

Amino Acid and Enzyme Assay in Ornithine Transcarbamylase Deficiency

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 소아과학교실
심정연·홍수종·김기수·문형남·홍창의

=Abstract=

Amino Acid and Enzyme Assay in Ornithine Transcarbamylase Deficiency

Jung Yeon Shim, Soo Jong Hong, Ki Soo Kim,
Hyung Nam Moon, and Chang Yee Hong

Department of Pediatrics, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center

Ornithine transcarbamylase(OTC) deficiency is the most common genetic enzyme deficiency in the urea cycle enzymopathy and is inherited as a sex-linked dominant mode. All of the urea cycle enzymopathies may result in the accumulation of ammonia in serum. This produces clinical symptoms such as episodes of vomiting, lethargy, seizure and coma. If hyperammonemia is not controlled, patient will die ultimately. We experienced a case of hyperammonemic coma in 3 day old male infant. He was confirmed to have OTC deficiency by the enzyme assay of liver tissue.

Key Words: Ornithine transcarbamylase deficiency, Enzyme assay

I. 서론

암모니아는 질소 화합물의 대사과정에서 생성되는 주요한 중간생성물의 하나로 음식이나 몸안의 단백질(아미노산)에서 만들어지고, 이는 간에서 요소 회로를 통해 몸밖으로 배설된다. 요소회로는 5가지 효소에 의해 이루어지고, 이중 한가지가 결핍되어 우리몸에 암모니아가 축적되는 것이 요소회로 효소병증인데 이는 선천성 대사장애의 일종이고, 임상적으로 구토, 기면상태, 경련, 혼수, 사망 등의 증

세를 나타내는 질환이다.¹ 요소회로 효소병증 중 가장 많은 빈도를 나타내는 것이 Ornithine Transcarbamylase(OTC) 결핍증으로 반성 유전을 하고 남아에서 증세가 심하게 나오며 주로 신생아기때 사망에 이른다.²

저자들은 1991년 6월에 생후 3일째부터 불규칙하고 빠른 호흡과 고암모니아혈증성 혼수에 빠진 환아에서 사망 후 일본대학병원 소아과 교실에서 시행한 간 부검 조직의 효소 분석을 통해 OTC 결핍증으로 밝혀진 증례를 경험하였고, 국내에서는 처음으로 효소분석으로 확진된 OTC 결핍증에 이를

문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다.

II. 증 례

환 아: 전 OO 아기, 생후 3일, 남아

주 소: 기면상태

분만력: 재태기간 39주에 정상 질식 분만하였고, 출생시 체중은 3.3kg였으며 첫 울음과 활동력은 모두 좋은 상태였다.

가족력: 환아의 아버지와 어머니는 모두 특별한 질환없이 각각 30세, 28세로 육체적으로 건강한 상태였고, 첫째 아기는 남아로 정상분만 후 생후 2일째 부터 기면, 경기, 혼수상태가 지속되어 생후 3일째 사망하였다.

현병력: 생후 3일째 되는 날 아침부터 잘 먹지 않고 울지않다가 불규칙하고 빠른 호흡과 기면상태에 들어 갔다.

이학적 소견: 체온은 36.5°C, 맥박은 128회/분, 호흡수는 80회/분 이었다. 대천문은 팽대되어 있지 않았고 동공은 양쪽이 같은 크기로 대광반사는 느렸다. 호흡시에 악취가 나고 흉골함몰이 있었으며, 간은 2.5cm축지되었다. 근 긴장도가 감소되어 있었고, 통각에 대한 반응이 없었다.

검사소견: 혈액 검사상 혈색소 21.7g/dl, 백혈구 9,700/mm³, BUN 7mg/dl, creatinine 1.2mg/dl, SGOT 89IU/l, SGPT 10IU/l 였다. 산-염기 검사는 동맥혈에서 PH 7.48, PCO₂ 32.3mmHg, PO₂ 71.2mmHg, HCO₃ 23.9mEq/l였고, 전해질은 Na 141mEq/l, K 6.4mEq/l, Cl 104mEq/l였으며 anion gap 은 13.9mEq/l로 정상 범위 였다. 혈액의 암모니아는 900 μg/dl 이상으로 현저하게 증가된 소견을 보 였고 CK 1226U/l, CK-MB 234U/l, LD 8135U/l로 매우 증가된 소견을 보였다. 소변과 혈액에서 케톤은 나오지 않았다.

