

有機酸代謝異常症の新生児マス・スクリーニング - ビオチンダーゼ欠損症, 高乳酸血症およびメチルマロン酸血症の パイロットスタディ結果について -

山口 昭弘 水嶋 好清* 福士 勝 清水 良夫
菊地由生子

要 旨

有機酸代謝異常症の中のビオチンダーゼ欠損症, 高乳酸血症およびメチルマロン酸血症について, 新生児マス・スクリーニングの新しい対象疾患としての可能性を検討するためパイロットスタディを行った。96穴マイクロプレートスケールで, 乾燥ろ紙血液中のビオチンダーゼ活性, 乳酸およびメチルマロン酸を簡便に測定する方法をそれぞれ開発し, 実際の新生児検体の測定を行った。ビオチンダーゼ欠損症は15万例の中から1例, 高乳酸血症は9万例の中から6例発見され, メチルマロン酸血症は6万例をスクリーニングしたが, 患児は発見されなかった。

1. 緒 言

有機酸代謝異常症は, 脂質, 糖質およびタンパク質の中間代謝経路における先天的な酵素障害により, 新生児期から幼児期にかけて意識障害・ケイレン・筋緊張低下などで発症し, 無治療の場合, その多くは非可逆的な心身障害から致死的な経過をたどる重篤な疾患群である。本症の早期診断は, 臨床症状に加え, アシドーシス・低血糖などが認められる患児に対して, 尿中有機酸代謝物をガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) により測定するハイリスク・スクリーニングにより, 一般的に行われている¹⁾。しかしながら, 高乳酸血症とメチルマロン酸血症についてはその急激な臨床経過から, 現実には新生児期早期に診断されないまま死亡する例が, かなり存在するであろうと予想されている。一方, ビオチンダーゼ欠損症は, 1983年に発見された新しい有機酸代謝異常症であり²⁾, 酵素欠損により不足する活性型ビオチン (ビタミンH) を経口投与することにより効果的な治療が可能な, 数少ない先天性代謝異常症の一つである。乾燥ろ紙血液中のビオチンダーゼ活性を測定する簡便なスクリーニング法も早い時期に開発され^{3,4)}, 現

在, 欧米を中心に多くの国で新生児スクリーニングが実施されている。

これらのことから, 我々は発生頻度の推定あるいは新たに開発した検査法の評価などを通して, 上記3疾患が新生児マス・スクリーニングの対象疾患に成りうるかどうかを明らかにするため, 現行の新生児マス・スクリーニングシステムに組み入れパイロットスタディを行った。

2. 方 法

先天性代謝異常症等の新生児マス・スクリーニング検査用に, 札幌市内の医療機関から送付された生後4-7日の新生児乾燥ろ紙血液を試料とした。検査法は, いずれも96穴マイクロプレートベースのマス・スクリーニング用に改良・開発した, 操作性・検体処理能力に優れた方法^{4,6)}を用い, ビオチンダーゼ欠損症, 高乳酸血症およびメチルマロン酸血症それぞれ, 乾燥ろ紙血液中のビオチンダーゼ活性, 乳酸およびメチルマロン酸を測定してスクリーニングした (表1)。

*札幌市白石保健所

Table 1. Summary of the screening methods

Disease	Method	Measured	Cut-off
Biotinidase deficiency	Microcolorimetry ¹	Biotinidase activity	0.6 pmole/min/dsic
Lactic acidemia	Microcolorimetry ²	Lactic acid	50 mg/dl-blood
Methylmalonic acidemia	Microcolorimetry ³	Methylmalonic acid	3 mg/dl-blood

Specimen: a 3mm-diameter blood disc in each assay

1: coloration for p-aminobenzoate liberated from an artificial substrate; biotin 4-amidobenzoate

2: lactate dehydrogenase with NAD/diaphorase coupling system

3: coloration for active methylene group with o-dianisidine

Table 2. Results of pilot screening for newborn organic acidemia

Disease	Period	Screened	Requested second card	Clinically examined	Confirmed patient
Biotinidase deficiency	Sep.'85- Mar.'93	154,410	13 (0.008%)	2	1
Lactic acidemia	July '87- July '92	91,898	43 (0.047%)	7	6
Methylmalonic acidemia	Apr. '89- Mar.'93	61,981	3 (0.005%)	0	0

3. 結 果

3-1 ビオチニダーゼ欠損症

1985年から、1993年までの8年間に154,410例をスクリーニングし、1例の患児を発見した(表2)。患児のビオチニダーゼ活性は、初回検査;生後5日および再検査;生後39日のろ紙血液ではともに測定感度

以下であり、精査時の血清では0.81nmole/min/mlと正常コントロールの10.8%であった(表3)。また、両親の活性値は父:3.47、母:3.88nmole/min/mlとともに正常の約50%とヘテロ保因者レベルであった。この症例は、日本人で先天的なビオチニダーゼの欠損が明らかにされている唯一の例である⁷⁾。

