

## 早期発見・早期治療に必要な検査

日大医学部小児科

近藤和喜夫 崎山武志 大和田 操 北川照男

### 目的

早期発見、早期治療を必要とする疾患は数多くあるが、これらのうち代謝障害の結果、知能障害、退行、痙攣などの中枢神経症状や重篤な場合は致死の経過をとる疾患の早期診断と適切な治療は特に重要である。この目的に添って、我国でもフェニルケトン尿症やクレチン症をはじめとした新生児スクリーニングが行われ、一般集団の中から患者を発見し治療が行われて精神運動発達遅滞児発生の予防がなされている<sup>1</sup>。しかし確立されたスクリーニング該当疾患はまだ少なく、何らかの臨床症状を呈して来院した患児のなかから適切な検査<sup>2</sup>を行うことによってのみ確定診断に到る疾患が多いことも事実であり、該当する疾患に必要な検査法の確立が臨床医が適格に判断をする指標として重要である。

これら疾患のうち、蓄積症の早期発見、診断は、保因者診断、出生前診断を行い再度の罹患児発生の予防に大切であるが大多数の罹患児の治療法はまだない。

一方、早期発見により治療が可能な疾患群にはアミノ酸代謝異常症、糖質代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症あるいは有機酸代謝異常症があり、尿や血液のアミノ酸分析、血液アンモニア濃度の測定や血糖、尿糖やガラクトースの測定によってアミノ酸、尿素サイクル、糖質代謝異常症の診断は可能である。しかし有機酸血症<sup>3</sup>は簡便な検出法がなく、また特有な臨床症状に乏しいため診断され難いのが現状である。本年度は1975年から1985年にかけて、我々の教室で行った検査項目と、対象とした疾患、検査例数とその検査の意義について述べると共に、現在行ってい

る有機酸代謝異常症の診断発見について述べる。

### 対象

アシドーシス、痙攣、呼吸障害、くり返す嘔吐や哺乳障害、意識障害を示した新生児、乳児あるいは発達遅滞、痙攣、筋緊張低下や感染、下痢等で症状増悪を来し、代謝異常が疑われる幼児学童について、血液、尿のアミノ酸分析(12例)、血中アンモニア(36例)乳酸、ビルビン酸(95例)の測定を行った。また筋緊張低下、肝脾腫と退行を示す乳児、関節拘縮、骨格異常、肝脾腫、知能低下、顔貌異常を示す幼児、学童の診断確定のための検査として、眼科的検査ならびに血清や白血球の酸性水解酵素活性、測定を行った。また有機酸血症のスクリーニングとして既に診断が確定されている楓糖尿症2例、プロピオン酸血症1例、メチルマロン酸血症2例、高アンモニア血症2例、PKU1例、その他疑わしい症例として23例についてガスクロマトグラフィを用いて分析した。

### 方法

アミノ酸分析は日立835型アミノ酸自動分析計を用いた。アンモニア測定はアミテスト(京都第一化学)及びデタミナーNH<sub>3</sub>(協和メディクス)を用いた。乳酸・ビルビン酸はラクトートテスト及びビルベートテスト(ペーリンガー)を用いた。測定法の詳細は添付された説明書に準じた。

