

平成30年6月23日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19636

研究課題名(和文) タンデムマス・新生児マススクリーニングでのMenkes病スクリーニング法の構築

研究課題名(英文) Study on screening methods for Menkes disease using neonatal mass screening system

研究代表者

佐藤 恭弘 (Sato, Yasuhiro)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：00750241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Menkes病患者を新生児マススクリーニングのろ紙血でスクリーニングできる方法を3種類検討した。

タンデムマス法によるカテコラミン分析では、ろ紙血からの抽出物ではカテコラミンは検出できなかった。第2の方法としてのろ紙血のメタロチオネインを測定した。本症患者3名とoccipital horn症候群1例では平均529ng/mLで対照の585ng/mLと差はなかった。Menkes病6例の新生児ろ紙血の3-Oメチルドーパ(3-OMD)は平均111ng/mLで対照88±27と相違はなかった。以上の結果から、今回検討した3つの方法では、新生児ろ紙血を用いてMenkes病をスクリーニングすることが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：Menkes disease (MD) is a neurodegenerative disease. However, the neurological prognosis is improved by an early treatment. Early diagnosis is necessary for early treatment.

We examined three methods for neonatal screening of MD, that is, catecholamine, metallothionein and 3-O-methyl dopa (3-OMD) were analyzed in the solutions eluted from newborn filter paper. Results: Catecholamines were examined by tandem mass spectrometry, but catecholamines could not be detected in the solutions from patients and controls. Metallothionein was analyzed by an ELISA Kit. There were no difference between the metallothionein concentrations in the solutions from patients and that of controls (mean value 529ng/mL and 585ng/mL, respectively). 3-OMD in the solutions was also analyzed by tandem mass spectrometry. There is no difference between patients and controls (mean 111ng/mL and 88±27ng/mL, respectively). These results suggest that these three methods could not be used for screening of MD.

研究分野：小児科

キーワード：Menkes病 occipital horn症候群 新生児マススクリーニング 濾紙血

1. 研究開始当初の背景

Menkes 病は先天性銅代謝異常症で、私が所属する研究室で行った全国調査結果では発症頻度は男子出生約 14 万人に 1 人である (Gu YH, Kodama H et al. J Inherit Metab Dis. 2005; 28: 473-478)。本症は著明な銅欠乏になり、極めて重篤な神経障害や結合織異常を発症する。しかし、神経障害が発症するのは、胎児期の母体由来銅が欠乏する生後 3 か月頃で、それまでは殆ど症状は見られない。現在、治療としてヒスチジン銅の皮下注射が行われているが、神経症状発症後に治療を開始しても神経障害は全く改善しない。しかし、新生児期に治療を開始すると、神経障害は予防できる (Kodama H et al. Current Drug Metab. 2012; 13: 237-250)。すなわち、新生児期の早期診断・早期治療開始により、予後は著しく改善する。しかし、今まで、本症の新生児期スクリーニング法は全く報告されていない。

本症では、銅酵素であるドーパミンヒドロキシダーゼ活性が低下し、カテコラミン代謝が障害される。この点に関しては、本症患者の尿中 VMA/HVA 比でスクリーニング可能であること (Matsuo M, Kodama H et al. J Inherit Metab Dis. 2005; 28:89-93) や血漿のカテコラミン測定が本症診断に有効であることが報告されている (Kaler SG et al. New Engl J Med. 2008; 358: 605-614)。

また、金属蛋白であるメタロチオネイン (MT) が Wilson 病患者および Menkes 病患者の血清で増加していると報告されている (Nakazato K et al. JETMB2014; 28: 441 - 7)。この点に注目して、ろ紙血の MT を測定することにより本症がスクリーニングできる可能性もある。

さらに、ドーパの代謝物である 3OMD は、芳香族アミノ酸デカルボキシダーゼ欠損症

では高値になり、新生児マススクリーニングでスクリーニングされると報告されている (Chien YH, et al. Mol Genet Metab 2016; 118: 259-63)。Menkes 病患者では、ドーパミンからノルアドレナリンの代謝を司るドーパミンヒドロキシダーゼ活性が低下していることから、ドーパミン、ドーパおよび 3-OMD が上昇していると推定される。この方法でも Menkes 病がスクリーニングされる可能性があると考えられた。

私達は、すでに Menkes 病患者の新生児ろ紙血を数人分保管している。これらを用いて研究を行うことが出来る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生児マススクリーニングで採取されているろ紙血を用いて、Menkes 病のスクリーニング法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) タンデムマス法での検討:

