

最小値を示した。表より EPP では遊離プロトポルフィリン (FEP または FP) が最大 19298 $\mu\text{g}/\text{dIRBC}$ を示した。CEP では FEP はあまり増量せず、亜鉛結合プロトポルフィリン (ZPP または ZP) の方がより増量していた。

健常者に対する比率を図 7 に示した。EPP と CEP では著しく異なっていることが分かる。

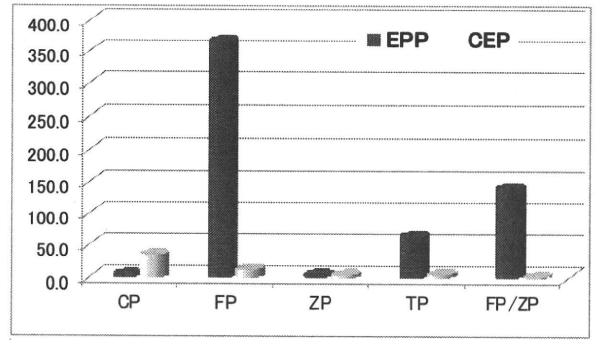


図 7. 赤芽球性ポルフィリン症の健常値の平均値に対する倍率
赤血球中のポルフィリンの健常者に対する倍率

	CP	FP	ZP	TP	FP/ZP
EPP	4.5	366.9	4.5	64.2	141.4
CEP	34.3	12.4	4.4	5.2	1.6

4. 糞便中のポルフィリン分析

表 5. 各種ポルフィリン症の糞便中のポルフィリンの平均値、標準偏差、最大値、最小値 ($\mu\text{g}/\text{g}$)

種別	UP	7P	6P	5I	5III	isoCP I	CPI	CPIII	HP	18.52	ZP	DP	23.7	MP	27.3	30.6	PP	Total
健常者	n 16	15	14	21	21	6	24	22	20	108	17	15	17	16	11	5	24	24
Mean	0.8	0.2	0.1	1.2	0.7	0.2	3.8	2.2	1.7	0.1	0.5	3.4	9.3	2.7	0.6	0.6	22.5	44.8
SD	1.0	0.3	0.0	0.9	0.7	0.2	2.5	1.6	1.5	0.6	0.5	5.9	19.9	3.8	0.8	0.4	26.1	47.5
Max	4.2	1.1	0.2	4.1	2.5	0.6	11.5	6.0	5.7	4.9	2.2	20.3	69.9	13.1	2.6	1.0	121.1	218.3
Min	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	1.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	8.0
AIP	n 7.0	4.0	4.0	4.0	4.0	2.0	10.0	9.0	7.0	75.0	1.0	3.0	3.0	7.0	2.0	2.0	10.0	10.0
Mean	6.0	0.8	4.0	2.2	1.5	0.1	9.4	2.5	2.0	0.1	0.2	0.4	2.4	1.1	0.5	0.6	18.3	44.8
SD	4.7	1.1	7.1	1.2	0.8	0.0	9.6	1.1	1.2	0.7	0.3	0.3	2.0	1.0	0.0	0.4	16.4	27.5
Max	12.6	2.4	14.6	3.5	2.7	0.2	35.1	4.0	3.9	5.5	0.2	0.7	4.0	3.0	0.5	0.9	54.8	93.6
Min	0.9	0.1	0.1	1.1	0.8	0.1	3.3	1.0	0.4	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.5	0.3	2.6	11.5
HCP	n 5.0	7.0	6.0	5.0	5.0	4.0	18.0	17.0	18.0	20.0	2.0	2.0	3.0	9.0	2.0	1.0	18.0	21.0
Mean	3.6	1.9	14.9	24.5	159.7	5.6	52.6	786.5	28.6	5.7	2.7	1.7	0.7	17.9	1.6	1.3	11.6	1035.7
SD	4.1	2.3	23.5	25.7	156.4	4.2	71.9	914.6	37.7	10.9	2.8	1.5	0.5	42.8	1.4	1.7	17.2	1259.6
Max	8.7	5.1	86.0	104.4	464.0	10.2	246.4	3359.6	142.4	48.8	4.7	2.8	1.2	131.6	2.6	1.3	72.0	4233.8
Min	0.1	0.1	0.4	1.6	8.6	0.9	1.5	9.7	1.7	0.0	0.7	0.6	0.4	0.1	0.5	1.3	0.0	0.0
VP	n 6.0	7.0	6.0	5.0	5.0	4.0	12.0	11.0	11.0	14.0	3.0	4.0	7.0	9.0	3.0	3.0	12.0	12.0
Mean	6.9	8.9	22.5	25.9	53.2	5.6	56.5	168.2	85.2	20.7	28.3	27.0	30.5	55.8	20.7	4.7	35.6	914.8
SD	8.2	20.3	49.6	38.0	70.4	7.0	70.9	220.9	95.1	30.1	23.5	36.6	46.9	41.6	22.2	5.9	33.7	880.2
Max	22.6	50.3	123.6	118.4	190.8	23.8	44.4	731.2	275.6	102.4	43.4	78.0	135.6	134.2	44.8	11.5	103.2	3103.9
Min	0.7	0.1	0.2	0.4	0.8	2.0	1.2	1.4	0.0	1.2	0.4	4.2	0.4	1.0	1.0	26.1	49.2	
PCT	n 14.0	7.0	6.0	5.0	5.0	4.0	21.0	12.0	8.0	44.0	2.0	2.0	2.0	19.0	1.0	2.0	21.0	21.0
Mean	23.7	9.1	68.0	10.6	7.2	12.7	21.6	7.1	5.5	2.7	0.0	4.4	16.6	3.4	0.1	27.7	14.0	204.3
SD	42.1	15.1	98.5	8.5	6.9	9.0	19.5	9.1	9.2	8.0	5.5	19.6	2.5	3.9	0.1	39.0	15.9	247.8
Max	162.6	60.4	304.0	20.5	14.0	21.6	60.3	29.9	28.1	50.0	8.2	30.5	7.3	0.1	55.3	68.6	1029.7	
Min	0.6	0.1	0.0	0.6	0.2	0.1	1.2	0.7	0.6	0.0	0.5	2.7	0.0	0.1	0.1	1.1	5.5	
EPP	n 16.0	15.0	14.0	15.0	15.0	4.0	32.0	29.0	27.0	61.0	13.0	13.0	14.0	29.0	12.0	10.0	35.0	61.0
Mean	1.0	0.2	1.1	1.9	9.5	0.8	6.9	24.7	33.1	2.3	16.0	20.6	7.8	9.1	3.0	5.8	814.9	520.0
SD	0.9	0.4	1.9	2.9	21.6	1.1	10.5	75.1	65.1	7.8	28.9	49.1	9.5	15.2	4.1	10.3	2901.6	2327.7
Max	3.5	1.8	7.2	11.5	78.5	2.4	44.9	299.0	337.2	55.3	99.7	178.0	30.0	64.4	12.2	31.1	17258.0	18011.9
Min	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.2	0.0
CEP	n 1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	8.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mean			20.4				2167.6	390.4	18.1	0.4				32.0			33.7	3091.6
SD									1.3									
Max			20.4				2167.6	390.4	18.1	3.6				32.0			33.7	3091.6
Min			20.4				2167.6	390.4	18.1	0.0				32.0			33.7	3091.6

