

分担研究報告 2)

脂肪酸代謝異常症の新生児スクリーニング導入の倫理的課題について

研究分担者 奥山虎之 国立成育医療センター臨床検査部

研究要旨

わが国に脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニング（NBS）を導入する際の倫理的諸問題について、すでに一部で導入が計画されている米国での議論をもとに提言する。同疾患のNBSを、現行のNBSと同様に公衆衛生事業とするか、個別医療の範疇で考えるかは議論のあるところである。いずれにしても、検査前のインフォームド・コンセントを充実させることが重要である。

A. 研究目的

脂肪酸代謝異常症に対するタンデムマス分析計を用いたNBSの実用化にむけたパイロット研究が進んでいる。技術的な改良は進んでいるが、体制の構築、特に倫理的な配慮に関しては、議論が進んでいない。

上記の背景を考慮し、本研究は、米国での議論等を検討し、わが国に脂肪酸代謝異常症のマススクリーニングを導入するさいに考慮すべき倫理社会的課題の提言を行うことを目的とする。

B. 研究方法

2008年に米国大統領委員会が作成した“The Changing Moral Focus of Newborn Screening. An Ethical Analysis by the President’s Council on Bioethics”およびその委員会に参加した生命倫理学者に対するインタビューを通じて、わが国に実情に合った脂肪酸代謝異常症のNBS体制の在り方に関する提言を行う。

C. 研究結果

脂肪酸代謝異常症をNBSに導入する際、考慮されるべき倫理的課題は、以下の2点である。

1) 疾患によっては、適切な治療法が確立していないものがある。

2) 生化学的な診断で脂肪酸代謝異常症と確認できても、発症しないスクリーニング陽性者が存在し、無用な不安を与えることになる場合がある。

米国大統領委員会の見解の一部を示す。

(1) 典型的なWilson-Jungnerスクリーニ

ング・クライテリアの本質的な重要性和継続的な適切性を再確認し、明らかに典型的なクライテリアに合致している疾患に対してのみ義務的な新生児スクリーニングが州において推奨されることを主張する。

(2) 典型的なクライテリアに合致しないその他の疾患のスクリーニングが、州によって自主的な研究のパラダイムのもとで両親へ依頼されて構わないとする見解を支持する。

上記をもとに、新生児マススクリーニング対象疾患は、原則的にはWilson-Jungnerスクリーニング・クライテリアに基づく必要があるが、一部の脂肪酸代謝異常症のようなこの基準に厳密には合致しない疾患については、それぞれの州が独自の基準のもとでパイロット研究として実施すべきであると結論付けている。

D. 考察

日本のNBSの対象疾患は、6疾患でいずれも新生児早期に発見し治療を開始することにより、限りなく正常に近い成長や発達が期待できる疾患に限られている。しかし、一部の脂肪酸代謝異常症では治療を発症前に開始した場合、患者家族のQOLを高めることは期待できるが完全に治癒できる状態にはならない可能性がある。また、疾患によっては、病態の進行を抑えることはできないであろう。また、生化学的な診断で脂肪酸代謝異常症と確認できても、発症しないスクリーニング陽性者が存在し、無用な不安を与えることになる場合についても考慮しなければならない。脂肪酸代謝異常症のNBSを導入するということは、わが国におけるNBSのあり方を変革するものであり、慎重な対応が必要になる。検査前

のインフォームドコンセントする心理社会的な支援体制の整備が、導入には不可欠と考える。

**E. 結論**

脂肪酸代謝異常症のNBSの導入には、倫理面に配慮した新たな体制の整備が必要である。

**G. 研究発表**

なし。

分担研究報告 3)

本邦における Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) 欠損症の  
臨床像について

研究分担者 高柳 正樹 千葉県こども病院医療長

研究要旨

Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) 酵素の欠損による本疾患は空腹時や感染を契機に低ケトン性低血糖を呈し、嘔吐、意識障害や痙攣などを繰り返し、脳障害や突然死をきたすことがある。これまで、われわれが診断・治療に関与した CPT I 欠損症症例は 8 家系 9 例である。臨床症状、検査成績は低ケトン性低血糖、高フリーカルニチン/低アシルカルニチン血症、高クレアチニンキナーゼ血症が特徴的だった。典型的な本疾患の酵素活性はほぼ 0% である。現在 8 家系中 6 家系の遺伝子検索が行われているが common mutation は今のところ見つかっていない。急性脳症や Reye 様症候群と診断されている症例の中に含まれている可能性が高く、タンデムマス、酵素活性、遺伝子検索等の診断のシステムを構築する必要がある。

A. 研究目的

カルニチンサイクルを構成している CPT I 酵素の欠損による本疾患は意識障害、痙攣を呈し、急性脳症やライ様症候群と診断されている患者の中に含まれている可能性がある。本疾患を正しく診断するためには本邦の患者の臨床症状や検査成績の検討が必要である。

B. 研究方法

われわれが診断・治療に関与した CPT I 欠損症症例は男児 3 例、女児 6 例の合計 8 家系 9 症例である。これら患者の臨床症状、酵素活性、遺伝子検索の結果をまとめ、比較検討した。

