

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

シトリン欠損症の実態調査と診断方法および
治療法の開発に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡野 善行

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

シトリン欠損症の実態調査と診断方法および治療法の開発に関する研究 ----- 1
岡野 善行

- (資料1) シトリン欠損症患者におけるピルビン酸ナトリウムの投与 ----- 10
(資料2) 【シトリン欠損症】ピルビン酸ナトリウム 調査用紙 ----- 14
(資料3) 疾患概要 ----- 26
(資料4) 研究者リスト ----- 27
(資料5) 平成22年度班会議抄録 ----- 28

II. 分担研究報告

1. シトリン欠損症モデル (citrin/mGPDH double KO) マウスを用いた ----- 38
病態解析と新規治療法の開発
佐伯 武頼

2. 成人型シトルリン血症 (CTLN2) 患者における食事摂取の特徴 ----- 49
池田 修一

3. シトリン欠損症患者に対するピルビン酸ナトリウムの有効性の検討 ----- 51
大浦 敏博

4. シトリン欠損症患者の倦怠感およびQOLの実態解明に関する研究 ----- 54
小林 京子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 63

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 65

〔I〕 總括研究報告

シトリン欠損症の実態調査と診断方法および治療法の開発に関する研究

研究代表者 岡野 善行 大阪市立大学 講師

研究要旨:シトリン欠損症は新生児期には胆汁うっ滞症、幼児期から青年期は適応・代償期、そして、予後不良な疾患である成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) を示す。本研究では、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し、治療指針を作成し、成人発症 CTLN2 の発症予防と発症後の肝移植の回避を目標にしている。CTLN2 発症後の治療には、ピ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た。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、低血糖、成長障害、易疲労感などの症状とともに、生活全般において著しい QOL の低下を示していた。この時期にも食事療法と共に適切な治療が必要であり、ピルビン酸ナトリウムの有効性を検討するために、血中シトルリン、酸化ストレスマーカー、患者 QOL 調査、食事調査、身体発育をマーカーとして臨床研究を開始している。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、MCT ミルクの有用性が示唆されている。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。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、医療費の軽減化が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

リン血症、肝障害、精神症状を主症状とし、予後不良な疾患である成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) 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

A. 研究目的

Kobayashi らは高アンモニア血症、高シトル

春期は適応・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が発症し、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・生活歴を明らかにすること、遺伝子診断以外の普遍性のある新しい診断方法を開発すること、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。初年度は1) 新生児～乳児期のNICCDに対する治療ガイドラインの検討。2) シトリン欠損による生体代謝環境やCTLN2発症に対する検査マーカーの有用性の検討。3) 患者のQOLを客観的な評価。4) 検査マーカー、患者のQOL評価表、食事評価によってピルビン酸ナトリウムの有用性とその評価を行う。5) 各ステージでのガイドラインを作成する。6) モデル動物にて新しい治療薬の開発を行う。7) シトリン蛋白検出による迅速で簡便な診断方法