아미노산 분석 및 효소 분석: 혈중 아미노산은 glutamine, glycine, alanine, lysine이 증가되어 있었고 특히 glutamine이 2283.82 μ moles/l로 현저히 상승 되어 있었다. citrulline은 혈중에서 0 μ moles/l로 전혀 측정되지 않았고, arginine은 정상 범위보다 조금 감소되어 있었으며, ornithine은 증가되어 있었

다(Table 1). OTC활성도는 정상 대조군에서 75.6 units/mg protein(이하 단위 생략)이고, OTC 결핍증 환아 대조군에서는 1.5이었는데 이 환아에서는 0으로 전혀 측정되지 않았으며 carbamylphosphate synthetase(CPS)활성도는 정상 범위였다(Table 2).

Table 1. Amino acid in serum (μ moles/l)

Amino Acid	Patient	Control
Glutamine	2288.82	420 - 730
Glycin	677.1	110 - 240
Alanine	610.26	200 - 450
Lysine	391.38	120 - 290
Citrulline	0.0	16 - 32
Ornithine	179.16	44 - 90
Arginine	30.36	44 - 120
Aspartic acid	11.7	0 - 26

Table 2. Enzyme assay in liver(units*/mg protein)

	Patient	Normal Control	OTC deficient control
OTC	0	75.6	1.5
CPS	0.033	0.032	0.02

OTC; ornithine transcarbamylase.

CPS; carbamylphosphate synthetase.

* 1 unit = amount of enzyme which forms 1 μg citrulline per minute

임상경과: 생후 3일째 기면상태에 빠지고 무호흡 발생하여 인공호흡기를 걸었고 경련 발생하여 phenobarbital을 투여 하였다. 생후 4일째 암모니아 수치가 1719 μg/dl까지 올라 복막 투석 시작하여 생후 5일째 586 μg/dl까지 떨어졌으나 생후 6일째 부터는 복막 투석을 해도 암모니아 수치가 조절되지 않았고, 대천문이 팽대되었다. 생후 12일째 혈중 암모니아 수치가 1000 μg/dl 이상으로 증가되면서 혼수상태가 지속 되어 생후 18일째 사망하였다. 사망후 효소 분석 위해 사후 간 조직 검사 시행한 결과 부 췌 간세포 이외의 특이할 만한 소견은 없었다.

III. 고 찰

신생아기에 올수 있는 고암모니아혈증은 생명을 위협하는 것으로써 여러가지 원인에 의한다(Table

3).¹ 이중 효소회로 효소병증은 효소회로를 이루는 5가지 효소, 즉 carbamyl phosphate synthetase (CPS), ornithine transcarbamylase(OTC), argininosuccinic acid synthetase(AS), argininosuccinate lyase(AL), arginase중 한가지가 결핍되어 요소가 합성되지 못하고 여러가지 질소 대사물(glutamine, glutamate, alanine, ammonia)이 축적되며,^{2,3} 이중 독성이 강한 암모니아가 특히 중추 신경계에 작용하여 기능적이고 기질적인 변화를 유발함으로써 병을 일으킨다.⁴

Table 3. Conditions resulting in neonatal hyperammonemia

Urea cycle defects
Carbamyl phosphate synthetase deficiency
Ornithine transcarbamylase deficiency
Argininosuccinate synthetase deficiency
Argininosuccinate lyase deficiency
Arginase deficiency
Transient hyperammonemia of prematurity
Disorders of branched-chain amino acid metabolism
β-ketothiolase deficiency
Isovaleric acidemia
Methylmalonic acidemia
Propionic acidemia
Severe perinatal asphyxia
Total parenteral nutrition
Liver failure

OTC 결핍증에 의한 고암모니아 혈증은 사촌인 두 여아에서 1963년 Russel 등⁵에 의해 처음 보고되었고, Allan 등⁶은 1958년 지능 발육지연이 있는 두 오누이의 소변에서 많은 양의 아미노산을 검출하였으며, Westfall은 그 물질이 argininosuccinic acid임을 밝힌 이후 지금까지 효소회로 효소병증에 관한 보고들이 계속 나오고 있다.^{7,8,9} 효소회로 효소병증의 발생빈도는 대략 30,000명 출생아당 한명정도에 이른다.^{1,10} 효소회로는 5가지의 효소가 관계되는 일련의 반응으로써 간세포의 사립체 (mitochondria)와 세포질에서 일어난다(Fig 1).

