

モニタリングのためのチロジン症の 2次スクリーニング

研究協力者 松本 勇

新家敏弘 井上義人

久原とみ子 松本雅裕

(金沢医科大学人類遺伝学研究所生化学部門)

緒 言

遺伝性高チロジン血症 I 型は、肝腎型高チロジン血症とも呼ばれ、比較的発生頻度の高い先天性代謝異常症の 1 つである。本疾患は生後まもなくから重症の肝および腎障害を伴って発症し、多くの場合は幼児期の比較的早期に死亡し、慢性型に移行した場合でも小児期に肝硬変や肝ガンを併発して死亡する例が多く、これまでに報告されている生存例の最年長患者は 26 歳である¹⁾。本疾患では、チロジン異化中間体の p-hydroxyphenylpyruvate (pHPPA), p-hydroxyphenyllactate (pHPLA) と p-hydroxyphenylacetate (pHPAA) が尿中に大量に排泄されるため、当初 p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (p-HPPA oxidase) の欠損がその病因と考えられてきた。事実、本疾患では本酵素活性の低下していることが *in vitro* の実験によって認められた^{2)~4)}。しかし、1977 年に Lindblad ら¹⁾ が本症患者尿中に succinylacetone (SA) および succinylacetoacetate (SAA) が異常排泄されることを発見し、本症の主因は fumarylacetoacetase (FAH) 欠損のためであろうと推測し、*in vitro* で本酵素活性の低下を証明して以来、肝の FAH の活性低下を伴った症例が相次いで報告され、現在では FAH の障害を主因とする説が有力である^{2)~10)}。しかし、わが国ではこれまで高チロジン血症 I 型患者尿に SA および SAA を検出した報告例はない。今回、われわれは肝、腎障害を伴った高チロジン血症 I 型患者 4 例について尿中有機酸を精査し、2 例の慢性型と考えられる患者尿中にわが国では初めて SA と SAA を検出した。しかし、残りの急性型患者 2 例では SA も SAA も検出できなかった。その詳細と、2 つの高チロジン血症 I 型の違いについて、若干の考察を加えて報告する。

症例および実験方法

症例 1 : 患者 N.N. は検査時 3 ヶ月の女児で、生後 8 日目より哺乳力低下をきたして、10 日目より嘔吐出現、血中チロジン 10.5 mg/dl, メチオニン 6.7 mg/dl と高値を示した。生後 3 ヶ月より黄疸増強、嘔吐出血傾向出現しはじめ痙攣も発現していた。生後 4 ヶ月に肝不全で死亡した。この時の血中アンモニアの値は 429 μ g/dl, α -フェトプロテイン 25.6 mg/ml と上昇して

いた。患者白血球の p-HPPAoxidase 活性は、正常値の22~25%に低下していた。

症例 2：患者 S.K. は検査時 7 ヶ月の女児で、出生直後より高ビリルビン血症、哺乳力低下をきたし、生後 5 ヶ月目に胆道閉鎖の診断で開腹手術したが、その時は、新生児肝炎の所見のみがみられた。その後黄疸が続き、発育遅延、高メチオニン血症、高チロジン血症をきたし、生後 9 ヶ月で大量吐血をきたして死亡した。剖検の結果、肝の p-HPPA oxidase 活性が正常値の9.2%、FAH 活性が正常値の22%に低下していた。

症例 3：患者 M.K. は検査時 11 歳 8 ヶ月の女児で、5 歳頃より X 脚に気づき、7 歳時にクル病を指摘され、ビタミン D (V.D.) の投与を受けたが改善されなかった。8 歳時に都立清瀬小児病院に入院し、Fanconi 症候群の診断で治療を受けていた。血中チロジン値は 300~400 $\mu\text{mole/ml}$ と増加していた。その後 V.D., PO_4 , NaHCO_3 および KHCO_3 による治療を受けていたが、肝ガンを併発して12歳で死亡した。

