

# BH<sub>4</sub> 欠乏症のスクリーニング及び DHPR 欠損症の酵素学的研究

成沢邦明, 渡辺文子, 多田啓也

(東北大小児科)

## 研究目的

BH<sub>4</sub> 欠乏症はジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 欠損症, ジヒドロビオプテリン合成酵素 (DHBS) 欠損症, および GTP シクロヒドロラーゼ (GTPCH) 欠損症からなっている。いずれも血中フェニルアラニンの上昇が認められ, その点では古典的 PKU と区別出来ないが, 古典的 PKU では低フェニルアラニン療法によって正常な発育が期待されるのに対し, BH<sub>4</sub> 欠乏症では食餌療法のみでは不十分で, BH<sub>4</sub> や神経伝達物質前駆物質の補充療法が必要とされている。しかもこの治療は早期に開始する必要がある診断が遅れば遅れるほど重篤な中枢神経障害を残す結果となる。従って新生児マス・スクリーニングにより血中フェニルアラニンの上昇が見出された場合, BH<sub>4</sub> 欠乏症か否かを可及的速やかに鑑別することは極めて重要である。われわれはこれまで乾燥濾紙血や濾紙尿を用いた簡便な鑑別診断法を検討し, それによる BH<sub>4</sub> 欠乏症の 2 次スクリーニングを行ってきたので, その結果を報告する。

更に DHPR 欠損症において生化学的異質性を明らかにすることを目的として酵素学的検討を加えたので合わせ報告する。

## 研究方法

### 1. 乾燥濾紙血液による DHPR 欠損症のスクリーニング<sup>1)</sup>

乾燥血液濾紙片を氷冷した 0.15 M KCl 0.2 ml に加え, 0 °C から 4 °C で 30 分以上放置し, その抽出液を酵素液とした。DHPR 活性測定の実験系は Tris-HCl (pH 7.6) 40 mM, チトクローム C 50 μM, NADH 50 μM, 6-メチルテトラヒドロプテリン (6-MPH<sub>4</sub>) 10 μM 及び酵素液からなっている。サンプルセルに Tris-HCl, チトクローム C, NADH および酵素液を加え, レファレンスセルに酵素液の代わりに蒸留水をくわえて 25 °C, 5 分間ブレインキュベーションした後, 両セルに 6-MPH<sub>4</sub> を加え 550 nm での吸光度の増加を測定した。チトクローム C の還元量は吸光度係数 21 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> を用いて算出し, 6-MPH<sub>4</sub> に依存しない吸光度の変化をもってブランクとした。乾燥濾紙血液の DHPR 活性は非常に安定で 30 °C で 10 日間, 4 °C では 2 ヶ月以上活性の低下がない。従って, 乾燥濾紙血を用いたこの方法は DHPR 欠損症のスクリーニング法として極めて有用な方法である。現在この方法は国の内外で広く用いられているが, 未だ false positive あるいは false negative だった症例の報告はない。

## 2. 乾燥濾紙尿のプテリン化合物の分析によるBH<sub>4</sub>欠乏症のスクリーニング<sup>2)</sup>

採尿後直ちにアスコルビン酸を加えた後(終濃度2%)、濾紙にスポットし、乾燥後遮光して保存又は輸送した。乾燥濾紙片(直径5mm)の16枚に蒸留水0.5mlを加え、室温に60分以上放置した後、ミリポアフィルター(GS, 0.22μm)で濾過し、抽出液の一部を直接HPLCに注入し、残りをFukushimaらの方法で酸性下沃素処理を行った。HPLCはFipak Sil 18カラム(日本分光)、移動相5%メタノール、流速1.2ml/min、励起波長360nm、分析波長450nmの条件で行った。乾燥濾紙尿のプテリン化合物は尿中プテリン化合物をよく反映し、ほとんどがネオプテリン(N)とピオプテリン(B)である。これらは乾燥濾紙尿中では非常に安定で、不安定とされているテトラヒドロピオプテリンでさえ室温30日の保存で、わずかに18.7%の減少をみるに過ぎなかった。DHBS欠損症ではNの著大な増加とBの著減があり、またGTPCH欠損症ではNおよびBの著大な減少をみることから、他の高フェニルアラニン血症と容易に鑑別される。

