

21-ハイドロキシラーゼ欠損症 (塩喪失型)

1 家系における出生前診断の試み

国立奈良病院小児科

三上 貞昭, 森井 直之,

根津 智子, 山下千賀子, 新家 直子

国立奈良病院産婦人科

寺本 好弘

奈良県立医科大学小児科学教室

西村 拓也, 中 宏之

PRENATAL DIAGNOSIS IN A FAMILY WITH 21-HYDROXYLASE
DEFICIENCY (SALT-WASTING TYPE)SADAAKI MIKAMI, NAOYUKI MORII,
SATOKO NEZU, CHIKAKO YAMASHITA and NAOKO NIINOMI*Pediatric Clinic, National Nara Hospital*

YOSHIHIRO TERAMOTO

Obstetrical and Gynecological Clinic, National Nara Hospital

TAKUYA NISHIMURA and HIROYUKI NAKA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received March 29, 1991

Summary: A prenatal diagnosis was performed in a family with salt-wasting type of 21-hydroxylase deficiency (21-OHD). A trial of DNA diagnosis in the family, including a patient, did not reveal informative data when DNAs were restricted with TaqI and hybridized with pC21/3c probe. The level of 17-OHP in the amnion was within a normal range. A girl was born without clinical symptoms. One HLA haplotype which was detected in the patient was inherited from the father. With a view to increasing the number of Japanese families which are proceeded to prenatal DNA diagnosis, it is expected that a beneficial combination with a small number of intragenic RFLPs and/or extragenic RFLPs close to the gene will be established and widely used. Hereafter, prenatal diagnosis in early pregnancy will be important for families with 21-OHD.

Index Terms

21-hydroxylase deficiency, prenatal diagnosis, DNA diagnosis, 17-OHP, HLA haplotype

はじめに

21-ヒドロキシラーゼ欠損症 (21-OHD) は常染色体性劣性遺伝を示し, 先天性副腎過形成の約 90% を占める. 古典型 (Classical type) の臨床像は副腎アンドロゲン過剰による症状を主とする単純男性化型 (SV 型) とアルドステロン分泌不全を伴う塩喪失型 (SW 型) に大別され, 後者では早期に診断, 治療を行わなければ死に至らしめることがある. このため新生児マススクリーニングに本症が追加されることとなった.

本症は妊娠中期ですでに男性化が認められるので, 妊娠中より治療を開始すべきとの報告¹⁾が注目されており, 出生前診断が重要視されてきている. 従来より出生前診断は羊水中のコレステロール中間代謝物質である 17-ヒドロキシprogesterone (17-OHP) の異常高値や HLA ハプロタイプを指標^{2,3)}としていたが, 近年 21-OHD の遺伝子座が明らかにされ⁴⁾, 妊娠早期の出生前診断に遺伝子診断が応用されるようになってきた.

本稿では強い出生前診断の希望のある 21-OHD SW 型 1 家系で行った出生前診断の経過, 成績および問題点を述べる.

1. 家系

血族結婚なし. 第 1 子 (男子, 2 才) はまだ新生児マススクリーニングが行われていない時期に出生しており, 生後 1 カ月時塩喪失クリーゼをきたして入院, 21-OHD SW 型と診断され, 現在加療中である. 第 2 子妊娠前より強い出生前診断の希望があったので, 遺伝子診断の準備をしていたところ第 2 子を妊娠した.

2. 出生前診断の計画

1) 本家系にて遺伝子診断が行えるか. 可能であれば

妊娠 8-10 週で胎盤絨毛を採取し, 遺伝子診断をおこなう. 遺伝子診断の準備中に妊娠したので, 患者を含めた本家系で本法が使用可能かどうかの検査がなされていない. 至急これを間に合わせる.

2) 遺伝子診断が行えない家系であるならば妊娠 4-5 カ月で羊水採取を行い, 17-OHP を測定する.

3) 上記 2 法で出生前診断を行い, 児が出生すれば HLA のハプロタイプを決定する.

