

図1. 尿中有機酸分析

ジカルボン酸尿、軽度ケトーシス、グルタル酸等の排泄増加を認めた。アジピン酸、スベリン酸、セバシン酸は、全てジカルボン酸（2つのカルボキシル基をもつ有機化合物のこと）である。

表. タンデムマス分析

			下限値	上限値
C0	6.88 μ M	Low	10	60
C2	12.15 μ M		5	45
C4	0.53 μ M			1.4
C6	0.31 μ M	High		0.25
C8	0.45 μ M	High		0.35
C8:1	0.039 μ M			0.43
C8DC	0.076 μ M			0.25
C10	0.52 μ M	High		0.4
C10:1	0.1 μ M			0.28
C10DC	0.16 μ M			1.2
C12/C6:1DC	0.51 μ M	High		0.3
C12:1	0.15 μ M			0.15
C12DC	0.1 μ M			0.5
C14/C8:1DC	0.76 μ M	High		0.7
C14:1	0.47 μ M	High		0.4
C14-OH	0.039 μ M			0.12
C16	1.66 μ M		0.6	6.5
C16:1	0.67 μ M			0.785
C16-OH	0.025 μ M			0.12
C18	0.87 μ M		0.15	2.1
C18:1	1.21 μ M		0.3	3.2
C18:2	0.24 μ M		0.03	0.8
C18-OH	0.005 μ M			0.1
C18:1-OH	0.021 μ M			0.07
C8/C2	0.037	High		0.02
C8/C10	0.67			3

遊離カルニチン低下、中鎖～長鎖アシルカルニチン広範上昇を認めた。アミノ酸分析結果は、異常を認めないため表中から省いた。

しながらGIRの調整を行った。入院当日夜間から非代償性の代謝性アシドーシスとなり (pH 7.30、 $p\text{CO}_2$ 38.9、 HCO_3^- 17.3、BE -6.7mmol/L)、炭酸水素ナトリウム投与 (6.6mEq) により補正を試みたが反応せず、それ以上の補正は行わず経過観察した。凝固障害は、ATⅢ 500Uの補充により改善し、その後、再燃することはなかった。

入院翌日、傾眠傾向ではあったが時折開眼し視線が合うようになった。入院3日目には自然経過で代謝性アシドーシスは改善し、GIR漸減したが血糖値も安定した。自分でガラガラを持って遊び、哺乳が可能になり、意識レベルはほぼ改善した。肝酵素異常は改善したが、肝腫大は持続した (図2)。意識障害が改善したため、入院3日目よりソリタ T_8 水の注入を開始。4日目よりミルクの注入を開始し以後漸増。6日目より直接哺乳を開始、7日目より自律哺乳とした。

急性期の尿中有機酸分析の結果、低ケトン性ジカルボン酸尿がみられた (図1) ことから、何らかの脂肪酸代謝の存在が疑われた。さらに、タンデムマス分析で血中遊離カルニチンの低下および

中～長鎖脂肪酸の著明な増加を認め (表)、尿中有機酸分析で有機酸代謝経路の脱水素反応の障害を反映するグルタル酸および2-ヒドロキシグルタル酸の増加を認めた (図1) ことから、グルタル酸血症Ⅱ型と診断した。リボフラビン100mg/dayで内服を開始し、全身状態良好のため入院10日目に退院した。退院時、活気あり、座位保持可能、おもちゃで一人遊びができ、意識レベルは入院前と変わらぬ状態まで改善した。直母による哺乳や離乳食摂取も問題なく行える状態となった。

後日、島根大学小児科に依頼して分子遺伝学的解析を行った (図3)。ImmunoblottingによりETFDH蛋白の発現を認めなかった。ETFDH遺伝子の変異解析の結果、複合ヘテロ接合体変異 (Exon3にc.251C>T, p.A84V、および、Exon8にc.890G>T, p.W297L) を認めたことから、グルタル酸血症Ⅱ型と確定診断した。両親の保因者解析は希望されなかった。

【退院後の経過】

退院1ヶ月後、肝酵素は正常化し、肝腫大も認

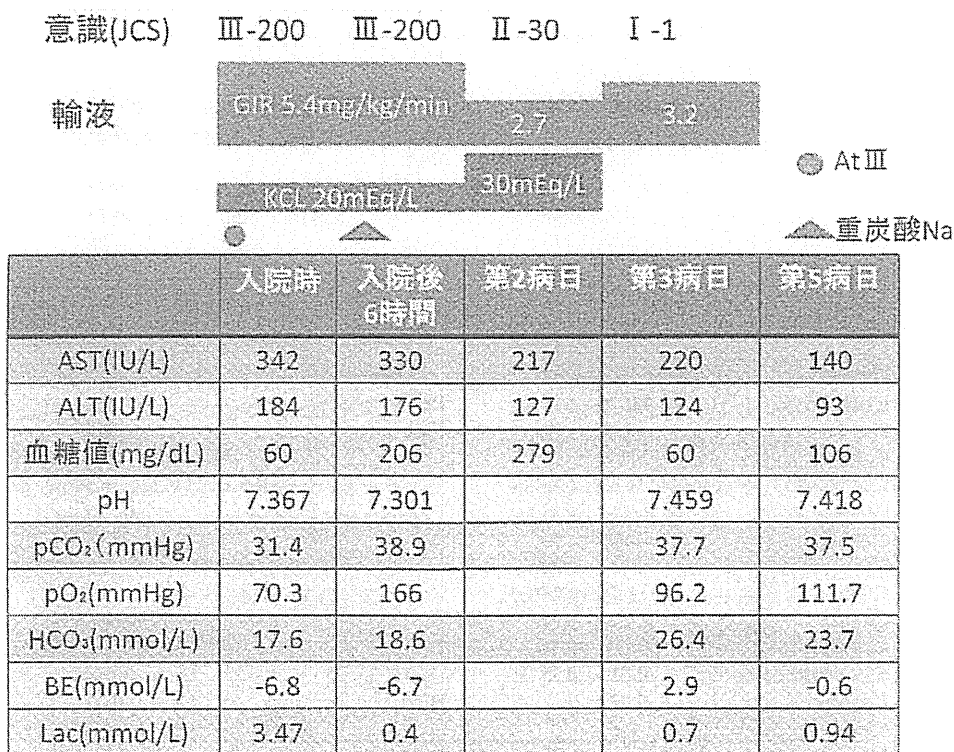


図2. 経過表

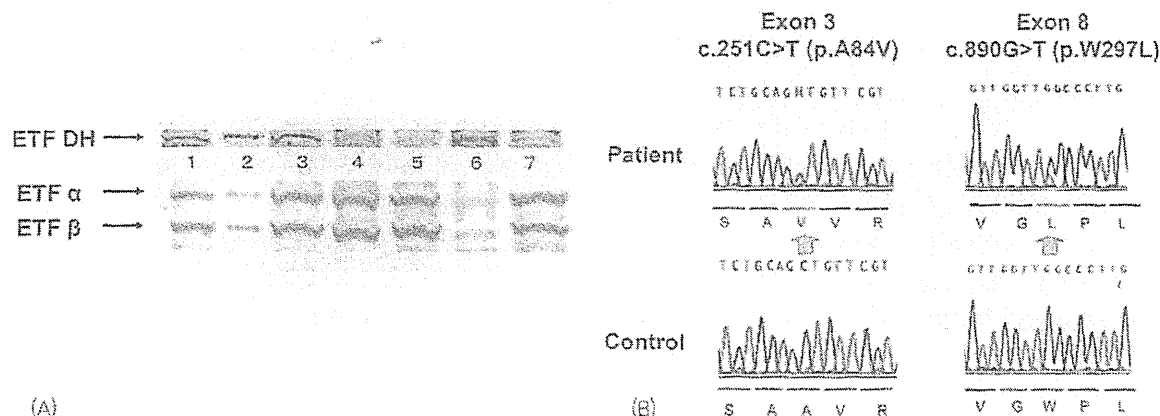


図3. 分子遺伝学的解析

(A) Immunoblotting

レーン1&3: コントロール・線維芽細胞, 2: コントロール・肝臓, 4 & 5: DH欠損患者・線維芽細胞, 6: α3欠損患者・線維芽細胞, 7: 本患者・線維芽細胞

(B) ETFDH遺伝子解析

本患者において、Exon3にc.251C>T (p.A84V)、および、Exon8にc.890G>T (p.W297L)を認めた(複合ヘテロ接合変異)。

めなくなった。その後、リボフラビン内服を継続して、定期的に外来経過観察中である。6歳になるまでの5年半の間に、インフルエンザウイルス感染、ロタウイルス胃腸炎、急性気管支炎などで計5回、各2~3日間の入院加療を行った。軽度の代謝性アシドーシスや低血糖を示すことはあるものの、重篤な急性代謝不全に陥ることはなく、毎回輸液療法のみで改善した。身体発育および精神運動発達は順調で、10カ月でお座り、12カ月でははい・つかまり立ち、1歳2カ月で有意語、1歳3ヶ月で独歩可となった。現在、普通学級に通学中である。成長曲線を図4に示す。

回復後に行ったタンデムマス分析では、C8、C10、C12の中鎖アシルカルニチンの上昇を認めたものの、上昇の程度は急性期と比べて軽減していた。また、尿中有機酸分析ではエチルマロン酸およびアジピン酸の軽度排泄増加を認めたのみで全体として安定したプロファイルであった。

