

〈論文〉

瀬川病では血液ネオプテリン値が低下する

藤岡弘季*, 新宅治夫**

Decrease in Pteridine Level with Segawa Disease

Hiroki Fujioka and Haruo Shintaku

要約: 瀬川病は著名な日内変動を伴うドーパ反応性ジストニア (DRD) を特徴とし、グアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ (GTPCHI) の部分欠損によっておこる。近年、瀬川病の診断において、ドーパ反応性ジストニア症状を示すにもかかわらず GTPCHI 遺伝子異常を認めない患者が現れており、診断に苦慮することがある。今回我々は患者の血漿・髄液のネオプテリン・ビオプテリン値を測定した。28 人の日本人ドーパ反応性ジストニア患者および 42 人の対照群の計 70 人について検討した。前者は GTPCHI 遺伝子解析・酵素活性測定を行い、瀬川病と診断されたもの 7 人 (瀬川病群) と変異を持たないもの 21 人 (非瀬川 DRD 群) に更に分割し、3 群間で比較を行った。各群において臨床症状の比較を行い、全ての群で全例において血漿・髄液のネオプテリン・ビオプテリン値を測定し比較した。血漿ネオプテリン値、髄液ネオプテリン・ビオプテリン値は瀬川病群で有意に低値であった。ROC 曲線にて解析を行うと血漿ネオプテリン値が AUC 0.99、感度 100%、特異度 95.2% とスクリーニングにもっとも適していた。カットオフ値は 11.37 nM であった。血漿ネオプテリン値の測定は瀬川病のスクリーニングに有用である。

Abstract: Segawa disease is characterized by dopa-responsive dystonia (DRD) with marked diurnal fluctuation and is caused by a defect in guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I (GTPCH I), the first enzyme in de novo bipterin synthesis. Biochemical diagnosis is performed by measurement of neopterin and bipterin levels of cerebrospinal fluid since both are low in DRD. To diagnosis Segawa disease, we evaluated plasma neopterin and bipterin levels in patients with DRD with diurnal fluctuation. A total of 70 patients were included in the study: seven patients, who had mutations in the *GCHI* gene or a decrease in GTPCH I activity, were classified as the "Segawa Disease" group, 21 patients with symptoms of DRD but no abnormality in their *GCHI* gene were classified as the "non-Segawa DRD" group, and 42 patients who did not respond to the administration of l-dopa were classified as controls. Neopterin and bipterin levels were measured by HPLC after iodine oxidation. Ascorbic acid was added to each sample to terminate oxidation. Neopterin concentrations were significantly lower in the Segawa Disease group compared to the non-Segawa DRD group and non-DRD controls. Plasma bipterin concentrations were not different among the three groups. Based on a ROC curve analysis, plasma neopterin levels dis-

受付日 2016. 6. 24 / 掲載決定日 2016. 11. 15

*関西福祉科学大学 健康福祉学部 教授

**大阪市立大学大学院医学研究科 発達小児医学 教授

criminated between Segawa disease patients and the other two groups, with a sensitivity of 100% and specificity of 95.2%. The cut-off value of plasma neopterin concentration was 11.37 nM. A lower level of plasma neopterin was associated with a clinical diagnosis of Segawa disease and was useful to screen Segawa disease from other diseases.

Key words : ドーパ反応性ジストニア dopa-responsive dystonia 瀬川病 Segawa disease ネオプテリン Neopterin グアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I

I. 緒 言

瀬川病 (DYT 5) は著明な日内変動を呈するジストニアで L-ドーパが著効する。この疾患は 1973 年に瀬川らによって見いだされた¹⁾。瀬川病は男性より女性の方で数倍発症率が高く²⁾、多くの例で 10 歳以前に発症する³⁾。瀬川病は常染色体優性遺伝を示し、グアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ I (GTPCHI) の遺伝子変異によって発症することが報告された⁴⁾。GTPCHI はピオプテリン合成系の律速酵素であり、グアノシン三リン酸 (GTP) から 7,8-ジヒドロネオプテリン三リン酸を合成する⁵⁾。これがさらに修飾を受けてピオプテリンとなる。ピオプテリンの活性型であるテトラヒドロピオプテリン (BH4) は様々な酵素の補因子として働くことが知られており、BH4 の欠乏によってチロシン水酸化酵素の活性が低下し、中枢神経系でのチロシンからドパミンの前駆体である L-ドーパへの合成が阻害される⁶⁾。瀬川病では中枢神経系でのドパミン欠乏によりジストニア症状が生じ、L-ドーパ投与により中枢神経系にドパミンが補充されると症状は軽快する。他のピオプテリン合成型の酵素異常ではフェニルアラニンの代謝が阻害され高フェニルアラニン血症を認めることが知られているが、瀬川病ではフェニルアラニン値はやや高値だが正常範囲内である。これは瀬川病では GTPCHI の部分欠損によって症状が起こるためであると考えられており、ごくまれに GTPCHI の完全欠損が認められる患者では高フェニルアラニン血症を示

