

表 6. 検査施設ガイドラインの例

国、組織	ガイドラインの内容
国際マススクリーニング学会	a) 大規模な集中化された検査室で実施 b) 必要な専門的技術・知識を備え、検査施設としての認定 (ISO, CLIA) を取得 c) スクリーニング検査過程の外部評価委員会による評価
米国 (全米州立衛生研究所協会、小児科学会)	a) 新生児スクリーニング検査施設では年間 3 万検体以上とすべき b) 新生児スクリーニング検査施設は CLIA '88 の要求基準、認定
ドイツ (小児科学会、新生児学会、新生児スクリーニング学会等)	a) 全ての検査を同一施設で実施 b) 年間 10 万検体を処理 c) 連邦政府のガイドラインに基づく精度保障システムの確保: ISO15189 で認証 d) 年間 1 回の” Quality Report for the Board of Insurance” の作成
オーストラリア (オーストラリア人類遺伝学会; HGSA)	a) 大規模な集中化された検査室で実施 b) 検査施設として認定 (ISO, CLIA) を取得 / 外部評価委員会による評価 c) HGSA が精度管理プログラムを実施

国における年間出生数と検査施設の数、表 5 に示すように集約化が進んでいる。検査施設あたり年間 3 万以上であった。

諸外国の施設設置基準について、表 6 にいくつかの国の例を挙げた。共通することは、一定以上の大規模検査施設、専門技術と知識の認証を受けることがあげられている。

タンデムマススクリーニングで備えるべき二次検査 (2nd tier test) として備えるべき検査項目を表 7 に挙げている。HPLCS-MS/MS および GC/MS 検査のことが要求されよう。

D. 結論

タンデムマス対象疾患の自然歴の追跡によって、多くの対象疾患でタンデムマス・スクリーニング実施による効果が認められた。一方メチルマロン酸血症など一部の疾患で効果が明らかでない疾患もある。疾患によって遺伝子型よりも後天的因子の関与が大きい疾患もあることと、アジアの中でも遺伝背景の共通点のみられない疾患も多いことが示唆された。また遺伝子変異の同定できないケースも少なくないが、そのようなケースでは MLPA 法が有効なオプションになることが示され

表 7. タンデムマススクリーニングにおける 2 次検査 (2nd tier test) の内容

異常	内容
C3 高値	HPLC-MS/MS: メチルマロン酸、3-ヒドロキピロピオン酸の定量 GC/MS: メチルマロン酸、2-メチルクエン酸の定量
Leu 高値	HPLC-MS/MS: アロイソロイシン、分岐鎖アミノ酸の定量
Met、C3 高値	HPLC-MS/MS: 総ホモシステイン、メチルマロン酸、2-メチルクエン酸の定量 GC/MS: メチルマロン酸、2-メチルクエン酸の定量
C5-OH 高値	GCMS: メチルクロトニルグリシン、メチルグルタコン酸、ヒドロキシメチルグルタル酸、メチルグルタル酸 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシンの定量
17-OHP 高値	HPLC-MS/MS: 関連ステロイドの定量 (陽性率は 1/10)

た。さらにタンデムマス検査施設の集約化について欧米先進国を調査したが、先行国でも集約化を進めていることがわかった。タンデムマス検査施設基準を設定することが、効率的体制に重要である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

論文発表

- 1) Tomatsu S, Montaño AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Gutierrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Barrera LA, Kida K, Kubota M, Orii T: Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolysaccharidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* 99:124-131, 2010 (February)
- 2) Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of Chromatography B* 878(13-14): 942-948, 2010 (April)
- 3) 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* 32: 362-370, 2010 (May)
- 4) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type2. *Journal of Chromatography B* 878: 1673-1676, 2010 (Jun)
- 5) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat Stress Deteriorates Mitochondrial β -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid β -Oxidation Disorders. *Journal of Chromatography B* 878 (20): 1669-1672, 2010 (Jun)
- 6) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique. *Journal of Chromatography B* 878: 3113-3118, 2010 (November)
- 7) 長谷川有紀, 山口清次: 新生児突然死の原因と予防. *産婦人科治療* 100 (増刊): 793-796, 2010 (4月)
- 8) 山口清次: 新生児マススクリーニングの新技術: タンデムマス法について. *日産婦医会報* 5月号: 8-9, 2010 (5月)
- 9) 虫本雄一, 竹谷健, 長谷川有紀, 小林弘典, 福井徹, 渡邊敏明, 山口清次: ステロイド抵抗性の難治性アトピー性皮膚炎として加療されていたピオチン欠乏の1例. *アレルギーの臨床* 30 (6): 543-547, 2010 (6月)
- 10) 虫本雄一, 山口清次: ロイシン. *小児内科* 42 (7): 1084-1087, 2010 (7月)
- 11) 小林弘典, 山口清次: 新しい新生児マススクリーニング: タンデムマスの導入. *Neonatal Care* 23 (9): 889-894, 2010 (9月)
- 12) 小林弘典: 新生児拡大マススクリーニング—タンデムマス法—. *小児科臨床* 63 (10): 2063-2069, 2010 (10月)
- 13) 小林弘典, 山口清次: タンデムマスによる新生児マススクリーニング. *小児科* 51 (12): 1697-1703, 2010 (11月)

- 14) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R. : Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy : The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening. . Molecular Genetics and Metabolism, 2011
- 7) Yamaguchi S : Expanded newborn screening in JAPAN, and the benefit for collaboration with developing countries. . 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening Symposium. Indonesia, October 2010

学会発表

- 1) Yamaguchi S : Heat Stress and Acute Encephalopathy in Childhood due to Inherited Organic and Fatty Acid Disorders. International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases. Taipei, Taiwan, March 2010
- 2) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Fukuda S, Yamaguchi S : Clinical and genetic investigation of 12 Japan cases of glutaric acidemia type1. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 3) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Li H, Mushimoto Y, Yamaguchi S : Developed diagnostic method for carnitine cycle disorders using in vitro acylcarnitine probe assay. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 4) Yamaguchi S : Pediatric emergency and inborn metabolic diseases. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases Seminnar. Fukuoka, 2010年3月
- 5) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S: Toxic effect of cereulide of bacillus cereus on mitochondrial fatty acid oxidation. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月
- 6) Yamaguchi S : Pediatric emergency and nutritionally treatable inborn errors of metabolism. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening Lecture. Indonesia, October 2010
- 8) Yamaguchi S : Organic acidemia and its treatment in JAPAN. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening Symposium. Indonesia, October 2010
- 9) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S : Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation (FAO) in FAO disorders : evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. Society for the study of inborn errors of metabolism. Istanbul, August 2010
- 10) Yamaguchi S : Japan MSMS pilot-how to turn pilot into NBS program. Annual Newborn Screening Seminar 2010. Finland, Jun 2010
- 11) Yamaguchi S : Pediatric emergency and inherited metabolic disorders (IMDs) : prevention from impairments. China (Ningxia)-Japan Inherited Metabolic Disorder Forum. 中国, September 2010
- 12) 内田由里, 長谷川有紀, 虫本雄一, 高橋知男, 小林弘典, 山口清次 : インフルエンザ脳症と代謝異常症の関連について. 第85回山陰小児科学会. 松江, 2010年4月
- 13) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, プレブスレンジャミヤン, 山口清次: 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた簡便な脂肪酸代謝異常症の酵素活性評価. 第113回日本小児科学会. 岩手, 2010年4月
- 14) 山口清次 : 小児突然死を引き起こすような代謝異常とタンデムマスによる予防. 第2回こども急性疾患学寄附講座「こどもの救急医療

