

201128053B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究

平成22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 中村 公俊

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究

熊本大学医学部附属病院	中村 公俊
国立成育医療センター	奥山 虎之
国立成育医療センター	笠原 群生
熊本大学医学部附属病院	遠藤 文夫
国立香川小児病院	伊藤 道德
広島大学	但馬 剛
名古屋市立大小児科	伊藤 哲哉

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 22

III. 平成22年度～23年度研究構成員

----- 24

I. 総合研究報告

高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究

研究代表者 中村公俊 所属 熊本大学医学部附属病院小児科

研究要旨

本研究では、わが国における高チロシン血症の発生状況とその後の経過について調査した。高チロシン血症は遺伝的にも生化学的にも多様な疾患群であり、その患者数は増加しつつある。われわれが行った全国調査（回答率 71%）では、遺伝性高チロシン血症 I 型 5 例、II 型 2 例、III 型 1 例の回答があった。そのほかに原因不明の高チロシン血症が 10 例回答されており、確定診断に至らない症例も少なくないと考えられた。高チロシン血症の確定診断は血中チロシン値のみでは困難であり、先進医療に基づく複数の検査が必要である。特にろ紙血や尿中有機酸分析を用いたサクシニルアセトンの検出は有用である。また、高チロシン血症の治療として、主に食事療法が行われているが、最先端の治療は、新規薬物治療や肝臓移植の導入に伴い大きく変化した。しかしわが国の多くの患者はその恩恵を十分に受けていない。また、肝臓移植は先天代謝異常症の小児期患者に対する治療法として確立し、高チロシン血症 I 型患者の予後を大きく改善していると考えられた。

A. 研究目的

高チロシン血症はタンデムマスを利用した新規新生児スクリーニングの対象疾患に含まれており、新生児期に患者が発見されることもある。しかし新生児期に血中チロシン高値を示す児は多く、その中から希少難病である遺伝性高チロシン血症を発見することは困難なことも少なくない。高チロシン血症は遺伝的にも生化学的にも多様な疾患群であり、患者数はタンデムマススクリーニングの進展とともに増加している。チロシン高値は新生児の 0.85%、欧米でも 0.5-1.8%に認められる頻度の高い異常である。一方で、重度の肝硬変、精神発達遅滞などが生じる遺伝性高チロシン血症は希少難病であり、多くのチロシン高値を示す新生児から、この希少難病を発見するための診断指針は確立していない。その確定診断は血中チロシン値のみでは困難であり、先進医療に基づく複数の検査が必要となってきた。高チロシン血症の最先端の治療は、新規薬物治療や肝臓移植の導入などにより予後の改善が期待できるように

なった。しかし、わが国の多くの患者では、先進医療を取り入れた診断治療指針が十分に提供されていない。そこで、わが国における高チロシン血症の患者の診断・治療の状況について調査し、高チロシン血症の診断基準、治療指針を作成することを目的とした。

B. 研究方法

われわれはタンデム質量分析計を用いた新生児ろ紙血中のチロシンを測定し、高チロシン血症を示す新生児数を検討した。測定にはタンデム質量分析計（MICROMASS Quattro micro API）、HPLC（Waters 2795 Alliance）を用いた。試料として新生児スクリーニング用ろ紙血液を重松らの方法に準じて前処理を行ない、血中チロシン値 8mg/dl 以上をチロシン高値とした。次に、全国の 930 施設を対象とした全国調査（回答率 71%）を行った。その調査では、遺伝性高チロシン血症 I 型 5 例、II 型 2 例、III 型 1 例の回答があった。そのほかに原因不明の高チロシン血症が 10 例回答されており、確定診断に至らない症例も

少なくないと考えられた。確定診断のための検査法のひとつとして、高チロシン血症 I 型におけるゲノム DNA からのエクソン直接塩基配列解析法による遺伝子診断系を設定した。鑑別疾患となる高チロシン血症 II 型・III 型については、酵素反応産物を HPLC によって分離・定量する酵素診断系を設定した。遺伝性高チロシン血症を含む先天性代謝異常症に対する生体肝移植症例の国内調査においては、1990 年から 2008 年末までに、日本肝移植研究会に登録された小児代謝性肝疾患に対する生体肝移植症例の実態調査を、日本肝移植研究会データベースに基づき実施した。また、全国調査において報告された症例として、現在 NTBC (ORFADIN) および低チロシン・低フェニルアラニン食餌療法で治療中の高チロシン血症 I 型の患児の治療経過と今後の問題点について検討した。これらの検討から、診断指針の確立のためには、遺伝性高チロシン血症 I 型においては、尿中有機酸分析におけるサクシニルアセトン増加の検出、遅発型の高チロシン血症 I 型においてはろ紙血チロシン値と尿中サクシニルアセトンの増加の検出、軽微な異常値を示す例では酵素活性測定が必要である。遺伝性高チロシン血症 II 型、III 型においては、チロシン高値が著明であり、サクシニルアセトンの増加を伴わないことを確認し、肝生検による酵素活性の測定を行うことが必要である。このほか、新生児一過性高チロシン血症の鑑別などが重要であることなどを診断の指針とした。

(倫理面への配慮)

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と保護者への説明と同意に基づいて行った。

C. 研究結果

高チロシン血症の実態調査

タンデムマスを用いた高チロシン血症を示す新生児数を検討したところ、新生児 72,695 人中に 8.0mg/dl 以上のチロシン高値を認めた新生児は 95 人 (0.13%) 存在した。これらの新生児はチロシン値のみでは遺伝性高チロシン血症との区別は困難であった。

次に、全国の 930 施設を対象とした全国調査 (回答

率 71%) を行った。その調査では、遺伝性高チロシン血症 I 型 5 例、II 型 2 例、III 型 1 例の回答があった。そのほかに原因不明の高チロシン血症が 10 例回答されており、確定診断に至らない症例も少なくないと考えられた。確定診断のための検査法のひとつとして、高チロシン血症 I 型におけるゲノム DNA からのエクソン直接塩基配列解析法による遺伝子診断系を設定した。鑑別疾患となる高チロシン血症 II 型・III 型については、酵素反応産物を HPLC によって分離・定量する酵素診断系を設定した。

遺伝性高チロシン血症を含む先天性代謝異常症に対する生体肝移植症例の国内調査においては、1990 年から 2008 年末までに、日本肝移植研究会に登録された小児代謝性肝疾患に対する生体肝移植症例の実態調査を、日本肝移植研究会データベースに基づき実施した。また、全国調査において報告された症例として、現在 NTBC (ORFADIN) および低チロシン・低フェニルアラニン食餌療法で治療中の高チロシン血症 I 型の患児の治療経過と今後の問題点について検討した。これらの検討から、診断指針の確立のためには、遺伝性高チロシン血症 I 型においては、尿中有機酸分析におけるサクシニルアセトン増加の検出、遅発型の高チロシン血症 I 型においてはろ紙血チロシン値と尿中サクシニルアセトンの増加の検出、軽微な異常値を示す例では酵素活性測定が必要である。遺伝性高チロシン血症 II 型、III 型においては、チロシン高値が著明であり、サクシニルアセトンの増加を伴わないことを確認し、肝生検による酵素活性の測定を行うことが必要である。このほか、新生児一過性高チロシン血症の鑑別などが重要であることなどを診断の指針とした。