（倫理面への配慮）

すべての検査は、特に遺伝子検査に関しては、患者家族の了解を得て行った。

C. 研究結果

臨床像

症状出現により診断されたのは 6 症例、そのほかに家族内検索により 1 例、新生児マススクリー

ニングにより 2 例発見されている。6 症例の発症年齢は 9 ヶ月から 4 歳であった。初発症状は 6 例とも意識障害であり、血糖が測定されている症例では全例低血糖を認めた。そのほかの症状としては嘔吐、下痢、痙攣、脱力、感冒症状などであり、非特異的な症状のみであった。

検査結果としては低ケトン性低血糖、高フリーカルニチン/低アシルカルニチン血症、高クレアチニンキナーゼ血症が特徴的であった。また、4 症例ではアシルカルニチン値が高値であった。クレアチニンキナーゼも 71 から 1545 までとばらつきを認めた。

臨床診断としては症状の出現した 6 例中 5 例が Reye 様症候群、1 例が脂肪酸代謝異常症であった。

8 家系中 2 家系に血族婚を認め、8 家系中 3 家系に兄弟の死亡例を認めた。1 症例で重篤な身体障害を残している。確定診断がなされた後の予後は比較的良好であり、診断にいたるまでの発作による障害の程度が予後に大きく関係すると考えられた。

酵素活性

各症例について、CPT I の酵素活性の測定を Demaugre らの方法に準じて行った。測定には症状の出現した 6 症例は線維芽細胞、マススクリーニングで発見された 2 例は末梢リンパ球を用いた。症状の出現した 6 症例では 1 例を除き CPT I 活性は非常に低かった。

マスキングで発見された2症例はそれぞれ43%、20%と比較的活性が残存していた。  
遺伝子検索(表2)

症例が少ないため断定はできないが common mutation は今のところ見つかっていない。Genomic DNA ではナンセンス変異やフレームシフト、大きな deletion を示しており、これは典型的な CPT I 欠損症において酵素活性が非常に低い原因であると考えられる。

### D. 考察

今後、タンデムマスによるマスマスクリーニングが導入されると、本疾患が疑われる例が増加すると考えられる。そのような症例においては、今まで典型的とされている CPT I 欠損症のように酵素活性が非常に低いものから比較的残存しているものまで様々なバリエーションが認められる可能性が高い。酵素活性だけではなく、タンデムマスの結果、遺伝子検索などを組み合わせて診断することが必要となると思われる。

## E. 結論

CPT I 欠損症の臨床症状は意識障害、痙攣を主体とし、検査成績は低血糖が必発である。急性脳症やライ様症候群と診断されている患者の中から、本症を的確に診断していくための、診断システムの確立が重要である。これはマスキング陽性患者の確定診断のためにも確立を急がなければならない。

## G. 研究発表

論文発表 1079

1.Ogawa E, Kanazawa M, Takayanagi M et al :  
Expression analysis of two mutations in  
carnitine palmitoyltransferase I A  
deficiency : J Hum Genet 47 : 342-347, 2002

2. 高柳正樹 他：肝型カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I 欠損症の一女兒例：特殊ミルク情報 39：24 - 27、2003

3. Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N et al. Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. Brain Dev. 32:409-11. 2010

4. 高柳正樹. 先天性代謝異常症 カルニチン代謝異常症. 小児内科 41 巻増刊 387-389. 2009.

5. 高柳正樹, 山本重則, 小川恵美他。カルニチン  
 パルミトイルトランスフェラーゼ II 酵素欠損症  
 17 家系 20 症例の臨床像について。 日本マス・ス  
 クリーニング学会誌 18 巻 43-49. 2008.

6. 藤浪綾子, 高柳正樹, 山本重則他. 本邦における Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) 欠損症の臨床像について. 小児科臨床 60 巻 2115-2120. 2007

## 2. 学会発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし 4592

### 1. 特許取得

なし

## 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

日本人長鎖脂肪酸代謝異常症の患者数把握と、治療指針作成  
および長期フォローアップ体制確立のための研究  
分担研究報告書

分担研究課題：タンデムマス法によって発見された長鎖脂肪酸代謝異常症例の検討

分担研究者：島根大学医学部小児科助教 長谷川有紀

**研究要旨**

長鎖脂肪酸代謝異常症は酵素活性低下の重症度によって、出生後早期に心筋症などを発症する群や、乳幼児期に感染を契機に重度の低血糖を生じて突然死や急性脳症として発症する群、さらに幼児期以降に強い筋肉痛などの骨格筋症状で発症する群などに分類される。つまり小児でこれらの症状を認めた場合には、基礎疾患として長鎖脂肪酸代謝異常の有無を検討する必要がある。

今回、2009 年 1 月～12 月末までに次の 3 群に該当する症例について、島根大学小児科でタンデムマスによるアシルカルニチン分析を行い、長鎖脂肪酸代謝異常症が疑われた症例を検討した。集団の内訳はア) タンデムマスによる新生児マススクリーニングで異常を示した症例、イ) 乳幼児突然死症候群や Reye 症候群、インフルエンザ脳症などで急性発症した症例、ウ) 幼児期以降に筋肉痛、脱力、横紋筋融解症などの骨格筋症状で発症した症例である。該当した症例はア) 群は 41 例、イ) 群が 36 例、ウ) 群が 2 例であった。このうちア) 群で 7 例、イ) 群 8 例、ウ) 群 2 例で、何らかの脂肪酸代謝異常症の存在が疑われた。長鎖脂肪酸代謝異常症では低血糖を避けることが最も有効な治療である。飢餓を避ける、糖분을補給するといった生活指導によって、脳症様の症状や後遺症を避けることが可能な、費用対効果の高い疾患ともいえる。これらの疾患頻度を検討し、タンデムマス法によって新生児期の発症前に診断できれば、発症・障害予防に非常に有効と考えられる。

