

んぱく質量30%) では若干体重が増加したが、食事摂取量には大きな変化はなかった。続いて AIN-93M を投与すると再び摂食量と体重の減少を起こした。

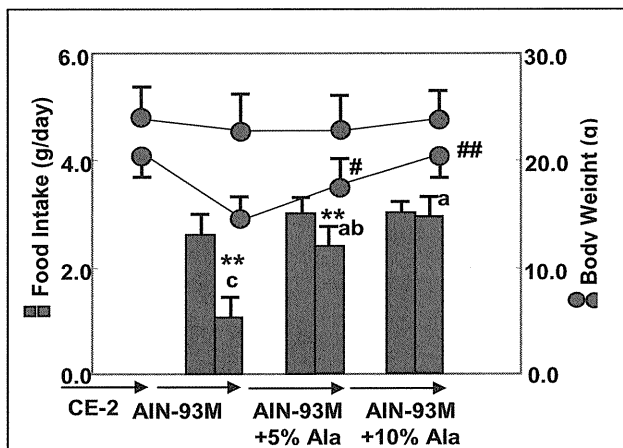


図2. AIN-93Mによる体重減少と摂食量低下に対するAlaの効果

青はmGPD-KO赤はdouble-KOマウスを示す。有意差# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ はAIN-93M投与時の体重との比較を示す。** $p < 0.01$ vs mGPD-KOマウス食事摂取量。同じアルファベット間には有意差なし(食餌摂取量間のANOVA解析)。

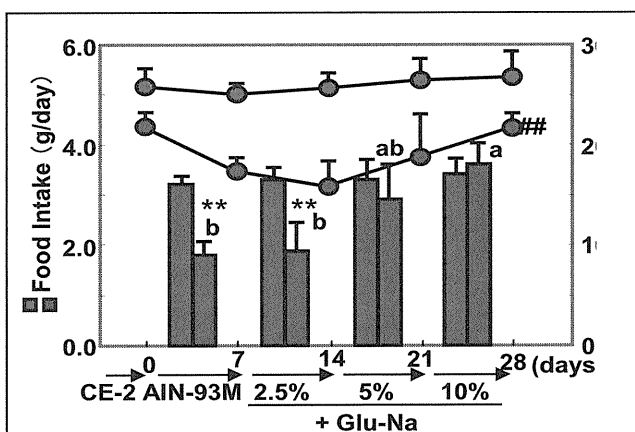


図3. AIN-93Mによる体重減少と摂食量低下に対するGlu-Naの効果

青はmGPD-KO、赤はdouble-KOマウスを示す。有意差# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ はAIN-93M投与時の体重との比較を示す。** $p < 0.01$ vs mGPD-KOマウス(食餌摂取量)。同じアルファベット間には有意差なし(食餌摂取量間のANOVA解析)。

2) AlaとGlu-Naの効果

そこで、カゼインの成分アミノ酸の効果を検定した。すでに他の方法で有効性を確認していたAlaをAIN-93Mに添加した結果、図2に示すように5%~10%の添加でカゼインと同様の効果を得た。同様の効果はGlu-Naの添加によっても得ることができた(図3)。他のアミノ酸については検討していない。Glycineなどは大量に投与するとそれ自体で血中アンモニアが生じる可能性がある。

3) Pyr-Naの効果

Pyr-Naは、すでにCtrn-KOマウスの灌流肝における塩化アンモニウムからの尿素合成を活性化する(Moriyama et al. J Hepatol 2006;44:930-938)ことが知られており、臨床的にも効果がある(Mutoh et al. Inherit Metab Dis 2008;Suppl2:S343-347)ことが判明しつつある。そこで、この系においても有効かどうかを検定した。図4に示すようにPyr-Naの10%添加で摂食量の増加と体重の正常化をもたらした。

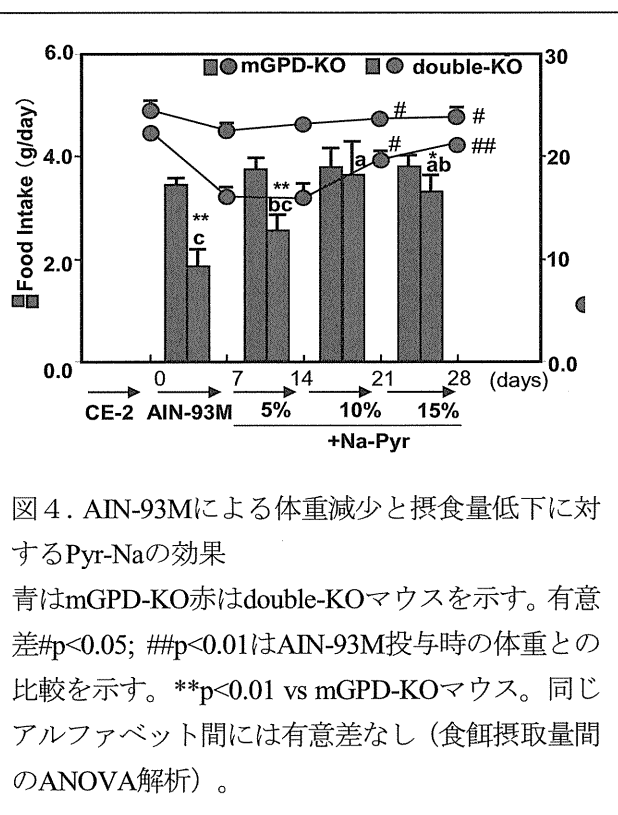


図4. AIN-93Mによる体重減少と摂食量低下に対するPyr-Naの効果

青はmGPD-KO赤はdouble-KOマウスを示す。有意差# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ はAIN-93M投与時の体重との比較を示す。** $p < 0.01$ vs mGPD-KOマウス。同じアルファベット間には有意差なし(食餌摂取量間のANOVA解析)。

