

SKY FISH analysis showed that the marker chromosome was derived from chromosome 14. Suspecting a relationship between the presence of marker chromosome 14 and upd(14)mat, we performed a DNA methylation test at *MEG3* in 14q32.2 [Hosoki et al., 2009], resulting in the abnormal hypomethylation of this gene (Fig. 1B). To confirm the origin of chromosome 14, microsatellite analysis using polymorphic markers on chromosome 14 was performed using ABI PRISM Linkage Mapping Set v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Microsatellite polymorphism analysis indicated that both alleles of chromosome 14 were derived from the patient's mother and marker chromosome 14 was from her father (Fig. 1C). Fragment analysis at D14S275 showed a small peak of paternal inheritance, indicating the mosaic status of the marker of paternal origin (Fig. 1D). To further define the region of marker chromosome 14, microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) analysis performed using a 105K microarray kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The gain of genomic copy numbers was detected at 14q11.2-q12 indicating the molecular karyotype as arr14q11.2q12(19,761,035–30,941,609) × 1–1.5 (Fig. 2A,B). *FOXG1* was located in this region. Both parents had normal karyotypes.

DISCUSSION

The present patient showed intrauterine growth retardation, feeding difficulty during the neonatal period, mild hypotonia, and postnatal growth retardation. These findings fit well with those of upd(14)mat. Chromosomal analysis revealed mosaicism of 47,XX,+mar(14)/46,XX. From the association of the clinical findings of this patient and the presence of small SMC 14, we suspected that her clinical symptoms were related to upd(14)mat and performed a DNA methylation test at *MEG3* in 14q32.2 and microsatellite polymorphism analysis. We successfully confirmed that her condition was upd(14)mat. Upd(14)mat is manifested in clinical features overlapping the Prader-Willi phenotype, particularly during infancy. Therefore, this syndrome is considered to be underestimated. Hosoki et al. [2009] recommended performing the *MEG3* methylation test for all undiagnosed infants with hypotonia.

Infantile spasms or seizures are uncommon complications of upd(14)mat. We postulated that an increased dosage of some genes in extra SMC could be responsible for West syndrome. To identify the affecting gene, we performed aCGH analysis. The analysis showed an increased dosage of 14q11.2-q12. These regions contain 124 RefSeq genes including *FOXG1*. Recently, *FOXG1* on 14q12 was reported to be a dose-sensitive gene, and duplication of this gene could cause severe epilepsy and developmental retardation [Yeung et al., 2009; Brunetti-Pierri et al., 2011]. Several patients with *FOXG1* haploinsufficiency have been associated with a Rett-like syndrome and epilepsy [Shoichet et al., 2005; Jacob et al., 2009]. Deletion of this gene could cause seizures, but not infantile spasms. On the other hand, duplication of this gene is reported to cause infantile spasms or seizures during infancy. Yeung et al. [2009] first reported a patient with 4.45 Mb microduplication in 14q12. This patient showed infantile spasms at 6 months. In addition, Brunetti-Pierri et al. [2011] studied six patients with duplication of the 14q12 region. In their series, the size of the duplication varied between ~3 and 14.5 Mb with the patient carrying the largest

duplication showing a 14.5 Mb duplication in 14q11.2-q13.1. The shortest region of overlap for the duplicated regions in the six patients contained only three genes, including *FOXG1*. Three of the six patients showed infantile spasms. The authors concluded that *FOXG1* represented the most interesting candidate for explaining the abnormal neurodevelopment phenotypes [Brunetti-Pierri et al., 2011]. The present patient also showed infantile spasms. However, her seizures are not refractory and are well controlled by anti-epileptic drugs and ACTH therapy. Her developmental delay is also not so severe. The 14q11.2-q12 region involved in our patient was almost equal in size to the largest duplication in Brunetti-Pierri's series. *FOXG1* is a dose-sensitive gene, and the results of our patient strongly suggested that an increased dosage of a small amount of this gene might lead to a milder West syndrome and milder intellectual disability.

The West syndrome has a heterogeneous etiology. Recent molecular biological approaches have identified several causative genes. To date, *ARX*, *CDKL5*, *STXBPI*, and *SPTAN1* have been reported as being associated with West syndrome [Kato et al., 2006; Otsuka et al., 2010; Saito et al., 2010]. These previous reports state that haploinsufficiency or small mutations of these genes are related to their phenotypes. In addition, duplication of *FOXG1* was recently reported to cause severe epilepsy and developmental delay, including infantile spasms. Epilepsies associated with increasing gene dosage are rare [Ramocki et al., 2010; Brunetti-Pierri et al., 2011]. The results of the study of our patient will provide further evidence that not only duplication but also a small increasing dose of *FOXG1* could cause infantile spasms or seizure during early infancy. Of course, in our patient, the contribution of other genes in 14q11.2-q12 could not be excluded.

The first patient with upd(14)mat had a Robertsonian translocation (13;14) [Temple et al., 1991]. This syndrome was also reported in carriers of Robertsonian translocation involving chromosome 14 and in patients with normal karyotypes [Mitter et al., 2006]. Other chromosomal rearrangements frequently associated with upd are small SMCs [Starke et al., 2003; Liehr et al., 2004]. Mitter et al. [2006] reported 10 patients with upd(14)mat, two of whom had SMC 14. In our patient, we were also able to determine that the marker chromosome was derived from chromosome 14 by SKY FISH, microsatellite polymorphism analysis, and aCGH analysis. The coexisting of small marker chromosome 14 and upd(14)mat is likely to be originated in functional trisomic rescue or gamete complementation in the formation of the chromosome aberration in our patient [Kotzot, 2002].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Shigeru Maruyama and Masashi Suda for providing patient information. The authors are grateful to the patient's family for their cooperation.

REFERENCES

- Brunetti-Pierri N, Paciorowski AR, Ciccone R, Mina ED, Bonaglia MC, Borgatti R, Schaaf CP, Sutton VR, Xia Z, Jelluma N, Ruivenkamp C, Bertrand M, de Ravel TJL, Jayakar P, Belli S, Rocchetti K, Pantaleoni C, D'Arrigo S, Hughes J, Cheung SW, Zuffardi O, Stankiewicz P. 2011.

- Duplications of *FOXG1* in 14q12 are associated with developmental epilepsy, mental retardation, and severe speech impairment. *Eur J Hum Genet* 19:102–107.
- Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. 2009. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr* 155:900–903.
- Jacob FD, Ramaswamy V, Andersen J, Bolduc FV. 2009. Atypical Rett syndrome with selective *FOXG1* deletion detected by comparative genomic hybridization: Case report and review of literature. *Eur J Hum Genet* 17:1577–1581.
- Kato M. 2006. A new paradigm for West syndrome based on molecular and cell biology. *Epilepsy Res* 70:S87–S95.
- Kotzot D. 2002. Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD): Coincidence or consequence? *J Med Genet* 39:775–778.
- Kotzot D, Utermann G. 2005. Uniparental disomy (UPD) other than 15: Phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet Part A* 136A:287–305.
- Liehr T, Claussen U, Starke H. 2004. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 107:55–67.
- Mitter D, Buiting K, von Eggeling F, Kuechler A, Liehr T, Mau-Holzmann UA, Prott EC, Wieczorek D, Gillesen-Kaesbach G. 2006. Is there a higher incidence of maternal uniparental disomy 14 [upd(14)mat]? Detection of 10 new patients by methylation-specific PCR. *Am J Med Genet Part A* 140A:2039–2049.
- Otsuka M, Oguni H, Liang JS, Ikeda H, Imai K, Hirasawa K, Imai K, Tachikawa E, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. 2010. *STXBPI* mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome—Result of Japanese cohort study. *Epilepsia* 51:2449–2452.
- Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. 2010. The *MECP2* duplication syndrome. *Am J Med Genet Part A* 152A:1079–1088.
- Saito H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. 2010. Dominant-negative mutations in α -II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* 86:881–891.
- Shoichet SA, Kunde SA, Viertel P, Schell-Apacik C, von Voss H, Tommerup N, Ropers HH, Kalscheuer VM. 2005. Haploinsufficiency of novel *FOXG1B* variants in a patient with severe mental retardation, brain malformations and microcephaly. *Hum Genet* 117:536–544.
- Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. 2003. Small supernumerary marker chromosome (SMCs): Genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 114:51–67.
- Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. 1991. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 28:511–514.
- Yeung A, Bruno D, Scheffer IE, Carranza D, Burgess T, Slater HR, Amour DJ. 2009. 4.45 Mb microduplication in chromosome band 14q12 including *FOXG1* in a girl with refractory epilepsy and intellectual impairment. *Eur J Med Genet* 52:440–442.

Original article

A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder

Yoriko Watanabe^{a,1,*}, Shoji Yano^b, Tetsuya Niihori^c, Yoko Aoki^c,
Yoichi Matsubara^c, Makoto Yoshino^a, Toyojiro Matsuishi^{a,1}

^a Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, Japan

^b Genetics Division, Department of Pediatrics, LAC+USC Medical Center, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

^c Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

Received 6 July 2010; received in revised form 3 October 2010; accepted 6 October 2010

Abstract

A connection between LEOPARD syndrome (a rare autosomal dominant disorder) and autism spectrum disorders (ASDs) may exist. Of four related individuals (father and three sons) with LEOPARD syndrome, all patients exhibited clinical symptoms consistent with ASDs. Findings included aggressive behavior and impairment of social interaction, communication, and range of interests. The coexistence of LEOPARD syndrome and ASDs in the related individuals may be an incidental familial event or indicative that ASDs are associated with LEOPARD syndrome. There have been no other independent reports of the association of LEOPARD syndrome and ASDs. Molecular and biochemical mechanisms that may suggest a connection between LEOPARD syndrome and ASDs are discussed.