3. 遺伝子診断

1) 21-ヒドロキシラーゼ遺伝子 (Fig. 1) 21-ヒドロキシラーゼ (チトクローム P450_{c21}) 遺伝子は第 6 染色体短腕に存在するヒト HLA クラス III 領域に位置し, 2 つの第 4 補体成分 C4A および C4B 遺伝子の 3' 側に隣接してそれぞれ C21A, C21B が存在する. 塩基配列は 98% の相同性を有するが, C21A は機能を持たない偽遺伝子であり, C21B が正常機能を発揮する. C21B は 10 個のエクソンを有し, 約 3.4kb である⁵⁾.

2) 遺伝子解析法

ヒト白血球より DNA を抽出し, 制限酵素 TaqI⁶⁾ で処理し, サザンプロット⁷⁾ 後標識プローブ (pC21/3c) でハイブリダイゼーションを行えば⁸⁾, C21A 由来の 3.2kb フラグメントと C21B 由来の 3.7kb フラグメントが出現する^{4,9)}. 古典型 21-OHD 遺伝子では C21A または C21B の欠失あるいは重複, C21B の C21A への置き換えなどが高頻度 (25-40%) に認められるため⁹⁾⁻¹²⁾ 制限酵素処理後のフラグメントの長さ, 濃さが異なる. 21-OHD 遺伝子でこの異常フラグメントが同定されれば出生前診断への応用が可能となる. TaqI フラグメントの異常があれば他の制限酵素 BglIII でも確認される. なお本法は遺伝子点変異例の解析を行うものではない. プローブは New

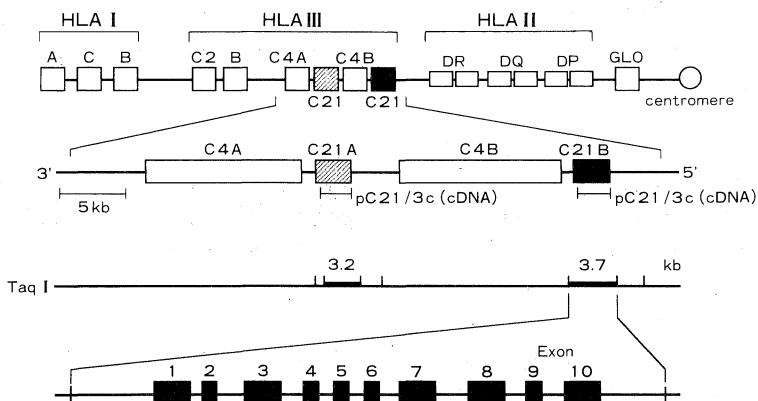


Fig. 1. Steroid 21-hydroxylase (P-450_{c21}) gene.

The gene is located in the chromosome 6p. C21A is a pseudogene.

York Hospital-Cornell Medical CenterのDr P.C. Whiteより譲渡を受けた⁴⁾。なおC 4 関連プローブ (pAT-A, pC4s) は入手できなかった。

3) 家系検索 (Fig. 2)

正常ヒト, 両親, 第1子 (21-OHD) とともに TaqI 処理にて 3.7 および 3.2kb フラグメントが出現し, フラグメント濃淡異常やフラグメント長異常は観察されなかった。本家系においては本法による遺伝子診断は不可能であり, 更に pC21/3c プローブを用いた Restriction fragment length polymorphism (RFLP) を行っても当時の状況では得られる情報は少ないと考えられ¹³⁾, また長期に亘る検索では時間的余裕もないことから, やむを得ず胎盤絨毛の採取は見送り, 次の羊水診断を待った。

4. 羊水診断

妊娠4カ月に羊水を採取し, 17-OHP を測定した。17-OHP 値 3.4ng/ml (テストステロン値 47ng/dl) と羊水の正常範囲にあるので, 無治療で妊娠を継続し平成元年8月5日, 39週, 3554g で自然頭位分娩となった。女児であった。

5. 第2子の検索

1) 臨床像および17-OHP値

男性化, 色素沈着も認められず臍帯血 17-OHP 30ng/ml, 2カ月時 1.4ng/ml, 1才3カ月時 1.5ng/ml と正常であり, 現在1才8カ月になるが発育も正常である。新生児マススクリーニングでの異常も指摘されていない。

