

先天異常の疫学・遺伝に関する研究

—先天性副腎過形成（21-水酸化酵素欠損症）をモデルとして，Ⅱマススクリーニングに関する検討—

笹 月 健 彦

（東京医科歯科大学難治疾患研究所 人類遺伝学部門）

下 澤 和 彦

齊 藤 喜 親
（東京医科歯科大学医学部小児科）

はじめに

わが国における各種先天異常の発症を正確に把握することができるような，モニタリングシステムを確立するために，先天異常の疫学・遺伝に関する解析を行うことを目的とする。この目的を遂行するために先天性副腎過形成（21-水酸化酵素欠損症）をモデルとしてとりあげ，昭和54年度は家系分析を行うことにより，遺伝学的に詳細な検討を加えた。すなわち，

(1)本疾患は，単純劣性遺伝性疾患であること，

(2)単純劣性であるにもかかわらず，患児の男女比は，1：1.86と女兒に多いように見えること，これは女兒の方が男性化ということで診断が容易であること，逆に男の患児が相当数見落されていること，

(3)HLA と密に連鎖していること，すなわち，出生前診断，あるいは出産後の早期診断として，HLA タイピングを利用しうること，などを明らかにした。

そこで本年度は，本疾患をモデルとして，

(1)マススクリーニングの方法を開発する，

(2)開発したマススクリーニング法を実際に応用した集団のスクリーニングを行う，ことにより，先天性副腎過形成の発症モニタリング法を確立するにとどまらず，一般に先天異常モニタリングにおける問題点を明らかにすることを目的とした。

先天性副腎皮質過形成はその臨床症状や欠損酵素の如何により数型に分類されているが，その大部分の80～90%が21-水酸化酵素欠損症（以下本症）とされている¹⁾。本症はその臨床症状から食塩喪失型と単純男性化型の2型に分類されるが，その病型別の実態は先年まとめられた全国アンケート調査¹⁾によりほぼ明らかにされた。図1に病型別の患者数を示したが，食塩喪失型での男女比（Genetic sex）が1：0.87でほぼ等しいのに対し，単純男性化型でのそれは0.24：1と男児は女兒の1/4にすぎないことがわかる。本症は常染色体性劣性遺伝形式をとる

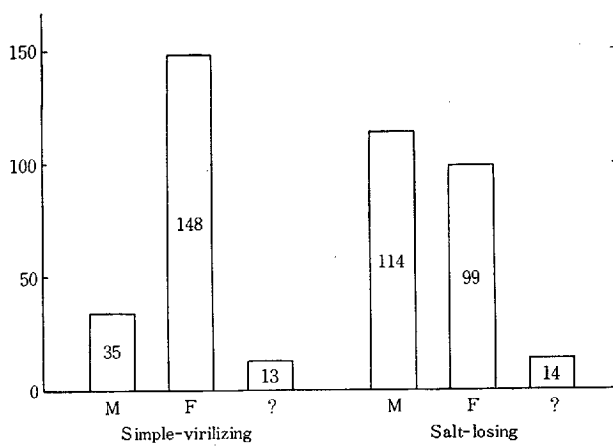


図1 Genetic sex and the number of patients in the two types of 21-hydroxylase deficiency.

ところから理論的には性差は認めないはずであり、このことは多数の単純男性化型の男児が女児に比較して男性化症状が不明瞭なために見逃されていることを示唆している。また食塩喪失型の診断も一般医家では比較的困難であることも加え相当数の本症患者が未治療のまま放置されていることが推測される。わが国における本症の発生頻度は約45,000人に1人といわれているが²⁾、先に述べたことより実際にはより高頻度であるものと考えられる。本症のモニタリングにあたっては何らかの方法で本症を早期にもれなく発見することが当面の課題であり、これにより本症の正確な発生頻度も明らかになるものと思われる。

本症では、図2に示したように生体維持に不可欠な糖質コルチコイドならびに鉱質コルチコイドの合成障害の結果、間脳一下垂体一副腎皮質系の feed-back 機構が発動され、21-水酸化酵素の基質である17 α -hydroxyprogesterone (以下17-OHP) や21-deoxycortisol (以下21-DOF)

