

有機酸代謝異常症のハイリスクスクリーニング結果 (I)

山口 昭弘 三上 篤 水嶋 好清 福士 勝
清水 良夫 菊地由生子 楠 祐一*

要 旨

医療機関にて筋緊張低下、ケイレン、嘔吐などの臨床症状から有機酸代謝異常症が疑われたハイリスク児 53 例につき、2 カラムキャピラリーガスクロマトグラフィーによる尿中有機酸代謝物測定によるスクリーニングを行った。その結果、先天性高乳酸血症 2 例、グルタル酸尿症 2 例(同胞例)、フルクトースジフォスファターゼ欠損症 1 例および非ケトーシス型ジカルボン酸尿症 1 例の合計 6 例の患児が発見された。

1. 緒 言

有機酸代謝異常症は、アミノ酸、脂質および糖質の中間代謝経路の障害により、有機酸が異常蓄積された状態であり、現在、50 種類以上の疾患が知られ、さらに年々、新しい疾患も発見されつつあり。本症のスクリーニングに関しては、障害部位の多様性に対応できる、簡便、安価かつ大量検体処理が可能な検査法が存在しないため、意識障害、嘔吐、ケイレンなどの一般的な臨床症状を呈するハイリスク児に対し、尿中の有機酸およびその代謝物を、ガスクロマトグラフィー(GC)およびガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)を用いて測定する方法によりなされている。しかし、実際には、GC-MSを有する限られた大学研究室でのみ実施可能であり、むしろ本症が強く疑われた児に対する確定診断を目的とした性格が強い。このことから、我々は、より多くのハイリスク児に対するスクリーニングを行うため、安価で保守、管理の容易な 2 カラム

キャピラリー GC システムによるスクリーニング法の基礎的条件検討を行ってきたが²⁾、今回は、この方法による、1 年半のパイロットスクリーニングの結果から、有機酸代謝異常症ハイリスクスクリーニングの有用性について検討を加えた。

2. 方 法

2-1 測定方法

尿中有機酸代謝物は、既報に従い²⁾、オキシム化、ジエチルエーテル/酢酸エチル抽出、トリメチルシリカ化後、2 カラムキャピラリー GC システムにより測定した。また、GC-MS による確認同定は旭川医科大学小児科において行った。

2-2 対 象

札幌市の医療機関(一部市外も含む)にて、臨床症状から有機酸代謝異常症が疑われたハイリスク児 53 例を対象とした(Table 1)。

Table 1 High-risk patients in the screening for organic acidemia

A: Age distribution		B: Symptom or Biochemical abnormality			
<1M	7 (13.2%)	Acidosis*	9 (17.0%)	Hyperammonemia	4 (7.5%)
-3M	5 (9.4)	Hypotonia	8 (15.1)	Hypoglycemia	3 (5.7)
-6M	6 (11.3)	Epilepsy	8 (15.1)	Vomiting	3 (5.7)
-1Y	7 (13.2)	Convulsion	7 (13.2)	Reye like syndrome	2 (3.8)
-2Y	6 (11.3)	Mental retardation	7 (13.2)	Weak suction	1 (1.9)
>3Y	22 (41.5)	Developmental delay	5 (9.4)	Others	8 (15.1)
Total	53	* increase of lactic and pyruvic acids were indicated for 3 patients			

* 旭川医科大学小児科学教室

3. 結 果

3-1 ハイリスク状況

スクリーニングの対象となった53例の年齢構成は、生後1日の2例を含めた1カ月以内が7例(13.2%)、その後、2歳までが58.5%で、3歳以上は41.5%であった(Table 1-A)。ハイリスクの理由としては、アシドーシス(17.0%)、筋緊張低下(15.1%)、てんかん(15.1%)、ケイレン(13.2%)、精神発達遅滞(13.2%)などが高頻度に見られた(Table 1-B)。

3-2 ハイリスクスクリーニング結果

スクリーニングを開始した1990年3月から1991年8月までの1年半の期間に、53例のハイリスク児につき、尿中有機酸代謝物の測定を行った結果、一次性的有機酸代謝異常症としては、先天性高乳酸血症2例、グルタル酸尿症I型2例(同胞例)、フルクトースジフォスファターゼ欠損症1例および非ケトーシス型ジカルボン酸尿症1例の合計6例が検出された(11.3%)(Table 2)。また、2次性あるいは一過性の異常としては、軽度の高乳酸血症2例、ケトーシス1例、ケトーシス型ジカルボン酸尿症(脱水症状)およびその他6例の合計11例(20.8%)において認められた。また、抗てんかん薬のバルプロ酸代謝物が認められた例が4例、Tanakaら³⁾のリテンションインデックスを用いても同定できなかった不明ピークが存在した例は6例であった。

