

わが国における G6PD 異常症

研究協力者 三 輪 史 朗
(東京大学医科学研究所・
内科)

研 究 目 的

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症は、1956年 Carson ら¹⁾ によって発見された伴性遺伝性疾患で、赤血球酵素異常と溶血の関係が解明された最初の赤血球酵素異常症である。本症発見以来、溶血性貧血を生じる遺伝性の赤血球酵素異常症は、全部で16種知られるにいたったが、G6PD 異常症の頻度は世界で最も高く、熱帯亜熱帯地域でその頻度は高いとされている。われわれの従来行ったわが国の頻度調査では0.1%程度と低頻度であったが²⁾、これは一部の地域で行った結果にすぎない。

今回、われわれは、濾紙に吸着した血液を用いて、新生児のマススクリーニングにも行いうることが可能なホルマザンリング法³⁾ を、G6PD 異常症のスクリーニング法として開発し、これを用いて日本各地で頻度調査を行ったので報告するとともに、原因不明の溶血性貧血の検索で発見した G6PD 異常症についても報告する。

方 法

G6PD 異常症のスクリーニングは Beutler 法⁴⁾ ないしはホルマザンリング法³⁾ にて行った。スクリーニングで、強く G6PD 異常症が疑われる例については、直接酵素活性の測定と澱粉ゲル電気泳動⁵⁾ を行い確認した。

ホルマザンリング法の概略は次のごとくである。10 mM MgCl₂ を含む 100 mM TrisHCl 緩衝液 (pH 6.5) 20ml中に、150 mg の noble-agar を入れ、加熱して溶かす。55°C に保ち、手早く glucose 6-phosphate (G6P) 25 mg, NADP 5 mg, 3 (4,5-dimethylthiazolyl 1-2), 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 5 mg, Phenazine methosulfate (PMS) 5 mg, を加え混和後、13×6×2 cm のプラスチック容器に入れ、固まらせる。これで21検体の検索ができる。陽イオン交換濾紙 (Whatman P81) に被検者血液約10 μl を塗布乾燥させたものから、直径 6 mm の円形を打ち抜き、これを寒天プレート表面に置き、暗所またはアルミフォイルで遮光し、37°C, 8時間孵置する。濾紙周囲のホルマザンリング産生の有無とその大きさにより判定する。G6PD 異常症ではホルマザンリングの産生が不良で大きさが正常に比し明らかに小さいか、ほとんど産生がない。

G6PD 異常症例の変異酵素の検索は、WHO の推奨法⁵⁾ により行った。

対 象

すべて男性を対象とした。東京地区では、日赤医療センターに提出された検体、および学校の貧血検診で採血し、血算をした残りの検体を重複がない様に整理したものが21,945体につき、検査した。同様に山口地区は山口大学医学部中央検査部、および山口赤十字センターの検体12,694例、鹿児島大学医学部中央検査部の検体3,003例、沖縄地区は検査センターの検体2,308例、札幌地区は札幌医科大学中央検査部の検体597例につき検査した。原則として血算施行後の残りの血液を東京に空輸し、採血後5日以内に検査を行った。

結 果

図1に正常対照、G6PD Ube, G6PD Fukushima のホルマザリング法での結果を示す。G6PD Ube は、活性が正常の約50%で臨床症状を伴わない例で、G6PD Fukushima は、活性が正常の数%で慢性溶血性貧血を伴った例である。図1に示すように、ホルマザンリング面積を測定しなくても正常の50%活性低下を示す G6PD Ube と正常対照との違いは明らかである。図2に種々の G6PD 活性を示す検体とホルマザンリング面積の関係を示すが、正の相関