表 6. 各種ポルフィリン症の糞便中ポルフィリンの平均値

種別	UP	7P	6P	5I	5III	isoCP I	CPI	CPIII	HP	18.52	ZP	DP	23.7	MP	27.3	30.6	PP	Total
健常者	0.8	0.2	0.1	1.2	0.7	0.2	3.8	2.2	1.7	0.1	0.5	3.4	9.3	2.7	0.6	0.6	22.5	44.8
AIP	6.0	0.8	4.0	2.2	1.5	0.1	9.4	2.5	2.0	0.1	0.2	0.4	2.4	1.1	0.5	0.6	18.3	44.8
HCP	3.6	1.9	14.9	24.5	159.7	5.6	52.6	786.5	28.6	5.7	2.7	1.7	0.7	17.9	1.6	1.3	11.6	1035.7
VP	6.9	8.9	22.5	25.9	53.2	5.6	56.5	168.2	85.2	20.7	28.3	27.0	30.5	55.8	20.7	4.7	35.6	914.8
PCT	23.7	9.1	68.0	10.6	7.2	12.7	21.6	7.1	5.5	2.7	0.0	4.4	16.6	3.4	0.1	27.7	14.0	204.3
EPP	1.0	0.2	1.1	1.9	9.5	0.8	6.9	24.7	33.1	2.3	16.0	20.6	7.8	9.1	3.0	5.8	814.9	520.0

表 7. 各種ポルフィリン症の糞便中ポルフィリンの平均値の健常者に対する倍率

種別	UP	7P	6P	5I	5III	isoCP I	CPI	CPIII	HP	18.52	ZP	DP	23.7	MP	27.3	30.6	PP	Total
AIP	7.1	4.2	68.5	1.8	2.3	0.9	2.5	1.1	1.2	0.7	0.5	0.1	0.3	0.4	0.8	1.0	0.8	1.0
HCP	4.2	10.1	257.5	19.8	235.2	35.0	13.9	359.7	16.4	38.9	5.7	0.5	0.1	6.6	2.5	2.0	0.5	23.1
VP	8.3	47.5	390.4	20.9	78.3	0.0	14.9	76.9	49.0	142.5	59.9	7.9	3.3	20.6	33.2	7.4	15.8	20.4
PCT	28.3	48.5	1178.6	8.5	10.6	79.0	5.7	3.3	3.2	18.8	0.0	1.3	1.8	1.2	0.1	44.1	0.6	4.6
EPP	1.2	1.3	18.6	1.5	14.0	5.0	1.8	11.3	19.0	16.1	33.8	6.1	0.8	3.4	4.7	9.3	36.1	11.6

表5に糞便中のポルフィリンの平均値、標準偏差、最大値、最小値を示した。また、表6に各病型のポルフィリン症の平均値をまとめて示した。表7は健常者に対する比率を示した。糞便中には主に脂溶性のポルフィリンとして2カルボキシルポルフィリンが出現する。COPROは水溶性、脂溶性の両方の性質を持ち、糞便中にも出現する。しかし、PCTなどポルフィリン症によっては体液中の水溶性ポルフィリンも出現する。これらをまとめたのが図8および9である。

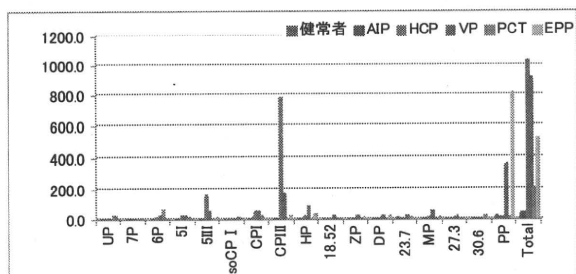


図8. 各種ポルフィリン症の糞便中ポルフィリンの平均値

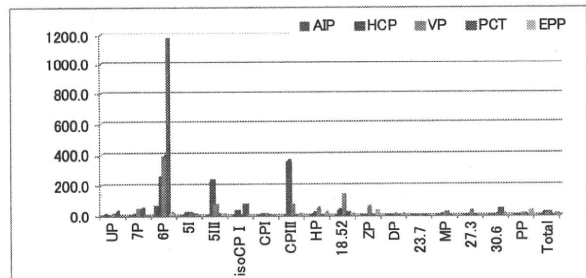


図9. 各種ポルフィリン症の糞便中ポルフィリン平均値の健常値に対する倍率

図10は各種ポルフィリン症の総ポルフィリンに対する健常値に対する比率を示した。AIP, HEP, VP, PCT, EPPは、それぞれ健常者の平均値の1.0、23.1、20、4、4、6、11.6倍であった。

