

1) SIDS 様症状で発症した症例の代謝プロフィールの検討

2001 年から 2009 年の間に、SIDS・ALTE を主訴に尿中有機酸分析、もしくは血中アシルカルニチン分析を行った症例を対象に、代謝プロフィールを検討し、特徴の有無を検討した。

2) 日本における MCAD 欠損症の臨床像と予後の検討

これまでに島根大学で診断した MCAD 欠損症例 7 例の発症時期と診断時期、初発症状、および転帰を調査した。

(倫理面への配慮)

分析結果を診断後の治療に役立てるため、患者の尿、血液検体は連結匿名化して分析を行った。保存ろ紙血を用いた分析では、血液ろ紙の使用について家族から同意を得た症例について検討した。その他、「臨床研究に関する倫理指針」に基づき、患者の個人情報について管理を行った。

C. 研究結果

1) SIDS 様症状で発症した症例の代謝プロフィールの検討

2004 年から 2009 年に SIDS または ALTE を主訴に、島根大学に代謝異常診断依頼のあった症例は 64 例あった。内訳は SIDS が 38 例、ALTE が 26 例であった。いずれも乳幼児期の発症例が多く、SIDS 症例では 38 例中 28 例 (74%)、ALTE 症例では 26 例中 20 例 (77%) を占めていた (表 1)。

64 例のうち、脂肪酸代謝異常症と診断された例が 2 例、脂肪酸代謝異常症が強く疑われた症例が 4 例あった。疾患の内訳は代謝異常と診断された症例は MCAD 欠損症とミトコンドリア三頭酵素 (TFP) 欠損症が 1 例ずつであった。代謝異常が強く疑われた症例は、グルタル酸尿症 2 型 3 例、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) -1 欠損症 1 例であった。この 6 例のうち、TFP 欠損症を除く 5

例が新生児期から乳幼児期 (2 歳まで) に発症していた。

タンデムマスによる血中アシルカルニチン分析はほぼすべての患者に行われており (64 例中 59 例、92%)、組織障害に伴う異常が 20 例に認められた他、遊離カルニチン低値が 10 例に認められた。

なお、代謝プロフィールについて、血中アシルカルニチン分析のみで尿中有機酸分析は行われなかった症例が、SIDS 症例では 38 例中 26 例 (68%) であった。ALTE 症例ではアシルカルニチン分析しかできなかった症例は 26 例中 8 例 (30%) であった。SIDS 症例では、尿が取れないことが多かった。上記の代謝異常を強く疑われた症例でも血液の分析しかできず、診断が困難であった。

2) 日本における MCAD 欠損症の臨床像と予後の検討

島根大学で MCAD 欠損症と診断した 7 例のうち、3 例は発症前に診断できた症例であった。内訳は同胞スクリーニング (1 例) と新生児スクリーニングで発見された症例 (2 例) であった。この 3 例はいずれも症状なく、正常発達を獲得していた。

発症してから診断された 4 例のうち 2 例は新生児期に発症し、他の 2 例は幼児期にそれぞれ重度の低血糖、けいれん、意識障害で発症した。転帰は 1 例が突然死し、3 例では発達障害を残していた。

なお発症した例はすべて日本人における common 変異である c.449delCTGA 変異の homozygote であった。

D. 考察

SIDS 様の症状で発症する代謝異常症として、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル異常症などがあるが、日本ではこれらの疾患と突然死の関連についてはほとんど検討されていなかった。今回、64 症例の調査で SIDS

もしくは ALTE 症例のうち約 10%に脂肪酸代謝異常症が潜んでいる可能性が示唆された。脂肪酸代謝異常症は乳幼児期に飢餓や感染を契機に重篤な低血糖を発症することが知られているが、この時期は SIDS の好発年齢とも重なっている。今回の結果は、突然死症例では必ず先天代謝異常の検索を行う必要があることを示している。

MCAD 欠損症は欧米では 1 万人に 1 人と頻度が高いが、日本では稀な疾患と考えられ、あまり注目されてこなかった。しかし今回の研究で、我が国でも MCAD 欠損症の患者が突然死したり、原因不明の脳症後遺症として重篤な発達遅滞を抱えていることがわかった。まだ一般小児科医に脂肪酸代謝異常症が広く知られているとはいえない現状を考えると、もっと多くの脂肪酸代謝異常患者が原因不明の突然死として片付けられている可能性もあり、症例を増やしてさらに検討する必要がある。

さらに SIDS 症例では、血液以外の検体採取が困難な場合も多く、血中アシルカルニチン分析しか行われずに確定診断に至らない症例が少なくなかった。現場で尿の採取にも注意を払うべきである。正しい診断は両親が児の死を受け止めたり、次子への遺伝カウンセリングを行う上で必要な場合も多い。不幸にして死の転帰をとった場合でも、できる限り死後早期に皮膚線維芽細胞を含む種々の検体を採取しておき、原因検索に備える体制作りも必要である。

E. 結論

SIDS や ALTE 症例には一定の割合で脂肪酸代謝異常症などの先天代謝異常症が含まれている。突然死をきたす背景疾患としてこれらの代謝異常症を念頭におき、十分な検索を行うことが、SIDS の病態解明には重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Li H, Fukuda S, Shigematsu Y, Fukao T, Yamaguchi S: A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD): c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD. *Molecular Genetics and Metabolism* 96(2): 77-79, 2009 (February)
- 2) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain & Development*, 2009 (inpress)
- 3) Korematsu S, Kosugi Y, Kumamoto T, Yamaguchi S, Izumi T: Novel mutation of early, perinatal-onset, myopathic-type very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Neurology* 41(2): 151-153, 2009 (August)
- 4) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 98(4): 372-377, 2009 (December)
- 5) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial

- β -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development*, in press, 2009
- 6) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Nakamura I, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: Enzymatic evaluation of glutaric academia type 1 by an in vitro probe assay of acylcarnitine profiling using fibroblasts and electrospray ionization / tandem mass spectrometry (MS/MS). *Journal of Chromatography B* 877: 2648-2651, 2009 (July)
- 7) 四本由郁, 長谷川有紀, 小林弘典, 内田由里, 山口清次, 石川順一, 塩見正司: 脂肪酸代謝障害の所見を示したセレウス菌食中毒に伴う急性脳症の 5 歳例. *日本小児科学会雑誌* 113(1): 75-78, 2009 (1月)
- 8) 小林弘典, 虫本雄一, 山口清次: ESI-MS/MS と培養細胞を用いた in vitro probe acylcarnitine profiling assay による脂肪酸 β 酸化能の評価. *JSBMS Letters* 34(2): 21-26, 2009 (6月)
- 9) 山口清次: 新生児突然死の予防: タンデムマスによる早期発見. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4): 973-976, 2009 (12月)
- 10) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 坂本 修, 大浦敏博, 山口清次: 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症の 2 例: 血清分析の必要性. *日本マス・スクリーニング学会誌* 19(3): 255-259, 2009 (12月)
- 11) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李 紅, 福田誠司, 近藤陽一, 脇口 宏, 藤枝幹也, 高杉尚志, 山口 結, 吉良龍太郎, 原 寿郎, 山口清次: 中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症日本人 5 症例の発症形態の検討. *日本小児科学会雑誌* 113(12): 1800-1804, 2009 (12月)
- 12) 山口清次: 新生児マススクリーニングの新しい展開. *日本小児科学会教育委員会編: ここまで来た注目の小児科臨床ガイド 小児科専門医のための生涯教育ナビゲータ*. 5 章 診断・検査医学の進歩, 中山書店, 東京, pp182-188, 2009 (4月, 全 263 頁)

