

カップ麺をよく与えていた。

現病歴

上気道炎による咳嗽のため食事摂取不良が2日間続いた後、呼吸窮迫、活気低下を認め、痙攣が出現。近医受診、呼吸循環不全と著明な代謝性アシドーシス、低血糖を認めた。糖補充、メイロン補正を行い、また挿管にて人工呼吸器管理、カテコラミンによる循環管理を開始し、当院に紹介搬送となった。

経過

発症時及び当院入院時の検査データを表1に示す。著明なケトアシドーシス、乳酸、アンモニアの上昇、高度な低血糖を認めた。有機酸代謝異常を疑い、高濃度糖液の輸液、Lカルニチン、ピオチン、メチコバル、安息香酸、アルギニンの投与を行った。呼吸循環状態および代謝不全が改善した後、自然蛋白を制限したミルクの注入を行った。以後ケトアシドーシスなく経過していたが、普通ミルクに変更し経口哺乳を進めたところ、注入量減量と同時期に咳嗽等の感冒症状出現、頻回嘔吐を認めケトアシドーシスが出現した。この感冒罹患時の尿中有機酸分析にて2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸の排泄を認めたことから、T2欠損症が疑われ、皮膚線維芽細胞の酵素診断により確定診断された。診断確定後は、摂取カロリーを80kcal/kg/day以上とし、自然蛋白摂取量2.0g/kg/day以下として投薬はLカルニチンのみとした。その後の状態は良好に経過している(図1)。発達は年齢相当で、遅滞は認めない。

診断確定のための検査結果

尿中有機酸分析および血中アシルカルニチン分析の結果を表2に示す。発症時の尿中有機酸分析ではチグリルグリシン、2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸などの特異的な上昇を認めず、血中アミノ酸分析、血中アシルカルニチン分画でも診断は困難だった。その後の感冒罹患・摂取カロリー低下時の尿中有機酸分析で、3-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸の排泄増加を認めたが、血中アシルカルニチン分析では、チグリルカルニチンの上昇を認めなかった。

末梢血より分離した培養リンパ球酵素活性でSCOT活性 14.6 nmol/min/mg proteinと低下は認めず、SCOT欠損症は否定的だった。皮膚線維芽細胞にてカリウム依存性アセトアセチル-CoA チオラーゼ活性を認めなかった。また、免疫ブロット法にて酵素タンパク量はコントロールの約1/4に低下していた。

皮膚線維芽細胞より抽出したゲノムDNAを用い、 β ケトチオラーゼをコードするACAT1遺伝子解析を既報の方法で行った。一方のアレルのACAT1遺伝子エクソン6にc. 556 G>T(D186Y)のミスセンス変異を、もう一方のアレルのエクソン10にアミノ酸置換を伴わない1塩基置換c. 951C>T(D317D)を、それぞれヘテロで認めた(図2)。発現実験の結果、エクソン10の1塩基置換は、スプライシング異常を来し、停止コドンc. 1011TAAを生じた。

D. 考察

一部の先天代謝異常症では、正常に発育していた乳幼児が感染や栄養の問題を契機に突然重篤な代謝不全を呈し発症することがある。一般に代謝予備能の少ない乳児においては、基礎疾患のない場合でも栄養の偏りや摂取量の低下は、ケトン血性低血糖症を来しやすい。本症例では新生児・乳児期早期には特に異常なく経過していたが、感冒と食事摂取不良により、生命が危ぶまれる呼吸循環不全を伴った重篤なケトアシドーシスに陥った。臨床的には、ケトアシドーシスの重症度が高度であったこととケトン体産生量が大量であったことから、基礎疾患としてケトン体代謝異常が予想された。生化学的検査では、特徴的な尿中チグリルグリシンと2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸の排泄増加が発症時には認められず、診断に苦慮した。しかし、その後のケトアシドーシス時に尿中有機酸分析にて2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸の上昇を認めたため、T2欠損症が疑われた。確定診断は皮膚線維芽細胞を用いたアセトアセチルCoAチオラーゼ(β ケトチオラーゼ)活性を認めなかったこと、遺伝子診断にて複合ヘテロ接合性変異を認めたことでなされた。遺伝子検査では、一方の変異がアミノ酸置換を伴わず、発現実験にてスプライシング異常を来することが確認された。これにより早期に停止コドンがはいることで短縮され機能を有さない酵素蛋白が合成されると考えられた。

本疾患では発作間欠期には臨床的にも生化学的にも異常を認めず、本症例でも発作間欠期は生化学検査異常は認めなかった。また、本症例の新生児マススクリーニング検査時の濾紙血、発作間欠期、発作時の検体のいずれも、特異的といわれるチグリルカルニチンの上昇は明らかではなく、新生児期の診断は困難であったと考えられた。生化学的診断においては、より精度の高い検査が求められ、また疑い例では繰り返し検索することが必要であると考えられた。

本疾患の臨床的予後は、適切な食事療法等により良好となるため、早期確定診断の重要性が示唆された。

E. 結論

T2欠損症の7ヶ月女児例について、臨床経過と診断上の問題点について検討した。重篤なケトアシドーシスを来した症例では積極的に本症を鑑別診断に入れ、生化学検査を繰り返し行うこと、皮膚線維芽細胞をも引いた酵素診断と遺伝子診断が必須であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayakawa K, Katsumata N, Abe K, Hirano M, Yoshikawa K, Ogata T, Horikawa R, Nagamine T. Wide range of biotin (Vitamin H) content in foodstuffs and powdered milks as assessed by

high-performance affinity chromatography. Clin Pediatr Endocrinol 18(1): 41-49, 2009

2. Kasahara M, Horikawa R, Sakamoto S, Shigeta T, Tanaka H, Fukuda A, Abe K, Yoshii K, Naiki Y, Kosaki R, Nakagawa A. Living donor liver transplantation for glycogen storage disease type Ib. Liver Transpl. 15(12): 1867-71, 2009.

3. Matsumoto H, Kajiwarra S, Ogura Y, Asano T, Horikawa R, Nonoyama S. A case of glycogen storage disease type Ib presenting with prolonged neonatal hypoglycaemia and minimal metabolic abnormalities. Acta Paediatr. Oct 19. [Epub] 2009

4. Sato S, Kasahara M, Fukuda A, Mizuguchi K, Nakagawa S, Muguruma T, Saito O, Karaki C, Nakagawa A, Yoshii K, Horikawa R. Liver transplantation in a patient with propionic acidemia requiring extra corporeal membrane oxygenation during severe metabolic decompensation. Pediatr Transplant. 13(6):790-3,2009.

2. 学会発表

1. 早期に生体肝移植を施行した carbamoyl phosphatase synthetase I 欠損症の 2 例 吉井啓介, 阿部清美, 綾部匡之, 磯島豪, 内木康博, 堀川玲子, 佐々木一成, 重田孝信, 福田晃也, 笠原群生 第 144 回日本小児科学会(奈良, 2009 年 4 月 18 日) 栄養状態改善により腎機能回復を認め、生体肝移植術を施行しえた OTC 欠損症の新生児発症 1 男児例 野田雅裕, 吉井啓介, 阿部清美, 内木康博, 堀川玲子 第 51

回日本先天代謝異常学会(東京, 2009 年 11 月 5 日)

2. 尿素サイクル異常 6 例に対するフェニル酪酸ナトリウムの使用経験 阿部清美, 吉井啓介, 野田雅裕, 内木康博, 堀川玲子, 笠原群生 第 51 回日本先天代謝異常学会(東京, 2009 年 11 月 5 日)

3. 尿素サイクル異常症、有機酸代謝異常症、肝型糖原病における肝移植治療指針の作成 堀川玲子, 中村公俊, 大浦敏博, 重松陽介, 依藤亨, 笠原群生, 伊藤秀一, 斉藤昭彦, 遠藤文彦 第 51 回日本先天代謝異常学会(東京, 2009 年 11 月 5 日)