す事が報告されている⁷⁾。GTPCHI 遺伝子 (GCHI) 解析では瀬川病患者の変異は様々であり共通の変異はみとめられない^{8,9)}。また、瀬川病のように L-ドーパが著効するジストニアを呈する患者のうち GCHI に変異を認める患者はおおよそ半数といわれ、Nyggaard らはドーパ反応性ジストニア (DRD) という概念を提唱している¹⁰⁾。現在までに瀬川病以外に一部の家族性パーキンソンニズム¹¹⁾、チロシン水酸化酵素欠損症^{12,13)}、セピアプテリン還元酵素欠損症¹⁴⁾の患者で DRD の症状を示す事が報告されている。そのため、これまで患者単球¹⁵⁾や繊維芽細胞¹⁶⁾の GTPCHI 活性測定¹⁷⁾が瀬川病の診断に用いられてきた。また、髄液中ピオプテリンやネオプテリンの低値もスクリーニング検査として用いられてきた。

瀬川病が疑われる患者についてのスクリーニング検査としては髄液や繊維芽細胞の採取よりも血液の採取が簡便で迅速であるため、血中ネオプテリンをスクリーニングに利用できれば患者負担も少なくなる。そのため、今回我々は血中ネオプテリン値を測定し、スクリーニング検査として有用であるかどうかについて検討したので報告する。

II. 方 法

1. 対象患者

28 人の日本人ジストニア患者について検討を行った。患者は 1987 年から 2008 年に診断を希望した患者で DRD の症状を示した。これらの患者について後述の GCHI 解析を行った。

対照の42人はドーパ非反応性ジストニアもしくはアテトーゼ、ヒョレアなど他の不随意運動症状を示した患者である。遺伝子解析は説明と書面による同意を得て行った。

2. 生化学的分析

(1) 試薬：特に記述のない試薬は和光純薬（大阪、日本）とシグマ（セントルイス、MO）にて購入したものを使用した。すべての試薬は今回の研究に必要な純度のものを用いた。

(2) ビオプテリン・ネオプテリン解析：各患者から血液および髄液検体を採取した。感染やストレスの影響を避けるため、明らかな発熱や感染のない時に採取を行った。

検体 500 μ l に 20 g/L のアスコルビン酸 50 μ l を加え、25°C、15,000 g で 10 分間遠心分離した後、100 μ l の上清を取り、100 μ l の 30% トリクロロアセチル酸を加え、脱タンパクを行った。これを 15,000 g で遠心した後、上清 100 μ l を取り 100 μ l のヨウ素酸化液（2.7% ヨウ素、5.4% ヨウ化カリウム）を加えた。これを室温、暗所にて一晩放置した後 0.5 μ g のアスコルビン酸を加えて酸化を停止し、HPLC 装置（CLASS VP Series、島津製作所、京都）にて解析を行った¹⁷⁾。

(3) GTPCHI 活性：GTPCHI 活性は一定期間に産生するビオプテリン量を測定した¹⁸⁾。

(4) アミノ酸分析：患者血漿はフェニルアラニン・チロシン量を測定するためアミノ酸分析を行った。解析は自動アミノ酸分析計（L-8800、日立、東京）を用いた。

3. GTPCHI 遺伝子 (*GCHI*) 解析

ゲノム DNA は末梢血単核球より抽出した。*GCHI* 遺伝子の各エクソンと周辺イントロンは PCR 装置にて増幅し ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER（Perkin Elmer、ノーウォーク、CT）を用いて解析した。PCR に使用したプライマーは、エクソン 1 のセンスプライマー 5'-GTT TAG CCG CAG ACC TCG AAG CG-3' と