© 2010 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: LEOPARD syndrome, Noonan syndrome; Autism spectrum disorders (ASDs); RAS/MAPK signal transduction pathway

1. Introduction

LEOPARD syndrome (OMIM#151100) is a rare autosomal dominant disorder characterized by **L**entigines, **E**lectrocardiogram abnormalities, **O**cular hypertelorism, **P**ulmonic valvular stenosis, **A**bnormalities of genitalia, **R**etardation of growth, and **D**eafness. This syndrome is caused by germline missense mutations in the *PTPN11* gene that encodes Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 (Shp2): non-receptor protein-tyrosine phosphatase comprising two N-terminal SH2 domains, a catalytic domain, and a C

terminus with tyrosylphosphorylation sites and a proline-rich stretch. The mutations induce catalytically impaired Shp2 by a “dominant negative effect” [1–2].

In the more common Noonan syndrome, approximately 50% of patients have *PTPN11* mutations scattered over the entire Shp2, including the catalytic domain. The mutations resulting in the Noonan phenotype are the “gain-of-function” mutations, and they exhibit substantially increased catalytic ability. Although LEOPARD syndrome and Noonan syndrome are caused by *PTPN11* mutations resulting in opposite effects, they share many common clinical features, including physical dysmorphic findings and intellectual disability [1].

The term “autism spectrum disorders (ASDs)” was first used by Lorna Wing [3] and then widely used as a category comprised of autistic disorder, Asperger’s

* Corresponding author. Tel.: +81 942 35 3311x3656; fax: +81 942 38 1792.

E-mail address: yorika@med.kurume-u.ac.jp (Y. Watanabe).

¹ The author contributed equally to this work.

disorder, and other related conditions [4]. These conditions are very common neurobehavioral disorders that are characterized by impairments in three behavioral domains, including social interaction, language/communication/imaginative play, and a range of interests and activities [3–5].

At least ten genes have been reported to be associated with ASDs [6]. Except for Rett syndrome, the other pervasive developmental disorder (PDD) subtypes including autistic disorder, Asperger's disorder, disintegrative disorder, and PDD Not Otherwise Specified (PDDNOS) are not tightly linked to any particular gene mutations. Several common genetic syndromes are known to be associated with ASDs. Autism is frequent in patients with tuberous sclerosis (TSC) [7], with neurofibromatosis type 1 [8,9] and with Fragile X syndrome [10]. Studies of psychological profiles of adults with Noonan syndrome did not suggest a specific behavioral phenotype, but difficulties with social competence and emotional perceptions were noted [11]. A case of Noonan syndrome who was also diagnosed with autism was reported [12]. The present study of neuropsychiatric evaluation in a familial case of LEOPARD syndrome indicates all patients satisfied the criteria of ASDs. An association of LEOPARD syndrome and ASDs has not been reported previously. The familial case presented in this report may suggest such an association.

2. Patients and methods

After obtaining written informed consent, fifteen coding exons in *PTPN11* were sequenced in each patient following the methods described somewhere else [13].

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV-TR) [5] and The high-functioning Autism Spectrum Screening Questionnaire (ASSQ) [14] were used in neuropsychiatric evaluation of the subjects.

Patient 1 is a 20-year-old male who was born as the second child to a non-consanguineous Japanese couple. His early developmental milestones were reportedly unremarkable. He was clinically diagnosed with LEOPARD syndrome at age 7 years based on findings that included lentigines, multiple café-au-lait spots, electrocardiogram (ECG) abnormalities, ventricular septal defect, ocular hypertelorism, short stature, and unilateral renal hypoplasia. *PTPN11* mutation analysis revealed a heterozygous mutation of 1403C > T (T468 M). The patient was diagnosed as having Asperger's disorder based on ASSQ and DSM-IV-TR, at age 12 years. His intelligence quotient (IQ) by the Wechsler Intelligence Scale for Children-third edition (WISC-III) was 85 (verbal: 77, performance 98). His ASSQ score by mother's rating was 41. He met the DSM-IV-TR diagnostic criteria of Asperger's disorder with all subcategories in the category of Qualitative impairment in social interaction

(Category 1), three subcategories (1,2, and 4) in the category of Restricted repetitive and stereotyped patterns of behavior, interests and activities (Category 2), and the rest of the four categories (Table 1).

Patient 2 is a 15-year-old younger brother of Patient 1. His early infantile developmental milestones were unremarkable. He was diagnosed with growth retardation at age 2½ years. At age 12 years his clinical findings of a few café-au-lait spots, ocular hypertelorism, and undescended testes led us to obtain *PTPN11* mutation analysis, which showed the same heterozygous mutation of 1403C > T. At age 9 years, a diagnosis of Asperger's disorder was made based on ASSQ and DSM-IV-TR. His full-scale IQ by WISC-III at age 9 years was 99 (verbal 104, performance 92). His ASSQ score by parental rating was 32 at age 15 years. He also met the Asperger's disorder diagnostic criteria with all subcategories of Category 1, three of Category 2 (1, 2, and 4), and the rest of the categories (Table 1).

Patient 3 is the 22-year-old eldest brother of Patients 1 and 2. His developmental milestones were normal, although his ritualistic behavior and difficulties in relating to peers were noted in his childhood. He had a surgical repair of bilateral undescended testes and inguinal hernia. He was diagnosed with Wolff-Parkinson-White syndrome at age nine years. He has ocular hypertelorism and short stature. The same *PTPN11* heterozygous mutation found in the two younger siblings was identified in this patient. He attends college, and was diagnosed as having PDDNOS, because he also had impaired development of reciprocal social interaction associated with communication skills, repetitive routine, and ritualistic behavior. His ASSQ score was 7 at age 22 years (Table 1).

Patient 4 is a 55-year-old male who is the father of the siblings. He has prominent lentigines, bilateral mild hearing loss, cardiac anomalies, ECG abnormalities, short stature, and apparent ocular hypertelorism. His early developmental milestones are not well known. He has been noted to have obsession with a specific topic, repetitive routine and rituals, and clumsy movements. At age 50 years, his social skills and aggressive behavior were noted to be deteriorating, and consequently he was suspected of having Asperger's disorder based on DSM-IV-TR. He met the diagnostic criteria of Asperger's disorder with Category 1 (1 and 3), Category 2 (1 and 2), and the rest of the four categories. His ASSQ score was 20 at age 55 years by his wife's evaluation. He has the same heterozygous *PTPN11* mutation (Table 1).

3. Discussion

The presented familial case of LEOPARD syndrome included individuals (patients 1, 2, and 4) diagnosed with or suspected of having Asperger's disorder, and

Table 1
Summary of clinical findings and *PTPN11* mutation.

	Pt. 1 Male	Pt. 2 Male	Pt. 3 Male	Pt. 4 Male
Age	20 y	15 y	22 y	55 y
<i>Physical findings</i>				
Skin: café-au-lait spots	multiple	a few	a few	a few
Lentigines	+++	+++	–	+++
Cardiac defects	VSD	No	No	No
EKG abnormalities	+	No	WPW	No
Ocular hypertelorism	+	+	+	+
Pulmonary stenosis	No	No	No	No
Abnormal genitalia	No	Und. Testes*	Und. Testes*	No
Renal anomalies	R-hypoplasia	No	No	No
Retardation of growth	Yes	+	+	No
Deafness	No	No	No	Yes
<i>Miscellaneous:</i>				
Rocker bottom feet	Yes	Yes	Yes	No
Macrocephaly	Yes	Yes	Yes	No
<i>PTPN11</i> mutation	T468 M	T468 M	T468 M	T468 M
<i>Neuropsychological</i>				
Diagnosis	AD**	AD**	PDDNOS***	AD**
ASSQ score ⁽¹⁾ (age)	41 (12 y)	32 (15 y)	7 (22 y)	20 (50 y)
WISC-III ⁽²⁾ (age)	85 (12 y)	99 (9 y)	n/a	n/a
-Verbal/performance	77/98	104/92	n/a	n/a

* Und. Testes, undescended testes.

** AD, Asperger's disorder.

*** PDDNOS, Pervasive developmental disorder not otherwise specified.

⁽¹⁾ ASSQ score, Autism Spectrum Screening Questionnaire Score. The cutoff score of 3 predicts 91% of the true positive rate of Autistic spectrum disorders.

⁽²⁾ WISC-III, Wechsler Intelligence Scale for Children-third edition.

patient 3 was diagnosed as having PDDNOS, which may lead to the diagnosis of ASD. ASDs were first introduced by Lorna Wing, who suggested that Asperger's disorder is a type of ASD and described in detail its various manifestations in speech, nonverbal communication, social interaction, motor coordination, motor clumsiness, and idiosyncratic interests [3]. Patient 3 did not have enough clinical symptoms to meet the diagnostic criteria for Asperger's disorder; however, he had some symptoms suggestive of ASD in his childhood that led to a diagnosis of PDDNOS.

The ASSQ is a 27-item checklist for completion by lay informants when assessing characteristic symptoms of Asperger's disorder and high-functioning autism in children and adolescents with normal intelligence or mild mental retardation. The ASSQ allows for rating on a 3-point scale (0, 1, or 2; 0 indicating normality, 1 some abnormality, and 2 definite abnormality). The range of possible scores is 0–54. The mean ASSQ parent scores in the Asperger's disorder validation sample were 25.1 (SD, 7.3) [14]. The cutoff score of 13 is 91% of the true positive rate of ASDs. The ASSQ score was established as a screening tool primarily for children between 6 and 17 years of age by parents and/or teachers. The delayed evaluation of patient 3 may account for the difference in diagnosis between this patient and his siblings.