2. 学会発表

- 1) 山口清次: 小児救急の場で知っておくべき代謝性疾患. 第 6 回和歌山小児救急研究会 講演. 和歌山, 2009 年 6 月
- 2) 山口清次: 新生児突然死の予防: タンデムマス導入による早期発見. 第 45 回日本周産期・新生児医学会総会・学術集会 教育講演. 名古屋, 2009 年 7 月
- 3) 李 紅, 小林弘典, 長谷川有紀, プレブスレンジャミヤン, 虫本雄一, 山口清次: 高温環境における脂肪酸代謝異常患者のアシルカルニチンプロファイル変化. 第 34 回日本医用マススペクトル学会年会. 大阪, 2009 年 9 月
- 4) 長谷川有紀, 虫本雄一, 小林弘典, 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症における新生児期発症患者の臨床像. 第 51 回日本先天代謝異常学会. 東京, 2009 年 11 月

G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

表1 SIDS・ALTEを主訴として質量分析を行った症例の発症年齢分布

	新生児期	乳児期	幼児期	学童以上	不明
SIDS(38例)	4	23	5		6
ALTE(26例)	2	18	2	2	2

表2 日本におけるMCAD欠損症の臨床像と予後の検討

症例	性	発症時期	症状	診断時期	転帰	変異
1	F	新生児期	低血糖 けいれん	2y5m	発達遅滞	c.449delCTGA c.449delCTGA
2a	M	新生児期	低血糖 けいれん	1y8m	突然死	c.449delCTGA c.449delCTGA
3a	F	2y4m	低血糖 急性脳症	8y10m	重症心身障害	c.449delCTGA c.449delCTGA
4b	M	1y4m	低血糖 けいれん	1y4m	重症心身障害	c.449delCTGA c.449delCTGA
5b	M	-	(同胞スクリー ニング)	5y5m	正常	c.449delCTGA c.449delCTGA
6	F	-	(新生児スクリ ーニング)	新生児期	正常	c.449delCTGA c.134A>G
7	M	-	(新生児スクリ ーニング)	新生児期	正常	c.449delCTGA c.820A>G

a, b = 同胞例

厚生労働科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）
「乳幼児突然死症候群(SIDS)における病態解明と臨床的対応および
予防法開発とその普及啓発に関する研究」
分担研究報告書

乳幼児突然死症候群における組織バンク構築と病理組織学的研究

研究分担者 中山雅弘（大阪府立母子保健総合医療センター検査科）

研究協力者 木本哲人、松岡圭子、桑江優子、平野慎也、的場梁次

（大阪府立母子保健総合医療センター検査科、新生児科大阪大学法医学教室）

研究要旨

今年度は、乳幼児突然死症例につき、アナフィラキシー反応に関与する補体関連物質(C3aR, C5aR)を用いて検討した。

C3aR は、リンパ球中心に発現、気管支周囲にはほぼ全例に一定量存在。SIDS 典型例は SUD や窒息群に比べて、発現が低い傾向であった。

C3aR は、肺泡領域には発現は見られなかった。C5aR は、SIDS 症例では、SIDS は、1 例のみ陽性で、他には発現されていなかった。窒息や喘息症例では、発現されていた。アナフィラキシーの関連において、乳幼児突然死でも、C3aR, C5aR の解析は一定有用であると考えられる。

SIDS 研究のバンク(medical information bank)設立のための検討を行った。大阪府をパイロット的な対象ととらえ、大阪大学法医学教室、大阪府監察医事務所、大阪府立母子保健総合医療センター検査科(病理及びマス・スクリーニング)の協力の下に、地域組織バンクの構築を検討した。

A. 研究目的

SIDS の原因に関しては、慢性低酸素症・脳幹部神経伝達物質の異常・覚醒反応の低下を含めた脳機能異常・循環系調節異常など様々な異常が示唆されているが、未だ解明に至らず国内外の専門家によってその原因究明にむけた研究がなされている。剖検例の遺伝子

検査を含めた病理組織学的検索は SIDS 研究の基本である。発生メカニズムに対して免疫学的な関与に関してはこれまで十分な検討がなされていなかった。剖検例でアナフィラキシーの存在の有無に関して、補体成分の C3a, C4a, C5a は、アナフィラキシーの惹起に重要

な物質である(図 1)。アナフィラトキシンは血中に存在するものであるが、そのレセプターを解析することは剖検例で可能である。肺の病理標本において、レセプターの生成物を分析することによりアナフィラキシーの動態解析が可能である。

SIDS に関しては、日本全体では年間 300 例程度が発生すると推測されるが、剖検率の低下もあり、十分な検討を特定の単独施設等で行うことは不可能である。大学法医学教室、監察医務院・事務所、救急医療関連施設、小児医療施設等による協力体制が不可欠と考える。当面は、大阪府をパイロット的な対象ととらえ、大阪大学法医学教室、大阪府監察医事務所、大阪府立母子保健総合医療センターの協力の下に、地域組織バンクの構築を試行する。

B. 研究方法

当センターで剖検後保管されていた肺標本 23 例を用いた。11 例は、SIDS の診断がなされており、12 例は SIDS 以外の診断であった症候性突然死の症例である。肺炎、敗血症、脳症からクモ膜下出血、窒息まで幅広い疾病を含んでいる(表 1)。

剖検肺のパラフィンブロック標本を用いて、C3a, C5a のレセプター(C3aR, C5aR)の免疫染色を施行した。用いた

抗体は、SANTA CRUZ 社の C3aR(H-300):sc-20138, C5aR(3H1740):sc-70813 である。

大阪府下地域バンクの条件として、大阪府監察医事務所内に倫理委員会設立のための協議会を持った。又、大阪大学法医学教室と母子保健総合医療センターで地域バンクの設立条件が討議された。

C. 研究結果

C3aR は SIDS 症例においては、気管支周囲性には大部分の症例が染色され、3 例に強陽性であった(図 2)。症候性の突然死群においては半分以上の症例で気管支周囲に強陽性の所見を呈した(図 3、表 1)。

C5aR は粘膜において、SIDS 症例ではほとんどが陰性であった。1 例のみ強い陽性像を示した(症例 4)。陽性部位は、血管内皮あるいは線維芽細胞などが考えられた。この例は、症候性突然死症例では 4 例に陽性所見が得られた。窒息、ミルク誤嚥が 3 例、喘息が 1 例であった。

バンクの構成の主体は、研究班、学会、行政機関の可能性が考えられるが、当面は SIDS 研究班でモデル事業を実施する。施行場所は、大学、監察医関連施設、小児病院、SIDS 研究センター等の可能性があるが、地域バンクのモ