先天代謝異常症の肝移植

代謝性疾患に対する肝移植は、その症例数の少なから、移植適応・周術期管理において未だ基準を作成するに至っていない。当院で実施した代謝性肝疾患症例を考察し、移植適応・管理方法を明らかにする。2005 年 11 月から 2012 年 2 月で肝移植 180 例を実施した。代謝性疾患は 39 例で有機酸代謝異常 15 例 (Methylmalonic academia (MMA) 12 例, Propionic

academia(PA) 3 例)、尿素サイクル異常症 12 例 (Ornithin transcarbamylase deficiency(OTCD)6 例、Carbamyl phosphate synthetase 1 deficiency (CPS1D)6 例)、糖原病(GSD) 1b 8 例、Wilson 病 2 例、高シュウ酸尿症 2 例に肝移植を適応した。移植適応・周術期管理を検討した。頻回の Metabolic decompensation, 著しい QOL の低下、易感染性、および非代償性肝硬変を肝移植適応とした。移植時年齢は 3 か月から 18 歳であった。

FAH 遺伝子解析

患児の FAH 遺伝子解析を単核球から得られたゲノム DNA を鋳型として全エクソンを PCR 法により増幅し、その塩基配列を決定した。FAH 遺伝子の塩基配列を検討したところ、366 番目のセリンがプロリンへの置換をおこすエクソン 13 の 1096 番目の塩基に T から C への置換がホモ接合体として認められた。高チロシン血症 I 型の遺伝子解析が可能となった。

フマリルアセト酢酸の合成

Western blot によって、HEK293 細胞でのヒト HGD タンパクの発現が確認され、この方法で作成した細胞で培養実験を実施した。HPLC にてフマル酸とホモゲンチジン酸の標品を分析したところ、260nm 紫外吸光にて保持時間各 9.4 分、21.3 分で検出された。同じ標品を FAA に特異性の高い 330nm 吸光で測定すると、フマル酸では 260nm 吸光度の 0.7%、ホモゲンチジン酸では 2.4%へと低下した。HGD 過剰発現系にホモゲンチジン酸 2mM を添加した培養上清を分析したところ、260nm にてフマル酸ピークはなく、330nm で有意のピーク出現も見られなかった。培養細胞の破碎液の分析ではホモゲンチジン酸・フマル酸いずれのピークも見られなかった。

高チロシン血症 I 型の診断治療の実際

症例 1

現病歴：在胎 37 週 3 日、出生体重 3608g、正常分娩で出生。初期嘔吐、低血糖のため日齢 10 まで小児科入院となったがその後回復して退院。1 ヶ月時、発熱と肝脾腫あり、軽度肝機能異常 (AST:75~100

U/l, ALT:35~44 U/l 程度) を認めたため腹部 CT 検査を行われたが異常なく、ウイルス感染症を疑われ経過観察されていた。5 ヶ月時、発熱、咳嗽あり、腹部画像診断で肝内多発性腫瘍であったこと、両側腎腫大も認めたことから代謝異常症の精査が行われ、チロシン血症 I 型と診断された。肝障害が進行することから生体部分肝移植が考慮された。母をドナーにした生体部分肝移植が生後 7 ヶ月時に施行された。摘出肝には多発性に腫瘍を認め、病理組織検査では肝細胞癌の所見を示す部位も認めた。摘出肝を用いたフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ活性は、正常の 4%と低下していた。移植後経過は順調で良好な臨床経過をとっている。

症例 2

高チロシン血症 I 型の次子

兄が高チロシン血症 I 型、母から生体部分肝移植施行し経過良好であった。出生体重 4130 g、正常分娩で出生。巨大児、新生児低血糖症のため治療された。兄が高チロシン血症 I 型であり、アミノ酸分析にてチロシン高値等を認めたため本児も同疾患と診断されフェニルアラニン・チロシン除去ミルクを開始された。腎障害も著明になったことから生体部分肝移植の適応と考えられたが、母は兄への移植をすでにすませていたこと、父は心疾患があることから早期の肝移植は困難であった。生後 2 ヶ月半から NTBC : 1mg/kg/日の投与を開始した。NTBC 開始後は数日で皮疹、貧血、低蛋白血症、肝機能障害などが劇的に改善し、児の活動性も良好となった。家族が生体部分肝移植を強く希望され、母方叔母からドナーとなる申し出があったため、1 歳 9 ヶ月時に生体部分肝移植を施行した。摘出した肝は軽度の繊維化を認めたのみで悪性所見は見られなかった。その後はほぼ問題なく経過し、蛋白制限、NTBC 投与もなしで良好な経過を取っている。

チロシン血症の遺伝学的検査

医学会ガイドラインをもとにチロシン血症の遺伝学的検査の在り方を検討した。チロシン血症の診断には、緊急を要する場合が少なくないので、事前に遺伝カウンセリングを行うために不必要

な時間をとられて、診断および治療が手遅れになることは極力避けなければならない。また、本疾患は常染色体劣性遺伝病であり、本症を子に持つ両親に本症が生まれる確率は25%である。出生前診断も考慮される重篤な疾患である。本症は、肝臓移植が有用であるので、新生児期から治療的介入をするためにも、出生前診断は意義がある。

D. 考察

タンデムマス検査と全国の実態調査によって、わが国における高チロシン血症の診断治療の実態を把握することができた。特にタンデムマスによる高チロシン血症を示す新生児数、遺伝性高チロシン血症と一過性高チロシン血症とのチロシン値の比較についての検討は高チロシン血症の診断指針を考えるうえで重要であった。また、全国の930施設を対象とした全国調査は、わが国では初めて行われた高チロシン血症についての実態調査であった。多くのチロシン高値を示す新生児から、この希少難病を発見するための診断指針として、先進医療に基づく複数の検査を試みた。高チロシン血症の最先端の治療は、新規薬物治療や肝臓移植の導入などにより予後の改善が期待できるようになった。そして今回の調査結果に基づいて、効率的な診断、治療の方法について多施設による前方視的検証モデルを作成することが次の課題の一つと考えられた。高チロシン血症I型の治療においては、NTBCを用いた治療を行っている症例の実態と治療の問題点を明らかにすることができた。特に、NTBC (ORFADIN)はわが国では未承認薬であるため、医師の個人輸入によって無償で提供されている。もし有償となれば1日当たり約10万円程度の治療費が必要となり、本治療を中止せざるを得ない。すなわち今後早急にわが国での承認が望まれる治療薬の一つであることが明らかになった。

欧米においては高チロシン血症の治療は食事治療の内容、新規薬物治療の導入などにおいて近年急速に変化している。そのため、わが国の状況を正確に把握し、必要な診断治療の課題を明らかにした本研究の意義は大きい。高チロシン血症の治療として主に食事療法が行われてきているが、肝臓移植の導入