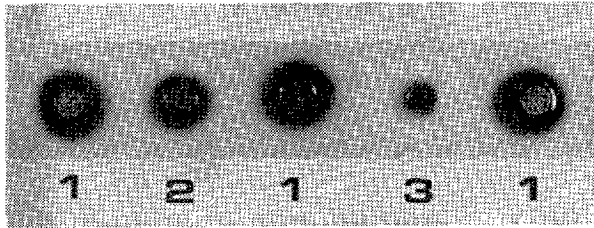


図1 ホルマザンリング法

1: 正常対照, 2: G6PD Ube, 3: G6PD Fukushima

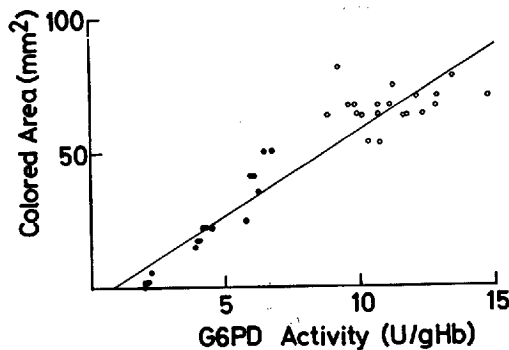


図2 G6PD 活性とホルマザンリング面積の関係

を示し、相関係数は、0.94であった。

図3に札幌、東京、山口、鹿児島、沖縄地区における G6PD 異常症の頻度を示す。総数

40,547検査し、39例の G6PD 異常症を発見し、わが国における平均頻度は、約0.1%であった。山口地区の頻度は、0.2%と東京、鹿児島地区よりやや頻度が高い様である。沖縄地区2,308例、札幌地区597例検査した限りでは G6PD 異常症は見出されていない。現在までに発