【考察】

今回われわれは、タンデムマス・スクリーニング導入以前に、嘔吐と意識障害で発症したグルタル酸血症II型の一乳児例を経験したので報告した。

本症例における意識障害の原因は、代謝性アシドーシスおよび低血糖によるものと考えられる。

横断的標準身長・体重曲線 女子(0-18歳) 2000年度版

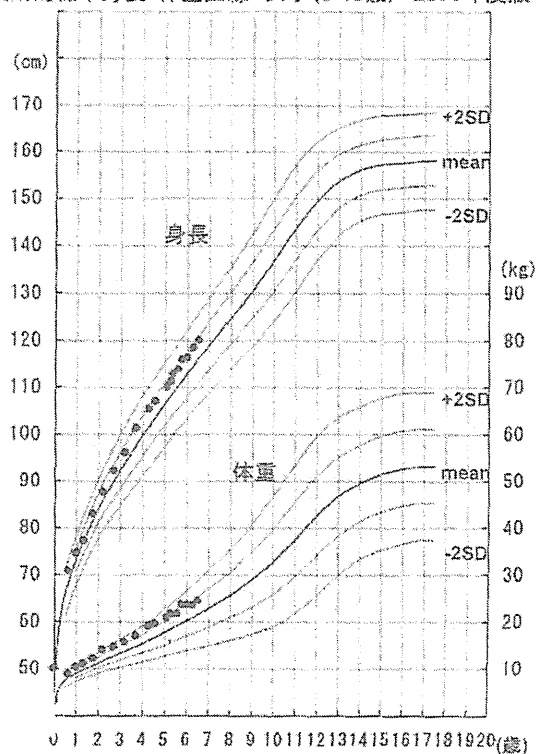


図4. 成長曲線

来院数日前より出現していた上気道症状や嘔吐を契機に哺乳困難から飢餓状態となり、アミノ酸異化過程および脂肪酸 β 酸化の障害からケトーシスを呈し、非代償性の代謝性アシドーシスをきたしたと考えられる。低血糖および代謝性アシドーシスの改善に伴い、意識が改善したこと、他に意識障害の原因となりうる、脳症をはじめとする脳の器質的変化、てんかん、内分泌学的異常、電解質異常、心疾患、重篤感染症、高・低体温、低酸素血症等が除外されたことから、意識障害の原因は低血糖および代謝性アシドーシスに起因したものと結論される。

意識障害を主訴に来院した患児に対して、先天代謝異常症の存在を鑑別に置くことが重要である。グルタル酸血症Ⅱ型は、致死的な場合が多い新生児発症の重症型から、乳幼児期にストレスなどを契機に発症する病型、思春期以降に筋力低下等で発症する病型まで多様であるが、遅発型の病型に対する対応の遅れは重篤な転機に帰結する⁹⁾。そのため、いち早く本疾患を疑い、前駆アミノ酸摂取の制限、脂肪の過剰を避け、糖質を主体とした適切なエネルギー補給を行う必要がある。本症例では最初に脳症を除外した。アニオンギャップ増加型の代謝性アシドーシスや低血糖を認めたが、下痢や還流量低下はなく、脱水症・低酸素血症・敗血症・心不全・腎不全など代謝性アシドーシスの原因となりうる全身状態の変化を認めなかった。このことから、何らかの代謝異常症がベースにあることが推測され精査を行うと同時に、高めのGIRでエネルギー補給を開始した。また、確定診断後はリボフラビンの内服と、感染などストレス時に入院・輸液療法を行った。その後、急性代謝不全の状態に陥ることなく経過しており、成長・発達は順調である。

意識障害を主訴に来院した患児に対し代謝異常症の存在が疑われた場合、急性期の血漿および尿の採取が望まれる。本疾患はタンデムマス分析および尿中有機酸分析により確定診断が可能である

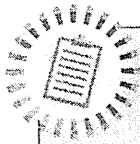
が、急性期を脱した安定期に採取した血漿および尿の分析では、診断がつかないことも珍しくない¹⁰⁾。本症例は、それほど強い代謝性アシドーシスではなく、乳酸やアンモニアの上昇も軽度であったことから、有機酸や糖の代謝異常症や尿素サイクル異常症、ミトコンドリア病等は否定的であり、脂肪酸やアミノ酸の代謝異常症が有力であった。最終的には、急性期の尿中有機酸分析とタンデムマス分析の結果より、本疾患と確定した。昨今、タンデムマス・スクリーニングが全国的に行われるようになってきたことから、グルタル酸血症Ⅱ型の多くが早期診断可能になったと考えられる。しかし、タンデムマス・スクリーニングで異常を指摘されないような症例もあると考えられ、意識障害や低血糖を認める症例では、本症を含む先天代謝異常症の存在を鑑別に置くことが重要である。

【謝辞】

タンデムマス分析、分子遺伝学的解析を担当していただきました島根大学医学部小児科の小林弘典先生、長谷川有紀先生、山口清次教授に感謝いたします。

【参考文献】

- 1) 山口清次: グルタル酸血症Ⅱ型。有機酸代謝異常ガイドブック、診断と治療社、72-73、2011
- 2) 西本由都、他: グルタル酸血症Ⅱ型患者17例の臨床像と病因の検討。日本先天代謝異常学会雑誌 21(2): 143、2005
- 3) Yotsumoto Y et al.: Clinical and molecular investigations of Japanese cases of glutaric acidemia type 2. Mol Genet Metab 94(1): 61-67、2008
- 4) Voekley J et al: Glutaric aciduria type 2 and newborn screening: commentary. Mol Genet Metab 93(1): 5-6、2008
- 5) Pollard LM et al.: Diagnosis, treatment, and long-term outcomes of late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. J Child Neurol 25(8): 954-960、2010



訪問看護師による経静脈的ビタミンD補充でくる病の顕著な改善を得た進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Byler病) の1例

さとうたけし 佐藤武志^{※1-1}

ひるやこうじ 室谷浩二^{※1}

はなかわじゅんこ 花川純子^{※1}

あさくらゆみ 朝倉由美^{※1}

こんどうおさむ 近藤 脩^{※2}

あだちまごり 安達昌功^{※1}

要 旨

症例は現在19歳の男性。生後6カ月時に進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Byler病) と診断された。ビタミンD欠乏性くる病に対し、カルシトリオール的大量投与、および隔月の受診ごとにエルゴカルシフェロール800 IUの経静脈的投与を行ったが、骨変形と低カルシウム血症が増悪し、15歳時には歩行困難となった。入院のうえ、同量のエルゴカルシフェロール投与を週3回のペースで1.5カ月間行ったところ、顕著な改善が得られた。退院後は、地元の訪問看護師の協力を得て、本治療を週2回ペースで継続することで治療効果を維持できた。同時に明らかな成長率の増加が得られ、二次性徴も発来した。訪問看護師による脂溶性ビタミン経静脈的投与は、胆汁鬱滞性疾患におけるビタミンD欠乏性くる病の管理に有用であると考えられた。

[小児科臨床 66:2263,2013]

KEY WORDS

進行性家族性胆汁鬱滞症1型, Byler病, 肝性くる病, 訪問看護師, 脂溶性ビタミン

はじめに

進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Progressive familial intrahepatic cholestasis-1, PFIC1) は、Byler病とも呼ばれ、胆汁の輸送を担うP型ATPase蛋白の機能低下に起因し、ATP8B1遺伝子異常による常染色体劣性遺伝疾患である¹⁾。乳児期から成長障害および胆汁鬱滞を呈し、最終的に胆汁鬱滞性肝硬変に至る。胆汁鬱滞による脂溶性ビタミン欠乏は内服によるビタミン補充に抵抗

性であり、管理に難渋することが多い²⁾⁻⁵⁾。

今回われわれは、大量の活性型ビタミンD剤投与にもかかわらず重度のくる病から歩行困難を来したPFIC1の男性に対し、訪問看護師による週2回の経静脈的ビタミンD補充を実施したところ、顕著な改善を得たため報告する。