#### 有機酸分析法<sup>4</sup>

##### I 尿の前処理

尿有機酸のオキシム誘導体化およびトリメチルシル誘導化。

尿は採取後、クレアチニン濃度を測定し、2・4-ジニトロフェニルヒドラジン反応（以下DNPHと略す）により $\alpha$ -ケト酸の定性試験をしておく。そして尿の誘導体を作製するまでは冷凍保存しておく、DNPH反応陽性の尿はオキシムトリメチルシリル誘導体化を、またDNPH反応陰性の尿はトリメチルシリル（以下TMSと略す）誘導体のみを作製する。すなわち、尿1 mlをとり、DNPH反応陽性の尿には、30%水酸化ナトリウムを3~4滴滴化し、PHを14に調製し、尿クレアチニン濃度（ $mg/ml$ ）の100倍量のヒドロオキシラミン・塩酸を加え、60℃にて30分間放置し、オキシム誘導体とする。次にTMS誘導体の作製を行なうが、オキシム誘導体化を完了した尿ならびにDNPH反応陰性の尿1 mlは、ともに6-N-塩酸を3~8滴滴化し、PHを1.0以下に調製し、内部標準物質（Internal Standard以下ISと略す）としてテトラコサン（ $C_{24}$ -paraffin n-tetracosane .19.6  $mg/100 ml$  Hexane）を、尿のクレアチニン濃度に従った概当量を加え、ジメチルエーテル3 mlとエチル酢酸3 mlにておのおの2回ずつ有機酸を抽出し、無水硫酸ナトリウム約5 gにて脱水後、窒素気流中で濃縮乾固し、BSTFA with 1% TMS（N,O-bis（Trimethyl silyl）trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane, Pierce）を尿のクレアチニン濃度に従って概当する量を加え、80℃にて15分以上放置し、得られた尿有機酸のオキシム-TMO誘導体またはTMO誘導体をGC分析ならびにGC-MS分析の試料とし、分析まで-5℃以下にて保存する。

## II GC分析条件

カラムは5% ON-22 on Supelcoport 80/100 meshを2 mm×2 mのガラスカラムに充填し、キャリアガスは窒素を30 ml/分の流量とし、90℃にて4分間保持の後、290℃まで8℃/分の昇温分析を行なった。また注入部温度は90℃で検出器はFIO（Flame Ionization Detector）を使用し、GC機器は島津GC-7Aを用いた。ピークの固定は標準炭化水素化合物を用いた

Retention timeにより行い、不明ピークはGC-MSにて分析を行った。

## 結果

表1に示すように、アミノ酸分析を行った120例中（うち新生児・乳児25例、幼児・学童95例）、新生児、乳児期で3名、幼児学童期で1名の異常者を検出した。その内訳は、先天性高アンモニア血症（GFS欠損およびOTO欠損）2例、アルギニノコハク酸尿症1例、高アルギニン血症1例であった。また、血中アンモニア測定は36検体について行われ、内4例（上記尿素サイクル代謝異常症）に異常を認め、血中乳酸ピルビン酸の測定は、95検体中2例に異常を認め、Leigh脳症であった。蓄積症を疑わせた25例中16例が異常を示した。そのうちで、角膜混濁2例はハーラー病1例、ムコリビドーシスⅢ型1例であり、cherry-red spotを示した疾患7例はTay-Sachs病3例、GM<sub>1</sub>ガングリオシドーシス2例、シアリドーシス2例であった。すなわち蓄積症が疑われた16例の内訳は、I-cell病5例、ムコリビドーシスⅢ型1例、ハンター病3例、ハーラー病1例、シアリドーシス2例、Tay-Sachs病3例、GM<sub>1</sub>ガングリオシドーシス1例である。このような疾患の確定診断には、眼科的ならびに酵素学的検索は極めて有用である。

有機酸血症のガスクロマトグラフィーによる分析結果では、既に診断されていた疾患については、その疾患特有なガスクロマトグラフィーパターンを確認した<sup>4, 5</sup>。すなわちMSUDでの2-Keto-iso-caproicの検出（図2）、プロピオン酸血症での3-ヒドロキシプロピオン酸、プロピオニルグリシン、メチルクエン酸などを検出（図3）、メチルマロン酸血症ではメチルマロン酸、メチルクエン酸、プロピオニルグリシン、3-ヒドロキシプロピオン酸などを検出（図4）、高アンモニア血症では安息香酸Naで治療中のため、ジヒドロオロツト酸、クエン酸に加え、馬尿酸、安息香酸Naの大きなピークを検出した（図

5)。アミノ酸分析、その他で異常がなく、臨床的に発育不良、痙攣、筋緊張低下や亢進などを示し、有機酸血症のスクリーニングを行った23例中1例が図3に示したプロピオン酸血症と殆んど同一であることから、ガスクロマトグラフィー上、プロピオン酸血症と診断した。また、肝機能障害を来さず、アミノ酸分析にて血中チロジンの上昇を認めた乳児の尿有機酸がスクロマトグラフィーで、正常では殆んど検出されないフェニルピルビン酸、P-ヒドロキシフェニルピルビン酸を検出したため、チロジン症Ⅱ型(Richner-Hanhart Syndrome)を疑い現在、経過観察中である。