デル事業として、法医症例のセンターを大阪府監察医事務所(法医バンク)に、病理症例のセンターを母子保健総合医療センター検査科(病理バンク)に設置する。代謝疾患・脳病理・心臓病理では専門の依頼施設を設置する(図4)。

バンクの対象・集約方法の案は以下に示す。

1) フォルマリン標本

脳・心臓(伝導系)などは、専門医による検索後は返却、記録のみの保存。

2) パラフィン標本(全臓器)および臨床検体(血清・血球・尿および臨床情報など)

バンク参加施設においてはセンターに登録のみを行い各施設でそれぞれ検体保存。可能であればセンター組織でも重複保存を行う。

その他の地域(非参加施設)で発生した SIDS 症例は登録とともに検体もバンクセンター組織で集約。

3) 凍結標本(脳、肝臓、肺、髄液、尿、胆汁など)および遺伝子(DNA)

バンクセンターには登録のみを行い、バンク参加施設で凍結組織を各施設で保存。

D. 考案

アナフィラキシーの形成に重要な anaphylatoxin は肥満細胞を刺激し、ヒ

スタミンなどの放出に関与する。Anaphylatoxin の重要な一部である C3a、C5a の受容体(C3aR、C5aR)の免疫染色を今回施行した。

C3aR の気管支周囲での陽性例は、非特異的な印象が強かった。陽性細胞は、H.E.標本などと比較して、血球成分とくにリンパ球の可能性が考えられる。一般的に C3aR は活性化リンパ球や大脳で発現が見られるといわれている。我々の例での陽性部位も活性化リンパ球に合致すると考えられる。確定のためには、リンパ球のマーカーとの二重染色などが必要である。しかし、臓器や間質の細胞で陽性が見られるとの報告もあり、今後も症例を重ねて検討を続けたい。

C5aR は SIDS 症例でほとんどが陰性であったが、1 例において強陽性像を示した。この症例 4 は経過および剖検報告を詳細に振り返ると、数日前からの細気管支炎があり、剖検で、髄膜炎(軽度)などが記載されており、免疫学的な関与の可能性も十分に考慮される病態であった。非 SIDS 症例の中で、喘息が含まれていることは納得できるが、窒息が 3 例あるのは興味深い所見である。現在の所見だけで意義を推測することは困難であるが、今後、肥満細胞や他のアナフィラトキシンの検索とともに、症例を増やして検討を続けたい。陽性細胞は、血管内皮、筋細胞、間葉

細胞などが考えられた。C5aR は、一般的には肝細胞・肺・平滑筋・血管内皮などで陽性像が見られるという。

E. 研究発表(論文)

1. Hosokawa S, Takahashi T, Kitajima H, Nakayama M, Okamoto N, Kosaki K. Case report of Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and NIPBL gene mutation. *Congenital anomaly* 2009
2. Takeuchi M, Nakayama M, Tamura A, Kitajima H. Hydrops Fetalis Due to Agenesis of the Ductus Venosus: New Hepatic Histological Features *Pediatric and Developmental Pathology* 2009; 12: 239-243
3. Fujino T, Okamura A, Hatsukawa Y, Nakayama K, Inoue M, Nakayama M. A case of intraocular yolk sac tumor in a child and its pathogenesis. *Journal of AAPOS* 2009; 13: 613-615
4. Wakasa T, Wakasa K, Nakayama M, Kuwae Y, Matsuoka K, Takeuchi M, Suehara N, Kimura T. Change in Morphology and Oxytocin Receptor Expression in the Uterine Blood Vessels during the Involution Process. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2009; 67: 137-144
5. Takeuchi M, Nakayama M, Nakano A, Kitajima H, Sawada A. Congenital systemic juvenile xanthogranuloma with placental lesion. *Pediatrics International* 2009; 51: 833-836
6. 末原節代、和栗雅子、中西功、光田信明、今吉雄三、中山雅弘. Protein S 欠乏症合併妊娠 16 例の検討 —とくに血栓合併症と予防的抗血栓療法について— *Jpn.J.Obst.Gynecol.Neonatal Hematol* 2009; 19: 41-42
7. 中山雅弘. 胎盤・臍帯病理検査 *周産期医学* 2009; 38: 194-199
8. 宮野章、江口政志、宮道徹、中山雅弘、末原則幸. サイトメガロウイルス IgM 抗体陽性妊婦の IgG 抗体 avidity 測定 *医学検査* 2009; 58: 177-180
9. 澤田明久、井上雅美、近藤統、木本富子、山田佳世、中山雅弘、桑江優子、西川正則、大川洋二、井田孔明、徳田桐子、真部淳、土屋邦彦、奥山宏臣、窪田昭男、川原央好、長谷川利路、米田光宏、竹本理、山田淳二、川端秀彦、田村太資、木内恵子、平野慎也、宇野誠、竹下泰史、石原卓、岡村隆行、坂田尚己、水谷修紀、中畑龍俊、

- 迫正廣、多和昭雄、尾路祐介、坪井昭博、小山真穂、岡芳弘、安井昌博、杉山治夫、河敬世. 小児がんに対する WT1 ペプチドによるワクチン療法 日本小児がん学会雑誌 2009; 46: 6-16
10. 白石淳、望月成隆、細川真一、佐野博之、北島博之、藤村正哲、奥山宏臣、川原央好、窪田昭男、中山雅弘. 胎便関連性腸閉塞症の病因に基づく診断と治療 日本周産期・新生児医学会雑誌 2009; 45: 14-18
11. 中山雅弘、桑江優子、松岡圭子、窪田昭男. 著しい神経成分の増加がみられた成熟奇形種の1症例 日本小児がん学会雑誌 2009; 46: 234
12. 桑江優子、松岡圭子、中山雅弘、窪田昭男. 10歳男児の船尾部皮下原発粘液乳頭状上衣腫 日本小児がん学会雑誌 2009; 46: 239
13. 南條浩輝、北島博之、西澤和子、高橋伸方、杉本佳乃、望月成隆、北島真一、佐野博之、和田芳郎、白石淳、平野慎也、中山雅弘、藤村正哲. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染が原因と考えられた壊死性気管食道瘻の2症例 日本周産期・新生児医学会雑誌 2009; 45: 787-793、
- 1209-1305
14. 中山雅弘、桑江優子、松岡圭子、濱中拓郎、末原則幸、和田芳郎、北島博之. 胎盤病理からみたFGR(IUGR) 周産期シンポジウム 2009; 27: 15-23
15. 中山雅弘、松岡圭子、桑江優子. 胎児と薬剤性障害 病理と臨床 2009; 27: 884-889

