

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 大浦敏博：シトリン欠損症研究の進歩～
発症予防・治療法の開発に向けて．日本
小児科学会雑誌 113 巻 11 号 1649-53
(2009 年)
2. 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 May; 97(1): 21-6. Epub 2009 Jan
25.

2. 学会発表

1. 大浦敏博：シトリン欠損症研究の進歩：
発症予防・治療法の開発に向けて．第 112
回日本小児科学会教育講演 2009 年 4
月 17－19 日、奈良
2. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
分担研究報告書

無症状期シトルリン欠損症の病態について

研究協力者 長坂 博範（宝塚市立病院小児科医長）

研究要旨：シトルリン欠損症無症状期の病態を明らかにするために、3・7才のシトルリン欠損症患者 20 名のアミノ酸、糖質、脂質代謝のプロフィー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。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。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、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)などの複合的代謝障害が残存し、また、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る。

A. 研究目的

シトルリン蛋白は、カルシウム結合ミトコンドリア蛋白の 1 つの、liver-type aspartate/glutamate carrier isoform 2 (AGC2)であり、malate-aspartate NADH shuttle を構成し、細胞質内 NADH/NAD⁺比を決定する一方、尿素サイクルや糖新生など多くの代謝をコントロールしている(1-3)。

シトルリン欠損症は新生児期には肝内胆汁うっ滞症(NICCD)をはじめ、シトルリン

血症、ガラクトース血症、低血糖、低蛋白血症、軽度高アンモニア血症など多様な症状を示す(4-6)。しかしながら、それらの症状は生後 6-12 ヶ月で自然に軽快し、無症状期(silent stage)を経た後、遺伝学的な患者の 20%に、繰り返す高アンモニア血症、精神障害、意識障害を呈する成人発症 II 型シトルリン血症を発症する(7-9)。肝臓の病理組織では著明な脂肪肝が特徴である。成人発症 II 型シトルリン血症は、しばしば致死的事であることから、その発症および進

展のメカニズムの解明は急務である。

現状では、その発症機序に関する研究は、殆ど進んでいない。また、この時期の代謝の特徴について包括的検討はなされていない。

近年、いろいろな疾患で、酸化ストレスと病態との関係が調べられている(10-13)。特に、脂肪肝の発症、進展に酸化ストレスがしばしば深く関与していることは多くの論文に記載されている(12-13)。

今回、我々は、NICCDと診断され、その後、明らかな臨床症状を呈さない silent stage としてフォローされている 20 名のシトリン血症患者における酸化ストレスおよびアミノ酸、糖質、脂質代謝を評価し、同年代の健常児と比較した。

アミノ酸のうちアルギニン・シトルリンはオルニチンとともに尿素サイクルを構成する(図1)。アルギニンは一酸化窒素(NO; nitric oxide)合成の基質であり、NO合成酵素(NOS)により、NOとともにシトルリンができる(14-17)。従って、アルギニン・シトルリンと共にNO産生も検討した。このNO産生においても酸化ストレスが強く影響することはよく知られていることから酸化ストレスの間接評価としての意義はあるのではないかと考えた(15、17)。

B. 研究方法

[対象]

肝機能がほぼ正常で無症状期とみなしえるシトリン欠損症 20 名(男/女、10/10; 年齢、1歳10ヶ月から10歳5ヶ月)と32名の健常児(男/女、16/16; 年齢、2歳29ヶ月から10歳5ヶ月)を対象とした。患者

20名のうち12名は生後5日目の新生児代謝スクリーニングで高ガラクトース血症、高フェニールアラニン血症、高メチオニン血症が見つかりフォローされていた。その他の8名は生後1.5-4ヶ月までに黄疸を指摘されフォローされていた。いずれの児も遺伝子検索の結果シトリン欠損症と診断されている。

[デザイン]

