

基質として 1 mmol/L 4-MU-ID, 10 μ l を加え, 37°C で 20 時間インキュベートした。その後, 0.085 mol/L グリシン-炭酸緩衝液 (pH10.5), 200 μ l を加え, 蛍光強度 (励起波長: 365 nm, 蛍光波長: 450 nm) を測定した (図 1)。

(2) 反応条件の検討: 原報に従い, 標準液として 4-methylumbelliferone を用い, 0~100 nmol/ml の範囲で良好な直線性が認められたが, 血液の添加とともに, 蛍光強度が低下することが確認された。ろ紙血 1/4 量で約 1/3, 1 枚で約 1/10 に低下した。最適な基質濃度と血液量について, 4 種類の異なったろ紙血を用いて検討した。基質濃度は, 原報の 1/2, 1/5 と低下するにしたがい, 蛍光強度は減少した。これに対して, 血液量は, 原報の 1/2, 1/4 と減るごとに蛍光強度が上昇した。以上の結果から, 血液量は原報の 1/4, 基質濃度は 1/2 とした (図 2)。

(3) 保存安定性: ①札幌市では, 新生児スクリーニングで使用したろ紙血は, 半年間, 冷凍保存した後, 冷蔵保存している。1ヶ月前から 2 年前までの保存血液ろ紙それぞれ 24 検体の ID 活性を測定した。その結果, 平均蛍光強度は, 冷凍期間中は, ほとんど変化がなかったが, 冷蔵後, 保存期間が長くなるほど低下し, 半年で約 50% 程度の活性の低下が認められた (図 3)。②新生児ろ紙血 8 検体を, 35 日間, 4°C, 25°C で保存し, 濾紙血中 ID 活性を測定した結果, 25°C では, 蛍光強度は 1 週間で約 15%, 1 か月で約 25% 程度低下した。また, 4°C では 2 週間で約 10% 低下したが, その後 1 か月間変化がなかった (図 4)。

(3) 濾紙血中 ID 活性: 健常新生児 80 例の ID 活性は 4.83 ± 1.68 (mean \pm SD, nmol/ml blood/hr) であったが, MPS I 型患者 8 例では 1.11 ± 0.32 , MPS I 型キャリアでは 1.99 ± 0.23 となり, 3 群を良好に区別することが可能であった。また, 札幌市で確認された MPS I 型患者の新生児スクリーニング時の検体では, それぞれ, 0.41, 0.26 nmol/ml blood/hr と ID 活性の低下が確認された。なお, MPS II 型患者およびキャリアでは, 正常群に比べやや低い活性であった (表 1)。

考察

MPS 治療においては, I 型 (Hurler 症候群) における酵素補充療法が開始され, 他の型においても治療が開始されるなど, 治療可能な疾患となってきており, MPS を早期に発見するための一次スクリーニング法の開発が期待されている。昨年度は, ろ紙血中ケラタン硫酸測定 ELISA キットによる検討を行った結果, 健常群と患者との鑑別は可能であったが, 新生児期のろ紙血中ケラタン硫酸は上昇しておらず, 一次スクリーニング法としては適当ではないことが確認された²⁾。標的物質がケラタン硫酸ではあったが, 新生児期での血中蓄積物質の上昇の程度が不明であり, スクリーニング対象物質の再検討が必要であった。

Dr. Chamoles らは, 新生児スクリーニングで用いるろ紙血を用い, 多種類の Lysosome 酵素活性測定法を開発したが¹⁾, 今回, ろ紙血中 ID 酵素活性を測定することで一次スクリーニングが可能かどうか検討を行った。その結果, 3mm ディスク 1 枚を用いるろ紙血中 ID 活性測定により, 新生児ろ紙血検体を用いて, 患者と健常群を良好に鑑別することが可能であり, 乳幼児期に診断された患者の新生児スクリーニングの検体においても, ID 活性の低下が確認された。

本測定法を一次スクリーニング検査法と考えた場合, MPS I 型とともに, 基質の選択により, 他の MPS の新生児期のマス・スクリーニングの可能性は期待できるものの, 病型に応じた測定系が必要であり, 大量検体を扱う一次スクリーニング検査法としての利用は難しいと考えられた。しかしながら, 一次スクリーニング後の確認検査や精密検査において, ろ紙血 3mm ディスク 1 枚を用いて酵素診断が可能な点で有用な方法であると考えられる。

学会発表

第 32 回日本マス・スクリーニング学会, 仙台市, 2004 年 10 月

新生児濾紙血中 Iduronidase 活性測定によるムコ多糖症 I 型スクリーニングの可能性

花井潤師¹⁾, 野町祥介¹⁾, 田上泰子¹⁾, 水嶋好清¹⁾, 福士勝¹⁾, 藤田晃三¹⁾, 山口昭弘²⁾, 窪

田 満³⁾, Nestor A. Chamoles⁴⁾

1) 札幌市衛生研究所, 2) 財) 日本食品分析センター, 3) 北大医学部小児科, 4) LABORATORY OF NEUROCHEMISTRY, URIARTE 2383, Argentina

文献

- 1) N. A. Chamoles, et al: Clin Chem, 47:12, 2098-2102, 2001.
- 2) 花井潤師, 他: 平成 15 年度厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)「マスキングの効率的実施及び開発に関する研究」報告書, 2003, 94-96.

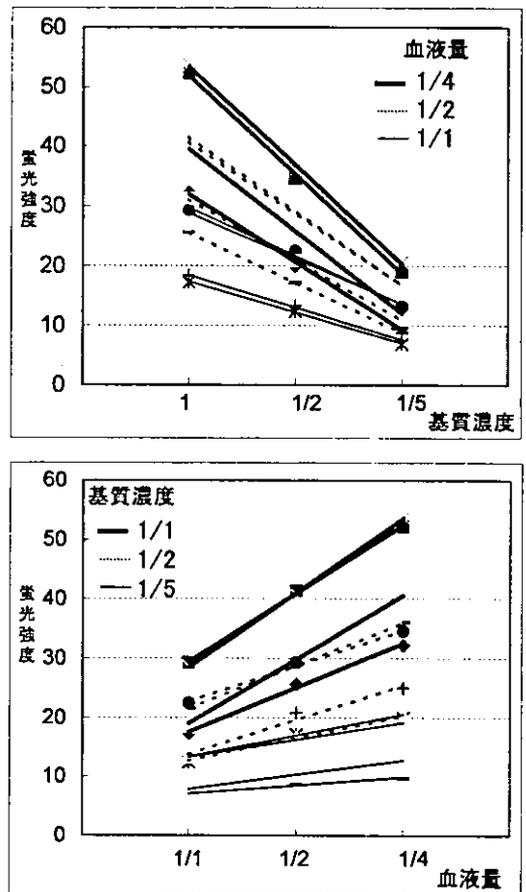
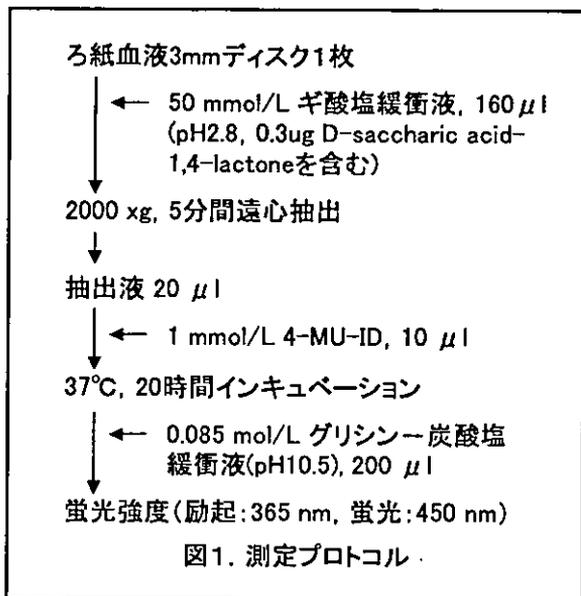


