

分担研究報告3)  
日本人症例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

分担研究者： 高柳 正樹（千葉県こども病院 副院長）

### 研究要旨

2010年11月から千葉県下において全県的に拡大新生児マススクリーニングを開始した。「新しい検査法による新生児マススクリーニング試験研究事業千葉県委員会」を立ち上げ、事業については千葉県新生児マススクリーニング連絡協議会の承認を得た。血液濾紙の転用については、千葉県および千葉市の承認を得た。追加検査項目は有機酸8項目、脂肪酸8項目、尿素サイクル2項目である。1年間の検査総数は5万件を考えている。

### 分担研究者

高柳正樹（千葉県こども病院・副院長）

#### A. 研究目的

今回は日本人では一番発症頻度の高い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（CPTII）について、その臨床像を検討することにより日本におけるCPTII欠損症の実態を検討する。

#### B. 研究方法

対象：これまでわれわれが診断、治療に関与した、17家系20症例のCPTII欠損症を対象とした。

CPTII酵素活性測定：酵素活性：酵素活性は線維芽細胞、末梢リンパ球、リンパ芽球様細胞、筋肉、肝臓を酵素試料として、Demaugreらの方法に準じて測定した。

CPTII遺伝子変異の検討：遺伝子解析の方法はYamamotoらの報告した方法に準じて行った。

（倫理面への配慮）

個人の氏名や誕生日はすべて秘匿し、個人が特定されないようにした。

#### C. 研究結果

症例：臨床症状が出現し、その後のハイリスクスク

リーニングにて発見された症例は16症例、家族内検索にて発見された症例は3例、マススクリーニングで発見された症例は1例である。

この20例全症例の性別、発症年齢、臨床症状、酵素活性、MS/MSによるアシルカルニチン分析の結果をまとめて表に示した。

臨床症状：今回の検討では全身型は11例で全症例小児例であった。筋型は5例であり、うち成人例が4症例、小児例が1症例であった。発症年齢は全身型の最小年齢は6ヶ月であった。筋型の発症は学童期にも見られた。

男女比は確認できた症例では男子9例、女子7例であった。

今回検討した症例中死亡例は2例であった。しかし家系内検索でライ様症候群の診断名で死亡している兄弟が認められた家系が2家系あった。

CPTII酵素活性：酵素活性はそれぞれの病型で広く分布しており、酵素活性に全身型と筋型の間に統計的な有意差はなかった。

マススクリーニングで発見された症例は、活性は正常対照の17.7%であった。

遺伝子検索：遺伝子変異のうちいくつかはすでに報告している<sup>2) 3)</sup>が、そのほかの検索結果の詳細は別報で報告する予定である。今回報告した17家系中5

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

家系で両方のアレルの変異が同定されており、そのほかの5家系で片側のみのアレルの遺伝子変異が確認されている。

#### D. 考察

今回集計した17家系において、患者自身を含めるとライ症候群、インフルエンザ脳症という診断で死亡している者がいる家系が4家系あることが判明した。CPTII欠損症は診断がつかず、適切な治療がなされないと死亡に至る疾患であることが再確認された。

今回全身型と筋型と残存酵素活性値に統計学的な差異を認めなかった。測定試料が肝臓、線維芽細胞、リンパ芽球様細胞など5種類と多く、今回の検討だけでは臨床病型と残存酵素活性との関連を明確にする事は難しいと思われた。筋型の成人例1例は兄がライ様症候群で死亡しており、本人も小児期に低血糖の発症を確認されている。全身型と筋型とに明確に分類できない症例が存在することも重要な知見と思われた。

今回の調査からもCPTII欠損症は死に至る疾患であり、診断がつけば予後の比較的良好の疾患であることが判明した。CPTII欠損症の予後の改善に対するマススクリーニングの効果は大きいと考えられた。

#### E. 結論

日本人においても年長から17家系内にCPTII欠損症によると考えられる死亡症例を有する家系が4家系も確認できた。診断のついた症例の予後は良好で

ある。このことからCPTII欠損症を新生児マススクリーニングにて発見することは意義のありことと思われる。

スクリーニング発見患者の治療管理法、さらに治療予後については今後さらに十分な検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

高柳正樹, 山本重則, 小川恵美, 小川真司, 金澤正樹, 阿部博紀, 大竹明. 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: 43-49, 2008

