

先天代謝異常症の遺伝子診断

—新生児マススクリーニング陽性例の早期診断への応用—

長尾 雅悦

IRYO Vol. 62 No. 2 (69-75) 2008

要 旨

新生児マススクリーニングは知的障害の予防に大きな成果をあげてきたが、対象疾患の種類や頻度が増加し陽性例を早期に診断する体制が求められている。そこで先天代謝異常症4疾患（フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、ガラクトース血症）の精査症例を臨床応用の進歩著しい遺伝子検査を用いて確定診断を行った。札幌市および北海道の過去5年間（平成14-18年度）の受診者数は約45,000人/年で、精密検査対象は37例あった。この中から古典型フェニルケトン尿症（PKU）3例、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ（MAT）欠損症1例、シトリン欠損症（NICCD）1例を遺伝子診断した。遺伝子診断された5例以外はすべて一過性あるいは他の病態を反映した2次的な検査値の異常であった。変異の同定により病型診断とそれに応じた治療方針の決定も可能となった。スクリーニング陽性症例を早期に診断治療するシステムの確立に向け、国立病院機構の遺伝学的診断機能を充実することが期待される。

キーワード 新生児マススクリーニング, 遺伝子検査, 先天代謝異常症

はじめに

日本では昭和52年から先天代謝異常の新生児マススクリーニング事業が開始され、30年を経過し知的障害の予防に著しい成果をあげてきた。一方で少子化による受診者総数の減少、自治体単独事業化（平成13年度より）、患者の長期追跡体制と予後の評価などの課題も浮かび上がっている¹⁾。とくにスクリーニング陽性例の診断支援および確定診断体制を確立することが事業全体の円滑な運営に欠かすことができない。近年、一部の地域でタンデムマスなどの

新技術が導入され、発見される疾患の種類、頻度とも増加している。検査センター、採血医療機関、精査医療機関の間で密接な連携をとり、患者が早期に受診して納得のいく診断治療を受けられるシステムが必要である。札幌市および北海道の過去5年間（平成14-18年度）のスクリーニングにより当院（西札幌病院）へ依頼された陽性例の精査の過程で、遺伝子検査を有効に活用することができた。国立病院機構の臨床研究として遺伝子検査による新生児マススクリーニング事業への参画とその成果について報告する。

国立病院機構西札幌病院小児科

別刷請求先：長尾雅悦 国立病院機構西札幌病院 小児科 〒063-0005 札幌市西区山の手5条7丁目1番1号
（平成19年7月19日受付，平成19年12月21日受理）

Genetic Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism:

Application for Early Diagnosis of Newborn Mass-screening Positive Patients

Masayoshi Nagao

Key Words: newborn mass-screening, genetic tests, inborn errors of metabolism

1. 北海道および札幌市における新生児マススクリーニング

先天代謝異常症4疾患（フェニルケトン尿症，ホモシスチン尿症，メープルシロップ尿症，ガラクトース血症）マススクリーニングの平成14-18年度年間受診者数は北海道（札幌市を除く）が約27,000-29,000人，札幌市は約15,000-17,000人であり，合わせて約45,000人／年であった．検査方法はフェニルケトン尿症，メープルシロップ尿症，ホモシスチン尿症におけるアミノ酸測定をHPLC法で，またガラクトースの測定を酵素法で行った．札幌市では平成17年度よりタンデムマス法によるスクリーニングのパイロットスタディを開始し，アミノ酸測定でのHPLC法との併用を行った．

2. 生化学的診断

初回陽性例は1週間以内に再検査しカットオフ値（フェニルアラニン2.5mg/dl，ロイシン3.5mg/dl，メチオニン1.0mg/dl，ガラクトース4.0mg/dl）を超えた場合，精査医療機関に受診しアミノ酸分析（血液・尿），尿有機酸分析，尿中ホモシスチン，ガラクトース代謝酵素など症例ごとに精密検査を行った．また高フェニルアラニン血症ではビオプテリン負荷試験を実施した．