4) 脂質の効果

シトリン欠損症患者はたんぱく質と同時に脂質の摂取比率も高い。そこで、この系に、オリーブオイル、ラード、魚油、中鎖トリグリセロド (MCT) などを6%の割合で添加した。その結果を図5に示す。長鎖脂肪酸を成分とするオリーブオイル、ラード、魚油 (data, not shown) はなんらの効果も示さなかったが、MCTの添加は摂食量の増加と体重の増加をもたらした。

5) 経口ショ糖投与による肝代謝異常へのPyr-Na、Ala、Glu-Na、MCTの効果の比較

Pyr-Na、Ala、Glu-Na、およびMCTは、AIN-93Mによる食餌摂食量と体重の減少を回復させる効果があったので、それがショ糖投与による肝代謝異常に対してどのような効果を示すのか、またその相互の比較を目的として25%ショ糖溶液に上記物質を混じり、比較検討した。

① ショ糖による肝内G3P濃度上昇への効果比較
 ショ糖投与による最も顕著な肝代謝異常はG3Pの著しい増加である。図6に示すように、ショ糖投与による著しいG3Pの上昇は、Pyr-Naの投与でdouble-KOマウスの生食投与のレベルよりも低下し、wtのレベルに近づき、高いG3P低下能力を

示した。2種のアミノ酸は、G3Pレベルを生食投与のレベルにまで低下させ高い効果が得られている。一方、MCTは変動が大きく、有意には低下効果を示していない。しかし、個々のデータでは低下も観察された。

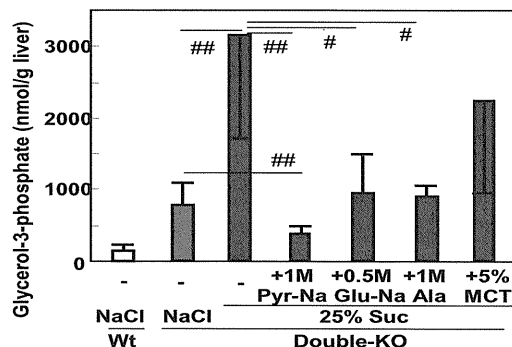


図6. ショ糖による肝内G3P上昇に対するPyr-Na、アミノ酸、およびMCTの効果
 白はwtマウスを、赤はdouble-KOマウスを示す。NaCl投与に比し、ショ糖 (Suc)投与でG3Pレベルが上昇するが、Pyr-Naなどの同時投与でG3P上昇が抑制されていることを示す。
 #p<0.05; ##p<0.01.

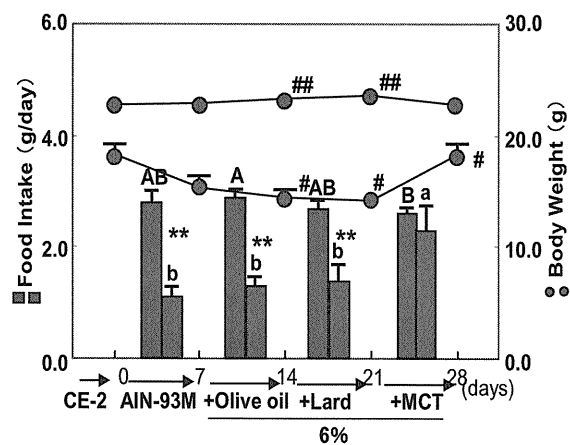


図5. 摂食量と体重変化に対する脂質の効果
 青はmGPD-KOを、赤はdouble-KOマウスを示す。
 **p<0.01 vs mGPD-KOマウスの摂食量; #p<0.05; ##p<0.01 vs AIN-93Mの体重。同種マウス間の摂食量の比較はANOVA解析により、同じアルファベット間には有意差はない。

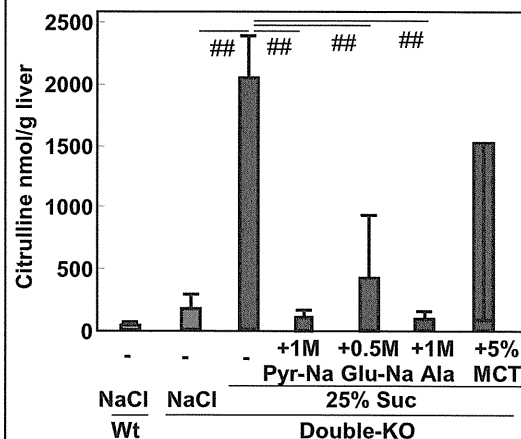


図7. ショ糖による肝内citrulline上昇に対するPyr-Na、アミノ酸、およびMCTの効果
 白はwtマウスを、赤はdouble-KOマウスを示す。
 ##p<0.01.

② ショ糖による肝内citrulline濃度上昇への効果
 ショ糖投与によって尿素合成はarginino-succinate synthetaseのレベルで阻害され、citrullineが蓄積する。このcitrullineレベルへの効果を比較した(図7)。Pyr-Na、アミノ酸はほぼ同様にcitrulline濃度を生食投与レベルまで低下させたが、MCTの効果は変動が大きく有意な効果とは判定できなかった。

③ ショ糖投与による肝内citrate濃度低下への効果比較

ショ糖投与によってTCAサイクル中間体濃度は高いレベルから低いレベルに低下する。Pyr-Naはショ糖の投与によって低下したcitrateレベルを有意に上昇させたが、他のアミノ酸、およびMCTにはそのような効果は観察されなかった(図8)。