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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）  
研究分担報告書

症例番号	家系	発症年齢	性別	臨床症状	酵素活性	測定検体	MS/MS
1	A	11M	M	肝機能障害 低血糖 痙攣	18.0%	線維芽細胞	異常
2	B		M	ライ様症候群死亡	4.3%	肝臓	異常
3	B	新生児	M	家族内検索、症例2の弟	36.0%	末梢リンパ球	
4	C	9M	F	肝機能障害 低血糖 高アンモニア血症	3.6%	リンパ芽球	不明
5	C	6M	M	低血糖	3.0%	リンパ芽球	不明
6	D		F	肝機能障害 低血糖 意識障害	57.0%	リンパ芽球	異常
7	E		F	肝機能障害 低血糖 痙攣	36.0%	線維芽細胞	不明
8	F	1M	F	家族内検索、兄2名ライ様症候群で死亡	5.6%	リンパ芽球	異常
9	G		F	白血病 低血糖	20.0%	線維芽細胞	異常
10	H			インフルエンザ感染後、痙攣、多臓器不全、死亡	15.0%	肝臓	異常
11	I		M	肝機能障害 低血糖 痙攣	11.7%	末梢リンパ球	異常
12	J	5Y	M	嘔吐頻回 知能発達遅延	30.0%	リンパ芽球	異常
13	K	1Y2M	F	意識障害、痙攣、低血糖、肝障害、高アンモニア血症	15%	線維芽細胞	異常
14	L	成人	F	横紋筋融解	46.0%	線維芽細胞	
15	M	19Y	F	横紋筋融解、兄ライ症候群にて死亡、本人低血糖の既	6.2%	筋肉	異常
16	N	成人	M	横紋筋融解	37.0%	筋肉	
17	O	24Y	M	横紋筋融解	4.8%	リンパ芽球	異常
18	O	22Y	M	家族内検索、症例18の弟	未測定		
19	P	学童		横紋筋融解	33.0%	筋肉	
20	Q	1M		新生児マススクリーニングにて発見	17.7%	リンパ芽球	異常

CPTII 欠損症17家系20症例の一覧表

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

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：長谷川有紀 島根大学医学部小児科助教

### 研究要旨

極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症は、長鎖脂肪酸代謝異常症の中でも報告例の多い疾患である。酵素活性低下の重症度によって、1）新生児型：新生児期～乳児期早期に心筋症や重度の低血糖を発症し死亡率の高い群、2）中間型：乳幼児期に感染などのストレス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、および3）骨格筋型：一般に幼児期以降に反復する横紋筋融解症などの骨格筋症状で発症する群の3つに分類される。このうち骨格筋型は成人期のミオパチーの原因としても重要である。

今回、島根大学小児科で VLCAD 欠損症と診断した症例と、既報告症例とを検討し、我が国における VLCAD 欠損症の特徴を検討した。島根大学小児科で診断された症例は計 11 例で、うち新生児マススクリーニングで発見された未発症例が 2 例あった。発症例の重症度内訳は新生児型が 2 例、中間型が 1 例、骨格筋型 6 例であった。既報告例は計 20 例あり、これらはすべて発症例であった。重症度は新生児型が 1 例、中間型が 2 例、骨格筋型 17 例で、いずれも骨格筋型の占める割合が多かった。

新生児型の予後は不良であったが、中間型や骨格筋型は発症時早期の十分な糖の補充やカルニチン内服、および飢餓時間を作らないようにするなどの治療によって、知的・生命予後は良好であった。新生児期のタンデムマススクリーニングにより、発症前に VLCAD 欠損症を診断することは、発症・障害予防につながる事が強く示唆される。

### A. 研究目的

脂肪酸代謝異常症（FAOD）は近年、タンデムマスによるアシルカルニチン分析によって発見症例は増加傾向にある。特に極長鎖アシル 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は、若年者における横紋筋融解症の原因疾患としても注目されている。長期脂肪酸代謝異常患者の治療指針を策定する上で、今回、我々はこれまでに診断された VLCAD 欠損症患者に注目し、自然歴など我が国での特徴を明らかにすることとした。