図2. 反応条件の検討

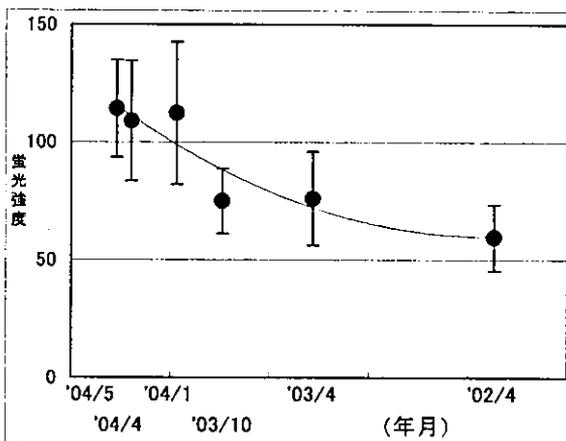


図3. 保存安定性(1)

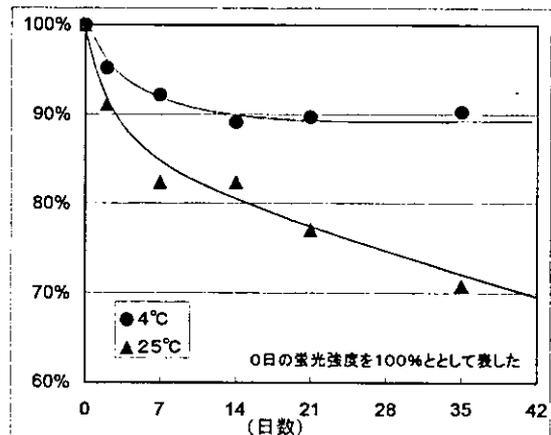


図4. 保存安定性(2)

表1. 健常群、患者群におけるろ紙血中ID活性

	normal newborn	newborn MPS I	MPS I	MPS I Carrier	MPS II	MPS II Carrier
mean	4.83	0.33	1.11	1.99	3.81	2.53
SD	1.68	0.10	0.32	0.23	1.55	0.68
min	2.29	0.26	0.64	1.76	2.32	1.72
max	11.75	0.41	1.68	2.30	7.26	3.68
n	80	2	8	7	8	7

単位: nmol/ml blood/hr

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

ムコ多糖症のスクリーニングの過去、現在、未来

研究要旨

1957 年 Dorfman および Lorincz がムコ多糖症の患者の尿中に大量のグリコサミノグリカン（ムコ多糖）の排泄を報告して以来、診断のために尿中ムコ多糖の測定法が開発されてきた。しかし、尿中にムコ多糖を排泄するムコ多糖症 I、II、III、IV、VI および VII 型の総てを新生児期に血液濾紙を使用して簡便、大量、低価格且つ正確に測定する方法は、現在、国の内外で報告されていない。一方、ムコ多糖症の治療については骨髄移植が 1981 年 Hobbs により実施され、2003 年からムコ多糖症 I 型に対する酵素補充療法がアメリカで認可、発売され、ムコ多糖症 II 型について本年 3 月アメリカを中心とした臨床試験が終了予定である。しかるに著者らが過去 20 数年間に全国の医療機関から依頼された時点の患者年齢は酵素診断された 385 例中 1 歳未満は 17 名で 4%、1 歳から 2 歳未満は 31 名で 7%であった。これまでの経験からより低年齢での治療の有効性が確認されているので、新生児期に血液濾紙を使用した診断法が開発が望まれる。

研究協力者

折居忠夫（中部学院大学教授）鈴木康之（岐阜大学医学教育開発研究センター教授）、加藤智美（岐阜大学医学教育開発研究センター助手）、折居恒治（岐阜大学医学部小児病態学助手）、花井潤師（札幌市衛生研究所）、加藤俊、宮浦修一、岡村和夫（生化学工業）

研究目的

この数年ムコ多糖症、特に I、II 型に対する酵素補充療法が、或は臨床試験が実施されている。

一方、著者らの成績では、ムコ多糖症の過半数を占めるのはハンター病（II 型）であり、その大部分の重症型の臨床診断は平均 3.8 歳であった。この数値は米国、英国、ドイツ、オーストラリア、ブラジルの数値とほぼ一致していた。

酵素補充療法および従来からの骨髄移植の治療成績をより効果的に向上させるためには、新生児期のマススクリーニングが必須であるが、世界的に実用的な方法は開発されていない。

そこで、これまで著者らが行なってきたマススクリーニングのパイロットスタデーとその試みについて記載し、今後のマススクリーニングの方策について考察する。

研究対象および方法

I 1,9-Dimethylmethylen Blue Method(DMB)法を用いた尿中ムコ多糖症のマススクリーニングのパイロットスタデー

岐阜県で実施されていた神経芽細胞腫の検索用に採取された平均 8 ヶ月尿検体について家族からインフォームドコンセントの得られた検体を使用した。当初 COBAS MIRA を使用したが、その後、より簡便なマイクロプレート法に切り替えた。

1) マイクロプレート法

10 μ l 尿（-20°C凍結保存）に 240 μ l DMB 試薬（35 μ M-DMB, 50mM-Formatebuffer/ 0.18M-Tris pH8.8）を加え、MICRO PLATE READER（520 nm）で測定した。

2) 濾紙法

濾紙に尿または MPS/クレアチニン標準液を浸して一夜風乾する。エッペンチューブに破片濾紙、 $0.4 \times 2\text{cm}$ を入れ、 $300 \mu\text{l}$ の蒸留水または、 500mM -Formate buffer/ 0.18M -Tris pH8.8 を加え、室温で一時間放置後、vortex をかけて抽出し、 $10,000\text{rpm}$, 10 分間、遠心後、その上清を使用した。

II ELISA キットによる新生児濾紙血中ケラタン硫酸 (KS) の測定

ムコ多糖症の血液ならびに尿中に原因が不明であったが、KS の増量することを、戸松らが見出した。そこで、各年齢による正常および患者の検討を実施したところ、患者の骨髄移植および酵素補充前後のフォローに有用であることが判明した。そこで新生児濾紙血によるマススクリーニングに使用可能か否か検討した。

対象は正常群として、札幌市のマススクリーニングを受験した新生児 398 例、患者群として、ムコ多糖症患者親の会、岐阜大学、国立成育医療センターから供与されたムコ多糖症 I,II,III 型の検体 16 件およびムコ多糖症患者で、札幌市の新生児スクリーニングを受験していることが確認された患児 2 例である。試料はいずれもインフォームドコンセントを得て採取した濾紙血を使用した。濾紙血中 KS の測定は生化学工業で開発された ELISA によるキットを用いた。

研究結果

I 1993 年 10 月から 2000 年 6 月まで計 116,972 例を検索、その結果 1 例 (8 ヶ月) のムコ多糖症 II 型を見出した。この他、同じくムコ多糖症 II 型の胎児が出生前診断されたので、実質的には 116,972 例に 2 例即ち 58,486 例に 1 例ということになった。

II 1) 正常新生児の KS 濃度

新生児濾紙血 398 件の KS 測定の結果はほぼ正規分布を示し、平均 \pm SD は $95.8 \pm 29.3\text{ng/ml}$ であった。

2) ムコ多糖症患者の KS 濃度

患者検体として、2 歳から 30 歳のムコ多糖症 I 型 2 例、II 型 11 例、III 型 3 例の濾紙血の測定結果、I 型、II 型、III 型、いずれの患者も、濾紙血中 KS 濃度は高値を示し、正常新生児の 90% 点、約 130ng/ml を上回っていた。