アンチセンスプライマー 5'-GAG GCA ACT CCG GAA ACT TCC TG-3'、エクソン 2 のセンスプライマー 5'-TAG GGA GGA TTA ACG TTC GT-3' とアンチセンスプライマー 5'-GTT ATT AGT CAG GTT AAT AA-3'、エクソン 5 のセンスプライマー 5'-GTG TCT TGG CTC TTA AAT CT-3' とアンチセンスプライマー 5'-AGA TCA CTT CTA GTG CAC CA-3' であった。シークエンス解析用には各エクソンのセンスプライマーを使用した¹⁹⁾。

4. 統計解析

統計解析には SPSS 16.0.2 と R 2.7.1 を使用した。多重解析には一次元分散分析 (ANOVA) を使用し比率の比較には Ryan の検定および Tukey の検定を使用した。ROC 曲線は感度と特異度を調べ、カットオフ値を決定するために使用した。カットオフ値は感度+特異度が最大になる点とした。

Ⅲ. 結果

1. 瀬川病の診断

DRD 症状を示す患者のうち 4 人については *GCHI* 遺伝子解析において対立遺伝子の一方のみに遺伝子変異が見いだされた。遺伝子検査にて異常を示さなかった別の 1 人はダイレクトシークエンス法では遺伝子変異は見出されなかったが、他施設にて各エクソン遺伝子量の定量分析を行なったところ、エクソン 2 とエクソン 3 の遺伝子量が半減していることがわかった。*GCHI* 遺伝子は 6 つのエクソンから構成されるが⁸⁾、他のエクソン遺伝子量に異常は認められなかったため、この結果から患者 *GCHI* 遺伝子にはエクソン 2 からエクソン 3 にまたがる巨大欠失が存在すると判断され、瀬川病と診断された²⁰⁾。別の 2 人については他施設で患者末梢血 GTPCHI 活性の低下によりすでに瀬川病であると診断されており（表 1）、遺伝子解析は希望されなかったため行わなかった。以上の結果から瀬川病と診断されたものは合計 7 人であ

った (瀬川病群)。他の 21 人のドーパ反応性を示すジストニア患者では遺伝子異常は認めなかったため瀬川病とは診断されなかった (非瀬川 DRD 群)。

患者の特徴や臨床症状については表 2 に示した。測定年齢と発症年齢については瀬川病群と非瀬川 DRD 群では有意差を認めなかった。

(一次元 ANOVA) 男女比、症状についてはカルテより抽出して確認し、それぞれ Ryan の検定を行った。男女比については瀬川病群では全員が女性であり他の群と有意差を認め、瀬川病群で女性が多かった。(α=0.017, p=0.010) 下肢のジストニアと日内変動の有無については瀬川病群と非瀬川 DRD 群では対照群に対して有

表 1 瀬川病患者の GCH 遺伝子変異

Case	血漿ネオプトリン値 (nM)	血漿ビオプトリン値 (nM)	血漿フェニルアラニン値 (mg/dl)	血漿チロシン値 (mg/dl)	髄液ネオプトリン値 (nM)	髄液ビオプトリン値 (nM)	GCHI 変異	GTPCHI 活性 (%)
3	5.86	8.40	1.15	1.37	5.05	6.37	A 190 V	-
9	2.10	12.50	2.47	2.26	5.40	4.00	A 190 V	-
15	8.39	7.78	0.97	0.91	7.91	8.19	T 186 A	-
16	11.27	23.47	1.25	1.25	8.60	15.66	Deletion of Exon 2-3	-
20	7.50	7.49	0.81	0.87	4.94	5.95	K 107 fs	-
5	4.30	3.00	1.41	0.96	4.40	6.40	-	33.00%
65	4.48	10.11	1.07	0.99	3.60	6.65	-	44.40%