- のこれから」講演。神戸，2010年6月
- 15) Yamaguchi S: Present situation of expanded newborn screening in Japan, and collaboration with Asian countries. . International Forum of Child Intractable Diseases 講演。Tokyo, 2010年7月
 - 16) 山口清次: わが国のタンデムマス・スクリーニングの現状と今後の展望。第37回日本マス・スクリーニング学会 シンポジウム。横浜，2010年8月
 - 17) 小林弘典: タンデムマス・スクリーニングの質的向上をめざして～非誘導体化法キットの導入経験と検査の Pitfall ～。第37回日本マス・スクリーニング学会 セミナー。横浜，2010年8月)
 - 18) 小林弘典，虫本雄一，長谷川有紀，伊藤由香，江角豊美，富田奈奈，園山京子，青砥仁泉，信藤真理子，角森正信，石原隆範，田中央吾，山口清次: 自治体主導のタンデムマス・スクリーニング: 島根県での試み。第37回日本マス・スクリーニング学会。横浜，2010年8月
 - 19) 高橋知男，小林弘典，虫本雄一，長谷川有紀，坂本修，大浦敏博，山口清次: 新生児マススクリーニングで発見されたプロピオン酸血症患児の尿中3-ヒドロキシプロピオン酸とメチルクエン酸の推移。第37回日本マス・スクリーニング学会。横浜，2010年8月
 - 20) 小林弘典: タンデムマスによる新生児スクリーニングのデータ解釈と臨床的意義。平成22年度先天性代謝異常・内分泌疾患マス・スクリーニング基礎理論研修会 セミナー。東京，2010年10月
 - 21) 川名修一，中川勝博，宮川治彦，長谷川有紀，山口清次: GC/MSによる血漿中アミノ酸類の高速・多成分一斉分析法の検討。第35回日本医用マススペクトル学会年会。名古屋，2010年9月
 - 22) 長谷川有紀，虫本雄一，小林弘典，プレブスレン ジャミヤン，山口清次: 乳幼児期に嘔吐発作で発症した有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の検討。第52回日本先天代謝異常学会。大阪，2010年10月
 - 23) 虫本雄一，長谷川有紀，小林弘典，プレブスレン ジャミヤン，山口清次: グルタル酸血症1型日本人症例の発症形態と臨床像のまとめ。第52回日本先天代謝異常学会。大阪，2010年10月
 - 24) 小林弘典，プレブスレン ジャミヤン，李紅，虫本雄一，長谷川有紀，山口清次: ミトコンドリア三頭酵素欠損症に対するベサフィブレードの効果に関する In vitro probe assay での検討。第52回日本先天代謝異常学会。大阪，2010年10月
 - 25) 虫本雄一，小林弘典，長谷川有紀，伊藤由香，江角豊美，富田奈奈，園山京子，青砥仁泉，信藤真理子，角森正信，石原隆範，田中央吾，山口清次: 島根県における自治体主導のタンデムマス・スクリーニング。第19回中国・四国小児保健学会。広島，2010年10月
 - 26) 山口清次，プレブスレン ジャミヤン，李紅，虫本雄一，小林弘典，長谷川有紀，福田誠司，八木麻理子，松尾雅文，折居建治，深尾敏幸: ミトコンドリア三頭酵素 (MTP) 欠損症日本人6症例の臨床遺伝学的検討。第55回日本人類遺伝学会。埼玉，2010年10月
 - 27) 山口清次: 質量分析を用いたメタボロミクス解析による先天代謝異常の診断、病態評価。第2回臨床メタボロミクス研究会講演。神戸，2010年11月
 - 28) Purevsuren J，長谷川有紀，山口清次: Acute encephalopathy due to emetic toxin bacillus cereus and mitochondrial fatty acid oxidation disturbance. 第42回日本小児感染症学会。仙台，2010年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究課題：効率的な体制、臨床的效果に関する研究

タンデムマス・スクリーニングの対象疾患を含む有機酸・脂肪酸代謝異常症の自然歴

研究要旨

2001～2010年の10年間に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症例の疾患の内訳と発症時期を明らかにした。

診断症例はOAが191症例、FAODが67症例、計258症例であり、うち新生児マススクリーニングなど未発症時での診断例は43症例(17%)を占めた。

A) 疾患内訳：OAにおける疾患の内訳は、1) 尿素サイクル異常症 67/191例(35%)で、2) メチルマロン酸血症 54例(28%)、3) プロピオン酸血症 22例(12%)、4) グルタル酸尿症1型 13例(7%)と続いていた。このうち、プロピオン酸血症では新生児マススクリーニングで発見される未発症例が59%を占めているのが特徴であった。FAODは1) グルタル酸尿症2型が16/67例(24%)で最も多く、引き続いて2) 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症と中鎖アシル CoA 脱水素酵素(MCAD)欠損症がそれぞれ14例(21%)であった。VLCAD欠損症とMCAD欠損症は新生児マススクリーニングで4症例ずつ発見されており、これらの児は低血糖などの症状が出現した場合でも早期に治療を行うことができ、いずれも良好な予後を獲得していた。

B) 発症時期：未発症例を除く215症例の検討では、1) 新生児期発症 OA 41%、FAOD 22%、2) 乳児期発症はそれぞれ25%、31%、3) 幼児期発症 18%、33%、4) 学童期以降 16%、15%で、OAでは新生児から乳児期発症が6割以上を占めるのに対し、FAODでは発症が少し遅く、乳幼児期発症が約6割を占めていた。ただし、尿素サイクル異常症だけにしぼると新生児期と幼児期以降の発症がそれぞれ4割以上をしめており、他のOAとは異なる特徴が認められた。またFAODでは、乳幼児期発症例のほとんどが初発症状として感染時などに急性脳症様の症状を呈していた。

以上より、OAおよびFAODのうち、新生児期に発症する疾患はスクリーニングが間に合わないこともあること、しかし遅発型や乳幼児期に急性脳症様に発症する疾患ではタンデムマスによる新生児マススクリーニングが発症予防や障害予防に寄与する可能性が高いことが示唆された。

研究協力者

長谷川有紀 (島根大学小児科助教)
山田健治 (島根大学小児科医員)
小林弘典 (島根大学小児科助教)
虫本雄一 (島根大学小児科助教)
山口清次 (島根大学小児科教授)

を行う上で、疾患の選択は費用対効果などを考慮する必要がある。今回、2001年から2010年に当科で診断した有機酸代謝異常症(OA)と脂肪酸代謝異常症(FAOD)の症例について、疾患の内訳と発症時期を明らかにし、スクリーニングの有用性について検討した。

A. 研究目的

タンデムマスによる新生児マススクリーニング

B. 研究方法

1) 発症後に診断された有機酸代謝異常症(OA)

の疾患内訳と発症時期

2001年1月から2010年12月の間に当科で診断された症例について、疾患の内訳と各疾患の発症時期について検討した。

2) 発症後に診断された脂肪酸代謝異常症 (FAOD) の疾患内訳と発症時期

OAと同様に、疾患の内訳と各疾患の発症時期を検討した。

なお、新生児マススクリーニングで発見された未発症例について、それぞれどのような疾患が多かったかも検討した。

C. 研究結果

1) OA の疾患内訳と発症時期 (表 1)

対象は191症例であった。疾患の内訳はオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症などの尿素サイクル異常症が最も多く67例で、続いてメチルマロン酸血症54例、プロピオン酸血症22例、グルタル酸尿症1型13例、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症9例、アルカプトン尿症・3メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) 欠損症それぞれ8例などとなった。また新生児マススクリーニングなどによる未発症での発見例は31症例 (16%) であった。

発症例160例の発症時期を検討すると、新生児期発症が66症例 (41%) で、ほとんどが哺乳不良や嘔吐、意識障害といった非特異的な症状で発症していた。乳児期とあわせて1歳までに発症した例は66%を占めた。