症 例

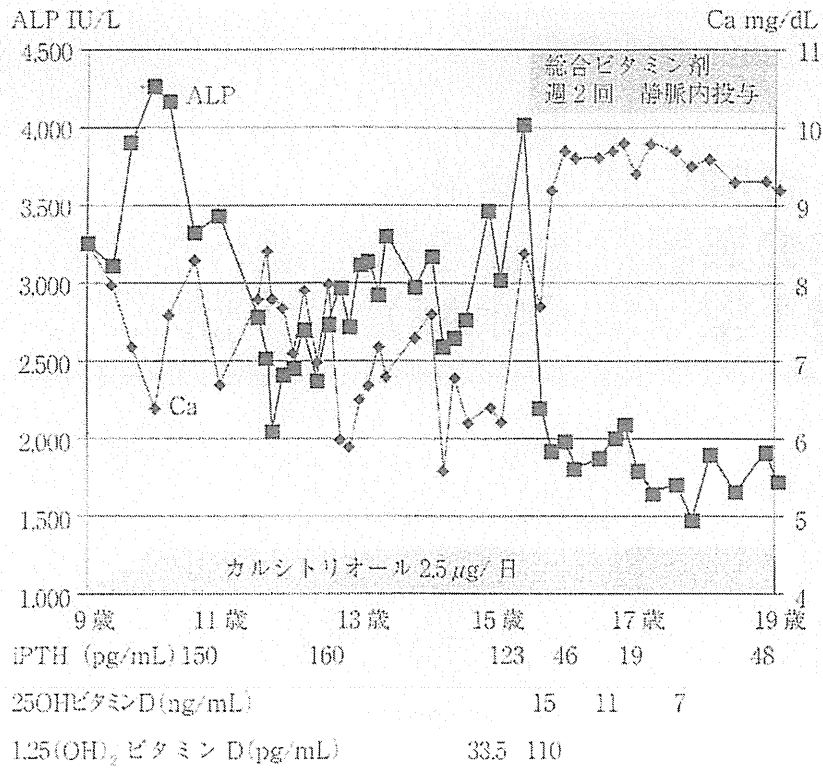
症例：現在19歳、男性

周産期歴：在胎41週3日、出生体重2.942 g。

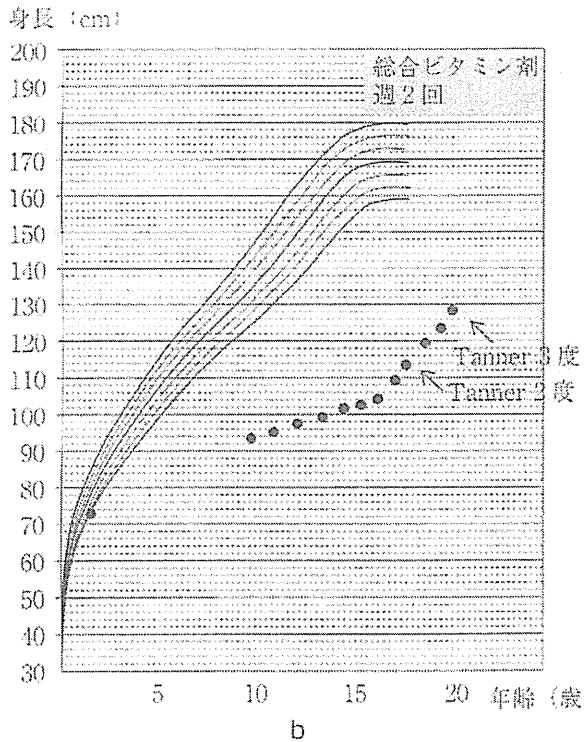
※1：神奈川県立こども医療センター 内分泌代謝科 (〒232-8555 神奈川県横浜市南区六ツ川2-138-4)

※2：仁厚会病院 内科

※1-1：現 慶應義塾大学医学部 小児科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35)



a



- a : カルシトリオール2.5 μg/日と2カ月ごとの総合ビタミン剤の経静脈的投与を行ったが、低カルシウム血症、iPTH 高値、ALP 高値は持続した。15歳時から週2回の総合ビタミン剤の経静脈的投与を行ったところ、Ca、iPTH は基準範囲内まで改善、ALP も低下した。血中25OHD 値は低値のままであった。
- b : 週2回の経静脈的ビタミンD補充開始後から身長著明な増加が認められ、同時に二次性徴の進行も認められた。

図1 血中ALP, Ca, iPTH, 25OH ビタミンD, 1,25 (OH)₂ ビタミンDの推移と成長曲線

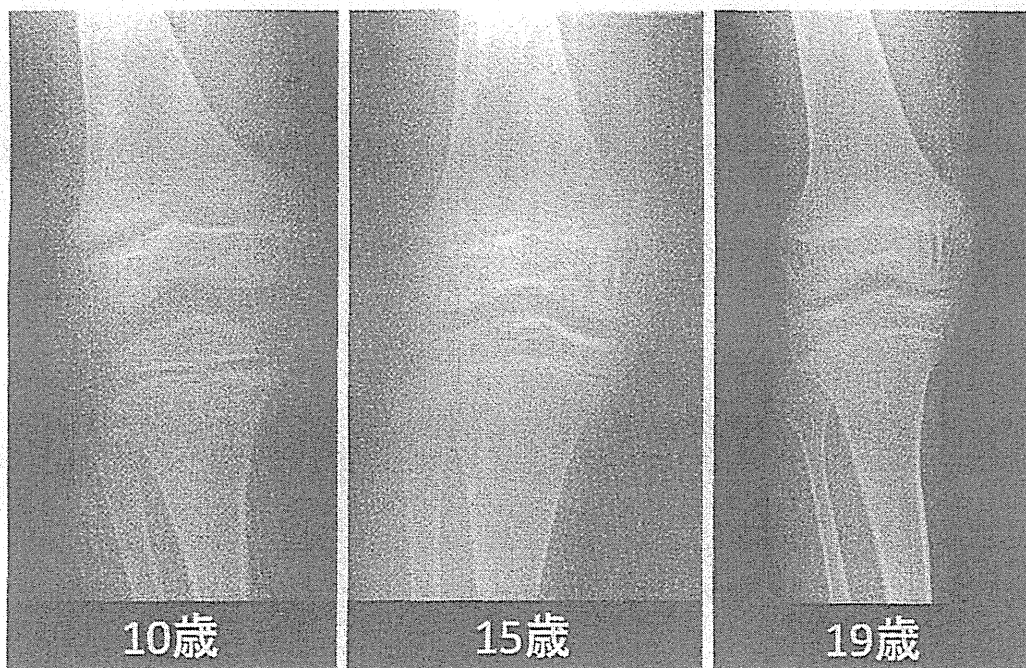


図2 右膝関節X線所見の推移

10歳時、カルシトリオール $2.5 \mu\text{g}/\text{日}$ 、乳酸カルシウム $1\text{g}/\text{日}$ を内服していたが、下肢痛のため間欠的に車椅子を必要としていた。

15歳時、歩行困難となる。

19歳時、週2回総合ビタミン剤の経静脈的投与を行い、くる病所見は改善した。

低置胎盤のため帝王切開で仮死なく出生した。

家族歴：血族婚なし。母：難聴、知的障害。父：健康。姉：原因不明の胆汁鬱滞に対し、生後8カ月時に他院で肝生検を施行され、その1週間後に劇症肝炎を発症し死亡。16歳弟：健康。12歳弟：健康。

現病歴：3カ月健診で体重増加不良、肝腫大、黄疸を指摘されたが受診せず。6カ月健診で再び同症状を指摘され、当院に紹介受診。初診時、体重増加不良・黄疸・肝腫大・皮膚掻痒を認め、検査で胆汁鬱滞の所見（T-Bil 6.5 mg/dL 、D-Bil 4.9 mg/dL 、血中胆汁酸 $160.8 \mu\text{mol/L}$ ）を認めたが、 γGTP は基準範囲（ 8 IU/L ）であった。1歳11カ月に行った肝生検では、非特異的な肝障害および胆汁鬱滞の所見のみ認められた。尿中胆汁酸分析で抱合型胆汁酸（グリココール酸、タウロコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸）の異常高値を認めた。ATP8B1遺伝子解析は行っていないが、以上の所見からPFIC1と診断した。また、知的障害を認

めており、12歳時の知能指数は66であった。

その後の経過：初診時の段階で、ALP高値（ $1,861 \text{ IU/L}$ ）、インタクトPTH（iPTH）高値（ 160 pg/mL ）、25水酸化ビタミンD（25OHD）低値（ $< 4 \text{ ng/mL}$ ）を認め、ビタミンD欠乏性くる病と考えた。ほかの脂溶性ビタミンの血中濃度も低値であった。くる病の治療として、当初はアルファカルシドールを使用したが奏効せず、カルシトリオールの大量投与に変更した。しかし、くる病所見は改善せず次第に骨変形が増悪し、8歳時には下肢痛のため間欠的に車椅子が必要となった。この時期より低カルシウム血症も認めるようになったが、この時点でのカルシトリオール投与量は $2.5 \mu\text{g}/\text{日}$ であり、乳酸カルシウム（ $1\text{g}/\text{日}$ ）も併用していた。11歳時から、外来受診時に総合ビタミン剤の静脈内投与を行ったが、受診が不定期でかつ2～3カ月ごと程度にしか受診できないという家庭の事情もあり、効果は認められなかった（図1、2）。

15歳時に、歩行困難となり、また無症候性の骨

折を認めたため、入院加療とし、総合ビタミン剤2バイアル、週3回の経静脈投与を開始した。1か月半の入院加療で、骨痛の軽減・血中カルシウム濃度の正常化が得られ、歩行も可能となった。退院後も同様の治療の継続を模索したが、住居が遠方であるため当院への来院は困難と思われ、また近医に依頼した場合でも頻回の受診が守られる可能性は低いと予想された。そこで、地元の訪問看護ステーションに協力を依頼し、週2回の訪問看護を計画したうえで、その際に総合ビタミン剤を末梢静脈から投与することとした。退院後2か月後から車椅子は不要となり、図1、2に示すように、血中25OHD濃度は低値であったが、ALPが低下し低カルシウム血症の再燃もなく、治療の有効性が維持された。年間成長率が1.3 cm (開始前) → 6.4 cm (1年目) → 7.7 cm (2年目) → 5.9 cm (3年目)と著明に改善した。また、15歳時には二次性徴は全く発来していなかったが、18歳時には、精巣サイズ6～8cc、恥毛Tanner 2度程度の発達を認めた。

考 察

本症例は、カルシトリオールを最大2.5 μg/日まで増量したが、くる病の進行は抑制できなかった。PFIC1におけるくる病は、腸管からの脂溶性ビタミンの吸収障害が主因であり、また肝でのビタミンD25位の水酸化障害も加味され、多量のビタミンD経口投与に抵抗性を示す場合も少なくない。本症例では、約15年の経過で、歩行不能の状態まで増悪が認められた。治療後に成長速度が改善し、思春期徴候も進展したことから、著明な低身長と思春期遅発もくる病に由来していたことが推察される。

静脈注射や筋肉注射による脂溶性ビタミンの補充は、腸管での吸収障害の影響を避けることができる有用な方法である⁶⁾。本症例では、週2回の総合ビタミン剤投与により、短期間で顕著な効果が認められた。これは1週間当たりビタミンD 1,600 IUに相当し、1日当たりでは約230単位となる。経口摂取量の第6次改定日本人栄養所要量によれば、15～17歳男性でのビタミンDの所要量