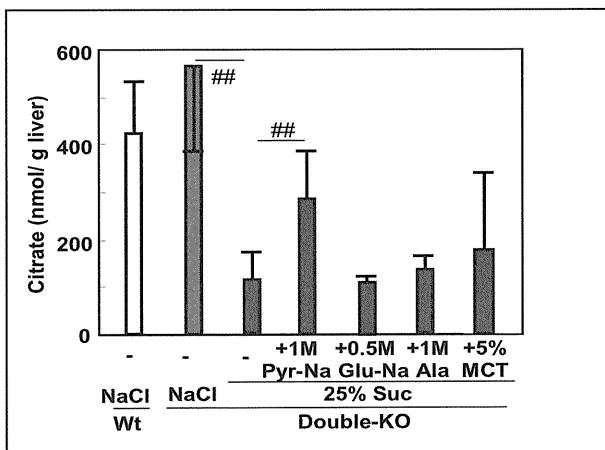


図8. ショ糖による肝内citrate上昇に対するPyr-Na、アミノ酸、およびMCTの効果
 白はwtマウスを、赤はdouble-KOマウスを示す。
^{##}p<0.01.

④ ショ糖投与による肝内lysine濃度低下への効果比較

Double-KOマウス肝内のlysine (Lys)濃度がショ糖投与によって上昇することはメタボローム解析で得られた結果である。更なる解析結果は、Lysからsaccharopineの反応が阻害されていることを示していた。ショ糖投与によって上昇したLys濃度はPyr-Naによって生食投与およびwtマウスレベルまで低下したが、2種のアミノ酸では有意な効果は観察されず、MCT投与では有意の低下が観察された(図9)。

D. 考察

シトリン欠損症に観察される特異な食癖は、シトリン欠損症の病態、および治療を考える上において非常に大きく重要な意味を持っている。糖質摂取を嫌う食癖は糖質によって高アンモニア血症などの病態を引き起こすことを意味し、本研究でも食餌摂取が抑制され、摂取不足によって成長障害や痩せを引き起こしていることが明確となった。さらには、たんぱく質・脂質に富む食事・食品を好むことは、食事・食品に含まれるたんぱく質や脂質が糖質の毒性を緩和していることによることが本研究で明らかとなった。その作用点はまだ明確ではないが、すでにその効果が明らかとなっているPyr-Naとの比較で、2種のアミノ酸、MCT、Pyr-Naは明らかに作用点異なることを示唆している。すなわち、G3P濃度に関してはPyr-Naの効果が一番大きく、アミノ酸群はそれに次ぐが、MCTには効果が見られなかった。Citrullineレベルに関してはPyr-Naとアミノ酸の

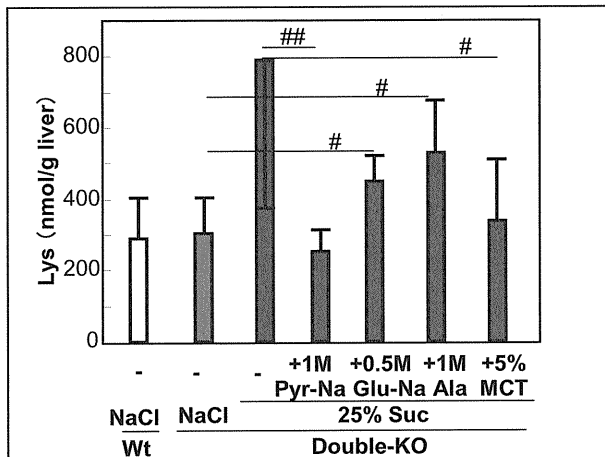


図9. ショ糖による肝内Lys上昇に対するPyr-Na、アミノ酸、およびMCTの効果
 白はwtマウスを、赤はdouble-KOマウスを示す。
[#]p<0.05; ^{##}p<0.01

作用は同等で、MCTには効果がなかった。しかし、Lysレベルに関しては、Pyr-NaとMCTに効果があり、アミノ酸では有意な効果が出なかった。Pyrの作用点は、乳酸脱水素酵素反応による細胞質NADHの酸化によるNAD⁺の再生である。この他、Pyrは直接ミトコンドリアに入り、エネルギー源となることが考えられる。事実citrate濃度はPyr-Naによって増加した。一方、AlaとGlu-NaによるG3Pやcitrullineレベルの低下作用の機構は不明である。Alaはアミノ基転移によってPyrを生成するが、citrate濃度の上昇はあまり起していない。Gluは肝臓でも肝小葉の中心静脈周辺perivenous領域の肝細胞には取り込まれるが、周辺部periportal領域の肝細胞には取り込まれない。しかし、もうひとつのアミノ酸のAlaと同等の作用を示している。このことから、これらアミノ酸が肝臓以外で作用している可能性も考えられる。一方、MCTは腸管内で分解された後、門脈から直接肝臓に取り込まれ、調節を受けず、脂肪酸酸化系で代謝されるので、エネルギー源としては大きな作用を持つと考えられる。しかし、直接、NADHの酸化を起すとは考えにくく、実際にG3Pの濃度低下は有意には低下させていない。しかし、個々のデータを見ると明らかに低下したデータもあることから何らかの作用がある可能性があること、さらには何らかの他の因子の関与も考えられる。もっとも興味ある現象は肝内のLys濃度を有意に低下させていることである。高アンモニア血症における血漿Lysの増加に関してはすでにKamoun et al.(*J Inherit Metab Dis.* 2002;25:1-6)が、□□ ketoglutaratのavailabilityの低下による、と報告している。この現象の意味するところ、「□□ ketoglutaratのavailabilityの低下」とは何かについては検討する必要があるが、MCTには他の有効因子とは異なる作用点がある可能性を示唆している。