に伴い、重症例の生命予後は改善している。これらの課題を解決することによって、高チロシン血症の診断、治療指針には、先進医療を取り入れた検査、治療薬が不可欠であることが明らかになった。診断においては、普及型C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィ法という汎用性の高い方法を採用することで、タンデムマス新生児スクリーニング対象である有機酸・脂肪酸代謝異常症の酵素診断に応用している分析システムがそのまま高チロシン血症の診断に有用である。多種類の稀少疾患の酵素診断系を長期間継続して実施するためにはこのような省力化した方法を確立することが大切であると考えられた。

E. 結論

遺伝性高チロシン血症と鑑別が困難である新生児一過性高チロシン血症はチロシン分解系の成熟に関連して、新生児期に一過性に高チロシン血症を示すと考えられている。チロシン濃度が極端に高い場合は精神発達に影響を与えることが懸念されている。また、重篤な進行性肝障害が合併した場合には、遺伝性高チロシン血症との鑑別は臨床的には困難である。遺伝性高チロシン血症では先進医療に基づく治療を必要とするため、確定診断が重要であり、包括的な診断指針の確立が急務である。また、LC/MS (液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー)法を用いて高チロシン血症を呈する疾患の病態解明が必要である。極少量の血液検体を利用したチロシンの測定方法を用いてベッドサイド、外来診療あるいは自宅、外出先などで簡単にチロシンを測定する持ち運び可能な簡易測定装置を用いた食事療法のコントロールを試みることにより、患者のQOLが間然する可能性がある。さらに上記の高チロシン血症の患者の臨床状況の収集と解析によって構築した前方視的研究モデルにおいて、高チロシン血症の病態を明らかにしたい。

また、欧米においては高チロシン血症の診断、治療が近年急速に変化しており、食事治療の内容、新規薬物治療の導入などわが国で取り入れるべき課題は多い。そのため、高チロシン血症の治療として主に行われる食事療法の標準化や、肝臓移植の適応基準

の確立によって、重症例の生命予後がどのていど改善するのかを検証する必要がある。これらの課題を解決することによって、高チロシン血症の診断、治療指針として、先進医療を取り入れた検査、治療薬を利用することができる。さらに、新規のアミノ酸測定法や、酵素活性の測定法を臨床応用することによって、新規測定技術の基礎を確立できる。多種類の稀少疾患の診断技術を応用した高チロシン血症の診断法を確立することで、高チロシン血症のみならず他の先天代謝異常症の診断も継続して進む可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S. Cerebral hemorrhage in Fabry's disease. *J Hum Genet.* 55, 259-261. (2010)
中村公俊 Fabry 病の疫学と診断 *神経内科* 73, 168 - 172 (2010)

中村公俊 アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル異常症、糖原病の新しい治療法 *小児内科* 42, 1191-1194 (2010)

中村公俊 代謝プロファイリング 「見逃せない先天代謝異常」(高柳正樹 編集) *小児科臨床ピクシス* 第 23 巻(2010)

Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn Screening for lysosomal disorders. *Am J Med Genet* (2011)

2. 学会発表

ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング
中村公俊、服部希世子、松本志郎、三淵浩、遠藤文夫
第 52 回日本先天代謝異常学会、平成 22 年 10 月 22 日 大阪国際会議場

シトルリンによる尿素サイクル異常症治療の問題点
城戸淳、中村公俊、服部希世子、松本志郎、三淵浩、遠藤文夫 第 52 回日本先天代謝異常学会、平成 22 年 10 月 22 日、大阪国際会議場

Screening for Fabry Disease in Japan

K.Nakamura, K.Hattori, S.Matsumoto, H.Mitsubuchi, F.Endo 12th ICHG Montreal2011, October11-15th, 2011, Montreal Canada

尿素サイクル異常症 (OTC欠損症、CPS1欠損症) とリジン尿性蛋白不耐症におけるシトルリン治療 城戸淳、中村公俊、三淵浩、大浦敏博、高柳正樹、松尾雅文、芳野信、堀川玲子、遠藤文夫 第53回日本先天代謝異常学会 2011年11月24-26日 千葉市

尿素サイクル異常症 (UCD) の治療法 - 風はどっちにふいている? - 中村公俊 第53回日本先天代謝異常学会 2011年11月24-26日 千葉市

ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング 中村公俊、服部希世子、松本志郎、田崎隆二、三淵浩、遠藤文夫 第53回日本先天代謝異常学会 2011年11月24-26日 千葉市

ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニングと α ガラクトシダーゼ遺伝子のE66Q変異 中村公俊、服部希世子、松本志郎、三淵浩、遠藤文夫 第56回人類遺伝学会 2011年11月9日-12日 千葉市
ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング 中村公俊、服部希世子、田崎隆二、松本志郎、三淵浩、遠藤文夫 第38回日本マス・スクリーニング学会 2011年10月-29日 福井市

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

チロシン血症の遺伝学的検査

研究分担者 奥山虎之 国立成育医療センター 臨床検査部長

研究要旨

旧来の遺伝関連 10 学会による遺伝学的検査ガイドライン(10 学会ガイドライン)と 2011 年 2 月に日本医学会から発表された遺伝学的検査・診断に関するガイドライン(医学会ガイドライン)の比較検討をもとに、チロシン血症の遺伝学的検査のあり方を検討した。遺伝学的検査は、発症者の確定診断として有用であり、出生前診断にも応用可能である。

A. 研究目的

近年、医療の様々な場面で、遺伝学的検査が広く用いられるようになったが、臨床的な遺伝学的検査における倫理的配慮については、これまで限られた遺伝学関連 10 学会の学会員を対象としたガイドラインの他に参考となるべきものはわずかであった。実際、10 学会ガイドラインは、遺伝学的検査のリスクを強調するあまり、遺伝学的検査が広く日常診療で行うことの障壁となっていた。この問題を解決するために、日本医学会は、新たなガイドラインを 1 年間かけて作成した。上記の背景をもとに、本研究では、旧来の遺伝関連 10 学会による遺伝学的検査ガイドライン(10 学会ガイドライン)と 2011 年 2 月に日本医学会から発表された遺伝学的検査・診断に関するガイドライン(医学会ガイドライン)の比較検討をもとに、わが国の実情に即した遺伝病診断ガイドラインのあり方について検討し、これらの検討を通じてチロシン血症 I 型の遺伝学的検査施行時の倫理的配慮について検討する。

B. 研究方法

旧来の遺伝関連 10 学会による遺伝学的検査ガイドライン(10 学会ガイドライン)と 2011 年 2 月に日本医学会から発表された遺伝学的検査・診断に関するガイドライン(医学会ガイドライン)のそれぞれ該当する部分を抽出し、その変化を明らかにする。さらに、その変化が、チロシン血症 I 型の遺伝学的検査施行時に与える影響について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究では、特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