症例 4：患者 F.T. は38歳の女性。生下時不詳。10 ヶ月で歩行を開始したがよたよた歩きであった。2 歳時にクル病を指摘され肝油を服用したが効果はなかった。この頃から腹部膨満があり、その後、下肢脱力、股関節および肩関節痛を訴え、38歳で精査のため神戸大学医学部第3内科に入院した。入院時には汎血球減少を伴う肝硬変、Fanconi 症候群および骨軟化症などの臨床症状が認められ、また血中チロジン 9.0 mg/dl および尿中チロジンが360 mg/day と上昇し、尿の 2,4-DNPH 反応は陽性であった。

試料調製と GC/MS 分析

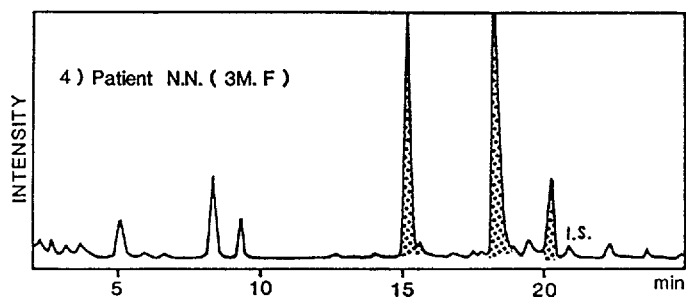
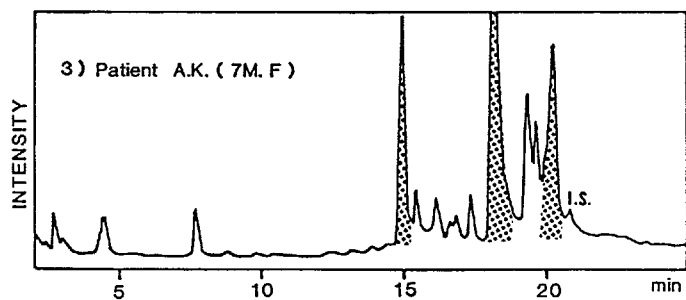
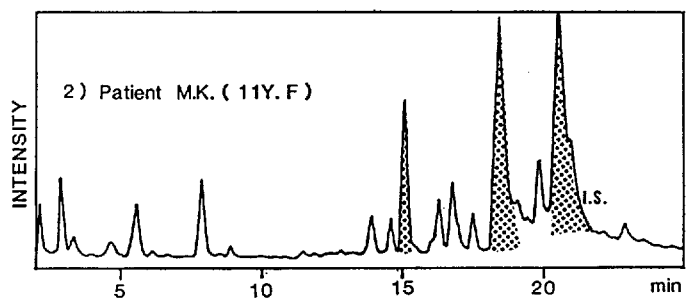
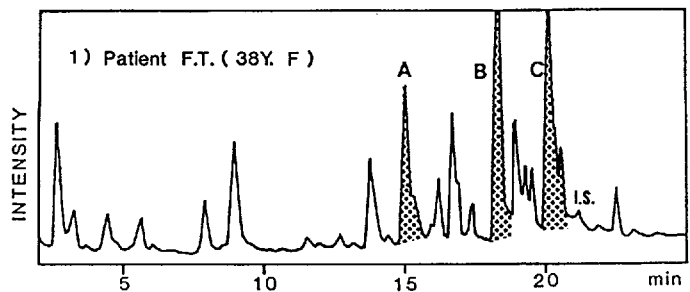
尿中有機酸は既報¹¹⁾によりトリメチルシリル (TMS) 誘導体に変えて、GC および GC/MS 分析した。GC/MS は日本電子製 JMA-3500 データシステムを on-line した JMS-DX 300 を使用した。