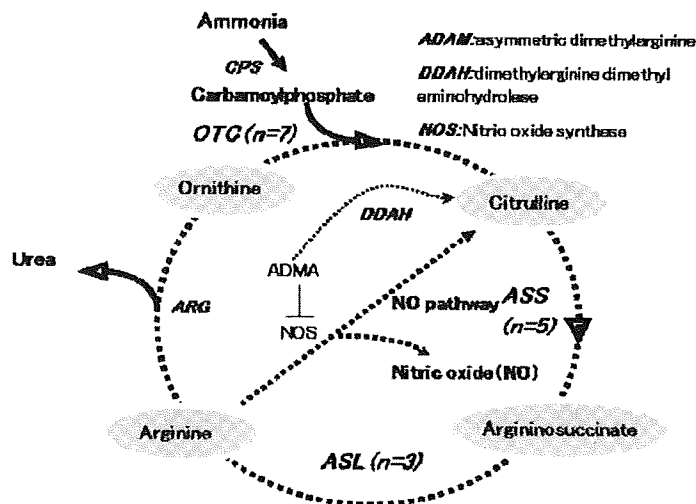
酸化ストレスに関しては尿中酸化ストレスマーカーである、8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) および acrolein-lysine、血中酸化LDLなどにより評価した。また、superoxide dismutase (SOD), catalase などの anti-oxidants enzymes の赤血球での活性を測定した。

血清アミノ酸の定量、血漿アンモニア値を調べ、アミノ酸代謝を評価した。同時にNOの代謝産物 nitrite/nitrate (NOx) および NOS の抑制物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) の血清濃度を調べた(図1)。糖質では血中グルコース、ガラクトース、ピルビン酸、乳酸を、脂質代謝に関しては、総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、アポ蛋白などを調べた。

[検体採取および処理]

血液検体は、早朝空腹時の静脈穿刺にて採取した。アミノ酸、NOx、ADMA、MDA-LDL などの測定のために、血清と血漿を確保した。同時に遠心により、赤血球分画もえた。赤血球は冷やした 0.9%食塩水で洗浄され、その 100 μ l を 1ml の蒸留水に

図 1. 尿素サイクルと一酸化窒素(NO)



加えた溶液を、抗酸化酵素である SOD、catalase 測定のために用意し、それぞれ分析までは -80°C で冷凍保存した。尿検体も 8-OHdG、Acrolein lysine 測定用に、同時に採取し、同温にて保存した。比較用の健常児の検体も、同一の処理がなされた。

[分析]

血漿アミノ酸値は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分光蛍光法を用いて測定した。ニンヒドリン発色の検出は、測定波長 440,570nm で行った。MDA-LDL は ELISA 法を用いて測定した。

SOD 活性は既報に従い、分光測光法 (505nm、RANSOD kit、Randox Laboratories 社) を用いて測定した。CAT 活性は、Aebi らの方法で測定した。

血清 NO 値は比色定量法 (nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical 社) を用いて測定した²⁴⁾。血清 ADMA 値は ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent

assay kit、DLD Diagnostika 社) にて測定した。

尿中の acrolein-lysine と 8-OHdG は ELISA 法 (それぞれ、ACR-Lysine Adduct competitive ELISA kit (NOF 社)、8-OHdG Check competitive ELISA kit (Institute for the Control of Aging 社) により測定した。結果はすべて Cr 比で表示している。

総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸はそれぞれの commercial kits を用い酵素法にて測定した。HDL-コレステロールは 13% ポリエチレン法にて測定した。LDL-コレステロールは commercial kit を用い enzyme immunoassay にて測定した。アポ蛋白 (apoA-I, B, CII, E など) は turbidimetric immunoassay にて測定した。

[統計]

結果は平均 $\pm$ SD 値と分布域で示した。PKU 患児群と健常児群の有意差の検定に

は student's t test を用いた。 p 値が 0.05 以下であるとき、統計的に有意であると判定した。

(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

血漿アンモニア値は患児では上昇はみら

れず、健常児と同様な値を示した。しかし、オルニチンは対健常児比 1.7 倍 ($p<0.001$)、シトルリンは 1.4 倍 ($p<0.01$) と有意な上昇を認めた。一方、アルギニンも含めて他のアミノ酸には有意な所見は認められなかった (表 1)。

血清 NOx^- と ADMA はこの 2 群間では有意な差はなく、NO 産生は健常児群同様と判断した (表 1)。

グルコース、ガラクトース、乳酸、ピルビン酸値は 2 群間に統計的有意差を認めなかった (表 2)。しかし、乳酸/ピルビン酸比は患児群で有意に高い値をしめし ($p<0.05$) NADH/NAD^+ が依然高い状態が持続している可能性ないしはミトコンドリアの機能が少し障害されている可能性等が考えられた。