B. 研究方法：

旧来の遺伝関連 10 学会による遺伝学的検査ガイドライン(10 学会ガイドライン)と 2011 年 2 月に日本医学会から発表された遺伝学的検査・診断に関するガイドライン(医学会ガイドライン)のそれぞれ該当する部分を抽出し、その変化を明らかにする。さらに、その変化が、わが国の医療環境に即した実効性のあるものか否かを検証する。

C. 研究結果

1. 医学会ガイドラインの概要

1) 遺伝学的検査の適用範囲については、DNA や RNA の検査だけでなく、遺伝生化学的検査、染色体検査も含まれる。

2) 医学会ガイドラインは、アンブレラであるという立場を明確にし、診療科別のガイドラインやマニュアルは、各医学会分科会が作成することを推奨している。

3) 医学会ガイドラインでは、遺伝学的検査実施上の留意点(倫理的配慮)を遺伝学的検査の用途に即して示した。特記すべきことは、すでに発症している患者の診断を目的として行われる遺伝学的検査については、検査の説明は、主治医が行うこととし、10 学会ガイドラインが義務づけていた検査前の遺

伝カウセリングは、必要に応じて行うこととした点である。

2. チロシン血症の遺伝学的検査

医学会ガイドラインをもとにチロシン血症の遺伝学的検査の在り方を検討した。チロシン血症の診断には、緊急を要する場合が少なくないので、事前に遺伝カウセリングを行うために不必要な時間をとられて、診断および治療が手遅れになることは極力避けなければならない。また、本疾患は常染色体劣性遺伝病であり、本症を子に持つ両親に本症が生まれる確率は25%である。出生前診断も考慮される重篤な疾患である。本症は、肝臓移植が有用であるので、新生児期から治療的介入をするためにも、出生前診断は意義がある。

D. 考察

近年のゲノム医学の進歩により、今日、多くの遺伝学的検査が日常診療の中に組み入れられている。しかし、一般の臨床医を対象とした遺伝学的検査のガイドラインは我が国ではこれまで示されてこなかった。そのため、遺伝学関連 10 学会が編纂した「遺伝学的検査ガイドライン」を参考に対応している現状があったが、10 学会ガイドラインは、すべての遺伝学的検査について、検査前に十分な遺伝カウセリングを行うことを要求しており、チロシン血症のような迅速な診断・治療を行う必要のある疾患のガイドラインとしては極めて不適切であった。今回の医学会ガイドラインは、この点の改良がみられ、チロシン血症にも適用できるガイドラインとなっている。ただし、医学会ガイドラインは、医学会分科会が今後作成するガイドラインで、個々の疾患について記載する必要がある。

E. 結論

医学会ガイドラインに基づく遺伝学的検査が、チロシン血症の確定診断および出生前診断に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

総合研究報告書

高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究

分担研究課題 代謝性肝疾患に対する肝臓移植について

研究分担者 笠原群生 所属 国立成育医療研究センター

研究要旨

代謝性肝疾患に対する肝臓移植について

A. 研究目的

代謝性疾患に対する肝移植は、その症例数の少なから、移植適応・周術期管理において未だ基準を作成するに至っていない。当院で実施した代謝性肝疾患症例を考察し、移植適応・管理方法を明らかにする。

B. 研究方法

2005年11月から2012年2月で肝移植180例を実施した。代謝性疾患は39例で有機酸代謝異常15例（Methylmalonic academia(MMA)12例、Propionic academia(PA)3例）、尿素サイクル異常症12例（Ornithin transcarbamylase deficiency(OTCD)6例、Carbamyl phosphate synthetase 1 deficiency(CPS1D)6例）、糖原病(GSD)1b8例、Wilson病2例、高シュウ酸尿症2例に肝移植を適応した。移植適応・周術期管理を検討した。

（倫理面への配慮）

今回申請した研究においては、ヘルシンキ宣言を尊重し計画するとともに、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護を最優先とし、説明と理解（インフォームドコンセント）を徹底した。国立成育医療研究センターに設置された生体・脳死肝移植適応評価委員会の承認を得て、すべての生体・脳死肝移植を実施した。

C. 研究結果

頻回のMetabolic decompensation, 著しいQOLの低下、易感染性、および非代償性肝硬変を肝移植適応とした。移植時年齢は3か月から18歳であった。

D. 考察

1. 尿素サイクル異常症：不安定な代謝コントロールにより移植時期を延ばすことが、発作に伴う患者の発達遅延につながる可能性があるため、内科的治療で高アンモニア血症の発作がコントロールできない症例に対して、早期に移植を考慮すべきであった。比較的早期の肝移植適応にも関わらず、当院での尿素サイクル異常症は、頻回の高アンモニア血症発作によると思われる発達遅延を認めた。肝移植後は食事制限なく、健常児と同様の食生活を送りながら通学可能であることは、患者・家族のQOLを著しく向上し、移植後の精神発達は比較的良好であった。

2. 糖原病1b 8例に肝移植を適応した。肝移植適応は、血糖コントロール不良、成長・発達遅延、肝腫瘍と報告されている。自験例ではこの他に、好中球減少に伴う易感染性を認め、Granulocyte stimulating factor(G-CSF)使用にも関わらず、頻回の上気道感染等を認め長期入院管理を要した。6例では肝移植後に血糖値ばかりでなく、好中球数も改善を認め易感染性も改善した。

3. 有機酸代謝異常：自然予後の悪さから、有症状の場合、積極的に肝移植の適応としている。移植後も原疾患に対する内科治療を継続する必要がある、短期予後は満足すべきものだが、長期予後に関しては未だ結論を得ていない。PAでは肝移植後に重篤な心機能障害を認めておらず、良好なQOLで経過観察している今後、成長発達・腎障害・神経障害の長期経過報告をすべきである。

4. Wilson 病：自己肝臓に肝硬変を有する代謝性疾患では、肝予備能を考慮し移植時期を決定した。

5. 高シュウ酸血症：シュウ酸沈着に伴い、腎不全合併することが多く、診断ができ次第早期に肝移植を実施すべきである。肝腎同時移植のよい適応であるため、脳死移植を推進すべきである。

39 例中、メチルマロン酸血症 2 例を術後拒絶反応その後の発作および移植後感染症で、高シュウ酸血症を感染症で、CPS1 欠損症 1 例を感染症で失った。生存率は 89.7% で良好な肝移植成績であった。今後、代謝性肝疾患に対する脳死肝移植適応についても検討が必要である。

E. 結論

代謝性肝疾患に対する肝臓移植は移植適応を厳密に行えば安全に実施でき、著明な QOL 改善が見込まれる治療法であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

