

脳と発達〔第41巻・第2号〕別刷

2009年3月1日発行

発行所 株式会社 診断と治療社

遺伝性溶血性貧血の遺伝カウンセリング

苛原 香^{1) 2)}, 浦野真理¹⁾, 斎藤加代子¹⁾, 濱田貴子¹⁾, 菅野 仁^{1) 3)}

Genetic counseling of hereditary hemolytic anemia

Kaori Irahara^{1) 2)}, Mari Urano¹⁾, Kayoko Saito¹⁾,
Takako Hamada¹⁾, Hitoshi Kanno^{1) 3)}

Summary

Since we have established genetic counseling system for subjects of hereditary anemia in 2004, twenty-six patients visited our institute. We successfully diagnosed fourteen patients by biochemical and/or genetic tests; six cases of thalassemia, four of hereditary spherocytosis (HS), three of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, and one of sickle cell anemia. HS is the most common hereditary hemolytic anemia among Japanese. Although thalassemia and G6PD deficiency are less common in Japanese, it should be noted that they are increasing in recent years due to international marriages between Japanese male subjects and females from tropical Asia. Subjects with G6PD deficiency are susceptible to hemolysis by numbers of drugs and ingestion of fava beans, thus it is quite beneficial to inform the exogenous factors to G6PD-deficient individuals. Two cases of thalassemia consulted our institute during their pregnancy and we were able to contribute to provide adequate management of both mothers and babies by collaborating with the obstetrics department.

キーワード: hereditary hemolytic anemia: 遺伝性溶血性貧血、genetic counseling: 遺伝カウンセリング

- 1) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター
Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University
2) 日本赤十字社医療センター小児科
Department of Pediatrics, Japanese Red Cross Medical Center
3) 東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科
Department of Transfusion Medicine and Cell Processing,
Tokyo Women's Medical University

平成20年9月11日受付

平成21年2月17日受理

はじめに

溶血性貧血とは赤血球寿命の短縮により生じる貧血の総称であり、我が国の遺伝性と後天性溶血性貧血の頻度はほぼ等しい。遺伝性溶血性貧血の推定有病者数は620～2,200人で、有病率は100万対5.7～20.3人¹⁾と本邦では比較的まれな疾患である。原因は赤血球膜異常、赤血球酵素異常、ヘモグロビン異常に大別され(表1)、全体の約70%が赤血球膜異常症の代表的疾患である遺伝性球状赤血球症(hereditary spherocytosis:HS)である。溶血性貧血の原因の如何に関わらず、その症状は、貧血、黄

疸、脾腫や胆石症などで気づかれることが多い。また慢性溶血性貧血を伴わないで感染や薬剤摂取などを契機に急性溶血発作を来す場合もあり、重症例では腎不全にまで至ることがある。したがって、生活や内服薬に留意することで溶血発作を未然に防ぐことが可能であり、正しい診断と生活指導がQOLを大きく左右する疾患である。

2004年に当センターが開設してから3年間に、26症例の遺伝性溶血性貧血症例に関して遺伝カウンセリングを行った。クライアントの主訴は①溶血性貧血であることは確定しているが病因为未確定、②貧血の家族歴を指摘されていて罹患者あるいは保因者の疑いがある、③既に診断が付いており生活上の注意点や新規治療法の有無などの情報を求めている、の3つに大別された(図1)。①、②のうち当院で確定診断に至った例は14例であった。遺伝子検査を行うにあたっては、文書によるクライアントの承諾を得た。本稿では当院で遺伝カウンセリングを行った(1)遺伝性球状赤血球症、(2)グルコース6リン酸脱水素酵素(glucose-6-phosphate dehydrogenase:G6PD)異常症、(3)サラセミア、(4)鎌状赤血球症、遺伝性溶血性貧血ではないが本邦において頻度の高い体質性黄疸である(5)Gilbert症候群について家系図を交えながら報告する。(検査で確定診断が得られた例は家系図内に横線を用いて示した。)

症例

(1) 遺伝性球状赤血球症 (HS)

HSは人口5万~10万人あたり1例とわが国における遺伝性溶血性貧血の中でもっとも頻度の高い疾患である。全患者の2/3が常染色体優性遺伝(AD)型、1/3が孤発例または常染色体劣性遺伝(AR)型の遺伝形式をとるとされているが²⁾、川崎医科大学で検索した60家系の結果ではAD型遺伝形式が明らかな家系は約1/3の19家系で、残りの41家系はAR型あるいは孤発例とされた³⁾。

われわれが経験したAD型、孤発例の家系図をそれぞれ示す(図2-1,2)。図2-1のクライアントは健診で貧血を指摘され、近医を受診して病歴と赤血球形態からHSを疑われ、紹介となった。フローサイトメトリーを用いた赤血球 eosin 5'-maleimide(EMA)結合能測定⁴⁾によりHSと診断し、同様に発端者の父、弟もHSと診断した。診断は未確定であるが、各世代に貧血、黄疸、胆石などの症状を持つ構成員(灰色)が存在することからも、AD型遺伝形式であることが伺える。

図2-2のクライアントは福山型筋ジストロフィーの患児で貧血および総胆管結石による閉塞性黄疸を併発した症例である。血液所見から溶血性貧血を疑い、赤血球EMA結合能低下を認めたためHSと診断した。本家系に

はクライアント以外に貧血等の症状を呈する構成員はおらず、ARまたは孤発例であることが伺える。学齢期に達し、ヘモグロビン8g/dl以下の重症例であることから摘脾の適応があると考え、内視鏡的摘脾術を施行した。術後黄疸は消失し、ヘモグロビン値は14g/dl以上にまで改善を認めた。

(2) グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)異常症
ヒポクラテスの時代から地中海沿岸にはfava bean(ソラマメの一種)を摂取することで急性溶血発作を起こす疾患がfavismとして知られていた。マラリア治療薬のプリマキンを服用することにより、溶血を起こす例はプリマキン過敏症と呼ばれていた。その後の研究成果から、favismおよびプリマキン過敏症を起こす患者赤血球中の還元型グルタチオン(reduced glutathione)の低下、および五炭糖リン酸回路の最初の段階を触媒するG6PD活性の低下が示された⁵⁾。全世界では約4億人が異常遺伝子をもつとされ、マラリアへの耐性があることから特に地中海沿岸、東南アジア地域を中心に保因者が集中している。本邦におけるG6PD異常症の頻度は0.1%と低いため、臨床上問題になる例は稀である。G6PD遺伝子座はXq28でX連鎖劣性遺伝形式をとる。

G6PD異常症の3家系の家系図を示す(図3-1,2,3)。図3-1のクライアントはシンガポールで出生しており、現地でのG6PD異常症のスクリーニングが陽性であったため、確定診断を目的に当院を受診した。クライアントの曾祖母がタイ人であった。図3-2のクライアントはソラマメ摂取後に急性溶血発作をきたし、近医より本疾患を疑われて当院を紹介受診した。母親がフィリピン人であった。図3-3のクライアントは感冒罹患後に急性溶血発作をきたし、近医より精査目的に当院を紹介受診した。クライアントの家系構成員は日本人のみであった。本例は女兒であり、両親のG6PD活性は基準値内であった。配偶子形成段階でG6PD遺伝子に変異を生じた可能性が考えられたが、ヘテロ接合体として発症したのか、対立遺伝子の両方に発現低下を来す異常があるのかは不明である。

(3) サラセミア

ヘモグロビンは α ヘモグロビン2分子、 β ヘモグロビン2分子の4量体で構成されるタンパクで、サラセミアでは α または β グロビン遺伝子産物が減少して発症する。ヘモグロビン4量体の生成が低下して血球内のヘモグロビン量が減少することに加えて、 β サラセミアでは余剰の α グロビン鎖が変性して赤血球膜に酸化的障害を与え、溶血性貧血を起こす。日本人では α サラセミアが人口5,000人に1人、 β サラセミアが1,000人に1人程度の頻度で存在する⁶⁾。

東南アジア(South East Asia; SEA)型 α サラセミア

は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ グロビンの両遺伝子を含む領域が欠失する $\alpha 0$ サラセミアの一型である。SEA 型 α サラセミアは本邦における $\alpha 0$ サラセミアの中で最も高頻度に認められる。対立遺伝子が正常の場合 (-/ $\alpha \alpha$)、平均赤血球容積 (MCV) が 60 fL 台でごく軽度の貧血を認め、 α サラセミア保因者として発見される。一方、対立遺伝子にもう一つの α グロビン遺伝子変異がある場合 (-/ α) はヘモグロビン H 病となり、中等度の貧血を呈する。本邦の α サラセミアでは SEA 型が 49% を、また在日外国人では、 α サラセミアの 94% を SEA 型が占めている⁷⁾。