4. β ケトチオラーゼ欠損症の分子病態: Exonic Splicing Enhancer 変異の解析 深尾俊幸, 堀川玲子, 内木康博, 田中藤樹, 近藤直実 第 51 回日本先天代謝異常学会(東京, 2009 年 11 月 5 日)

5. 当院の高インスリン血症性低血糖症の 4 例-診断、治療、予後の比較 吉井啓介, 野田雅裕, 阿部清美, 内木康博, 堀川玲子, 高安肇, 田中秀明, 本名俊郎 第 51 回日本先天代謝異常学会(東京, 2009 年 11 月 5 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 発症時検査所見

CRP 4.84 mg/dl	RBC 399 ×10 ⁴ /mm ³	検尿
Glu 8 mg/dl	WBC 4,870 /mm ³	SG 1.015
GOT 57 IU/L	Hb 11.3 g/dl	pH 6.0
GPT 24 IU/L	Hct 34.5 %	蛋白 300 mg/dl
LDH 762 IU/L	PLT 78.4 ×10 ⁴ /mm ³	糖 0 mg/dl
CPK 192 IU/L		ケトン 150 mg/dl
BUN 24 mg/dl	<u>静脈血ガス</u>	潜血 (2+)
CRE 0.47 mg/dl	pH 6.796	白血球 (-)
NH3 363 mg/dl	PCO ₂ 19.4 mmHg	細菌 (-)
Lac 6.3 mg/dl	HCO ₃ 2.8 mmol/L	亜硝酸塩 (-)
Na 143 mEq/l	B.E. -28.2 mmol/L	
K 5.4 mEq/l	AG 24.2 mmol/L	<u>髄液検査</u>
Cl 108 mEq/l	Glu 11 mg/dl	細胞数 14/3
Ca 10.9 mg/dl	Lac 0.7 mmol/L	単核 9/3
総ケトン体		多核 5/3
33480 μmol/L	<u>カルニチン2分画</u>	蛋白 112 mg/dl
β-ヒドロキシ酪酸	フリーカルニチン	糖 36 mg/dl
21680 μmol/L	19.7 μmol/L	Cl 126 mg/dl
アセト酢酸	アシルカルニチン	
11800 μmol/L	74.5 μmol/L	

表2 病期に伴った血中アシルカルニチン分析、尿中有機酸分析

	血中アシルカルニチン分析 (MS/MS)	尿中有機酸分析 (GC/MS)
発症時	—	3-ヒドロキシ酪酸の排泄増加を認め たが、特異的な反応は認めず。
発作間欠期	チグリルカルニチン (C5:1) の上昇なし。	異常を認めず。
発作期	チグリルカルニチン (C5:1) の上昇なし。	3ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸の排泄 増加 2メチル3ヒドロキシ酪酸の排泄増加
新生児 マススクリーニング	チグリルカルニチン (C5:1) の上昇なし。	—

図1 症例の発症時からの臨床経過

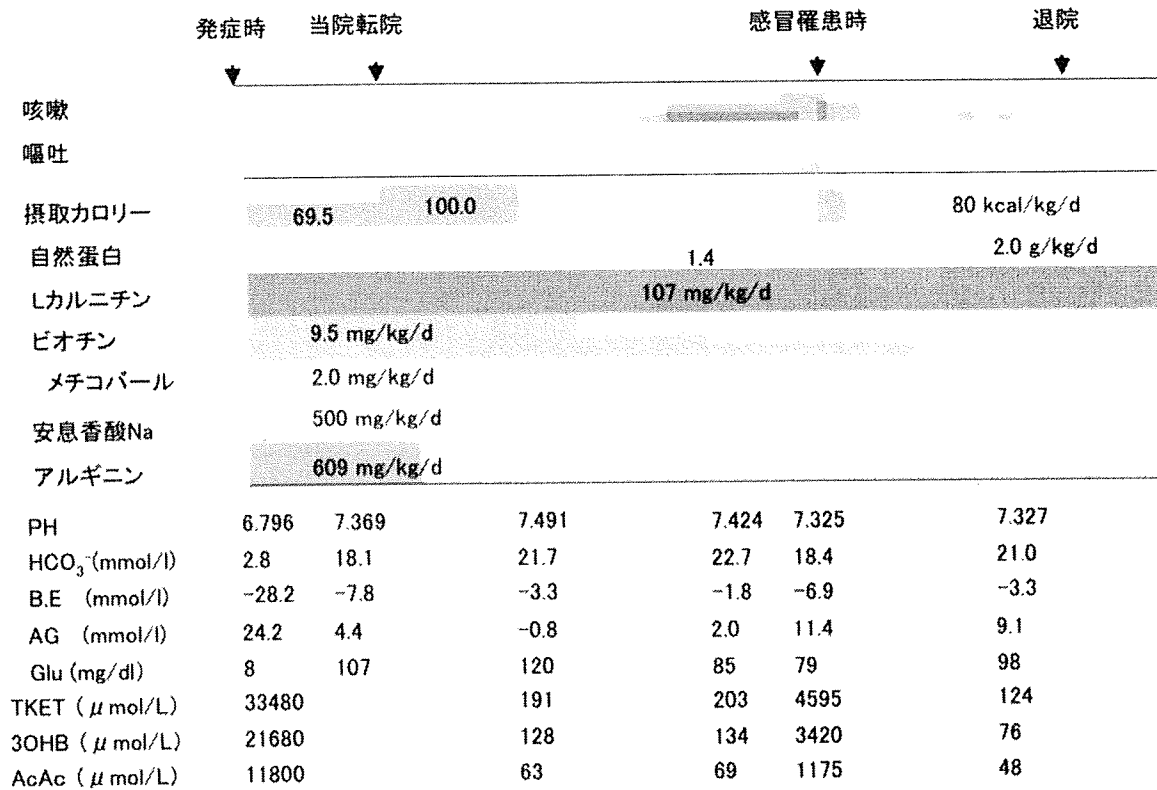
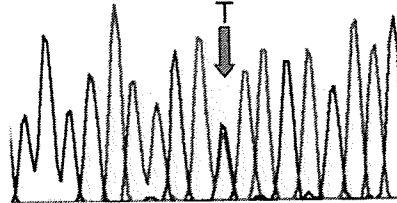


図2 皮膚線維芽細胞における ACAT1 遺伝子の解析

Exon 6

c. 556G>T
D186Y

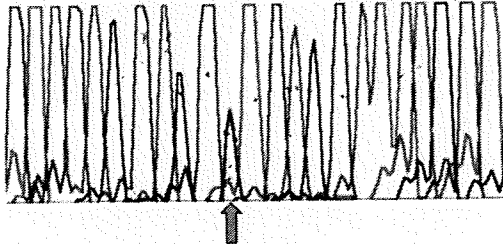
5'-GGGCTAACTGATGTCTAC-3'



Exon 10

GA⁹⁵¹C>GA⁹⁵¹T
D → D

← Exon 10 → Intron 9 ←
3'-GCTGTCGTCGCAGTCGTTTAC ga-5'
5'-CTACAGCAGCGTCAGCAAATG ct-3'



先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究

分担研究課題： β -ケトチオラーゼ欠損症の尿中有機酸分析
—急性期に指標物質が明確には確認できなかった症例—

分担研究者 高柳 正樹

所属

千葉県こども病院

研究要旨

β -ケトチオラーゼ欠損症の尿中有機酸分析について、急性期に指標物質が明確には確認できなかった症例の分析を通じて問題点を検討する。今回のわれわれの症例では急性期の尿中有機酸分析にて、3ヒドロキシ酪酸とアジピン酸葉明瞭に確認できたが、2メチル3ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、2メチルアセト酢酸、チグリルグリシンは確認できなかった。今回われわれの症例で明らかな指標物質が確認できなかった理由として、前処理法としてウレアーゼ法を用いていることから、これら物質が十分には抽出できなかった可能性が一番考えられた。

