

悪性高フェニルアラニン血症の 簡易診断法の開発

多田啓也，成沢邦明，早川 洋

(東北大小児科)

研 究 目 的

最近フェニルケトン尿症 (PKU) の新生児マス・スクリーニングの普及により，高フェニルアラニン血症の中に適切な食事療法にもかかわらず，重篤な中枢神経症状を呈する異型高フェニルアラニン血症 (悪性高フェニルアラニン血症) が見出されている。これらはテトラヒドロbiopterin (BH_4) の欠乏に基因するものであり，ジヒドロbiopterin還元酵素(DHPR)欠損症とジヒドロbiopterin合成酵素(DHBS)欠損症に分類されている。古典的PKUでは低フェニルアラニン食療法によって正常の発育が期待されるのに対し， BH_4 欠乏症では食事療法のみでは不十分で，神経伝達物質の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り診断が遅れば遅れる程重篤な中枢神経障害を残すこととなる。吾国で実施された新生児マス・スクリーニングの追跡調査の結果¹⁾でも数例の BH_4 欠乏症が見出されており，こちらはいずれも当初PKUと診断され食事療法が早期に開始されたにもかかわらず，中枢神経障害が出現し途中から BH_4 欠乏症であることが判明したものであり，いずれも知能の遅れが認められている。したがって新生児マス・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，古典的PKUか BH_4 欠乏症かを可及的速かに鑑別診断することが極めて重要であり，本研究は簡便な鑑別診断法の確立を目的として行なわれた。

研 究 方 法

古典的PKU 2例，DHPR欠損症 2例，DHBS欠損症 5例から得られた尿を対象として用いた。

採尿後直ちにアスコルビン酸を加え(終濃度2%)た後，沓紙(北里研究所製)にスポットとし，乾燥後遮光して冷蔵庫に保存した。

乾燥尿沓紙片(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, 0.22 μ m)で沓過し，抽出液の1部を直接HPLCに注入し，残りをFukushimaらの方法²⁾で酸性下及びアルカリ下で沃素処理を行った。酸性沃素処理によって BH_4 と BH_2 は酸化型biopterin(B)に，アルカリ沃素処理によって BH_2 はBに， BH_4 はbiopterinに変化する。還元型Bは蛍光をもたないことから，抽出液のB誘導体のうち，直接分析した時はBのみ，酸性沃素処理液ではtotal($B+BH_2+BH_4$)，

アルカリ沃素処理液ではBとBH₂の和が測定される。HPLCはFipak Sil 18カラム(日本分光), 移動相5%メタノール, 流速1.2 ml/min, 励起波長360 nm, 分析波長450 nmの条件で行った。

研究 成 果

乾燥尿紙尿のプテリン化合物はほとんどがネオプテリン(Ne)とB誘導体であった。

古典的PKU, DHP R欠損症及びDHBS欠損症の乾燥尿紙尿のNe及びBの%分布を図1に示した。古典的PKUではB 4.0~5.7%, BH₂ 3.4~6.1%, BH₄ 65.2~73.4%, Ne 19.2~23.0%であり, BはわずかでBH₄が主要なプテリン化合物であった。DHP R欠損症ではB 62.2~68.3%, BH₂ 13.8~15.4%, Ne 16.4~20.2%でありBH₄はほとんど見出せなかった。DHP Rの欠損にともなうq-BH₂が蓄積し, これは不安定なので容易にBH₂に転換するといわれているので, DHP R欠損症では理論的にはBH₂の増加が期待される。しかし, 我々の結果ではBが主要なプテリン化合物であった。DHBS欠損症では大部分がNe誘導体でBは0.5%以下を示した。乾燥尿紙尿でのプテリン化合物の分析が尿中プテリン化合物を反映しているか否かをみるために, 尿紙にスポットしたものと同じ尿のプテリン化合物を分析した。

図1に示すように%分布として見るとき, 尿そのものと尿紙尿はほとんど同様であり, 尿中プテリン化合物は尿紙にスポットした後でも何ら変化をみないことを示した。

表1は古典的PKU 2例, DHP R欠損症 2例, DHBS欠損症 5例, 対照成人 11例, 新生児 9例の尿紙尿のB, total B (B+BH₂+BH₄)及びNeの値をまとめたものである。
$$\%B = \frac{B}{B+Ne} \times 100$$
は古典的PKUでは20%, DHP R欠損症では80%, DHBS欠損症では0.5%以下であり, 一方, 対照成人 17.8~42.5%, 新生児 13.2%以下を示した。