3-2 高乳酸血症

1987年から1992年までの5年間に91,898例をスクリーニングし、6例の患児に先天的な高乳酸血症を認めた(表2)。患児はいずれも出生直後から、意識障害、筋緊張低下あるいは代謝性アシドーシスなど重篤な臨床症状を示し、血中乳酸値も明らかな異常高値を示した(表4)。この新生児期発症型の高乳酸血症は極めて予後不良の疾患であり、実際、乳

Table 3. Biotinidase activities in sera from a family with biotinidase deficiency

Serum	Biotinidase activity (nmole/min/ml)
Patient	0.81 (10.8%)
Father	3.47 (46.1%)
Mother	3.88 (51.6%)
Normal control	
Mean ± S.D.	7.52 ± 0.57
Range	6.94 - 8.30

Table 4. Congenital lactic acidemia Identified in the pilot screening

Patient	Sex	ID	Age at screening	Lactic acid (mg/dl)	Clinical course
Y.T-1	F	C-1021	1 day	232	Death at 15 day
Y.T-2	M	C-1364	1 day	213	Death at 5 day
Y.M	F	C-1584	2 day	204	Death at 3 day
S.S	F	8803418	5 day	64.2	Under management
T.K	M	9003601	5 day	57.2	Under management
A.I	M	9009202	6 day	68.4	Death at 3 month

酸値が200mg/dl以上の激症型3例は、生後15日以内に死亡している。また、乳酸値が100mg/dlを越えていない他3例においても1例は3ヵ月の時点で死亡している。高乳酸血症をきたす酵素欠損部位は多岐にわたり、病因の同定は困難な場合が多いが、表4の症例では、Y.T-1 (Y.T-2の姉) とA.Iの2例で、ミトコンドリア電子伝達系酵素の障害が確認されている。また、Y.T-2 (Y.T-1の弟), Y.MおよびS.S (Leigh脳症) についても、他の検査データ (血清, 尿の乳酸/ピルビン酸比, 等) から、やはりミトコンドリア電子伝達系酵素の障害が示唆されている。残る症例T.Kだけはピルビン酸脱水素酵素複合体の部分欠損症と診断されている。

3-3 メチルマロン酸血症

1989年から1993年までの4年間に61,981例をスクリーニングし、3例が要再採血となったが、いずれも

再検査の結果は正常であり、新生児スクリーニングの中から患児は発見されなかった (表2)。一方、札幌市外で出生し、尿中有機酸代謝物GC/MS分析にて診断されたメチルマロン酸血症患児 (B₁₂不応型) の新生児ろ紙血液を回収し測定したところ、生後5日および生後17日 (先天性副腎過形成症で要再検) のメチルマロン酸濃度は、それぞれ7.6, 5.1mg/dlと、本新生児スクリーニングにおいても十分検出可能な上昇を示していた。

3-4 マス・スクリーニング化の条件

本パイロットスクリーニングにより、ビオチンダーゼ欠損症 (1例/15万人), メチルマロン酸血症 (0例/6万人) および高乳酸血症 (6例/9万人) の我が国における大まかな発生頻度を明らかにすることができた。しかし、これら3疾患とも、現行の新生児マス・スクリーニングシステムに加わるべき新しい対

Table 5. Evaluation of the diseases referring criteria as population-based screening

Criteria	Biotinidase deficiency	Lactic acidemia	Methylmalonic acidemia
Necessity of early detection	YES	YES	YES
Effective treatment	YES	NO	YES
Simple and inexpensive test	YES	YES	YES
Moderate Incidence	NO	YES	NO

象疾患としての条件（早期発見の必要性・効果的な治療法・簡便安価な検査法・適度の発生頻度）のすべてを満たすものではなかった（表5）。

4. 考 察

先天性代謝異常症の新生児マス・スクリーニングは、現在、我が国では、フェニルケトン尿症、メイプルシロップ尿症、ホモシスチン尿症およびガラクトース血症の4疾患が対象となっている。これらの疾患はいずれも新生児期早期に発見し、治療を開始することにより、患児を健全な発育へと導くことができる先天性代謝異常症の中ではむしろ特別な疾患である。しかしながら、最も発生頻度の高いフェニルケトン尿症の場合でも約10万人に1人と、やはり新生児マス・スクリーニングの対象となっているクレチン症や先天性副腎過形成症といった内分泌疾患の発生頻度；数千～2万人に一人に比べ、発生頻度が極めて低いことも、我が国の新生児マス・スクリーニングの特徴の一つとなっている。