ASDs are known to be associated with particular genetic disorders such as fragile X syndrome [10,15,

16], tuberous sclerosis (TSC) [7], and neurofibromatosis type 1 [8,9]. Fifty percent of children with TSC have behavioral problems in the form of ASDs. Gene mutations in either *TSC1* or *TSC2* influence neural precursors, resulting in abnormal cell differentiation and dysregulated control of cell size. These cells migrate to the cortex to generate an abnormal collection of inappropriately positioned neurons, causing widespread cortical disorganization and structural abnormalities [7]. Mutations in *PTPN11* causing LEOPARD syndrome induce catalytically impaired Shp2. In situ hybridization detected Shp2 expression in the neural ectoderm and nervous system in mouse embryos, suggesting an involvement of Shp2 in neural development. Shp2 is a critical signaling molecule in the coordinated regulation of progenitor cell proliferation and neuronal/astroglial cell differentiation. The studies with mutant mouse strains with Shp2 selectively deleted in neural precursor cells showed a dramatic phenotype of growth retardation, early postnatal lethality, and multiple defects in proliferation and cell fate specification in neural stem/progenitor cells [17]. The product of the *TSC2* gene tuberin is known to up-regulate the B-RAF/MEK/MAPK signal transduction pathway. B-RAF is required for neuronal differentiation, suggesting another possible link between B-RAF signaling and the clinical manifestations of TSC including ASDs [18]. Disturbed neuronal cell differentiation and development due to mutations in

the TSC genes and the *PTPN11* gene are likely to contribute to the development of ASDs in patients with these syndromes.

NF-I is well known to be associated with ASDs. The prevalence of autism in patients with NF-I was reported to be 4% [9]. The well-known function of the NF-I protein is to act as a RAS-GTPase-activating protein known to be involved in the regulation of the RAS-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Mutations in the NF-I gene are thought to result in activation of the RAS/MAPK signal transduction pathway [2]. Clinical overlap between LEOPARD syndrome and NF-I is also well known [19].

Approximately 50% of patients with Noonan syndrome are due to missense *PTPN11* mutations [20]. *PTPN11* encodes SHP2, a protein tyrosine phosphatase, that is involved in the activation of the RAS/MAPK cascade [2]. Noonan syndrome is caused by “gain of function” *PTPN11* mutations [1,2], and the SHP2 mutants due to the *PTPN11* mutations causing Noonan syndrome cause prolonged activation of the RAS/MAPK pathway [2]. Schubbert et al. [21] reported that germline KRAS mutations cause Noonan syndrome through the hyperactive RAS/MAPK pathway.

Herault et al. [22] reported a positive association of the HRAS gene and autism. The psychological profiles of adults and children with Noonan syndrome have been studied, and deficiencies in social and emotional recognition and expression have been identified in adults, while low verbal IQ, clumsiness, and impairment of developmental coordination have been reported in children [23].

To date, there have been no reports to suggest an association of LEOPARD syndrome and ASDs. Our observations in this familial case may suggest at least some degree of association between LEOPARD syndrome and ASD phenotypes possibly through the RAS/MAPK signal transduction pathway. Further studies with more patients with LEOPARD syndrome are needed to establish the association and to investigate the genetic contributing factors causing ASDs, leading to the prevention and earlier detection of ASDs and better management of patients with these disorders.

References

- [1] Kontaridis M, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem* 2006;281:6785–92.
- [2] Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 2008;29:992–1006.
- [3] Wing L. Autistic spectrum disorders. *BMJ* 1996;312:327–8.
- [4] Khouzam HR, El-Gabalawi F, Pirwani N, Priest F. Asperger's disorder: a review of its diagnosis and treatment. *Comp Psychiatr* 2004;45:181–91.
- [5] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed.-Text Revision. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2000.
- [6] Muhle R, Trentacose SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics* 2004;113:e472–86.
- [7] Curatolo P. Tuberous sclerosis: genes, brain, and behavior. *Dev Med Child Neurol* 2006;48:404.
- [8] Gillberg C, Forsell C. Childhood psychosis and neurofibromatosis-More than a coincidence? *J Autism Dev Disord* 1984;14:1–8.
- [9] Williams PG, Hersh JH. The association of neurofibromatosis Type I and autism. *J Autism Dev Disord* 1998;28:567–71.
- [10] Cohen IL, Sudhalter V, Pfadt A, Jenkins EC, Brown WT, Vietze PM. Why are autism and the fragile-X syndrome associated? Conceptual and methodological issues. *Am J Hum Genet* 1991;48:195–202.
- [11] Verhoeven W, Wingbermuhle E, Egger J, Van der Burgt I, Tuinier S. Noonan syndrome: psychological and psychiatric aspects. *Am J Med Genet A* 2008;146A:191–6.
- [12] Ghaziuddin M, Bolyard B, Alessi N. Autistic disorder in Noonan syndrome. *J Intell Disabil Res* 1994;38:67–72.
- [13] Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, et al. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet* 2005;50:192–202.
- [14] Ehlers S, Gillberg C, Wing L. A screening questionnaire for Asperger syndrome and other high-functioning autism spectrum disorders in school age children. *J Autism Dev Disord* 1999;29:129–41.
- [15] Wahlstrom J, Gillberg C, Gustavson KH, Holmgren G. A Swedish multicenter study. *Am J Med Genet* 1986;23:403–8.
- [16] Tranebjaerg L, Kure P. Prevalence of fra (X) and other specific diagnoses in autistic individuals in a Danish county. *Am J Med Genet* 1991;38:212–4.
- [17] Ke Y, Zhang EE, Hagihara K, Wu D, Pang Y, Klein R, et al. Deletion of Shp2 in the brain leads to defective proliferation and differentiation in neural stem cells, and early postnatal lethality. *Mol Cell Biol* 2007;27:6706–17.
- [18] Karbowiczek M, Cash T, Cheung M, Robertson GP, Astrinidis A, Henske EP. Regulation of B-Raf kinase activity by Tuberin and Rheb is mammalian target of Rapamycin (mTOR)-independent. *J Biol Chem* 2004;279:29930–7.
- [19] Sarkozy A, Conti E, Digilio MC, Marino B, Morini E, Pacileo G, et al. *J Med Genet* 2004;41:e68.
- [20] Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29:465–8.
- [21] Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2006;38:331–6.
- [22] Herault J, Petit E, Martineau J, Perrot A, Lenoir P, Cherpi C, et al. Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of HRAS gene. *Am J Med Genet* 1995;60:276–81.
- [23] Lee DA, Portnoy S, Hill P, Gillberg C, Patton MA. Psychological profile of children with Noonan syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2005;47:35–8.

第157回 学術集会

フェニルケトン尿症の新しい治療法

—食事療法から薬物療法へ—

大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学分野 教授 新宅治夫

はじめに

フェニルケトン尿症 (PKU) の発見は1934年ノルウェーの医師フェーリングが、尿に独特の臭いのする重度知能障害の姉弟の診察を依頼されたことに始まる。彼はその臭いが重症糖尿病合併時の尿ケトン体 (Ketone bodies) 臭である可能性も考え、当時ケトン体検出に用いられていた塩化第二鉄溶液を加えてみた。ケトン体なら茶褐色に変化するはずであったが、患児の尿は緑色に変化した。驚いた彼は患児の尿を大量に集め精製して、緑色の原因がフェニルピルビン酸であることを確認し報告した。フェニルピルビン酸はケト基 ($>C=O$) を有するケトンであるのでフェニルケトンと呼ばれ、患者はPKUと呼ばれるようになった。その後PKUはフェニルア

ラニン (Phe) 水酸化酵素の先天性な障害により、Pheからチロシンへの代謝が障害され、Phe濃度の上昇のため、精神発達遅滞、痙攣などの中枢神経症状、赤毛、色白などのメラニン欠乏を主徴とする疾患であることが明らかにされた (図1)。なお、患者の尿臭 (ネズミ尿臭、カビ臭と表現される) はフェニル酢酸による。

1953年、ハイデルベルグ大学のビッケル教授はPhe制限食が本症の治療法としてきわめて有効なことを報告したが、知能障害、赤毛などの症状が現れるのは乳児期後半であり、その頃から厳格な食事療法を始めても多少とも脳に障害を残すことは避けられなかった。このため早期発見の重要性が指摘されるようになり、わが国でも1977年から公費による新

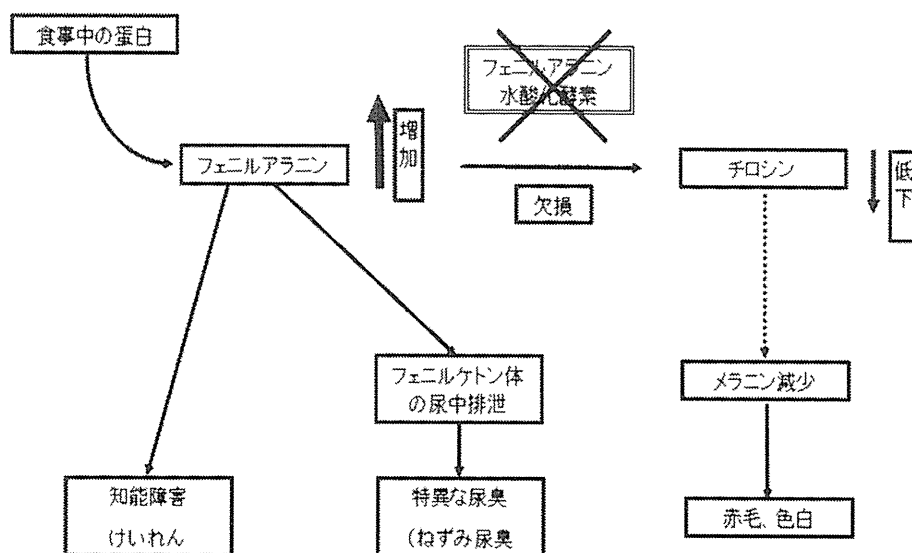


図1 フェニルケトン尿症における代謝

生児マス・スクリーニングが開始され、PKUの早期発見・早期治療が行われている。PKUは食事療法で知能障害を予防できることが明らかにされた最初の疾患である。

異型PKUの発見

1975年英国の女性医師スミスらは食事治療に反応せず中枢神経症状が進行する患者を発見し、異型PKUとして報告した。スミス医師はフェニルアラニン水酸化反応にはフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) だけでなく水素の供与体として補酵素テトラヒドロbiopterin (BH4) が必要であることに気づいてこの補酵素の代謝異常が異型PKUの原因であることを報告した。その中で、BH4が芳香族アミノ酸水酸化反応に共通の補酵素であるためPAHの障害による高Phe血症と同時に、チロシン水酸化酵素 (TH) とトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の障害による神経伝達物質の欠乏が重篤な中枢神経症状を引き起こすこ