表 1 血清アミノ酸、 NOx^- 、ADMA レベル

	Arginine ($\mu\text{mol/L}$)	Ornithine*** ($\mu\text{mol/L}$)	Citrulline** ($\mu\text{mol/L}$)	NOx^- ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	Ammonia ($\mu\text{g/dl}$)
20 patients	74.2 (14.4)	105.1 (24.2)	40.8(6.3)	31(5)	0.78 (0.11)	35(14)
Ranges	45.4–137.8	65.0–193.4	25.3–56.4	22–49	0.60–1.12	20–91
32 controls	85.0 (13.2)	61.3 (13.6)	28.2 (6.3)	30 (9)	0.63 (0.17)	31 (9)
Ranges	52.8–106.8	40.1–90.0	14.4–41.4	22–49	0.42–0.97	18–49

NOx^- , nitrite/nitrate; ADMA, asymmetric dimethylarginine

Presented data are mean (SD) values and ranges.

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus controls

表 2 血中糖質代謝パラメーター (4-5 h fasting)

	Glucose (mg/dl)	Galactose (mg/dl)	Pyruvate (mg/dl)	Lactate (mg/dl)	L/P *
Patients (n=20)	84(5)	0.3 (0.1)	0.8 (0.3)	12 (3)	15 (2)
Ranges	72-95	0.1-0.6	0.2-1.7	6-26	9-18
Controls (n=32)	85(5)	0.3 (0.1)	0.8 (0.2)	10 (4)	11 (1)
Ranges	76-99	0.1-0.5	0.3-1.1	7-19	7-13

L/P: ratio of lactate to pyruvate

Presented data are mean (SD) values and the ranges.

* $p < 0.05$ versus controls

血清LDL-コレステロール、HDL-コレステロールは健常児群の1.5倍となっており ($p < 0.01$) 総コレステロールは明らかに高くなっている。Apo-B, apo-AI も高く、それぞれLDL-コレステロール、HDL-コレステロールの値を反映していた (表3)。Apo E, CII も高い値をとっているが、これは主にHDL-コレステロールが高いためである。

遊離脂肪酸とトリグリセリドは2群間に差がなかったが、リン脂質は有意に高値であった。リン脂質はHDL、LDLに含まれている (特にHDLはその含有率が高い) ことから、総コレステロール値とリン脂質値が平行である。これら脂質の高い値は、脂質摂取量 (患者は高脂肪-高蛋白-低炭水化物の食事) の影響による違いだけで説明しうるかどうか、脂肪肝の観点からも検討しなければならない事項である。

MDA-LDLは患児群で高い値を示した (表3)。尿中acrolein-lysine と8-OHdGも患児群は有意に高く (acrolein-lysine, $p < 0.01$; 8-OHdG, $p < 0.001$)、逆にビタミンEは低い値を呈した (表4)。赤血球SODとcatalase 活性についても患児群で有意

に高い値 ($p < 0.05$)を示したことより、酸化ストレスが増したことに對する反応性の増加と解釈された。

D. 考察

今回の研究結果は、無症状期でも、決して代謝が正常化したのではないということを我々に知らしめるものであった。アミノ酸や、L/P比、脂質など、多くの面で正常群と異なる値を示し、尿素サイクル、糖質代謝、脂質代謝異常の存在を示唆していた。

ただし、これらの異常は決して顕著なものではなく正常群と患者群の比較により明らかになったものである。我々は顕著なものではなくとも、これだけ複合的な異常が長く持続することが成人発症II型シトルリン血症の発症につながるという可能性を考えなければいけないのかもしれない。逆に言うと、これらの代謝異常を、うまく矯正することが、成人発症II型シトルリン血症の発症を予防することにつながるのではないかと期待される。