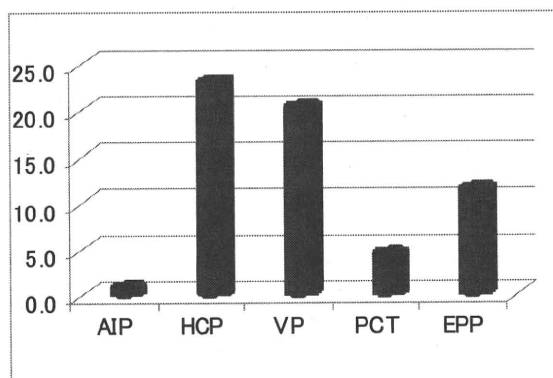


図10. 各種ポルフィリン症の健常値に対する倍率

5. その他のポルフィリン代謝異常症

化学的ポルフィリン症の代表として鉛中毒の尿中ポルフィリンのHPLCパターンを図11に示した。

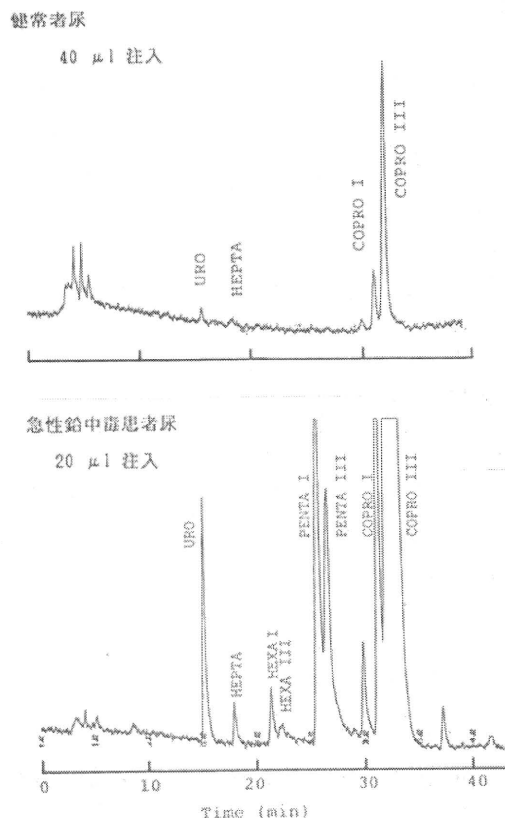


図11. 鉛中毒の尿中ポルフィリンのHPLC

鉛中毒ではCP IIIが以上の増量し、他の遺伝性ポルフィリン症と異なったパターンを呈する。その他、肝硬変症、肝がんなどの肝臓疾患、鉄欠乏性貧血症や鉄芽球性貧血症などの血液疾患、代謝亢進、内分泌性疾患など多くの疾患で、また、鉛や水銀などの重金属中毒、ダイオキシンやPCBなどの多芳香族ハロゲン化合物、フェノバルビタール、セドルミド、グリセオフルビン、カルバマゼピン等多くの医薬品によって体内のポルフィリン代謝の異常が起こることが知られ、これらの病態生化学機序解明にもポルフィリンの測定は重要である。

D. 考察、結論

以上の結果、ポルフィリン症の診断には典型的な臨床症状に加えて、生化学検査データが以下の値をとることによって診断することを提言する。

1. 急性ポルフィリン症の生化学診断基準案

AIP :

- 1) 尿中 ALA : 正常値の 3~90 倍 (平均約 20 倍)
- 2) 尿中 PBG : 正常値の 10~270 倍 (平均約 90 倍)

HCP :

- 1) 尿中 ALA : 正常値の 1.5~50 倍 (平均約 8 倍)
- 2) 尿中 PBG : 正常値の 2~70 倍 (平均約 25 倍)
- 3) 尿中 CP : 正常値の 3~800 倍 (平均約 160 倍)
- 4) 糞中 CP : 正常値の約 360 倍

VP :

- 1) 尿中 ALA : 正常値の 1.5~10 倍 (平均約 5 倍)
- 2) 尿中 PBG : 正常値の 1.5~20 倍 (平均約 10 倍)
- 3) 尿中 UP : 正常値の 2~500 倍 (平均約 80 倍)
- 4) 尿中 CP : 正常値の 4~80 倍 (平均約 25 倍)
- 5) 糞 CP、PP : 正常値の約 80 倍、16 倍

2. 皮膚型ポルフィリン症の生化学診断基準案

EPP :

- 1) 赤血球中 PP : 正常値の 15~1540 倍 (平均約 370 倍)

PCT :

- 1) 尿中 UP : 正常値の約 6~950 倍 (平均約 180 倍)
- 2) HEPTA : 正常値の約 10~2400 倍 (平均約 300 倍)

CEP

- 1) 尿中 UP I : 正常値の 35~11000 倍 (平均約 4000 倍)
- 2) 尿中 CP I : 正常値の 60~2000 倍 (平均約 700 倍)
- 3) 血液中 CP I : 正常値の約 30 倍

F. 研究発表

1. 論文・著書など発表

- 1) 近藤雅雄 : 5-アミノレブリン酸の機能性と
その利用、食品と開発、45 (8) : 7-9
- 2) 近藤雅雄 : ポルフィリン症、季刊健康、秋号、
彩風舎、2010
- 3) 近藤雅雄 : ポルフィリンおよび前駆体、臨床
検査ガイド 2009~2010~これだけは必要な検
査のすすめかた・データのよみかた、印刷中、
文光堂、2011.

2. 学会発表

- 1) 近藤雅雄、堀江裕、前田直人、川原繁、川
田暁、中野創、高村昇、大門真、上出良一、
井上克司 : 遺伝性ポルフィリン症の全国疫学
調査並びに診断・治療法の開発に関する研究、
第 37 回ポルフィリン研究会、東京、2010. 4.
17
- 2) 鈴木進一、臼田寛、河野公一、堀江裕、近藤
雅雄、網中雅仁、工藤吉郎 : 急性間欠性ポル
フィリン症 (AIP) と異型ポルフィリン症 (VP)
2 家系のその後について、第 37 回ポルフィリ
ン研究会、東京、2010. 4. 17
- 3) 前田直人、村脇義和、堀江裕、近藤雅雄 : 急
性間欠性ポルフィリン症における遺伝子解析
の意義、第 37 回ポルフィリン研究会、東京、
2010. 4. 17
- 4) 前田直人、村脇義和、堀江裕、近藤雅雄 : 急
性間欠性ポルフィリン症における遺伝子解析
の意義、第 18 回肝病態生理研究会、2010. 5. 26
- 5) 前田直人、村脇義和、堀江裕、近藤雅雄 : 急
性間欠性ポルフィリン症における遺伝子解析
の意義、第 46 回肝臓学会、山形、2010. 5. 27、
肝臓 vol151. Suppl (1) : A191, 2010
- 6) 川原繁、川田暁、上出良一、中野創、前田直
人、高村昇、近藤雅雄 : 皮膚ポルフィリン症
に関する全国疫学調査結果報告 (第一報)、第
32 回光医学・光生物学学会、2010. 7. 31, p92
- 7) 近藤雅雄 : 日本のポルフィリン症、第 34 回

日本鉄バイオサイエンス学会学術集会シンポジウム、シンポジウム1「日本のポルフィリン症」、プログラム・抄録集、p.20、東京 2010. 9. 11

- 8) 近藤雅雄：晩発性皮膚ポルフィリン症と鉄代謝、第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術