の開発を行う。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。

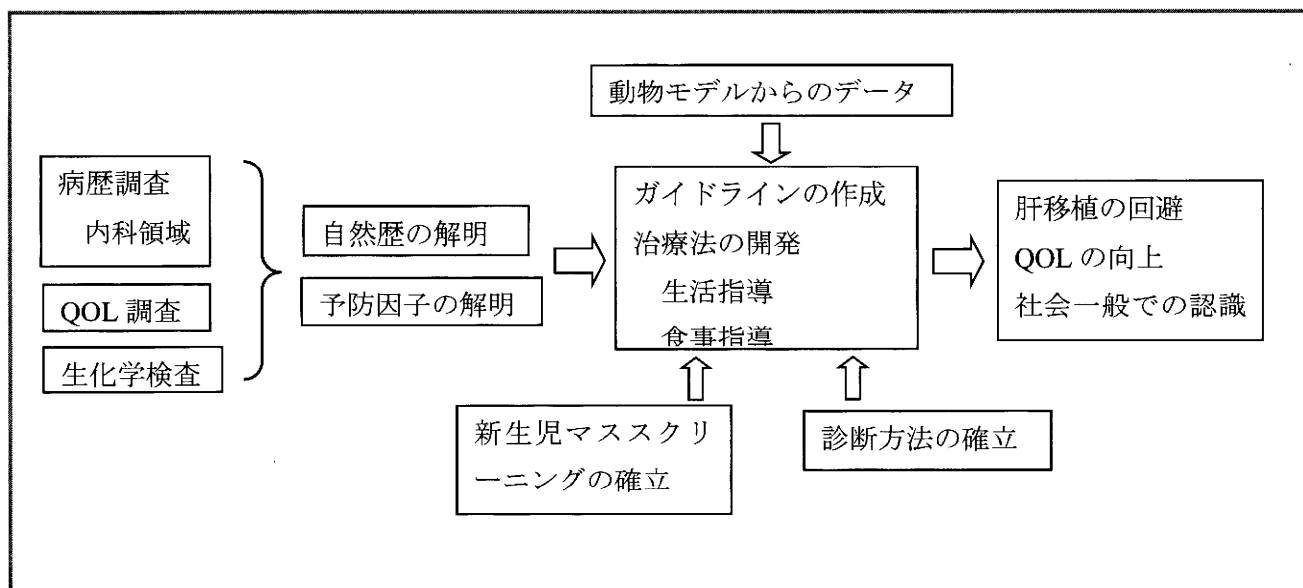
B. 研究方法

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)、堀川玲子(国立生育医療センター)、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)、大竹明(埼玉医科大学)、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、渡辺順子(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。大浦敏博(研究分担者)、岡野善行(研究代表者)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(胆汁うっ滞症、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。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、治療の分析を行った。

4) 前年度、小児の疲労尺度の測定方法を開発し、その有効性を確認している(Kobayashi et al. Qual Life Res in press)。本年度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、シトリン欠損症患者に調査票を配布した。岡野と小林京子(研究協力者、東京大学家族看護学分野)が担当した。

2. 成人発症 II 型シトルリン血症の治療法の開発

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、成人でのその効果を大浦と池田が報告した。

3. 小児での薬物療法(ピルビン酸ナトリウム)による臨床試験プロトコールを作成した(資料 1、2)。その効果判定には、前年度、当研究で代償期・無症状期においても有意にその変化が認められた酸化ストレス、アミノ酸、糖、脂質代謝マーカーを中心に測定し(Nagasaka et al. Mol Genet Metab 2009)、そのほかの検査項目として、食事内容、身体的発育、PedsQL、を指標としてもちいる。長坂博範(研究協力者、宝塚市立病院)が担当した。

4. 新生児マススクリーニング

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。新生児期の無症状シトリン欠損症患者の存在の有無と CTLN2 発症との関連性を明らかにする。遺伝子診断からの患者頻度 1/1.7 万人に比較して、その発見率は低く偽陰性に対してマススクリーニング法の改善とその有効性を再検討する。重松陽介(福

井大学)、稲岡一孝(大阪府立母子総合医療センター)酒本和也(大阪市環境保健協会)の各研究協力者が担当した。

5. 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)と小林(研究分担者)はシトリン欠損症モデル動物で、詳細な病態解析、治療法の効果判定を行い、森山光章(研究協力者、大阪府立大学)の協力の下、ピルビン酸ナトリウムの効果を本動物実験で確認した(Moriyama et al. J. Hepatol. 2006, Saheki et al J Biol Chem 2007) 種々の有効な食事療法や薬物療法の効果を解明し、治療法の実験を行う。

(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. 新生児肝内胆汁うつ対症の治療

本研究に参加する患者登録を進め、110 例を登録した。新生児胆汁うつ滞に対する診断と治療指針(案)を作成するため、平成 21 年度に作成した 0-2 才まで臨床経過と治療についての調査票から、新生児乳児期の NICCD における有効な治療法について検討した。対象はシトリン欠損症と診断された患者 60 名の新生児・乳児期の後ろ向き調査から得られたデータについて検討した。対象患者を治療群別に無治療群、

脂溶性ビタミン補充群、MCT ミルク使用群、ガラクトース除去ミルク使用群（MCT 使用はない）に分けたとした。治療の有効性は体重改善度、血中総胆汁酸、ALP を指標として判定した。MCT ミルク使用群では他の群に比較して、1才までに体重増加の改善が認められる傾向があった。血中総胆汁酸、ALP では各群間で明らかな差を認めなかった。シトリン欠損症は生後6カ月までに多くは自然軽快するため、治療効果の判定は難しい。MCT ミルクの使用は体重増加に関して改善効果を認め、NICCD に対して有効であると推定できた。今後さらなる症例の蓄積が必要と考えられる。

