

昭和56年度研究業績のまとめ

分担研究者 大浦 敏明

研究協力者

(染色体グループ)	中 込 弥 男	日 暮 真	
(基礎グループ)	荻 田 善 一	岡 田 善 雄	岩 井 和 夫
	松 本 勇	山 科 郁 男	成 瀬 浩
(小児科グループ)	松 田 一 郎	多 田 啓 也	鈴 木 義 之
	岡田伸太郎	一 色 玄	大 浦 敏 明
(産科グループ)	須 川 信	八 神 喜 昭	久 永 幸 生
	尾 崎 公 己	佐 藤 孝 道	松 本 雅 彦
(細胞バンクグループ)	岡 田 善 雄	荻 田 善 一	松 田 一 郎
	須 川 信	中 込 弥 男	多 田 啓 也
	北 川 照 男	和 田 義 郎	山 科 郁 男
	鈴 木 義 之	岡田伸太郎	高 瀬 讓 治

昭和55年度の検討と昭和56年度計画の展望のため、昭和56年5月9日(土)、大阪好文クラブにおいて第一回班会議を開催した。その際細胞バンクの重要性に鑑み、従来の4グループに加えて細胞グループを発足させることになり、研究協力者代表として阪大微生物研究所教授(附属ヒト遺伝病細胞系統保存施設長兼任)岡田善雄氏に依頼し、細胞バンク設立の具体案を作成することにした。協力者として従来の協力者8名に加え、新たに北川照男、和田義郎、高瀬讓治の3氏を依頼した。

また産科グループには、本年度より久永幸生、尾崎公己、佐藤孝道、松本雅彦が参加した。

昭和56年8月1日(土)、大阪好文クラブにおいて細胞グループ会議を開催した。

昭和57年2月20日(土)、大阪好文クラブにおいて、第2回班会議を開催し、昭和56年度の研究成果の発表ならびに討議を行った。

I. 染色体グループ (研究協力者代表 中込弥男)

1) 染色体異常症の診断にあたっては、初回の分析結果に応じて分染法による解析を追加する場合に、培養可能な生きた細胞の保存が必要である。しかも多数例に応用するためには、方法が簡単で、高価な試薬や設備を必要とせず、しかも成功率の高いことが望ましい。中込らはこれらの条件を満たす方法として、凍結保存法の開発に成功した。

ヘパリン採血の静脈血 1 ml ずつ小試験管に分注し、凍結液を等量加え -80°C のフリーザーに保存する。必要な期間の後 37°C の恒温槽で解凍し、洗滌の後培養液中に沈渣を浮遊させ、PHA を加えて培養する。以後は通常の血液培養に準じて操作する。以上の方法で88%が分析可能であったので、症例あたり2～3本を凍結すれば、ほぼ確実に結果が得られることになる。

またアクリジンオレンジによる簡便な分染法を考案し、haploid set (1～22およびX 1本)あたり850～900バンドまでの識別に成功した。

2) 日暮らは性染色質検査によるモザイク型性染色体異常のスクリーニング法の妥当性を検討した。

正常核型を有する女児新生児95名を、3才まで経時的に性染色質出現率に関して追跡した。

生後3日以内の出現率は 10.3 ± 4.4 、以後18ヵ月の 15.8 まで上昇傾向にあるが、少なくとも1才半まではモザイク型X染色体異常と正常女児との鑑別は本法では困難と考えられた。

Y染色質陽性率は新生児期に低値を示し、1ヵ月以降は成人値近くに増加する。この現象とエストロゲンとの関係を疑い、前立腺ガンの術後にエストロゲンを長期間与えられている男性22名のY染色質を検査したところ、その陽性率は $52.85 \pm 9.33\%$ で、正常男性値 $74.36 \pm 4.55\%$ に比し有意($p < 0.01$)に低値であった。このことからY染色質出現とエストロゲンとの間には、何らかの関係があることが推測される。

II. 基礎グループ (研究協力者代表 荻田善一)

A 組織細胞を試料とする遺伝性疾患の診断。保因者ならびに遺伝的異質性の診断法の開発

3) 荻田善一らは昨年度毛根による遺伝性疾患の系統的診断法を確立し、アデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) 活性の完全欠損による尿路結石患者を診断した。