**A. 研究目的**

脂肪酸代謝異常症（FAOD）は大きく分けて中鎖アシル CoA 脱水素酵素（MCAD）欠損症のような中鎖脂肪酸代謝異常症と、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症やカルニチン欠乏症といった長鎖の脂肪酸代謝異常に関する疾患がある。このような脂肪酸代謝異常症は我が国では稀な疾患と思われてきたが、近年、タンデムマスによるアシルカルニチン分析が行われるようになり、発見症例は増加傾向にある。特に急性脳症や乳幼児突然死症候群との関連や、若年者における横紋筋融解症の原因疾患として注目されるようになった。今回我々は、特に脂肪酸代謝異常症との関連が考えられている症状

を持つ集団に焦点をあて、長鎖脂肪酸代謝異常症の有無を検討した。

**B. 研究方法**

1) タンデムマスによるアシルカルニチン分析

2009 年 1 月～12 月末までに次の 3 群に該当する症例について、島根大学小児科でタンデムマスによるアシルカルニチン分析を行い、長鎖脂肪酸代謝異常症（LFAOD）が疑われた症例数を検討した。

ア) タンデムマスによる新生児マススクリーニングで異常を示した症例

イ) 乳幼児突然死症候群や Reye 症候群、インフルエンザ脳症などで急性発症した症例

ウ) 幼児期以降に筋肉痛、脱力、横紋筋融解症などの骨格筋症状で発症した症例

## C. 研究結果

### 1) タンデムマスによるアシルカルニチン分析

調査期間に島根大学小児科でアシルカルニチン分析を行った症例は計 1550 検体で、このうち 3 群に該当した症例は 79 例であった（表 1）。症例の内訳はア) 群は 41 例、イ) 群が 36 例、ウ) 群が 2 例であった。

ア) 群では 41 例中 7 例（17%）で何らかの FAOD を示唆する所見が得られた。疑われた疾患は MCAD 欠損症が 2 例、VLCAD 欠損症 2 例、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) -2 欠損症とミトコンドリア三頭酵素(TFP)欠損症がそれぞれ 1 例、グルタル酸尿症 2 型が 1 例であった。

イ) 群では 36 例中 8 例（22%）が同様に FAOD を疑われ、内訳はカルニチン欠乏症 5 例、VLCAD 欠損症と MCAD 欠損症、グルタル酸尿症 2 型がそれぞれ 1 例ずつであった。

ウ) 群では 2 例ともに FAOD の関与が疑われており、疾患はカルニチン欠乏症と VLCAD 欠損症が 1 例ずつであった。

疾患が疑われた 17 症例のうち、2009 年 12 月末の時点で確定診断がついた症例は 6 例で、VLCAD 欠損症と MCAD 欠損症が 2 例、TFP 欠損症と CPT-2 欠損症がそれぞれ 1 例と、6 例中 5 例は LFAOD であった。

表 1：3 群における脂肪酸代謝異常症の候補症例数

|                   | 対象症例数<br>(79 例) | FAOD<br>候補症例数 |
|-------------------|-----------------|---------------|
| ア) 新生児スクリーニング発見症例 | 41 例            | 7 例<br>(17%)  |
| イ) 急性発症例          | 36 例            | 8 例<br>(22%)  |
| ウ) 骨格筋症状発症例       | 2 例             | 2 例<br>(100%) |

## D. 考察と結論

FAOD は稀な疾患であるが、今回の研究から、特定の集団に焦点をあててアシルカルニチン分析を行うと FAOD の疑われる症例が少なからず発見されることが示唆された。特に急性脳症や乳幼児突然死症候群で分析依頼のあった症例の約 1/5 に何らかの脂肪酸代謝障害を疑わせる所見がみつかっており、これらの症例では必ず基礎疾患に FAOD がないかどうかを確認する必要がある。また症例数が 2 例と非常に少ないが、若年者の高 CK 血症や横紋筋融解症を呈する場合には高率で FAOD の関与する可能性も示唆された。

一方、新生児マススクリーニングで FAOD が疑われた症例は、いずれも診断時には未発症の状態であった。確定診断に至った症例では、主治医による生活指導により、2010 年 3 月末の時点では正常発達の獲得が確認されている。LFAOD は低血糖を避けることが最も有効な治療である。飢餓を避ける、糖分を補給するといった生活指導によって、脳症様の症状や後遺症を避けることが可能であり、費用対効果の高い疾患である。これらの疾患頻度を検討し、タンデムマス法によって新生児期の発症前に診断できれば、発症・障害予防に非常に有効な手段であろう。

## E. 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
- 2) 四本由郁, 長谷川有紀, 小林弘典, 内田由里, 山口清次, 石川順一, 塩見正司 : 脂肪酸代謝障害の所見を示したセレウス菌食中毒に伴う急性脳症の 5 歳例. *日本小児科学会雑誌* 113(1) 75-78,