このような背景から、より高い発生頻度が期待される先天性代謝異常症として、有機酸代謝異常症に注目した経緯がある。有機酸代謝異常症は、前述のように、比較的歴史が新しく、また、臨床的に急激な転帰をたどる場合も多いことから、発生頻度は過少評価される傾向にある。実際、今回のパイロットスタディにおいて高乳酸血症の発生頻度は、1/15,000人と極めて高いこと（表2）、また、そのほとんど（5/6例）がミトコンドリア電子伝達系酵素の障害に起因すると思われること（表3）、の2つの貴重な知見が得られた。しかしながら、高乳酸血症は、出生時、既に重篤な臨床症状を伴い、早期発見に関してはマス・スクリーニングのはたす役割は小さい。さらに、根本的な治療法が存在しないことから、残念ながら現状では、疾病予防への貢献も低い。ただ、一次的な病因が不明のまま、心不全等の死因に分類されていた中には、予想以上に高乳酸血症が高頻度に含まれることも明らかであり、患児を救命できないとしても、病因が特定できれば、将来の遺伝相談

さらには治療法の開発への道を開く手がかりとなるであろう。

一方、ビオチニダーゼ欠損症、メチルマロン酸血症はともに、効果的な治療法が知られており、発症前の早期発見を可能にする新生児マス・スクリーニングは、極めて効果的である。しかしながら、我が国での発生頻度は、我々のパイロットスタディの結果からも、新たにマス・スクリーニング化を行う際の日安である2-3万人に1人より高くないことは確かであろう（表2）。

これらの疾患に対しては、正常者を含め全例無差別に検査を行うマス・スクリーニングの代りに、臨床症状から有機酸代謝異常症が疑われる患児を対象を絞り、より多くの情報が得られ正確な診断が可能な尿中有機酸代謝物測定によるハイリスク・スクリーニングの方が適している。このことを受け、我々も、札幌市内の新生児・小児科医療機関の協力を得、1991年から有機酸代謝異常症ハイリスク・スクリーニングのシステム化に向けて準備を進めてきた⁹⁾。そして、現在、これら3疾患の新生児マス・スクリーニングは、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へと発展し役目を終えている^{9,10)}。

5. 結 語

本パイロットスタディにより、ビオチニダーゼ欠損症とメチルマロン酸血症の発生頻度はかなり低く、一方、高乳酸血症は発生頻度は高いものの出生直後から臨床症状が先行することから、これらの疾患は現行の新生児マス・スクリーニングの対象疾患としては適さず、むしろ臨床症状を呈する児に対する有機酸代謝異常症ハイリスク・スクリーニングの中で早期診断を行う方が効果的であることがわかった。

謝辞： 本パイロットスタディ実施に際して、ご指導およびご助言を頂きました北海道療育園の楠 祐一 先生、ならびに、貴重な

ろ紙血液検体の回収にご協力頂きました北海道立衛生研究所の市原 侃 先生に深謝いたします。

6. 文 献

- 1) 松本 勇 : 代謝, **26**(4), 81-94, 1989.
- 2) Wolf B, et al.: Clin. Chim. Acta, **131**, 273-281, 1983.
- 3) Heard G.S., et al: Clin. Chem., **30**, 125-127, 1984.
- 4) Yamaguchi A. et al: Tohoku J. exp. Med., **152**, 339-346, 1987.
- 5) 水嶋好清, 他 : 日児誌, **94**, 1344-1350, 1990.
- 6) 水嶋好清, 他 : 日本マス・スクリーニング学会誌, **3**, 139-145, 1993.
- 7) 冨田雅枝, 他 : 日本先天代謝異常学会雑誌, **6**, 206, 1990.
- 8) 山口昭弘, 他 : 札幌市衛生研究所年報, **17**, 84-91, 1990.
- 9) 山口昭弘, 他 : 札幌市衛生研究所年報, **18**, 75-80, 1991.
- 10) 山口昭弘, 他 : 札幌市衛生研究所年報, **19**, 86-92, 1992.

Newborn Screening for Organic Acidemia

- pilot studies for biotinidase deficiency, lactic acidemia and methylmalonic acidemia -

Akihiro Yamaguchi, Yoshikiyo Mizushima*, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu and Yuko Kikuchi

We had a pilot study for three of organic acidemias; biotinidase deficiency, lactic acidemia and methylmalonic acidemia to evaluate them suitable or not as a newborn population-based screening program. A microplate-scale assay with optimized procedures for a lot of samples was developed to measure an indicative enzyme activity or metabolite in each disease. These methods were applied for the newborn dried blood samples sent for us for the routine screening such as phenylketonuria, etc.. One biotinidase deficiency was detected from 154,410 newborns and 6 patients with congenital lactic acidemia were identified from 91,898 newborns. However, no patient with methylmalonic acidemia was detected among 61,981 newborns. It was clarified that the incidences of biotinidase deficiency and methylmalonic acidemia in Japan were too low to incorporate them into the routine newborn screening program. On the other hand, the incidence of lactic acidemia was enough higher, however the earlier clinical manifestation just after birth and the absence of effective treatment did not support the necessity of population-based screening of this disease as well. We concluded the screening for these three organic acidemia were rather preferable as a selective screening for high risk patients based on the measurement of urinary metabolites by a gas chromatography/mass spectrometry.

*Shiroishi Health Center of Sapporo City