A. 研究目的

β -ケトチオラーゼ欠損症の尿中有機酸分析について、急性期に指標物質が明確には確認できなかった症例の分析を通じて問題点を検討する

B. 研究方法

症 例 S.Y. 2005年11月25日出生の女児

<主訴>痙攣、意識障害

<家族歴>血族婚なし。神経疾患なし。突然死なし。

<既往歴>在胎38週、3452gで出生。母が発熱、嘔吐、新生児仮死を認めたため、緊急帝王切開となる。仮死なし。黄疸のため光線療法を受ける。発達は正常。発育も正常。

<現病歴> 生後6ヶ月半で突発性発疹。その後2週間咳が続く近医で与薬を受けていた。呼吸が荒かったと母親は表現している。6月30日の明け方、患児が痙攣していることに気づき、救急病院へ搬送となった。

<身体所見> 体重8287g。

ICU入室時 体温35.8度。脈拍164。血圧104/64 胸部 右肺野で粗なcrackles, エア入りやや不良。心雑音なし。腹部 肝は右鎖骨中線にて3cm触れ、脾臓は触れない 皮膚 膨疹認めず。肛門部周囲の糜爛発赤あり。意識障害を認める
<検査結果BS8mg/dl NH₃ 363 μ g/dl Lactic 6.3mg/dl β hydroxybutyrate 21.68 mmol/l acetoacetate 11.8 mmol/l F-Carnitine 19.7 μ mol/l A-Carnitine 74.5 μ mol/l pH6.796 pCO₂ 19.4 Torr HCO₃⁻ 2.8mmol/l BE -28.2 Anion gap 29.2

<尿中有機酸分析>

尿0.1mlを使用し、ウレアーゼ法で前処理

した。ヒューレッドパッカーのガククロマトグラフィー質量分析計にてキャピラリーカラムを用いて、昇温分析法にて分析した、1回の分析時間は27分である。

(倫理面への配慮)

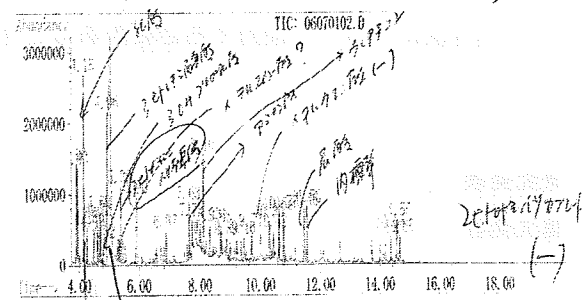
すべての検査は保護者の許可を得て行った。

C. 研究結果

<血中アミノ酸分析> Glutamine14.07/dl, Glycine 8.08mg/dl, Valine 9.73mg/dl, Isoleucine 4.07mg/dl, Leucine 8.44mg/dl, Lysine 14.03mg/dl と異常値を示した。

<尿中有機酸分析>

以下に症例の急性期の尿中有機酸分析のクロマトグラムを示す。



3ヒドロキシ酪酸とアジピン酸葉明瞭に確認できたが、2メチル3ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、2メチルアセト酢酸、チグリルグリシンは確認できなかった。

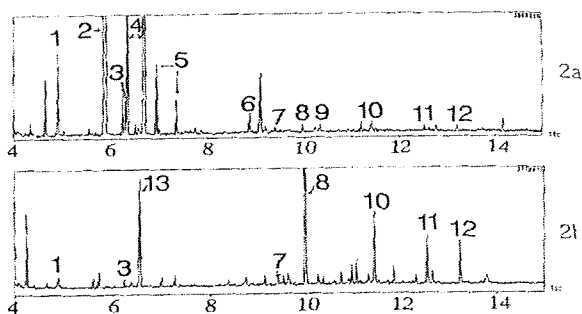
急性期の血中アシルカルニチンのMS/MS分析でもC5-OHやC5:1の異常値は確認できていない。

D. 考察

β -ケトチオラーゼ欠損症の急性期の尿中有機

酸分析においては、3ヒドロキシ酪酸、アジピン酸、2メチル3ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、2メチルアセト酢酸、チグリルグリシンが確認されることが多いとされる。

以下に浦沢林太朗ら（日本小児科学会雑誌 1999; 103: 849-852）が報告しているβ-ケトチオラーゼ欠損症症例の急性期の有機酸分析のクロマトグラムを示す



3ヒドロキシ酪酸2)、アジピン酸6)、2メチル3ヒドロキシ酪酸3)、アセト酢酸4)、2メチルアセト酢酸5)、チグリルグリシン7)

今回われわれの症例で明らかな指標物質が確認できなかった理由として、前処理法としてウレアーゼ法を用いていることから、これら物質が十分には抽出できなかった可能性はあると思われる。また分析時間もかなり短い分析法であるので、他のピークと重なった可能性もあるかと思われたが、各物質の特有な質量を用いて検索しているため、否定的である。

今後多くの症例についてその急性期、慢性期などで尿中有機酸のプロフィールを検討して、診断や治療効果の評価に役立てることが必要と考えられた。ことに前処理法に注目して検討する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

高柳正樹, 村山圭, 長坂博範, 真山義民, 鶴岡智子, 藤浪綾子. 先天性有機酸代謝異常症全国調査 (1990-1999) 日本マス・スクリーニング学会誌 19: 243-248, 2009.

藤浪綾子, 高柳正樹, 村山圭, 長坂博範. 米国ノースカロライナ州の新生児マススクリーニングにて発見された中鎖アシルカルニチン脱水素酵素 (MCAD)

欠損症日本人例 日本マス・スクリーニング学誌 19 227-231 2009

Kaji S, Murayama K, Nagata I, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohtake A, Iwasa H, Nishiyama M, Okazaki Y, Harashima H, Eitoku T, Yamamoto M, Matsushita H, Kitamoto K, Sakata S, Katayama T, Sugimoto S, Fujimoto Y, Murakami J, Kanzaki S, Shiraki K. Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol Genet Metab.* 97:292-6, 2009. Epub 2009 May 12

Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S. Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase capital I, Ukrainian (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain Dev.* 2009 Apr 2. [Epub ahead of print]

Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A. Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr.* 168(3):297-302. 2009

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究

分担研究課題：サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症の臨床像

分担研究者 新宅治夫 所属 大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学

研究要旨

Succinyl-CoA:3-Ketoacid CoA-transferase（以下 SCOT）欠損症は、乳児期に著しいケトアシドーシスで発症し死亡することもある、遺伝性ケトン体代謝異常症である。本症の報告はきわめて少なく、本邦と世界で報告されている 8 例について残存活性と予後について検討した。その結果、残存活性と予後に相関を認めため、少しでも本症が疑われた場合早期に酵素診断を行い、注意深い経過観察が必要と考えられた。

A. 研究目的

Succinyl-CoA:3-Ketoacid CoA-transferase（以下 SCOT）欠損症は、Acetoacetate を Aceto-acetyl-CoA に活性化する酵素の欠損で、乳児期に著しいケトアシドーシスで発症し死亡することもある、常染色体劣性遺伝形式のケトン体代謝異常症である。本症の報告は世界でも少なく、本邦での報告は数例のみである。世界で報告されている 5 例と我々の 3 例について残存活性と予後について検討したので報告する。

B. 研究方法

酵素活性の測定はリンパ球、皮膚繊維芽細胞、用いて行った。出生前診断は胎児絨毛と培養羊水細胞を用いて酵素活性の測定により行った。

（倫理面への配慮）

家族の希望により出生前診断の目的と手技について説明し同意を得て実施した。

C. 研究結果

下表の症例 1～5 はこれまでに世界で報告された 5 例で、症例 6 は 1994 年我々が発見した本邦初例、症例 7 は、その次子で出生前診断にて本症と診断したが両親の希望で妊娠継続し出生した第 2 例、症例 8 は 1999 年幼児期に発症し酵素活性の測定により SCOT 欠損症と診断した本邦第 3 例である。

