

小児期における血清オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ活性に関する研究

第1編 健康小児の血清オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ活性値について

金沢大学医学部小児科学教室 (主任 佐川一郎教授)

正 木 明 夫

(昭和40年9月3日受付)

哺乳動物の蛋白代謝終末産物である尿素生成は Krebs, Henseleit のオルニチン回路¹²⁾で行なわれ、その中間物質であるチトルリンの生成に関して Cohen ら⁴⁾, Jones ら⁸⁾, Marshall ら¹⁷⁾により詳細な検討が加えられた。チトルリンは次の反応により形成される。

Carbamyl phosphate + Ornithine →

Citrulline + Phosphate (反応1)

この反応を触媒する酵素は Reichard²⁸⁾によりラット肝から精製され Ornithine carbamyl transferase (以下 OCT と略す) と名づけられた。一方 Krebs ら¹⁸⁾はチトルリンが哺乳動物の肝において硫酸ソーダの存在の下にオルニチン、炭酸ガス、アンモニアに分解されることを見出した。

Arsenate

Citrulline $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ CO₂ + NH₃ + Ornithine
(反応2)

この加硫酸分解反応に関与する酵素は Reichard²⁸⁾によりラット肝から精製した OCT と同一物質であることが確認された。

一方 1954年 Wróblewski ら¹⁶⁾が心筋梗塞における血清トランスアミナーゼ活性の変動を報告して以来各種酵素活性の臨床的意義が検討されてきた。血清中酵素活性の変動から体内臓器の障害を評価しようとする場合、酵素の臓器特異性は極めて重要な問題であろう。この点 OCT の肝特異性は極めて高く²⁸⁾、また血清 OCT 活性の変動が肝障害に特異的であると報告²⁴⁾²⁹⁾は興味深い。

著者は各種小児疾患における血清 OCT 活性の変動を研究するに当たり、まず各年齢層の健康小児の血清

OCT 活性値を測定し年齢差について検討を加えた。また未熟児および臍帯血についても測定したので併せて報告する。

実 験 対 象

対象とした健康小児は金沢大小児科外来に健康診断で訪れ異常を認めなかつたもの、未熟児は福井赤十字病院未熟児室に入院した健康未熟児、臍帯血は金沢大産婦人科にて出生した児の臍帯血を選んだ。採血は食事時間と一定の関係なく行ない、採血後3時間以内に血清を分離し、採血当日に測定できなかつたものは密栓して deep freezer 中に -20°C で凍結保存し7日以内に測定した。溶血を認めた材料は対象より除外した。

測 定 方 法

Reichard 法²⁰⁾に準じアンモニアの定量はインドフェノール法⁵⁾によつた。

(試 薬)

- 1) チトルリン・硫酸ソーダ緩衝液: 0.2M の dl-チトルリンと 0.5M の硫酸ソーダ溶液を塩酸にて pH 7.1 に調整
- 2) 4N 過塩素酸
- 3) 硫酸ソーダ緩衝液: 0.5M の硫酸ソーダ溶液を塩酸にて pH 7.1 に調整
- 4) 0.01N 硫酸
- 5) 硼酸緩衝液; 12.3g の硼酸と 4N カセイカリ 80ml を混和し水を加えて全量 500ml とする。
- 6) アルカリ性フェノール溶液: 特級フェノール25

Activity of Ornithine Carbamyl Transferase in Sera of Children. I. Activity of Ornithine Carbamyl Transferase in Sera of Healthy Children. Akio Masaki, Department of Pediatrics, (Director: Prof. I. Sagawa), School of Medicine, Kanazawa University.

g に 5N カセイソーダ 54ml を冷却しかきまぜつつ徐々に添加したのち水で 100 ml に希釈する。褐色ビンに保存

7) 次亜塩素酸ナトリウム溶液: 次亜塩素酸ナトリウム溶液の有効塩素濃度が 1.3~1.4g/100ml になるように適当に希釈し密栓して氷室に保存

8) Mn^{2+} 溶液: 0.003M の $MnSO_4$ 溶液を調整

9) アンモニア標準液: 第一化学の硫酸アンモニウム標準液を使用

(手 技)

1) 被検血清 1 ml をチトルリン・砒酸ソーダ緩衝液 1 ml とともに遠心沈澱管に入れて混合し 37°C の恒温槽で24時間静置する。別に盲検として血清 1 ml と砒酸ソーダ緩衝液 1 ml を遠心沈澱管に入れ同じく 37°C の恒温槽で24時間静置する。ついで 0.2 ml の過塩素酸を両方の遠心沈澱管に加えじゅうぶん混合して遠心沈澱する。

