

[Improving the diagnostic method for the SLC25A13 gene 851del4 mutation and analysis of the common mutation frequencies in Quanzhou area.]

[Article in Chinese]

Gao H, Li Q, Zhuang X, Keiko K, Miharu U, Takeyori S, Hu W, Zhou C, Lin L.

The Second Clinical College, Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian, 362000 P.R.China.

fmufuer@public.qz.fj.cn.

Abstract

OBJECTIVE: To ascertain whether the carrier rate is high in Quanzhou which is next to Taiwan in South of the Yangtze River.

METHODS: Population analysis of three SLC25A13 mutations, i.e. 851del4, 1638-1660 dup, and IVS6+ 5G to A was carried out in 450 healthy individuals. DNA diagnostic method of 851del4 was improved by using PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) with restriction enzyme HpyCH4 IV, and the results were confirmed by GeneScan method.

RESULTS: Six carriers with 851del4, 3 with 1638-1660 dup and 3 with IVS6+ 5G to A was found.

CONCLUSION: The high carrier rate (0.027, 12/450) obtained from testing of only three mutations indicated that there must be a certain number of patients with citrin deficiency in Quanzhou, even in Fujian. Therefore, it is important for physicians in Quanzhou, Fujian province to learn about citrin deficiency, and to diagnose and treat the patients correctly.

PMID: 21154320 [PubMed - as supplied by publisher]

Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) in three Malay children.

Ngu HL, Zabedah MY, Kobayashi K.

Genetics Department, Kuala Lumpur Hospital, Jalan Pahang, 50586 Kuala Lumpur, Malaysia. ngulh@hotmail.com

Abstract

Citrin deficiency is an autosomal recessive disorder caused by mutation in the SLC25A13 gene. It has two major phenotypes: adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD). NICCD is characterized by neonatal/infantile-onset cholestatic hepatitis syndrome associated with multiple amino acidemia and hypergalactosemia. NICCD is self-limiting in most patients. However, some patients may develop CTLN2 years later, which manifests as fatal hyperammonemia coma. We report three unrelated Malay children with genetically confirmed NICCD characterised by an insertion mutation IVS16ins3kb in SLC25A13 gene. All 3 patients presented with prolonged neonatal jaundice which resolved without specific treatment between 5 to 10 months. Of note was the manifestation of a peculiar dislike of sweet foods and drinks. Elevated plasma citrulline was an important biochemical marker. NICCD should be considered in the differential diagnosis of cholestatic jaundice in Malaysian infants regardless of ethnic origin.

PMID: 20614727 [PubMed - indexed for MEDLINE]

9. 代謝

尿素回路障害 2: citrin 欠損症 (NICCD, CTLN2) citrin deficiency (NICCD, CTLN2)

鹿児島大学大学院医学総合研究科医化学
徳島文理大学健康科学研究科

小林圭子
佐伯武頼

Citrin 欠損症の病態像は多彩であるため、分子遺伝学的な確定診断が必要であるが、特異な食癖も有効な診断マーカーとなる。従来の治療法・対症療法の中に、症状の増悪化に繋がるものがあるので注意を要する。

診断のポイント

Citrin 欠損症診断のフローチャートを図 1¹⁾に示す。肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: NICCD) の 40%は新生児マス・スクリーニング陽性で、半数はおもに 1~4 カ月齢に遷延性黄疸、成長障害、凝固異常などの症状を呈することで気づかれる。いずれも一過性のシトルリン (citrulline: Cit) 血症を示すので、タンデムマス法などの導入により血中 Cit が測定できれば、多くの症例の早期発見に繋がる。しかし、citrin 欠損症では多種多様な検査所見から診断に苦慮する症例が少なくないため、遺伝子検査による確定診断の意義は大きい。多くの NICCD では、臨床症状・異常検査データが生後 6 カ月には正常化する。生後 4 カ月くらいまでにアミノ酸分析を行うことが重要である。また 1 歳以降では、問診により特異な食癖 (糖質を嫌い、蛋白質・脂質を好む) の有無を必ず把握すべきである。