### B. 研究方法

#### 1) 島根大学で診断された VLCAD 欠損症例の検討

島根大学小児科でタンデムマスが開始された 2003 年 5 月から 2010 年 12 月末までにアシルカルニチン分析によって、VLCAD 欠損症が疑われ、最終的に確定診断がなされた症例について、自然歴や予後を検討した。

#### 2) 既報告の VLCAD 欠損症例の検討

論文などですでに VLCAD 欠損症と診断された症

例について、自然歴や予後について検討した。

なおいずれも研究対象となった患者に対しては、主治医を通じ、今回の自然歴や予後に関する調査目的と個人情報の保護についてインフォームド・コンセントを行い、研究参加への了承を得た。

### C. 研究結果

#### 1) 島根大学で診断された VLCAD 欠損症例の検討 (図 1)

症例は計 11 例であった。うち新生児型は 2 例、中間型が 1 例、骨格筋型は 6 例で、残る 2 例は新生児期にタンデムマススクリーニングで診断され、現在まで未発症の症例であった。

発症例のうち、家族歴で異常があったものは 3 例であった。発症年齢は新生児型が乳児期早期、中間型は幼児期と、海外での報告例とほぼ同じであったが、骨格筋型は思春期・成人例は 2 例のみで、他の 4 例は就学前までに発症していた。臨床症状では、ア) 新生児型の 2 例では、いずれも心筋症と急性脳症様の症状がみられたこと、イ) 中間型の 1 例は急性脳症様の発症で、重度の低血糖とともに肝腫大を認めたこと、ウ) 骨格筋型の 6 例では、全例が強い筋肉痛や横紋筋融解症を認めたが、低血糖や肝腫大はみられないこと、がそれぞれに特徴的であった。予後は新生児型の 2 例はいずれも発症後数カ月以内に死亡したが、中間型と骨格筋型の症例はいずれも治療によって生存していた。中間型の症例は、成長とともに低血糖症状がみられなくなり、骨格筋型の症状に移行していた。いずれも生命予後は正常であった。

<図 1>

Case No.	Age at onset	Phenotype	Family history	Clinical findings					Outcome
				Cardiomyopathy	Hepatomegaly	Hypoglycemia	Acute encephalopathy	Myalgia/Rhabdomyolysis	
1	2m	severe	+	+	+	+	+	+	Dead (8m)
2	4m	severe	-	+	-	-	-	-	Dead (5m)
3	1y4m	intermediate	+	-	+	+	+	-	Alive
4	1y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
5	2y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
6	2y10m	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
7	5y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
8	10y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
9	20ys	myopathic	+	-	-	-	-	+	Alive
10	(5d)	(no symptom)	-	-	-	-	-	-	Alive
11	(5d)	(no symptom)	-	-	-	-	-	-	Alive

#### 2) 既報告の VLCAD 欠損症例の検討 (図 2)

症例は計 20 例であった。全てが発症例で、新生児型は 1 例、中間型が 2 例、骨格筋型 17 例と、骨格筋型が多かった。

家族歴に異常があった症例は 5 例であった。発症年齢は新生児型が出生直後で、中間型は幼児期であった。骨格筋型では就学前発症が 3 例あり、うち 1 例は乳児期に発症していた。学童発症例は 10 例、思春期以降が 4 例であった。臨床症状では、ア) 新生児型と中間型の 3 例の全例が肝腫大を呈しており、2 例で心筋症と重度の低血糖が認められたこと、イ) 骨格筋型の全例で、島根大学の症例と同様、強い筋肉痛や横紋筋融解症を認め、低血糖や肝腫大などはみられなかったこと、が明らかとなった。また予後についても、島根大学での症例と同様に、新生児発症型の 1 例は死亡したが、中間型・骨格筋型の症例

Case No.	Age at onset	Phenotype	Family history	Clinical findings					Outcome
				Cardiomyopathy	Hepatomegaly	Hypoglycemia	Acute encephalopathy	Myalgia/Rhabdomyolysis	
12	day 1	severe	-	+	+	+	+	-	Dead (1m)
13	1y5m	intermediate	-	-	+	-	+	-	Alive
14	4y9m	intermediate	-	+	+	+	-	-	Alive
15	9m	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
16	3y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
17	3y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
18	8y	myopathic	+	-	-	-	-	+	Alive
19	10y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
20	10y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
21	10y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
22	13y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
23	13y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
24	13y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
25	13y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
26	14y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive
27	14y	myopathic	+	-	-	-	-	+	Alive
28	16y	myopathic	+	-	-	-	-	+	Alive
29	16y	myopathic	+	-	-	-	-	+	Alive
30	20y	myopathic	+	-	-	-	-	+	Alive
31	29y	myopathic	-	-	-	-	-	+	Alive

