

consecutive days) revealed ameliorated gonadotropin responses (LH 0.3–6.4 IU/l; FSH 2.2–9.6 IU/l). The mother exhibited several features suggestive of mild IHH, whereas the father showed an apparently normal phenotype. **Results:** She had a paternally derived nonsense mutation at exon 1 (Y145X) and a maternally inherited single nucleotide (G) deletion from the conserved 'GT' splice donor site of intron 1 (IVS1+1delG). **Conclusions:** The results suggest hypothalamic dysfunction as the primary cause for IHH in patients with biallelic *TAC3* mutations and clinical manifestation in heterozygous females, together with the rarity of *TAC3* and *TACR3* mutations in patients with IHH.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is a genetically heterogeneous condition that lacks other pituitary hormone deficiency [1]. Recently, Topaloglu et al. [2] and Guran et al. [3] have reported homozygous *TAC3* or *TACR3* missense mutations in 11 patients with IHH from 5 Turkish or Kurdish families. *TAC3* belongs to an evolutionally conserved neuropeptide family, and *TACR3* belongs to a G-protein-coupled receptor family [4]. Topaloglu et al. [2] and Guran et al. [3] also performed functional studies using an intracellular calcium flux system, successfully revealing markedly attenuated activities of the *TAC3* and *TACR3* mutant proteins. These data provide the first evidence of genetic defects in *TAC3*/*TACR3* signaling being involved in an autosomal recessive form of IHH.

However, there is no other report of *TAC3* or *TACR3* mutations, and further studies are necessary to define the underlying factor(s) for IHH and clinical findings in *TAC3* or *TACR3* mutations. Here, we report a female with IHH and *TACR3* mutations, and discuss the primary cause for IHH and the clinical phenotypes of the patient and her heterozygous parents.

Methods

Mutation Analysis

This study was approved by the Institutional Review Board Committees at the National Center for Child Health and Development and Keio University School of Medicine. After obtaining written informed consent, leukocyte genomic DNA samples from 57 Japanese cases with IHH (38 with 46,XY and 19 with 46,XX) were PCR-amplified with the previously reported primers [2], and subjected to direct sequencing on a CEQ 8000 autosequencer (Beckman Coulter, Fullerton, Calif., USA). To confirm a hetero-

zygous mutation, the corresponding PCR products were sub-cloned with a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA), and the two alleles were sequenced separately.

Prediction of Aberrant Splicing and Nonsense-Mediated mRNA Decay

We utilized the splice site prediction program at the Berkeley Drosophila Genome Project (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) to predict aberrant splicing. On the basis of the previous report [5], we also analyzed whether identified mutations could be subject to nonsense-mediated mRNA decay (NMD) that functions as an mRNA surveillance mechanism to prevent the formation of aberrant proteins.

PCR-Based cDNA Screening for *TACR3*

Human cDNA samples from control subjects were prepared by RT-PCR or purchased from Clontech (Palo Alto, Calif., USA). PCR amplification was performed for *TACR3* with primers for exon 1 (5'-TTGTGAACCTGGCTTTCTCC-3') and exon 3 (5'-GGATTTCTCCTCCCCAGAGA-3'), as well as for *GAPDH* utilized as an internal control with primers for the boundary of exons 2/3 (5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGTCG-3') and the boundary of exons 4/5 (5'-TTGGAGGGATCTCGCTCCTG-3').

Results

Mutation Analysis

Mutation analysis identified two heterozygous mutations of *TACR3* in a female patient, i.e. a nonsense mutation at exon 1 (Y145X) and a single nucleotide (G) deletion from the conserved 'GT' splice donor site of intron 1 (IVS1+1delG; fig. 1A, B). The father was heterozygous for Y145X, and the mother was heterozygous for IVS1+1delG. No demonstrable mutation was detected for *TAC3* in this patient and for *TAC3* and *TACR3* in the remaining 56 cases.

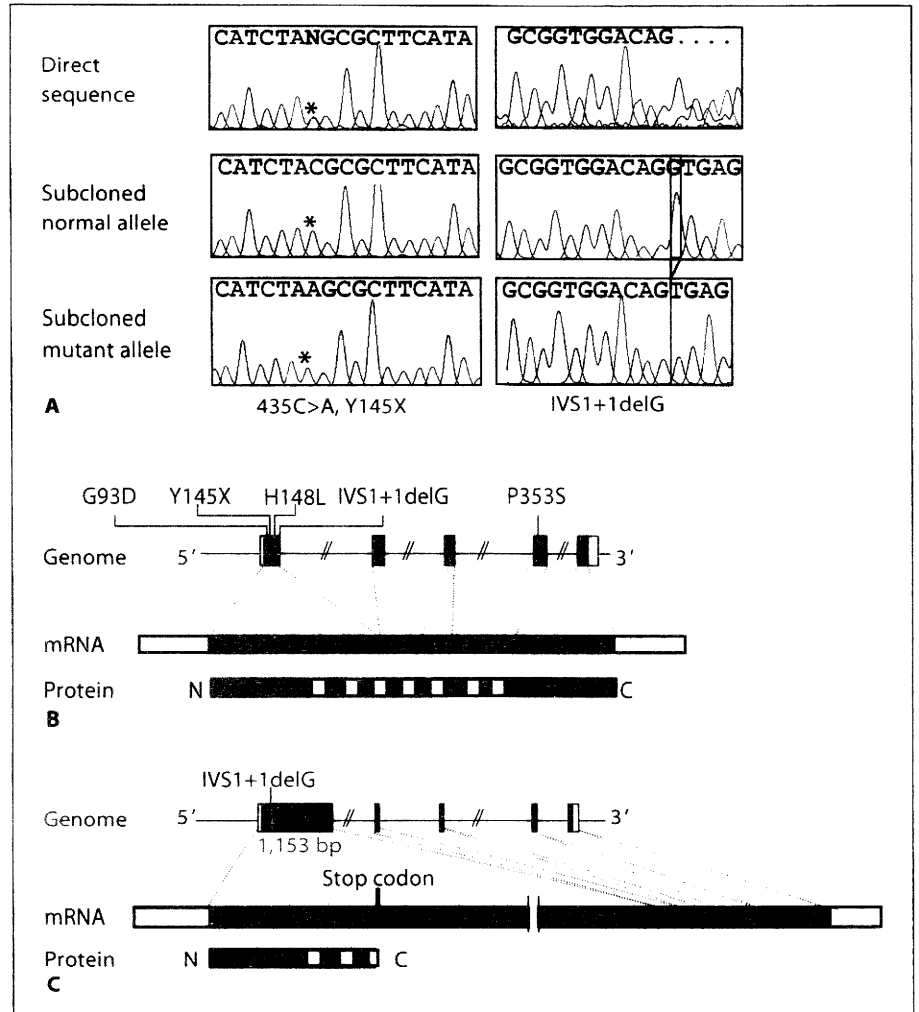
Prediction of Aberrant Splicing and NMD

The IVS1+1delG mutation was predicted to add a 1,153-bp intronic sequence to exon 1 and to cause aberrant splice formation between the added sequence and the normal splice acceptor site of exon 2 (fig. 1C). Furthermore, because of the presence of a stop codon on the added intronic sequence, the IVS1+1delG mutation was predicted to cause a premature termination at the 210th codon. Thus, both IVS1+1delG and Y145X satisfied the conditions for the occurrence of NMD.

PCR-Based cDNA Screening for *TACR3*

TACR3 expression was clearly identified in the hypothalamus and the pituitary as well as in the whole brain, the ovary, the placenta, and the fetal kidney, but not detected in the testis and leukocytes (fig. 2).

