

## ろ紙血によるシトルリン欠損症遺伝子診断

野町 祥介 田上 泰子 中澤 恵実理 水嶋 好清 尾崎 恒一 藤田 晃三

窪田 満<sup>\*1</sup> 長尾 雅悦<sup>\*2</sup> 山口 昭弘<sup>\*3</sup>

### 要 旨

成人発症型シトルリン血症(シトルリン欠損症)は、新生児マス・スクリーニング検査でガラクトース血症、血中メチオニン、フェニルアラニンなどの高値を契機に発見されることが多いが、スクリーニングで異常が判明した時点で他の疾患と区別することは困難である。本症例の中には乳幼児期から肝不全を来たす例があり、シトルリン欠損症を念頭に置いたろ紙血によるスクリーニングは重要性を増すものと考えられる。今回、ろ紙血検体を用いて同病責任遺伝子 SLC25A13 の主要な病変変異を検索する方法について検討した。主に PCR-restriction fragment-length polymorphism 法を用い、本症の 90% 以上を占める 7 変異遺伝子を簡便に検出する方法を開発した。

### 1. 緒 言

通常、シトルリン血症はアルギノコハク酸合成酵素の欠損による常染色体劣性遺伝の先天性代謝異常症である。しかし、近年になって臨床的に新生児肝炎とされてきた症例のうち新生児時に胆汁鬱滞(neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency, NICCD)や肝脂肪変性を伴う例が、主に 20~50 歳で失明当識、意識障害、手のふるえなどにより発症する成人型シトルリン血症型(以下、シトルリン欠損症)と共通の責任遺伝子 SLC25A13 (シトルリン, citrin)の異常により発症することが明らかにされた<sup>1,2)</sup>。この遺伝子は第 7 染色体長腕部 21.3 に座位し、その蛋白産物はミトコンドリア膜に局在するアスパラギン酸・グルタミン酸キャリアーであると考えられている<sup>3)</sup>。本疾患は新生児期にシトルリン、フェニルアラニン、スレオニン、チロシン、メチオニンなど多種の血中アミノ酸高値やガラクトース血症を示すため、新生児マス・スクリーニング検査陽性例として見出されることが多い。

NICCD 症状は一過性のものが多いが、重症例では肝障害に伴うビタミン K 欠乏による頭蓋内出血や重度の肝硬変を示すものがあり、本疾患の早期診断は重要である。また、新生児時に診断することにより、その後の経過観察を可能とし、発症防止や治療法確立に結びつくものと考えられる<sup>4,5)</sup>。

今回、Yasuda らの肝細胞剖検検体を試料とした変異同定法(以下、Yasuda らの方法)<sup>6)</sup>を基に、シトルリン欠損症の主要な 7 つの病変変異をろ紙血検体を用いて検索する簡便な方法を検討した。

### 2. 対象と方法

#### 2-1 対 象

札幌市で実施しているハイリスク・スクリーニングで、海外から依頼された高シトルリン血症例および、国内の医療機関で遺伝子検査のインフォームド・コンセントが得られ、遺伝子型の確定している成人発症型シトルリン血症例を対象とした。

1 北海道大学医学部小児科

2 国立療養所西札幌病院小児科

3 (財)日本食品分析センター 千歳研究所 生物科学

表1 PCR に用いたプライマーの塩基配列

変異	プライマー (タイプ)	増幅塩基数 (bp) * <sup>3</sup>	塩基配列
851del4	Ex9F (forward) * <sup>2</sup>	101 (97)	5'- TGT TGC TTG TGT TTG TTT TTC C -3'
	Ex9R-2 (reverse)		5'- TCAGCCAAGTTAAAGGGCAGA -3'
IVS11+1G>A	Ex11F-2 (forward)	184	5'- TTG GAG CCA CTG CTG TGT AT -3'
	Ex11R (reverse) * <sup>2</sup>		5'- TAA CAG GTA TTG AGC ATG TGG C -3'
1638ins23	IVS15F2 (forward) *	146 (169)	5'- TGT TGT GTC TCT CCT GCA GG -3'
	Ex16B (reverse) *		5'-GCA GTC TAT CAC TCC GCT GT-3'
S225X	IVS6F (forward) *	426	5'- GGA GAG TAC AAG TTC TGG TC -3'
	IVS7B (reverse) *		5'- ACT AGT TGC CTT CTT CAC CC -3'
IVS13+1G>A	Ex13F-2 (forward)	141	5'- CAC AAA GAT GGT TCG GTC CCA -3'
	Ex13R-2 (reverse)		5'- CAG AAG CCT TAG TCC ACA CCT -3'
1800insA R605X	IVS16F (forward) *	307 (308)	5'-CTA ATT ATA TCT GTG ATT TCT CCA-3'
	IVS17B (reverse) *		5'-GGA GTT GAT ACA TTC TCA TCA G-3'