集会シンポジウム、シンポジウム1「日本のポルフィリン症」、プログラム・抄録集、p.21、東京 2010. 9. 11

- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

皮膚型ポルフィリン症の遺伝子変異検出法の開発および実態

研究分担者 中野 創 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座准教授

研究要旨

本邦においては遺伝性ポルフィリン症の遺伝子診断による確定診断が十分なされておらず、患者実数の把握、病態解明あるいは遺伝カウンセリングにおいて支障をきたしている。そこで、皮膚型ポルフィリンの症例を収集し、分子遺伝学的解析を行った。その結果、本邦の骨髄性プロトポルフィリン症では依然新たな遺伝子変異が見つかり、遺伝子診断の重要性が確認された。また、従来の方法では変異検出が困難な症例において、新規のエクソン定量解析を行い、エクソン欠失を証明し得た。異型ポルフィリン症および遺伝性コプロポルフィリン症の遺伝子診断も行い確定診断を得たが、両疾患は臨床的に区別することが困難であり、遺伝子診断による確定診断が必須であると考えられる。

A. 研究目的

遺伝性ポルフィリン症は先天的なポルフィリン代謝の異常により生じる、非常にまれな遺伝性疾患である。本症は8病型に分類されてきたが、近年、アミノレブリン酸合成酵素2型の異常による骨髄性プロトポルフィリン症も知られ、9病型になった。これらは臨床的に皮膚の光線過敏症状を主とする皮膚型ポルフィリン症と急性の神経症状を主とする急性ポルフィリン症とに大別される。これらの病型の中には遺伝子診断を行わなければ、確定診断が難しいものも含まれる。現在、全ての病型で原因遺伝子が明らかになっているが、本邦においては散発的に遺伝子変異検索が行われてきたが、十分にされているとは言いがたく、患者実数の把握、病態解明あるいは遺伝カウンセリングにおいて著しく支障があった。そこで昨年度の厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業において、骨髄性プロトポルフィリン症（EPP）20家系について分子遺伝学的検索を行い、以下のことを明らかにした；1）20家系中15家系でFECH遺伝子変異が同定できたが5家系では変異が確認できなかった。2）2家系において未発症の潜在的患児を検出した。3）発症を規定する遺伝子多型IVS3-48Cの頻度が欧米人に比して日本人では7倍高く、本邦における本疾患の罹患率が高いことが推定された。4）遺伝子診断で変異が同定出来なかった症例の一部でフェロケラターゼ（FECH）酵素活性の低下を生化学的に確認し、確定診断し得た。また、異型ポルフィリン症（VP）2家系についてプロトポルフィリノーゲン酸化酵素遺伝子の変異を同定し、診断を確定した。

以上の結果をふまえ、本年度は1）さらに症例を収集し、遺伝子変異の性質と病態と

の関係を分析し、遺伝子診断の妥当性を検証する。2) 変異を同定し得なかった EPP 症例において、新規の変異検索法による解析を行う。

B. 研究方法

皮膚型ポルフィリン症患者ならびに家族の末梢血 DNA を採取し、PCR 法を用いて疾患原因遺伝子を増幅し、オートシーケンサーで塩基配列を決定した。一部の症例では末梢血白血球由来 RNA を採取し、一次構造解析を行った。また、ゲノム DNA における当該遺伝子のエクソンのコピー数を定量するために、MLPA 法を用いて解析を行った。遺伝子変異解析にあたって、倫理面ではヘルシンキ宣言や、政府および関連学会が制定した遺伝子解析に関するガイドライン等を順守した。また、研究実施施設における倫理委員会の承認も得た。

C. 結果および考察

1) 本研究で新たに 11 家系の EPP 症例を収集し、FECH 遺伝子変異解析を行った。その結果、9 家系で FECH 遺伝子に変異を同定し得た。そのうち新規変異は 5 例であった。また、昨年度同様イントロン 3 に存在する遺伝子多型 IVS3-48C が発症を規定していることが確認された。ゲノム DNA レベルで変異が同定できなかった症例において、RNA の一次構造解析を行ったところ、エクソン単位での欠失が明らかになり、さらに今回新たに MLPA 法を用いてゲノム DNA における当該エクソンのコピー数を定量したところ、健常人が 2n であったのに比較して症例では n と半分になっており、ゲノム DNA レベルでエクソンが欠失しているこ

とが明らかになった。

2) 臨床的に皮膚ポルフィリン症が疑われた 2 症例について遺伝子診断を行い、それぞれ VP、遺伝性コプロポルフィリン症 (HEP) であることが判明した。

D. 結論

1) EPP の遺伝子診断では依然新規の変異が同定されており、症状の程度、特に予後を左右する肝障害と変異の種類との関係が明らかでないため、さらに症例を収集し、解析を行う必要があるといえる。また、今年度導入した MLPA 法によって、従来検出不能であったゲノム DNA レベルでのエクソン欠失を同定し得るようになったため、これまで変異を検出できなかった症例については今後、遺伝子変異を明らかにできる可能性が大であると期待できる。

2) 臨床的にポルフィリン症であることは間違いないが、従来の生化学的手法によっても病型分類が成し得なかった 2 症例について、遺伝子診断で確定診断を得ることができた。VP、HCP とともにまれな病型であるため、正確な診断がなされていない症例が潜在している可能性が高く、ポルフィリン症の遺伝子診断による病型確定は今後の必須検討課題と言える。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) Hajime Nakano. Genetic analysis in Japanese families with erythropoietic protoporpyria. International Symposium: Treatment, from DNA to Stem cell. June 12,

2010. Keimyung, Korea.

2) 中野 創. ポルフィリン症の遺伝子診断. 平成 22 年度北陸地方会生涯教育講演会. 平成 22 年 6 月 27 日、金沢市.

3) 中野 創. 骨髄性プロトポルフィリン症の遺伝子変異解析. 第 32 回日本光医学・光生物学会 . 平成 22 年 7 月 30 日、東京.

3. 著書

1) ポルフィリン症. 小児科臨床ピクシス. 馬場直子編. 中山書店、東京. 2010、 p66-67.

