

有機酸代謝異常症の ハイリスク・スクリーニング結果(II)

山口 昭弘 福士 勝 清水 良夫 菊地由生子
楠 祐一*

要 旨

我々は、臨床的に有機酸代謝異常症が疑われたハイリスク児を対象に、2カラムキャピラリーガスクロマトグラフィ(GC)を用いて尿中有機酸代謝物を測定するスクリーニングシステムを導入し、パイロットスタディを行ってきた。最近1年間、61例に対するスクリーニングにより、高乳酸血症2例およびメチルマロン酸血症1例が新たに発見され、有機酸代謝異常症の発生頻度の高さが改めて認識された。このうち、メチルマロン酸血症については、臨床データからは有機酸代謝異常症を強く疑うことは困難であり、積極的なスクリーニングによってはじめて検出が可能であった。しかしながら、最終的にこれら患児はいずれも救命できず、本スクリーニングにより、患児の早期発見・早期診断は可能なものの、現時点では、治療面において問題が残されている。

1. 緒 言

有機酸代謝異常症は、新生児期から幼児期にかけて意識障害、嘔吐、ケイレンなどで発症を見る疾患であり¹⁾、脂質、アミノ酸あるいは糖質代謝経路の広範囲にわたり、現在、50種類以上の酵素障害部位が知られている。本症のスクリーニングは、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質量分析計(GC-MS)を用いて測定する方法により、これまで大学研究室を中心に実施されてきた^{2,3)}。しかし、スクリーニングよりも、むしろ確定診断を目的とした性格が強く、ハイリスクの対象はかなり絞られた状況にある。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システムを導入し、パイロットスクリーニングを行ってきた^{4,5)}。本報では、最近1年間に新たに発見された、高乳酸血症およびメチルマロン酸血症の解析を中心に、これまでの結果をふまえ、有機酸代謝異常症ハイリスク・スクリーニングの重要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⁴⁾、オキシム化、ジエチルエーテル/酢酸エチル抽出、トリメチルシリル

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-MC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、1991年9月から1992年8月までの1年間に、スクリーニング依頼を受けたハイリスク児61例を対象とした。

3. 結 果

3-1 スクリーニング結果

新たにスクリーニングを行った61例のハイリスク児の中から、一次性的有機酸代謝異常症は、先天性高乳酸血症2例、メチルマロン酸血症1例の合計3例が発見された。一方、二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、ジカルボン酸血症1例が認められたが、これらはいずれも再採尿検査において正常化している。また、有機酸代謝異常症ではないが、尿素サイクル異常症のオルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)欠損症1例が補助診断され、パニルマンデル酸とホモパニリン酸の上昇が他の1例において認められた。後者は、高速液体クロマトグラフィの結果⁶⁾からも神経芽細胞腫が疑われたため、精査となったが正常であった。