2. 代償期・無症状期の治療

1) PedsQL 疲労感尺度について

シトリン欠損症の適応・代償期（見かけ状健康）で指摘される倦怠感の実態は、これまで明らかにされておらず、この時期の倦怠感と QOL との関連も明らかになっていない。前年度、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。小児の倦怠感尺度は、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。

シトリン欠損症患者の倦怠感と一般 QOL の実態を PedsQL 倦怠感尺度および一般 QOL 尺度を用いて明らかにするとともに、両者の関連を検索した。53名のシトリン欠損症患者とその親51名からの回答を得た。シトリン欠損症患者の倦怠感、健康な子どもに比して強く、その QOL は低いことが明らかになった。倦怠感合計点と一般 QOL 合計点の間に、強い相関が示され、両者の関連は明らかであった。さら

に、シトリン欠損症患者と保護者間における倦怠感および一般 QOL の評価に差が認められた。保護者は患者自身よりも、倦怠感を低く、すなわち、QOL を高く評定しており、患者自身よりも患者の健康状態を良好であると捉えていることが明らかになった。（研究協力者 小林京子）

2) ピルビン酸ナトリウムの投与

幼児から青年期のシトリン欠損症患者を対象として、ピルビン酸ナトリウムの治療効果について検討している。これまで体重減少など著明な症状を示していた患者では、体重増加の回復と日常生活の QOL の改善が認められている (Mutoh et al J Inher Metab Dis 2008)。今後、前方視的に身長・体重の増加、QOL 調査、食事内容の変化、血中尿中酸化ストレス反応、糖アミノ酸代謝について検討する。

3. 成人発症 II 型シトルリン血症(CTLN2)患者の治療（研究分担者 池田修一、研究協力者 矢崎正英）

1) 26名の CTLN2 患者の臨床像、治療について検討した。患者は男性17名・女性9名で、発症年齢は 37.4 ± 13.6 歳 (12-65 歳) であった。初発症状は、意識障害が23名と最多で、ほかに抑うつ症状、てんかん発作、幻覚などの精神症状での発症者が存在した。平均の body mass index は 18.5 ± 2.6 と痩せた患者が多かった。ほぼ全例に、ピーナッツや大豆、肉や魚類、乳製品などの高蛋白・高脂質食を好み、糖質や飲酒を嫌う傾向が認められた。全例に軽度から高度の脂肪肝を認めた。また7名(27%)の患者で膵炎の罹患歴を有し、2名(8%)で肝癌を併発していた。

2) 成人患者 (39-52歳の男性5名) での栄養特性を明らかにするために、食事調査を施行した。平均蛋白質、脂質、炭水化物のエネルギー比 (PFC 比) は $19 \pm 3\% : 44 \pm 5\% : 37 \pm 4\%$ であり、

以前報告された若年層(1-33 歳)のシトルリン欠損症患者(19±2%:44±5%:37±7%)、Saheki et al. J Inherit Metab Dis 2008 とほぼ一致していた。特に CTLN2 患者は穀類摂取量が少なく、同世代の日本人平均の 56%であった。また、一般的な日本人では脂質摂取量は加齢とともに低下するが、この傾向は CTLN2 患者には見られなかった。今回の結果から、過去の若年層シトルリン欠損症患者の結果と同様に、成人 CTLN2 患者でも、低炭水化物、高蛋白・高脂質食が特徴的であり、その PFC 比は年齢や CTLN2 の発症に影響されない可能性が示唆された(Nakamura et al J Nutr Sci Vitaminol)。

3) ピルビン酸ナトリウムを 6 名の患者に対して、4-9g/日の投与を行い、その有効性について検討している。最長で 3 年半投与を継続しているが、6 名中 5 名で、明らかに脳症発作の頻度が減少した。しかしながら 1 名では、投与後も複数回、アンモニア上昇に伴う脳症発作を繰り返しており、非有効例も存在する可能性が示唆された。

4) 患者は 33 歳男性。突然の見当識、意識障害で発症、近医にて高アンモニア血症(400 μ g/dl 以上)を指摘され入院、シトルリン高値より成人型シトルリン血症 2 型と診断された。遺伝子検査では S225X/Q549X の複合ヘテロ接合体であった。また兄は新生児肝炎の既往歴があり、患者と同じ変異を有していたが、現在未発症である。