효소는 질소 대사의 주된 대사 산물로 신생아에서 소변으로 배출되는 질소의 2/3를 차지하고 효소회로는 유일하게 알려진 요소 합성 경로로 암모니아 비독성화의 주된 역할을 한다. 요소는 2개의 질

소 원자로 이루어 지는데 이중 하나는 암모니아에서 오고 다른 하나는 aspartic acid에서 온다.

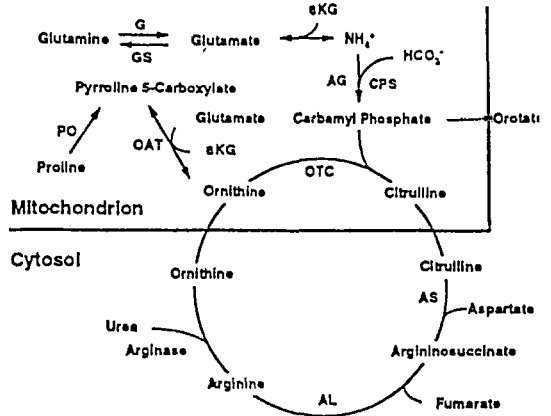


Fig 1. The precursors and pathway of urea synthesis.
 AG; acetylglutamate (a co-factor for CPS).
 AL; argininosuccinase.
 AS; argininosuccinic-acid synthetase.
 CPS; carbamyl phosphate synthetase.
 G; glutaminase.
 GS; glutamine synthetase.
 αKG; alpha-ketoglutarate.
 OAT; ornithine aminotransferase.
 OTC; ornithine transcarbamylase.
 PO; proline oxidase.

Aspartic acid의 α-amino nitrogen은 glutamate에서 탈아미노화하여 만들어진다. Glutamate는 α-ketoglutarate(α-KG)와 반응하는 모든 아미노산으로부터 아미노기를 받고 또한 glutamate는 사립체 기질(mitochondrial matrix)내에서 암모니아와 α-KG로 부터 형성된다.¹¹ Ornithine은 사립체내에서 OTC에 의해 citrulline으로 되고, 또 한편으로는 ornithine aminotransferase에 의해 glutamate semialdehyde(GSA)로 되어 glutamate로 산화되거나 pyrroline-5-carboxylate를 형성하여 proline으로 환원되기도 한다. 이런 반응들로 인해 OTC 결핍증이 있는 환아에서는 사립체 내에 ornithine이 축적되지 않게 되고 glutamate가 많아지며, 이 반응들은 가역적이다. OTC 결핍증에서 처럼 사립체 내에서 carbamyl phosphate의 이용이 차단되면 이것은 세포질로 나와 pyrimidine 합성회로의 기질로 이용되어 orotic acid를 비롯한 pyrimidine 전구 물질이 증가하게 된다. 그러므로 OTC 결핍증이 있는 환아는 고암모니아혈

증과 함께 소변의 orotic acid가 증가하게 되고 citrulline, argininosuccinic acid, arginine이 증가되지 않는다. 반면 CPS 결핍증에서는 소변에서 orotic acid가 증가하지 않게 된다.¹²

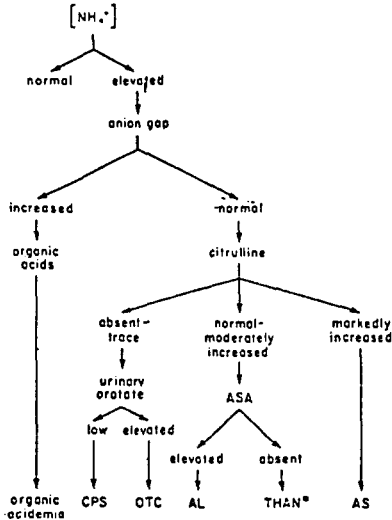


Fig 2. Flow diagram for diagnosis of urea cycle enzymopathies.
 CPS; carbamyl phosphate synthetase.
 OTC; ornithine transcarbamylase.
 AS; argininosuccinate synthetase.
 AL; argininosuccinate lyase.
 THAN*; transient hyperammonemia of newborn.