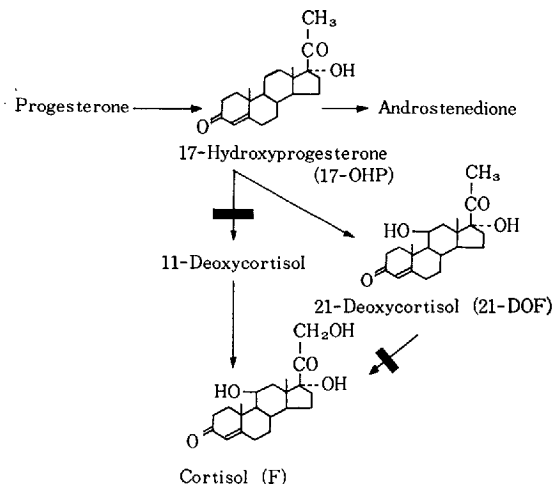


図2 21-hydroxylase 欠損 (図中■) による代謝過程の変化

の著増を認め、近年これらの precursors の測定はことに蓄尿の困難な新生児期において診断に有用であることが確認されている³⁾。

そこでわれわれはごく微量の乾燥滷紙血液（以下滷紙血）を用いて血中17-OHP を測定する方法を開発し、その方法が本症の診断に応用可能であることを報告してきた⁴⁾。しかしこの方法は検体溶出後エチルエーテルによる抽出操作を必要とし多数の検体の処理には不適当であったため、新たに抽出操作を省略した方法（以下本法）を開発し、本法によっても十分に本症患者の同定が可能であることを確認したので報告する。また昭和55年10月より試験的に開始した特定地域における早期新生児期でのマス・スクリーニングの結果についても併せて報告する。

I. 対象ならびに方法

1. 対象ならびに検体

対象は先天性代謝異常症ならびにクレチン症のマス・スクリーニングと同様に生後4～6日（低出生体重児などでは若干遅い時期となる）の新生児とし、検体には上記疾患のマス・スクリーニングのための検体の一部すなわち heel-prick により採取した滷紙血からパンチした3 mm ディスクの1ケを用いた。滷紙血の保存は採取後出来るだけ凍結保存とした。マス・スクリーニングの対象外ではあるが、一部の新生児では同時に毛細管にて血漿も採取し滷紙血による測定値と比較した。また本症患者の若干名にても同様に測定した。

2. 測定法

図3に測定法の概略を示した。検体の溶出にはバッファー(0.05 M Borate buffer, pH 7.8, 0.05% BSA, 0.06% Bovine γ -globulin) の0.2 ml を用いた。標準曲線用サンプルには、17-

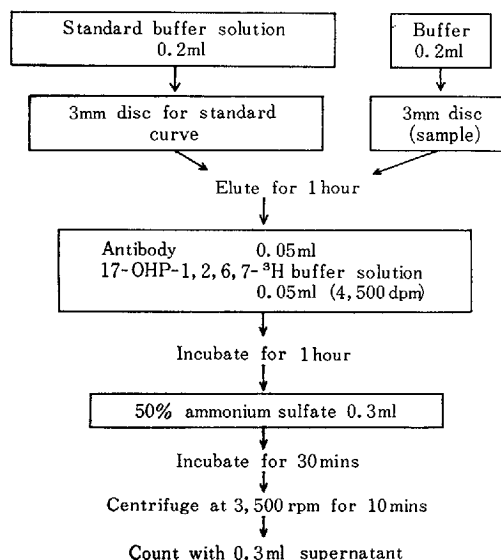


図3 Assay procedure

OHP を0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 pg/0.2 ml の各濃度になるように調整したバッファー溶液に血清を用いた標準法⁵⁾によりあらかじめ 17-OHP 濃度のきわめて低いことを確認した血液の滷紙血からの3 mm ディスク 1ケを加え検体と同様に溶出したものを用いた。溶出は室温にて1時間とし、つづいて直接 17-OHP-1, 2, 6, 7-³H のバッファー溶液 0.05 ml (4,500 dpm) と、抗 17-OHP-3-CMO-BSA 血清の10,000~14,000倍希釈液の 0.05 ml を加え混和後室温にて1時間 incubate した。incubate 終了後さらに50%硫酸アンモニウム溶液の等量 (0.3 ml) を加え混和後室温にて30分間 incubate し、つづいて 3,500 rpm にて10分間遠沈し B,F 分離を行いその上清の 0.2 ml または 0.3 ml にて ³H の放射能活性を count し、3 mm ディスク 1ケからの17-OHP 回収量を測定した。