尿中アミノ酸は日本電子製 JLC-200A 全自動アミノ酸分析計で分析した。

結 果

図 1 に 4 症例の患者尿中有機酸の RIC クロマトグラムを示した。このうち、1) と 2) が慢性型、3) と 4) が急性型のチロジン症 I 型患者のクロマトグラムである。4 症例ともに大量に pHPAA, pHPLA と pHPPA が排泄されている。図 2 は患者 F.T. の尿中 SA と SAA をマスキングクロマトグラフィーで検索したもののクロマトグラムである。本法は、ごく微量の成分や他の化合物との分離のよくない化合物の検索には、非常に優れている。図中、矢印で示したのが SA および SAA である。

ところで、高チロジン血症 I 型患者尿中に SA と SAA の検出されなかった理由が 2 つの化合物の不安定性によるという可能性が指摘されてきたが、凍結保存した場合の SA と SAA の安定性を検討した結果、SA と SAA は共に凍結状態では 2 ヶ月後でも検出可能で、殊に SA の場合は、凍結保存 7 ヶ月後でも検出可能であった。表 1 には検索した 4 名の高チロジン血症 I 型患者の尿中有機酸およびアミノ酸の排泄量を示した。4 症例とも pHPPA, pHPLA,



A: 4-hydroxyphenylacetate B: 4-hydroxyphenyllactate
 C: 4-hydroxyphenylpyruvate

☒ 1 RIC Chromatograms of Urinary Organic Acids
 in the Patients with Hypertyrosinemia

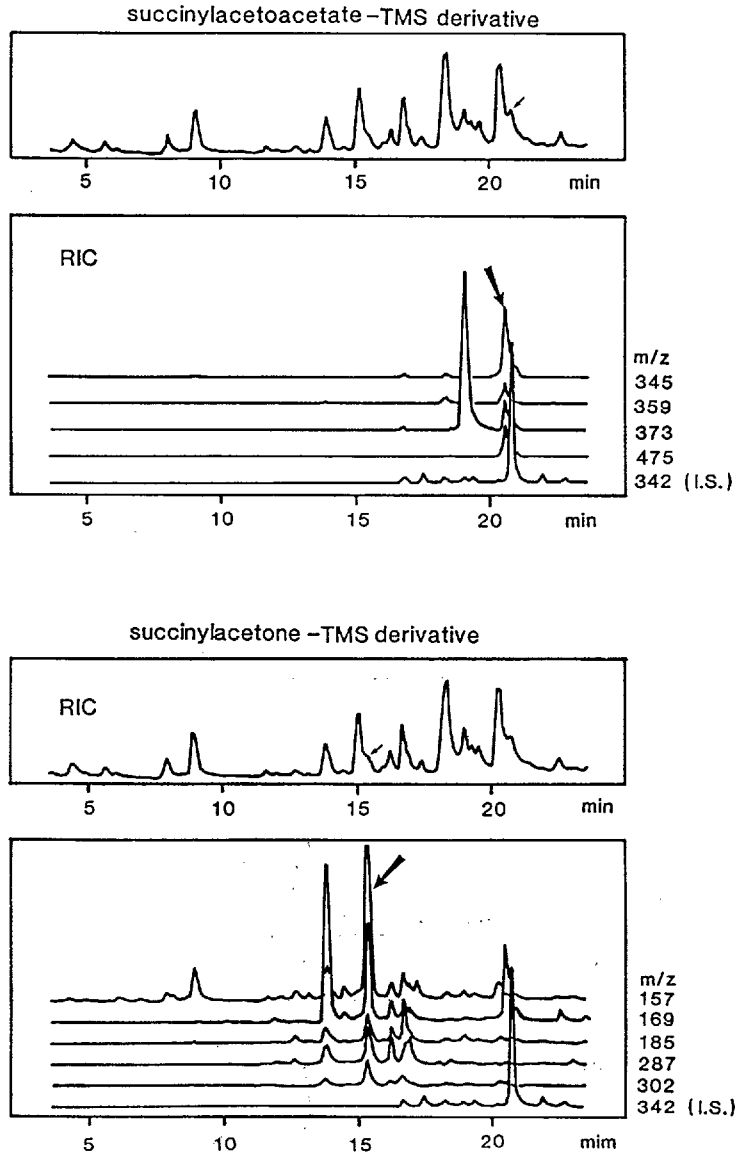


図2 Mass Chromatographic Identification of Succinylacetate TMS and Succinylacetone TMS

