text{OMP: } Y = 4.00X + 0.007, r = 0.999$$

Table 1 Reproducibility in the measurement of orotate in urine

Run	Urine-114			Urine-115		
	Δ Abs.	Orotate*	Orotate**	Δ Abs.	Orotate*	Orotate**
1	0.125	26.5	3.85	0.133	28.3	3.85
2	0.130	27.6	4.02	0.134	28.5	3.88
3	0.115	24.2	3.52	0.125	26.5	3.60
4	0.118	24.9	3.62	0.124	26.3	3.58
5	0.123	26.0	3.78	0.137	29.2	3.96
6	0.124	26.3	3.81	0.130	27.6	3.78
7	0.126	26.7	3.88	0.117	24.7	3.36
8	0.128	27.2	3.95	0.143	30.5	4.15
Mean \pm SD : 3.80 \pm 0.16			Mean \pm SD : 3.77 \pm 0.25			
CV (%) : 4.34			CV (%) : 6.59			

* μ M

** μ mol/mmol-creatinine

Table 2 Recovery of orotate from urine samples

Orotate added (μM)	ΔAbs	Orotate found (μM)	Recovery (%)
0	0.107	21.5	—
32	0.246	50.8	91.6
64	0.387	80.8	92.6

3-2 再現性および回収率

正常小児尿のオロト酸測定における、同時再現性を求めたところ、変動係数 4.34, 6.59% (n=8) と良好な結果が得られた。(Table 1)。また、添加回収試験においてもオロト酸 32, 64 μM 添加の回収率はそれぞれ、91.6, 92.6%と良好であった (Table 2)。

3-3 尿希釈試験

アロプリノール負荷により、オロト酸およびその関連代謝物 (オロチジン, OMP) の排泄が増大した OTC 欠損症患児 2 例の尿につき、脱イオン水で希釈系列を作成し、測定を行った。いずれの尿も、オロト酸 400 μM 以下の濃度で良好な直線性を示した (Fig. 2)。

3-4 アロプリノール負荷試験

OTC 欠損症患児 4 例, 患児の母親 1 例およびコントロールとしてアロプリノール投与を受けている高尿酸血症の患児 1 例につき、アロプリノール 300mg の負荷を行い、負荷 16 時間後の尿を採取した。また、症例 H

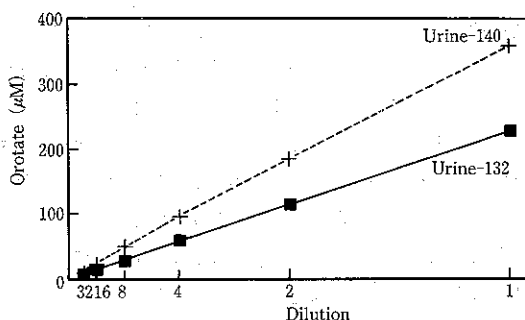


Fig.2 Dilution test for urine samples

Urine samples highly excreted orotate and related metabolites by allopurinol loading were diluted in series with deionized water

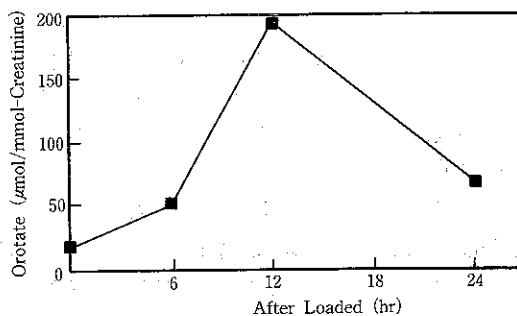


Fig. 3 Allopurinol loading test for the patient (H M) with OTC deficiency

Urine samples were collected during the time indicated after oral loading of allopurinol (300mg)

Table 3 Orotate excretion in urine from the patients with OTC deficiency

Patient	Age	Status	Orotate $\mu\text{mol}/\text{mmol-creatinine}$
OTC deficiency			
H. M	6Y	Rest	2.54
		Acute	75.9
		Allopurinol loaded(16hr)	195
Mother of H. M		Ordinary	1.48
		Allopurinol loaded(16hr)	6.34
Y. M*	7Y	Allopurinol loaded(16hr)	202
R. W*	1Y	Allopurinol loaded(16hr)	3.91
N. M	12Y	Allopurinol loaded(16hr)	222
Control Infant			
T. K	1Y	Allopurinol loaded(16hr)	21.4
(n=16)	1-12Y	Ordinary	Mean \pm SD : 3.94 \pm 0.67 Range : 2.74-5.09

* sibling case

Mについては、アロプリノール負荷後24時間の間の尿を逐次採取し、オロト酸の経時変化を追跡した (Fig. 3)。OTC欠損症患児4例の内、新生児期より治療、管理されていた症例R. Wを除き、他3例は195から222 μ Mと正常レベルの50倍のオロト酸著増を示した (Table 3)。一方、症例H. Mの母親は正常上限程度および高尿酸血症のT. Kは正常レベルの5倍程度の増大であった。また、症例H. Mの寛解期、母親の負荷前および症例Y. Wの同胞例R. Wの負荷後のオロト酸は、いずれも正常範囲内の値であった。

4. 考 察

OTC欠損症は、我国の全国調査結果⁵⁾からも先天性代謝異常症の中では、かなり発生頻度の高い疾患であることが示唆されており、新生児期発症型の多くは、生後早期に死亡する割合が高く、また、成人期に発症する例も存在することを考慮すると、実際には数万から10万人に1人程度の発生頻度と考えられる。本症の治療に関しては、安息香酸ナトリウムやカルニチン投与など効果的な治療法が開発されつつあり、患児の早期発見、早期診断の重要性が高まってきている。一次的には、高アンモニア血症を契機に発見される場合がほとんどであるが、二次検査として、肝酵素活性測定、タンパク負荷試験を行う必要がある。