2) HLA タイピング

両親, 第1子 (21-OHD) を含めての HLA ハプロタイプは Fig. 3 のごとくである。第2子は第1子と同じハプロタイプを父親より, 第1子と異なるハプロタイプを母親より受け継いでいるので保因者と考えられた。組み換えは認められなかった。なお第1子のハプロタイプは欧米人にて 21-OHD SW 型と相関があるとされる HLA-Bw60, Bw47¹⁴⁾ は同定されなかった。

考 察

21-ヒドロキシラーゼ (P-450_{c21}) の生化学的検討の進歩や遺伝子解析が取り入れられるようになって以来, 古典型を含めた 21-OHD の病態が急速に解明されつつある。放置すれば致死的である SW 型や早期診断, 早期治療を要する SV 型のために新生児マススクリーニングを行うようになってきているが, 出生前診断とくに遺伝子診断が重要視されてきている。その1つは本症は妊娠早期より治療を開始すべきとの考えが注目されていること¹⁾, 第2点は 22週以降を早産児とする時代では早期診断が必要であることによる。

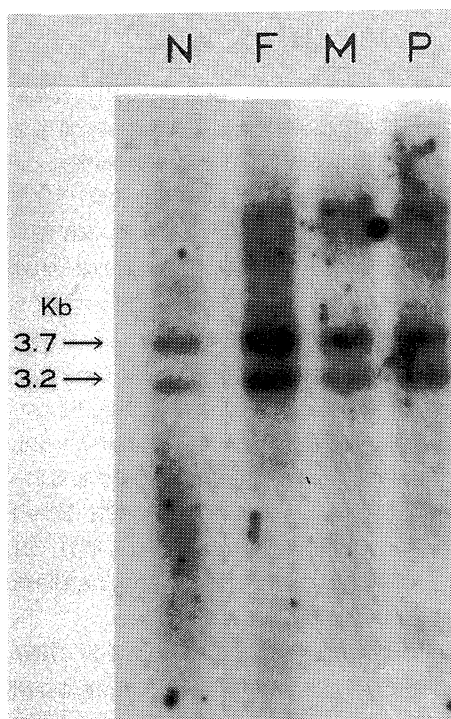


Fig. 2. Southern blot analysis after restriction with TaqI and hybridization with pC21/3c probe. N; normal, F; father, M; mother, P; patient.

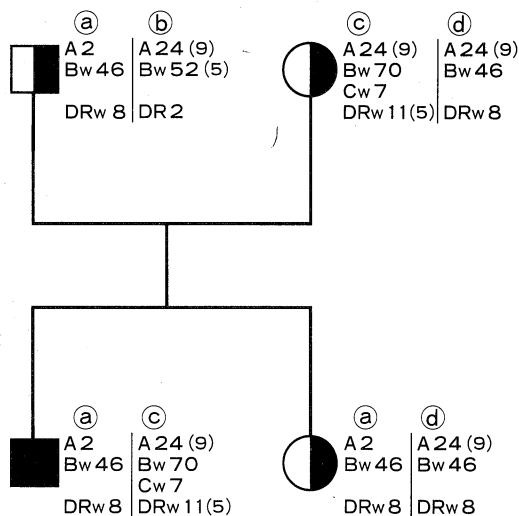


Fig. 3. HLA haplotypes in the family.

遺伝子解析の臨床応用の1つは Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) を用いての家系検索 (出生前診断, 保因者診断) である。本法は本来はある種の制限酵素切断部位での多型性を検索し, それによって

生ずるフラグメントの長さの違いをサザンプロット上で表わし、家系内で疾患を有する遺伝子がどのように受け継がれているかを観察する連鎖分析である。本症遺伝子内部では制限酵素多型部位の報告は少ないが、C21A(偽遺伝子)またはC21Bの欠失、重複あるいは置き換えなどの制限酵素切断フラグメントの長さに大きな変化を与える異常が高頻度(25-40%)で出現することが明らかにされているので⁹⁾⁻¹²⁾、これをもとに出生前診断あるいは保因者診断が行われている。出生前診断は妊娠8-10週の胎盤絨毛採取より抽出したDNAで行えるので妊娠早期での診断が可能となる。

