

分担研究課題名：新生児マススクリーニング対象疾患の確定検査の
標準化に関する研究

分担研究者： 新宅 治夫 (大阪市立大学 大学院医学研究科 特任教授)

研究要旨：NBS 対象疾患のフェニルケトン尿症とその関連疾患の確定検査に必須のプテリジン分析とジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 活性測定の標準化を目指して、複数施設による相互検証をしつつ実施できる体制を構築する。大阪市立大学小児科で実施しているプテリジン分析と DHPR 活性の測定を国立成育医療研究センターでも同様の方法で実施するためにプテリジン分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を設置し、DHPR 活性測定には分光光度計を用いて検体の分析を行い良好な結果をえた。

研究協力者：坂口知子
大阪市立大学大学院医学研究科・研究助手

A. 研究目的

フェニルケトン尿症 (PKU) とその関連疾患の確定検査に必須のプテリジン分析とジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 活性の測定を大阪市立大学大学院医学研究科と国立成育医療研究センターに2カ所で実施し、マススクリーニング事業の安定運営に寄与する。

B. 研究方法

1. 対象：令和元年度 (2019年4月1日～2020年3月31日) に新生児マススクリーニングで発見された高フェニルアラニン血症 (血中Phe値 \geq 2mg/dL) 27人について、アミノ酸分析とプテリジン分析と乾燥濾紙血DHPR活性測定を行った。
2. アミノ酸分析：アミノ酸自動分析器でフェニルアラニン値 (Phe) とチロシン値 (Tyr) を測定した (単位：mg/dL)。
3. プテリジン分析：血液と尿を酸性条件下でヨード酸化し高速液体クロマトグラフィーで分離し蛍光検出器で定量し、ネオプテリン値 (N)、ピオプテリン値 (B) とその比率 (N/B) を求めた。
4. 乾燥濾紙血DHPR活性の測定：血液ろ紙3mm

ディスクから酵素液を抽出し、分光光度計を用いて反応液の吸光度の変化を測定 (単位：nmol/min./5mm disc) し、コントロールに対する比活性 (%) で判定した。

5. 分析系の技術移転：国立成育医療研究センターでもプテリジン分析とDHPR活性測定を実施可能とするため、大阪市立大学から技術指導を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪市立大学医学系研究等倫理委員会の承認 (承認番号 4272) を得て実施した。

C. 研究結果

新生児マススクリーニングで発見された高フェニルアラニン血症 27 人の内訳は、古典的 PKU (cPKU : classic PKU) 7 人、軽症 PKU (mPKU : mild PKU) 1 人、軽症 HPA (mHPA : mild HPA) 18 人、BH4 反応性 PKU (BPKU) 1 人で BH4 欠損症は 0 人であった。結果を下表に示す。

表. 高フェニルアラニン血症例の診断内訳

	n	N	B	N/B	Phe	Tyr	DHPR	%
cPKU	7	170	63	2.7	37.98	1.06	2.05	86
mHPA	1	51	88	0.6	17.62	0.78	1.99	93
mHPA	18	35	20	1.9	2.37	1.83	2.41	114
BPKU	1	79	64	1.2	10.68	1.96	1.97	70
合計	27	72	35	2.0	12.47	1.59	2.30	105

n : 人数、

国立成育医療研究センターでセットアップしたプテリジン分析系とDHPR活性測定系の概要を図1, 図2に示す。

D. 考察

令和元年度新生児マススクリーニングで発見された高フェニルアラニン血症27人の高フェニルアラニン血症全例についてプテリジン分析とDHPR活性の測定を行い、BH4欠損症は0人であった。BH4・1回負荷試験で41%の血中Phe値の低下を認めた1人をBPKUと診断した。

E. 結論

新生児マススクリーニングで発見された高フェニルアラニン血症においてBH4欠損症の鑑別診断に必要なプテリジン分析とDHPR活性の測定を大阪市立大学と国立成育医療研究センターの2カ所で行い良好な結果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 新宅治夫: フェニルケトン尿症. 水澤英洋他(編)指定難病ペディア 2019. 日本医師会雑誌, 日本医師会出版, 東京, 148 巻特別 1, S270, 2019.
- 2) 新宅治夫: プテリジン分析. 山口清次(編)よくわかる新生児マススクリーニング, 診断と治療社, 東京, 146, 2019.
- 3) 新宅治夫: アミノ酸代謝異常症のスクリーニング概要. 山口清次(編)よくわかる新生児マススクリーニング, 診断と治療社, 東京, 20-23, 2019.
- 4) 新宅治夫: フェニルケトン尿症(高フェニルアラニン血症). 山口清次(編)よくわかる新生児マススクリーニング, 診断と治療社, 東京, 24-25, 2019.
- 5) 新宅治夫: H4 欠損症(悪性高フェニルアラニン血症). 山口清次(編)よくわかる新生児マススクリーニング, 診断と治療社, 東京, 26-27, 2019.
- 6) 新宅治夫: マターナル PKU. 山口清次(編)よくわかる新生児マススクリーニング, 診断と治療社, 東京, 28, 2019.
- 7) 原圭一, 但馬剛, 南花枝, 吉井千代子, 濱崎

考史, 新宅治夫: 経過観察中に BH4 療法を開始した軽症高フェニルアラニン血症の一例. 日本マススクリーニング学会誌, 29 (3) 257-262, 2019.