α サラセミアの家系を図 4-1, 2 に示す。図 4-1 のクライアントは鉄欠乏を伴わない小球性貧血の精査を目的に当院を紹介受診した。図 4-2 のクライアントはタイ人で、すでに自国でサラセミアの診断がついていたが、妊娠管理を目的に当院外来を受診した。症例 4-1, 2 の α サラセミア 3 例で遺伝子検査を行ったところ、3 例とも SEA 型 α サラセミア保因者であった。

β サラセミアの遺伝子変異は広範囲に欠失する α サラセミアと異なり、大部分が点変異である。日本人の β サラセミア変異は 35 種類以上にのぼっているが、そのうち 10 種類が患者の 80% を占める。 β サラセミアの家系を図 5-1 ~ 3 に示す。図 5-1 のクライアントは父親がすでに β サラセミアと診断されており、自身にも小球性貧血を認めるため、確定診断を希望して受診した。遺伝子検査で β IVS II - 1 の G \rightarrow A の変異が認められ、このスプライスアクセプター部位が消失することによって発症した β サラセミアと診断した。この変異は日本人の β サラセミアの 11.1% にみられる⁶⁾。

図 5-2 のクライアントは 1 ヶ月健診で黄疸と貧血を指摘された。母親が潰瘍性大腸炎でサラゾピリンを妊娠中・出産後も内服したため、授乳を中止したところ溶血所見が改善した。赤血球酵素異常症またはヘモグロビン異常症を疑われ、当外来を紹介受診した。本例の β グロビン遺伝子は正常であったが、ハプロタイプ解析により片方のアレルに β グロビン遺伝子上流の広範囲な欠失が認められた。この領域には β グロビン遺伝子の発現制御領域を含むため、この欠失が β サラセミアの病因と考えられた。サルファ剤は母乳移行性があり、母乳を介して児へサルファ剤が移行したことで薬剤誘発性溶血性貧血を惹起したと考えられた。図 5-3 のクライアントは他院で既に β サラセミアと診断されており、当外来へは妊娠管理目的に受診した。

(4) 鎌状赤血球症

ヘモグロビン S は異常ヘモグロビンとしては最初に発見され、世界的には最も高頻度に遭遇する。ヘモグロビン S は低酸素状態でデオキシヘモグロビン S が赤血球内でポリマーを形成し、赤血球が鎌状に変形する。この鎌

状赤血球は固く、変形能が低下しているため毛細血管を閉塞させて血栓症を誘発する。ヘモグロビン S は β グロビン鎖の N 末端から 6 番目のグルタミン酸からバリンへ単一アミノ酸置換している。主症状は前述の血栓形成と溶血性貧血で、これらは低酸素、アシドーシスなどによって惹起される。血栓形成による脾機能の低下や臓器の梗塞は感染症の罹患頻度を増やし、血栓による血管閉塞から虚血を生じ疼痛発作 (鎌状赤血球発作 sickle cell crisis) をおこす。ホモ接合体はアメリカ黒人の 400 人に 1 人存在し、重篤な症状を示すが、ヘテロ接合体は臨床的に無症状であることから AR 型遺伝形式をとる。

家系図を図 6 に示す。本例はナイジェリア人の一家で、クライアントと両親が鎌状赤血球症であることが自国で診断されていた。来日後頻回に疼痛発作を生じること、クライアントの次兄が同疾患により 25 歳時に死亡していることから、管理と病型決定のため当院を受診した。遺伝子検査により、ホモ接合型鎌状赤血球症と診断された。

(5) Gilbert 症候群

Gilbert 症候群は肝臓におけるビリルビンの抱合反応に関与する酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT) の異常によって発症する体質性黄疸の一型である。高間接ビリルビン血症を呈するため、しばしば軽症の溶血性貧血との鑑別が問題となる疾患である。HS や G 6 PD 異常症に合併することにより、新生児黄疸が重症化⁸⁾したり、胆石症の発症リスクが高まったり⁹⁾することが知られている。また ABO 血液型不適合による新生児黄疸の発症は本症候群の合併例で有意に高頻度に観察される⁹⁾。病因遺伝子は bilirubin-UGT と称される UGT 1 A 1 であり、その遺伝子座は 2 q37 に位置する。常染色体優性と劣性の遺伝形式をとるものの両方がみられ、日本人では AR 型遺伝形式をとる 71 番目のグリシンからアルギニンへの変異 (G71R) が多く認められる¹⁰⁾。他にプロモーターの TATA box の TA 繰り返し配列の反復数が 6 回から 7 回に増加したアレルは転写レベルが低下することも明らかになっている¹¹⁾。

家系図を図 7 に示す。クライアントは日齢 3 に高ビリルビン血症を呈し、交換輸血を要した。血液型不適合、溶血性貧血がなく、精査にて赤血球膜浸透圧抵抗は正常、赤血球酵素活性は基準値内、サラセミア・異常ヘモグロビン症も否定されたことから体質性黄疸を疑われた。UGT 1 A 1 遺伝子検査により G71R 変異のホモ接合体であることが判明し、Gilbert 症候群と診断が確定した。

まとめ

これまでに述べた疾患は、生活指導と医療的管理を適切に行うことで貧血の進行や急性溶血発作を回避でき、患者の QOL を改善することができる。

(1) HS

感冒が急性溶血発作の契機となることがあり、感冒罹患時には早めに医療機関を受診するなどの対応が必要である。溶血による代償性赤血球造血亢進に対して葉酸の内服を行う。Hb 8 g/dl 以下の症例では貧血管理とともに脾摘の適応についても考慮するが、摘脾後の重症細菌感染症を予防するために、肺炎球菌ワクチンの予防投与が必要となる。

(2) G 6 PD 異常症

感染、薬剤、ソラマメやその加工品の摂取で急性溶血発作を起こすものがあり(表2)、食物制限とともに薬剤処方時に注意が必要である。

(3) サラセミア

図5-2の例の様に酸化性薬剤による溶血発作を来す例があるため、表2の禁忌薬剤に関する情報を提供することが必要である。無効造血により鉄過剰症を併発する可能性があり、安易に鉄剤を投与することを避ける。軽症例では治療を要さないが溶血亢進例には葉酸の内服を行う。

妊娠管理目的に受診した2例のサラセミア罹患患者については定期的に受診と採血を行い、産婦人科と連携して葉酸内服などのアドバイスを行った。生まれた児に関してもサラセミアによる新生児黄疸重症化の可能性を念頭に置いた新生児管理を行なった。1例では早期にサラセミア保因者と診断し、適切な管理をすることが可能であった。

(4) 鎌状赤血球症

感染などが疼痛発作の契機となるため、体調管理に留意する必要がある。疼痛発作の際は早期治療を行う。Hbを一定以上に保つため、鉄・葉酸の内服と3ヵ月ごとの外来受診を指導している。重症例では摘脾・骨髄移植の適応の判断が必要である。

(5) Gilbert 症候群

Gilbert 症候群は日本人の5~6%にみられ、通常は軽微な黄疸程度であることから体質としての理解が適切である。しかし UGT 1 A 1 の活性は野生型の約30%に低下しており、新生児高ビリルビン血症、母乳性黄疸、抗腫瘍薬の代謝低下を起こすことがわかっている。例えば抗腫瘍薬のイリノテカン[®]は肝臓で UGT 1 A 1 により無毒化されるため、Gilbert 症候群の患者では骨髄抑制と重度の下痢の発現頻度が高く、投与の際は十分な留意が必要である。本症例はクライアントが小児であり、将来の発癌についての可能性が不確定なこと、小児がんでイリノテカン[®]を投与する機会は稀であることから、両親に対して特に抗がん剤使用に関する注意はしなかった。

いずれの疾患も日本人では比較的稀であるが、近年熱帯・亜熱帯地域からの入国者が増えていることから、溶

血性貧血の鑑別診断に考慮する必要がある。その際は詳細な家族歴、出身地の聴取が診断に有用である。また生活指導、医療的管理による予防が有効な疾患であるため、遺伝カウンセリング態勢が整った環境における生化学的検査/遺伝子検査による確定診断を行うことが重要であると考えられる。