#### 考察

新生児マス・スクリーニングの普及は、PKUやクレチン症をはじめとした先天性代謝異常症の早期発見、早期治療に直結し、知能障害発症の予防に大きく貢献している。また、マス・スクリーニングはされていないが、ハイリスクの患児のアミノ酸分析や尿の代謝異常スクリーニング、アミテストによる簡易アンモニア測定によつて、他のアミノ酸代謝異常症や糖質代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症が多く発見・報告されてきている。我々の教室でも過去10年間で、これらの検査をハイリスク患児に施行することで、尿素サイクル代謝異常症等の診断に大いに役立っている。しかし、早期発見・早期治療を要する疾患はまだ多く、このうち通常の検査法では診断が困難な疾患に有機酸代謝異常症がある。このうち、高乳酸、ピルビン酸血症の診断は既にキット化されているラクテートテストやピルベートテストを用いることで可能である。しかし、一般に有機酸血症に特有とされる臨床所見は乏しく簡便な検査法がなかったため、本症の発見、診断は長い間なされなかった。

最近、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーの普及により、これら有機酸血症を尿で分析診断することが可能となった。

一般に有機酸血症は、本症の原形である楓

糖尿症(MSUD)に類似する。主な臨床症状は重篤なアシドーシス、多呼吸や無呼吸発作、くり返す嘔吐、哺乳障害、易刺激性や痙攣、筋緊張低下、脱水、体重増加不良や嗜眠で、新生児敗血症様で、急激に増悪し、頭蓋内出血、呼吸障害、循環不全や他の先天代謝異常症を除外診断する必要がある。ある種の有機酸血症では、特有な臭いによって疾患が疑われる。また、残存酵素活性のため、新生児期には重篤にならず、1歳頃から感染症や脱水症、手術などを契期に痙攣を主体としてはじめて症状の発現をみるものがある。知能障害は多くの有機酸血症に合併するが、正常知能例も報告されており、知能障害は有機酸血症の特徴的な徴候とはいえない。

本症の早期診断には、アシドーシスの確認とアニオンギャップの計算が大切で、ケトン尿症も本症を疑わず主要な徴候である。これに加えて、低血糖症や高アンモニア血症、高アミノ酸血症、尿の特有な臭いも本症を疑って診断を進める手掛りとなる。このため、上記の臨床所見に加えて、従来から行われてきた検査項目、アミノ酸分析や血糖、アンモニア、それに加えて乳酸ピルビン酸の測定を行うことが診断を進める上で重要なポイントで、このような徴候を示す児を対象とした有機酸代謝異常のスクリーニングでは、その診断率も高いと報告されている<sup>6</sup>。しかし、蓄積する有機酸の固定、診断にはガスクロマトグラフィーまたはガスクロ・マススペクトロメーターが不可欠で、今回、我々が経験してきた有機酸血症の尿中ガスクロマトグラフィーの分析に基き、新たにハイリスク患児の尿分析によってプロピオン酸血症1例、チロジン症1例を診断しており、従来から行っている検査項目の意義が大きい点を強調すると共に、頻度的には決して少なくはないと考えられる有機酸代謝異常症をハイリスク患者を中心に検査した結果について報告した。

#### 文献

1) 多田啓也ほか：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, 日小児会誌 87;2475, 1983

2) 大和田操ほか: 代謝性疾患のスクリーニング, 最新医学 40;2233, 1985

3) 崎山武志: 有機酸代謝異常, 最新医学 40;2329, 1985

4) Goodman, S. I. et al.: Diagnosis of organic acidemias by gas chromatography - mass spectrometry 1981, New York, Alan R. Liss Inc.

5) Chalmers, R. A. et al.: Organic acids in man. 1982, London, Chapman and Hall Ltd.