### D. 考察と結論

脂肪酸代謝異常症は稀な疾患と考えられてきたが、タンデムマスによるアシルカルニチン分析が普及するにつれて、徐々に報告例が増加している。中でも

VLCAD 欠損症は小児のみならず、成人におけるミオパチーや反復性横紋筋融解症の原因の一つである。しかし、我が国での本疾患の特徴などはまだ不明な点が多い。

今回の研究で検討された VLCAD 欠損症患者はあわせて 31 例で、発症後に診断された症例は 29 例、スクリーニング発見群は 2 例であった。発症例の臨床病型は、新生児型が 3/29 例（10%）、中間型 3 例（10%）、骨格筋型が 23 例（79%）であった。これは海外の報告に比べて、非常に骨格筋型の割合が高かった。この背景としては、骨格筋型で多くを占める miss sense mutation において、我が国で同定される変異が欧米で報告される高頻度変異（c.848T>C）と異なっていること、また複数の高頻度変異（c.790A>G: 23 症例中 12allele, c.1144A>C: 6 allele, c.1246G>A: 4 allele）がみられることなど、人種特異的な差異があるものと考えられた。

臨床症状の特徴として、新生児型は全例が心筋症を呈しており、乳児期に全て死亡していた。中間型は重度の低血糖や急性脳症様の症状で発症しており、全例で肝腫大を認めていた。これは脂肪酸代謝が障害されて、脂肪滴が急激に細胞内に蓄積することにより引き起こされる脂肪肝の為と考えられる。ブドウ糖輸液により早期に肝腫大は改善しており、この急激な肝腫大の変化は脂肪酸代謝異常の鑑別の一つとして重要と考える。生命予後は良好であったが、重度の低血糖により後遺症を残す症例も認められた。

また骨格筋型は、海外の報告と比較して発症年齢が低い傾向にあり、就学前の発症例が 7/23 例（30%）、学童期が 11 例（48%）で、乳児期の発症例も 1 例認められた。これも臨床病型の割合の違いと同様、人種差があると思われた。しかし、発症が低年齢であっても診断されたのは成人期以降の症例が多かった。このために適切な治療・指導が行われずに横紋筋融解症を頻回に繰り返した症例もあり、生命予後は良好であっても、筋力低下や強い筋肉痛などで日常生活に支障を抱えている症例があった。

これらの症例とは対照的に、スクリーニング発見

例の 2 例は、生活上の指導やカルニチン投与、発症時の十分なブドウ糖補給などにより、現在までほぼ健常発達が可能であった。

以上より、新生児期のタンデムマススクリーニングにより、発症前に VLCAD 欠損症を診断することは、発症・障害予防につながるものが強く示唆された。長期フォローアップシステム体制の構築によって、発症後診断群と発症前診断群との予後の違いがいつそう明らかになると期待される。また、成人領域ではまだこれらの長鎖脂肪酸代謝異常症が広く知られているとは言えず、診断されていない症例も多いものと予測する。患者数把握のためには、小児のみならず、成人を対象とした原因不明のミオパチーなどを十分に検索する必要がある。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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. *Journal of Chromatography B* 878: 1673-1676, 2010
- 3) 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. *The Tohoku Journal of*

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

- Experimental Medicine 221(3): 191-195, 2010
- 4) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat Stress Deteriorates Mitochondrial  $\beta$ -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Disorders. Journal of Chromatography B 878(20): 1669-1672, 2010
- 5) 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
- 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
- 3) 川口剛史, 松井克之, 西尾友宏, 古川央樹, 吉岡誠一郎, 柳貴英, 越田繁樹, 丸尾良浩, 長谷川有紀, 竹内義博: 脳嚢胞を伴う極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症 (VLCAD) の一例. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月
- 4) 李知子, 八木麻理子, 栗野宏之, 辻雅弘, 但馬剛, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 竹島泰弘, 松尾雅文: 乳児期より筋痛を繰り返し、横紋筋融解症を契機に診断に至った三頭酵素欠損症の一例. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) Yamaguchi S: Expanded newborn screening
- F. 知的財産権の取得・登録状況  
特になし

