

## 細分課題 15

### 先天性代謝異常症のスクリーニングに 関する研究

東芝中央病院

森 山 豊

#### 研 究 目 的

先天性代謝異常症による心身障害の発生予防に必須な早期発見のためのマス・スクリーニング法の確立を目的とし、昨年度に引きつづき三つの主題について研究した。

#### A.代謝異常症マス・スクリーニングの実施と、それに伴う諸問題の研究

本研究班が最も力を入れたテーマであつてフェニルケトン尿症 (PKU)、メイプルシロップ尿症 (MSUD)、ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症、チロシン血症、およびガラクトース血症の6疾患を取りあげ、マス・スクリーニングを実施した。研究協力者松田一郎、北川照男、成瀬浩、岡田喜篤、大浦敏明、高坂睦年、有馬正高、山下文雄らが担当したが、これらは将来代謝異常スクリーニングが広く実施される場合、各地域の中心となるべき人たちである。

#### 研 究 方 法

日本母性保護医協会に所属する、各地区の産婦人科医および新生児医療を担当する小児科医の協力により、生後5~7日目の新生児の足底から、ランセットを用いて数滴の血液をとり、特定の採血用濾紙につけ、空気中で乾かした後に各協力者のスクリーニング検査室に郵送する。

この濾紙上の血液を検体として、上記の6疾患のスクリーニングを実施した。昭和51年1月末までに検査を行った新生児数と実施した検査の種類は表1のとおりである。松田は札幌およびその周辺の新生児を対象とした。北川は東京

都内の新生児の検体について日大駿河台病院と東京予防医学協会においてスクリーニングを実施した。成瀬の実施数には関東各県，および愛知県三河地区のほか，一部には東北，中部，九州，京都などから送られて来る検体も含んでいる。岡田は名古屋公害衛生研究所佐藤藤村技師，名古屋市衛生局，愛知県衛生部の協力を得て愛知県下の新生児を検査した。名古屋市内で出産したものは名古屋公害衛生研究所において検査を行い，名古屋市，三河地区以外の新生児の検体は愛知県心障コロニーにおいて検査を行った。大浦は大阪市およびその周辺の産婦人科医より送られて来る検体についてスクリーニングを実施しており，その一部の検体については，兵庫県砂子療育園上村博士らの協力を得ている。有馬は鳥取県下の新生児について，山下は久留米市周辺の新生児について検査を行った。

PKU，MSUD，ホモシスチン尿症，ヒスチジン血症，チロジン血症の検査には，Guthrieの開発した Bacterial Inhibition Assay を用いた。すなわち寒天 Demain 培地に枯草菌胞子(ATCC 6633)と阻害剤を入れ，検体中のアミノ酸の多い時のみ枯草菌が成長するように調整し，標準高アミノ酸血液と比較して，検体中のアミノ酸を推定する方法である。阻害剤は，PKUには $\beta$ -2-チエニールアラニン，MSUDに4-アザロイシン，ホモシスチン尿症にメチオニンD-Lスルフォチサミン，ヒスチジン血症に1.2.4.トリアールアラニン，チロジン血症にD-チロジンをを用いた。なおMSUDおよびチロジン血症には枯草菌胞子ATCC 6051を用いることが多い。

ガラクトース血症のスクリーニングのためには，血中のガラクトース-1-リン酸・ウリヂルトランスフェラーゼの酵素活性を測定する Beutler & Baluda により開発された，いわゆるポイトラー法を用い，併せて Paigen により開発され，Guthrie により改良された，血中のガラクトースを測定するペイゲン-フージュ法を用いた。ただし北川はポイトラー法のみを使用している。ポイトラー法とは，UDPグルコース，ガラクトース-1-リン酸，TPN等を混ぜたポイトラー試薬中に，検体より切りぬいた血液濾紙ディスクを入れるもので，血中にガラクトース-1-リン酸ウリヂルトランスフェラーゼ活性があれば，一定時間後にTPNHが生成されるので，液を正常者の血液濾紙に滴下し，紫外線ランプ下におくと蛍光を呈する。蛍光を示さないものを異常とする。