第 45 病日より低炭水化物食(P:F:C= 19:46:35)を開始した。しかし、その後もシトルリン値は 13.2mg/dl と上昇、中性脂肪も 1239mg/dl と著増した。アンモニアも 150-200 μ g/dl と高値で推移した。第 111 病日よりピルビン酸ナトリウムを 3g/日より開始。2 週間後に 6g、開始 1 か月(第 146 病日)後に 9g/日まで増量し維持量とした。中性脂肪はピルビン酸ナトリウム開始後漸減し、正常化した。PSTI も 97ng/ml を最高に漸減したが、60 前後と高値で推移している。

アンモニア値は 150 以下で、意識障害などの症状は見られなくなった。ピルビン酸ナトリウム投与後中性脂肪値は徐々に改善し、PSTI、シトルリン値も漸減した。これは、ピルビン酸ナトリウムにより肝細胞内 NADH/NAD+比が改善し、代謝不全が是正されたものと推察される。(研究分担者 大浦敏博)

4. 新生児マススクリーニング

タンデムマス法による新生児マススクリーニング(NMS)を大阪府では 2008 年から、大阪市では 2009 年から同意の得られた全新生児に対して開始された。その結果、174,000 人の NMS で 5 例のシトルリン欠損症患者が発見され、大阪地区でのシトルリン欠損症の頻度は 1/35,000 人であった。また、この大阪地区から NMS が正常であるにもかかわらず、1 例のシトルリン欠損症患者が発見されている。わが国のタンデムマススクリーニングの全国調査ではシトル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 万人に比較して非常に少ない。しかしながら、大阪地区ではシトルリン欠損症患者の 1/2 を NMS で発見し、NICCD や CTLN2 発症を予防、治療できる可能性が示唆された。(研究協力者 重松陽介、稲岡一孝、酒本和也)

5. シトルリン欠損症の診断

海外の臨床施設からも多くの依頼を受け、約 600 例シトルリン欠損症患者から、SLC25A13 遺伝子解析を行い、57 種の変異・塩基配列の変化を同定した。日本人症例で頻度の高い変異は、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ていた。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。すなわち、優位な遺伝子変異の起源は黄色人種が各人種に分かれる前に発生し、白人種とはその起源が異なることが推測された。

日本人症例では、6種類の優位な遺伝子変異で90%、15種の変異検索で、95%のシトリン欠損症遺伝子を診断可能であった。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った。すなわち、6種類の遺伝子変異の検索にて、両対立遺伝子の変異の80%、片対立遺伝子の19%を同定することができ、確定診断に十分有用であった。（研究分担者 小林圭子）

6. 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。

シトリン欠損症モデル（citrin/mGPDH double-KO）マウスのメタボローム解析から以下の結果を得た。Capillary electrophoresis /mass spectrometry (CE/MS)解析、酵素法による代謝物定量、LC/MSを用いるアミノ酸分析の結果、double-KOマウスは、ショ糖投与によって、大きく以下の4種の異常を示すことが判明した。

(1) glycerol 3-phosphateの顕著な蓄積と細胞質NADH/NAD⁺比の上昇：これは、細胞質NADHをミトコンドリアへ輸送できないため、NADHが蓄積して解糖系のglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenaseの段階が阻害され、DHAPがG3Pに還元されて生じる。細胞質NADHの蓄積の結果であることが示された。肝臓G3P濃度は、シトリン欠損症の病態を感知する有力なマーカーと考えられる。

(2) TCA サイクル中間体濃度の低下：この現象は、ショ糖投与によって解糖系が阻害された結果と考えられる。

(3) Citrulline 濃度の上昇に代表できる尿素合成の異常：明らかに citrulline→ASA の段階が阻害され、細胞質 Asp の欠如を伴っていると推測される。なお、citrulline の増加、ASA の低下に比べ、Arg の減少は少ないので、Glu 分解を主とするアミノ酸分解とともに尿素合

成の促進が同時に起こっていると推測している。

(4) Saccharopine dehydrogenase (NADP)の阻害に基づく Lysine 濃度の上昇：メタボローム解析では Lys 代謝経路の中間体である saccharopine、2-aminoadipic acid、N⁶-acetyllysine が検出できた。前2者の著しい低下と N⁶-acetyllysine の増加が Lys 濃度の上昇とともに見出したことから、明らかに Lys→saccharopine の段階が阻害されていると断定される。

これらの異常所見は、全てアスパラギン酸・グルタミン酸ミトコンドリア膜輸送体としてのシトリンの機能喪失に起因することが明確であり、治療法開発において重要なマーカーとして使用可能であると考えられる。（研究分担者 佐伯武頼、研究協力者 森山光章）