成人発症 II 型 Cit 血症 (adult-onset type II citrullinemia: CTLN2) の診断も、本疾患を念頭においていない限り大変むずかしく、他疾患と誤診する場合も多い。しかし、血中アンモニア・血漿 Cit・血中 PSTI (pancreatic secretory trypsin inhibitor) などの測定、脂肪肝の有無などに加え、特異な食癖を聞き出すことで容易に CTLN2 を診断することができる (図 1)¹⁾。

036-9806/10/¥100/頁/ICOPY

重症度評価

NICCD では、これまで 5 例が肝移植手術を受けているが、重篤になる要因は明らかでない。一方 CTLN2 では、肝臓特異的に ASS (argininosuccinate synthetase) 蛋白が低下する症例が多いため、高アンモニア血症をきたし重篤な症状の出現に至る。この肝 ASS 蛋白低下の原因は citrin 欠損に基づく二次的变化であること以外、いまだに解決されていない。しかし、肝 ASS 蛋白・活性の残存量は、治療法を検討するうえで重要な要因になると考えられる。

基本病態

図 2 に示すように、citrin 欠損症の病態は実に多彩である。二つの基本病態 (NICCD と CTLN2) 以外に、見かけ上、健康と考えられていた時期においてもさまざまな症状が出現していることもわかってきている。また一方、健康に過ごす citrin 欠損症例も存在すると考えられるので、citrin 欠損症の詳細な自然歴の検討が必要である。

本疾患のもっとも際立った特徴のひとつは、甘い

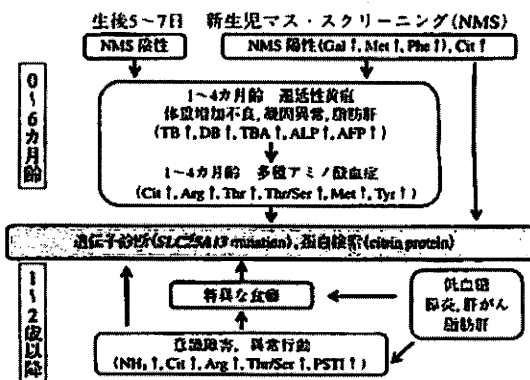


図 1 Citrin 欠損症診断のフローチャート
文献 1) より引用、一部改変

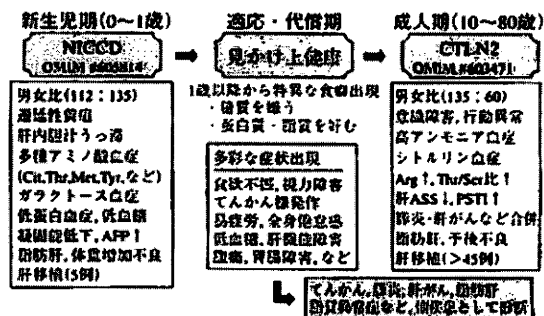


図 2 Citrin 欠損症の病態像

◆◆一般演題：原著◆◆

先天性代謝疾患と一酸化窒素, 酸化ストレス

Nitric oxide and oxidative stress in inherited metabolic disorders

長坂博範¹⁾、塚原宏一²⁾

はじめに

先天性の代謝性疾患において蓄積する代謝産物はその有害性から多種多様な症状を引き起こす。これらの産物はまたreactive oxygen species (ROS) を発生させることが想定されているが、実証された疾患は、まだ少ない。先天性尿素サイクル異常症では、一酸化窒素nitric oxide (NO) 合成の基質アミノ酸であるarginineやcitrullineの血中濃度の著明な変化を伴うことから、NO合成が変化することが想定される(図1)¹⁾。酸化ストレスとNO代謝は多くの生体反応に影響を与えることから、先天性代謝疾患においても、これら进行评估することは病態を理解するうえで重要である^{2) - 7)}。