各々の疾患毎の検討では、尿素サイクル異常症

は新生児期発症と幼児期・学童期での発症が4割ずつとほぼ同数で、他の疾患とは異なる特徴があった。

またグルタル酸尿症1型は乳児期に感染を契機として突然の退行で発症する例がほとんどであったが、1例は胎盤早期剥離のため、重症の新生児仮死で出生し、このときの頭画像検査でシルビウス裂の萎縮に気づかれて診断された例があった。頭囲拡大によって新生児期に気づかれた症例も1例認められた。

アルカプトン尿症は全て50歳代以上で関節痛や歩行障害などを契機に診断されていた。

そしてプロピオン酸血症では診断症例数22例のうち、未発症例が13例 (59%) と多数であった。

2) FAOD の疾患内訳と発症時期 (表 2)

対象は67症例であった。疾患の内訳ではグルタル酸尿症2型 (GA2) が最も多く16例で、以下極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症と中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症がそれぞれ14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6例と続き、この4疾患で75%を占めた。なお未発症例は16症例 (24%) で、うち VLCAD 欠損症と MCAD 欠損症が4例ずつ、SCAD 欠損症が3例と、アシル CoA 脱水素酵素欠損症が多くを占めていた。

発症例51例の発症時期を検討すると、新生児期発症は12症例 (24%) で、有機酸代謝異常症と同様に哺乳不良や意識障害など非特異的な症状で発症していた。新生児期発症のうち、8例がグルタル

表 1. 有機酸代謝異常症の発症時期のまとめ (N=191)

疾患名	症例数	発症例				未発症例
		新生児期	乳児期	幼児期	学童期以降 (成人例)	
尿素サイクル異常症	67	30	7	17	11(3)	2
メチルマロン酸血症	54	20	16	7	4(2)	7
プロピオン酸血症	22	4	3	2	-	13
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	9	6	2	1	-	-
グルタル酸尿症1型	13	2	8	-	-	3
MCC欠損症	8	-	1	-	1(0)	6
3-メチルグルタコン酸血症	4	1	2	-	1(1)	-
アルカプトン尿症	8	-	-	-	8(8)	-
複合型グリセロールキナーゼ欠損症	3	3	-	-	-	-
その他	3	-	1	1	1(0)	-

表 2. 脂肪酸代謝異常症の発症時期のまとめ (N=67)

疾患名	症例数	発症例				未発症例
		新生児期	乳児期	幼児期	学童期以降 (成人例)	
グルタル酸尿症2型	16	8	5	1	2(1)	-
カルニチン欠乏症	3	-	1	2	-	-
CPT1欠損症	2	-	-	1	-	1
CPT2欠損症	6	2	2	2	-	-
VLCAD欠損症	14	-	3	2	5(1)	4
MTP欠損症	4	2	1	-	1	-
MCAD欠損症	14	-	2	8	-	4
SCAD欠損症	3	-	-	-	-	3
β-ケトチオラーゼ欠損症	3	-	1	2	-	-
HMG血症	2	-	2	-	-	-

酸尿症2型であったが、これらのほとんどが potter 様顔貌で、多発性嚢胞腎を合併しており、治療に反応不良で、全例死亡していた。

乳幼児期には35症例(69%)が発症しており、うち28例に感染や長期間の飢餓に伴う急性脳症様の発作を認めた。特にMCAD欠損症では全例がこのような発作で発症していた。また長鎖脂肪酸代謝異常症の2歳以上の症例では骨格筋症状を訴える症例が多く、成人になってはじめて診断された症例も2例に認められた。

D. 考察と結論

今回の研究で以下のことが明らかとなった。

ア) 2001年-2010年での診断症例は258症例で、うち未発症例が43症例(17%)であった。

イ) 発症時期

OAでは新生児および乳児期発症が66%であるのに対し、FAODでは乳幼児期発症が64%と発症がやや遅い傾向にあった。

ウ) 尿素サイクル異常症は、新生児期と幼児期以降の発症がそれぞれ4割以上をしめており、他の疾患とは異なる特徴が認められた。またプロピオン酸血症は軽症型と思われる未発症例が6割近くを占めていた。

エ) FAODでは、乳幼児期発症例のほとんどが初発症状として感染時などに急性脳症様の症状を呈していた。

以上より、OAおよびFAODのうち、新生児期に発症する疾患はスクリーニングが間に合わないこともあること、しかし遅発型や乳幼児期に急性脳症様に発症する疾患ではタンデムマスによる新生児マススクリーニングが発症予防や障害予防に寄与する可能性が高いこと、疾患によっては軽症例が多く発見されるため、長期的な自然歴によってはスクリーニング疾患の再検討を要する可能性があることが、示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 栗野宏之, 八木麻理子, 起塚庸, 小林弘典, 長

谷川有紀, 山口清次, 坂本修, 大浦敏博, 竹島泰弘, 松尾雅文: 幼児期に繰り返す嘔吐発作で発症したメチルマロン酸血症の同胞例. 日本小児科学会雑誌 2010, 114: 961-965

2) 虫本雄一, 竹谷健, 長谷川有紀, 小林弘典, 福井徹, 渡邊敏明, 山口清次: ステロイド抵抗性の難治性アトピー性皮膚炎として加療されていたピオチン欠乏の1例. アレルギーの臨床 2010, 30:543-547

3) 吉良龍太郎, 磯部菜摘, 山口結, 馬場晴久, 鳥巢浩幸, 原寿郎, 山口英里, 長谷川有紀, 山口清次: 急性脳症で発症した中鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症の一例. 特殊ミルク情報 2009, 45:22-24

4) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S.: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. Mol Genet Metab. 2010, [Epub ahead of print]

5) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N.: Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. Tohoku J Exp Med. 2010;221 (3) :191-5

6) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S.: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type 2. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Jun 15;878 (20) :1673-6

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

グルタル酸血症 1 型日本人症例 19 例の発症形態と臨床像の検討

研究要旨

グルタル酸血症 1 型 (GA1) は、リジン、ヒドロキシリジン、トリプトファンの異化過程で働くグルタリル-CoA 脱水素酵素の異常に基づく有機酸代謝異常症であり、異常代謝産物の蓄積による錐体外路症状と頭部画像所見 (シルビウス裂の拡大、線条体病変) が特徴である。我々は、日本人患者 19 例について、臨床的・分子生物学的研究を行った。3 例がタンデムマススクリーニング (TMS) 発見例、1 例が同胞スクリーニング発見例、それ以外の 15 例は全例発症後に診断された。発症後に診断された 15 例中、11 例が重度の障害 (このうち 3 例が死亡)、3 例が中等度の障害を持ち、1 例が正常発達であった。一方、MS や同胞スクリーニングで診断された 4 例は良好な経過をとっていた。遺伝子型 / 臨床病型の関連性は明らかではなく、genotype よりも診断の時期が予後により関連していた。また、日本人 GA1 の遺伝子変異は多様であり、明らかな common mutation はみられなかった。早期診断と治療が行われた症例では良好な経過をとっており、タンデムマスによる新生児マススクリーニングは本症の予後改善に効果的である。

研究協力者

虫本雄一 (島根大学小児科)
小林弘典 (島根大学小児科)
長谷川有紀 (島根大学小児科)
Jamiyan Purevsuren (島根大学小児科)
山口清次 (島根大学小児科)

A. 研究目的

グルタル酸血症 1 型 (GA1) は、1975 年に発見されて以来、世界で 400 例以上が知られている。常染色体劣性遺伝形式をとり、原因遺伝子は GCDH 遺伝子である。白人での頻度は約 10 万出生に 1 人、日本での頻度は約 21 万出生に 1 人と推定されている。しかし日本人患者の遺伝的、または臨床的特徴を明らかにした報告はない。本研究では、日本人 GA1 患者の臨床的特徴、遺伝背景を明らかにし、TMS の予後に及ぼす効果を検討した。

