

200936248A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

シトリン欠損症の自然歴と生活歴にもとづく実態
解明と治療指針の作成に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡野 善行

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
シトリン欠損症の自然歴と生活歴にもとづく実態解明と治療指針	-----1
の作成に関する研究	
岡野 善行	
（資料1）シトリン欠損症調査用紙	
（資料2）シトリン欠損症治療指針（案）	
（資料3）疾患概要	
（資料4）研究者リスト	
II. 分担研究報告	
1. シトリン欠損症モデル（citrin/mGPDH double KO）	-----15
マウスを用いた病態解析と新規治療法の開発	
佐伯 武頼	
2. シトリン欠損症の遺伝子診断および病歴調査に関する研究	-----25
小林 圭子	
3. CTLN2患者における病歴調査に関する研究	-----33
池田 修一	
4. シトリン欠損症患者への食事療法の効果に関する研究	-----35
大浦 敏博	
5. 無症状期シトリン欠損症の病態について	-----39
長坂 博範	
6. PedsQL Multidimensional Fatigue Scale	-----49
（子どもの倦怠感尺度）日本語版の開発	
小林 京子	
（資料1）PedsQL 疲労尺度（子供のQOL）調査用紙	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----55
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----57

〔I〕 総括研究報告

シトルリン欠損症の自然歴と生活歴にもとづく実態解明と治療指針の作成

研究代表者 岡野 善行 大阪市立大学 講師

研究要旨： 本研究ではシトルリン欠損症による新生児期の肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) に対する治療指針の作成、生活指導と食事療法による成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の発症予防、薬物治療の開発による肝移植の回避を目標にしている。CTLN2 発症後の治療には、ビルビン酸ナトリウム投与と低炭水化物食療法がその進行を抑制し、肝移植を回避できる可能性を示唆する結果を得ている。幼児期以降は適応・代償期として見かけ上健康であるが、食癖異常、成長障害、易疲労感などの症状を示す。この時期でのビルビン酸ナトリウムの治療効果を判定するための有効な検査として、シトルリン、酸化ストレスマーカー、患者 QOL 調査、食事調査の有効性を検討している。新生児期の NICCD に対する適切な治療指針の作成のために調査票を作成し、その結果を解析中である。タンデムマス法による新生児マススクリーニングでの患者発見は予防医学の観点から非常に重要で効果的であるが、一部の患者が発見されているにすぎない。わが国で CTLN2 発症のために、国内で 45 例以上に肝移植が実施されている。本研究は、患者にとって生命の危険を伴う移植治療を回避し、また、医療費の軽減化をはかる事を目標にしている。また、患者の学校生活、社会生活上での QOL の向上に貢献し、そして、社会全体でその認識と理解を深め、国民の保健・医療・福祉の向上に貢献する。

研究分担者

佐伯武頼 徳島文理大学健康科学研究所
教授
小林圭子 鹿児島大学大学院医歯学総合研究
科 准教授
池田修一 信州大学医学部医学科神経内科学
教授
大浦敏博 東北大学医学部小児科 臨床教授

予後不良な疾患である成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) が SLC25A13 異常で生じることを報告した (Nat Genet. 1999)。その遺伝子産物であるシトルリンはミトコンドリア内膜に局在する肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体であり、その欠損は細胞質へのアスパラギン酸供給障害やミトコンドリアへの NADH の供給障害、糖新生障害となる (Palmieri L, EMBO J. 2001)。

シトルリン欠損症は新生児期に子宮内発育不全、肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) で発症し、生後 1 才までに自然寛解する (Tamamori A, Eur J Pediatr 2002, Ped Res 2004)。幼児から思春期は適応・代償期として見かけ上健康である

A. 研究目的

Kobayashi らは高アンモニア血症、高シトルリン血症、肝障害、精神症状を主症状とし、

が、食癖異常、成長障害、易疲労感などの症状が指摘されている。成人期にはシトリン欠損症患者の20%に CTLN2 を発症し、肝移植を必要とする。この CTLN2 発症には遺伝子型の違いは関与せず、環境因子、生活習慣、食事習慣等の関与が推定されている。現在、肝移植以外の確定された治療法はない。

本研究の目的は、シトリン欠損症の出生から老年に至るまでの自然歴・生活歴を明らかにし、各年代に適した生活指導を含めた食事療法、薬物療法等の治療法を開発することである。そのために、1) 新生児～乳児期の NICCD に対する治療ガイドラインを作成する。2) シトリン欠損症の自然歴・生活歴から CTLN2 発症の予防因子の発見と食事療法を確立する。3) 患者の QOL を客観的に評価する方法を確立する。4) シトリン欠損による生体代謝環境の解明と CTLN2 発症に対する検査マーカーを検索する。5) 薬物療法：ピルビン酸ナトリウムの有効性をアミノ酸、糖代謝、酸化ストレスマーカー、PedsQL で評価することである。そして、患者のよりよい QOL をめざした生活指導と食事療法、薬物療法を行い、CTLN2 発症を予防する。