3) ムコ多糖症患者の新生児期の KS 濃度

7 ヶ月と 2 歳 2 ヶ月のムコ多糖症 I 型と診断された患児で、札幌市の新生児スクリーニングを受検したことが確認された患児の新生児期の濾紙血中 KS を測定した。その結果、採血日齢、それぞれ 4 日、5 日の KS 濃度は、いずれも、正常新生児のほぼ平均値で、全くの正常であることが確認された。さらに後者については、生後 1 歳 5 ヶ月の時点で、当所でハイリスクスクリーニングを受検しており、その時に採血した濾紙血中の KS 濃度は 265.0ng/ml と上昇していた。

考察

I DMB 法による新生児マススクリーニング法

種々検討の結果、本法はムコ多糖症 I,II 型に対しては極めて有用であることが判明したが、III, IV 型の一部に偽陰性の症例があり、全てのムコ多糖症の検出には不向きであることが判明した。

II ELISA キットによる新生児濾紙血中ケラタン硫酸 (KS) の測定

本法は骨髄移植や酵素補充療法の前後の追跡には簡便で極めて有用であったが、新生児期では、正常児と患児で区別できず、正常値に属していた。このことは新生児期のマススクリーニングに本法は不適と判定された。これまで、ムコ多糖症で KS が高値を示す理由は不明であったが、体内のムコ多糖のある水準以上の蓄積に随伴して KS が蓄積すると考えられた。

III LC/MS におけるムコ多糖症マススクリーニング法開発の可能性

現在、世界的に簡便、正確、安価、全てのムコ多糖症に適用可能な新生児期のマススクリーニング法は報告されておらず、本症に有用な方法の開発に凌ぎを削っている状態で、そのなかで、

LC/MS 法を使用する方法が多数の検体を短時間で処理可能で、経済性、定量性に富み、最も有用と考えられている。但し、LC/MS/MS の設置に当初数千万円を要する。共同研究者の小熊が長年、組織ムコ多糖の LC/MS/MS による分析に取り組み、pmol レベルまでの高感度分析が可能であることを示し、さらに HS や KS などの同時定量の可能性について検討中である。また、前処理法としてルーチン分析に適した簡便な操作方法の開発、HPLC の分離に関して、カラムへの保持性を高めたり、生体由来成分のイオンサプレッションの低減化などの課題を検討中である。

結論

ムコ多糖症の臨床診断が各国ともおよそ平均 3.8 歳という状況下で、最近、本症の酵素補充療法が開発され、ムコ多糖症 I 型については欧米、台湾、韓国などで、認可、販売され、実用に供されている。ムコ多糖症 II 型については世界 5 カ国で臨床試験中で本年 3 月臨床試験が終了の予定である。ムコ多糖症の患児は出生時には臓器にムコ多糖の蓄積がすでに始まっており、薬剤の効果を高めるためには、新生児期からの治療開始が必須である。それ故に新生児期での有用なマススクリーニングの開発が早急に実現され、明年からのパイロットスタデーが待たれるのである。

文献

- 1) Tomatsu S, Okamura K, Taketani T et al.: Development and testing of new screening method for keratin sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatr Res.* 2004; 55(4):592-7
- 2) Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO et al.: Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A): identification of novel common mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Hum Mutat.* 2004; 24(2):187-8.
- 3) Tomatsu S, Nishioka T, Montano AM et al.: Mucopolysaccharidosis IVA: identification

of mutations and methylation study in GALNS gene. *J Med Genet.* 2004; 41(7):e98.

- 4) 折居忠夫: ムコ多糖症の診断と治療 SRL 宝函、2003; 27 (3) : 117-26

分担研究課題：新しい新生児マス・スクリーニング体制に関する研究

ジメチルメチレンブルー呈色反応による尿のムコ多糖症スクリーニング法の反省と方法の再検討

研究要旨

1996 年より、当院にて出生した新生児のうち希望者について、1 ヶ月時に尿ろ紙を用いてジメチルメチレンブルー呈色反応によりムコ多糖症のスクリーニングを行っている。1 次スクリーニング陽性検体について、コンドロイチナーゼ AC にて消化後、2 次スクリーニングを行う。消化により、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸が残り呈色する。現在までの検査件数は 10,259 検体、1 次スクリーニング陽性率 3.1%、2 次スクリーニング陽性率 0.9%であった。最近、スクリーニングで見逃された 4 歳のムコ多糖症 II 型患者が診断された。患児は、1 次スクリーニングで陽性であった。2 次スクリーニングでもコンドロイチナーゼ AC で消化されない異常なムコ多糖の割合が多かった。しかし、定量値が低かったため、陰性と判定されていた。尿ろ紙に十分に染みていない箇所を検体に用いたのではないかと推測され、UV によりろ紙上の尿の存在を確認して検査すべきであったことが反省点である。他方、さらに安定で特異的な検査法の開発が待たれる。

研究協力者

田中あけみ（大阪市立大学大学院医学研究科・助教授）、坂口知子（大阪市立大学大学院医学研究科・技術職員）

A. 研究目的

欧米では、先天性ムコ多糖症 I 型の酵素療法は、すでに治療法として認可され、酵素製剤は商品化されている。II 型の酵素製剤についても、現在、米国において世界規模での治験が進行中であり、まもなく、認可、商品化される予定である。早晚、我国にも、このムコ多糖症の酵素治療が導入されるであろう。効果的な治療が可能になってきたことから、早期診断、早期治療が望まれ、ムコ多糖症のマス・スクリーニング法の確立が急がれている。当科では、1996 年より、当院小児科および関連病院で出生した 1 ヶ月児について、尿ろ紙を材料としてジメチルメチレンブルー呈色反応によるムコ多糖症スクリーニングを行ってきた。この方法の有用性について、10 年間の経験を基に検討する。

B. 研究方法および対象

1 か月乳児の濾紙尿を用い、ムコ多糖症のスクリーニングを検討した。

検体収集法：新生児病棟を退院時、スクリーニング検査のパンフレットと検査用濾紙を配布する。検査希望者は、1 ヶ月検診時に、「ムコ多糖の尿検査に同意して提出します」と記載した封筒に、尿を染み込ませた濾紙を入れて持って来るようにした。

スクリーニング法：尿ろ紙 3/16 インチパンチ 6 枚を

300 μ l の 0.18M トリス蟻酸バッファー pH8.8 に室温で 48 時間浸してムコ多糖を抽出する。この抽出液 50 μ l と 48 μ M DMB/0.18M トリス蟻酸バッファー pH8.8 の 200 μ l とを 96 穴マイクロプレート上で混合、呈色反応させ、525 nm での吸光度を測定してムコ多糖を定量する。これを 1 次スクリーニングとする。1 次スクリーニング陽性検体について、2 次スクリーニングを行う。2 次スクリーニングでは、尿ろ紙をコンドロイチナーゼ AC 液に浸し、37°C で一昼夜消化した後、同様にしる紙からムコ多糖を抽出し、定量する。この処理により、異常なムコ多糖であるデルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸が残る。2 次スクリーニング検査でも高値を示すものについて、精密検査として原尿の提出を依頼し、尿中ムコ多糖の総ウロン酸量の測定とセルロースアセテート膜電気泳動を行う。

判定は、1 次スクリーニングでは、ジメチルメチレンブルー呈色反応にて 1mg/dl 抽出液以上、あるいは同一プレート内で、+2SD 以上のものを陽性とした。2 次スクリーニングについては、コンドロイチナーゼ AC 非消化検体と消化検体とを作成して同時に測定し、①非消化検体が再び 1mg/dl 抽出液以上の陽性のもの、②消化検体が正常域（0.5mg/dl 抽出液以下）でないもの、③あるいは消化されたムコ多糖の割合が 50% 未満のものを精密検査とした。