ペイゲン・フージュ法の原理は次のようである： Paigen により発見され

た大腸菌 Q 396 はファージ菌 C 21 により完全に溶菌されるが、もしガラクトースが一定量以上存在すると Q 396 の菌壁が強化され、C 21 により溶菌されなくなる。この Q 396 に適した寒天培地の上に、ガスリー法と同様に、検体より切りぬいた 3 mm ディスクをおく。するとガラクトースを多量に含む検体の周囲にのみ、大腸菌が成長し、他はファージにより全く溶菌される。従って大腸菌の成長帯を高ガラクトース血の標準血液と比較すれば、検体中のガラクトースの増加が発見できるのである。マス・スクリーニングによって発見された異常者は精密検査を行い、患者であることを確認した。

## 研究成果と考察

### (1) 異常者の頻度

確認された患者の数と種類を表 2 に示した。表 2 の B にあげた数は、スクリーニングの結果、異常を示したが精密検査実施前あるいは実施中に死亡したため確認診断のできなかった例で、疾患がかなり疑われるものである。高チロジン血症の例は肝障害が高度で、そのため血中チロジンが増加することもあるので、B) の中の高チロジン血症は肝障害の強い例ではないかと考えている。

各疾患ごとの確認患者について、発生率を見ると、PKU 300,624 名中 10 名、MSUD 104,574 名中 1 名、ホモシスチン尿症 137,228 名中 0 名、ヒスチジン血症 135,418 名中 0 名、チロジン血症 72,047 名中 1 名、ガラクトース血症 117,021 名中 2 名、高フェニールアラニン血症 300,624 名中 4 名、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症 117,021 名中 1 名である。

### (2) 患者発生率の考察

ガラクトース血症と MSUD の発生率は欧米の報告とほぼ同様であって表 2 の B) の如く、死亡のため未確認のものを除いて 10 万名中ガラクトース血症 2 名、MSUD 1 名程度という値は他国の報告と大差がない。

問題は PKU および高フェニールアラニン血症の発生頻度である。諸外国では PKU は、1 万名内外に 1 名、高フェニールアラニン血症も 2-3 万名に 1 名という報告が多い。しかし表 1, 2 を見て明らかなように、高フェニールアラニン血症は約 75,000 名に 1 人に過ぎない。PKU は 3 万名に 1 名の割合であるが、10 名の PKU 児のうち 8 名は high risk family から得たものである。PKU 検査に用いた 300,624 名の検体のうち、high risk family より

の検体の正確な数は不明であるが、10,000名を超すことはない。従って残りの一般新生児約290,000名からの発見は僅か2名に過ぎず、その率は約140,000名につき1名という極端に低い値になる。

ただし、この300,624名は、全国各地域で自発的に検査に協力した産科医のもとで生まれたものであるから、母集団がはっきりしない。そこで、比較的母集団のはっきりしている愛知県下の例につき、発生率を検討した。ここでは愛知県産婦人科医会が熱心に代謝異常スクリーニングを行っており、愛知県、名古屋市の行政当局も熱心であるので、49年度以後検査をうける新生児数が増えている。49年4月1日から51年1月31日の間に6,1594名がPKUスクリーニングをうけ、これら一般検体の中から2名のPKUと2名の高フェニールアラニン血症が発見された。この間の新生児総数は23万名前後で、このうち約2.6%がテストをうけていることになる。しかも検査を実施している病院、診療所に偏りがなないので、一応「at random」の資料と見なすことができよう。この数字からすれば、PKUの発生率は約3万名に1名になり、今までの推測と大きな差はない。なお愛知県における他の疾患の発生頻度は、ガラクトース血症が5,1250名中1名、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症が5,1250名中1名となっている。

いずれにせよ、全国のより多くの地域で、各種の産科施設から非常に多数の検体を送られて来ないと、種々の偶然的要素が入るため正確な発生頻度は得られない。このような点から、愛知県下のスクリーニングの発展が今後重要な資料を提供しうるであろう。