2009

- 3) 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* 32(5) 409-411, 2010
- 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
- 5) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S : Effect of

heat stress and bezafibrate on mitochondrial  $\beta$ -oxidation Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development* 32(5) 362-370, 2010

6) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Nakamaura I, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S : Enzymatic evaluation of glutaric academia type 1 by an in vitro probe assay of acycarnitine profiling using fibroblasts and electrospray ionization /tandem mass spectrometry (MS/MS) . *Journal of Chromatography B* 877 2648-2651, 2009

#### F. 知的財産権の取得・登録状況

特になし

図1. 発症後に診断された有機酸代謝異常症の発症時期と予後

(N = 108)

(N = 44)

| 疾患名                     | 新生児期                             | 乳児期     |                                   | 幼児期                                 |        | 学童期～ |
|-------------------------|----------------------------------|---------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------|------|
|                         | 出生時                              | 1m      | 1y                                | 6y                                  | // 50y |      |
| 尿素サイクル異常症<br>(OTC欠損症 等) | ○ ○ ▲▲▲▲▲▲▲<br>X X X X X X X X X | ○ ▲▲ X  | ○○○ XX<br>▲▲▲▲▲▲▲                 | ○▲ X                                | X      |      |
| メチルマロン酸血症               | ○ ○<br>X X X X X X X X X         | ○ ▲▲▲▲▲ | ○ ▲▲▲▲▲▲                          | ○ ▲                                 |        |      |
| プロピオン酸血症                | ▲ XX                             | ▲▲      | ▲▲                                |                                     |        |      |
| マルチプルカルボキシルーゼ欠損症        | ▲▲▲▲▲▲ X                         | ○       |                                   |                                     |        |      |
| グルタル酸血症1型               |                                  | ▲▲▲▲▲▲  |                                   |                                     |        |      |
| 複合型グリセロールキナーゼ欠損症        | ▲▲                               |         |                                   |                                     |        |      |
| イソ吉草酸血症                 | ○                                |         |                                   |                                     |        |      |
| アルカプトン尿症                |                                  |         |                                   |                                     | ○○○    |      |
| MCC欠損症                  |                                  | ○       | $\frac{5}{9}H \quad \frac{1}{8}G$ | $\frac{7}{10}H \quad \frac{1}{10}G$ | ▲      |      |
| その他                     |                                  |         |                                   |                                     |        |      |

○：正常 ▲：発達障害 X：死亡

表 1. 発症後診断例の発症時期のまとめ

比較

|                  | 新生兒期 | 乳兒期 | 幼兒期 | 學童期以降 |
|------------------|------|-----|-----|-------|
| 有機酸代謝異常症 (OAs)   | 48%  | 20% | 21% | 12%   |
| 脂肪酸代謝異常症 (FAODs) | 19%  | 41% | 30% | 10%   |

図2. 発症後に診断された脂肪酸代謝異常症の発

| 疾患            | 0~1m | 1~12m    | 1y~2y | 2y~6y | 6y~ |
|---------------|------|----------|-------|-------|-----|
| 全身性カルニチン欠乏(3) |      | ●        |       | ●     | ●   |
| CPT1 (1)      |      |          |       | ✕     |     |
| CPT2 (4)      | ▲    | ●        | ●●    |       |     |
| GA2 (12)      | ▲▲✕✕ | ●●●●●●●● |       |       | ☆   |
| VLCAD (10)    |      | ●●●✕✕✕   | ●     | ☆     | ☆☆☆ |
| MTP (3)       | ✕✕   | ●        |       |       |     |
| MCAD (7)      |      | ●▲       | ●●●●✕ | ●     |     |
| PKT (3)       |      | ●        | ✕✕    |       |     |
| HMG血症(1)      |      | ●        |       |       |     |

▲：非特異的所見、●：急性脳症様、☆：骨格筋症状  
 ○：後遺症あり、◇：死亡

表 2. 発症後診断例とスクリーニング例の予後の

|       |          | 正常発達  | 発達障害あり | 死亡    |
|-------|----------|-------|--------|-------|
| OAs   | 発症後診断例   | 18(%) | 52(%)  | 30(%) |
|       | スクリーニング例 | 89    | 7      | 4     |
| FAODs | 発症後診断例   | 52    | 20     | 28    |
|       | スクリーニング例 | 92    | 4      | 4     |

日本人長鎖脂肪酸代謝異常症の患者数把握と、治療指針作成および長期  
フォローアップ体制確立のための研究

分担研究報告 5)

研究分担者 但馬 剛 広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学 助教

迅速酵素活性測定＋遺伝子解析による  
極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症の確定診断

研究要旨

タンデム質量分析法による有機酸・脂肪酸代謝異常症の新生児スクリーニング陽性例および有症状精査陽性例の確定検査として、我々は高速液体クロマトグラフィーを用いてリンパ球中の酵素活性を簡便迅速に測定する方法を開発し、主要対象疾患に応用してきた。VLCAD 欠損症はそのひとつで、2008 年までに新生児スクリーニング陽性 2 例と有症状精査陽性 20 例を解析した。前者では 2 例とも罹患と診断され、後者では骨格筋症状が明らかな 7 例が罹患と診断されたが、13 例は正常活性を示し、その多くは非特異的な低血糖症例であった。2009 年には新たに有症状精査 4 例を解析し、骨格筋型 1 例と最重症新生児型 1 例を罹患と診断したが、やはり最重症新生児型様の臨床像を示した別の 2 例（双胎例）はヘテロ保因者相当の結果であった。遺伝子解析を実施できた症例では、総じて酵素診断結果に矛盾しない所見が得られたが、一部は病的意義の評価が困難な新規の変化であった。これらのことから、VLCAD 欠損症の診断にはタンデム質量分析法によるスクリーニング結果を速やかに確定させる検査体制を維持することが不可欠であり、我々の酵素活性測定は有用性の高い確定診断法と考えられた。