\* 6種のプライマーは Yasuda らの報告<sup>6)</sup>に従った。

\*<sup>2</sup> 2種のプライマーは Sinasac らの報告<sup>2)</sup>に従った。

\*<sup>3</sup> 増幅塩基数においてカッコ内に示したものは変異が存在する場合の増幅数である。

表2 判定方法

変異	検出方法	制限酵素	検出バンド塩基数 (bp)			検出頻度*
			( - )	( + )	( - / + )	
851del4	PCR-RFLP	HpyCH4IV	71,30	97	97,71,30	38.3%
IVS11+1G>A	PCR-RFLP	MnlI	146,38	184	184,146,38	41.3%
1638ins23	PCR	-	146	169	146,169	1.9%
S225X	PCR-RFLP	AluI	369,57	214,155,57	369,214,155,57	5.8%
IVS13+1G>A	PCR-RFLP	HpyCH4V	116,25	91,25	116,91,25	5.3%
1800insA	直接塩基配	-	-	-	-	1.5%
R605X	列解析法	-	-	-	-	0.5%

注1 \*検出頻度は Yasuda らの報告による<sup>6)</sup>。

注2 50bp 以下のバンドは本法では確認は難しい。

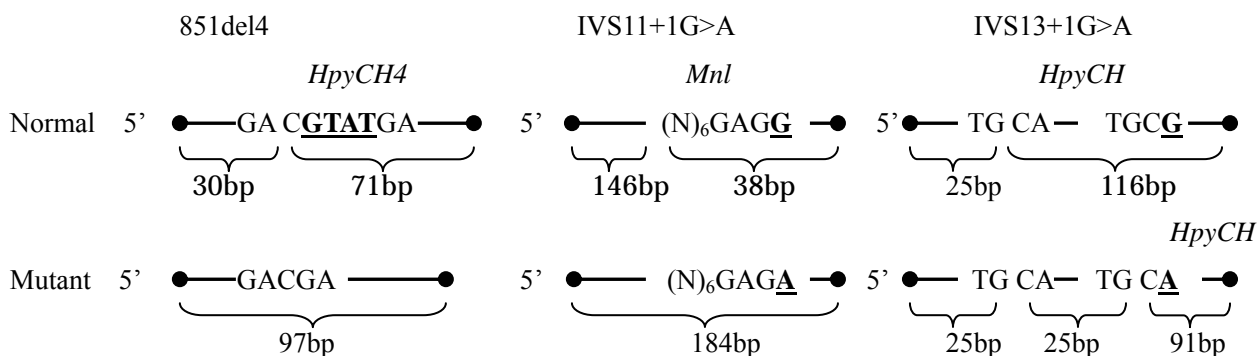


図1 新しい RFLP 法を検討した 3 つの変異と各制限酵素による切断部位

## 2-2 ろ紙血からの DNA 抽出

1/8 インチディスク 1 枚を有機溶媒による Hb 固定の後 95 °C で 20 分間のボイル処理を行い、遠沈により得られた上清をエクソン増幅用の DNA 試料とした<sup>7)</sup>。

## 2-3 PCR 反応

表 1 に示すプライマー・ペア(ファスマック)を用いて、TaqDNA ポリメラーゼ (Amersham Pharmascis NJ, USA)による PCR 反応(94 °C 30sec - 60 °C 30sec - 72 °C 30sec を 35 サイクル)により Gene Amp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Corp, CT, USA)で増幅した。PCR 反応溶液は、以下のような比率で調整した。蒸留水(大塚製薬) 11.4 $\mu$ l, 10 $\times$ Reaction Buffer 2 $\mu$ l, 2mMdNTP (タカラ) 2 $\mu$ l, 100pmol/ $\mu$ l プライマー各 0.2 $\mu$ l, Taq+Antibody(東洋紡)0.2 $\mu$ l, 抽出 DNA 溶液 4 $\mu$ l(全量 20 $\mu$ l)。