次に表1、2で問題となるのは、ヒスチジン血症の発生率が欧米諸国に比べて非常に低いことである。本症は欧米諸国では新生児2万名程度に1名の割合であるが、わが国では135,000名以上の中に1名も発見されておらず、この差は1%水準で有意である。ヒスチジン血症のスクリーニングはヒスチジンを測定しているが、このヒスチジンのガスリー法には多少技術的な問題もあり、スタンダードの血液が変質しやすいこと、同一の検体が前日には高値を示し翌日には正常値を示すといった再現性の疑問もあるようである。しかし、これら技術的な困難さだけでは発生頻度の差は説明できないと思われる。

### (3) 技術的問題の考察

北川は採血濾紙にとった血液が裏まで十分にしみ通っていないと、ガスリー

法で低い値が得られることを指摘し、採血方法の適不適がスクリーニングの結果に影響しうることについて注意を促した。

ヒスチジン定量の場合に、原則として検体や標準サンプルをオートクレーブしないことが、Guthrie らにより勧告されているが、オートクレーブしないと標準サンプルの成長帯の大きさにばらつきが大きく、検体の成長帯についても再現性のないことが指摘され、今後注意深く検討することの必要性が確認された。

ガラクトース血症のスクリーニング法のうち血中ガラクトースを定量するベイゲン・ファージ法は、理論的にはポイドラー法よりもすぐれているが、実施に際してかなり困難のあることが報告された。成瀬と大浦の経験では、同じ大腸菌菌株を用いても、かならずしも再現性は良くない。大腸菌の成長帯が明瞭に見られるときと、きわめて薄くて境界不鮮明のため判定に困るときとがある。大腸菌 Q 396 を培養し、収集しフリーズして保存するときに技術的な問題が考えられるので、この点引続き検討することが大切である。

他の定量に関しては、技術的な問題はあまり提起されていない。ただチロジン血症のスクリーニングについて、北川は第1回のスクリーニングにおいて 0.7~0.9%の多数が陽性に出るため、再採血要求が多くなって困ると指摘した。北川はまた一過性の高チロジン血症であった者のその後の身体発育を調査し、対照群とほぼ同様であることを示した。しかし一過性の高チロジン血症が脳機能の障害を惹起するという論文もあり、身体発達のみでは安全か否かわからないという指摘もあるので、チロジン血症に関しては今後引続きマス・スクリーニングの方法、あるいはマス・スクリーニングの必要の有無について研究を行うこととした。

さらにマス・スクリーニングを全国的に実施する場合に、標準血液の供給とスクリーニング技術の精度管理が大切であるという指摘が、多数の協力者より行なわれた。この問題に関してはスクリーニング研究班としても早急に対策を樹立する必要があることが確認された。

## B.新しい代謝異常スクリーニング法の開発

荒川雅男、鈴木義之、塚田裕三、多田啓也らがこの課題に当った。

(1) 先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)のマス・スクリーニング法の開発

クレチン症の一部は先天代謝異常であるが、これ以外にも異所性クレチン症、甲状腺形成不全性クレチン症など遺伝に関係がなさそうなものも含まれているので、純粹に本研究班の課題とはいえないかもしれない。しかし先述の採血濾紙にとった血液の一部を用いてクレチン症のマス・スクリーニングを行うことが理論的に可能となったため、スクリーニング研究班としてもこの課題を取り上げる必要があると判断した。

そもそも、代謝異常スクリーニング用の採血濾紙を用いて、クレチン症のマス・スクリーニングを行うことを始めたのは、カナダのキューベック地方のスクリーニンググループである。Dussault は濾紙上の血液の2スポットを用い、甲状腺ホルモン中の  $T_4$  (サイロキシン) を測定し、47,000人中7人のクレチン症を発見した。しかし  $T_4$  は患者の方が正常者よりもはるかに低量なのであって、マス・スクリーニング法として少なくなるものをピックアップすることは偽陽性を多くするし、おまけに偽陰性で見逃す可能性すらある。このため成瀬とその協力者入江実(東邦大, 第一内科)らは、血中の甲状腺刺激ホルモン(TSH)の測定を目標として成功した。甲状腺ホルモン( $T_4$  または  $T_3$ ) が低下すると、そのフィードバック機構として脳下垂体よりTSHが多量に分泌されるようになる。従ってクレチン症では生後の早い時期から血中のTSHが増量する。この採血濾紙よりのTSH測定法が昭和50年初めに報告され、50年度後半からは大浦とその協力者宮井、ならびに山下とその協力者近藤らにより、相次いでクレチン症のスクリーニングが開始された。この方法により現在までに外来通院幼児より3名のクレチン症が発見された。