本年度は毛根と赤血球の HPRT ならびに APRT の活性泳動帯の相違を明らかにした。

また毛根細胞の分析から、APRT の部分欠損例において尿路結石が見られたことを発見し、家系分析において APRT のヘテロ接合体でも発症することを報告した。

4) 岡田善雄はコケイン症候群患者の線維芽細胞において、DNA 複製の相補性を研究した。コケイン症候群では紫外線照射後細胞の定期 DNA 合成が障害されるが、細胞融合操作により CS7SE と CS1BE は同じ群に属し、CS3BE は異なった相補性群に属した。

B 代謝産物による代謝異常症の診断法の開発

5) 岩井和夫らは高速液体クロマトグラフィーによる尿中プテリン誘導体の分析を行い、フェニルケトン尿症の異型であるテトラヒドロピオプテリン欠乏症の病型診断に成功した。今年はさらに諸種疾患における尿中プテリン誘導体の分析を行った。ある種のガンにおいてモノプテリン排泄の増加が報告されており、今後悪性新生物を含めて、諸種疾患におけるプテリン誘導体の動態が明らかとなり、診断と治療に大きく貢献するであろう。

6) 松本勇らは引続きガスマス・コンピューターによる先天性代謝異常症の診断法の開発を進

めているが、今年度は最初血中ロイシンの高値で発見され、メープルシロップ尿症を疑われた患者が、尿中異常代謝産物の特徴的所見から、ジヒドロリポイル・デヒドロゲナーゼ欠損症であることを診断した。本疾患がわが国で発見されたのは本症例が最初で、新生児マス・スクリーニングで発見されるメープルシロップ尿症の鑑別診断に貴重な知見をもたらした。

7) 山科郁男は複合糖質代謝異常症のスクリーニング法として、ムコ多糖、糖タンパク質、糖脂質に共通した構成成分であるグルコサミンとガラクトサミンを測定する方法を確立した。本年はこの方法を症用して、Hurler もしくは Hunter 症候群と思われる患者を発見した。

Lowe 症候群患者由来の線維芽細胞の示すスクレオチドピロホスファターゼ活性は対照の約10倍の高値で、また保因者はその中間値であったことから、患者のみならず保因者の診断も可能となった。本症患者では、低硫酸化コンドロイチン硫酸Aと多量の結合型シアル酸が尿中に排泄されることを明らかにした他、尿中タンパク質の異常を認めた。すなわち、本症患者尿のSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、アルブミンより低分子のタンパク質の存在を認め、リゾチーム、 β 2-ミクログロブリンの排泄も確認された。

8) 成瀬浩らは典型的フェニルケトン尿症と、フェニルアラニン水酸化酵素活性の残存する高フェニルアラニン血症との鑑別のため、少量の重水素標識フェニルアラニンを使用し、生体内の代謝回転を測定する方法を研究した。PKU 7例の他、血中フェニルアラニン値では高フェニルアラニン血症と疑われた症例が、本法ではPKUと診断された。また3才でPKUと診断されたIQ 98の患者は、Phe-d5の減少程度はPKUと異なり、減少著明であるが、Tyr-d4は全く検出されなかった。このような「頭のよいPKU」の代謝回転に関して今後の検討がまたれる。

Ⅲ. 産科グループ (研究協力者代表 須川 信)

9) 須川 信、八神喜昭、久永幸生、尾崎公己、佐藤孝道、松本雅彦の産科グループは、前年度に引続き、わが国での出生前診断の実情を把握し、ひいては本検査法の安全性と分析精度につき検討を加えた。本年度は1970年から1981年までに検査された1210例について中間集計を行った。

適応としてはダウン症をはじめとする染色体異常出産歴を有する妊娠が最も多く、全体の63.1%を占めた。この群からは3.2%に染色体異常が発見された。年齢的には高齢妊婦からの発生率は高く、40才以上では5.9%となっている。

代謝異常での異常胎児・新生児の出現率は32.7%と高いが、4例が診断の誤りから患者として出産し、羊水細胞を用いての酵素分析の困難さが示された。

検査総数1210例のうち人工妊娠中絶68例、流産、胎内死亡、死産の胎児死亡が21例、生産823例の帰結が判明しており、残り298例が未追跡となっている。

12年間を1970～1974年、1975～1976年、1977～1978年、1979～1981年の四期に分けて、出生前診断の推移を見ると、穿刺の際の超音波検査は最初の4年間はほとんど行われておらず、次

の2年間ではほぼ半数に、1977年からはほぼ全例に近く行われており、1979年からは直視下超音波誘導穿刺も多く行われるようになっていく。年とともに誤診や診断不能例は著しく減少し、診断技術の向上がうかがえる。たとえば、流産、胎内死亡、死産などを合せた胎児死亡は、12年間の平均は1.7%であるが、最初の4年間は3.8%、最後の1979年以降は0.6%と大きな改善が認められた。