C. 研究結果

ジメチルメチレンブルー呈色反応は発色が不安定で、毎測定時に厳密に試薬調整を行い、内部標準を用いる

などの配慮が必要であった。材料としての尿ろ紙は、運搬に便利であり、室温に放置しても腐敗などの恐れもない。尿ろ紙よりムコ多糖を効率よく抽出するには、アルカリ液中での抽出を必要としたが、尿の pH や尿蛋白の共存による呈色反応への影響は、ろ紙により除くことができ、検体材料としては都合が良かった。しかし、尿は、血液と異なり、ろ紙上のスポットの状態が一見して分かりにくい欠点があるため、パンチを抜くときに十分に注意する必要がある。本スクリーニングは、思索中の検査であるため、インフォームドコンセントを得る必要がある。説明と同意の煩雑性をできるだけ少なくするため、検査の説明文と検体採取用のろ紙とともに、「ムコ多糖の尿検査に同意して提出します」と印刷した封筒を配布した。親が、この封筒に新生児の名前を書き込んで提出するようにし、この封筒を一定の期間保管することにした。

現在までの検査件数は 10,259 検体、1 次スクリーニング陽性率 3.1%、2 次スクリーニング陽性率 0.9% であった。患者は発見されなかった。

最近、スクリーニングで見逃された 4 歳のムコ多糖症 II 型重症型患者が診断された。患児は、2000 年にスクリーニングを受けており、1 次スクリーニングで陽性であった。2 次スクリーニングでも、コンドロイチナーゼ AC で消化されない異常なムコ多糖割合が 57% と高値を示していた。しかしながら、2 次スクリーニングでの定量値の絶対値が、コンドロイチナーゼ AC 非消化検体、消化検体ともに 0.5mg/dl 抽出液以下と低かったため、陰性と判定されていた。

D. 考察

ジメチルメチレンブルー呈色反応は安価で簡便であるが、全てのムコ多糖が反応するため、擬陽性が出やすい。さらに、呈色が不安定で、測定に変動が生じやすい。前者の欠点をカバーするため、2 次スクリーニングとしてコンドロイチナーゼ AC 消化を行い、目的とするムコ多糖だけが残って反応するよう試みた。後者の欠点については、吸光度の絶対値だけでなく、各プレート内吸光度の +2SD 以上を目安に判定を行った。生後 1 ヶ月の乳児では、ほとんどが 2~4 時間毎に哺乳しているため尿の濃さに変動は少ないものと推測され、また、クレアチニンの値が非常に低いことから、クレアチニン量による測定値の補正は行わなかった。

今回診断された見逃し症例は、1 次スクリーニングで陽性と判定されていた。しかし、2 次スクリーニングでは、2 次スクリーニング陽性判定基準とした①非消化検体が再び 1mg/dl 抽出液以上の陽性のもの、②消化検体が正常域 (0.5mg/dl 抽出液以下) でないもの、③あるいは消化されたムコ多糖の割合が 50% 未満のもの

とするなかの③に相当していたにもかかわらず、陰性と判定された。陰性とされた理由は、2 次スクリーニングでの定量値の絶対値が、コンドロイチナーゼ AC 非消化検体、消化検体ともにほぼゼロに近いほど低かったためと考えられる。このことは、尿がろ紙に十分に染みていない箇所を 2 次スクリーニングの検体に用いたのではないかと疑われた。UV により、ろ紙上の尿の存在を確認して検査すべきであったことが反省点である。また、呈色反応自体の不安定さも懸念された。今後、さらに安定で特異的な検査法の開発が待たれる。

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

遺伝子解析によるハンター症候群の保因者診断および発症前診断

研究要旨

マススクリーニングの目的のひとつは、早期診断・発症前診断により治療効果を高めることにある。ムコ多糖症 2 型（ハンター症候群）は、近い将来酵素補充療法が実現する可能性が高く、今後早期診断が重要になる疾患のひとつである。われわれは、ムコ多糖症 2 型の系統的遺伝子診断法を確立し、本症を有する家族の保因者診断に適応し、その臨床的有用性を検証した。7 家系 13 名の解析を行った。5 家系でイズロネートサルファターゼ遺伝子（IDS）の点変異（ミスセンス変異 4 例、ナンセンス変異 1 例）を、1 家系で微小欠失（4 塩基欠失）を認めた。さらに、1 家系では、IDS 遺伝子とその近傍に存在する偽遺伝子（IDS-2）との組み換えによると考えられる成績を得た。以上の結果から、今回確立した診断法は、ハンター症候群の遺伝子診断法として有用であり、遺伝カウンセリングと併用することにより適切な保因者診断や発症前診断（早期診断）に活用できることが示された。

研究協力者

奥山虎之（国立成育医療センター遺伝診療科）、
折居忠夫（中部学院大学）

A. 研究目的

ムコ多糖症（MPS）は、ライソゾーム病のなかでは、比較的頻度が高い疾患群である。特に、わが国では MPS2 型（ハンター症候群）の頻度が高いのが特徴である。X 染色体連鎖遺伝を示すハンター症候群の遺伝子診断は、発端者の確定診断や家族内の保因者診断に有用だけでなく、現在開発中の酵素補充療法を効果的に行うための、早期診断や発症前診断に活用できる可能性がある。これは、マススクリーニング法における 2 次的スクリーニング法として活用できる可能性を示唆している。上記の背景を考慮し、国立成育医療センターで診療を目的としたハンター症候群の体系的な遺伝子診断体制を確立することを目的とする。

B. 研究方法

（1）ハンター症候群の遺伝子診断法の確立
ハンター症候群の疾患責任遺伝子であるイズロネートサルファターゼ遺伝子（IDS）の 9 個のエクソンとその近傍のイントロンを PCR 法で増幅し、得られた DNA 断片の塩基配列を決定した。IDS 遺伝子には隣接して同遺伝子ときわめて相同性の高い偽遺伝子である IDS-2 が存在する。PCR により IDS-2 遺伝子が同時に増幅されないようにプライマーおよび反応条件について検討した。さらに、IDS 遺伝子と IDS-2 遺伝子の相同組み換えにより、IDS 遺伝子構造が異常となりハンター症候群が発症する場合がある。この、組み換えを迅速・簡便に検出できる方法を検討した。

（2）ハンター症候群の遺伝子検査と遺伝カウンセリングへの活用

（倫理面への配慮）国立成育医療センターでは、遺伝子検査実施規定を定めている。内容は、臨床検査前カウンセリングのなかで、検査の目的の明確化、プライバシー保護のための匿名化、および代諾で検査をする場合の妥当性についてカウンセラーに説明することを定めている。説明は臨床遺伝医療の経験豊富な臨床遺伝専門医が担当することが義務付けられている。

C. 研究結果

1. 1. ハンター症候群の遺伝子診断
7 家系、13 名の遺伝子解析を行った。発端者の遺伝子診断が 7 例、保因者診断が 6 例であった。点変異が 5 家系で見られた。アミノ酸が置換されるミスセンス変異が 4 例で、エクソン 3 の C690G（P120R）が 1 家系、エクソン 9 の G1265A（C422T）が 2 家系、エクソン 7 の A989G（Q310P）が 1 例であった。エクソン 3 とエクソン 9 のミスセンス変異は 既に報告のある変異であったが、エクソン 7 の変異は以前に報告のない変異であった。エクソン 7 の変異については、血縁関係のない日本人の 100 人の解析で同様の変異を検出できなかったことから、多型の可能性は低く疾患関連の遺伝子変異と考えた。また、エクソン 9 の変異は、以前に重症型ハンター症候群の遺伝子変異として報告された変異であるが、今回解析した 2 例とも知的障害を伴わない軽症型であり、遺伝子型と表現型に解離が認められた。4 例中、2 例で母親が保因者であることが確認された。エクソン 3 とエクソン 9 に変異を認めるおのおの 1 例であった。ナンセンス変異が 1 例で認められた。エクソン 3