と許容上限量は、それぞれ100 IU、2,000 IUとされている。したがって、所要量とほぼ同等のビタミンDを経静脈的に投与するだけで、肝性くる病の速やかな改善が得られることが理解される。

本症例は、両親および本人ともに理解力の問題があり、退院後の治療の継続は極めて困難であると予想された。このため、地元の訪問看護ステーションと協力し、週2回の訪問看護時に総合ビタミン剤を経静脈的に投与することとし、良好な治療効果を維持することができた。平成14年の通知(医政発093002)により、保健師助産師看護師法の解釈が変更され、それまで医師の直接監視下でのみ認められていた看護師の医療行為が、医療機関外でも認められることとなった。平成16年の診療報酬改定では「在宅患者訪問点滴注射管理指導料」が新設されている。これにより、医師が看護師に患家での点滴注射を指示し実施された場合には、上記の指導料と薬剤料が医療機関で算定できるようになっている。

家庭の事情によらない場合でも、一部であっても在宅で治療ができれば、通院回数が減り、患者家族の利便性につながると思われる。血管確保の困難性や輸液中の安静の問題から、乳幼児では困難を伴うことが予想されるが、血管確保が容易な年長児では、訪問看護を利用したビタミンD補充が有用な状況も少なくないと考えられた。

なお、本論文の要旨は第39回日本小児栄養消化器肝臓学会(2012年7月、大阪)において報告した。

文 献

- 1) Hori T, Nguyen JH, Uemoto S: Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9: 570~578, 2010
- 2) Skinner RK, Sherlock S, Wills MR et al: 25-hydroxylation of vitamin D in primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1: 720~721, 1977
- 3) Stropole J, Lovell G, Heubi J: Prevalence of subclinical vitamin K deficiency in cholestatic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49: 78~84, 2009
- 4) Saito K, Matsumoto S, Kamoshita S et al: Pathology of chronic vitamin E deficiency in fatal familial intrahepatic cholestasis (Byler Disease). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 396:

319~330, 1982

- 5) Shnider BL, Magee JC, Sokol RJ et al : Efficacy of fat-soluble vitamin supplementation in infants with biliary atresia. *Pediatrics* 130 : e607~614, 2012

- 6) Perlmutter DH, Gross P, Grand RJ et al : Intramuscular vitamin E repletion in children with chronic cholestasis. *Am J Dis Child* 141 : 170~174, 1987

Intravenous supplementation of fat-soluble vitamins by visiting nurses twice a week in a male with vitamin D deficiency rickets due to progressive familial intrahepatic cholestasis-1, Byler disease

Takeshi Sato¹⁾, Koji Muroya¹⁾, Junko Hanakawa¹⁾, Yumi Asakura¹⁾,
Osamu Kondoh²⁾ and Masanori Adachi¹⁾

¹⁾ Department of Endocrinology and Metabolism, Kanagawa Children's Medical Center

²⁾ Department of Internal Medicine, Jinkohkai Hospital



原 著

非進行性肝型と考えられる糖原病 IV 型の 1 例

神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科¹⁾, 同 感染免疫科²⁾, 同 病理診断科³⁾,
東京女子医科大学医学部小児科⁴⁾, 自治医科大学医学部小児科⁵⁾

河野 香¹⁾⁴⁾ 安達 昌功¹⁾ 朝倉 由美¹⁾
室谷 浩二¹⁾ 鹿間 芳明²⁾ 赤城 邦彦²⁾
田中 祐吉³⁾ 福田冬季子³⁾ 杉江 秀夫⁵⁾

要 旨

糖原病 IV 型は、グリコーゲン分枝酵素の欠損により進行性肝障害を呈する予後不良な疾患である。症例は現在 11 歳 6 か月の男児。1 歳 2 か月時に偶然肝逸脱酵素上昇を指摘され、肝脾腫も認められた。高乳酸血症は認めなかったが、肝生検組織の PAS 染色にてジアスターゼ抵抗性のアミロペクチン様物質を認め、赤血球中グリコーゲン分枝酵素活性の低下を確認した。経過中、肝脾腫の消失とともに肝逸脱酵素も低下し、現在は全く無症状であるため、非進行性肝型の糖原病 IV 型と考えられた。本疾患の臨床症状の多様性が再認識され、肝腫大症例では常に本疾患を念頭に置く必要があると考えられた。

キーワード：糖原病 IV 型、非進行性肝型、肝生検、PAS 染色

はじめに

糖原病はグリコーゲン代謝に関与する酵素の先天的な異常により、組織にグリコーゲン（糖原）が貯蓄する疾患の総称である¹⁾²⁾。グリコーゲンの蓄積部位により、全身型、肝型、筋型に分類される。糖原病 IV 型 (OMIM #232500) は肝型糖原病のひとつであり、Andersen 病あるいはアミロペクチノーシスとも呼ばれる。グリコーゲンの分枝構造形成にかかわるグリコーゲン分枝酵素 (glycogen branching enzyme : GBE) の欠損により発症し¹⁾²⁾、分枝した正常グリコーゲン分子が形成されず、直線状のアミロースが僅かに分岐した程度のアミロペクチン様の異常グリコーゲン分子が形成される。この異常グリコーゲンが蓄積することにより臓器障害をきたし、典型例では乳児期から肝障害が進行し、多くは 5 歳までに肝硬変で死亡する。今回われわれは、偶然発見された肝逸脱酵素上昇を契機に糖原病 IV 型と診断されたが、肝障害の悪化を認めず、非進行性と考えられる症例を経験したため報告する。

症 例

患者：現在 11 歳 6 か月の男児。
主訴：肝逸脱酵素上昇。

家族歴：父方祖父 早期胃癌。血族婚なし。3 歳年長の姉は健康。

既往歴：特記事項なし。

発達歴：独歩 11 か月、発語 1 歳 6 か月。

現病歴：1 歳 2 か月時、体幹部の発疹および持続する発熱を主訴に、近医より大学病院を紹介された。血液検査にて、AST 1,291U/L、ALT 415U/L と肝逸脱酵素の上昇を認め、精査目的で入院となった。入院後翌日には解熱し、発疹も消褪した。入院後の血液検査にて、HA 抗体陰性、HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV6)-IgG 640 倍、HHV6-IgM 10 倍、EB ウイルス (EBV) は既感染パターンであった。セルロプラスミン値の低下なく、抗核抗体も 40 倍未満であった。肝生検でウイルス感染による肝炎が疑われ、グリチルリチン製剤が投与された。しかし、その後も AST/ALT 200~300U/L が持続するため、2 歳 1 か月時に当院に入院となった。

入院時現症：身長 80.9cm (-1.5SD)、体重 10.54kg (肥満度 -0.4%)、全身状態良好であった。聴診上 3LSB に LevineII/VI の収縮期雑音を聴取した。腹部は軽度膨満し、やや硬い肝臓を右肋骨下縁から約 6cm 触知、脾臓を左肋骨下縁から約 1.5cm 触知した。神経学的所見には異常を認めなかった。

入院時検査所見 (表 1)：AST 221U/L、ALT 124U/L と高値が持続していたが、胆道系酵素は正常域であった。低血糖、アシドーシス、高尿酸血症、高脂血症は認めなかった。抗核抗体、抗平滑筋抗体、抗 LKM-1 抗体も陰性であり、HHV6、サイトメガロウイルス、

(平成 25 年 3 月 14 日受付) (平成 25 年 8 月 21 日受理)
別刷請求先：(〒232-8555) 横浜市南区六ツ川 2-138-4
神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科
安達 昌功

E-mail: madachi@mars.sannet.ne.jp

表1 当院入院時検査結果 (2歳時)

【血算】 WBC 11,100 / μ l RBC 465 万 / μ l Hb 9.2 g/dl Ht 29.5 % Plt 41.3×10^4 / μ l 【凝固線溶系】 PT 14.3 sec PT% 77.3 % PT-INR 1.20 APTT 33.5 sec Fib 216 mg/dl HPT 83.0 % 【血液ガス (静脈血)】 pH 7.357 PCO ₂ 43.2 mmHg HCO ₃ ⁻ 23.7 mmHg BE -1.8	【生化学】 TP 7.3 g/dl Alb 4.4 g/dl T-bil 0.2 mg/dl AST 221 U/l ALT 124 U/l ZTT 7.0 単位 TTT 15.4 単位 LDH 310 U/l ALP 870 U/l γ -GTP 79 U/l ChE 393 IU/l CK 81 U/l BUN 11.5 mg/dl Cr 0.19 mg/dl Na 140 mEq/l K 4.5 mEq/l Cl 103 mEq/l Ca 9.7 mg/dl P 5.3 mg/dl Fe 29 μ g/dl Ferritin 12.1 ng/ml	T-Chol 145 mg/dl TG 78 mg/dl CRP <0.1 mg/dl BS 75 mg/dl NH ₃ 47 μ mol/L 赤血球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性* 患児 0.16 μ mol/min/gHb 対照 0.17 μ mol/min/gHb ブドウ糖負荷試験 (2.5g/kg, 経口投与) グルカゴン負荷試験 (空腹時筋注, 0.03mg/kg) <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>血糖 (mg/dl)</th> <th>乳酸 (mg/dl)</th> <th></th> <th>血糖 (mg/dl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>前</td> <td>92</td> <td>10.3</td> <td>前</td> <td>74</td> </tr> <tr> <td>30分</td> <td>178</td> <td>16.9</td> <td>30分</td> <td>113</td> </tr> <tr> <td>60分</td> <td>136</td> <td>19.0</td> <td>60分</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>90分</td> <td>121</td> <td>20.0</td> <td>90分</td> <td>62</td> </tr> <tr> <td>120分</td> <td>100</td> <td>16.7</td> <td>120分</td> <td>78</td> </tr> </tbody> </table>		血糖 (mg/dl)	乳酸 (mg/dl)		血糖 (mg/dl)	前	92	10.3	前	74	30分	178	16.9	30分	113	60分	136	19.0	60分	70	90分	121	20.0	90分	62	120分	100	16.7	120分	78
	血糖 (mg/dl)	乳酸 (mg/dl)		血糖 (mg/dl)																												
前	92	10.3	前	74																												
30分	178	16.9	30分	113																												
60分	136	19.0	60分	70																												
90分	121	20.0	90分	62																												
120分	100	16.7	120分	78																												

*洗浄赤血球にウサギ筋ホスホリラーゼ b を加え、活性化されたホスホリラーゼ a をグリコーゲンを基質として測定.