D. 考察

SCOT 欠損症は意識消失を伴う重度のケトアシドーシス発作をおこすが、血糖、乳酸、アンモニア値はほぼ正常で、尿中有機酸分析でもケトン体の増加以外有機酸代謝異常の所見がないため、診断されないこともある。本症は新生時期から乳児期に発症し、残存活性の低いものは早期に発症し死亡している。残存活性が高い場合較的軽いと思われるが、症例 8 のように意識障

表. SCOT 欠損症 8 例の症状・予後と残存活性

症例	1	2	3	4	5	6	7	8
性別	M	M	M	F	F	M	F	M
血族結婚	-	+	-	+	+	-	-	-
発症月齢	2d	7	1	20	10	6	3	17
初発症状								
ケトアシドーシス	+	+	+	+	+	+	+	+
多呼吸	+	+	+	+	+	+	-	-
嘔吐	-	-	-	-	+	+	-	+
筋緊張低下	-	-	-	+	+	+	-	+
発作間欠期								
臨床症状	-	-	-	-	-	-	-	-
持続性ケトアシドーシス	+	+		+	+	+	+	+
予後	死	死	生	生	生	生	生	生
年齢	6m	21m	4y	3y	4y	6y	3y	2y
SCOT 活性	0	<5	20	22	23	14	15	24

1歳を越えて発症する事もあり、また症状は比
害をきたす重症のケトアシドーシス発作を繰り
返すこともある。

E. 結論

ケトアシドーシスを認め少しでも本症が疑わ
れた場合早期に酵素診断を行い、注意深い経過
観察が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究

分担研究課題： β -ケトチオラーゼ欠損症患者における血中アシルカルニチン分析

分担研究者 重松陽介

所属 福井大学医学部

研究要旨

β -ケトチオラーゼ欠損症の新生児マススクリーニングおよび化学診断の指標について、重症例 1 例と軽症例 4 例の濾紙血中アシルカルニチン濃度を分析した。重症例では、C5OH アシルカルニチン（2-methyl-3-hydroxybutyrylcarnitine）と C5:1 アシルカルニチン（tiglylcarnitine）の濃度が増加していたが、軽症例では C5OH アシルカルニチンのみ軽度上昇していた。新生児スクリーニングにおいては、軽症例での C5OH アシルカルニチン濃度上昇の程度では効率的にスクリーニングすることが困難であり、C5OH/C2 比を用いるとより精度の高いスクリーニング指標になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

β -ケトチオラーゼ欠損症（本症）においては、2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA と tiglyl-CoA が蓄積し、それぞれカルニチンと結合し C5OH アシルカルニチン（2-methyl-3-hydroxybutyrylcarnitine）と C5:1 アシルカルニチン（tiglylcarnitine）が増加することになる。その増加の程度は、イソロイシンの異化代謝の亢進の如何によって変化すると考えられ、実際に患児でその変化が検出できるかどうか、またどのような時期に検出できるかについてはまだ不明の点が多い。

今回、患児の濾紙血中のアシルカルニチンを分析し、上記診断指標物質の異常度を検討した。

B. 研究方法

タンデムマス・スクリーニングで実施している方法を用いて濾紙血中アシルカルニチンを分析した。即ち、96 穴マイクロプレートウエルに入れた直径 3 mm の乾燥濾紙血打抜き片に、重水素標識アシルカルニチンを内部標準として含むメタノール液を加え、

30 分間振盪により抽出操作を行った。抽出液は別の 96 穴マイクロプレートウエルに移し、窒素気流下で乾涸した。そこに塩酸ブタノール液を加え、プラスチックラップで密封し 65°C で 20 分間加熱し、ブチルエステル誘導体化を行った。誘導体化試薬を窒素気流下で除去した後、80%アセトニトリル溶液に溶解し、タンデム質量分析計での定量分析に供した。

C. 研究結果

表 1 に示した通り、本症重症型の患者 1 では C5OH と C5:1 の上昇が明らかであったが、他の軽症型患者 4 例では C5OH 上昇は軽度であり、C5OH/C2 の指標で正常対照と区別できたものの、C5OH/C3 の指標では正常対照との区別が困難であった。また C5:1 は正常対照と同様の値であった。

D. 考察

濾紙血中アシルカルニチン分析によって本症を新生児期にスクリーニングしようとする場合、スクリーニング指標として C5OH よりも C5OH/C2 が優れている可能性が示唆された。特異度からすると C5:1 が重要であるが、軽症例では正常対照と同じレベルにな

り、スクリーニング指標として使用することは困難である。

C5OHとC5OH/C2だけを指標としてスクリーニングを行う場合、これらの指標が増加する他の疾患であるマルチプルカルボキシラーゼ欠損症や3-methylcrotonyl-CoAカルボキシラーゼ欠損症、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoAリアーゼ欠損症を含め、尿有機酸分析によって鑑別診断する必要がある。この尿有機酸分析を行う場合も、軽症型の本症では診断指標物質の有意の上昇を認めないことがあるので、スクリーニングの精査法としては適切でなく、遺伝子診断が必要ということになる。

もし遺伝子解析が一定数の疑陽性例に対して実施可能であれば、このアシルカルニチン分析による本症の新生児期スクリーニングは意味を持つことになると考えられた。

また、有機酸代謝異常症では、血中・尿中の異常代謝産物が明らかに増加していない場合でも、尿中アシルカルニチンの上昇が化学診断に有用である場合が知られており、本症においても尿中C5OHや

C5:1アシルカルニチン排泄量が良い化学診断指標となり得る可能性がある。カルニチンを負荷して尿中排泄量を分析することで、更に診断精度を上げられるか検討が必要と考えられた。

E. 結論

軽症のβ-ケトチオラーゼ欠損症患者においては、新生児期も、それ以降の平常時や急性発症時においても、C5OHアシルカルニチンやC5:1アシルカルニチンが明確には上昇していないことがあると考えられる。C5OH/C2比や尿中C5OH・C5:1アシルカルニチン測定の有用性について検討する必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録 なし

表1. β-ケトチオラーゼ欠損症患者濾紙血中アシルカルニチン分析結果

	C5OH	C5OH/C2	C5OH/C3	C5:1
患者1	3.61	0.243	2.47	0.85
患者2	0.54	0.063	0.56	0.048
患者3	0.50	0.071	0.48	0.043
患者4	0.52	0.079	0.51	0.055
患者5	0.43	0.049	0.27	0.133

新生児対照値 0.16±0.07 0.014±0.006 0.167±0.090 0.16±0.11
(mean±SD : nmol/ml)

先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究

分担研究課題：タンデムマス・有機酸診断、診断指針作成、症例スクリーニング

分担研究者 山口清次

所属 島根大学小児科

研究要旨

日本とアジア諸国（中国、インド、ベトナム、タイ）の β ケトチオラーゼ欠損症例の、診断時の尿中有機酸および血中アシルカルニチン分析所見の特徴を検討した。2000年から2008年に島根大学で診断された患者数は日本5例、アジア24例の計29例で、特に南アジアで発見頻度が高い傾向がみられた。本疾患では、尿中有機酸分析での2-methyl-3-OH-butyrateとtiglylglycineの増加、血中アシルカルニチン分析でのC5:1とC5-OHの増加がそれぞれ特徴的である。しかし、日本人症例では尿中有機酸分析を行った5例すべてで、急性期にもかかわらず2-methyl-3-OH-butyrateの軽度増加を認めるのみであり、アシルカルニチン分析でも異常代謝産物の増加は軽度か、全く認められず、最終診断には酵素診断が必要であった。一方、アジアの症例はいずれの分析でもほとんど全例で、安定期であっても異常代謝産物の著明な増加が認められた。以上より、本症の代謝プロファイルには民族差がありうる。遺伝背景を明らかにするために、今後genotype/phenotype correlationを検討する必要がある。日本人患者では本症に特徴的なマーカーの濃度が低いため、タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングで見逃す可能性がある。

