

# メープルシロップ尿症の遺伝的異質性

犬童康弘, 遠藤文夫, 赤泉 泉, 松田一郎

(熊本大小児科)

## 研究目的

メープルシロップ尿症(以下MSUD)には臨床的に5つの表現型が存在することが知られている。今まで、MSUD患者由来の皮膚線維芽細胞について、intact cellを用いたり、disrupted cellを用いたりして、分岐鎖ケト酸脱水素酵素(以下BCKDH)の速度対基質濃度曲線の kinetics を調べてあるが、いずれも高い基質濃度を用いてあり、精製酵素のKm値に近い低濃度の範囲まで調べた報告は少ない。しかも、従来の報告は、古典型、サイアミン反応型の症例を中心に調べてあるが、間歇型および中間型に対する詳細な検討はない。さらに、我国で、新生児マススクリーニングにより発見されたMSUDの症例の中には、必ずしも5つの表現型に当てはまらないものが存在することも指摘されている。

そこで、我々は皮膚線維芽細胞ではなく、EB virusにより株化したMSUD患者由来のリンパ芽球を用い、以前報告されているよりも低濃度の基質を用いてBCKDHの kinetics を調べ、臨床表現型との相関について検討してみた。

## 研究方法

### 【対象】

患者は1例を除いて全て新生児マススクリーニングによりMSUDと診断された。患者の臨床経過については、アンケートを各医療施設に送付し、回答してもらった。また、古典型の患者に由来する細胞(GM 1366 : A<sub>1</sub>)を米国細胞バンクより購入した。

### 【細胞培養】

MSUD患者由来のリンパ球は、EB virusとインキュベーションすることにより株化した。3～4日間毎にsubcultureし、stationary phaseに達した細胞のうち、viability 90%以上のものを、PBSにより2回洗浄後、-70°Cにて凍結保存した。

### 【BCKDH活性の測定】

BCKDHの活性は、Chuangらの方法<sup>1)</sup>に準じ、基質として<sup>14</sup>Cにてラベルした $\alpha$ -ketoisovaleric acid(以下KIV)を用い、酵素液として凍結融解した細胞を用いて測定した。

## 研究結果

### 【MSUD患者の臨床経過】

表1は、臨床経過をまとめたものである。R.F.以外は全て、新生児マススクリーニングに

より診断されている。

R. F. はスクリーニング開始以前に出生した症例で、間歇的にケトアシドーシス発作を起こし、2歳時にMSUDと診断された。それ以後、タンパク制限にて維持され、感染時に時

々急性発作を起こして輸液療法を受けていた。しかし、10歳時になる現在では、食餌制限は必要なく、また血中アミノ酸等も正常である。このことから、R. F. は間歇型MSUDと考えられる。

K. F., K. S. は、新生児期に古典型に相当する症状が認められ、腹膜透析等にて加療された。しかし、乳幼児期には、タンパク制限のみで維持療法が可能であることと、血中アミノ酸値は正常もしくは、軽度上昇しているにすぎないこと、および感染などに伴ない急性発作が誘発されることなどから、むしろ間歇型MSUDと考えた方がよいと判断されている。

Y. O., T. Ho., およびR. D. もマススクリーニングにより診断されたが、特に症状を認めず、血中ロイシン値も、軽度上昇しているのみであった。以後は、古典型で言われている程、厳密な食餌制限も必要でないが、常に軽度から中等度の血中ロイシン値の上昇が認められる。時々、食欲低下と検査上、軽度のアシドーシスが認められるが、あきらかに急性発作と言える激しい症状はみられないことから、いわゆる中間型MSUDに相当するものと考えられる。

T. H. は、新生児期、古典型の症状があり、交換輸血・腹膜透析などにより救命され、その後は、食餌療法などにより順調な精神発達を示している。感染時など、ataxia等の症状が出現することはあるが、従来、古典型と言われている症例に比し、タンパク摂取に対する耐容性は高く、新生児期以後は、発熱・下痢に伴なり軽度の発作が年に2～3回程度あり、中間型と間歇型の両者の性質をもっていると考えられる。

E. K. も新生児期、古典型に相当する重篤な症状が認められた。しかし、その出現時期は生後3週間を過ぎており、実際に腹膜透析などの治療を開始されたのは、生後26日目と従来、古典型で言われている発症時期より遅いようである。以後、E. K. はアミノ酸制限にもかかわらず、常に、血中ロイシン高値が認められる。しかしながら、急性発作に相当する症状は認められない。このことから、E. K. は、古典型と中間型の両者の性質を兼ね備えている。

いずれの症例においても、臨床的・生化学的にE<sub>3</sub>欠損は認められず、Scriverらの症例<sup>4)</sup>のような典型的なサイアミン反応型MSUDも含まれていない。