の、C514T (R172X) 変異であり、過去に報告のあるもので、母親は保因者で表現型は重症型であった。

エクソン9の4塩基が欠失しフレームシフトを生じる症例を1例認めた。これは、以前に報告のない変異で、母親は保因者ではなかった。

また、IDS 遺伝子と IDS-2 遺伝子の相同組み換えが原因と考えられる症例を1例認めた。

2. 遺伝カウンセリングの内容

7家系中、6家系の遺伝子解析にあたって、国立成育医療センターで検査前後に遺伝カウンセリングを行った。遺伝子診断を希望したすべての家族で、母親あるいは発端者に姉妹がいて、その保因者診断を希望し来院していた。発端者の姉妹はすべて未成年であり、検査前遺伝カウンセリングを行った結果、全例で、保因者診断を当面行わないという結論になった。

D. 考察

1. ハンター症候群の遺伝子解析：

ハンター症候群の遺伝子変異はホットスポットが存在せず、症例ごとにすべてのエクソンの網羅的解析が必要とされている。今回の7例の解析でも6種類の遺伝子変異が検出された。しかも、2例は未報告の変異であり、本症の遺伝子診断は過去の報告例の解析だけでは不十分であることが示された。

2. 遺伝カウンセリングの必要性：

ハンター症候群の遺伝子解析は、家族内の保因者診断には必須の検査である。しかし、保因者はとくに症状を呈することがないため、小児期に両親の希望により保因者診断を行うことは、通常妥当とは考えられていない。保因者診断は、本人が成人し自らの意思でおこなうことが適切と考えられる。今回、検査前遺伝カウンセリングで発端者の両親にその点を説明したところ、全例で未成年の検査を保留することとなった。検査前遺伝カウンセリングの有用性が示される結果となった。

E. 結論

ハンター症候群の遺伝子診断体制を確立した。遺伝子解析においては、偽遺伝子との相同組み換えを検出する必要性が示された。遺伝カウンセリングにおいては、未成年の保因者診断には慎重に対応することが必要であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

奥山虎之 他. 内分泌疾患の診療とカウンセラーの資格と責任 ホルモンと臨床 52, 79-88, 2004

2. 学会発表

1. Fukuhara Y, Okuyama T, et al. Long-term behavioral improvement after intra-cerebral transplantation of neural stem cells into the mice with mucopolysaccharidosis VII. 10th annual meeting of the gene therapy 2004, 8月5日、東京

H. 知的財産権の出願・登録

本年度は特に予定していない。

分担研究課題:新しい新生児マス・スクリーニング体制に関する研究

喘鳴、呼吸不全で発症したグルタル酸尿症 2 型の 1 例
—タンデムマス質量分析による新生児スクリーニングの有用性の検討—

研究要旨

4 ヶ月時に重度の呼吸器症状で発症、気管内挿管下の長期臥床により重度の筋力低下をきたし、特徴的顔貌(細長い顔つき、テント状上口唇)より先天性ミオパチーが疑われたグルタル酸尿症 2 型(GA2)を経験した。GA2 は、複数部位の Acyl-CoA 脱水素酵素が同時に障害される疾患であり、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化障害(Mitochondrial fatty acid β-oxidation disorders)の 1 つである。GA2 では、感染症などのストレスを契機に、筋力低下、肝腫大、高アンモニア血症、高 CK 血症、低血糖、代謝性アシドーシスなどの症状で発症したという報告が、特に乳児を中心にみられるが、その筋力低下は約 1 週間から 1 ヶ月程度で軽快している。本症例は長期で重篤な筋症状を伴った為当初先天性ミオパチーも疑われた。GA2 はタンデムマス質量分析計を用いた新生児スクリーニングで発見が可能であり、このような症例を早期に発見するためにも全国レベルでの早期実施が望まれる。

研究協力者

大浦敏博(助教授)、廣瀬三重子、坂本修(助手)、
飯沼一字(教授)
(東北大学大学院小児病態学分野)

験したのでその詳細を報告する。さらに本症例において新生児期にタンデムマス質量分析(TMS)によるスクリーニングが実施されていれば早期発見が可能であったかどうかを新生児期に採取されたろし血を用いて検討した。

A. 研究目的

グルタル酸尿症 2 型(GA2)は、複数部位の Acyl-CoA 脱水素酵素が同時に障害される疾患であり、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化障害(Mitochondrial fatty acid β-oxidation disorders; FAODs)の 1 つである。現在までに、本邦で報告されている GA2 患者は、1985 年から 2000 年までで 14 例と極めて稀な疾患である。FAODs は、Reye 症候群、乳児突然死症候群、乳幼児突発性危急事態(Acute life threatening events; ALTE)様の疾患の原因の 1 つと考えられている。GA2 も Reye 症候群様症状で発症することが多く、一旦発症した場合は不幸な転帰をとるため早期発見、発症予防が求められている。我々は喘鳴、呼吸不全で発症し、長期の挿管管理を余儀なくされた結果高度の筋力低下を合併した GA2 を経

B. 症例報告

主訴:喘鳴、呼吸不全、先天性ミオパチー疑い

周産歴:

在胎 40 週 2 日、自然分娩にて出生。出生体重 2444g。羊水混濁著明で、Apgar score 3/6。出生後、多呼吸、非胆汁性嘔吐のため、近医 NICU へ搬送入院。日齢 3 には全身状態良好となり、日齢 5 で母子ともに退院した。4 ヶ月検診では、体重増加良好で、追視、笑顔あり。定頸はやや不完全であった。

現病歴:

生後 5 日目ごろから時に喘鳴を認めていた。2003 年 8 月 9 日(生後 4 ヶ月)、啼泣時・睡眠時に吸気性喘鳴が出現。8 月 18 日近医にて気管支炎と診断。8 月 20 日吸気性喘鳴増悪し、哺乳量も 20-40ml/回に

低下。8月21日発熱 38°C、吸気性喘鳴著明にて、近医小児科を受診。上気道狭窄の疑いにて入院した。

入院後の経過:

前医入院時は、体温 38.0°C、SaO₂ 94%。吸気性喘鳴著明。意識は清明。胸部 X 線上は肺炎像なし。Nasal airway 挿入後も吸気性喘鳴は改善しなかった。8月30日哺乳時の嘔吐後に呼吸状態悪化したため、気管内挿管を行ないIMV管理となった。8月30日の血液ガス分析で Anion Gap 29.1 と開大を認めていたが、アシドーシスはなく有機酸分析等は実施されなかった。9月に自己抜管した際は、吸気性喘鳴が強く、再挿管を必要としたが、徐々に呼吸状態は改善し、11月12日に抜管できた。挿管直後は、四肢・頭部の自発運動は殆どみられず、腱反射も消失。9月下旬より、上下肢の抗重力運動が見られるようになり、徐々に抗重力運動が可能となったが、年齢と比較して、筋力低下は極めて著明であった。精査目的にて生後7ヶ月時に当科転院となった。

当科入院時所見 (生後7ヶ月):

身長 68cm、体重 6kg。周囲に対する反応は良好。高口蓋や細長い顔つき、テント状上口唇などのミオパチー様顔貌を認めた。呼吸音清明、吸気性喘鳴を聴取。肝を1横指触知。追視あり。視性・聴性瞬目は正常。舌の線維束攣縮なし。上下肢ともに筋トーンス低下、スカーフ徴候あり。深部腱反射は上下肢ともに消失。病的反射なし。背臥位では frog posture を呈した。頭部は右向きが多いが、頭部自発運動はゆっくりなら可能。目と手の協調運動は正常。上肢は垂直まで数秒ほど挙上可能。下肢は時に膝を曲げ、踵を浮かせることが可能。引き起こし反射では、著明な頭部後屈と上肢過伸展を認めた。腹臥位では、頭部挙上は不可能。

検査所見:

血算、生化学検査、血液ガス分析、血中乳酸、ビリルビン正常。血中・尿中アミノ酸分析では特異的ピークなし。頭部MRI、脳波検査、聴性脳幹反応、視覚誘発電位は正常。11月25日筋生検を施行。結果は Oil red O 染色で筋線維中に著明な脂肪滴貯留を認めた。基礎疾患として FAODs が疑われた為脂肪酸