6) Chalmers R. A. et al.: Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. J. Inher Metab. Dis. 3, 27, 1980

検査項目	検査の対象となった状態	検査例数	異常例	正常例
アミノ酸 (血液、尿)	遅れん、呼吸障害、意識障害を示す新生児、乳児	25	3	22
	発育遅滞、遅れん、麻痺、筋緊張低下を示し代謝異常が疑われた幼児、学童	95	1	94
血中アンモニア	同上	36	4	32
血中乳酸 ビルビン酸	同上	95	2	93
眼科検査	関節拘縮、骨格異常、知能低下、顔貌異常を示す幼児、学童 筋緊張低下、肝脾腫、進行変性を示す幼児	25	16	9
血清及び白血球の 酸性水解酵素活性	同上	25	16	9

図1 1975 ~ 1985年に我々の教室で行ったハイリスク患児の検査

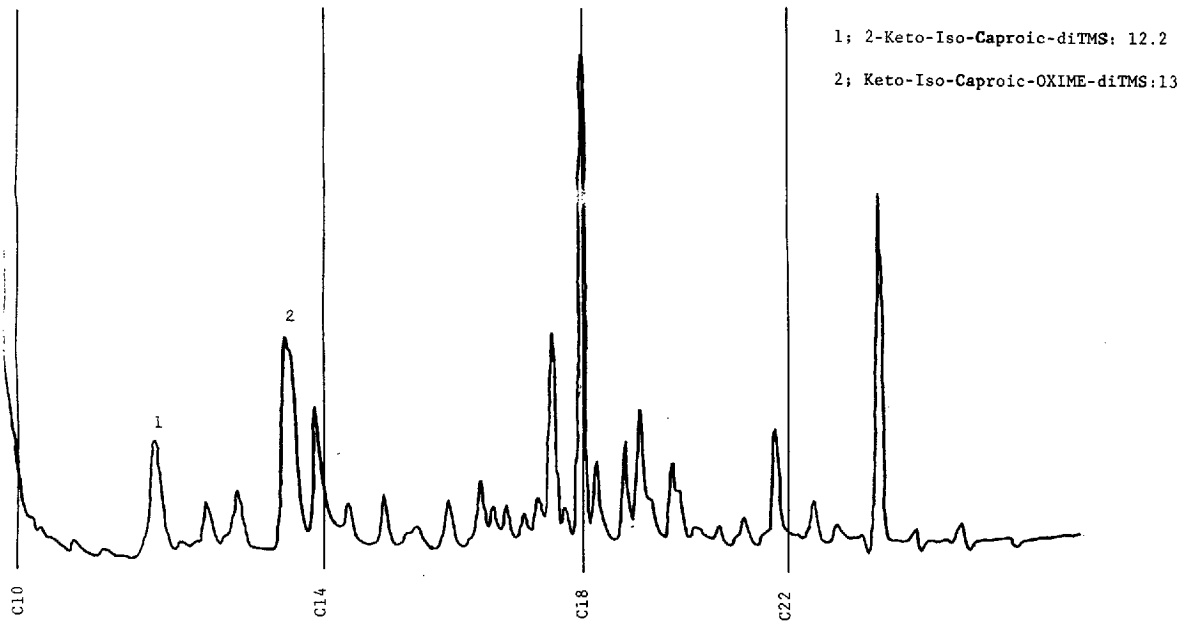


Fig. 2 GC-pattern of MSUD

- |                                  |                                  |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1; 3-OH-Propionic-diTMS: 12.1    | 2; Propionyl-Glycine-diTMS: 15.8 |
| 3; Methyl-Citric-Tetra TMS: 19.2 | 4; 3-OH-Propionic-TriTMS: 19.7   |