先天性尿素サイクル異常症では、血中arginineとcitrulline濃度の著明な異常が特徴的である(図1)。その病態は単にammoniaが高いというだけで説明できない部分が多いとされている。citrin欠損症は尿素サイクル関連疾患とされているが、そのclinical pictureは極めて特徴的である(図2)^{8) 9)}。乳児期は胆汁鬱滞、ないしは、乳児肝炎様症状を呈し、大部分の症例が1歳までに症状は軽快する。しかし、一部の症例は思春期ないしはそれ以降に、著明な脂肪肝および肝不全(成人発症高シトルリン血症; CTLN) を発症する。先天性門脈大循環shuntは、新生児mass-screeningで高galactose血症などにより、しばしば発見される^{10) - 12)}。正確な予後は不明であるが最近、10歳以降に肺高血圧症を呈した症例のreportsが増えている。NOは血管内皮機能

endothelial functionのhomeostasisを維持するという極めて生体にとって重要な役割を担っていることから、先天性門脈大循環shuntにおいてもNO合成を評価することは必要と思われる。

今回、我々は、これらの疾患におけるNO代謝、酸化ストレスの評価を試みたので報告する。

対象と方法

以下の3疾患を対象にして、NOの代謝産物nitrite/nitrate (NOx⁻) およびNO合成酵素 (NOS) の抑制物質であるasymmetric dimethylarginine (ADMA)の血清濃度を調べた^{13) - 15)}。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'-deoxyguanosine (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の赤血球での活性や抗酸化作用を有するビタミンEの血中レベルを測定した。先天性門脈大循環shuntではvasoconstrictorであるendothelin-1 (ET-1)の血漿中濃度も調べた^{16) 17)}。

尿素サイクル異常(図1): ornithine transcarbamylase defect (OTCD) 7名(女/男, 5/2; 1-7歳) Arginosuccinate synthase defect (ASSD) 5名(女/男, 4/1; 9-19歳), Arginosuccinate lyase defect (ASLD) 3名(女/男, 1/2; 5-8歳)。類縁疾患として、リジン尿性蛋白不耐症 lysinuric protein intolerance (LPI) 患者3名(女/男, 1/2; 21-34歳)。Citrin欠損症: 1-10歳の肝機能ほぼ正常化している20名(女/男10/10)。先天性門脈大循環

¹⁾千葉県こども病院 総合診療科

²⁾福井大学 小児科

shunt : 1 - 5 歳の14名 (女/男 6/8) の肝内門脈肝静脈shuntの症例。

結 果

尿素サイクル異常症患者ではL-arginine投与中であり血中arginine濃度は正常群よりやや高めである。OTCD患者のNOxは同年代正常群に較べて有意に高かったが、ADMA値は正常群同様であった。さらに、NOxは血中arginine値と有意な正の相関をしていた。ASSD患者は、NOxは同年代正常群に較べて有意に低く、ADMA値は高値であった。ASLD患者は、NOx、ADMA値ともに正常群と有意差を示さなかった。ASSD、ASLDはともにcitrulline値が極めて高く(特にASSD)、citrulline濃度はADMAと正の相関、NOx濃度と負の相関を示した。LPI患者では、arginine低値とNOx高値が目立った(図3、表1, 2)。

Citrin欠損症患者では、NOx、ADMA濃度は正常群と有意差はなかった。しかし、尿中8-OH dGおよびacrolein-lysine、血中酸化LDLは有意に高かった(表3, 4)。

先天性門脈大循環shuntでは、血中アミノ酸濃度に変化はなかったが、NOxは正常群より有意に低値、ADMA濃度は有意に高値を呈していた。血漿中ET-1濃度は、正常群より有意に高かった。また、尿中8-OH dGおよびacrolein-lysine、血中酸化LDLなどの酸化ストレスマーカーの有意に上昇しており、逆にvitamin E濃度は低下していた(図4)。