고암모니아혈증은 임상적으로 심한 구토와 수유장애, 빈호흡, 기면, 혼수와 경련을 동반하고 심하면 호흡부전, 신부전, 순환부전을 유발하여 고암모니아혈증을 더욱 가속화시킨다.¹ 요소회로 효소병증에서 효소의 완전한 결핍인 경우는 임상적 증세가 대부분 생후 몇일 이내에, 일반적으로 단백질이 포함된 수유를 시작한 후에 발생한다. 그러나 효소가 부분적 결핍만 있을 때는 영아 후기나 어린이기에 증세가 발현되는 경우도 있다.¹³ 이번 증례에서는 OTC 효소 활성도가 전혀 없어 OTC 결핍증 중에서도 매우 심한 경우이고 따라서 수유가 시작된 지 이틀만에 고암모니아혈증으로 인한 혼수 상태에 빠졌고 복막투석에도 암모니아가 효과적으로 감소되지 않아 결국 사망하였다. 그러므로 요소회로 효소병증이 의심되면 혈액 암모니아를 측정하여 고암모니아혈

증이 있으면 진단적 접근을 시작함과 동시에 고암모니아혈증에 대한 치료를 빨리 시작해야 한다. 또한 신부전증에 대비하여 소변 검체를 미리 받아 놓아야 한다.^{1, 8, 13}

Batshow등이 제시한 진단적 접근방법은 혈청 전해질 측정으로 anion gap을 계산하여 20mEq/l 이상이 되면 유기 산혈증(organic acidemia)에 의한 고암모니아혈증으로 보고 정상 anion gap일 때는 혈액과 소변의 아미노산을 측정하여 어느정도 요소회로 효소병증에 대한 진단을 내릴수 있다고 했다.^{1, 14}(Fig. 2). 그렇지만 효소 결핍의 정도를 나타내는 확진을 해야하는데 이것은 간조직이나 Table 4에서 제시된 기타 다른 조직의 효소 분석을 통해 할 수 있다.²

Table 4. Sites for enzyme assay

CPS deficiency	--liver
OTC deficiency	--liver, intestinal mucosa
AS deficiency	--liver, fibroblasts, lymphoblasts
AL deficiency	--liver, fibroblasts, erythrocytes
Arginase deficiency	--liver, erythrocytes, fibroblasts(?)

CPS; carbamyl phosphate synthetase.
 OTC; ornithine transcarbamylase.
 AS; argininosuccinate synthetase.
 AL; argininosuccinate lyase.

모든 신생아 고암모니아혈증의 치료 목적은 암모니아를 빨리 체외로 배설시켜 비가역적인 신경학적 손상을 막고 정상적 항상성을 유지하며 적절한 칼로리와 필수 아미노산을 공급하여 이화작용에 의한 조직 단백질의 분해를 막는데 있다. 적절한 칼로리, 수분, 전해질 공급을 해야하고 칼로리는 지방으로 보충시키며 단백질은 필수 아미노산형태로 공급해 준다. 또한 sodium benzoate와 phenylacetate, arginine 공급을 하기 시작한다. 만일 위의 방법이 몇 시간 내에 암모니아를 효과적으로 감소시키지 못하면 혈액투석이나 복막투석을 해야한다.¹⁵ 교환수혈은 일시적인 효과만 있어 적절하지 못하므로 혈액투석이 불가능한 경우나 고빌리루빈혈증이 있는 신생아에서 시행하고 복막투석은 지속적으로 암모니아를 제거하고 신부전시 생화학적인 교정이 가능한 면 중증도의 고암모니아혈증 치료에 도움이 된다.¹ 혈액투석은 생명을 위협하는 고암모니아혈증의 초기 치료로 효과가 높지만 신생아에서는 위험도가 크고,

또한 전문성을 요하는 제한점이 있다.¹

질소를 배설시키는 경로에는 요소 회로를 이용하여 요소를 배설시키는 것과 alternative pathway를 이용하여 비요소 대사물을 배설시키는 경로가 있어 치료적 측면에서 이용되고 있다. 비요소 대사물에는 요소회로 중간 대사물(citrulline, argininosuccinic acid, arginine)과 아미노산 acylation 산물(hippuric acid, phenylacetylglutamine)의 2가지 종류가 있다.^{8, 16}(Fig. 3)

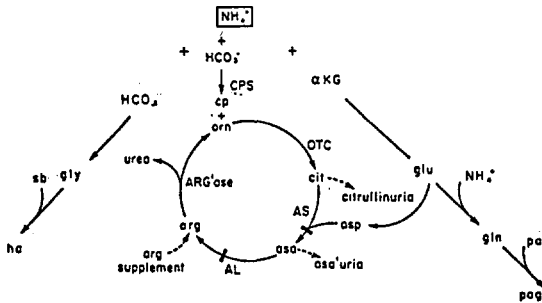


Fig 3. Normal and alternative pathways of waste nitrogen excretion. ha ; hippuric acid. sb ; sodium benzoate. pag ; phenylacetylglutamine. pa ; phenylacetic acid. cp ; carbamy1 phosphate. asa ; argininosuccinic acid.