*旭川医科大学小児科

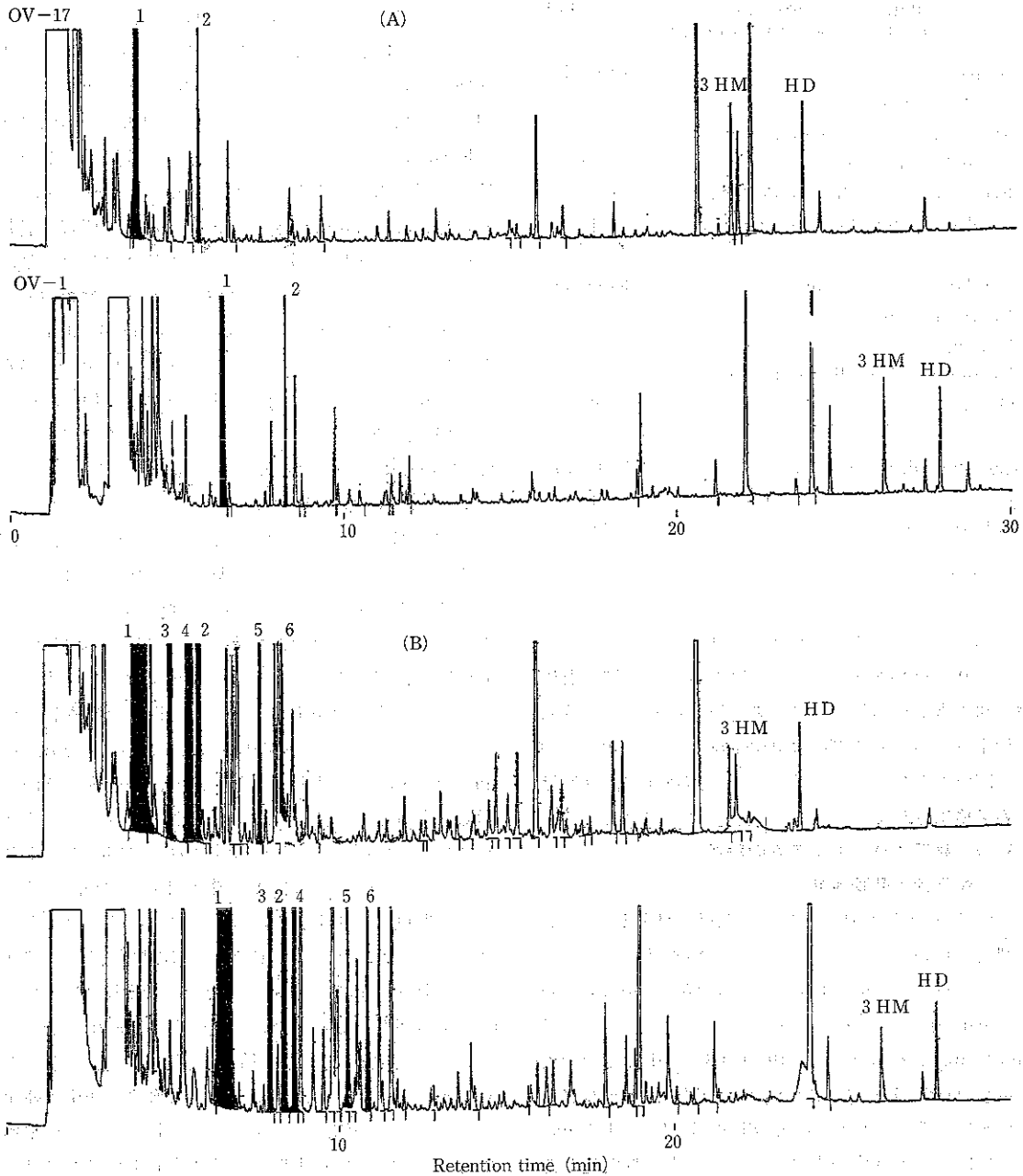


Fig. 1 Chromatograms of organic acids extracted from the urine of the patient (S.O) with lactic acidemia at 3 days (A) and 15 days (B) after birth

1: lactate, 2: pyruvate, 3: 2-hydroxybutyrate, 4: 3-hydroxybutyrate, 5,6: acetoacetate (oxime)
3HM, HD: internal standards
Oxime-TMS derivatives of organic acids were analyzed on both OV-1 (lower) and OV-17 (upper) columns with single injection.

Table 1. Results of selective screening for organic acidemia (Screened: 114, Period: Mar. '90—Aug. '92)

Primary	9(7.9%)
Lactic acidemia	4
Methylmalonic acidemia	1
Glutaric acidemia	2*
Fructose diphosphatase deficiency	1
Nonketotic dicarboxylic acidemia	1
Secondary or Transient	16(14.0%)
Lactic acidemia	4
Ketosis	1
Ketoic dicarboxylic acidemia	3
Others	9
Drugs or Unknowns	15(13.2%)
Drugs	4
unknown peak	11

*sibling case

今回の結果を含め、これまで2年半のスクリーニングにより、114例のハイリスク児の中から9例の有機酸代謝異常症が発見されている (Table 1)。このうちの約半分に当たる4例は高乳酸血症であり、次いで頻度が高いとされているメチルマロン酸血症が、今回はじめて検出された。

3-2 患児クロマトグラムの解析

(1) 先天性高乳酸血症

症例 S.O (生後3日, 男児) 家族歴に問題なく, 心筋肥大, 代謝性アシドーシス, 低血糖を認めスクリーニングを行った。生後3日の尿では乳酸 $72 \mu\text{mole/mg-creatinine}$ (正常 0.83 ± 0.42), ビルビン酸 $1.7 \mu\text{mole/mg-creatinine}$ (0.19 ± 0.06) と中程度の増大を示した (Fig 1-A)。この時の, 血清乳酸, ビルビン酸の値は, それぞれ 99.7 mg/dl (正常 <50), 1.7 mg/dl (正常 <2) と軽度の上昇であった。出生時仮死があり, これによる二次的な乳酸の上昇の可能性が考えられたが, 生後15日, アシドーシス発作時の尿による再検査では, 乳酸 $610 \mu\text{mole/mg-creatinine}$, ビルビン酸 $20.2 \mu\text{mole/mg-creatinine}$ と著増しており, ケトン体の排泄も認められた (Fig 1-B)。この時の血清乳酸, ビルビン酸も, 155 mg/dl , 4.49 mg/dl と前回よりも上昇していた。患児はその後, ジクロル酢酸投与に

