

ながら」データを秘匿するのではなく、国家的な視野で一元的に集計・管理するシステムを確立することがのぞまれる。

E. 結論

新生児マススクリーニング対象疾患患児の長期追跡調査を実施するための効率的なシステム構築について課題を検討した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Sakurai M, Cavé H, Verloes A, Nishio K, Ohashi H, Kurosawa K, Okamoto N, Kawame H, Mizuno S, Kondoh T, Addor MC, Coeslier-Dieux A, Vincent-Delorme C, Tabayashi K, Aoki M, Kobayashi T, Guliyeva A, Kure S, Matsubara Y. Clinical manifestations in patients with SOS1 mutations range from Noonan syndrome to CFC syndrome. **J Hum Genet.** 53:834-41, 2008.
- 2) Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. **Hum Mutat.** 29:992-1006, 2008.
- 3) Inoue H, Kayano S, Aoki Y, Kure S, Yamada A, Hata A, Matsubara Y, Suzuki Y. Association of the GABRB3 gene with nonsyndromic oral clefts. **Cleft Palate Craniofac J.** 45:261-6, 2008.
- 4) Kojima-ishi K, Kure S, Ichinohe A, Shinka T, Narisawa A, Komatsuzaki S, Kanno J, Kamada F, Aoki Y, Yokoyama H, Oda M, Sugawara T, Mizoi K, Nakahara D, Matsubara Y. Model mice for mild-form glycine encephalopathy: behavioral and biochemical characterizations and efficacy of antagonists for the glycine binding site of N-methyl D-aspartate receptor. **Pediatr Res.** 64:228-33, 2008.
- 5) Aoki Y, Matsubara Y. Costello syndrome. In: **Inborn errors of Development**, 2nd ed. (eds. Epstein C, Erickson R, Wynshaw-Boris A), Oxford University Press, pp632-638, 2008.
- 6) Matsubara Y, Tada K. Hartnup disease. In: **Encyclopedic Reference of Molecular Mechanisms** (ed. Lange, R.), Springer-Verlag, Heidelberg (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

2008 年に発見されたタンデムマススクリーニング対象疾患の予後調査

研究要旨

タンデムマスによる新生児スクリーニングの有用性を明らかにするためには、有機酸・脂肪酸代謝異常症の自然歴の検討とスクリーニング発見例の予後の比較が重要である。2008 年に島根大学では 44 症例が新規に診断され、うち発症後診断例が 29 例、マススクリーニング発見例が 15 例であった。発症後診断例では 21% が死亡、24% に後遺症がみられており、治療中で予後が判断できない症例などを除くと正常発達を獲得した症例は 31% であった。特に新生児期に発症した 14 例（48%）では 6 例が死亡するなど予後不良であった。発症後に診断された脂肪酸代謝異常症は 4 例のみであったが、うち乳幼児期に突然の低血糖と意識障害で発症していた。一方マススクリーニング発見例は現在までいずれも正常発達を獲得していた。

また脂肪酸代謝異常症に焦点を当てて発症後診断群と発症前診断群について検討したところ、疾患頻度の順位は両群で同様なパターンを示すにもかかわらず、正常発達の獲得率は前者で 60%、後者で 100% と大きく異なっていた。さらに発症前診断群では、経過中に低血糖を示したが、早期の治療により特に障害を残さず回復した症例の存在が確認された。

以上の結果はタンデムマスによる新しい新生児マススクリーニングにより、特に脂肪酸代謝異常症において発症前診断が疾患の発症/障害予防に寄与することを強く示唆している。

研究協力者

長谷川有紀（島根大学小児科助教）
小林弘典（島根大学小児科助教）
斎藤敦郎（大田市立病院小児科医師）
虫本雄一（島根大学小児科大学院生）
山口清次（島根大学小児科教授）

A. 研究目的

タンデムマスによる新生児マススクリーニングの効果を評価するため、有機酸・脂肪酸代謝異常症の自然歴を明らかにすることが必要である。2008 年に当科で診断した先天代謝異常症例の自然歴を検討し、2007 年までの診断症例と比較した。さらに脂肪酸代謝異常症において、発症後診断例と発症前にスクリーニングで診断された症例の予後を比較分析した。

B. 研究方法

1) 有機酸・脂肪酸代謝異常症の発症形態と予後
2007 年 12 月から 2008 年 11 月に当科で診断され、2007 年末時点で予後の明らかな症例について各疾患の発症時期と初発症状、および予後について検討した。

2) 脂肪酸代謝異常症例における、発症後診断群と発症前診断群の予後

2001 年以降に発見された脂肪酸代謝異常症例のみを取り上げ、発症後に診断された症例との予後を比較した。

C. 研究結果

1) 有機酸・脂肪酸代謝異常症の発症形態と予後
2007 年 12 月から 2008 年 11 月に当科で診断された症例は 44 症例であった。うち発症後診断例が 29 例（有機酸代謝異常症 25 例、脂肪酸代謝異常症 4 例）、マススクリーニング発見例が 15 例であった。

発症後診断 29 例のうち新生児発症は 14 症例 (48%) で、これらは哺乳不良や嘔吐、意識障害といった非特異的な症状で発症していた。しかし脂肪酸代謝異常症だけに焦点を当てると 4 例中 3 例が乳幼児期の発症であり、初発症状は 3 例とも突然の低血糖と意識障害であった。これらの症例は当初、急性脳症や乳幼児突発性危急事態 (ALTE) として、分析を依頼されていた。

予後は治療などでまだ判断できない 7 例を除き、6 例 (21%) が死亡、7 例 (24%) に後遺症がみられており、正常発達を獲得したのは 9 例 (31%) のみであった。さらに死亡した 6 例はいずれも新生児期発症例であった。

一方、マススクリーニング発見例 15 例はいずれも現在まで正常発達を獲得していた。

2) 脂肪酸代謝異常症例における、発症後診断群と発症前診断群の予後

2001 年から 2008 年 11 月までに診断された症例は計 51 例であった。うち発症後診断例は 30 症例であった (図 1)。内訳は極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症が 10 例と最も多く、次いで中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 7 例、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) -2 欠損症 4 例などとなっていた。

30 例中 19 例 (63%) が生後 1 か月から 2 歳までに発症しており、また 30 例中 20 例 (67%) が感染や長期間の飢餓に伴う急性脳症様の発作を初発症状としていた。予後は、後遺症を残した症例が 30 例中 5 例 (17%)、死亡例が 7 例 (23%) で、正常発達を獲得できたのは 18 例 (60%) であった。

発症前にタンデムマススクリーニングで診断された症例は計 21 例であった (図 2)。内訳は MCAD 欠損症が 6 例、VLCAD 欠損症 5 例、CPT-2 欠損症 4 例の順番であり、診断後症例と似通っていた。

しかし予後については、発症前診断群では食事間隔を開けすぎないなどの生活指導や一部カルニチン補充などが行われていたため、感染時などに一過性に低血糖を生じた例などがあっても早

期に治療がなされ、全例で正常発達を獲得していた。

D. 考察と結論

今回の研究で以下のことが明らかとなった。

ア) 発症後診断例の発症時期: 2008 年に診断された 29 症例のうち、新生児期発症は 48% と最も高く、年齢が高くなるほど減少した。しかし脂肪酸代謝異常症 (FAOD) だけを見ると、4 例のみの検討ではあるが 3 例 (75%) が乳幼児期に発症しており、有機酸代謝異常症に比べて遅い傾向にあった。さらに乳幼児期発症の 3 例は全て突然の低血糖と強い意識障害を呈しており、乳幼児突発性危急事態 (ALTE) と判断されていた症例もあった。このことは乳幼児突然死症候群 (SIDS) に脂肪酸代謝異常症が含まれている可能性も示唆する。

