

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

簡易尿ウレアーゼ法による有機酸血症のスクリーニング
- プロピオン酸血症，メチルマロン酸血症を中心に -

研究要旨

簡易尿ウレアーゼ法¹⁾とはろ紙尿あるいは原尿にureaseを加えて，大過剰に存在し分析を妨害する尿素を分解して除去した後，有機酸，アミノ酸，糖，糖アルコール，プリン，ピリミジンの代謝中間体をTMS誘導体としてGC/MSで一斉分析する方法で，通常0.1mlの尿で有機酸血症を含む多くの代謝異常症が化学診断できると考えられる。今回，ろ紙血のタンデムマスにより検出された無症状の28生日児を含むプロピオン酸血症（PCC）の4例を本法で分析したところ，指標物質であるメチルクエン酸のジアステレオマー1, 2のSD異常度（mean + n SDにおけるn値）は無症状児でもそれぞれ，37, 32と異常高値で，後に肝移植を受けた重症例ではそれぞれ1,600, 600と超異常高値であった。一方，羊水のメチルクエン酸を指標としてPCCの出生前診断ができる事実も考慮すると，本法により発症前のPCCも新生児期に殆ど見落しなく検出できるものと推定された。一方，メチルマロン酸尿症（MMA）の本法による感度，特異度については新生児マススクリーニング試験研究で2例（低～中等度の高排泄者で現在も無症状）が発見されたことから，簡易尿ウレアーゼ法でも良性で経過する可能性の高いMMAを高感度で検出できること，従って，MMAの新生児が偽陰性となる可能性は極めて低いことが確認された。

研究協力者

久原とみ子，井上義人，大土井千恵，
大瀬守眞，新家敏弘

（金沢医科大学総合医学研究所
人類遺伝学部門生化学）

研究目的

早期診断，早期治療が有効で，発生率の高い有機酸血症であるPCCとMMAが，新生児期に0.1ml尿を用いた簡易尿ウレアーゼ法¹⁾により確実に検出できるかどうかを，新生児スクリーニング試験研究成績やハイリスク児の診断支援研究の実績などをもとに検討した。

研究対象および方法

PCCの4例：福井医科大，重松らがる紙血のタンデムマスにより発見した無症状のPCC 28生日児（症例1），重症で後に肝移植をうけた7生日児（症例2），ある施設で0.1ml尿，TMS誘導体という条件では診断できないと判定された14生日児（症例3）と7生日児（症例4）の4症例，および，日令の近い対照児の尿を用いた。

MMAの2例：簡易尿ウレアーゼ法を用いた新生児マススクリーニング試験研究²⁾で発見された低～中等度のメチルマロン酸高排泄者2例（現在も無症状）

について追跡した。

研究結果および考察

スキーム1に示すようにこの前処理法ではクレアチニンも回収されるので尿中代謝物の濃度の評価が適切に行える。図1に症例2の同一尿試料についてウレアーゼ法と有機溶媒抽出法を比較したクロマトグラムを示した。PCCの指標物質であるメチルクエン酸ジアステレオマー1, 2のSD異常度（mean + nSDにおけるn値）は症例1の28生日の無症状児でも37, 32と大きく，メチルクエン酸が発症前でも著明に増加していることがわかった。症例2で1,600, 600と超異常度を示した。症例3, 4でそれぞれ，79, 125, 55, 103であった（図2）。羊水のメチルクエン酸を指標としてPCCの出生前診断ができることを合わせ考えると，試料調製やGC/MS conditioning に問題がなければ新生児期に0.1ml尿，TMS化での簡易尿ウレアーゼ法により発症前のPCCをほぼ確実に検出できるものと推定される。

この簡易尿ウレアーゼ法を用いて行った新生児マススクリーニング試験研究成績でMMA 2例（低～中等度の高排泄者で現在も無症状）が発見された。この2名のメチルマロン酸排泄量の経過を追跡したところ，0.16～1.7，および0.5～3 mol/mol Creであり，対照との比較は明白であった。

一方、175万人を対象としたケベックでの尿による試験成績（1975年より）からMMAの発生率は8.3万人に1人、1.4 mol/mol Cre以下の無症状の低～中等度MMA高排泄者は5万人に1人で、0.2～1.1 mol/mol Cre で経過したことが報告されている³⁾。

このことから、簡易ウレアーゼ法でも無症状を含む低～中等度の高排泄者を見落とさないこと、発症の確率が高いMMAは最初からその濃度がかなり高く、偽陰性となる可能性は殆どないと推定される。久留米大学、島根医科大学、千葉県こども病院を含めた4試験機関全体では1月末で3.3万人を分析し、尿素回路異常症2例など重要な疾患が発見されている。また、MMA高排泄者の発見率は1/1.7万人であった。

我が国において紙血のタンデムマスを用いた重松らによる4万人を対象としたスクリーニング成績の発見例はPPCの1例である⁴⁾。簡易尿ウレアーゼ法の発見率はテクニカルには金沢医科大も含めて改善の余地があることを考慮するとこれより向上するものと考えられ、心身障害発症予防に有効な方法と確信している。