F. 知的財産の出願・登録状況

なし。

EPP患者の遺伝子診断に関する研究

研究分担者 竹谷 茂 京都工芸繊維大学教授

研究要旨

1 EPP 家系の遺伝子診断を行った結果、湯本らによってすでに報告があった Ferrochelatase 遺伝子の T555C (I186T) 変異の患者と同じ変異を有することが分った。また 5 EPP 家族のすべての正常遺伝子型が IVS3-48C に相当することを確かめた。さらに、IVS3-48C/T 型による ferrochelatase 活性の違いを測定した所 IVS3-48T/T > IVS3-48C/T > IVS3-48C/C の順に低くなり、IVS3-48C/C の活性は IVS3-48T/T のその約 35% であった。その結果 IVS3-48 型での活性の低さが EPP 発症につながる事が分った。さらに日本人は IVS3-48C が約半数に達し日本人は EPP 発症率が他の人種に較べて高いことが分った。

A. 研究目的

ポルフィリア症の中でも、本邦で最も症例数の多い EPP 患者の ferrochelatase 遺伝子の変異を明らかにして、全国患者の遺伝子変異の関連を調べる。

B. 研究方法

ヒト ferrochelatase 遺伝子解析は末梢血から分離したゲノム DNA を用いて、ferrochelatase 遺伝子の各 Exon を挟んだ primer で PCR を行って、それぞれの Exon 部分を増幅した後、DNA シークエンスを決定した。酵素活性はヒト末梢血リンパ球の細胞懸濁液を用いて、亜鉛-プロトポルフィリンの生成量を PLC を用いて分析した。

（倫理面への配慮）

全ての EPP 患者およびその家族の血液の採取

にはインフォームドコンセントを実施した。

C. 研究結果

EPP 患者の ferrochelatase 遺伝子の変異は T555C (I186T) であることが分った。また患者の正常側 allele の Ferrochelatase 遺伝子のイントロン 3 の -48C (IVS3-48C) が発症の原因かどうかを調べた結果、EPP 5 家族の患者のすべての遺伝子型が IVS3-48C に相当することを確かめた。さらに、IVS3-48C の変異による発症の原因を調べるために、正常人 (30 人) の末梢血リンパ球での Ferrochelatase 活性を遺伝子型との違いで比較した。その結果 IVS3-48T/T > IVS3-48C/T > IVS3-48C/C の順に低くなり、IVS3-48C/C の活性は IVS3-48T/T のその約 35% であった。

D. 考察

今回調べたEPP患者の遺伝子変異はYumotoらによって以前に報告があったI186T変異の患者と同じ変異を有することが分った。また、発症の有無は本遺伝子型の違いによってFerrochelatase活性が異なり、IVS3-48型での活性の低さがEPP発症につながる事が分った。さらに日本人140人の遺伝子型を調べた所IVS3-48Cは約半数に達し日本人はEPP発症率が他の人種に較べて高いことが分った。しかしEPPにおける肝障害を伴う重症の分子的機構については依然として不明である。Ferrochelataseの基質が二価鉄であり、ポルフィリン代謝と鉄代謝の調節の要に位置しているのでEPP患者におけるポルフィリンの蓄積の個人差にはミトコンドリアでの鉄利用の違いが関連するとも考えられる。

E. 結論

我国ではEPPを発症する危険性が高い、難病克服に向けて更なる分子的な解析が必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 竹谷 茂、遺伝子発現調節のリガンドとしてのヘムの機能 ビタミン (2010) 84 (3) 123-127.
2. Tahara, T., Yamamoto, M., Akagi, R., Harigae, H. & Taketani, S. The low expression allele (IVS3-48C) of the ferrochelatase gene leads to the low enzyme activity associated with erythropietic protoporphyria. (2010) Int. J. Hematol. 92:769-771.
3. Chau TT, Ishigaki M, Kataoka T, Taketani S. Porcine Ferrochelatase: The Relationship between

Iron-Removal Reaction and the Conversion of Heme to Zn-Protoporphyrin. (2010) Biosci Biotechnol Biochem. 74(7): 1415-1420.

2. 学会発表

1. 竹谷 茂 ポルフィリン症と鉄代謝、第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、2010.9、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

急性ポルフィリン症治療の啓発、及び、その1型である異型ポルフィリン症の病因遺伝子異常解析

研究分担者 大門 真 山形大学医学部内科学第三講座准教授

研究要旨：急性ポルフィリン症治療の啓発、及び、異型ポルフィリン症の病因遺伝子異常解析

急性発作を主症候とする急性ポルフィリン症は、死亡にもつながる疾患であり、発症時速やかに、治療される必要がある。そこで、一般医家に、本疾患の診断及び治療に関する情報を、容易にアクセス出来る型で提供する事とし、遺伝性ポルフィリン症ホームページ(<http://www.med.kindai.ac.jp/derma/index2.html>)に医療者向けとして治療について掲載した。また、本症の1型である、異型ポルフィリン症(VP)の病因遺伝子異常の解析システムの構築を目的とし、解析に必要なプライマー、及び、患者の染色体DNAの準備を行い、実際の症例で、その有用性を確認する準備が出来た。

A. 研究目的

急性発作を主症候とする急性ポルフィリン症は、診断を誤り適切な治療を行わなかった場合、死亡にもつながる疾患であり、発症時速やかに、治療される必要がある。しかしながら、本症の有病率は高く無く、一般的な医療関係者には馴染みの無い疾患で有り、診断が遅れる、あるいは、間違った診断をされる事が少なからず見られる。また、診断が、なされた場合も、治療法に苦慮される事も多く見られる。

研究1) そこで、一般医家に、本疾患の診断及び治療に関する情報を、容易にアクセス出来る型で提供する事とした。

研究2) また、治療を早期に行う、あるいは、発症を予防するという見地に立てば、発症前に診断することが望まれるが、一般

生化学的及び血液学検査では不可能なことも多く、遺伝子診断は不可欠である。しかしながら、本疾患の病因遺伝子異常には特定のものがなく、症例家系毎に異なる病因異常をもっていると考えても過言ではない程であり、診断を確実にを行うには、家系毎に病因遺伝子異常の解析を行う必要があるが、解析の技術、時間および経費がかかることが大きな問題であり、これまでは、一般的な方法としては行われていない。私達は、今回、異型ポルフィリン症(VP)の病因遺伝子異常の解析システムの構築を目的とした。

B. 研究方法

研究1) 種々の関連ウェブサイト、及び、教科書より、急性ポルフィリン症に関

する記述を抽出し、解説を加えた、実臨床ですぐに参考になる型にまとめる。

研究 2) 異型ポルフィリン症(VP)の病因遺伝子(プロトポルフィリノゲンオキシデース(PPOX)遺伝子)の全エクソン、付随するイントロン部分およびプロモーター領域を PCR 直接シーケンシング法および PCR-クローニング-シーケンシング法にて解析し、正常塩基配列と比較する事により病因遺伝子異常を見つける方法を構築すべく、

準備を進めている。必要なプライマーは、図 1 の様に設計した。本解析法を用いて解析する予定の VP の 1 症例(症例: 58 歳男性。光線過敏性皮膚炎を主訴に来院。糞便中プロトポルフィリン、コプロポルフィリンの高値から本症と診断された。)より、DNA を抽出し、病因遺伝子異常の解析を進める。