酸化ストレスマーカー、赤血球抗酸化酵素は高い値を示した。逆に抗酸化作用を有するビタミンEなどは消耗性に低下してい

表3 血清脂質およびアポ蛋白、MDA-LDL

Lipids	TC*** (mg/dl)	LDL-C*** (mg/dl)	HDL-C*** (mg/dl)	PL*** (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFA (mmol/L)
Patients (n=20)	213(32)	116(23)	79(7)	237(40)	77(19)	0.8 (0.2)
Ranges	153–319	76–196	54–108	189–333	38–124	0.4–1.2
Controls (n=32)	169(22)	85(13)	54(11)	193 (25)	80(25)	0.9 (0.2)
Ranges	111–207	42–106	39–77	123–239	35–139	0.4–1.5
Apoproteins & Ox LDL	Apo-AI*** (mg/dl)	Apo-AII*** (mg/dl)	Apo-B*** (mg/dl)	Apo-CII* (mg/dl)	Apo-E* (mg/dl)	Ox LDL *** (U/L)
Patients (n=20)	169(20)	36(5)	111(22)	3.5(1.1)	5.6 (1.5)	82 (24)
Ranges	133–213	30–50	79–192	1.5–7.5	3.1–9.4	39–156
Controls (n=32)	127(16)	30(4)	78(13)	3.1 (1.1)	4.6(1.1)	25 (7)
Ranges	88–165	20–42	48–109	0.8–5.5	1.9–7.5	5–50

TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; PL, phospholipids; TG, triglycerides; FFA, free fatty acids; Ox LDL, oxidized LDL

Presented data are mean (SD) values and the ranges.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus controls

表4 尿中酸化ストレスマーカー、ビタミンEおよび赤血球中抗酸化酵素活性

	3-OHdG*** (ng/mg Cr)	Acrolein-lysine** (nmol/mg Cr)	SOD*	Cat*	Vitamin E** (mg/dl)
Patients (n=13)	67(21)	481 (125)	1.49(0.34)	3.60(0.52)	0.60 (0.21)
Ranges	32–100	220–686	0.92–1.92	2.77–4.44	0.32–1.29
Controls (n=32)	19 (5)	272 (90)	1.06 (0.18)	2.96 (0.21)	0.98 (0.14)
Ranges	11–29	70–424	0.80–1.50	2.55–3.56	0.67–1.45

3-OHdG; urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; SOD: superoxide dismutase (U/mg protein); Cat, catalase (pmol/mg protein); Cr, creatinine

Presented data are mean (SD) values and ranges.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus controls

た。酸化ストレスが、炎症や脂肪肝など多彩な病態を引き起こすことは周知のとおりである。酸化ストレスが強い状態が続くこともまた、将来、シトリン欠損症患者の肝臓、脳などに不都合なeventが起きることにつながりかねないと考えられた。その意味で酸化ストレスの緩和も成人発症II型シトリン血症の発症の予防に寄与するのかもしれない。

以上、無症状期シトリン欠損症の代謝を包括的に調べた。複合代謝異常および酸化ストレス増強をうまくコントロールすることが、成人発症II型シトリン血症の発症を予防することにつながるかどうか、引き続き検討課題である。

E. 結論

シトリン欠損症の無症状期において

1) アミノ酸代謝では血中シトルリンとオルニチンが軽度上昇していた。

2) ウレアサイクル近縁のアルギニンからのNO産生には差が認められなかった。

3) 糖質代謝ではL/P比の上昇があり、細胞室内のNADHの増加、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。

4) コレステロールの上昇があり、食事の影響とコレステロール合成促進が推定された。

5) 酸化ストレスを受けていることが、その産生物質と抑制物質の両者の増加によって支持された。

シトリン欠損症では無症状期にもその影響

が軽度に認められ、アスパラギン酸の供給障害、ミトコンドリア障害、酸化ストレスの影響が推定された。

{参考文献}

1. Kobayashi K, Iijima M, Yasuda T, Sinasac DS, Yamaguchi N, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T. Type II citrullinemia (citrin deficiency): a mysterious disease caused by a defect of calcium-binding mitochondrial carrier protein. In: Pochet R, Donato R, Haiech J, Heizmann C, Gerke V (eds) *Calcium: The molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp 2000; 565-87
2. Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* 1999; 22:159-63
3. Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, Del Arco A, Kobayashi K, Iijima M, Runswick MJ, Walker JE, Saheki T, Satrustegui J, Palmieri F. Citrin and aralar1 are Ca^{2+} stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J* 2001; 20:5060-69
4. Tomomasa T, Kobayashi K, Kaneko H, Shimura H, Fukusato T, Tabata N, Inoue Y, Ohwada S, Kasahara M, Morishita Y, Kimura M, Saheki T. Possible clinical and histological manifestations of adult-onset type II citrullinemia in early infancy. *J Pediatr* 2001; 138: 741-3.
5. Tazawa Y, Kobayashi K, Ohura T, Abukawa D, Nishinomiya F, Hosoda Y, Yamashita M, Nagata I, Kono Y, Yasuda T, Yamaguchi N, Saheki T. Infantile cholestatic jaundice associated with adult-onset type II citrullinemia. *J Pediatr* 2001; 138: 735-40.
6. Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, Abukawa D, Sakamoto O, Tsuchiya S, Saheki T. Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 139-44.
7. Yasuda T, Yamaguchi N, Kobayashi K, Nishi I, Horinouchi H, Jalil MA, Li MX, Ushikai M, Iijima M, Kondo I, Saheki T. Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* 2000; 107:537-45
8. Yamaguchi N, Kobayashi K, Yasuda T, Nishi I, Iijima M, Nakagawa M, Osame M, Kondo I, Saheki T. Screening of SLC25A13 mutations in early and late onset patients with