2) おのおの上澄液 1 ml をあらかじめ中央室に 0.01N 硫酸を入れた Conway の微量拡散器の側室に入れる。硼酸緩衝液 3 ml を側室に入れて蓋をし側室の液をよく混和してから両方の Conway 微量拡散器を 37°C, 2 ½時間静置する。

3) ついで中央室の液 0.5 ml をとり出し共センの目盛付試験管に入れる。両方の試験管を氷水を入れた水浴に立てそれぞれに 0.003M $MnSO_4$ 溶液 0.05ml, アルカリ性フェノール溶液 1 ml, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 0.5 ml をこの順序で静かに加える。全部加え終つてから直ちにセンをして静かに試験管中の液をまぜ直ちに沸騰湯浴中に 5 分間つける。5 分後すぐに氷水中で 2 分間冷却してから蒸留水を加えて全量 8ml に希釈し室温に 20 分間放置後波長 625m μ で吸光度を測定する。別にアンモニア標準液より 1 ml あたりアンモニア窒素 2.5, 5, 10, 20 μ g を含む溶液を調整してその 1 ml を Conway 微量拡散器の側室に入れ 2) 以下の手技と同じ方法で蒸留水を対照として検量曲線を作製する。なお検量曲線は被検血清測定の度ごとに作製し, 比色計としては日立 EPU 2 型分光光度計を使用した。なお試薬の調整, 器具の洗滌など

に使用した蒸留水はすべてアンモニア不含有水³⁸⁾を用いた。

(活性のあらわし方)

検量曲線よりアンモニアの濃度を読みとり被検血清と盲検の差を計算し, 酵素活性は 37°C, 24時間 で血清 0.5 ml あたりに生成するアンモニアの μ M で表わした。

実験成績

健康小児 1~12カ月群14例, 2~5歳群10例, 6~10歳群10例, 11~15歳群10例と臍帯血 8例ならびに健康未熟児13例の血清 OCT 活性値は図 1 の如くであった。各群の血清 OCT 活性値の範囲, 平均値およびその信頼度95%の信頼限界, 危険率 5%の棄却限界上界は表 1 の如くであった。臍帯血, 健康未熟児, 健康小児各年齢群間の平均値の差について推計学的に検定した結果 5%の危険率で有意とはいえず年齢差は認められない。1カ月~15歳までの健康小児44例について 5%の棄却限界上界を求めると 0.27 μ MNH₃/0.5ml となる。したがって著者は 0.28 μ MNH₃/0.5ml 以上をもつて異常値とした。

考 察

血清 OCT 活性の測定法には大別して Brown 法と Reichard 法がある。Brown 法¹⁾は OCT の酵素作用によりオルニチンとカルバミル磷酸から生成されたチ

図 1 臍帯血, 未熟児および健康小児各年齢群の血清 OCT 活性値

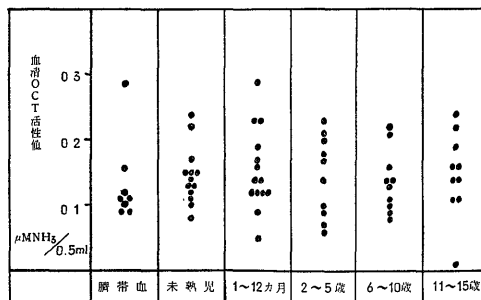


表 1 臍帯血, 未熟児および健康小児各年齢群の血清 OCT 活性値

	臍帯血	未熟児	1~12カ月	2~5歳	6~10歳	11~15歳
例数	8	13	14	10	10	10
範囲	0.09~0.29	0.08~0.24	0.05~0.29	0.06~0.23	0.08~0.22	0.01~0.24
平均値	0.13	0.15	0.16	0.15	0.14	0.15
信頼限界	0.13±0.045	0.15±0.026	0.16±0.036	0.15±0.043	0.14±0.034	0.15±0.045
棄却限界上界	0.27	0.25	0.30	0.29	0.25	0.30