よりアシドーシスの補正は順調に経過していたが, 心筋症による心不全により3か月目に死亡した。

症例 Y.M (生後2日, 女児) 生後1日から嘔吐, 出血傾向, 代謝性アシドーシスを認め, 生後2日の尿を用いて有機酸分析を行ったところ, 前処理の段階で尿を塩酸酸性とした時点で大量の淡黄色沈殿を生じた。検査結果の方も, 乳酸 $>1,000 \mu\text{mole/mg-creatinine}$, ビルビン酸 $>100 \mu\text{mole/mg-creatinine}$ と極端な異常高値を示し, 小康を得ることなく生後3日目に多臓器不全にて死亡した。血清の乳酸, ビルビン酸の値も, それぞれ 295 mg/dl (正常 <50), 3.9 mg/dl (正常 <2) と上昇しており, アミノ酸全般の血清, 尿中での異常高値も見られた。この例は, 出生直後より尿が出にくく, 尿が濃縮状態にあったと思われるがクレアチニンは $81 \mu\text{g/ml}$ と通常の新生児レベルであった。

(2) メチルマロン酸血症

症例 A.G (4か月, 男児) 生後1か月頃までは順調に発育していたが, その後, 風邪を契機に哺乳不良, 汎血球減少, 体重増加不良 (4か月時 $3,800 \text{ g}$) 認めた。本スクリーニング以前の検査では, 高アンモニア血症, 低血糖, 代謝性アシドーシスいずれも認められず, ウリテストも陰性の結果であった。有機酸分析を行ったところ, メチルマロン酸の巨大なピーク ($47.4 \mu\text{mole/mg-creatinine}$, (正常 <0.1)) に加え, その他, 診断の指標となる3-ヒドロキシプロピオン酸およびメチルクエン酸の位置にピークが検出された (Fig 2)。それぞれ, マススペクトルによる確認同定の結果, メチルマロン酸血症と化学診断された。高速液体クロマトグラフィーによる血清の測定では, 発作時以外は, メチルマロン酸は検出されず ($<2 \text{ mg/dl}$), 乳酸, ビルビン酸も正常範囲内であった。患児の血清, 尿中メチルマロン酸レベルのフォロー結果を Fig. 3 に示した。なお, ビタミン B_{12} 欠乏の鑑別のため血清, 尿中の総ホモシステインの測定⁹⁾ も行ったが, 上昇はなく正常値であった。さらに, 新生児先天性代謝異常症等スクリーニング用に採取されていた本患児の保存乾燥濾紙血についても, 比色法⁹⁾ により測定する機会を得た。生後5日, 17日 (副腎過形成症検査にて要再検の結果正常) のメチルマロン酸の値は, それぞれ $7.6, 5.1 \text{ mg/dl}$ (正常 $<2 \text{ mg/dl}$) と発症前の新生児期に既に上昇していたことが確認できた。