- citrin deficiency and in the Japanese population: identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis method for the nine mutations. *Hum Mutat* 2000; 19:122-30.
9. Saheki T, Kobayashi K. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD). *J Hum Genet* 2002; 47:333-41
 10. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Clinical J Physiology* 2001; 44: 1-44.
 11. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidant stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222-300.
 12. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-7.
 13. Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2714-24.
 14. Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr* 2004; 134:2820S-5S.
 15. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147:S193-201
 16. Nagasaka H, Komatsu H, Ohura T, Sogo T, Inui A, Yorifuji T, Kikuta H, Kobayashi K. Nitric oxide synthesis in ornithine transcarbamylase deficiency: possible involvement of low NO synthesis in clinical manifestations of urea cycle defect. *J Pediatr* 2004; 145:259-62.
 17. Cook JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005; 10:S11-7.
 18. Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Nishijima K, Kotsuji F, Kawakami H, Nishijima K, Sekine K, Nagasaka H, Mayumi M. Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood. *Metabolism* 2008; 57: 215-20.
 19. Yamaguchi A, Fukushima M, Mizushima Y, Shimizu Y, Takasugi N, Arashima S, Ohyanagi K. Microassay for screening newborns for galactosemia with use of a fluorometric microplate reader. *Clin Chem* 1989; 35: 1962-4.
 20. Chiba H, Osaka T, Iwasaki N, Suzuki H, Akizawa K, Fujisawa S, Intoh S, Watanabe M, Yoshida J, Matsuno K. Spurious elevation of serum high-density lipoprotein cholesterol in patients with cholestatic liver diseases. *Biochem Med Metab Biol*

- 1991; 46: 329-43.
21. Kotani K, Maekawa M, Kanno T, Kondo A, Toda N, Manabe M. Distribution of immunoreactive malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in human serum. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1215: 121-25.
 22. Tamura S, Tsukahara H, Ueno M, Maeda M, Kawakami H, Sekine K, Mayumi M. Evaluation of a urinary multi-parameter biomarker set for oxidative stress in children, adolescents and young adults. *Free Radical Res* 2006; 40:1198-205.
 23. Rizzo C, Dionisi-Vici C, D'Ippoliti M, Fina F, Sabetta G, Federici G. A simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of plasma 7-dehydrocholesterol and vitamin E: its application in Smith-Lemli-Opitz patients. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 97-102.
 24. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-55.
 25. Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Gross J. Properties of erythrocyte catalase from homozygotes and heterozygotes for Swiss-type acatalasemia. *Biochem Genet* 1976; 14:791-807.
 26. Veech RI. The metabolism of lactate. *NMR Biomed* 1991; 4: 53-8.
 27. Saeki T, Kobayashi K, Terashi M, Ohura T, Yanagawa Y, Okano Y, Hattori T, Fujimoto H, Mutoh K, Kizaki S, Inui A. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects. *J Inher Metab Dis*. 2008; 31: 386-94
 28. Dimmock D, Kobayashi K, Iijima M, Tabata A, Wong LJ, Saheki T, Lee B, Scaglia F. Citrin deficiency: a novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. *Pediatrics* 2007; 119: 773-77.
- 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 May; 97(1): 21-26. .
- 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：無症状期シトル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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

PedsQL Multidimensional Fatigue Scale（子どもの倦怠感尺度）日本語版の開発

研究協力者 小林 京子（東京大学大学院医学系研究科）

要約：倦怠感とは、患者にとってつらい症状でありながら、評価が難しいとされており、慢性疾患をもつ小児では、周囲の理解を得にくさが、日常生活上の困難を生じさせる可能性がある。そこで、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をもつ小児に適用していく予定である。