イ) 予後: 発症後診断例では正常発達を獲得した例が 29 例中 9 例 (31%) にとどまったのに対し、マススクリーニング発見例 15 例はすべてが正常に発達しており、マススクリーニングが予後の改善に役立つことが示唆された。

ウ) 脂肪酸代謝異常症例における、発症後診断群と発症前診断群の予後: 発症後診断群では正常発達を獲得した症例は全体の 60% であったのに対し、発症前診断群では全てが正常発達を獲得していた。欧米での検討で、MCAD 欠損症の場合、診断数のおよそ半数が未発症例と言われている。仮に脂肪酸代謝異常症の半数が未発症であったとしても、残りの半数は自然歴の検討から、放置しておけば乳幼児期に急性脳症や ALTE として発症した可能性が高い。実際、発症前診断群において感染時に低血糖を生じたが、早期治療によって障害の発生もなく、軽快した症例が認められた。どの患者が発症し、どの患者が未発症で一生を過ごすのかを見極める手段はないこと、脂肪酸代謝異常症と診断できれば生活指導やカルニチン補充といった治療で重篤な発作を防ぎ得ることから、タンデムマススクリーニングは少なくとも脂肪酸代謝

異常症の発症予防・障害予防に非常に有用なツールであると考え。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 真々田容子, 村田敬寛, 谷口歩美, 長谷川有紀, 鈴木徹臣, 幸田恭子, 那須野聖人, 渡邊敏明, 山口清次, 石黒精: 牛乳蛋白アレルギー児に発症したアミノ酸調整粉末哺育によるビオチン欠乏症. アレルギー 2008, 57: 552-557
- 2) 神田貴行, 堀向健太, 井上岳彦, 村上潤, 小林弘典, 長谷川有紀, 林篤, 山口清次, 神崎晋: 間歇的な抗生物質投与との関連が疑われた低カルニチン血症の 1 例. 小児科診療 2008, 71:1053-1056
- 3) 山田健治, 小林弘典, 遠藤充, 長谷川有紀, 白石英幸, 山口清次: ビボキシル基をもつセフェム系抗菌薬 11 日間投与後に 2 次性カルニチン欠乏症を来した 2 歳男児例日本小児科学会雑誌 2008, 112:1382-1385
- 4) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Li H, Fukuda S, Shigematsu Y, Fukao T, Yamaguchi S.: A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD): c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD. Mol Genet Metab. 2009, 96:77-9

2009, 96:77-9

- 5) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yamaguchi S: Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency. Mol Genet Metab. 2008, 95:46-51
- 6) Tajima G, Sakura N, Shirao K, Okada S, Tsumura M, Nishimura Y, Ono H, Hasegawa Y, Hata I, Naito E, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Kobayashi M.: Development of a new enzymatic diagnosis method for very-long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-hexadecenoyl-CoA production and its application in tandem mass spectrometry-based selective screening and newborn screening in Japan. Pediatr Res. 2008, 64:667-72
- 7) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamaguchi S.: Improvement of sample throughput using fast gas chromatography mass-spectrometry for biochemical diagnosis of organic acid disorders. Clin Chim Acta. 2008, 392:34-40

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

疾患(症例数)	0~1m	1m~12m	1y~2y	2y~6y	6y~
全身性カルニチン欠乏(3)		○		◎	○
CPT1 (1)				×	
CPT2 (4)	+	◎	◎◎		
VLCAD(10)		◎◎×××	◎	*	★★★
MTP (3)	××	◎			
MCAD (7)		◎◎	◎◎◎×	◎	
βKT (1)		◎			
HMG血症(1)		◎	◎		

◎: 発症時期(6例), ◎: 急性脳症(20例), * 骨髄腫(4例)
○: 経過良好(5例), ×: 死亡(7例)

図 1. 脂肪酸代謝異常症例の発症時期と予後 (N=30)

疾患(症例数)	0~1m	1m~12m	1y~2y	2y~6y	6y~
全身性カルニチン欠乏(3)		○○○			
CPT1 (3)			○	○○	
CPT2 (4)			○○○	○	
VLCAD(5)		○○		○○	○
MTP					
MCAD (6)	○	○○○	○	○	
βKT					
HMG血症					

○: 正常発達

図 2. タンデムマスマスクリーニングで発見された脂肪酸代謝異常症例の予後 (N=21)

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

タンデムマススクリーニング導入時の課題

- 自治体との関係、費用とその負担、効果的な実施に向けて -

研究要旨

【目的】タンデムマススクリーニングの導入で課題となっている自治体との関係及び費用に関する課題を明らかにして早期導入の方策を検討する。【方法】平成 17 年度～19 年度に実施した検査施設基準に関する検討結果から、自治体との連携と検査費用について再検討した。【結果と考察】新生児スクリーニングの実施主体である自治体の多くでは連絡協議会が設置されていないこと、専門化からの指導・助言を受ける機会が少ないこと、自治体の財政状況の悪化などから、現行スクリーニングの課題の解決ばかりでなく、新たなスクリーニング対象疾患の導入について政策決定できる自治体は少ない。このような問題の解決には、自治体に対して厚生労働省からの適切な助言・指導、関係学会からの働きかけ、スクリーニング検査実施施設からタンデムマスによる拡大スクリーニングの導入を積極的に働きかけることが重要である。タンデムマススクリーニングの導入に伴うコストは、既存スクリーニング対象疾患と合わせて行う場合は、年間 3 万人から 5 万人のスクリーニング検査施設では 1 件当たり 130 円程度の増で可能であり、タンデムマススクリーニングの効果を考えると費用対効果が高いことを自治体に理解してもらうことで早期導入を目指していくべきである。また、現行スクリーニングの対象疾患の見直しと優先順位の検討により、発見頻度が極めて低く、費用便益でも効果が低いとされているガラクトース血症のスクリーニングを中止することで、現在のコストでタンデムマススクリーニングを導入は可能である。次に、タンデムマススクリーニングを有料で実施した場合の問題点として、タンデムマススクリーニングのみ有料で実施する場合、無料で行われている現行スクリーニングとの整合性、現行スクリーニングの将来的な有料化、現行アミノ酸 3 疾患の取扱い、採血医療機関におけるインフォームドコンセントの取得、料金徴収事務の増加などの問題を解決しておく必要がある。

研究協力者

福士 勝（札幌市衛生研究所）
山口清次（島根大学小児科）

A. 研究目的

新生児マススクリーニングへのタンデムマススクリーニングの導入で課題となっている自治体との関係及び費用に関する課題を明らかにして早期導入の方策を検討した。

B. 研究方法

平成 17 年度から 19 年度の本研究班の新生児スクリーニング検査施設基準に関する報告及びその後の調査結果などをもとに自治体との連携の強化対策と検査費用について再検討した。検査費用では現行スクリーニング対象疾患の見直しによるタンデムマススクリーニングの導入の可能性についても検討した。