とを明らかにし、食事治療とともにこれらの神経伝達物質の前駆体であるL-DOPAと5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) を投与することで治療できる可能性を示した。早期治療により予後良好であり、現在ではBH4欠損症と呼んでいる (図2)。

BH4欠損症 (異型PKU) の代謝異常については1966年のプテリジン代謝異常症の国際シンポジウムでBH4の代謝に異常があれば芳香族アミノ酸水酸化酵素全般に障害が起るため、PAHの異常によるPKUに比べて重症の神経症状をきたすことがすでに予測されていた。しかしこのBH4欠損症がスミスらにより始めて報告されるまでに約10年が経過し、この間食事治療だけで中枢神経症状の進行する (異型) PKU患者が適切な治療を受けることはなかった。この10年のブランクを考えると常に最先端の知識をもちそれを日常臨床に取り入れることの重要性を痛感させられる。

このBH4欠損症の治療に開発されたBH4

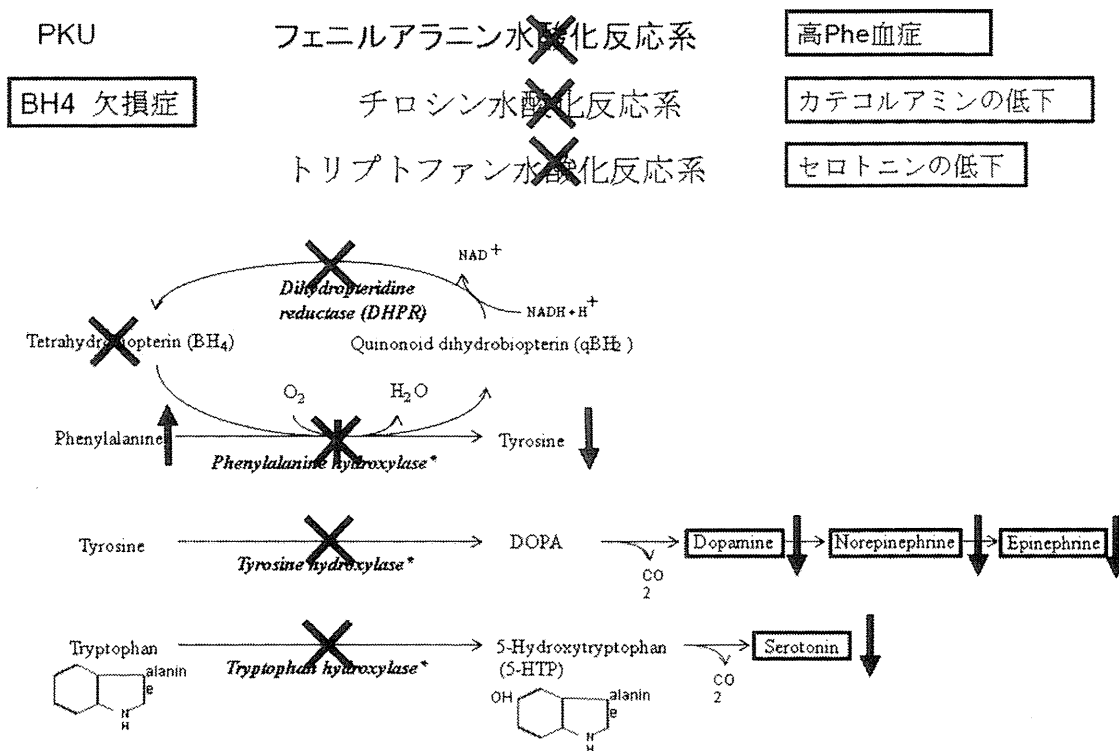


図2 BH4欠損症の代謝

は、実際にBH4欠損症の患児に投与すると数時間で血中Phe値は正常範囲まで低下するが、PAH欠損症であるPKU及び高Phe血症患児に投与しても血中Phe値は全く低下しないことから、BH4欠損症とPAH欠損症の鑑別診断にも経口負荷試験として用いられるようになった(図3)。

BH4反応性高Phe血症の発見

1999年に東北大学のKureらは、BH4経口負荷試験でBH4に反応して血中Phe値が低下するにも拘らず、プテリン分析やDHPR活性の測定でBH4欠損症とは考え難い症例を報告した。2004年著者らはこのような症例では、BH4の内服で食事療法の軽減や、普通食でも

血中Phe値がコントロールできることを報告し、これがBH4反応性高Phe血症、あるいはBH4反応性PAH欠損症とよばれるようになった(図4)。このBH4反応性高Phe血症を的確に診断し安全に治療するために設置された「BH4反応性高Phe血症に関する治療基準設定専門委員会」(以下専門委員会と略)の報告をもとに、病態の解明と診断・治療法の開発が行われるようになった。

1. 病態と頻度

BH4反応性高Phe血症において、BH4がPAH活性を上げるメカニズムの詳細は不明な点も多いが、次のような可能性が示されている。第一にBH4に対する変異PAH蛋白の親和性の低下に起因するMichaelis定数(以下Km値と略)の上昇、第二にBH4がPAH蛋白を安定化し分解から保護することにより活性を上げることなどであるが、その他BH4の効果はPheの濃度依存的にPAHの高次構造に作用

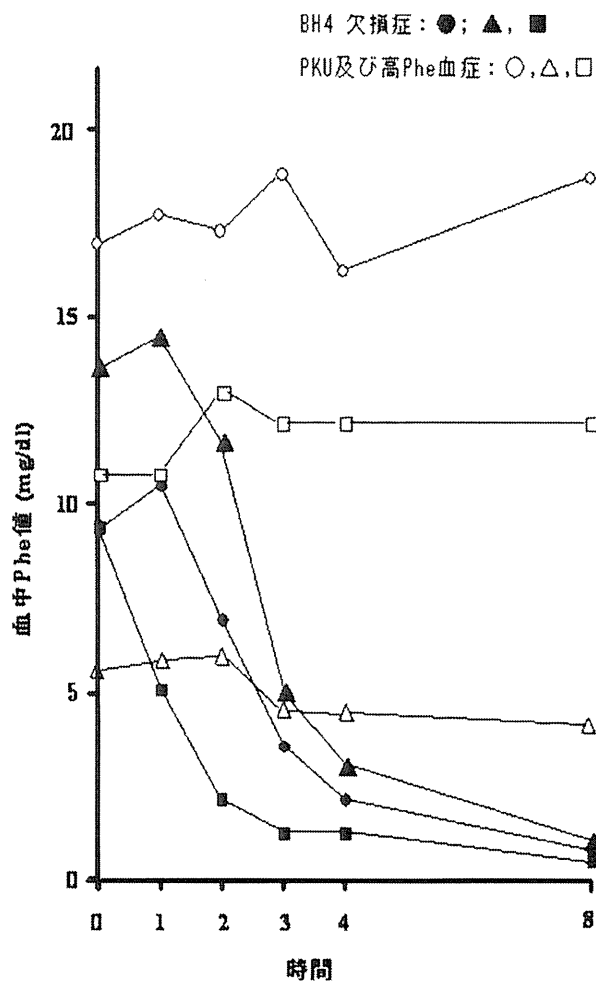


図3 BH4経口負荷試験

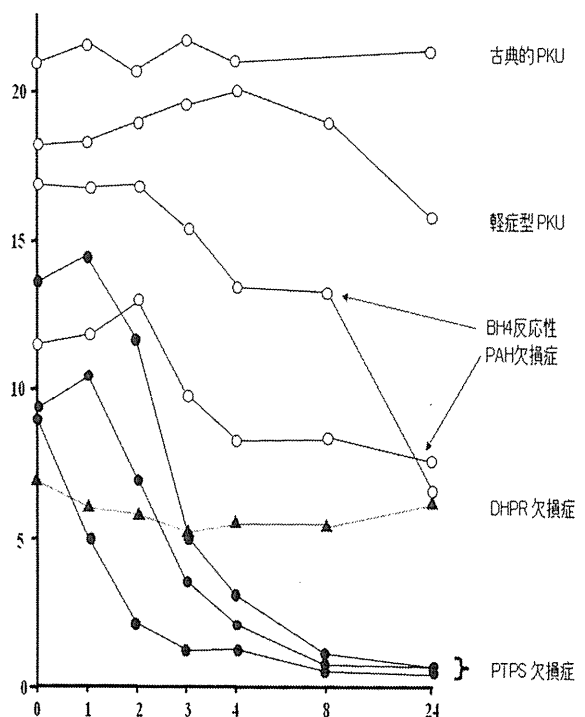


図4 BH4・1回負荷試験

して安定性や活性を上げることが報告されている。いずれにしても細胞内のBH4濃度を上げることで酵素活性が上昇するためには、ある程度の残存活性が認められなければならない。我が国におけるBH4反応性高Phe血症の遺伝子解析では、軽症型の遺伝子変異と考えられるR241CまたはP407S変異が少なくとも一方の対立遺伝子に認められた。このようにBH4反応性が遺伝子異常から推測されることもあるが、生理的な条件下でPAH活性に対するBH4の効果はPheの濃度に依存し複雑に制御されているためBH4反応性を診断するにはBH4の経口負荷試験が不可欠である。日本におけるBH4反応性高Phe血症の頻度は専門委員会が暫定診断基準を決めた2002年以後はPAHの異常が原因の高Phe血症の25%であった。米国で行われた8~49歳（平均20歳）のPKU患者87人に対する多施設間二重盲検法では、44%（18/41）、また欧米で行われた8~48歳（平均21.8歳）の高Phe血症患者490人に対するBH4投与の治験では、BH4反応性高Phe血症の頻度は治療前の血中Phe値により異なり、10mg/dl未満の54%、10~15mg/dlの24%、15~20mg/dlの10%、20mg/dl以上の10%であった。

