

新生児ヘモグロビン変異種をモデルとする 先天異常モニタリングの試み

分担研究者 林 昭
 共同研究者 和田 芳直
 藤田 富雄
 木戸口 公一
 (大阪府立母子保健総合
 医療センター)

先天異常モニタリングの目標を大別すると突然変異原と催奇形原になるが、それぞれの指標として国際的にも広く用いられているのは、表1のごとく、突然変異原については染色体異常症、各種優性遺伝病および各種血液蛋白の構造変異種などが、催奇形原については各種外表奇形群である。したがって、われわれが研究テーマとして取り上げたヘモグロビン (Hb) 変異種は、班計画のなかでは突然変異原モニタリングの指標として位置づけられる。

研究計画のあらまはは昨年度報告書¹⁾ に述べたごとくで、Hb 変異種のマス・スクリーニングと一次構造の解析を2本の柱として取上げて試みが続けられている。

§ 1. 試 料

これまでわが国および欧米諸国を問わず、試料としては臍帯血が広く用いられてきた。しか

表1 先天異常のモニタリング

“突然変異原のマーカー”	“催奇形原のマーカー”
1. 染色体異常症	外表奇型症候群
数の異常	無脳症
構造の異常	水頭症
2. 常染色体優性遺伝病	脊椎披裂症
軟骨形成不全症	口蓋裂症
両側性網膜芽細胞腫	食道閉鎖症
Apert 症候群	直腸・肛門閉鎖症
Marfan 症候群	尿道下裂症
その他	四肢絞扼輪症候群
3. 血液蛋白変異種	その他
ヘモグロビン変異種	
グルコース・6・リン酸脱水素酵素変異種	
トランスフェリン	
α_1 -アンチトリプシン	
その他	

しこの場合には、Hb 変異種を異常 Hb 分子および異常グロビン鎖の両面から解析することができるという利点があるが、試料の採取、搬送、さらに取扱いともに困難である。

これに対して、試料としての濾紙乾燥血は、異常グロビン鎖を解析する新技術の開発を必要とするが、試料の採取、搬送、取扱いが臍帯血とくらべてはるかに容易である。しかも、もし現在わが国において全国的規模で実施されている新生児先天性代謝異常マス・スクリーニングの試料の残りを利用する事ができれば、厚生省の希望するような人口ベースでの突然変異モニタリングも可能である。

幸いにも、この試料利用計画に対する厚生省および大阪府当局の許可も得られたので新しい技術の開発に踏み切った。

§ II. 濾紙乾燥血を試料とする Hb 変異種マス・

スクリーニング法の確立とその試行²⁾

(1) Hb 変異種のマス・スクリーニング法：すでに、昭和57年度研究報告書³⁾ で詳細に述べたように、まず先天性代謝異常マス・スクリーニングに使用した残りの濾紙乾燥血から 3 mm 径のディスクを切り抜き、8M 尿素存在下でグロビン蛋白を抽出し、等電点電気泳動により分離した後、最終的に異常グロビン鎖の検出を行なった。

試行の過程で、西ドイツにおいても Altrand らが新生児代謝異常マス・スクリーニングに用いられる濾紙乾燥血を利用して Hb 変異種マス・スクリーニングをおこなっていることを知ったが、用いられた方法は本質的に我々と全く同じであった。

(2) 大阪府における新生児 Hb 変異種マス・スクリーニングの成果：昭和58年9月以降大阪府で出生したほぼすべての新生児について試行が行なわれているが、昭和61年1月末現在でその数は140,000人を超え、見出された変異種の数も119に達している。その内訳は、表2のごとく α 鎖変異種28 (約1/5,000)、 γ 鎖変異種91 (約1/1,500) で、欧米諸国でのこれまでの成績と比較して γ 鎖変異種の数が多いことが特徴である。

β 鎖変異種については、昨年度も報告したごとくまだ見出されていないが、その理由としては、量が少なく、修飾、あるいは変性物質による妨害を受けて見落されたためと考えている。