C. 研究結果

1) 現行スクリーニング実施体制及びタンデムマ

スクリーニングの導入における自治体の 問題点とその対策

現状の新生児スクリーニングでの自治体の問題点として、関係機関との協力体制の確立に必須である連絡協議会が設置されていないことが多いこと、専門家から適切な指導・助言を受ける機会が少ないこと、国（厚生労働省）からの通知・指導・助言がなければ新しい施策を開始することがほとんどないこと、自治体の財政状況の悪化していることなどがあり、現行スクリーニングの課題の解決ばかりでなく、新たなスクリーニング対象疾患の導入についても独自に施策を決定できる自治体は少ない。このような状況の解決には、厚生労働省から自治体に対して厚生労働科学研究の成果に基づいたタンデムマススクリーニングの重要性・有効性など積極的に情報提供していただくこと、関係学会（日本マス・スクリーニング学会、日本先天代謝異常学会）から自治体へタンデムマススクリーニングの実施を働きかけること、現行スクリーニング検査施設から委託元自治体へアミノ酸代謝異常3疾患の検査法としてタンデムマス法の導入とともに、タンデムマスによる拡大スクリーニングの導入を積極的に働きかけることが必要と考えられる。

2) タンデムマススクリーニング導入に伴うコストと対象疾患の見直し後のコスト（表）

タンデムマススクリーニングの導入に伴うコストは、既存スクリーニング対象疾患と合わせて行う場合は、年間3万人から5万人のスクリーニング検査施設では1件当たり120円から140円程度の増で可能である。また、現行スクリーニングの費用の範囲内でタンデムマススクリーニングを導入するためには、対象疾患の優先順位の見直しをしなければならない。疾患の発見頻度、費用便益から検討すると、頻度が極めて低く、費用効果も低いガラクトース血症のスクリーニングを中止した場合、現行スクリーニングの費用でタンデムマススクリーニングの導入が可能となる。

3) タンデムマススクリーニングを有料で実施した場合の問題点

タンデムマススクリーニングのみ有料で実施する場合、無料で行われている現行スクリーニングとの整合性、現行スクリーニングの将来的な有料化などの問題がある。特に検査機関が実施主体となって有料で行う場合は現行のスクリーニング対象疾患と別に実施することになり、現行アミノ酸3疾患の取扱い、採血医療機関におけるインフォームドコンセントの取得、料金徴収事務の増加などの問題を解決しておく必要がある。

D. 考察と結論

タンデムマススクリーニングの早期の効果的な実施に向けて取り組むべき要件として下記の事項への取組みが必要である。

1) 新生児スクリーニングを継続・拡大していくためには、自治体の取組みが強化されなければならないことから、厚生労働省、関係学会、検査機関が連携して新生児スクリーニングの重要性、タンデムマススクリーニングの効果について働きかける。

2) タンデムマススクリーニングの導入と新生児スクリーニング費用の適正化のためには、1検査施設で年間5万人の検査を行うことにより、現行6疾患のスクリーニングに130円程度の増加で可能となり、発見頻度が極めて低く、単独の検査法が必要なガラクトース血症を中止すると、現行検査費用の範囲内でも可能となることから、費用便益の観点から再検討されるべきである。

3) 新生児スクリーニングの有料化の是非

タンデムマススクリーニングの早期導入には有効な手段であるが、現行スクリーニングへの悪影響を及ぼさないようなシステム構築を図るべきである。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 富士 勝: タンデム質量分析計による新生児スクリーニングの検査施設基準に関する検討. 日本マス・スクリーニング学会誌 2008, 18:210-214

2. 学会発表

マス・スクリーニング学会，松江，2008.

- 1) 福士 勝：マス・スクリーニングで結ぶ医師、
行政、検査、患者家族の連携—検査施設のあり
方と検査・行政・医療機関の連携— 第 35 回

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

表 スクリーニング実施方法と検査費用
-ガラクトース血症スクリーニング継続の有無による検査費用の相違-

スクリーニング実施条件		検査費用(円/新生児)	
		3万人/年	5万人/年
現行6疾患の スクリーニング	ガラクトース血症(+)	2,621	2,347
	ガラクトース血症(-)	2,343	2,127
現行6疾患+ タンデムマススクリーニング	ガラクトース血症(+)	2,735	2,484
	ガラクトース血症(-)	2,457	2,264
タンデムマススクリーニング を現行スクリーニングと異なる 施設で実施した場合	先天性甲状腺機能低下症 副腎過形成症		
	ガラクトース血症(+)	2,016	1,795
	ガラクトース血症(-)	1,738	1,519
	アミノ酸3疾患 +タンデムマススクリーニング	1,350	1,284

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

タンデムマススクリーニングパイロット研究の今後のあり方・進め方
～陽性者発見時の対応と問題点

研究要旨

3年間の試験研究で42,540人を検査し、5名の患児を発見した。成果の得られた一方で化学診断、確定診断や治療上の問題点、プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症スクリーニングにおける問題点、非典型例の存在、家族への説明の難しさなど解決すべき点が明らかになってきた。タンデムマススクリーニングは多くの有機酸・脂肪酸代謝異常症の早期発見に有用であることが明らかにされたが、今後普及に当たりこの様な問題点を早急に改善する必要がある。

研究協力者

大浦敏博（仙台市立病院小児科）
坂本 修（東北大学大学院小児病態学分野）

果が得られた。頻度は約8,500人に1例となる。この試験研究を通してタンデムマススクリーニング実施に際しての問題点も明らかになってきた。

A. 研究目的

宮城県では平成17年度より島根大学小児科との共同研究でタンデムマススクリーニング試験研究を実施してきた。5名の患児を発見するという成果と共に改善すべき問題点も明らかになってきたので報告する。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

保護者への説明は分娩施設の医師により行われた。同意を取るに際しては、その目的、方法および異常が出たときの対応、予想される効果、危険性とそれに対する対処法、個人情報保護、検査費用、自由意志で撤回も可能でありそれによる不利益の無いことなどについて説明した。

書面で同意を得た検体は検査施設で分別され、従来の6項目のスクリーニング検査終了後、残りのろ紙血を週に1回島根大学小児科に発送し、タンデムマス質量分析計によるスクリーニングを行った。結果は島根大学より研究協力者の大浦にE-mailで連絡された。陽性検体が出た場合、大浦から直接分娩施設の担当者に連絡し、再採血、精検依頼を行った。

C. 研究結果と考察

3年間で42,540人を検査し、3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1欠損症、軽症型プロピオン酸血症をそれぞれ1名、極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症2名を発症前に発見する成

1. 化学診断の問題点

有機酸、脂肪酸代謝異常症の化学診断には尿ガスクロマトグラフィー質量分析、血中アシルカルニチン分析、カルニチン分画定量が必須である。しかし、いずれの検査も保険収載されていない。一部の研究機関に無料で委託するか、病院などの費用持ち出しで外注検査機関に測定を依頼しているのが現状である。精密検査を迅速に行うためにも保険収載が緊急の課題である。

また、これらの検査結果の解釈には高度の専門的知識が必要であり、専門医を結ぶ地域を越えた診断ネットワークが不可欠である。同時に医師、技術者向けの診断ガイドラインの作成も必要となる。

2. 確定診断の問題点

化学診断のみでは確定診断が付けられない症例に関しては細胞、臓器を用いた酵素学的診断や遺伝子診断が必要である。従来は研究の一環として多くは無料で行われてきたが、経済的問題、研究室の研究テーマの変更や担当者の異動により現在実施施設はほとんどない。最近、一部の遺伝子診断に関しては有料ではあるが可能となってきた（表）。今後より多くの疾患の酵素診断、遺伝子診断が保険収載されることが望まれる。詳細は<http://www.onj.jp/index.html>を参照されたい。

3. メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症

いずれも代表的有機酸代謝異常症であるが早

期診断にも関わらず予後の悪い例の存在や疑陽性が多いことを理由にドイツでは対象疾患から削除された。宮城県での3年間の試験研究では11例が精査対象となり、その内7例に黄疸の既往が認められた。疑陽性は3名のみで、残り8名は尿GCMS分析で異常代謝産物が検出されフォローされたが、量的にも微量で無症状であった。この内遺伝子診断で軽症プロピオン酸血症と診断された1例を除いては経過中尿所見も改善し一過性の異常であった。この様な治療不要の一過性の症例に対し過剰診断をしないように注意しなくてはならない。