トルリン (反応1) を比色定量する方法である。Reichard 法²¹⁾ はチトルリンの加砒酸分解反応を応用して生成された炭酸ガスまたはアンモニア (反応2) のいずれかを定量するものでありそのうち標識チトルリンを基質とする測定法²¹⁾²⁷⁾ は 1-Citrulline carbamyl-C¹⁴ を用いて生成される C¹⁴O₂ を測定する方法である。他の1つはアンモニア微量拡散法²¹⁾²⁰⁾ であり dl-Citrulline を基質として生成されたアンモニアを、Conway の微量拡散法とネスラー法の組み合わせで測定している。Reichard によればこれら2つの方法で同一血清を測定した場合にははなはだ良好な相関関係がみられるとし²¹⁾, $y=27.2x+0.57$ なる回帰方程式が求められている²⁵⁾。著者の用いた方法は Reichard のアンモニア微量拡散法の変法である。原法では Conway の方法で拡散吸収させたアンモニアの酸性溶液をネスラー法により発色してアンモニアを定量しているが、ネスラー法で再現性ある正確な値を得るためには発色時の温度、発色時間、試薬の調整などで守るべき条件ははなはだ厳密であり⁵⁾、著者も実際行なってみたが、夏季では発色に際して瞬時に混濁を生ずるなど実地上使用し得なかつた。この点インドフェノール法⁹⁾ は正確さ、感度もすぐれており守るべき条件はネスラー法ほどきびしくないのでアンモニアの定量にはインドフェノール法を使用した。

OCT は血清中で非常に安定であり、+4°C では少なくとも1週間は安定、-15°C ではやく1年間酵素活性値に変動が認められない。また全血は室温で1日保存しても活性値に低下がない。凍結、融解を繰り返しても活性値に変化を及ぼさず、ヘパリン、クエン酸ソーダ、蔞酸ソーダ添加、軽度の溶血でも活性値に影響しない。至適 pH は 7.15, 至適温度は +45°C であり耐熱安定性であるなどの事実が知られている²¹⁾。

小児期の血清酵素活性については多く報告されておりアルカリ性フォスファターゼ¹⁹⁾、乳酸脱水素酵素³¹⁾、トランスアミナーゼ³⁰⁾、イソクエン酸脱水素酵素³⁹⁾¹⁴⁾などは乳児期または小児期で成人よりも高く、トランスアミナーゼ⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾³³⁾³⁴⁾⁶⁾、乳酸脱水素酵素³¹⁾³³⁾、アルドラーゼ³³⁾³⁴⁾、ロイシンアミノペプチダーゼ¹⁵⁾は未熟児を含めて新生児期では他の小児期よりも高いとされ、グルコース 6 フォスファターゼは小児と成人では差がない²²⁾などの報告がある。このようにいくつかの血清酵素活性の年齢的な差が知られているので血清 OCT 活性値の年齢差を検討することは意義あることと思われる。血清 OCT 活性値は成人についてかなり報告されているが、小児の年齢別の記載はみられない。健康成人の血清 OCT 活性値について、Brown

法によるものでは Brown ら¹⁾ は正常範囲 0.12-0.30 μM チトルリン/ml, 平均値 0.22 μM チトルリン/ml とし、菅野²⁹⁾ らは正常範囲 0.11-0.22 μM チトルリン/ml, 早野⁷⁾ らは正常範囲 0.14-0.27 μM チトルリン/ml であるといい、Reichard の 1-Citrulline carbamyl-C¹⁴ 法では²⁶⁾ 0.060 μM C¹⁴ O₂/0.5ml 以下を正常とし 0.100 μM C¹⁴ O₂/0.5ml 以上を明らかに異常であるとしている。Reichard のアンモニア微量拡散法およびその変法による成績では Reichard ら²¹⁾ は 0.28 μM NH₃/0.5ml 以上を病的であるとし、辻³⁵⁾ は平均値 0.054 \pm 0.024 μM NH₃/0.5 ml で正常上限を 0.102 μM NH₃/0.5ml, Chauschu ら²⁾ は正常範囲 1-4 μg N-NH₃/0.5ml, Vaništa ら³⁶⁾ は 0.26 μM NH₃/0.5ml までを正常範囲とし、Weber³⁷⁾ は正常範囲 0.12-0.64国際単位, 平均値 0.38 国際単位であるとしている。著者は健康小児を 1-12カ月, 2-5歳, 6-10歳, 11-15歳の4群に分けて年齢の差異について検討した結果各群の平均値の差は有意とはいえなかつた。1カ月-15歳までの健康小児44例の平均値は 0.15 μM NH₃/0.5 ml, 棄却限界上界は 0.27 μM NH₃/0.5ml となり、Chauschu ら, Reichard, Vaništa らの成人の値とほぼ一致する成績を得た。Masopust ら¹⁸⁾ も健康小児の活性値に年齢差を証明しなかつたと述べている。また未熟児ならびに臍帯血についても健康小児の値と有意差はなかつた。