考 察

尿素サイクル異常症では、血中arginineないしはcitrulline濃度がNO代謝にリンクしていることが示された。ASSD、ASLDでは極めて高い血中citrulline値がNO産生を抑制していると解釈された。その際、ADMAはNOxと反対にcitrullineと強い正の相関がみられたことから、ADMA増加を介したNO産生の抑制という解釈もできよう。LPIは腎、腸管上皮における二塩基アミノ酸(lysine, arginine, ornithine) トランスポーターである、SLC7Aの欠損により起こる疾患である¹⁸⁾。この疾患ではNOxの増加は顕著であった。しかしながら、ADMAの増加はみられず、NOとADMAとの間で前者優位の不均衡が生じていると考えられた。本疾患の随伴症状としてmacrophage-activated hemophagocytosisが有名であるが、NOの過剰産生がその要因になっている可能性

がある。Arginineが細胞内に停滞することによりNOが異常に産生されるという報告もある¹⁹⁾。

Citrin欠損症ではsilent stageといえども酸化ストレスがenhanceされた状態であることが推察された。酸化ストレスとCTLN-2の関係をより詳細に検討する必要があると考えられた。特に、CTLN-2の脂肪肝はしばしば顕著であり何らかの機序で肝臓にかかる酸化ストレスがenhanceされた状態が続くと考えられる^{8) 9)}。

先天性門脈大循環shuntでは、NOとET-1産生のアンバランスがあることが推察された。これが思春期以降の肺高血圧発症に関与しているかどうか、これから検証しなければならぬ¹²⁾。また、酸化ストレスマーカーが有意に増加していることから、酸化ストレスもまた肺高血圧発症に関与している可能性が考えられた。NO産生は酸化ストレスと密接に関係している(図5)。酸化ストレスが遷延する場合にはNOS構造が変化し、またNO産生に必須のBH4が枯渇してNOの代わりにsuperoxideが過剰産生されることがある⁴⁾。さらに酸化ストレスは内皮細胞でのET-1産生を亢進させる⁷⁾。先天性門脈大循環shuntのNOとET-1産生のアンバランスは、酸化ストレスが介在するこれらの機序からくるのかもしれない。特にshunt率が40%を超えると、このような異常が顕著になってくることから、shunt率が高い場合、肺高血圧発症に注意して、心電図、心エコー、血中BNPなどのモニターが必須であると考えられる。

以上、酸化ストレス、NO代謝異常が先天代謝異常症の病態を多面にわたり修飾していることが強く示唆された。

文 献

- 1) Brusilow SW, Horwich AL: Urea cycle enzymes. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease, 8th edition. New York: McGraw-Hill; 2001, p. 1909-1963.
- 2) Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. J Nutr 2004; 134: 2820S-2825S.
- 3) Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol 2006; 147: S193-201.
- 4) Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide in vascular disease from marvel to menace. Circulation 2006; 113: 1708-1714.

- 5) Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F871-880.
- 6) Karaa A, Kamoun WS, Clemens MG. Oxidative stress disrupts nitric oxide synthase activation in liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1320-1331.
- 7) Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defence mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 338-549.
- 8) Kobayashi K, Iijima M, Yasuda T, Sinasac DS, et al. Type II citrullinemia (citrin deficiency): a mysterious disease caused by a defect of calcium-binding mitochondrial carrier protein. in: R. Pochet, R. Donato, J. Haiech, C. Heizmann, V. Gerke (Eds.) *Calcium: The molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, New York, 2000, pp. 565-587.
- 9) Yasuda T, Yamaguchi N, Kobayashi K, et al. 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* 107 (2000) 537-545.
- 10) Uchino T, Matsuda I, Endo F. The long-term prognosis of congenital portosystemic venous shunt. *J Pediatr* 1999; 135: 254-256.
- 11) Shiomi S, Sasaki N, Ikeda N, et al. Usefulness of per-rectal portal scintigraphy with Tc-99m pertechnetate for galactosemia in infants. *Ann Nucl Med* 1998; 12: 375-378.
- 12) Ohno T, Muneuchi J, Ihara K, et al. Pulmonary hypertension in patients with congenital portosystemic venous shunt: a previously unrecognized association. *Pediatrics* 2008; 121: e892-e99.
- 13) Kielstein JT, Tsikas D, Fliser D. Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 39-44.
- 14) Cook JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005; 10: S11-7.
- 15) Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 41-51.
- 16) Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 325-415.
- 17) Little PJ, Ivey ME, Osman N. Endothelin-1 actions on vascular smooth cell functions as a target for the prevention of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2008; 6: 195-203.
- 18) Palacin M, Bertran J, Chillaron J, et al. Lysinuric protein intolerance: Mechanism of pathophysiology. *Mol Genet Metab* 2004; 84 Suppl 1: S27-37.
- 19) Mannucci L, Emma F, Markert M, et al. Increased NO production in lysinuric protein intolerance. *J Inherit Metab Dis*. 2005; 28:123-129.