クレチン症は、小児科医の印象では、フェニルケトン尿症よりも発生頻度が高いとのことであり、マス・スクリーニングの重要な対象である。しかしこれは前述の如く遺伝性疾患でないものも多いのであり、今後はスクリーニング研究班とは別個の研究グループが必要となるであろう。

## (2) アデノシンデアミナーゼ欠損症のマス・スクリーニングの開発

荒川と協力者和田ら、および多田とその協力者一色らにより、アデノシンデアミナーゼ欠損症のマス・スクリーニングの開発が進められた。本症は免疫不全症を来し、感染症に罹患したとき早く重症化するので、早期に診断し対策を講じることが必要である。

Moore らは採血濾紙上の血液を用いて本疾患のマス・スクリーニングを試

みた。赤血球中のアデノシンデアミナーゼ (ADA と略) はアデノシンをイノシンに換え、その過程でアンモニアを生成する。適当な培地にアデノシンを加え、その培地上に血液ディスク (5 mm 直径) をおくと、ADA が存在すればアンモニアが発生するから、アンモニア発生によってディスクの周囲が赤紫色になるようにブロームチモールなどの色素を入れておく。多田らは、この方法がマス・スクリーニングとして使用しうるか否かを検討した。通常の寒天皿にブロームチモール青、フェノール赤、アデノシン、アガロースを含んだ培地を入れ、他方対照としてアデノシンを含まない培地を作り、その上に 5 mm 血液濾紙ディスクをおいて、アンモニアが逃げないようにサララップで蔽い室温で放置し、反応条件を種々分析した。その結果一定の溶液をまぜて培地を作り、約 8 時間室温に放置すると、正常赤血球を有する検体ではディスクの周囲が鮮明な赤紫色を呈することがわかった。検体は採血後 30 日程度の保存 (ただし低温低湿条件) でも充分 ADA 活性を保つことが確認され、この方法はマス・スクリーニングに使用しうるという。

荒川らは、ADA 活性を判定する別の方法を考案した。その方法は<sup>14</sup>C-アデノシンを用い、適当な組成の反応液に血液濾紙を加え、37℃で 20 分培養し、その後反応液をとり<sup>14</sup>C-イノシンが生成されたか否かを電気泳動により測定するものである。最終的には電気泳動でイノシンを分離し、液体シンチレーションカウンターを用いてその放射能を分析するのであるから労力を必要とし、多数検体の検査に多少の困難が考えられる。しかしこの方法は<sup>14</sup>C-アデノシンの代わりに<sup>14</sup>C-ヒポキサンチンを用いることにより、ヌクレオシドフォスホリラーゼが測定でき、あるいはヒポキサンチン・グアニルフォスフォトランスフェラーゼも測定できる。後者はレッシ・ナイハン症候群で異常を示す酵素である。

このように荒川らの方法を用いると、ADA のみでなく他の酵素も測定でき、ヌクレオシドフォスホリラーゼ欠損症やヒポキサンチン・グアニルフォスフォトランスフェラーゼ欠損症の 3 つの疾患のスクリーニングが可能となる。現在のところ、この方法は多数検体を扱う公衆衛生領域のマス・スクリーニングとしては実用性に欠けるが、外来患者等のスクリーニングや二次スクリーニング用としては極めてすぐれているので、方法的改良によってはマス・スクリーニングに応用できる可能性もあり、今後の発展が期待される。