B. 研究方法

臨床所見と GC/MS または MS/MS により GA1 と生化学診断された日本人患者 19 例を対象とし、発症形態、転帰および GCDH 遺伝子の解析を行った。研究対象の内訳は、新たに検索した症例が 13 例、過去に報告された症例 6 例であった。同胞例が 19 例中 2 家系 (4 例) あった。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析結果を含む個人情報、あらかじめ学内の倫理委員会で承認を受けた形式に則り、患者および家族の人権等に十分に配慮して行った。

C. 研究結果と考察

a) 臨床的特徴 (図 1)

1) 転帰：対象となる 19 例を神経学的な予後によって 3 群に分類した。19 例の内訳は、正常群が 5 例、中等群が 3 例、重症群が 11 例であった。

2) 診断：正常群 5 例中 3 例が MS で、1 例が同

胞スクリーニングにより発症前に診断されていた。残りの15例は、発症後に診断された症例であった。中等群の診断時期(4.7 ± 2.7ヶ月)は、重症群(11.6 ± 12.7ヶ月)よりも早い傾向があった。

3) 発症契機、形態:感染や発熱などの誘引が明らかなものが8例、ポリオの予防接種後の発症が1例にみられた。痙攣や意識障害等の急性脳症様発作での発症が発症症例の大部分(15例中10例)でみられた。

4) macrocephaly: 19例中6例(32%)にみられた。海外の報告(65-75%)に較べ頻度が低い。

5) 尿中有機酸分析: 19例全例がグルタル酸の著明増加がみられ、high excretor typeであった。

6) 血中アシルカルニチン分析: 19例中9例におこなわれ、全例にC5DCの上昇がみられた。

7) 頭部画像検査: 19例全例に典型的な所見がみられたが、正常群の5例中3例ではマイルドな所見であった。

b) 臨床像と遺伝子背景 (図2)

1) 新規の変異: 今回新たに13例を解析し、26アレル中、19種類の変異を同定した。また、そのうち8種類は新規の変異であった。

2) ホモ変異: 19例中、Q352XとR355Hの2種類。

3) 複数にみられた変異: S305L変異が4アレルに、S139L、R355H、R383Cが3アレルに、Q352Xを2アレルに認め、これらの変異をあわせると、全体の44.3%となった。

4) 遺伝子型/臨床病型: 同じ変異を持ちながら異なる経過をとった同胞例があった。遺伝子変異と臨床像の相関はみられなかった。

D. 結論

1) 発症してから診断された症例の予後は不良であった。

2) 遺伝子型/臨床病型の関連性は明らかではなく、genotypeよりも診断の時期が予後により関連していた。

3) 日本人GA1の遺伝子変異は多様であり、明らかなcommon mutationはみられなかった。

4) 発症前に診断する新生児マススクリーニングが本症の予後改善のために有用であり、今後の普及が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 虫本雄一、竹谷健、長谷川由紀、小林弘典、福井徹、渡邊敏明、山口清次: ステロイド抵抗性の難治性アトピー性皮膚炎として加療されていたピオチン欠乏の1例: アレルギーの臨床 30: 543-547, 2010

2) 虫本雄一、山口清次: 診断へのアプローチ 新生児マススクリーニング ロイシン: 小児内科 42: 1084-1087, 2010

3) 虫本雄一: 母体代謝疾患の新生児: 周産期医学 40:628-631, 2010

4) Yuichi Mushimoto, Seiji Fukuda, Yuki Hasegawa, Hironori Kobayashi, Jamiyan Purevsuren, Hong Li, Takeshi Taketani, Seiji Yamaguchi: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. Mol Genet Metab: 2010 (in press)

2. 学会発表

1) Yuichi Mushimoto, Yuki Hasegawa, Hironori Kobayashi, Hong Li, Jamiyan Purevsuren, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi: Clinical and genetic investigation of 12 Japanese cases of glutaric acidemia type1: The 1stAsian Congress for Inherited Metabolic Diseases. 福岡, 2010年3月

2) 虫本雄一、小林弘典、長谷川有紀、李紅、Jamiyan Purevsuren、山口清次: 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた簡便な脂肪酸代謝異常症の酵素活性評価: 第113回日本小児科学会. 岩手, 2010年4月

3) Yuichi Mushimoto, Yuki Hasegawa, Hironori Kobayashi, Hong Li, Jamiyan Purevsuren, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi: Clinical and genetic

investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type I: Society for the study of Inborn Errors of Metabolism annual symposium. Istanbul, 2010 August

4) 虫本雄一、小林弘典、長谷川有紀、Jamiyan Purevsuren、山口清次: グルタル酸血症1型日本人症例の発症形態と臨床像のまとめ. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図1 GA1日本人19例の臨床経過

Case	Age at onset	Age at diagnosis	Precipitating factor	Clinical symptoms	Macrocephaly	Urine GA	GSDG (<0.3)	Neuro imaging	Outcome
1)	-	1m	None	Normal development	-	High	1.08	Typical	Normal (4m)
2)	-	1m	None	Normal development	-	High	2.22	Mild	Normal (5y4m)
3)	-	1m	None	Normal development	-	High	1.95	Mild	Normal (7y5m)
4) a	-	2y 0m	None	Normal development	-	High	N.D.	Mild	Normal (22y)
5)	6m	2y 5m	None	Normal development	+	High	4.4	Typical	Normal (9y11m)
6)	2m	2m	None	Enlargement of ventricles	+	High	N.D.	Typical	Mild (23y)
7)	2m	4m	None	Seizure	+	High	N.D.	Typical	Mild (25y)
8)	3m	8m	None	Seizure, regression	+	High	3.36	Typical	Mild (3y2m)
9)	4m	4m	None	Seizure, regression	+	High	N.D.	Typical	Severe (1y4m)
10)	4m	7m	None	Regression, dystonia	-	High	N.D.	Typical	Severe (9y2m)
11)	5m	6m	None	Seizure, regression, dystonia	-	High	N.D.	Typical	Severe (9y2m)
12)	5m	6m	Infection, fever	Seizure, dystonia	-	High	N.D.	Typical	Severe (5y0m)
13)	5m	7m	Infection	Seizure, regression, dystonia	-	High	N.D.	Typical	Severe (2y5m)
14)	5m	7m	Kawasaki disease	Regression, dystonia	-	High	1.76	Typical	Severe (7y)
15) b	5m	4y 3m	Fever	Regression, dystonia	-	High	0.38	Typical	Severe (5y2m)
16)	7m	7m	Infection, fever	Unconscious, dystonia	-	High	0.57	Typical	Severe (1y1m)
17)	7m	12m	Gastroenteritis	Seizure, regression, dystonia	+	High	N.D.	Typical	Severe (2y5m)
18) b	8m	9m	Polio vaccine, infection, fever	Regression, dystonia	-	High	0.41	Typical	Severe (1y8m)
18) a	8m	12m	Gastroenteritis	unconscious, dystonia	-	High	N.D.	Typical	Severe (20y)