2. 診断と治療

BH4反応性高Phe血症を診断するためには、高Phe血症の中でビオプテリン代謝に異常がなく、BH4経口負荷試験で血中Phe値が一定以上低下することを証明する必要がある。日本先天代謝異常学会の専門委員会では、通常BH4・1回負荷試験において血中Phe値が負荷前値に比べ20%以上低下した患者、あるいはBH4・1回負荷試験でBH4反応性が否定された患者にさらにBH4・1週間投与試験を実施し血中Phe値が負荷前値に比べ30%以上低下した患者をBH4反応性高Phe血症と診断

することとしている。これは診断の精度を高めると同時にBH4投与による治療効果を予測するために行うものである。

特殊ミルク共同安全開発委員会の専門委員会が定めた暫定治療基準によると「普通食下、BH4を原則として1日10mg/kg（分3）を投与し、臨床症状等の観察を行いながら、血中Phe値に応じて治療方法を検討し、1日20mg/kgのBH4投与によっても治療目標とする血中Phe値に到達しない場合は、Phe制限食を併用する」としているが、実際にはBH4の投与量は15~20mg/kgでかなりの症例で食事療法無しでコントロール可能であると考えられる。

安全性の面では、嘔吐がみられたためBH4投与量を減量した1例を除き、臨床上特に問題となる症状や臨床検査値の異常な変動等の有害事象は認められなかったと報告されている。

2008年にBH4反応性高フェニルアラニン血症に対する治療薬としてBH4の適応拡大が認められたため、日本先天代謝異常学会では2009年にBH4の適正使用に関する提言を行っている。

おわりに

このように食事治療に代わってBH4の大量投与による薬物治療がPKUの新しい治療法として世界的に注目されている。従来唯一と考えられていた食事治療に対して薬物治療の選択肢が新たに加わることにより、Phe制限食を嫌って血中Phe値をコントロールすることが困難な患児もBH4を併用することにより改善できる可能性が示された。さらに普通食下でBH4単独治療、あるいはBH4の投与でPhe制限食を緩めることができれば、治療のコンプライアンスは著しく改善し、患児だけでなく保護者のQOLも向上することが期待され

る。世界に先駆けて日本で最初に始められた画期的な治療法であり、厳密なコントロールが要求される乳幼児期のBH4療法は必須の治療法と考えられるが、新生児期には慎重な使用が求められている。

シンポジウム：新しい治療法の適応とガイドライン

BH4 反応性 PAH 欠損症

新宅 治夫

大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学

要旨 テトラヒドロbiopterin (BH4) 反応性高フェニルアラニン血症は、フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) の異状に基づく高フェニルアラニン血症であるが、PAH の補酵素 BH4 の経口投与により血中フェニルアラニン値 (血中 Phe 値) の低下する疾患で、BH4 反応性 PAH 欠損症または BH4 反応性軽症 PKU と呼ばれることもある。日本では 2008 年に BH4 反応性高 Phe 血症に対して BH4 療法の適応拡大が承認された。診断は新生児マススクリーニングで biopterin 代謝に異常がなく BH4・1 回負荷試験で血中 Phe 値が負荷前値の 20%以上の低下を認めた場合、また BH4・1 週間投与試験で血中 Phe 値が負荷前値の 30%以上低下することが必要である。治療は BH4 の内服だけで食事治療の軽減または中止できることが特徴である。BH4 反応性高 Phe 血症の診断と BH4 療法は、事前に BH4 専門委員会の承認を得ることが必要である。

Key words: テトラヒドロbiopterin, フェニルケトン尿症, BH4 反応性軽症 PKU, 高フェニルアラニン血症, フェニルアラニン水酸化酵素

序 言

テトラヒドロbiopterin (以下 BH4) 反応性高フェニルアラニン血症 (以下 BH4 反応性高 Phe 血症) は、フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) の異状に基づく高フェニルアラニン血症 (以下高 Phe 血症) であるが、補酵素 BH4 の経口投与により血中フェニルアラニン値 (以下血中 Phe 値) の低下する疾患で、BH4 の代謝に異常のある BH4 欠損症¹⁾と区別するため、BH4 反応性 PAH 欠損症または BH4 反応性軽症フェニルケトン尿症 (PKU) と呼ばれることもある²⁾(図 1)。2002 年に特殊ミルク事務局に「BH4 反応性高フェニルアラニン血症に関する治療基準設定専門委員会」が設置され、暫定診断および治療基準が発表された³⁾。それまでに発見されていた日本人 12 人の患者の長期治療経過を詳細に検討した報告⁴⁾を基に米国で臨床試験が始まり、2007 年 12 月に世界で初めて BH4 反応性高 Phe 血症の BH4 療法が承認され、この米国の試験データを基に日本でも 2008 年 7 月に世界で 2 番目に BH4 反応性高 Phe 血症に対し

て BH4 療法の適応拡大が承認された。さらにヨーロッパでも 2008 年 12 月に承認された。これで BH4 療法は BH4 欠損症だけでなく PAH 欠損症の治療にも全世界で使用されるようになった。BH4 の薬品名はサプロプテリン塩酸塩で日本では bioptin 顆粒 2.5% (BIOPTEN®)、欧米ではクバン錠 (KUVAN®) の商品名で販売されている。これを踏まえて日本先天代謝異常学会では BH4 反応性高 Phe 血症の診断と治療に関する専門委員会 (以下 BH4 委員会) を設置し、BH4 の適正使用に関する提言を発表した⁵⁾。

診断と治療法

1. 診断

新生児マススクリーニングで bioptin 代謝に異常がなく BH4・1 回負荷試験で血中 Phe 値が負荷前値の 20%以上の低下を認めた場合、また BH4・1 回負荷試験で診断されなかった場合でも BH4・1 週間投与試験で血中 Phe 値が負荷前値の 30%以上低下した場合は BH4 反応性高 Phe 血症と診断される。

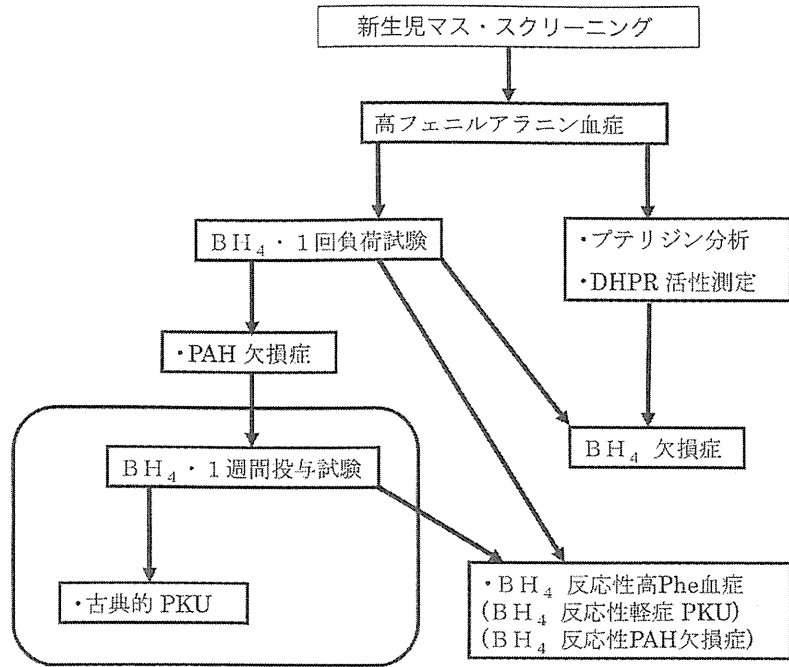


図1. 新生児・マススクリーニングにおける高フェニルアラニン血症の鑑別診断 (BH₄・1回負荷試験は乳児期以後に行う)