ケース 16 は他施設にて遺伝子解析を施行された。

表 2 被験者の背景因子

	瀬川病群 n=7	非瀬川 DRD 群 n=21	対照群 n=42	独立性的検定 One-way ANOVA		post hoc test				
測定時年齢	12.00±4.40	19.67±15.33	12.72±12.88	0.128		-	-	-	-	-
発症年齢	7.29±2.98	7.33±5.87	7.75±10.70	0.983		-	-	-	-	-
	One-way ANOVA or Fisher の正確検定				Ryan's stepwise pair-comparison					
			瀬川病群 vs 対照群		非瀬川 DRD 群 vs 対照群		瀬川病群 v 非瀬川 DRD 群			
			α'	p 値	α'	p 値	α'	p 値		
男性数	0/7	8/21	22/42	0.025*	0.017	0.01	NS		NS	
症状										
ドーパ反応性	7	21	0	-	-	-	-	-	-	-
ジストニア部位	7	21	32	-	-	-	-	-	-	-
片側性	4/7	6/21	10/32	0.363	-	-	-	-	-	-
- 上肢	0/7	1/21	7/32	0.167	-	-	-	-	-	-
- 下肢	7/7	17/21	16/32	0.009**	0.017	0.011	0.033	0.023	NS	
他の部位	0/7	3/21	10/32	0.131	-	-	-	-	-	-
日内変動	7/7	20/21	5/32	<0.001**	0.017	<0.001	0.033	<0.001	NS	

年齢は平均±SD で示した。測定年齢と発症年齢の独立性的検定には one-way ANOVA を用いた。複数群間の比率の検定には Fisher の正確検定を用いた。*p<0.05, **p<0.01。Post hoc test は one-way ANOVA or a Fisher's exact test にて有意差が認められた時にだけ行った。

“α” は多重比較による偽陽性の影響を排した 5% の有意差であり p 値が α' 未満で有意とした。

“NS” は有意差なしを示す。“-” は検定を行っていないことを示す。

意差を認め、いずれも対照群に比べて症状を持つ人の比率が多かった。一方、瀬川病群と非瀬川 DRD 群では有意差を認めず、症状で瀬川病と非瀬川 DRD 群を区別することは困難であった。

ダイレクトシーケンス法にて変異が見出された瀬川病群の患者における遺伝子変異の内訳は、A 190 V のミスセンス変異を認めた患者が 2 人、T 186 A のミスセンス変異を認めた患者が 1 人、K 107 fs のフレームシフト変異を認めた患者が 1 人であった。A 190 V の変異を認め

た患者には知りうる限り血縁関係は認めなかった (表 1)。

2. 血漿と髄液の生化学的解析

血液・髄液の測定は全例で行った。前述のように全ての患者で検体の採取時は感染や発熱は認めなかった。瀬川病群の各患者における血漿・髄液のネオプテリン値及びビオプテリン値及び血漿フェニルアラニン値、チロシン値は表 1 に示す。血漿と髄液におけるネオプテリン、ビオプテリン値は平均と標準偏差 (SD) を表 3

表 3 生化学的所見

	瀬川病群 n = 7	非瀬川 DRD 群 n = 21	対照群 n = 42	One-way ANOVA p 値	post hoc test (Tukey's test) : p 値		
					瀬川病群 vs 対照群	非瀬川 DRD 群 vs 対照群	瀬川病群 vs 非瀬川 DRD 群
血漿ネオプテリン値 (nM)	6.27±3.04	9.88±6.29	18.60±6.32	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.51
血漿ビオプテリン値 (nM)	10.39±6.44	8.78±3.35	12.67±8.08	0.105	—	—	—
髄液ネオプテリン値 (nM)	5.70±1.84	8.99±6.36	15.56±8.18	<0.001**	0.003**	0.004**	0.5
髄液ビオプテリン値 (nM)	7.60±3.76	11.03±8.89	19.66±8.24	<0.001**	0.002**	0.001**	0.612
	n = 7	n = 13	n = 31				
血漿フェニルアラニン値 (mg/dl)	1.30±0.54	1.01±0.50	1.04±0.28	0.719	—	—	—
血漿チロシン値 (mg/dl)	1.23±0.49	1.22±0.46	1.19±0.39	0.666	—	—	—