共同研究者

神戸大学大学院保健学研究科 法橋尚宏

A. 研究目的

シトリン欠損症はエネルギー供給の障害を来す疾患です。そのために、代償期で一般的に無症状と言われている学童期においても、日常生活に疲労を訴える患者が多くいます。その QOL を明らかにするために、世界共通の小児の QOL である PedsQL 疲労尺

度を作成し、日本語版を作成しました。そして正常コントロールについて検討した。

倦怠感とは、慢性疾患をもつ子どもにとって苦痛を伴う症状の一つで、QOL を低下させる要因である。また、疾患がない場合でも、倦怠感の訴えは多く、倦怠感と不登校などとの関連も報告されており、子どもの健康生活に重要な症状である。倦怠感の主観的なものとされ、子どもの場合でも子ども自身の主観的倦怠感を明らかにすることが重要であるが、わが国では簡便で、様々な年齢・健康状態の子どもに適応できる自

己評価式倦怠感尺度の開発が十分ではない。そこで、本研究は、米国 Varni が面接調査、文献検討から開発し、信頼・妥当性が確立された 18 項目からなる PedsQL Multidimensional Fatigue Scale 日本語版（以下 PedsQL 倦怠感尺度）の信頼性と妥当性を明らかにすることを目的とした。PedsQL 倦怠感尺度は、健康問題の有無に関わらず子どもの倦怠感を自己評価及び代理評価によって評価できる尺度である。

B. 研究方法

保育所または小学校に通所・通学中の 5～12 歳の子どもとその親（652 組）及び 1～4 歳の子どもの親 91 名を対象に無記名式質問紙調査を 2008 年 12 月に行った。子どもからは PedsQL 倦怠感尺度（自己評価尺度）、PedsQL Generic Core Scales（一般的な QOL：自己評価尺度）・年齢・性別、親からは PedsQL 倦怠感尺度（代理評価尺度）・PedsQL Generic Core Scales（一般的な QOL：代理評価尺度）・子どもの定期的な通院の必要な疾患の有無をきいた。本研究での倦怠感とは、包括的かつ多面的な疲れとした。

（倫理面への配慮）

PedsQL 調査をする際には対象者に対する説明書、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、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、対象者、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

尺度の信頼性係数のクロンバックの α 係数は、総得点で自己評価尺度 0.87、代理評価尺度 0.92 であった。尺度の構成概念を確認的因子分析にて検討したところ、適合度指標は自己評価尺度 GFI=0.90, CFI=0.88, RMSEA=0.07、代理評価尺度 GFI=0.83, CFI=0.88, RMSEA=0.11 となった。弁別妥当性検討のため、対象者を定期的な通院の必要な疾患をもつ子ども「慢性群」、通院を必要としない子ども「健康群」の 2 群に分け、PedsQL 倦怠感尺度得点を比較したところ、「健康群」が有意に低い倦怠感を示し（t 検定, $p < 0.01$ ）、エフェクトサイズは自己評価 0.20～0.37、代理評価 0.28～0.43 であった。

D. 考察

PedsQL 倦怠感尺度は、自己・代理評価尺度ともに高い信頼係数を示し、内的整合性が確認された。構成概念妥当性は、自己評価尺度で十分な適合度が示されたが、代理評価ではやや不十分であった。また、弁別妥当性において慢性状態群の倦怠感の得点が健康群に比して有意に高かったことは、PedsQL 倦怠感尺度が本研究の対象者のような保育所または学校に通所・通学可能な健康レベルの子どもにおける慢性疾患児の倦怠感を弁別できることを示した。

	小児：自己評価者	親：代理評価者
対象者数	652人	743人
健康群 (%)	530人 (84.0%)	594人 (82.6%)
慢性疾患群 (%)	102人 (16.0%)	125人 (17.4%)