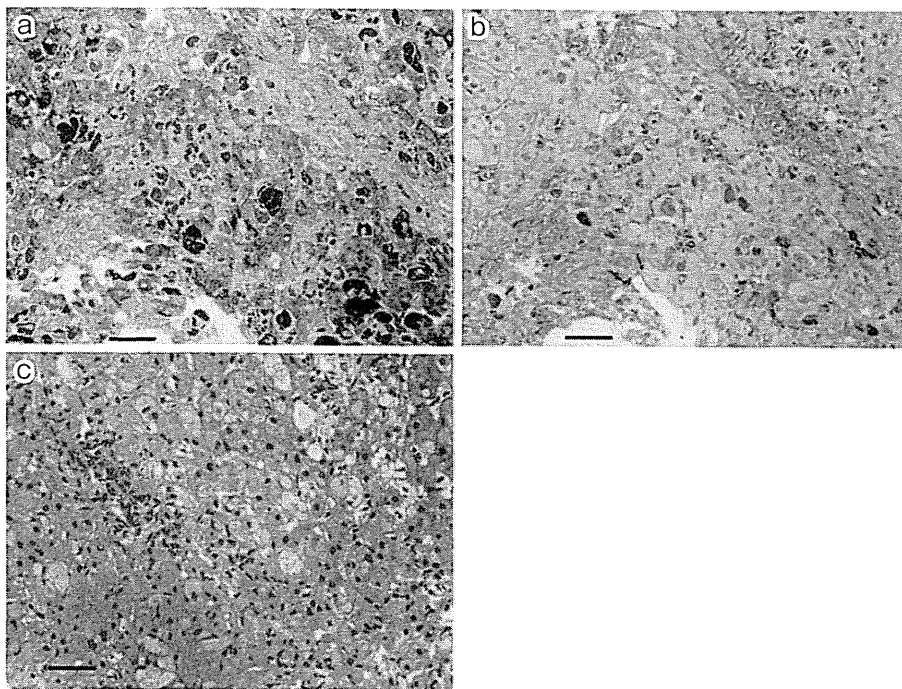


図1 肝生検の光学顕微鏡像 (bar : 100 μ m)

- a) PAS 染色:細胞質内にPAS (periodic acid-Schiff) 染色陽性の顆粒状物質の蓄積を認めた.
- b) ジアスターゼ処理後:PAS 陽性物質はジアスターゼ処理に部分的に抵抗性を示した.
- c) Azan 染色:生検組織の一部に軽度の線維化が認められる.

表2 赤血球グリコーゲン分枝酵素活性測定結果

	Branching Enzyme ($\mu\text{mol Pi/min/g Hb}$)	Phosphorylase b kinase (nmol/min/g Hb)
正常対照 1	2.5	18.6
正常対照 2	3.2	21.3
正常対照 3	2.4	15.9
患児	0.3	22.6
陽性対照 (GSD IV 症例)	0.2	0.5
	(GSD IV 症例)	(PBK 欠損症症例)

対照として測定した赤血球ホスホリラーゼ・キナーゼ b 活性は正常であり、グリコーゲン分枝酵素活性のみが明らかな活性低下を示した。

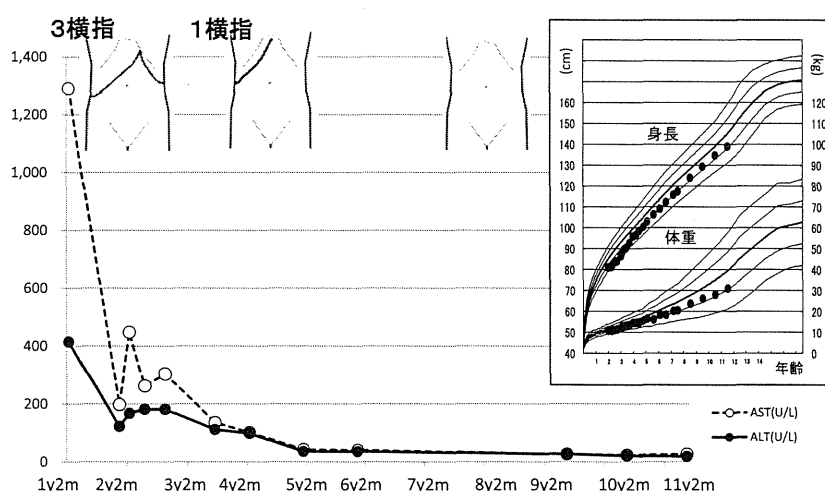


図2 肝腫大・肝機能検査の推移および成長曲線

肝逸脱酵素は徐々に低下し、5歳1か月時に正常範囲内となった。肝脾腫は8歳6か月時に改善した。身長・体重は-1SD前後を推移している。

EBV は既感染パターンであった。腹部超音波検査では実質輝度上昇を伴った肝腫大および脾腫を認めた。ブドウ糖負荷試験では、血糖・乳酸値とも正常反応を示し、空腹時グルカゴン負荷での血糖反応も正常であった。赤血球を用いてホスホリラーゼ・キナーゼを検討したが、正常活性であった。

経過：両親から同意を得て当院で再度行った肝生検にて、細胞質内にPAS (periodic acid-Schiff) 染色陽性でジアスターゼにやや抵抗性の顆粒状物質の蓄積が見られた(図1)。この時点で糖原病IV型がもっとも疑われたが、肝硬変の所見は軽微で、小葉構造は保たれており、門脈域への軽度のリンパ球浸潤と、Azan 染色にて部分的な線維化を認める程度であった。次いで、赤血球中のグリコーゲン分枝酵素活性を測定したところ、対照酵素活性は正常範囲で、分枝酵素活性のみが明らかに低下しており(表2)、糖原病IV型の診断に至った。外来にて無治療で経過観察していたところ、徐々に肝逸脱酵素は低下し、5歳1か月時にはAST 43 U/L、ALT 36U/Lと正常範囲となった。その後の再上

昇もなく、11歳6か月現在もAST 27U/L、ALT 19U/Lで、触診上の肝脾腫も消失した(図2)。成長発達を含め全く無症状であり、超音波検査による心機能評価にも問題を認めなかった。

考 察

本症例では18か月時に偶然肝脾腫と肝逸脱酵素の上昇が発見された。肝生検にて細胞質内のアミロペクチン様物質を確認し、酵素活性の測定にて糖原病IV型の診断に至った。しかし、肝脾腫の消失とともに肝逸脱酵素は正常化し、現在まで肝機能は正常に保たれている。以上の経過より本症例は非進行性肝型の糖原病IV型と考えられる。

糖原病IV型は、糖原病の約0.3%を占めるまれな常染色体劣性遺伝性疾患である。GBEは α -1,4結合のグルコース残基に1,6結合のグルコースを付加する酵素で、この酵素の欠損により分枝がほとんどないアミロペクチン様の異常グリコーゲンが蓄積する。この異常グリコーゲンは極めて難溶性で組織障害的に作用し、

多臓器の障害が引き起こされる。臨床症状は様ではなく、現在、①古典型、②非進行性肝型、③致死的新生児神経・筋型、④乳児神経・肝型、⑤成人ポリグルコサン小体病 (adult polyglucosan body disease : APBD) の5つの病型が報告されている。古典型では、成長障害、肝脾腫を呈し、18か月までには肝硬変に進行し、生後5年以内に死亡する³⁾。特異的な治療はなく、肝硬変に対する対症療法が主であるが、肝移植による長期生存例も報告されている⁴⁾⁵⁾。非進行性肝型は非常に稀であり、現在のところ世界でも数例の報告に留まり、検索しえた範囲では本症例がわが国では最初の報告である³⁾。2009年に行われた国内の調査では、肝移植後の長期生存1名と3名の死亡例が確認されている。

GBE 遺伝子は3p14に座位し702個のアミノ酸よりなる⁶⁾。現在までに40近くの変異が報告されている⁷⁾。頻度が高い特定の変異は存在せず、GBE 遺伝子内どこでも変異は生じうる⁸⁾。変異の部位と臨床症状との相関についてはR515C, F257L, R524Xが古典型、Y329Sが非進行性肝型との関連が報告されている。本症例では遺伝子検査は行っていないが、酵素活性がある程度保たれるようなミスセンス変異の存在が想定される。