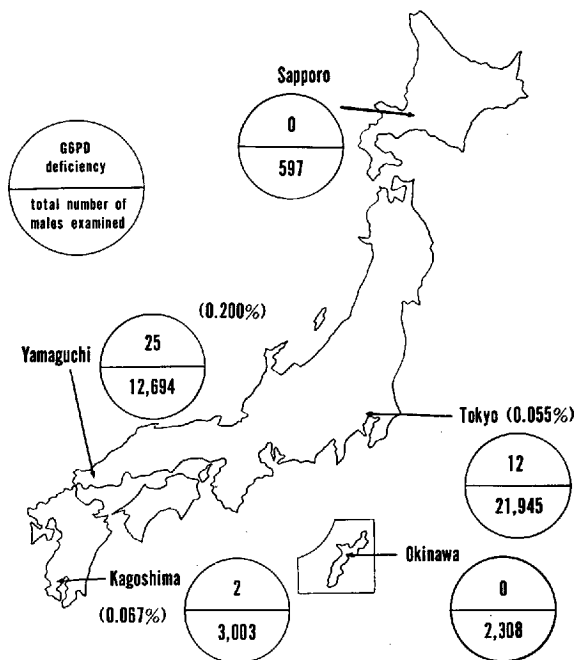


図3 日本各地における G6PD 異常症の頻度

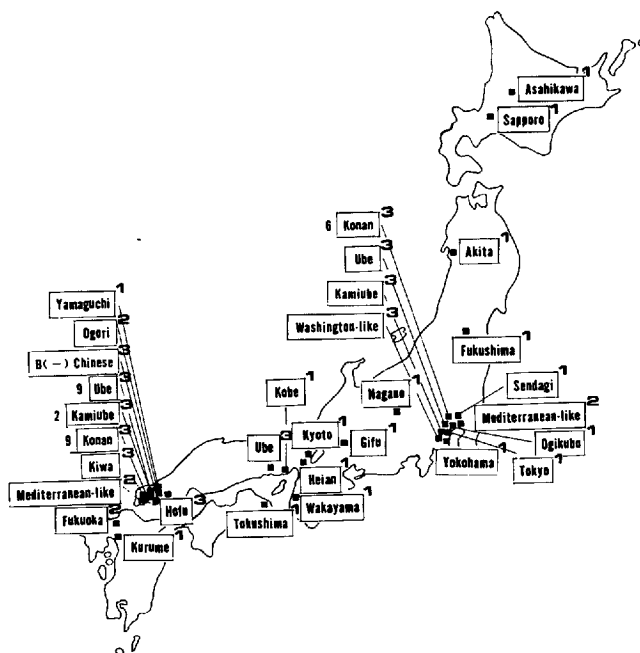


図4 わが国における G6PD 異常の地理的分布
1: Class 1, 2: Class 2, 3: Class 3

表1 Main Features of G6PD Variants Found in Japan

| | Hb (g/100ml) | Retic (%) | Indirect Bilirubin (mg/dl) | Neonatal Jaundice | Hemolytic Crisis | |
|--------------------|-----------------|--------------|----------------------------------|----------------------|------------------|--|
| | | | | | Infection | Drug |
| <u>Class 1</u> | | | | | | |
| Tokyo | 12.6 | 4.5 | 1.4 | - | + | sulfisomedine, sulfa- methoxypyridazine, chloramphenicol |
| Tokushima | 12.1 | 22.0 | 2.6 | - | - | |
| Ogikubo | 9.2 | 8.4 | 2.3 | + | - | acetylsalicylic acid |
| Kurume | 10.6 | 4.0 | 3.5 | - | - | |
| Fukushima | 6.5 | 18.5 | 1.6 | - | - | sulpyrine, aminopyrine |
| Yokohama | 7.5 | 35.2 | 1.2 | - | + | |
| Yamaguchi | 6.9 | 32.4 | 1.2 | - | + | aminopyrine, sulpyrine |
| Wakayama | 10.6 | 3.6 | 1.9 | - | + | sulpyrine, sulfisomezole |
| Akita | 11.1 | 15.0 | 1.6 | - | - | sulpyrine |
| Gifu | 11.1 | 10.7 | 0.8 | - | + | |
| Kobe | 8.8 | 39.9 | 6.1 | - | + | |
| Sapporo | 8.6 | 20.2 | 1.1 | + | - | phenacetin, aminopyrine erythromycin |
| Nagano | 10.0 | 33.8 | 1.6 | + | + | |
| Sendagi | 5.8 | 49.6 | 1.4 | - | + | |
| Asahikawa | 4.9 | 13.1 | 1.7 | - | + | |
| <u>Class 2</u> | | | | | | |
| Mediterranean-like | 9.2 | 2.0 | 0.3* | - | - | chloramphenicol |
| Ogori | 15.9 | 3.3? | 0.8* | - | - | |
| Fukuoka | 11.1 | 1.7 | 0.2 | - | - | sulpyrine, erythromycin |
| <u>Class 3</u> | | | | | | |
| Hofu | 15.1 | 3.2 | - | - | - | |
| B(-) | | | | | | |
| Chinese | 13.1 | 4.3 | 0.6 | - | - | |
| Ube | 14.0 | 1.0 | 0.6* | - | - | |
| Konan | 13.7 | 0.8 | - | - | - | |
| Kamiube | 12.5 | 1.1 | - | - | - | |
| Kiwa | 13.0 | 1.0 | - | - | - | |
| Washington-like | 14.7 | 1.6 | - | - | - | |

* total bilirubin.

見した G6PD 異常症の酵素学的性質の検索により G6PD Hofu⁶⁾, B(-) Chinese⁷⁾, Ube⁸⁾, Konan, Kamiube, Kiwa⁹⁾, Washington-like と 7 種の変異酵素を同定した (Table I, II)。これらの変異酵素は正常の12~64%と中等度の活性低下を示すが、全く臨床症状を伴わず、WHO 分類で Class 3 に属する。その地理的分布を図4に示す。これらの変異酵素は、当然スクリーニングを行った地区に集中するが、G6PD Konan は5家系、G6PD Ube は11家系、G6PD Kamiube は3家系存在し、他は孤発例である。尚、G6PD Ube の1例は韓国人である。