(3) Hb 変異種マス・スクリーニングの運営経費の試算：表に示すごとく、装置、試薬など

表2 大阪府における新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニング

検査した試料の数：	140,597
検出したヘモグロビン変異種の数：119	
α 鎖変異種：	28 (1/5,000)
β 鎖変異種：	0
γ 鎖変異種：	91 (1/1,500)
δ 鎖変異種：	0

表3 大阪府における新生児ヘモグロビン変異種の
マスキューニングの実施

○装置
分析用等電点電気泳動システム (Bio-Rad 社)
電気泳動装置
等電点電気泳動用キット
電圧発生装置
スラブゲル乾燥装置
○試薬
pH 勾配形成試薬 (アンフォライト)
尿素
メルカプトエタノール
N, N'-メチレン-ビスアクリルアミド
過硫酸アンモニウム
N, N-N', N'-テトラメチルエチレンジアミン
トリクロール酢酸
クマジーブルーR-250
アクリルアミド
○検査技師: 非常勤技師1人
1,800試料/毎週
○運用経費
人件費を含めて1試料当たり約20円

はごくありふれたものを使用し、非常勤技師1人を雇って1,800試料/週のペースでスクリーニングがすすめられている。運営経費も現在では人件費を含めて1試料当たり20円以下にまで下げることができた。

§ III. 濾紙乾燥血を試料とする γ 鎖変異種の

構造解析法の確立とその試行

遺伝子変異の結果その支配下にある蛋白質におこる最も普遍的な変化は単一のアミノ酸置換であり、そのおこる場所、あるいは置換するアミノ酸の種類により臨床症状の有無が決まる。上述のスクリーニングで見出された Hb 変異種の大部分は、このようなアミノ酸置換の結果等電点が変わったためにスクリーニングされたものである。したがって、見出された変異種がどのような種類のアミノ酸置換を有するかを決める事は、マス・スクリーニングの内容を一気に分子レベルにまで引き上げると共に、突然変異原のモニタリングを含めて突然変異の意義を理解し、さらに患児に対する医療の必要性を決定する上にもきわめて重要である。

(1) マス・スクリーニングで見出された Hb 変異種の構造解析法⁴⁾: 現状からみて患児及びその両親との接触が困難であるという前提の下に、残された濾紙乾燥血を利用する超微量構造解析法の開発が要求された。そこで我々が着目したのは質量分析法の導入で、その結果、従来から広く用いられてきたフィンガープリント法や高速液体クロマトグラフィー法にかわる指数プリント (digit print) 法が開発された。この方法では、グロビン鎖の各トリプシン分解ペプチドがそれぞれピークとして現われ (図1参照)、変異グロビンの場合には特定のピークが