表 1 に本法に用いる抗血清の cross reaction を 50 % 結合率を示す 17-OHP 量と他の各種ステロイド量との比で表わしたもので示したが、17-OHP に比べはるかに高い血中濃度を示す cortisol は 0.04% 以下であり、他の各種ステロイドもすべて 10% 以下を示しほぼ満足されるものであった。しかし、胎児皮質の遺残により高値を示す可能性のある progesterone ならびに 17 α -hydroxypregnenolone ではそれぞれ 7.9%, 6.3% と比較的高値を示しており、この点に関しては後述したい。

表 1 The cross reaction of anti-17-OHP with various steroids

Steroids	Cross reaction
17 α -OH-Progesterone	100 %
Progesterone	7.9
17 α -OH-Pregnenolone	6.3
20 α -OH-Progesterone	3.2
16 α -OH-Progesterone	2.5
21-Deoxycortisol	1.3
11-Deoxycortisol	0.9
11-Deoxycorticosterone	0.7
16 α -OH-Pregnenolone	0.7
Dehydroepiandrosterone	<0.04
Cortisol et al.	<0.04

3. マス・スクリーニング法

前述のように、特定地域にて出生した新生児について先天性代謝異常症ならびにクレチン症のマス・スクリーニングのための検体の一部を用い、まず 3 mm ディスク 1ケからの17-OHP 回収量を single にて測定し、その Assay 内で 97 th percentile 以上の高値を示したものを要再検者とし同一検体から再度 3 mm ディスクをパンチし duplicate にて再検した。再検の結果再度 97 th percentile 以上の高値を確認したものは要精検者として専門医療機関を受診させ、臨床症状のチェックを行い同時に静脈採血にて血清を採取し、血清電解質ならびに血中 17-OHP と 21-DOF を microcolumn を用いた従来の方法⁵⁾にて正確に測定し、本症か否か

を判定した。なお最近では精検までに汚紙血の再採血のステップを加え要精検者数の減少を試みている。

Ⅱ. 成 績

1. 測 定 法

i. 標準曲線 (図 4)

Bound/Total でみると 0 pg/tube での 78.6% から 200 pg/tube での 35.5% まで比較的良好な曲線を示しており、感度 (sensitivity) は 5 pg/tube と考えられた。

ii. 希釈試験 (図 5)

横軸にすでに溶出を行った 0.2 ml のバッファー溶液のうち測定に用いた量を、縦軸に回収された 17-OHP 量をとると、closed-circle 実線の正常新生児、open-circle 破線の本症患者の両者とも直線性を示しており満足されるものであった。

iii. 精度 (precision) (表 2)

Intraassay coefficient of variation は低濃度の sample A で 26.2% と比較的大きいが低濃度から高濃度までほぼ満足されるものであった。また Interassay coefficient of variation でも低濃度での検討は行っていないが中濃度以上では、10~20% を示し満足されるものであった。

iv. 本法による汚紙血からの 17-OHP 回収量と本法を一部改変して測定した血漿濃度との相関 (図 6)

横軸には本法による 3 mm ディスク 1 ケからの 17-OHP 回収量を、縦軸には汚紙血と同時に採取した血漿をバッファーにて適当な濃度 (およそ 5 μ l 血漿/0.2 ml バッファー) に希釈し本法により測定した血漿濃度を示したが、両者の間には危険率 1% 以下で有意の相関関係を認められた。また図には示さないがさらに高濃度の検体においても良好な相関を認めた。