謝辞

赤血球酵素異常症、不安定ヘモグロビン症および遺伝性球状赤血球症のスクリーニング検査は東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 藤井寿一先生、サラセミア遺伝子検査に関しては川崎医療福祉大学 原野恵子先生および山口大学医学部保健学科 服部幸夫先生、Gilbert 症候群遺伝子検査に関しては滋賀医科大学 丸尾良浩先生に実施して頂きました。紙面をお借りして深謝申し上げます。

文献

- 1) 藤井寿一: 溶血性貧血、三輪血液病学、第3版、pp.1038-1044、文光堂、東京、2006。
- 2) Eber SW, Armbrust R, Schrter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J Pediatr*.117:409-16,1990.
- 3) 八幡義人: 赤血球膜異常症、三輪血液病学第3版、pp.1044-1134、文光堂、東京、2006。
- 4) 菅野 仁: 遺伝性球状赤血球症、血液疾患ハンドブック上巻、pp.65-72、医薬ジャーナル社、大阪、2005。
- 5) Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8th ed., pp.4517-4553, McGraw-Hill, New York, 2001.
- 6) 服部幸夫: 異常ヘモグロビンとサラセミア、赤血球、藤井寿一・高桑雄一編、pp.179-194、文光堂、東京、1998。
- 7) 山城安啓: ヘモグロビン異常症の検査、*Medical Technology*, 32:565-572, 2004。
- 8) del Giudice EM, Perrotta S, Nobili B, et al.: Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. *Blood*, 94:2259-62, 1999.
- 9) Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, et al.: Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12128-32, 1997.
- 10) Kaplan M, Hammerman C, Renbaum P, et al.: Gilbert's syndrome and hyperbilirubinaemia in ABO-incompatible neonates. *Lancet*, 356:652-3, 2000.
- 11) Koivai O, Nishizawa M, Hasada K, et al.: Gilbert's

syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. Hum Mol Genet, 4 :1183-6,1995.

basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med,333:1171-5,1995.

12) Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al: The genetic

表1 遺伝性溶血性貧血を呈する主な疾患

赤血球膜の異常	遺伝性球状赤血球症 遺伝性楕円赤血球症
赤血球酵素異常	グルコース6リン酸脱水素酵素異常症 ビルビン酸キナーゼ異常症
ヘモグロビンの異常	サラセミア 鎌状赤血球症 不安定ヘモグロビン症

表2 遺伝性溶血性貧血症例で急性溶血発作を引き起こす可能性のある薬剤

	確実な薬剤	可能性のある薬剤	疑わしい薬剤
サルファ剤	スルファピリジン	スルファメトキシピリダジン	スルホキソンナトリウム スルフィソキサゾール
スルホン剤	ジアミノフェニルスルホン		
解熱剤	アセトアニリド		アミノピリン アセトアミノフェン フェナセチン アスピリン
その他	プリマキン ナリジクス酸 ニリダゾール ナフタレン	カルバマゼピン クロロキン クロラムフェニコール ビタミンK	PAS Lドーパ ジメルカプロール アドリアマイシン プロベネシド

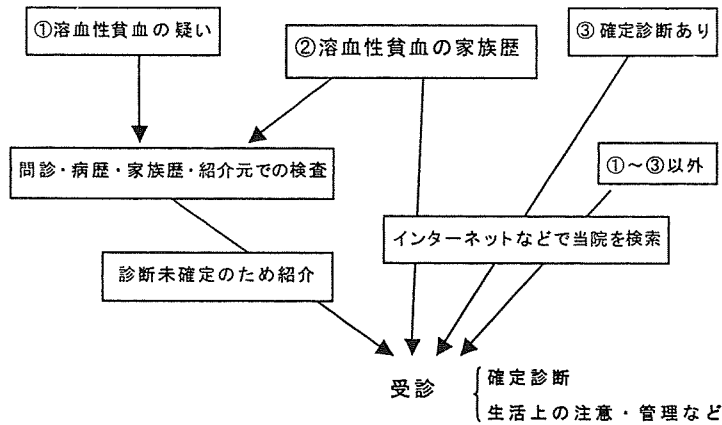


図1 当院遺伝カウンセリング外来を受診するまでの経緯

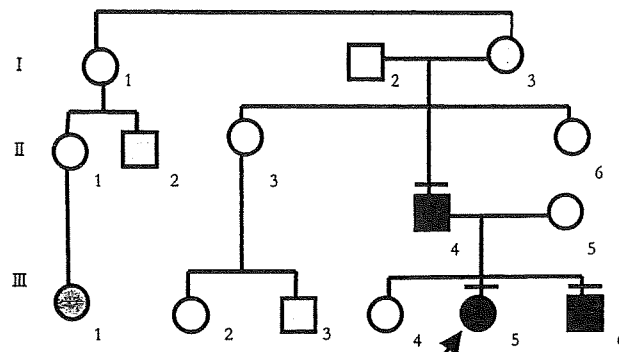


図2-1 遺伝性球状赤血球症の1家系 (AD型)