3. 遺伝子検査

上記の生化学的検査により確定診断や病型診断に至らなかった症例について，以下の遺伝子検査を実施した．高フェニルアラニン血症ではフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）遺伝子変異の検索を既報に従って行った²⁾．ホモシスチン尿症をとみなわない高メチオニン血症ではMAT遺伝子について，まず最も頻度の高いR264H変異を調べ，陰性の場合には各エクソンのシーケンスを行った³⁾．またフェニルアラニン，メチオニン，ガラクトースなど複数の項目が異常を示すシトリン欠損症（NICCD）が疑われる症例では，小林らの方法⁴⁾により日本人に代表的な9つの変異の検索を行った．以上の遺伝子検査に関しては，西札幌病院倫理委員会の承認のもと，『遺伝的検査に関するガイドライン』の趣旨を両親に十分説明し同意を得た上で行った．

北海道全体で平成14-18年度5年間に再検査後，精密検査対象となったのは，フェニルアラニン高値13例，ロイシン高値2例，メチオニン高値6例，ガラクトース高値16例（計37例）であった．以上の精密検査症例から当院へ確定診断の依頼があり，古典型フェニルケトン尿症（PKU）3例，MAT欠損症1例，シトリン欠損症1例の計5例を遺伝子診断した（表1）．ホモシスチン尿症，メープルシロップ尿症，ガラクトース血症の発生はなく，遺伝子診断された5例以外は一過性あるいは他の病態を反映した2次的な検査値の異常であった．

症例1（古典型フェニルケトン尿症）：

40週1日，正常分娩，3,025g，仮死なし．第1子女児で，日齢5日目のガスリー検査で血中フェニルアラニンが17.1mg/dlと高値を認め再検査で35mg/dlまで上昇した．ビオプテリン1回負荷試験にて血中フェニルアラニンが20%低下しビオプテリン反応性フェニルケトン尿症を示唆した．しかしフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）の遺伝子検査にて古典型に特有なR111XとIVS4-nt-1の2つの変異（図1a, b）を認め，不応性の古典型フェニルケトン尿症と診断に至った．後にビオプテリン4回負荷試験にて不応性が確認された．本症例のようにビオプテリン負荷試験の再検査を要する症例において，早期の遺伝子診断がビオプテリン反応性を含めた病型診断と治療方針の決定に有用であった．

症例2（古典型フェニルケトン尿症）：

双胎の第1子．患児は28週6日，出生体重，1,052g，帝切にて出生した．RDS（Bomsel 2度）のため，挿管およびサーファクタント治療をうけた．日齢8日目にフェニルアラニン高値（24mg/dl）あったが，1,000gの未熟児であったためビオプテリン負荷試験をすぐ実施できず，日齢20日目よりフェニルアラニン除去ミルクを開始した．日齢24日目にはフェニルアラニンが著しく減少し（0.08mg/dl），その摂取量を増量した．日齢95日目にビオプテリン負荷試験を施行したが，まったくビオプテリンに反応がなかった．以上の経過が早産低出生体重児やRDSに起因するものなのか，先天代謝異常症なのかを鑑別するため遺伝子検査をすることになった．その結果，IVS4-nt-1/R252W（図1b, e）の複合ヘテ

表1 遺伝子診断した症例一覧

症例	1	2	3	4	5
在胎週数	40週 1日	28週 6日	41週 2日	40週 6日	29週 6日
出生体重	3025g	1052g (双胎)	3438g	3388g	1266g
NBS (1)	Phe 17.1	Phe 24.0	Phe 21.3	Met 1.7	Phe 3.9
NBS (2)	Phe 35.0	Phe 2.4	Phe 38.3	Met 3.5	Cit 5.95 Met 1.5 etc.
臨床診断	フェニルケトン尿症 ピオプテリン 反応性?	フェニルケトン尿症 一過性または 肝未熟性?	フェニルケトン尿症	持続性高 メチオニン血症	シトリン欠損症 (NICCD) 新生児肝炎、 肝未熟性?
疾患遺伝子	PAH	PAH	PAH	MAT1A	SLC25A13
遺伝子変異	R111X/IVS4-nt-1	IVS4-nt-1/R252W	R243Q/R413P	R264H/正常	IVS11+1G>A/ IVS13+1G>A
確定診断	古典型 フェニルケトン尿症	古典型 フェニルケトン尿症	古典型 フェニルケトン尿症	MAT欠損症 (常染色体優性)	シトリン欠損症 (NICCD)