Fig. 1. *TACR3* mutations of the female Japanese patient. **A** Electrochromatograms showing 435C>A (Y145X; indicated by asterisks) and IVS1+1delG (highlighted by red lines). The mutation was indicated by direct sequencing, and confirmed by the subsequently performed sequencing of the subcloned normal and mutant alleles. **B** Schematic presentation of the positions of the mutations. The gray and white boxes on genomic DNA (Genome) and mRNA indicate the coding regions and the untranslated regions on exons 1–5. *TACR3* protein (Protein) harbors 7 transmembrane domains (yellow boxes). The mutations identified in the Japanese patient are shown in red, and those reported by Topaloglu et al. [2] and Guran et al. [3] are shown in blue. **C** Predicted consequences of the IVS1+1delG mutation. In silico analysis indicates that IVS1+1delG causes addition of 1,153-bp intronic sequences (green box) to exon 1 and an aberrant splice formation between the added sequence and the normal splice acceptor site of exon 2. The transcribed intronic sequence (green box) harbors a stop codon on its very proximal 5' region.



Case Report

This Japanese female patient was born as the sole child to non-consanguineous parents at 42 weeks of gestation after an uncomplicated pregnancy and delivery. Her postnatal growth and development were normal until pubertal age. At 19 years of age, she was seen at a local clinic because of primary amenorrhea. She exhibited poor pubertal development (breast, Tanner stage 1; pubic hair, stage 2), with low basal gonadotropin and estradiol values (table 1). Thus, she received cyclic estrogen and progesterone therapy, and showed periodic withdrawal bleeding. She showed markedly high educational achievement at a university.

At 24 years of age, she was referred to us for further investigations. She measured 163 cm (+0.7 SD) and weighed 48.5 kg (–0.6 SD). Her breast development was at Tanner stage 3–4, and her pubic hair at stage 4. Magnetic resonance imaging delineated normal pituitary structure. Basal blood hormone values measured at 4 weeks after discontinuation of the hormone replacement therapy were consistent with IHH (table 1). Furthermore, while an initial standard GnRH test showed a poor gonadotropin response, the second-time GnRH test performed after GnRH priming (100

µg i.m. for 5 consecutive days) revealed obviously ameliorated gonadotropin responses (table 1).

The 58-year-old mother had menarche at 14.6 years of age (the menarchial age of Japanese females is 9.75–14.75 years). Subsequently, she had regular but long (~45 days) menstrual cycles with occasionally slight intermenstrual bleeding. She had no signs of androgen excess such as hirsutism. She married at 25 years of age, and failed to conceive for 3 years despite an ordinary conjugal life. Basal body temperature records indicated frequent, though not invariable, occurrence of monophasic cycles. Thus, she was treated with clomiphene citrate by a local medical doctor, and became pregnant at the second cycle of this therapy. Polycystic ovary was excluded by repeatedly performed ultrasound studies during pregnancy. Her menses became irregular from ~45 years of age and ceased at 56 years of age (the menopausal age of Japanese females is 45–56 years). She was otherwise healthy with normal stature (150 cm, –0.5 SD for her age) and intelligence. The 59-year-old father was clinically normal with normal stature (168 cm, +0.9 SD for his age) and intelligence. Allegedly, he had an age-appropriate pubertal development and started shaving at 16 years of age.

Table 1. Endocrine data of the mutation-positive Japanese female

Hormone	Stimulus	Patient		Reference values ¹	
		basal	peak	basal	peak
Examinations at 19 years of age					
LH, mIU/ml		0.4		1.1–4.5	
FSH, mIU/ml		1.7		2.0–6.0	
Estradiol, pg/ml		<4.0		11–82	
Examinations at 24 years of age					
LH, mIU/ml	GnRH ^{2,3}	<0.2	0.6	1.1–4.5	2.0–9.2
LH, mIU/ml	GnRH (after priming) ^{2,4}	0.3	6.4	1.1–4.5	2.0–9.2 ⁵
FSH, mIU/ml	GnRH (after priming) ^{2,4}	2.2	9.6	2.0–6.0	4.5–12.0 ⁵
Estradiol, pg/ml		15		11–82	
Prolactin, ng/ml		12.6		2.4–18.7	
TSH, mIU/l		0.75		0.30–4.50	
GH, ng/ml		8.3		<0.1–10.0	
ACTH, pg/ml		8.0		7–56	
AMH, ng/ml		3.4		0.1–7.4	

¹ Reference values in age-matched Japanese females.

² Hormone replacement therapy was discontinued for 4 weeks before GnRH tests.

³ GnRH 100- μ g bolus i.v. and blood sampling at 0, 30, 60, 90, and 120 min; FSH was not measured.

⁴ GnRH 100- μ g bolus i.v. after priming with GnRH 100 μ g i.m. for 5 consecutive days.

⁵ Reference peak values in a standard GnRH test; there are no reference data after GnRH priming.

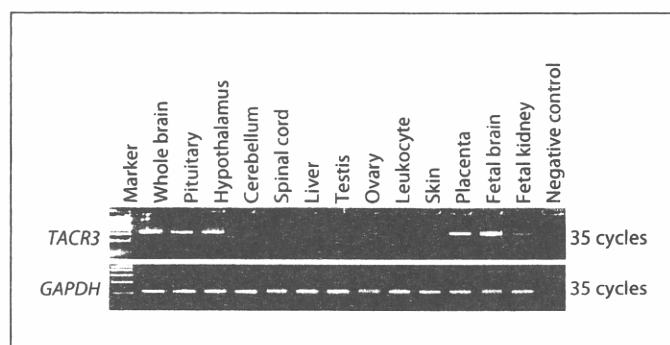


Fig. 2. PCR-based human cDNA screening for *TACR3*. *GAPDH* = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Discussion

This patient had compound heterozygous mutations of *TACR3*. In this regard, both IVS1+1delG and Y145X were predicted as a pathologic mutation missing most of the transmembrane domains. Furthermore, although mRNA was not studied because of absent *TACR3* expression in available leukocytes, both Y145X and IVS1+1delG were predicted to undergo NMD. Thus, the results pro-

vide further support for *TACR3* mutations being involved in IHH. Furthermore, the results of the 57 cases suggest the rarity of *TAC3* and *TACR3* mutations in IHH (none for *TAC3* and 1.8% for *TACR3*).

In this patient, it is notable that gonadotropin responses to GnRH stimulation were ameliorated after GnRH priming. This may suggest that the primary lesion for IHH resides in the hypothalamus rather than in the pituitary. Indeed, *TACR3* protein is strongly expressed in the human hypothalamus (fig. 2) [6]. Furthermore, rodent *Tacr3*, *Kiss1r* (*Gpr54*), and *Gnrh1* proteins are clearly expressed in the median eminence that regulates pulsatile GnRH secretion [7, 8], and human *TAC3*, *KISS1*, and *ESR1* proteins are co-expressed in the infundibular nucleus that modulates estrogen feedback for gonadotropin secretion [9, 10]. In addition, hypertrophy of *TAC3*-positive neurons and increased *TAC3* expression have been observed in the hypothalamus of postmenopausal females with hypoestrinism [9]. These data suggest that a molecular network involving *TAC3/TACR3*, *KISS1/KISS1R*, and estrogen/*ESR1* may underlie the regulation of GnRH secretion in the hypothalamus.

The heterozygous mother exhibited several clinical features suggestive of mild IHH [11]. While such manifestations are apparently absent from the previously re-

ported females heterozygous for *TACR3* missense mutations (G93D, P353S, and H148L) [2, 3], this may be due to the residual activity being retained by the missense mutations but not by the splice donor site mutation of the mother, or to the ethnic difference. Similarly, while the heterozygous father of this patient apparently lacked discernible clinical features, this may be due to sex dimorphism that GnRH secretion remains fairly constant in males and shows dynamic change with menstrual cycles in females [11, 12].