A. 研究目的

タンデム質量分析法を用いたアシルカルニチン分析では、炭素鎖数 14 の不飽和アシルカルニチン (C14:1-AC) 増加所見によって、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症をスクリーニングすることができる。陽性例の確定検査として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたリンパ球中の酵素活性測定法を開発・応用して、その有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 酵素診断

国内各地の血中 C14:1-AC 陽性例について、リンパ球を粗酵素源として palmitoyl-CoA から 2-hexadecenoyl-CoA を生成させ HPLC で定量する既報の方法 (Tajima G et al.: Pediatr Res 64: 667-672, 2008) で酵素活性を測定した。

2) 遺伝子診断

ゲノム DNA を基に各エクソンを直接塩

基配列決定法で解析した。

3) 倫理面への配慮

タンデム質量分析法による新生児スクリーニングの試験研究、および VLCAD 欠損症の遺伝子解析については広島大学倫理委員会で承認済みであり、所定の説明を行い、同意書を得た上で実施した。酵素活性測定についても、遺伝子解析について承認を受けた方法に準じて、同意書を得た上で実施した。

C. 研究結果

1) 酵素診断実績（表 1, 2）

2008 年までに新生児スクリーニング陽性 2 例と有症状精査 20 例の診断依頼があり、前者は 2 例とも罹患と判定されたが、後者のうち酵素活性低下を認めたのは 7 例のみで、13 例は除外診断された。2009 年には一卵性双生児を含む有症状精査 4 例を解析し、2 例を罹患と診断したが、双胎例は正常ないしヘテロ保因者と考えら

れる結果であった。

## 2) 遺伝子診断実績（表 1, 2）

2008 年までの酵素活性測定例のうち、活性低下 9 例中 5 例と、活性低下を認めなかった 13 例中 9 例について遺伝子解析を実施した。前者では全例で複合ヘテロ変異が同定され、後者ではいずれも変異は検出されなかった。

2009 年の新規 4 症例のうち、酵素活性低下を認めた骨格筋型の 1 例では複合ヘテロ変異が同定された。残存活性がほとんどなく、最重症の新生児型と考えられた 1 例ではホモ接合性の 1 塩基置換が見出されたが、アミノ酸の置換は伴わない変化であった。エクソン 13 末端部に位置していることから、スプライス異常を引き起こすのかも知れないが、両アレルに大欠失が存在する可能性も推測される（※追加の解析は未施行）。残存活性からヘテロ保因者とも考えられた双胎例では、1 アレルに新規変異の可能性がある 1 塩基置換が認められた。

## D. 考察と結論

血中 C14:1-AC の増加を指標とするスクリーニング陽性例は、我々が酵素診断を実施している他の有機酸・脂肪酸代謝異常症と比較しても、発見頻度がかなり高くなっている。しかしながら、新生児スクリーニング発見例は少なく、我々が解析依頼を受けたのは 2 例に留まっており、大半は有症状精査例が占める形となっている。2008 年までの有症状精査例で酵素活性低下を認めた 7 例は、すべて発症時期の遅い骨格筋型の臨床像を示し、急性期血清 CK の著しい増加を伴っていた。

2009 年には新たに有症状精査 4 例の解析依頼があり、うち 1 例は同様に骨格筋型の罹患者と診断されたが、他の 3 例は新生児期に低血糖症ないし心停止を起こした症例で、VLCAD 欠損症であれば最重症型に相当する病像であった。このうち 1 例は酵素活性測定で合致する結果が得られた。他の 2 例は双胎例で、酵素活性は対照の 50% 程度あり、罹患は否定的であったが、遺伝

子解析では新規の塩基置換が 1 アレルに見いだされ、VLCAD 欠損症のヘテロ保因者と思われた。低血糖症・心停止の原因は他に求める必要があるが、ストレス負荷時の C14:1-AC 軽度増加への関与はあると推測される。

一方、酵素活性測定結果が正常で、スクリーニング所見は「偽陽性」と判断された例が少なからず生じていた。その多くはケトン体増加を伴う低血糖症の精査例であり、脂肪酸動員の亢進によって非特異的に長鎖アシルカルニチンの軽度増加を来したものと推測された。このようなケースの除外診断には酵素活性測定が最も優れた方法と言える。遺伝子解析でも矛盾しない結果であった。