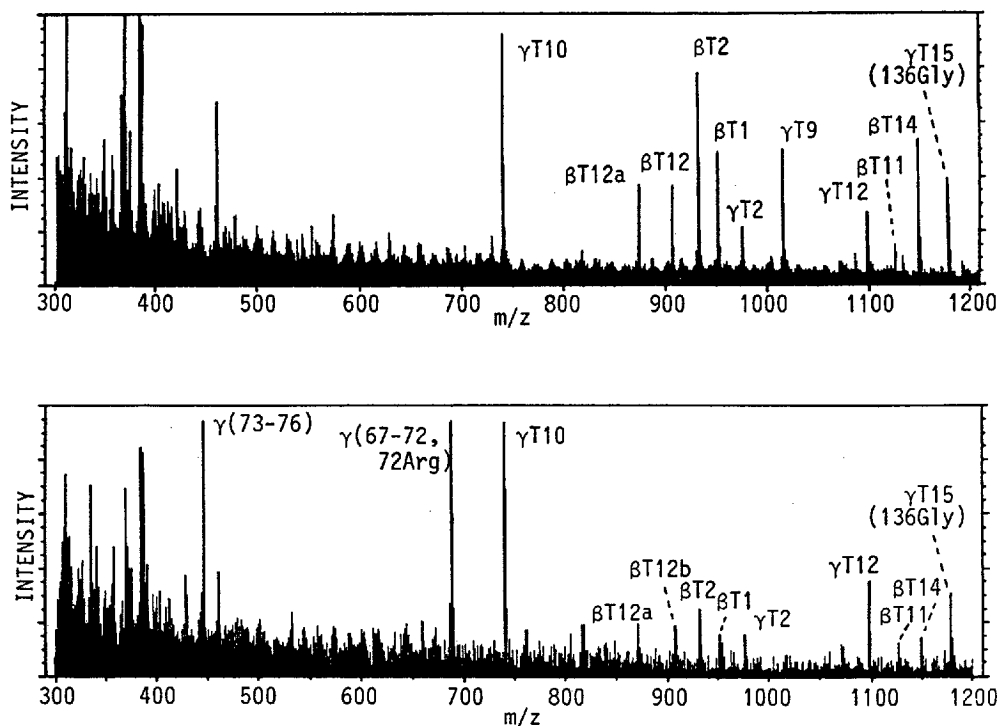


図1 Hb F Minoo の異常 γ 鎖の指数プリント

アミノ酸配列番号	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	MW	m/z
HbF γ T9	Val	Leu	Thv	Sev	Leu	Gly	Asp	Ala	Ile	Lys	1015	1016
γ (73-76)						↓	Asp	Ala	Ile	Lys	445	446
γ (67-72 Arg)	Val	Leu	Thv	Sev	Leu	Arg					687	688
Hb F Minoo γ T9	Val	Leu	Thv	Sev	Leu	<u>Arg</u>	Asp	Ala	Ile	Lys	1114	1115

図2 正常および異常 (Hb F Minoo) γ T9 の一次構造

消失し新しいピークとおきかわる。したがって、これらピークの質量数の差が置換したアミノ酸残基の質量数の差を正確に表現する。このように、指数プリント法は従来の方法と較べて表現が正確なだけでなく感度が著しく高く、現在では濾紙乾燥血の 3 mm 径ディスク 1 枚で構造決定が可能なのである。

図1は、この方法により一次構造の異常が決定された新しい γ 鎖変異種 Hb F Minoo の指数プリントである。少量の正常 β 鎖を混じてはいるが、正常 γ 鎖と異常 γ 鎖の指数プリントを比較して最初から目につくのは、 γ T9 (m/z, 1016) の消失と、m/z, 446および688に出現した新しいピークであった。この事実は、図2に示す γ T9 のアミノ酸配列のどこかでリジン、又はアルギニン残基の導入を含む新しいアミノ酸置換がおり、その結果トリプシンによる分解を受けた可能性を強く示すものである。そこで、C末端側から分子量を計算してみると、 γ 73 Asp~ γ 76 Lys のペプチドが m/z 446 のピークに相当することが明らかになり、

表4 指数プリント法により構造の決定された γ 鎖変異種
(65例を解析)

Hb F Yamaguchi	: A γ T 80 Asp→Asn	: 40例
Hb F Fuchu*	: G γ 21 Glu→Glu	: 4例
Hb F Kotobuki (Izumi)	: A γ I 6 Glu→Gly	: 1例
Hb F Minoo*	: G γ 72 Gly→Arg	: 1例
Hb F Iwata	: A γ I 72 Gly→Arg	: 2例
未決定	:	: 17例
計		65例

* 新変異種

もう一つの m/z 688 のピークは、72 γ Gly が Arg に置換することにより生ずる67 γ Val ~72 γ Arg のペプチドに一致した。したがって、Hb F Minoo は G γ 72 Gly→A γ g という構造を有する新しい γ 鎖変異種で、すでに報告されている Hb F Iwata (A γ I 72 Gly→Arg) とは遺伝子は異なるが全く同一のアミノ酸置換を有する変異種であった。

(2) 大阪府で見出された γ 鎖変異種：表4に示すごとく、上述の指数プリント法により65種類の γ 鎖変異種が調べられた。その結果特筆すべきことは、Hb F Yamaguchi という特定の変異種が約3%を占め、大阪府で出生する新生児にみられる γ 鎖変異種の普遍種 (common variant) であることが明らかになった。現在ではこの変異種は大阪府というよりは日本人新生児にみられる γ 鎖変異種の普遍種であると考えられている。さらに、Hb F Fuchu が4例、Hb F Kotobuki が1例、Hb F Minoo が1例、Hb F Iwata が2例見出されており、この中で Hb F Fuchu と Hb F Minoo はこれまでに報告されたことのない新しい γ 鎖異種であった。