原因不明の遺伝性溶血性貧血の原因検索、目的で依頼を受けた症例より21家系25例の

表2 Enzymatic Properties of G6PD Variants Found in Japan

| Class | Variant | RBC G6PD activity (%) | Electro-phoretic mobility (%) | Km G6P (μ M) | Km NADP (μ M) | Ki NADPH (μ M) | Utilization of 2dG6P dNADP % of G6P, NADP | Heat stability (20 min) | pH optimum | Reference |
|-------|-----------|-----------------------|---|-------------------|--------------------|---------------------|---|-------------------------|------------------------|-----------|
| 1 | Normal B | 100 | 100 | 31~71 | 2.6~6.6 | 4.9~12.9 | 1.6~6.4 | 51~69 | normal | |
| | Tokyo | 4.4 | 90(Tris ^a) 90(TEB ^b) 70(ph ^c) | 65 | 5.5 | normal | 2.5 | 55 | normal | 10 |
| | Tokushima | 3.0 | 100 | 50 | 27.0 | normal | 2.0 | 52 | normal | 10 |
| | Ogikubo | 3.0 | 100 | 47 | 3.0 | 11.5 | 7.5 | 52 | normal | 11 |
| | Kurume | 0.8 | 96(Tris) 92(TEB) | 43 | 5.7 | 1.9 | 5.0 | 66 | biphasic | 12 |
| | Fukushima | 2.8 | 87(ph) 86(Tris) 88(TEB) | 31 | 5.0 | 4.4 | 3.0 | 37 | normal | 12 |
| | Yokohama | 1.9 | 100 | 70 | 6.1 | 2.9 | 4.0 | 63 | normal | 11 |
| | Yamaguchi | 3.5 | 57(Tris) 73(TEB) | 37 | 15.2 | 7.6 | 4.1 | 94 | narrow peak at pH 8.76 | 12 |
| | Wakayama | 4.5 | 48(ph) 89(Tris) 81(TEB) | 46 | 6.5 | 3.2 | 1.7 | 66 | normal | 12 |
| | Akita | 0 | 100 | 33 | 3.3 | 7.9 | 3.7 | 59 | normal | 11 |
| | Gifu | 2.9 | 100 | 48 | 3.1 | 7.1 | 4.8 | 121 | normal | 13 |
| | Kobe | 21.7 | 82(Tris) 89(TEB) | 143 | 4.7 | 8.2 | 4.6 | 80 | acidic | 14 |
| | Sapporo | 3.6 | 100 | 51 | 3.3 | 40.3 | 6.6 | 75 | normal | 14 |
| | Nagano | 5.5 | 123(Tris) 121(TEB) 132(ph) | 28 | 9.1 | 3.1 | 3.0 | 65 | normal | 15 |

(2)

| Class | Variant | RBC G6PD activity (%) | Electrophoretic mobility (%) | Km G6P (μ M) | Km NADP (μ M) | Ki NADPH (μ M) | Utilization 2dG6P dNADP % of G6P NADP | Heat stability (20 min) | pH optimum | Reference | |
|-----------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------|-------------------|----|
| 1 | Sendagi | 8.4 | 97(Tris) | 11 | 4.4 | 15.3 | 8.4 | 142 | 0 | alkaline | 16 |
| | | | 98(TEB) | | | | | | | | |
| | | | 84(ph) | | | | | | | | |
| | Asahikawa | 3.8 | 98(Tris) | 30 | 18.3 | 2.1 | 7.1 | 109 | 9.1 | biphasic | 17 |
| | | | 94(TEB) | | | | | | | | |
| | | | 94(ph) | | | | | | | | |
| 2 | Mediterranean-like | 3.5 | 100 | 20 | 2.1 | — | 12.6 | 180 | 60.3 | slightly biphasic | 6 |
| | | | 100 | 40 | 5.0 | — | 3.4 | 68 | 90.9 | normal | 6 |
| | | | 109(Tris) | 92 | 6.0 | 7.9 | 2.1 | 79 | 27.8 | biphasic | 13 |
| | | | 105(TEB) | | | | | | | | |
| | | | 113(ph) | | | | | | | | |
| 3 | Hofu | 12.1 | 100 | 25 | 5.0 | — | 5.2 | 105 | 89.5 | normal | 6 |
| | | | 25.1 | 51 | 5.6 | 21.0 | 3.1 | 67 | 92.0 | normal | 7 |
| | | | 46.4 | 48 | 6.1 | 17.0 | 2.4 | 53 | 90.0 | normal | 8 |
| | Konan | | 108(Tris) | | | | | | | | |
| | | | 107(TEB) | 41 | 5.9 | 8.7 | 4.5 | 57 | 90.0 | normal | 9 |
| | | | 113(ph) | | | | | | | | |
| | Kamiube | | 108(Tris) | | | | | | | | |
| | | | 107(TEB) | | | | | | | | |
| | | | 112(ph) | | | | | | | | |
| | Kiwa | 45 | 100 | 37 | 3.9 | 7.9 | 3.5 | 53 | 88.0 | normal | 9 |
| 64 | | 102(Tris) | 42 | 6.1 | 8.6 | 5.7 | 68 | 88.0 | normal | 9 | |
| Washington-like | | 103(TEB) | | | | | | | | | |
| | | 105(ph) | | | | | | | | | |
| | 17.5 | 90(Tris) | 32 | 2.3 | 8.3 | 5.1 | 80 | 89.0 | normal | | |
| | | 92(TEB) | | | | | | | | | |
| | | 88(ph) | | | | | | | | | |