研究協力者

長谷川有紀（島根大学小児科）

A. 研究目的

β ケトチオラーゼ欠損症は尿中有機酸分析、および血中アシルカルニチン分析が化学診断に有用である。しかし本症では、典型例に比べ、異常代謝産物の増加が著明でない症例もある。また本疾患は我が国では稀であり、海外の症例との比較は我が国の患者の特徴を分析する上で重要である。我々は質量分析による化学診断の有用性と限界、およびアジア諸国の症例との相違について検討した。

B. 研究方法

2000年から2008年までに島根大学で診断された症例30例。

1) β ケトチオラーゼ欠損症の発見頻度の検討

同時期に診断された有機酸・脂肪酸などの先天代謝異常患者数から、本疾患の頻度を検討した。

2) 我が国とアジアの本疾患患者における質量分析の特徴

ア) 尿中有機酸分析

本疾患に特徴的な異常代謝産物である、2-methyl-3-OH-butyrate (2M3HB) と tiglylglycine (TG)の排泄の程度について比較検討した。

イ) タンデムマスによる血中アシルカルニチン分析

本疾患で特徴的とされるC5:1とC5-OHの血中増加について比較検討した。

(倫理面への配慮)

分析結果を診断後の治療に役立てるため、患者の尿、血液検体は連結匿名化して分析を行った。その他、「臨床研究に関する倫理指針」に基づき、患者の個人情報について管理を行った。

C. 研究結果

1) β ケトチオラーゼ欠損症の発見頻度（表1）

2000年から2008年までに島根大学で診断された29症例のうち、日本人症例は5例、アジアの症例は24例で、アジアの症例の内訳は、インド9例、ベトナム8例、中国6例、タイ1例であった。

同時期に我が国で何らかの代謝障害を疑われ、島根大学で診断された症例は194例であり、うちβケトチオラーゼ欠損症が占める割合は3% (5例)であった。

これに対し、インドではこの割合が7%、ベトナム12%、中国2.9%であり、南アジアで発見される頻度が高い傾向がみられた。なおタイについては依頼症例数が少ないため、今回の検討からは除外した。

2) 我が国とアジアの患者における質量分析の特徴 (表2)

ア) 尿中有機酸分析

日本人症例では5例全例に尿中有機酸分析が行われた。全て急性期の検体であったが、2M3HBの排泄量は軽度～中等度であり、TGは検出感度以下であった。

一方、アジアの症例では24例中21例で尿中有機酸分析が行われており、うち9人は安定期の検体であった。インドの1例を除く全例で、急性期・安定期にかかわらず2M3HBとTGの排泄増加は著明であった。

イ) アシルカルニチン分析

日本人症例では5例中4例に行われた。1例はC5:1、C5-OHとも明らかに増加していたが、その他は強いケトアシドーシス発作を呈していた1例にごく軽度のC5:1の増加を認めたのみで、2例ではいずれも増加を認めなかった。

アジアの症例では中国とベトナム、タイの患者の計14例にアシルカルニチン分析が行われた。Cut offの前後の値を示した3例以外の11例ではC5:1、C5OHいずれも増加は明らかで、診断は容易であった。

D. 考察

今回の検討で以下のことが明らかとなった。

1) βケトチオラーゼ欠損症の発見頻度には民族差がある。

日本と中国では有機酸・脂肪酸代謝異常のうち、本疾患の頻度はおよそ3%であったが、インドとベトナムではそれぞれ7%、12%と2～4倍の頻度があった。これは南～東南アジアで本疾患が比較的多い可能性を示唆する。この民族差の遺伝背景を明らかにするためには、今後genotype/phenotype correlationを調べる必要がある。

2) 異常有機酸の排泄量は急性期と安定期では必ずしも相関しない。

アジアの症例で検討すると、2M3HBは急性期にやや排泄量が多い傾向にあるが、TGは安定期でも急性期と同程度の排泄増加を認めた。

3) 質量分析において、日本人症例では異常代謝産物の排泄量が少ない。

日本人症例の現病歴からは、アジアの症例と同様に激しいケトアシドーシスをきたしているにもかかわらず、代謝産物は明らかに低値であった。このため最終診断として全例に酵素活性測定が行われた。残存酵素活性があっても発作の重症度との相関がないとの報告があるが、これを強く支持する所見であった。

βケトチオラーゼ欠損症は食事指導や早期のグルコース投与で発作を予防できる、治療効果の高い先天代謝異常症である。このために新生児マススクリーニングで発症前に発見できれば、正常発達が期待できる。しかし今回の結果は、我が国のβケトチオラーゼ欠損症はタンデムマスを用いても見逃す可能性があることを示していた。

E. 結論

質量分析はβケトチオラーゼ欠損症の診断に有用だが、残存酵素活性が高い症例では発作の程度に比べ異常代謝産物の排泄量が少なく、タンデムマススクリーニングでは見逃す可能性がある。本疾患は東アジアに比べ、南～東南アジアでの発見頻度が高く、民族差がある。この遺伝背景を明らかにするために、genotype/phenotype correlationを今後調査する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Molecular Genetics and Metabolism* 96(2): 77-79, 2009 (February)
- 2) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain & Development*, 2009. (inpress)
- 3) Korematsu S, Kosugi Y, Kumamoto T,

- Yamaguchi S, Izumi T: Novel mutation of early, perinatal-onset, myopathic-type very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Neurology* 41(2): 151-153, 2009 (August)
- 4) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 98(4): 372-377, 2009 (December)
- 5) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial β -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development*, 2009 (in press)
- 6) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Nakamura I, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: Enzymatic evaluation of glutaric acidemia type 1 by an in vitro probe assay of acylcarnitine profiling using fibroblasts and electrospray ionization /tandem mass spectrometry (MS/MS). *Journal of Chromatography B* 877: 2648-2651, 2009 (July)
- 7) 山口清次: 新生児突然死の予防: タンデムマスによる早期発見. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4): 973-976, 2009 (12月)
- 8) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 坂本 修, 大浦敏博, 山口清次: 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症の2例: 血清分析の必要性. *日本マス・スクリーニング学会誌* 19(3): 255-259, 2009 (12月)
- 9) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李 紅, 福田誠司, 近藤陽一, 脇口 宏, 藤枝幹也, 高杉尚志, 山口 結, 吉良龍太郎, 原 寿郎, 山口清次: 中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症日本人5症例の発症形態の検討. *日本小児科学会雑誌* 113(12): 1800-1804, 2009 (12月)
2. 学会発表
- 1) 山口清次: 小児救急の場で知っておくべき代謝性疾患. 第6回和歌山小児救急研究会 講演. 和歌山, 2009年6月
- 2) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, Kobayashi H, Fukuda S, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. New York, August 2009
- 3) Hori T, Fukao T, Teramoto T, Kobayashi H, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N: The time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation to a CPT2-deficient patient. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. New York, August 2009
- 4) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀 友博, 小林弘典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: CPT2欠損症: 生後0日からの血液ろ紙、血清のアシルカルニチンプロファイルの変化. 第51回日本先天代謝異常学会. 東京, 2009年11月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