その後, 患児は低タンパク負荷, ビタミン B_{12} ・カル

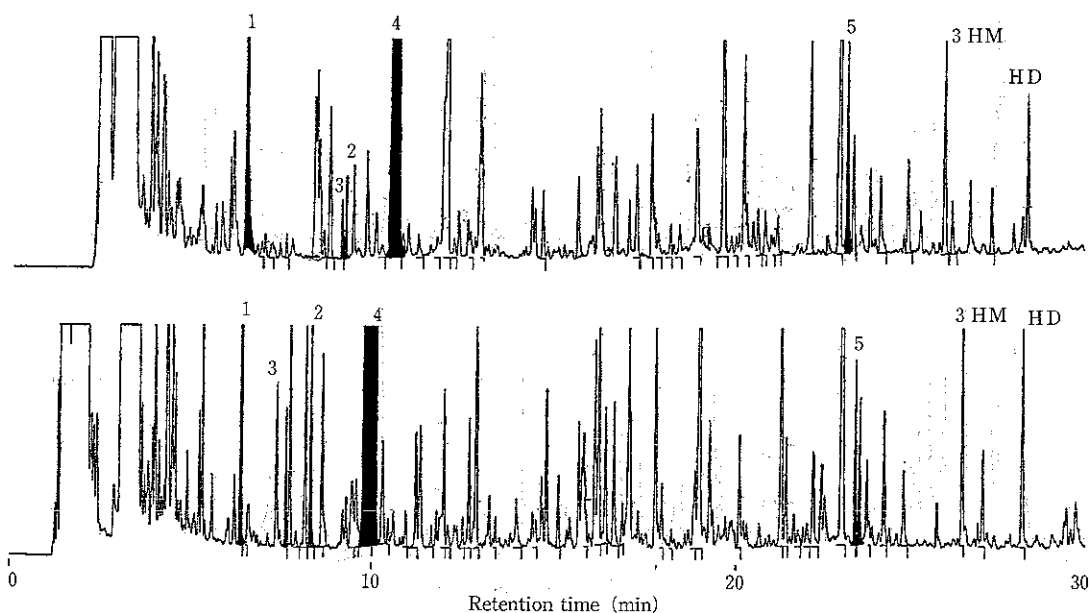


Fig. 2 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of the patient (A.G) with methylmalonic acidemia

1: lactate, 2: pyruvate, 3: 3-hydroxypropionate, 4: methylmalonate, 5: methylcitrate
Other descriptions are the same as in Fig 1

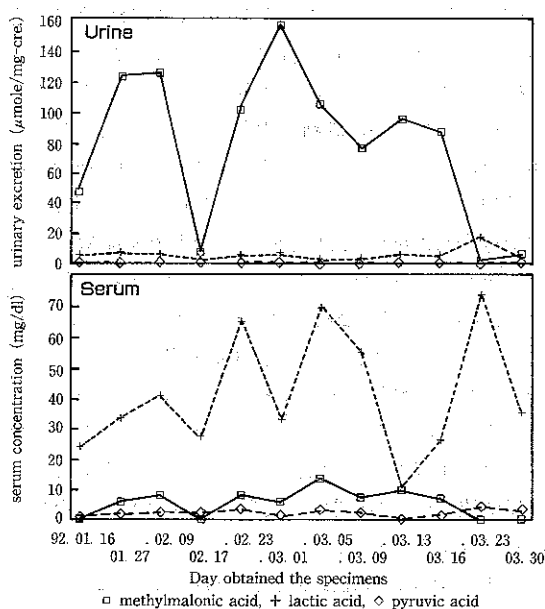


Fig. 3 Concentration levels of methylmalonic acid, lactic acid and pyruvic acid each in urine and serum samples from the methylmalonic acidemia patient (A.G).

ニチン投与下にあったが、治療に対する反応は鈍く、嘔吐、発熱発作を繰り返し、最終的に汎血球減少による血栓症で6カ月目に死亡した。

(3) OTC 欠損症

症例 A.M (6歳, 男児): 新生児期から幼児期にかけて順調に発育していたが、6歳時、最初の高アンモニア血症発作により、昏睡、死亡に至っている。発作時尿の有機酸分析の結果、正常では検出されないウラシルのピークが認められた (Fig 3)。オロット酸のピークは GC ではかなり小さかったが、比色法¹⁰⁾によるオロット酸の値は $311 \mu\text{mole}/\text{mmole-creatinine}$ (正常 3.9 ± 0.7) と著増していた。その後の剖検肝の OTC 活性の低下と合わせて OTC 欠損症と診断された。

4. 考 察

Tanaka ら¹¹⁾ が 1966 年にイソ吉草酸血症を報告して以来、GC-MS による尿中異常代謝産物の同定に基づき、数多くの有機酸代謝異常症が発見されてきた。有機酸代謝症の発生頻度は、全体では少なくとも 1 万人に 1 人以上と考えられており、先天性代謝異常症の

