

Biotinidase 欠損症 マスクリーニング法の研究

成瀬 浩¹⁾, 鈴木恵美子²⁾, 熊田淳子¹⁾, 浜中広健³⁾, 吉田篤子³⁾

1) 国立武蔵療養所神経センター 2) 日本公衆衛生協会 3) 千葉県予防衛生協会

〔目的〕

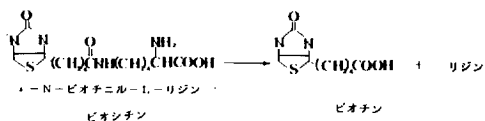
最近、アメリカのWolfらにより、遅発型のMultiple carboxylase deficiencyがbiotinidaseの欠損により引き起こされることが明らかになり、この疾患をBiotinidase欠損症と呼ぶようになった。本疾患では、出生直後から酵素活性の異常が認められるが、実際には、発見が遅れ、不可逆的な脳障害を示す例もある。しかし、早期に発見できれば治療は可能であり、外国の例では、発生頻度も1～数万人に1人とされている。我が国における発生頻度などはまだ不明であり、スクリーニングの必要性についても今後の検討が必要であるが、今回予備的研究を行ない、一般新生児検体にも応用したので報告する。

Biotinidase欠損症は、常染色体劣性遺伝であり、遅発型のMultiple carboxylase deficiencyとも呼ばれている。臨床症状は、第1表に示した通りである。生後3週から5年位の間に発症するが、この症状の発現は、患者により程度がさまざまであり、臨床的に容易に診断できるものばかりではない。この疾患は、biotin（ビタミンH）の大量投与による治療が有効であるが、早期に正確に診断され、早期に治療が開始されないと、不可逆的な脳障害の残る場合がある。

第1図には、biotinidaseの作用について説明した。Biotinidaseは、biotinをcarboxylase

第1表 Biotinidase 欠損症

- ・常染色体劣性遺伝
- ・遅発型の Multiple Carboxylase Deficiency
- ・臨床症状
 - ケトアシドーシス、有機酸血症、発達の遅れ
 - 皮膚あれ、結膜炎、脱毛、運動失調
- 生後3週間 ~ 5年で症状発現
- ・治療
 - ビオチン投与
- ・頻度
 - 1/10,000 ~ 1/40,000



ビオシチンをビオチンとリジンに加水分解する酵素。

生成されたビオチンは、体内でmultiple carboxylaseの補酵素として、再利用される。(通常食物中のビオチンのみでは不足)

存在：肝臓、腎臓、腸、血清。

第1図 Biotinidase

また、血液濾紙検体を室温に1か月以上放置しても、酵素活性は認められているし、また、発色の弱い検体でも、患者の検体および酵素活性を失活させた検体と比較すると、明らかな紫の呈色があった。

これらの事は、この検査の疑陽性率が少なく、また、濾紙上の酵素が安定ということを示している。

以上のように、酵素活性の有無を検査する biotinidase 欠損症のスクリーニングは、実施可能と考えられ、また、酵素蛋白自体を測定する RIA, EIA 法の開発も可能と思われる。

現在、バージニア州や、その他のアメリカの数か所では、実際の新生児スクリーニングが行なわれており、患者も発見されている。今後、我が国で、この疾患がどの程度の発生頻度をもつかを調べ、もし、この患者の存在することが確認されたならば、スクリーニングの開始について検討することが必要と考えられる。

最後に、貴重な症例の血液濾紙をお譲りいただいた、Medical College of Virginia の Barry Wolf 先生に深謝いたします。

〔文献〕

1. Barry Wolf et al.: Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 131 273-281 (1983)
2. Gregory S. Heard et al.: A screening method for biotinidase deficiency in newborn. *Clinical Chemistry* 30 125-127 (1984)

第2表 一般新生児検体検査総数

被検査者総数:	22,091人
発色の弱い者	----- 339人 (1.53%) *
発色の極弱い者	----- 16人 (0.07%) **

- * 3 皿ディスク2枚で再検査して総て正常
- ** 15人はディスク2枚で再検して正常となった。
1人は再採血して検査し、正常と判定した。

から遊離させる酵素であり、実際には、biocytin を biotin と lysin とに加水分解する。この biotin は、体内で multiple carboxylase の補酵素として再利用される。

〔方法〕

第2図には、biotinidase 活性の測定法の原理および操作方法を示した。

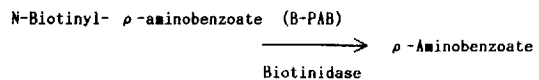
原理としては、N-biotinyl-*p*-aminobenzoate (以下B-PABと略)が、biotinidase により、*p*-aminobenzoate に分解されるので、これをジアゾ色素化し、546nm で比色定量あるいは肉眼判定するものである。

検体としては、血液濾紙検体を用いた。

操作方は、まず3mmディスク1枚に、B-PAB 試薬(Wolfらの方法により合成)を30μℓ 加え、37℃で16時間反応させる。その後、30%のTCA 30μℓ で反応を停止させ、3分間隔にてNaNO₂, ammonium sulfamate, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride を各30μℓ ずつ加えジアゾ色素化する。判定は、試薬を入れてから10分後に肉眼で行なう。Biotinidase 活性があれば、反応液は紫色を呈し、活性が無いかまたは極めて弱い場合には、むぎわら色を呈する。判定の対照としては、Wolfより送られた、この疾患者の血液を用いた。なお、この反応には、ディンプルトレイ、マイクロタイターウエル、小試験管などが使用できる。

〔結果と考察〕

第2表には、実際に、一般新生児について検査した結果を表した。総数22,091人のうち、発色の弱いものが339人(1.53%)、発色の極弱いものが16人(0.07%)であった。発色の弱いもの、および発色の極弱いものについては、3mmディスク2枚を用いて再検査を実施したところ、1人を除いて正常であった。この1人は、ポイトラー法の検査でも活性が無いため、再採血を依頼し、再採血検体で再検査したところ、ポイトラー法は正常、biotinidase活性も正常であった。その後の調査でこの方の第1日目採血検体については、採血後の乾燥および保存に問題があったようである。現在実施されているカスリー法の採血と郵送状態では、極端な活性低下は考えられない。



〔操作方法〕

- | | | |
|----|------------------------------------|--------------|
| 1) | 3 mm disc | 1枚 |
| | 150 μM B-PAB | 30 μℓ |
| | 50mM Phosphate Buffer PH6.0 | |
| | 5mM EDTA | |
| | 37℃にて一夜放置 | |
| 2) | 10% TCA | 30 μℓ |
| 3) | 14.5mM Sodium nitrite | 30 μℓ |
| | 43.8mM Ammonium sulfamate | 30 μℓ |
| | 3.86mM N-1-Naphthylethylenediamine | 30 μℓ |
| | dihydrochloride | |
| | すべて3分間隔で加える | |
| 4) | 10分後に肉眼判定 | purple color |
| | | 546nmにて比色も可能 |

第2図 原理と操作方法



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



〔目的〕

最近,アメリカのWolfらにより,遅発型のMultiple carboxylase deficiencyがbiotinidaseの欠損により引き起こされることが明らかになり,この疾患をBiotinidase欠損症と呼ぶようになった。本疾患では,出生直後から酵素活性の異常が認められるが,実際には,発見が遅れ,不可逆的な脳障害を示す例もある。しかし,早期に発見できれば治療は可能であり,外国の例では,発生頻度も1~数万人に1人と言われている。我が国における発生頻度などはまだ不明であり,スクリーニングの必要性についても今後の検討が必要であるが,今回予備的研究を行ない,一般新生児検体にも応用したので報告する。