今回の21-OHD SW型1家系での制限酵素切断フラグメントの長さ、濃さには患者、両親ともに異常が認められず、出生前診断への応用はできなかった。本家系のごとく本症の60-70%の家系では上記の検索法のみでは出生前診断は不可能であるので、遺伝子内または近傍(遺伝子外)での制限酵素多型部位検索するRFLPs分析の追加が必要である。本症例診断当時C4関連プローブによるC4領域が遺伝子外RFLPsとして観察されていたが¹⁵⁾⁻¹⁷⁾、pC21/3cプローブによるRFLPsは少なく遺伝子外HindIII部位が遺伝子外RFLPとして報告されていたが、日本人ではヘテロを示す割合が少ないことが明らかにされていた¹⁹⁾。当時既に著者らが検討している血友病A日本人家系は数多くの遺伝子内RFLPsのうち、2種の遺伝子内RFLPsを観察することにより70%以上の家系で診断可能になっていた¹⁹⁾ので的確な遺伝子内RFLPsの発見が待たれた。伴性劣性遺伝である血友病と異なり、常染色体劣性遺伝である21-OHDの分析では更に多くの情報が必要である。近年21-OHDにおいても日本人集団でのpC21/3cプローブを用いてのEcoRI RFLPが0.43/0.57の頻度で出現することが報告されている¹⁹⁾。多型フラグメント長からみてC4B遺伝子の多型性を観察していると考えられるが、pC21/3cプローブで検索できる利点がある。しかし保因者診断を含めた的確な遺伝子診断を行うためには、できれば複数のRFLPsで両親がヘテロを示すことが分析の前提となる。現在のところC4関連RFLPsを組み込むことにより65%の診断率に達するようになってきている¹⁹⁾。将来においても21-ハイドロキシラーゼ遺伝子に隣接し、RFLPs出現率のよいC4領域を観察しなければならない家系も存在するだろうが、理想的である遺伝子内あるいはできる限り近傍におけるRFLPsの観察を行うため、日本人集団において更に新たな遺伝子内または可能な限り近傍のRFLPsを検索し、得られた情報の中から適当な少数のRFLPsの組合せを確立し、追加することにより診断可能

な家系を飛躍的に増加させる試みが必要となる。とくに早期の出生前診断が重要視されてきている本症においては今後重要な課題となるであろう。

本症例の検索では当時報告されていたpC21/3cプローブを用いてのHindIII RFLPを観察しても得られる情報は少ないと考えたので胎盤絨毛を材料としての遺伝子診断は諦め、やむを得ず妊娠4カ月に入ってから羊水中の17-OHPを測定し、その低値をもって正常児と診断した。日本人家系では21-OHDとHLAハプロタイプとの連鎖は認められていないが²⁰⁾²¹⁾、患者および両親を含む家系内のHLAハプロタイプが決定されていれば羊水細胞のHLAハプロタイプを観察することによって出生前診断が可能であろう。ただしこの場合は遺伝子組み換えが出現していないかどうかについては注意しなければならない。出生後に行なったHLAハプロタイプでは第2子は第1子(21-OHD)と同じ1種を父親から受け継いでいた。父母ともども保因者の可能性がある。

ま と め

21-OHD SW型1家系の出生前診断を試みた。本家系第1子(患者)および両親の遺伝子解析においてpC21/3cをプローブとした場合、制限酵素TaqI切断フラグメントの長さ、濃さに異常を認められなかったので出生前診断には用いられなかった。羊水中の17-OHP低値より正常胎児と診断した。女兒が出生し、12-OHP値正常で、臨床症状もない。HLAハプロタイプでは第1子と同じ1種を父親より受け継いでいた。今後遺伝子診断が可能となる家系数(日本人)を増加するため、新たな遺伝子内および近傍のRFLPsを発見し、適当な組合せを確立し、追加することが早急に望まれる。