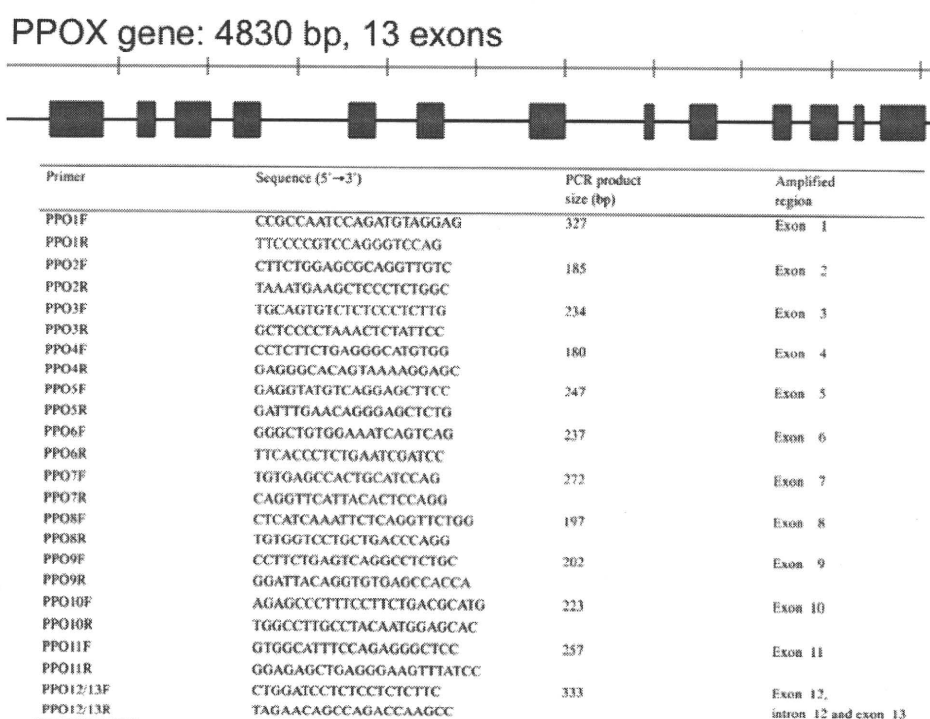


図 1. 異型ポルフィリン症病因遺伝子(PPOX gene)の解析に用いるプライマー

C. 研究結果及び考案

研究 1) 遺伝性ポルフィリン症ホームページ (<http://www.med.kindai.ac.jp/derma/index2.html>) に医療者向けとして治療について載せた。

研究 2) 解析に必要なプライマー、及び、患者の染色体 DNA の準備を整えた。

D. 考察

研究 1) Web 上でアクセスできる型で、急性ポルフィリン症の治療について提示できたことは、治療法の啓発につながると思われた。

研究 2) 解析システムが確立されれば、多くの症例で遺伝子解析が可能となる。本解析システムの構築は実臨床に役立つと思

われた。

E. 結論

研究 1) 医療者向けの急性ポルフィリン症治療の方法について、Web 上で掲示した。

研究 2) 異型ポルフィリン症の遺伝子解析を行う方法を整え、実際の症例で、その有用性を確認する準備が出来た。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

急性ポルフィリン症の遺伝子解析

研究分担者 前田 直人 鳥取大学医学部講師

研究要旨

本研究では本邦の急性間欠性ポルフィリン症（AIP）の実態解明に寄与することを目的に、AIPの責任酵素であるハイドロキシメチルビレンシンターゼ（HMBS）の遺伝子解析を行った。数年来の急性発作を繰り返したのち四肢麻痺および球麻痺を来してAIPが疑われた症例を解析した結果、HMBS遺伝子に酵素活性の低下をもたらすと考えられる変異が同定された。さらに、同意を得てその家系に対してDNAを解析した結果、HMBS変異は父方由来であり患者の未発症の父と兄にも同一の変異が検出された。AIPにおける遺伝子解析は診断の確定のみならず、家系内保因者の早期発見や将来の発症予防にも有効であることが示された。こうした結果をもとに、ポルフィリン症者の情報源として立ち上げられつつある当研究班のポルフィリン症ホームページにおいて、「AIPの診断」に関する情報として提供した。

A. 研究目的

急性間欠性ポルフィリン症（AIP）は、ヘム合成系酵素のひとつであるハイドロキシメチルビレンシンターゼ（HMBS）の活性低下により前段階の δ -アミノレブリン酸やポルフォビリノゲンが体内に過剰蓄積し、それらの有する神経毒性によって急性症状や神経障害を呈する遺伝性疾患である。分担研究者は本研究全体の中において、本邦AIP症例についてHMBS遺伝子を解析するとともにDNAレベルでの家族解析を行い、診断の確定とその家系内未発症保因者の発掘を通じて、本邦AIPの実態解明に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

数年来の急性発作を繰り返したのち四肢麻痺および球麻痺を来してAIPが強く疑われた長崎県症例を遺伝子解析した。遺伝子解析の方法として、末梢血DNAを用いてHMBS遺伝子の各エクソン（1-15）を含む領域それぞれにつきPCR増幅を行ったのち、オートシーケンサーにより塩基配列を決定し、変異の有無を確認した。

（倫理面への配慮）

- 1) データの管理・保管について

患者および医師の個人名など、個人情報に関わる情報と測定データは別途管理している。プライバシーに関わる情報は紙の場合は鍵のかかる保管庫で管理しており、電子媒体による情報は研究分担者個人のパーソナルコンピュータ上およびフラッシュメモリでのバックアップにて管理している。研究の終了と同時に、必要に応じてシュレッダーにより裁断、あるいは電氣的に消去する予定である。なお、測定データの管理は個人が特定できないようにID番号等で管理している。

2) インフォームド・コンセントについて

本研究における遺伝子解析にあたっては、あらかじめ本研究の目的・内容・方法について記載された「説明書」、「同意書」および「同意撤回書」を作成しているが、例外として、患者側から遺伝子解析依頼のあった場合にはそれぞれの担当主治医から患者本人または家族の同意を得ていただくことも認めている。患者及び家族の解析結果については本疾患が遺伝性疾患であることを鑑みて、当人の要求があった場合には担当主治医を介してのみ報告するものとし、それ以外の方法では一切報告していない。

C. 研究結果

本研究で確認されたHMBS遺伝子変異はエクソン10: 517C→T (R173W) およびエクソン10: 606G→T (polymorphism) であり、前者によるアミノ酸置換がHMBS酵素活性低下に影響したものと推測された。この変異は、1998年にわれわれが解析した島根県のAIP症例にみられた変異と偶然に一致していた。さらに、