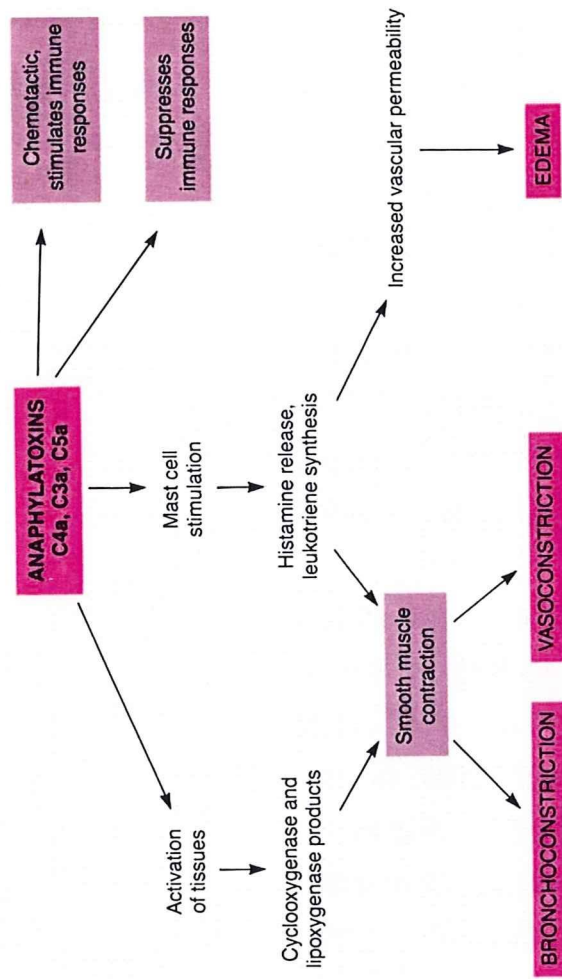


図 1

アナフィラトキシンの作用機序

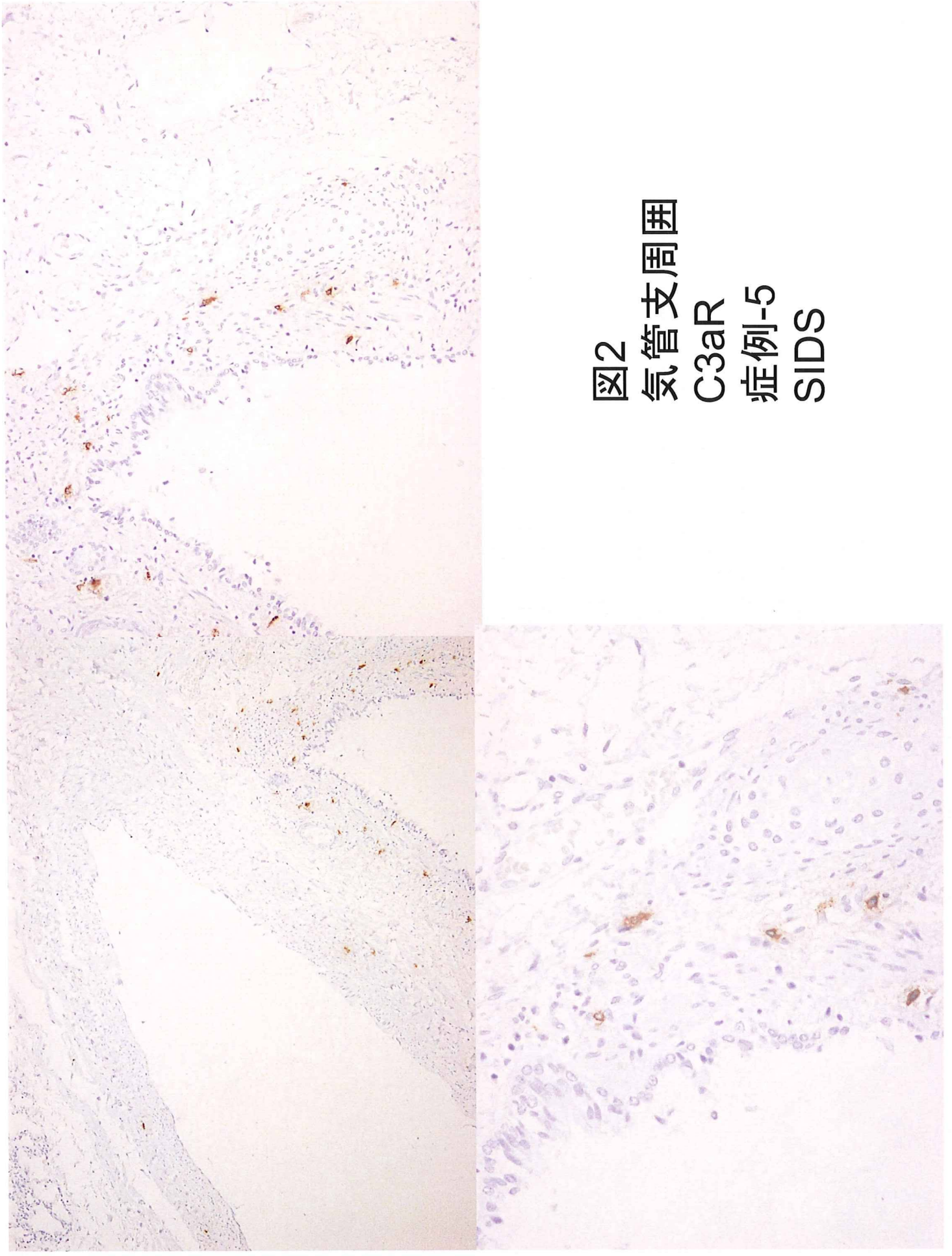


图2
支气管周围
C3aR
病例-5