In this study, it appears worthwhile to point out that *TACR3* was clearly expressed in the ovary, but not in the testis. Although the role of *TACR3* in ovarian tissue has not been well studied, a possible involvement of *TACR3*

in the development of the corpus luteum has been suggested [13]. Thus, *TACR3* mutations may also have exerted a direct impact on the ovarian function in this patient, independent of gonadotropin deficiency. In addition, the gonadal expression pattern of *TACR3* may be relevant to the phenotypic difference between the mother and father.

In summary, the present study suggests a probable hypothalamic dysfunction in patients with biallelic *TACR3* mutations and heterozygous manifestation in females, together with the rarity of *TAC3* and *TACR3* mutations in patients with IHH. Further studies will help to clarify the clinical and molecular characteristics in *TACR3* mutations.

References

- 1 Achermann JC, Hughes IA: Disorders of sex development; in Kronenberg HM, Melmed M, Polonsky KS, Larsen PR (eds): Williams Textbook of Endocrinology, ed 11. Philadelphia, Saunders, 2008, pp 783–848.
- 2 Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK: *TAC3* and *TACR3* mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009;41:354–358.
- 3 Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, Turan S, Gribble FM, Kotan LD, Akcay T, Atay Z, Canan H, Serin A, O'Rahilly S, Reimann F, Semple RK, Topaloglu AK: Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3633–3639.
- 4 Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martin JD, Candenas ML: Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem* 2004;11:2045–2081.
- 5 Kuzmiak HA, Maquat LE: Applying non-sense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 2006;12:306–316.
- 6 Koutcherov Y, Ashwell KW, Paxinos G: The distribution of the neurokinin B receptor in the human and rat hypothalamus. *Neuroreport* 2000;11:3127–3131.
- 7 Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE: Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 2005;489:372–386.
- 8 Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1761–1766.
- 9 Rance NE: Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 2009;30:111–122.
- 10 Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE: Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2744–2750.
- 11 Bulun SE, Adashi EY: The physiology and pathology of the female reproductive axis; in Kronenberg HM, Melmed M, Polonsky KS, Larsen PR (eds): Williams Textbook of Endocrinology, ed 11. Philadelphia, Saunders, 2008, pp 541–614.
- 12 Goh HH, Ratnam SS: The LH surge in humans: its mechanism and sex difference. *Gynecol Endocrinol* 1988;2:165–182.
- 13 Brylla E, Aust G, Geyer M, Uckermann O, Löffler S, Spanel-Borowski K: Coexpression of preprotachykinin A and B transcripts in the bovine corpus luteum and evidence for functional neurokinin receptor activity in luteal endothelial cells and ovarian macrophages. *Regul Pept* 2005;125:125–133.

Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with *LHX4* Deletion

Sumito Dateki, Maki Fukami, Ayumi Uematsu, Masayuki Kaji, Manami Iso, Makoto Ono, Michiyo Mizota, Susumu Yokoya, Katsuaki Motomura, Eiichi Kinoshita, Hiroyuki Moriuchi, and Tsutomu Ogata

Department of Endocrinology and Metabolism (S.D., M.F., M.I., T.O.), National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan; Department of Pediatrics (S.D., K.M., E.K., H.M.), Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8501, Japan; Division of Endocrinology and Metabolism (A.U., M.K), Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka 232-8555, Japan; Department of Pediatrics and Developmental Biology (M.O.), Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo 113-8519, Japan; Department of Pediatrics (M.M.), Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890-8544, Japan; Department of Medical Subspecialties (S.Y.), National Children's Medical Center, Tokyo 157-8535, Japan

Context: Mutations of multiple transcription factor genes involved in pituitary development have been identified in a minor portion of patients with combined pituitary hormone deficiency (CPHD). However, copy number aberrations involving such genes have been poorly investigated in patients with CPHD.

Objective: We aimed to report the results of mutation and gene copy number analyses in patients with CPHD.

Subjects and Methods: Seventy-one Japanese patients with CPHD were examined for mutations and gene copy number aberrations affecting *POU1F1*, *PROPI*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, and *SOX3* by PCR-direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification. When a deletion was indicated, it was further studied by fluorescence *in situ* hybridization, oligoarray comparative genomic hybridization, and serial sequencing for long PCR products encompassing the deletion junction.

Results: We identified a *de novo* heterozygous 522,009-bp deletion involving *LHX4* in a patient with CPHD (GH, TSH, PRL, LH, and FSH deficiencies), anterior pituitary hypoplasia, ectopic posterior pituitary, and underdeveloped sella turcica. We also identified five novel heterozygous missense substitutions (p.V201I and p.H387P in *LHX4*, p.T63M and p.A322T in *LHX3*, and p.V53L in *SOX3*) that were assessed as rare variants by sequencing analyses for control subjects and available parents and by functional studies and *in silico* analyses.

Conclusions: The results imply the rarity of abnormalities affecting the six genes in patients with CPHD and the significance of the gene copy number analysis in such patients. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 4043–4047, 2010)

Pituitary development and function depends on spatially and temporally controlled expression of multiple transcription factor genes such as *POU1F1*, *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX3*, and *OTX2* (1–3). Mutations of these genes are usually associated with combined pituitary hormone deficiency (CPHD), although they sometimes lead to isolated GH deficiency (1–3). However, mutations of these genes have been found only in a minor portion of patients with CPHD (2–6). Thus, although multiple genes would remain to be identified in CPHD, a certain fraction of mutations may have been overlooked in these known genes. In this regard, because previous studies have primarily been performed with PCR-direct sequencing for coding exons (4–6), gene copy number aberrations (deletions and duplications) affecting such genes, as well as pathological mutations in noncoding regions, may remain undetected in patients with CPHD. Indeed, microdeletions of *PROP1* and *LHX3* and microduplications of *SOX3* have been identified in a few patients with CPHD (7–9). Thus, we performed sequence and gene copy number analyses for six pituitary transcription factor genes in Japanese patients with CPHD.

Patients and Methods

Patients

We studied 71 Japanese patients with various types of CPHD (39 males and 32 females; age 1–43 yr). In all the patients, *OTX2* mutations and gene copy number aberrations have been excluded previously (3).

Primers and probes

The primers and probes used are summarized in Supplemental Table 1 (published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>).

Sequence analysis

This study was approved by the Institutional Review Board Committee at the National Center for Child Health and Development. After obtaining written informed consent, leukocyte genomic DNA samples of the 71 patients were amplified by PCR for the all coding exons and their flanking splice sites of *POU1F1*, *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, and *SOX3*. Subsequently, the PCR products were subjected to direct sequencing on a CEQ 8000 autosequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). To confirm a heterozygous substitution, the corresponding PCR products were subcloned with a TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), and normal and mutant alleles were sequenced separately. The GenBank sequence data at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) were used as references. For controls, DNA samples of 100 Japanese healthy adults were used with permission.

Functional studies

Functional studies were performed for an *LHX4* missense variant (for details, see Supplemental Methods). In brief, we con-

structed expression vectors containing wild-type and variant *LHX4* cDNAs and a luciferase reporter vector containing the *POU1F1* promoter sequence with an *LHX4*-binding site (10). Subsequently, transactivation analysis was performed with dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI) using COS1 cells.

In silico analyses

The conservation status of substituted wild-type amino acid residues was investigated using the UniGene data at NCBI. The possibility that identified substitutions could cause aberrant splicing was examined by ESE finder release 3.0 for the prediction of exonic splice enhancers (ESEs) (http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi) (11) and by the program at Berkeley *Drosophila* Genome Project for the prediction of splice donor and acceptor sites (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (12).