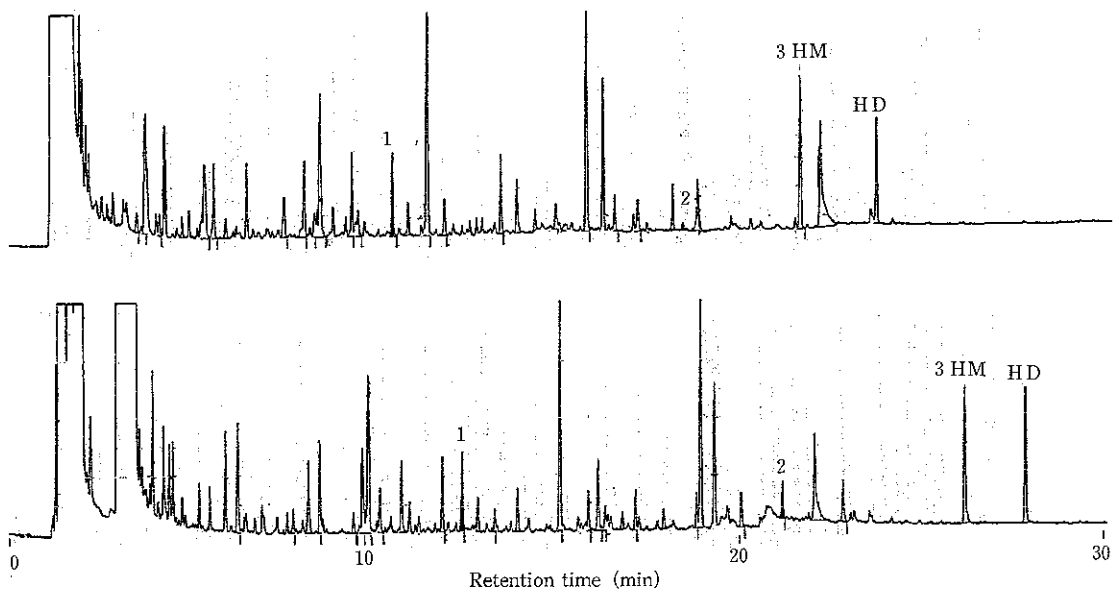


Fig. 4 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of the patient (A.M) with ornithine transcarbamylase deficiency

1: uracil, 2: orotate

Other descriptions are the same as in Fig. 1

中では頻度の高い疾患群である。しかし、GC-MSによる診断法がかなり普及してきた現在においても、本症に対する一般的な認識は低く、また、GC-MSによるスクリーニングは対象が絞られた確定診断的なものであるため、遅発型や軽度の患児、あるいは逆に、本報の高乳酸血症 Y.M. のように出生直後に死亡する例などは、対象を絞ったスクリーニングからは洩れる可能性を否定できない。このことから、我々は、スクリーニングセンターレベルで利用できる、汎用性の高い2カラムキャピラリーGCシステムを導入し、対象範囲を少しでも本症が疑われる児にまで拡大したハイリスク・スクリーニングを行なってきた。

これまで、2年半のスクリーニングの結果、114例のハイリスク児の中から、9例の有機酸代謝異常症患児が発見されており、その頻度の高さは依然注目に値する。以下、今回、新たに発見された個々の症例についての考察を加える。

高乳酸血症2例のうち、症例 Y.M. は、典型的な新生児発症型と考えられ、生後2日に診断は可能であったものの、生後3日に死亡している。本例は、尿を塩酸酸性とした時、大量の沈殿の生成が見られた点が特異

であり、沈殿成分のマスマスペクトルによる解析を試みたが、有効な情報は得られなかった。症例 S.O. は、生後3日の時点では、新生児仮死が認められていたこと、乳酸、ビルビン酸の上昇も中程度であったことから、先天性か二次性かの判断は困難であった。しかし、生後15日、アシドーシス発作時の再検査尿は、典型的な高乳酸血症のパターンを示した (Fig. 1)。本例は、前報で報告した症例 A.I.⁹⁾と同様、新生児発症型の中では治療に対する反応が比較的良好な例と考えられたが、心筋症の合併を認め残念ながら救命できなかった。これまでに発見された高乳酸血症4例は、いずれも乳酸/ビルビン酸比の上昇などから、エネルギー産生系の障害が示唆されており、最近、明かされたミトコンドリアDNAの点変異¹²⁾についても濾紙尿あるいは尿沈渣を用いて検討したが¹³⁾、いずれもこの変異に関しては正常であった。

メチルマロン酸血症 AGについては、アシドーシス・低血糖見られず、さらに尿の簡易定性反応ウリテストの結果も正常であったことから有機酸代謝異常症を積極的に疑うことは困難である。しかし、ウリテストのp-ニトロアニリンによるメチルマロン酸の検出