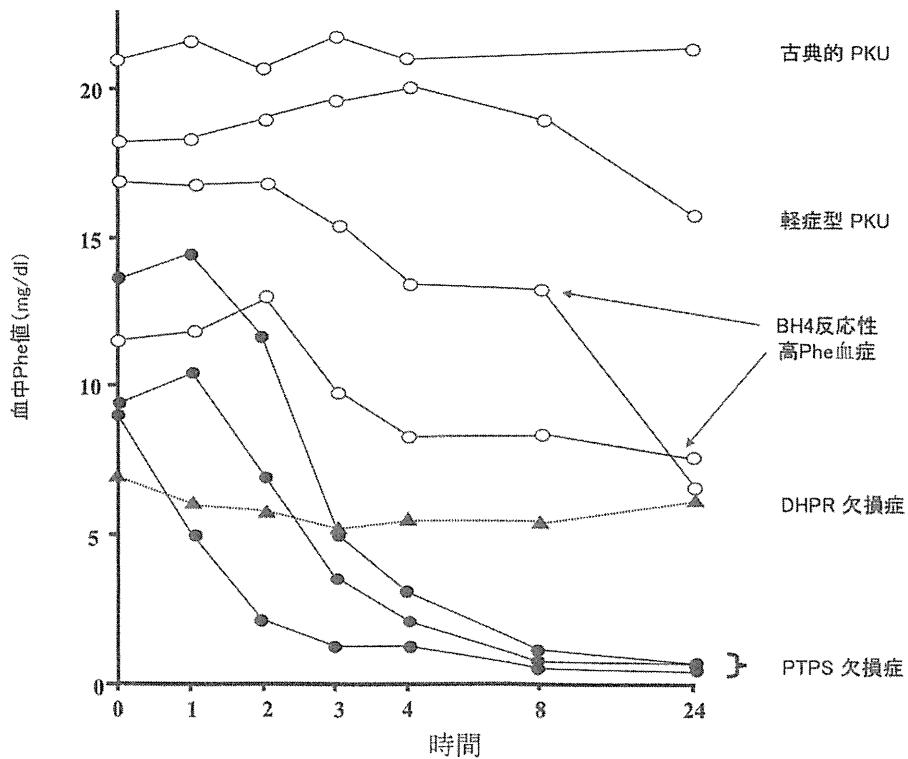


図2. BH₄・1回負荷試験におけるBH₄欠損症、PAH欠損症、BH₄反応性高Phe血症の血中Phe値の変化

(1) BH₄・1回負荷試験

新生児・マススクリーニングでは生後5日目にガスリーろ紙血を採取しPhe値が2mg/dl以上を高Phe血症として再検査を行い再び乾燥濾紙血で

Phe値が2mg/dlを越えた場合、精密検査のため医療機関に紹介される。精密検査では全例に血漿アミノ酸分析とプテリジン分析さらに乾燥濾紙血でジヒドロプテリジン還元酵素 (DHPR) 活性の測

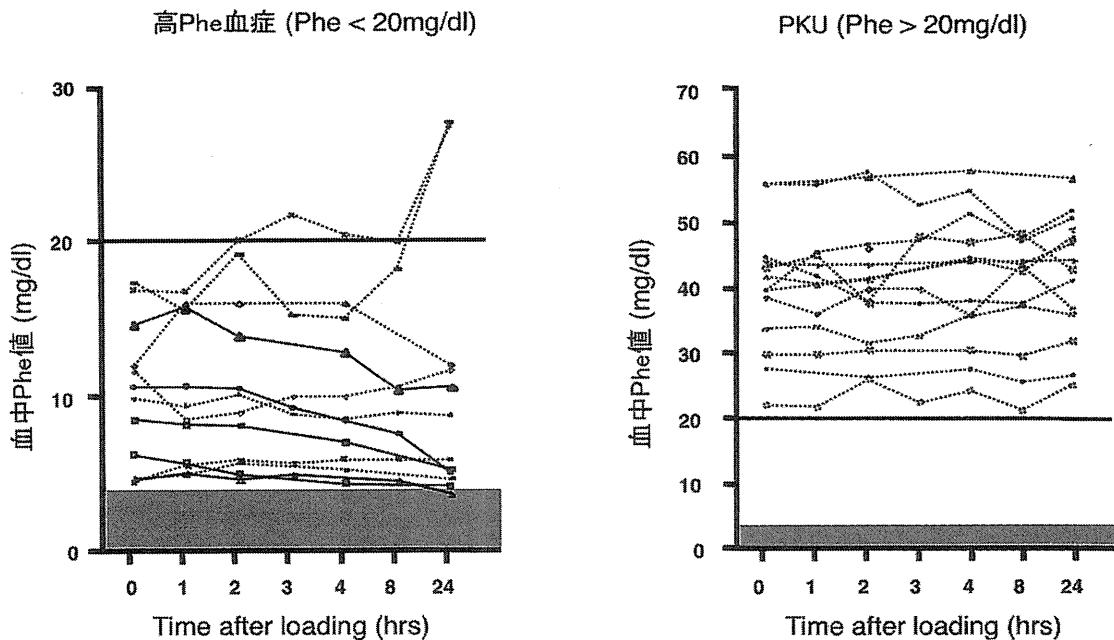


図3. BH4・1回負荷試験における古典的フェニルケトン尿症 (PKU: 右図) と高フェニルアラニン血症 (高 Phe 血症: 左図) の血中 Phe 値の変化

定を行い、BH4 欠損症と PAH 欠損症の鑑別が行われている。この新生児・マススクリーニングの鑑別検査において、負荷前の血中 Phe 値が 6mg/dl 以上の場合、BH4・1回負荷試験 (BH4: 10mg/kg) を行う。BH4 欠損症 (DHPR 欠損症以外) では負荷後数時間で血中 Phe 値は 2mg/dl 未満となるが、PAH 欠損症ではほとんど変化しない (図2)。しかし、24 時間以内に負荷前値から血中 Phe 値が 20% 以上低下する場合、2002 年の暫定診断基準では BH4 反応性高 Phe 血症と診断している (図2)。これまで新生児・マススクリーニングで発見された高 Phe 血症における BH4・1回負荷試験では負荷前の血中 Phe 値が 20mg/dl 以上の古典的 PKU ではほとんど低下が認められなかったが (図3右)、負荷前の血中 Phe 値が 5~20mg/dl の高 Phe 血症では 2002 年の暫定診断基準である 20% 以上の低下が認められた (図3左: 実線)。

しかし、新生児期に BH4 欠乏症を鑑別するために行っている BH4・1回負荷試験ではすべての反応性患児を拾い上げることは不可能であるため、2009 年の暫定指針の中では「BH4・1週間投与試験 (BH4: 20mg/kg/day) を行い血中 Phe 値が負荷前値の 30% 以上低下することで反応性を診断す

る必要がある」としている。

(2) BH4・1週間投与試験

新生児・マススクリーニングで行われた BH4・1回負荷試験で血中 Phe 値の低下が認められなかった高 Phe 血症だけでなく古典的 PKU でも BH4 反応性高 Phe 血症の診断のための BH4・1週間投与試験を受けることができる。BH4・1週間投与試験では BH4 の投与法は 1日量を 1回~3回に分けて投与しても結果は同様であるが、2回に分けて投与することが一般的である。また BH4 の投与は食事との関係はなく食前でも食後でも問題無く投与できるが乳幼児の場合食前に投与されることが多い。採血も原則早朝空腹時としているが、乳幼児の場合食後の採血でも結果に大きな影響はない。BH4・1週間投与試験では投与前と投与4日目と7日目の血中 Phe 値を測定し判定するが、BH4 反応性高 Phe 血症ではすでに4日目でも有意な血中 Phe 値の低下が認められることが多い (図4)。

II. 治療

BH4 反応性高 Phe 血症は、BH4 欠損症と異なり神経伝達物質補充療法は必要なく、また古典的フェニルケトン尿症と異なり、BH4 の内服で食事療法の軽減や、普通食でも血中 Phe 値がコントロール

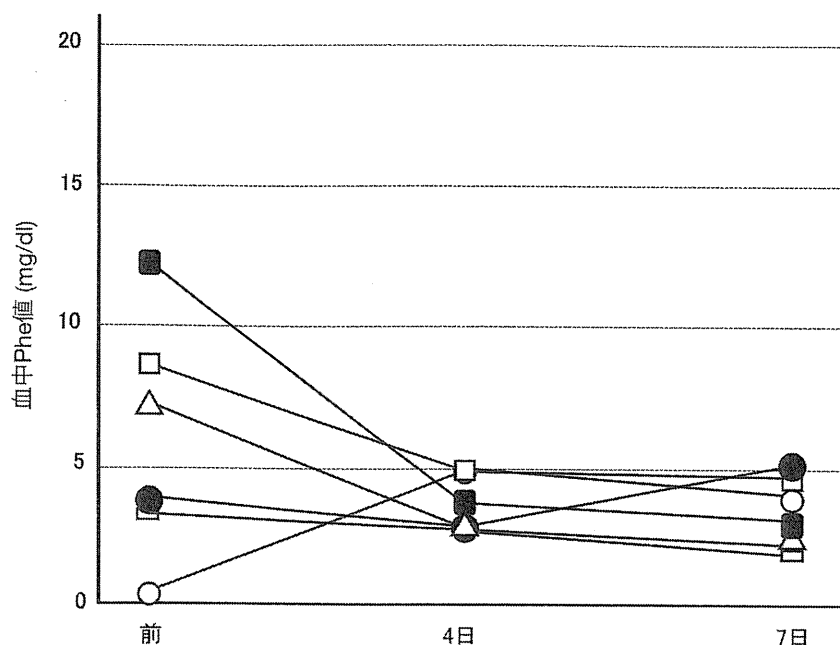


図4. BH4・1週間投与試験におけるBH4反応性高Phe血症の血中Phe値の変化

できることが特徴である。2002年の暫定治療指針では、「普通食でBH4を10mg/kgで開始し、血中Phe値を治療指針の範囲にコントロールできるようにBH4投与量を適宜増減する。ただし、20mg/kgを上限としそれ以上必要な場合はBH4を増量せずにPhe制限食を併用する。」としている。しかしBH4・1週間投与試験の4日目の血中Phe値でBH4反応性高Phe血症の診断基準を満たしている場合、7日目以後もBH4を投与し徐々に減量して至適量を決定することが勧められる。BH4反応性高Phe血症と診断された場合十分量のBH4を投与すればほとんどの症例は食事治療なしで血中Phe値のコントロールが可能である。