Gene copy number analysis

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (13) was performed as a screening of a possible gene copy number alteration (deletion and duplication) in all 71 patients, using a commercially available MLPA probe mix (P236) (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) for all coding exons of *POU1F1*, *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, and *LHX4*, together with originally designed probes for *SOX3*. The procedure was as described in the manufacturer's instructions. To confirm a deletion, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed with a long PCR product. To indicate an extent of a deletion, oligoarray comparative genomic hybridization (CGH) was carried out with 1x244K Human Genome Array (catalog no. G4411B; Agilent Technologies, Santa Clara, CA), according to the manufacturer's protocol. Finally, to characterize a deletion, long PCR was performed with primer pairs flanking the deleted region, and the PCR product was subjected to direct sequencing using serial sequence primers. The deletion size and the junction structure were determined by comparing the obtained sequences with the reference sequences at NCBI Database (NC_000014.7), and additional deleted genes were examined with Ensembl Database (<http://www.ensembl.org/>). The presence or absence of repeat sequences around the breakpoints was examined with RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>).

Results

Identification of five missense variants

We identified five novel heterozygous missense substitutions, *i.e.* p.T63M (c.188C→T) and p.A322T (c.964G→A) in *LHX3* (GenBank accession number NM_178138), p.V201I (c.601G→A) and p.H387P (c.1160A→C) in *LHX4* (NM_033343), and p.V53L (c.157G→C) in *SOX3* (NM_005634). These substitutions were found in different patients. No other mutations or novel substitutions were identified in the six genes examined. In the 100 control subjects, *LHX4*-p.H387P was detected in four subjects and *SOX3*-p.V53L in three subjects, whereas *LHX3*-p.T63M, *LHX3*-p.A322T, and *LHX4*-p.V201I were absent. Furthermore, sequencing of

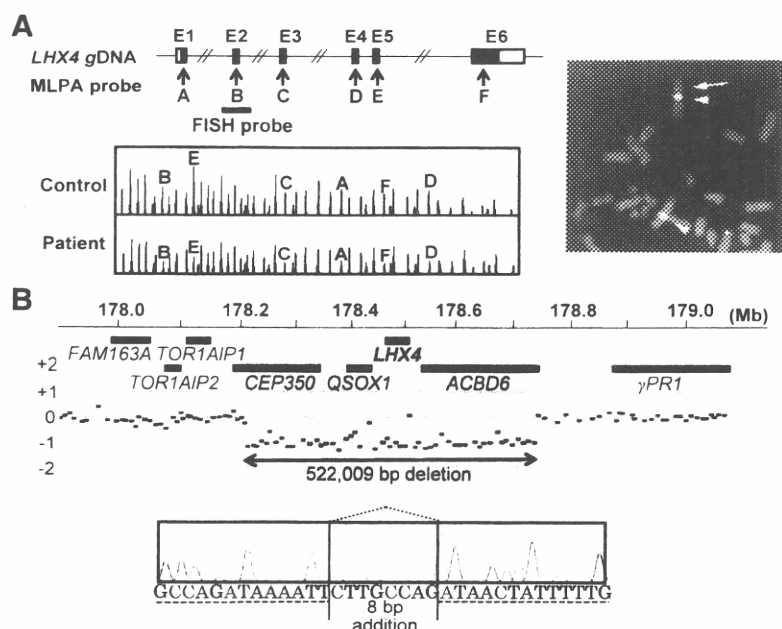


FIG. 1. Gene copy number analysis. Panel A, MLPA and FISH analyses. The black and white boxes on genomic DNA (gDNA) denote the coding regions on exons 1–6 (E1–E6) and the untranslated regions, respectively. The sites examined by MLPA probes (A–F) are indicated by arrows, and the region identified by the 5305-bp FISH probe is shown by a thick horizontal line. In MLPA analysis, the peaks for the sites A–F are reduced in the patient. The red peaks indicate the internal size markers. In FISH analysis, the red signal is derived from the probe for *LHX4*, and the green signals are derived from chromosome 1 centromere control probe (Cytocell, Cambridge, UK) used as an internal control. The probe for *LHX4* is labeled with digoxigenin and detected by rhodamine antidigoxigenin, and the control probe is labeled with biotin and detected by avidin conjugated to fluorescein isothiocyanate. Panel B, Oligoarray CGH analysis and direct sequencing of the deletion junction. The deletion is 522,009 bp in physical size (shaded in gray) and is associated with an addition of an 8-bp segment of unknown origin (highlighted in yellow). The normal sequences flanking the microdeletion are indicated with dashed underlines.

parental samples revealed *LHX3*-p.T63M and *LHX3*-p.A322T in the phenotypically normal mother and father, respectively; parental analysis was refused for *LHX4*-p.V201I, *LHX4*-p.H387P, and *SOX3*-p.V53L. Thus, four missense variants except for *LHX4*-p.V201I were found in healthy controls or parents. For *LHX4*-p.V201I, functional studies showed a normal transactivation function for the *POU1F1* promoter, with no dominant-negative effect (Supplemental Fig. 1). *In silico* analyses indicated that the V201 and the H387 residues in *LHX4* and the A322 residue in *LHX3* were well conserved, whereas the T63 in *LHX3* and the V53 in *SOX3* were poorly conserved (Supplemental Table 2). Furthermore, it was predicted that *LHX4*-V201I and *LHX4*-H387P were unlikely to influence ESEs, whereas *LHX3*-T63M and *LHX3*-A322T might affect ESEs (Supplemental Table 3). None of the missense variants were predicted to influence splice sites (Supplemental Table 4).

Identification of a microdeletion involving *LHX4*

A heterozygous deletion involving *LHX4* was indicated by MLPA and confirmed by FISH (Fig. 1A). Oli-

goarray CGH and sequencing of the fusion point showed that the deletion was 522,009 bp in physical size and was associated with an addition of an 8-bp segment of unknown origin (Fig. 1B). There were no repeat sequences around the deletion breakpoints. The deletion also affected *CEP350*, *QSOX1*, and *ACBD6*. This microdeletion was absent from the parents.

Patient with the microdeletion

This Japanese female patient was born at 40 wk gestation after an uncomplicated pregnancy and delivery. At birth, her length was 48.0 cm (-0.2 SD), her weight 2.59 kg (-1.0 SD), and her head circumference 33 cm (-0.1 SD). She had transient respiratory distress and hypoglycemia in the early neonatal period. Furthermore, biochemical studies for prolonged jaundice indicated central hypothyroidism at 1 month of age (Table 1). Thus, she was placed on thyroid hormone replacement therapy.

At 1 yr 6 months of age, she was referred to us because of severe short stature. Her height was 64.5 cm (-5.1 SD), and her weight was 6.2 kg (-2.8 SD). Endocrine studies at that time revealed severe GH and prolactin deficiencies

(Table 1). Her karyotype was 46,XX in all 50 lymphocytes examined. Recombinant human GH therapy (0.175 mg/kg-wk) was started at 1 yr 8 months of age, showing a remarkable effect. Brain magnetic resonance imaging at 5 yr of age delineated anterior pituitary hypoplasia with a small cystic lesion, ectopic posterior pituitary, and underdeveloped sella turcica (Supplemental Fig. 2). At 11 yr of age, a GnRH test was performed due to lack of pubertal signs, revealing gonadotropin deficiencies (Table 1). Thus, sex steroid replacement therapy was started at 13 yr of age. She had no episode of adrenal insufficiency, with normal blood ACTH and cortisol values at yearly examinations. A CRH stimulation test at 17 yr of age also showed an apparently normal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) function (Table 1). On the last examination at 17 yr old, she measured 148.7 cm (-1.8 SD), weighed 45.6 kg (-0.9 SD), and manifested full pubertal development. She had no developmental retardation.

The nonconsanguineous parents and the three brothers were clinically normal. The father was 164 cm (-1.2 SD) tall, and the mother was 155 cm (-0.6 SD) tall.