表 1 日本とアジア各国の代謝異常とβケトチオラーゼ欠損症の発見頻度

		Japan*	Asia/Total	China	India	Vietnam	Thai	Korea
No. of cases analyzed		8,944	3,762	2,251	798	627	54	32
No. of patients with disease (detection incidence, %)		194 (2.3%)	407 (11%)	207 (9%)	128 (16%)	65 (10%)	5 (8%)	2 (6%)
Organic acidemias	Methylmalonic aciduria	49	164	103	45	16		
	Propionic aciduria	14	29	13	12	4		
	Urea cycle disorder	31	37	16	17	3	1	
	β-keto-thiolase def.	5	24	6	9	8	1	
	Glutaric aciduria type 1	9	19	12	6	1		
	Multiple carboxylase def.	16	15	8	5	2		
	5-Oxoprolinemia	6	15	5	1	9		
	3-Methylglutaconic aciduria	4	6	1	4	1		
	Glycerol kinase def.	1	3	3				
	4-OH-butyric aciduria	2	4	4				
	MCC def.	4	5		4			1
	HMG-CoA lyase def.	5	5	4		1		
	Isovaleric aciduria	1	4	2	1		1	
	Glutaric aciduria type 2	7	4	1	2	1		
	Alkaptonuria	2	6	1	5			
2-OH-glutaric aciduria	2	4	1	3				
Others	1	2	2					
Fatty acid oxidation disorders	MCADD	6	7	4		2	1	
	VLCADD	7	3	1		2		
	MTP	1						
	Carnitine transporter def.	3	3	2			1	
	CPT-2 def.	1	4	2		2		
	others	2	3	2	1			
Amino acid disorders	MSUD	3	20	4	10	6		
	PKU (+ hyperphenylalanemia)	1	15	8	1	5		1
	Homocystinuria		3	2		1		
Others	Peroxisomal disease	3	2		1	1		
	FDPase def.	2	1		1			

表 2 島根大学で診断されたβケトチオラーゼ欠損症患者の質量分析結果

国	Case No.	診断時年齢		GC/MS		MS/MS	
				2M3HB < 1.3	TG 0.0	C5:1 < 0.2	C5-OH < 1.0
日本	1	8m	A	31.5	—	—	—
	2	3y4m	A	23.6	—	±	—
	3	3y4m	A	21.8	—	—	—
	4	3y8m	A	4.0	—	×	×
	5	?	A	×	×	1.48	1.85
中国	1	5m	A	129.2	80.0	0.24	—
	2	1y1m	S	67.0	30.0	0.29	1.30
	3	1y1m	A	125.9	29.4	0.70	1.68
	4	2y6m	?	×	×	±	0.19
	5	14y10	?	×	×	0.60	0.35
	6	?	S	72.9	384.6	×	×
インド	1	6m	A	950.4	853.5	×	×
	2	7m	A	83.5	?	×	×
	3	7m	A	31.4	128.8	×	×
	4	1y1m	S	76.7	±	×	×
	5	2y5m	A	32.0	—	×	×
	6	11y5m	S	43.5	185.1	×	×
	7	?	S	21.1	42.8	×	×
	8	?	S	160.5	64.0	×	×
	9	?	S	±	+	×	×
ベトナム	1	3m	A	203.1	228.0	0.42	1.10
	2	3m	S	53.7	?	0.19	1.09
	3	6m	A	120.1	207.8	0.60	2.73
	4	7m	A	132.7	101.7	0.78	1.92
	5	11m	A	419.1	192.7	0.89	2.46
	6	2y9m	A	73.9	472.1	0.53	1.52
	7	3y1m	S	34.1	168.2	1.20	2.35
	8	?	A	118.7	212.7	0.44	1.38
タイ	1	1y	?	×	×	1.21	2.83

A : 急性期
S : 安定期

2M3HB :
2-メチル 3-ヒドロキシ酪酸

TG : チグリルグリシン

C5:1 : チグリルカルニチン

C5-OH :
2-メチル 3-ヒドロキシブチ
リルカルニチン

先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究

分担研究課題：酵素、遺伝子診断（典型例、非典型例、海外の症例を含めて）

分担研究者 深尾 敏幸 所属 岐阜大学

研究要旨

先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸CoAトランスフェラーゼ欠損症）の酵素診断、遺伝子診断については、日本のみでなく海外からの依頼にも対応しており、診断センター的な役割をしてきている。今回、 β -ケトチオラーゼ欠損症についての解析を報告する。

（1）典型例の遺伝子解析としてベトナムの 8 症例の解析を行い、残存活性を持たない R208X 変異を変異アリール の 87.5% に認めた。これは本症において初めての コモン変異である。（2）フランスの兄弟例、日本の双子例で有機酸所見やタンデムマスの所見が典型例より軽度である症例を解析し、残存活性を持つ変異を同定した。日本においては強い残存活性をもつ H144P 変異があり、診断を慎重に行うことが必要であると考えられた

A. 研究目的

先天性ケトン体代謝異常症（ β -ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸CoAトランスフェラーゼ欠損症）の酵素診断、遺伝子診断については、日本のみでなく海外からの依頼にも対応しており、診断センター的な役割をしてきている。今回、 β -ケトチオラーゼ欠損症について 1) 典型例の遺伝子解析としてベトナムの 8 症例の解析、2) 有機酸所見、タンデムマスの所見が軽度で非典型例の日本人双子例について解析した結果を報告する。

B. 研究方法

1) 症例とサンプル

A) ベトナム症例については、2005年～2009年に研究分担者の島根大学山口清次先生のところで、尿有機酸分析、血液ろ紙アシルカルニチン分析にて典型的なパターンをしめした（山口清次分担報告書参照）8例を対象とした。サンプルとしては1例が線維芽細胞、残りはゲノムDNAを送ってもらい解析した。

B) フランスの兄弟例で、姉が2歳でケトアシドーシス発作で発症、発作時は典型的な尿有機酸所見で、活性測定にて本症と診断された。非発作時の検査では tiglylglycine は検出されなかった。その後4回のケトアシドーシス発作を4歳までに経験後、16歳までは軽度のエピソードを繰り返している。弟は6歳まで発作はなく、6歳時に1回のみ発作を経験。そのときに診断を受けた。姉が診断後に出生していたが発作をきたすまでは検査をうけていなかった。

C) 日本症例については線維芽細胞をもちいた。3歳7ヶ月で一卵性双子の兄弟が1日の差で重篤なケトアシドーシスを初めて生じ、急性期の尿有機酸分析ではわずかの 2-methyl-3-hydroxybutyrate

は存在したが、tiglylglycine は検出されない非典型的パターンを呈した（山口分担報告書表 2 日本症例 2, 3）。重篤な発作のため1例は死亡、1例は発作から回復し、正常発達。

2) 遺伝子解析

常法に従い、 β -ケトチオラーゼ欠損症の責任遺伝子 T2 遺伝子の各エクソンとその両端のスプライス部位を含んで増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。

3) 変異 cDNA の発現実験

pCAGGS 発現ベクターに Wild-type, mutant の T2 cDNA を組み込み、T2 欠損 SV 40 形質転換線維芽細胞にリポフェクタミンを用いて導入して、活性、蛋白の検出を行った。

（倫理面への配慮）

ベトナム症例については、ベトナムハノイ病院にて遺伝子解析の承諾をとっており、日本症例においても遺伝子解析承諾をとって解析を行った。本遺伝子解析研究は岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) ベトナム症例の解析

表 1 に解析症例の臨床像、遺伝子変異解析の結果を示す。特に解析した家系間に血縁関係などはないが、8例中6例が R208X 変異のホモ接合体で、2例がヘテロ接合体であった。R208X は 87.5% を占めた。この変異はオランダ症例 2 名でもヘテロで同定されているが、T2 遺伝子の 2 つのポリモルフィズムを解析するとベトナム症例ではすべて 13C, In9C であり、オランダ症例では 13G, In9C であり、由来は異なる可能性が示唆された。今回患者の同定されたのは 2003年～2008年生まれの子で、患者が診断されたハノイ小児病院のカバーする年間出生数を考えるとベト

ナムにおいては33万人に1名程度の発症頻度が考えられた。そのため新生児400例の血液ろ紙による本変異の同定を試みたが検出されず、R208Xアリのホモの患者の頻度は64万人に1名以下と計算された。