E. 結論

シトリン欠損症における糖質毒性の機構のひとつは、高糖質食に対する忌避の結果として食事

摂取量の低下があり、それは体重減少につながり、成長障害や痩せを引き起こすことを、シトリン欠損症モデルマウスを用いて明らかにした。その治療には、たんぱく質、その成分としてのアミノ酸、ならびに脂質のひとつ、MCT、が有効であることが判明した。さらにそれらの作用点は現在、臨床研究が行われているPyr-Naの作用とは異なると考えられる結果を得、これらの結果を応用できれば、今後のシトリン欠損症治療に役立つものと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S, Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13, *Mol Genet Metab* 2012 in press
- 2) Nakamura M, Yazaki M, Kobayashi Y, Fukushima K, Ikeda S, Kobayashi K, Saheki T, Nakaya Y, The characteristics of food intake in patients with type II citrullinemia, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 7(3):239-245, 2011.
- 3) Saheki T, Inoue K, Ono H, Tushima A, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Kuhara T, Ohse M, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Kobayashi K. Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite perturbations in citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human citrin deficiency." *Mol Genet Metab* 104(4):492-500, 2011.
- 4) Song YZ, Deng M, Chen FP, Wen F, Guo L, Cao SL, Gong J, Xu H, JiangGY, Zhong L, Kobayashi K, Saheki T, Wang ZN. Genotypic and phenotypic features of citrin deficiency: five-year experience in a Chinese pediatric center. *Int J Mol Med.* 28(1):33-40, 2011.
- 5) Ushikai M, Horiuchi M, Kobayashi K, Matuda S, Inui A, Takeuchi T, Saheki T. Induction of PDK4 in the heart muscle of JVS mice, an animal model

- of systemic carnitine deficiency, does not appear to reduce glucose utilization by the heart. *Mol Genet Metabol* 102(3):349-355,2011.
- 6) Fu HY, Zhang SR, Wang XH, Saheki T, Kobayashi K, Wang JS, The mutation spectrum of the SLC25A13 gene in Chinese infants with intrahepatic cholestasis and aminoacid-emia, *J Gastroenterol* 46(4):510-518, 2011.
- 7) Pardo B, Rodrigues TB, Contreras L, Garzón M, Llorente-Folch I, Kobayashi K, Saheki T, Cerdan S, Satrustegui J, Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation, *J Cereb Blood Flow Metab* 31(1):90-101, 2011.
- 8) 大浦敏博、呉重雄、菊池敦生、坂本修、重松陽介、岡野善行、小林圭子、佐伯武頼、シトリン欠損症マス・スクリーニングの可能性、*日本先天代謝異常学会雑誌* 27(1)42-45, 2011
2. 学会発表
- 1) 菊池敦生、市野井那津子、坂本修、大浦敏博、佐伯武頼、小林圭子、松原洋一、呉繁夫「シトリン欠損症の簡便・迅速な遺伝子診断法の確立」第53回日本先天代謝異常学会、第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム 幕張、2011年11月
- 2) 佐伯武頼、井上可奈子、小野裕実「シトリン欠損症の研究（1）モデルマウス肝病態のメタボローム解析」第53回日本先天代謝異常学会、第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム 幕張、2011年11月
- 3) 佐伯武頼、井上可奈子、小野裕実、桂菜摘、横川茉奈、吉積由加里「シトリン欠損症の研究（2）マウスモデルを用いる治療法の開発」第53回日本先天代謝異常学会、第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム 幕張、2011年11月
- 4) Saheki T, Kobayashi K, Overview of Citrin Deficiency: Pathophysiology and therapy for citrin deficiency based on the mouse model analysis, *The AASPP International Symposium on Citrin Deficiency in Matsumoto, Matsumoto* Oct 2011
- 5) 佐伯武頼、成人発症II型シトリン血症 (CTLN2) の治療法は他の高アンモニア血症治療とはまったく異なる、*JDDW福岡* 2011年10月
- 6) Saheki T, Kobayashi K, Pathophysiology of Citrin Deficiency, a liver-type mitochondrial aspartate glutamate carrier, deficiency and development of therapeutics-Analysis using a mouse model-, 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Beijing, August, 2011
- 7) Saheki T, Overview of citrin deficiency: SLC25A13 mutations and frequency Pathophysiology and therapy of citrin deficiency judging from analysis of the model mice-, *The AASPP-Seminar on Citrin Deficiency in Chengdu, China,* June, 2011
- 8) 佐伯武頼、小林圭子、「シトリン欠損症の発見から治療法開発まで」第7回近畿先天代謝異常研究会、大阪、2011年6月
- 9) 佐伯武頼、小林圭子「成人発症II型シトリン血症における糖質等発症誘発因子の作用機構—モデルマウスの解析から—」第47回日本肝臓学会総会ワークショップ1、東京、2011年6月
- 10) 佐伯武頼、井上可奈子、小野裕実、小林圭子「モデルマウスを用いたシトリン欠損症の肝代謝病態とピルビン酸ナトリウムの治療効果」、第58回日本実験動物学会総会、東京、2011年5月
- 11) Saheki T, Kobayashi K, Pathophysiology and treatment of deficiency of citrin, liver-type aspartate glutamate carrier: A lesson from the mice model, *Bari Symposium on the Celebration of Professor Dr. Ferdinando Palmieri Retirement, Bari, Italy, May 2011.*
- 12) 佐伯武頼、井上可奈子、小野裕実、桂菜摘、

横川茉奈、吉積由加里、小林圭子、「Citrin
欠損症における糖質の毒性とたんぱく質（ア
ミノ酸）・脂質の治療効果」、第14回日本
病態栄養学会シンポジウム、横浜2011年
1月

13) 佐伯武頼、井上可奈子、津島杏弥、小野裕
実、小林圭子、「モデルマウスを用いるシト
リン欠損症治療法の開発（1）カゼイン水解
物の有効性」、第14回日本病態栄養学会、
横浜2011年1月