### 【 BCKDHの kinetics 】

BCKDHの速度対基質濃度の kinetics は、インキュベーション時間および加えたタンパク量

表1 MSUDの臨床表現型とBCKDHの kinetics の関係

Pt	Tentative Diagnosis in the Neonatal Period	Final Diagnosis	Kinetics of BCKDH
K.F.	Classical	Intermittent	Hyperbolic (H <sub>1</sub> )
K.S.	Classical	Intermittent	Hyperbolic (H <sub>1</sub> )
T.H.	Classical	Intermittent or Intermediate	Hyperbolic (H <sub>2</sub> )
R.F.	—	Intermittent	Hyperbolic (H <sub>1</sub> )
E.K.	Classical	Intermediate or Classical	Sigmoid (S <sub>1</sub> )
Y.O.	Intermediate	Intermediate	Sigmoid (S <sub>1</sub> )
T.Ho.	Intermediate	Intermediate	Sigmoid (S <sub>1</sub> )
R.D.	Intermediate	Intermediate	Sigmoid (S <sub>1</sub> )
MSUD A <sub>1</sub>	Classical	Classical	Sigmoid (S <sub>2</sub> )

と酵素活性との間に直線性が認められるところで求めた。

正常対照者由来の細胞を用いた kinetics は KIV 0.05 ~ 2.0 mM の範囲で Michaelis-Menten の式に従う hyperbolic curve であった。Vmax は 13 ~ 15 nmol/mg · hr, Km は 0.05 ~ 0.06 mM であった。

一方, MSUD 患者由来の細胞を用いて kinetics を求め

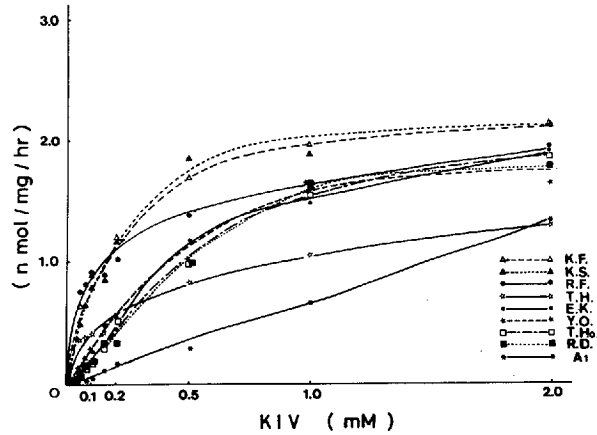


図1 MSUD患者のBCKDH (kinetics)

ると, 図1のごとく, 大きく4つのタイプが得られた。すなわち, (H<sub>1</sub>): hyperbolic kinetics を取るもの, (H<sub>2</sub>): hyperbolic であるが (H<sub>1</sub>)より Vmax が低いもの, (S<sub>1</sub>): sigmoid kinetics を取るもの, (S<sub>2</sub>): sigmoid であるが, (S<sub>1</sub>)より K<sub>0.5</sub> が大きいもの, 以上4つのタイプである。

(H<sub>1</sub>)には, K.F., K.S., R.F. が属し, (H<sub>2</sub>)には, T.H. が, (S<sub>1</sub>)には, E.K., Y.O., T.Ho., R.D. が, (S<sub>2</sub>)には A<sub>1</sub> が, それぞれ属する。A<sub>1</sub> は, 米国の古典型患者由来の細胞株である。(H<sub>1</sub>)および (S<sub>1</sub>)に属する各1例については, KIV 5.0 mMでの活性についても調べたが, 2.0 mMでの活性と差がなかった。

0 ~ 0.1 mMの KIV は, 正常細胞 BCKDH の Km 附近に相当する濃度であるが, その範囲での活性を比較してみると, (H<sub>1</sub>)に属する K.F., K.S., R.F. は正常対照の 6.4 ~ 10% の活性がみられ, (H<sub>2</sub>)に属する T.H. は, 4.5% の活性がみとめられる。(S<sub>1</sub>)に属する E.K., Y.O., T.Ho., R.D. の残存活性は, 1.5 ~ 3.2% しかなく, タイプ (S<sub>2</sub>)に属する A<sub>1</sub> にいたっては, ほとんど 0 に近いものであった。

このように, 正常の BCKDH の Km 値に近い, 低い基質濃度では, 各タイプに明らかに残存活性の差が認められる。しかし, 基質濃度が上昇するに従い, 各タイプ間の活性の差は著明ではなくなり, 2.0 mM では, すべて正常の 9 ~ 15% の範囲にはいる。

#### 【MSUD 患者の臨床型と BCKDH の kinetics の比較】

間歇型の K.F., K.S., R.F. は, hyperbolic kinetics を取り, 中間型の Y.O., T.Ho., R.D. は, sigmoid kinetics を取り, そして古典型の A<sub>1</sub> は中間型とは異なる sigmoid kinetics を取る。これを, 正常 BCKDH の Km 附近での残存活性に置きかえてみると, 間歇型 > 中間型 > 古典型の順で高い。

先に, T.H. は臨床経過から中間型と間歇型の間に位置すると考えたが, このことを反映するように, BCKDH の kinetics は, 間歇型の kinetics とは異なる hyperbolic type であり, Km 附