TABLE 1. Blood hormone values of the patient with *LHX4* deletion

	Stimulus (dosage)	1 month, basal	1.5 yr		11 yr		17 yr	
			Basal	Peak	Basal	Peak	Basal	Peak
GH (ng/ml)	GHRH (1 mg/kg)		0.2	1.2				
	Arginine (0.5 g/kg)		0.1	0.2				
	L-Dopa (10 mg/kg)		0.1	0.1				
LH (mIU/ml)	GnRH (100 mg/m ²)		<0.5		0.3	0.8		
FSH (mIU/ml)	GnRH (100 mg/m ²)		0.5		1.3	1.6		
TSH (mIU/ml)	TRH (10 mg/kg)	3.5	2.3 ^a	3.9^a				
Prolactin (ng/ml)	TRH (10 mg/kg)		<1.0	<1.0				
ACTH (pg/ml) ^b	CRH (2 mg/kg)		24.6		26.4		26.1	118.7
Cortisol (μg/dl) ^b	CRH (2 mg/kg)		17.5		10.6		15.7	37.82
IGF-I (ng/ml)			9					
Free T ₄ (ng/dl)		0.6	1.1^a					
Estradiol (pg/ml)					<15			

The conversion factors to the SI unit are as follows: GH 1.0 (μg/liter), LH 1.0 (IU/liter), FSH 1.0 (IU/liter), TSH 1.0 (mIU/liter), prolactin 1.0 (μg/liter), ACTH 0.22 (pmol/liter), cortisol 27.59 (nmol/liter), IGF-I 0.131 (nmol/liter), free T₄ 12.87 (pmol/liter), and estradiol 3.671 (pmol/liter). Hormone values have been evaluated by the age- and sex-matched Japanese reference data; low hormone data are in *bold*. Blood sampling during the provocation tests were done at 0, 30, 60, 90, and 120 min.

^a Examined under T₄ supplementation therapy.

^b Obtained at 0800 h.

Discussion

We performed sequence and gene copy number analyses for all coding exons of six previously known genes in 71 patients with CPHD, although noncoding regions were not examined. Consequently, we could identify only a single patient with a heterozygous microdeletion involving *LHX4*. This indicates the rarity of abnormalities affecting the six genes in patients with CPHD and, at the same time, the significance of the gene copy number analysis in such patients. In this regard, because gene copy number aberrations have been found for multiple genes including microdeletions of *PRO1* and *LHX3* and microduplications of *SOX3* (7–9, 14, 15), this implies that gene copy number aberrations should be screened in genetic diagnosis.

Several matters are noteworthy for the clinical and molecular findings of the patient with the microdeletion involving *LHX4*. First, the HPA function was preserved normally at 17 yr of age. However, ACTH deficiency has often been identified in the previously reported patients with heterozygous intragenic loss-of-function mutations of *LHX4* (Supplemental Table 5), and the HPA function often deteriorates with age in patients with CPHD (2). Thus, careful follow-up is necessary for the HPA function of this patient. Second, the microdeletion has affected three additional genes. In this context, the pituitary phenotype of this patient remains within the clinical spectrum of patients with *LHX4* mutations (Supplemental Table 5), and there was no discernible extrapituitary phenotype. Thus, hemizygoty for the three genes would not have a major clinical effect, if any. Third, the deletion breakpoints resided on nonrepeat sequences, and the fusion point was associated with an addition of an 8-bp segment

of unknown origin. This indicates that the deletion has been produced by nonhomologous end joining, *i.e.* an aberrant breakage and re-union between nonhomologous sequences (16).

We also identified five novel heterozygous missense substitutions. In this regard, the data obtained from sequencing analysis in control subjects and available parents, functional studies, and *in silico* analyses argue against the five missense substitutions being a disease-causing pathological mutation, although the possibility that they might function as a susceptibility factor for the development of CPHD remains tenable. In particular, *LHX4*-p.V201I, which was absent from 100 control subjects and affected the well-conserved V201 residue, may have been erroneously regarded as a pathological mutation, unless additional studies were performed. Indeed, *LHX4*-p.V201I exerted no predictable effect on the splicing pattern and had a normal transactivation activity in the used system, although transactivation function may be variable depending on the used promoters and cells (17). Such rare variants with an apparently normal function have also been reported previously (3, 18). Thus, whereas *in vitro* experimental data and *in silico* prediction data may not precisely reflect *in vivo* functions, it is recommended to perform such studies for novel substitutions, especially missense substitutions.

In summary, the results imply the rarity of pathological abnormalities in the previously known genes in patients with CPHD and the significance of the gene copy number analysis in such patients. Thus, the causes of CPHD remain elusive in most patients, and additional studies are required to clarify the underlying factors for the development of CPHD.

Acknowledgments

We thank the patients and the parents for participating in this study. We also thank Dr. Takizawa and Dr. Morita for participating in medical care of the reported patients.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. T. Ogata, Department of Endocrinology and Metabolism, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Ohkura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan. E-mail: tomogata@nch.go.jp.

This work was supported by Grants for Child Health and Development (20C-2) and Research on Children and Families (H21-005) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare and by Grants-in-Aid for Young Scientists (B) (21791025) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

Disclosure Summary: All authors report no conflicts of interest.

References

- Cohen LE, Radovick S 2002 Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr Rev* 23:431–442
- Kelberman D, Rizzotti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT 2009 Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 30:790–829
- Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T 2010 Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756–764
- Coya R, Vela A, Pérez de Nanclares G, Rica I, Castaño L, Busturia MA, Martul P; GEDPIT group 2007 Panhypopituitarism: genetic versus acquired etiological factors. *J Pediatr Endocrinol Metab* 20:27–36
- Mehta A, Hindmarsh PC, Mehta H, Turton JP, Russell-Eggitt I, Taylor D, Chong WK, Dattani MT 2009 Congenital hypopituitarism: clinical, molecular and neuroradiological correlates. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71:376–382
- Reynaud R, Gueydan M, Saveanu A, Vallette-Kasic S, Enjalbert A, Brue T, Barlier A 2006 Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3329–3336
- Abrão MG, Leite MV, Carvalho LR, Billerbeck AE, Nishi MY, Barbosa AS, Martin RM, Arnhold IJ, Mendonca BB 2006 Combined pituitary hormone deficiency (CPHD) due to a complete PROP1 deletion. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:294–300
- Pfaeffle RW, Savage JJ, Hunter CS, Palme C, Ahlmann M, Kumar P, Bellone J, Schoenau E, Korsch E, Brämwig JH, Stobbe HM, Blum WF, Rhodes SJ 2007 Four novel mutations of the *LHX3* gene cause combined pituitary hormone deficiencies with or without limited neck rotation. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1909–1919
- Woods KS, Cundall M, Turton J, Rizzotti K, Mehta A, Palmer R, Wong J, Chong WK, Al-Zyoud M, El-Ali M, Otonkoski T, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R, Woodward KJ, Dattani MT 2005 Over- and underdosage of *SOX3* is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet* 76:833–849
- Machinis K, Amselem S 2005 Functional relationship between *LHX4* and *POU1F1* in light of the *LHX4* mutation identified in patients with pituitary defects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5456–5462
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR 2002 Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285–298
- Strachan T, Read AP 2004 Instability of the human genome: mutation and DNA repair. In: *Human molecular genetics*. 3rd ed. London and New York: Garland Science; 334–337
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G 2002 Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57
- Desviat LR, Pérez B, Ugarte M 2006 Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin Chim Acta* 373:164–167
- Fukami M, Dateki S, Kato F, Hasegawa Y, Mochizuki H, Horikawa R, Ogata T 2008 Identification and characterization of cryptic *SHOX* intragenic deletions in three Japanese patients with Léri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet* 53:454–459
- Shaw CJ, Lupski JR 2004 Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 13:R57–R64
- Ito M, Achermann JC, Jameson JL 2000 A naturally occurring steroidogenic factor-1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *J Biol Chem* 275:31708–31714
- Castinetti F, Saveanu A, Reynaud R, Quentien MH, Buffin A, Brauner R, Kaffel N, Albarel F, Guedj AM, El Kholy M, Amin M, Enjalbert A, Barlier A, Brue T 2008 A novel dysfunctional *LHX4* mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2790–2799

厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患克服研究事業)

「性分化異常症の実態把握と治療指針作成：外科的初期対応の確立に関する研究」

平成22年度 研究協力者会議

平成22年11月5日

研究分担者 島田憲次

「性分化疾患における診断法の確立と治療指針の作成」
平成22年度 研究協力者会議

日 時 : 平成 22 年 11 月 5 日 (金) 午後 2 時～ 3 時 30 分

開催場所 : かごしま県民交流センター リハーサル室 4

参加者 : 島田 憲次 (研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター 泌尿器科)
松本 富美 (大阪府立母子保健総合医療センター 泌尿器科)
川越 真理 (鹿児島大学 泌尿器科)
野口 満 (佐賀大学 泌尿器科)
宮里 実 (東北大学 泌尿器科)
高橋 正幸 (徳島大学 泌尿器科)
木原 敏晴 (長崎大学 泌尿器科)
山口 孝則 (福岡市立こども病院・感染症センター 泌尿器科)
松岡 弘文 (福岡大学 泌尿器科)
森 健一 (大分大学 泌尿器科)

目 的 : わが国の新生児期・乳児期性別不祥児がどのように扱われているかの実態を調査し、それを基に性分化疾患の外科的初期対応の指針を作成することについて話し合う

検討項目 : 1. 新生児・乳児期に性別不詳として紹介された場合の対応：施設内での他科との連携
2. 泌尿器科的処置（内視鏡検査、生検、その他）を加えた症例
3. 代表的な症例の提示
4. その他

島田：今日はお忙しいところお集まり頂きましてありがとうございました。

今日は厚生労働省の科学研究課題で「性分化疾患の実態把握と治療指針の作成」という研究がありまして成育医療研究センターの緒方先生が班の代表者なのですが、分担研究として私と北大の野々村先生が外科的対応のところをまとめることになりました。私は特に新生児期の外科的対応をまとめてほしいと言われました。今日はここに示している資料としての2ページ目から見て頂きたいのですが、「性分化疾患初期対応の手引き」というものがあります。

これは、小児科の先生方の集まりー日本小児内分泌学会ーの中で性分化委員会というのが立ち上がっておりまして、その委員会の先生がこういう対応をしたらいいのではないかという指針をまとめておられます。その中に、いくつか外科的な処置あるいは外科的な対応という項目があります。

それを参考にしながら今日は話を進めていきたいと思います。

まずはじめに、本日お話し頂く内容として、小さな子供の性別がわからない時にどういう風に各施設で対応されているのかをまず伺いたいと考えております。

各施設でどの程度のこういう性分化疾患というのがコンサルトされているのかというだいたいの数、お話し頂けないでしょうか。

例えば私達の施設では松本先生が90例あったと言いましたが、これは決して少ない数ではないと思っています。福岡こどもの山口先生のところがだいたいの数を出しておられますね。

それを話して頂けますか。

山口：うちで、2008年ー昨年ーまでのデータですが、いわゆる ambiguous genitalia が全部で58例あります。

21-hydroxylase 欠損症は28例あって、もちろん女の子です。いろんなものがありますけれど全てのケースでだいたい小児科で診断されて外性器の形成術をお願いしますという形でコンサルトがきます。ただこの5例はきびしかった症例で、なかでもそのうち3例、これは女の子として登録されていた子どもたちなのですが、これはおかしいということで検査を加え、その後性別を変えたという症例があります。

まず性腺の分化異常16例、一番多いのはもちろん ovotesticular DSD ですが、だいたいその時点で性が決まっていますのでその手術をしています。

その ovotesticular DSD が全部で12例ありますけれども、そのうちの10例は male、あとの2例は female で、染色体と左右性腺の成分ですね、これもそんなに普通のものとは変わってないと思います。

1歳6カ月の、見た感じ女の子ですよ、尿道と膣も完全に分かれていてこの子はどちらかと言うとお話しして女の子にと言ったのですが、絶対男の子として養育したいという強い希望がありましたので、性腺を診てみると右側が卵精巣、こんな状況で左側は卵巣で右の方の明らかに精巣だということを固定して一方は切除してその通りの組織でした。今もう13歳になったのですが、今は男の子として立派に育っているのですけど。

島田：先生、まずだいたいの数だけをお知らせいただけますか。58例あって、CAHが28例でしたね。

山口：CAHは28例ですね。もちろん一番多いですね。

松本：あの、リポイド過形成だけべつに分けているのですね。

山口：分けています。

松本：それが3例なんですね。

島田：ovotesticular DSDが多いですね。

山口：これが全体の数です。

島田：はい。

母子はどうでしたか。90例ですよ。

松本：うちは90例ですけど、結構うちは内分泌学的な異常というのもありますけど、ものすごく小さく生まれて外性器が高度な尿道下裂で性別がわからないというような子も含まれていますね。

島田：そうですね、超低出生体重児というのが問題ですね。

松本：だいたいおおまかにDSD分類で分けたらこんな風になります。46のXX-DSDはほとんどCAHで、21-水酸化酵素欠損症ですよ。

島田：だいたいパーセントで46XYが55パーセントくらいですか。

松本：そうですね。で、XXが30パーセント弱くらいです。同じくらいがその他です。

島田：基礎疾患としては明らかにこれは内分泌学的な検討だけでいけるというのは、46XX-DSDつまりCAHの場合ですね。

松本：基礎病態を調べるときに外科的に何かしないとというのがこのくらいの割合（2/3）になっています。

島田：まずおおまかに分けますと、外科的検索の対象になるというのがこの程度になるのではないかと思います。

他の施設はどうですか。内容の2番目に移っていきたいと思うのですが、今日のお話の内容は、泌尿器科あるいは外科的な処置がいつ必要になるか、どういう風な処置がされているのかという実態をお話し頂くということになります。

この小児科からのガイドラインを見ていただきたいのですが、ガイドラインの3ページ目から、

こういうところがあるのですが。

日齢・一番左の出生時という、一番最初の診断の時、この時に出生時の診断・治療のところに外科的疾患に対する対応、これはですね、外反症あるいは総排泄腔異常、そういうものだと思うのですが、これはDSDとはちょっと別なのでここでは触れませんけれど。

さきほども木原先生がおっしゃっていたように診察の時に性腺を触知して欲しいという問い合わせがくると。だから性腺の診断に関してはやっぱり我々泌尿器科医が慣れているという風に見られているようです。この辺はどうなのでしょうね。小児科任せで診断が下されているのでしょうか。我々だってわからないことが多いのですが。

山口：明らかにこれはもう単径部に触れる、しっかりおりてきている性腺が分かるのになぜか女の子として登録されていた症例がうちにはあるんですね。しっかり性腺を触っていれば絶対おかしいと思うはずなのにという症例は福岡にもあります。その典型例はこれなんです。2歳7カ月の女の子がそうなんです。

ちょっと大きなクリトリスかなど。もちろん尿道下裂です。

生まれて2歳7カ月まで女の子とされてたのですが、下に次女が出来て、「下の子と絶対外陰部が違う」とお母さんが初めて気付いて、小児科に受診した子どもです。

島田：その時点で気付かれたのですか。

山口：そうなんです。

野口：高度の尿道下裂と停留精巣ですか。

山口：そうなんです。単径部に停留精巣が触れて一性腺はもう完全な精巣で一そして高度の尿道下裂で全く女性内性器が無い、染色体ももちろんXYです。以前の症例ですのでまず精巣を固定して、尿道下裂は2回に分けましたけれど、4歳で尿道が形成出来ました。3歳の時点で男の子に性別を変えました。