このように、タンデム質量分析法による代謝異常症スクリーニング検査を導入すると、VLCAD 欠損症を疑われる症例の発見頻度はかなり高いと考えられる。我々の経験では、そのうち過半数が非罹患者であり、スクリーニング陽性例の確定検査を速やかに実施しなければ、現場での診療方針に混乱を来すことが懸念される。我々の簡便迅速な酵素診断法は、このような要請に対して非常に有用であり、本疾患の国内実態の解明に寄与すべく、実施体制を引き続き維持したいと考えている。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 但馬剛, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介. タンデムマス新生児スクリーニングで発見された中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 3 例の診療経験. 特殊ミルク情報, 45: 18-21, 2009.
- 2) 但馬剛, 佐倉伸夫. 新生児タンデムマスパイロット研究にて異常を指摘された新生児例. 日本先天代謝異常学会 (編), 症例から学ぶ先天代謝異常症. 診断と治療社, 113-116, 2009.
- 3) 但馬剛, 佐倉伸夫. メープルシロップ尿症の酵素診断. 日本マス・スクリーニング学会誌, 19: 45-49, 2009.
- 4) 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-OTC 欠損症を中心として-。日本マス・スクリーニング学会誌，19：29-32，2009.

- 5) 大坪善教，白尾謙一郎，岡田賢，但馬剛，佐倉伸夫，楠本隆，青木幹弘，中下誠郎．新規 *ETHE1* 遺伝子変異を認めたエチルマロン酸脳症の1例．日本小児科学会雑誌，113；739-744，2009.

## 2. 学会発表

- 1) Tajima G, Sakura N, Tsumura M, et al.: The ten-year experience of tandem mass spectrometry-based newborn screening in Hiroshima area of Japan. The 2nd Kure International Medical Forum. Kure, July 2009
- 2) 但馬剛，佐倉伸夫，津村弥来，他：広島県におけるタンデムマス新生児スクリーニング10年間の経験．第36回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2009年8月
- 3) 但馬剛，佐倉伸夫，畑郁江，重松陽介：HPLCを用いたグルタル酸尿症1型の酵素診断．第34回日本医用マススペクトル学会．東大阪，2009年9月
- 4) 但馬剛，佐倉伸夫：タンデムマス・スクリーニングに向けた簡易な酵素活性測定法の開発．第51回日本先天代謝異常学会．東京，2009年11月

## F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表 1. 血中 C14:1-アシルカルニチン増加例の酵素診断・遺伝子診断：2008 年までの実績

| 被験者               | 残存活性 (%)*  | 遺伝子解析結果           |         |
|-------------------|------------|-------------------|---------|
| 新生児スクリーニング陽性      | 12.5       | C237R             | R511Q   |
| 新生児スクリーニング陽性      | 11.7       | T258M             | 997insT |
| 低血糖＋骨格筋症状         | 5.4        | 他施設で複合ヘテロ変異を同定済み  |         |
| 骨格筋症状             | 6.3        | 995insT           | V547M   |
| 骨格筋症状             | 9.5        | V174M             | R450H   |
| 他の骨格筋型 4 例        | 6.5～25.5   | 未解析               |         |
| 低血糖症 11 例 ＋ 他 2 例 | 53.9～148.9 | 解析実施 9 例には変異を検出せず |         |

\* 残存活性は正常対照検体での平均活性値に対する百分率表示。

表 2. 血中 C14:1-アシルカルニチン増加例の酵素診断・遺伝子診断：2009 年の新規解析例

| 被験者               | 残存活性 (%)* | 遺伝子解析結果                            |       |
|-------------------|-----------|------------------------------------|-------|
| 新生児発症（低血糖症・心停止）   | 0.5       | 1332G>A (K444K) homo<br>(スプライス変異？) |       |
| **新生児発症（低血糖症・心停止） | 44.8      | A359V hetero                       |       |
| **新生児発症（低血糖症）     | 57.2      | A359V hetero                       |       |
| 骨格筋症状             | 4.7       | P266A                              | R385W |

\* 残存活性は正常対照検体での平均活性値に対する百分率表示。

\*\* 双胎例

### 〔III〕 研究成果の刊行に関する一覧表

## 刊行成果一覧

## 書籍

| 著者氏名         | 論文タイトル名                                    | 書籍全体の編集者名      | 書 籍 名                 | 出版社名       | 出版地 | 出版年  | ページ     |
|--------------|--------------------------------------------|----------------|-----------------------|------------|-----|------|---------|
| 大竹 明         | ミトコンドリア、高<br>乳 酸 血 症 Meet<br>the Expert    | 日本先天代<br>謝異常学会 | 症例から学ぶ<br>先天代謝異常<br>症 | 診断と治<br>療社 | 東京  | 2009 | 140-143 |
| 但馬剛,<br>佐倉伸夫 | 新生児タンデムマ<br>スパイロット研究<br>にて異常を指摘さ<br>れた新生児例 | 日本先天代<br>謝異常学会 | 症例から学ぶ<br>先天代謝異常<br>症 | 診断と治<br>療社 | 東京  | 2009 | 113-116 |