## 3. 赤血球DHPRの酵素学的研究

洗浄赤血球を凍結融解し、DEAEセルロースカラムにかけて血色素を除いた後、硫酸55~75%飽和の分画をとり、透析後、更にDEAE Sephadex-A50カラムを用いて精製し、これを酵素液とした。免疫化学的解析はSDS-PAGEによって分離後Towbinの方法でゲルからニトロセルロース膜に移し、牛DHPR抗体を用いて行った。

## 研究結果

BH<sub>4</sub>欠乏症のスクリーニングを血清フェニルアラニン値が4mg/dl以上の患者を対象に行った。DHPR欠損症は乾燥濾紙尿のDHPR活性の測定によって容易に、しかも確実にスクリーニングされる。一方、DHBS欠損症やGTPCH欠損症の酵素学的スクリーニング法はなく、乾燥濾紙尿でのプテリン分析によってなされる。新生児のなかには一過性にNの高値、Bの低値をみる例があるので、確定診断には経時的測定が必要である例もある。表1はこれまで各国から依頼され検索した高フェニルアラニン血症135例の結果である。DHPR欠損症9例、DHBS欠損症9例、GTPCH欠損症0となっている。高フェニルアラニン血症のうちBH<sub>4</sub>欠損症のしめる割合がかなり高くなっているが、これはこれまでの検体の多くがマス・スクリー

当科でのBH<sub>4</sub>欠乏症スクリーニング

ニングでみいだされた直後のものばかりでなく、臨床症状から主治医が強くBH<sub>4</sub>欠乏症を疑った上で送られたものも多く含まれていたからである。

|      | 検体数(新生児) | DHPR欠損症 | DHBS欠損症 |
|------|----------|---------|---------|
| 日本   | 29 (15)  | 3       | 7       |
| 中国   | 67       | 0       | 2       |
| カナダ  | 17       | 1       | 0       |
| フランス | 9        | 2       | 0       |
| イタリア | 8        | 2       | 0       |
| チェコ  | 5        | 1       | 0       |
| 計    | 135      | 9       | 9       |

## 2. DHPR 欠損症の酵素学的研究

DHPR 欠損症について酵素学的検討を加える目的で赤血球 DHPR の精製を試みた。患者は粗酵素を用いる限り、赤血球、白血球、線維芽細胞のいずれでも DHPR 活性はほぼ 0 であった。正常ヒトの洗浄赤血球を凍結融解し、DEAE-セルロースで血色素を除いたものを硫酸分画し、55~75%飽和で沈殿する蛋白質をとると、DHPR は溶血液の約 2200 倍精製された。患者赤血球に同様の操作を加えると DHPR 活性は硫酸分画で測定可能となり、これを DEAE-Sephadex を通すと比活性は 62.6 nmol/min/mg となった(表 2)。これは対照の 2.4% に相当する活性である。

これらの精製酵素について  $6\text{ MPH}_4$  に対する  $K_m$  値、熱安定性を検討したところ、前者では対照  $7.7 \times 10^{-6}\text{ M}$ 、患者  $10.0 \times 10^{-6}\text{ M}$  と変りなく、後者でも両者に有意の差が認められなかった。

同量の蛋白質を SDS-PAGE で分離した後ニトロセルロース膜にプロットし、牛抗 DHPR 抗体を用いての免疫化学的検討では図 1 にみる如く、対照が約 30000 の分子量の単一バンドに対し、患者では該当する蛋白は見出せなかった。以上の結果は患者 DHPR は活性の低下のみでなく、蛋白量の著明な低下を示唆するものである。