図2 臨床像と遺伝子背景

Case	Sex	Base change	Effect
1)	F	1064 G>A / 1147 D>T	R356H/R383D
2)	F	556 A>T / 914 C>T	S186C / S305L
3)	F	215 G>T / 1237 T>G	R72L/Y413D
4) a	F	914C >T / 1015A > G	S305L / M339V
5)	M	416C >T / ?	S139L / ?
6)	M	914C >T / 1147 C>T	S305L / R383C
7)	M	413G>A / 416C>T	R138K / S139L
8)	F	914C >T / 1081A> G	S305L / K351E
9)	M	<u>IV84+2T>C</u> / <u>532G>A</u>	Truncated (splicing) / G578R
10)	F	<u>1054G > T</u> / <u>1054C > T</u>	Truncated (G352stop) / Truncated (G352stop)
11)	M	226C>T / <u>T30G>A</u>	Truncated (G76stop) / G244S
12)	M	1064G >A / 1064G >A	R355H / R355H
13)	F	<u>1061G > C</u> / <u>IV810-2A>C</u>	G354A / Truncated (splicing)
14)	M	416C >T / 769C>T	S139L / R257W
15) b	M	<u>88 or 90delC</u> / <u>451A>G</u>	Truncated (frame shift) / Y155C
16)	M	<u>1144-1145delGC</u> / <u>1298C>T</u>	Truncated (frame shift) / A433V
17)	M	383G>A / 1147C>T	R128Q / R383C
18) b	F	<u>88 or 90delC</u> / <u>451A>G</u>	Truncated (frame shift) / Y155C
18) a	F	914C >T / 1015A>G	S305L / M339V

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

小児慢性特定疾患登録患者データベースにおける

タンデムマスによる新生児マス・スクリーニング対象疾患患者の検討

研究要旨

小児慢性特定疾患治療研究事業における登録患者データベースに平成 17～21 年度において登録されているアミノ酸代謝異常症を除くタンデムマスによる新生児マス・スクリーニング (MS) 対象疾患患者の解析を行った。登録症例数が最も多かったのは、メチルマロン酸血症の 101 例で、最も少なかったのは SCAD 欠損症の 1 例であった。また、MS での発見例が最も多かったのはプロピオン酸血症の 15 例であった。MS 発見例のある疾患の知的予後について MS 発見例と MS 以外での発見例について比較検討したところ、プロピオン酸血症とグルタル酸尿症 1 型において明らかに MS 発見例で知的予後は良好であった。

研究協力者

伊藤道徳 (独) 国立病院機構香川小児病院
副院長

して登録データがなく就学前および就学状況の明らかでない患者は解析不能群として、検討を行った。

A. 研究目的

小児慢性特定疾患治療研究事業における登録患者データベースに登録されている患者の登録データを解析することにより、タンデムマスによる MS の有用性を明らかにすることを目的に本研究を行った。

B. 研究方法

平成 17～21 年度に小児慢性特定疾患治療研究事業における登録患者データベースに登録されているアミノ酸代謝異常症を除くタンデムマスによる MS 対象疾患患者についてその症例数、MS での発見の有無、知的障害の有無、就学状況について解析し、知的予後に対する MS の有用性を検討した。患者数に関しては登録データから経年的に登録されていると考えられる患者については、最終年度のみを症例数と算出した。また、知的予後については、知的障害あり/特別支援教育・訪問教育を受けている患者を予後不良群、知的障害なし/普通学級の患者を予後良好群、知的障害に関

C. 研究結果

登録症例数を表 1 に示す。登録症例数が最も多かったのは、メチルマロン酸血症の 101 例で、登録患者数の最も少なかったのは、SCAD 欠損症の 1 例であった。MS で発見された症例数の最も多かったのはプロピオン酸血症の 15 例で複合カルボキシラーゼ欠損症を含む 6 疾患では MS 発見症例はなかった。

知的予後 (表 2) に関しては、プロピオン酸血症で全体の予後不良群 41.7% に比して MS 発見例での予後不良群は 7.1%、グルタル酸尿症 1 型では全体の予後不良群 55.0% に対して MS 発見例では 0% であった。メチルマロン酸血症では、全体の 52.0% の予後不良群に対して MS 発見例での予後不良群は 40.0% であった。

D. 考察

今回の解析では、MS での発見症例数が少ないこともあり、知的予後に対する MS の有用性の検討が困難な疾患が多かったが、プロピオン酸血症

とグルタル酸尿症1型ではMSによる知的予後の改善が認められた。プロピオン酸血症では、MSにおいてわが国に特徴的な軽症型が多く発見されているために、MSによって知的予後の改善が認められている可能性もある。メチルマロン酸血症では、MSによる知的予後の改善は認められなかったが、これは予後良好とされるビタミンB12反応型が、MS発見なしに含まれていることによる可能性も考えられる。

E. 結論

タンデムマスによるMSによって、プロピオン酸血症およびグルタル酸尿症1型においてMSによる知的予後の改善が認められた。

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・登録状況

なし

表1：平成17～21年度での各疾患の登録症例数

データ提供実施主体数 / 総実施主体数		97/98	96/99	99/94	84/103	9/103
疾患名	症例数	H17年度	H18年度	H19年度	H20年度	H21年度
メチルマロン酸血症	101(5)*	65(5)	71(6)	62(8)	51(4)	3(0)
プロピオン酸血症	51(15)*	33(3)	32(4)	34(5)	31(4)	1(0)
グルタル酸尿症2型	26(3)*	13(3)	13(2)	13(3)	12(2)	1(1)
CPT欠損症	26(1)*	11(0)	15(0)	17(1)	12(2)	3(2)
HMG尿症	23(3)*	13(2)	11(1)	15(2)	12(0)	2(0)
グルタル酸尿症1型	22(4)*	12(1)	11(2)	12(1)	19(7)	1(0)
VLCAD欠損症	18(2)*	10(2)	7(0)	12(2)	11(2)	1(0)
MCAD欠損症	11(4)*	6(0)	5(1)	6(2)	8(1)	1(1)
複合カルボキシラーゼ欠損症	8(0)*	7(0)	7(0)	6(1)	5(0)	0
イソ吉草酸血症	7(1)*	5(0)	6(1)	3(0)	3(0)	0
カルニチン/アシルカルニチン転移酵素欠損症	4(0)*	2(0)	3(0)	3(0)	3(0)	0
β-ケトチオラーゼ欠損症	4(0)*	3(0)	1(0)	3(0)	2(0)	0
β酸化異常症	3(0)*	2(1)	1(1)	1	1	0
長鎖ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素欠損症	2(0)*	2(1)	1(0)	2(0)	1(0)	0
SCAD欠損症	1(0)*	0	0	1(0)	1(0)	0

() * : MSでの発見症例数 () : 新規登録症例数

表 2 : 各疾患での知的予後の検討

疾患名	MSでの 発見	解析可能 症例数	予後不良	予後良好
メチルマロン酸血症	あり	5	2(40.0%)	3(60.0%)
	なし	78	37(47.4%)	41(52.6%)
	無記入	15	12(80.0%)	3(20.0%)
	合計	98	51(52.0%)	47(48.0%)
プロピオン酸血症	あり	14	1(7.1%)	13(92.9%)
	なし	27	15(55.6%)	12(43.4%)
	無記入	7	4(57.1%)	3(42.9%)
	合計	48	20(41.7%)	28(58.2%)
ゲルタル酸尿症 2 型	あり	2	1(50.0%)	1(50.0%)
	なし	18	7(38.9%)	11(61.1%)
	無記入	2	1(50.0%)	1(50.0%)
	合計	22	9(40.9%)	12(59.1%)
CPT 欠損症	あり	1	0(0%)	1(100%)
	なし	18	3(16.8%)	15(83.3%)
	無記入	4	3(75.0%)	1(25.0%)
	合計	23	6(26.1%)	17(73.9%)
HMG 尿症	あり	3	1(33.3%)	2(66.7%)
	なし	10	2(20.0%)	8(80.0%)
	無記入	7	5(71.4%)	2(28.6%)
	合計	20	8(40.0%)	12(60.0%)
ゲルタル酸尿症 1 型	あり	4	0(0%)	4(100%)
	なし	15	11(73.3%)	4(26.7%)
	無記入	1	0(0%)	1(100%)
	合計	20	11(55.0%)	9(45.0%)
VLCAD 欠損症	あり	2	0(0%)	2(100%)
	なし	10	1(10.0%)	9(90.0%)
	無記入	2	0(0%)	2(100%)
	合計	14	1(7.1%)	13(92.9%)
MCAD 欠損症	あり	4	0(0%)	4(100%)
	なし	5	1(20.0%)	4(80.0%)
	無記入	2	0(0%)	2(100%)
	合計	11	1(9.1%)	10(90.9%)
イソ吉草酸血症	あり	1	0(0%)	1(100%)
	なし	5	2(40.0%)	3(60.0%)
	無記入	1	0(0%)	1(100%)
	合計	7	2(28.6%)	5(71.4%)