口接合体であり両方の変異とも活性を有しない古典型フェニルケトン尿症と考えられた。R252Wの5'上流にある245番目のバリンの多型(GTA/GTG)は病態に影響しない(図1e)。なお第2子のフェニルアラニン値は正常であった。

症例3 (古典型フェニルケトン尿症) :

41週2日, 3,438g, 正常分娩にて出生し, 黄疸の増強もなかった。家族歴に特記すべきことはない。日齢5日目で実施した新生児マススクリーニングで血中フェニルアラニンが21.3mg/dlと高値であった。再検し38.3mg/dlとさらに上昇しており, ピオプテリン負荷試験にて反応性を認めなかった。フェニルアラニン除去ミルクを開始し40mg/kg/dayのフェニルアラニン摂取量にて治療を開始した。古典型フェニルケトン尿症と臨床診断したが, 家族がさらに遺伝子検査による確定診断を希望した。その結果, R243Q/R413P(図1c,d)の複合ヘテロ接合体と判明し, 酵素活性およびピオプテリン反応性のない古典型フェニルケトン尿症であった。

症例4 (MAT欠損症) :

40週6日, 3,388gで出生した男児。正常分娩。日齢5日目にメチオニンが1.7mg/dl, 日齢16日目3.5mg/dlと上昇した。日齢22日目に精査のため受診し, 3.29-3.72mg/dlと高値が持続した。肝機能は正常で尿中ホモシチンも上昇はなかった。また, 尿有機酸分析, 血中ガラクトース, 乳酸, ピルビン

酸の各値も正常域にあった。家族歴に異常なく, 両親の血中メチオニン値は父が0.63mg/dl, 母が0.22mg/dlであった。ホモシチン尿症をともしない持続性の高メチオニン血症と考え, MAT遺伝子の変異解析を行い, R264Hを一方のアリールに認めた(図2)。常染色体優性遺伝するMAT欠損症と診断された。

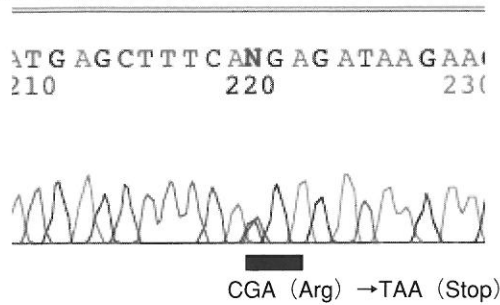
症例5 (シトリン欠損症) :

29週6日, 1,266gで出生した男児。日齢14日目(初回採血)でフェニルアラニンが3.9mg/dlと高値, 再採血でシトルリン5.95mg/dlのほかにスレオニン, アルギニン, チロシンも上昇していた。日齢22日目にはフェニルアラニンは正常域となったが, メチオニンが1.5mg/dl, シトルリン高値(11.1mg/dl)も続いた。当初, 早産低出生体重児であり肝臓の未熟性による病態を考慮したが, 遷延性黄疸, 下腿の浮腫と血液凝固因子の低下も併発し臨床的にもシトリン欠損症(NICCD)が疑われた。SLC25A13遺伝子の変異を調べ, IVS11+1G>A / IVS13+1G>Aの複合ヘテロ接合体(図3)と診断された。経過中にガラクトースも上昇したため乳糖除去ミルクを用い, 凝固因子低下に対し新鮮凍結血漿を投与して軽快した。