B. 研究方法

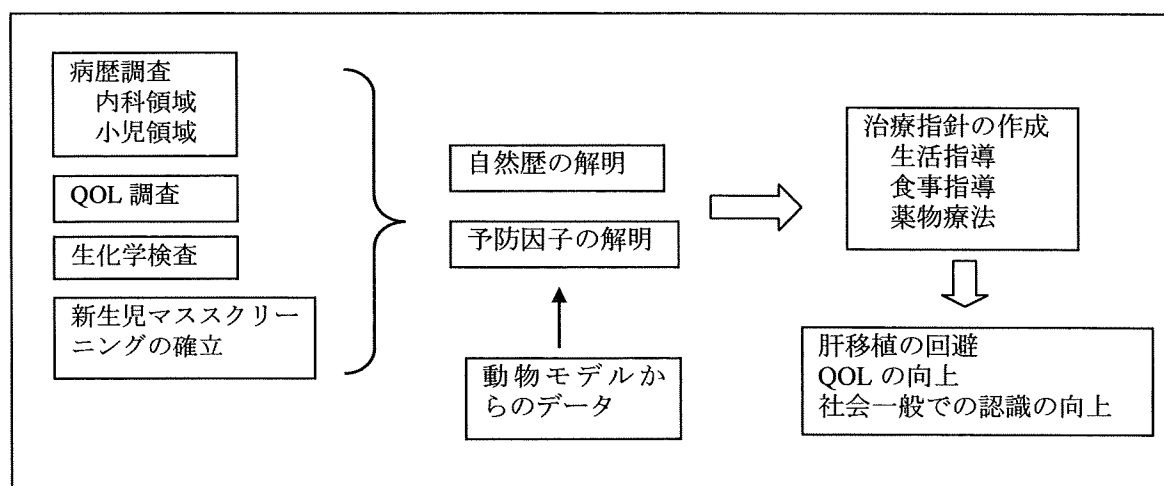
1. 病歴・病態調査

1) 小児領域の患者(100 例以上)について病歴調査を行う。本症例を多く経験している窪田満(手稲溪仁会病院)、長尾雅悦(西札幌病院)、野口篤子(秋田大学)、藤沢知雄・乾あやの(済生会横浜東部病院)、高柳正樹(千葉県こども病院)、虫明聡太郎(大阪大学)、伊藤哲哉(名古屋市立大学)、梶俊策(津山中央病院)玉森晶子(長吉総合病院)芳野信(久留米大学)、井原健二(九州大学)の各研究協力者に患者登録を依頼し、調査を行った。大浦と小林圭子が担当した。

2) 成人領域の患者は池田修一(研究分担者)と矢崎正英(研究協力者、信州大学)が担当した。

3) 新生児から乳児期の症状(胆汁うつ滞症、発育不全、低血糖等)と治療(薬物療法と食事療法)について検討するために調査票を作成した。

4) 乳児期肝不全のため生体肝移植を必要とした患児について、その臨床経過、治療、切除肝の病理組織分析を行った。



5)小児の疲労尺度の測定方法の開発：シトリン欠損症の代償期（無症状期）の生活全般および疲労の QOL を客観的に把握するために、PedsQL を作成し、その有効性を確認した。すなわち、正常集団 500 名以上について評価、標準化を行った。岡野と小林京子（研究協力者、神戸大学大学院保健学研究科）が担当した。

6) シトリン欠損症の身体状況を検討した。すなわち、一般生化学、肝臓機能検査、血中乳酸/ピルビン酸、アンモニア、血清アミノ酸、PSTI、酸化ストレスマーカー（尿 8-OHdG, ACR-lysine、血中ビタミンE、カタラーゼ、SOD）を測定する。長坂博範（研究協力者、千葉県こども病院）が担当した。

2. 栄養療法、治療法の開発

成人発症 II 型シトルリン血症では、緊急救命的な治療として、ピルビン酸ナトリウムの投与と食事療法がなされている。今回、その効果について大浦と池田が報告する。

3. 新生児マススクリーニング

シトリン欠損症の新生児マススクリーニングによる早期発見は CTLN2 発症予防に対しての生活および食生活指導、医療ケアにとって重要な要素である。現在、北海道、東京、大阪、福井、島根、熊本でタンデムマス法が実施されており、新生児期の無症状シトリン欠損症患者の存在の有無とマススクリーニングでの発見頻度、CTLN2 発症との関連性を明らかにする。重松陽介（研究協力者、福井大学医学部看護学科）が担当した。

4. 動物モデルを用いた病態解明と治療方法の開発

佐伯（研究分担者）はシトリン欠損症モデル動物（KO マウス）を作成し、より詳細な病

態解析、治療法の効果判定を可能としている（Saheki T J Biol Chem 2007）。森山光章（研究協力者、大阪府立大学大学院）の協力を得て、動物モデルによる食事療法、肝灌流実験、薬剤効果実験等でヒトの病態解明を補足する。

（倫理面への配慮）

DNA 診断および追跡調査をする際には患者に対する説明書、同意書を作成し、1) 検査目的、2) 検査法と費用、3) プライバシーの保護、4) 検査をすることの利益と不利益、5) 診断後のカウンセリング体制について説明、書面での同意を得た。また、検査を受けなくても不利益を受けないこと、同意後にも検査を中止する権利があること、結果については希望に応じて知らせる（知りたくない権利の尊重）事などを説明し、患者、家族の人権の擁護および不利益の排除に努める。

C. 研究結果

1. 病歴・病態調査

1) 本研究に参加する患者登録を進め、110 例を登録した。平成 21 年度は新生児胆汁うっ滞に対する診断と治療指針(案)を作成するため、0-2 才まで臨床経過と治療についての調査票を作成配布した（資料 1）。現在、回収中である。

2) 成人 26 名の成人型シトルリン血症（CTLN2）患者の臨床像を検討した。26 名の患者のうち、男性は 17 名で女性は 9 名であった。CTLN2 の平均発症年齢は 37.4 歳であり、膵炎の罹患歴がある患者が 7 名(27%)、肝癌罹患患者が 2 名(8%)存在した。また全例に脂肪肝の所見が認められた。CTLN2 患者では、神経症状発症以前に、膵炎や肝癌、脂肪肝を罹患している患者が存在し、若年者非アルコール性膵炎、肝癌、脂肪肝、脂肪肝炎患者に、

シトリン欠損症患者が含まれている可能性が示唆されている。(研究分担者 池田修一、研究協力者 矢崎正英)

2) 小児の疲労尺度の測定法の開発：小児の倦怠感の主観的評価を可能にする PedsQL Multidimensional Fatigue Scale (以下倦怠感尺度) の日本語版の開発を行った。倦怠感尺度は、米国の Varni が開発し、高い信頼性と妥当性が示されており、全 18 項目、「全般的な疲労について」「睡眠／休息時の疲労について」「知る／理解することの疲労について」の 3 つの下位尺度で構成されている。小児自身が回答する自己評価尺度と親が回答する代理評価尺度を備えている。