代謝関連の検査を施行した。血清カルニチン分画 ($\mu\text{mol/l}$) では、総カルニチン 59.4 (正常 45-91)、遊離カルニチン 38.2 (36-74)、アシルカルニチン 21.2 (6-23) と相対的なアシルカルニチンの増加を認めた。TMS を用いた血中アシルカルニチン分析では C4 から C18:1 のアシルカルニチンの増加を認め、グルタル酸尿症 2 型が疑われた。ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた尿中有機酸分析ではエチルマロン酸、イソバレリルグリシン、グルタル酸、2-ヒドロキシグルタル酸の排泄増加、および非ケトン性ジカルボン酸尿の所見も認められた。さらに短鎖・中鎖脂肪酸の代謝異常で見られる代謝産物の上昇も認められ、アシルカルニチン分析の結果と合わせてグルタル酸尿症 2 型 (GA2) と診断した。

経過:

当科入院後は、呼吸器症状は安定しており、酸素投与は必要としなかった。筋生検・尿中有機酸分析・血中アシルカルニチン分析などの結果から GA2 と診断されたため、12月22日より、リボフラビン 100mg/日、カルニチン 200mg/日の投与を開始。筋症状は12月4日腹臥位にて一瞬頭部挙上可能となり、12月12日手で足をつかむ動作、2004年1月7日初めて寝返り、2月13日「いないいないばあ」などの遊びが可能となるなど、入院後徐々に粗大運動の改善を認めた。同年2月14日退院。退院後も、徐々に発達・筋力は改善傾向にある。

新生児ろし血の TMS 分析:

室温に約 11ヶ月間保存されていた患児の新生児期に採取されたろし血を取り寄せ、TMS によるアシルカルニチン分析を実施した。C4-C18:1 アシルカルニチンの増加が見られ、新生児期の診断は可能と考えられた。

C. 考察

本症例では、気管内挿管を必要とするほどの呼吸障害で発症し、人工換気療法が施された。その後重度の筋力低下症状が認められ、テント状上口唇、細長い顔つきなどの特徴ある顔貌から先天性ミオパチーが疑われた。しかし、筋生検所見で多量の脂肪滴貯留を認めた為 FAODs が疑われ、血中アシルカル

ニチン分析、尿有機酸分析より GA2 と診断した。本邦において、GA2 初発時の症状として筋力低下を来たすものは多い。しかし、その筋力低下は約1週間から1-2ヶ月程度で軽快しており、本症例ほど長期で重篤な筋症状を伴った GA2 の報告はなく、極めて重症な経過をとった例と考えられる。また、GA2 のうち呼吸器症状で発症しているのは、新生児期発症が多く、ほとんどが致命的転帰をとっている。本症例の様に4ヶ月時に発症し長期間にわたって人工呼吸管理を必要とした報告はこれまでに認められず、非常に稀有な例と考えられる。

GA2 における筋力低下は、筋肉や神経の変性疾患ではなく、代謝異常によるエネルギー産生障害としての症状であり、ストレスの度合い、エネルギー消費の違いなど、個人差、年齢差が非常に大きい。通常は、急性期に脱力症状を来たした後、1週間から1ヶ月程度で筋力が回復することが多い。本症例は、呼吸状態の悪化より、呼吸管理を必要としたため、Midazolam による鎮静が行われていた。患児は生後4ヵ月時点では定額がやや遅れている程度の筋力低下であったが、挿管、鎮静、長期の臥床による修飾を受けたため、増悪を来たしたものと考えられる。また、GA2 の呼吸器症状の原因は、代謝性アシドーシスの補正、および呼吸筋を含む体幹筋の筋力低下によるものと考えられる。

GA2 は本邦では、稀有な疾患の1つであるが、急性発症し、筋力低下を来たす疾患の1つであり、また、本症例のように、いくつかの条件が重なると、長期にわたって重度の筋力低下を来たすこともあり鑑別診断上重要である。また GA2 は TMS を用いた新生児スクリーニングで早期発見が可能な疾患である。患児の新生児ろし血を用いたアシルカルニチン分析でもそのことは確認された。発症前に診断されれば頻回食、急性疾患罹患時の早期高張糖液の補給などにより急性発作を回避することは可能であり、TMS による新生児スクリーニングの早期実施が望まれる。

D. 結論

TMS を用いた新生児スクリーニングは GA2 の早期発見に有用であり、可及的速やかに実施されることが

望ましい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大浦敏博：マス・スクリーニング対象外疾患の発見—シトリン欠損症について—臨床的知見 小児内科 36 巻、12 号 1923-1927, 2004 年
- 2) 大浦敏博、岡野善行：シトリン欠損症スクリーニング. 小児科 45 巻 11 号 2014-2019, 2004 年
- 3) 大浦敏博、小林圭子、虻川大樹他：新生児マス・スクリーニングを契機に診断された citrin 欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) 2 症例の臨床経過. 日本マス・スクリーニング学会誌第 14 巻、1 号：47-52、2004 年
- 4) Yusaku Tazawa, Keiko Kobayashi, Toshihiro Ohura et al: Clinical heterogeneity of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: case reports from 16 patients. Mol Genet Metab (2004) 83: 213-219
- 5) Xue Yang, Osamu Sakamoto, Toshihiro Ohura et al: Mutation analysis of the MMAA and MMB genes in Japanese patients with vitamin B12-responsive methylmalonic academia: identification of a prevalent MMAA mutation: Mol Genet Metab (2004) 82: 329-333
- 6) Xue Yang, Osamu Sakamoto, Toshihiro Ohura et al: Mutation spectrum of the PCCA and PCCB genes in Japanese patients with propionic academia. Mol Genet Metab 81 (2004) 335-342

2. 学会発表

坂本修、大浦敏博、飯沼一字他：若年発症性脳梗塞を契機に21歳で発見されたホモシスチン尿症の1例。第32回日本マス・スクリーニング学会、仙台、平成16年10月8日。

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

脂肪酸代謝異常症の血中カルニチンについて

研究要旨：

今回血中カルニチン値測定の脂肪酸代謝異常症診断・治療における有用性について検討した。測定方法はカイノス社の総および遊離カルニチン測定試薬を用い、日立自動分析器 8070 に組み込み測定した。

カルニチントランスポーター欠損症ではフリーカルニチンが著しく低値であり、CPT I 欠損症ではフリーカルニチンがきわめて高値であった。筋型の CPT II 欠損症、VLCAD 欠損症などの症例では非発作時は血中カルニチン値は正常値である事が多い。

タンデムマスによる血中アシルカルニチンプロファイルの検討と組み合わせて検討することが重要であると考えられた。

研究協力者

高柳正樹（千葉県こども病院小児救急総合診療科部長）

A. 研究目的

各種の脂肪酸代謝異常症は血中カルニチン値の異常を示す事が多い。今回血中カルニチン値測定の脂肪酸代謝異常症診断・治療における有用性について検討した。

各種疾患の発作時の値の検討から血中フリーカルニチンが $20 \mu\text{mol/l}$ 以下になるとエネルギー危機発作が引き起こされる可能性が高いと思われた。

タンデムマスによる血中アシルカルニチンプロファイルの検討と組み合わせて検討することが重要であると考えられた。

B. 研究方法

血中カルニチン測定対象は私がこれまで経験した 39 例の先天性脂肪酸代謝障害症のうちの 26 例である。症例の一覧症を表 1 に示す。

血中カルニチンの測定方法はカイノス社の総および遊離カルニチン測定試薬を用い、日立自動分析器 8070 に組み込み測定した。測定原理は酵素サイクリング法である。

C. 研究結果

診断のついた脂肪酸代謝異常症においてはほとんどの症例で血中カルニチンは正常値を逸脱していた。ことにカルニチントランスポーター欠損症ではフリーカルニチンが著しく低値であり、CPT I 欠損症ではフリーカルニチンがきわめて高値であった。筋型の CPT II 欠損症、VLCAD などの症例では非発作時は血中カルニチン値は正常値である事が多い。