本疾患の診断に際しては、以下の2点に注意する必要がある。1)他の肝型糖原病と異なり、高乳酸血症が顕著ではない。つまり、I型では空腹時に高乳酸血症が著明で、VI型(ホスホリラーゼ欠損)、VIII型(ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損)ではブドウ糖負荷後に乳酸値の上昇を見るが、本症ではいずれにも該当しない。糖原病を疑った場合の診断アルゴリズムとして、Fernandesの方法がよく知られているが⁹⁾、それに準拠した場合、本症は診断に至らない。2)従って診断には肝生検が重要となるが¹⁰⁾、通常の病理検索では見逃されやすい。肝腫大を伴った肝機能障害の場合には、糖原病を鑑別に挙げ、できればPAS染色を念頭に置いた組織の固定を行い、必ずPAS染色およびジアスターゼ処理による消化PAS染色を実施する必要がある。

前述のように、本症の臨床症状は多様である。したがって、本症例でも、筋症状や神経症状が今後に現れる可能性は排除できない。非進行性肝型と考えられる場合でも、長期の経過観察が必要であることを、医療者及び本人・家族ともよく理解しておく必要があると考えられた。

結 語

非進行性肝型の糖原病IV型の1例を経験し、本症の臨床症状が多様であることが再認識された。本症は負荷試験で異常を示さず、肝組織のPAS染色および消化PAS染色によって診断が示唆されることがあり、肝腫大症例の場合には糖原病IV型を念頭に置いた鑑別を行う必要がある。

謝辞 赤血球中ホスホリラーゼ・キナーゼ活性を測定いただきました。大阪大学医学部小児科 酒井規夫先生に深謝申し上げます。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Shin YS. Glycogen storage disease : clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. *Semin Pediatr Neurol* 2006 ; 13 : 115—120.
- 2) 杉江秀夫, 杉江陽子. 先天性代謝異常症 糖原病IV・V・VII型. *小児内科* 2003 ; 35 (増刊) : 401—405.
- 3) 小林博司. 先天性代謝異常症 糖原病 肝型糖原病を中心に. *小児内科* 2009 ; 41 (増刊) : 401—406.
- 4) McConkie-Rosell A, Wilson C, Piccoli DA, et al. Clinical and laboratory findings in four patients with the non-progressive hepatic form of type IV glycogen storage disease. *J Inherit Metab Dis* 1996 ; 19 : 51—58.
- 5) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan : clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *Journal of Human Genetics* 2013 ; 58 : 285—292.
- 6) 新垣和也, 仲西貴也, 金城貴夫. 遺伝と代謝 糖質代謝異常症 糖原病IV型. *日本臨床. 別冊肝・胆道系症候群 I*. 2010 : 482—485.
- 7) Li SC, Chen CM, Goldstein JL, et al. Glycogen storage disease type IV : novel mutations and molecular characterization of a heterogeneous disorder. *J Inherit Metab Dis* 2010 ; doi 10.1007/s10545-009-9026-5.
- 8) Moses SW, Parvari R. The variable presentations of glycogen storage disease type IV : a review of clinical, enzymatic and molecular studies. *Curr Mol Med* 2002 ; 2 : 177—188.
- 9) Fernandes J, Huijing F, van de Kamer JH. A screening method for liver glycogen diseases. *Arch Dis Child* 1969 ; 44 : 311—317.
- 10) Mizuochi T, Kimura A, Nishiura H. Liver biopsy is an important procedure in the diagnosis of glycogen storage disease type IV. *Pediatrics International* 2011 ; 53 : 129—130.

A Case of the Non-progressive Hepatic form of Type IV Glycogen Storage Disease

Kaori Kawano^{1,4}, Masanori Adachi¹, Yumi Asakura¹,
Koji Muroya¹, Yoshiaki Shikama², Kunihiro Akagi²,
Yukichi Tanaka³, Tokiko Fukuda⁵ and Hideo Sugie⁵

¹Department of Endocrinology and Metabolism, Kanagawa Children's Medical Center

²Division of Infection, Immunology and Rheumatology, Kanagawa Children's Medical Center

³Diagnostic Pathology, Kanagawa Children's Medical Center

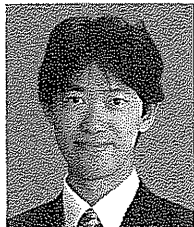
⁴Department of Pediatrics, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University

⁵Department of Pediatrics, School of Medicine, Jichi Medical University

Glycogen storage disease (GSD) type IV is a heritable metabolic disorder caused by a defective glycogen branching enzyme (GBE) that frequently gives rise to cirrhosis. Our patient was 1 year old when he was found to have abnormal liver functions with hepatosplenomegaly. A histological examination revealed periodic acid Schiff (PAS)-positive amylopectin-like material in the hepatocytes that was partially resistant to diastase digestion. GSD-IV was suspected and confirmed by decreased GBE activity in the erythrocytes. Because the patient had no liver damage or hepatomegaly at 11 years of age, it was most likely the non-progressive hepatic form of GSD-IV. In conclusion, as GSD-IV has a wide spectrum of clinical features, physicians should note that PAS staining is essential for diagnosing GSD-IV.

次世代シーケンシングによる 先天性内分泌疾患の分子基盤の解明

Unveiling the genetic landscape of congenital endocrine disorders by next generation sequencing



鳴海覚志(写真) 長谷川奉延

Satoshi NARUMI and Tomonobu HASEGAWA

慶應義塾大学医学部小児科

◎先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症などの内分泌器官の先天異常は、先天性内分泌疾患と総称される。先天性内分泌疾患の一部は単一遺伝子異常を病因とするが、その分子基盤の全貌は十分に理解されていない。著者らはベンチトップ型次世代シーケンサーを用いて先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子約120種を超高速度解析する“Endocrinome システム”を開発・運用し“先天性内分泌疾患患者のうち既知責任遺伝子の変異が検出されるのはどの程度か?”という問いへの答えを得つつある。一方、Endocrinome システムを用いてもなお変異を同定できない症例に対し、全2万遺伝子を対象としたエクソーム解析を積極的に適用し、新規責任遺伝子の同定に挑んでいる。本稿では、次世代シーケンサーという新しいツールを用いて先天性内分泌疾患の分子基盤解明をめざす著者らの取組みを紹介したい。



先天性内分泌疾患、単一遺伝子異常、エクソーム解析

先天性内分泌疾患の遺伝学

先天性内分泌疾患とは、各種内分泌器官に先天性に生じた形態的異常あるいは機能的異常によりホルモン欠乏をきたす病態の総称である。内分泌器官には視床下部-下垂体系、甲状腺、副甲状腺、副腎、性腺、膵内分泌細胞などが含まれるため、先天性内分泌疾患は異質性の高い疾患単位といえる。

先天性内分泌疾患のすくなくとも一部は、単一遺伝子異常を病因とする Mendel 遺伝形質である。疾患に占める単一遺伝子異常の寄与は一様ではなく、器官により大きく異なる。たとえば、先天性副腎機能低下症の80%以上は糖質コルチコイド合成に不可欠な21水酸化酵素の欠損症(CYP21A2変異)である。一方、先天性下垂体機能低下症では10種以上の責任遺伝子が報告されているが、変異が検出される患者の割合は積算でも5%未満と考えられる。このように器官ごとに単一遺伝子異常の寄与の程度には差異が認められるが、その一方で責任遺伝子には共通のパターン

があり、病因論的に重要である。具体的には以下の3グループに大別可能である(図1、表1)。

グループ1：内分泌器官の形成(=発生・分化)にかかわる転写因子の異常。

グループ2：内分泌器官でのホルモン合成にかかわる分子(酵素、トランスポーターなど)の異常。

グループ3：内分泌器官の機能調節を行う上位ホルモンとその受容機構の異常。

この分類に基づくと、臨床像(たとえば内分泌器官の画像所見)から責任遺伝子の機能のある程度予測することができる。

先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子の包括的解析

著者らの研究室では2005年以来、先天性甲状腺機能低下症、先天性下垂体機能低下症、副腎低形成症、性分化疾患など、さまざまな先天性内分泌疾患の遺伝子解析をPCR-直接シーケンス法(以下、Sanger法)で行ってきた。多数の患者からな

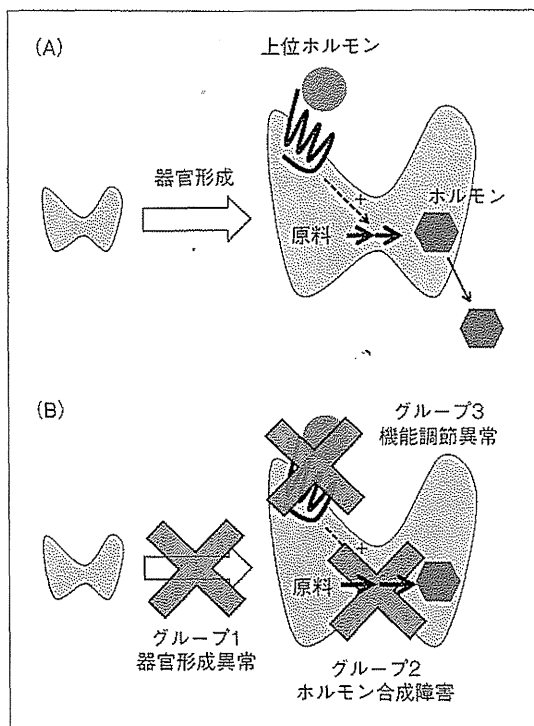


図1 先天性内分泌疾患の病因分類

A: 正常なホルモン分泌機構(例として甲状腺を模したもの)。正常な器官形成過程を経て成熟した内分泌器官は、典型的には器官のホルモン合成能を制御する上位ホルモンの支配下にホルモンを合成し、循環血液中へと放出する。