<2011 年>

1. K. Kamei, S. Ito, T. Shigeta, S. Sakamoto, A. Fukuda, R. Horikawa, O. Saito, T. Muguruma, S. Nakagawa, K. Iijima, M. Kasahara: Preoperative Dialysis for Liver Transplantation of Methylmalonic Acidemia, Therapeutic Apheresis and Dialysis. 2011; Ther Apher Dial. Oct;15(5):488-92.
2. Mizuochi T, Kimura A, Suzuki M, Ueki I, Takei H, Nittono H, Kakiuchi T, Shigeta T, Sakamoto S, Fukuda A, Nakazawa A, Shimizu T, Kurosawa T, Kasahara M: Successful heterozygous living donor liver transplantation for an oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency in a Japanese patient. Liver Transpl. 2011 17(9):1059-65.
3. 田中久子, 瀧本哲也, 阪本靖介, 福田晃也, 垣内俊彦, 重田孝信, 中澤温子, 笠原群生: 国立成育医療研究センターにおける小児生体肝移植の実態(第 1 報)—小児肝移植のデータベース構築に向けて—。移植 2011; 46(4/5), 325-334

<2010 年>

1. Kasahara M, Sakamoto S, Shigeta T, Fukuda A, Kozaki R, Nakazawa A, Uemoto S, Noda M, Naiki Y, Horikawa R: Living Donor Liver Transplantation for Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 Deficiency. Pediatr Transplantation 2010;14:1036-1040
2. Hori T, Egawa H, Takada Y, Ueda M, Oike F, Ogura Y, Sakamoto S, Kasahara M, Ogawa K, Miyagawa-Hayashino A, Yonekawa Y, Yorifuji T, Watanabe KI, Doi H, Nguyen JH, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Uemoto S: Progressive familial intrahepatic cholestasis: a single-center experience of living-donor liver transplantation during two decades in Japan. Clin Transplant. 2010 Dec 16
3. 笠原群生, 堀川玲子: 先天性代謝異常症に対する肝移植。小児科臨床 2010; 63: 2103-2109
4. 笠原群生: (松井陽監修) 小児肝臓病肝移植アトラス, 診断と治療社, 2010
5. 笠原群生: 肝移植。(五十嵐隆, 高柳正樹編集) 小児臨床ピクシス 23 見逃せない先天代謝異常, 中山書店, 2010; 188-192

2. 学会発表

<2011 年>

1. Fukuda A, Kasahara M: Evaluation of Living Donor Liver Transplantation for Patients with Methylmalonic Acidemia, The European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Sorrent, Italy, 2011/5/28
2. 福田晃也, 重田隆信, 阪本靖介, 笠原群生, 堀川玲子, 重松陽介, 伊藤玲子, 野田雅裕, 西垣五月, 垣内俊彦, 伊藤秀一, 亀井宏一, 中澤温子, 中川聡, 松井陽: メチルマロン酸血症とプロピオン酸血症に対する生体肝移植療法の位置づけ。第 28 回 日本小児肝臓研究会, 筑波, 2011/7/16

3. 大平智子, 岡田純一郎, 大矢崇志, 渡邊順子, 田代恭子, 猪口隆洋, 松石豊次郎, 堀川玲子, 笠原群生, 重松陽介, 芳野信: 肝移植後に自然蛋白摂取量を緩和し神経症状悪化が認められたメチルマロン酸血症の2例. 第28回日本小児肝臓研究会, 筑波, 2011/7/16
4. 福田晃也, 唐木千晶, 垣内俊彦, 重田孝信, 金澤寛之, 阪本靖介, 笠原群生, 堀川玲子, 野田雅裕, 西垣五月, 水野裕介, 宮下健悟, 中澤温子, 中川聡, 重松陽介: 有機酸代謝異常に対する肝移植. 第3回小児肝臓・肝移植セミナー, 東京, 2011/9/10
5. 重田孝信, 阪本靖介, 福田晃也, 金澤寛之, 垣内俊彦, 唐木千晶, 田中秀明, 笠原群生, 内木康博, 堀川玲子: 当院における尿素サイクル異常症・NICCDに対する肝移植の経験. 第3回小児肝臓・肝移植セミナー, 東京, 2011/9/10
- 藤秀一, 齋藤昭彦, 中川聡, 松井陽: 代謝性疾患に対する肝移植治療. 第113回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010/4/25
4. 清水泰岳, 柳忠宏, 垣内俊彦, 肥沼幸, 新井勝大, 重田孝信, 阪本靖介, 福田晃也, 笠原群生, 中川温子: 生体肝移植が奏効したPFIC-2(Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 2)の姉妹例. 第42回武蔵野小児肝臓病懇話会, 東京, 2010/7/7
5. 福田晃也, 重田隆信, 阪本靖介, 笠原群生, 堀川玲子, 重松陽介, 伊藤玲子, 野田雅裕, 西垣五月, 垣内俊彦, 伊藤秀一, 亀井宏一, 中澤温子, 中川聡: メチルマロン酸血症とプロピオン酸血症に対する生体肝移植療法の位置づけ. 第27回日本小児肝臓研究会, 千葉, 2010/7/24
6. 阪本靖介, 笠原群生, 福田晃也, 重田孝信, 田中秀明, 中澤温子, 中川聡, 堀川玲子: 尿素サイクル異常症に対する肝移植の役割. 第46回日本移植学会, 京都, 2010/10/21
7. 笠原群生, 小児肝移植・肝臓病ミニレクチャー, 講演「代謝性肝疾患」, 国立成育医療研究センター, 東京, 2010/7/27

<2010年>

1. Sakamoto S, Kasahara M: The role of liver transplantation for urea cycle disorder. Korea-Japan Transplantation Meeting, Kyoto, 2010/10/21
2. 笠原群生, 堀川玲子, 小崎里華, 中川温子, 伊藤秀一, 齋藤昭彦, 中川聡, 松井陽: 【分野別シンポジウム 5 先天性代謝異常症の最新治療】代謝性疾患に対する肝移植治療. 第113回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010/4/24
3. 笠原群生, 堀川玲子, 小崎里華, 中川温子, 伊

H. 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

「高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究」

分担研究者 伊藤 道德 独立行政法人国立病院機構香川小児病院副院長

研究要旨

本年度は、現在2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチル-ベンゾイル)-1,3-シクロヘキサネジオン (NTBC, ORFADIN) および低チロシン・低フェニルアラニン食餌療法で治療中のチロシン血症I型の14歳患児の治療経過を検討し、NTBCの投与量の指標として血液凝固系検査、特にトロンボテストが有用であることが明らかとなった。また現在わが国では、FAH酵素活性の測定ができる施設はなく、チロシン血症I型の確定診断のためのFAH遺伝子解析システムを構築し、現在経過観察中の患児がS366P (T1096C) 変異のホモ接合体であることを明らかにした。本遺伝子解析システムにより、今後のチロシン血症I型が疑われる患児の確定診断を行うことが可能となった。