## 雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 論文タイトル名                                                                                                                                                                                                  | 発表誌名                                             | 巻号      | ページ     | 出版年  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------|---------|------|
| Murayama K, Nagasaka H,<br>Tsuruoka T, Omata Y, Horie<br>H, Tregoning S, Thorburn DR,<br><u>Takayanagi M, Ohtake A</u>                                                                                                                                                                  | Intractable secretory<br>diarrhea in a Japanese boy<br>with mitochondrial<br>respiratory chain complex<br>I deficiency.                                                                                  | Eur J Pediatr                                    | 168(3)  | 297-302 | 2009 |
| Kaji S, Murayama K, Nagata<br>I, Nagasaka H, <u>Takayanagi M,</u><br><u>Ohtake A,</u> Iwasa H,<br>Nishiyama M, Okazaki Y,<br>Harashima H, Eitoku T,<br>Yamamoto M, Matsushita H,<br>Kitamoto K, Sakata S,<br>Katayama A, Sugimoto S,<br>Fujimoto Y, Murakami J,<br>Kanzaki S, Shiraki K | Fluctuating liver functions<br>in siblings with MPV17<br>mutations and possible<br>improvement associated<br>with dietary and<br>pharmaceutical treatments<br>targeting respiratory chain<br>complex II. | Mol Genet<br>Metab                               | 97(4)   | 292-296 | 2009 |
| Komaki H, Nishigaki Y, Fuku<br>N, Hosoya H, Murayama K,<br><u>Ohtake A,</u> Goto YI,<br>Wakamoto H, Koga Y, Tanaka<br>M                                                                                                                                                                 | Pyruvate therapy for Leigh<br>syndrome due to<br>cytochrome c oxidase<br>deficiency.                                                                                                                     | Biochim<br>Biophys Acta<br>(General<br>Subjects) | 1800(3) | 313-315 | 2010 |

|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                  |                                   |       |         |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------|---------|------|
| Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T                                                  | Japan Elaprase Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II)                | Mol Genet Metab                   | 99(1) | 18-25   | 2010 |
| 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&Dev.                        | 32    | 409-11  | 2010 |
| 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 |
| 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 |

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

|                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                   |         |           |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|-----------|------|
| Li H, Fukuda S, <u>Hasegawa Y</u> ,<br>Kobayashi H, Purevsuren J,<br>Mushimoto Y, Yamaguchi S                               | Effect of heat stress and<br>bezafibrate on<br>mitochondrial $\beta$ -oxidation<br><br>Comparison between<br>cultured cells from normal<br>and mitochondrial fatty<br>acid oxidation disorder<br>children using in vitro<br>probe acylcarnitine<br>profiling assay | Brain &<br>Development            | 32(5):  | 362-370   | 2010 |
| Mushimoto Y, <u>Hasegawa Y</u> ,<br>Kobayashi H, Li H,<br>Purevsuren J, Nakamura I,<br>Taketani T, Fukuda S,<br>Yamaguchi S | Enzymatic evaluation of<br>glutaric academia type 1 by<br>an in vitro probe assay of<br>acylcarnitine profiling<br>using fibroblasts and<br>electrospray ionization<br>/tandem mass spectrometry<br>(MS/MS)                                                        | Journal of<br>Chromatography<br>B | 877     | 2648-2651 | 2009 |
| 大坪善教, 白尾謙一郎,<br>岡田賢, <u>但馬剛</u> , 佐倉伸夫,<br>楠本隆, 青木幹弘,<br>中下誠郎                                                               | 新規 <i>ETHE1</i> 遺伝子変異<br>を認めたエチルマロン<br>酸脳症の 1 例                                                                                                                                                                                                                    | 日本小児科学<br>会雑誌                     | 113 (4) | 739-744   | 2009 |

#### 〔IV〕 研究成果の刊行物・別刷

# 症例から学ぶ 先天代謝異常症

～日常診療からのアプローチ～

編集 日本先天代謝異常学会

編集委員：遠藤文夫, 山口清次, 高柳正樹, 深尾敏幸



診断と治療社

## 1 高乳酸血症の鑑別

低血糖, ケトーシスの有無, 乳酸/ピルビン酸(L/P)比と3-ヒドロキシ酪酸/アセト酢酸(3-OHB/AcAc)比の測定により, ある程度の病因の予測は可能である(表1).

## 2 ミトコンドリア病, 先天性高乳酸血症の発症形態

いかなる症状, いかなる臓器・組織, 何歳でも, そしていかなる遺伝形式でも発病する(図1). ミトコンドリアの最大の役割はATPの合成であり, その中心的存在がミトコンドリア呼吸鎖である. 図2にミトコンドリア呼吸鎖を示すが, ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の共同作業で生合成されることに留意してほしい. したがって, ミトコンドリア病はミトコンドリア遺伝(母系遺伝)以外に常染色体・性染色体すべての遺伝形式で発病し得る. 特に新生児発病例は症状が多彩で重篤な症例が多いが, その9割近くは核遺伝子異常によるものである. さらに新生児発病例は, ①脳筋症状, ②消化器・肝症状, ③心筋症状が3大病型である. 従来より強

調されている筋肉症状が前景にたつ症例は, 年長発症の軽症例に多い.

## 3 ミトコンドリア病の診断基準

以上のようにミトコンドリア病は症状・所見が多岐にわたるために, 簡便でしかもすべてを網羅する診断基準を作ることは非常に難しい. 筆者らの用いている Bernier らの診断基準を示す(表2). 従来よりの病理組織所見に加えて, 呼吸鎖複合体酵素活性の診断上の重要性がわかる. 一見煩雑に見えるが慣れればこれに勝る基準はない. 梶らの mtDNA 枯渇症候群は大基準 III(と後ほど V) + 小基準 I, III, VI を満たし, 内藤らの呼吸鎖 I 欠損症は大基準 III + 小基準 I, VI を満たし, いずれも確定例に当てはまる.