D. 考察

シト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。

シトリン欠損症では、年齢によって生化学検査所見・症状が大きく変化するため、診断は容易ではない。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胆汁うつ滞などの症状は消失する。しかしながら、中には肝移植を必要とする重篤な症例も存在する (4 例/253 例：1.6%)。幼児から青年期では、適応・代償期としてその症状は非常に個人差が大

大きく、一見無症状から発育不良、精神神経症状まで様々な病像を示す。そして、成人に達すると疾患遺伝子をホモで持つ患者の約 20%において CTLN2 を発症する。以上のような症状の多様性と年齢的变化のために、シトリン欠損症の確定診断として、SLC25A13 遺伝子に異常を見いだす遺伝子診断は不可欠な状況である。

本研究ではシト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低炭水化物食の併用は一定の効果、むしろ、両者の併用によって、その疾病の進行を抑制し、肝移植を回避できる可能性が示唆されている。しかしながら、その併用療法の限界性をも示唆する症例も報告されている。

適応・代償期においても、本疾患の病態であるエネルギー産生障害、糖新生障害からの、易疲労性、低血糖、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。また、患者および保護者の QOL 調査では、対照コントロールと比較して明らかに一般尺度および特に疲労尺度評価は低下しており、QOL の低下が示唆された。その結果で注目されることは、保護者の認識以上に患児自身はその疲労感を強く感じているという結果を得ており、一見明らかな症状のない状況であっても、代謝機能の異常は QOL に大きな影響を与えていた。

代償期・無症状期においても、症状の改善を必要とする患者と病態であることは明らかで、CTLN2 と同様にピルビン酸ナトリウム治療の臨床研究を開始している。その治療効果の判定には患者の QOL 調査、栄養調査、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。

わが国では CTLN2 発症後 45 例以上で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っている。

シトリン欠損症モデルマウスの開発とその研究はピルビン酸ナトリウムの有効性を実証している。そして、メタボローム解析の結果は治療効果を判定すべきマーカーをも明らかにしている。これらのモデルマウスとマーカーを用いて、新しい治療薬の開発、食事療法の開発を進めることができるようになった。

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っ滞症 (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. Kyoko Kobayashi K, Okano Y, Hohashi N.: Reliability and validity of the PedsQLTM Multidimensional Fatigue Scale in Japan. *Qual Life Res* (in press)
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. Moriyama M, Li M.X, Kobayashi K, et al., (2006) Pyruvate ameliorates the defect in

ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. *J Hepatol* 44: 930-938.

8. 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
9. Mutoh K, Kurokawa K, Kobayashi K, et al. (2008) Treatment of a citrin-deficient patient at the early stage of adult-onset type II citrullinaemia with arginine and sodium pyruvate. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31, doi:10.1007/s10545-008-0002-0
10. T. Saheki T, Kobayashi K, Terashi M, et al. (2008) Reduced carbohydrate intake in citrindeficient subjects, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31: 386-394.
11. Nakamura M, Yazaki M, Kobayashi Y, et al. (2011): The characteristics of food intake in patients with type II citrullinemia. *J Nutr Sci Vitaminol* (in press)
12. 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. 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* 2010; 40: 295-303.
2. Kobayashi K, Okano Y, Hohashi N.: Reliability and validity of the PedsQLTM

Multidimensional Fatigue Scale in Japan. Qual
Life Res (in press)

2. 学会発表

1. Okano Y, Kobayashi K, Saheki T.: A dynamic change of clinical manifestations by age in citrin deficiency. AASPP (Asia Africa Science promotion Project) Joint Meeting at Beijing [May 24, 2010] Beijing, China
2. Okano Y, Kobayashi K, Saheki T.: A dynamic change of clinical manifestations by age in citrin deficiency. AASPP Symposium at Changchu [July 31, 2010] Changchu, China
3. 岡野善行：ガラクトース血症マスキリーニングの現状と課題. 第52回日本先天代謝異常学会 [Oct 23, 2010] 大阪
4. Okano Y, Kobayashi K, Saheki T.: A dynamic change of clinical manifestations by age in citrin deficiency. Asia Pacific Conference on Human Genetics [December 2, 2010] Hong Kong, China

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(資料 1)

シトリン欠損症患者における ピルビン酸ナトリウムの投与の研究について

[目的及び内容]