14) 井上可奈子、小野裕実、津島杏弥、桂菜摘、
横川茉奈、吉積由加里、佐伯武頼、小林圭
子、「モデルマウスを用いるシトリン欠損
症治療法の開発（2）有効アミノ酸の同定」、
第14回日本病態栄養学会、横浜2011
年1月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) シトリン欠損症の治療薬「ピルビン酸ナトリ
ウム」 「特願2004-214483」（登
録決定）

成人型シトルリン血症患者の臨床像と治療戦略

研究分担者 池田修一 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
共同研究者 矢崎正英 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究要旨:成人型シトルリン血症(CTLN2)患者の臨床像と治療戦略を明らかにするために、自験例 31 名(男性 17 名、女性 14 名)の臨床像と治療内容について後方視的に検討した。初発年齢は平均 38.9±15 歳(12-73 歳)であった。30 名に飲酒や糖質を嫌う食嗜好が認められたが、73 歳発症の患者では、飲酒も可能であり、特異な食癖は顕著ではなかった。治療に関しては、15 名で肝移植を施行。12 名で肉親者をドナーとする生体肝移植、1 名でドミノ移植を施行した。また最近、内科的治療法に抵抗性を示した 2 名において、国内で脳死体肝移植を施行した。内科的治療としては、低炭水化物食による食事療法、アルギニン製剤と、ピルビン酸ナトリウムの投与を導入した。ピルビン酸ナトリウムに関しては、これまで 12 名の患者に施行している。これら内科的治療法により、上記の脳死体肝移植を施行した 2 名以外は、脳症の発作頻度も激減して、経過良好である。以前は、本症と確定診断後早期に肝移植を提唱していたが、病態に即した内科的治療法も確立されてきており、現在では、食事療法・アルギニン製剤・ピルビン酸ナトリウム投与などの内科的治療法を試みた上で、治療抵抗性の患者に対して肝移植を施行すべきと考えている。

A. 研究目的

成人型シトルリン血症(CTLN2)は、ミトコンドリアのシトルリン蛋白の欠損あるいは機能不全に起因し、肝性脳症を引き起こす疾患である。ほとんどの患者で、糖質や飲酒を嫌い、高蛋白・高脂質食を好むという特異な飲食に対する嗜好が知られている。これまで、本症に対する治療は、肝移植が主体であったが、近年食事療法、内服治療を含めた内科的治療法も確立されてきている。今回、自験例 CTLN2 患者の臨床像と治療経験を検討し、当科における治療戦略について報告する。

B. 研究方法

1990 年以降、当科に入院加療歴のある本症患者 31 名(男性 17 名;女性 14 名)の臨床像と治療内容を検討した(表)。CTLN2 の診断は、高アンモニア血症に伴う脳症症状の存在と、*SLC25A13* 遺伝子解析結果に基づいて行った。

(倫理面での配慮)

遺伝子解析については、全例インフォームド・コンセントを得て施行した。ピルビン酸ナトリウムの投与に関しては、信州大学医学部倫理委員会で承認を得たのち、患者と家族に十分な説明を行い、本人(あるいは代諾者)の同意を得て投与した。

C. 研究結果

初発年齢は平均 38.9±15 歳(12-73 歳)であった。ほとんどの患者で意識障害(異常行動含めた)であったが、1 名で統合失調症、2 名でうつ病として加療されていた。発症誘因が比較的明らかな患者は、3 名(飲酒 1 名、腎不全食 2 名)であった。30 名に飲酒や糖質を嫌う食嗜好が認められたが、73 歳発症の患者では、飲酒も可能であり、特異な食癖は顕著ではなかった。脳症以外の臨床像としては、全例で脂肪肝を認め、7 例(22.5%)で脳症発症以前に膵炎の罹患歴が認められた。2 例(6.5%)に肝臓癌の合併、同じく 2 例で多発のう胞腎による慢性腎不全を併発している。また 1 名(11 歳)で神経性食思不振症・成長障害を合併した。

治療に関しては、15 名で肝移植を施行。12 名で肉親者をドナーとする生体肝移植、1 名でドミノ移植を施行した。また最近、以下に示す内科的治療に抵抗性を有した 2 名で、国内で脳死体肝移植を施行した。内科的治療としては、低炭水化物食による食事療法(食事の炭水化物熱量を 45%-40%)、アルギニン製剤(3-12g/日)と、4 年前からピルビン酸ナトリウムの投与(3-15g/日)を導入した。ピルビン酸ナトリウムに関しては、これまで 12 名の患者に施行している。これら内科的治療法により、上記の脳死体肝移植を施行した 2 名以外は、脳症の発作頻度も激減して、経過良好である。これまで、肝移植非施行患者 5 名が死亡しているが、特にピルビン酸ナトリウム導入以後は、死亡例はな

い。

D. 考察

本症の臨床像は多様性に富んでおり、脳症発症以前に、膵炎、脂肪肝、肝臓癌、神経性食思不振症を併発する。本症と多発のう胞腎との関連性は明らかではないが、腎機能低下に対しての蛋白制限食が発症誘因となっていた可能性がある。高齢発症患者では、本症に特異な食癖は目立たず、また飲酒も可能であり、高齢発症の肝性脳症患者には、本症の可能性についても注意が必要である。

以前は、本症と確定診断後、早期に肝移植施行することを提唱していたが、最近病態に即した内科的治療法も確立されてきており、現在では、ラクツロースやカナマイシンなどの経口抗生剤投与に加えて、食事療法・アルギニン製剤・ピルビン酸ナトリウム投与などの内科的治療法を試みた上で、治療抵抗性の患者に対して肝移植を施行すべきと考えている。これまで、肉親者に生体ドナーが存在しない患者を如何に救命するかが問題であったが、脳死体肝移植における本症の医学的緊急度も、近年みなおされてきており、国内で脳死体肝移植をうけるという選択肢も加わった。