しかし、酵素活性の測定は、肝生検を要し、また、*in vitro*での活性が必ずしも、酵素障害の程度を反映するものではなく、一方、タンパク負荷による尿中オロト酸排泄を測定する方法では、患児の状態悪化を招くなどの問題点が残されていた。これに対し、Elizabeth³⁾らによって開発された、アロプリノール負荷後のオロチジン、オロト酸測定による診断法は、侵襲性のない簡便な方法であり、その有用性が期待されている。

我々は、Elizabeth³⁾らのHPLCによるオロチジン、オロト酸測定に対し、従来、一般的に用いられてきた臭素化-DABA反応によるオロト酸の比色定量法を、マイクロアッセイに改良し、その適用を試みた訳であるが、マイクロプレートを用いることにより、試薬分注、測定などの操作性が、はるかに改善され、その信頼性においても再現性、回収率、尿希釈試験の結果 (Table 1, Table 2, Fig. 2)は満足できるものであった。ただ、最終段階でDABAの1-プロパノール

溶液を加えた際に、マイクロプレートミキサーによる攪拌だけでは、水溶液と1-プロパノールの混合が不十分であり、反応が60%程度しか進行しないことから、ピペットによる4-5回のポンピングを必要とする点に注意する必要がある。また、アロプリノール負荷後、患児ではオロト酸の著増を示し、尿中濃度が400 μ M以上の場合も存在するが、このレベルでは検量線の直線関係が得られないため、希釈後測定する必要がある。

臭素化-DABA反応による比色法では、オロト酸以外に、そのリボース化体のオロチジンおよび5'-リボースリン酸化体のOMPも同様に発色することが知られている^{6,7)}。実際、OMPの本報の測定条件における反応性は84%であり (Fig. 1)、オロチジンについては、今回実験は行っていないが、5'-リン酸基の有無のの違いであり、同程度の反応性が予想される。Elizabeth³⁾らのらのOTC欠損症ヘテロ保因者へのアロプリノール負荷試験の結果からは、オロチジン、オロト酸いずれも正常コントロールに対して、10から20倍の排泄増大を認めており、ともに診断上の有用性が示されている。従って、実際応用として用いる場合、比色法により、オロト酸、オロチジンおよびOMPの合計量を測定しても問題はなく、むしろ、今回、開発したマイクロアッセイでは簡便性、検体処理能力などの点でHPLCよりも実用的な方法であると考えられる。

OTC欠損症患児へのアロプリノール負荷試験の結果、4例の患児の内3例で著名なオロト酸排泄増大が認められたのに対して、1例 (症例R. W)は正常範囲内の値であった点に関しては、この症例は症例Y. Wの弟であるが、同胞例においても障害の程度がことなる場合もあり (遺伝素因)、また、新生時期より治療管理がなされていたこと (環境要素)も影響している可能性がある。しかし、単に、負荷、採尿時の条件が影響した可能性も否定できないことから、再度、負荷試験を行い、確認する必要がある。また、症例H. Mの母親も、負荷試験において陰性の結果であり、家族歴、臨床的にも問題はないことから、ヘテロ保因者の可能性は低く、症例H. Mの単発変異が考えられる。

5. 結 語

OTC欠損症は、遺伝的にも表現形においても、かな

りの多様性がみられ、単一の検査で診断できる疾患ではないが、今回、検討したアロプリノール負荷-マイクログロアッセイによる尿中オロト酸測定は、その簡便性から、高アンモニア血症の既往歴を有するハイリスク児に対するスクリーニング法として非常に有用であることが確認された。

6. 文 献

- 1) Adachi, T., et al: J. Vitaminol, 9, 217-226, 1963.
- 2) Finkelstein J E., et al: J. Pediatr., 17, 897-902, 1990.
- 3) Elizabeth R., et al: N. Engl. J. Med., 322, 1641-1645, 1990.
- 4) Brusilow S. W.: Techniques and Diagnostic Human Biochemical genetics (in press), Alan R. Liss, New York.
- 5) 永田憲行, 他: 昭和 63 年度厚生省心身障害研究「マスクリーニングに関する研究報告」, 214-215, 1989.
- 6) Kesner L., et al: Clin. Chem., 21, 353-355, 1975.
- 7) Harris M. L., and Oberholzer V. G.: Clin. Chem., 26, 473-479, 1980.

Microassay for Orotic Acid in Urine: Its Application to Allopurinol Loading Test for Ornithine Transcarbamylase deficiency

Akiniro Yamaguchi, Atushi Mikami, Masaru Fukushi,
Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi, Tetsuo Takahashi*¹,
Heimei Hyuga*¹ and Shin-ichiro Arashima*²

ABSTRACT

A simple and reliable microassay for orotic acid in urine was developed by a modification of the original colorimetric method¹⁾ which was based on the bromination followed by the reaction with p-dimethylaminobenzaldehyde. The use of a microplate with its reader permitted the practical and convenient measurement for a number of samples, in addition to the efficient results of reproducibility, recovery and dilution tests. The microassay was applied to the allopurinol loading test for 4 patients with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. Massive orotate excretions in the urine samples from the 3 patients were observed except for the patient who has been under medical care from the birth.

*¹ Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine *² Hokkaido University School of Education