シトリン欠損症は肝型ミトコンドリア内膜局在アスパラギン酸グルタミン酸輸送体欠損に起因する疾患で、新生児期には肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) を、成人期には精神神経症状、シトルリン血症、高アンモニア血症 (成人発症 II 型シトルリン血症: CTLN2) を発症して短期間で死亡する重篤な疾患です。1~2 歳ごろから異常な食嗜好・食癖、低血糖、易疲労が認められています。動物実験ではピルビン酸ナトリウムの投与により尿素合成が促進され、治療に役立てられると考えられています。実際に成人発症 II 型シトルリン血症患者ではピルビン酸ナトリウムの投与で生体肝移植の回避に成功しています。青年期の患者では低血糖の予防と疲労回復効果が認められています。今回、成人発症 II 型シトルリン血症における高アンモニア血症、高シトルリン血症、精神症状の改善と幼児青年期での低血糖予防、学校生活を含めた日常生活での QOL を改善するために、ピルビン酸ナトリウムの投与を行い、その効果を検討するために、以下のような研究を開始いたします。

シトリン欠損症ワーキング・グループ

徳島文理大学 健康科学研究所	佐伯武頼
信州大学医学部神経内科	池田修一
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	小林圭子
仙台市立病院	大浦敏博
大阪市立大学大学院 医学研究科	岡野善行

[実施計画]

I. 対象患者

シトリン欠損症と遺伝子解析または蛋白質解析で確定診断され、以下のような症状および基準を満たす患者とします。

- 1) 成人発症 II 型シトルリン血症の症状を示す。すなわち、高アンモニア血症、高シトルリン血症、精神神経症状を示す患者。
- 2) 幼児期から青年期で、成人発症 II 型シトルリン血症の症状はないが、低血糖症、発育不全、易疲労症などの症状を示す患者
- 3) 新生児乳児胆汁うっ滞性肝障害を示し、肝不全へ発展し、肝移植を必要とする可能性の高い患者。
- 4) 妊婦ではないこと。
- 5) 書面によるインフォームド・コンセントを本人もしくは代諾者から得られた患者

2. 投与方法、投与量、投与期間

- 1) 投与方法：経口投与 1日 2-3回食後
- 2) 投与量：ピルビン酸ナトリウム粉末もしくはカプセル (250mg) を一日 100 mg/kg 分 2 もしくは分 3 から開始し、特に副作用がなければ、一般症状の変化および血中の各種検査項目の変化を観察しながら 300 mg/kg/日まで増量することができる。
- 3) 投与期間：ピルビン酸ナトリウムを 16 週間投与する。患者がこのピルビン酸ナトリウム服用を希望すれば、研究終了後も続けることができる。

3. 検査内容、検査スケジュール

- 1) 臨床症状のチェック (血圧、脈拍、体重、身長を含む)：投与前、投与後 2-4, 8-16 週の 3 回行う。
- 2) 血液検査：投与前、投与後 2-4, 8-16 週の 3 回行う。
 - a) 各施設で検査：
 - 一般末梢血球数、電解質 (Na、K、Cl)、肝機能検査 (AST、ALT、ALP、総胆汁酸)、腎機能検査 (BUN、Creat)、膵機能検査 (アミラーゼ)、血糖、アンモニア、ケトン (アセト酢酸、3-ヒドロキシ酪酸)、乳酸、ピルビン酸、総コレステロール、トリグリセライド、LDL、HDL、PSTI を測定する。
 - b) 大阪市立大学医学部小児科へ凍結後、ドライアイス入りで送付する。
 - i) 血清 2 ml 前後以上
 - ii) ヘパリン血 2-4 ml を採取し、直ちに氷冷し、通常の検査室遠心器 (3,000rpm x 10 分) で分離する。血漿成分と血球成分に分けて、-80 度で保存し、血漿と血球両者を送付する。
アミノグラム、アポリポ蛋白、Malondialdehyde-modified LDL、nitrite/nitrate (NOx)、asymmetric dimethylarginine (ADMA)、Catalase、vitamin E、superoxide-dismutase (SOD)、thiobabituric acid reactive species (TARS)、total anti-oxidant reactivity (TAR)、glutathione peroxidase を測定する。
 - iii) 尿 5-10ml を採取し、凍結保存。
acrolein-lysine と 8-OHdG を測定する
- 3) 栄養評価：投与前と投与後 4 から 16 週目に 2-3 日間の摂取栄養量を 2 回チェックする。
 - a) 3 食については食事前の献立を 15 cm 前後の定規と一緒に撮る。
 - b) 食事内容を記載する。少なくとも食材名を記載する。できれば重さ (g) を記入する。以上を大阪市立大学医学部小児科・東北大学小児科に提出し、両者で比較検討する。
- 4) QOL 調査：投与前と投与後 4 から 16 週目の 2 回行う。
PedsQL 一般と疲労にて評価する。