最後に筆者らが診断した90例の臨床診断を図3に示す. 非常に多岐にわたることに注目いただきたい.

表1 高乳酸血症の鑑別

| 時間帯 | 低血糖   | ケトーシス | L/P | 3OHB/AcAc | 疾患名 or 欠損酵素名            |
|-----|-------|-------|-----|-----------|-------------------------|
| 食後  | (+)   | (+)   | →   | →         | 糖原病 III, VI, VIII 型, GS |
|     | 空腹時   | 空腹時   | →   | →         |                         |
|     | (+/-) | (-)   | →   | →         | PDHC                    |
|     | (+/-) | (+)食後 | ↑   | ↓         | PC, MC, αKGDHC          |
| 空腹時 | (+/-) | (+)食後 | ↑   | ↑         | 呼吸鎖, TCA cycle          |
|     | (+)   | (+)   | →   | →         | 糖原病 I 型, FDPase         |
|     | 空腹時   | 空腹時   | →   | →         |                         |
|     | (+)   | (-)   | →   | →         | FAO, FDPase             |
|     | 空腹時   | 空腹時   | →   | →         |                         |

GS: グリコーゲン合成酵素, PDHC: ピルビン酸脱水素酵素複合体, PC: ピルビン酸カルボキシラーゼ, MC: マルチプルカルボキシラーゼ, αKGDHC: αケトグルタル酸脱水素酵素複合体, FDPase: 果糖ジフォスファターゼ, FAO: 脂肪酸β酸化系



図1 ミトコンドリア病の発症形態

Munnich & Rustin (Am.J.Med.Genet. 2001, 106: 4-17) 他を改変.

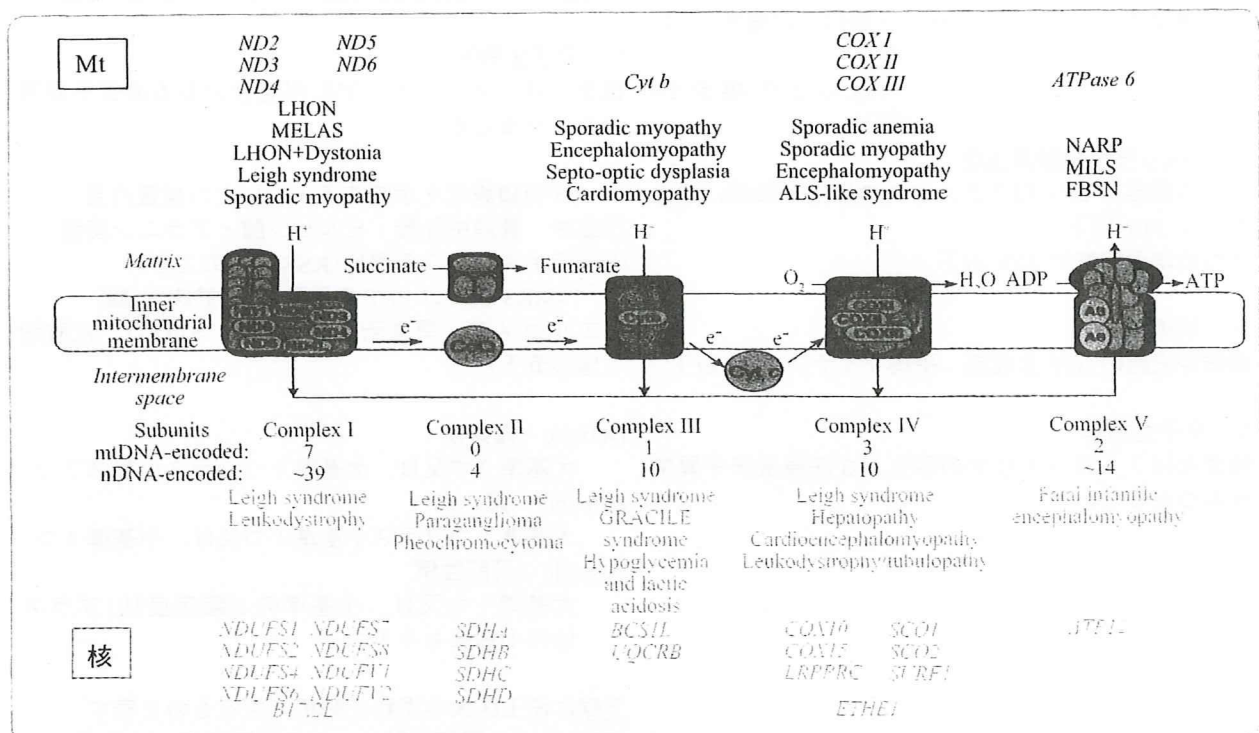


図2 ミトコンドリア呼吸鎖→核とMtの共同作業

黒字イタリックはミトコンドリアにより, 青字イタリックは核遺伝子によりコードされるサブユニットまたはアセンブリー-蛋白質遺伝子を示す. その内側に示されるのは, それぞれの異常で報告されている病型である. DiMauro S and Schon EA in Mitochondrial Medicine, 2006 Informa より一部改変.