表1 Levels of plasma arginine and citrulline and serum nitrite/nitrate and asymmetric dimethylarginine in urea cycle defects

Deficiency (Age at present)	Arginine ($\mu\text{mol/L}$)	Citrulline ($\mu\text{mol/L}$)	NOx^- ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	ADMA/ NOx^-
OTC, $n=7$ (1.7–7.8 years)	185 ± 45^c (129–278)	8.4 ± 2.1^c (5.9–9.6)	67 ± 23^a (35.3–108)	0.860 ± 0.271 (0.367–1.556)	0.015 ± 0.007 (0.003–0.027)
ASS, $n=5$ (9.3–17.1 years)	229 ± 19^c (204–256)	2867 ± 864^c (1768–3870)	22 ± 7^b (13.8–32.1)	1.422 ± 0.257^b (1.090–1.872)	0.061 ± 0.021^c (0.034–0.082)
ASL, $n=3$ (5.6–8.8 years)	259 ± 14^c (235–276)	562 ± 84^c (457–688)	49 ± 2 (45.1–50.8)	1.125 ± 0.064 (1.032–1.225)	0.024 ± 0.002 (0.024–0.027)
LPI, $n=3$ (21.5–34.8 years)	36 ± 5^c (31–41)	44 ± 2 (41–46)	110 ± 21^c (75–145)	0.583 ± 0.111 (0.423–0.698)	0.004 ± 0.004^c (0.002–0.009)
Controls, $n=36$ (1.1–19.9 years)	99 ± 19 (66–156)	36 ± 8 (16–56)	39 ± 16 (17.9–80.1)	0.513 ± 0.116 (0.199–0.875)	0.019 ± 0.008 (0.006–0.036)

OTC, ornithine transcarbamylase; ASS, argininosuccinate synthetase; ASL, argininosuccinate lyase; NOx^- , nitrite/nitrate; ADMA, asymmetric dimethylarginine; LPI, lysinuric protein intolerance. Data are presented as mean \pm SD and range. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ vs. controls. In the control group, no significant correlation was found between the age and the variables.

表2 Correlation (*r* values) in pairs of variables in children with urea cycle defects

Deficiency	Arginine vs.	Arginine vs.	Citrulline vs.	Citrulline vs.	NOx ⁻ vs.
	NOx ⁻	ADMA	NOx ⁻	ADMA	ADMA
OTC	0.99 ^b	-0.47	0.08	-0.14	-0.39
ASS	-0.75	0.55	-0.97 ^a	0.93 ^a	-0.96 ^a
ASL	0.67	-0.75	-0.98 ^a	0.99 ^a	-0.75

OTC, ornithine transcarbamylase; ASS, argininosuccinate synthetase; ASL, argininosuccinate lyase; NOx⁻, nitrite/nitrate; ADMA, asymmetric dimethylarginine.

^a *p* < 0.05, ^b *p* < 0.01 (Pearson's correlation test).