E. 結論

本症の臨床像は非常に多様であり、発症年齢も広い範囲にわたっていた。

高齢発症患者では、必ずしも特異な食嗜好が目立たない場合もある。

肝移植については、炭水化物制限による食事療法・アルギニン製剤・ピルビン酸ナトリウム投与などの内科的治療法を試みた上で、治療抵抗性の患者に対して施行すべきである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura M, Yazaki M, Kobayashi Y, Fukushima K, Ikeda S, Kobayashi K, Saheki T, Nakaya Y: The characteristics of food intake in patients with type II citrullinemia. J Nutr Sci Vitaminol 57, 239-245, 2011

矢崎正英、池田修一、小林圭子、佐伯武頼.

成人型シトルリン血症の治療—低炭水化物食と経

口ピルビン酸投与の有効性 臨床神経学

2010;50:844-847

2. 学会発表

Ikeda S. A rare manifestation of he patients with citrin deficiency: chronic pancreatitis and hepatic cancer. The AASPP-International Symposium on Citrin Deficiency, 松本、2011

Yazaki M, Ikeda S. Therapeutic approaches for patients with adult onset type II citrullinemia (CTLN2)-low carbohydrate diet and oral administration of sodium pyruvate. The AASPP-International Symposium on Citrin Deficiency, 松本、2011

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 成人型シトルリン血症31名のまとめ

	性	発症年齢	変異	初発症状	発症誘因	BMI	食嗜好	飲酒	肺炎	肝癌	脂肪肝	慢性腎不全	肝移植	アルギニン製剤	Na-Pyr	予後(肝移植後年数)
1	M	24	VI	意識障害		18.4	+	-	-	-	+	-	+	-	-	生存(16)
2	M	44	VVI	意識障害		17.1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	生存(15)
3	F	23	VII	意識障害		15.1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	生存(14)
4	F	12	VII	うつ症状		15.7	+	-	-	-	+	-	+	-	-	生存(13)
5	F	17	VII	てんかん		23.6	+	-	-	-	+	-	+	-	-	生存(12)
6	M	20	VI	意識障害		18.8	+	-	+	-	+	-	+	-	-	生存(11)
7	F	51	VII	意識障害		21.5	+	-	-	-	+	-	+	-	-	生存(10)
8	M	32	IV/IV	意識障害	飲酒	18	+	-	-	-	+	-	+	+	-	生存(7)
9	F	40	IV/IV	意識障害		16.2	+	-	-	-	+	-	+	+	-	生存(7)
10	M	47	VII	意識障害		16.1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	生存(6)
11	M	35	IXXXVII	意識障害		18.1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	生存(6)
12	F	45	VI	意識障害		20.3	+	-	-	-	+	-	+	+	-	生存(4)
13	M	29	不明	意識障害		19.7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	死亡
14	M	25	VII	意識障害		20.6	+	-	+	-	+	-	-	+	-	死亡
15	F	39	VII	意識障害		14.8	+	-	-	+	+	-	-	+	-	死亡
16	M	25	IIXXII	幻覚		14.9	+	-	+	-	+	-	-	+	-	死亡
17	M	50	II/II	意識障害		22	+	-	-	+	+	-	-	+	-	死亡
18	M	42	VV	意識障害		18.6	+	-	-	-	+	-	-	+	-	生存
19	M	65	IVXVI	意識障害		17.7	+	-	-	-	+	-	-	+	-	生存
20	M	51	IV	意識障害		22.3	+	-	-	-	+	-	-	+	+	生存
21	M	48	VI	意識障害		16.6	+	-	-	-	+	-	-	+	+	生存
22	M	52	VII	意識障害		16	+	-	-	-	+	-	-	+	+	生存
23	F	47	VII	意識障害		21.3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	生存(2)
24	F	49	II/IV	意識障害	腎不全食?	22.3	+	-	+	-	+	+	-	+	+	生存
25	M	38	IIXXIX	意識障害		17.6	+	-	-	-	+	-	-	+	+	生存
26	F	54	II/II	意識障害		16.9	+	-	-	-	+	-	-	+	+	生存
27	F	28	VII	うつ症状		20.2	+	-	-	-	+	-	+	+	+	生存(1)
28	F	73	VII	意識障害		14.7	-	+	-	-	+	-	-	+	+	生存
29	M	38	IVQ357R	意識障害		14.7	+	-	-	-	+	-	+	+	+	生存(8ヵ月)
30	F	11	IXIX	食欲不振, 成長不良		11.9	+	-	-	-	-	-	-	+	+	生存
31	F	54	II/II	意識障害	腎不全食?	15.7	+	-	-	-	-	+	-	+	+	生存
平均		39.9				18										
SD		15				2.84										

SLC25A13遺伝子変異番号: Tabata et al. J Hum Genet 2008;53:534-45; Na-pyr: sodium pyruvate; BMI: body mass index

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
（分担）研究報告書

シトリン欠損症の簡便・迅速な遺伝子診断法の確立～遺伝子スクリーニングの可能性～

研究分担者 大浦敏博（東北大学医学部非常勤講師、仙台市立病院小児科）

研究要旨

シトリン欠損症は SLC25A13 遺伝子の異常による疾患で、NICCD（シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症）と CTLN2（成人型シトルリン血症 2 型）の年齢依存性の二つの臨床病型が存在する。臨床像は多彩で、検査データの異常も一過性であることが多く、確定診断には遺伝子診断が不可欠である。今回我々は日本人患者における 11 種類の高頻度変異の有無を約 1 時間で簡便に解析する方法を開発したので報告する。本法を用いれば、変異を持つ遺伝子の約 95%を診断することが可能である。新生児マス・スクリーニングへの導入に関しては発症前診断となるため、倫理的問題も含め未解決の問題が残されている。