I-3貧血 II-2胆石 II-3貧血 III-1胆石 III-3脾摘
III-5貧血精査のため近医より紹介受診した

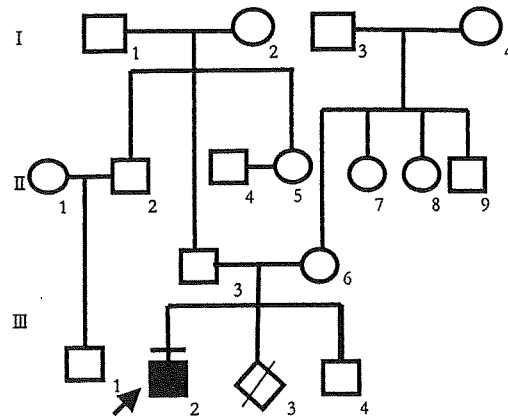


図 2 - 2 遺伝性球状赤血球症の一家系 (孤発例または AR 型)
 III - 2 福山型筋ジストロフィーの経過中に、総胆管結石による閉塞性黄疸を併発した

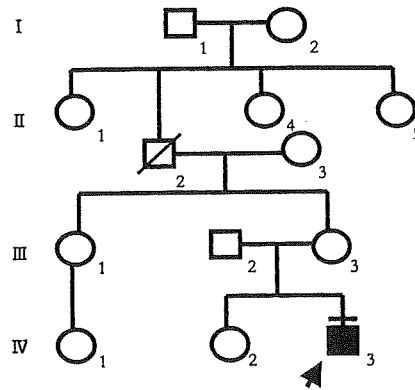


図 3 - 1 G 6 PD 異常症の一家系
 I - 2 タイ人 IV-3 G 6 PD 異常の新生児スクリーニング陽性のため精査目的に受診した

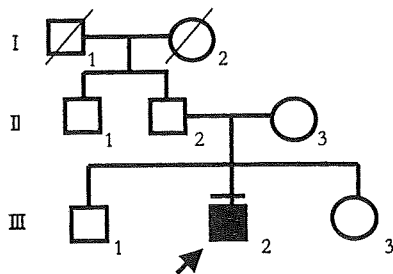


図 3 - 2 G 6 PD 異常症の一家系 II-3 フィリピン人
 III - 2 ソラマメ摂取により急性溶血発作を呈した

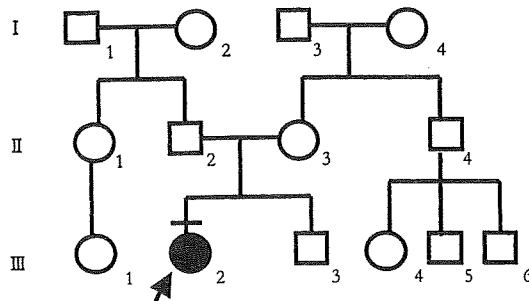


図 3 - 3 G 6 PD 異常症女児例
 III - 2 急性上気道炎を契機に急性溶血発作を呈した

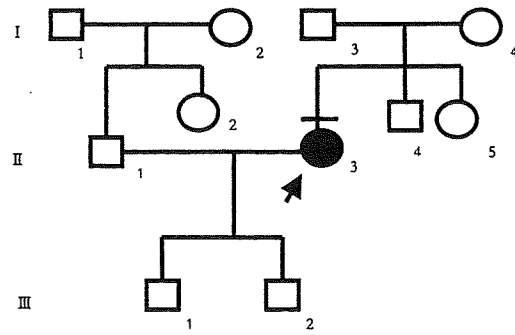


図 4-1 α サラセミアの一家系 II-3 小球性貧血精査にて受診した

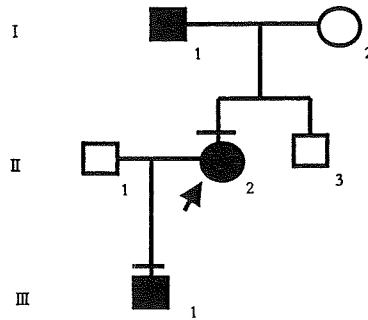


図 4-2 α サラセミアの一家系

I-1、II-2 はタイ人でサラセミアに罹患、II-2 病型決定および妊娠管理目的に受診した
III-1 新生児貧血精査にて受診した

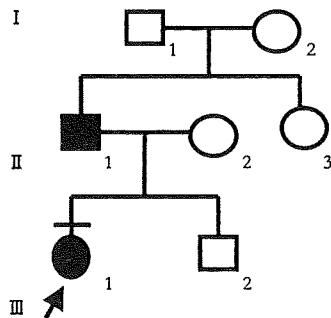


図 5-1 β サラセミアの一家系 III-1 小球性貧血精査目的に受診した

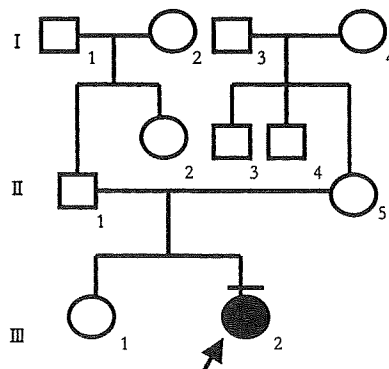


図 5-2 β サラセミアの一家系 II-5 潰瘍性大腸炎 (サルファ剤内服)
III-2 母乳栄養で溶血性貧血を呈した

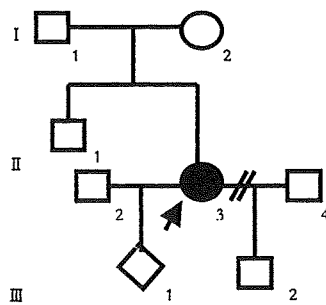


図5-3 β サラセミアの一家系 II-3 妊娠管理目的に受診した

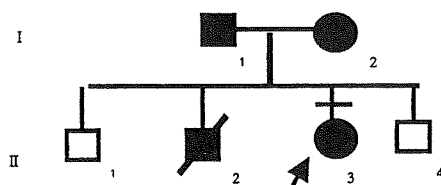


図6 鎌状赤血球症の一家系 I-1,2およびII 1~4ナイジェリア人
II-3 病型決定および管理目的に受診した

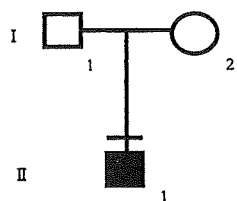


図7 Gilbert 症候群の一家系 II-1 重症新生児黄疸の精査目的で受診した

ゲノム研究と社会との係わり

遺伝子変異と遺伝カウンセリング

松尾真理^{1,2} 浦野真理¹ 斎藤加代子¹

Gene mutation and genetic counseling

^{1,2}Mari Matsuo, ¹Mari Urano, ¹Kayoko Saito¹Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University²Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University

Abstract

With the advance of technology of genetic research, a lot of genetic testing has been available as a clinical service. The genetic testing has sometimes been applied to not only diagnosis of a patient, but also pre-symptomatic diagnosis, prenatal diagnosis, carrier diagnosis, and susceptibility diagnosis. Genetic knowledge and psychological support are necessary for the subject for adequate voluntary decision making. Thus genetic counseling by a clinical geneticist or a genetic counselor is very important and must be offered on every genetic testing according to the Guidelines for genetic testing proposed by Genetic-Medicine-Related Societies.

Key words: gene mutation, genetic testing, genetic counseling

はじめに

遺伝医学分野における最近の研究進歩は目ましく、2004年にヒトゲノム30億塩基対の解読が終了した。ヒトゲノムに含まれる遺伝子推定数は約2万個とされ、既に約2,500の疾患について原因遺伝子が特定されている。これまで遺伝性疾患の診断は、病歴、臨床症状、生化学検査などから成されていた。しかし遺伝子解析研究の進歩により、遺伝子診断が可能である疾患が急増しており、かつその臨床的有用性が認められている。この結果、疾患の診断確定、継続的な医療管理、適切な遺伝カウンセリングを実施するうえで、遺伝子診断は非常に重要な位置を占めている。また遺伝子診断の際のクライ

エントの自発的な意思決定を支援するためには、すべての遺伝子診断において遺伝カウンセリングが提供されるべきであり、これは遺伝医学関連10学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン」¹⁾に記載されているとおりである。

本稿では当センターにおける経験を交えて、遺伝子変異の診断と遺伝カウンセリングについて紹介する。

1. 単一遺伝子病と多因子遺伝病

a. 単一遺伝子病

1つの遺伝子の変異が原因で惹起される疾患を単一遺伝子病という。染色体上の遺伝子の変異により発症する場合(Mendel遺伝病)と、ミトコンドリア遺伝子の変異より発症する病態が

¹東京女子医科大学附属遺伝子医療センター ²東京女子医科大学 小児科

含まれる。Mendel 遺伝病の場合、常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、X連鎖性の遺伝形式をとる。単一遺伝病における遺伝学的検査としては、確定診断、発症前診断、保因者診断、出生前診断などがある。家系内にある疾患を有する発端者がいる場合がほとんどであり、その診断確定や、自身の次の子どもにも同様の疾患が出るのか、発端者の子どもにも同じく体質が伝わるのか、他の親族への影響はどうか、など具体的な検査動機があることが多い。確定診断につながる遺伝子検査であれば有効な治療法が確立されていなくても、自然歴情報を入手することで医療管理方針決定が可能となり、その他の無駄な検査を回避できるなどメリットがあるため、被検者が未成年であっても検査の適応となる場合がほとんどである。一方で、発症前診断、保因者診断の場合には、症状がない個人が検査の対象となるため、被検者の‘知る権利’と‘知らない権利’を守るためには、発症時に有効な治療法が確立されている疾患の場合を除いて未成年者の検査は回避されるべきである。更に成人であっても、本人の自発的意思に基づいているか、時期や状況が妥当か、フォローアップ体制が整っているかなど、万全の体制で臨む必要がある。着床前診断を含む出生前診断の場合には、検査を希望し同意する親と被検者である胎児の立場が異なるため、検査の実施にあたっては疾患ごとの議論と症例ごとの慎重な対応が必要不可欠となる。

b. 多因子遺伝病

複数の遺伝子の変異と環境要因が相互に影響して惹起される疾患を多因子遺伝病という。多因子遺伝病は質的形質(先天奇形や糖尿病など)と量的形質(高血圧、高脂血症、肥満など)に分けられる。多因子遺伝病に関する遺伝学的検査としては、易罹病性検査、素因検査がある。臨床現場での運用に際しては、その分析のおよび臨床的妥当性と、臨床的有用性が明確であることが必要不可欠となる。適切な運用により個別化健康増進が可能となる一方で、適切な遺伝カウンセリングが提供されずに検査のみが先行してしまう場合や、妥当性・有用性が不明瞭な場

合など問題点が少なくない。

2. 遺伝子検査

一般的な遺伝子検査について、検出可能な遺伝子変異ごとに簡単に触れる。

a. 一塩基から数百塩基の変異

一塩基から数百塩基の変異(置換、欠失、挿入)を検出するためには、従来の遺伝子検査としては polymerase chain reaction (PCR) シーケンシング法が一般的である。これは、遺伝子のエキソン部分やエキソンイントロン境界を PCR 法で増幅し、その塩基配列を解読する方法である。検体数や解析エキソン数が多い場合には、denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) 法でまずスクリーニングし、変異が予測されるものについてシーケンシングを実施するとコスト、検査時間、マンパワーを削減できる。

b. 数 kb から数 Mb の微細なコピー数変化

1 kb を超える欠失または重複など DNA コピー数の変化は、上記のシーケンシング法では検出困難となる。この場合には、サザンブロット法、FISH 法、CGH 法が適応となる。また、最近 multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法が開発され、特に Duchenne 型筋ジストロフィの診断(図 1)や染色体サブテロメア領域の欠失解析など、広く用いられるようになった。

c. 数 Mb 以上の比較的大きなコピー数変化

数 Mb を超える欠失または重複など DNA コピー数の変化については、これまでどおり G 分染法など染色体分析が適応となる。臨床症状から欠失または重複の部位が予測される場合には、FISH 法が実施される。