SIDS

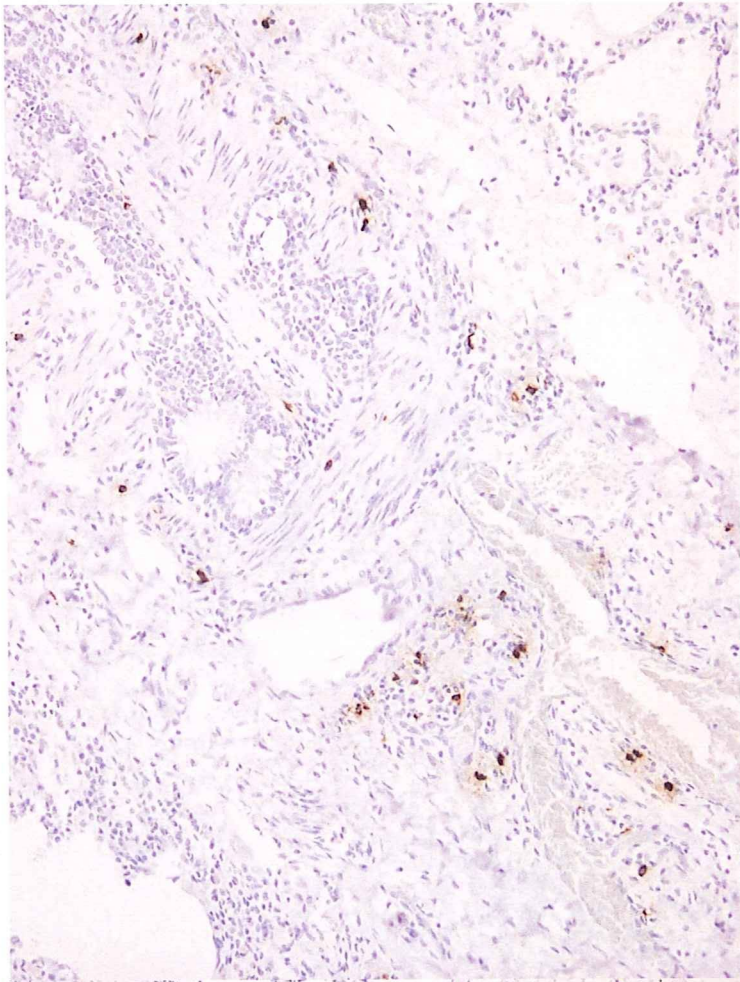
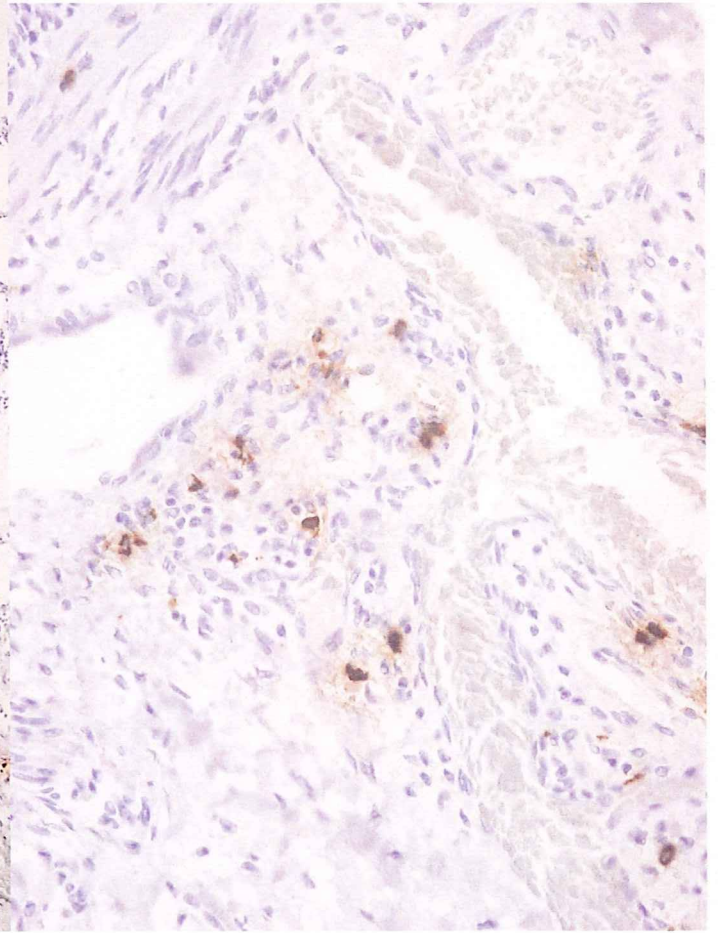
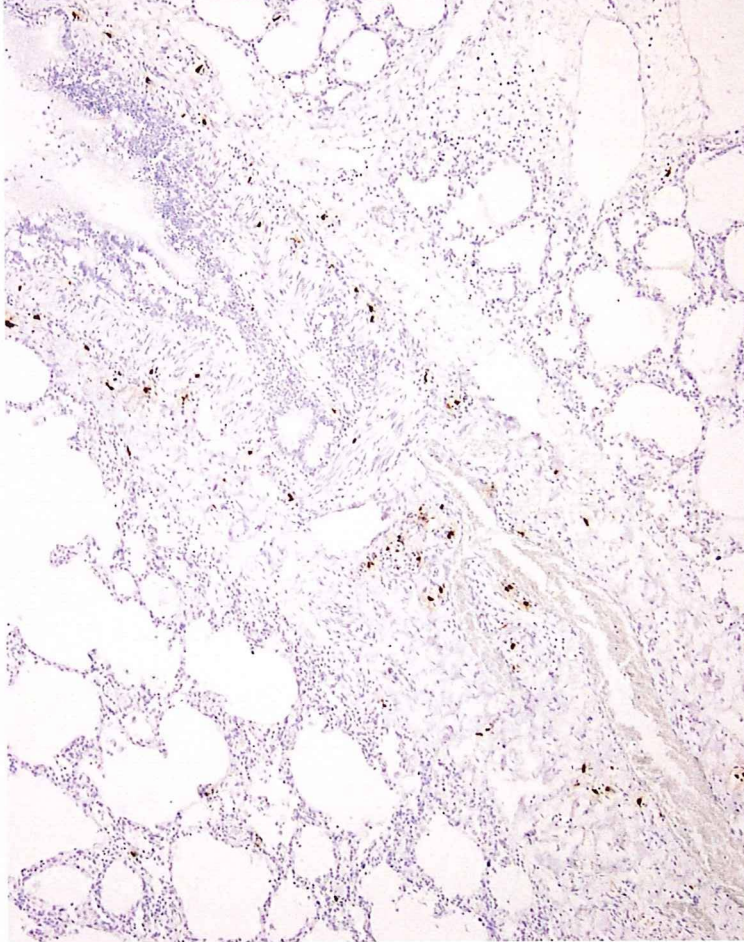