データは平均±SD で示した。**, p<0.01. Posthoc test は one-way ANOVA で有意差があった時だけ施行した。

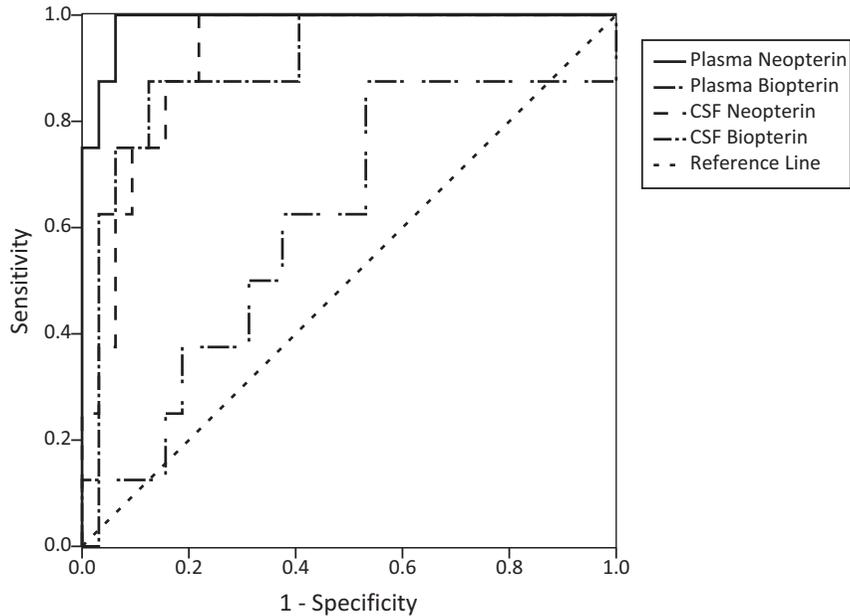


図 1 ROC 曲線

表 4

	AUC	カットオフ 値(nM)	感度 (%)	特異度 (%)
血漿ネオプテリン	0.99	11.37	100	95.2
血漿ピオプテリン	0.61	10.58	71.4	59.5
髄液ネオプテリン	0.94	8.69	100	83.3
髄液ピオプテリン	0.91	8.36	85.7	90.5

に示した。また血漿中フェニルアラニン値とチロシン値は一部の患者で測定された(瀬川病群; n=7、非瀬川 DRD 群; n=12、対照群; n=31)。

一次元 ANOVA では血漿ネオプテリン値、髄液ネオプテリン値、ピオプテリン値に有意差を認め、post hoc test として Tukey の検定を行ったところ、いずれも瀬川病と非瀬川 DRD 群、瀬川病と対照群で有意差を認め、瀬川病群で低値を示した。

3. 判別分析

瀬川病群と非瀬川 DRD 群を判別するために ROC 曲線を使用した(図 1)。ROC 曲線は各物質の濃度ごとに患者・非患者を判別し、その感度 (Sensitivity)、特異度 (Specificity) をグラフに表したものである。一般に ROC 曲線の面積 (AUC; Area Under the Curve) が大きいほど鋭敏な指標といえることができる。血漿・髄液のネオプテリン、ピオプテリン値において AUC と感度+特異度が最大になる値を表 4 に示した。その結果、血漿ネオプテリン値がカットオフ値 11.37 nM で感度 100%、特異度 95.2% と最大になった(表 4)。

IV. 考 察

本研究では血漿ネオプテリン値の低下が瀬川病のスクリーニングにもっとも有用であるという結果を示した。髄液中ネオプテリン値、ピオプテリン値も同様の傾向を示した。ネオプテリンは GTP から合成される 7,8-ジヒドロネオプテリン 3 リン酸の代謝産物であり GTPCHI 活性を直接反映していると考えられる。ピオプテ

リンについては *de novo* 代謝系により GTP から 7,8-ジヒドロネオプテリン 3 リン酸を経て合成されるが、一旦合成されたピオプテリンは Recycling 経路において活性型のピオプテリンである BH4 に代謝され、使用された BH4 が再びピオプテリンに還元されるため血漿サンプルでは正しく GTPCHI 活性を反映しなかった可能性がある。

瀬川病患者で血漿中フェニルアラニン値とチロシン値が変動しなかったことは、GTPCHI 活性の部分的な低下を示唆している。GTPCHI を含む *de novo* 代謝系では GTP から BH4 を合成するが、BH4 は肝臓でフェニルアラニンをチロシンに代謝するフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素であり、BH4 完全欠損症では高フェニルアラニン血症を来することが知られている。今回、瀬川病患者において高フェニルアラニン血症が認められなかったことは瀬川病患者では必要最低限の BH4 が供給されており、GTPCHI の部分欠損であることを示唆した。