B: 先天性内分泌疾患の3つの病因グループ。本稿では便宜的に、器官形成過程の異常をグループ1、成熟した内分泌器官内のホルモン合成障害をグループ2、機能調節機構の異常をグループ3とした。通常、グループ1と3の異常をもつ内分泌器官は低形成となり、グループ2では過形成となる。

るコホートを解析した結果、単一遺伝子異常の寄与の程度は従来の認識よりも高いことが明らかになった。たとえば、先天性甲状腺機能低下症患者における単一遺伝子異常保有者の割合は、従来5~10%と見積もられていたが¹⁾、日本人患者コホートに対する包括的解析では20%以上に単一遺伝子異常を同定できた²⁻⁴⁾。ただし、これまでの遺伝疫学研究的の多くは、Sanger法の時間的・経済的制約から相対的に変異が高頻度な遺伝子、臨床像から予測可能な遺伝子など一部の責任遺伝子のみが解析されてきた。そのため、得られるデータは疾患の遺伝的背景の全貌には遠く、各遺伝子の変異頻度の推定値や臨床像スペクトラムへの選択バイアスの影響は排除しきれなかった。

このような限界を打破すべく、著者らは2012年2月から次世代シーケンサーを用いて先天性内分泌疾患のほぼすべての既知責任遺伝子を超高速度解析する“Endocrinome システム”を開発・運用している(「サイドメモ1」参照)。以下、このシステムについて概説する。

1. Endocrinomeシステムの概要

本システムの最新バージョンでは先天性下垂体

機能低下症、先天性甲状腺機能低下症、先天性副甲状腺機能低下症、先天性副腎機能低下症、性分化疾患などの既知責任遺伝子約120種が解析可能である。上記疾患の既知責任遺伝子の大半が網羅

サイドメモ1

臨床遺伝子診断への次世代シーケンサーの参入

Sanger法の数万倍以上の解析力をもつ次世代シーケンサーが2000年代の半ばに市販され、2009年に特定遺伝子のエクソン領域を選択的に濃縮するキットがAgilent Technologiesなどから発売されると、遺伝子解析研究の障壁のひとつであった時間的・経済的制約の解消は時間の問題となった。しかし、2009年時点で普及していた次世代機はランニングコストの高い大型機であり、エクソーム解析など少数症例に対する探索的研究には威力を発揮したが、“既知責任遺伝子の変異検索”といった中規模の診断研究には応用しにくかった。2011年に入るとIon PGM(Life Technologies)、MiSeq(Illumina)といった、低ランニングコストのベンチトップ機が市場投入され、既知責任遺伝子の変異検索に次世代シーケンサーを適用できる環境が整った。

表 1 先天性内分泌疾患の病因分類と責任遺伝子

	下垂体	甲状腺	副甲状腺	副腎	精巣
グループ1 器官形成異常	<i>POU1F1</i> <i>PROP1</i> <i>LHX4</i>	<i>PAX8</i> <i>NKX2-1</i> <i>FOXE1</i>	<i>GCM2</i> <i>GATA3</i>	<i>NR0B1</i> <i>CDKN1C</i>	<i>NR5A1</i> <i>SRY</i> <i>WT1</i>
グループ2 ホルモン合成障害	<i>GH</i> <i>TSHB</i> <i>LHB</i>	<i>TG</i> <i>TPO</i> <i>DUOX2</i>	<i>PTH</i>	<i>CYP21A2</i> <i>CYP17A1</i> <i>STAR</i>	<i>HSD3B2</i> <i>HSD17B3</i> <i>CYP17A1</i>
グループ3 機能調節異常	<i>GHRHR</i> <i>TRHR</i> <i>KISS1R</i>	<i>TSHR</i>	<i>CASR</i>	<i>MC2R</i>	<i>LHCGR</i>

されている。末梢白血球細胞から抽出したゲノム DNA 2 μ g を開始試料とし、Covaris による DNA 断片化の後 SureSelect XT カスタムキット (Agilent) を用いて、上記 120 遺伝子のエクソンに由来する DNA を選択的に濃縮する。濃縮した DNA からライブラリ (次世代シーケンサーで解析可能な状態の DNA プール) を構築する過程で、24 種の識別配列のうち 1 つを付加する。塩基配列決定は MiSeq (Illumina) で行う。識別配列を利用して 12 検体あるいは 24 検体を同時に 150 塩基ペアエンドモードで解析している。得られた配列データは二次・三次解析プログラム群 (BWA, SAMtools, GATK, ANNOVAR など) による標準パイプラインで解析し、バリエーション (多型, 変異) の一覧リストを出力する。標的エクソンの 95% 以上で 30 \times 以上のカバレッジ (塩基当り配列決定回数) が得られた場合を解析完了とする。実験開始からこの段階までを計 5 日間で行うことができる。患者の疾患との関連が疑われるバリエーションが検出された場合、Sanger 法でその存在を確認している。

2. Endocrinome システムの運用実績

2012 年 2 月～2013 年 1 月に計 215 名の先天性内分泌疾患患者の遺伝子解析を Endocrinome システムで行った。このうち 20 名以上を解析した疾患は、先天性甲状腺機能低下症 84 名、性分化疾患 47 名、中枢性性腺機能低下症 28 名の 3 疾患であった。標的領域の平均カバレッジは 100 \times ～500 \times 程度であり、90% 以上の検体は 1 回で解析完了した。対象 215 名中 55 名で変異を検出した (変異陽性率 27%)。Endocrinome システムの偽陽性 (変異検出判定が Sanger 法での検証で覆された例) は 2 検体 (1%) であった。これらは、反復配列の周囲で認め

られたことから、アライメント (得られた配列を標準ゲノム配列へ参照する解析過程) の不正確さが原因と考えられた。

解析件数の多い先天性甲状腺機能低下症の変異陽性率を 2012 年 1 月まで (Sanger 法) と 2012 年 2 月以降 (Endocrinome システム) で比較すると、19 (440 検体) \rightarrow 29 (84 検体) と有意な増加を認めた ($p=0.02$, Fishser 検定)。

3. Endocrinome システムの評価

先天性内分泌疾患患者の遺伝子診断において、Endocrinome システムは Sanger 法による従来型遺伝子解析と比較して以下の特徴があると考えられた。

① 変異陽性率の改善……Sanger 法では全症例で全責任遺伝子を検索することは不可能であったが、Endocrinome システムはこれを可能とした。網羅性の向上は変異陽性率 (診断率) の増加に寄与すると想定されたが、すくなくとも先天性甲状腺機能低下症においては想定を支持する成績が確認された。

② 診断に要するマンパワーの低減……従来、著者らの研究室では内分泌器官ごとに担当者を決め、逐次 Sanger 法で解析する体制であった。Endocrinome システムではサンプル調整からバイオインフォマティクス解析までの次世代シーケンシング解析を専任者 1 名 (著者) が行い、器官担当者は変異陽性検体の Sanger 法による確認解析のみを行う体制とした。その結果、各担当者の遺伝子解析にかかる労力は大幅に減少した。臨床遺伝子診断を従来よりも少ないマンパワーで維持できるようになり、各担当者は発現実験などの病態解析により重点をおけるようになった (「サイドメ

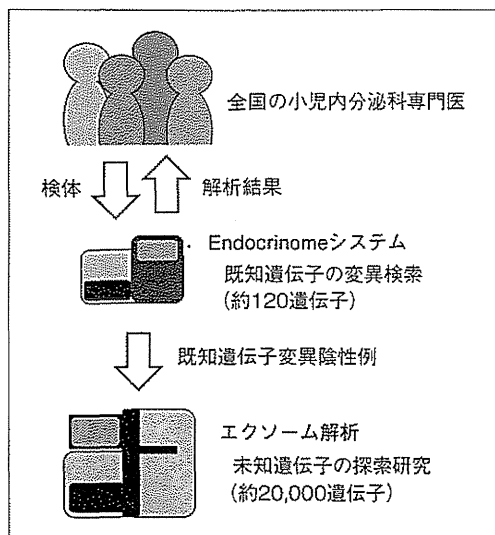


図 2 未知責任遺伝子の探索：研究の概要

著者らは全国の小児内分泌科専門医から臨床検体・臨床情報を収集し、Endocrinome システムによる遺伝子解析を行っている。解析結果はおおむね3カ月程度で主治医へフィードバックされる。既知遺伝子変異陰性例のうち、家族歴あり、重症例、両親検体が利用可能、など研究的価値が高い症例についてはエクソーム解析による未知責任遺伝子の探索を行っている。

モ 2」参照)。

③ コストは？……検体当りの解析コスト比較(従来法 vs. Endocrinome システム)は、前者のコストが対象疾患ごとに異なることから容易ではない。消耗品費ベースで考えると、従来法での50アンプリコン分(エクソン10個からなる遺伝子なら5遺伝子分)のコストとEndocrinome システムのコストはほぼ同等であった。シーケンサー本体の導入・維持費用は次世代シーケンサーのほうが高額であり、減価償却の観点からは後者は不利である。一方、商業ベースでの運用を想定すると、解析に要するマンパワー(人件費)は後者のほうが低

く、多数検体を解析する場合は後者にメリットがあると考えられる。また、従来型シーケンサーのデータ出力量がここ10年近く頭打ちであるのに対し、現在普及している次世代シーケンサーの出力量は改善の余地を残しており、塩基当り解析コストは今後さらに下がることが予想される。遺伝子解析における従来型シーケンサーの役割が今後縮小していくことは間違いないであろう。