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

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

VLCAD 欠損症と CPT-2 欠損症の確定診断：実績と課題

研究要旨

タンデム質量分析法による VLCAD 欠損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、HPLC を用いた酵素活性測定を継続した。今年度は新生児スクリーニング陽性 3 例中 3 例と有症状精査 4 例中 1 例を罹患と診断した。遺伝子解析では昨年度に続いて今年度もアミノ酸置換を伴わない 1 塩基置換が見出され、今年度のものについてはスプライシング異常を示唆する所見が得られている。

今年度は有症状精査で CPT-2 欠損症が疑われた 2 例の遺伝子解析も実施し、いずれも複合ヘテロ変異が見出されたが、1 例は新規変異の組み合わせとなっており、病因性の確認のために本疾患についても簡便な酵素診断法の実用化に取り組む方針である。また、1 例は広島県の新生児スクリーニングで見逃されており、指標の改善や採血時期変更などの課題についても検討が必要である。

研究協力者

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

極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）  
欠損症の国内実態把握のため、タンデム質

量分析法（以下タンデムマス）によるスクリーニング検査における陽性例の確定検査として、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を用いたリンパ球中の酵素活性測定と遺伝子解析の実施を継続した。また、広島県でカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-2（CPT-2）欠損症が疑われる新規症例が生じたことに対応して、CPT-2 遺伝子解析の実施体制を整え、臨床症例への応用を試みた。

B. 研究方法

1) 酵素活性測定（VLCAD）

国内の血中 C14:1-アシルカルニチン陽性例について、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（VLCAD, CPT-2）

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) VLCAD 欠損症の診断実績 (表 1, 2)

2009 年度までに新生児スクリーニング陽性 2 例と有症状精査 24 例の診断依頼があり、前者は 2 例とも罹患と判定された。後者のうち酵素活性低下を認めたのは 9 例で、13 例は除外診断され、一卵性双胎の 2 例はヘテロ保因者と考えられた。

2010 年度は新生児スクリーニング陽性 3 例と有症状精査 4 例の診断依頼があり、前者 3 例と後者のうち 1 例を罹患と診断した。新生児のうち 1 例は、片方のアレルにアミノ酸置換を起こさない 1 塩基置換 852G>A (V284V) が検出され、mRNA の解析からスプライシング変異と考えられた。また、有症状精査で酵素活性低下を認めた 1 例では、新生児期発症の最重症型症例でホモ接合性に見られたものと同じ 1332G>A (K444K) が 1 アレルに同定された。これについても mRNA の解析を進めている。

### 2) CPT-2 欠損症の診断実績 (表 3)

広島県で生後 7 か月の男児が急性脳症を発症し、低ケトン性低血糖症・高アンモニア血症が認められたため、脂肪酸代謝異常症が強く示唆された。急性期血清のタンデムマス分析で C16, C18-アシルカルニチンの上昇が見られたことから、CPT-2 欠損症もしくはカルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ欠損症が疑われた。国内頻度を考慮して CPT-2 遺伝子を解析した結果、既報の変異の複合ヘテロ接合体と判明した。本例は広島県のタンデムマス新生児スクリーニングで正常と判定されており、脂肪酸代謝異常症の新生児スクリーニ

ングで国内最初の偽陰性例となった。

その後、県外から骨格筋症状を繰り返す幼児の CPT-2 欠損症疑い例の解析依頼があり、新規変異の複合ヘテロ接合体と判定された。なお、両症例とも酵素活性は測定できていない。

## D. 考察と結論

タンデムマス新生児スクリーニング実施地域の拡大に伴い、VLCAD 欠損症の発見例も増加傾向を示している。酵素活性測定結果からは、これまでのところ偽陽性例はないが、遺伝子解析ではアミノ酸置換のないスプライシング変異と考えられる 1 塩基置換が見出された。昨年度も新生児期発症の重症例で同様の 1 塩基置換がホモ接合性に見られており (表 1)、酵素診断所見がなければ病因性の変異と評価するのは難しかったかも知れない。一方、有症状精査例では酵素活性が正常で罹患が否定される例が今年度も相次いでおり、我々の HPLC 酵素診断法は、タンデムマス陽性後の精査において、1st line の確定検査として有用と考えられた。