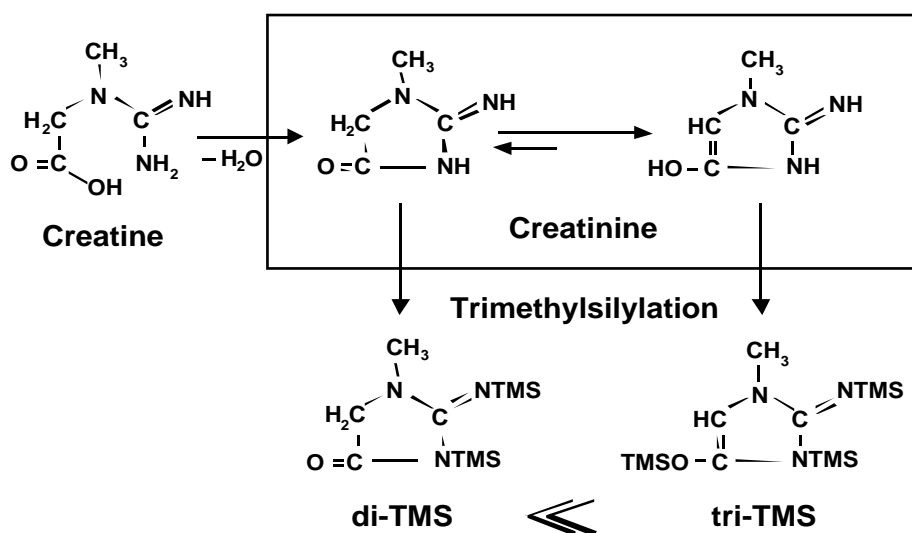
謝辞

MMA高排泄者1例の追跡調査にご協力頂きました

金沢医科大学 高橋弘昭教授、柿沼宏明助教授に御礼申し上げます。

文献

1. I. Matsumoto, T. Kuhara: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 15: 43-57 (1996)
2. T. Kuhara et al: Pilot study of gaschromatography-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J. Chromatogr. B*, 731: 141-147 (1999)
3. Sniderman LC et al: Outcome of individuals with low-moderate methylmalonic aciduria detected through a neonatal screening program. *J. Pediatr.* 134: 675-680 (1999)
4. 重松陽介：ESI-MS/MSによる新生児代謝異常マスクリーニング-パイロットスタディ地域の拡大と患者検体分析による知見の蓄積-平成11年度厚生科学研究-マスクリーニングの見逃し等を予防するシステムの確立に関する研究-研究班全体会議. 2000. 2. 12



Scheme 1 Determination of urinary creatinine using a stable isotope-labelled internal standard.