ネオプテリンについては炎症時に IFN- γ ²¹⁾ や Nuclear Factor- κ B²²⁾ の作用により GTPCHI 活性が上昇することから白血球で合成されることが知られており、いくつかの疾患で血中ネオプテリン値が上昇することが知られている^{23,24)}。しかし、今まで血中ネオプテリン値が低下する疾患は知られていない。大脳においては年齢依存性にピオプテリン値の低下が起こることが報告されている²⁵⁾。しかし、今回の研究では測定した年齢域でピオプテリン値に有意な年齢依存性は認めなかった。(Data Not Shown) 今回の研究では感染等による末梢血単核球の活性化が血漿ネオプテリン値の上昇などの影響を与えないように検体採取時には発熱や感染がないことを確認した。

血液ネオプテリン値については主に末梢血単核球由来のネオプテリン値を反映すると考えられてきたが、感染等の影響を受けると末梢単核球の活性化からネオプテリン値が上昇する可能性があるため、一般的に感染の影響を受けない

髄液ネオプテリン・ビオプテリン値の測定、もしくは末梢血単核球における GTPCHI 活性の測定が重要であるとされてきた。しかし、今回の研究からは明確な感染状態にない瀬川病患者では血中ネオプテリン値の低下が認められ、髄液と同様にスクリーニングに使用できることが示唆された。血液の採取は髄液に比べ安全で簡便であることからドーパ反応性ジストニアのスクリーニングとして有用であることが示唆された。

今回の研究では *GCHI* 遺伝子に変異を認め、瀬川病と診断された患者はすべて女性であった。以前の報告から瀬川病を発症する患者は男性よりも女性に多いとされている^{2,3)}。非瀬川 DRD 群の患者はドーパ反応性ジストニア症状を呈しながら *GCHI* 遺伝子の異常が認められず、確定診断がつかなかった。この中には *GCHI* 遺伝子エクソンの巨大欠失による瀬川病患者が含まれているため、通常のダイレクトシーケンシング法では変異が見つからなかった患者が存在する可能性がある。しかし巨大欠失を示す患者は瀬川病の中で 10% と比較的まれであると報告されている²⁰⁾。その他の可能性としては一部のチロシン水酸化酵素欠損症、セピアプテリン還元酵素欠損症患者で DRD の症状を示すという報告がある⁸⁾。また、若年性パーキンソニズムの一部に DRD 症状を示す症例があることが報告されており¹¹⁾、今後は DRD 患者を診断するときには様々な疾患の可能性を考えて鑑別する必要がある。

今回の我々の研究では GTPCHI 欠損症である瀬川病と他の DRD 患者では血漿ネオプテリン値で区別できる可能性が示された。今後は DRD 患者のスクリーニングとして血漿あるいは髄液のネオプテリン値もしくは髄液ビオプテリン値を測定し、必要な場合にはさらに遺伝子検索を行う事で確定診断を目指す必要があると考えられる。

V. 結 論

瀬川病のスクリーニングには血漿ネオプテリン値の低下が有用であり、ドーパ反応性ジストニアを呈する患者でネオプテリン値が 11.37 nM 未満の場合には瀬川病を考え、*GCHI* 遺伝子解析を優先すべきであり、それ以上の場合には若年性パーキンソン病などのドーパ反応性ジストニアを示す他の疾患について検討すべきである。