図 1 に測定した血中カルニチンの値を横軸にフリーカルニチン、縦軸にアシルカルニチンを取り二次元にて表示した。なお当院の正常としている値はフリーカルニチンは $41.3 \pm 15.6 \mu\text{mol/l}$ (mean \pm S.D.)、アシルカルニチンは $13.1 \pm 12.9 \mu\text{mol/l}$ (mean \pm S.D.) である。

D. 考案

最近タンデムマスが普及し血中アシルカルニチンプロファイルが比較的容易に測定できるようになってきたので、今回発表したカルニチンに二分画測定法の有用性は低くなるものと思われる。しかしカルニチントランスポーター欠損症や CPT I 酵素欠損症などいくつかの疾患では血中フリーカルニチン、アシルカルニチンを測定するのみで診断のおおよそのめどがつくものもある。今後タンデムマスによる血中アシルカルニチンプロファイルの検討と組み合わせて検討することが重要であると考えられた。

また各種疾患の発作時の値の検討から血中フリーカルニチンが $20 \mu\text{mol/l}$ 以下になるとエネルギー危機発作が引き起こされる可能性が高いと思われた。

E. 結論

先天性脂肪酸代謝異常症の診断においては、血中カルニチンの二分画測定とタンデムマスによる血中アシルカルニチンプロファイルの検討とを組み合わせて検討することが重要であると考えられた。

F. 研究発表

論文発表：

Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M. Selective screening for fatty

acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;792(1):63-72.

Ogawa E, Kanazawa M, Yamamoto S, Ohtsuka S, Ogawa A, Ohtake A, Takayanagi M, Kohno Y. Expression analysis of two mutations in carnitine palmitoyltransferase IA deficiency. *J Hum Genet.* 2002;47(7):342-7.

古田忍, 大矢紀昭, 太田茂, 高橋浩子, 近藤雅典, 高柳正樹, 小川恵美. 全身型 Carnitine palmitoyltransferase II 型欠損症の 1 例. *日本小児科学会雑誌* (0001-6543)106 巻 5 号 Page684-687(2002.05)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 各種脂肪酸代謝異常症の血中カルニチン値

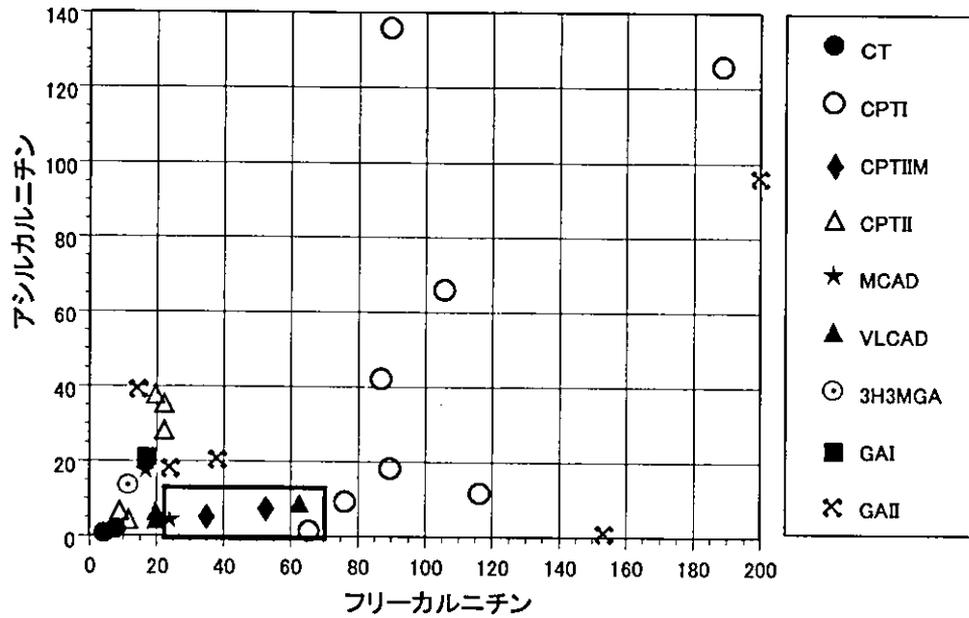


表1 当院で経験した脂肪酸代謝異常症症例数およびカルニチン測定症例数

疾患名	症例数	カルニチン測定症例数
カルニチントランスポーター欠損症	2	2
CPT I 欠損症	8	8
CPT II 欠損症	17	7
MCAD	2	2
VLCAD	4	2
グルタル酸尿症II型	6	5
合計	39	26

平成 16 年度厚生労働省科学研究費補助金（子ども家庭総合医療研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

有機酸代謝異常症、ミトコンドリア脂肪酸転送・ β 酸化障害の発症予防
および急性期管理に関する研究

研究要旨

有機酸代謝異常症、ミトコンドリア脂肪酸転送・ β 酸化障害の発症予防及び発症後の保存的急性期管理には種々の処置が試みられている。これまでに試みられているこれらの処置の有効性、問題点につき文献的考察を行った。その結果、有機酸代謝異常症に対しては 1. ブドウ糖輸液は体タンパク異化抑制効果を通じて有意義、かつ無害（ただし乳酸血症を合併する病態を除く）、2. L-カルニチンは有効または無効かつ無害、3. タンパク（先駆アミノ酸）制限は有効であるが、欠乏による副作用もありうる、また十分な熱量確保が前提である、4. ビタミン B12 依存性メチルマロン酸血症では補充すべき B12 の補酵素型はどれが良いか、検討の余地がある。また、ミトコンドリア脂肪酸転送・ β 酸化障害にたいしては、1. ブドウ糖輸液は脂肪酸動員抑制効果を通じて有意義、かつ無害、2. 脂肪の過剰摂取は避けるべきだが制限の効果はあきらかではない、3. (極)長鎖脂肪酸の酸化障害を伴う病態に対する中鎖脂肪酸の補充効果は明らかではない、4. L-カルニチンはその欠乏がある場合は有効であるが、長鎖脂肪酸の酸化障害を伴う病態では、過剰投与により病状の増悪を招く危険性がある。5. リボフラビンが有効な病態、症例もあるが多くの病態で無効である。

研究協力者

芳野 信（久留米大学医学部小児科学教室・教授）

渡辺順子（同・助手）

吉田一郎（久留米大学医学部医学教育学・教授）

B. 研究方法

文献上報告されている有機酸代謝異常症や MFAOD の治療法を分析し、改善の有無とその根拠を調査する。

A. 研究目的

有機酸代謝異常症、脂肪酸のミトコンドリア転送・ β -酸化障害（以下、“MFAOD”と略する）による疾患の発症予防には長時間の空腹をさけることが第一である。ここではそれ以外の発症予防・発症後の急性期の管理に関するこれまでに報告された治療的試みを再吟味し、その意義、副作用などについて再検討する。

C. 研究結果

1. 有機酸代謝異常症

1) ブドウ糖投与

ブドウ糖輸液は低血糖の治療、予防の意味以外に内因性インスリン分泌を刺激し体タンパク異化抑制効果があると考えられている。有機酸血症の急性増悪の場合、ブドウ糖輸液をしないことはないため、その効果はかえって確認されていない。しかし、過去のメープルシロップ尿症などの研究から体タンパク異化抑制効果ならびに、同化促進が欠損部位

の先駆アミノ酸の負荷軽減にきわめて効率が低いことが証明されている。唯一の潜在的注意点はマルチプルカルボキシラーゼ欠損症など高乳酸血症を伴う病態に対しては増悪させる危険性が否定できない。