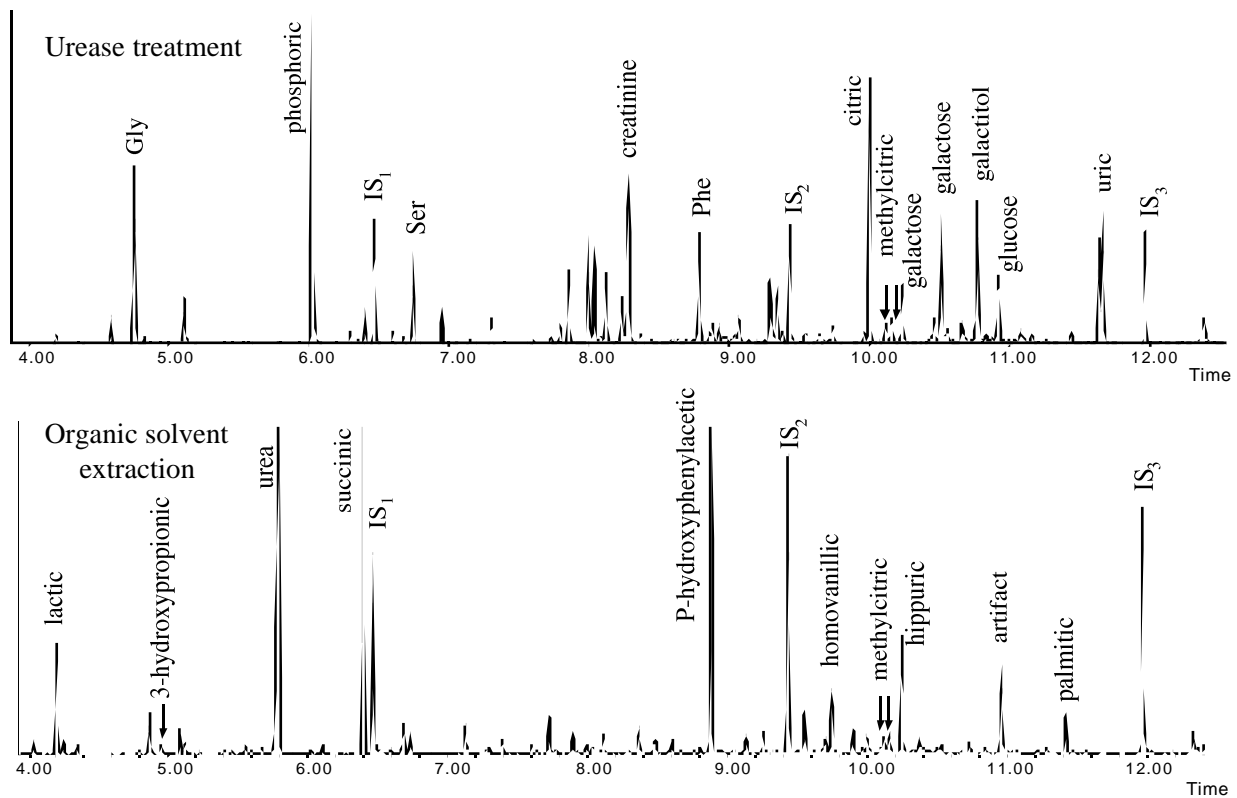


Fig. 1 GC/MS analysis of TMS derivatives of urinary metabolites from a 28-days-old asymptomatic propionic acidemia patient. The urine sample was kindly given from Prof. Shigematsu.

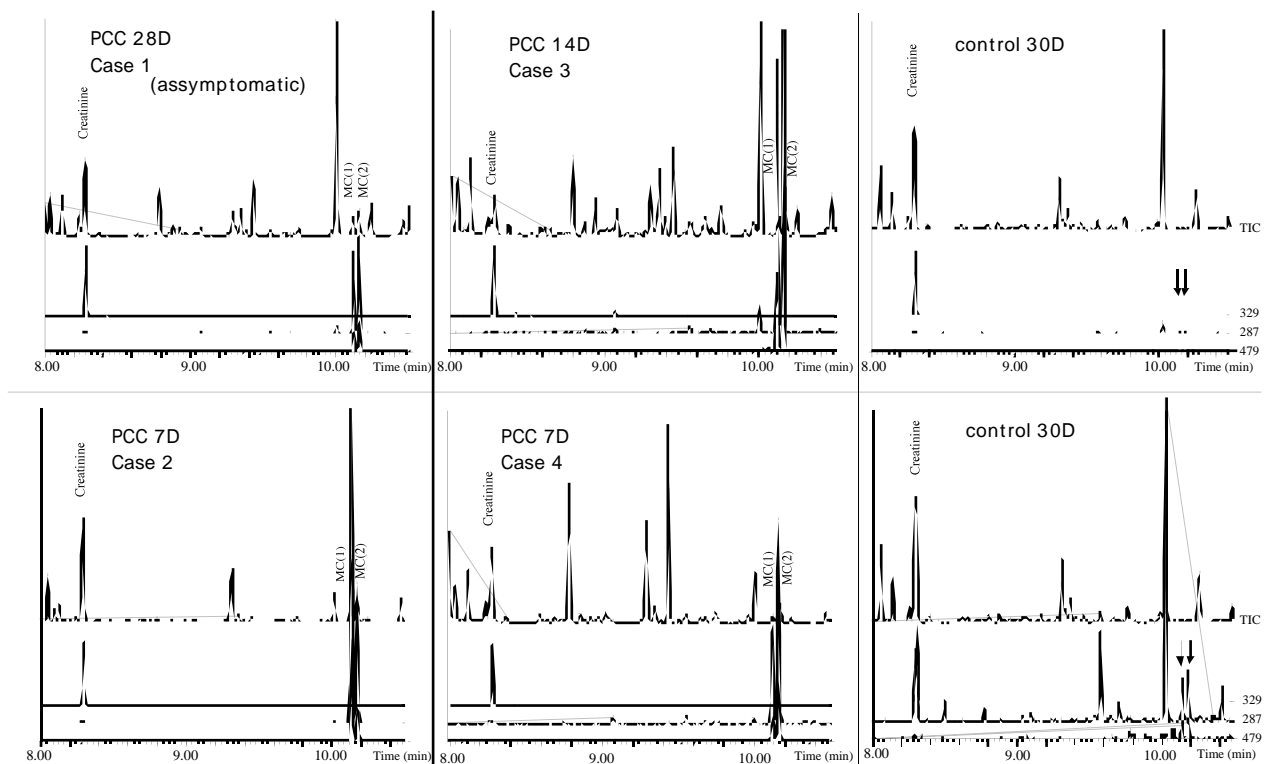


Fig. 2 TIC & mass chromatograms of four cases with propionic acidemia (PCC)

MC: methylcitrate - TIC $\times 0.1$ - m/z 329 $\times 1$ - m/z 287 $\times 4$ - m/z 479 $\times 7$
 Partly reduced (1/25) scale for control is also shown (lower).