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

古典期 PKU と BH₄ 反応性 PKU の栄養摂取の長期評価

およびフォローの必要性について

研究要旨

前年度に実施した栄養食事調査の対象者のうち、古典的 PKU 1 名、BH₄ 反応性 PKU 4 名に対して、長期的な栄養摂取状況の評価と重点的なフォローの必要性を検討するために再度栄養食事調査を行った。方法は、前回と同様に食事記録を依頼し、栄養価を算出後、性・年齢別の食事摂取基準量と比較した。古典的 PKU では、成長に伴う治療用ミルクの種類の変化により、水溶性ビタミンの摂取量の低下が懸念される。特に女性の妊娠時における葉酸の摂取量確保の必要性が示唆された。

研究協力者

小松祥子 (大手前栄養学院 講師)

新宅治夫

(大阪市立大学大学院医学研究科

発達小児医学 教授)

A. 研究目的

前年度に実施した栄養食事調査の対象者のうち、BH₄ 反応性 PKU 4 例 (BH₄ 群)、古典的 PKU 1 例に対して、長期的な栄養摂取状況の評価と重点的なフォローの必要性を検討するために再度栄養食事調査を行った。

B. 研究方法

方法は、研究の目的を説明し同意の得られた対象者あるいは保護者に前回調査と同様に秤量法を基本とした 1～2 日分の食事記録を依頼した。このデータをもとに栄養価を算出後、食品数量、野菜摂取量、たんぱく質および Phe の摂取量、また、各栄養素については性・年齢別の食事摂取基準 2010 年度版の基準量をもとに算出した値を用いて、前年度との比較を行なった。

C. 研究結果

1) 対象者の身体的特徴

対象者の基礎データを表 1 に示す。BH₄ の 4 名はいずれも学童期であり、身体精神的発達に問題は無い。血中 Phe 濃度は 1 名が範囲を超えて高い状態であった。古典的 PKU の対象者は 1 年の内に BMI が 4 ポイント低下し、体重の減少がみられた。

2) BH₄ 群の食事栄養摂取状況

この調査における BH₄ 群は、PKU の食事療法の要であるたんぱくおよび Phe 摂取制限を解除されており、それらの摂取量は健常児と同様であった (表 2)。また、表 3 に示すように、たんぱく質は食事摂取基準の推奨量 (RDA: 母集団の 97～98% が必要量を満たすと考えられる量) を大きく超えていた。昨年同様、BH₄ 群では脂質は基準である目標量 (DG: 生活習慣病の 1 次予防のため策定された量) の上限付近、炭水化物は同じく DG の上限付近であり、脂質の割合の多い食事内容となっている (表 3)。葉酸は全症例で推奨量 (RDA: 母集団の 50% が必要量を満たすと考えられる量) 以上摂取していたが、症例 1～3 で Ca は推定平均必要量 (EAR) に満たない、Fe は EAR と RDA との間、ビタミン B₁、B₂ は EAR に満たないかまた

は EAR と RDA との間の摂取状況であった。

3) 古典的 PKU 1 例の食事栄養摂取状況

BH₄ 群と同様のデータを表 4、5 に示す。エネルギーは 1 日分の約 50% を、たんぱく質は 90% 以上を治療用ミルクから摂取していた。たんぱく質摂取量は RDA 以上となっており、脂質、たんぱく質は目標量 (DG) の範囲内に納まっていた。Ca、Fe は RDA を大きく上回り、不足の確率はかなり低くなっている。これらの摂取は 90% 以上がミルク由来である。一方、ビタミン B₁、B₂ および葉酸は、基準 (EAR あるいは RDA) の 50% 程度の摂取量であった。これらの栄養素もミルクからの摂取が約 70~90% を占めているが、ミルク中の含有量が少ないことが影響している。

D. 考察

食事栄養摂取の傾向は、どの症例も前年度と同様であった。調査項目に挙げた栄養素に関しては、BH₄ 群では葉酸は十分摂取できていたが、Ca や Fe の摂取が少ない傾向が示唆された。反対に、PKU では水溶性ビタミン類の摂取量が低い傾向にあった。PKU の食事療法では、たんぱく密度の高い治療ミルクであるフェニルアラニン無添加総合アミノ酸粉末や低フェニルアラニンペプチド粉末の使用割合が多くなるにつれてミネラル、ビタミンの摂取量が著しく減少するため、長期に亘る使用では注意が必要と考える。また、葉酸に関しては、妊娠を計画する際の厳しい食事制限をする場合は、一般の妊婦の摂取以上にプテロイルモノグルタミン酸としての付加が必要と考える。

今後は両者の食事栄養摂取の傾向について、対象者数を増やし、長期的な精査が必要である。

E. 結論

長期的および重点的フォローの必要性について、前年度に行なった調査から得られた傾向と比較を行なうために、BH₄ 反応性 PKU 4 例 (BH₄ 群)、古典的 PKU 1 例に対して再調査を行なった。両群内、両群間の傾向は前年度と同様であった。BH₄ 群では、Ca、Fe、PKU では葉酸などについて、

摂取量が著しく減少しないようにフォローしていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 千葉力 他 4 人 新生児・マススクリーニング (NMS) で発見されたテトラヒドロピオプテリン (BH₄) 反応性高フェニルアラニン血症 (HPA) の一例 青森市病医誌・15 巻 1 号・1-5・2010
- 2) 新宅治夫 フェニルアラニン 小児内科 42 巻 7 号・1069-1074・2010
- 3) 新宅治夫 フェニルケトン尿症に対するテトラヒドロピオプテリン治療 小児科臨床 63 巻 10 号・2089-2096・2010

2. 学会発表

- 1) 食事調査からみた BH₄ 反応性高フェニルアラニン血症患者の食事・栄養素摂取状況 第 32 回臨床栄養学会総会 第 31 回臨床栄養協会総会 第 VIII 回連合大会 名古屋 2010 年 8 月
- 2) フェニルケトン尿症 第 32 回臨床栄養学会総会 第 31 回臨床栄養協会総会 第 VIII 回連合大会 名古屋 2010 年 8 月
- 3) Shintaku H, Ohwada M, Kitagawa T Long-term Follow-up of Tetrahydrobiopterin (BH₄) Therapy in Patients with BH₄ Deficiency in Japan, SSIEM Annual Symposium 2010 (Istanbul) Aug 2010
- 4) BH₄ 反応性 PAH 欠損症 第 52 回日本先天代謝異常学会 大阪 2010 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表 1 対象者の基礎データ