### (3) ラジオイムノアッセイによるスクリーニング

松田とその協力者荒島らは今後マス・スクリーニングの領域にラジオイムノアッセイ (RIAと略) の導入が必然的であるとの考えから、濾紙ディスクを固定相としたRIA法を用い、ヒトの $\beta_2$ ミクログロブリンの測定を行い成功した。そして尿中の $\beta_2$ ミクログロブリンを測定し、カドミウムに接触するかカドミウム汚染地区の人々の尿中に増加する傾向のあることを確認した。

現時点でこの物質の測定自体は代謝異常マス・スクリーニングとは無縁であるが、こういう濾紙を固定相とした簡便なRIAの開発は、今後のマス・スクリーニングにとり非常に有用で、応用が期待される。

### (4) 酵素測定によるスクリーニング

鈴木は昨年に引続き、糖脂質あるいはムコ多糖代謝異常の正確な診断のためのスクリーニング法の開発を続けている。昨年度の方法を改良し、簡便化し、一部を機械化して、より多数の検体の処理を可能とし、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ、 $\alpha$ -フコシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、N-アセチル- $\beta$ -グルコサミダーゼ、N-アセチル- $\alpha$ -グルコサミダーゼ、アシドフォスファターゼ、アリルスルファターゼAおよびB、ガラクトセレブロンダーゼ、アシドリパーゼの諸酵素の測定を行っている。まだ血液量10mlを必要とすることからマス・スクリーニングとして適当とはいえないが、ハイリスクの患者のスクリーニングには非常に有効な分析法で、この方法によりハイリスク乳児につきスクリーニングを行い、50年度末までに54名の脂質代謝異常症を診断している。心身障害の早期診断法としては極めて優秀な方法であり、今後の発展が期待される。

### (C) 代謝異常症マス・スクリーニングの全国的普及に関する研究

森山豊，五味淵政人，皆川進は全国の産婦人科医が先天代謝異常スクリーニングに関してどれだけ理解をもつようになり、検査のため新生児から採血するという業務にどの程度協力する態勢にあるかを知る目的で、各県の施設から568か所(病院190，医院378)を無作為的に抽出し、アンケート調査を行った。その結果82.5%は尿によるPKUスクリーニングを実施したことがわかった。しかしガスリー法による新生児期のPKUスクリーニングに切換

えた施設はわずかに病院 11.9%、医院 11.9%であり、実施予定が病院 25%、医院 26%で、残りはまだ尿によるスクリーニングを続ける態勢である。ことに現在スクリーニング班が勧告しているマルチプルスクリーニングは実施中および実施予定を併せて病院 19.4%、医院 23.9%であった。

このような状況の原因は第 1 に産科医の知識の不充分さによる。また行政上、このスクリーニングに関する体制が全く整備していないことも原因の一部と考えられる。

そこで森山らは日本母性保護医協会に働きかけ、日母医報という会員向けの通信に代謝異常スクリーニングの重要性を強調し、どのようにすれば実施できるかという情報を提供した。さらに「先天代謝異常の早期発見と治療」を昭和 51 年度の研修テーマに決め、研修ノートとして全会員に先天代謝異常の本態、治療、早期発見法を記述したパンフレットを配布することを決め、本研究班から数名が執筆に協力した。このような準備にもとづいて 51 年度には、全国の産科医に対しこの研修が実施されるとのことなので、スクリーニングの知識の急速な普及が期待できる。

一方厚生省に対しては、昨年度に本研究班より PKU、MSUD、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症、ヒスチチン血症のスクリーニングの実施についての詳細な報告書を提出し、本年度もこの具体化について担当官と検討を重ねた。この結果、51 年度中に各県の適当な検査施設の検査技師に対する技術研修を行うことが決められ、スクリーニング研究班は積極的に協力する予定である。

こうしてスクリーニングの全国普及の準備が進むのに平行して、スクリーニング班では技術的改善に努めている。採血濾紙の改造がその 1 例である。今までは 1 枚の濾紙であったが、これに 2 枚のコピー部分をつけて採血医師の控用と返信用とし、事務処理の便宜をはかった。