タンデムマス新生児スクリーニングでは長鎖脂肪酸代謝異常症を見逃す危険性が既に指摘されているが、今年度は我々の広島県において、国内最初の実例に遭遇することとなった。本例は周産期・生後経過とも何ら異常なく、生後早期の良好な哺乳によって日齢 5 には異常所見がマスクされてしまったものと推測される。初期診療の担当医が血液ガス・血糖・ケトン体・アンモニアなどのチェックを怠らなかった結果、典型的な異常値パターンから急性期保存血清によるタンデムマス再検へつながったが、診断が見逃されている類似症例も発生しているものと考えなくてはならない。本例は最重度障害を遺残して救命されたが、7 か月の急性発症まで発育良好であり、発症前診断されていたならば、このような急性発症は防げたはずの症例である。その後、本例の新生児スクリーニング結果を参考にして、陽性基準の見直しが行われたが、根本的には採血時期を日齢 3 と日齢 5 の 2 回にするなどの改善策が必要である。

確定検査として現在は遺伝子解析だけを行っているが、2例目では新規変異が同定されており、やはり病因性の確認には酵素活性測定が重要である。国内では放射性同位体標識基質を用いた方法ですでに多数の診断実績があるが、我々としては VLCAD と同様の HPLC を用いる方法を今後実用化して、CPT-2 欠損症の診断体制をより充実させたいと考えている。

## E. 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.

### 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, 2010年7月
- 2) 原圭一, 但馬剛, 白尾謙一郎, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介: 当科で診断した中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症例について. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪市, 2010年10月

## F. 知的財産権の出願・登録状況

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：2009 年度までの実績

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	11.9	709T>C (C237R)	1532A>G (R511Q)
新生児スクリーニング陽性	11.2	779C>T (T258M)	997insT
新生児発症 (低血糖症・心停止)	0.8	1332G>A (K444K) homo スプライス変異?	
低血糖症 骨格筋症状	5.1	(他施設で複合ヘテロ変異を同定済み)	
骨格筋症状	6.0	995insT	1639C>T (V547M)
骨格筋症状	9.1	520G>A (V174M)	1349G>A (R450H)
骨格筋症状	6.5	696C>G (P266A)	1153C>T (R385W)
他の骨格筋型 4 例	6.2 ~ 24.2	未解析	
**新生児発症 (低血糖症・心停止)	61.9	1076C>T (A359V) hetero	
**新生児発症 (低血糖症)	79.1	1076C>T (A359V) hetero	
低血糖症 11 例 + 他 2 例	46.9 ~ 141.4	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。

\*\* 双胎例

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：2010 年度の新規症例

被験者	残存活性 (%)*	遺伝子解析結果	
0m, M 新生児スクリーニング陽性	4.8	708delCT	1246G>A (A416T)
0m, M 新生児スクリーニング陽性	6.3	852G>A (V284V) スプライス変異?	1434G>A (M478I)
0m, M 新生児スクリーニング陽性	3.8	1793A>G (H598R)	1808G>C (C603S)
25y, F 骨格筋症状	感度以下	1332G>A (K444K)	1349G>A (R450H)
11m, M 低血糖発作 (初回) ケトーシス (+)	59.0		未解析
6y, M 低血糖症反復 代謝性アシドーシス (+)	81.7		未解析
3y, M 嘔吐発作反復 低血糖なし, ケトーシス (+)	112.3		未解析

\* 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 3. CPT-2 欠損症疑い例の遺伝子診断

被験者	遺伝子解析結果	
7m, M 急性脳症 低ケトン性低血糖症 (+) 高アンモニア血症 (+)	481C>T (R161W)	1102G>A (V368I)
2y, F 骨格筋症状	647A>G (Q216R)	G551D (1652G>A)