送付先

岡野善行 大阪市立大学大学院医学研究科 発達小児医学

〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

TEL 06-6645-3816, FAX 06-6636-87837

E-mail okano@med.osaka-cu.ac.jp

参 考

I. ピルビン酸ナトリウムの概要

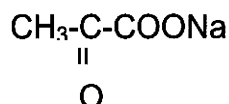
ピルビン酸ナトリウムは生体内ではピルビン酸として利用され、解糖系の最終産物である。現在、薬剤としては承認されていないが、これまで、心不全、肝障害、ミトコンドリア病の治療薬としてその効果について報告されてきている。また、インターネット上ではピルビン酸カルシウム・ピルビン酸ナトリウムなどが脂肪燃焼促進に対して効果があるとしてサプリメントとして販売されている。

1) 物理化学的性質

薬剤名： ピルビン酸ナトリウム

化学名： 2-オキソプロパン酸ナトリウム

構造式：



2) 毒性（基礎データ）

急性毒性： LD₅₀ 5,600～10,000 mg/kg（ラット経口）、

LD₅₀ 3,775 mg/kg（ラット腹腔内投与）

亜急性毒性： Wistar 系ラットへの 300 mg/kg と 600 mg/kg の 30 日間、筋肉内投与では毒性は認められていない。

その他の毒性： 250 mg/kg ピルビン酸ナトリウムの静脈内注射による Pyrogen テストで異常は認めなかった。

3) 薬理作用

一般薬理：ピルビン酸は炭水化物、アミノ酸、脂質の代謝において中心的役割を演じている。ピルビン酸は解糖系の最終産物であり、3つの経路に利用される。すなわち、1)還元されて乳酸となる。2)ピルビン酸脱水素酵素複合体（PDHC）によって酸化されアセチル CoA を生じる。そして、好氣的解糖系である Krebs 回路で ATP のエネルギー産生に寄与する。3)ピルビン酸カルボキシラーゼによってカルボキシル化されオキサロ酢酸となり TCA サイクルの中間体を補充する。

シトリン欠損症でのピルビン酸ナトリウムの効果は、動物実験で明らかにされている。すなわち、シトリンノックアウトマウスの肝臓にピルビン酸ナトリウムを灌流すると、アンモニアからの尿素合成が改善されている。このピルビン酸の効果は以下のように説明される。ピルビン酸は NAD⁺を供給し、この NAD⁺はリンゴ酸のオキサロ酢酸への酸化に利用される。アスパラギン酸はグルタミン酸からオキサロ酢酸へのアミノ基転移によって形成される。このようにして

ミトコンドリアから細胞質へのアスパラギン酸の運び出し系の欠損による代謝的異常は、ピルビン酸を肝臓に供給することによって回避される。

4) 薬物動態 [ヒトにおける Cmax、Tmax、T 1/2、尿中排泄率、蛋白結合率]

薬物動態は明らかではない。以下にピルビン酸ナトリウムを投与した例における血中ピルビン酸の変化を記載すると、CPEO の患者 (26 歳、女性) に 5 g のピルビン酸ナトリウムを投与し、その 30 分後にピルビン酸値は 0.85 mg/dL から 1.16 mg/dL に上昇し (正常値 0.30-0.90 mg/dL)、乳酸値は 21.8 mg/dL から 18.9 mg/dL に下降し (正常値 4.0-16.0 mg/dL)、L/P 比は 25.65 から 16.29 に低下している (正常値 < 10)。

5) 臨床試験成績

ピルビン酸ナトリウムは、現在ミトコンドリア病への適用などが検討されつつあり、投与量の検討もされている。過去のミトコンドリア病に対する投与量ではピルビン酸ナトリウムとして一日 15g 投与されている。シトルリン欠損症については成人期 2 人、思春期 2 人、学童期 1 人に投与されている。成人発症 II 型シトルリン血症患者ではアンモニア値が低下し、肝移植が回避されている。思春期、学童期の患者では低血糖の予防、身体発育のキャッチアップ、生活活動および運動意欲の回復が認められている。