A. 研究目的

チロシン血症 I 型は、北川らによって初めて報告された常染色体劣性の遺伝形式をとるフマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ (FAH) の欠損による疾患で、重篤な肝障害、腎尿細管障害を主要症状とし、多くの症例では乳児期早期に肝不全や出血などにより死亡することが多い。また、緩やかに進行する慢性型でも肝硬変から肝癌を高率に発症し死亡することが多い。本症においては肝臓移植が唯一の治療とされてきたが、1992年に Lindstedt らが 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素の阻害剤である 2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチル-ベンゾイル)-1,3-シクロヘキサネジオン (NTBC, ORFADIN) による治療の有効性を報告して以来、200 例以上の症例で治療経過が検討され、その有効性が報告されている。チロシン血症 I 型患児の薬物療法の治療プロトコールを確立するために、本年度は、現在わが国において NTBC 療法を受けている患児の臨床経過を検討して、NTBC の投与量の指標として血液凝固系検査が有用であることを明らかにしたので報告する。また、チロシン血症の確定診断には肝での FAH 活性の測定あるいは FAH 遺伝子解析が必要であるが、現在わが国で酵素活性の測定できる施設はないため、今後のわが国におけるチロシン血症 I 型が疑われる患児の確定診断のために遺伝子解析システムを構築したので、あわせて報告する。

B. 研究方法

昨年度報告した生後9ヵ月から 14 歳の現在まで NTBC 療法および低チロシン・低フェニルアラニン食事療法による治療を受けているチロシン血症 I 型患児の治療経過および検査結果から、NTBC の投与量の指標となる検査項目を検討した。また、チロシン血症 I 型の確定診断のための遺伝子解析システムを構築するために、本患児の FAH 遺伝子解析を単核球から得られたゲノム DNA を鋳型として表 1 に示すプライマーを用いて全エクソンを PCR 法により増幅し、その塩基配列を決定した。

C. 研究結果

患児の体重が 40kg を超えるまでは、NTBC の投与量を 0.85 から 1.05mg/kg で設定していたが、体重が 40kg を超えてからは、40mg/日の投与量で維持してきた。12歳 4 ヶ月頃までは、検査成績で血液凝固系検査の一つであるトロンボテストが、時々 60.0%台(基準値 70%以上)になることがあったが、他の凝固系検査に以上はなく、トロンボテストも基準範囲内に戻っていた。12歳 8 ヶ月からはトロンボテストがほとんど 70.0%未満となり、50.0%台になることが多くなってきた。しかしながら、これまでと同様他の凝固系検査には異常はみとめられなかった。しかしながら 13 歳 7 ヶ月時の検査ではトロンボテストだけではなく、プロトロンビン時間(PT)が 14.5 秒(基準値 11.0~13.1 秒)に延長し 13 歳 8 ヶ月ではヘパプラスチンテストが 70%未

満(基準値 70.0%異常)となった。その後、13 歳 10 ヶ月まで経過を見ていたが、トロンボテストは 48.6~56.6%, PT は 13.4~14.5 秒, HPT は 62.8~68.9%と基準値以下が続いたため、NTBC の投与量を 50mg/日 (0.95mg/kg)に増量した。その後もトロンボテスト, PT, HPT の低値は続いていたが 14 歳 2 ヶ月からは HPT は基準値以上となった。しかしトロンボテストと PT は改善傾向は認められるものの基準値未満の状態が続き、14 歳 6 ヶ月からは投与量を 60mg/日 (1.02mg/kg)に増量して現在経過観察中である。この間のその他の検査成績に異常は認められなかった。

本患児の FAH 遺伝子の塩基配列を検討したところ、366 番目のセリンがプロリンへの置換をおこすエクソン 13 の 1096 番目の塩基に T から C への置換がホモ接合体として認められ(図 1)、これが本患児の病因遺伝子変異と考えられた。

D. 考察

チロシン血症 I 型に対する治療法としては、肝臓移植が唯一の治療法とされてきたが、薬物療法としての NTBC 療法が提唱されてから、その有効性が報告されている。わが国において NTBC による治療を受けてきた患児においても短期間のみならず長期間での有効性を確認することができた。チロシン血症 I 型の治療プロトコールにおいて NTBC 療法は取り入れられるべき治療法であり、肝臓移植となる症例においても、移植が実施できるまでの治療として有効な治療法と考えられている。NTBC の投与量は 1mg/kg/日 が基準として推奨されているが、小児においては体重増加により、体重あたりの投与量が減少していくが、どの時点で増量するかは指標は示されていない。これまで本患児では、体重増加により 0.85mg/kg/日 以下にならないように投与量の調節を行ってきたが、体重が 40kg になった時点で 40mg/日の投与量に増量以後は投与量の増量は行わずに経過を見ていた。投与量が 0.8mg/kg/日 近くになって血液凝固系検査でまずトロンボテストが、基準値以下となり、その後 PT, HPT が順に異常となっていった。チロシン血症 I 型での肝機能異常はまず、肝での凝固因子の合成障害がみとめられ、現在経過観察している患児も、新生児期にビタミン K 不応性の HPT 異常として見いだされている。今回の検討で、NTBC 投与量の減少に従って血液凝固系検査の異常が認められたことは、NTBC による薬物療法が不十分で、NTBC 投与量増量の必要性を示唆する所見と考えられる。

もし、増量せずに治療を継続した場合には、さらに肝機能障害を増悪させて肝臓の発生を引き起こす可能性が非常に高くなるものと考えられる。このように、NTBC による薬物療法を継続する場合には、血液凝固系検査、特にトロンボテストの異常を指標として、NTBC の投与量を検討していくことが重要であると考えられた。

チロシン血症 I 型の確定診断は、FAH 活性の測定あるいは FAH 遺伝子変異の同定に行われるべきではあるが、わが国においては酵素活性測定のための基質の入手困難から FAH 活性の測定を実施している施設はなく、また FAH 遺伝子変異の検索を実施できる施設も見あたらないのが現状である。そこで、今後確定診断のための遺伝子変異の検索検査を必要時に提供できるようにするために、FAH 遺伝子解析システムを構築し、現在経過観察中の患児の遺伝子解析を行った。今回の解析で患児の FAH 遺伝子においてエクソン 13 における 1096 番目の塩基 T の C への置換がホモ接合体でみとめられ、これは 366 番目のアミノ酸セリンのプロリンへの置換を伴っており、これが本患児の病因遺伝子変異と考えられた。今後、チロシン血症 I 型が疑われる患児の確定診断法の一つとして、本検査法を提供することが可能となり、今後継続して本監査が実施できるようにしていく予定である。

E. 結論

チロシン血症 I 型の薬物療法として、NTBC 療法は非常に有用であるが、NTBC 療法を継続していく場合、小児における成長に伴う投与量の増量の指標としては血液凝固系検査、特にトロンボテストが有用である。また、チロシン血症 I 型の確定診断のための FAH 遺伝子解析システムを構築し、今後必要とされる患児に対して提供していくことが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