Table 2 Results of selective screening for organic acidemia (Screened: 53, Period: Mar.'90-Aug.'91)

Primary	6(11.3%)
Lactic acidemia	2
Glutaric acidemia	2*
Fructose diphosphatase deficiency	1
Nonketotic dicarboxylic acidemia	1
Secondary or Transient	11(20.8%)
Lactic acidemia	2
Ketosis	1
Ketoic dicarboxylic acidemia	2
Others	6
Drugs or Unknowns	10(18.9%)
Drugs	4
unknown peak	6

*sibling case

また、GC-MSによる異常代謝物の測定を行った例は、18例(34%)であり、その内訳は、最終的な確認(GC分析のみでも同定可能)が11例、不明ピークあるいは疑わしいピークの否定(GC分析のみでは判断不能)が7例であった。

3-3 患児クロマトグラムの解析

(1) 先天性高乳酸血症

症例A.I(生後1日, 男児)代謝性アシドーシスにより、スクリーニングを行った例で、乳酸 $311\mu\text{mol}/\text{mg}-\text{creatinine}$ (正常 0.83 ± 0.42)、ピルビン酸 $8.74(0.19\pm 0.06)$ と著明な増大を示した(Fig. 1)。重炭酸ナトリウムなどによる治療で、一旦は寛解状態を得、乳酸、ピルビン酸の値も10分の1程度まで低下していたが、2カ月頃より状態が悪化し、3カ月目に死亡した。

症例Y.T(生後1日, 男児)出生直後より、全体状態悪く、生後1日の尿で、乳酸 $753\mu\text{mol}/\text{mg}-\text{creatinine}$ (正常 0.83 ± 0.42)、ピルビン酸 $16.8(0.19\pm 0.06)$ と症例A.I以上の著明な増大が認められ、生後5日目に死亡した。この例の同胞例もやはり先天性高乳酸血症により生後18日で死亡しており、ミトコンドリア呼吸鎖の障害が示唆されている。

(2) グルタル酸尿症I型

症例A.E(8カ月, 女児)無熱性ケイレンによる入院後、筋緊張低下も認められた例で、グルタル酸 $20.0\mu\text{mol}/\text{mg}-\text{creatinine}$ (正常 $\text{ND}<0.06$)の著増に加え、グルタコン酸および3-OH-グルタル酸の排泄も認められる特徴的な有機酸プロファイルから、グルタル酸尿症I型と診断された(Fig. 2)。現在、トリプトファン制限食、GABA、カルニチンおよびタミンB₂投与による治療がなされ良好に経過している。

症例Y.E(2歳, 女児)症例A.Eの姉で、熱性ケイレンの既往歴が1度あるのみで、心身発達の遅延は認められていないが、尿中有機酸の測定結果は、グルタル酸 $17.7\mu\text{mol}/\text{mg}-\text{creatinine}$ (正常 $\text{ND}<0.06$)の著増、グルタコン酸および3-OH-グルタル酸の検出と症例A.Eと全く同じプロファイルを示した。現在、症例A.Eと同じ治療を行っている。

(3) フルクトースジフォスファターゼ欠損症

症例Y.O(4歳, 男児)ケトン性低血糖症により糖原病などが疑われた症例で、発作時尿において乳酸 $294\mu\text{mol}/\text{mg}-\text{creatinine}$ (正常 0.83 ± 0.42)、ピルビ

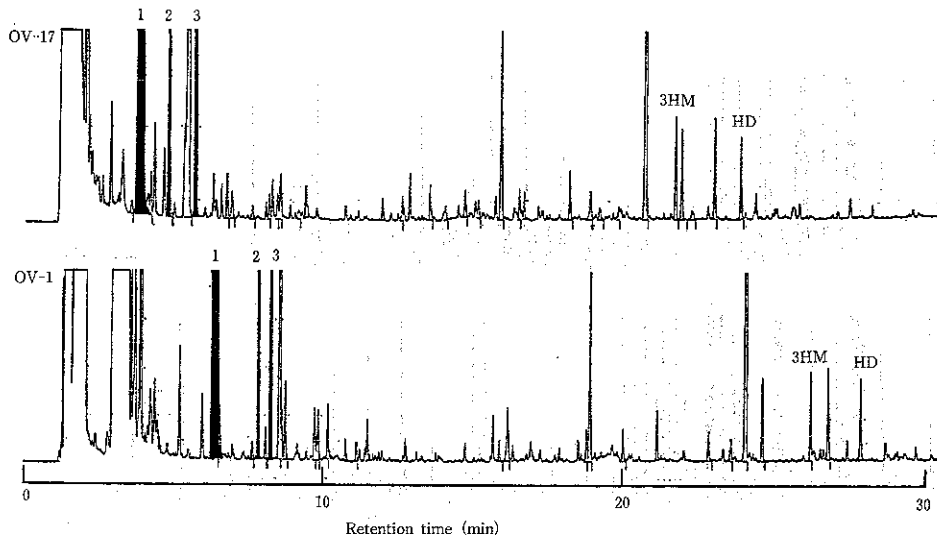


Fig. 1 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient (A. I, 1 day) with lactic acidemia