この結果は尿紙尿での%Bの測定がDHP R欠損症やDHBS欠損症の診断に有用であることを示している。更に%Bと%total Bを比較することによってDHP R欠損症と古典的PKUの区別がより明確となる。即ち, DHP R欠損症では%Bと%total Bはほとんど差がないのに対し, 古典的PKUでは%Bが%total Bに比して著明に低い。

DHP R欠損症と古典的PKUの鑑別には還元型Bが尿紙上で安定であることが必要である。還元型Bの安定性をみるために, PKU患者の乾燥尿紙尿を4°Cと室温に保存した。図2に示す如く, 4°Cでの保存では30日間で還元型Bのわずかに10%が酸化されたにすぎず, 室温30日間でも18.7%であった。

図3は実際に郵送尿紙尿を用いて分析した結果であり, 左は宮崎大より送られたDHBS欠損症の尿であり, Neの著増とBの低値を示し%Bは1.3%, 中央はフランスより送られたDHP R欠損症の尿であり%Bは72.1%と高値を示し明らかに鑑別診断が可能であった。(右側は中央の症例の妹でコントロールと見做し得るが%Bは15.2%であった。)

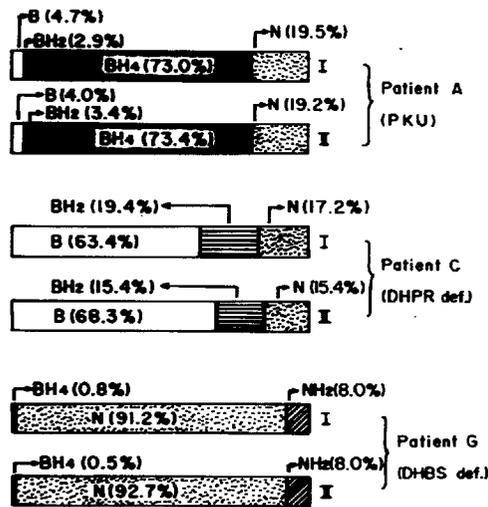
結 論

以上の研究により乾燥濾紙尿の還元ピオプテリンは安定であり通常の郵送も可能であり、この乾燥濾紙尿を用い高速液体クロマトグラフィーによりネオプテリンとピオプテリンの測定を行ないその比を求めることにより悪性高フェニルアラニン血症と古典的PKUを容易に鑑別し得ることが明らかにされた。

文 献

- 1) 多田啓也 他, 新生児マス・スクリーニング計画により発見された先天性代謝異常症の追跡調査, 日本小児科学会誌, 87: 2475, 1983.
- 2) Fukushima, T., Nixon, J. C.: Anal. Biochem., 102: 176, 1980.

Percent Distribution of Pterine Derivatives in Urines (I) and Filter Paper Spots of Urine (II)



B : Biopterin . BH₂ : Dihydrobiopterin .
 BH₄ : Tetrahydrobiopterin .
 N : Neopterin . NH₂ : Dihydroneopterin .

図 1. Distribution of pterin derivatives in filter paper spots of urine from classic PKU patients (A, B), DHPR deficient patients (C, D) and DHBS deficient patients (E, G).

表 1. Neopterin (N), biopterin (B) and total B levels on filter paper spots of urine (pmol/disc)

	Age	N	B	Total B	% B	% total B
Control						
newborns (9)*		0.36~ 2.76	<0.12~0.42	0.13~ 0.76	<5.3~13.2	6.2~37.8
adults (11)*		1.03~19.31	0.76~6.49	2.70~24.16	17.8~42.5	55.6~72.9
Classic PKU						
A	7Y	16.07	3.47	70.46	17.2	80.8
B	9Y	12.30	3.04	41.14	19.8	77.0
DHPR deficiency						
C	14Y	15.97	66.61	81.60	80.7	83.6
D	19Y	16.15	49.85	63.99	75.5	79.8
DHBS deficiency						
E	1Y	566.20	<0.12	<0.12	<0.02	<0.02
F	1Y	22.75	<0.12	0.25	<0.5	1.1
G	5Y	80.21	<0.12	0.42	<0.1	0.5
H**	6Y	290.37	—	3.08	—	1.0
I**	8Y	264.94	—	1.56	—	0.6