4. 非典型例の存在

タンデムマススクリーニング実施以前では、患児は発症後診断される典型例がほとんどであった。タンデムマスでは軽症型プロピオン酸血症の如く軽症例、非典型例が発見される。非典型例は記載が少なく、自然予後も不明であり、新たな治療法の作成が必要である。

5. 治療上の問題点

対象疾患はいずれも希少疾患であり、専門家は少ない。各地域、ブロック毎にコンサルタント医師を指名し、経験の少ない主治医に会ってはその指導下に診断、治療を行うべきである。同時に治療ガイドラインの整備も必要となる。

治療薬のひとつであるエルカルチン[®]は現在プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症以外には保険適応がない。多くの有機酸・脂肪酸代謝異常でエルカルチン[®]は必要とされ、早期の適応拡大が望まれる。

ニチシノン、ベタイン、フェニル酪酸ナトリウムはそれぞれチロジン血症、ホモシスチン尿症、高アンモニア血症治療薬であるが国内では未承認である。速やかな承認が望まれる。

メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症では拒食のためしばしば経管栄養が必要である。しかし、特殊ミルク使用例では在宅成分栄養経管栄養法指導管理料が算定できないので改める必要がある。

6. 家族への説明の難しさ

従来のスクリーニング対象疾患であるPKUの場合、未治療では発育が障害されるが、早期治療による効果はほぼ100%保障されている。その為、説明は比較的容易である。一方重症型のプロピオン酸血症などでは早期発見されても予後は不良の場合が多くスクリーニングの効果は不十分である。脂肪酸代謝異常症では通常無症状であるが発熱や胃腸炎などで経口摂取が出来なくなると異化が亢進し低血糖、CPK上昇、急性脳症様症状が引き起こされる。発症予防には飢餓の防止が重要で、保護者へは食事間隔や代謝ストレス時の早期ブドウ糖補液を指導する。この際の説明の仕方によっては保護者が過度に心配しすぎることもあるし、逆に不十分な説明では大切な症状に気付かない場合もある。その為家族向けパンフレットなどを作成し、症例ごとに出来るだけ具体的な指示を出す必要がある。

D. 結論

タンデムマススクリーニングは現行の3アミノ酸代謝異常症に加え、20種類以上の有機酸・脂肪酸代謝異常症が発見される。宮城県での試験研究の成果を見ても有用性は明らかである。しかし、実施に当たっては改善する点も多く残されており、今後の課題である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

大浦敏博、坂本修：宮城県でのタンデムマススクリーニング試験研究の成果と浮かび上がった問題点。特殊ミルク情報第44号：43-46, 2008

2. 学会発表

坂本修、大浦敏博他：タンデムマス新生児スクリーニングでのC3、C3/C2の高値例の検討。第35回マス・スクリーニング学会、松江、2008。

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

グルタル酸尿症Ⅱ型 3 例の救急発症時治療法の検討

研究要旨

3 例のグルタル酸尿症Ⅱ型の急性発症時の治療などを比較検討し、その予後と比して検討した。

対象症例は 4Mo、12Mo、5Mo 時発症の 3 例。治療としては 3 例中 2 例にカルニチン、各種ビタミン（B1,B2,B12,C,E）などの投与が行われた。診断はそれぞれ発症後 4 日、1 日、当日に行われている。

予後を改善する要素として 1. 発症後の敏速な診断 2. 診断の付く前の各種ビタミン、カルニチンなどの投与 3. 代謝専門医の関与が考えられた。

4Mo、5Mo 発症症例にて新生児期の血液濾紙血でもグルタル酸尿症Ⅱ型の診断が可能であった。

新生児期のスクリーニングを行い、早期に治療が行われていれば発症の予防、早期の治療開始が可能となるものと考えられた。今回の検討から考えられた予後改善の要素から考えて、新生児期のスクリーニングが最大の予後改善法となるのではと考えられた。

研究協力者

高柳正樹（千葉県こども病院 代謝科）
村山 圭（千葉県こども病院 代謝科）
長坂博範（千葉県こども病院 代謝科）
木谷 豊（船橋市立医療センター 小児科）

3 症例の治療法、発症後確定診断までの日数、予後について検討した。

A. 研究目的

グルタル酸尿症Ⅱ型は症例によりその治療効果や長期予後が大きく異なる。われわれは 3 例のグルタル酸尿症Ⅱ型の急性発作時における治療を経験した。この 3 例の治療法をはじめとして、予後に関連すると考えられる要素を検討し、予後改善にかかわる要素を明らかにした。

B. 研究方法

対象症例：

発症 月令 治療病院 主訴

case1 4Mo 地域病院 嘔吐、意識障害、呼吸困難
2 12M 当院 意識障害、顔色不良
3 5Mo 専門医のいる病院 発熱、元気がない

C. 研究結果

治療法：

case1 気管内挿管、人工呼吸器管理、中心静脈確保、高濃度糖液、アルカリ剤、マニトール

case2 中心静脈、高濃度糖液、アルカリ剤、カルニチン、各種ビタミン（B1,B2,B12,C,E）、コエンザイム Q10

case3 中心静脈、高濃度糖液、アルカリ剤、カルニチン、各種ビタミン（B1,B2,B12,C）

発症後確定診断までの日数：case1 は発症後 4 日、2 は発症当日、3 は翌日 GC/MS にて診断がなされている。なお case1,3 は新生児期の血液濾紙血でもグルタル酸尿症Ⅱ型の診断が可能であった。

予後：case1 は重篤な中枢神経系の後遺症を残し、2 年後に繰り返す呼吸器感染により死亡した。Case2,3 はその後、急性発作の出現はなく、順調な身体的、神経学的発達をしている。

D. 考察と結論

予後を改善する要素として

1. 発症後の敏速な診断
2. 診断の付く前の各種ビタミン、カルニチンなどの投与
3. 先天代謝異常症専門医の関与

が考えられた。

Case 1、2、3とも、急性期を脱した後は、食事療法、薬物療法を行い、経過中一回も発作を認めていない。

Case1 は急性発作により引き起こされた重篤な中枢神経障害の合併症により死亡したものである。

新生児期のスクリーニングを行い、早期に診断が行われ治療が開始されていれば、発症の予防、早期の治療開始が可能となるものと考えられた。

今回の検討から考えられた予後改善の要素から考えて、新生児期のスクリーニングが最大の予後改善法となるのではと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高柳正樹、村山圭、高澤博道：無タンパク乳 S-23 を使用して食事療法を行った遅発型グルタル酸尿症 2 型の一女児例. 特殊ミルク情報、43 : 47-50, 2007

2. 学会発表

- 1) 木谷豊、高柳正樹、真山義民、村山圭、長坂博範：尿所見から脂肪酸代謝異常症が疑われ、グルタル酸尿症 2 型の診断に至った 1 例. 第 50 日本先天代謝異常学会. 米子, 2008