과거에는 식이요법으로 단백질 제한, 필수아미노산, nitrogen-free analogues 등을 병용하였지만 고암모니아 혼수가 있는 1년내에 거의 사망하였다.^{3, 4} 이것은 음성 질소 평형이 되면 조직 단백질이 산화되며 에너지를 내게 되는데 이때 많은 양의 질소가 나오게 되고 이것은 요소회로 효소병증이 있는 환아에서 사망할 정도의 많은 암모니아를 만들기 때문이다. 그러므로 질소 노폐물(waste nitrogen)을 다른 경로를 이용하여 배설시키려는 노력이 시도되었고 Lewis,¹⁷ Sherwin과 Shiple¹⁸은 각각 sodium benzoate와 phenylacetic acid를 먹었을때 소변에 요소 질소가 적어지며 hippurate와 phenylacetylglutamine 질소가 많아지고 총 질소 배설에는 별 차이가 없음을 제시하였다.^{13, 19} 이러한 alternative pathway를 통한 암모니아 제거는 총 질소 노폐물 배설의 28-59%를 차지하므로 요소회로 효소병증에서 이것을 활성화시키면 생존률과 임상적 결과를 증가시킬수 있다.³ 1 mole의 benzoate는 1mole의 암모니아를, 1mole의 phenylacetate는 2mole의 암모니아를

각각 glycine과 glutamine 형태로 소변으로 배설시킨다.¹⁵ Batshow 등은 sodium benzoate를 고암모니아 혈중성 혼수 8례에 투여하여 이중 6례에서 혈액 암모니아 수치가 효과적으로 떨어짐을 보고하였다.¹³ Arginine 결핍증을 제외한 요소회로 효소병증에서 arginine 공급은 단백질 공급과 요소회로 중간대사물인 citrulline과 argininosuccinic acid의 생성과 배출을 위한 공급체로서 중요하다. 또한 CPS, OTC, AS의 불완전 결핍 때는 낮은 혈중 ornithine 상태가 속도 제한 과정이 되므로 arginine 공급은 ornithine 농도를 올리는 데도 중요하다.¹³ 장기적 치료는 각 질병에 따라 달라진다.¹ AL 또는 AS 결핍증의 경우 하루에 1.5gm/kg의 중등도의 단백 제한과 arginine 보충이 필요하지만 OTC와 CPS의 완전 결핍 때는 하루 0.5-1.0gm/kg의 보다 강력한 단백 제한과 필수 아미노산 공급, 그리고 sodium benzoate나 sodium phenylacetate 공급이 질소 배설과 고암모니아 혈중 조절을 위해 필요하다.¹⁹

이들의 예후는 조기 진단과 치료에 의해 달라지게 되고 혈중 암모니아 수치가 정상화 되어도 신경학적 회복은 몇일이 소요된다. AL 혹은 AS 결핍증에서는 arginine 정맥 주사에 의해 효과가 있고 OTC와 CPS 결핍증에서는 alternative pathway를 통한 sodium benzoate나 phenylacetic acid 공급에 의해 예후가 좋아졌지만, 장기적 효과를 알기 위해서는 더 오랜 시일이 필요하다. 신경학적 그리고 발육에 관한 예후는 고암모니아혈증의 정도와 혼수상태의 기간 그리고 신경학적 호전의 정도에 따라 달라진다.¹

AL과 AS 결핍증의 자궁내 진단은 양수 세포를 배양함으로써 알 수가 있지만 OTC와 CPS 결핍증의 경우는 이 방법으로 진단이 불가능하고 태아 간 생검으로 진단하며 최근 용모막을 이용한 DNA polymorphism 연구가 시행되고 있다.¹⁵ OTC 결핍증의 경우를 제외하고는 모두 상염색체 열성 유전이고 OTC 결핍증의 경우는 반성 유전이므로 유전적 상담을 통해 고위험도의 가족을 찾아내어 임신증과 분만후에 조기 치료를 시작하는 것이 필요하다. 보인자를 찾아내는 방법으로 OTC 결핍증의 경우 6시간 단백 부하 시험을 하여 혈액 암모니아와 소변의 orotic acid를 측정하는 것이 있고 AS, AL 그리고