お母さんはこの時点で、やっぱり女の子の遊びじゃなく、興味があるのが絶対に車だったって言うんですよ。この子どもは3歳の時点で家庭裁判所に行って性を変えました。

今11歳になって毛も生えてきているのですけれども。こういう症例が実際あるのです。うちで3人いるんです。

野口：確かに一番問題なのはこのようなパターンが悲惨な経過をとるのがあるんじゃないかなと思います。

佐賀で僕がコンサルトを受けたのが実は、高度な尿道下裂プラス両側停留精巣で触知しない症例でした。で、それは小児科がご紹介して頂いてこういうチェックをしていったらこうのが分かってというのが一例ありましたね。僕が長崎にいたときに、前任の先生が関わってらっしゃるケースがあるのですが、戸籍を2回変えたんです。

山口：2回戻したということですか。

野口：今これはちょっと問題になっているケースなのですけれど。

川越：尿道下裂のおばあちゃんがありますよ。
手術室の時にカテーテルが入りませんと。
実は尿道下裂だったという。

松本：そのおばあちゃんはおじいちゃんだったの。
先生のところは年齢の大きな症例がいるから。

野口：私はあまり関わってなくて分からないのですけれども、多分これは尿道下裂で腹腔内に性腺があったものを色々やってしまって、女性－男性－女性と変更し、現在は社会的に女性なんです。今問題になっているのは、陸上部に入っていて好成績を出していることです。2回くらいお会いしたのですけれども、もはや現在では困ってないと言うんですよ。
だから結局、初期対応がまずいと悲惨な結果になって行くのかなと思いました。

島田：実際に小児科の先生あるいは新生児科の先生がちょっと困った症例、ちょっと普通とは違う外性器の子どもの診察をした場合に、やっぱり各施設で困られていますか。
私たちの施設ではやはり高度の尿道下裂でも新生児科の先生から呼ばれますね。
だからこの辺で、この小児科の先生方が作られたガイドライン「診察」のところで、場合によっては子どもの外性器をよく知った小児の泌尿器科医にコンサルトする必要があるということをつけ加えておいた方がいいと思うのですけれども。いかがですか。

宮里：初期の段階でコンサルトを受けたことがほとんどないのですが、実際どんなタイミングでコンサルトを受けるかと言いますと、ホルモン検査や染色体検査を加えて、どうもおかしいと両方の成績が出ている場合に性腺の検索をしてほしいということで、1歳前後に紹介があることは数年に一度ありました。

出生直後に性を決定する段階でコンサルトを受けたことは記憶する限りないという状況です。ですから実際は性が決まって、後にその性に合わせて性腺の検索をして欲しいということがほとんどです。

その後どういう風な経過を辿って社会的に適応しているのか、トラブルを抱えているのか、そこまであまり関わってないので。実際もしかしたらかなり困った症例があるかもしれないのですけれども、ちょっと実情がつかめていません。我々の関わり方も悪いのかなと反省はしているのですけれども。

島田：新生児を扱う施設、先生方、助産師の方への宣伝ですよ。それをしないと性別が決まってからしか紹介されないし、決まった性別に合わせるような治療をしてほしいとなるのでしょうか。

山口：根本的にはそうですね。ですから明らかに私達から診てこれはおかしいということで、内分泌の先生も一緒に入ってもらって相談してご両親も納得して頂くという形になりますね。実際には本当に分からなくて来られるというのは大阪母子センター以外にはあまり無いのではないのでしょうか。

野口：私達の施設にはどちらかと言うと性別が分からない時期に送られてきますよ。性別判定不態という依頼で。それですぐコールがかかりますけれども。だから、生まれてすぐ電話がかかってくるよ。

宮里：数例前の症例ですが、2歳ぐらいの時にコンサルトがあったのです。御両親とも医療関係者で初めての子どもさんでした。明らかに外性器がおかしいのですけれども、長男として育てたいということで、長男として性を決定したのですが、やはり検索してみるとSRYでプラス、エコーでは子宮が見えるということで性腺の検索をしてほしいと紹介されました。性腺をみるとやっぱり卵精巣と反対側は卵巣という真性半陰陽だったのです。この症例も長男として育てられていましたし、その性に合わせて外性器も形成してほしいということでかなりきびしい尿道下裂だったのですけれども、2期的に形成しました。この症例は九州小児泌尿器科研究会で報告したときに、松本先生からそれはまずいのではないのかと言われたのですけれども、それが実態かなというところですね。初期段階から関わっていると、ある程度外性器に合わせた性決定が出来るかと思うのですけれども、途中から関わるとその性に合わせた治療をしてほしい、形成をしてほしいということでやはり無理が出てくるところがあります。

島田：確かにそうですね。だから一番最初の段階でちょっと疑問がある時には呼んでもらうと良いですね。そのためにはやはり宣伝をしないといけないですね。

川越：そうですね。まだ小児科医はじゃ、泌尿器科に聞こうと言ってくれますが、産婦人科医は泌尿器科を呼ぶとは絶対言わないですね。

山口：言わないですよ。

野口：絶対に言わないですよ。

川越：ほんとにないですね。

野口：だから産科が小児科、新生児科医に言って、その新生児科医がリスポンしてくれるかどうかですよ。

産科から小児科に連絡が行くかどうかひとつのキーになるのではないのでしょうか。

川越：産科医はとりあえずでという感じで、性別を告げているところがありますね。

野口：あとは僕、大学で講義の時に、学生達にこの問題を取り上げています。

小児泌尿器科の emergency 疾患としてこれを学生に話して、戸籍の waiting も出来るんですよという事を必ずしていったるのです。

島田：それは良いことと思いますね。

野口：はい、学生から植えつけておいて、おかしいと思ったらすぐ誰かその地域にいる人にコールするようにしてくれとずっと言ってます。画像を少し出すと眠くなっている学生も起きてくれるので、非常に効率的かなと思っています。

島田：先生も講義されているのではないですか。

高橋：僕もしているのですが、少し話に出すことはあるのですけれどもあまり反応がなくて。徳島大学では実はこの8年で4例ぐらいしか経験がないので、あまり具体的な例が出せていないというのがあります。

診断も性別も決まり性腺をとって欲しいというためだけの紹介という人も含めて4例しかなく、新生児の時のコンサルトはありません。

宮里：そうですね。小児外科にも紹介が入っていることはなさそうです。外反症、総排泄腔異常があれば別ですけどね。

島田：鹿児島も講義で頑張っているのでしょうか。

川越：私はスタッフではないのでまだ学生講義はしていません。

私は大阪母子から帰ってきてもう5年目になるのですけれども、小児科は知り合いが多いので、知っている小児科の先生に色々言うのです。「いつでも呼んでください」「いつでも大丈夫」と言うんですね。

特に鹿児島市立病院に NICU があるので絶対そこが出生数が多いからですね。それでもやっぱり我々の耳に入って来ない。で、たまたま噂話で小児外科や小児科の先生からポツと「こういう子が生まれたんだって」という感じで入ってくる。

このあいだ相談した陰莖欠損症のプルンベリー症候群の子ども、それも生まれてから1週間目ちょっとくらいしてたまたまうちの同僚の先生が小児外科の先生と話をして入ってきたんですね。だから、直接電話で大学病院でも病棟でもいいから連絡してもらえば夜中でも行きますよという話はしているんですけど、道具持って検査しに行きますからと言っているのですが、それでもやっぱり婦人科に響いていないみたいですね。

島田：確かにその生まれたときにですね、呼吸の方とか、それで手いっぱいだったら性なんて後の方でいいのではないかという、それはありますよね。命をまず助けるというね。

でも、そういうことをして頂いている新生児科の先生でも、ちょっと性別のことを頭の端にで

もインプットしておいて頂くという機会があったらいいと思うのですよね。

松岡先生も講義の時にそういうことは話されているのですか。

松岡：うちは性分化のところだけはまだ他の先生が続けておられるので、私は話す機会はありません。院内のNICUから相談はありますけど、染色体の結果が出た時点で例えばXYだったら、もう2回目来るときは堂々と男の子の名前がポンとついてやってくるパターンです。