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

タンデムマス新生児スクリーニングの確定検査：
粗酵素診断＋分子遺伝学的診断

研究要旨

前年度に引き続き、リンパ球由来の粗酵素を用いた新生児スクリーニング陽性例の酵素診断を実施してきた。前年度報告分以降では 8 例（プロピオン酸血症(PA) 4 例、イソ吉草酸血症 1 例、MCAD 欠損症 3 例）の酵素診断依頼があり、うち PA 疑いの 1 例を除く 7 例を罹患と診断した。過去の陽性例に関して、SCAD 欠損症は粗酵素診断が困難であったため、変異酵素の発現系を作成して酵素活性を検討した。その結果、スクリーニング陽性 2 例の変異(3 種類)の残存活性が、いずれも野生型酵素の 10%内外に低下することを確認した。一方、SCAD における 2 種類の common variants は 50%程度の活性を示した。さらに免疫染色を試みたところ、変異酵素の細胞内局在が異なることも示唆された。我々はこれで直鎖アシル CoA 脱水素酵素 3 種（SCAD/MCAD/VLCAD）の酵素診断・遺伝子診断系を確立したことになる。今後、SCAD で試みた分子遺伝学的手法を用いて、粗酵素診断で高めの残存活性が観察される症例の診断精度向上や、日本人症例における phenotype-genotype 相関の検討などへの応用を進めたい。

研究協力者

佐倉伸夫（重症心身障害児施設鈴が峰病院長）
但馬剛（広島大学大学院小児科学助教）
白尾謙一郎（広島大学大学院小児科学大学院生）
津村弥来（広島大学大学院小児科学大学院生）
岡田賢（広島大学病院小児科医師）
西村裕（国立病院機構呉医療センター小児科医師）
小野浩明（県立広島病院小児科医師）
中常千代美（広島市医師会臨床検査センター）
渡川美弥子（広島市医師会臨床検査センター）
吉井千代子（広島市医師会臨床検査センター）
濱川以行（広島市医師会臨床検査センター）
畑郁江（福井大学医学部小児科助教）
重松陽介（福井大学医学部看護学教授）

A. 研究目的

前年度に引き続き、タンデムマス新生児スクリーニングの主な対象疾患陽性例の確定検査として、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を用いたリンパ球中の粗酵素活性測定の有用性を検討した。SCAD 欠損症の粗酵素診断は、ブチリル CoA に対する MCAD の活性が影響するため困難であったため、分子遺伝学的方法による解析を試みた。

B. 研究方法

1) 粗酵素診断

平成 20 年 1 月以降に、広島・福井・徳島県全県および国内各地で実施中のタンデムマス新生

児スクリーニングで陽性となった症例について、既報の方法で酵素活性を測定した（但馬剛，佐倉伸夫：日本マス・スクリーニング学会誌 16, 27-32, 2006）。

2) SCAD 欠損症の分子遺伝学的診断

プラスミド pcDNA 3.1 に予め myc His タグを組み込み、C 末端がラベルされた野生型 SCAD が得られるように作成した発現ベクターを基に、新生児スクリーニング陽性 2 例の変異（P55L, G108D, E344G）および既知の高頻度異型（R171W, G209S）について、各変異酵素の発現ベクターを作成した。これらを HEK 293 細胞に遺伝子導入して培養後、細胞破砕液中のブチリル CoA 脱水素活性を測定した。症例の複合ヘテロ変異を再現するよう、2 種類の変異を導入した培養細胞も作成し、同様に酵素活性を測定した。

変異 SCAD の細胞内局在を調べるため、各ベクターを U2OS 細胞導入して免疫染色を施行した（c-Myc に対して Alexa fluor 488 を、核に対して Hoechst 33342 を使用）。

C. 研究結果

1) 新規陽性例の酵素診断実績

前年度報告以降、広島県内では我々の酵素診断対象疾患陽性例がなく、県外から 8 例（プロピオン酸血症(PA) 4 例、イソ吉草酸血症 1 例、MCAD 欠損症 3 例）の診断依頼があった。うち PA 疑いの 1 例を除く 7 例を罹患と診断した（表

1)。これらを加えた我々の全実績では、新生児スクリーニング陽性 44 例の酵素活性を測定して、31 例を罹患と診断した。

2) MCAD 欠損症・VLCAD 欠損症の酵素

診断法：臨床応用からの考察

直鎖脂肪酸のアシル CoA 脱水素酵素については、炭素鎖長に関して隣接する酵素の基質特異性に重複があるため、粗酵素系では活性低下を証明することが難しいとされてきたが、MCAD 欠損症と VLCAD 欠損症の酵素診断における問題は解決された。

VLCAD はミトコンドリア膜結合タンパクであることから、活性測定用の粗酵素調製には界面活性剤の添加が必要となるが、不添加で調製した粗酵素(SCAD, MCAD, LCAD などの活性は含まれるはず)ではパルミトイル CoA (C16) 脱水素反応産物が現れない。同じ膜酵素である ACAD9 の影響は否定できないが、遺伝子診断でも確定した欠損症例の残存活性は最低例では 5%程度となっており、リンパ球には実際上問題となるレベルの ACAD9 活性はないものと考えられる。

逆に MCAD の測定では VLCAD の影響は生じないが、同様にミトコンドリア基質に溶存する LCAD などは、オクタノイル CoA (C8) に対する代謝活性を示すはずである。しかし、449-452delCTGA homozygote の症例で、遺伝子型に矛盾のないゼロ活性という結果が得られており、粗酵素を用いたオクタノイル CoA 脱水素活性がそのまま MCAD 活性を反映していると考えられた。これは、各酵素の至適反応条件の違い、特に電子受容体との「相性」の差 (MCAD では ferrocenium ion を、他の酵素には phenazine methosulfate を使用) が、MCAD については好都合に働いているものと思われる。

3) SCAD 欠損症例の分子遺伝学的解析

新生児スクリーニング陽性例の 3 種類の変異酵素の残存活性は、いずれも野生型酵素の 10%前後に低下していることを確認した。2 種類の高頻度異型は 50%程度の活性を示した(図 1)。免疫染色では、野生型酵素はミトコンドリア内発現を支持する繊維状の分布が観察できるのに対し、変異酵素はドット状の蓄積が見られ、繊維状の分布をほとんど認めなかった。高頻度異型では、繊維状の分布も見られたが、野生型に比べると低頻度であった(図 2)。

D. 考察と結論

我々はこれで、直鎖アシル CoA 脱水素酵素 3 種 (SCAD/MCAD/VLCAD) の酵素診断・遺伝子診断系を確立したことになる。SCAD で試みた分子遺伝学的手法は、我々が目指し異にするが、粗酵素診断で高めの残存活性できた「簡便・迅速な」診断法とは趣旨をが観察される症例の診断精度向上や、日本人症例における phenotype-genotype 相関の検討への応用を進めたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tajima G, Sakura N, Shirao K, Okada S, Tsumura M, Nishimura Y, Ono H, Hasegawa Y, Hata I, Naito E, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Kobayashi M: Development of a new enzymatic diagnosis method for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-hexadecenoyl-CoA production and its application in tandem mass spectrometry-based selective screening and newborn screening in Japan. *Pediatr Res* 64: 667-672, 2008.
- 2) 但馬剛, 佐倉伸夫: タンデムマス新生児スクリーニング: 確定診断とフォローアップにおける問題点. *日本マス・スクリーニング学会誌* 18, 17-22, 2008.