表3 Blood levels of amino acids, NOx and ADMA in citrin-deficit children

	Arginine (μmol/L)	Ornithine*** (μmol/L)	Citrulline** (μmol/L)	NOx ⁻ (μmol/L)	ADMA (μmol/L)	Ammonia (μg/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4 Levels of urinary biomarkers for oxidative stress, anti-oxidant enzyme activities in erythrocytes and blood vitamin E level in citrin-deficit children

	8-OHdG*** (ng/mg Cr)	Acrolein-lysine** (nmol/mg Cr)	SOD* (U/mg prot)	Cat* (pmol/mg prot)	Vitamin E** (mg/dl)
13 patients	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
32 controls	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

8-OHdG; urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; SOD: superoxide dismutase; Cat, catalase; Cr, creatinine

Presented data are mean (SD) values and ranges.

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

图 1. Urea cycle and NO pathway

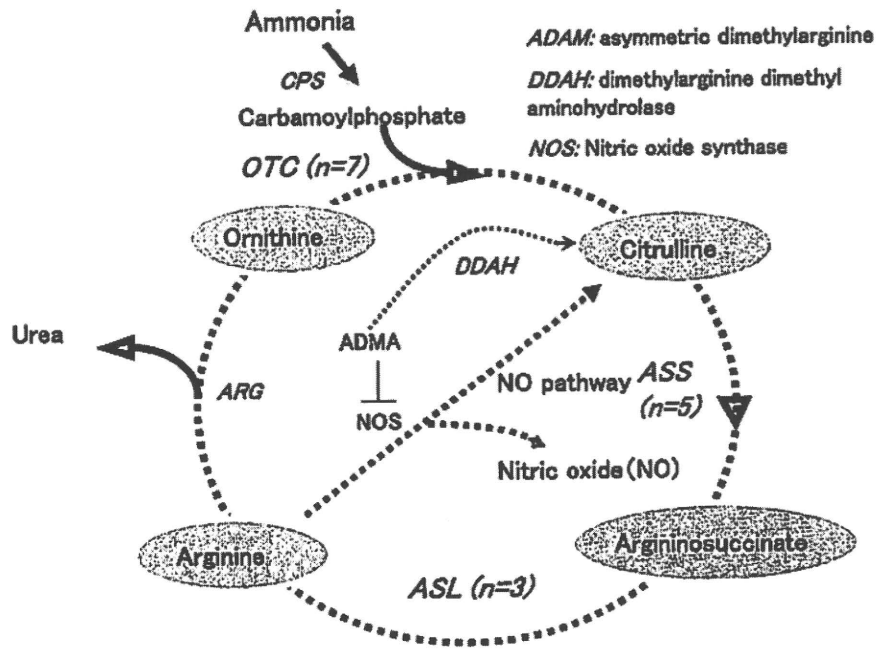
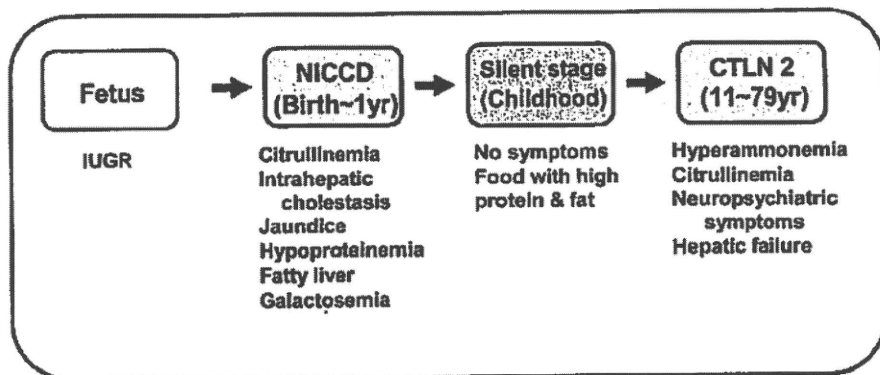


图 2. Clinical course of citrin deficiency



We examined the profiles of amino acids, carbohydrates, and lipids, NO synthesis, and the status of oxidative stress.