§ IV. 考 按

(1) 試料としての濾紙乾燥血の利用について。

欧米諸国で始まった濾紙乾燥血を試料とする新生児先天性代謝異常マス・スクリーニングは、わが国でも調査研究に引き続き昭和52年より国の手でフェニルケトン尿症 PKU など5疾患についてマス・スクリーニングが開始され、現在ではわが国で生まれる新生児のほとんどすべてをカバーするに至っている。

これに続いて、この貴重な濾紙乾燥血を上記5疾患以外の疾患を対照とするマス・スクリーニングに応用する調査研究が始められ、クレチン症、先天性副腎皮質過形成、尿素サイクル代謝異常症、G-6-PD 異常症、高コレステロール血症などや、今回の Hb 変異種などがその対象として選ばれた。このなかから、まずクレチン症のマス・スクリーニングがその有効性を認められて昭和55年から国の事業として取り上げられ、また、先天性副腎過形成についてもいずれも近い将来日の目を見ようとしている。

このように、濾紙乾燥血の有効な利用は調査研究レベルでは Hb 変異種だけでなく数多くの対象について試みられており、しかもクレチン症のごとく正式に国の事業として取り上げられる例も出ている。

(2) 新生児 Hb 変異種のマス・スクリーニングから期待される効果。

現在国がマス・スクリーニングの対象として取り上げている先天性代謝異常症およびクレチン症は、前者は遺伝性疾患、後者は一種の先天奇型とそれぞれ原因を異にするが、いずれも患児の治療を目標として選ばれた。これに対して Hb 変異種の場合には、患児の医療目標もさることながら突然変異原モニタリングのマーカーとして選ばれたものである。

イ 突然変異原モニタリングへの期待：前述のごとく、われわれの開発した Hb 変異種のマス・スクリーニング法は、方法論的にはほぼ完成されたものである。すなわち、量的には、操作が容易で十分な数をこなすことができ、疫学的に人口ベースでの解析を可能とし、質的にも信頼度が高く、分子レベルでの情報を得ることができ、さらに経済的にも十分採算のとれる方法である。したがって、突然変異原モニタリングの基礎資料となる突然変異率の算定を容易に行うことができる。特に、Hb 変異種は国際的に最も普遍的なマーカーであるため、最近ソ連で起った原子力発電所の事故の様な場合には、突然変異原としての放射性物質のモニタリングを国際的なネットワークの下で監視することも可能である。

ロ 臨床症状を呈する異常 Hb 症は ?：今回の Hb 変異種のマス・スクリーニングと、国で実施している先天性代謝異常マス・スクリーニングとの本質的な違いは、目標とする物質が前者は蛋白質であるのに対し後者は代謝物であるという点にある。今ここでどちらがいいかを論ずるつもりはないが、蛋白質を目標とする方が質的にはるかにすぐれていることは言うまでもない。例えば、PKU の場合、本来目標とする疾患は古典的な PKU (フェニールアラニン水酸化酵素欠乏症のホモ接合体) であるが、方法論的にガスリー法は血中のフェニールアラニン濃度の高くなる疾患をすべてスクリーニングするはずで、似て非なる PKU がひっかかってきても何ら不思議ではない。事実、PKU とは治療法の全く異なる各種高フェニールアラニン血症患児がこのマス・スクリーニングで見出されて話題を呼んでいる。さらに、PKU にも Hb 変異種と同様に多くの変異種が存在するはずであるが、方法論、特に感度の問題から重篤な病気をおこす患児のみがスクリーニングされる様になっており、境界領域にある患児や病気をおこさない変異種をもつ新生児はこの方法では見出されない。

一方、蛋白質を目標としてスクリーニングする Hb 変異種の場合には、病的な臨床症状を呈する患児から、全く健康な新生児までもの中広い範囲の変異種が含まれる⁹⁾。例えば、これまで400種類以上も見出されている成人の Hb 変異種では、その大部分は無症状であるが、残る20~30%は病的な臨床症状を伴っており、有名な鎌型赤血球貧血症はその最も重篤な変異種の代表で、成人になるまでに大部分が死亡する。これら病的な臨床症状の大部分は溶血性貧血で、鎌型赤血球貧血のごとく重篤なものから軽症のものまであり時には感染や薬剤などの化学物質により誘発される溶血性貧血もある。このような成人 Hb 変異種についての情報はそ