結果：信頼性と妥当性

	信頼性係 数 α	全体 平均 $\pm$ SD	健康群 平均 $\pm$ SD	慢性群 平均 $\pm$ SD	t 検定 (p)
自己評価		n=652	n=530	n=102	
合計得点	0.87	76.7 $\pm$ 16.3	77.6 $\pm$ 16.0	72.3 $\pm$ 17.7	0.003
全般的な疲労	0.81	80.6 $\pm$ 19.0	81.7 $\pm$ 18.3	74.9 $\pm$ 22.1	0.001
睡眠休息時の疲労	0.62	71.9 $\pm$ 18.7	72.8 $\pm$ 18.6	67.6 $\pm$ 19.4	0.011
知る／理解することの疲労	0.82	77.9 $\pm$ 20.2	78.5 $\pm$ 20.4	74.5 $\pm$ 19.4	0.067
代理評価		n=743	n=594	n=125	
合計得点	0.93	84.7 $\pm$ 13.9	85.6 $\pm$ 13.6	80.2 $\pm$ 14.4	< 0.000
全般的な疲労	0.88	84.0 $\pm$ 15.9	84.9 $\pm$ 15.6	79.4 $\pm$ 16.3	< 0.000
睡眠休息時の疲労	0.81	85.2 $\pm$ 15.4	86.2 $\pm$ 14.8	79.9 $\pm$ 17.2	< 0.000
知る／理解することの疲労	0.92	85.1 $\pm$ 16.4	85.8 $\pm$ 16.1	81.3 $\pm$ 17.4	0.005

信頼性係数 α ：クロンバックの α 係数

慢性群：定期的な受診の必要があると回答した対象者の群

E. 結論

PedsQL 倦怠感尺度日本語版は臨床における有用性を示した。

参考文献

1. Varni, J. W., Seid, M., & Rode, C. A. (1999). The PedsQL™: measurement model for the pediatric quality of life inventory. *Medical Care*, 37, 126–139.
2. Varni, J. W., Seid, M., & Kurtin, P. S. (2001). PedsQL™ 4.0: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory™ version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations. *Medical Care*, 39, 800–812.
3. Varni, J. W., Burwinkle T. M., & Szr I. S. (2004). The PedsQL™ Multidimensional Fatigue Scale in pediatric rheumatology: reliability and validity. *The Journal of Rheumatology*, 31, 2494–2500.
4. Varni, J. W., Burwinkle, T. M., Katz, E. R., Meeske, K., & Dickinson, P. (2002). The PedsQL™ in pediatric cancer: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory™ Generic Core Scales, Multidimensional Fatigue Scale, and Cancer Module. *Cancer*, 94, 2090–2106.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 小林京子, 岡野善行, 法橋尚宏: PedsQL Multidimensional Fatigue Scale (子どもの倦怠感尺度) 日本語版の開発」日本小児保健学会 2010年9月16～18日 新潟県新潟市

2) 小林京子, 岡野善行, 法橋尚宏: 「子どもの倦怠感評価における自己・代理評価者間差に関する研究」日本看護科学学会 2010年12月3, 4日 北海道札幌市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ID#

Date:

PedsQL™

(子供の QOL)

疲労尺度

Standard Version - 日本語

小児用 (13-18 才用)

方 法

次のページには、あなたにとってたいへんなことかもしれないことが、表になっています。この 1 ヶ月間、それぞれがあなたにとってどれくらいたいへんだったのかあてはまるものに○をしておしえてください。

- | | | |
|---|---------|-------------|
| 0 | ぜんぜん | たいへんではない |
| 1 | ほとんど | たいへんではない |
| 2 | ときどき | たいへんでなことがある |
| 3 | よく | たいへんでなことがある |
| 4 | ほとんどいつも | たいへんである |

答えに正解、不正解はありません。
質問内容がわからないことがあれば、きいてください。

名前と年齢、性別を記載してください。

名前：

年齢： 才、 男 女

この1ヶ月間に、あなたにとって次のことは、どれくらいたいへんでしたか？

全般的な疲労について (…について問題がある)	ぜんぜん ない	ほとんど ない	ときどき ある	よく ある	ほとんど いつも
1. (私は) 疲れを感じる	0	1	2	3	4
2. 体力がない(強くない) と感じる	0	1	2	3	4
3. 疲れていて好きなことができない	0	1	2	3	4
4. 疲れていて友達と遊べない	0	1	2	3	4
5. 何かを最後まで行うことはたいへんです	0	1	2	3	4
6. 何かを始めることはたいへんです	0	1	2	3	4