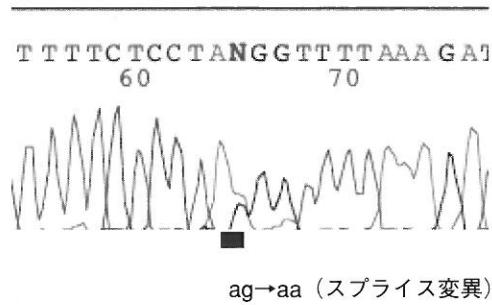
考 察

新生児スクリーニングが開始され30年を経過し,

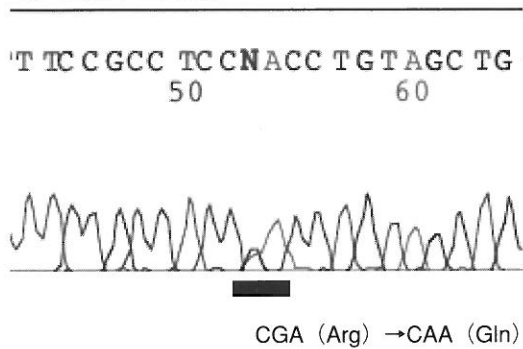
a) Exon 3 R111X



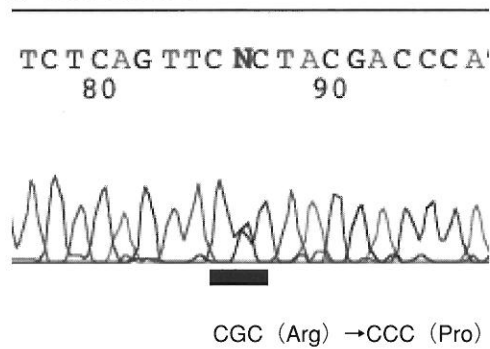
b) Intron 4 IVS4-nt-1



c) Exon 7 R243Q



d) Exon 12 R413P



e) Exon 7 R252W

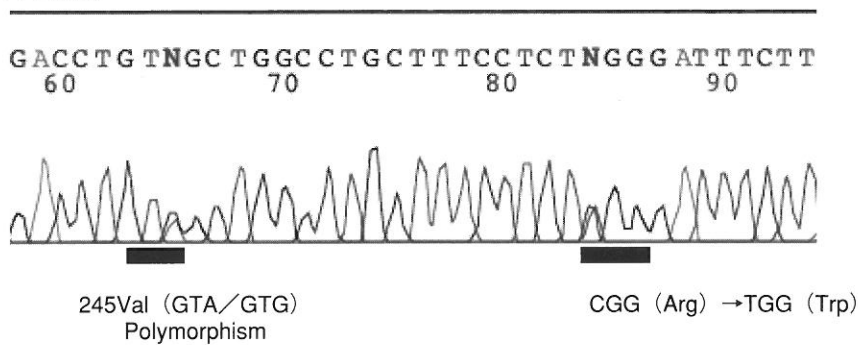


図1 フェニルケトン尿症の遺伝子変異

a) R111X, b) IVS4-nt-1, c) R243Q, d) R413P, e) R252W

exon 7 R264H

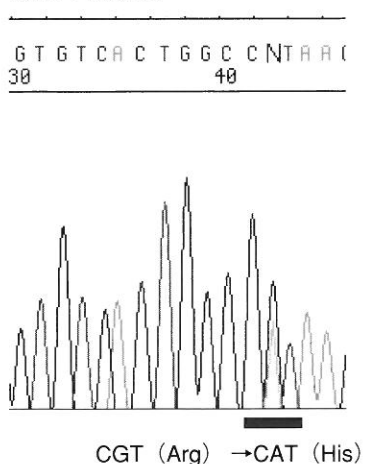


図2 MAT欠損症の遺伝子変異

検査体制と技術の進歩によりアミノ酸代謝異常3疾患（フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症）は年間25例ほど発見されている。今後、タンデムマス法が全国的に導入されると、有機酸・脂肪酸代謝異常も含めて120-150例に増加すると予想される⁵⁾。マススクリーニングで重要なことはただ発見するだけでなく、的確な診断と治療に結びつけることである。事業の主体が地方自治体であるため、陽性例の診断支援と確定診断体制を地域ごとに整備する必要がある(図4)。今回、年間45,000人のスクリーニング対象を有する北海道と札幌での過去5年の経験から、確定診断における遺伝子検査の有用性が明らかになり、MAT欠損症やシトリン