a ; Tris-hydrochloride buffer, pH 8.8, b ; Tris-EDTA borate buffer, pH 8.6, c ; phosphate buffer, pH 7.0.

G6PD 異常症を発見し、18種の変異酵素を同定した (Table I, II)。G6PD Tokyo, Tokushima¹⁰⁾, Ogikubo, Yokohama, Akita¹¹⁾, Kurume, Fukushima, Yamaguchi, Wakayama¹²⁾, Gifu¹³⁾, Kobe, Sapporo¹⁴⁾, Nagano¹⁵⁾, Sendagi¹⁶⁾, Asahikawa¹⁷⁾ は、慢性溶血を伴い、Class 1 に属する。これら15種の変異酵素の内、3種が重症の新生児黄疸を伴い、6種で感染後の急性溶血発作、3種で感染ないしは、薬剤投与後に急性溶血発作がみられている。G6PD Mediterranean-like, Ogori⁶⁾, Fukuoka¹³⁾ は、高度の G6PD 活性低下を呈し、Class 2 に属す。G6PD Mediterranean-like と Fukuoka は、薬剤惹起性溶血を伴う。

考 察

われわれが開発したホルマザンリング法によれば、正常の50%活性低下を示す G6PD 異常症の検出は容易であり、さらに乾燥濾紙をデシケーターに保存すれば、室温でも7日、4°C では、30日後も判定可能である。この方法は、従来の G6PD スクリーニング法と比較して(1)手技が非常に簡単であり、(2)反応ゲルは、暗所保存により数ヵ月安定で使用可能であり、(3)検者1人で1日に数百検体と多検体の処理が可能であり、(4)結果の判定が容易で、(5)孵置温度は、室温でも何ら支障はなく恒温槽、分光光度計や、UV ライトなどの特殊な装置は不要であり、マススクリーニングに適した方法となりうる。

今回のわれわれの目的は、大量の検体をスクリーニングすることによってわが国での正確な頻度を知ること、および国内でも南と北とで頻度に差があるかどうかを調査することにあつた。今回の調査では日本人男性4万人以上を検索した結果、頻度は約0.1%であつた。この頻度は東南アジア地域の他の国、例えば中国南部(5.5%)¹⁸⁾, 台湾—ハッカ(5.5%)¹⁹⁾, フィリピン(6.0%)²⁰⁾ の頻度と比較すると非常に低い。日本に近接した東南アジアにおいて、比較的頻度の高い変異酵素である G6PD Mahidol と Canton が、わが国では1例も見出されていない点、さらに鹿児島、沖縄地区での頻度が日本の他の地区より高くない点より考えると、東南アジア地域からわが国への gene-flow は比較的少なかったものと考えられる。ただ韓国での本症の頻度は、0.13%と低く、G6PD Ube の1例が韓国人であつた事は、民族の移動を考える上で興味深い。わが国で同定した変異酵素は G6PD B(-) Chinese を除き、わが国が大陸から分離した後に行った変異と考えられさらにわが国は、温帯に位置しマラリアの浸潤地帯でないために、G6PD 異常症の頻度はこの様な低い頻度になつたものと考えられる。