图3
支气管周围
C3aR
症例-14
窒息？



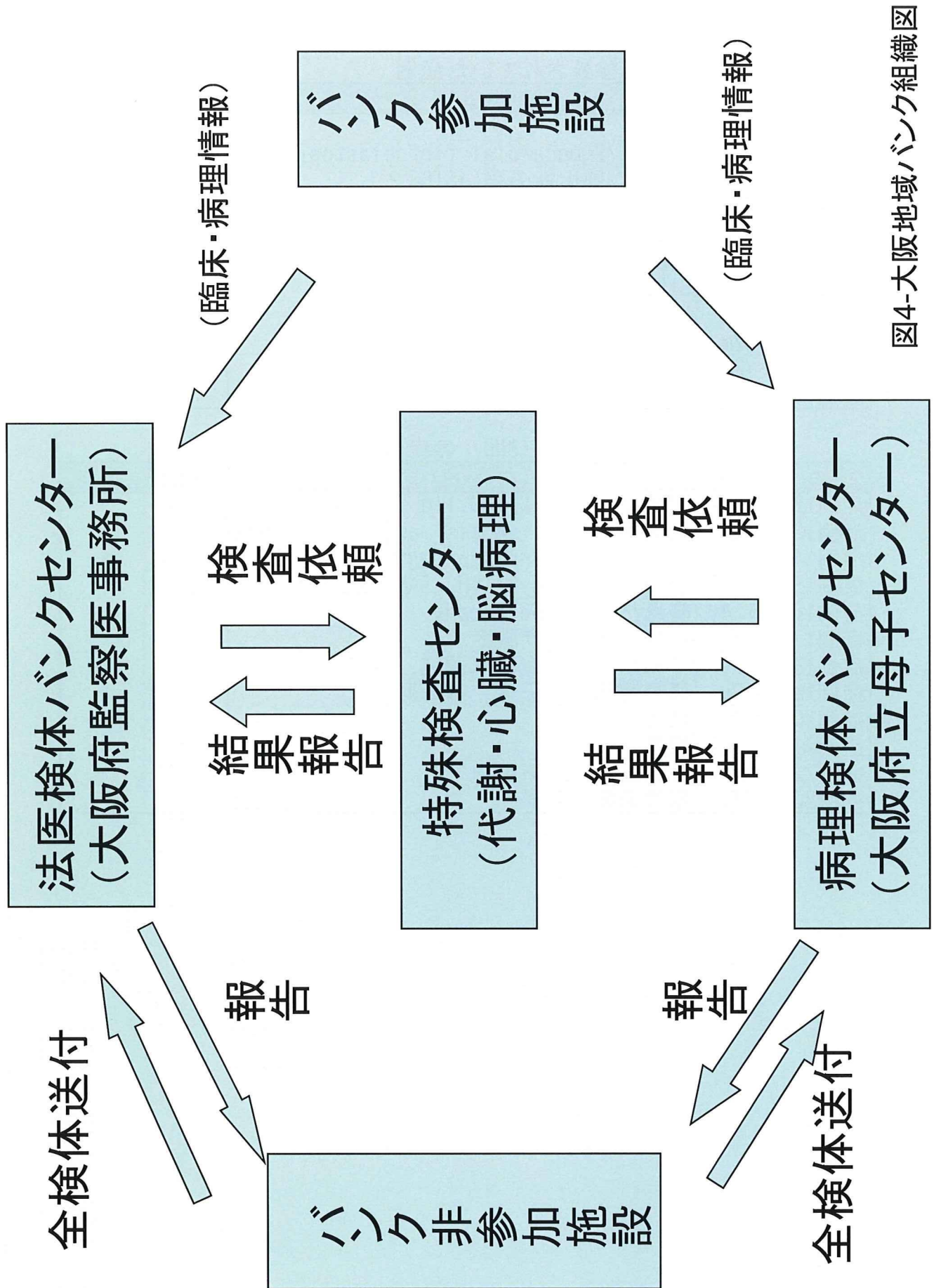


図4-大阪地域バンク組織図

表1-突然死におけるアナフィラトキシンの免疫染色結果

SIDSと診断されていた症例

sample	age	diagnosis	C3aR	C5aR
症例1	10m	SIDS	++	-
症例2	6m	SIDS?/Endocardial fibroelastosis	+	-
症例3	1m	SIDS?/肺出血の強いSIDS?	+	-
症例4	3m	SIDS/10日前より細気管支炎/small VSD	++	++
症例5	3m	SIDS典型例/託児所死亡	+	-
症例6	8m	SIDS?/数日前〜感冒/1/w convulsion	+	-
症例7	3m	SIDS/胎児仮死・CP	++	-
症例8	2m	SIDS	-	-
症例9	2m	SIDS	+	-
症例10	2m	SIDS	+	-
症例11	5m	SIDS	±	±

症候性突然死 (SUD) の症例

sample	age	diagnosis	C3aR	C5aR
症例12	12m	間質性肺炎、PS, ASD, 11q trisomy	++	-
症例13	5m	敗血症/E.coli sepsis, endotoxin shock	+	-
症例14	3m	ミルク誤嚥/Hirschsprung病	++	++
症例15	12d	Cardiomyopathy?/IVH, SAH, SHE, PVL	±	-
症例16	1.4y	窒息?/LV hypertrophy	++	++
症例17	2y	インフルエンザ脳症	+	-
症例18	5y	てんかん、出血後水頭症、喘息	++	+
症例19	2y	原発性肺高血圧症、骨奇形	+	-
症例20	4y	肺炎	++	-
症例21	2m	窒息	+	++
症例22	11m	外傷性クモ膜下出血	++	-
症例23	4y	脳性麻痺、肺炎	++	-

厚生労働科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）
「乳幼児突然死症候群 (SIDS) における病態解明と臨床的対応および
予防法開発とその普及啓発に関する研究」
分担研究報告書

心臓ナトリウムイオンチャネルコード遺伝子 (SCN5A) 転写調節領域における
ディプロタイプ解析

研究分担者 的場梁次

(大阪大学大学院医学系研究科予防環境医学専攻社会環境医学講座法医学教室)

研究協力者 中留真人 (藤田保健衛生大学医学部法医学講座)

研究要旨

ヒトナトリウムイオンチャネルをコードしている SCN5A 遺伝子は、心筋に発現する心筋ナトリウムチャネル病の原因遺伝子であることが判明している。今回我々は、SCN5A 蛋白発現に関与する転写調節領域に存在する 6 箇所の SNP (C-1418T, T-1062C, T-847G, -835insGC, T-834C, C287T) について、乳幼児突然死症候群 (SIDS) を含む原因不明の突然死との関連を検討した。その結果、6 箇所の SNP の組み合わせによるディプロタイプは全部で 38 通り検出され、その出現頻度を比較した結果、4 番目に出現頻度の多かったディプロタイプ D (Dip. D): CTG-TC/CCG-TC 型が突然死群において有意に高かった。このことから、この型を有する個体は、たとえエクソン内に変異が存在しなくても、mRNA 転写活性に影響を与え、その結果ナトリウムチャネルの機能異常につながる可能性が示唆された。さらに、転写調節領域内のディプロタイプが、明らかな異常所見の無い原因不明の突然死の遺伝子診断マーカーとして利用できる可能性も示唆された。

A. 研究目的

ナトリウムイオンチャネルは、神経・筋などの興奮性細胞の細胞膜に存在する細胞電位依存性のタンパク質分子であり、カリウムイオンチャネルと共に、活動電位の発生並びに情報の伝播を担っている。ヒトのナトリウムイオンチャネルは、SCN5A-11A の α サブユニット遺伝子と SCN1B-SCN3B の β サブユニット遺伝子から構成され¹⁾、その中の SCN5A 遺伝子は、心筋に発現する心筋ナトリウムチャネル病の原因遺伝子であることが判明

している²⁾。この SCN5A 遺伝子は、心筋の電氣的興奮に重要な役割を果たしていることから、SCN5A 遺伝子内の変異と、心電図の QT 間隔延長と突然死を惹起する血管障害によって特徴付けられる QT 延長症候群との関連^{3),4)}、さらに、心室頻拍及び心室細動が頻発し突然死を来たす Brugada 症候群との関連⁵⁾⁻⁷⁾を示唆する報告が近年なされている。

そこで今回我々は、SCN5A 蛋白発現に関与する転写調節領域⁸⁾に存在する 6 箇所の SNP (C-1418T,

T-1062C, T-847G, -835insGC, T-834C, C287T) に着目し, PCR-RFLP 法及びダイレクトシーケンス法にて型判定を行い, 乳幼児突然死症候群(SIDS)を含む原因不明の突然死との関連を検討した。

B. 研究方法

(1) 試料

インフォームドコンセントによって同意を得た, 健常者 112 名 (男性 70 名, 女性 42 名, 年齢 0-60 歳, mean=40±15 years) の血液から抽出した DNA と, 大阪大学法医学教室にて司法解剖にふされた原因不明の突然死症例 70 名 (SIDS 症例 20 名: 男性 10 名, 女性 10 名, 年齢 2-12 ヶ月, mean=8±2 months, 及び大人の突然死症例 50 名: 男性 35 名, 女性 15 名, 年齢 20-60 歳, mean=41±13years) の血液から抽出した DNA を PCR の鋳型として用いた。DNA 抽出は, PureLink GenomicDNA MiniKit (invitrogen)を用いて行った。