pHPAA, チロジンおよびグリシンの異常排泄が認められたが、SA と SAA は慢性型患者 M.K. と F.T. でのみ観測され、急性型患者 N.N. と S.K. では検出されなかった。逆にメチオニンは急性型患者で異常増加していたが、慢性型患者では正常値内にあった。

考 察

遺伝性高チロジン血症の診断には、血中または尿中に蓄積あるいは異常排泄するチロジンと、その異化中間体の検出、特に SA および SAA の検出が決め手となる。わが国ではこれ

表 1 Urinary Excretion of Tyrosine and It's Metabolites, and Gly and Met in Patients with Hypertyrosinemia

Patient	N.N. (3M. F)	A.K. (7M. F)	M.K. (11Y. F)	F.T. (38Y. F)	Control (1~4Y)
<u>Organic acids*1</u>					
p-HPAA	1.42	0.50	0.30	0.25	0.06
p-HPLA	3.00	2.11	2.49	0.80	<0.01
p-HPPA	0.11	0.98	6.74	1.06	N.D.
SA	N.D. *3	N.D.	0.018(0.05)*4	0.037(0.19)	N.D.
SAA	N.D.	N.D.	— (0.06)	— (0.32)	N.D.
<u>Amino acids *2</u>					
Gly	15.1	13.2	18.5	15.1	0.72~2.74
Tyr	6.86	2.46	4.31	5.25	0.06~0.41
Met	1.76	1.64	0.15	0.08	0.05~0.12

*1 Values were expressed as mg/mg creatinine.

*2 Values were expressed as μ moles/mg creatinine.

*3 N.D. means not detectable.

*4 Relative peak ratios to the internal standard which were measured by mass chromatogram.

まで SA および SAA を検出した症例は報告されていない。その理由は、この2つの化合物は不安定で、保存中あるいは試料調製中に分解した可能性が指摘されてきた。今回、われわれは上記2つの化合物を異常排泄する FAH 欠損症患者尿を分析し、さらに -20°C に凍結保存した際の安定性について検討した結果、2ヵ月後でも十分に検出可能であることが分かった。したがって、FAH 欠損症患者尿を、採尿後直ちに凍結保存すれば、われわれのスクリーニング法で確実に化学診断可能である。これまでわれわれは24症例のチロジン血症患者の化学診断を行ってきたが、SA および SAA を検出したのは今回の2症例が最初で、しかもこの2症例は共に慢性型高チロジン血症 I 型である。従来報告されてきた FAH 欠損症患者は慢性型の症例が多いが、その多くは幼児期に死亡することが多い。患者 F.T. は高チロジン血症 I 型としては極めて珍らしく38歳の高年齢であった。急性型高チロジン血症 I 型の2症例は、典型的な臨床像を呈し、共に死の転帰を辿ったが、そのうちの患者 S.K. は剖検で肝の FAH 活性が対照の22%に低下していたことが明らかにされた。それにもかかわらず、SA も SAA も検出されなかった。その理由は明らかではないが、本患者では FAH 活性の低下よりも pHPPA oxidase 活性の低下が大きく、FAH の基質となるホモゲンチジン酸が充分量生成、または蓄積し得なかったことが原因ではないかと考えられる。あるいは本疾患では SA や SAA の蓄積が徐々に進行するので、急性型の場合にはわれわれの分析法で検出できる限界量以下であった可能性も考えられる。われわれがこれまで化学診断したチロジン血症患者のうち、肝腎型と考えられた症例は今回の4例も含めて全部で10症例で、上記4症例以外は全て生後4ヵ月以内に検索した。