1: lactate, 2: 2-OH-butyrate, 3: pyruvate

3HM, HD: 3-OH-myristate, heptadecanoate as internal standards (the same as in the other figures)

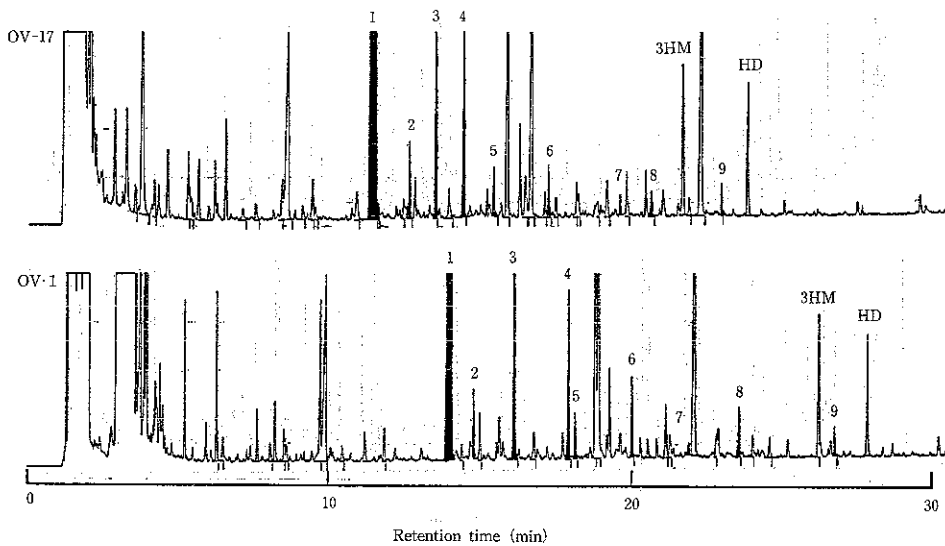


Fig. 2 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient (A. E, 8 months) with glutaric acidemia type I

1: glutarate, 2: glutaconate, 3: agipate, 4: 3-OH-glutarate, 5: pimelate, 6: suberate, 7: agelate, 8: sebacate, 9: 3-OH-sebacate

ン酸 7.71 (正常 0.19 ± 0.06), 3-OH-酪酸 38.3 (正常 0.34 ± 0.17) およびアセト酢酸 26.1 (正常 $ND < 0.1$) の著増に加え、グリセロールの増大が認められ、糖新生系の障害の可能性が示唆された (Fig. 3)。GC, GC-

MS による測定では、障害酵素の同定は困難であったが、臨床症状およびフルクトースなど各種負荷試験の結果から、フルクトースジフォスファターゼ欠損症と診断された。

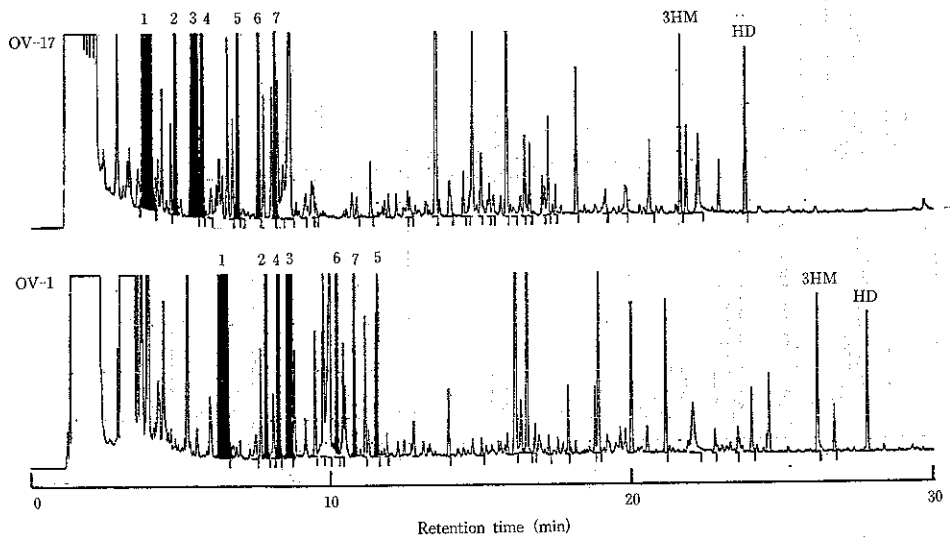


Fig 3 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient (Y. O, 4 years) with fructose diphosphatase deficiency