### 〔III〕 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行成果一覧表

書籍

なし

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
Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kure S, Matsubara Y.	Non-Hodgkin lymphoma in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome.	J Pediatr Hematol Oncol	In press	In press	2011
Komaki H, Nishigaki Y, Fuku N, Hosoya H, Murayama K, Ohtake A, Goto YI, Wakamoto H, Koga Y, Tanaka M.	Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency.	Biochim Biophys Acta (General Subjects)	1800(3)	313-315	2010
Sadakata R, Hatamochi A, Kodama K, Kaga A, Yamaguchi T, Soma T, Usui Y, Nagata M, Ohtake A, Hagiwara K, Kanazawa M.	Ehlers-Danlos syndrome type IV, vascular type, which demonstrated a novel point mutation in the <i>COL3A1</i> gene.	Intern Med	49(16)	1797-1800	2010

Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Miyazono K, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T, Katagiri T.	A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H.	Biochem Biophys Res Commun	407(1)	213-218	2011
Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, Ohtake A, Murayama K, Mori M, Miyata R, Hatai Y.	Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy.	Brain Dev	In press	In press	2011
Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y.	Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria.	Mol Genet Metab	In press	In press	2011
Nakano Y, Murayama K, Tsuruoka T, Aizawa M, Nagasaka H, Horie H, Ohtake A, Saitou K.	Fatal case of mitochondrial DNA depletion with severe asphyxia in a newborn.	Pediatr Int.	53(2)	240-242	2011

Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Wada M, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Hirayama S, Miida T, Fujimoto H, Mochizuki H, Hattori T, Okano Y.	Cross-sectional study of bone metabolism with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening.	J Bone Miner Metab	In press	In press	2011
Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S.	Cerebral hemorrhage in Fabry's disease.	J Hum Genet	55	259-261	2010
Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FW, Reuser AJJ, Okumiya T.	Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid alpha-glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots.	Mol. Genet. Metab	103	12-17	2011
Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, et al.	Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplement.	Tohoku J Exp Med.	221	191-5.	2010
Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, et al.	Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase 1 deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan.	Brain Dev.	Apr 2	[Epub ahead of print]	2009

Yasuno T, <u>Kaneoka H</u> , Tokuyasu T, et al.	Mutations of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) in Japanese patients with CPT II deficiency.	Clin Genet.	73	496-501.	2008
高柳正樹, 山本重則, 小川恵美, 小川真司, 金澤正樹, 阿部博紀, 大竹明	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	43-49	2008
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	942-948	2010
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
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	The Tohoku Journal of Experimental Medicine	221	191-195	2010
Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S	Heat Stress Deteriorates Mitochondrial $\beta$ -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid $\beta$ -Oxidation Disorders	Journal of Chromatography B	878	1669-1672	2010

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
Kenichiro Shirao, Satoshi Okada, Go Tajima, Miyuki Tsumura, Keiichi Hara, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Ikue Hata, Nobuo Sakura, Yosuke Shigematsu, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi	Molecular pathogenesis of a novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	Human Genetics	127 (6)	619-628	2010
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
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

[IV] 研究成果の刊行物・別刷

## Non-Hodgkin Lymphoma in a Patient With Cardiofaciocutaneous Syndrome

Akira Ohtake, MD, PhD,\* Yoko Aoki, MD, PhD,† Yuka Saito, MD,† Tetsuya Niihori, MD, PhD,†  
Atsushi Shibuya, MD, PhD,\* Shigeo Kure, MD, PhD,† and Yoichi Matsubara, MD†

**Summary:** Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome is a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome characterized by a distinctive facial appearance, ectodermal abnormalities, and heart defects. Clinically, it overlaps with both Noonan syndrome and Costello syndrome. Mutations in KRAS, BRAF, and MAP2K1/2 (MEK1/2) have been identified in patients with CFC syndrome. BRAF mutations are involved in more than 80% of CFC syndrome patients, and we have reported earlier that 2 CFC patients with BRAF mutations developed acute lymphoblastic leukemia. Here we report a boy with CFC syndrome who developed non-Hodgkin lymphoma. At 2 months of age, he developed pneumonia with pleurisy and was diagnosed as having non-Hodgkin lymphoma (precursor T-cell lymphoblastic lymphoma) by cytopathologic examination of the pleural fluid. He was suspected of having Noonan syndrome because of his facial appearance, webbed neck, and cubitus valgus. Precursor T-cell lymphoblastic lymphoma was treated by the TCCSG NHL 94-04 protocol. At 9 years of age, he was clinically reevaluated and diagnosed as having CFC syndrome because of his distinctive facial appearance, multiple nevi, and moderate mental retardation. Sequencing analysis showed a germline p.A246P (c.736G > C) mutation in BRAF reported earlier in CFC syndrome. Molecular diagnosis and careful observation should be considered in children with CFC syndrome.