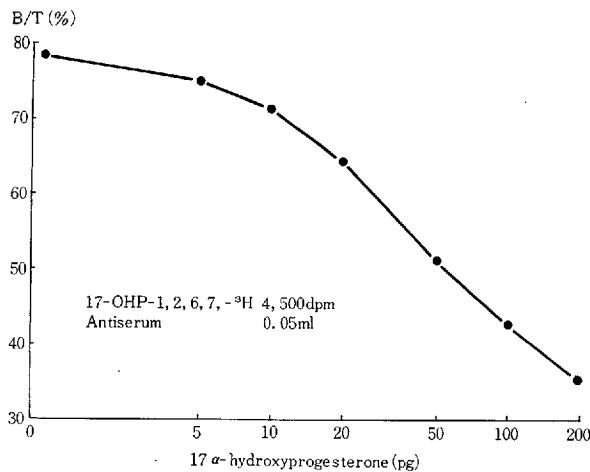


図 4 Standard curve for simplified 17-OHP radioimmunoassay

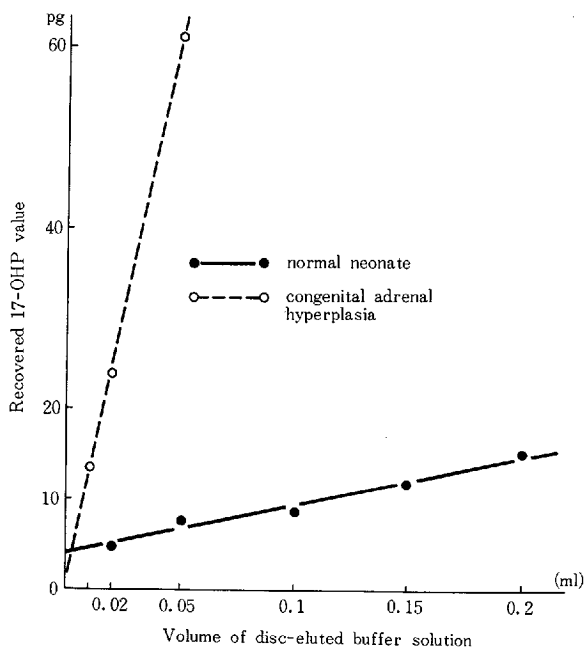


図5 Dilution test

表2 Precision

No.	Intraassay			Interassay	
	sample			sample	
	A	B	C	B	C
1	6.75	88.0	115	84.1	125
2	5.50	74.0	150	55.5	153
3	8.40	87.0	134	88.0	160
4	9.20	78.5	122	69.0	153
5	11.0	93.0	106	64.0	—
mean	8.17	84.1	125	72.1	148
S.D.	2.14	7.68	17.1	13.6	15.5
CV(%)	26.2	9.10	13.7	18.9	10.5

V. エチルエーテル抽出法（滷紙血）と本法との相関（図7）

横軸には抽出法による3 mm ディスク1ヶからの17-OHP回収量を、縦軸には本法による17-OHP回収量を示したが、両者の間には危険率0.5%以下で有意の相関関係を認めた。しかし本法では抽出法に比べ約4倍の高値を示しており、この原因については現在検討中である。

2. 本症患者での測定結果

治療開始前の本症患者では scale-over を示し希釈にて239 pg/disc という異常高値であることが判明した。また補償療法中でも治療が不十分と思われた症例では153 および69.0 pg/disc

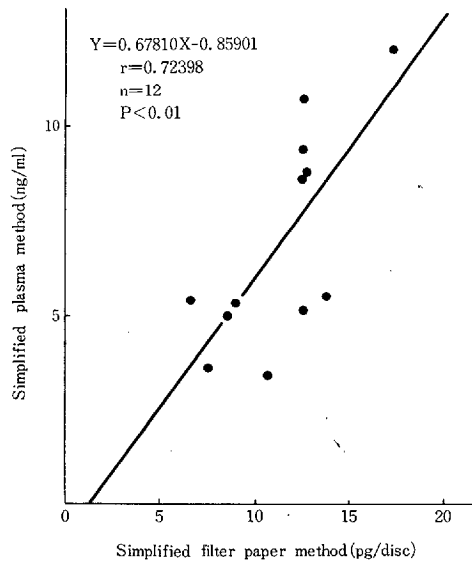


図 6 Correlation between simplified filter paper method and simplified plasma method

