

## 論文内容要旨

先天性代謝異常症の早期診断・治療を目的とした新生児マススクリーニングは、本邦では1977年にガスリー法による5疾患を対象に開始され、早期治療と長期予後改善に多大な貢献をしてきている。欧米では1990年代に、直列に結合した質量分析計を用いたタンデムマス法が新生児マススクリーニングに導入され、大きな成果を上げている。本邦でも1997年よりタンデムマス法による新生児マススクリーニングが試行され、2014年からは全国都道府県・政令指定都市において実施されるに至った。この際に19疾患に拡大された対象疾患に、中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症が含まれている。

MCADは脂肪酸 $\beta$ 酸化系の第一段階に働く酵素である。MCAD欠損症患者は通常3歳以前に、発熱や飢餓時間の遷延を契機に急性脳症様の発作で発症し、発症した小児の多くは初回発作で突然死するか重い神経学的後遺症を遺す。新生児マススクリーニングで発症前診断が可能となれば、保護者に対し長時間飢餓の防止や高熱を伴う感染時の医療機関への早期受診など、適切な対応をあらかじめ指導することで急性発症を防ぐことができ、患児は正常な発育・発達が期待できる。MCAD欠損症は他の先天性代謝異常疾患同様、生化学診断、酵素学的診断、遺伝子診断の組み合わせで確定診断される。欧米のMCAD欠損症の90%以上を占めるK329E変異蛋白の特性は詳しく検討がなされている。また2番目に多いY67H変異はスクリーニング陽性者にのみ見付き、急性発症した症例には見つかっていないため、一塩基多型 (SNP) である可能性が否定できず、保護者への指導上の問題を残している。ところが、本邦患者やマススクリーニング陽性例ではこれらの変異は皆無であり、本邦例の変異蛋白の特性を検討する必要が生じた。

本研究では急性発症した日本人MCAD欠損症患者5人とマススクリーニング陽性者8人に同定された11の変異蛋白と、欧米における好発変異 (K329E, Y67H) の病原性について検討を行った。正常・変異MCADを培養細胞 (HEK293) に導入し過剰発現させたところ、免疫ブロット法では本邦における好発変異P128Xおよび急性発症患者で同定されたP92LではMCAD蛋白発現がみられなかった。さらに細胞抽出液を可溶性分画および不溶性分画に分けて検討すると、急性発症患者で同定された2つの変異を含む3つの変異蛋白 (P92L, Y397L, Q45R) は不溶性分画に多く発現しており、蛋白の折り畳み異常や凝集の可能性が考えられた。

次に変異MCAD遺伝子を導入した細胞抽出液のMCADの比活性を、高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を定量することにより測定した。欧米人好発変異K329EおよびY67Hの残存活性は野生型に比し、それぞれ28.6%, 62.5%で、これまでの報告と同様であった。本邦患者とマススクリーニング陽性者に認めた変異ではP128Xが検出感度以下、3つの変異

(R281S, G362E, Y397N) で 1%程度の残存酵素活性であった。一方、主にマススクリーニング陽性者に見つかった 5 つの変異 (R53C, K271E, M274V, I416T, R17H) では 50%以上の活性を有していた。

急性発症は発熱時に認められることが多いため、酵素の熱に対する安定性検討は重要である。実際に K329E は高温条件下 (40℃) で活性が大きく下がることが知られている。比較的活性の保たれていた 4 つの変異 (R17H, K271E, M274V, I416T) については反応温度を 40℃とした場合の活性を 37℃の場合と比較したところ、マススクリーニング陽性者に見つかった M274V では K329E のような高温条件下での著明な活性低下がみられた。

MCAD 欠損症のマススクリーニング陽性者には急性発症のリスクの高いものとそうでないものが含まれている可能性がある。本検討から、従来からの陽性者白血球を用いた酵素診断の有用性が確認され、遺伝子解析結果と組み合わせることで陽性者の発症リスク評価の一助となることが明らかとされた。