6) ヒトにおける副作用および使用上の注意

予測される副作用としては、ナトリウム塩のため、ナトリウムの過剰による影響が可能性として考えられる (電解質異常、高血圧など)。他の疾患患者にも投与されているが、悪心、下痢などの消化器症状が出現することがある。一つの研究報告例であるが、54 g (150 mg/min) 6 時間および 72 もしくは 86.4 g (200 mg/min) 6~8 時間での点滴静脈注射した場合には、ほとんどの患者において脈拍の増加、血圧の上昇、のどの渇き、頭痛が記録されている。また、悪心、しゃっくり、不快感、発熱が非常にまれに認められている。今回は 1 日総投与量で 1/2 以下、分 3、経口投与であるので、このような副作用の発現の可能性は低いと考えている。

【 シトリン欠損症 】ピルビン酸ナトリウム 調査用紙

フリガナ		男・女
患者氏名		年齢
生年月日	西曆	年 月 日
ID		
診断の経緯	<input type="checkbox"/> 新生児マススクリーニングで発見され、診断された。 (<input type="checkbox"/> ガラクトース、 <input type="checkbox"/> フェニルアラニン、 <input type="checkbox"/> メチオニン、 <input type="checkbox"/> シトルリン)	
	<input type="checkbox"/> 症状が出現し、医療機関を受診して診断された。 (マススクリーニングは <input type="checkbox"/> 正常、 <input type="checkbox"/> 異常 であった。)	
確定診断	西曆	年 月
SLC25A13 遺伝子型		

施設名	
住所	〒
電話	
診療科名	
フリガナ	
担当医師名1	
フリガナ	
担当医師名2	
フリガナ	
担当医師名3	

既往歴・合併症	□ あり、 □ なし、 □ 不明	
	疾患名	状 況
		□過去罹患、 □現在罹患
		□過去罹患、 □現在罹患
		□過去罹患、 □現在罹患
		□過去罹患、 □現在罹患
		□過去罹患、 □現在罹患
		□過去罹患、 □現在罹患
アレルギー歴	□ あり、 □ なし、 □ 不明	
症 状	□なし □あり	
	全身倦怠感	□なし □あり (出現時期: 才 ヶ月から)
	成長障害	□なし □あり (出現時期: 才 ヶ月から)
	胃腸の不快感	□なし □あり (出現時期: 才 ヶ月から)
	腹痛	□なし □あり (出現時期: 才 ヶ月から)
	低血糖	□なし □あり (出現時期: 才 ヶ月から)
その他 (出現時期: 才 ヶ月から)		
通園・通学の状況、現在の問題点		

その他の薬物療法				
薬剤名	投与量(mg/日)	本試験開始前から服用	本試験中に服用開始	本試験中に服用終了
食べ物の嗜好	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり（出現時期： 才 ヲ月から）			
	ごはん、うどん <input type="checkbox"/> 好き <input type="checkbox"/> 嫌い <input type="checkbox"/> どちらとも言えない 唐揚げ、ハンバーグ <input type="checkbox"/> 好き <input type="checkbox"/> 嫌い <input type="checkbox"/> どちらとも言えない 牛乳 <input type="checkbox"/> 好き <input type="checkbox"/> 嫌い <input type="checkbox"/> どちらとも言えない（1日にどれ位飲みますか mL） 食事回数（ ）回 <input type="checkbox"/> 朝、 <input type="checkbox"/> （ ）、 <input type="checkbox"/> 昼、 <input type="checkbox"/> おやつ、 <input type="checkbox"/> （ ）、 <input type="checkbox"/> 夕、 <input type="checkbox"/> 夜			
	好きな食べ物			
	嫌いな食べ物			

ピルビン酸ナトリウム使用状況

服用開始日	西暦 年 月 日		西暦 年 月 日		
			服用を続けている		
	服用前	2-4週	8-16週	週	週
年月日					
体重(kg)					
身長(cm)					
体温					
最高血圧					
最低血圧					
脈拍					
ピルビン酸 ナトリウム					
1日 2回 3回 4回					
投与量 (mg/日)					
栄養チェック	<input type="checkbox"/> 必須		<input type="checkbox"/> 必須		
QOLチェック	<input type="checkbox"/> 必須		<input type="checkbox"/> 必須		
血液採取と送付	<input type="checkbox"/> 必須	<input type="checkbox"/> 必須	<input type="checkbox"/> 必須		
血清2-3ml					
血漿1-2ml					
赤血球					
尿5-10ml 採取 と送付	<input type="checkbox"/> 必須	<input type="checkbox"/> 必須	<input type="checkbox"/> 必須		