## 2-4 各変異の同定法

以下に述べる方法で各変異の有無を判定した。その判定方法の詳細は表 2, 図 1 に示す。

(1) PCR-RFLP (restriction fragment-length polymorphism)法

任意の変異部位を含む領域を PCR 増幅した後に制限酵素反応を行い、アガロースミニ・ゲル(NuSieve 3:1 agarose, Bio Whittaker Molecular Applicatiuons, ME, USA)で 35min100V の電気泳動によりバンドの切断の可否で変異の有無を検出した。

S225X 変異の検索は、Yasuda らの方法をろ紙血に応用することで検査可能であった。

851del4 と IVS11+1G>A の変異については、変異が存在しない場合、それぞれ、制限酵素 HpyCH4IV (BioLabs, NE, USA)の切断認識部位(5' A $\nabla$ CGT)と制限酵素 Mnl I (BioLabs, NE, USA)の切断認識部位(5' CCTC(N)<sub>7</sub> $\nabla$ )が存在することにより同定した。

IVS13+1G>A の変異については、変異が存在する場合制限酵素 HpyCH4V (BioLabs, NE, USA) の切断認識部位(5' TG $\nabla$ CA)が 2 箇所(ない場合、1 箇所)存在することにより同定した。なお、これらの酵素反応は添付の説明書に従い 37 °C 60min で行った。

## (2) PCR 法

1638ins23 変異は増幅するとバンド長に 23 塩基の差ができることで Yasuda らの方法通り同定した。

## (3) 直接塩基配列解析法

1800insA と R605X の変異については両変異が gDNA 上で 15bp の近傍に存在するため、直接塩基配列法により同時に解析した。すなわち、得られた PCR 産物を精製したのち、これを鋳型 DNA として 5' 蛍光標識(テキサスレッド)プライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行い、尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により蛍光標識されたヌクレオチド断片をレーザー照射することで、塩基配列を解析した<sup>7)</sup>。

## 3. 結果

851del4, IVS11+1G>A, 1638ins23, IVS13+1G>A 各変異の RFLP 法および PCR 法における解析結果をそれぞれ図 2~5 に示す。