睡眠/休息時の疲労について (…について問題がある)	ぜんぜん ない	ほとんど ない	ときどき ある	よく ある	ほとんど いつも
1. (私は) たくさん寝ている(疲れているので)	0	1	2	3	4
2. 夜中に目が覚めることがある	0	1	2	3	4
3. 朝起きたとき疲れていると感じる	0	1	2	3	4
4. よく休けいする	0	1	2	3	4
5. よく昼寝をする	0	1	2	3	4
6. ふとんの中で長い時間を過ごす	0	1	2	3	4

知る／理解することの疲労について (…について問題がある)	ぜんぜん ない	ほとんど ない	ときどき ある	よく ある	ほとんど いつも
1. (私は) 何かに集中し続けることはたいへんです	0	1	2	3	4
2. 人に言われたことを覚えるのはたいへんです	0	1	2	3	4
3. たった今聞いたことを思い出すのはたいへんです	0	1	2	3	4
4. 早く考えることはたいへんです	0	1	2	3	4
5. たった今考えていたことを思い出すのはたいへんです	0	1	2	3	4
6. 同時に2つ以上のことを覚えるのはたいへんです	0	1	2	3	4

〔Ⅲ〕 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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

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
Shigeta T, Kasahara M, Kimura T, Fukuda A, Sasaki K, Arai K, Nakagawa A, Nakagawa S, Kobayashi K, Soneda S, Kitagawa H.	Liver transplantation for an infant with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency using heterozygote living donor.	Pediatr Transplant	[Epub ahead of print]		2009
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	97 (1)	21-26	2009
D. Noto, K. Takahashi, T. Hamaguchi, K. Inamura, K. Nobata, M. Yazaki, S. Ikeda, K. Kobayashi, M. Yamada.	A case of adult onset type II citrullinemia with portal-systemic shunt.	J Neurol Sci	281 (1-2)	127-129	2009
T. Hutchin, M. A. Preece, C. Hendriksz, A. Chakrapani, V. McClelland, F. Okumura, Y.-Z. Song, M. Iijima, K. Kobayashi, T. Saheki, P. McKiernan, U.	Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) as a cause of liver disease in infants in the UK.	J Inherit Metab Dis	[Epub ahead of print]		2009

Baumann.					
Y.-Z. Song, B.-X. Li, F.-P. Chen, S.-R. Liu, J.-S. Sheng, M. Ushikai, C.-H. Zhang, T. Zhang, Z.-N. Wang, K. Kobayashi, T. Saheki, X.-Y. Zheng.	Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: Clinical and laboratory investigation of 13 subjects in mainland of China.	Dig Liver Dis	41 (9)	683-689	2009
Kimura A, Kage M, Nagata I, Mushiake S, Ohura T, Tazawa Y, Maisawa S, Tomomasa T, Abukawa D, Okano Y, Sumazaki R, Takayanagi M, Tamamori A, Yorifuji T, Yamato Y, Maeda K, Matsushita M, Matsuishi T, Tanikawa K, Kobayashi K, Saheki T.	Histological findings in the livers of patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency.	Hepatol Res	40	295-303	2010
Thong MK, Boey CCM, Sheng JS, Ushikai M, Kobayashi K.	Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency in two Malaysian siblings: outcome at one year of life.	Singapore Med J	51 (1)	e12-e14	2010
Fukushima K, Yazaki M, Nakamura M, Tanaka N, Kobayashi K, Saheki T, Takei H, Ikeda S	Conventional diet therapy for hyperammonemia is risky in the treatment of hepatic encephalopathy associated with citrin deficiency.	Inter Med	49 (3)	243-247	2010
Saheki T, Inoue K, Tushima A, Mutoh K, Kobayashi K.	Citrin deficiency and current treatment concepts.	Mol Genet Metab	100 (Suppl 1)	S59-S64	2010
佐伯武頼, 小林圭子.	シトリン欠損症原因遺伝子の発見が臨床に与えたインパクト.	日本遺伝カウンセリング学会誌	30 (2)	45-50	2009
大浦敏博	シトリン欠損症研究の進歩～発症予防・治療法の開発に向けて.	日本小児科学会雑誌	113	1649-1653	2009
舟邊さやか, 田中亮太, ト部貴夫, 川崎誠二, 小林圭子, 服部信孝.	非けいれん性てんかん重積状態をくりかえした成人発症 II 型シトリン血症の 1 例.	臨床神経学	49 (9)	571-575	2009