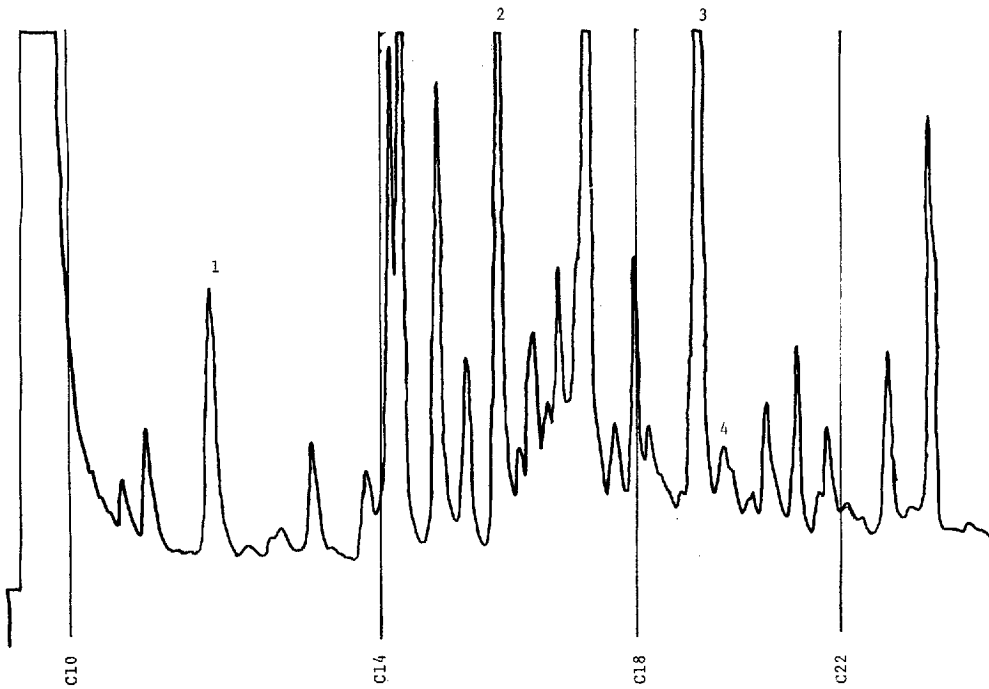


Fig. 3 GC-Pattern of Propionic Acidemia

1; Methyl-Malonic-diTMS:13.3  
3; Methylcitric-Tetra TMS:19.2

2; Propionyl-Glycine-MonoTMS:16.0  
4; 3-OH-Propionic-TriTMS: 19.7

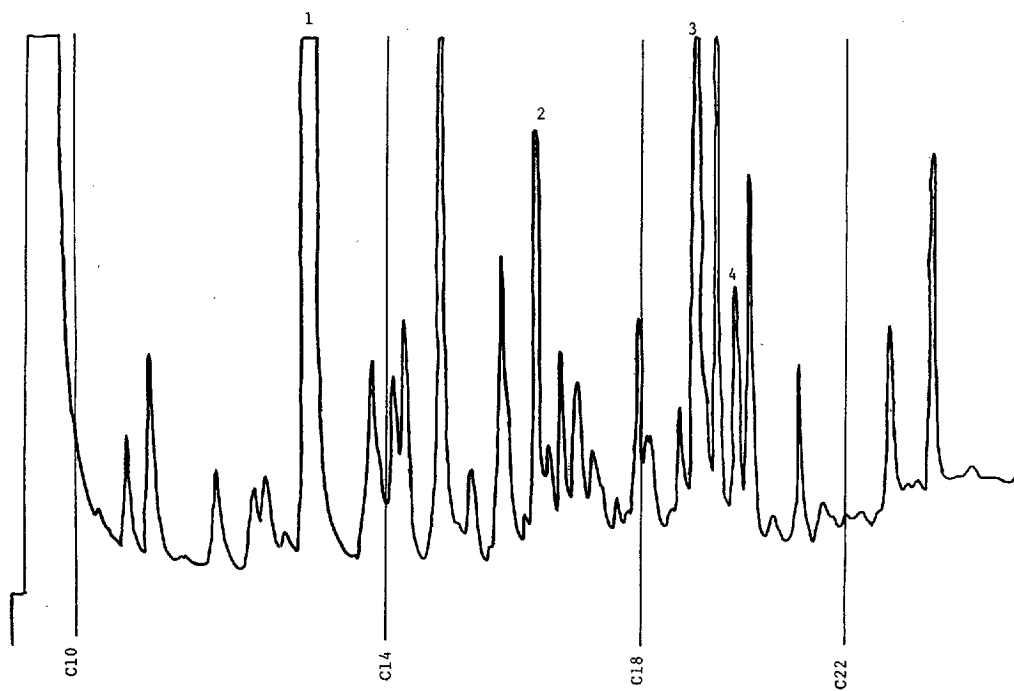


Fig. 4 GC-Pattern of MMA

1; Citric-TetraTMS:18.9

2; Sodium-Benzoic Acid Derivative

3; Dihydro-Orotic-TriTMS:20.6

4; Hippatic-monoTMS:21.7

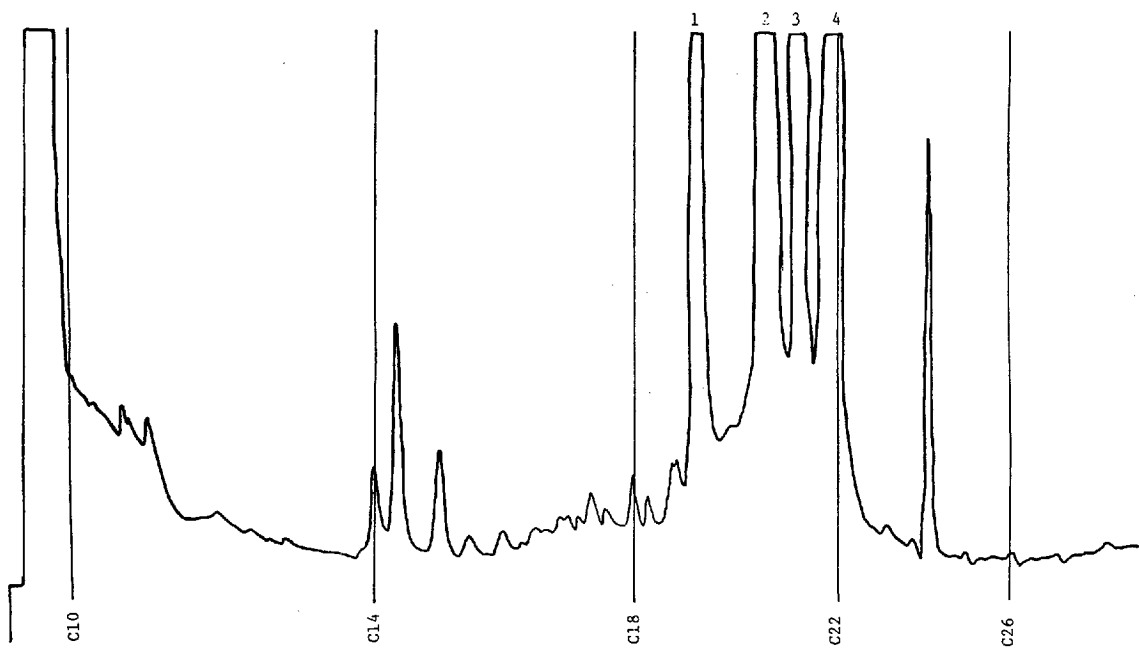
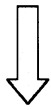


Fig. 5 GC-Pattern of Hyperammonemia



## 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



### 目的

早期発見・早期治療を必要とする疾患は数多くあるが、これらのうち代謝障害の結果、知能障害、退行、痙攣などの中枢神経症状や重篤な場合は致命的経過をとる疾患の早期診断と適切な治療は特に重要である。この目的に添って、我国でもフェニルケトン尿症やクレチン症をはじめとした新生児スクリーニングが行われ、一般集団の中から患者を発見し治療が行われて精神運動発達遅滞児発生の予防がなされている。しかし確立されたスクリーニング該当疾患はまだ少なく、何らかの臨床症状を呈して来院した患児のなかから適切な検査を行うことによつてのみ確定診断に到る疾患が多いことも事実であり、該当する疾患に必要な検査法の確立が臨床医が適格に判断をする指標として重要である。

これら疾患のうち、蓄積症の早期発見、診断は、保因者診断、出生前診断を行い再度の罹患児発生の予防に大切であるが大多数の罹患児の治療法はまだない。