3. 遺伝カウンセリング

‘遺伝カウンセリング’について、UNESCO の‘ヒト遺伝情報に関する世界宣言(2003)’²⁾第 11 条項では‘健康にかかわる重要な意味をもつ可能性がある遺伝学的検査を行おうとする場合、当事者が遺伝カウンセリングを適切な方法で受けられるようにするべきである。遺伝カウンセ

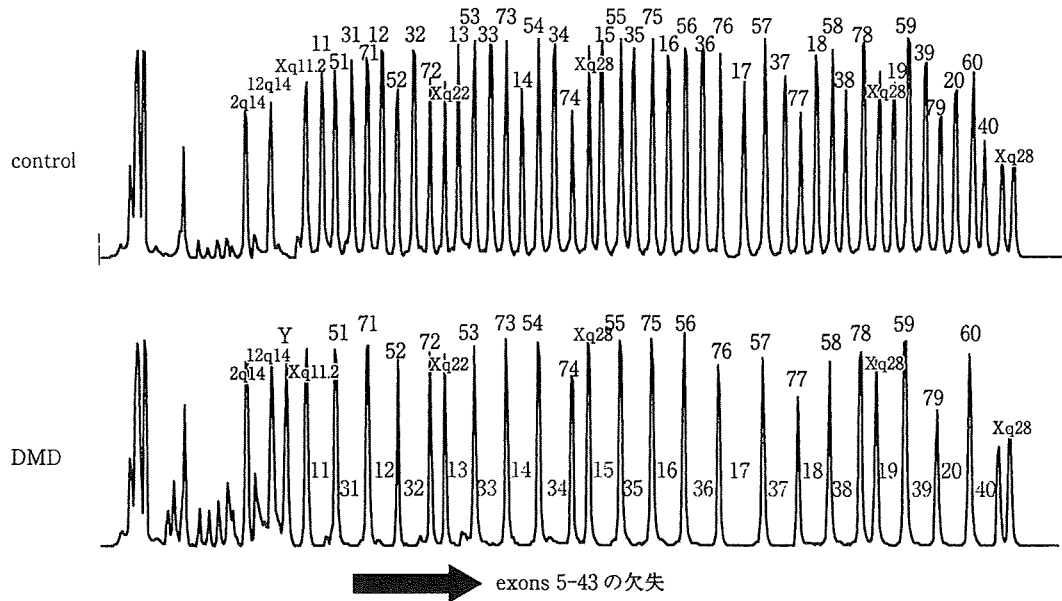


図1 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法による
Duchenne型筋ジストロフィ(DMD)の遺伝子診断

リングは、非指示的であり、文化的に適合したものであり、かつ当事者の最大の利益と一致したものであるべきである'と述べている。遺伝カウンセリングでは、自身または家族の遺伝に関する問題を抱えるクライアントに対して、①臨床診断とリスク評価、情報収集を行い、②意思決定の際に必要な情報提供を行い、③自発的なその人本来の意思決定ができるよう支援していくことが必要である。

図2に当センターにおける遺伝カウンセリングの流れを示す。遺伝カウンセリングには、臨床遺伝専門医と臨床心理士が毎回同席している。臨床遺伝専門医が主に、問診、診察、医学的情報の説明など遺伝カウンセリングの進行を担当し、臨床心理士はクライアントの心理状態の評価、社会背景の把握、メールや電話を介した綿密な関係性構築を担当する。当センター開設後に経験した遺伝カウンセリングの対象疾患を図3に示した。また、その相談内容は確定診断が44.2%、出生前診断が26.6%、発症前診断が10.3%、保因者診断が7.6%、易罹病性診断が0.7%、その他10.6%であった。遺伝カウンセ

リングの過程で更に遺伝学的検査に至った症例数は733例であった(図4)。該当疾患は非常に多岐にわたり、相談内容に関してもクライアントごとに状況が全く異なる。これらの遺伝カウンセリングに適切かつ柔軟に対応するためには、普段から最新の遺伝情報にアクセスし、臨床心理職、遺伝看護師、ソーシャルワーカーなどと協力して、チーム医療として実施することが望ましい。

おわりに

平成20年度の診療報酬の改定に伴い、指定の13疾患について遺伝子検査と、それに伴う遺伝カウンセリング加算(1回のみ)が保険収載された(表1)。しかしこれらのごく一部の疾患を除いた遺伝性疾患の遺伝子検査は、保険医療の対象外であり、検査会社による商業的検査提供もなされていない。このため現時点で遺伝性疾患の遺伝学的検査の多くは、一部の研究機関のボランティアで支えられている状況である。しかし、先端医療としての遺伝子解析研究が終了した後に、これらの施設にボランティア検査

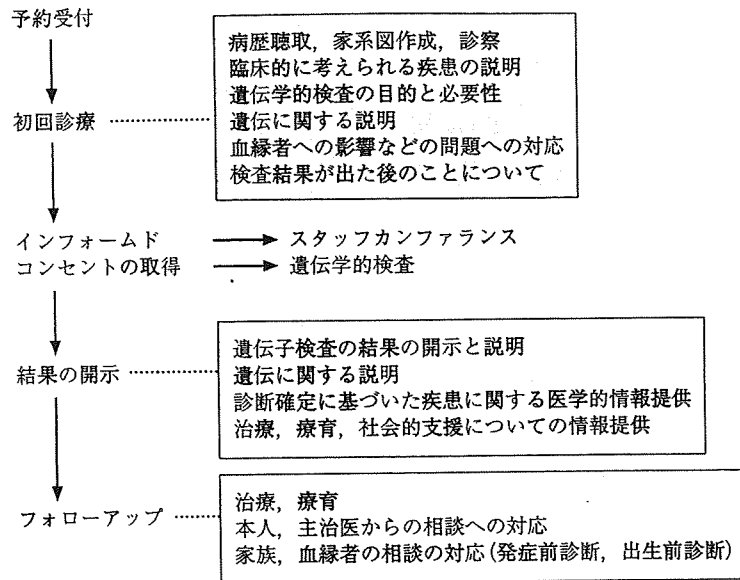


図2 東京女子医科大学附属遺伝子医療センターにおける
遺伝カウンセリングの流れ

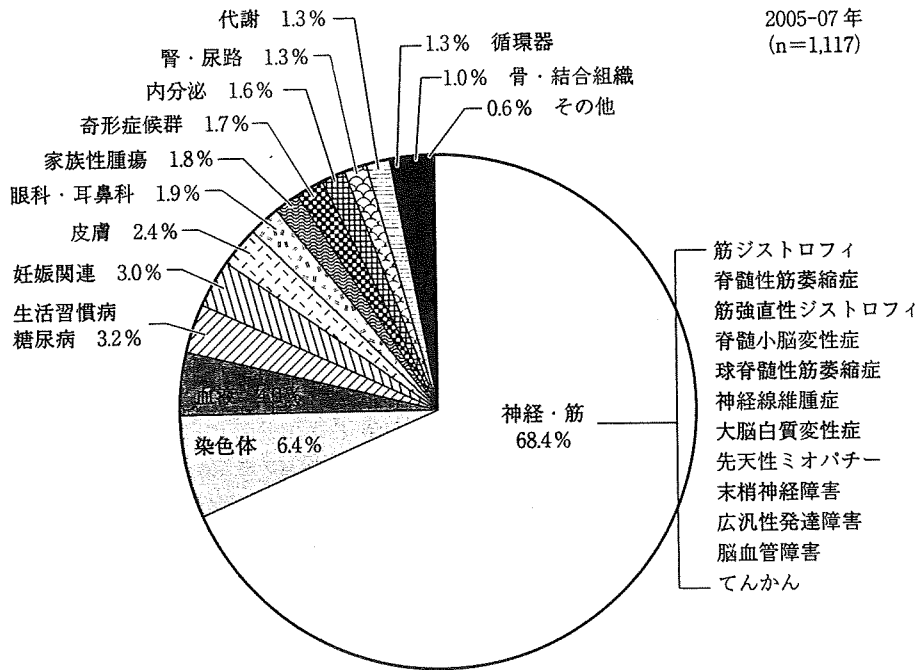
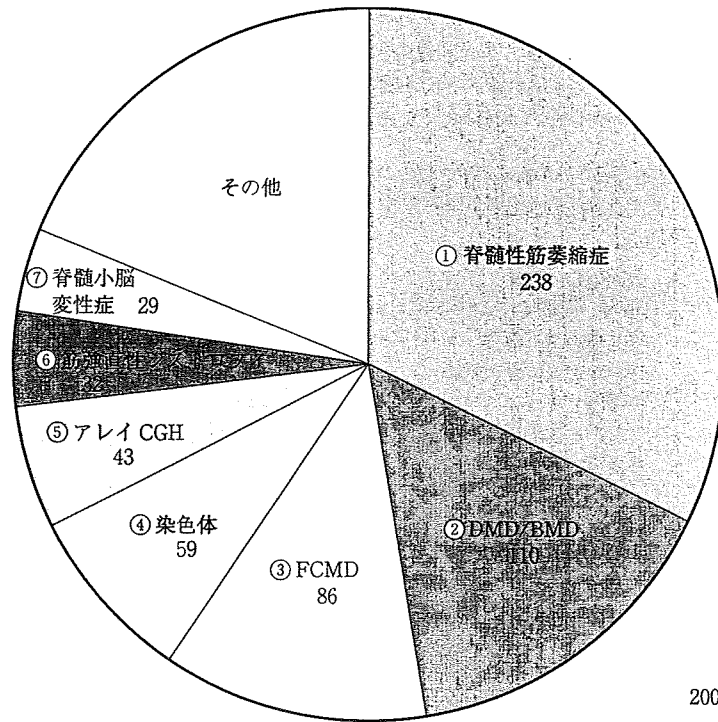