同意の得られた本症例の家族に対してDNA解析を行ったところ、患者の父親および兄(いずれもAIP未発症)に同様の変異が認められた。この結果は、本研究で得られたこれまでの結果とともに当研究班によるポルフィリン症ホームページにおいて「AIPの診断」に関する情報として提供することができた。

D. 考察

前年度の当研究班の研究成果から、本邦AIP症例のHMBS遺伝子変異には、わが国特有の、いわゆるホットスポットといえるような変異はなく、各家庭でそれぞれ異なる変異をもつことが示されている。また、AIPにおける遺伝子解析は、診断の確定のみならず、家系内保因者の早期発見や将来の発症予防、あるいは変異がないことの確認により患者家族の精神的苦悩の除去にも有効であると考えられる。

AIP症例もしくはその疑診例に対するHMBS遺伝子解析は、従来より生化学的手法により行なわれ、その結果判定に疑診、いわゆるグレイゾーンがあったAIP診断の欠点を克服し、もはやAIP診断のgold standardと考えてよいと思われる。ただし、遺伝子変異は発症の必要条件ではあるが、変異をもつ個体が必ずしも発症するわけではなく、患者にとっては十分条件(後天的因子、すなわち環境因子の関与が想定される)についても今後さらに検討がなされ、ポルフィリン症ホームページなどで逐次情報公開されてゆくことが必要となろう。

一方、現在の遺伝子解析は、1症例につきHMBS遺伝子の各エクソン一つ一つについて塩基配列を決定してゆくという方法でしか行えないため、疾患スクリーニングを目的とした場合には遺伝子解析はきわめて非効率的な手段であるといわざるをえない。しかしながら、遺伝子解析の煩雑な手法に対しては現時点で解決策はなく、今後ともこの手技を変更することはできず、また、解析可能な施設も限られると思われる。疾患スクリーニングについては、現在の生化学的方法を凌駕する、より正確でより効率的な方法の開発が望まれる。

本研究では引き続いて順次遺伝子解析を行ってゆく方針であるが、現時点ではその数は昨年度の実績を加味してもまだ8家系15症例にとどまる。国際的に変異部位などの比較が可能と考えられる20家系以上の解析を目標としているので解析症例数の達成率としてはまだ満足できるものではないが、もともと発生頻度の少ない疾患であり、解決法として、今後も継続して地道に症例を集積しながら研究を行ってゆく必要がある。幸い、本研究分担者には国内各地からAIPが疑われる症例の遺伝子解析の依頼が相次いでおり、解析可能症例数はさらに増えると期待される。

E. 結論

本研究では本邦AIP1家系4症例を解析しえた。AIPにおける遺伝子解析は診断の確定のみならず、家系内保因者の早期発見や将来の発症予防、あるいは変異がないことで患者家族の精神的苦悩の除去にも有効であることが

確認された。また、この結果をふまえてポルフィリン症ホームページにおいて新しい情報を提供することができた。

先頃来報道された鳥取県のプロトポルフィリン症の兄弟例でも知られたように、ポルフィリン症は患者のQOLを著しく損なわしめ、また疾病に対する根本的治療はいまだなく、適切な対処がなされない場合には重篤な後遺症を残し、あるいは致命的ともなりうる。このため、本症と診断された患者たちは不安な日々を過ごすことを余儀なくされている。本研究を次年度以降も継続し、この難治性疾患の克服に向けて研究を一步でも前進させてゆく必要がある。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書を参照)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 前田直人. 急性間欠性ポルフィリン症. 山口 徹、北原光夫、福井次矢 総編集. 今日の治療指針. 医学書院、東京. 2010、pp605-606.
- 2) 前田直人. ポルフィリン症. 村脇義和 監修、向坂彰太郎、孝田雅彦 編集. 遺伝性肝疾患. 中外医学社、東京. 2010、pp164-172.
- 3) 堀江 裕、前田直人. 急性間欠性ポルフィリン症の長期経過観察例. 村脇義和 監修、向坂彰太郎、孝田雅彦 編集. 遺伝性肝疾患. 中外医学社、東京. 2010、pp182-184.
- 4) 前田直人、村脇義和、堀江 裕、近藤雅雄. 急性間欠性ポルフィリン症における遺伝子解析の意義. 薬理と臨床 38:S189-S192, 2010.

2. 学会発表

- 1) 前田直人, 急性間欠性ポルフィリン症における遺伝子解析の意義 (奨励賞受賞講演) .
第37回ポルフィリン研究会学術集会 (2010年4月、神奈川)
- 2) 前田直人、村脇義和、堀江 裕、近藤雅雄.
急性間欠性ポルフィリン症における遺伝子解析の意義. 第46回日本肝臓学会総会 (2010年5月、山形)

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

遺伝性ポルフィリン症の光線過敏に対する新規治療薬の開発と有用性の検討

研究代表者: 川田 暁 近畿大学医学部皮膚科
研究分担者: 上出 良一 慈恵医大第三病院皮膚科
川原 繁 近畿大学医学部皮膚科

研究要旨

遺伝性ポルフィリン症の主な臨床症状である光線過敏に対する新規治療薬の開発を行った。2種の化粧料の組み合わせが光線防御効果を有することがわかった。実際に9例の遺伝性ポルフィリン症患者に使用してもらい、その有効性と安全性を確認できた。

A. 研究目的

遺伝性ポルフィリン症のうち骨髄性プロトポルフィリン症と先天性骨髄性ポルフィリン症では、主な臨床症状として光線過敏が重要である。光線過敏は患者にとってきわめて苦痛をもたらすものであり、QOLを低下させる。特に青少年患者では屋外及び社会活動が制限されるため、光線過敏に対する治療薬が望まれてきた。本研究では、遺伝性ポルフィリン症の光線過敏の新規治療薬を開発することを目的とする。

B. 研究方法

光線過敏の治療薬としては、光に当たっても症状を出現させない予防的なものが望ましい。そこで、ポルフィリンに吸収されて様々な有害事象を起こす光を防御する外用剤を開発し、その有用性を検討する。

まずポルフィリン症において有害な光が

410 nmの可視光であることはすでに知られている。この光を防御する指数の算定方法は平成21年度にすでに開発した。この方法を用いて、すでに市販されている光防御効果をもつ化粧料の評価を行い、比較検討する。次に、この方法で検討した化粧料のうち、最もポルフィリン症の有用と思われるものを、実際に患者に使用してもらい、その効果・安全性を検討する。