考 察

BH4反応性高Phe血症に対するBH4療法は4歳未満の治療経験が少ないため、4歳未満の治療には家族への十分な説明と同意が必要である。このため日本先天代謝異常学会では、新生児期を過ぎれば4歳未満でも十分な説明を行い家族の同意を得た上でBH4・1週間投与試験を行なうことは可能であるが、事前にBH4専門委員会の承認を得ることが必要であるとしている。またBH4反応性

高Phe血症の診断にはBH4・1週間投与試験が必要であるとされているが、BH4・1回負荷試験で負荷後24時間以内に血中Phe値が4mg/dl以下に低下しているか、あるいは低下率が30%以上の場合、その結果を添えて申請すればBH4専門委員会の判定でBH4・1週間投与試験なしでもBH4反応性高Phe血症と診断されることもある。

BH4反応性高Phe血症のBH4療法について、BH4専門委員会は2009年の暫定指針で、「新生児スクリーニングで発見された新規患者にはPhe除去ミルクを用いた食事療法を優先させるべきである。またBH4反応性高フェニルアラニン血症患者であってもサプロプロテリン塩酸塩単独で血中フェニルアラニン濃度を基準値以下に下げることが困難な場合には、食事療法と併用するのが原則である。」としている。このため、BH4療法は離乳食を開始し自然蛋白の制限が必要となる乳児期後半に家族の希望があればBH4・1週間投与試験を行ってから始めることが望ましいと考えられる。そして投与試験4日目の血中Phe値がBH4反応性高Phe血症の診断基準を満たしている場合、BH4・1週間投与試験終了後もBH4の投与量を中止せずに20mg/kgで継続し目的とする血中Phe値の

維持範囲にコントロールできる状態を保ちながらゆっくりと減量していくことが重要である。BH4・1週間投与試験でBH4反応性高Phe血症と診断された症例では、このような手順を踏めば原則として普通食でもBH4単独で治療できるはずである。これは欧米との診断法の違いによるもので、欧米では食事治療を行いながらBH4を併用し、1日のBH4投与量を10mg/kgとし1ヶ月間継続投与して血中Phe値の安定性により治療効果を判定し、十分でない場合は20mg/kgに増量した上でさらに1ヶ月間継続投与して治療効果を判定することになっている⁶⁾。しかし日本ではまず治療食を中止し、普通食でBH4投与試験を行いBH4反応性高Phe血症と診断された患者にのみBH4療法が認められることになっているからである。

このように欧米に比べて日本でのBH4反応性高Phe血症の診断基準は厳しいため古典的PKUの患者にBH4療法が適応されることは当面少ないと思われるが、今後欧米の治療実績を踏まえて現在の暫定的な診断と治療の基準を見直すことも必要と考えられる。また小児慢性特定疾患の適応がなくなる成人以後の治療費について高額医療費補助だけでは患者負担が大きすぎるため難病の指定を受けるなどの経済的・社会的な支援の問題も早急に対応することが望まれる。

結 論

サプロプテリン塩酸塩がBH4反応性高Phe血症に適応追加されたことにより、今後は血中Phe濃度のコントロールの改善、食事療法の緩和などが期待される。PKUに対する食事療法はPhe除去のため自然蛋白を制限し不足する蛋白質を人工的なアミノ酸で補うという、普通食に比べてきわめて不自然な栄養法であり、この従来のPhe制限食からの開放は、患者・家族にとって普通食が食べられるという心理的な利点だけでなく、BH4併用により多くの自然蛋白摂取が可能となり、栄養学的な面からも制限食療法に比べて大きな利点があ

ると考えられる。

文 献

- 1) Shintaku H.: Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. *Curr. Drug. Metab.* 3:123-31, 2002
- 2) Kure S., Hou D.C., Ohura T., Iwamoto H., Suzuki S., Sugiyama N., Sakamoto O., Fujii K., Matsubara Y. and Narisawa K.: Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J. Pediatr.* 135:375-378,1999
- 3) 松原洋一、呉 繁夫、大浦敏博、大和田操、鈴木健、杉山成司、新宅治夫、岡野善行、佐倉伸夫、芳野信、吉田一郎、北川照男、多田啓也、大浦敏明、青木菊麿：テトラヒドロピオプテリン（BH4）反応性高フェニルアラニン血症に関する治療基準設定専門委員会の研究報告2、特殊ミルク情報38：44-59,2002
- 4) Shintaku H., Kure S., Ohura T., Okano Y., Ohwada M., Sugiyama N., Sakura N., Yoshida I., Yoshino M., Matsubara Y., Suzuki K., Aoki K. and Kitagawa T.: Long-Term Treatment and Diagnosis of Tetrahydrobiopterin-Responsive Hyperphenylalaninemia with a Mutant Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Pediatr. Res.* 55:425-430,2004
- 5) 大浦敏博、新宅治夫、高柳正樹、呉繁夫、大和田操、松原洋一、芳野信、岡野善行、伊藤哲哉、奥山虎之、中村公俊、松尾雅文、遠藤文夫：テトラヒドロピオプテリン（BH4）反応性高フェニルアラニン血症に対する天然型BH4製剤塩酸サプロプテリンの適正使用に関する暫定指針、日小児会誌113：649-653,2009
- 6) Nenad Blau:Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiency. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 5:483-494,2010

検体検査の選択と解釈

夏目 淳*

けいれん重積を起こした患者が搬送された際には、救急処置，問診，診察を行い鑑別診断を考えたうえで画像検査と合わせて検体検査を行う。けいれん重積後の急性期における検体検査の目的は患者の状態把握と原因検索である。疑われる原因によって必要な検査も異なってくる。後に必要となる検査がある場合もあるので、けいれん発作の原因がはっきりしない場合には、急性期に採取した血液，尿，髄液などの保存をしておくことも重要である。

表 1 けいれん重積における検体検査

・血液スクリーニング検査 末梢血，生化学 (AST, ALT, LDH, CK など)，電解質 (Na, K, Cl, Ca, Mg)，血糖，CRP
・代謝異常症が疑われる場合 アンモニア，ガス分析，乳酸，ピルビン酸，アミノ酸分析，尿中有機酸分析
・中枢神経感染症が疑われる場合 髄液検査
・出血傾向や頭蓋内出血がある場合 PT, APTT, フィブリノーゲン，FDP, D ダイマー
・薬物血中濃度 抗てんかん薬，テオフィリンなど

I 救急におけるスクリーニング検査

最初のスクリーニング検査として，末梢血で血算，生化学検査が行われる (表 1)。

1. 血算

白血球の上昇は細菌感染を疑わせる。ただし，けいれん重積によるストレスでも白血球は上昇する場合があるため，けいれん発症前からの発熱や感染症状の有無，および CRP など他の炎症反応も参考にすることが必要である。貧血や血小板減少がある場合は頭蓋内出血，DIC などの可能性も考慮される。

2. 血液生化学，電解質，血糖，炎症反応

低 Na，高 Na，低 Ca，低血糖などはけいれん発作の原因となる。また，急性脳症に伴う抗利尿

ホルモン不適合分泌症候群 (SIADH) や cerebral salt wasting syndrome (CSWS) により低 Na 血症が起こる場合もある。可逆性脳梁膨大部病変を有する脳炎脳症 (MERS) では低 Na 血症が多いことが報告されている¹⁾。ウイルス性脳症においては AST, ALT, LDH や血糖の上昇がみられる場合がある。細菌感染では CRP の上昇がみられるが，細菌性髄膜炎が発熱時けいれんで発症した場合に初回検査ではまだ CRP は上昇していないことも多いので CRP が陰性でも注意を要する。

3. 血液ガス分析

血液ガス分析は呼吸状態や代謝性アシドーシスの評価に用いられる。先天代謝異常症が疑われる場合にはとくに必要である。血液ガス分析器には同時に乳酸を計測できるものがあり，可能ならそれをを用いると有用である。

4. アンモニア

高アンモニア血症はアミノ酸代謝異常症，有機酸代謝異常症，Reye 症候群などで認められる。ただし，抗てんかん薬のバルプロ酸を内服してい

Natsume Jun

* 名古屋大学医学部小児科

[〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65]

TEL 052-744-2294 FAX 052-744-2974

E-mail: junnatsu@med.nagoya-u.ac.jp

る場合は日頃から血中アンモニアが上昇している場合があるので、急性の所見なのか判断には注意がいる。

5. 凝固機能

出血傾向、頭蓋内出血などがみられれば検査が必要である。細菌性髄膜炎など重症細菌感染では DIC を合併している場合がある。また、血友病、胆道閉鎖症など出血素因がある患者が頭蓋内出血によるけいれん発作で発見される場合がある。

6. 髄液検査

発熱や感染を疑う症状があり、中枢神経感染症の可能性があれば緊急で行う必要がある。細胞数、蛋白、糖、細菌培養などの評価を行う。ただし、脳腫瘍や脳出血、高度脳浮腫がある場合は腰椎穿刺によって脳ヘルニアが起こることがあるため、まえもって画像検査を行わなくてはならない。血液検査で乳酸の上昇が認められミトコンドリア異常症などが疑われる場合は、血中の乳酸は駆血などで容易に上昇するが髄液の乳酸は比較的安定しているので髄液中の乳酸、ピルビン酸を測定することが有用である。

7. 尿検査

尿ケトンの確認や、尿路感染症の確認をする場合には一般尿、培養検査が行われる。有機酸代謝異常症の鑑別のためには、急性期に採取し保存しておいた尿を用いての有機酸分析も必要な場合がある。