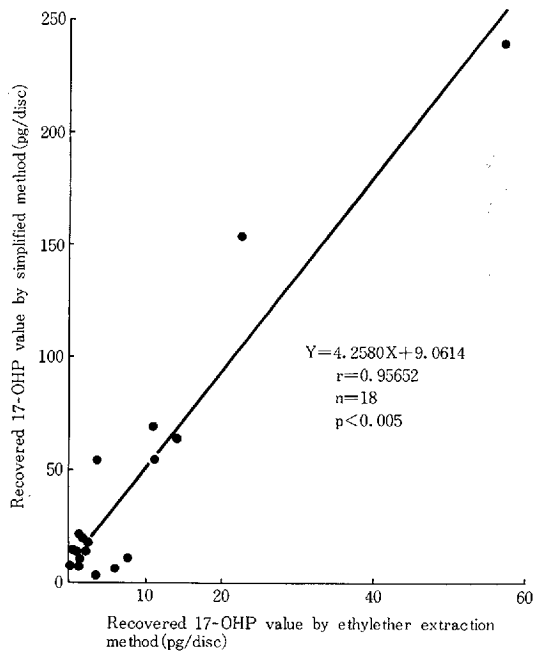


図 7 Correlation between recovered 17-OHP values by ethylether extraction method and that by simplified method

とやはり高値を示し、逆に治療が過剰と思われた症例では not detectable であった。

3. マス・スクリーニング

試験的にモデル地域を定めて行った早期新生児期における成績を図 8 に示した。横軸には

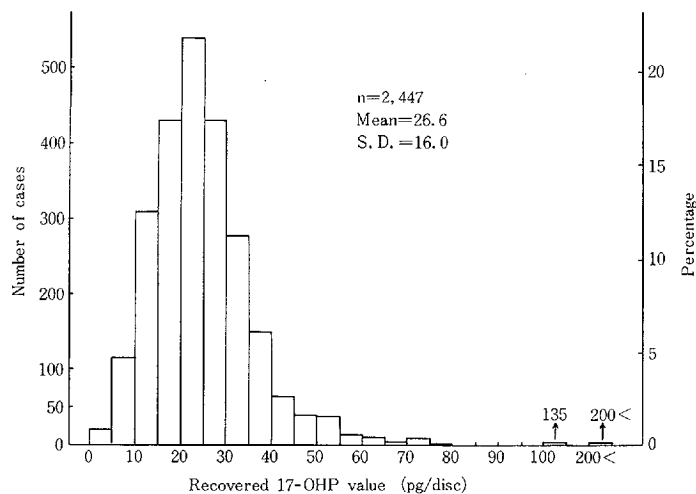


図 8 Distribution of neonatal 17-OHP determination

表 3

Pt.	Filter paper method	Standard method	
	17-OHP (pg/disc)	17-OHP (ng/dl)	21-DOF (ng/dl)
K.M.	200<	38.9	28.6
H.T.	73.5	97.9	51.2
Y.Y.	31.1	50.6	39.3
O.Ak.	72.5	52.8	32.4
O.K.	32.6	46.2	40.0
O.Ai.	32.9	56.8	206
K.A.	30.7	22.6	69.0
I.K.	73.0	35.5	20.4
N.M.	65.0	55.0	30.1
Normal value		31.1±10.1	23.5±6.9

3 mm ディスク 1 ケからの 17-OHP 回収量を、縦軸左のスケールには新生児数を、右のスケールには percentage を示したが、ほぼ正規分布を示しておりその測定値は 26.6 ± 16.0 pg/disc (Mean \pm S. D.) であった。マス・スクリーニング開始当初は再検にて再度高値を示したものを要精検者として、静脈採血による血清を用い血中 17-OHP ならびに 21-DOF 濃度を測定していたがその結果を表 3 に示した。Standard method による血中 17-OHP, 21-DOF がともに Mean + 2 S.D. 以上の高値を示したものは 2 例 (Pt., H.T. と O.Ai.) であったが、この値は本症としては十分な高値ではなく、本症の heterozygous carrier の可能性などさらに詳細な検討が必要と思われた。