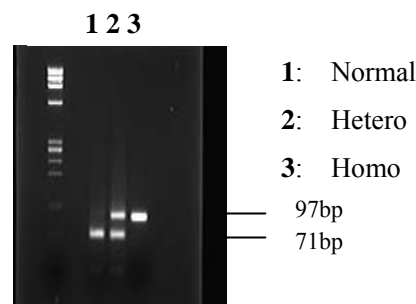


図 2 電気泳動による 851del4 の同定

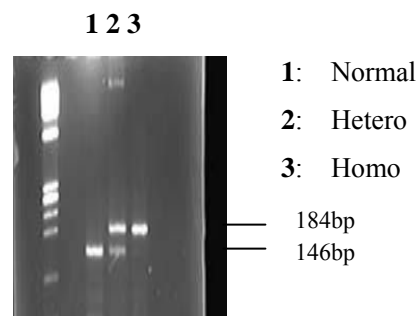


図 3 電気泳動による IVS11+1G>A の同定

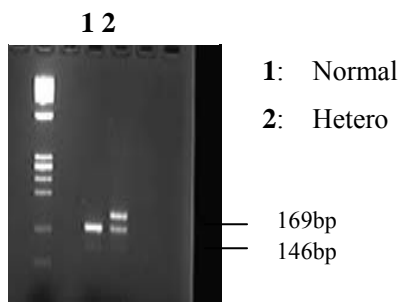


図4 電気泳動による 1638ins23 の同定

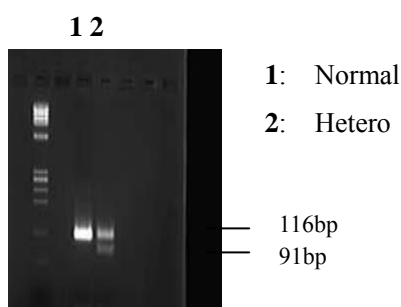


図5 電気泳動による IVS13+1G>A の同定

今回新たな方法で検討した 851del4, IVS11+1G>A, IVS13+1G>A の3つの変異についてはいずれも感度よく同定が可能であった。

直接塩基配列法による 1800insA および R605X 変異検索については、当該変異を持った検体が入手できなかった。しかし、他の検体を用いて検討した結果、該当する gDNA は PCR 法により容易に増幅が可能であり、塩基配列解析も精度の高い結果が得られた。

#### 4. 考 察

従来から新生児マス・スクリーニングで見出される血中多種アミノ酸高値やガラクトース血症を示す新生児肝炎症例の存在が指摘されてきたが、疾患概念は 1999 年 Kobayashi らによって責任遺伝子 SCL25A13 が同定されることで確立され、その遺伝子産物はシトリン (citrin) と命名された<sup>1)</sup>。これまで、シトリン欠損症は成人期に意識障害や異常行動

などにより突然発症するシトリン欠損症として認識されてきたが、責任遺伝子の発見を契機に新生児・小児期の病態が解明され、経過観察が行われている。一方で、新生児マス・スクリーニング検査で陽性例となりうる本疾患は、他の代謝異常症や肝炎、サイトメガロウィルス感染の可能性を考慮しつつ血中ガラクトース値や胆汁酸値をみながら経過観察を行う必要があり、早期診断に限界がある。

シトリン欠損症における NICCD は一過性のことが多いが、中には頭蓋内出血を伴う例や重度の肝硬変により肝移植が必要な例も報告されており<sup>8)</sup>、早期診断により本症例の経過観察を行うことは重要である。また、報告されている保因者率(1/70)から計算される頻度 (1/20,000) と、実際の発症率 (1/100,000) との間に大きな乖離があることから<sup>6)</sup>、シトリン欠損症による代謝不全に加えて、成人発症例における別の発症因子の存在が予測されている。このこともふまえ、今後本症の予後改善のために早期からの経過観察は重要である。

そのため、新生児マス・スクリーニングで用いられている紙血を用いた確定診断法の確立は重要と考え、私たちは Yasuda らの報告<sup>6)</sup>に基づいて、紙血検体を試料とした狭雑物質の多い粗 DNA 溶液でも可能な、簡便で感度の高い確定診断法を検討した。

S225X は当該変異を持っている検体が入手できなかったため検討できなかったが、変異部位を含むヌクレオチド増幅が可能であり、Yasuda らの方法で紙血を試料としても変異の同定が可能である。

851del4 は、Yasuda らの方法では判定の根拠となる塩基長の違いが 4bp であり分別が難しかったが本法では 26bp の違いにより十分な分離が得られた (図2)。

IVS11+1G>A と IVS13+1G>A は、Yasuda らの方法ではミスマッチ・プライマーにより変異点に隣接もしくは 2bp 以内の近傍に存在する塩基を別塩基に置換することにより酵素認識部位を導入する方法で同定していたが、正常と変異した allele の間に

増幅効率に差があった。本法で用いたプライマーは変異点から少なくとも 30bp 離れたヌクレオチドを認識し, 加えてミスマッチを用いないことで変異の有無により増幅能に差が生じることを避け, 3紙血由来の DNA 溶液を用いても効率的に遺伝子型を判断できた(図 3,5)。

シトリン欠損症の病変変異はすべて見出されているわけではないが, 今回の簡便な遺伝子診断法によりアレル比で全病変異の 92%を占める 851del4, IVS11+1G>A, 1638ins23, S225X, IVS13+1G>A の 5 つの主要な病変変異<sup>6)</sup>の検索が可能であり, 今回検討した 7 つの病変変異の検索によって 90%以上の症例の確定診断が可能である。