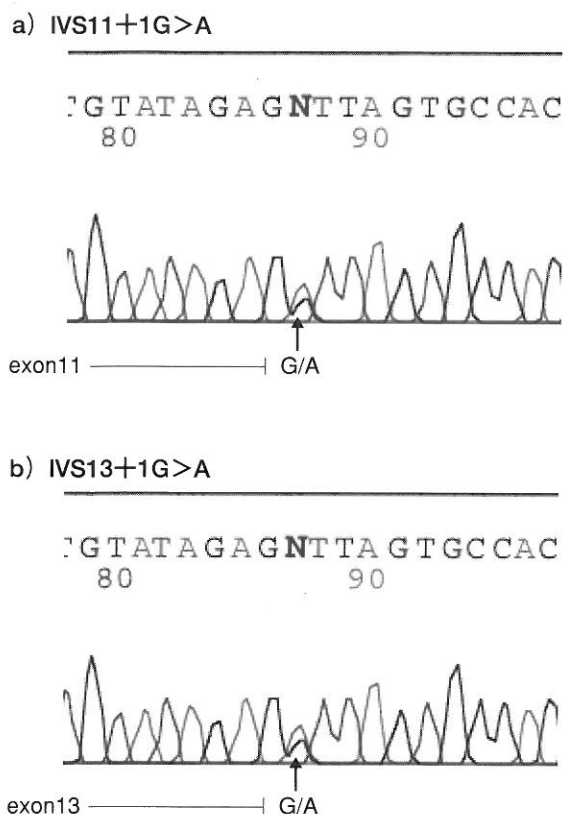


図3 シトリン欠損症 (NICCD) の遺伝子変異
a) IVS11+1G>A, b) IVS13+1G>A

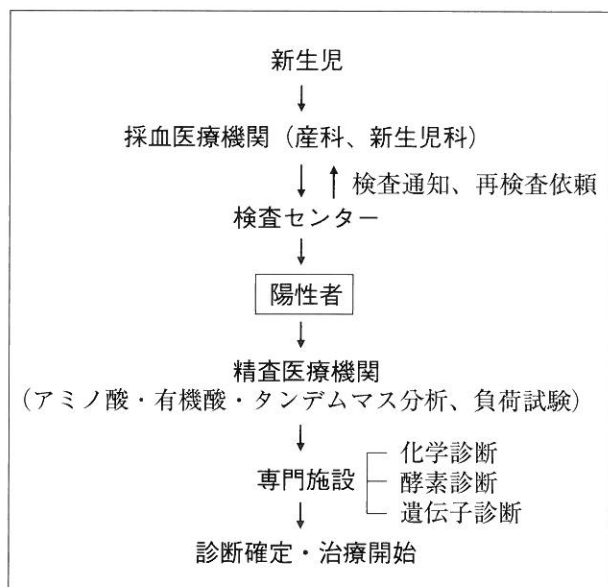


図4 マスクリーニング陽性例の確定診断システム

欠損症 (NICCD) のようなマススクリーニング対象疾患以外も早期診断治療が可能となった。

マススクリーニングでは発見される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の先天的欠損症と補酵素テトラヒドロbiopterinの遺伝

的合成障害 (悪性高フェニルアラニン血症) に大きく分けられる。前者のフェニルアラニン水酸化酵素欠損症には、治療を要しない病型 (良性高フェニルアラニン血症) や、テトラヒドロbiopterin負荷により血中フェニルアラニン値が低下するbiopterin反応性のタイプが含まれる。biopterin代謝異常による高フェニルアラニン血症は1-2%と頻度は低いが治療方法がフェニルケトン尿症とは異なることから鑑別を要する。

このようにスクリーニング陽性の高フェニルアラニン血症を取り上げていくつかの病型があり治療方針も異なる。このような臨床的なサブタイプとPAH遺伝子変異との関連が明らかになってきた⁶⁾。biopterin反応性のある変異が対立遺伝子の一方にあると、血中Phe濃度による重症度が低くなる。たとえばR241C変異を日本人のbiopterin反応性高フェニルアラニン血症のうち半数以上に認め、biopterinによる治療のみ血中Phe濃度をコントロールできることが多い⁷⁾。