● 先天性内分泌疾患の未知責任遺伝子の探索

家族性の先天性内分泌疾患であるにもかかわらず、Endocrinome システムで既知責任遺伝子に変異が見出せない家系が散見される。また、孤発例であっても子の世代で新生した変異(*de novo* 変異)が未知の責任遺伝子に起こり、発症するような場合も十分に想定される。著者らは先天性内分泌疾患の未知責任遺伝子を探索すべく、エクソーム解析を中心とした研究に取り組んでいる(図2)。想定される遺伝形式に合わせ、複数の解析戦略を組み合わせて研究を進めている(図3)。以下、著者らの取組みの実例を紹介する。

1. 常染色体優性の大家族

5世代罹患者20名以上の常染色体優性遺伝を呈する先天性内分泌疾患家系の解析を行っている。本家系はshort tandem repeat マーカーを用いた連鎖解析によりLODスコア4以上の候補領域を4Mbまで絞り込んでいるが、この領域には既知責

サイドメモ 2

次世代シーケンシングは遺伝子診断に何をもたらすか

次世代シーケンシングを利用した遺伝子解析では数百個規模の遺伝子を同時解析可能であり、共通のワークフローで複数の病態の診断が可能である。次世代シーケンシングではサンプル調整およびバイオインフォマティクスの習熟が必須であるが、一度これに習熟すれば複数の病態を共通の技術で解析可能であることを意味する。従来、遺伝子診断はおもに研究室レベルで疾患ごと、責任遺伝子ごとに行われており、試薬組成や機器設定条件といった解析ノウハウが研究室を超えて共有されることは珍しかった。臨床遺伝子診断への次世代シーケンシングの導入により、このような閉鎖的状況が打破される可能性がある。

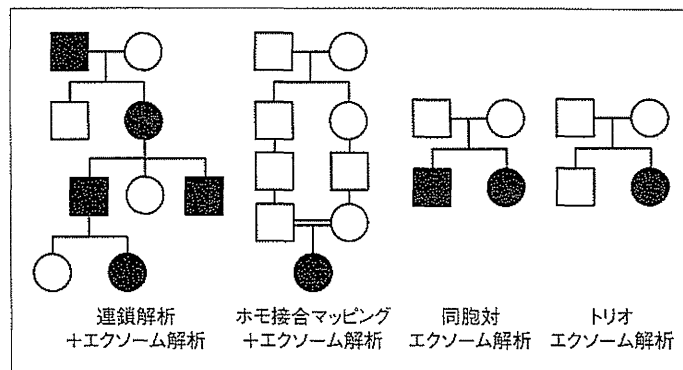


図 3 想定される遺伝形式に応じた解析戦略

左から、常染色体優性の大家系、近親婚家系、(親が非罹患の)罹患同胞対、孤発例の代表的な家系図を示す。どの場合においてもエクソーム解析は強力な解析ツールとなるが、遺伝歴濃厚な場合は連鎖解析、ホモ接合マッピングなどの物理的方法を組み合わせることにより効率的な研究推進が可能である。また、孤発例であってもトリオ解析を用いることにより責任遺伝子を絞り込める場合がある(本文参照)。

任遺伝子は含まれない。この領域には約20の遺伝子がコードされており、このなかに新規責任遺伝子が存在する可能性が高いと考えている。候補ゲノム領域をイントロン、遺伝子間領域も含めて濃縮するカスタム SureSelect を作製し、この領域の詳細な解析を行ったが、エクソン内部には変異と考えられるバリエーションが同定されなかった。イントロンの変異、調節領域の変異などを想定し、解析継続中である。

2. 近親婚の罹患同胞対

はとこ同士(近交係数 1/64 の近親婚)の父母から出生した合併奇形を伴う先天性甲状腺機能低下症の同胞例を解析中である。本罹患同胞対に対するホモ接合マッピング(SNP アレイ解析)により約8Mbの autozygous segment を同定した。この領域には先天性甲状腺機能低下症の既知責任遺伝子が存在し、Sanger 法でホモ接合性のスプライスサイト変異を確認した。

当初、①合併奇形の存在、②重症度の高さから、その責任遺伝子の変異を想定できなかった。②に関しては当該変異がわが国ではきわめてまれなホモの無機能型変異であったためと考えられる。①に関しては変異同定済みの責任遺伝子による症状としては説明がつかないため、autozygous segment に存在する他遺伝子に未同定の変異が存在する可能性が考えられる。現在、エクソーム解析

により候補領域に存在するホモ接合性バリエーションを探索中である。なお、本家系の解析は Endocrinome システム導入以前であったが、かりに Endocrinome システムで解析していたとするならば遅滞なく先天性甲状腺機能低下症にかかわる変異を同定できていたと考えられる。

3. 非近親婚の罹患同胞対

従来、非近親婚の罹患同胞対に対する解析(たとえば SNP アレイ)でその責任遺伝子を同定することはきわめて困難であったが、エクソーム解析の導入によりこれが可能となった⁵⁾。非罹患の両親から罹患同胞対が生じる機序として、①常染色体劣性変異、②常染色体優性変異であるが親が未発症(不完全浸透・性腺モザイクなど)、③(兄弟例の場合)X連鎖変異、などといった可能性が考えられる。このうち、①についてはエクソーム解析を行い“同胞間で共有される変異が同一遺伝子内に2アレル(ホモ接合あるいは複合ヘテロ接合)あるような遺伝子”という条件でフィルタリングすることにより責任遺伝子同定に至る可能性がある。X連鎖の場合は共有されるヘミ接合性変異として同定可能である⁶⁾。

著者らはこれまで複数の先天性内分泌疾患の罹患同胞対に対して、このアプローチで解析している。著者らの二次・三次解析アルゴリズムでは、1エクソームに含まれる低頻度(アレル頻度 0.2%

未満)かつ機能異常と推測されるバリエーションの個数は200~250程度である。これらのうち、2つ以上のバリエーションが同一遺伝子内に同定される遺伝子の数は0~5程度であり、この時点で候補遺伝子はかなり絞り込まれる。同胞間でバリエーションが一致する遺伝子数はかなり少なく、著者らの経験では0~2である。

このように、罹患同胞対に対するエクソーム解析は非常に効率のよい新規責任遺伝子探索法に思われるが、実際には解析中の家系では有力な候補遺伝子の同定に至っていない。解析が困難である要因のひとつとして、エクソーム解析のβエラー(偽陰性)の確率の高さが考えられる。一般的に第1エクソンなどGC含有率の高いゲノム領域は核酸ハイブリダイゼーションによる選択的濃縮が困難であり、エクソーム解析においてカバレッジが不十分となりやすい。優性モデルの場合1つの変異のみを検出すればよいのに対し、劣性モデルでは2つの変異の双方が検出される必要があり、βエラーの影響をより受けやすいと考えられる。

4. 孤発例に対する解析

“遺伝子変異をもつ孤発例”の成立機序として、①常染色体劣性変異、②常染色体優性変異であるが親が未発症(不完全浸透・性腺モザイクなど)、③(男児例の場合)X連鎖変異、④常染色体優性変異が患児で新生(*de novo*変異)、といった可能性が考えられる。①~③については上述した同胞対と同様であるが、④が利用できる点が決定的に異なる。一世代で生じる*de novo*変異は1エクソーム内で0~2個程度であることが報告されている⁷⁾。かりに、ある孤発例が未知責任遺伝子の*de novo*変異を有するならば、患者とその両親のエクソームを比較し“発端者にのみに存在するバリエーション”の条件でフィルタリングすることにより同定可能である。

著者らはこれまで、複数の先天性内分泌疾患の孤発例に対して5~10トリオのエクソーム解析を行っている。その結果、ある先天性内分泌疾患2

例において機能未知遺伝子Aの*de novo*変異を同定した。遺伝子Aの変異は類似の表現型を示す他患者のエクソームにも含まれており、有力な新規責任遺伝子候補と考えられる。現在、患者コホート解析と分子機能解析を並行して進行中である。

次世代内分泌学に向けて

医学・医療の歴史のなかで、疾病の制圧にはつねに正確な病因診断が先立ってきた。感染症学を例にとれば、起因病原体の分離・観察により病因診断が成立し、起因病原体ごとの抗生物質治療が開発・最適化されてきた。感染症学においては顕微鏡が細胞レベルの観察を可能とするが、Mendel遺伝病学においてはシーケンサーが“分子レベルの顕微鏡”として威力を発揮する。これまで20年以上にわたりキャピラリー型の第一世代シーケンサーが豊かな知見をもたらしてきた。そして現在においては、広大なゲノムのランドスケープ全体を見渡すことができる次世代シーケンシングが医学研究のさまざまな局面で利用できる時代となった。今後も次世代シーケンシングが医学・医療の幅広い分野を大幅にバージョンアップしていくことに疑いの余地はない。著者らも内分泌学の分野で、次世代シーケンシングにより得られる“果実”を患者・家族、そして臨床現場で活躍する諸先生方に還元できるよう、努力を続けていきたいと考えている。

文献

- 1) Krude, H. et al.: *Horm. Res.*, **53**(Suppl.1): 12-18, 2000.
- 2) Narumi, S. et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**: 1317-1323, 2009.
- 3) Narumi, S. et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**: 1981-1985, 2010.
- 4) Narumi, S. et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**: E1340-E1345, 2011.
- 5) Ng, S. B. et al.: *Nat. Genet.*, **42**: 30-35, 2010.
- 6) Shoubridge, C. et al.: *Nat. Genet.*, **42**: 486-488, 2010.
- 7) Veltman, J. A. and Brunner, H. G.: *Nat. Rev. Genet.*, **13**: 565-575, 2012.

* * *