開発は、順翻訳、逆翻訳、プレテストの後、5～12 歳の小児 652 名とその親及び 1～4 歳の小児の親 743 名を対象に信頼性と妥当性を検討した。その結果、信頼性係数クロンバックの α は総得点で自己評価尺度 0.87 及び代理評価尺度 0.92 と良好であった。また、定期的な通院の必要な「慢性状態の小児群」と疾患をもたない「健康群」に分け、両群の倦怠感尺度の得点を比較したところ、有意に「健康群」が高い得点を示し、エフェクトサイズは、小児自己評価 0.20～0.37、親代理評価 0.28～0.46 であり、倦怠感尺度の臨床的妥当性が明らかになった。今後は倦怠感尺度をシトリン欠損症患者に適用していく予定である。(研究協力者 小林京子)

3) シトリン欠損症無症状期の病態を明らかにするために、3-7 才のシトリン欠損症患者 20 名のアミノ酸、糖質、脂質代謝のプロファイルと酸化ストレスマーカーについて検討した。いずれの患者も肝機能検査、アンモニアは正常範囲内であった。尿素サイクルでは、オルニチン、シトルリンはいずれも正常対照

より有意に高値であった。アルギニンからの NO 産生には影響がなかった。糖質代謝では、血糖、ガラクトース、ピルビン酸、乳酸値は正常対照と差はなかったが、乳酸/ピルビン酸比は患者群で有意に高値を示した。高脂肪高蛋白低炭水化物の食事の影響を考える必要があるが、脂質代謝では、総コレステロール、LDL-C、HDL-C は 1.5 倍高値を示している。酸化ストレスマーカーでは、尿中 acrolein-lysine、8-OHdG は有意に高く、血中ビタミン E は低下し、SOD とカタラーゼ活性は正常対照より有意に高値であった。無症状期といわれている著明な臨床症状のない時期においても、尿素サイクル機能障害、脂質異常(高コレステロール血症など)、酸化ストレスの影響を受けており、ミトコンドリア機能の低下が推定された(Nagasaka Mol Genet Metab 2009)。(研究協力者 長坂博範)

2. シトリン欠損症の診断

日本人症例の場合、まず、15 種の既知変異検索を実施する。これまでにシトリン欠損症と確定診断した 442 例では 15 種の変異解析により、大体 95% の allele を診断できた。残り 4% の allele では 15 種以外の変異(新規変異を含む 22 種)を見いだしたが、約 1% の allele ではさらに新たな変異を同定する必要がある。

海外の臨床施設からも多くの依頼を受け、*SLC25A13* 遺伝子・mRNA 解析を行い、600 例近いシトリン欠損症からこれまでに 57 種の変異・塩基変化を明らかにしている。日本人症例で明らかにした変異は、中国・韓国・ベトナム・マレーシアなど東南アジア人にも共通に認められるものが多いが、イスラエル人や白人集団などとは 2 種の変異以外すべて異なっていた。

3. 成人発症 II 型シトルリン血症(CTLN2)患

者の治療

1) CTLN2 患者の肝移植にかわる治療法の確立目的で、脳症発症患者 7 名に対しピルビン酸ナトリウムを投与し有効性を検討した。全例炭水化物制限食（炭水化物熱量/食事総熱量比を 40-50%とする）とピルビン酸ナトリウム 4~9g/日を投与し（最長 2 年間）、臨床症状を観察した。ピルビン酸ナトリウム投与後気分不快にて中止した 1 名を除き、6 名では、ピルビン酸ナトリウム投与後に脳症の再発頻度の低下もしくは再発の消失、血漿アンモニア値の低下を認めた。この結果から炭水化物制限食とピルビン酸ナトリウム投与は、CTLN2 に対し非常に有効で、肝移植療法に変わる治療法となりうる可能性が示唆されている。

また、本疾患の脳症発症・病態悪化因子として、過剰な糖質投与、飲酒、グリセロール投与が知られている。肝不全食で病態が悪化した成人型シトルリン血症（CTLN2）症例を経験し、高脂肪炭水化物制限食（PFC 15%:40%:45%）とアルギニン投与にて回復している。炭水化物含有量の多い肝不全食、腎不全食などの病院セット食は CTLN2 の病態を悪化させる可能性があるため、注意喚起が必要である(Fukushima Inter Med 2010)。(研究分担者 池田修一、研究協力者 矢崎正英)

2) 68 歳で初めて CTLN2 を発症した症例の報告がなされている。家族からの聞き取りにより、普段は好まない飴一袋（約 150 g）を発症数日前に摂取していたことが判明した。この患者に対してアルギニン、ピルビン酸ナトリウム投与、高蛋白質、高脂肪、低炭水化物食事療法を施行したところ神経症状の改善、食欲増進、全身状態も良好となり、検査上も血中シトルリン値、睪分泌性トリプシンインヒビター（PSTI）値も正常化した。CTLN2 は栄養療法とピルビン酸ナトリウムにて改善

する可能性が示唆された。(研究分担者 大浦敏博)

4. 新生児マススクリーニング

わが国のタンデムマススクリーニングでのシトリン欠損症の発見率は 12/91 万人と、遺伝子診断からの患者頻度 1/1.7 万人に比較して少ない。新生児期に生化学的異常や臨床症状を示さない患者の存在が推定され、その方法の改善とその有効性の検討が必要であった。(研究協力者 重松陽介)