2) タンパク (先駆アミノ酸) 制限

タンパク (先駆アミノ酸) 制限は有効であるが、その客観的指標は疾患毎に種々である。また必要以上の制限によって特定のアミノ酸の欠乏を引き起こし、それが体タンパクの同化阻害、さらに異化惹起による副作用もありうる。また十分な熱量確保が大前提であり、熱量が不足するとタンパク (先駆アミノ酸) 制限は無効である。

3) L-カルニチン補充

L-カルニチン補充は有機酸代謝異常症にはその欠乏がある場合、有効である。無効なばあいもあるが、少なくとも有害ではない。ただしグルタル酸尿症2型のように長鎖脂肪酸酸化障害をともなう病態では、MFAOD の項で述べる理由によってその過剰投与は病状の悪化を招く危険性が否定できない。

4) ビタミン依存症に対する補充補酵素の化学型

メチルマロニル-CoA ムターゼの補酵素はデオキシコバラミンである。したがってもしこの補酵素型の製剤が、分解されずに利用されれば、理論的にはこの化学型が最適である。しかし、今のところその証拠はない。欧米で使用されるヒドロクソコバラミンやシアノコバラミンとの有効性の比較はなされていない。ビタミン B12 依存性メチルマロン酸血症で補充すべき B12 の補酵素型はどれが良いか、検討の余地がある。いっぽう、ピオチニダーゼに対するピオチンの効果はあきらかである。

2. ミトコンドリア脂肪酸転送・ β 酸化障害(MFAOD)

1) ブドウ糖投与

ブドウ糖輸液の内因性インスリン分泌刺激効果は、タンパク質異化抑制以上に脂肪酸動員抑制効果は著明である。したがって MFAOD では、まず第一に行うべき処置である。そして今のところ問題となる副作用は知られていない。

2) L-カルニチンはその欠乏がある場合にその補充は有意義であり、必要である。いっぽう L-カルニチ

ンは長鎖脂肪酸のミトコンドリア間質側への転送に必須であるだけでなく、過剰に存在するときは促進効果がある。従って長鎖脂肪酸の酸化障害を伴う病態では、過剰な L-カルニチン投与により長鎖脂肪酸のミトコンドリア間質側への転送が亢進し、遊離の CoA がその酵素欠損部位の上流の脂肪酸アシル基とのエステル化に消費される結果、ミトコンドリア内の遊離の CoA が枯渇し、細胞のエネルギー代謝を阻害することが予測される。過去に L-カルニチンの過剰投与により病状が増悪した例が報告されている。

3) リボフラビン

リボフラビンが有効な病態、症例もあるが多くの場合、有効性は生化学的指標が主体で臨床的効果の評価は困難である。

D. 考察

症例数が少ないこと及び同一疾患でも個人差が大きいために、ある治療法の有効性の評価は困難である。いきおい、経験的な治療を行うことが多いがそれらの中でもブドウ糖投与は有効性がほぼ確立しており、更に副作用がない点で有機酸代謝異常症、MFAOD のいずれでも適応可能と考える。L-カルニチンは有機酸代謝異常症に対しての投与の考え方は、欠乏している L-カルニチンを補充し、生理的需要を回復するという考えと、生理的必要量以上の量を投与し、蓄積したアシル-CoA をそのカルニチンエステルとして排泄を促すという積極的な考え方がある。L-カルニチンを過剰に投与すると尿中のアシルカルニチン排泄が増加するのは事実である。いっぽうで長鎖脂肪酸のミトコンドリア間質側への転送促進がミトコンドリア間質側のホメオスタシスにどのような影響をあたえるかは未だに明らかでない。今後、L-カルニチンの、生理的必要量以上の投与については、その効果、副作用とも更に検討が必要であろう。この点は、長鎖脂肪酸の酸化障害を伴う MFAOD ではなおさらである。

E. 結論

有機酸代謝異常症、MFAOD のいずれに対しては、ブドウ糖投与と欠乏を補充する程度の量の L-カルニチン投与は確立した治療法といえる。生理的必要

量以上の投与の有効性は更に検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshino M Tokunaga Y, Watanabe Y, Yoshida I, Sakaguchi M, Hata I, Shigematsu Y, Kimura M, Yamaguchi S., Effect of supplementation with L-carnitine at a small dose on acylcarnitine profiles in serum and urine and the renal handling of acylcarnitines in a patient with multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation defect. J. Chromatogr. B 2003; 792 : 73-82.

芳野 信、原田英明、渡辺順子：メープルシロップ尿症 小児内科 小児疾患診療のための病態生理 2003 ; 35 : 322-326.

芳野 信：救急医療における先天代謝異常症—ありふれた徴候の背後に潜むもの。柳澤正義監修、市川光太郎編集、小児科外来診療のコツと落とし穴 5 小児救急、中山書店(東京) 2004 ; 94.

Wada N, Matsuishi T, Nonaka M, Naito E, Yoshino M. Pyruvate dehydrogenase E1 α subunit deficiency in a female patient: evidence of antenatal origin of brain damage and possible etiology of infantile spasms. Brain Dev 2004;26:57-60.

Shintaku H, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, Sugiyama N, Sakura N, Yoshida I, Yoshino M, Matsubara Y, Suzuki K, Aoki K, Kitagawa T. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. Pediatr Res 2004;55:425-430.

芳野 信、渡辺順子、中島正幸、片山幸樹、田崎隆二、梅橋豊蔵、Hsiao K-J:ボイトラー試験異常が契

機となって診断されたグルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症の男児例. 日本マス・スクリーニング学会誌 2004 ; 14 : 63.

芳野 信、徳永泰幸、渡辺順子、吉田一郎、畑 郁江、重松陽介、木村正彦、山口清次：グルタル酸尿症 II 型におけるアシルカルニチンの腎での handling. 日本先天代謝異常学会雑誌 2004 ; 20 : 214.

文森明代、吉田一郎、猪口隆洋、市川光太郎、廣瀬伸一、小林圭子、佐伯武頼、芳野 信、田中正敏：シトリン欠損症 (NICCD) における尿中 2-ヒドロキシイソ吉草酸の意義. 日本先天代謝異常学会雑誌 2004 ; 20 : 219.

2. 学会発表

西浦博史、熊谷優美、渡辺順子、芳野 信、猪口隆洋、吉田一郎、呉 繁夫、松原洋一：3-methylglutaconic acid 排泄増加を伴った糖原病 1a 型 第 106 回日本小児科学会学術集会 2003.4.25-4.27 (福岡)

渡辺順子、山下裕史郎、山本俊至、難波栄二、中島正幸、吉田一郎、松石豊次郎、芳野 信：セルロプラスミン遺伝子の 4 塩基欠失変異により生じた、錐体外路症状を伴う常染色体優性低セルロプラスミン血症の一家系

日本人類遺伝学会第 48 回大会 2003.10.21-10.24 (長崎)

Yoshino M, Watanabe Y, Yoshida I, Kobayashi K, Saeki T: 9th International Congress on Inborn Errors of Metabolism, 2003 UCD Satellite meeting 'New developments in urea cycle disorders'. 'Long-term follow-up of a patient with citrin deficiency'

31 August -1 September 2003, Sydney

芳野 信、徳永泰幸、渡辺順子、吉田一郎、畑 郁江、重松陽介、木村正彦、山口清次：グルタル酸尿症Ⅱ型におけるアシルカルニチンの腎での handling 第 47 回 日本先天代謝異常学会 2004. 11. 11-13 (宇都宮)

文森明代、吉田一郎、猪口隆洋、市川光太郎、廣瀬伸一、小林圭子、佐伯武頼、芳野 信、田中正敏：シトリン欠損症 (NICCD) における尿中 2-ヒドロキシイソ吉草酸の意義 第 47 回 日本先天代謝異常学会 2004. 11. 11-13 (宇都宮)

片山幸樹、中島正幸、渡辺順子、芳野 信：ポイトラー試験異常が契機となって発見されたグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 欠損症の男児例 第 432 回日本小児科学会福岡地方会例会 2004. 12. 11

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他