(2) SCN5A 遺伝子エクソン内変異の検索

SCN5A 遺伝子の各エクソン内について, 突然変異の存在の有無を, PCR 増幅後シーケンス法にて検索した。

(3) 多型検出

SCN5A 遺伝子転写調節領域内の多型 (Fig. 1) 検出法は, Bezzina ら⁹⁾の報告に準じた。C-1418T 及び T-1062C 多型の検出は, PCR-RFLP 法にて型判定し, 残りの 4 箇所の多型検出は, シークエンス法にて型判定を行った。

(4) 統計学的解析

6 箇所の多型における遺伝子型の出現頻度、及びそれらで構成されるディプロタイプの出現頻度について, 分布に差があるか否かを検定するため, カイ 2 乗検定ならびに Odds Ratio, 95%CI を用いて有意差の有無を検討した。

C. 研究結果

サンプル全ての SCN5A 遺伝子エクソン内には, 突然変異は認められなかった。

C-1418T, T-1062C, T-847G, -835insGC, T-834C, C287T 多型の遺伝子型出現頻度において, 健常者群と突然死群間に有意差は認められなかった (Table 1)。一方, その組み合わせによるディプロタイプは全部で 38 通り検出され, その出現頻度を比較した結果, 4 番目に出現頻度の多かったディプロタイプ D (Dip. D): CTG-TC/CCG-TC 型が突然死群において有意に高かった (Table 2)。SIDS 症例に関しては, 1 例のみからこの型が検出された。

D. 考察

Bezzina ら⁹⁾の報告では, プロモーター領域内の 6 箇所の多型で構成されるハプロタイプ B (HapB) が mRNA 転写活性低下と関連があることを, 培養心筋細胞を用いた実験で証明している。この HapB は今回我々が検出したディプロタイプ D (Dip. D): CTG-TC/CCG-TC 型と多型部位が 1 箇所異なるものの, 非常に類似性が高いことが判明した。このことから, この型を有する個体は, たとえエクソン内に変異が存在しなくても, mRNA 転写活性に影響を与え, その結果ナトリウムチャンネルの機能異常につながる可能性が示唆された。一方, SIDS 症例に関しては, 20 例中 1 例のみこのディプロタイプ D が検出されたものの, 今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。また, このディプロタイプ D が, 直接心機能異常 (不整脈等) につながるか否かは現在不明であるが, エクソン内に変異が存在しない場合には, 転写調節領域内のディプロタイプが, 明らかな異常所見の無い原因不明

の突然死の遺伝子診断マーカーとして、利用できる可能性も示唆された。

参考文献

1) Dhar MJ, Chen C, Rivolta I, et al.: Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation*, 103: 1303-1310, 2001.

2) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al.: Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, 392: 293-296, 1998.

3) Moric-Janiszewska E, Markiewicz-Loskot G, Loskot M, et al.: Challenges of diagnosis of long-QT syndrome in children. *Pacing Clin Electrophysiol*, 30: 1168-1170, 2007.

4) Horie M, Itoh H: Disorders of cardiac repolarization -long QT and short QT syndromes-. *Circ J, Suppl A*: A50-A53, 2007.

5) Antzelevitch C, Brugada P, Borggreffe M, et al.: Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart Rhythm*, 2: 429-440, 2005.

6) Clancy CE, Wehrens XHT: Mutation-specific effects of lidocaine in Brugada syndrome. *Int J Cardiol*, 121: 249-252, 2007.

7) Koopmann TT, Beekman L, Alders M, et al.: Exclusion of multiple candidate genes and large genomic rearrangements in SCN5A in a Dutch Brugada syndrome cohort. *Heart Rhythm*, 4: 752-755, 2007.

8) Yang P, Kupersmidt S, Roden DM: Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovascular Research*, 61: 56-65, 2004.

9) Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, et al.: Common sodium channel promoter haplotype in Asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation*, 113: 338-344, 2006.

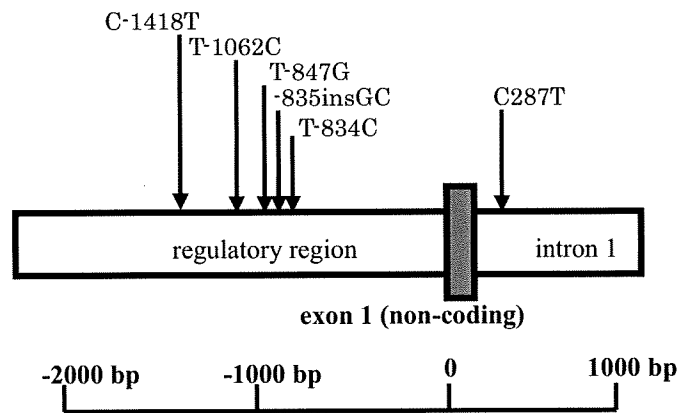


Fig.1. The SCN5A regulatory region including 2.2 kb upstream of exon 1, exon 1 (which is 173 bp and non-coding), and the proximal 439 bp of intron 1. Six major nucleotide variations are indicated.

Table 1
Genotype frequency in the Japanese control group and sudden death group

Genotypes	Controls (N=112)	Sudden Death (N=70)	OR (95%CI)	P value
C-1418T				
C/C	55	40	1	
C/T	40	25	0.86 (0.45 - 1.64)	0.74
T/T	17	5	0.40 (0.14 - 1.19)	0.14
T-1062C				
T/T	68	41	1	
T/C	37	27	1.21 (0.64 - 2.27)	0.63
C/C	7	2	0.47 (0.09 - 2.39)	0.48
T-847G				
T/T	65	41	1	
T/G	34	17	0.79 (0.39 - 1.60)	0.60
G/G	13	12	1.46 (0.61 - 3.52)	0.50
-835insGC				
-/-	68	53	1	
-/GC	37	15	0.52 (0.26 - 1.05)	0.09
GC/GC	7	2	0.37 (0.07 - 1.84)	0.30
T-834C				
T/T	102	58	1	
T/C	7	10	2.51 (0.91 - 6.95)	0.11
C/C	3	2	1.26 (0.20 - 7.77)	1.00
C287T				
C/C	64	44	1	
C/T	39	22	0.82 (0.43 - 1.57)	0.62
T/T	9	4	0.65 (0.19 - 2.23)	0.56

N; sample numbers, ins; insertion, -; insertion negative

Table 2
 Diplotype groups formed by 6 polymorphisms and frequency in the Japanese control group and sudden death group

Diploypes	Controls (N=112)	Sudden Death (N=70)	OR (95%CI)	P value
Dip.A (Wild-type)	29	14	1	
CTT-TC/CTT-TC				
Dip.B	11	10	1.88 (0.65-5.48)	0.28
CTT-TC/CTG-TCT				
Dip.C	7	5	1.48 (0.40-5.50)	0.73
CTT-TC/TCG-TC				
CTG-TC/TCT-TT				
CCT-TC/TTG-TC				
TTF-TC/CCG-TC				
Dip.D	4	10	5.18 (1.38-19.45)	*0.01
CTG-TC/CCG-TC				
Dip.E	4	3	1.55 (0.31-7.91)	0.68
TTF-TC/TCT-TC				
TTF-TC/TCT-TT				
Dip.others (33 patterns)	57	28	1.38 (0.65-2.95)	0.45

N; sample numbers, -, insertion negative, *,significant

sudden death by unknown causes. Leg Med, 11(6): 298-301, 2009.