しかし, 現行の新生児マス・スクリーニング・システムでは, 受検希望の段階で保護者による遺伝子検査に対するインフォームド・コンセントが得られていないため, たとえ二次検査などの名目であっても本検査は実施できない。そのため, 精査医療機関において改めてインフォームド・コンセントを得た上で, シトリン欠損症疑例のハイリスク・スクリーニング検査として実施しているのが現状である<sup>9,10)</sup>。今後, マス・スクリーニング検査においてこれらの遺伝子検査をも考慮した申し込み方式が検討される必要がある。

## 5. 結 語

3紙血検体を試料として, 主に PCR-RFLP 法による簡便なシトリン欠損症確定診断法に検討を加え, 有用な方法が確立された。

## 6. 文 献

- 1) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M et al: The gene mutated in adult-onset type citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nature Genet* 22, 159-163, 1999
- 2) Sinasac DS, Crackower MA, Lee JR et al: Genomic Structure of the Adult-Onset Type Citrullinemia Gene, SLC25A13, and Cloning and

Expression of Its Mouse Homologue. *Genomics* 62, 289-292, 1999

- 3) 小林 圭子, 佐伯 武頼: Citrin 欠損症 ~ SLC25A13 遺伝子変異がもたらす疾患とその病体. *日本マス・スクリーニング学会誌* 11, 17-22, 2001.
- 4) Ohura T, Kobayashi K, Tazawa, Y et al: Neonatal presentation of adult-onset type citrullinemia. *Hum Genet* 108, 87-90, 2001
- 5) 大浦 敏博, 虻川 大樹, 相川純一郎, 他: Citrin 欠損症 ~ 新生児マス・スクリーニングを契機に発見された Citrin 欠損による新生児肝内うっ滞症: 9 症例の臨床像の検討. *日本マス・スクリーニング学会誌* 11, 23-27, 2001.
- 6) Yasuda T, Yamaguchi N, Kobayashi K et al: Identification of two novel mutations in SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type citrullinemia. *Hum Genet* 107, 537-545, 2000.
- 7) 野町 祥介, 田上 泰子, 水嶋 好清, 他: ウィルソン病確定診断法としての責任遺伝子 ATP7B の直接塩基配列解析法. : *日本マス・スクリーニング学会誌*, 11, 41-46, 2001.
- 8) Tamanoi A, Okano Y, Ozaki H, et al: Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: severe hepatic dysfunction in an infant requiring liver transplantation. *Eur J Pediatr* 161, 609-613, 2002.
- 9) 田上 泰子, 花井 潤師, 野町 祥介, 他: 札幌市における先天性代謝異常症ハイリスク・スクリーニング結果(1996 ~ 1999 年度). *札幌市衛生研究所年報* 27, 32-37, 2000.
- 10) 田上 泰子, 花井 潤師, 野町 祥介, 他: 札幌市における先天性代謝異常症ハイリスク・スクリーニング (第 2 報). -JICA 関連諸国からの検体の検査状況-. *札幌市衛生研究所年報* 28, 45-52, 2001.

# Genetic Diagnostic Scheme for Adult-Onset Type 2 Citrullinemia Using Dried Blood Samples

Shosuke Nomachi, Yasuko Tagami, Emiri Nakazawa, Yoshikiyo Midzushima,  
Tsuneichi Ozaki, Kozo Fujita,  
Mitsuru Kubota\*<sup>1</sup>, Masyoshi Nagao\*<sup>2</sup> and Akihiro Yamaguchi\*<sup>3</sup>

Newborn infants with adult-onset type 2 citrullinemia often show galactosemia and hyperaminoacidemia as hypermethioninemia and hyperphenylalaninemia in neonatal screening. It is difficult to diagnose these patients, since neonates with other inborn error of metabolism or hepatitis show the similar screening results. The early diagnosis of adult-onset type 2 citrullinemia is important since some patients have liver dysfunction as vitamin K deficiency and cirrhosis in young childhood. Therefore, we tried to develop a simple and convenient genetic diagnostic scheme, consisted mainly with PCR-restriction fragment-length polymorphism, using dried blood samples. By our method, it is possible to identify more than 90 percentage of patients with mutations in the responsible gene of adult-onset type 2 citrullinemia, SLC25A13.

---

1 Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine  
2 Department of Pediatrics, National Nishi Sapporo Hospital  
3 Chitose Institute of Japan Food Research Laboratories