古典型フェニルケトン尿症とbiopterin反応性高フェニルアラニン血症との鑑別にはbiopterin負荷試験が必要である⁸⁾。負荷試験は1回法、4回法、1週間法があり、徐々に負荷量を増やし反応性を確認する。症例1では1回負荷試験で約20%血中濃度が減少する反応性がみられたが、4回法では反応性が認められなかった。このように1回の負荷試験では診断を確定できない場合もある。本稿の3例とも最終的に古典型フェニルケトン尿症であったが、遺伝子変異の決定によりbiopterin不応性を確認できた。

今後、フェニルケトン尿症の遺伝子診断を行う利点として、1) 負荷試験を必要最小限にすることができる、2) biopterin反応性の確認により早期にbiopterinの投与と食事の緩和が可能となる、3) 予想される重症度に基づく治療方針 (フェニルアラニン制限の度合い) の決定、などがある。現状では遺伝子診断をどこでも実施できる状況ではない。今後新生児マススクリーニングと並行したPAHの遺伝子検索を進められる検査体制の整備が望まれる。

マススクリーニングにおける血中メチオニンの上昇に加え、尿中のホモシスチン、血中のホモシステインの増加をともなうとホモシスチン尿症が疑われる。しかし高メチオニン血症の原因はさまざまであり、肝機能検査も含め広く鑑別診断を行う必要があ

る。この中で MAT 欠損症は頻度が高く、1 次および 2 次スクリーニングでは血中メチオニン濃度の単独上昇のみで、ホモシスチン尿症等の含硫アミノ酸の異常はない。

症例 4 のような R264H 変異による MAT 欠損症は臨床的に良好な経過をとり、成人期には血中メチオニン濃度が正常上限から 2 - 3 mg/dl 程度に低下する⁹⁾。この変異は dominant negative effect により常染色体優性遺伝するが、アミノ酸分析により、両親のいずれか、あるいは同胞に高メチオニン血症を認めるので家族歴の聴取が大切である。一方、常染色体劣性遺伝する複合ヘテロ接合体では、メチオニン値が高く経過中にホモシスチンの軽度上昇のためホモシスチン尿症として治療されていることもある。また乳児期に体重増加不良やアンモニアの軽度上昇を示すことがあるので、アミノ酸分析などで後述するシトリン欠損症 (NICCD) を鑑別する必要がある。したがって高メチオニン血症のスクリーニング陽性者では、R264H 変異を含めた MAT 欠損症の遺伝子診断が重要である。

シトリン欠損症による新生児期の病態は新生児肝内胆汁うっ滞 (NICCD) と呼ばれ、遷延性黄疸、脂肪肝、シトルリン・メチオニン・フェニルアラニンなどの各種アミノ酸の上昇、あるいはガラクトースの上昇をとまう¹⁰⁾。したがって生後 5 日目のろ紙血で発見され、フェニルケトン尿症やガラクトース血症の疑いで精査されていることが多い。しかし NICCD 症例の多彩な症状や検査所見は一過性であり出現時期や程度もさまざまのため、シトリン欠損症を考慮していなければ診断困難なことが多い。これまでのところ約 40% はマススクリーニングでガラクトース、メチオニン、フェニルアラニンの単独あるいは複数陽性を示している。しかし生後 5 日目のろ紙採血の解析では、すでにシトルリンは上昇しているが、ガラクトース、胆汁酸、他のアミノ酸の上昇は一様でなく現行の検査項目のみでスクリーニングすることは難しい。したがってシトルリンを検査項目に加えることで早期発見率を上昇させる可能性がある。この意味でタンデムマス法によるアミノ酸スクリーニングにはシトルリンが含まれており、今後これを指標にしたシトリン欠損症の発見例も増加するであろう。本症は胆汁うっ滞による白色便のため、生後 1 カ月の先天胆道閉鎖症のマススクリーニングでも発見されており、小児外科治療の適応となる病態との鑑別を要する。NICCD は 1 歳ころまで

に症状が消失し、見かけ上健康な時期 (適応・代償期) に入るが、成人期に 2 型シトルリン血症として再発する可能性が示唆されている¹⁰⁾。以上のような症例に積極的に遺伝子診断を導入することが、発症予防と予後改善のため必要である。

