

氏 名 (本籍) ^{はや}早 ^{かわ}川 ^{ひろし}洋

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 6 3 6 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 0 年 2 月 2 7 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 5 2 年 3 月
秋 田 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 乾 燥 濾 紙 尿 に よ る 高 フェ ニ ール ア ラ ニ ン 血 症 の 鑑
別 診 断

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 小 暮 久 也

教 授 岡 本 宏

論 文 内 容 要 旨

新生児マススクリーニングで見い出されるフェニールケトン尿症 (PKU) の大部分はフェニールアラニン水酸化酵素の欠損によるものであるが、なかにはこの酵素が正常であるにもかかわらず、ビオプテリン (B) 代謝異常により補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH_4) の欠乏に起因する異型PKUが見い出されている。古典的PKUでは早期からの低フェニールアラニン (Phe) 食療法によって良好な発育をみるが、異型PKUでは低Phe食療法に反応せず、重篤な進行性の中樞神経症状を呈してくるため、神経伝達物質の前駆物質の補充療法が必要とされている。しかもこの治療は症状発現以前に行なう必要があり、いかに早期に診断するかが患者の予後を左右する。 BH_4 欠乏症は障害部位によって、ジヒドロプテリジンレダクターゼ (DHPR) 欠損症とジヒドロビオプテリン合成酵素 (DHBS) 欠損症とに分類されており各々の診断法が開発されている。我々はすでにアスコルビン酸添加尿での高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析が有用であることを報告しているがアスコルビン酸添加尿を乾燥濾紙にスポットし、その抽出液をHPLCを用いて分析した。その結果アスコルビン酸の存在下では乾燥濾紙尿のプテリン化合物は安定であることを明らかにし、又HPLCを用いた分析でも高Phe血症をきたす疾患の各亜型の診断が可能であることを明らかにした。さらにDHBS欠損症においては heterozyotes の診断にも有用であることを明らかにした。対象はPKU 2例とその両親、DHPR欠損症 2例とその両親、DHBS欠損症 5例とその両親及びコントロール 20例 (新生児 9例, 成人 11例) を用いた。 BH_4 は不安定なため採尿後ただちに 20 mg/ml のアスコルビン酸を加え、代謝異常検査用濾紙 (北里研究所製) にスポットした。充分乾燥した後、遮光して -20°C に保存、乾燥尿濾紙片 (直径 5 mm) の 16枚に脱イオン水 0.5 ml 加え暗所、室温に 60分以上放置した後ミリポアフィルタ (GS $0.22 \mu\text{m}$) で濾過して抽出液とした。抽出液の一部を直接HPLCに注入し、残りを福島らの方法を一部改善した方法で、2つの処理 (酸性溶液下ヨード処理, アルカリ溶液下ヨード処理) を行なった。酸性溶液下ヨード処理によって BH_4 とジヒドロビオプテリン (BH_2) は酸化型Bに、アルカリ溶液下ヨード処理によって BH_2 はBに BH_4 はプテリンに変化する。還元型Bは蛍光をもたないことから、抽出液のビオプテリン誘導体のうち、直接分析した時はBのみ、酸性ヨード処理液では total B ($B + BH_2 + BH_4$)、アルカリヨード処理液では $B + BH_2$ の和が各々測定される。このことを利用してB, BH_2 , BH_4 を測定した。HPLCは逆相HPLCを用い Fipak Sil 18カラム (日本分光) で岩井らの方法で移動相 5%メタノールで行ない励起波長 360 nm , 分析波長 450 nm の蛍光比色計で検出した。乾燥濾紙尿の尿中プテリン化合物を $\%B = [B / (B + Ne)] \times 100$, $\% \text{ total B} = [\text{total B} / (\text{total B} + Ne)] \times 100$ で表わした。その結果 $\%B$ は古典

的PKUでは20%，DHPR欠損症では80%，DHBS欠損症では0.5%以下であり，一方対照成人は17.8～42.5%，新生児13.2%以下を示した。つまり濾紙尿での% Bの測定は各疾患の鑑別診断に有用であることを明らかにした。更に% Bと% total Bを比較することによって，DHPR欠損症と古典的PKUの区別がより明確となる。即ちDHPR欠損症では% Bと% total Bはほとんど差がないのに対し古典的PKUでは% Bが% total Bに対して著明に低いことが明らかになった。DHPR欠損症と古典的PKUの鑑別には還元型Bの濾紙上で安定であることが必要であるが，4℃の保存では30日間で還元型Bのわずか10%が酸化されたにすぎず，室温では30日間でも18.7%であった。DHPRの保因者診断は白血球や赤血球のDHPR活性を測定することによって可能であるがDHBS欠損症についてはまだ報告がない。各疾患の両親の% total Bを比較すると古典的PKUとDHPR欠損症の場合は対照成人とほとんど差をみないがDHBS欠損症では平均32%で対照成人平均64%に対して，両者に重複はなく% total Bの測定で保因者診断が可能であることを明らかにした。従来BH₄欠乏症の診断のため尿中プテリジン誘導体の測定はすべて酸化処理をした試料が用いられてきたが，アスコルビン酸を添加した尿を用いると酸化処理をしない試料でNeとBを測定するのみで各疾患の亜型の診断が可能であることが明らかになった。ただし新生児早期には，酸性処理によってtotal Bを測定しなければならない場合もありさらに必要ならBH₄負荷テスト，phe負荷テスト，乾燥血液濾紙でのDHPR活性の測定をあわせて行えばよいと思われる。アスコルビン酸の存在下でスポットした乾燥濾紙尿のプテリン化合物は安定で郵送が可能でありガスリーテストで見いだされた高phe血症の全例を検索することを容易にするとと思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

新生児マス・スクリーニングで発見されるフェニルケトン尿症（PKU）の大部分はフェニルアラニン水酸化酵素の欠損に基づくものであるが、中にはこの酵素が正常であるにもかかわらずピオプテリン（B）代謝異常により補酵素であるテトラヒドロピオプテリン（BH₄）の欠乏に起因する高フェニルアラニン血症が発見され、その鑑別診断が臨床上極めて重要な課題となっている。ピオプテリン欠乏性高フェニルアラニン血症ではフェニルアラニンのみならずトリプトファン、チロジンの水酸化反応が障害を受け脳内神経伝達物質の欠乏を来すため、古典的PKUとは異なった治療を行なう必要があるからである。BH₄欠乏性高フェニルアラニン血症には現在ジヒドロプテリジンリダクターゼ（DHPR）欠損症及びジヒドロピオプテリン合成酵素（DHBS）の存在が知られている。

本研究は、PKU及びDHPR欠損症、DHBS欠損症々例から得られた尿を用いて高速液体クロマトグラフィーによりプテリン化合物の分析を行ない、これらの鑑別診断を行ない得ることを明らかにしたものである。さらにアスコルビン酸添加尿を乾燥濾紙にスポットし、その抽出液を用いて高速液体クロマトグラフィーにてプテリン化合物を分析した結果、乾燥濾紙尿の尿プテリン化合物を $\%B = \left[\frac{B}{B+N} (\text{ネオプテリン}) \right] \times 100$ で表現すると、 $\%B$ はPKUでは20%、DHPR欠損症では80%、DHBS欠損症では0.5%以下であり、これら疾患の鑑別に極めて有用であることを明らかにした。アスコルビン酸添加乾燥濾紙尿中のプテリン化合物は極めて安定であり室温で30日間保存でも僅くわずかの変化を見るに過ぎず、郵送も可能であることから臨床上極めて有用であると考えられる。

以上により本論文は医学博士の授与に値するものと評価される。