* Number of observations

** Ascorbic acid was not added to urine

$\%B=100 B/(B+N)$, $\% \text{ total B}=100 \text{ Total B}/(\text{Total B}+N)$

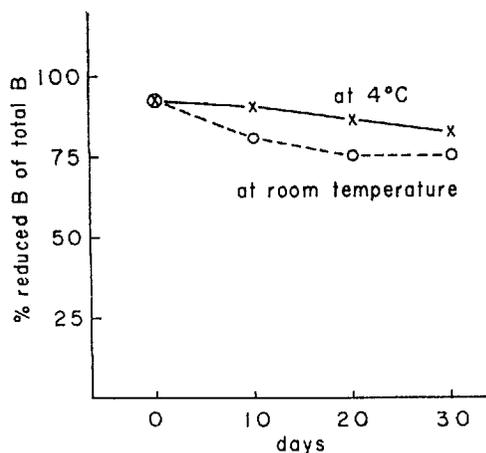
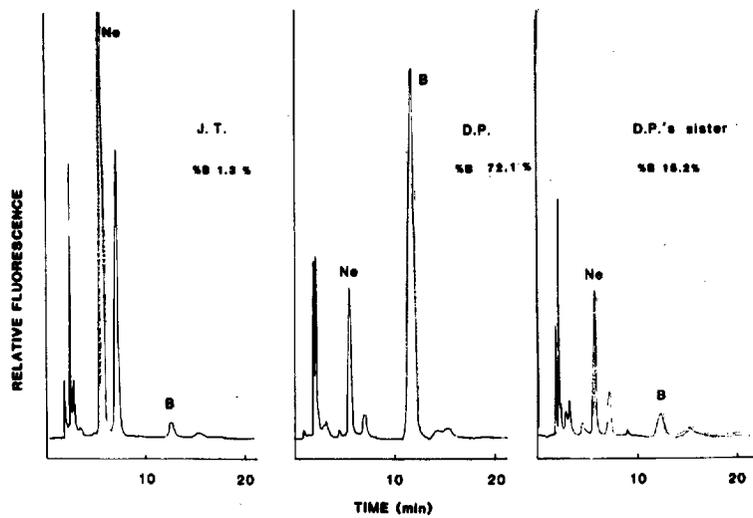
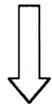


图 2. Stability of reduced biopterin in filter paper spots of urine from PKU.

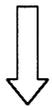


3. HPLC pattern of dried urine spot
 Left: DHBS defect, Middle: DHPD defect



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

最近フェニルケトン尿症(PKU)の新生児マス・スクリーニングの普及により,高フェニルアラニン血症の中に適切な食事療法にもかかわらず,重篤な中枢神経症状を呈する異型高フェニルアラニン血症(悪性高フェニルアラニン血症)が見出されている。これらはテトラヒドロピオプテリン(BH4)の欠乏に基因するものであり,ジヒドロプテリジン還元酵素(DHPR)欠損症とジヒドロピオプテリン合成酵素(DHBS)欠損症に分類されている。古典的 PKU では低フェニルアラニン食療法によって正常の発育が期待されるのに対し,BH4 欠乏症では食事療法のみでは不十分で,神経伝達物質の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程重篤な中枢神経障害を残すこととなる。吾国で実施された新生児マス・スクリーニングの追跡調査の結果でも数例のBH4欠乏症が見出されており,こちらはいずれも当初PKUと診断され食事療法が早期に開始されたにもかかわらず,中枢神経障害が出現し途中からBH4欠乏症であることが判明したものであり,いずれも知能の遅れが認められている。したがって新生児マス・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,古典的PKUかBH4欠乏症かを可及的速かに鑑別診断することが極めて重要であり,本研究は簡便な鑑別診断法の確立を目的として行なわれた。