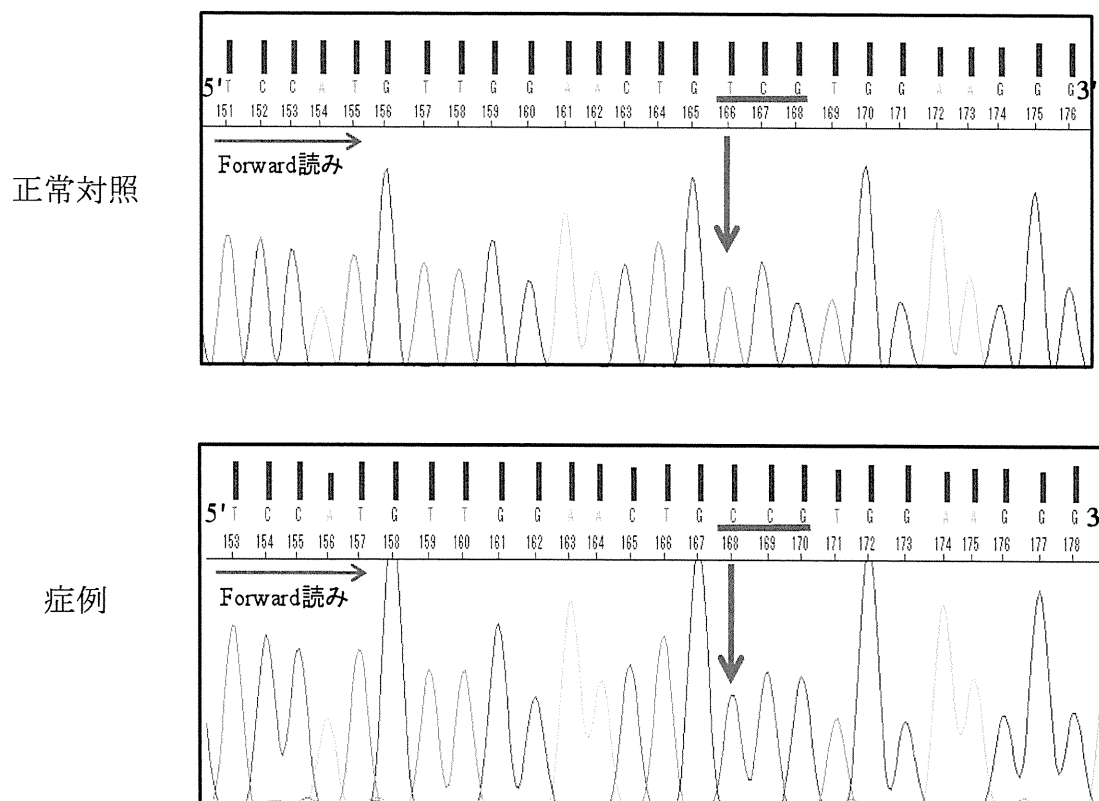
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1:FAH 遺伝子解析のための PCR プライマー

Primer		bp	
Exon	Forward primer	Reverse primer	
1	TG TTCACGGTGAGACCAAAA	TCATTC CACTCCATTCCACT	348
2	TGTGGACTCTTCAATAGATAG	TTCGATGGCATTACCTCTATC	311
3	TGAGTTAGCGGGAGAGAAGT	TCCCATCAATAGGCAGCTC	399
4	TGGAGATTGTGGATAATCTTG	CACACAGATGCAGAACCAAA	240
5	TGTGTAAACAGTATTGTGTGC	GGTTGCAACATCATAACTGC	331
6	TGTGTATGTGGCGACTCTTT	CCACAGAACTCTCTGTGTG	270
7	GACAGATGAAACCTGATGAC	GGATCAACTGTCCTTCTGAT	350
8	GAGTTTGGAAATACCTGACC	CATCACCTGCCACTTTTGA	302
9	TTGTGGAGATGGCAGTGCT	TGGTCTGCATGCCTGGCAT	337
10	GAGGGAATGCTCCTGCTGT	TGCCAAAGCTCAGGAGCCT	299
11	AGCTTCAGCCACAGAACAAT	CATCATATCCCAAAGGAATG	237
12	ATGTGTCCTTACTATAAGGGA	AAGACAGAGTTGTGAGATACA	398
13	ATGTCTCAAAGGCATCTCTG	TGAGAACAGATGGCTTCATG	389
14	AGATATGTGTGTGTGATTCTG	AATGAATATCTGGCAGGGAG	435

図 1 : FAH 遺伝子解析結果



S366P(T1096C)の塩基置換がホモ接合体で見いだされた。

「高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究」

分担研究者 但馬 剛 広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学・助教

研究要旨

遺伝性高チロシン血症1型の酵素活性測定を実用化するには、酵素反応基質であるフマリルアセト酢酸を自作する必要がある。基質が市販されている上流の酵素であるホモゲンチジン酸ジオキシゲナーゼの過剰発現系を作成し、培養細胞に高濃度のホモゲンチジン酸を代謝させ、フマリルアセト酢酸の蓄積が得られるか検討したが、培養上清・細胞破碎液いずれにも検出されず、ホモゲンチジン酸は細胞内へ取り込まれないものと考えられた。今後、簡便性は低下するが、ホモゲンチジン酸ジオキシゲナーゼおよびマレイルアセト酢酸イソメラーゼ両者の発現系から粗酵素を調製してホモゲンチジン酸を代謝させる必要があると考えられた。

研究協力者

津村 弥来

(広島大学大学院小児科学大学院生)

原 圭一

(広島大学大学院小児科学大学院生)

岡田 賢 (Postdoctoral associate,

St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University)

A. 研究目的

タンデムマス法による新生児スクリーニング (MS/MS-NBS) 施行地域の拡大に伴い、対象疾患となっている遺伝性高チロシン血症1型の確定診断体制が求められている。1999年から広島県全域で実施している MS/MS-NBS において、我々はこれまでに高チロシン血症1型が疑われた症例を1例だけ経験した。本例は初回濾紙血にてチロシン高値かつサクシニルアセトン高値を示した女児で、生後経過は良好であった。精査として濾紙血タンデムマス分析(再検)・血漿アミノ酸分析・尿中有機酸分析・尿中 δ -アミノレブリン酸測定を実施したが、いずれも特異所見を認めなかった。肝逸脱酵素の上昇はなく、腹部超音波所見にも著変なかった。これらの検査を2回繰り返したが異常なく、発育経過も問題なかったため、非罹患と結論している。

この症例の確定検査に用いたのは、いずれも代謝産物の測定による生化学診断法であった。遺伝子解析は手技的に対象疾患を問わない汎用性の点で優れており、

本疾患の診断にも有用な方法であるが、本例のように罹患の可能性が低いと考えられる症例の除外診断には適していない。診断確定・除外いずれにおいても酵素活性測定は優れた検査法であるが、本疾患の酵素反応基質であるフマリルアセト酢酸 (FAA) は市場供給されておらず、容易には実施できない状況にある。

このような課題を背景に、我々は FAA の自作法を検討することとした。チロシン代謝経路において、遺伝性高チロシン血症1型の責任酵素フマリルアセトアセターゼ (FAH) の上流で入手可能な基質はホモゲンチジン酸である。この物質を代謝するホモゲンチジン酸ジオキシゲナーゼ (homogentisate 1,2-dioxygenase; HGD) は肝・腎でしか発現していないが、続くマレイルアセト酢酸イソメラーゼ (MAAI) と FAH は普遍的に発現していることが知られている。そこで、培養細胞系に HGD の発現ベクターを導入して過剰発現させ、高濃度のホモゲンチジン酸存在下に培養することで、培養液中に FAA が蓄積するか検討した。