血清酵素活性の変動を検討するに際し体内での分布が問題になるが、OCT の臓器内分布に関して Krebs ら¹³⁾ はチトルリンの Arsenolysis に関与する酵素はラット、モルモット、羊、ひきがえるの肝に存在し、ラットの脳、腎、睾丸、肺、脾、心筋、横紋筋、羊の脾、小腸、鳩の肝には存在しないと述べ Reichard²²⁾ は犬において組織 g あたり肝 2,900, 十二指腸36, 回腸43, 盲腸2.6 μM C¹⁴ O₂ で胃、胆汁、血清にわずかに証明されその他の臓器には存在しないとし、人間の臓器内分布は²³⁾ 肝 2,500, 小腸 347, 大腸 5.76, 胃 4.7, 肺1.52 μM C¹⁴ O₂ でその他の臓器にははなはだ少ないことを報告している。辻³⁵⁾ も家兎につき肝の OCT 活性値を100とすると小腸5, 脾3, 脳, 肺, 腎2, 心, 脾, 骨格筋1の割合であつたと述べている。人間の 小腸 OCT は肝のそれのやく 1/10 を示すが Reichard²³⁾ によれば広範な障害または壊死を起すような小腸の疾患ははなはだまれであり、血中からの酵素消失障害を仮定しない限り血清 OCT 活性の上昇をきたすのは肝障害のみであると示唆している。一般に血液凝固因子を別として血清中にみられる種々の酵素が血清中で積極的に代謝機能を営むものではなく本来

細胞内で代謝にたずさわるものであり、血清酵素活性値は細胞の酵素蛋白合成能、細胞からの遊出などの程度、血中での安定性、さらに賦活因子、阻害因子、破壊、排泄などの因子により左右されると考えられており⁸⁾ 現在のところ全く解明されていない。しかしながら各種疾患に際して血清酵素活性値を測定し臨床的に利用することは有意義であり、また小児科領域へ応用するにあたり小児期の正常範囲および年齢差を検討することは必要であると思われる。

ま と め

Reichard のアンモニア微量拡散法の変法により 1～12カ月14例, 2～5歳10例, 6～10歳10例, 11～15歳10例合計44例の健康小児ならびに臍帯血8例, 健康未熟児13例について血清 OCT 活性値を測定しつぎの結果を得た。

1. 健康小児の血清 OCT 活性値の平均値は 1～12カ月 $0.16\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$, 2～5歳 $0.15\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$, 6～10歳 $0.14\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$, 11～15歳 $0.15\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$ であり各年齢群の平均値に有意の差は認められなかつた。

危険率 5% の棄却限界上界をもつて正常上界とする小児では $0.27\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$ までが正常とみなされた。

2. 血清 OCT 活性値の平均値は臍帯血 $0.13\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$, 未熟児 $0.15\mu\text{M NH}_3/0.5\text{ml}$ で健康小児各年齢群の平均値との間に有意の差を認めなかつた。

文 献

- 1) Brown, R. W. & Grisolia, S. : J. Lab. Clin. Med., 54, 617 (1959).
- 2) Chauschu, E., Toridzhesku, V., Kalota, M., Pyrvu, D., Paraskiv, D. & Antoniadu, M. : Fed. Proc. (Trans Suppl.), 23, 865 (1964).
- 3) 藤沢 洌, 坪井栄一 : 臨床酵素学 (赤堀・沖中監修), 第1版, 514頁, 東京, 朝倉書店, (1964).
- 4) Grisolia, S. & Cohen, P. P. : J. Biol. Chem., 198, 561 (1952).
- 5) 波田野博行, 桐田智子 : 生化学領域に於ける光電比色法 各論2, 化学の領域, 増刊34, 46頁, 東京, 南江堂, (1958).
- 6) 菱川音三郎 : 日児誌, 68, 626 (1964).