5. シトリン欠損症モデル (Citrin/mGPDH double KO) マウスを用いた病態解析と新規治療法の開発を行った。

1) モデルマウスは、シトリン欠損症発症誘導因子である蔗糖、グリセロールおよびアルコールの摂取を好まなかった。

2) 血中アンモニア濃度上昇を起こす蔗糖の投与によって、肝内 glycerol 3-phosphate (G3P)濃度が著しく増加した。さらに、他の発症誘導因子であるグリセロールやエタノールの投与でも同様に肝内 G3P 濃度の上昇を起こす。以上から、肝内 G3P 濃度はシトリン欠損症発症診断および薬剤開発のマーカーとなりうる。グリセロールやエタノールも大量であれば、肝内 G3P 濃度を挙げ、脂肪肝などの形成に関与した。

3) 野生型マウスの維持が可能な食餌である AIN93 の投与は、モデルマウスの、摂取量減少によると思われる体重減少をもたらした。AIN93 に含まれるたんぱく質含量の増加は、摂取量と体重の増加をもたらし、シトリン欠損症に対する食事のたんぱく質含量の重要性を示唆した。

4)ピルビン酸ナトリウムの投与はモデルマウスにおいて蔗糖投与による高アンモニア血症および肝内 G3P 濃度上昇を完全に抑制した。

5) シトルリン欠損症患者においても、ピルビン酸ナトリウム予備的試験投与は、臨床症状(疲労感、発育不良)と検査所見(血漿シトルリン濃度、血漿 Thr/Ser 比、血清 PSTI 値)の著しい改善をもたらした。

6) ある種のアミノ酸投与はモデルマウスの蔗糖忌避行動を、蔗糖を好む嗜好に変えとともに、肝内 G3P 濃度を低下させ、新治療薬開発の可能性が見いだされた。(研究分担者 佐伯武頼、研究協力者 森山光章)

D. 考察

シトルリン欠損症の研究は、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) は SLC25A13 異常で生じることを研究分担者の Kobayashi らが Nat Genet(1999)に報告したことに始まる。その後も、研究代表者や研究分担者によって、わが国を中心にその研究がなされてきた。本疾患の頻度は日本で 1/17,000、中国南部で 1/6,400 と東アジアを中心に高い頻度を示し、北米、欧州では低頻度の疾患である。以上のように、本疾患の解明にはわが国での研究開発が重要なポイントとなっており、国際的にもその病態解明と治療法の開発が待たれている。

シトルリン欠損症では、異常検査所見・症状が年齢によって変化するため、診断は容易ではない。また、大部分の NICCD 症例は生後 6 ヶ月～1 歳までに検査所見の正常化と症状が消失するが、中には肝移植を必要とする重篤な症例も存在する (5 例/253 例: 2%)。シトルリン欠損症では確定診断として、現在 SLC25A13 遺伝子に異常を見いだすことは不可欠であるため、新規変異同定の継続は必要である。また、シトルリン蛋白の有無を検索することも重要な情報である。さらに、シトルリン欠損症に特有な食癖も診断マーカーとしては強力であるので、詳細な問診の実施が重要

である。

本研究ではシトルリン欠損症による新生児期の NICCD に対する治療指針の作成、生活指導と食事療法による CTLN2 の発症予防、薬物治療の開発を行うことで、肝移植を回避することを目標にしている。成人の CTLN2 発症患者に対するプレリミナリーな研究結果では、理論的に有効であろうと考えられていたピルビン酸ナトリウムと患者の食癖からその有効性が推定されていた高蛋白質高脂肪食の併用は一定の効果を示し、その疾病の進行を抑制し、肝移植を回避できる可能性を示唆する結果を得ている。モデルマウスにおいてもその有効性が確認されている。

適応・代償期においても、本疾患の病態であるエネルギー不足からの易疲労性、成長障害を示す患者は少なくない。アミノ酸、糖質、脂質、そして、酸化ストレスの検査マーカーの探索では、シトルリン高値、ミトコンドリア機能異常、酸化ストレスの増加、高コレステロール血症が明らかであった。たとえ無症状であっても、生体代謝環境は正常コントロールと明らかに異なる結果となっている。これらの検査マーカーを CTLN2 発症前後、肝移植前後の患者で検討するとともに、薬物療法と食事療法の有効性の判定に有用である。患者の QOL 調査および栄養調査に上記検査マーカーを合わせた 3 者を総合的に評価し、よりよいコントロールと QOL、CTLN2 発症予防のための治療指針を作成する。本年度は、これまでの報告をもとにして、治療指針(試案)を作成している(資料 2)。本研究班によって研究調査を十分に行い、EBM に基づいた治療指針へと検証と改訂を行なわなければならない。

シトルリン欠損症患者は自然に低炭水化物、高脂肪、高蛋白質を摂取し、幼児から学童にかけては頻回摂取が必要な患者も認められて

いる。高脂肪食であるために適応・代償期のシトリン欠損症患者では高コレステロール血症となることが明かとなったが、その長期的な影響、生命予後に与える影響は明確ではない。モデルマウスでの食餌での各栄養素の割合の検討を行い、シトリン欠損症患者にとって有用な栄養素の同定および理想的な栄養バランスを確立する必要がある。それらの食事療法のための補助食品の開発を行う。

わが国で CTLN2 発症のために、国内で 45 例以上に肝移植が実施されている。その発症予防のために、生活習慣の改善、食事療法、薬物療法を行うためにも、新生児マススクリーニングによるシトリン欠損症の早期発見は非常に重要である。シトリン欠損症を対象疾患としたタンデムマス法による新生児マススクリーニングの有効性とその限界は今回の調査ではいまだ不確かである。そのため、NICCD 未発症のシトリン欠損症患者が発見できる新たなスクリーニング法の開発について検討する必要がある。シトリン蛋白検出による診断法が報告されており (Tokuhara Mol Genet Metab 2007)、より迅速で鋭敏な診断方法の開発を行うことが必要である。

E. 結論

本研究の結果、1) 新生児マススクリーニングで早期発見と早期治療を行える可能性がある。2) 新生児から乳児期の肝内胆汁うつ滞症 (NICCD)、幼児から青年期の適応・代償期、成人期の成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の各ステージにおいて、食事療法と薬物療法によって、患者の治療と QOL の改善が可能であり、CTLN2 の発症を予防できる。3) モデルマウスを用いた研究で新たな薬物療法の開発が可能である。これらの研究成果は、将来、患者とその保護者に対して、学校生活、社会生活上での QOL の向上に貢献し、そして、