8. 薬物血中濃度

てんかんで抗てんかん薬を内服している患者では、薬物血中濃度を計測しておくとうまくある場合がある。以前と比べて血中濃度が高度に低下している場合は、内服をしていなかった可能性も考えられる。また、テオフィリンなどけいれんを誘発する可能性がある薬を内服している場合には血中濃度を計測すると参考になる。

表 2 治療可能な代謝性疾患によるてんかん：10 の疾患

- 1) GLUT1 異常症
- 2) DEND 症候群
- 3) ピリドキシン (ビタミン B₆) 依存性けいれん
- 4) 先天性高インスリン・高アンモニア血症 (congenital hyperinsulinism with hyperammonemia: HI/HA)
- 5) 脳葉酸欠乏症 (cerebral folate deficiency)
- 6) セリン合成異常症
- 7) クレアチン合成異常症
- 8) BH₄ 欠損症
- 9) ビオチニダーゼ欠損症
- 10) hyperekplexia (startle disease, びっくり病)
←てんかんと鑑別が必要

(Pearl²⁾, 2009)

II さらなる鑑別診断のための検体検査

けいれんなどの神経症状がみられ、画像や前述の検査などで診断がつかない場合、代謝性疾患などまれな疾患の鑑別のための検体検査が必要になる。前項で述べた血液ガス分析、血糖、アンモニア以外に、乳酸、ピルビン酸、血漿・尿中アミノ酸分析、尿中有機酸などを行い鑑別を進める。

Pearl は 2009 年のアメリカてんかん学会および 2010 年の乳幼児けいれん研究会において、「治療可能な代謝性疾患によるてんかん」として 10 の疾患をあげている²⁾(表 2)。いずれも重要な疾患であり、以下に列記する。

1. GLUT1 異常症

血中から中枢神経系へのブドウ糖の輸送に関わるグルコース輸送体 GLUT1 の欠乏により、てんかん、失調、発達遅滞などの神経症状を呈する。運動後や空腹時に神経症状が悪化するのが特徴である。ケトン体が中枢神経系のエネルギー源となるためケトン食療法が有効である。空腹時の検査で血中と髄液の糖を比較し、髄液/血中の糖比が 0.4 以下であればその可能性が高くなる。赤血球の糖とり込み能の測定、*SLC2A1* 遺伝子の異常などから確定診断がされる。ただし、最近では赤血球糖とり込み能正常例³⁾や髄液糖正常の軽症例⁴⁾などが報告されており、その疾患スペクトラムは広がりを見せている。

2. DEND 症候群

DEND (developmental delay, epilepsy, neonatal diabetes) 症候群は、新生児期発症の糖尿病と早期発症のてんかん、発達遅滞などの神経症状を呈する。早期発症のてんかん患者で高血糖、HbA1cの上昇など糖尿病を示唆する所見があった場合には本疾患が疑われる。糖尿病はインスリンよりも経口血糖降下薬であるスルホニルウレア剤が有効であり、早期からの治療により神経系への効果も期待される。

3. ピリドキシン (ビタミン B₆) 依存性

けいれん

ピリドキシンの投与が特異的に有効である。新生児期から乳児期発症の原因不明の難治性てんかんにおいてはピリドキシンの投与が試みられるべきである。本疾患は最近、リジン分解に関わる antiquitin をエンコードする *ALDH7A1* 遺伝子の異常によることがわかってきた。ピリドキシン投与の効果がない場合でも、ピリドキサルリン酸依存性けいれんもありピリドキサルリン酸の投与も試みられるべきである。

4. 先天性高インスリン・高アンモニア血症 (HI/HA)

HI/HA はグルタミン酸脱水素酵素の遺伝子異常で、全般てんかん、学習障害などの症状を示す。高インスリン性の低血糖、高アンモニア血症がみられた場合には疑う必要がある。治療としてジアゾキサイドの投与および蛋白摂取制限が用いられる。

5. 脳葉酸欠乏症 (cerebral folate deficiency)

髄液中の 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) が低下しており、血中の葉酸は正常範囲である。けいれん、発達遅滞などがみられ、フォリン酸 (folinic acid) による治療が行われる。

6. セリン合成異常症

小頭症やてんかんを呈する。L-セリンやグリシンによる治療が行われる。

7. クレアチン合成異常症

クレアチン生合成や輸送の異常は、知的障害やてんかん発作をひき起こす。尿中、血中でグアニノ酢酸の異常がみられる。また、MRS で脳内クレアチンの低下が確認される。治療としてクレアチンの摂取などが行われる。

8. BH₄ 欠損症

フェニルアラニン水酸化酵素の補酵素であるテトラヒドロbiopterin (BH₄) の代謝異常による疾患である。新生児マススクリーニングで高フェニルアラニン血症として発見される。体液中プテリジン分析や BH₄経口負荷試験、赤血球酵素活性の測定などでフェニルケトン尿症と鑑別される。食事による血中 Phe のコントロールと併せて BH₄、L-ドーパ、5-ヒドロキシトリプトファンの投与などが行われる。

9. ビオチンダーゼ欠損症

ビオチンダーゼ欠損症はビオチンの再利用の障害をきたし、けいれんなどの神経症状や湿疹性の皮疹などの皮膚症状がみられる。日本ではまれだが、欧米では新生児スクリーニングの対象になる。代謝性アシドーシス、高アンモニア血症、高乳酸血症などがみられる。尿中有機酸分析が行われる。ビオチンの投与が有効である。

10. hyperekplexia (startle disease, びっくり病)

けいれん発作ではないが、けいれん発作と鑑別が必要な疾患として知っておく必要がある。予期しない刺激で過剰な驚愕反応が起こる。グリシン受容体 α_1 サブユニットをコードする *GLRA1* 遺伝子の異常によるものが多い。ベンゾジアゼピン系の薬剤が有効とされる。

文 献

- 1) Takanashi J, Tada H, Maeda M, et al : Encephalopathy with a reversible splenic lesion is associated with hyponatremia. *Brain Dev* **31** : 217-220, 2009
- 2) Pearl PL : Treatable inherited metabolic epilepsies : The top ten diagnoses you can't afford to

Key Points

- ① けいれん発作の原因がはっきりしない場合には、急性期に採取した血液、尿、髄液などを保存しておく。
- ② バルプロ酸を内服していると、日頃から血中アンモニアが上昇している場合がある。
- ③ 抗てんかん薬を内服している患者では、薬物血中濃度を計測すると有用な場合がある。
- ④ GLUT1 異常症など、まれな疾患でも診断により治療が可能になるものもある。

miss. Epilepsia **50** (Suppl 11) : 501, 2009

- 3) Wang D, Yang H, Shi L, et al : Functional studies of the T295M mutation causing Glut1 deficiency : glucose efflux preferentially affected by T295M. *Pediatr Res* **64** : 538-543, 2008
- 4) Mullen SA, Suls A, De Jonghe P, et al : Absence epilepsies with widely variable onset are a key feature of familial GLUT1 deficiency. *Neurology* **75** : 432-440, 2010

お知らせ (2)

第 15 回ウイルソン病研究会

会 期 : 2011 年 5 月 14 日 (土) 14 : 00~18 : 00
会 場 : 東邦大学医療センター大森病院 臨床講堂
(東京都大田区)

代表幹事 : 青木 継 稔 (東邦大学)

参加費 : 2,000 円

特別講演 : Wilson 病全国調査成績 (清水 教一 : 東邦大学大橋病院小児科)

一般演題 : Wilson 病をはじめ Menkes 病など銅代謝異常症に関する症例・研究報告など。

事務局 : 〒 153-8515 東京都目黒区大橋 2-17-6
東邦大学医療センター大橋病院小児科内
ウイルソン病研究会事務局 清水 教一
TEL 03-3468-1251 (内線 3354, 3355)
FAX 03-3468-2927
E-mail : norikazu@med.toho-u.ac.jp

第 36 回日本医用マススペクトル学会

会 期 : 2011 年 9 月 15 日 (木)・16 日 (金)
会 場 : ホテル阪急エキスポパーク 星雲の間
(大阪府吹田市 TEL 06-6878-5151)

年会長 : 中西 豊 文 (大阪医大臨床検査医学)

構 成 : 招待講演, シンポジウム, ワークショップ,
松本 勇 賞受賞講演, 奨励賞受賞講演, ポスター
賞受賞講演, 一般口演・ポスター発表など

演題募集 : 2011 年 4 月 1 日 (金) ~ 6 月 30 日 (木)

事務局 : 〒 569-8686 大阪府高槻市大学町 2-7
大阪医科大学総合医学講座臨床検査医学
中西 豊 文

TEL 072-683-1221 (内線 2658)

FAX 072-684-6548

E-mail : jsbms36@art.osaka-med.ac.jp

学会ホームページ <http://www.jsbms.jp/>

第 17 回日本保育園保健学会

日 時 : 2011 年 11 月 12 日 (土), 13 日 (日)

会 場 : 岡山コンベンションセンター

会 頭 : 小田 慈 (岡山大学大学院保健学研究科)

メインテーマ : はぐくみ, いつくしむ~子どもたちは
世界の宝

会長講演 : 保育園保健の現状とこれから (鴨下 重彦 :
日本保育園保健協議会会長)

会頭講演 : 小児科医は地域に飛び出そう~はあとふる
サロンの試み (小田 慈 : 岡山大学小児科)

基調講演 : こどもの権利を考える (石井 栄一 : 愛媛大
学小児医学)

生涯研修取得単位 : 日本保育園保健協議会生涯研修シ
ステム登録者 : 15 単位, 日本小児科学会専門
医制度 : 8 単位

参加費 : 一般 : 7000 円 (前登録 : 6000 円), 学生 :
1000 円, 交流会費 : 6000 円

申込法 : 学会ホームページより