HPLC は Discovery HS F5 を使用し、移動相 A に 0.1%ギ酸、移動相 B び 0.1%ギ酸-アセトニトリルを用いグラジエントをかけ、ドーパミン、ノルアドレナリン、DOPAC (dihydroxyphenylacetic acid), DHPG (dihydroxyphenyl-glycol) が分離し、感度よく検出できる系を検討する。さらに、乾燥ろ紙血から 3.2mm ディスクをパンチし、0.1%ギ酸-精製水で処理し、標品を添加して LC/MS/MS で分析した。

(2) ろ紙血のメタロチオネイン (MT) 分析: Menkes 病患者 3 名と occipital horn 症候群 (OHS) 1 名のろ紙血の MT を市販の ELISA キットを用いて測定し、対照と比較した。

(3) 3-O メチルドーパ (3-OMD) 分析: タンデムマス法で、ろ紙血の 3-OMD を Chien らの方法 (Chien YH, et al. Mol Genet Metab 2016; 118: 259-63) で分析

した。

4. 研究成果

(1) タンデムマス法での検討：

結果を図1, 2に示す。ろ紙血から抽出したサンプルにドーパミン、ノルアドレナリン、DOPAC(dihydroxyphenylacetic acid), DHPG(dihydroxyphenyl-glycol)の標品を加えたものを分析すると、4物質が分離された(図2)。しかし、ろ紙血中の4物質を検出するには感度が低く、本方法で本症をマススクリーニングすることが難しいと判断した。

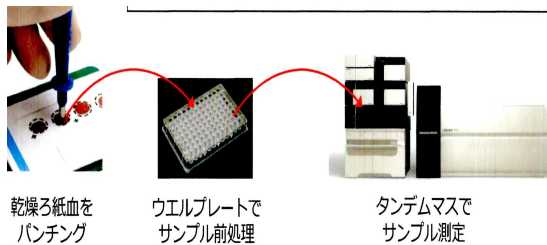


図1 ろ紙血からタンデムマス測定までの手順

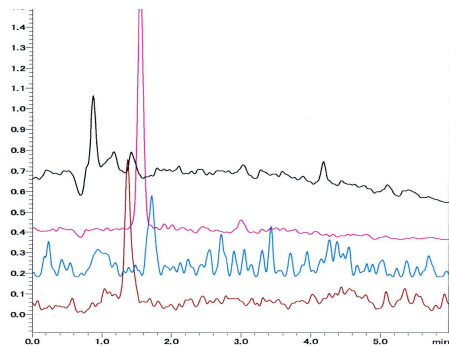


図2 ろ紙血から抽出したサンプルに標品を加えたタンデムマスチャート(4物質が分離されている)

(2) ろ紙血のメタロチオネイン(MT)分析：
結果を表1に示す

表1 メンケス病患者および対照の血清およびろ紙血のメタロチオネイン 1/2 濃度 (ng/mL)

	血清	ろ紙血
Menkes 病 HM	67.6	402.2
OHS KM	119.9	276.6
Menkes 病 KN	90.0	586.0
Menkes 病 KN	1141.0	652.4
正常対照	50.5	584.6
人対照血清	44.2	

Menkes 病および occipital horn 症候群(OHS) 患者では血清 MT は対照に比べて高値であったが、ろ紙血から抽出したサンプルは、血清値に比較して著明に高値で、Menkes 病、OHS と対照と差はなかった。MT は血清より血球に多く存在するためと考えられた。したがって、本方法でも Menkes 病患者をスクリーニングできないことが判明した。

(3) 3-O メチルドーパ (3-OMD) 分析
表2に結果を示す。

表2 Menkes 病(MD)患者および対照のろ紙血の3OMD 値

検体 No		3OMD (ng/mL)
JP01	14 歳対照	< LOD
JP02	新生児 (対照)	121.51
JP03	新生児 (MD)	110.91
JP04	新生児 (MD)	121.23
JP05	新生児 (MD)	93
JP06	新生児 (MD)	205.87
JP07	新生児 (MD)	100.27
JP08	11 か月 (MD)	40.32
control	新生児 (対照)	88.08 (0 ~ 259)

Chien YH et al. 3-O-methyldopa levels in newborns: Results of newborn screening for aromatic l-amino-acid decarboxylase deficiency. Mol Genet Metab 2016 118: 259-63 よ

り引用

表2に示すように、Menkes病患者のろ紙血の値は、対照と差はなかった。本方法もMenkes病の新生児スクリーニングに使用できないことがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 恭弘 (Sato, Yasuhiro)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号: 00752241

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()