E. 研究発表

1) 国内

1. 中留真人、山本琢磨、磯部一郎、的場梁次：心臓ナトリウムイオンチャネルコード遺伝子 (SCN5A) プロモーター領域に存在する SNP 解析. 第93次日本法医学会学術全国集会 (大阪) 講演要旨集 p72. 2009.
2. 中留真人、山本琢磨、的場梁次、浜島誠、平田ゆかり、磯部一郎：心臓ナトリウムチャネル遺伝子 (SCN5A) 転写調節領域におけるディプロタイプ解析. 日本 DNA 多型学会第18回学術集会 (福岡) 抄録集 p76. 2009.
3. 中留真人、山本琢磨、磯部一郎、的場梁次：心臓ナトリウムイオンチャネルコード遺伝子 (SCN5A) プロモーター領域に存在する SNP 解析. DNA 多型, Vol.17, 256-259, 2009.

2) 海外

1. Nakatome M, Yamamoto T, Isobe I, Matoba R: Diplotype analysis of the human cardiac sodium channel regulatory region in Japanese cases of

厚生労働科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）
「乳幼児突然死症候群(SIDS)における病態解明と臨床的対応および
予防法開発とその普及啓発に関する研究」
分担研究報告書

乳幼児突然死症候群の病態解明のための組織バンク構築に関する倫理的研究

研究分担者 平野慎也（大阪府立母子保健総合医療センター新生児科）

研究要旨

乳幼児突然死症候群の病態解明のための組織バンク構築に関する倫理的研究を行うに当たり、特に乳幼児突然死症候群症例の組織検体の提供および研究の同意取得という点につき、現存の倫理指針等を参照し、剖検および検体の保存・利用にあたっての同意説明文書に記載すべき内容を整理し、組織バンクの構成について検討整理した。

A. 研究目的

乳幼児突然死症候群（SIDS）の診断には、病歴と死亡状況調査(death scene investigation；DSI)と剖検が必須であり、死因に重大な影響を及ぼす疾患、病態、外因等を厳しく鑑別してなされるべきである。

現在、SIDS がなんらかの病因を有する疾患であるという立場から、SIDS の原因に関しては、睡眠に随伴した覚醒反応の低下を含めた脳機能の異常、先天性代謝異常症の存在、感染症、慢性の低酸素症の存在など様々なものが指摘されているが、未だ解明には至っていない。

将来的にその病態解明に役立てるためには医学の進歩、医学研究の進歩に随時対応し、検体試料を保存、管理し利用することを考えなくてはならない。

組織バンクは提供組織（試料）の保存、管理とその利用（研究）がその機能の主要部分であるが、組織バンクの構築をめざすにあたり、その試料の提供と利用についての代諾者へのインフォームド・コンセントについて説明文書に書くべき内容について

検討、整理した。

B. 研究方法

わが国での倫理指針等のインフォームド・コンセントに関する部分を参照し、同意説明文書に含まれるべき項目（内容）を整理した。

人間を対象とする医学研究の倫理的原則であるヘルシンキ宣言の下、

- ・疫学研究に関する倫理指針（平成19年8月16日全部改正）
 - ・臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正）
 - ・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成17年6月29日一部改正）
- 「臨床研究に関する倫理指針」（改訂）についてのQ&A（平成20年12月26日版）
- ・病理解剖の倫理的課題に関する提言（社団法人日本病理学会 倫理委員会・理事会 平成13年11月26日）

・症例報告における患者情報保護に関する指針（日本病理学会）

- ・病理解剖についての説明
- ・「症例報告を含む医学論文及び学会研究会発表における患者プライバシー保護に関する指針」（平成16年4月6日 外科関連学会協議会）
- ・医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（GCP）

を参考にした。

C. 研究結果

●同意に関して

SIDS の診断、試料提供、およびその利用におけるインフォームド・コンセントにおいては、

1. 診断のための解剖に関するもの
 2. SIDS の病態解明のための（バンクへの）試料提供および利用に関するもの
- の2つに大別できるかと思う。

1. 解剖における同意について

まず、我が国では監察医制度が存在し、その施行区域と区域外では対処の方法が違う。

監察医制度は、1947年の制度導入時の年人口上位7都市（東京23区・大阪市・京都市・名古屋市・横浜市・神戸市・福岡市）に導入されたが、京都市と福岡市で同制度は廃止され、現在、残る5都市（東京23区、大阪市、名古屋市、横浜市、神戸市）で運用しているとされている。

SIDS では、その死亡は予測できない死であり、すべて異状死体の範疇に入り、法的には医師法第21条に基づき異状死体の届け出を所轄警察署に行わなければならない。遺体は刑事訴訟法第229条に基づく検察官や警察官による検視が行われ、この時点で犯罪もしくは関係者の過失が疑われる症例は、刑事訴訟法第223条に基づいて司

法解剖の手続きがとられる。

- ・司法解剖に関しての同意の必要性
多くのケースでは被解剖者の遺族への心情的配慮から、その了承を得た上で解剖が行われている。法律上では裁判所から「鑑定処分許可状」の発行を受ければ、遺族の同意が得られなくても職権で強制的に行うことが可能であるとされている。

検視の結果、犯罪等の疑いがない場合は、それ以降の遺体の扱いについては、監察医制度施行地域とそうでない地域に分かれる。

監察医制度施行地域では、監察医による検屍解剖（行政解剖）が行われる。

- ・行政解剖では同意を必要とされない。

監察医制度施行地域以外では、基本的には遺族の同意による篤志病理解剖（死体解剖保存法による）に準拠するが、多くの件で承諾解剖の予算が確保され、犯罪の疑いがなくとも法医学解剖（司法解剖、行政解剖）されることがある。

- ・承諾解剖である：同意が必要

さて、分担研究者の居住する大阪府は大阪府を含むが、監察医制度を持つ大阪府では SIDS の診断のための解剖は行政解剖であり、遺族の同意を必要としない事となる。しかし、組織バンクへの試料提供、将来的な試料の利用については、解剖の際に同意を得ておくのが、倫理的にもまた現在の社会的な背景からも妥当であると考えられる。

また、今後組織バンクの構築に当たっては、こういった同意を必要としない制度の改革も考慮する必要があるのではないかと考える。

組織バンクの役割については、

1. SIDS の試料として研究の目的のみに使用
 2. 将来的な医学研究の進歩に対応し、随時死因を解明し遺族に伝える。
- の2つがあるかと思う。