社会全体でその認識と理解を深め、国民の保健・医療・福祉の向上に貢献できる可能性を十分に示している。

参考文献

1. Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, et al (1999) The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* 22: 159-163.
2. Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, et al (2001) Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J* 20: 5060-5069.
3. Tamamori A, Okano Y, Ozaki H, et al (2002) Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: severe hepatic dysfunction in an infant requiring liver transplantation. (2002) *Eur J Pediatr* 161: 609-613.
4. Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y, et al (2004) Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency. *Pediatr Res* 56: 608-614.
5. Saheki T, Iijima M, Li MX, et al (2007) Citrin/mitochondrial glycerol 3-phosphate double-knockout mice recapitulate features of human citrin deficiency. *J Biol Chem* 282: 25041-25052.
6. Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, et al. (2009) Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin-deficiency even during the silent period. *Mol Genet Metab* 97:21-26.

7. Fukushima K, Yazaki M, Nakamura M, et al. (2010) Conventional diet therapy for hyperammonemia is risky in the treatment of hepatic encephalopathy associated with citrin deficiency. Intern Med. 49:243-247.
8. Tokuhara D, Iijima M, Tamamori A, et al. (2007) Novel diagnostic approach to citrin deficiency: Analysis of citrin protein in lymphocytes. Mol Genet Metab 90:30-36.

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji J, Miida T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Hirano K, Takayanagi M, Yorifuji T: Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin deficiency even during the silent period. Mol Genet Metab. 2009, 97: 21-26.

2. 学会発表

1. 岡野善行、長坂博範、大浦敏博、小林圭子、佐伯武頼、高柳正樹：無症状期シトリン欠損症の病態について。第 112 回日本小児科学会 2009 年 4 月 17-19 日、奈良
2. Okano Y, Nagasaka H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Takayanagi M: Overcoming Barriers—New Developments and Future Directions for Urea Cycle Disorders:

Hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in the patients with citrin deficiency during the silent period. Satellite symposium 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. 2009.8.28-8.30 (La Jolla, USA)

3. Okano Y, Nagasaka H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Takayanagi M : Hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in the patients with citrin deficiency during the silent period. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. 2009. 8.30-9.2 (SanDiego, USA)
4. Okano Y, Tokuhara D, Tamamori A, Iijima M, Kobayashi K, Saheki T, Yamano T: A dynamic change of clinical manifestations by age in citrin deficiency and novel diagnostic approach to citrin deficiency. International symposium on citrin deficiency. 2009. 9.11-14 (Sheng Yang, People's Republic of China)
5. Okano Y, Nagasaka H, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Takayanagi M. Hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in the patients with citrin deficiency during the silent period. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases: Citrin AASPP-Workshop. 2010. 3. 7-10 (Fukuoka)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

【シトリン欠損症】調査用紙(1)

フリガナ			フリガナ		
患 者 氏 名			男 ・ 女	担当医氏名	
生年月日	西暦	年	月	日	所属機関名 (TEL, FAX Email等)
診断年月日	西暦	年	月	日	
記入年月日	西暦	年	月	日	
家族歴	血族結婚 ☐ 無 ☐ 有(具体的に:) 同病の家族歴 ☐ 無 ☐ 有(具体的に:)				
周産期の特記所見	☐ 無 ☐ 有 (具体的に:)				
出生時データ	在胎週数	週	日, 体重	g, 身長	cm, アプガースコア
新生児期の特記所見	☐ 無 ☐ 有 (黄疸, 体重増加不良, 灰白色便, その他)				
新生児マススクリーニング歴	☐ 正常				
採血日時(生日)	☐ 異常	☐ フェニルアラニン(mg/dl)		☐ メチオニン (mg/dl)	
		☐ ロイシン (mg/dl)		☐ ガラクトース(mg/dl)	
タンデムマススクリーニング歴	☐ 未施行 ☐ 施行 (採血日時 生日) ☐ 正常 ☐ 異常(具体的に:				
初診時データ					
現病歴					
初診時現症	初診時年齢	才	か月(または	生日), 身長	cm, 体重
症状	マスクリーニング異常 ☐ 無 ☐ 有 黄疸 ☐ 無 ☐ 有 体重増加不良 ☐ 無 ☐ 有 肝機能異常 ☐ 無 ☐ 有 凝固異常 ☐ 無 ☐ 有 灰白色便 ☐ 無 ☐ 有 肝脾腫 ☐ 無 ☐ 有 出血傾向 ☐ 無 ☐ 有 白内障 ☐ 無 ☐ 有 低血糖 ☐ 無 ☐ 有 その他、左に具体的な記入をお願い致します。				

検査値、栄養法、薬剤使用状況							
		0-1m	1-3m	3-5m	5-7m	7-12m	12m-
	年齢						
	体重(kg)						
	身長(cm)						
血液検査 生化学検査	Hb (mg/dl)						
	TP (g/dl)						
	Alb (g/dl)						
	T.Bil (mg/dl)						
	D.Bil (mg/dl)						
	ALP (IU/L)						
	AST (IU/L)						
	ALT (IU/L)						
	γ GTP (IU/L)						
	LAP (IU/L)						
	総胆汁酸 (μ mol/L)						
	BS (mg/dl)						
	Lac/Pyr(mg/dl//mg/dl)						
	NH3 (μ g/dl)						
	T. Chol (mg/dl)						
凝固検査	PT (%、sec)						
	APTT (%、sec)						
	HPT (%)						
血中アミノ酸分析 (nmol/ml or mg/dl) 単位に○を つけて下さい	Cit						
	Tyr						
	Thr						
	Ser						
	Gln						
栄養法 (それぞれの栄養法 のおおよその割合% を記入してください。)	☐ 総哺乳量(わかれば)						
	☐ 母乳						
	☐ 人工乳						
	☐ MCT						
	☐ ガラクトース除去						
	☐ その他						
薬剤 (1週間当たりの投与 単位数:どちらか選択 して記入してくだ さい。)	☐ ビタミンA (U)						
	☐ ビタミンD (ml, μg)						
	☐ ビタミンE (mg)						
	☐ ビタミンK (ml, mg)						
	☐ ウルソ (mg)						
	☐ フェノバール(mg)						
	☐ ()						
確定診断時期		年	月	日			
SLC25A13遺伝子型							
		〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3 大阪市立大学発達小児医学:岡野善行 TEL 06-6645-3816, FAX 06-6636-87837 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学小児科:大浦敏博 TEL 022-717-7287, FAX 022-717-7290 〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学分子病態生化学:小林圭子 TEL 099-275-5241 FAX 099-264-6274					