2) フランスの兄弟例の解析

M193T変異とIVS8+5g>tの複合ヘテロ接合体であった。後者の変異はエクソン8スキップを来すことがcDNA解析より明らかとなった。

3) 本邦一卵性双子の解析

遺伝子解析の結果H144P変異を双子ともホモで認め、両親はヘテロキャリアーであった。この兄弟例では線維芽細胞をもちいた活性でもかなりの残存活性があり、本変異の発現実験においてもWild-typeの20-25%程度の活性が検出された。これが変異とよいか活性に影響する多型というべきを検討するために日本人コントロール50例100アリの解析をおこなったがH144P変異は同定されず、変異と考えると結論した。

D. 考察

1) ベトナム症例の解析から。

今回ベトナム症例において患者の変異アリの87.5%を占めるR208Xというコモンな変異が同定された。これまで世界の100例近いβ-ケトチオラーゼ欠損症の解析がおこなってきたが、多くても数例で同一変異がヘテロで検出される程度で、コモン変異は認められていなかった。今回の症例はすべてベトナムの最もメジャーなKinh族の属しており、共通祖先遺伝子変異と考えられる。すくなくともベトナムにおいては遺伝子診断が第一選択となりうる。今後ほかの東南アジアの国々の症例についての解析が必要である。

2) フランスの兄弟例の解析

有機酸所見でいえば、発作時にtiglylglycineは出るが、非発作時にはないという例で、表現型とすると、ベトナムの典型例と、下述の日本症例の中間である。エクソン8スキップを来す変異が極少量の正常スプライシングをきたすことで、残存活性を生じていると考えられた。

3) 日本の双子症例解析

今回の症例で検出されたH144P変異はこれまででもっとも残存活性をもち、変異であるのか、活性に影響する多型か迷う変異であった。このような残存活性を持つ変異の症例では酵素診断も注意が必要である。またこれだけの残存活性を持つ症例でも死亡することがあるということを忘れてはいけない。

E. 結論

β-ケトチオラーゼ欠損症の3つの異なる表現型の遺伝子解析を行い、臨床表現型と遺伝子型について考察を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Thümmeler S, Dupont D, Acquaviva C, Fukao T, de Ricaud D. Different Clinical Presentation in Siblings with Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase Deficiency and Identification of Two Novel Mutations. *Tohoku J Exp Med* 220:27-31, 2010

2) 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. *Molecular Medicine Reports* 3:355-359, 2010

3) Fukao T, Nguyen HT, Nguyen NT, Vu DC, Can NTB, Pham ATV, Nguyen KN, Kobayashi H, Hasegawa Y, Bui TH, Niezen-Koning KE, Wanders RJA, de Koning T, Nguyen LT, Yamaguchi S, Kondo N. A common mutation, R208X, identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency *Mol Genet Metab in press*

2. 学会発表

1) Fukao T, Naiki Y, Tanaka, Kondo N. An exonic splicing mutation identified in a beta-ketothiolase-deficient patient. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, August 29-September 2, San Diego, USA, 2009

2) Toshiyuki Fukao, Hoan Thi Nguyen, Nhan Thu Nguyen, Ngoc Thi Bich Can, Dung Chi Vu, Anh Thi Van Pham, Khanh Ngoc Nguyen, Hironori Kobayashi, Yuki Hasegawa, Thao Phuong Bui, Liem Thanh Nguyen, Seiji Yamaguchi, Naomi Kondo. A common mutation R208X identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. March 7-10, Fukuoka, Japan, 2010

3) 深尾敏幸, 近藤直実, 内木康博, 堀川玲子, 田中藤樹. エクソン内1塩基置換により, Exonic splicing Enhancer 配列に影響し, エクソンスキップを来したミトコンドリアアセトアセチル-CoA チオラーゼ (T2) の1症例. 第54回日本人類遺伝学会 8月24日-26日 東京, 2009

4) 深尾敏幸, 堀川玲子, 内木康博, 田中藤樹. 近藤直実, β-ケトチオラーゼ欠損症の分子病態: Exonic splicing enhancer 変異の解析. 第51回日本先天代謝異常学会総会 11月5日-7日 東京, 2009

5) 丸山慎介, 豊島光雄, 鋤田直美, 深尾敏幸, 堀川玲子, 内木康博, 田中藤樹. 近藤直実, β-ケトチオラーゼ欠損症の分子病態: Exonic splicing enhancer 変異の解析. 第51回日本先天代謝異常学会総会 11月5日-7日 東京, 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ベトナム症例の臨床像と変異

Table 1 Clinical and molecular summary of T2-deficient patients.

Consanguinity	Sex	Death of elder siblings	The first crisis											Prognosis			Mutations		Polymorphisms		
			Onset of 1st crisis	Preceding illness	pH	HCO ₃	BE	Glucose	NH ₃	Unconsciousness	Polypnea	Mechanical ventilation	Number of crises	Present age	Condition	Paternal allele	Maternal allele	Msp I P	Taq I P		
Vietnamese																					
GK70	-	M		34m	pneumonia				5.5	196	Coma	+	+	1	4.5	delayed	R208X	163_167del5 ins2	Mm	Tt	
GK72	-	M	Sis 24m	12m	pneumonia	6.93	4	-26	2		Coma	+		2	4	good	R208X	R208X	MM	TT	
GK73	-	M	Bro 11m	13m		7.08	2.4	-27	5.8	86	Coma	+		1	4	good	R208X	R208X	MM	TT	
GK74	-	M		18m	pneumonia	6.9	2	-20	5.9	96	Coma	+	+	2	died at 2 yr		IVS10-1g>c	R208X	Mm	Tt	
GK75	-	M	Bro 27m	11m	acute diarrhea	6.88	1.5		5.3	39.4	Lethargy	+		1	2	good	R208X	R208X	MM	TT	
GK76	-	M		13m		7.11	3.3	-26	19.4		Coma	+		2	4	good	R208X	R208X	MM	TT	
GK79	-	F		12m	acute diarrhea	7.1	4	-20	6		Lethargy		+	2	3.5	good	R208X	R208X	MM	TT	
GK80	-	F		9m	acute diarrhea	6.89	2.6	-28	5.5	130	Coma	+	+	1	1	good	R208X	R208X	MM	TT	
Dutch																					
GK35	-	M		12m	pneumonia	7.13	8	-21	3		lethargy	+		2	14	good	R208X	IVS11+2t>c	mm	Tt	
GK36	-	F		No acute episodes											0	13	good	R208X	IVS10-2a>c	mm	Tt

GK79 was evaluated in stable condition after two acute acidotic episodes and diagnosed as having T2 deficiency

GK36 was suspected of having T2 deficiency by organic acid analysis performed for evaluation of motor skills at the age of 1y9m.

Deaths of elder siblings due to metabolic decompensation were noted in 3 patients: Sis 24m means a sister died at 24 months of age.