野口：長崎大学にいたときは用も無いのにNICUに僕達行ってきましたよね。泌尿器系に問題のある子はいないかって、チェックに。

島田：ま、そうですね。野口先生言われたように、新生児科から来るのを待つのではなくて、やはりこちらからも、ちょっと気軽に行くという態勢というのは大事でしょうね。では、この表の次のページを開いて頂きたいのですが。生まれてから7日までというのが書いてありますね。そのあいだに一番初めに染色体の検査を出しなさい、と小児内分泌の委員会で指導されています。その次に性腺、内性器の検索が大事ですということが書いてありますよね。お話を伺いますと、やっぱり性腺を診て欲しいというコンサルトが多いとお聞きしました。この早い時期にしないといけないというのはどういう場合なんでしょうかね。多分これは性腺を診ないと性決定の判定に非常に困難であるという、そういう理由でここに載せてあると思うのですよね。明らかにコリッとした性腺が陰のう内に触れ、これは精巣ですという場合は別にしまして。どなたかそのような例をお話し頂けますか。

松本：性腺をしっかり診ないといけなかった例というのはこの症例ですね。ご覧の通り典型的な、ambiguous genitaliaで性腺は両側非触知。それで、結構な陰核肥大というか陰茎も大きいのですけれども、でもちゃんとエコーで子宮も分かるんですね。この子の検査をすると、内視鏡でみると腹腔の奥にちゃんと子宮頸部を確認出来ました。性腺は両側腹腔内でした。腹腔内でちょっと非典型的なんですけれどこれ片方ストリークで、片方は精巣というような状態です。ま、MGDなんですけれども、普通医学的に考えるとこういう場合どちらがいいかという、腹腔内のこういう異形成の性腺なので、将来の悪性化のことを考えるとやっぱり残すよりは取って、femaleに性別を決めた方がいいんじゃないかなと思うような症例ですけれども。これが例えばこう単径部あたりに両方ちゃんとした精巣があったとしたら、この子はやっぱりmaleかなと思います。だからやっぱり性腺の所見で随分意見が分かれる症例だなと思います。

島田：やっぱり性腺を診ないと決定的なことが言えないというのが、少ないのだけれどもあるということですね。

特にその性腺が思春期あるいは青年期になってちゃんと機能を発揮(function)するかどうかというのと、もうひとつは悪性化の問題ですよね。悪性化の危険性が高いというのはそれなりのことを家族にも説明しないとイケない。で、それで家族が決定することになると、そういうご発言ですよね。

山口先生のところは、性が決まって来るんだという風におっしゃっていましたが、性腺を

診に行かれたというのはいかほどのパーセントになりますか。

山口：ありますね。特に混合型性腺異形成の場合には僕はもう完全に女性にすべきだという風に思っているんです。やっぱり性腺は残すべきではないと。そこが男の子として養育したいという風に決まっていれば、左はとって、右をどうにか陰のうまでおろして外性器は男の子にするんですよ。

固定させた精巣の悪性化の可能性はある程度あると思うのですが、どうにかして陰のうまでおろして、とにかく腫れたらすぐ来なさいという事をお話しします。

島田：やっぱり最初に性別が決まって来られているから、それを先生のところに行かれてから性別を変えた方がいいというような意見を言われても、そこで非常に抵抗があるということですね。

山口：そうです。はい。

松本：MGDはほんと、どっちにでも転ぶというか難しいですよ。これなんかもMGDですけど。

これなんかかなり外性器が男性寄り、片方の精巣もしっかり袋の中にあるんですね。そういう場合は腹腔内とは違って悪性化の頻度が低いと言われていまして、そのまま精巣機能を期待した方がより自然かなと思いますね。

野口：私は以前、性同一障害学会の会員になっていて、長崎大学では性別判定委員会というのが実はあるんですよ。小児の時の論議とは別に、大人になってからの論議が実はまたもう1つあって、F to MとかM to FがOKなのかを判定するんですね。その中での論議では、本人の意思がしっかりしてきて変わって来る状況を考えておかないといけないという事です。それと同じように、我々小児泌尿器科医は、性分化疾患を扱わないといけないと思います。僕達がやっぱりご両親と話をしてデータから男性の方に、男性化の方がいいのではないですかという話をしても、結局20年後30年後は本人の意思で性別を変更することになるのもちょっとやっぱり頭に入れておかないといけないのではないかと思うのですよね。

島田：こういう性分化異常、性分化疾患というのは生まれたとき、あるいは思春期に色々対応する必要があるのですが、その本人が将来どういう風に考えるかというのは予想がつかないという、それは確かにありますね。次にもう一ぺんちょっと戻して頂いて、性腺に関してやっぱりこれは性別を評価するときにはkey pointになるという風に皆さん考えていいですかね。

次に書いてある内性器の検索なのですよ。現在最も一般的な内性器の検索法と言うのはまず超音波でですね、膀胱の後ろに大きな子宮がないかどうか。エコーで分かりにくいのはMRIまで撮ることもありますけれども、その次は泌尿器科的に内視鏡をして欲しいと頼まれることもあるということですよ。

この内性器の検索ということですよ。まあ、早い時期にした方がいいという書き方で書いてありますけれども、これに関してはいかがですか。

泌尿器科というのは外科と違って簡単に内視鏡してもらえるとということで依頼されますが、我々もまず内視鏡で内性器を診てみましょうかという風に言うことが多いですけども。内視鏡所見をいろんなパラメーターのうちの1因子という風に考えるのか、内視鏡でこれが思ってもみなかった所見で、ちょっと非常に重要な所見だったというそういうことがこれまでございますでしょうか。

松本：あのやっぱりさっきの症例もそうなんですけれども、MGDで本当に男の子で良いか女の子が良いか悩む症例でやっぱり女の子を強く推す時には、やっぱり子宮があるかないかなのですよね。だから内視鏡でしっかりした子宮があれば、将来かなりfunction期待できるので、どの要素ひとつとっても決定打になるのは多分無いと思うのですけれども。

島田：我々外科なのでいろんな手技を持っていますので。もうひとつお聞きしたいのは、膣の開口部の位置はどののですか。膣開口部の位置。一般に言われているのは、これはもうすぐそこに膣が開いているから、膣口を作るのは簡単だという風なことをよく言われていましたが。

山口：先天性副腎過形成では尿生殖洞の長さを必ず内視鏡で確認しますね。単純なカットバックでいいのか、会陰部のフラップで形成すればいいのか、そうではないもっと複雑な方法を用いないといけないのか、そのためにも必ずします。

野口：実際7日以内にこれをするのかという問題ですが。生後7日で全麻かけて内視鏡をするケースも無いわけではないですけども、そんなに多くはないのではないかと思います。むしろ、少ないのではないかなと。

山口：ただ性が決まってない子どもだったら、やはり一度麻酔をかけてきちんと検査すると思いますけど。

宮里：私はせいぜいエコーくらいですね。

野口：だからそこまでにほぼ診断が決まってしまうたら行わないでしょ。やっぱり分からないという時だけのものじゃないかなと思うのですけれど。

松本：この指針案みたいになんかどうしても決めきれない症例に限られるのですよね。

野口：そうですね。ルーチンに7日目までに小児内分泌の先生から指針ではこうなっているからやっつてと言われても、ちょっと辛いものがあるような気がしますけれど。

島田：その下に14日までと書いてあるんですよね。

戸籍の提出期限というのは非常に重要だということで書かれているのだと思いますけれど。

野口：しかしです、ホルモン検査と染色体検査と画像検査があったら、性別はほぼ決まるのではない