使用する試料は、既に市販されているものであり、安全性と有用性が確認されている。また多くの正常人において日常的に使用されていて、安全性が担保されているため、倫理的には問題が生じない。

C. 研究結果及び考察

まず昨年開発した、410 nm光を防御する指数の算定方法を用いて、すでに市販されている光防御効果をもつ4種類の化粧料の

評価を行った。そしてポルフィリンに対する防御指数を算定した。その結果、防御指数の高い試料1と2の重層法が有効であり、その防御指数が5-7であると算定された。この結果から、光防御を有する化粧品2種の組み合わせ外用法が実際の遺伝性ポルフィリン症患者へ応用できることが示唆された。

次にポルフィリン症患者に対して実際に使用してもらい、その有効性と安全性を評価した。試料を6ヵ月以上使用した、ポルフィリン症患者9例について検討した。その内訳は男性6例、女性3例、年齢は14-38歳(平均22.3歳)であった。疾患としては7例が骨髄性プロトポルフィリン症、1例が多様性ポルフィリン症、1例が先天性赤芽球性ポルフィリン症であった。通年で使用したのが5例、夏に使用したのが2例、強い日差し時に使用したのが3例であった。実際の防御効果では症状消失が6例、症状が出現するまでの露光時間が2倍になったものが2例、1.25倍になったものが1例であった。効果判定では、有効が5例、やや有効が3例、効果が少なかったものが1例であった。無効例はなかった。また副作用は全例で認めなかった。患者満足度では、満足が5例、やや満足が2例、不満が2例であった。また全例が今後も継続使用を希望した。

D. 評価

1) 達成度について

1年間という限られた研究期間において、①新たな防御指数の算定方法によって実際に試料を *in vitro* で評価できた、②2つの試料の組み合わせによる方法が *in vitro* で防御指数が高いことが判明した、③その方法を

ポルフィリン症患者に実際に使用してもらった、④その方法がポルフィリン症患者の光線過敏症状の出現を抑制でき、さらに安全であったこと、を確認できた。以上のことから、達成度はきわめて高いものと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これらの結果は、学術的に全く新規で、かつきわめて高いレベルのものである。欧米でも類似のものはない。今後この研究の継続によって、他の多くの遺伝性ポルフィリン症患者にこれらの化粧品が実際に応用できると思われる。

3) 今後の展望について

本研究では、すでに市販されている化粧品を検討している点が特徴的である。すなわちその有用性と安全性が正常人において担保されているため、きわめて実用的であり、今後も継続して患者における使用が可能であると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

この研究は時間やコストの無駄がきわめて少なく、実際の継続使用に向けて効率性がきわめて高いと考えられる。

E. 結論

本研究によって、遺伝性ポルフィリン症患者に対する新規治療薬の開発が確立した。さらに9例のポルフィリン症患者において、本治療薬の有効性と安全性が示され、有用性が確認できた。来年度にこの研究が継続されれば、さらに多くのポルフィリン症患者がこの治療薬を使用することが可能となり、患者のQOL向上に寄与することを確信している。

F. 研究発表

口頭発表 4件

原著論文による発表 1件

それ以外の発表 0件

そのうち主もの

論文発表

1. 川田 暁. 日焼けと紫外線防止クリーム. チャイルドヘルス 13: 473-475, 2010.
2. 川田 暁. 小児の日焼けとその対策. 東京小児科医会会報 29: 13-17, 2010.
3. 川田 暁. 紫外線から肌を守り, いつまでも美しく -皮膚科医から化粧品業界に望むこと-. 化粧品誌 34: 185-189, 2010.

学会発表

1. 川田 暁. 紫外線から肌を守り, いつまでも美しく -皮膚科医から化粧品業界に望むこと-. 35回日本化粧品学会, 2010.06.03-04
2. 川原 繁, 川田 暁, 上出良一, 中野 創, 前田直人, 高村 昇, 近藤雅雄. 皮膚ポルフィリン症に関する全国疫学調査結果報告 (第一報). 32回日本光医学・光生物学会, 2010.07.30-31
3. Kawada A, Sasaya H, Hirao A, Wada T, Ishihara K. Skin typing, sun exposure, and sunscreen use in a population of Japanese females. The First Eastern Asia Dermatology Congress, 2010.09.30-10.03

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし。

皮膚ポルフィリン症の診断法・治療法の開発

研究分担者 上出良一 東京慈恵会医科大学附属第三病院皮膚科教授

研究要旨

皮膚ポルフィリン症患者の QOL を維持できる具体的生活指導を冊子，インターネットを通じて届けるために，骨髄性プロトポルフィリン症患者の赤血球中プロトポルフィリン値と臨床症状，必要な光線防御対策を関連づけて検討した。

A. 研究目的

皮膚ポルフィリン症は小児期に光線過敏症状で発症し，まれな疾患であることよりプライマリ・ケア医での診断が遅れることが多い。その結果，十分な光線防御が行われず，皮膚障害や，時により重篤な肝障害を発症する。多くの場合，いくつかの医療機関を受診した後，光線過敏症の専門施設を紹介されて受診し，確定診断される。現時点では根本治療がない疾患であるため，光線防御が必須の予防策となる。しかし，光線防御対策は個々の患者によっても異なるので，患者本人はもとより家族の不安は大きい。また，過剰な光線防御により学校生活上の制約で，QOL が損なわれる事例も経験する。

本研究ではプライマリ・ケア医にもわかりやすい診断の手引きの分担執筆と，患者・家族への生活指導を中心とした Q&A 形式の手引き書を作成し，冊子あるいはインターネットのウェブサイトへの掲載を目的とした。

B. 研究方法

内外の文献を検索すると共に，自験例の集計結果から，骨髄性プロトポルフィリン症を中心とした皮膚型ポルフィリン症における，ポルフィリン体定量結果と実際に行う光線防御の程度と肝障害予防のための生活指導を関連させて検討した。なお，本研究では検査データの取り扱いにおいて個人を特定できないよう配慮した。

診断手引きの作成に関しては別項に記載する。

C. 結果

骨髄性プロトポルフィリン症では，赤血球中プロトポルフィリン値が $3,000 \mu\text{g/dlRBC}$ 以下の場合，帽子，日傘，長袖，長ズボン，手袋など衣類等による光線防御をできるだけ行い，運動会などやむを得ない屋外活動に際しては，露出部皮膚がヒリヒリしたら直ちに屋内や日陰に入ることを励行すれば，強い光線過敏症状を回避でき，肝障害も生じないことがわかった。一方，