近での活性は、中間型と間歇型の間にある。

また、E.K.は古典型と中間型の両者の性質を備えている症例と考えたが、kineticsは中間型のそれと同じであった。新生児期の発症が遅いこと、およびそれ以後は、発作を起こさないことなどから、E.K.は、古典型と中間型の間に位置しながら、より中間型に近い症例と言えるかもしれない。

## 考 按

これまで、MSUDの表現型やタンパク摂取耐容量と、intact cellを用いアミノ酸を基質に測定したBCKDHの残存活性の中に相関があることが知られている<sup>3</sup>。しかし、中間型と間歇型の臨床症状の違いを、残存酵素活性だけからうまく説明した報告は少ない。我々は、BCKDHのkineticsを調べ、古典型、中間型、間歇型が、それぞれ異なるkinetic patternを取ることを示した。しかも、正常のKm附近で測定した残存活性が三者間に明らかに差が認められ、間歇型>中間型>古典型の順であった。動物実験を用いた系で、臓器中の分岐鎖ケト酸濃度がBCKDHのKmを越すことは稀であること<sup>4</sup>、さらに、MSUD患者由来の線維芽細胞に、ロイシンを負荷して対応するケト酸の細胞内濃度を測定してみても、正常細胞との間に差が認められるのは、負荷する濃度を非常に高くした時のみであること<sup>5</sup>などから、ミトコンドリア内のBCKDHは、実際は、比較的低い基質濃度にて機能している可能性がある。それゆえ、比較的低濃度のケト酸を基質としてdisrupted cellを用いて測定したBCKDH活性と、従来どおり、アミノ酸を基質にintact cellを用いて測定したBCKDH活性が相関すると考えられる。

MSUDの表現型と、BCKDHのkineticsとの相関について述べてきたが、もちろん例外的な症例も存在する。しかし、そのような例の臨床経過も、BCKDHのkineticsから、大まかに説明できるのではないかと考えられる。MSUDの表現型は、すべて典型的病型に分類されるのではなく、実際の临床上は、重症のものから比較的軽度のものまで、連続的なスペクトルを示しているのかもしれない。さらに同一のkineticsをとるものでも、臨床像は環境因子(タンパク摂取量、治療、感染など)により修飾されるため、一見、異なっているように考えられる可能性もある。

ところで、新生児期の症状に基づく病型分類は、必ずしも十分とは言えない。なぜなら、新生児期の重症度と、乳幼児期の重症度が必ずしも一致しない例が存在するからである。特に、新生児期は重篤な症状を示した例の中に、その時期を適切な治療で乗りきると、以後はタンパク制限のみ、もしくは、軽度のアミノ酸制限だけで治療することが可能で、全く正常に発達する例もあるからである。同じようなBCKDHのkineticsを示しながら、正常に発達するものと、そうでないものが認められるのは、新生児期の急性発作とその早期治療とに関連していると考えられる。

欧米では、MSUDは早期発見しても治療困難で死亡率が高いと判断され、スクリーニングの対象に入れていない国もある中で、我国の成績はそれを否定し、マススクリーニングの有効

性を増した点で、その成果は大きいと思われる。

最後に、MSUD患者のリンパ球の送付およびアンケートの記入に、御協力いただいた久留米大、京都府立医大、奈良県立医大、東京女子医大、国立岡山病院、鹿児島大、熊本市民病院の諸先生方へ深謝いたします。

## 文 献

- ① Chuang et al. Biochem. J. 200 : 59 - 67, 1981.
- ② Scriver et al. Lancet 1 : 310 - 312, 1971.
- ③ Dancis et al. J. Pediatr 81 : 312 - 320, 1972.
- ④ Livesey et al. Biochem. J. 188 : 705 - 713, 1980.
- ⑤ Wendel et al. Biochem. Med. 31 : 294 - 302, 1984.



## 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

メープルシロップ尿症(以下 MSUD)には臨床的に5つの表現型が存在することが知られている。今まで,MSUD 患者由来の皮膚線維芽細胞について,intact cell を用いたり,disrupted cell を用いたりして,分岐鎖ケト酸脱水素酵素(以下 BCKDH)の速度対基質濃度曲線の kinetics を調べてあるが,いずれも高い基質濃度を用いてあり,精製酵素の $K_m$ 値に近い低濃度の範囲まで調べた報告は少ない。しかも,従来の報告は,古典型,サイアミン反応型の症例を中心に調べてあるが,間歇型および中間型に対する詳細な検討はない。さらに,我国で,新生児マススクリーニングにより発見された MSUD の症例の中には,必ずしも5つの表現型に当てはまらないものが存在することも指摘されている。

そこで,我々は皮膚線維芽細胞ではなく,EB virus により株化した MSUD 患者由来のリンパ芽球を用い,以前報告されているよりも低濃度の基質を用いて BCKDH の kinetics を調べ,臨床表現型との相関について検討してみた。