シトリン欠損症の治療指針（試案）

本治療指針（試案）はこれまで報告された論文をもとにまとめたものであり、プレリミナリーなものである。これから本研究班によって研究調査を十分に行い、EBM に基づいた治療指針へと検証と改訂を行なわなければならない。

シトリンはミトコンドリア内膜に局在するアスパラギン酸・グルタミン酸輸送体(aspartate・glutamate carrier: AGC)であることが明らかにされている。AGC はミトコンドリアで生成するアスパラギン酸を細胞質に供給するとともに、リンゴ酸・アスパラギン酸シャトルを構成しており細胞質の NADH 還元当量をミトコンドリアに輸送する機能をも保持している。シトリンの機能喪失は尿素・蛋白合成、好氣的解糖、糖新生、さらにはエネルギー代謝などに障害を与える。その結果、シトリン欠損症患者では多彩な症状を呈する。

（１）シトリン欠損症の臨床像

シトリン欠損症では新生児から乳児期には肝内胆汁うつ滞症（neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: NICCD）、幼児から成人にかけては一見症状のない見かけ上健康な時期、そして、いわゆる成人発症 II 型シトルリン血症（adult-onset type II citrullinemia: CTLN2）として高アンモニア血症高シトルリン血症を発症する。その臨床症状と病態像を図 1 に示している。

図 1．シトリン欠損症の病態像

（２）NICCD

NICCD 症例の症状や異常検査所見は新生児マススクリーニングでの異常（ガラクトース血症、他種類のアミノ酸高値）、遷延性黄疸、肝内胆汁うつ滞、脂肪肝、低蛋白血症、体重増加不良、凝固能低下、低血糖、 α -fetoprotein(AFP)の上昇など非常に多彩である。

胆汁うつ滞に対する治療が中心となる

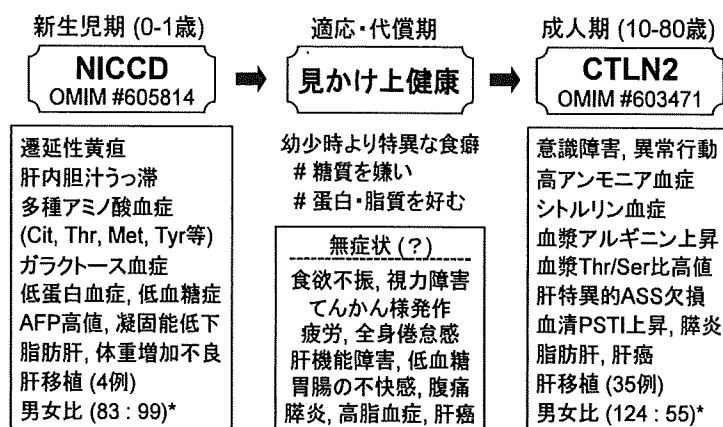
食事療法（ミルク）：母乳、一般ミルクとも炭水化物：蛋白質：脂肪のカロリー比はほぼ（40%、10%、50%）であり、栄養素から見ると NICCD にとって不適切ではない。しかしながら、NICCD では高ガラクトース血症、胆汁うつ滞症をきたすため、それに対応するミルクが必要である。

1) 胆汁うつ滞性肝障害には MCT ミルクを使用する。

2) 胆汁うつ滞性肝障害と高ガラクトース血症がある場合には MCT+乳糖除去ミルク（蛋白加水分解 MCT ミルク：ML-3）を使用する。もしくは、乳糖除去粉乳 100ml に MCT オイル 2 ml 添加する（炭水化物：蛋白質：脂肪のカロリー比は 40%、10%、50%）。

薬物療法：胆汁うつ滞性肝障害が強い場合は新生児肝炎の治療に準じて行なう。

ビタミンA（チョコラA） 400～500 IU/kg/日 →「パンビタンなど総合ビタミンで代用可」



ビタミン D (アルファロール)	0.05～0.1 µg/kg/日
ビタミン E (ユベラ)	軽症 5～10 mg/kg/日、中等症 20～50 mg/kg/日
ビタミン K (ケイツーシロップ)	2 mg/週～5mg/日
ウルソデオキシコール酸 (ウルソ)	10～15 mg/kg/日

(3) 適応・代償期

30 から 50%の症例で不定愁訴を含めた多彩な症状を示す。幼少時より大豆、ピーナッツ、卵、チーズ、牛乳、魚肉類などを好む。

1) シトリン欠損症患者の平均的摂取カロリー比は炭水化物 (30－40%)、蛋白質 (15－25%)、脂肪 (40－50%) と低炭水化物・高蛋白質・高脂肪である。この特異な食癖が症状の発現を予防していると考えられており、是正しない。

2) 糖新生、エネルギー産生障害があるので、頻回食もしくは補食を必要としている場合が多い。たとえば、おやつとして牛乳をよく飲み、1日 2 L 前後摂取する例も珍しくない。