感度は 300 mg/dl とかなり悪く、Fig 2 に示した尿においても 79 mg/dl とウリテストは陰性であり、発作時の最も高い時においても 360 mg/dl と検出限界付近の値であった。結果的には本症例の場合、ウリテストが、早期発見を妨げた形となり、このことから GC 分析によるスクリーニングを普及させることの重要性があると考えられる。一方、血中のメチルマロン酸のレベルは、概ね尿中レベルと平行しており (Fig 3)、発作時には 10 mg/dl 位まで上昇するが、寛解期には検出されず (<2)、乳酸、ピルビン酸とともに患児においても異常値を示さない場合があることに注意する必要がある。ただ、本患児においては、濾紙血の測定結果から発症前の新生児期に 7.6, 5.1 mg/dl と既にメチルマロン酸の上昇が見られていること、またメチルマロン酸血症は、効果的な治療法が開発されつつあることから、現在、我々は、新生児先天性代謝異常症等検査用の濾紙血を用いて、新たに開発した比色マイクロアッセイによりメチルマロン酸血症のパイロットスクリーニングを開始している⁸⁾。本患児についても、新生児スクリーニングが実施され、発症前に治療が開始されていたならば予後は変わっていたものと考えられる。

OTC 欠損症の GC 分析結果では、ウラシルの明瞭なピークが認められたが、オロト酸のピークは不明確であった。これは、オロト酸の前処理段階での抽出率の低さに原因があり、もともと有機酸代謝異常症スクリーニングを目的とした条件であるため止むを得ないところである。OTC 欠損症の鑑別には、高アンモニア血症発作時あるいはアロプリノール負荷時の尿を用いたオロト酸の比色マイクロアッセイ¹⁰⁾が簡便かつ確実である。

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スクリーニングの結果、2 年半、114 例のハイリスク児の中から 9 例の患児が発見された。発生頻度の高さと早期発見における本スクリーニングの有用性

が確認されたが、最終目標である患児の救命・健全な発育のためには、効果的な治療法の開発を待つ必要がある。

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。斗南病院 松浦信夫先生、北見赤十字病院 久保秀司先生、佐竹典子先生、天使病院 坂井多恵子先生はじめ、各医療機関小児科の諸先生方に深謝致します。また、メチルマロン酸血症患児濾紙血の測定機会を与えて頂きました道立衛生研究所 市原侃先生に心から御礼申し上げます。

6. 文 献

- 1) Chalmers R. A. and Lawson A. M: Organic acids in man, 213-216, Chapman and Hall, 1982
- 2) 松本 勇・代謝, **26**(4), 81-94, 1989.
- 3) 山口清次, 他・小児科, **25**, 769-782, 1984.
- 4) 山口昭弘, 他・札幌市衛生研究所年報, **17**, 84-91, 1990.
- 5) 山口昭弘, 他・札幌市衛生研究所年報, **18**, 75-80, 1991.
- 6) Hanai J, et al・Clin.Chem. **33**, 2043-2046, 1987.
- 7) 水嶋好清, 他・日児誌, **94**, 1344-1350, 1990.
- 8) 水嶋好清, 他・日本マス・スクリーニング学会誌 (投稿準備中)
- 9) 山口昭弘, 他・臨床小児医学, **37**, 109-113, 1989.
- 10) 山口昭弘, 他・札幌市衛生研究所年報, **18**, 92-96, 1991.
- 11) Tanaka K., et al・Proc Nat. Acad. Sci USA, **56**, 236-242, 1966.
- 12) Goto Y, et al・Nature, **348**, 651-653, 1990.
- 13) 山口昭弘, 他・札幌市衛生研究所年報, **19**, 94-97, 1992.

Results of Selective Screening for Organic Acidemia (II)

Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu,
Yuko Kikuchi and Yuichi Kusunoki*

ABSTRACT

The successive result of selective screening for organic acidemia was reported. During the latest one year two patients with congenital lactic acidemia and one with methylmalonic acidemia were detected from newly screened 61 high-risk infants. The progressive interest for the screening was necessary to detect the case of methylmalonic acidemia because the clinical informations could not strongly suspect the patient as the organic acidemia. The medical treatments for all the three patients had to be finally ended by their death. These results showed ; the higher incidence of organic acidemias, and also the screening could contribute to the detection or diagnosis of the patients, however there exists some difficulties in the aspect of the treatment.

*Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College