2. 学会発表

- 1) 但馬剛, 佐倉伸夫: メーブルシロップ尿症の酵素診断. 第 35 回 日本マス・スクリーニング学会. 松江, 2008.
- 2) 小野浩明, 但馬剛, 佐倉伸夫, 重松陽介: タンデムマス新生児スクリーニングの尿素サイクル異常症に対する有用性. 第 35 回 日本マス・スクリーニング学会. 松江, 2008.
- 3) 但馬剛, 白尾謙一郎, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介, 長谷川有紀, 木村正彦, 山口清次: 本邦初例と思われるエチルマロン酸脳症の 1 例. 第 50 回 日本先天代謝異常学会. 米子, 2008.
- 4) 白尾謙一郎, 但馬剛, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介: 短鎖アシル CoA 脱水素酵素 (SCAD) 欠損症の分子遺伝学的解析. 第 50 回 日本先天代謝異常学会. 米子, 2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表 1. 平成 20 年 1 月以降の酵素診断結果

疾患	陽性例数	活性低下	正常活性
プロピオン酸血症	4 (大阪 2) (静岡 1) (東京 1)	3	1
イソ吉草酸血症	1 (福井)	1	0
MCAD 欠損症	3 (東京 2) (熊本 1)	3	0
合計	8	7	1

図 1. HEK293 細胞で発現させた SCAD の
ブチリル CoA 脱水素活性測定結果

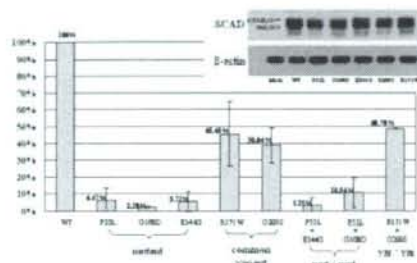
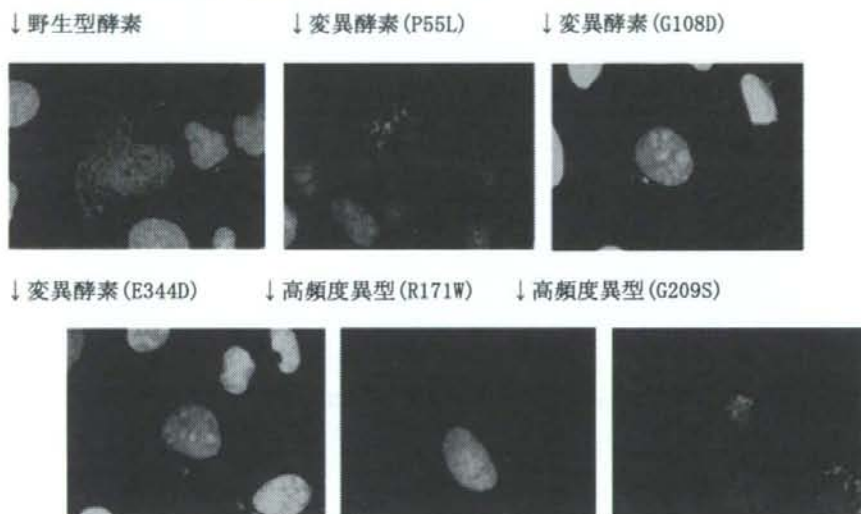


図 2. U2OS 細胞で発現させた SCAD の免疫染色像



分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

末梢リンパ球を用いた *in vitro* probe assay による脂肪酸 β 酸化能評価：
中鎖アシル CoA 脱水素酵素（MCAD）欠損症 3 例の検討

研究要旨

我々は脂肪酸代謝異常症スクリーニングの補助診断として、線維芽細胞とタンデム質量分析法（MS/MS）を用いた脂肪酸 β 酸化能を評価する *in vitro* probe assay 法を導入してきた。今回、線維芽細胞の代わりに末梢血リンパ球を用いた β 酸化能評価方法を検討した。対象は遺伝子検査で診断が確定された中鎖アシル CoA 脱水素酵素（MCAD）欠損症の 3 例。末梢血よりリンパ球を分離し、パルミチン酸を添加した培地で 120 時間培養後、培養液中のアシルカルニチンを MS/MS で分析した。MCAD 欠損症 3 症例では、C8-アシルカルニチンが 0.96、0.49、0.58 nmol/ml とコントロール（ 0.19 ± 0.07 nmol/ml）に比較して高値であった。アシルカルニチン間の比で見ると、C8/C10 比が対照と比べ差が最も大きかった（ $p < 0.01$ ）。リンパ球を用いた *in vitro* probe assay によって上記指標を用いれば MCAD 欠損症の診断が可能であることを確認した。

研究協力者

虫本雄一（島根大学小児科助教）
小林弘典（島根大学小児科助教）
長谷川有紀（島根大学小児科助教）
Jamiyan Purevsuren（島根大学小児科大学院生）
李 紅（島根大学小児科大学院生）
山口清次（島根大学小児科教授）

A. 研究目的

新生児マススクリーニングはガスリー法を中心とした従来の方法からタンデム質量分析法（MS/MS）に変わろうとしている。この方法により対象となる代謝異常症は、現行の 6 疾患から有機酸代謝異常症、アミノ酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症（fatty acid oxidation disorders: FAODs）を含む 20 疾患以上に増えるとされている。このうち FAODs は脂肪酸 β 酸化の障害により細胞中のエネルギーの枯渇を引き起こす。低血糖発作で発症することが多く、突然死や重度の障害を残す危険も指摘されている。

中鎖アシル CoA 脱水素酵素（MCAD）欠損症は、

ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化のうち主に炭素数（C）10 から 4 のアシル CoA を代謝する MCAD の異常によっておこる。欧米では 1~2 万に 1 人と最も頻度の高い先天性代謝異常症の一つであり、かつ突然死様の発症をすることで有名である。日本でのパイロットスタディによると約 10 万出生に 1 人の頻度と考えられている。MCAD 欠損症は、適切な生活指導、食事指導で良好な予後が期待でき、早期に発見することは健康な発育を維持するために重要である。

タンデムマス・スクリーニングによって、発見された患者の確定診断を迅速かつ正確に要求されるべきケースも増えることが予想される。我々はこれまで脂肪酸酸化異常症の酵素診断をするために患者の培養皮膚線維芽細胞と MS/MS によって β 酸化能を評価する *in vitro* probe assay を検討してきた。今回、皮膚線維芽細胞の代わりに、より簡便で侵襲が少ない末梢血リンパ球を用いて *in vitro* probe assay の有用性を検討した。

B. 対象と研究方法

1) 対象

MS/MSによるアシルカルニチン分析で異常を示し、遺伝子解析によりMCAD欠損症と確定診断した3例である。

2) 方法

既報の方法(A.Schulze-Bergkamen 2005)を一部改変して行った。静脈血5mlからリンパ球を分離し、パルミチン酸を加え培養した。120時間後に上清を採取しタンデムマスでアシルカルニチン分析を行った。

C. 研究結果

MCAD欠損症3例とコントロールのアシルカルニチンプロファイルを図1に示す。MCAD欠損症ではC8-アシルカルニチン(C8)が0.96、0.49、0.58 nmol/mlとコントロール(0.19±0.07 nmol/ml)に比べ高値であった。C8/C10比 4.58、6.08、3.49 nmol/ml(コントロール 0.98±0.13 nmol/ml)、C8/C6比 4.58、6.08、3.49 nmol/ml(コントロール 1.01±0.18 nmol/ml)、C8/C4比 7.69、6.18、4.30 nmol/ml(コントロール 1.05±0.45 nmol/ml)も高値を示した。コントロールとの有意差は、C8/C10比が $p=0.0068$ 、C8/C4比が $p=0.0330$ 、C8/C6比が $p=0.0377$ であった(表2)。C8/C14比 99.78、14.06、35.62 nmol/ml(コントロール 2.48±1.23 nmol/ml)と、C8/C2比 0.044、0.103、0.58 nmol/ml(コントロール 0.01±0.003 nmol/ml)ではコントロールと比較して高値を示したが有意差を認めなかった。