(4) CTLN2

意識障害、失見当識、異常行動、けいれん、てんかん様発作など多彩な精神神経症状で発症し、高アンモニア血症、シトルリン血症となる。脳症発症以前に、約 10%の患者で急性・慢性膵炎の発症や肝臓癌の合併例がみられる。また、ほとんどの患者で脂肪肝を合併しており、その病理像は、NASH (non-alcoholic steatohepatitis)と同様である。

肝性脳症患者に対しての一般的な肝臓病食 (病院セット食：低蛋白食) で病態が悪化した患者も報告されており、低蛋白食に伴う高炭水化物含有が原因と考えられる。CTLN2 に伴う肝性脳症患者には、まずは下記の様な炭水化物制限食を試みる。

- 1) 炭水化物制限食 (炭水化物熱量/食事総熱量比を 40-50%とする)
- 2) L-アルギニン製剤の経口投与とピルビン酸ナトリウム 4～9g/日
- 3) 肝不全症状が改善されない場合、最終的には肝移植を必要とする。

(5) 禁忌事項

- 1) アルコール摂取
- 2) 高炭水化物食および大量の糖質摂取
- 3) 高濃度糖質輸液、グリセロール

(6) 確定診断

特異な食癖、飲酒を嫌うなどの臨床的特徴に加えて、高アンモニア血症、高シトルリン・アルギニン血症のある患者は積極的に CTLN2 を考える。また血清 PSTI レベルは、診断マーカーとしてすでに報告されている。確定診断は、遺伝子診断によるが、新規の遺伝子変異の同定には、かなり時間を要するため、補助診断法として、肝組織や末梢リンパ球中のシトリンの免疫ブロット解析も有用である。

【疾患名】

シトルリン欠損症

【患者数】

6,000人

【概要】

シトルリンはミトコンドリア内膜に局在する肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体で、その欠損は細胞質へのアスパラギン酸供給障害やミトコンドリアへのNADHの供給障害、糖新生障害を引き起こす。その欠損症は新生児・乳児期では肝内胆汁うつ滞症、高シトルリン血症、幼児・青年期では無症状ながら食癖異常など、成人期では高アンモニア高シトルリン血症、精神症状、肝不全などの成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) を発症する。年齢依存性に、また、各個人で多彩多様な症状を呈することを特徴としている。治療は確定したものはないが、各症状に対して対処療法を行い、最終的には肝移植を必要とする場合もある。最近、CTLN2発症予防、治療としてピルビン酸ナトリウム投与、食事療法が考えられている。

【原因の解明】

高アンモニア血症、高シトルリン血症、肝不全、精神症状を呈し、予後不良な疾患である成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) の原因遺伝子としてSLC25A13が同定された。その遺伝子産物であるシトルリンはミトコンドリア内膜に局在する肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体であり、その欠損により細胞質へのアスパラギン酸供給障害やミトコンドリアへのNADHの供給障害、糖新生障害を生じる。新生児・乳児期では胆汁うつ滞症、高シトルリン血症、幼児・青年期では原則無症状ながら食癖異常などを示し、成人期にはその代償機構の破綻により、約20%の患者でCTLN2を発症する。このCTLN2を顕在化せしめる原因についてはいまだ明確ではなく、遺伝的要因とともに環境的要因の関与が推定されている。

【主な症状】

シトルリン欠損症は新生児から老年までの幅広い年齢にわたり、また、それぞれの患者で異なる症状を呈する。

(1) 新生児・乳児期: 子宮内発育不全、高シトルリン血症、ガラクトース血症、肝内胆汁うつ滞症、黄疸、発育不全、低血糖症、ビタミンK欠乏性凝固異常を呈するが生後6～12ヶ月で自然軽快する。

(2) 幼児から青年期: 食癖異常 (高脂肪高蛋白低糖質、頻回摂取)、成長障害 (体重増加不良)、易疲労感、低血糖症、肝機能異常。

(3) 成人期: 成人発症II型シトルリン血症—高アンモニア血症、高シトルリン血症、高アルギニン血症、肝不全、けいれん、精神症状 (見当識障害、異常行動など)。

【主な合併症】

1) 新生児・乳児期: 凝固障害による脳内出血、ガラクトース血症による白内障。
2) 学童から成人期: 胃腸の不快感、高脂血症、脂肪肝、肝癌、膵炎。

【主な治療法】

現在確立したものはない。

1) 新生児・乳児期: 胆汁うつ滞に対する治療 (利胆剤、脂溶性ビタミン剤、MCTミルク)、ガラクトース除去ミルク。肝不全をきたし、肝移植を必要とする症例もある。

2) 食事療法 (高脂肪・高蛋白・低炭水化物食)。

3) 成人期 (成人発症II型シトルリン欠損症): 高アンモニア血症に対する対処療法 (血液透析、血漿交換療法、フェニル酪酸、安息香酸ナトリウム、アルギニンの投与)、食事療法、ピルビン酸ナトリウムの投与、肝移植。