**Key Words:** RAF, RAS-MAPK, non-Hodgkin lymphoma, cardiofaciocutaneous syndrome, Noonan syndrome, KRAS, BRAF, leukemia

(*J Pediatr Hematol Oncol* 2010;00:000–000)

Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome is a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome characterized by heart defects, facial dysmorphism, ectodermal abnormalities, and mental retardation.<sup>1,2</sup> Typical facial characteristics include a high forehead with bitemporal constriction, hypoplastic supraorbital ridges, downslanting palpebral fissures, a depressed nasal bridge, and posteriorly angulated ears with prominent helices. Affected individuals present with heart defects, including pulmonic stenosis, atrial septal defects, and hypertrophic cardiomyopathy. Ectodermal abnormalities including sparse, friable hair,

multiple nevi, and hyperkeratotic skin lesions are noted. CFC syndrome has many clinical features in common with those of Noonan syndrome and Costello syndrome. Of these 3 syndromes, Noonan syndrome is most frequent, its incidence is estimated to be 1 in 1000 to 1 in 2500 live births. Compared with the other 2 syndromes, Noonan syndrome has lower frequencies of mental retardation (24% to 35%), heart defects (50% to 67%), and skin abnormalities (2% to 27%),<sup>3</sup> whereas CFC patients show a high frequency of growth failure (78.9%), mental retardation (100%), heart defects (84.2%), and skin abnormalities (68.4%).<sup>2</sup> Costello syndrome is characterized by mental retardation, high birth weight, neonatal feeding problems, curly hair, redundant skin, nasal papillomata, and tumor predisposition. Wrinkled palms and soles, hyperpigmentation, and joint hyperextension, which have been commonly reported in Costello syndrome but not in CFC syndrome, have been observed in 30% to 40% of the mutation-positive CFC patients.<sup>4</sup> Thus, differential diagnosis of these syndromes is difficult because of their overlapping clinical manifestations.

Mutations in molecules in the RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway have been identified in these disorders: HRAS in Costello syndrome<sup>5</sup>; *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, and *NRAS* in Noonan syndrome<sup>6–12</sup>; and *KRAS*, *BRAF*, and *MAP2K1/2* in individuals with CFC syndrome.<sup>2,13</sup> Therefore, these syndromes are termed NCFC syndrome or RAS/MAPK syndromes.<sup>14,15</sup> Approximately 10% of patients with Costello syndrome have been shown to have malignant tumors, including neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, and bladder carcinoma. For Costello syndrome, tumor-screening protocols have been proposed.<sup>16</sup> In contrast, little attention has been paid to the development of tumors in patients with CFC syndrome.

Herein we report a Japanese patient with CFC syndrome who developed non-Hodgkin lymphoma (NHL) at 2 months of age. Although he had been suspected of having Noonan syndrome, reevaluation of the clinical manifestations and identification of a BRAF mutation led to a re-diagnosis of CFC syndrome. Our observations, together with a literature review of earlier patients, suggest the importance of the careful observation for malignancy in CFC syndrome.

### CASE REPORT

The proband was a 12-year-old Japanese boy. He was the first son of unrelated healthy parents. At birth, his father was 27 years old, as was his mother. The baby was delivered at 40 weeks by obstetrical vacuum extraction and its birth weight was 3488 g (+0.8 SD), length was 49.6 cm (+0.1 SD), and occipitofrontal circumference was 35 cm (+1.0 SD). At 2 months of age, coughing, rhinorrhea, and feeding difficulty were observed. He was admitted

Received for publication October 29, 2009; accepted February 19, 2010. From the \*Department of Pediatrics, Saitama Medical University, Moroyama, Saitama; and †Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan.

This work was supported by grants-in-aid from Japan Society for the Promotion of Science and from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. The authors have no financial interest in the outcome of this study.

Reprints: Yoko Aoki, MD, PhD, Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Sendai 980-8574, Japan (e-mail: aokiy@mail.tains.tohoku.ac.jp).  
Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins