

Ⅱ. 分担研究報告書

(1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子
診断システムの構築と病態の解明

機器分析を用いた尿中および血中ステロイド分析による正期産および早産児の

新生児・乳児期におけるステロイド分泌動態の解析と基準範囲設定

研究分担者

慶應義塾大学医学部 小児科 長谷川奉延

研究協力者

慶應義塾大学病院 中央臨床検査部 本間桂子

慶應義塾大学医学部 臨床検査医学 小山雄平

株式会社あすか製薬メディカル 中川利沙、本間誠次郎

慶應義塾大学医学部 小児科 三輪雅之、池田一成、石井智弘

【研究要旨】

【目的】正期産および早産児の新生児・乳児期におけるステロイド分泌動態の解析および基準範囲設定。【対象】在胎 25-41 週、生後 3 日～6 ヶ月児尿 2472 件、在胎 37-41 週、生後 4-6 日児血清 91 件。【方法】GC-MS により胎生皮質ステロイド和・cortisol 代謝物と・aldosterone 代謝物を測定し在胎週数・出生体重・生後週数・修正週数別分布を検討。誘導体化後 LC-MS/MS 法を用い、生後 4-6 日男女別血中 T・DHT・T/DHT 基準範囲を設定(2.5-97.5%ile)。【結果と考察】1) SGA(出生体重分布 10 パーセントイル未満)の生後 3-5 日 cortisol・pregnenolone 分泌は AGA(同 10 パーセントイル以上)より低値であったことから、束状層・胎生皮質の成長・成熟は、子宮内発育遅延において低下することが示唆された。2) 早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークは、在胎 34 週以下の群において修正 35-40 週の間が存在し、ピークの高さは在胎週数が少ないほど高かったことから、修正週数依存性の胎生皮質退縮の前に、在胎週数依存性の胎生皮質分泌増加が存在すると考えられた。3) 免疫化学的測定法より特異的な LC-MS/MS 法により、十分な例数を用いた T・DHT・T/DHT 基準範囲を初めて設定し、DHT・T/DHT における性差を初めて統計的に証明した。

【背景】

副腎・性腺ステロイド産生異常診断には、基準範囲設定が不可欠であるが、新生児・乳児期においては、十分な例数を用いた信頼性の高い基準範囲の報告は少ない。なぜなら、1) 測定対象が胎生皮質・束状層・球状層・性腺由来ステロイドと多種類で、かつ血清・尿試料中に最大 8 オーダー異なる濃度差のものが共存するため特異的な測定が難しい、2) 出生から生後 1 年まで、在胎週数 (22-41 週)・出生体重

(500-4500g)・性別により異なる、ダイナミックな濃度変化があり、膨大な検体数を解析する必要がある、ためである。我々は以前より、免疫化学的測定法より特異性が高く必要検体量も少ない、ガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)による尿ステロイドプロファイル測定法および液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)による血中ステロイドプロファイル測定法を用い、新生児・乳児期尿中・血中ステロイドの在胎週数・出生体重・性・日齢(週齢・

月齢別基準範囲設定、ステロイド産生異常症診断カットオフ値設定を最終目標として、解析を行っている。

【研究目的】

平成20年度:在胎週数別SGA(出生体重10%タイル未満)群とAGA(同10%タイル以上)群の尿中ステロイド代謝物の分布から、子宮内発育遅延が新生児早期の副腎皮質3層ステロイド分泌能に及ぼす影響を調べる。

平成21年度:早産児尿中DHEA代謝物の分布から、胎生皮質ステロイド分泌ピークの存在・時期・高さが、在胎週数・生後週数・修正週数(在胎週数+生後週数)のいずれに依存するのか明らかにする。

平成22年度:健常正常産新生児における血中testosterone(T)・dihydrotestosterone(DHT)・T/DHT比を基準範囲設定する

【対象・方法】

対象は、保護者の同意を得られた神経学的異常・内分泌学的異常・ステロイド治療なしの当院出生新生児・乳児。

平成20年度:在胎週数35-41週、生後3-5日児の尿1598件(表1)について、GC-MSによる尿ステロイドプロフィール測定法を用い、胎生皮質・束状層・球状層機能を反映するpregnenolone代謝物とcortisol代謝物とaldosterone代謝物を測定し、在胎週数別にSGA群とAGA群のステロイド代謝物濃度範囲・中央値を算出。

平成21年度:在胎週数25-36週、生後0-21週(修正25-44週)の早産児314例の尿874件(表2)について、GC-MSによる尿ステロイドプロフィール測定法を用い、胎生皮質機能を反映するDHEA代謝物を測定し、在胎週数別に生後週数または修正週数別中央値を求め有意差検定した。

平成22年度:在胎週数37-41週、出生体重2532-3732g、生後4-6日新生児(男児48、女児43)の血清について、ピコリン酸エステル誘導体化後LC-MS/MS法を用い、男女別血中T・

DHT・T/DHT基準範囲を設定(2.5-97.5%ile)。Mann-Whitney順位和検定により性差検定。

【研究成果および考察】

平成20年度:

1) SGAの束状層分泌能:SGAのcortisol分泌は、早産においてAGAより低分泌、正常産においてほぼ同等であった(図1a)ことから、早産SGAは、cortisol分泌予備能が低い可能性が示唆された。このことから、SGAにおける束状層の成長・成熟は、子宮内発育遅延の影響を受け、早産ではAGAより低下傾向を示し、正常産であれば、catch upできると推測された。

2) SGAの球状層分泌能:SGAのaldosterone分泌は、早産・正常産いずれにおいてもAGAとほぼ同等であった(図1b)。このことから、SGAの球状層の成長・成熟は、少なくとも在胎35週以上であれば、子宮内発育遅延の影響はなく、AGAと変わらない、と推測された。このことは、球状層が出生以降、水・塩類調節を自立して行う環境になって初めて活動しはじめることと矛盾しない。

3) SGAの胎生皮質分泌能:SGAのpregnenolone分泌は、早産、正常産いずれにおいてもAGAより低分泌であった(図1c)。また、少なくとも35週以降、明らかな高分泌・漸減のパターンを認めなかった。このことから、SGAの胎生皮質の成長・成熟は、子宮内発育遅延の影響を受け、著明に低下していることが示唆された。

平成21年度:

早産児の在胎週数別DHEA代謝物の生後週数変化と修正週数変化(図2a,2b)における分泌ピークについて、

1) ピークが存在したのは、在胎33-34週以下の群だった(図2c)ので、ピークの存在は在胎週数に依存すると推測された。

2) ピークの時期は、生後4-11週、修正35-40週の間であり、修正37-38週に集束していた(図2d)ので、生後週数より修正週数に依存すると推測された。

3) ピークの高さは、在胎週数が少ないほど高く、在胎週数に逆比例していた(図 2e)ので、在胎週数に依存すると考えられた。

今回観察した早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークは、今まで知られていた胎生皮質ステロイドの分泌低下期の前に、分泌増加期が存在することを示唆するものとする。

平成 22 年度 :

生後 4-6 日の新生児血清 T、DHT および T/DHT 比の基準範囲を設定し、過去の免疫化学的測定法および LC-MS/MS 法による既報と比較した(表 3-5)。男女別分布(図 3a,3b,3c)は 3 項目いずれにおいても性差を認めなかった($p < 0.05$)。

1) 生後 4-6 日の T/DHT 基準範囲、DHT および T/DHT の性差は、世界で初めての報告である。

2) RIA による基準範囲と比較し、男児 T、女児 T、男児 DHT において本検討の基準範囲は低値であった。RIA 既報と乖離した理由は、RIA 法では胎生皮質ステロイド等の共存ステロイドの影響を受けるが、LC-MS/MS 法では受けないためと考える。

3) LC-MS/MS による新生児早期の基準範囲の報告は、2010 年 Kulle らの報告のみであった。Kulle らの報告と比較し、男児 T、男児 DHT、女児 DHT の範囲はほぼ同等、女児 T では低値であった。なお、Kulle らの例数は男児 8 例、女児 6 例と少数、定量下限は 0.03ng/ml と我々の方法(0.01ng/ml)より高く、T、DHT いずれにおいても、男女の中央値が同じ値であった。

以上より、今回設定した我々の基準範囲は、RIA および LC-MS/MS による既報に比し、より信頼性が高いと考える。

【結 語】

平成 20 年度 :

SGA における新生児早期副腎皮質機能は、束状層では、早産において AGA より低分泌、球状層では、早産・正期産ともに AGA と同等、胎生皮質では、早産・正期産ともに AGA より低分泌である

平成 21 年度 :

早産児の尿中 DHEA 代謝物とを、在胎週数別に出生から修正 44 週まで横断的に解析した。その結果、早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークの有無および高さは在胎週数に、時期は生後週数より修正週数に依存していることが示唆された。

平成 22 年度 :

既報に比しより信頼性の高い、生後 4-6 日の新生児血清 T、DHT および T/DHT 比の基準範囲を設定した。生後 4-6 日の T/DHT 基準範囲、DHT および T/DHT の性差は、世界で初めての報告である。

【研究発表】

【論文発表】

- 1) 三輪雅之、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 新生児期副腎皮質機能の評価方法. 新生児内分泌研究会編. 新生児内分泌ハンドブック. MC メディカ出版. 2008 年 5 月. p.32-38
- 2) KEIKO HOMMA, MARIKO HIDA, KAZUSHIGE IKEDA, NOBUO YAMAGA, MITSURU MURATA, TOMONOBU HASEGAWA. The Measurement of Serum 17 α -hydroxyprogesterone in Newborn Infants by Stable Isotope Dilution – Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Clin Pediatr Endocrinol 18(3):77-80,2009
- 3) 小山 雄平、本間 桂子、三輪 雅之、丹羽 房子、河井 昌彦、村田 満、池田 一成、長谷川 奉延. 尿中遊離型ベタメサゾン GC/MS 測定法の確立と母体ベタメサゾン投与新生児尿測定. ホルモンと臨床 57(12):29-31 2009

【学会発表】

- 1) 本間 桂子、太田敦美、本間誠次郎、小山雄平、三輪雅之、池田一成、村田満、長谷川奉延. 新生児血中ステロイド測定のピットホール. 第 81 回日本内分泌学会. 青森 2008.5.15-17
- 2) 丹羽房子、松倉崇、水本洋、河井昌彦、中畑龍俊、本間桂子、長谷川奉延. 尿ステロイド

- プロフィールによる晩期循環不全の予測 第44回日本周産期・新生児医学会(口演). 横浜.2008.7.13-15
- 3) 三輪雅之、有光威志、松崎陽平、栗原伸芳、北東功、池田一成、本間桂子、長谷川奉延. 血中ステロイドホルモン一斉測定による早産SGA・AGA児の副腎機能評価. 第44回日本周産期・新生児医学会(口演). 横浜.2008.7.13-15
- 4) 本間桂子、太田敦美、石橋みどり、菊池春人、小山雄平、本間誠次郎、三輪雅之、池田一成、長谷川奉延、村田満. 汎用性免疫化学的測定法による新生時血中ステロイド値は偽高値である. 第41回日本臨床化学年次学術集会.静岡.2008.8.31
- 5) Masayuki Miwa, Takeshi Arimitsu, Yohei Matsuzaki, Nobuyoshi Kurihara, Isamu Hokuto, Kazushige Ikeda, Tomonobu Hasegawa. SERUM STEROID PROFILE IN NEWBORN: COMPARISON BETWEEN TERM AND PRETERM INFANT BY USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY. The European Society for Paediatric Research (ESPR) 2nd Congress. Copenhagen 2008.8.24
- 6) 本間桂子. 尿ステロイドプロフィールによる新生児副腎性腺機能へのアプローチ. 第2回新生児内分泌研究会.京都.2008.9.12
- 7) 飛弾麻里子、島袋林秀、城裕之、本間桂子、長谷川奉延. 新生児副腎機能—新生児・乳児の永久皮質ステロイド分泌に日内変動はあるか?—第2回新生児内分泌研究会.京都.2008.9.12
- 8) 小山雄平、本間桂子、三輪雅之、丹羽房子、河井昌彦、村田満、池田一成、長谷川奉延. 尿中ベタメサゾン GC-MS 測定法の確立と母体ベタメサゾン投与早産児尿中濃度測定. 第42回日本小児内分泌学会.米子 2008.10.2-4
- 9) 飛弾麻里子、島袋林秀、城裕之、本間桂子、長谷川奉延. 新生児副腎機能—新生児・乳児の永久皮質ステロイド分泌に日内変動はあるか?—第53回日本未熟児新生児学会(口演). 札幌.2008.10.30-11.1.
- 10) 飛弾麻里子、島袋林秀、本間桂子、長谷川奉延、城裕之. 新生児副腎機能—新生児・乳児の永久皮質ステロイド分泌日内変動の有無について—第112回小児科学会.奈良. 2009.4.17-19
- 11) 三輪雅之、松崎陽平、栗原伸芳、北東功、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 30週以下の早産児における出生後早期の血中ステロイドホルモン値. 第45回日本周産期・新生児医学会.名古屋. 2009.7.12-14
- 12) Yuhei Koyama, Keiko Homma, Masayuki Miwa, Mariko Hida, Kazushige Ikeda, Mitsuru Murata, Koji Muroya, Tomonobu Hasegawa. Urinary Free Steroids in Newborn Infants with 21-Hydroxylase Deficiency using Stable Isotope Dilution Gas Chromatography / Mass Spectrometry. The 8th Joint Meeting, ESPE- LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York City, Sept. 9-12, 2009
- 13) Keiko Homma, Yuhei Koyama, Masayuki Miwa, Mariko Hida, Kazushige Ikeda, Mitsuru Murata, Tomonobu Hasegawa. Activity of fetal adrenal in Japanese preterm infants using urine steroid profile by gas chromatography / mass spectrometry. The 8th Joint Meeting, ESPE- LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York City, Sept. 9-12, 2009
- 14) 本間桂子、小山雄平、三輪雅之、池田一成、土田悦司、藤枝憲二、村田満、長谷川奉延. 尿pregnanetrioloneによる新生児～乳児古典型21OHD生化学的診断-日齢別カットオフ値設定. 第43回日本小児内分泌学会. 宇都宮 2009.10.1-3
- 15) 小山雄平、本間桂子、三輪雅之、池田一成、村田満、長谷川奉延. 母体投与ベタメサゾンによる早産児副腎機能抑制. 第43回日本

- 小児内分泌学会. 宇都宮 2009.10.1-3
- 16) 小山雄平、本間桂子、三輪雅之、池田一成、村田満、長谷川奉延. 母体投与ベタメサゾンによる早産児胎生皮質ステロイド抑制. 第17回日本ステロイドホルモン学会. 福岡.2009.11.24
- 17) Yuhei Koyama, Keiko Homma, Maki Fukami, Reiko Horikawa, Masayuki Miwa, Kazushige Ikeda, Mitsuru Murata, Tsutomu Ogata, Tomonobu Hasegawa. Discrimination P450 oxidoreductase deficiency from classical 21-hydroxylase deficiency in Japanese infants using urinary 11beta-hydroxyandrosterone by gas chromatography / mass spectrometry. 14th International Congress of Endocrinology(ICE2010). Kyoto. 2010.3.26-30
- 18) 三輪雅之、置塩英美、有光威志、松崎陽平、栗原伸芳、北東功、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 正期産児および早産児における出生後血中ステロイドホルモン変化の比較. 第46回日本周産期・新生児医学会. 神戸. 2010.7.11-13
- 19) 寺脇正典、小山典久、梅村佳菜、佐々木智章、安田真里、戸川貴夫、本間桂子、長谷川奉延. 極低出生体重児における尿中ステロイドプロファイルの検討-晩期循環不全の病態解明のために. 第46回日本周産期・新生児医学会. 神戸. 2010.7.11-13
- 20) 本間桂子、小山雄平、三輪雅之、池田一成、大竹和子、清水長子、涌井昌俊、深見真紀、緒方勤、長谷川奉延、村田満. 尿ステロイドプロファイルによる新生児・乳児古典型 21-hydroxylase 欠損症および P450 oxidoreductase 異常症の鑑別診断. 第57回日本臨床検査医学会. 東京. 2010.9.9-12
- 21) Yuhei Koyama, Keiko Homma, Maki Fukami, Masayuki Miwa, Kazushige Ikeda, Mitsuru Murata, Tsutomu Ogata, Tomonobu Hasegawa. Biochemical Differential Diagnosis of Classical 21-hydroxylase Deficiency, P450 Oxidoreductase Deficiency, and Transient Hyper 17-hydroxyprogesteronemia by Urinary Free Steroids in Newborn Infants using Stable Isotope Dilution Gas Chromatography / Mass Spectrometry. 49th annual meeting of European Society for Pediatric Endocrinology. Prague - Czech Republic. 2010.9.22-25
- 22) 本間桂子、小山雄平、石井智弘、三輪雅之、池田一成、位田 忍、涌井昌俊、村田満、長谷川奉延. 3つの尿 5 α /5 β 代謝物比により生後2か月から5 α -reductase 欠損症を生化学診断可能である. 第44回日本小児内分泌学会. 神戸.2010.10.7-9
- 23) 小山 雄平, 本間 桂子, 三輪 雅之, 池田 一成, 涌井 昌俊, 村田 満, 長谷川 奉延. 新生児乳児尿中遊離型コルチゾール—安定同位体希釈質量分析法と免疫化学的測定法の比較—. 第44回日本小児内分泌学会. 神戸.2010.10.7-9
- 24) 中川利沙、本間桂子、小山雄平、三輪雅之、池田一成、石井智弘、涌井昌俊、村田満、本間誠次郎、長谷川奉延. 液体クロマトグラフ—タンデム型質量分析計を用いた新生児血清 testosterone, dihydrotestosterone 基準範囲. 第44回日本小児内分泌学会. 神戸.2010.10.7-9
- 25) 小山 雄平, 本間 桂子, 三輪 雅之, 池田 一成, 涌井 昌俊, 村田 満, 長谷川 奉延. 免疫化学的測定法による新生児尿中遊離型コルチゾールは直接法、抽出法共に偽高値を呈する. 第18回日本ステロイドホルモン学会. 2010.11.27

【知的財産権の出願・登録状況】

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1. 平成20年度 対象新生児

在胎週数	出生体重(g)		N数	
	中央値	(範囲)	AGA	SGA
35	2233	(1200-3730)	47	20
36	2371	(1275-3464)	101	23
37	2691	(1371-3776)	203	22
38	2882	(1666-3946)	317	22
39	3002	(1889-4148)	335	21
40	3162	(2250-4200)	317	8
41	3226	(1788-4248)	155	7

表2. 平成21年度 対象新生児・乳児

在胎週数	症例数	尿検体数
25-26w	18 (M7, F11)	148
27-28w	13 (M5, F8)	119
29-30w	14 (M10, F4)	123
31-32w	23 (M11, F12)	106
33-34w	54 (M32, F22)	124
35-36w	192 (M100, F92)	254
all	314 (M165, F149)	874

表3. Testosterone基準範囲(ng/ml) -既報との比較-

測定法	日齢	男児			女児			
		例数	基準範囲 [範囲]	中央値	例数	基準範囲 [範囲]	中央値	
本検討	LC-MS/MS	4-6	48	0.13-0.91 [0.06-1.01]	0.31	43	0.03-0.18 0.02-0.20	0.08
Tomlinson (2002)	RIA	<10	36	0.29-3.31	0.66	36	0.09-1.08	0.21
Pang (1979)	RIA	<14	29	[ND-2.4]	-	20	[ND]	-
Kulle (2010)	LC-MS/MS	<7	8	[0.06-0.78]	0.20	6	[0.06-0.78]	0.21

表4. Dihydrotestosterone基準範囲(ng/ml) -既報との比較-

測定法	日齢	男児			女児			
		例数	基準範囲 [範囲]	中央値	例数	基準範囲 [範囲]	中央値	
本検討	LC-MS/MS	4-6	48	0.01-0.24 [<0.01-0.27]	0.07	43	<0.01-0.04 [<0.01-0.04]	0.01
Pang (1979)	RIA	<14	16	[ND-0.6]	-	12	[ND]	-
Kulle (2010)	LC-MS/MS	<7	8	[<0.03-0.20]	0.03	6	[<0.03-0.03]	0.03

表5. T/DHT比 基準範囲

測定法	日齢	男児			女児			
		例数	基準範囲 [範囲]	中央値	例数	基準範囲 [範囲]	中央値	
本検討	LC-MS/MS	4-6	48	2.7-9.4 [2.6-14.2]	4.3	43	2.4-17.2 [1.4-19.0]	5.6

図1. 平成20年度
在胎週数別SGAとAGAの中央値比較

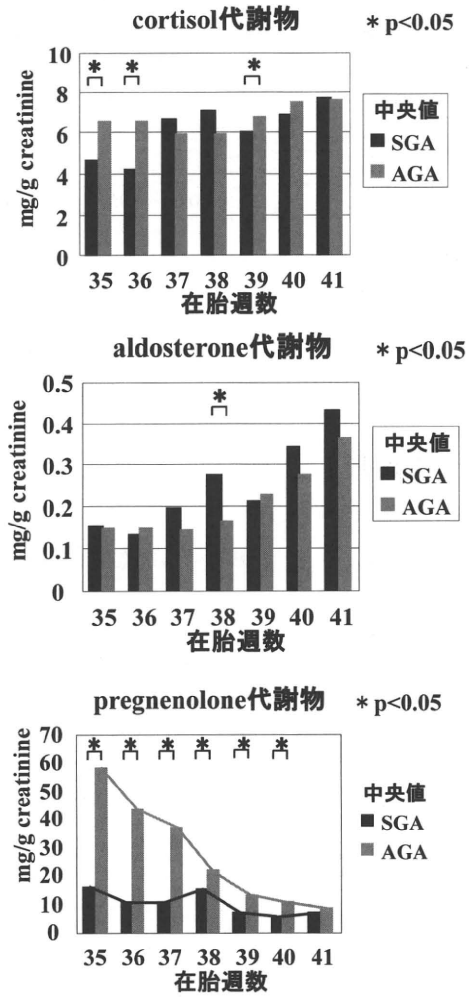


図2. 平成21年度
在胎週数(GA)別 DHEA代謝物と中央値

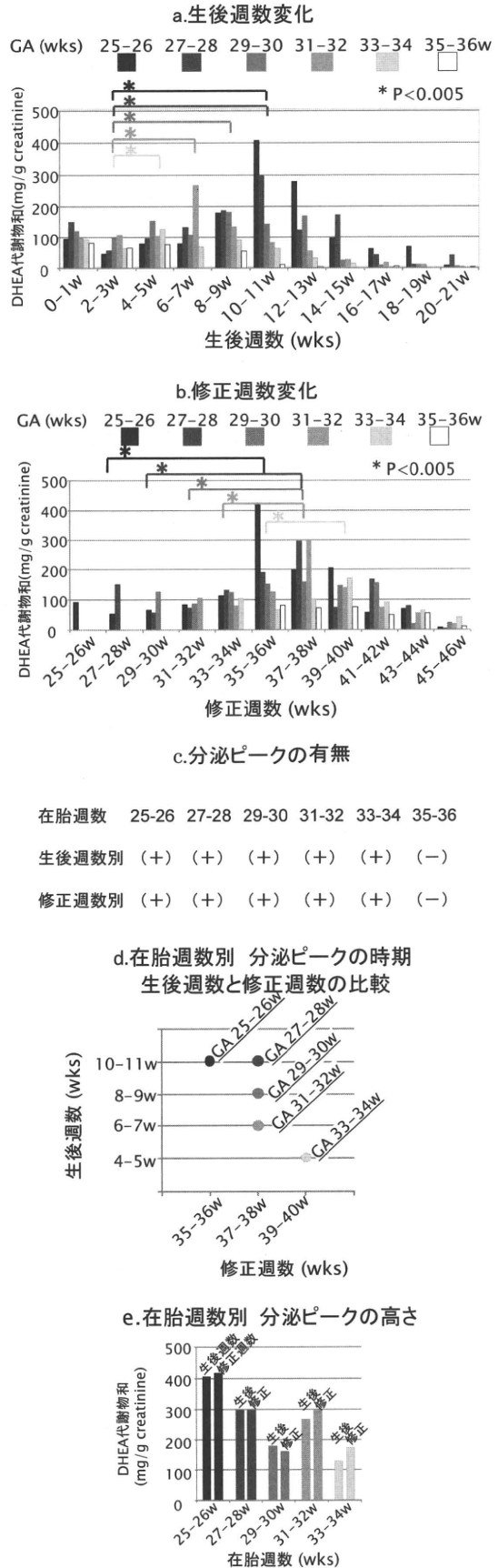
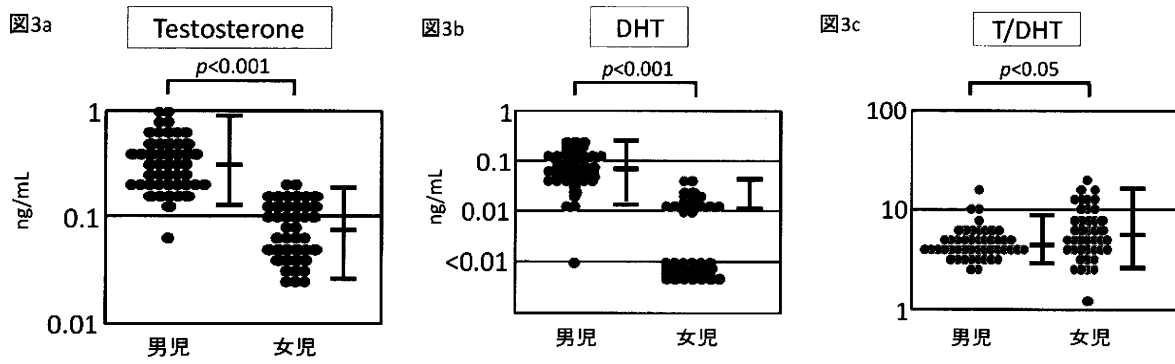


図3. 生後4-6日の新生児血清T、DHTおよびT/DHT比の男女別分布



非古典的 StAR 欠損症の分子遺伝学的、臨床的解析

研究分担者 勝又 規行

国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 基礎内分泌研究室長

【研究要旨】

非古典的 StAR 欠損症において、新規の *STAR* 変異を同定した。新規変異 StAR の活性は低下するが、残存活性を有しており、非古典型表現型の病因と考えられた。臨床所見のみでは ACTH 不応症、副腎低形成症との鑑別が困難な症例があり、その確定診断には遺伝子解析が必須であった。非古典的 StAR 欠損症の男子では外性器は男性型であるが、停留精巣などの異常を伴うことがあった。また、本症では男女ともに二次性徴が自然に発来、進行した。

A. 研究目的

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) をコードする *STAR* 遺伝子異常は先天性副腎リポイド過形成症の原因であり、本症患者は、生後早期からの副腎不全症状に加え、46,XY 個体でも女性型の外性器を呈するとされてきたが、2006 年に幼児期に発症する副腎不全と正常男性型の外性器を呈する男児で *STAR* 遺伝子異常が同定され(Baker BY, et al. J Clin Endocrinol Metab, 91:4781-4785, 2006)、StAR 欠損症には臨床的多様性が存在することが明らかになった。本研究では、本邦の非古典的 StAR 欠損症の分子遺伝学的、臨床的解析を行った。

B. 研究方法

対象：家系図を図 1 に示す。対象は同胞発症の 2 家系 4 例を含む先天性副腎機能低下症の 5 家系 7 例（男子 5 例、女子 2 例）。家系 2 では、皮膚色素沈着を認めた症例 3 の兄が、1 歳 6 カ月のとき急性脳症で死亡。

STAR 遺伝子の解析：*STAR* 遺伝子の各エクソンを PCR 法で増幅し、PCR 産物の塩基配列を直接シーケンス法で決定した。

変異 StAR の機能解析：同定した新規 *STAR*

変異を野生型 *STAR* cDNA に組換え PCR 法で導入した後に、野生型および変異 StAR 発現プラスミドを F2 プラスミド（コレステロール側鎖切断酵素・アドレノドキシシン還元酵素・アドレノドキシシン-融合蛋白発現プラスミド）と共に COS-1 細胞にトランスフェクションし、培養液中のプレグネノロンを測定した。
臨床的解析：臨床情報を後方視的に解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析研究は、施設の倫理審査委員会承認された説明書・同意書を用いて同意を得た後に行った。

C. 研究成果

STAR 遺伝子解析：R188C/Q258X 変異が家系 1 で、L157P/R188H 変異が家系 2 で、Q258X/R272H 変異が家系 3 で、Q258X/R272C 変異が家系 4、5 で同定された。R188H 変異、R272H 変異および R272C 変異は、これまでに報告のない変異であった。

変異 StAR の機能解析：R188H、R272H および R272C 変異 StAR の活性は、それぞれ野生型の 37.4%、32.4% および 35.0% であった。

臨床的解析：副腎不全発症時の所見を表 1 に示

す。発端者の発症年齢は、6 ヶ月から4歳であった。初発症状として、皮膚色素沈着が全例で認められ、それ以外に下痢および発熱・痙攣が1例ずつで認められた。副腎不全発症時の検査所見を表2に示す。血漿ACTHは全例で高値であったが、コルチゾールは正常から低値であった。血漿レニン活性は正常から著明な高値まで幅広かった。血清電解質は、発熱・痙攣で発症した症例3を含む全例で正常であった。副腎の腫大は認めなかった。

男子5例のうち4例の外性器は正常男性型であり、残りの1例では片側の停留精巣が認められた(症例7)。女子2例の外性器は正常女性型であった。

最近の臨床所見を表3に示す。成人男子2例(症例7、8)および思春期年齢に達した男子1例(症例1)では、二次性徴は自然に発来し、進行した。成人男子2例では造精能が確認された。思春期年齢に達した女子1例(症例3)では、二次性徴が自然に発来、進行し、12歳6ヵ月で初経がみられた。

D. 考察

5家系7例で同定した*STAR* 遺伝子変異は複合ヘテロ接合性変異である。家系2で同定されたL157P変異および残りの4家系で同定されたQ258X変異は、古典的先天性副腎リポイド過形成症で報告されており、StAR活性を完全に損なう(Fluck CE, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5304-5308, 2005; Lin D, et al. *Science* 267:1828-1831, 1955)。家系1で同定したR188C変異は、非古典的症例で既に報告されており、活性を野生型の22.3%に低下させることが示されている(Baker BY, et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4781-4785, 2006)。家系2で同定したR188H変異、家系3で同定したR272H変異、家系4、5で同定したR272C変異は、新規の変異であり、活性を野生型の37.4%、32.4%、35.0%に低下させる。したがって、R188C変異、R188H変異、R272C変異およびR272H変異が、今回報告した5家系7例の非古典的表現型の原因であ

ると考えられる。

今回報告した非古典的StAR欠損では、副腎の腫大は認められず、血清電解質は正常であり、血漿レニン活性は正常から高値まで幅広く分布する。血漿レニン活性が正常な症例では、鉱質コルチコイドの分泌は保持されていると考えられ、臨床所見のみではACTH不応症との鑑別はきわめて困難である。逆に、漿レニン活性が高値をとる症例では、鉱質コルチコイド分泌不全が存在すると考えられ、臨床所見のみでは副腎低形成症との鑑別が困難である。したがって、非古典的StAR欠損症の確定診断には*STAR* 遺伝子解析が必須であると考えられる。非古典的StAR欠損症の男子5例の外性器は男性型であるが、1例は片側の停留精巣を認める。したがって、非古典的StAR欠損症でも男性化障害を伴う例が存在すると考えられる。思春期年齢以降まで観察している男子3例では、二次性徴が自然に発来、進行し、停留精巣を認めた例でも造精能が確認されている。したがって、非古典的StAR欠損症男子の性腺機能の予後は比較的良好であると考えられる。

非古典的StAR欠損症の女子2例の外性器は正常女性型であり、思春期年齢以降まで観察している女子では、二次性徴が自然に発来、進行し、初経が認められるが、妊孕性については今後の課題である。

E. 結論

- 1) StAR欠損症の臨床型は残存活性の高い方のアレルに依存する。
- 2) 非古典的StAR欠損症では副腎の腫大は認められない。
- 3) 非古典的StAR欠損症ではACTH不応症、副腎低形成症との鑑別が困難な例がある。
- 4) 非古典的StAR欠損症の確定診断には*STAR* 遺伝子解析が有用である。
- 5) 非古典的StAR欠損症の男子では、外性器は男性型であるが、停留精巣などの異常を伴うことがある。
- 6) 非古典的StAR欠損症の男女とも二次性徴が自然に発来、進行する。

G. 謝 辞

本研究にご協力いただいた福井大学医学部小児科・中井昭夫先生、慶應義塾大学医学部小児科・長谷川奉延先生、慶應義塾大学医学部同腎臓内分泌代謝内科・柴田洋孝先生、埼玉県立小児医療センター代謝内分泌科・望月弘先生、福井県立病院小児科・津田英夫先生に深謝いたします。

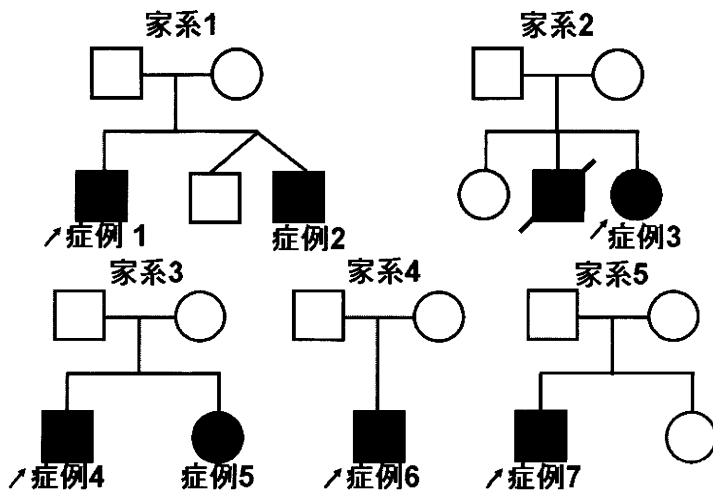


図 1. 非古典的 StAR 欠損症の 5 家系 7 症例

表 1. 非古典的 StAR 欠損症患者の副腎不全発症時の臨床所見

	家系 1		家系 2	家系 3		家系 4	家系 5
	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6	症例 7
性別	男	男	女	男	女	男	男
STAR 遺伝子 変異	R188C/ Q258X		L157P/ R188H	Q258X/ R272H		Q258X/ R272H	Q258X/ R272H
在胎週数	38 週	38 週	38 週	38 週	38 週	40 週	44 週
出生時体重	2910 g	2710 g	2730 g	3070 g	3350 g	3690 g	2990 g
発症年齢	6 ヲ月	12 日	2 歳 5 ヲ月	1 歳 8 ヲ月	1 歳 8 ヲ月	4 歳 6 ヲ月	4 歳 11 ヲ月
初発症状	色素沈着、 下痢	色素沈着、	色素沈着、 発熱、痙攣	色素沈着	色素沈着	色素沈着、	色素沈着、
外性器	正常 男性型	正常 男性型	正常 女性型	正常 男性型	正常 女性型	正常 男性型	左停留 精巢

表 2. 非古典的 StAR 欠損症患者の副腎不全発症時の検査所見

	家系 1		家系 2	家系 3		家系 4	家系 5
	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6	症例 7
検査時年齢	11 ヲ月	12 日	2 歳 5 ヲ月	2 歳 3 ヲ月	2 歳 3 ヲ月	4 歳 6 ヲ月	4 歳 11 ヲ月
ACTH (pg/ml)	1910	299	3000	7500	380	>6000	4600
Cortisol (μ g/dl)	1.7	6.6	2.0	2.7	8.8	1.7	2.4
PRA (ng/ml/h)	42.7	N. A.	5.5	4.6	0.9	3.9.	24.0.
PAC (pg/ml)	52.2	410	41	13	46	64	59
Na (mEq/l)	139	127	134	138	138	135	142
K (mEq/l)	4.7	5.5	3.9	4.4	4.0	4.1	4.1
Cl (mEq/l)	105	95	89	106	107	106	109
BS (mg/dl)	104	86	63	101	94	N. A.	N. A.
副腎画像	正常 (CT)	N. A.	正常 (CT)	正常 (CT)	正常 (CT)	N. A.	N. A.

N.A., データなし

表 3. 非古典的 StAR 欠損症患者の最近の臨床所見

	家系 1		家系 2	家系 3		家系 4	家系 5
	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6	症例 7
年齢	15 歳	10 歳	14 歳	10 歳	8 歳	36 歳	30 歳
身長 (cm)	163.0 (-0.8 SD)	128.8 (-1.6 SD)	150.7 (-1.0 SD)	131.5 (-1.2 SD)	123.3 (-1.1 SD)	158.5 (-2.2 SD)	170.6 (mean)
体重 (kg)	53.0	31.9	64.4	42.8	32.47	61.4	71.5
BMI	19.9	19.2	28.4	24.8	21.3	24.4	24.6
Tanner 分類	5	1	5	1	1	5	5
精巣容積 (ml)	18/18	6/6	-	3/3	-	20-25/ 20-25	Rt 20/ Lt 12
精液検査							
量 (ml)	N. A.	N. A.	-	N. A.	-	6.0	4.0
精子数 (ml^{-1})	N. A.	N. A.	-	N. A.	-	14×10^6	120×10^6
初経	-	-	12 歳 6 ヲ月	-	未	-	-

N.A., データなし

先天性副腎疾患の病態解明とその治療

研究分担者 田島 敏広

北海道大学大学院・医学研究科・生殖発達医学講座・小児科学分野・講師

【研究要旨】

先天性副腎低形成症（X-連鎖性以外の遺伝形式を示すタイプ）、偽性低アルドステロン症（PHA1）の原因の解析、臨床面では21-水酸化酵素欠損症（21-OHD）の成長を検討した。

その結果先天性副腎低形成症の候補遺伝子の一つである ACD 遺伝子には異常を認めなかった。低出生体重児の PHA1 型にはミネラルコルチコイド受容体異常は同定できず、尿細管の未熟性がその原因と考えられた。

臨床的には21-OHDの成人身長解析の結果、男子で身長は-1.26SD、女子では-0.78SDであり、出生後半年までに身長SDスコアは-0.75SD、1歳までに-1.5SDまで低下することが判明した。今後ステロイド補充量などの検討を要すると思われた。

A. 研究目的

小児における先天性副腎疾患は稀であるが、その成因はすべてが解明されたわけではない。また頻度の多い21-水酸化酵素欠損症の治療後の成長については低身長になることが報告されている。

今回の3年間で先天性副腎疾患の中の副腎低形成症、アルドステロン不応症を示す偽性低アルドステロン血症（PHA1）の成因を解析すること、加えて新生児マススクリーニングにより早期に治療開始した21-水酸化酵素欠損症（21-OHD）の成長予後を解析し、ステロイド補充の問題点を検討することを目的とした。

B. 研究方法

先天性の副腎低形成と診断された患者で StAR, Ad4BP, DAX-1, SCC, MRAP, ACTH-R, POR 遺伝子がすべて正常であった4例（1同胞例）についてヒト ACD 遺伝子を解析した。PHA1型の原因の一部はミネラルコルチコイド受容体（MR）異常である。PHAI型の病態と診断

された10例についてMR遺伝子を解析した。遺伝子診断は北海道大学倫理委員会の承認を得て、ご両親に説明し、書面にて同意を得た。21-水酸化酵素欠損症について当院で1歳前より治療を行い、成人身長に到達した15歳以上になった者14名（男性3名、女子11名）対象に、各年齢での身長、予測身長との差、治療薬剤投与量などを検討した。

C. 研究結果

副腎低形成4例のACD遺伝子解析の結果では異常を見いだせなかった。PHA1型では、10名中2名にR947X、R651Xをヘテロ接合性に同定した。21-OHDの患者で成人身長に到達した男子で身長は-1.26SD、女子では-0.78SDであった。また成長経過では出生後半年までに身長SDスコアは-0.75SD、1歳までに-1.5SDまで低下していた。しかしその後8歳までに-0.1SDとなった。グルココルチコイドの投与量は年齢経過を通じて日本小児内分泌学会の推奨量範囲内であった。

D. 考案

今回先天性副腎低形成症の中で、副腎症状のほか成長障害、難聴をともなっている症例を対象に検討したが、原因を同定することはできなかった。成因の同定にはCGHアレイ、次世代シーケンサーによる解析が必要と考えられる。またPHA1ではMR遺伝子の変異を2名に同定した。しかし早期産児の8例ではMR異常を同定できなかった。ヒト胎児におけるMRの遠位尿細管での発現を検討した報告では、15週令、24週令の胎児では発現が認められたが、30週令では発現が低下し、出生時には発現はほとんど認めず、その後10ヶ月-1歳までに再度発現してくるパターンであった。したがって、早産児にみられるPHA1型はMR異常より、MRの発現の減少がその根底にあると考えられる。21-OHDでの成長予後の検討では、出生後1歳まで身長伸びが低下することが示され、過去の報告と一致していた。日本でのグルココルチコイド投与量は新生児期から乳児期にかけて、欧米より多い。成長率低下と関連するかは今後多数例での解析が必要であり、適切なステロイド治療について今後成人期も含めて検討が必要である。

E. 結論

1. MR遺伝子異常を2例のPHAで同定した。
2. 21-OHD患者では1歳までの成長率の低下が成人身長の低下をもたらすことが示された。

F. 健康危険情報

なし

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

副腎皮質の発生初期過程に関する研究

研究分担者 諸橋 憲一郎
九州大学大学院医学研究院 教授

【研究要旨】

転写因子 Ad4BP/SF-1 は副腎皮質におけるステロイドホルモン産生能を制御し、同時に副腎形成過程で重要な役割を担っている。我々は Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質における発現を誘導する胎仔副腎エンハンサーを同定した。この配列を用いることで、Ad4BP/SF-1 を発現する細胞を GFP でラベルしたマウスや胎仔副腎において Ad4BP/SF-1 を強制的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスを用いることで、①初期の胎仔副腎皮質細胞は成獣副腎皮質細胞を前駆細胞としての能力を有すること、②Ad4BP/SF-1 の発現量（遺伝子量）に応じて胎仔副腎皮質が増殖することを見いだした。これらの結果は Ad4BP/SF-1 が標的遺伝子の発現制御を通じ副腎皮質の細胞増殖を制御することを示していた。そこで、③次世代シーケンサーを用い、Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子の全貌を明らかにする実験系を確立した。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質分化過程における機能を調べることで、副腎皮質の分化メカニズムを解明することを目的とした。本実験で得られる成果は副腎皮質の再生に向けた研究に対し、基礎的な情報を提供するものである。

B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質エンハンサーの制御下に GFP ならびに Cre-recombinase や Ad4BP/SF-1 自身を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製した。副腎皮質のマーカー遺伝子として一連のステロイドホルモン産生関連遺伝子の発現を *in situ hybridization* と免疫染色にて検討した。

次世代シーケンサーと免疫沈降法を用いる配列決定法にて、標的遺伝子配列を決定するための予備実験を行った。

(倫理面への配慮)

本実験にはトランスジェニックマウスならびに遺伝子破壊マウスを用いるが、全ての動物実験は九州大学動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は九州大学実験動物委員会の承認を得たものである。同様に組み替え DNA 実験については、組み替え DNA 実験委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

①胎仔副腎皮質に cre-recombinase を発現するトランスジェニックマウスを用い、胎仔副腎が成獣副腎へと分化するかを調べた。その結果、胎齢 11.5 日までのマウスの胎仔副腎皮質は成獣副腎皮質へ分化する能力を有していたが、胎齢 14.5 日にはその能力を消失していた。

②胎仔副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の強制発現の影響を調べたところ、正常の副腎皮質以外に、より頭部側に副腎皮質様の細胞集団を検出した。副腎ステロイドホルモン産生に不可欠