結 論

Beutler のスポットテストないしは、われわれが開発したホルマザンリング法を用い、日本各地におけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症の頻度調査を行った。男性40,547例検索し、39例の G6PD 異常症を発見し、頻度は約0.1%であつた。WHO の規定に従つて変異酵素の性質を検索し、G6PD Hofu, B(-) Chinese, Ube, Konan, Kamiube, Kiwa, Washington-like と7種の変異酵素を同定した。これらの変異酵素は全て WHO 分類で Class

3に属し、臨床症状を伴わない例であり、G6PD Konan は15家系、G6PD Ube は11家系とわが国においては頻度の高い変異酵素である。さらに、原因不明の溶血性貧血の病因検索により18種の変異酵素を発見した。慢性溶血を伴う Class 1 の変異酵素は、G6PD Tokyo, Tokushima, Ogikubo, Kurume, Fukushima, Yokohama, Yamaguchi, Wakayama, Akita, Gifu, Kobe, Sapporo, Nagano, Sendagi, Asahikawa, の15種、著明な活性低下を示す Class 2 は、G6PD Mediterranean-like, Ogori, Fukuoka の3種である。

最後に、本調査にご協力いただいた日赤医療センター、東京都予防医学協会、札幌医科大学中検、鹿児島大学医学部中検、古波倉内科医院、はじめ関係の諸先生方に感謝します。

文 献

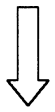
- 1) Carson, P.E., Flanagan, C.L., Ickes, C.E. and Alving, A.S. : Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*, **124** : 484~485, 1956.
- 2) Fujii, H., Nakashima, K. and Miwa, S. : Incidence and characteristics of G6PD deficiency in Japan. *Jpn. J. Hum. Genet.*, **23** : 271~272, 1978.
- 3) Fujii, H., Takahashi, K. and Miwa, S. : A new simple screening method for glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Haematol. Jpn.* **47** : 185~188, 1984.
- 4) Beutler, E. and Mitchell, M. : Special modification of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood*, **32** : 816~818, 1968.
- 5) Report of WHO Scientific Group : Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. WHO Tech. Rep. Ser., **366** : 1~53, 1967.
- 6) Miwa, S., Nakashima, K., Ono, J., Fujii, H. and Suzuki, E. : Three glucose-6-phosphate dehydrogenase variants found in Japan. *Hum. Genet.*, **36** : 327~334, 1977.
- 7) Beutler, E. : Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism. Plenum Medical Book Co., New York, 1978.
- 8) Nakashima, K., Ono, J., Abe, S., Miwa, S. and Yoshida, A. : G6PD Ube, a glucose-6-phosphate dehydrogenase variant found in four unrelated Japanese families. *Am. J. Hum. Genet.*, **29** : 24~30, 1977.
- 9) Nakatsuji, T. and Miwa, S. : Incidence and characteristics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Japan. *Hum. Genet.*, **51** : 297~305, 1979.
- 10) Miwa, S., Ono, J., Nakashima, K., Abe, S., Kageoka, T., Shinohara, K., Isobe, J. and Yamaguchi, H. : Two new glucose 6-phosphate dehydrogenase variants associated with congenital nonspherocytic hemolytic anemia found in Japan : Gd (-) Tokushima and Gd (-) Tokyo. *Amer. J. Hematol.*, **1** : 433~442, 1976.
- 11) Miwa, S., Fujii, H., Nakashima, K., Miura, Y., Yamada, K., Hagiwara, T. and Fukuda, M. : Three new electrophoretically normal glucose-6-phosphate dehydrogenase variants associated with congenital nonspherocytic hemolytic anemia found in Japan : G6PD Ogikubo, Yokohama, and Akita. *Hum. Genet.*, **45** : 11~17, 1978.
- 12) Miwa, S., Fujii, H., Nakatsuji, T., Ishida, Y., Oda, E., Kaneto, A., Motokawa, M., Ariga, Y., Fukuchi, S., Sasai, S., Hiraoka, Kashii, H., Kodama, T. and Miura, Y. : Four new electrophoretically slow-moving glucose 6-phosphate dehydrogenase variants