B. 研究方法

1) HGD発現系の作成

ヒトHGD cDNA クローンとして、pDNR-LIB Donor Vector に組み込んで大腸菌に導入した製品 (MGC Collection 6714217; ライフテクノロジーズジャパン, 東京) を使用した。増殖後、制限酵素 (EcoRI, XhoI) 処理を加えて発現ベクター pcDNA 3.1 myc-His へ組み替え、

HEK293 細胞へ導入した。24時間培養後、細胞を回収して western blot を行い、抗 HGD 抗体にて発現確認を行った。

2) ホモゲンチジン酸存在下でのHGD発現細胞の培養

HEK293細胞をDMEM培地(10% FCS, スレプトマイシン, ペニシリンG添加)で 7×10^5 cells/ 5ml / 6cm dish にて24時間培養後、ヒトHGDを組み込んだ pcDNA 3.1 発現ベクター5 μ gを、リン酸カルシウム法にてHEK293 細胞へ遺伝子導入した。24時間培養後、培養液にホモゲンチジン酸Na を最終濃度2mMとなるように添加して、さらに24時間培養した。

3) 培養細胞による代謝産物の分析

培養上清と細胞を分離回収し、上清と細胞破砕液を逆相HPLC法で分析した。

分析条件: C18カラム, 移動相 5mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 2.4) + アセトニトリル 0% \rightarrow 10% linear gradient (流量 1ml/min)。検出には紫外吸光度計を使用した。

(倫理面への配慮)

患者検体への応用は行っていない。

C. 研究結果

Western blot によって、HEK293 細胞でのヒト HGD タンパクの発現が確認され、この方法で作成した細胞で培養実験を実施した(図1)。

上記の HPLC 条件でフマル酸とホモゲンチジン酸の標品を分析したところ、260nm 紫外吸光にて保持時間各 9.4 分, 21.3 分で検出された(図2)。同じ標品を FAA に特異性の高い 330nm 吸光で測定すると、フマル酸では 260nm 吸光度の 0.7%, ホモゲンチジン酸では 2.4%へと低下した。

HGD 過剰発現系にホモゲンチジン酸 2mM を添加した培養上清を分析したところ、260nm にてフマル酸ピークはなく、330nm で有意のピーク出現も見られなかった(図3)。培養細胞の破砕液の分析ではホモゲンチジン酸・フマル酸いずれのピークも見られなかった(図4)。

D. 考察

遺伝性高チロシン血症1型の診断は、異常代謝産物の分析+遺伝子解析で行うのが、方法論としては容易である。また、明らかな罹患者の診断については、これらの方

法で確定的な所見が得られるものと推測される。しかしながら、新生児スクリーニングでは確定診断に苦慮する非典型例や偽陽性例に遭遇することを想定しておく必要があり、酵素活性測定が希求されることになる。

FAAの化学構造を考えた場合、今回用いたHPLC条件では、より極性の高いジカルボン酸類であるフマル酸と、芳香環を有することでより極性が低いホモゲンチジン酸の中間の保持時間で溶離するものと推定されるが、今回の実験系では培養上清中にフマル酸の生成が確認できなかった。細胞破砕液の分析ではホモゲンチジン酸のピークも見出されず、今回の方法ではホモゲンチジン酸を細胞内に取り込ませることができていないものと考えられた。

E. 結論

ホモゲンチジン酸ジオキシゲナーゼ (HGD) を発現させた HEK293 細胞にホモゲンチジン酸を添加して培養したが、異化反応が進んだ証左は得られなかった。HGD 粗酵素を用いる反応系では高濃度酸素下での反応が求められ、さらに次のマレイルアセト作酸イソメラーゼの粗酵素を用意する必要があるなど、診断系を長く維持するには簡便性の点で難があるが、引き続き検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

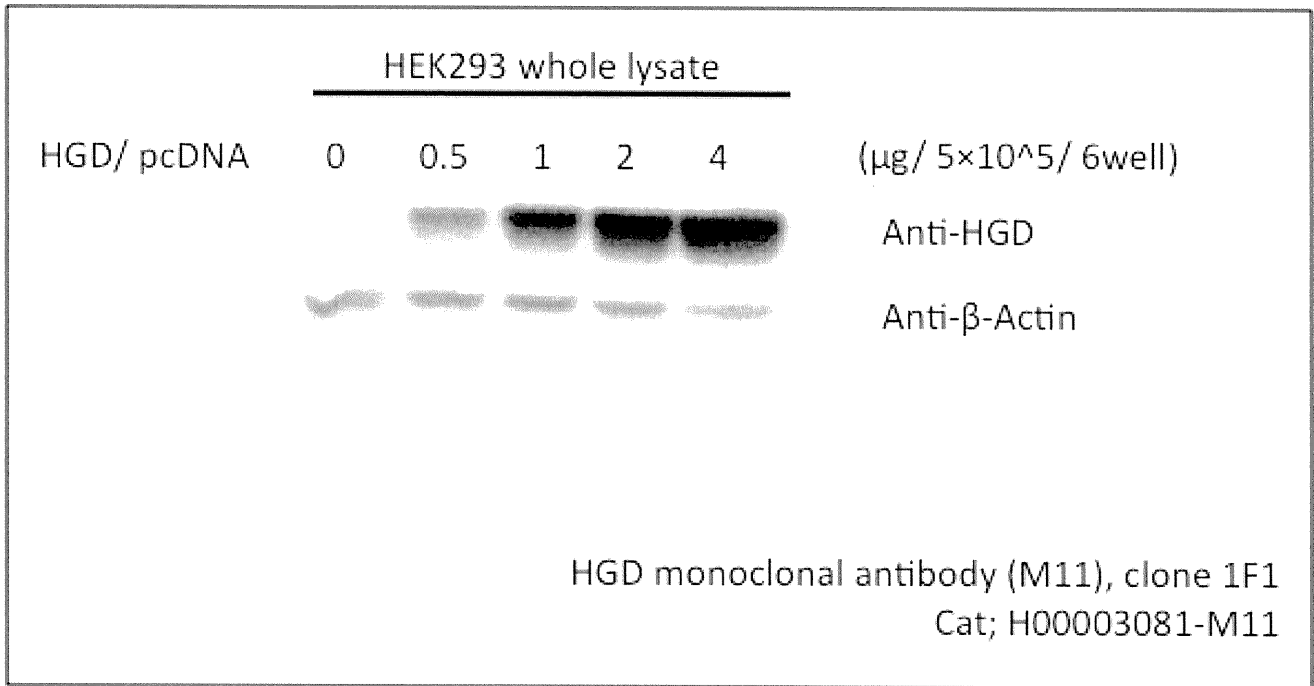


図1. ホモゲンチジン酸ジオキシゲナーゼ (HGD) を発現させた HEK293 細胞抽出物の western blot 解析結果