参考文献

- 1) Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol.* 1976; **14**: 215-33.
- 2) Furukawa Y, Lang AE, Trugman JM, Bird TD, Hunter A, Sadeh M, et al. Gender-related penetrance and de novo GTP-cyclohydrolase I gene mutations in dopa-responsive dystonia. *Neurology.* 1998; **50**: 1015-20.
- 3) Segawa M, Nomura Y, Nishiyama N. Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease). *Ann Neurol.* 2003; **54**: S 32-45.
- 4) Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet.* 1994; **8**: 236-42.
- 5) Shintaku H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. *Curr Drug Metab.* 2002; **3**: 123-31.
- 6) Brautigam C, Steenbergen-Spanjers GC, Hoffmann GF, Dionisi-Vici C, van den Heuvel LP, Smeitink JA, et al. Biochemical and molecular genetic characteristics of the severe form of tyrosine hydroxylase deficiency. *Clin Chem.* 1999; **45**: 2073-8.
- 7) Blau N, Ichinose H, Nagatsu T, Heizmann CW, Zacchello F, Burlina AB. A missense mutation in a patient with guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency missed in the newborn screening program. *J Pediatr.* 1995; **126**: 401-5.
- 8) Thony B, Blau N. Mutations in the BH4-

- metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4 a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat.* 2006 ; **27** : 870-8.
- 9) Zirn B, Steinberger D, Troidl C, Brockmann K, von der Hagen M, Feiner C, et al. Frequency of GCH1 deletions in Dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008 ; **79** : 183-6.
 - 10) Nygaard TG, Marsden CD, Duvoisin RC. Dopa-responsive dystonia. *Adv Neurol.* 1988 ; **50** : 377-84.
 - 11) Tassin J, Durr A, Bonnet AM, Gil R, Vidailhet M, Lucking CB, et al. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain.* 2000 ; **123** : 1112-21.
 - 12) Knappskog PM, Flatmark T, Mallet J, Ludecke B, Bartholome K. Recessively inherited L-DOPA-responsive dystonia caused by a point mutation (Q 381 K) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Genet.* 1995 ; **4** : 1209-12.
 - 13) Ludecke B, Dworniczak B, Bartholome K. A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Hum Genet.* 1995 ; **95** : 123-5.
 - 14) Bonafe L, Thony B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet.* 2001 ; **69** : 269-77.
 - 15) Ichinose H, Ohye T, Yokochi M, Fujita K, Nagatsu T. GTP cyclohydrolase I activity in mononuclear blood cells in juvenile parkinsonism. *Neurosci Lett.* 1995 ; **190** : 140-2.
 - 16) Bonafe L, Thony B, Leimbacher W, Kierat L, Blau N. Diagnosis of dopa-responsive dystonia and other tetrahydrobiopterin disorders by the study of biopterin metabolism in fibroblasts. *Clin Chem.* 2001 ; **47** : 477-85.
 - 17) Hyland K, Gunasekara RS, Munk-Martin TL, Arnold LA, Engle T. The hph-1 mouse : a model for dominantly inherited GTP-cyclohydrolase deficiency. *Ann Neurol.* 2003 ; **54** : S 46-8.
 - 18) Fukushima T, Nixon JC. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem.* 1980 ; **102** : 176-88.
 - 19) Togari A, Ichinose H, Matsumoto S, Fujita K, Nagatsu T. Multiple mRNA forms of human GTP cyclohydrolase I. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 ; **187** : 359-65.
 - 20) Ohta E, Funayama M, Ichinose H, Toyoshima I, Urano F, Matsuo M, et al. Novel mutations in the guanosine triphosphate cyclohydrolase I gene associated with DYT 5 dystonia. *Arch Neurol.* 2006 ; **63** : 1605-10.
 - 21) Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Yim JJ, et al. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. *J Biol Chem.* 1990 ; **265** : 3189-92.
 - 22) Huang A, Zhang YY, Chen K, Hatakeyama K, Keaney JF, Jr. Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear factor-kappaB and Stat 1/Stat 3. *Circ Res.* 2005 ; **96** : 164-71.
 - 23) Adachi T, Naruko T, Itoh A, Komatsu R, Abe Y, Shirai N, et al. Neopterin is associated with plaque inflammation and destabilisation in human coronary atherosclerotic lesions. *Heart.* 2007 ; **93** : 1537-41.
 - 24) Zhang L, Rao F, Zhang K, Khandrika S, Das M, Vaingankar SM, et al. Discovery of common human genetic variants of GTP cyclohydrolase I (GCH1) governing nitric oxide, autonomic activity, and cardiovascular risk. *J Clin Invest.* 2007 ; **117** : 2658-71.
 - 25) Furukawa Y and Kish SJ. Influence of development and aging on brain biopterin : implications for dopa-responsive dystonia onset. *Neurology.* 1998 ; **51** : 632-4.