## 要 約

スクリーニング研究班は今年度下記のような研究を行った。

### (1) 代謝異常マス・スクリーニングの実施

今年度末までに全国各地で約 30 万名の新生児より採血した血液検体のスクリーニングを行い、フェニルケトン尿症 10 例、高フェニルアラニン血

症 4 例，メイプルシロップ尿症 1 例，高チロジン血症 1 例，ガラクトース血症 2 例，グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症 1 例を確認したほか，死亡のため未確認であるが代謝異常の疑の濃厚な症例 9 名を発見した。まだ検査数不十分のため正確な頻度は得られないが，一部の異常では欧米人に比べ著しく頻度の低いことが示唆された。

## (2) 新しいスクリーニング法の開発

グレチン症についてマス・スクリーニング法を開発し，今年度より 3 か所でルーチンにスクリーニングを始めた。またアデノシンデアミナーゼ欠損症のマス・スクリーニング，二次スクリーニング法を開発した。ラジオイムノアッセイを今後マス・スクリーニングに導入するための基礎的検討を行った。また脂質代謝異常のハイリスク乳児のスクリーニング法を開発中である。

(3) 代謝異常マス・スクリーニングの全国実施を円滑にするため産婦人科医の意識調査を行い，51 年度に全国産婦人科医に対しスクリーニングに関する研修を行う準備を進めた。

発 表 論 文

- 1) 成瀬浩, (1975), 先天代謝異常スクリーニング. 東京医学, 83(4), 300.
- 2) 大浦敏明. (1975). 先天代謝異常の治療. 遺伝, 29(7), 37.
- 3) 成瀬浩, (1975). 先天代謝異常の新生児血によるスクリーニング. 遺伝, 29(7), 30.
- 4) 小西ユミ子・中村了正・鈴木義之. (1975). I Cell Disease の 1 例. 脳と発達, 7(2), 88.
- 5) 北川照男. (1975). 新生児における先天代謝異常マス・スクリーニングの収支バランス(費用と効果の分析). 脳と発達, 7(3), 235.
- 6) Irie, M., Enomoto, K. and Naruse, H. (1975), Measurement of thyroid stimulating hormone in dried blood spot. Lancet (Dec. 20), 1233.
- 7) Wada, Y., Arakawa, T., Suzuki, Y. et al. (1975), Globoid cell leukodystrophy; the first case with antemortem diagnosis in Japan. Tchoku J. Exp. Med. 115(1), 53.

表 1 先天代謝異常スクリーニング対象者数 (1976.1.31迄)

施設 ( 班員名 )	PKU	MSUD	ホモシステイン尿症	ヒスチジン血症	チロシン血症	ガクトース血症	発見患者数 ( 確認数 )
北大・小児(松田一郎)	28135	0	0	8453	0	0	0
国立精研(成瀬浩)	81106	65704	65499	62114	35106	65704	PKU 4, Gal. 2, MSUD 1 Tyr 1, Hyper-ph 4
日大・小児(北川照男)	22496	0	19086	11094	13588	4337	0
東京予防医学協会( )	13873	0	13873	0	0	0	0
名古屋市衛研(岡田喜篤)	25650	25650	25650	25650	25650	25650	PKU 1
愛知県心障コロニー( )	10344	7726	7726	7726	0	0	0
大阪市小児保健センター(大浦敏明)	105217	0	20381	0	0	21330	PKU 5
兵庫県砂子療育園( )	0	5494	0	5494	0	0	0
鳥取大・小児(有馬正高)	7308	0	0	0	0	0	0
久留米大・小児(山下文雄)	6500	0	0	0	0	0	0
検査数総計	300624	104574	137228	135418	72047	117021	

発見患者数

表 2

A) 確認患者数	
PKU*	2例
高フェニールアラニン血症	4例
MSUD	1例
高チロジン血症 (高メチオニン血症)	1例
ガラクトース血症	2例
グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症	1例
B) 死亡のため未確認	
ガラクトース血症の疑い	1名
MSUDの疑い	1名
高フェニールアラニン血症	4名
高チロジン血症	3名

\*ほかに high risk family より 8例発見された。

↓ 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

先天性代謝異常症による心身障害の発生予防に必須な早期発見のためのマス・スクリーニング法の確立を目的とし、昨年度に引きつづき三つの主題について研究した。