- associated with congenital nonspherocytic hemolytic anemia found in Japan : Gd (-) Kurume, Gd (-) Fukushima, Gd (-) Yamaguchi and Gd (-) Wakayama. *Amer. J. Hemat.*, **5** : 131~138, 1978.
- 13) Fujii, H., Miwa, S., Takegawa, S., Takahashi, K., Hirono, A., Takizawa, T., Morisaki, T., Kanno, H., Taguchi, T., and Okamura, J. : Gd (-) Gifu and Gd (-) Fukuoka. Two new variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase found in Japan. *Hum. Genet.*, **66** : 276~278, 1984.
 - 14) Fujii, H., Miwa, S., Tani, K., Takegawa, S., Fujinami, N., Takahashi, K., Nakayama, S., Konno, M., and Sato, T. : Glucose 6-phosphate dehydrogenase variants : A unique variant (G6PD Kobe) showed an extremely increased affinity for galactose 6-phosphate and a new variant (G6PD Sapporo) resembling G6PD Pea Ridge. *Hum. Genet.*, **58** : 405~407, 1981.
 - 15) Takahashi, K., Fujii, H., Takegawa, S., Tani, K., Hirono, A., Takizawa, T., Kawakatsu, T. and Miwa, S. : A new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Nagano) associated with congenital hemolytic anemia. *Hum. Genet.*, **62** : 368~370, 1982.
 - 16) Morisaki, T., Fujii, H., Takegawa, S., Tani, K., Hirono, A., Takizawa, T., Takahashi, K., Shinogi, M., Teshirogi, T. and Miwa, S. : G6PD Sendagi : A new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant associated with congenital hemolytic anemia. *Hum. Genet.*, **65** : 214~215, 1983.
 - 17) Takizawa, T., Fujii, H., Takegawa, S., Takahashi, K., Hirono, A., Morisaki, T., Kanno, H., Oka, R., Yoshioka, H. and Miwa, S. : A unique electrophoretic slow-moving glucose 6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Asahikawa) with a markedly acidic pH optimum. *Hum. Genet.*, **68** : 70~72, 1984.
 - 18) Chan, T.K., Todd, D. and Wong, C.C. : Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese. *Br. Med. J.*, **2** : 102, 1964.
 - 19) Lee, T.C., Shih, L.Y., Huang, P.C., Lin, C.C., Blackwell, B.N., Blackwell, R.Q. and Hsia, D.Y.Y. : Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Taiwan. *Am. J. Hum. Genet.*, **15** : 126~132, 1963.
 - 20) Motulsky, A.G., Stransky, E., and Fraser, G.R. : Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, thalassemia, and abnormal haemoglobins in Philippines. *J. Med. Genet.*, **1** : 102~106, 1964.



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



研究目的

グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素(G6PD)異常症は,1956年 Carson らによって発見された伴性遺伝性疾患で,赤血球酵素異常と溶血の関係が解明された最初の赤血球酵素異常症である。本症発見以来,溶血性貧血を生じる遺伝性の赤血球酵素異常症は,全部で16種知られるにいたったが,G6PD 異常症の頻度は世界で最も高く,熱帯亜熱帯地域でその頻度は高いとされている。われわれの従来行ったわが国の頻度調査では0.1%程度と低頻度であったが,これは一部の地域で行った結果にすぎない。

今回,われわれは,濾紙に吸着した血液を用いて,新生児のマススクリーニングにも行いうることが可能なホルマザンリング法を,G6PD 異常症のスクリーニング法として開発し,これを用いて日本各地で頻度調査を行ったので報告するとともに,原因不明の溶血性貧血の検索で発見した G6PD 異常症についても報告する。