- 7) 早野 薫夫, 遠渡 正夫, 和田 英一, 神本 敏治, 今尾 恒裕, 伊藤 達次, 三浦 佳久 : 肝臓, 6, 48 (1964).
- 8) Jones, M. E., Spector, L. & Lipmann, F. J. : J. Amer. Chem. Soc., 77, 819 (1955).
- 9) Kove, S., Goldstein, S. & Wróblewski, F. : Pediatrics, 20, 584 (1957).
- 10) Kove, S. & Wróblewski, F. : Amer. J. Dis. Child., 94, 550 (1957).
- 11) Kove, S. & Wróblewski, F. : Amer. J. Med. Sci., 240, 353 (1960).
- 12) Krebs, H. A. & Henseleit, K. : Ztschr. Physiol. Chem., 210, 33 (1932).
- 13) Krebs, H. A., Eggelston, L. V. & Knivett, V. A. : Biochem. J., 59, 185 (1955).
- 14) 小宮和彦 : 日児誌, 67, 288 (1963).
- 15) 小泉英雄 : 日児誌, 69, 605 (1965).
- 16) La Due, J. S., Wróblewski, F. & Karmen, A. : Science, 120, 497 (1954).
- 17) Marshall, R. O., Hall, L. M. & Cohen, P. P. : Biochim. Biophys. Acta, 17, 279 (1955).
- 18) Masopust, J., Tomašová, H., Brachfeldová, J. & Staninec, M. : Acta univ. Carol. (Praha) Med., 7, 263 (1961). Zbl. Kinderh., 85, 112 (1962) より引用.
- 19) 織田 敏次, 小出 輝 : 最新医学, 13, 205 (1958).
- 20) Reichard, H. : Scand. J. Clin. & Lab. Invest., 9, 103 (1957).
- 21) Reichard, H. & Reichard, P. : J. Lab. Clin. Med., 52, 709 (1958).
- 22) Reichard, H. : J. Lab. Clin. Med., 53, 417 (1959).
- 23) Reichard, H. : J. Lab. Clin. Med., 56, 218 (1960).
- 24) Reichard, H. : J. Lab. Clin. Med., 57, 78 (1961).
- 25) Reichard, H. : Enzymol. biol. Clin., 1, 47 (1961).
- 26) Reichard, H. : Acta Med Scand., 172, 723 (1962).
- 27) Reichard, H. : J. Lab. Clin. Med., 63, 1061 (1964).
- 28) Reichard, P. : Acta chem. Scand., 11, 523 (1957).
- 29) 菅野二郎, 近藤 修, 三浦重隆 : 日消誌, 58, 548 (1961).
- 30) 島 信幸 : 日児誌, 63, 1636 (1959).
- 31) 鈴木昌樹 : 日児誌, 66, 182 (1962).
- 32) 白木和夫 : 日児誌, 67, 261 (1963).
- 33) Stave, U. : Z. Kinderheilk., 81, 472 (1958).
- 34) Stave, U. : Z. Kinderheilk., 81, 675 (1958).
- 35) 辻 功 : 日消誌, 58, 1323 (1961).
- 36) Vaništa, J., Beranová, Z. & Shametti, H. : Zschr. inn. Med., 19,

- 137 (1964). 37) Weber, H. : Klin. 医書出版社, (1955). 39) 吉岡 邦 : 日児誌
 Wschr., 41, 37 (1963). 38) 吉川春寿 : 臨 68, 812 (1964).
 床医化学 I (実験篇), 第 4 版, 210 頁, 東京, 協同

Abstract

The activity of ornithine carbamyl transferase in sera (S-OCT) of infants and children was measured by using the modified method of Reichard's microdiffusion technique for the purpose of determining the normal value in sera. The subjects consisted of 44 healthy children (14 cases 1 to 12 months of age, 10, 2 to 5 years old, 10, 6 to 10 years old and 10, 11 to 15 years old) and 13 premature infants and 8 cord blood specimens of full-term infants.

1) The mean value of the activity of S-OCT in healthy children was as follows; 0.16 $\mu\text{M NH}_3/0.5 \text{ ml.}$ in the group of one to 12 months of age, 0.15 in 2 to 5 years old group, 0.14 in 6 to 10 years old group, and 0.15 in 11 to 15 years old group. Statistically significant differences were not observed between these mean values. The upper limit of rejection at five percentage risk was 0.27 $\mu\text{M NH}_3/0.5 \text{ ml.}$ which was considered to be the upper limit of normal value in children.

2) The mean value of the activity of S-OCT was 0.13 $\mu\text{M NH}_3/0.5 \text{ ml.}$ in the group of cord blood and 0.15 in the group of premature infants. The difference between the mean values of these two groups and the healthy children group was not recognized to have any statistical significance.