のまま新生児 Hb 変異種についても当てはまると考えられるが、周産期分野の臨床研究の貧困さを反映してか新生児 Hb 変異種に関する知見はきわめて乏しい。しかし、われわれ自身の経験した貴重な 1 例は⁶⁾、出生後重篤な新生児黄疸を呈し、交換輸血により脳性麻痺の原因となる核黄疸を免がれた。

したがって、新生児 Hb 変異種のマス・スクリーニングは、これら臨床症状を伴う患児を早期に医療レベルにのせることができる。

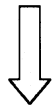
(3) 新生児 Hb 変異種をめぐる問題点。

以上述べたごとく、現在大阪府における新生児 Hb 変異種のマス・スクリーニングは順調に進められてきたが、これを突然変異原のモニタリングに発展させる道は残念ながら現在のところ閉ざされている。その理由は、特定のグループから提起されたプライバシーをめぐる声からんで、行政当局が我々とスクリーニングされた新生児及びその両親との接触に同意しないからである。すなわち、この接触がなければ見出された Hb 変異種が両親から直接伝えられたものか、あるいは突然変異により新しく出現したものかを区別する事はできない。さらに重要なことは、一部の医療を必要とする患児がそのまま放置されている可能性もある事で、臨床医としては誠にやり切れない気持である。

これは、わが国には鎌型赤血球のごとく重篤な臨床症状を伴う Hb 変異種が少ないというところもあって、Hb 変異種に関する一般的な知識と関心が乏しいからとも考えられるが、今後国際交流もますます盛んになりつつある折柄、当局の一層の御理解をお願いする次第である。

文 献

- 1) 林 昭, 和田芳直, 藤田富雄, 木戸口公一: 大阪府における新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニング, 厚生省「先天異常のモニタリングに関する研究」昭和59年度研究報告書, p. 15~19.
- 2) Wada, Y., Fujita, T., Kidoguchi, K. and Hayashi, A.: Fetal hemoglobin variants in 80,000 Japanese neonates: high prevalence of Hb F Yamaguchi ($A\gamma T 80 Asp \rightarrow Asn$). *Human Genetics* 72: 196~202, 1986.
- 3) 林 昭, 和田芳直, 藤田富雄, 木戸口公一: 新生児異常ヘモグロビン症のマス・スクリーニング; 方法の確立とその試行, 厚生省「先天異常のモニタリングに関する研究」昭和57年度研究報告書, p. 113~119.
- 4) Wada, Y., Hayashi, A., Fujimura, M., Katakuse, I., Ichihara, I., Nakabushi, H., Matsuo, T., Sakurai, T. and Matsuda, H.: Characterization of a new fetal hemoglobin variant. Hb F Izumi $A\gamma 6 Glu-Gly$, by molecular secondary ion mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 749: 244~248, 1983.
- 5) 林 昭: 異常ヘモグロビン, 岩波講座現代生物科学 16「代謝異常」(山村雄一編), p. 1~41, 1975.
- 6) Hayashi, A., Fujita, T., Fujimura, M. and Titami, K.: A new abnormal fetal hemoglobin, Hb F-M-Osaka ($\alpha_2 \gamma_2^{63} His-Tyr$). *Hemoglobin*, 4: 447~448, 1980.



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



先天異常モニタリングの目標を大別すると突然変異原と催奇形原になるが、それぞれの指標として国際的にも広く用いられているのは、表1のごとく、突然変異原については染色体異常症、各種優性遺伝病および各種血液蛋白の構造変異種などが、催奇形原については各種外表奇形群である。したがって、われわれが研究テーマとして取り上げたヘモグロビン(Hb)変異種は、班計画のなかでは突然変異原モニタリングの指標として位置づけられる。

研究計画のあらましは昨年度報告書に述べたごとくで、Hb 変異種のマス・スクリーニングと一次構造の解析を2本の柱として取上げて試みが続けられている。