謝辞：羊水を採取していただいた大阪市立母子センター産婦人科松本雅彦先生、羊水の17-OHP値およびテストステロン値を測定および判定していただいた国立小児病院内分泌科田苗綾子先生に深謝いたします。

本文の要旨は平成3年2月2日、第45回日本小児科学会奈良地方会にて発表した。

文 献

- 1) Evans, M. I., Chrousos, G. P. and Mann, D. W.: Pharmacologic suppression of the fetal adrenal gland in utero; Attempted prevention of normal external genital masculinization in suspected congenital adrenal hyperplasia. JAMA. 253: 1015-1020, 1985.
- 2) New, M. I. and Levine, L. S.: Congenital

- adrenal hyperplasia. Monographs on Endocrinology 26. Berlin, Springer-Verlag, 1984.
- 3) **Pollack, M. S., Maurer, D. and Levine, L. S.** : Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) by HLA typing. *Lancet* **1** : 1107-1108, 1979.
 - 4) **White, D. C., Grossberger, D. and Onufer, B. J.** : Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 1089-1093, 1985.
 - 5) **Higashi, Y., Yoshioka, H. and Yamane, M.** : Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 2841-2845, 1986.
 - 6) **Carroll, M. C., Campbell, R. D. and Porter, R. R.** : Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement C4 gene in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 521-525, 1985.
 - 7) **Southern, E. M.** : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98** : 5-3-517, 1975.
 - 8) **西野正人, 西村拓也, 中 宏之** : サザンプロット法を用いた第IX因子 cDNA による血友病B患者の第IX因子遺伝子の解析. *奈医誌*. **37** : 762-768, 1986.
 - 9) **White, P. C., New, M. I. and Dupont, B.** : HLA linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 7505-7509, 1984.
 - 10) **Donohoue, P. A., Dop, C. V. and McLean, R. H.** : Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **62** : 995-1002, 1986.
 - 11) **原田文樹** : 21-ハイドロキシラーゼ欠損症の分子遺伝学的研究. 単因子遺伝性疾患発症機構としての遺伝子変換の意義. *福岡医誌*. **78** : 55-66, 1987.
 - 12) **土師正文, 小河 淳, 名和田新** : 21-ハイドロキシラーゼ欠損症. *日本臨床* **47** (増刊号) DNA 診断 : 405-412, 1989.
 - 13) **近藤達郎** : 先天性副腎過形成の DNA 分析による出生前診断. *小児科臨床* **50** : 2479-2484, 1987.
 - 14) **Duont, B., Virdis, R. and Lerner, A. J.** : Distinct HLA-B antigen associations for the salt-wasting and simple-virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *in* *Histocompatibility Testing* (Albert, C. D., Bauer, M. P. and Mayr, W. R., eds.). Springer-Verlag, p660-661, 1984.
 - 15) **Palsdottir, A., Fossdal, R. and Arnason, A.** : Heterogeneity of human C4 gene size. A larger intron (6.5kb) is present in all C4A genes and some C4B genes. *Immunogenet* **25** : 299-304, 1987.
 - 16) **Donohoue, P. A., Jospe, N. and Migeon, C. J.** : Restriction maps and restriction fragment length polymorphism of the human 21-hydroxylase genes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **136** : 722-729, 1986.
 - 17) **Strachan, T., Sinnott, P. J. and Smeaton, I.** : Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* **1** : 1272-1273, 1987.
 - 18) **三上貞昭** : 血友病の遺伝子診断 (血友病A, B, キャリアー). *臨床病理 特集* **85** : 102-113, 1990.
 - 19) **近藤達郎** : 21-水酸化酵素遺伝子の分子遺伝学的研究と 21-水酸化酵素欠損症の出生前 DNA 診断法開発に関する研究. *日児誌*. **92** : 2512-2521, 1988.
 - 20) **田苗綾子** : 21OHase 欠損 CAH と HLA. *臨床免疫* **14** : 86-95, 1982.
 - 21) **Naito, S.** : The association of HLA with diseases in Japanese. *Jpn. J. Hum. Genet.* **31** : 323-329, 1986.