D. 考察と結論

今回の研究において、末梢血リンパ球を用いるin vitro probe assayによってMCAD欠損症の診断が可能であることを確認した。リンパ球を使用する方法は検体として約5mlの採血のみでよく、皮膚生検が必要なくなり非侵襲的で、線維芽細胞では1ヶ月近くかかっていた培養時間も短縮される。又、安定期には正常にみえる症例においても、in vitroで飢餓状態をつくることによってより正確な代謝能評価が可能である。

血中アシルカルニチン分析や尿中有機酸分析でFAODsが疑われた場合、遺伝子解析などの確定診断を行う必要がある。遺伝子検査はある程度専門的技術が必要であり、コストと時間がかかることが問題である。MCAD欠損症の酵素診断としてin vitro probe assay応用が可能であることを示した。本方法で補助診断を行うことにより、より疑わしい症例の確定診断を迅速に行うことが可能となる。

今回検討したMCAD欠損症症例では、長鎖脂肪酸であるパルミチン酸(C16)を添加した場合にコントロールと比較してC8の上昇を認め診断が可能であった。さらにC8/C10、C8/C6、C8/C4などのアシルカルニチン比をみることで、より診断精度を高めることができた。今回の検討では、MCAD欠損症症例とコントロールの値で最も差を認めたのはC8/C10比であった($p=0.0068$)。

我々はこれまでの線維芽細胞を使用した検討から、長鎖脂肪酸を添加しβ酸化の状態をMS/MSによって分析する方法が、脂肪酸代謝がどのレベルで障害されているかを評価できることを確認している。同様の理由により本方法でも、MCAD欠損症だけでなく他のFAODsの診断も可能である可能性が高い。今後の課題として、本方法では線維芽細胞を用いた場合と比較して再現性を確認できない点があげられる。EBウイルストランスフォームリンパ球様細胞の使用も検討しているが、cell line化した細胞での脂肪酸酸化能が通常の細胞と同じかどうかについての検討が必要であり、培養に時間がかかることも課題としてあげられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 虫本雄一、小林弘典、長谷川有紀、中村勇、山口清次:末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた日本人中鎖アシル CoA 脱水素酵素(MCAD)欠損症3例の脂肪酸β酸化能の検討。日本マススクリーニング学会誌 2008, 18:250-255

- 2) Jamiyan Purevsuren, Hironori Kobayashi, Yuki Hasegawa, et al: A Novel Molecular Aspect of Japanese Patients with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MCADD): 449-452delCTGA is a Common Mutation in Japanese Patients with MCADD. *Molecular Genetics and Metabolism* 2009, 96: 77-79
- 3) 虫本雄一、長谷川有紀、山口清次、田中主美、倉内宏一郎、山崎雄一: 原因不明の脳症と診断されていたグルタル酸血症1型の兄妹例. *特殊ミルク情報* 44: 23-26, 2008

2. 学会発表

- 1) 虫本雄一、小林弘典、李 紅、Jamiyan Purevsuren、長谷川有紀、山口清次: タンデムマス・スクリーニングにおける酵素評価: 末梢血リンパ球と

タンデムマスを用いた脂肪酸 β 酸化能の試み: 第35回マス・スクリーニング学会. 島根, 2008.

- 2) 虫本雄一、長谷川有紀、遠藤充、小林弘典、李 紅、Jamiyan Purevsuren、山口清次: 培養細胞とタンデムマスによる有機酸代謝異常症の酵素評価の試み: 第33回日本医用マススペクトル学会. 東京, 2008.
- 2) 虫本雄一、長谷川有紀、小林弘典、李 紅、Jamiyan Purevsuren、山口清次: 線維芽細胞とタンデムマスを用いたグルタル酸血症1型の酵素活性評価: 第50回日本先天代謝異常学会. 鳥取, 2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

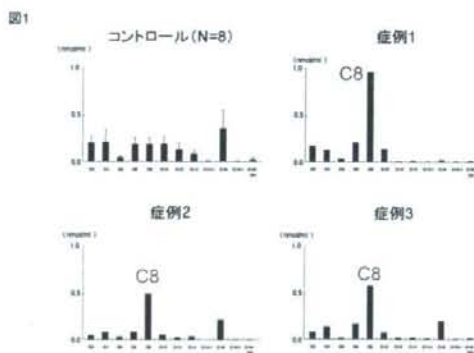


図1 タンデム質量分析によるアシルカルニチンプロファイル

リンパ球にパルミチン酸を添加し、

120時間培養後の培養液をタンデム質量分析計で分析した。

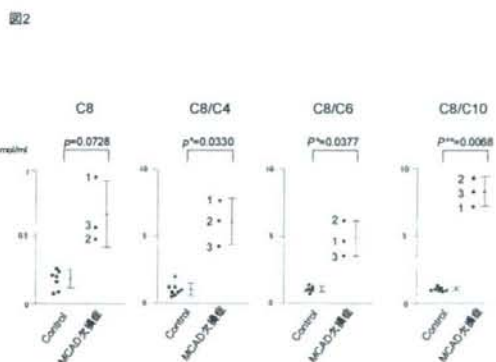


図2 中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症と Control におけるアシルカルニチンの比較

図内の数字は症例番号を示す

$p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

ミトコンドリア 3 頭酵素欠損症ミスセンス変異解析のための変異 cDNA 発現系の確立

研究要旨

ミトコンドリア 3 頭酵素(TFP)は 2 つの異なるサブユニット α と β からなるヘテロ 8 量体 ($\alpha 4 \beta 4$) をとり、長鎖エノイル-CoA ヒドラターゼ、長鎖 3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素 (以上 α サブユニット)、長鎖 3-ケトアシル CoA チオラーゼ活性 (β サブユニット) をもつ。我々は日本人 3 頭酵素欠損症の遺伝子解析を行い、いくつかのミスセンス変異を β サブユニットに同定した。ミスセンス変異の特徴を調べるためには、変異 cDNA の発現系が必要であり、今回それを構築した。Wild-type TFP の α および β の cDNA を正常細胞から PCR を用いて増幅し、pUC ベクターにサブクローニングして PCR エラーのないことを確認後、さらに pCAGGS 発現ベクターに挿入した。 β のミスセンス変異の発現ベクターも作成した。発現させる細胞は TFP 欠損症 (β 欠損) の線維芽細胞を SV40 で不死化して用いた。正常 TFPcDNA を TFP β cDNA と同時に導入することにより著しい活性の上昇が得られ (正常線維芽細胞活性の 4 倍程度)、変異 cDNA の残存活性評価が可能となった。

研究協力者

深尾敏幸 (岐阜大学 教授)

共同研究者

Jamiyan Purevsuren(島根大学 大学院生)

長谷川有紀 (島根大学 講師)

小林弘典 (島根大学 講師)

山口清次 (島根大学 教授)

ないことを確認後、さらに pCAGGS 発現ベクターに挿入した。 β サブユニットのミスセンス変異も pUC ベクター上で in vitro mutagenesis を行い、同様に pCAGGS ベクターに挿入した。発現させる細胞としてはバックグランド活性を抑えるため、TFP 欠損症 (β サブユニット欠損) の線維芽細胞を SV40 で不死化して用いた。導入はリポフェクタミンで行い、72 時間後に活性およびイムノプロットを行った。