	性別	調査年度	年齢 (y.m)	身長 (cm)	(S.D.)	体重 (kg)	(S.D.)	Phe値 (mg/dl)	維持範囲と比較	BH ₄ (mg/kg)
BH ₄	1 男	21	10.1	141.9	0.1	36.5	平均	5.84	→	9.3
		22	11.5	145.7	0.1	39.0	平均	8.26	→	9.3
	2 男	21	10.4	132.9	-0.9	28.1	-0.9	7.22	→	11.0
		22	10.1	137.1	-0.7	29.1	-0.5	8.87	↑	10.0
	3 男	21	11.2	148.8	0.8	36.0	-0.4	4.40	→	3.9
		22	11.1	154.9	0.9	39.0	-0.3	5.95	→	3.7
	4 男	21	14.8	155.3	-1.7	44.5	-1.2	8.54	→	7.6
		22	15.4	160.2	-1.3	46.5	-1.2	9.99	→	4.2
PKU	女	21	39.1	146.6	—	53.0	24.7*	9.53	→	
		22	39.1	147.3	—	45.1	20.8*	8.73	→	

*: BMI

表 2 BH₄群のたんぱく質および Phe 摂取量

	年度	たんぱく質 (g)	(g/kg)	Phe (mg)*	(mg/kg)
症例1	21	66.4	1.8	2479	67.9
	22	68.1	1.7	2501	64.1
症例2	21	96.3	5.6	3099	181.3
	22	59.5	2.0	2452	84.3
症例3	21	81.9	2.3	3679	102.2
	22	80.8	2.1	3313	85.0
症例4	21	118.0	2.7	3878	87.1
	22	67.5	1.5	3031	65.2

: 成分不明の食品はたんぱく質の5%量として算出

表 3 BH₄群のエネルギーおよび主な栄養素摂取量

年度	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (%E)	炭水化物 (%E)	Ca (mg)	Fe (mg)	B ₁ (mg)	B ₂ (mg)	葉酸 (μg)	
症例1	21	1926	66.4	25.4	59.1	363	6.0	1.14	0.80	216
	22	1891	68.1	38.7	45.5	291	8.2	1.34	0.95	259
症例2	21	2979	97.0	35.2	49.2	589	11.7	1.42	1.51	304
	22	2192	59.5	39.0	49.1	436	5.3	0.81	0.99	266
症例3	21	2205	81.9	30.4	52.4	567	7.9	1.38	1.40	285
	22	2262	80.8	32.4	50.1	398	8.2	0.87	1.12	239
基準 (10~11歳)		EAR	DG	DG	EAR	EAR	EAR	EAR	EAR	
		40	20~30	50~70	600	7.0	1.0	1.1	160	
		RDA			RDA	RDA	RDA	RDA	RDA	
症例4	21	3283		31.7	52.5	772	13.4	1.72	2.15	308
	22	2388		43.0	44.9	806	7.8	2.55	2.88	252
基準 (15~17歳)		EAR	DG	DG	EAR	EAR	EAR	EAR	EAR	
		50	20~30	50~70	650	8.0	1.2	1.4	200	
		RDA			RDA	RDA	RDA	RDA	RDA	
	60			800	9.5	1.5	1.7	240		

EAR: 推定平均必要量 RDA: 推奨量 DG: 目標量

表 4 PKU 1例のたんぱく質および Phe 摂取量

	たんぱく質 (g)	(g/kg)	ミルク中たんぱく (g)	Phe (mg)	(mg/kg)
21	63.2	1.2	59.2	274	5.2
22	64.5	1.4	59.2	101	2.2

表 5 PKU 1例のエネルギーおよび主な栄養素摂取量

年度	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (%E)	炭水化物 (%E)	Ca (mg)	Fe (mg)	B ₁ (mg)	B ₂ (mg)	葉酸 (μg)
21	1304	63.2	21.8	58.4	1058	15.2	0.44	0.64	100
22	1332	64.5	18.3	63.1	1045	15.0	0.41	0.64	161
(うちミルク*)	610	59.2	—	—	984	14.4	0.32	0.55	92.4
基準 (30~49歳)		EAR	DG	DG	EAR	EAR	EAR	EAR	EAR
		40	20~25%	50~70%	550	9.0	0.9	1.0	200
		RDA			RDA	RDA	RDA	RDA	RDA
	50			650	11.0	1.1	1.2	240	

*ミルク重量の内訳: 雪印新フェニルアラニン除去ミルク90g+低フェニルアラニンペプチド粉末30g

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

日本人 MCAD 欠損症例で同定された変異酵素の残存活性評価

研究要旨

タンデムマス新生児スクリーニング実施地域拡大に伴い、最重要対象疾患である中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症の発見例が増加している。我々は国内症例の半数以上を酵素診断し、罹患者に多様な遺伝子変異を同定してきた。これらの変異の発現系による活性評価を行ったところ、残存活性がほとんど失われるもの、正常に近い活性を示すもの、中間レベルのものに大別された。これらの組み合わせによって、急性発症リスクは症例毎に大きく異なることが推測され、発見例を適切にフォローするための情報として重要と考えられた。

研究協力者

但馬 剛 (広島大学大学院小児科学助教)
原 圭一 (広島大学大学院小児科学大学院生)
津村弥来 (広島大学大学院小児科学大学院生)
宇都宮朱里 (広島大学大学院小児科学大学院生)
岡田 賢

(Laboratory of Human Genetics of
Infectious Diseases,
The Rockefeller University)

佐倉伸夫 (重症心身障害児施設鈴が峰病院長)
阪本直美 (広島市医師会臨床検査センター)
中常千代美 (広島市医師会臨床検査センター)
吉井千代子 (広島市医師会臨床検査センター)
濱川以行 (広島市医師会臨床検査センター)

A. 研究目的

国内ですでに 20 例以上の MCAD 欠損症例が発見され、多様な遺伝子変異が同定されている。我々の酵素診断実績では、既発症例は総じて残存活性が非常に低く、新生児スクリーニング例ではかなり高い活性値まで広がり大きい。各症例の生化学的重症度に応じた適切なフォローのため、各変異および欧米の高頻度変異 (985A>G) の発現系を作成して活性評価を行い、急性発症リスクの層別化を試みた。

B. 研究方法

検討対象：血中 C8- カルニチンが高値で、当科でリンパ球中の酵素活性を測定して低下を認めた 18 症例。内訳：タンデムマス新生児スクリーニング発見 9 例 (表 1)、発症後精査等 9 例 (表 2)。

野生型 MCAD の発現ベクターは、プラスミド pcDNA 3.1 に予め myc His タグを組み込んでおき、これによって C 末端がラベルされた酵素タンパクが得られるように作成した。これを基に、日本人 MCAD 欠損症例の遺伝子変異および 985A>G 変異について、PCR-based mutagenesis によって発現ベクターを作成した。各発現ベクターを HEK 293 細胞に遺伝子導入して培養後、細胞破碎液中の酵素活性を測定し、野生型 MCAD の活性値に対する相対活性を算出した。

(倫理面への配慮)

タンデムマス新生児スクリーニング試験研究および対象疾患 (MCAD 欠損症を含む) 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取得している。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、同意書取得後に実施している。今回の検討はこれらの実績から得られた情報に基づいて実施した。

C. 研究結果

985A>G (K329E) 変異酵素の相対活性値は約20%であった。日本人症例の各変異酵素の活性値は以下のような分布となった。

- (1) 低活性群 (5% 未満) :
449-452delCTGA (T150fsX3) , 843A>T (R281S) , 1085G>A (G362E)
- (2) 中間群 (50% 前後) : 50G>A (R17H)
- (3) 高活性群 (80% 以上)
157C>T (R53C) , 1247T>C (I416T)

D. 考察

白人症例の大半は985A>G変異のホモ接合体で、この群は生後の環境次第で発症を免れる例もあるが、誘因があれば急性発症するリスクは明らかである。我々が示した相対活性約20%という値は、従来の報告に合致しており、これと同等以下の変異のホモ接合体ないし複合ヘテロ接合体は、現実に急性発症しうるリスクがあると評価してよいであろう。日本人例で頻度の高い449-452delCTGA変異は活性をほぼ喪失するため、少なくともひとつのアレルにこの変異を有する個体は、他方のアレルの変異が比較的軽度な活性障害に留まるものであっても、in vivoの活性値はかなり低くなることが推測される。