*In Dutch patients, familial segregation of these mutations was not determined

ベトナム症例の遺伝子解析 GK73 は R208X 変異のホモ接合体

この変異で NlaIII 部位ができるためスクリーニングできる。

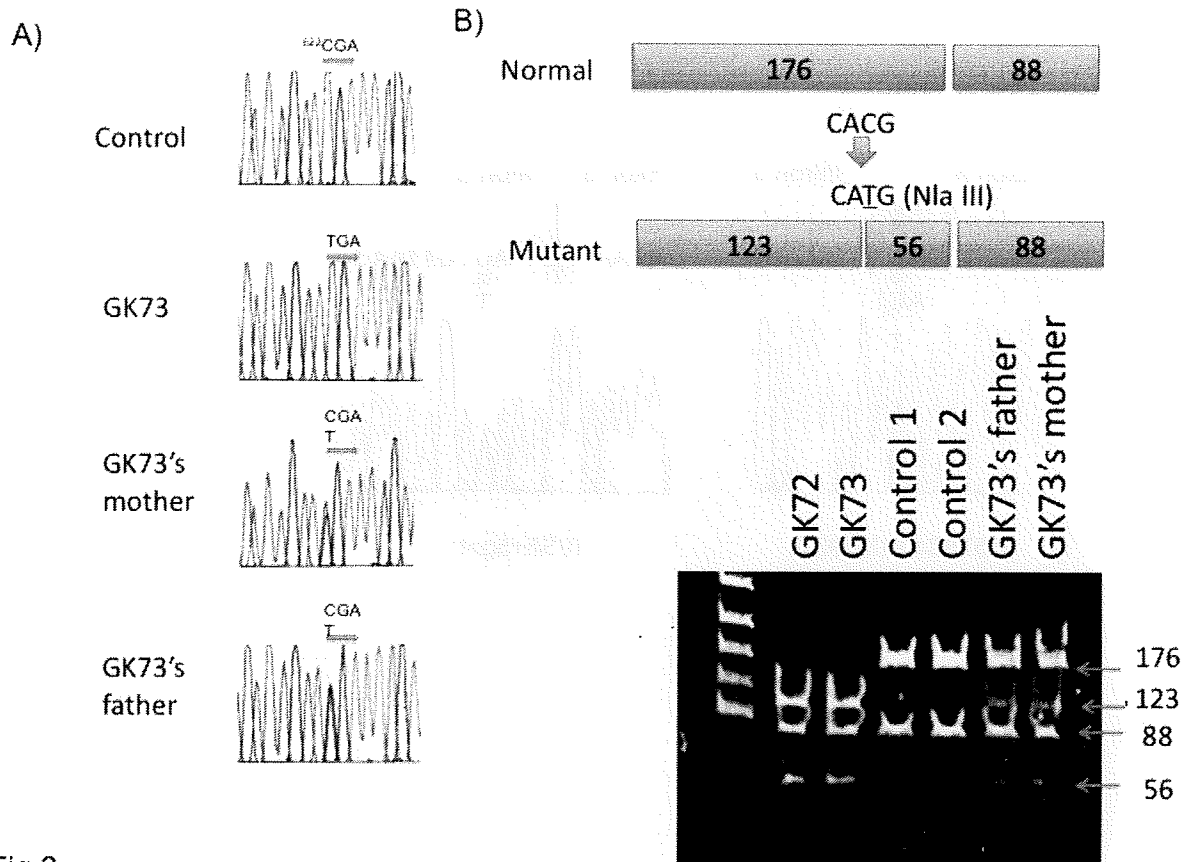
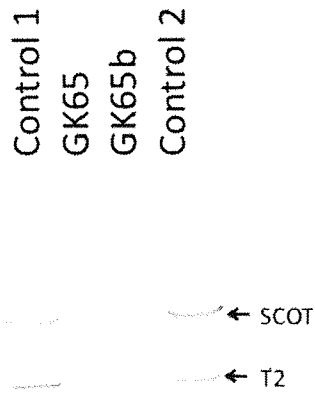


Fig.2

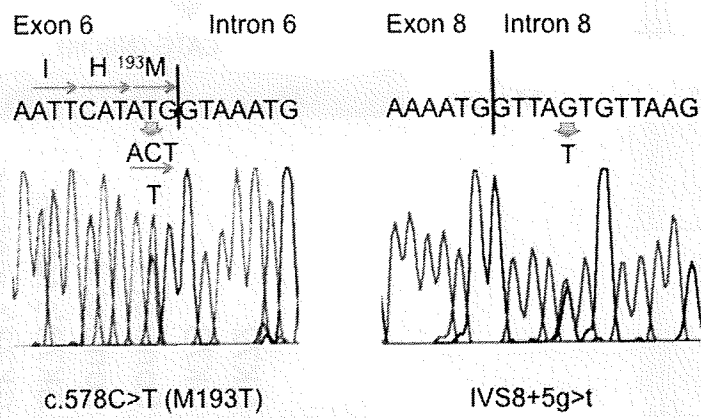
フランス兄弟例のイムノブロット GK65, GK65b とともに T2 蛋白検出できず.

Fig.1

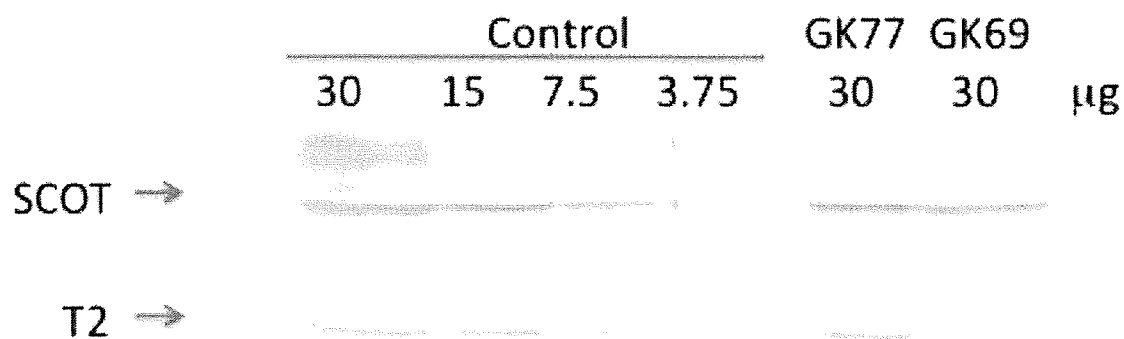


フランス症例の遺伝子解析 GK65 は M193T と IVS8+5g>t の複合ヘテロ接合体

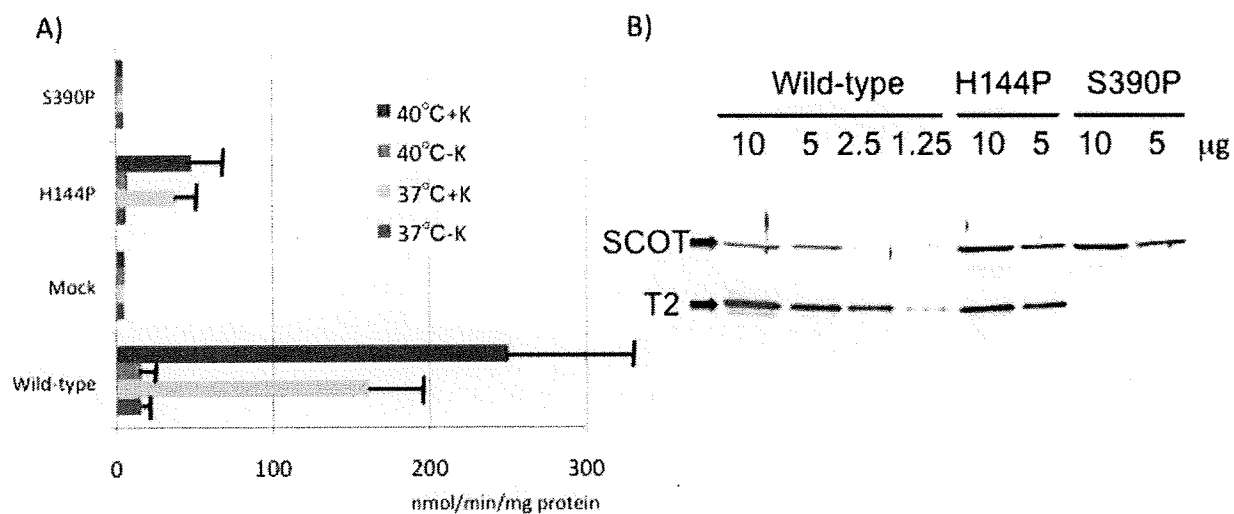
Fig.2



日本症例のイムノブロット GK77 も GK69 も T2 蛋白をコントロールよりは少ないものの検出できる。



日本人症例の遺伝子変異の発現実験 S390P 変異は残存活性なく、H144P 変異は残存活性あり、変異蛋白も同定された。



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表