【研究班】

シトルリン欠損症の実態調査と診断方法および治療法の開発研究班

留意事項

患者数欄には年間発生数や発生率等ではなく、国内の推定患者数(人)を記入してください。
研究班欄には研究課題名の末尾に「班」や「研究班」をつけて記入してください。

様式1

シトリン欠損症の自然歴と生活歴にもとづく実態解明と治療指針の作成班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	岡野 善行	大阪市立大学医学部小児科	講師
研 究 分 担 者	佐伯 武頼	徳島文理大学健康科学研究所	教授
	小林 圭子	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	准教授
	池田 修一	信州大学医学部医学科神経内科学	教授
	大浦 敏博	東北大学医学部小児科	臨床教授
研 究 協 力 者	窪田満	手稲溪仁会病院	主任医長
	長尾雅悦	独立行政法人国立病院機構西札幌病院	部長
	藤沢知雄	済生会横浜東部病院子供センター	部長
	乾あやの	済生会横浜東部病院子供センター	副部長
	高柳正樹	千葉県こども病院	医療局長
	長坂博範	千葉県こども病院	主任医長
	重松陽介	福井大学医学部看護学科	教授
	伊藤哲哉	名古屋市立大学	准教授
	野口篤子	秋田大学医学部小児科	助教
	依田忍	大阪府立母子保健総合医療センター	科長
	虫明聡太郎	摂南病院 小児科	部長
	梶 俊策	津山中央病院	部長
	玉森晶子	長吉総合病院小児科	医長
	小林京子	神戸大学大学院保健学研究科	助教
	井原健二	九州大学医学部小児科	講師
	芳野信	久留米大学医学部小児科	教授
	矢崎正英	信州大学医学部医学科神経内科学	講師
	森山光章	大阪府立大学大学院	准教授
事 務 局	岡野 善行	大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学 〒586-0091 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-3 T E L 06-6645-3816 F A X 06-6636-8737 e-mail okano@med.osaka-cu.ac.jp	
経理事務担当者	坂口 知子	同上 T E L 06-6645-3816 F A X 06-6636-8737 e-mail saka-tomo@med.osaka-cu.ac.jp	

〔Ⅱ〕 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
シトリン欠損症の自然歴と生活歴にもとづく実態解明と治療指針の作成
分担研究報告書

シトリン欠損症モデル (citrin/mGPDH double KO) マウスを用いた病態解析と
新規治療法の開発

研究分担者 佐伯 武頼 徳島文理大学健康科学研究所教授

研究要旨：シトリン欠損症モデル (citrin/mGPDH double KO) マウスの解析から以下の結果を得た。

- 1) モデルマウスは対照マウスと比し、シトリン欠損症発症誘導因子である蔗糖、グリセロールおよびアルコールの摂取を好まない。
 - 2) 血中アンモニア濃度上昇を起こす蔗糖の投与によって、肝内 glycerol 3-phosphate (G3P) 濃度が著しく増加する。さらに、他の発症誘導因子であるグリセロールやエタノールの投与でも同様に肝内 G3P 濃度の上昇を起こす。
- 以上から、肝内 G3P 濃度はシトリン欠損症発症診断および薬剤開発のマーカーとなりうる。グリセロールやエタノールもモデルマウスが嫌う濃度で、肝内 G3P 濃度を上昇させ、脂肪肝などの形成に関与しうる。

A. 研究目的

本分担研究では、分担者らが新たに開発したシトリン欠損症モデルマウスを用いて、シトリン欠損症の病態を解明し、肝移植以外の有効な治療法を開発・確立することにある。シトリン欠損症は、佐伯と小林らが、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の病因遺伝子として見出した SLC25A13 によってコードされるたんぱく質をシトリンと名づけたことから始まる (Kobayashi et al. Nat Genet 1999;22:159-163)。シトリン欠損はその後、新生児肝炎、または肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) を引き起こすこ

となど、多彩な病態を呈することから、これらを総称してシトリン欠損症という疾患概念を確立した (Saheki & Kobayashi J Hum Genet 2002;47:333-341)。シトリンは、さらに、ミトコンドリア膜アスパラギン酸 (Asp)・グルタミン酸 (Glu) 輸送体である (Palmieri et al EMBO J 2002; 20:5060-5069) ことを明らかにし、病態発症機構を推定できるようになった。さらにシトリン欠損症患者の特異な食癖の解析 (Saheki et al. J Inherit Metab Dis 2008;31:386-394) から、従来の高アンモニア血症に対する治療法が、シトリン欠損

症にとっては、非常に危険であることも判明してきた(Yazaki et al. Intern Med 2005;44:188-195; Takahashi et al. Med Sci Monit 2006;12:CS13-15; Fukushima et al. Intern Med. 2010;49:243-247)。その詳細な病態形成機構の解明は、これまで肝移植以外には効果的な治療法がなかった本疾患の病因・病態に基づく新たな治療法開発には欠かせない。そのような目的からシトルリン欠損症モデルマウスを作出した結果、現在、その病態解析を行い、新たな治療法を打ち立てることが可能になった。

B. 研究方法

1. シトルリン欠損症モデルマウスと対照マウス

シトルリン欠損症モデルマウスは、すでに Saheki et al. (J Biol Chem 2007;282:25041-25052) が報告したように、シトルリンをコードする Slc25a13 遺伝子を破壊 (knock-out; KO) したシトルリン欠損 (citrin KO) マウス (Sinassac et al. Mol Cell Biol 2004;24(2):527-536) と mitochondrial

glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mGPDH) KO マウスを交配して作成した。作成された citrin/mGPDH double KO (Slc25a13^{-/-} mGPDH^{-/-}) マウスは、ヒトシトルリン欠損症である、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) や新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) と同様の、多くの症状を呈し、シトルリン欠損症モデルマウスとして確立できた (表 1)。本研究では、対照マウスとして、野生型 (citrin^{+/+}/mGPDH^{+/+})、citrin KO (citrin^{-/-}/mGPDH^{+/+})、mGPDH KO (citrin^{+/+}/mGPDH^{-/-}) の 3 種を用いた。

1. 蔗糖、グリセロール、およびエタノール嗜好実験

マウスの嗜好を、水と各種試験溶液の 2 液のいずれかを自由に選択して摂取できる装置を開発し、(1) 20%蔗糖投与の嗜好を調べた。さらに、(2) 溶液の濃度変化を行って、摂取量 (g/日) および preference (嗜好度) [溶液摂取量/(溶液摂取量+水摂取量)] を計算し、詳細な比較検討を行った。溶液としては、蔗糖、サッカリン、グリセロール、およびエタノールを使用した。

表 1. マウスの症状 Citrin/mGPDH ダブル KO マウスの症状

症状	シトルリン欠損症	モデルマウス
高アンモニア血症	あり(特に摂食時)	あり(特に摂食時)
シトルリン血症	あり	あり
脂肪肝	あり	あり
低血糖	あり	あり
成長障害	あり	あり
糖質による毒性	発症誘発; 血中アンモニア ↑	高アンモニア血症増悪