A. 研究目的

ミトコンドリア 3 頭酵素(TFP)は 2 つの異なるサブユニット α と β からなるヘテロ 8 量体 ($\alpha 4 \beta 4$) をとり、3 つの酵素活性、長鎖エノイル-CoA ヒドラターゼ、長鎖 3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素、長鎖 3-ケトアシル CoA チオラーゼ活性をもつ。前 2 者が α サブユニットに、チオラーゼは β サブユニットにコードされている。この TFP は極長鎖アシル CoA 脱水素酵素とともに長鎖ミトコンドリア β 酸化系を構成している。我々は日本人 3 頭酵素欠損症の遺伝子解析を行い、いくつかのミスセンス変異を同定した。これまでのところ日本人の変異はすべて β サブユニットに存在している。これらのミスセンス変異の特徴を調べるためには、変異 cDNA の発現系が必要であり、今回それを構築した。

B. 研究方法

Wild-type TFP の α および β サブユニットの cDNA を正常細胞から PCR を用いて増幅し、pUC ベクターにサブクローニングして PCR エラーの

C. 研究結果

最初導入細胞には TFP の α サブユニットは正常であるので、 β サブユニットのみを導入してみたが、Wild-type β cDNA を発現させても 3-ケトパルミトイル-CoA チオラーゼ活性は正常線維芽細胞の活性の 1 / 5 以下の活性しか得られず、変異 cDNA 発現による残存活性評価はできなかった。そのため正常 α サブユニットの cDNA を同時に導入してみたところ、著しい活性の上昇が得られ Wild-type では正常線維芽細胞の活性の約 4 倍の活性が得られ、変異 cDNA の残存活性評価が可能となった。

D. 考察

遺伝子解析においては、同定されたミスセンス変異が病因となる変異であるかどうかを確認することが一般には必要である。遺伝子多型でないことはその population の 100 アレル程度に同定できないことから推測はできるが、疾患の重症度などよりよき理解のためには、やはり変異蛋白の特

徴をしらべることが重要となる。今回確立したシステムは非常に感度がよく有用であることがわかった。この系を用いた日本人変異についての解析の論文投稿を準備中である。

E. 結論

TFP はヘテロ 8 量体を形成することから、 β サブユニットの発現実験には wild-type の α サブユニットを十分補給する必要があり、Cotransfection で変異蛋白の評価が可能となった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yotsumoto Y, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Endo M, Fukao T, Yamaguchi S. Clinical and molecular investigations of Japanese cases of glutaric acidemia type 2. *Mol Genet Metab.* 2008 94(1):61-67
- 2) Fukao T, Boneh A, Aoki Y, Kondo N. A Novel Single-Base Substitution (c.1124A>G) that Activates a 5-Base Upstream Cryptic Splice Donor Site within Exon 11 in the Human Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase Gene. *Mol Genet Metab.* 94(4):417-421, 2008
- 3) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y; Fukuda S, Kobayashi H, Yamaguchi S: Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab* 95(1-2):46-51, 2008
- 4) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Li H, Fukuda S, Shigematsu Y, Fukao T, Yamaguchi S: A Novel Molecular Aspect of Japanese Patients with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MCADD): 449-452delCTGA is a Common Mutation in Japanese Patients with MCADD. *Mol Genet Metab* 96: 77-79, 2009

2. 学会発表

- 1) Fukao T, Zhang G, Matsuo N, Kondo N : CpG islands around exon 1 in succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene were hypomethylated even in human and mouse hepatic tissues where SCOT gene expression was completely suppressed. 2008 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. September 2-5, 2008.
- 2) Fukao T, Boneh A, Kondo N : A novel single-base substitution(c.1124A>G)that activates 5-base

upstream cryptic splice donor site within exon 11 in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. 2008 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. September 2-5, 2008.

- 3) プレブスレン ジャミヤン, 深尾敏幸, 長谷川有紀, 小林弘典, 福田誠司, 山口清次: Clinical and molecular investigations of 5 Japanese patients with MTP deficiency. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会. 米子, 2008.11.6-8
- 4) 久保寺訓子, 内山温, 長澤宏幸, 山本裕, 河野芳功, 深尾敏幸, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 安野哲彦: 新生児期発症のカルニチン/アシルカルニチントランスロカーゼ欠損症の 1 例. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会. 米子, 2008.11.6-8
- 5) 堀友博, 深尾敏幸, 小林弘典, 寺本 貴英, 高柳正樹, 遠藤充, 長谷川有紀, 安野哲彦, 山口清次, 近藤直実. CPT2 欠損症の初期カルニチン治療における血中および尿中アシルカルニチンの推移の検討. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会. 米子, 2008.11.6-8
- 6) 深尾敏幸, 櫻井里美, 近藤直実: T2 遺伝子の c.1124A>G(N375S)変異の特徴—スプライシング実験から. 第 111 回日本小児科学会学術集会. 東京, 2008.4.25-27

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制の検討

タンデムマス対象疾患の遺伝子診断
-CPT1 欠損症、CPT2 欠損症の変異解析例-

研究要旨

タンデム質量分析計（タンデムマス）による新しいマス・スクリーニングの今後の普及を考えるに当たり、タンデムマスがあくまでスクリーニング検査であることを考慮に入れる必要がある。つまりその後の確定診断までのシステムをいかに構築するかも考慮すべきテーマとなる。確定診断には生化学的診断、酵素学的診断、遺伝子診断などの方法が挙がるが、疾患ごとに有用な方法を選択する必要がある。

これまで我々はプロピオン酸血症、メチルマロン酸血症（B12 反応型、不応型）に関し、積極的に遺伝子解析を実施し、日本人患者における変異スペクトラムを明らかにしてきた。

今回、我々はマス・スクリーニング発見例の CPT1 欠損症、発症例の CPT2 欠損症に関し遺伝子診断を実施する機会を得たので報告する。

研究協力者

坂本 修（東北大学病院小児科講師）
大浦敏博（仙台市立病院小児科医長、
東北大学医学系研究科非常勤講師）

A. 研究目的

タンデム質量分析計（タンデムマス）によるマス・スクリーニングの普及を考えたとき、その診断の確定が重要になる。つまりタンデムマスそのものはスクリーニング検査であり、その後何らかの方法で診断を確定する必要がある。疾患ごとに生化学的診断、酵素学的診断、遺伝子診断など確定診断として選択すべきものが異なるものの、新しい新生児マススクリーニング体制という意味においては、確定診断を提供するシステムの構築をも考慮に入れる必要がある。

これまで我々はプロピオン酸血症、メチルマロン酸血症（B12 反応型、不応型）に関し、積極的に遺伝子解析を実施し、日本人患者における変異スペクトラムを明らかにしてきた。

今回、我々はマス・スクリーニング発見例の CPT1 欠損症、発症例の CPT2 欠損症に関し遺伝子

診断を実施する機会を得たので報告する。

B. 研究方法

1) 症例

<症例 1>3 歳女児。家族歴に特記事項なし。新生児タンデムマススクリーニングで遊離カルニチン高値(C0 105 μ M)及びアシルカルニチン低値(C16 0.09 μ M)から CPT1 欠損症が疑われ、1 か月時に受診した。初診時、肝腫大や筋緊張低下なく、検査所見では肝機能障害や代謝性アシドーシスを認めなかった。CPT1 酵素活性は正常対象の 11~26%に低下していた。低脂肪食に中鎖脂肪酸を補充する食事療法及び発熱時には早期に輸液を行うなどの低血糖予防により、重篤な症状なく経過している。

<症例 2>9 歳女児。幼児期に 2 回、発熱に伴う高度の筋痛で他院に入院した。今回、急性胃腸炎、マイコプラズマ感染症に伴い、CK10250IU と著明な上昇を認めた。AZM の投与と輸液療法で徐々に症状は改善し、第 7 病日には CK141IU と改善した。日常的にも筋痛が多かったとのことで、アシルカルニチン分析を実施したところ、長鎖ア