研究協力者

呉 繁夫、菊池敦生、坂本 修（東北大学小児病態学分野）

小林圭子、佐伯武頼（鹿児島大学大学院医化学分野）

A. 研究目的

シトリン欠損症には図 1 に示すようにシトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症（NICCD）とシトルリン血症 II 型（CTLN2）の二つの病型が知られている。NICCD は新生児マス・スクリーニング陽性を契機に診断されたり、肝障害や黄疸などの症状で発見されることが多い。また CTLN2 は成人期以降に意識障害や高アンモニア血症で発症する。NICCD は多くの場合 1 歳頃までに一旦症状が改善し、見かけ上健康な状態になるが、糖質を好まない特徴的な食癖がみられ、易疲労感、低血糖、膵炎などの症状を訴える患者も報告されている。典型的な

状、検査データが揃えば診断は比較的容易

であるが、検査値の異常は数ヶ月で改善することが多く、診断には遺伝子解析が不可欠であった。今回我々はシトリン欠損症の迅速・簡便な遺伝子解析法の開発を目的に研究を行った。

B. 研究方法

シトリン欠損症には表 1 に示すように比較的頻度の高い変異が報告されている。この 11 種類の変異の有無をスクリーニングすることで変

図1:シトリン欠損症の臨床像

NICCD	見かけ上健康	CTLN2
新生児～乳児		11～79才
黄疸、胆汁うっ滞 肝障害、脂肪肝 凝固障害、Cit ↓ 低蛋白血症 NBS陽性(40%) 肝移植	特異な食癖 豆類を好む 糖質を好まない 無症状(?) 易疲労感 低血糖、膵炎 高脂血症、肝癌	意識障害 失見当壊 精神症状、脂肪肝 NH ₃ ↑, Cit ↓ PSTI ↓ 肝ASS活性低下 予後不良、肝移植

NICCD: シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症

CTLN2: 成人発症 II 型シトルリン血症

Cit: シトルリン、NBS: 新生児マススクリーニング、NH₃: アンモニア

PSTI: 膵分泌性トリプシンインヒビター、ASS: アルギニノコハク酸合成酵素

異を持つ遺伝子の95%が診断可能である。今回我々は Real-time PCR 法を用いた解析手法に Hybprobe (Roche) という蛍光フォーマットを組み合わせ、融解温度曲線を解析することで変異を検出した。解析には LightCycler®を用い、一つのチューブに入れたまま約1時間で解析が終了できる。

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学大学院医学系研究科及び鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の倫理委員会の承認を得た。検体採取にあたっては保護者に文書で説明後、書面で同意を取得した。

C. 研究結果

この簡便・迅速診断法の信頼性を確かめるために、鹿児島大学ですでに遺伝子診断された患者50名のDNAを解析した。その結果、結果は完全に同一であった。また、患者26名のろ紙血を用いてDNAを抽出し、遺伝子検査を行ったところ変異の検出は可能であった。

D. 考察

今回新しく開発した簡便・迅速なシトリ

ン欠損症の遺伝子診断法は信頼性の高い検査法であることが証明された。表1に示す11種類の高頻度変異をスクリーニングすることで、患者の変異アレルの95%が検出される。両方のアレルもしくは一方のみの変異が検出される確率はそれぞれ90.4%、9.3%である。両方のアレルに変異が検出できない確率は0.3%以

表1:シトリン欠損症の遺伝子検査～日本人高頻度変異～

変異番号	遺伝子変異	変異部位	アレル頻度
I	c.851delGTAT	Exon 9	32.8%
II	c.1018+1G>A	Intron 11	36.3
III	c.1638ins23	Exon 16	4.6
IV	c.674V>A	Exon 7	3.3
V	c.1230+1G>A	Intron 13	9.8
XIX	g.IVS16ins3kb	Intron 16	4.4
VI	c.1799-1800insA	Exon 17	4.6
VII	c.1813C>T	Exon 17	
VIII	c.1801G>T	Exon 17	
IX	c.1801G>A	Exon 17	
XXI	c.1793T>G	Exon 17	
			計 95.9%

Tabata et al. J Hum Genet. 2008;53(6):534-45.

下であり、この遺伝子検査法は臨床的に有用であると考えられた。

420名の健康な成人からのDNAを用いて検索を行ったところ、10名のヘテロ保因者が同定された。Carrier rateは1/42であり、シトリン欠損症の推定頻度は1/7,100となり従来の頻度(1/17,000)より高い結果であった。母集団が420と少なく統計的な処理は不可能であるが、地域による偏りも考慮すべきであろう。

シトリン欠損症の遺伝子解析の対象者を表2に示した。症状よりNICCDやCTLN2が疑われた患者を対象に遺伝子解析を行い(High risk スクリーニング)、確定診断された場合は、積極的に栄養療法・薬物療法などの治療介入が出来るため患者にとっては極めて有益である。今回ろ紙血から直接抽出したDNAを用いても、変異の検出は可能であった。このことは新生児ろ紙血を用いたDNAスクリーニングが技術的に可能

であることを意味する。発症前にシトリン欠損症と診断されることの利点としては①食事療法(低炭水化物食)、薬物療法(ピルビン酸Na)によりCTLN2の発症予防が期待できる、②禁忌薬物(グリセオール、高カロリー輸液)使用を避けることができる、③CTLN2を発症した場合にも適切な対応ができる等があげられる。一方、欠点としては①遺伝子変異を持つ人が全員将来発症するかどうか不明であること、②将来CTLN2を発症することへの不安、精神的ストレス、③保険加入、就職・結婚に際しての不安等がある。症状発現前に遺伝子診断を行うに当たっては、遺伝カウンセリングを行い病気の説明のみならず、利点、欠点についても十分説明を