pHPLA や pHPPA などに比して SA と SAA は量的に非常に少ないため、その検出にはマスキングマトグラフィーによって検索したが、いずれの場合も SA と SAA は検出されなかった。このように、非常に微量であることが本疾患の解析を困難にしている大きな理由である。ところで、もし FAH 欠損が本症の真の原因であり、pHPPA や pHPLA などの異常排泄が肝障害による二次的なものであるとすると、肝障害高チロジン血症の全ての症例で SA と SAA が必ず検出されるはずである。今回の検索では、完全な肝障害をきたしている 2 例の慢性型高チロジン血症患者でのみ、これら 2 つの化合物が検出され、急性型で検出されなかったのは、単に検出感度だけの問題ではなさそうである。事実、肝障害の程度と pHPPA や pHPLA の排泄量との間に必ずしも相関関係が認められず、Furukawa ら¹²⁾ のデータでも、肝ガン患者の pHPPA oxidase 活性はそれ程低下していない。Berger ら¹⁰⁾ は、fumarylacetoacetate はメチオニンおよび 5-アミノレブリン酸の代謝を阻害するが、pHPPA oxidase 反応は直接阻害しないと報告している。その他にも FAH 欠損をチロジン症 I 型の原因として説明するのは無理があるような症例報告も 2, 3 あり、今後の研究に俟たねばならない。

ところで、われわれが経験した 2 症例のチロジンアミノトランスフェラーゼ欠損症患者尿中の pHPLA/pHPPA 比は、肝腎型チロジン症に比べて可なり高い¹⁴⁾。

重症の肝障害では、時として高チロジン血症を呈するが、チロジン異化中間体の尿中異常排泄は少なく、高チロジン血症の原因は、チロジンアミノトランスフェラーゼの活性低下にあるという報告もある¹³⁾。

大部分の肝腎型高チロジン血症患者の症例では、pHPPA oxidase 活性の低下が確認されている。今回の急性型患者 N.N. と S.K. でも pHPPA oxidase の活性低下が認められたが、チロジンアミノトランスフェラーゼの活性低下は認められていない。われわれも以前に FAH 欠損を伴わない pHPPA oxidase 欠損症の高チロジン血症の例を報告したが、その症例ではチロジンの他にグリシンやセリンも尿中に異常排泄されていたにもかかわらず、著明な肝障害は認められなかった¹⁵⁾。したがって、肝腎型高チロジン血症の原因が pHPPA oxidase 欠損、FAH 欠損、あるいは他の何らかの調節因子によるものかなど、現段階では明らかでなく、今後この問題の解明を進めてゆきたいと考えている。

要 約

重症の肝障害を伴った高チロジン血症 I 型患者 4 例の尿中有機酸を GC/MS/COM システムで分析した。全ての症例で 4-hydroxyphenyl pyruvate, 4-hydroxyphenyllactate と 4-hydroxyphenylacetate の大量排泄が認められたが、慢性型患者 2 名ではその他に succinylacetone (SA) と succinylacetoacetate (SAA) が検出された。しかし、残りの急性型患者 2 名では SA も SAA も検出されなかった。

SA と SAA は、採尿後直ちに凍結保存するとかなり安定で、2 ヶ月後でも検出可能で、殊に SA は 7 ヶ月後でも充分検出可能であった。現在、高チロジン血症 I 型は FAH 欠損が主

因とされているが、今回、分析して得られた結果から、全ての高チロジン血症 I 型が FAH 欠損によるとする結論は得られなかった。

謝辞：本研究にあたり貴重な試料を提供して頂いた筑波大学臨床医学系中村了正先生，京都府立医科大学古川宣明先生，都立清瀬小児病院土屋裕先生および神戸大学医学部福岡佳宏先生に深謝します。