本調査はまだ中間的なもので未調査の部分も多く、精細な検討は最終年度に行う予定である。

IV. 小児科グループ（研究協力者代表 松田一郎）

10) 松田一郎らはメープルシロップ尿症患者の末梢リンパ球を E-B ウイルス感染により株化するとともに、種々の酵素学的検討を行なっている。材料は新生児マス・スクリーニングで発見された鹿児島、久留米、京都、名古屋の4株と、米国より購入した2株である。

その結果、分枝ケト酸脱水素酵素が10~20%活性を有する variant form と2~5%を示す classical form があり、これらの細胞を20 mM のロイシン添加培養液中で培養すると、classical form の細胞増殖は強く抑制されるが、variant form では対照と classical form との間型を示した。これらはメープルシロップ尿症の診断に非常に有用なデータである。

11) 多田啓也らは、フェニルケトン尿症と早期に鑑別する必要の生じたテトラヒドロbiopterin (BH₄) 欠乏症のスクリーニング法と診断法を検討した。対象はジヒドロbiopterin 合成酵素 (DHBS) 欠乏症4例、ジヒドロbiopterin還元酵素 (DHPR) 欠乏症2例、古典的 PKU 2例、対照5例である。

高圧濾紙電気泳動法と上昇法ペーパークロマトグラフィーの組合せによるbiopterin誘導体の分析は、短時間で多数の検体を処理でき、スクリーニング法として有用であった。

病型診断の目的には、酸性下でヨード処理したもの、アルカリ下でヨード処理したものについて高速液体クロマトグラフィーを行ない、尿中biopterin誘導体を分析することで一層確実なものになると思われた。

12) 大浦敏明らは前年度に引き続き BH₄ 欠乏症とその病型診断を症例を増加して検討し、高速液体クロマトグラフィーによるbiopterin誘導体の分析より得たネオブテリン/biopterin比 (Ne/Bi) は、有用な示標であることを確認した。

また BH₄ 欠乏症の早期診断のため、正常新生児から成人に至る122例の年齢群別の尿中biopterin誘導体の分析を行った。対照群の Ne/Bi は、3~6日の新生児で13.1、1ヵ月児6.7、3~8ヵ月児2.5、1~5才児1.6、6~11才児1.5、20~35才成人1.2、50~70才成人2.4で、新生児・乳児で高く、以後月齢、年齢とともに下降した。ちなみに DHBS 欠損症の Ne/Bi は3例においてそれぞれ、92、380、658であった。

13) 鈴木義之は前年度酵素的サイクリング法による超微量定量法を開発したが、本年度はこの方法を応用しての測定機器を試作した。現在この試作機により種々の物質の定量を検討中で

ある。この方法は極めて高感度で、多くの物質の定量に応用できるので、その将来が期待される。

14) 岡田伸太郎らはリソゾーム蓄積症の研究に、上皮性細胞の酵素活性を測定する方法を導入し、同時に電顕的観察を行なった。対象は正常由来、I-cell 病とその両親、マンノシドーシスとその家族、シアリドーシスとその父である。その結果、培養条件により得られる上皮性細胞の量が一定しない、上皮性細胞の継代培養ができない、線維芽細胞を完全には除き得ないなどの欠点はあるが、応用価値あるものと考えられた。

15) 一色玄はムコ多糖体代謝異常症のスクリーニングに用いられる尿のセタブロン反応の条件を検討した。また沈澱したムコ多糖をセフエデックス G-75 によるゲル濾過を行うことにより分子量をしらべた。その結果、正常者の尿中ムコ多糖の分子量はおよそ 1 万から 5 万の間に分布し、腎不全患者では千から 5 万の広域に分布し、1 万以下の低分子のものが増加していた。以上のことからセタブロン反応により腎不全を知ることができると考えられた。

V. 細胞バンクグループ（研究協力者代表 岡田善雄）

昭和56年度に発足した細胞バンクグループは、その重要性和緊急性に鑑み、8月1日（土）第1回グループ会議を開いた。そこで得られた成案を基に、×別紙「要望書」を「行政システム班」班長小西宏氏に提出した。その大要は、小西班が担当している「先天異常モニタリングセンター」の計画の中に、細胞バンクに関する調査室を組み込んで欲しいというものであった。