図3 東京女子医科大学附属遺伝子医療センターにおける
遺伝カウンセリングの対象疾患のまとめ



2004.5.1-2008.4.30
(n=733)

- ① 脊髄性筋萎縮症
 - ② DMD/BMD
 - ③ FCMD
 - ④ 染色体
 - ⑤ アレイ CGH
 - ⑥ 筋強直性ジストロフィ
 - ⑦ 脊髄小脳変性症
- 'その他'の対象疾患

遺伝性痲痺性対麻痺	β -ウレイドプロテインナーゼ欠損症	DRPLA
球脊髄性筋萎縮症	Krabbe 病	ペルオキシソーム病
Charcot-Marie-Tooth 病	AXPC 遺伝子	HNPCC
副腎白質ジストロフィ	Huntington 病	Werner 症候群
Mowat-Wilson 症候群	SMA+横隔膜麻痺	Alexander 病
Prader-Willi 症候群	MEN-2	Hallerborden-Spatz 病
MEN-1	Gorlin 症候群	心筋緻密化障害
ミトコンドリア異常症	FTDP-17	プロピオン酸血症
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィ	Osler 病	West 症候群
周期性四肢麻痺	Noonan 症候群	Leber 病
白皮症	遠位型筋ジストロフィ	Parkinson 病
QT 延長症候群	肢帯型筋ジストロフィ	アミロイドーシス
ジストニア	眼咽頭遠位型ミオパチー	致死性骨異形成症
Emery-Dreifuss 症候群	Thomsen 病	Niemann-Pick 症候群
Lesch-Nyhan 症候群	Channel 病	CADASIL
家族性大腸ポリポーシス	Machad-Joseph 病	Rett 症候群
		Alport 症候群

図 4 東京女子医科大学附属遺伝子医療センターにおける遺伝学的検査実施数

表 1 平成 20 年度診療報酬改定内容

・ 遺伝病的検査の普及に適切に対応するため、遺伝病的検査を行う場合に、臨床遺伝学の専門的知識を持つ医師が、本人または家族に対して心理社会的支援を行った場合の評価(加算)を創設する。	500 点
・ 遺伝病的検査は以下の遺伝子疾患が疑われる場合に行うものとし患者 1 人につき 1 回算定できる。	2000 点
Duchenne 型筋ジストロフィ	中枢神経白質形成異常症
Becker 型筋ジストロフィ	ムコ多糖症 I 型
福山型先天性筋ジストロフィ	ムコ多糖症 II 型
栄養障害型表皮水疱症	Gaucher 病
家族性アミロイドーシス	Fabry 病
先天性 QT 延長症候群	Pompe 病
脊髄性筋萎縮症	

を継続して強いることは現実的に困難である。また遺伝学的検査の際の遺伝カウンセリングが検査結果開示時のただ 1 回の面談で終了することは現実的に皆無であり、これも現状にそぐわ

ない。我が国における遺伝性疾患の診断検査および遺伝カウンセリングの基盤整備と更なる発展のために、現状改革が急務であり望まれる。

■ 文 献

- 1) 遺伝医学関連 10 学会：遺伝学的検査に関するガイドライン, 2003 <http://www.congre.co.jp/gene/guideline.html>
- 2) UNESCO: ヒト遺伝情報に関する世界宣言, 2003 <http://www.unesco.org/ibc/>

日本臨牀 第67巻・第6号（平成21年6月号）別刷

特集：ゲノム研究最前線

遺伝子変異と遺伝カウンセリング

松尾真理 浦野真理 斎藤加代子

ORIGINAL ARTICLE

Nevoid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel *PTCH* gene mutations

Ryo Sasaki^{1,2}, Kayoko Saito³, Yorikatsu Watanabe¹, Yoshinaga Takayama⁴, Katsunori Fujii⁵, Kaori Agawa¹, Toshiyuki Miyashita⁴, Tomohiro Ando² and Tanetaka Akizuki¹

Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) is a rare autosomal dominant disorder characterized by developmental abnormalities and a predisposition to cancers. Two unrelated patients, 21- and 16-year-old males, with cleft lip and palate and multiple jaw cysts, were diagnosed according to clinical criteria. To confirm a diagnosis of NBCCS, we undertook a molecular genetic analysis of the *PTCH* gene. Their *PTCH* genes were analyzed by direct sequencing of the PCR product from their DNA, and previously unreported mutations were identified. A heterozygous duplication at the nucleotide position between 3325 and 3328 of the *PTCH* gene (c.3325_3328dupGGCG) was detected in the 21-year-old patient. It caused a frameshift mutation, resulting in a premature termination of the PTCH protein. A point mutation (G to C) in intron 7 of the *PTCH* gene (c.1067+1G>C) was detected in the 16-year-old patient. This caused an aberrant splicing of *PTCH*. It is interesting to note that the non-canonical cryptic splice-donor site was activated, which did not conform to the GT–AG rule.

Journal of Human Genetics (2009) 54, 398–402; doi:10.1038/jhg.2009.51; published online 12 June 2009

Keywords: BCC; CLP; Gorlin syndrome; KCOT; NBCCS

INTRODUCTION

The nevoid basal-cell carcinoma syndrome (NBCCS) or the Gorlin syndrome is an autosomal dominant disorder first described by Gorlin and Goltz in 1960,¹ and characterized by developmental abnormalities and tumorigenesis such as basal cell carcinoma and medulloblastoma. Pathognomonic signs including nevoid basal-cell carcinoma (BCC), multiple jaw cysts, palmar and plantar pits and calcification of the falx cerebri lead to the diagnosis of NBCCS. Its prevalence is estimated to be 1/56 000 in the United Kingdom to 1/164 000 in Australia.^{2,3} However, it remains unreported from other countries including Japan. Complications have been described for NBCCS, including congenital skeletal anomalies such as bifid ribs, medulloblastoma, cleft lip and palate (CLP).^{2,3} The human homolog of *Drosophila patched* (*PTCH*), mapped to the NBCCS locus on chromosome 9q22.3, has been found to be mutated in patients with NBCCS in 1996.^{4,5} It is reported that 75% of Japanese NBCCS patients had a *PTCH* mutation.⁶ Although some authors reported NBCCS associated with CLP,^{7–10} mutational analysis was poorly performed in NBCCS associated with CLP.¹¹ CLP is a major congenital anomaly, with a birth prevalence from 0.3/1000 in African American to 3.6/1000 in Amerindian, depending on genetic, geographic, ethnic and

socioeconomic factors.¹² The incidence of CLP in Japanese newborns is approximately 2.1 in 1000.¹² It is reported that the incidence of CLP in NBCCS is 4–9.1%.^{2,3,9,13} There is an excess of males with CLP, the proportion ranging from 60 to 80 percent.¹⁴ The male–female ratio of clefting in this syndrome is statistically not different from the ratio in the normal population.¹⁰ To confirm a diagnosis of NBCCS, we undertook a molecular genetic analysis of the *PTCH* gene in two unrelated NBCCS patients with CLP.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Two unrelated patients with CLP showed multiple jaw cysts in a panoramic X-ray during a series of cleft lip and palate treatments, and were clinically diagnosed as having NBCCS by the clinical criteria of Kimonis *et al.*¹⁵ (Table 1). Patient 1, a 21-year-old male, showed palmar and plantar pits, calcification of the falx cerebri, bridging of sella, bifid ribs, scoliosis and Sprengel shoulder (Figure 1). Patient 2, a 16-year-old male, showed calcification of the falx cerebri and bridging of sella. Neither patient showed BCC and a family history of NBCCS. Both the patients underwent a multiple jaw cysts removal operation. Pathological finding indicated a keratocystic odontogenic tumor (KCOT) (Figure 2).

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Tokyo Metropolitan Police Hospital, Nakano-ku, Tokyo, Japan; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan; ³Institute of Medical Genetics, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan; ⁴Department of Molecular Genetics, Kitasato University, School of Medicine, Sagami-hara-shi, Kanagawa, Japan and ⁵Department of Pediatrics, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chuo-ku, Chiba-shi, Japan
 Correspondence: Dr R Sasaki, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Tokyo Metropolitan Police Hospital, 4-22-1 Nakano, Nakano-ku, Tokyo 164-0001, Japan.
 E-mail: sasaki@oms.twmu.ac.jp

Received 18 January 2009; revised 12 April 2009; accepted 8 May 2009; published online 12 June 2009

Table 1 Clinical characteristics of the two patients according to the diagnostic criteria by Kimonis

	Patient 1	Patient 2
<i>Major criteria</i>		
More than two BCCs or one under the age of 20 years	No	No
Odontogenic keratocysts of the jaw proven by histology	Yes	Yes
Three or more palmar or plantar pits	Yes	No
Bilamellar calcification of the falx cerebri	Yes	Yes
Bifid, fused or markedly splayed ribs	Yes	No
First degree relative with NBCC syndrome	No	No
<i>Minor criteria</i>		
Macrocephaly determined after adjustment for height	No	No
Congenital malformations	Cleft lip and palate	Cleft lip and palate
Other skeletal abnormalities	Sprengel deformity	No
Radiological abnormalities	Bridging of the sella turcica	Bridging of the sella turcica
Ovarian fibroma	No	No
Medulloblastoma	No	No

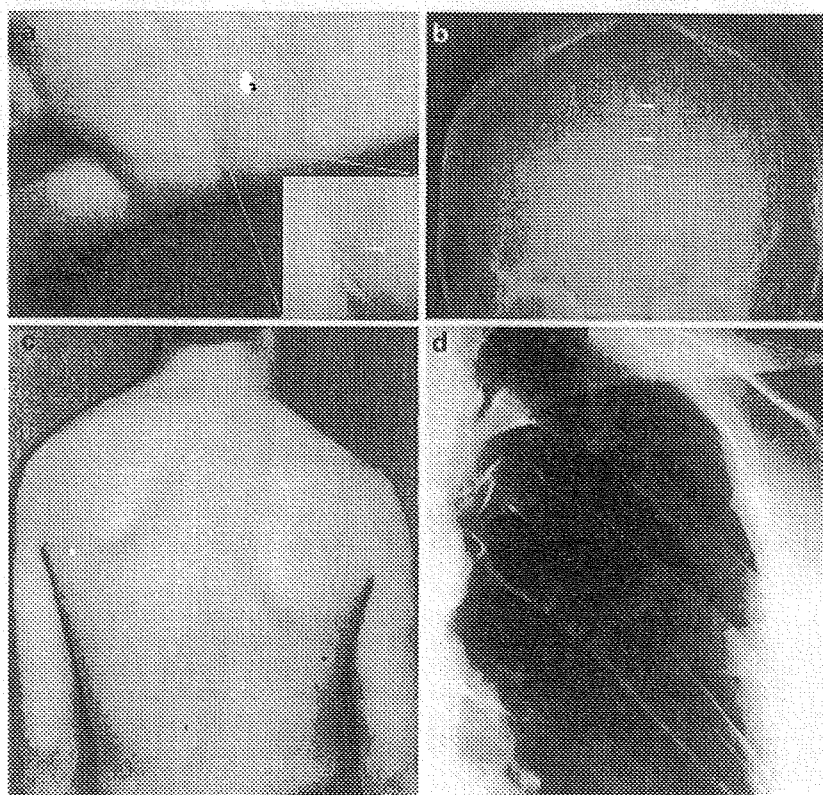


Figure 1 Patient 1, a 21-year-old male shows (a) palmar pits, (b) calcification of the falx cerebri, (c) scoliosis and Sprengel shoulder and (d) bifid ribs.

Mutational analysis

All studies described below were approved by the ethics committee at Kitasato University. After written informed consent was obtained, blood samples were taken from each patient. Genomic DNA was extracted using a QIAamp DNA blood midi kit. For the production of the Epstein–Barr virus (EBV)-immortalized lymphoblastoid cell line, mononuclear cells were washed and suspended in an RPMI-1640 medium with 20% fetal calf serum (1.2×10^6 ml). The cells were cultured in multiple aliquots in 24-well tissue culture plates (1×10^6 per

well) with a 20% filtrate of a B95-8 culture supernatant. The cultures were refed and expanded for 3–6 weeks and harvested for the preparation of total RNA. Genomic DNA samples were amplified with primers for all exons as described previously.⁶ Amplified products were gel-purified using a QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and cycle sequenced with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in both directions. The sequence was analyzed on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). For the analysis of aberrant splicing, total

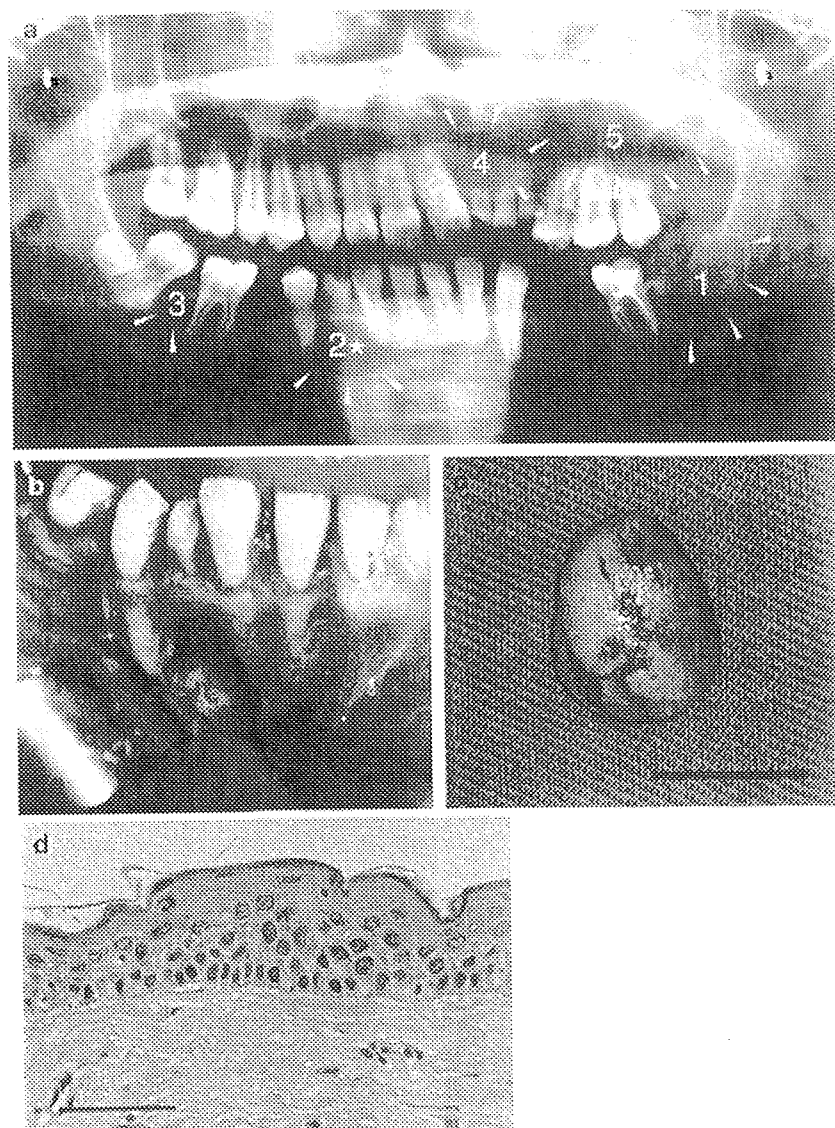


Figure 2 Patient 2, a 16-year-old male. (a) Panoramic X-ray shows five multiple jaw cysts. (b) Operative view. (c) Removed cyst from the asterisk of A. Scale bar: 10 mm. (d) HE staining shows lining of parakeratinized squamous epithelium. It indicates a keratocystic odontogenic tumor (KCOT). Scale bar: 50 μ m.