先天代謝異常症では欠損酵素の活性やタンパク量の測定を確定診断に用いることが多かった。しかし研究室レベルの設備を必要とすることが多く、臨床検体の解析に汎用されるには至っていない。また血球細胞での測定が難しい場合、肝生検や皮膚繊維芽細胞の採取培養を必要とし患者への侵襲性も大きい。一方、マススクリーニング対象疾患では遺伝子レベルでの解析が進み、白血球より抽出したゲノム DNA を用いた PCR とシーケンスにより診断できることが多い。MAT 欠損症のように高頻度変異があれば、PCR-RFLP 法などを用いてきわめて短時間での診断も可能である。

今回報告した疾患はこれまで確立された方法で早い時期に遺伝子変異が決定され、臨床経過や病態の変化による修飾があっても基本的な治療方針を立てることができた。また、MAT 欠損症やシトリン欠損症 (NICCD) のように対象疾患ではないが現在の検査項目の陽性例から拾い上げることができ、早期治療と経過観察が可能である。とくに日本におけるシトリン欠損症の変異ホモ接合体の頻度は 1 / 17,000 と高く、タンデムマスなど精度の高い技術を利用してスクリーニングし遺伝子検査により確定診断するモデル的な疾患である。

しかし遺伝子検査の多くは健康保険適用外であるため、試薬や機器を購入する費用は研究費に依存し、マンパワーは研究者の献身的な努力に依存する所が大きい。また一部の検査会社は有料にて遺伝子検査を受託しており、費用の負担を家族に求めなければいけないこともある。このような状況の中でより効率的な運営の求められる国立病院機構での検査実施は容易ではない。以上述べたようなシステムを実現し機能させるためには、遺伝子検査を専門とする国立病院機構に特殊診療機能として付与し、自治体と連携し広域な地域に貢献することが期待される。

[文献]

- 1) 山口清次. 新生児マススクリーニング実施の要点. 周産期医 2005; 35: 1209-12.
- 2) Sueoka H, Nagao M, Chiba S. Rapid mutation screening of phenylketonuria by polymerase-

- linked enzyme assay and direct sequence of the phenylalanine hydroxylase gene: clinical application in northern Japan and northern China. *Genetic Testing* 2000; 4: 249-56.
- 3) 長尾雅悦. 医療に貢献している分子生物学の進歩
その4 持続性高メチオニン血症の遺伝子診断—PCR-SSCP法による変異の検出—. *日マス・スクリーニング会誌* 1999; 9: 65-70.
- 4) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M et al. The gene mutated in adult-onset type II citrullinemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* 1999; 22: 159-63.
- 5) 山口清次. わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究. 平成17年度厚生労働省科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業) 総括研究報告書 2005; p 5-13.
- 6) Okano Y, Asada M, Kang Y et al. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. *Hum Genet* 1998; 103: 613-8.
- 7) Kure S, Hou DC, Ohura T et al. Tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135: 375-8.
- 8) 松原洋一, 呉 繁夫, 大浦敏博ほか. 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* 2002; 38: 44-59.
- 9) 長尾雅悦. 遺伝性高メチオニン血症 (MAT欠損症) の現況. *小児内科* 2004; 36: 1887-91
- 10) 小林圭子, 飯島幹雄, 牛飼美晴ほか. シトリン欠損症. *日小児会誌* 2006; 110: 1047-59.

Genetic Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism : Application for Early Diagnosis of Newborn Mass-screening Positive Patients

Masayoshi Nagao

Abstract The newborn mass-screening program has been quite effective for the prevention of mental retardation and developmental disorders. It is still necessary to diagnose positive cases rapidly, since disease types and their frequencies are increasing. We therefore used genetic testing for definite diagnosis of inborn errors of metabolism (phenylketonuria, homocystinuria, maple syrup urine disease, galactosemia) detected by newborn screening. The number of newborns who received mass-screening was about 4,500/year (from 2004 to 2008) in Hokkaido and Sapporo, and 37 cases were referred for further analysis because of abnormal results. DNA analysis revealed three cases of classical phenylketonuria, a case of methionine adenosyltransferase (MAT) deficiency, and a case of citrin deficiency (NICCD). Other cases were finally confirmed to be normal, suggesting a transient or secondary increase of metabolites. We expect development of genetic diagnostic laboratories in National Health Organization for early diagnosis and treatment of positive patients.