しかしその経過の中で、「モニタリングセンター」の内容そのものに対する担当班内での見解の多様性の整理に問題が残し、早急な実現は困難と思われる。

したがって細胞バンクグループとしては、前記要望書への期待を保持しながらも、小西班の作業とは別箇に、より可能性の高い計画を独自に作る必要に迫られていると判断した。

この見地から、昭和57年2月20日の班会議において、細胞バンクグループは新たな成案を得、全体会議の諒承を得て分担研究者大浦宛に別紙答申がなされた。

その大要は、第1ステップとして、先天異常患者を積極的に取扱っている日本各地の病院をピックアップし、それぞれに「細胞保存システム（液体窒素、 -80°C 冷凍庫）」を配備できるよう厚生省に要請する。第2ステップとして、配備できた病院では、保存株のリストの提出を義務づける。この作業の中から、全国の関係者のネットワーク組織を作る。第3ステップは真に利用の高い永続性のある細胞バンクセンターをこのネットワーク組織の上に作りあげる。

本年度はこの案を山村班全体で、検討を重ねる予定である。

なお細胞バンクグループには以下の研究報告が提出されている。

16) 北川照男らはアルギニノコハク酸尿症と、メーブルシロップ尿症の出生前診断を行った。前者については羊水中のアミノ酸分析により明らかなアルギニノコハク酸のピークを認め、培養羊水細胞の酵素測定では argininosuccinate lyase 活性は対照の $1/20$ に低下しており、胎児

は患者と診断された。メープルシロップ尿症の疑われた胎児の線維芽細胞は、対照と同じ decarboxylase 活性を示し、正常と判断された。両症例とも中絶した胎児および出生した児において診断が確認された。

17) 和田義郎らは、遺伝的異質性の多様なシトルリン血症の酵素学的検索を行った。高アンモニア血症をひきおこす尿素サイクル異常症はすべて脳障害をきたすが、早期発見、早期治療の可能性が探求されている。シトルリン血症ではアルギニノコハク酸合成酵素の質的異常と量的異常の存在することが知られており、和田らの症例は ASA 合成酵素蛋白の合成の低下を示唆するもので、肝の酵素活性低下は認められたが、力学的性質には異常を認めなかった。また皮膚線維芽細胞での活性は正常であった。今後、多彩な臨床像と酵素学的異質性との関連を明らかにすることが期待される。

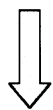
VI. その他の協議事項

1) 検査マニュアルの作成

本研究班の目的達成の一つの手段として、先天性代謝異常と染色体異常に関して、全国の精密検査機関および研究者のために、検査マニュアルを作成することが提案された。まず小委員会をつくる事となり、委員長として荻田教授が推薦され、委員としてとりあえず松田一郎、松本勇、中込弥男の3氏が決定した。今後どの範囲をカバーし、どの程度の内容とするか委員会で検討を進めることとなった。

2) 検査機関名簿の作成

先天性代謝異常症の精密検査機関名簿は、かつて昭和51年度「心身障害の発生予防に関する遺伝学的研究班（班長：井上英二教授）」の作業として、大浦敏明、有馬正高らが作成した。しかし、この分野の発展は著しく、今日の実態に即しなくなったので、今回新たに全国の精密検査機関名簿の改訂版を事務局で編集することとした。これは代謝異常症の診療一般に益することは元より、特に新生児マススクリーニングで発見され、診断困難な症例や早期に鑑別を要する症例の確認に大いに有用であろう。また、「遺伝相談とそのシステム化に関する研究班」の坂元正一班長より、全国の遺伝相談ネットワークで常備すべき資料の一つとして要望されているので、その期待に答えようとするものである。



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



昭和 55 年度の検討と昭和 56 年度計画の展望のため,昭和 56 年 5 月 9 日(土),大阪好文クラブにおいて第一回班会議を開催した。その際細胞バンクの重要性に鑑み,従来の 4 グループに加えて細胞グループを発足させることになり,研究協力者代表として阪大微生物研究所教授(附属ヒト遺伝病細胞系統保存施設長兼任)岡田善雄氏に依頼し,細胞バンク設立の具体案を作成することにした。協力者として従来の協力者 8 名に加え,新たに北川照男,和田義郎,高瀬譲治の 3 氏を依頼した。

また産科グループには,本年度より久永幸生,尾崎公己,佐藤孝道,松本雅彦が参加した。

昭和 56 年 8 月 1 日(土),大阪好文クラブにおいて細胞グループ会議を開催した。

昭和 57 年 2 月 20 日(土),大阪好文クラブにおいて,第 2 回班会議を開催し,昭和 56 年度の研究成果の発表ならびに討議を行った。