III. 考 按

乾燥濾紙血液を用いて血中 17-OHP の定量を行い本症の診断に応用しようという試みは

Pang らのもの⁶⁾ のみのようであり、これにより実際にマス・スクリーニングを行っているという報告はいまだみられない。われわれは高感度の測定系を開発することによりごく微量の濾紙血からの血中 17-OHP の測定に成功し報告してきた⁴⁾⁷⁾ が、さらにエチルエーテル抽出・乾固といった煩雑な操作を省略することにより多数の検体を短時間で容易に処理することを可能とした。本法は 3 mm ディスク 1 ケで測定が可能であり、測定に要する時間も 2 日間と短く、測定値も血中 17-OHP 濃度を十分に反映するものであり、また早期新生児期での測定値はほぼ正規分布を示し本症のそれとは明らかに区別できるものであったことより、現在のところ本症のマス・スクリーニングに最も適した方法といえよう。

抗血清の特異性は前述のように満足されるものであったが、対象が新生児となると若干の問題も生ずる。すなわち胎児皮質の遺残のあるような新生児（たとえば早産児や出生直後の新生児）では、本抗血清と若干の交叉反応性を示す pregnenolone (0.5%), 17 α -hydroxypregnenolone (6.3%), 16 α -hydroxypregnenolone (0.7%), progesterone (7.9%) などが高値を示す可能性があり⁸⁾, false positive として検出される場合があることである。すでにわれわれは出生直後では高値を示すことを確認しているが⁴⁾, それ以降でも確かに要再検者ならびに要精検者には早産児や低出生体重児が多いようであり今後詳細な検討が必要と思われる。

参考までにマス・スクリーニングのプロトコルの素案を図 9 に示した。現在までのところ再検数は全体の約 5.8%, Recall を必要とするものすなわち要再採血者は全体の約 1.1% であるが、患者はいまだ発見されていない。現在行っているマス・スクリーニングは一部の特定地域を対象に試験的に行っているものであるため、検体の流れにも無駄が多く、また疑陽性者（こ

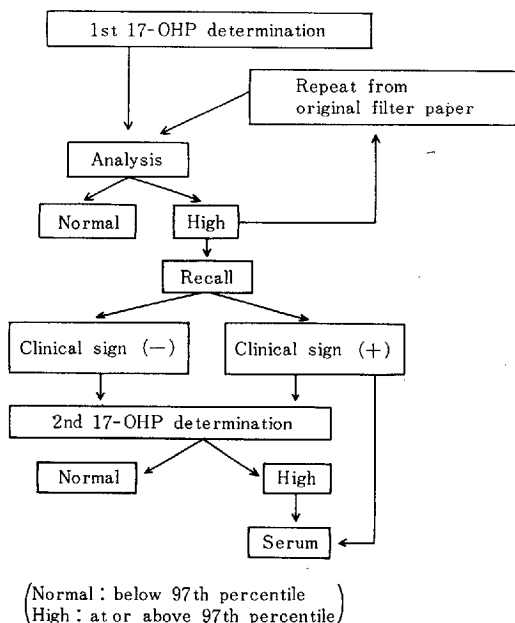


図 9 Logistic protocol by which patients are recalled or diagnosed.

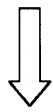
とに要再採血者)の解析も十分とはいえないのが現状であり、当面はマス・スクリーニングシステムの確立が課題といえよう。

IV. 結 語

微量の乾燥濾紙血液を用いた簡便な血中 17 α -hydroxyprogesterone の radioimmunoassay を開発することにより 21-水酸化酵素欠損症のマス・スクリーニングが可能となった。現在早期新生児期における本症のマス・スクリーニングを特定地域において先天性代謝異常症ならびにクレチン症のスクリーニングと平行して行っているが、将来システムの確立、検査数の増量さらに対象地域の拡大により本症患者の早期発見はもとより、本症の正確な発生頻度の解明が可能となるものと思われる。

文 献

- 1) 諏訪城三：昭和53年度研究報告書，厚生省心身障害研究．小児慢性疾患研究班，1979.
- 2) 吉田 久，ら：小児科診療，**40**：1203，1977.
- 3) Franks, R.C.：J. Clin. Endocrinol. Metab., **39**：1099，1974.
- 4) 下澤和彦，ら：ホと臨床，**27**：1048，1979.
- 5) 齊藤喜親，ら：ホと臨床，**25**：981，1977.
- 6) Pang, S., et al.：J. Clin. Endocrinol. Metab.,**45**：1003，1977.
- 7) 神戸川明，ら：ホと臨床，**28**：773，1980.
- 8) Huhtaniemi, I., et al.：Steroids. **16**：197，1970.