1: lactate, 2: 2-OH-butyrate, 3: 3-OH-butyrate, 4: pyruvate, 5: glycerol, 6,7: acetoacetate

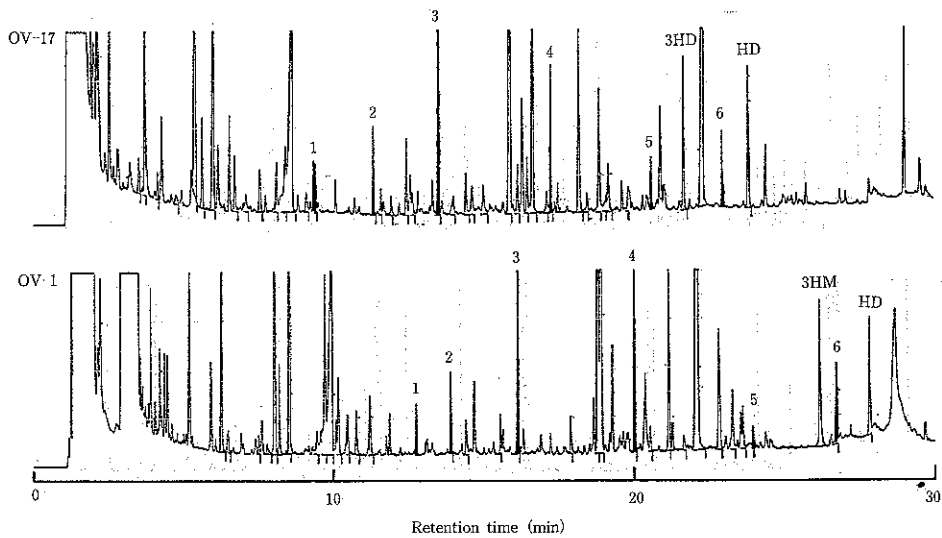


Fig. 4 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient (M. A, 8 months) with nonketotic dicarboxylic acidemia

1: fumarate, 2: glutarate, 3: adipate, 4: suberate, 5: sebacate, 6: 3-OH-sebacate

(4) 非ケトーシス型ジカルボン酸尿症
症例M.O. (8カ月, 男児): ライ様症候群が疑われた症例で, 発作入院後, 寛解に向かいつつある時の尿を測定した(Fig 4)。ケトン体, 乳酸, ビルビン酸の上昇が見られず, フマル酸 $0.75 \mu\text{mol}/\text{mg}-\text{creatinine}$

(正常 < 0.3), グルタル酸 0.50 (正常 < 0.1), アジピン酸 1.57 (正常 0.12 ± 0.07), スベリン酸 0.55 (正常 0.09 ± 0.05) の C4 から C8 のジカルボン酸の上昇に加え, β 酸化障害の指標となるセバシン酸 1.10 (正常 $\text{ND} < 0.03$) も検出されたことから非ケトーシス型ジ

カルボン酸尿症と診断された。

4. 考 察

有機酸代謝異常症は、1966年にTanakaら⁹が尿のGC分析によりイソ吉草酸血症を報告して以来、GC-MSによる異常代謝産物の同定に基づき、数多くの疾患が発見され、中間代謝経路の解明にも大きく貢献することとなった。有機酸代謝異常症の中で最も頻度の高い高乳酸血症は、1から2万人に1人、ついでメチルマロン酸血症が数万から10万人に1人とされているが、全体では少なくとも1万人に1人以上の発生頻度と考えられている。しかし、GC-MSによる診断法がほぼ確立された現在においても、本症に対する一般的な認識は低く、また、GC-MSを有する限られた施設でのスクリーニングも対象がかなり絞られた確定診断的なものであるため、原因不明の精神発達遅滞や乳幼児期の突然死の背景に本症が存在する可能性も依然として残されていると考えられる。このことから、我々は、通常のスクリーニングセンターにおいても利用できる、保守管理の容易な2カラムキャピラリーGCシステムを導入し、少しでも本症が疑われる児にまでスクリーニング対象範囲を拡大したハイリスクスクリーニングを検討した訳である。