2. 学会発表

- 1) 花山佳子, 徳原大介, 服部俊一, 濱崎考史, 新宅治夫: 先天性代謝異常フェニルケトン尿症合併妊娠に対する栄養食事指導の経験から. 日本病態栄養学会誌, 22: S137, 2019.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当事項なし

分析条件

カラム: CHEMCOSORB 7-ODS-L 4.6×250
移動相: 1% メタノール
流速: 1ml/min
カラム温度: 40℃
検出設定: 励起350nm 蛍光450nm

分析試料

NP, BP, 7B, BH4, BH2, NH2を血漿に添加
↓
除たんぱく (30%TCA使用)
↓
酸性ヨード酸化
↓
過剰のヨードをアスコルビン酸で還元
↓
蛍光分析

分析結果

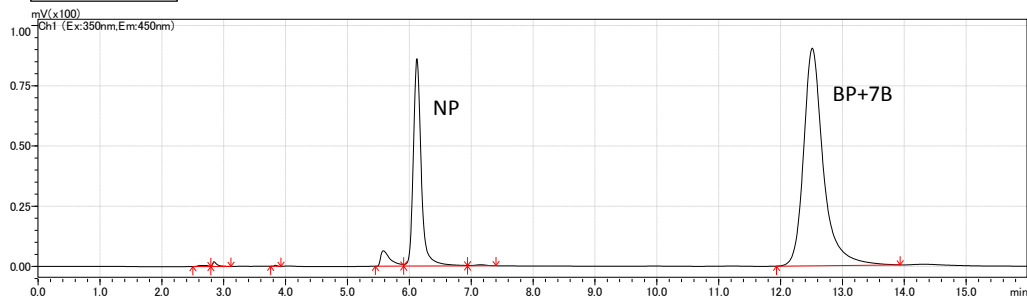
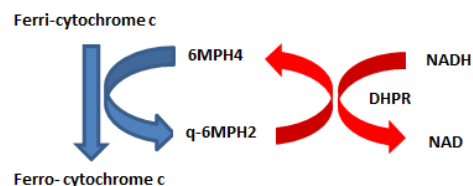


図1. 国立成育医療研究センターでのプテリジン分析系

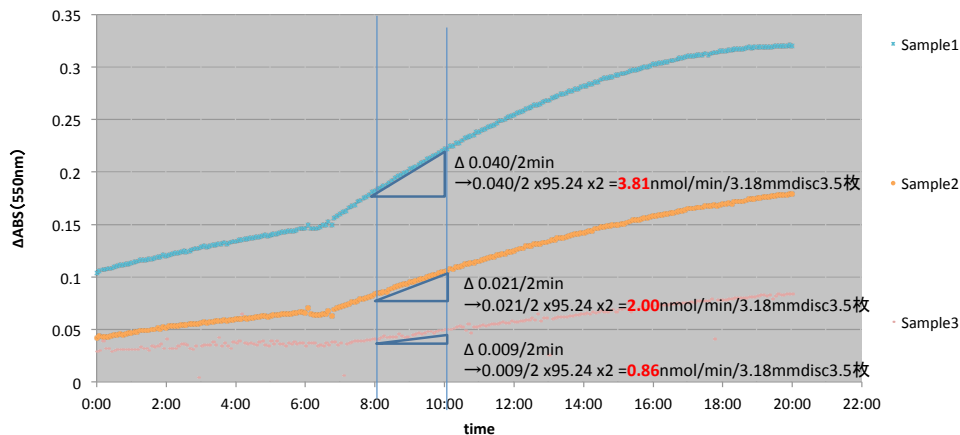
赤血球DHPR活性測定

測定原理:

DHPRによりNADHがNADに酸化されるとともにq-6MPH2が6MPH4に還元され、Ferri-cytochrome cと反応し、生成されるFerro-cytochrome c (550nm)を測定、1分間における吸光度の変化からDHPR活性値を算出する



赤血球DHPR活性



Sample: 健常者血液 (Sample1~3はSample添加量の違い)
Sample1: 通常量、Sample2: 1/2量、Sample3: 1/4量

図2. 国立成育医療研究センターでの DHPR 活性測定系