文 献

- 1) Lindblad, B., Lindstedt, S. and Steen, G. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74** : 4641, 1977.
- 2) Sakai, K. and Kitagawa, T. : Jikeikai Med. J., **4** : 1, 1957.
- 3) Sakai, K. and Kitagawa, T. : Jikeikai Med. J., **4** : 1, 1957.
- 4) Taniguchi, K. and Gjessing, L.R. : Br. Med. J., **1** : 968, 1965.
- 5) Berger, R., Smith, G.P.A., Stoker-de Vries, S.A., Duran, M., Ketting, D. and Wadman, S.K. : Clin. Chim. Acta, **114** : 37, 1981.
- 6) Kvittingen, E.A., Jellum, E. and Stokke, O. : Clin. Chim. Acta, **115** : 311, 1981.
- 7) Christensen, E., Jacobsen, B.B., Gregersen, N., Hjeds, H., Pedersen, J.B., Brandt, N.J. and Baekmark, U.B. : Clin. Chim. Acta, **116** : 331, 1982.
- 8) Grenier, A., Lescault, A., Laberge, C., Gagne, R. and Mamer, O. : Clin. Chim. Acta, **123** : 93, 1982.
- 9) Kvittingen, E.A., Halvorsen, S. and Jellum, E. : Pediatr. Res., **14** : 541, 1983.
- 10) Berger, R., van Faassen, H. and Smith, G.P.A. : Clin. Chim. Acta, **134** : 129, 1983.
- 11) 松本 勇 : 質量分析, **32** : 79, 1984.
- 12) Furukawa, N., Kinugasa, A., Seo, T., Ishii, T., Ota, T., Machida, Y., Inoue, F., Imashuku, S., Kusunoki, T. and Takamatsu, T. : Pediatr. Res., **18** : 463, 1984.
- 13) Andersson, S.M., Salaspuro, M. and Ohisals, J.J. : Gastroenterology, **82** : 554, 1982.
- 14) Shinka, T., Kuhara, T. and Matsumoto, I. : NEONATAL SCREENING, ed. by Naruse, H. and Irie, M., Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 314, 1983.
- 15) Endo, F., Kitano, A., Uehara, I., Nagata, N., Matsuda, I., Shinka, T., Kuhara, T. and Matsumoto, I. : Pediatr. Res., **17** : 92, 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



緒言

遺伝性高チロジン血症 型は、肝腎型高チロジン血症とも呼ばれ、比較的発生頻度の高い先天性代謝異常症の1つである。本疾患は生後まもなくから重症の肝および腎障害を伴って発症し、多くの場合は幼児期の比較的早期に死亡し、慢性型に移行した場合でも小児期に肝硬変や肝ガンを併発して死亡する例が多く、これまでに報告されている生存例の最年長患者は26歳である¹⁾。本疾患では、チロジン異化中間体の p-hydroxyphenylpyruvate (pHPPA)、p-hydroxyphenylacetate (pHPLA) と p-hydroxyphenylacetate (pHPAA) が尿中に大量に排泄されるため、当初 P-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (P-HPPA oxidase) の欠損がその病因と考えられてきた。事実、本疾患では本酵素活性の低下していることが *in vitro* の実験によって確められた²⁾⁴⁾。しかし、1977年に Lindblad ら¹⁾が本症患者尿中に succinylacetone (SA) および succinylacetoacetate (SAA) が異常排泄されることを発見し、本症の主因は fumarylacetoacetase (FAH) 欠損のためであろうと推測し、*in vitro* で本酵素活性の低下を証明して以来、肝の FAH の活性低下を伴った症例が相次いで報告され、現在では FAH の障害を主因とする説が有力である^{2)~10)}。しかし、わが国ではこれまで高チロジン血症 型患者尿に SA および SAA を検出した報告例はない。今回、われわれは肝、腎障害を伴った高チロジン血症 型患者4例について尿中有機酸を精査し、2例の慢性型と考えられる患者尿中にわが国では初めて SA と SAA を検出した。しかし、残りの急性型患者2例では SA も SAA も検出できなかった。その詳細と、2つの高チロジン血症 型の違いについて、若干の考察を加えて報告する。