RNA was extracted from an EBV-immortalized lymphoblastoid cell line using the QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) and subjected to reverse-transcription (RT)-PCR using a QIAGEN LongRange 2Step RT-PCR Kit (QIAGEN) with oligo dT. The forward and reverse primers for exon 6 and 9 were 5'-CTTCGACCCCTTTGGAATTCCTGG-3' and 5'-TCACAGGGTCGTG GTGGTGAAGGAAA-3', respectively. The amplified product was also sequenced as described above.

RESULTS

A heterozygous duplication at the nucleotide position between 3325 and 3328 of *PTCH* exon 20 (c.3325_3328dupGGCG) was detected in patient 1 (Figure 3a). It caused a frameshift mutation and a prematurely terminated translation of the *PTCH* gene. In patient 2, a point mutation (G to C) in intron 7 of the *PTCH* gene (c.1067+1G>C) was detected (Figure 3b). To analyze the splicing events in this patient, total RNA was extracted from the EBV-immortalized lymphoblastoid cell line, and an RT-PCR analysis was performed using a pair of primers located in exon 6 and exon 9 (Figure 3b). As shown in

Figure 3c, an additional PCR product of larger molecular weight was detected in patient 2 (transcript 2). Sequencing this product revealed that this mutation caused the activation of a cryptic splice site in intron 7, resulting in a 77-bp insertion of the intronic sequence (Figures 3b and c), which also prematurely terminated the *PTCH* protein because of the in-frame stop codon located just after the mutation. This activated splice site did not conform to the GT-AG rule.¹⁶

DISCUSSION

Multiple jaw cysts were the first signs of NBCCS in these two cases and the pathological finding indicated KCOT. It is reported that the incidence of KCOT in NBCCS is 75–90%.^{2,3,13} KCOT, previously known as odontogenic keratocyst, is a benign cystic lesion, but it often shows locally destructive behavior and a high recurrence rate.¹⁷ Therefore, in the new WHO classification revised in 2005, KCOT is defined as a benign neoplasm of odontogenic origin with the characteristic lining of a parakeratinized squamous epithelium.¹⁸ Therefore, a careful clinical observation is needed for patients with KCOT.

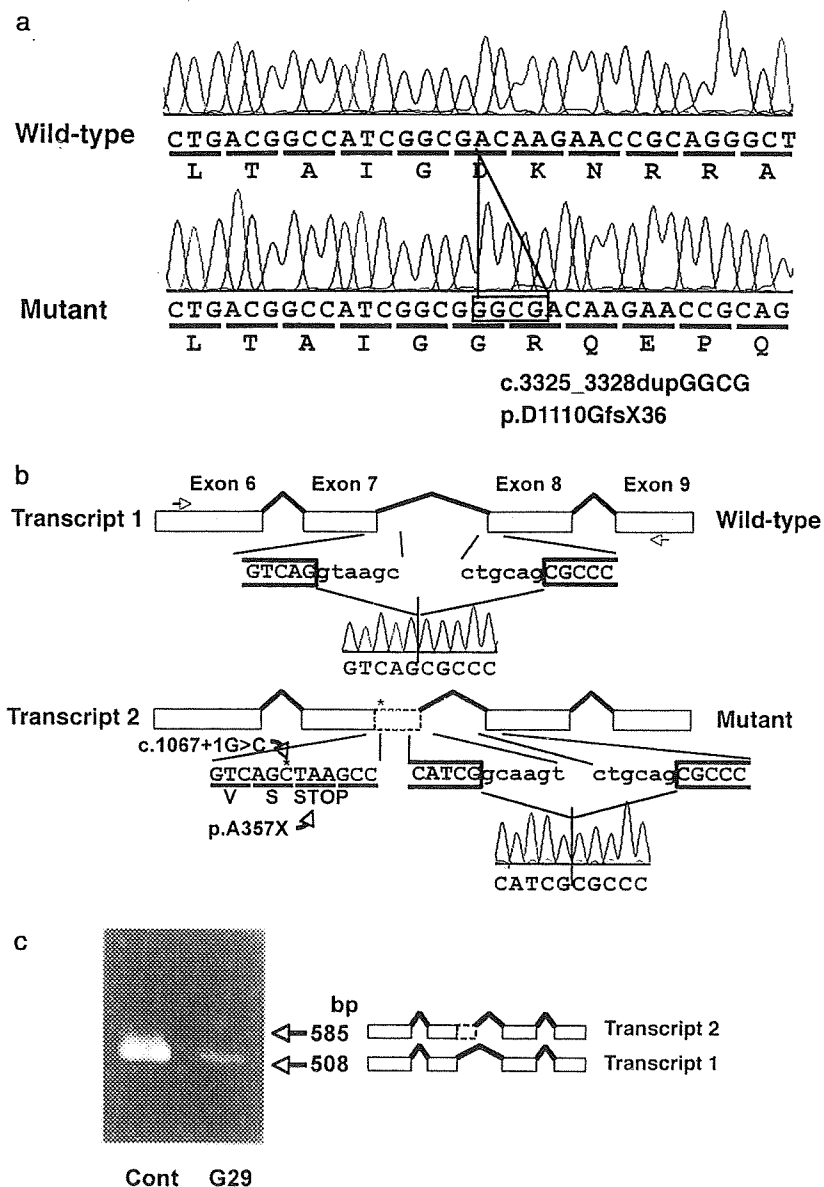


Figure 3 Mutations found in our study. (a) A heterozygous duplication at the nucleotide position between 3325 and 3328 of the *PTCH* gene (c.3325_3328dupGGCG) was detected in patient 1. (b) A point mutation (G to C) in intron 7 of the *PTCH* gene (c.1067+1G>C) was detected in patient 2. Red arrows indicate the position of primers used for RT-PCR (See also c). (c) Electropherogram of the RT-PCR products. In addition to the normal transcript (transcript 1), a longer product (transcript 2) was detected in patient 2. Sequencing this product revealed the aberrant splicing that lead to the addition of the intron 7 sequence of 77 bp (See also b). A full colour version of this figure is available at the *Journal of Human Genetics* journal online.

CLP is a common birth defect that results from a mixture of genetic and environmental factors, and two genes, *MSX1* and *IRF6*, now seem to have a measurable role in the causation of CLP.^{19,20} It is reported that the incidence of CLP in NBCCS is 4–9.1%.^{2,3,9,13} The human homolog of *Drosophila patched* (*PTCH*) has been found to be mutated in patients with NBCCS.^{4,5} The *PTCH* protein is a receptor for Sonic hedgehog (SHH). SHH is essential for the morphogenesis of frontonasal and maxillary processes and the loss of SHH signaling in the embryonic face inhibits the growth of the primordial and results in defects of CLP.²¹ However, mutational analysis was poorly performed in NBCCS associated with CLP. Therefore, it is not clear whether the *PTCH* gene mutation specifically causes CLP.¹¹

Thus, we undertook *PTCH* mutational analysis and identified two previously unreported mutations in *PTCH*. Mutational analysis is also

important to confirm the clinical diagnosis of NBCCS and to assess and to reduce the risk for BCC. BCC is one of the major criteria of NBCCS, and is reported to occur in 75% of patients over 20 years of age and in more than 90% over 40 years of age in the United Kingdom.² The prevalence of BCC is 15% lower in Korean NBCCS patients than in those from the United Kingdom, probably due to the difference in the degree of skin pigmentation.¹³ As face and back are the most severely affected sites of BCCs,³ ultraviolet radiation is a risk factor for developing BCCs.

Interestingly, in patient 2, a cryptic splice site that does not conform to the GT–AG rule was activated at least in the EBV-immortalized lymphoblastoid cell line, because the second base of intron 7, which was created by the aberrant splicing, was cytosine, not thymine. This cryptic splice site cannot be predicted by current algorithm such as the