図3. NOx and ADMA concentrations in urea cycle defects

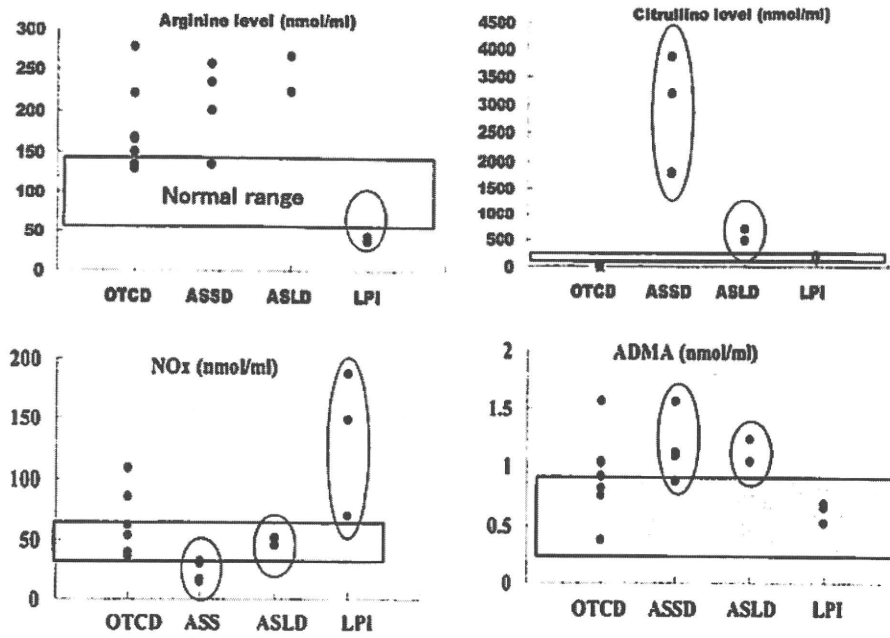


図4. Biomarkers in congenital portosystemic venous shunt

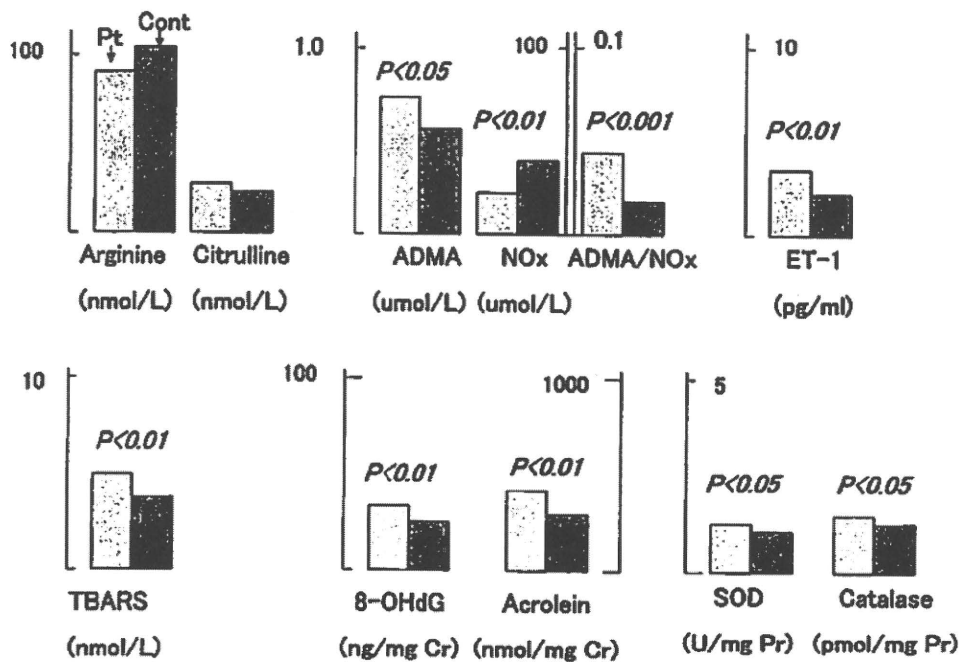


图5. Structure of eNOS and molecular mechanism for co-productions of NO and superoxide