表 2  
Purification of DHPR from human erythrocytes

|                                | Specific activity<br>(nmol/mg/min) |         |
|--------------------------------|------------------------------------|---------|
|                                | Control                            | Patient |
| Homolysate                     | 0.253                              | —       |
| DEAE-elute                     | —                                  | —       |
| Ammonium sulfate precipitation | 570                                | 15.2    |
| DEAE Sephadex                  | 2,565                              | 62.6    |

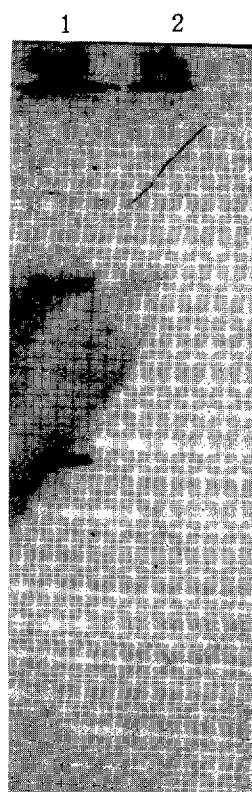


図 1 Peroxidase-immunostained transblots of erythrocyte DHPR from a control (lane 1) and the patient (lane 2)

## 結 論

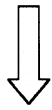
1. 乾燥濾紙血液の DHPR 及び乾燥濾紙尿のプテリン化合物はいずれも安定で、通常の国内の郵送は勿論、外国からの輸送にも耐えられるものである。我々は、これらを利用した  $BH_4$  欠乏症のスクリーニング法を確立し、現在まで 135 例の高フェニルアラニン血症を検索した。それにより DHPR 欠損症 9 例、DHBS 欠損症 9 例を見出した。

今後、わが国での新生児マス・スクリーニングで見出された高フェニルアラニン血症の全例が  $BH_4$  欠乏症のスクリーニングをうけられるような、全国的なシステムの確立が必要であろう。

2. 赤血球 DHPR を約 10000 倍に精製し、DHPR 欠損症の 1 例で生化学的、免疫学的検討を行ったところ、酵素活性のみでなく、酵素蛋白の著明な減少を認めた。しかし、残存酵素の  $K_m$  値や熱安定性は対象と差を認めなかった。今後、多くの症例で同様の検討を行い、本症での遺伝的異質性を明らかにしたい。

## 文 献

- 1) Arai N., Narisawa K., Hayakawa H. and Tada K.  
Pediatrics **70**, 426-430, 1982.
- 2) Narisawa K., Hayakawa H., Arai N., Matsuo N., Tanaka T., Naritomi K.  
and Tada K.  
J. Pediatr. **103**, 577-579, 1983.



## 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

BH4 欠乏症はジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 欠損症, ジヒドロピオプテリン合成酵素 (DHBS) 欠損症, および GTP シクロヒドロラーゼ (GTPCH) 欠損症からなっている。いずれも血中フェニルアラニンの上昇が認められ, その点では古典的 PKU と区別出来ないが, 古典的 PKU では低フェニルアラニン療法によって正常な発育が期待されるのに対し, BH4 欠乏症では食餌療法のみでは不十分で, BH4 や神経伝達物質前駆物質の補充療法が必要とされている。しかもこの治療は早期に開始する必要がある診断が遅れれば遅れるほど重篤な中枢神経障害を残す結果となる。従って新生児マス・スクリーニングにより血中フェニルアラニンの上昇が見出された場合, BH4 欠乏症か否かを可及的速やかに鑑別することは極めて重要である。われわれはこれまで乾燥濾紙血や濾紙尿を用いた簡便な鑑別診断法を検討し, それによる BH4 欠乏症の 2 次スクリーニングを行ってきたので, その結果を報告する。

更に DHPR 欠損症において生化学的異質性を明らかにすることを目的として酵素学的検討を加えたので合わせ報告する。