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



はじめに

わが国における各種先天異常の発症を正確に把握することができるような、モニタリングシステムを確立するために、先天異常の疫学・遺伝に関する解析を行うことを目的とする。この目的を遂行するために先天性副腎過形成(21-水酸化酵素欠損症)をモデルとしてとりあげ、昭和54年度は家系分析を行うことにより、遺伝学的に詳細な検討を加えた。すなわち、

- (1)体疾患は、単純劣性遺伝性疾患であること、
- (2)単純劣性であるにもかかわらず、患児の男女比は、1:1.86と女兒に多いように見えること・これは女兒の方が男性化ということで診断が容易であること、逆に男の患児が相当数見落されていること、
- (3)HLAと密に連鎖していること、すなわち、出生前診断、あるいは出産後の早期診断として、HLAタイピングを利用しうること、などを明らかにした。

そこで本年度は、本疾患をモデルとして、

- (1)マススクリーニングの方法を開発する、
 - (2)開発したマススクリーニング法を実際に応用した集団のスクリーニングを行う、
- ことにより、先天性副腎過形成の発症モニタリング法を確立するにとどまらず、一般に先天異常モニタリングにおける問題点を明らかにすることを目的とした。

先天性副腎皮質過形成はその臨床症状や欠損酵素の如何により数型に分類されているが、その大部分の80~90%が21-水酸化酵素欠損症(以下本症)とされている¹⁾。本症はその臨床症状から食塩喪失型と単純男性化型の2型に分類されるが、その病型別の実態は先年まとめられた全国アンケート調査¹⁾によりほぼ明らかにされた。図1に病型別の患者数を示したが、食塩喪失型での男女比(Genetic sex)が1:0.87でほぼ等しいのに対し、単純男性化型でのそれは0.24:1と男児は女兒の1/4にすぎないことがわかる。本症は常染色体性劣性遺伝形式をとるところから理論的には性差は認めないはずであり、このことは多数の単純男性化型の男児が女兒に比較して男性化症状が不明瞭なために見逃されていることを示唆している。また食塩喪失型の診断も一般医家では比較的困難であることも加え相当数の本

症患児が未治療のまま放置されていることが推測される。わが国における本症の発生頻度は約 45,000 人に 1 人といわれているが²⁾、先に述べたことより実際にはより高頻度であるものと考えられる。本症のモニタリングにあたっては何らかの方法で本症を早期にもれなく発見することが当面の課題であり、これにより本症の正確な発生頻度も明らかになるものと思われる。

本症では、図 2 に示したように生体維持に不可欠な糖質コルチコイドならびに鉱質コルチコイドの合成障害の結果、間脳一下垂体一副腎皮質系の feed - back 機構が発動され、21 - 水酸化酵素の基質である 17 - hydroxyprogesterone(以下 17-OHP) や 21 - deoxycortisol(以下 21-DOF)の著増を認め、近年これらの precursors の測定はことに蓄尿の困難な新生児期において診断に有用であることが確認されている³⁾。

そこでわれわれはごく微量の乾燥炉紙血液(以下炉紙血)を用いて血中 17-OHP を測定する方法を開発し、その方法が本症の診断に応用可能であることを報告してきた⁴⁾。しかしこの方法は検体溶出後エチルエーテルによる抽出操作を必要とし多数の検体の処理には不適當であったため、新たに抽出操作を省略した方法(以下本法)を開発し、本法によっても十分に本症患児の同定が可能であることを確認したので報告する。また昭和 55 年 10 月より試験的に開始した特定地域における早期新生児期でのマス・スクリーニングの結果についても併せて報告する。