一方、我々の測定では、449-452delCTGA変異のヘテロ保因者のリンパ球中酵素活性は30～40%程度であった。これと同程度以上の酵素活性が残っている個体が急性発症することはあるのだろうか？乳幼児期を中心に、異化亢進状態を放置しないように注意を怠らない方がよいとしても、危険の程度に合わせた説明内容の調整が必要であろう。リンパ球での酵素活性測定例のうち、同定された両アレルの変異酵素を発現系で検討できた症例の結果を比較した限りでは、矛盾のない傾向となっている(表3)。血中C8-カルニチンが軽度高値で未知の1塩基置換が検出された場合など、遺伝子解析結果が独り歩きするのは過大評価に陥りやすいと考えられる。

E. 結論

我が国のタンデムマス新生児スクリーニングをより有益なものとしていく一助として、我々は引き続き、日本人MCAD欠損症例について、酵素活性に関する情報を備えた変異データベースの構築を進めたい。

F. 健康危険情報

有機溶媒の使用する操作があり(DNA抽出時のフェノール、酵素活性測定時のアセトニトリル)、換気装置を備えた実験室で行っている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirao K, Okada S, Tajima G, Tsumura M, Hara K, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M: Molecular pathogenesis of a novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 127 (6) : 619-628, 2010.
- 2) 但馬剛, 佐倉伸夫, 津村弥来, 宇都宮朱里, 原圭一, 白尾謙一郎, 岡田賢, 西村裕, 小野浩明, 中常千代美, 渡川美弥子, 吉井千代子, 濱川以行, 畑郁江, 重松陽介: 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. *日本マス・スクリーニング学会誌* 20 (3) : 217-222, 2010.
- 3) 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. *日本先天代謝異常学会雑誌* 26 (1) : 43-49, 2010.
- 4) 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. 学会発表

- 1) 但馬剛, 佐倉伸夫: MCAD欠損症(脂肪酸代謝異常症). 第27回日本小児肝臓研究会, シンポ

ジウム「先天代謝異常症と小児肝疾患」. 千葉市, 日本先天代謝異常学会. 大阪市, 2010年10月
2010年7月

2) 原圭一, 但馬剛, 白尾謙一郎, 佐倉伸夫, 畑郁江, H. 知的財産権の出願・登録状況
重松陽介: 当科で診断した中鎖アシル CoA 脱水 なし
素酵素 (MCAD) 欠損症例について. 第 52 回

表 1. タンデムマス新生児スクリーニング発見症例の酵素診断・遺伝子診断結果

症例	リンパ球中 酵素活性 (%)	新生児濾紙血中 C8- カルニチン (μM)	<i>ACADM</i> 遺伝子変異 (1)	<i>ACADM</i> 遺伝子変異 (2)
A	感度以下	5.53	843 A>T	IVS3+2 T>C
B	感度以下	(データ提供なし)	解析予定	解析予定
C	2.6	5.92	未同定	未同定
D	10.7	0.56	50 G>A	1085 G>A
E	13.2	0.43	50 G>A	449-452 delCTGA
F	18.1	(データ提供なし)	同定済み (データ提供なし)	
G	22.6	0.64	653 C>G	未同定
H	31.6	1.33	449-452 delCTGA*	830 A>C*
I	46.0	0.33	解析予定	解析予定

* 特殊ミルク情報, 2009 に掲載されたデータを転載。

表 2. 発症後精査症例等の酵素診断・遺伝子診断結果

症例	リンパ球中 酵素活性 (%)	臨床症状など	<i>ACADM</i> 遺伝子変異 (1)	<i>ACADM</i> 遺伝子変異 (2)
a	感度以下	低血糖症	449-452 delCTGA	449-452 delCTGA
b	感度以下	低血糖症	449-452 delCTGA*	449-452 delCTGA*
c	感度以下	急性脳症	Del exon 11-12*	Del exon 11-12*
d	感度以下	低血糖症	同定済み (データ提供なし)	
e	2.2	症例 f の未発症同胞	大欠失 *	大欠失 *
f	3.0	低血糖症	大欠失 *	大欠失 *
g	3.3	(情報提供なし)	解析予定	解析予定
h	10.3	ALTE	157 C>T	449-452 delCTGA
i	47.5	嘔吐	50 G>A	1247 C>T

* 特殊ミルク情報, 2009 に掲載されたデータを転載。

表 3. 患者リンパ球中の活性値と発現系での変異酵素の活性値の比較

症例	リンパ球 活性 (%)	<i>ACADM</i> 遺伝子変異 (1)	活性 レベル	<i>ACADM</i> 遺伝子変異 (1)	活性 レベル
D	10.7	50 G>A	中	1085 G>A	低
E	13.2	50 G>A	中	449-452 delCTGA	低
a, b	感度以下	449-452 delCTGA	低	449-452 delCTGA	低
h	10.3	157 C>T	高	449-452 delCTGA	低
i	47.5	50 G>A	中	1247 C>T	高

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

タイ人イソ吉草酸尿症の遺伝子診断

研究要旨

イソ吉草酸尿症 (IVA) は GC/MS により診断された最初の先天性有機酸代謝異常症として記念碑的な疾患である。C5 を指標としてタンデムマスでのスクリーニングが可能である。欧米ではスクリーニング例において軽症型のコモン変異が報告されている。昨年度、研究協力者は日本人症例 3 例について遺伝子解析を実施した。本年度はタイ人症 5 例について遺伝子解析を実施した。変異 10 アレルをすべて検出し、そのうち 6 アレルで c.457-3_2CA>GG が共通していた。

研究協力者

坂本 修 (東北大学病院小児科講師)

A. 研究目的

イソ吉草酸尿症 (IVA) は GC/MS により診断された最初の先天性有機酸代謝異常症として記念碑的な疾患である。分岐鎖アミノ酸であるロイシンの第 3 段階の酵素であり、イソバレリル-CoA を 3-メチルクロトニル-CoA に変換するイソバレリル-CoA 脱水素酵素 (IVD) の先天的異常によって生じる。C5 を指標としてタンデムマスでのスクリーニングが可能であり、欧米ではスクリーニング例において軽症型のコモン変異が報告されている (Am J Hum Genet 75:1136, 2004)。

昨年度、研究協力者は日本人症例 3 例について遺伝子解析を実施し、6 種の変異を検出した。

今後、症例を増やし、日本人患者における表現型・遺伝子型の関連の有無の検討、アジア諸国の患者間での変異の異同の検討を予定している。本年度はタイ人症例 5 例における遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

1) 対象

症例 1：生後 7 日で発症。重度の精神発達遅滞。

症例 2：生後 14 日で発症。中等度の精神発達

遅滞。

症例 3：生後 3 日で発症。精神発達正常。

症例 4：生後 7 日で発症。敗血症で 3 ヶ月時に死亡

症例 5：生後 12 ヶ月で発症。重度の精神発達遅滞。

2) 方法

IVD 遺伝子の翻訳領域をダイレクトシーケンシング法で解析した。

C. 研究結果

全例で 2 つの塩基置換で検出された。

症例 1：

c.457-3_2CA>GG/c.1199A>G (p.Y371C)

症例 2：

c.457-3_2CA>GG/c.281C>G (p.A65G)

症例 3：

c.457-3_2CA>GG/c.457-3_2CA>GG

症例 4：

c.457-3_2CA>GG/c.358G>A (p.G91R)

症例 5：

c.457-3_2CA>GG/c.827T>C (p.L247P)

D. 考察

5 例において 10 種の変異を検出した。このうち c.281C>G (p.A65G)、c.358G>A (p.G91R) は新規の