Arginase결핍증의 경우 피부 섬유아세포나 적혈구를 배양하여 효소 분석을 하는 것이 있다. CPS 결핍증의 경우는 보인자를 찾아내는 효과적인 방법이 아직 없다. 또한 원인을 알 수 없는 고암모니아혈증으로 죽은 신생아는 다음 아기에 대한 유전 상담을 위해 효소 분석이 필요하므로 사후 간조직을 떼어 -70C 에 보관한 후 효소 분석을 통한 정확한 진단을 내리는 것이 요구된다.¹

V. 결 론

저자들은 생후 3일째 기면상태에 빠져 본원 소아과에 입원하여 고암모니아혈증으로 사망한 신생아에서 간조직의 효소 분석을 통해 OTC결핍증으로 확진된 증례를 경험하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Donn SM, Banagale RC: Neonatal hyperammonemia. *Pediatrics in Review* 1984;5:203-208.
2. Synderman SE: Clinical aspect of disorders of urea cycle. *Pediatrics* 1981; 68:284-289.
3. Batshaw ML, et al.: Treatment of inborn errors of urea synthesis. Activation of alternative pathways of waste nitrogen synthesis and excretion. *N Engl J Med* 1982; 306:1387-1392.
4. Brusilow SW, Valle DL, Batshaw ML: New pathways of nitrogen excretion in inborn errors of urea synthesis. *Lancet* 1972;2:452-454.
5. Russell A, Levin B, Oberholzer VG, Sinclair L: Hyperammonemia. A new instance of an inborn enzymatic defect of the biosynthesis of urea. *Lancet* 1962;ii:699-700.
6. Allan JD, Cusworth DC, Dent CE, Wilson VK: A disease, probably hereditary, characterised by severe mental deficiency and a constant gross abnormality of aminoacid metabolism. *Lancet* 1958;i:182-187.
7. Levin B, Oberholzer VG, Sinclair L: Biochemical investigation of hyperammonemia. *Lancet* 1969;2:170-174.
8. Mastsuda I, Arashima S, Nambu H, Takekoshi Y, Anakura M: Hyperammonemia due to a mutant enzyme of ornithine transcarbamylase. *Pediatrics* 1971;48:595-600.
9. 한현석, 김윤덕, 최용, 고광옥: 요소회로 효소병증. *대한의학 협회지* 1986;29:324-330.
- 10) Koch R: Introduction to urea cycle symposium. *Pediatrics* 1981;68:271-172.
11. Stryer L: *Biochemistry*. 3rd Ed. W.H. Freeman and Company, 1988;495-502.
12. Snodgrass PJ: Biochemical aspect of urea cycle disorders. *Pediatrics* 1981;68:273-283.
13. Batshaw ML, Brusilow SW: Treatment of hyperammonemic coma caused by inborn error of urea synthesis. *J. Pediatrics* 1980;97:893-900.
14. Batshaw ML, Thomas GH, Brusilow SW: New approaches to the diagnosis and treatment of inborn errors of urea synthesis. *Pediatrics* 1981;68:290-297.
15. Richard EB, Victor VD: *Nelson Textbook of Pediatrics*. 14th Ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1991; 327-332.
16. Moldave K, Meister A: Synthesis of phenylacetylglutamine by human tissue. *J Biol Chem* 1957; 229:463-475.
17. Lewis HB: Studies in the synthesis of hippuric acid in the animal organism. *J Biol Chem* 1914;18:225-231.
18. Shiple GT, Sherwin CP: Synthesis of hippuric acid in the animal organism. *J Biol Chem* 1914;18:225-231.
19. Brusilow SW, Tinker J, Batshaw ML: Aminoacid acylation, A mechanism of nitrogen excretion in inborn errors of urea synthesis. *Science* 1980;207: 659-661.
20. Wiegand C, Thompson T, Bock GH, Mathis RK, Kjellstrand CM, Mauer SM: The management of life-threatening hyperammonemia; A comparison of several therapeutic modalities. *J. Pediatrics* 1980; 96:142-144.
21. Naylor EW: Newborn screening for urea cycle disorders. *Pediatrics* 1981;68:453-457.