今回の、1年半のパイロットスクリーニングでは、53例のハイリスク児の中から、6例の有機酸代謝異常症患児が発見されており、対象範囲を拡大したハイリスクスクリーニングにも関わらず、その頻度の高さは注目に値する。個々の症例についての考察を加えると、高乳酸血症の2例はいずれも典型的な新生児期発症型で、生後1日に診断は可能であったものの、最終的には救命することはできなかった例である。しかし、症例A-I (Fig 1)は、重炭酸ナトリウムによるアシドーシスの補正により、症状の寛解および乳酸、ピルビン酸の低下を認め退院しており、その後の定期的な測定を行っていなかったならば、一過性として見過ごされた危険性を含んでいる。高乳酸血症の酵素障害部位については、ピルビン酸代謝、糖代謝、ミトコンドリア呼吸鎖系など多岐にわたる関連酵素活性の測定が必要となるが、この2症例ともミトコンドリア呼吸鎖系酵素の障害が認められている。次に、グルタル酸尿症I型の姉妹例は、妹の症例A-E (Fig 2)の無熱性ケイレンを契機に、2歳までほとんど無症状の姉も本

症と診断されたケースである。有機酸代謝異常症に最も典型的なアシドーシスを伴わず、これだけの臨床データからは、一般的には有機酸代謝異常症を疑うことは困難で、積極的なスクリーニングによって、はじめて検出することができる疾患と考えられた。フルクトースジフォスファターゼ欠損症の症例M-O (Fig 3)は、ケトン性低血糖症の発作を繰り返していた例で、発作時の尿にケトン体、乳酸、ピルビン酸に加え、グリセロールの著増が認められたことから、糖新生系の障害が考えられた訳であるが、寛解期の尿においては、全く異常は見られず、従来から言われているように、採尿のタイミングに注意を要することを改めて認識した。非ケトーシス型ジカルボン酸尿症の症例M-O (Fig 4)は、セバシン酸が検出されたことから、 β 酸化障害による本症と診断されたが、寛解期に向かいつつある時の尿であるため、ジカルボン酸の増大はそれほど顕著ではなく(正常の数倍から10倍)、脱水状態によるケトーシス型ジカルボン酸尿症との鑑別に注意する必要があった。

我々の、ハイリスクスクリーニングシステムは、2カラムGCによる一次スクリーニングとGC-MSによる確認検査よりなり、GC分析のみでも同定可能な異常ピークの最終確認も含めて、GC-MSによる測定を行った例は18/53例(34%)であるが、GC分析のみでは判断不能な不明ピークあるいは疑わしいピークの否定は、7/53例(13%)と、大部分がGC分析のみで対応できることが判る。実際、今回、検出された患児も、一次スクリーニングの段階で全て診断可能であった。しかし、診断結果を左右する、グルタコン酸、3-OH-グルタル酸、グリセロールおよびセバシン酸については、夾雑ピークの可能性を否定しきれないため、最終的なGC-MSによる確認同定は不可欠であると考えられる。

5. 結 語

2カラムキャピラリーGCシステムによる有機酸代謝異常症ハイリスクスクリーニングのパイロットスタディの結果、53例のハイリスク児の中から6例の患児が発見され、本スクリーニングの有用性が確認された。今後、スクリーニング対象範囲の拡大とともに、GC/GC-MSの限界をふまえ、効果的な診断のための関連酵素活性測定、遺伝子解析技術を導入し、スクリーニ

シグセンターとしての充実を図って行きたいと考える。

謝 辞

ハイリスクスクリーニングを行うにあたり、積極的に検体採取へのご協力を頂きました、各医療機関の諸先生方に深謝致します。

6. 文 献

- 1) 松本勇：代謝，26 (4)，81-94，1989.
- 2) 山口昭弘他：札幌市衛生研究所年報，17，84-91，1990.
- 3) Tanaka K, and Hine D. G.: J Chromatogr., 239, 301-322, 1982.
- 4) Tanaka K., et al: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 236-242, 1966.

Results of Selective Screening for Organic Acidemia (I)

Akihiro Yamaguchi, Atushi Mikami, Yoshikiyo Mizushima,
Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi
and Tomoichi Kusunoki*

ABSTRACT

We described the results of selective screening for organic acidemia by the measurement of abnormal metabolites in urine using a 2-column capillary gas chromatography. Two patients with congenital lactic acidemia, a sibling case with glutaric acidemia type I, one with fructose diphosphatase deficiency and one with nonketotic dicarboxylic acidemia (the total of six patients) were detected from 53 high-risk infants suspecting the organic acidemia with hypotonia, convulsion or vomiting etc.

* Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College.