表2:シトリン欠損症の遺伝子スクリーニングの対象

- High riskスクリーニング
原因不明の胆汁うっ滞症、肝障害
 - 家族内検索
家族がシトリン欠損と診断された場合。
 - 化学診断スクリーニングで陽性(未発症)
一過性高シトルリン血症
 - 新生児マススクリーニング
新生児期に診断された場合、治療介入が可能か?
- 1、2、3はおそらく問題ないが、4に関しては時期尚早

行ったうえで同意を取得することが重要である。

E. 結論

11 種類の高頻度変異を簡便・迅速に遺伝子診断できる方法を開発した。NICCD や CTLN2 を疑われた患者の診断確定に極めて有用な方法である。一方、発症前の患者の遺伝子診断にあたっては十分な説明と同意取得が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

大浦敏博、呉繁夫、菊地敦生、坂本修、重松陽介、岡野善行、小林圭子、佐伯武頼. シトリン欠損症マス・スクリーニングの可能性. 日本先天代謝異常学会雑誌 2011 年;27 巻 1 号:42-45. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by

screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. Mol Genet Metab. 2012 Jan 8. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

菊池敦生、市野井那津子、坂本修、大浦敏博、佐伯武頼、小林圭子、松原洋一、呉繁夫. シトリン欠損症の簡便・迅速な遺伝子診断法の確立—感度のさらなる改善と 2 年間の運用実績について—. 第 53 回日本先天代謝異常学会 千葉 平成 23 年 11 月 24 日

大浦敏博 タンデムマス対象疾患と陽性者への対応

分野別シンポジウム タンデムマスを導入した新しい新生児スクリーニング

第 114 回日本小児科学会学術集会 東京 平成 23 年 8 月 13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

一酸化窒素合成系に関連する生体マーカーを用いた病態評価と治療への応用

研究分担者：塚原宏一（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学・准教授）

研究協力者：山田睦子、林 優子、藤井洋輔（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学）川谷正男（福井大学医学部小児科）、松原康策（西神戸医療センター小児科）

梶 俊策（津山中央病院小児科）、長坂博範（宝塚市立病院小児科）

研究要旨：ヒトの生体制御において一酸化窒素（NO）をとりまく L-arginine / NO 合成酵素 / NO 系と PRMT / ADMA / DDAH 系の相互作用は重要である。本研究の目的はシトリン欠損症などの小児疾患において NO-ADMA 系が偏倚し、そのことが病像の多様性と重篤な合併症を導くかどうか、一方、NO-ADMA 系に介入することで疾患の予防や治療が可能になるかどうか検討することである。

結果：小児、成人における血清 ADMA、NO_x、8-OHdG の基準値が設定された。それらの結果に基づいて、生体マーカーの高値基準が設定された。その高値基準を用いて川崎病の急性期で NO、ADMA 両系が活性化し、酸化ストレスが亢進していることが示された。他の疾患群についても検討がなされたが、酸化ストレス亢進と合併症発生が関連する可能性が示された。シトリン欠損症、先天性肝内門脈-静脈シャントの検討では、肝機能低下が酸化ストレス亢進、血管内皮機能不全をもたらすことが示唆された。8-OHdG については迅速診断が可能であり、実地臨床に生かせることが示された。結論：血清 NO_x、ADMA、8-OHdG 濃度の基準値が設定された。これらの生体マーカーの計測により小児疾患の NO-ADMA 系、酸化ストレス環境が低侵襲的に経時的に評価できることが示された。

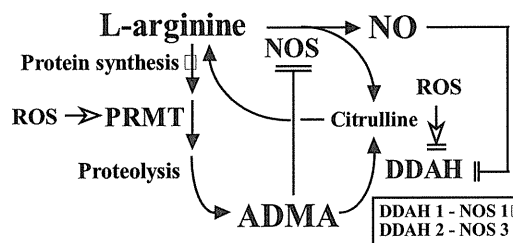
A. 研究目的

ヒトの生体制御において、一酸化窒素（NO）をとりまく L-arginine / NO 合成酵素 / NO 系と protein-arginine methyltransferase (PRMT: タンパク質中の L-arginine 残基をメチル化する酵素) / asymmetric dimethylarginine (ADMA: 内因性の NO 合成阻害因子) / dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH: ADMA を特異的に分解する酵素) 系の相互制御は重要と考えられる。

これらの系を追究することは、複雑な生体ネットワークの生物学的理解をさらに進めるだけでなく、多様な疾患群の予防・治療、身体機

能維持、QOL 向上を目指した新規の効果的な管理法の開発につながると期待される。

上記の NO-ADMA 系は、肝臓だけでなく腎臓、血管などの重要臓器において尿素サイクル・アミノ酸代謝系を介しながら、好氣的解糖、酸化的リン酸化、タンパク質合成にも関連すると想定される。



本研究の目的は、シトリン欠損症などの小児疾患においてNO-ADMA系が偏倚し、そのことが病像の多様性と重篤な合併症を導くかどうか、一方、NO-ADMA系に介入することで疾患の予防や治療が可能になるかどうか検討することである。

B. 研究方法

(1) 血清 NO_x、ADMA 濃度について健常者検体を用いて基準値を設定した。NO_x、ADMA は Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay (Cayman Chemical)、ADMA-ELISA (DLD Diagnostics) を用いて計測した。結果は平均±SD (範囲) で表し、統計は t-test を用いて $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

(2) 血清 8-OHdG 濃度について健常者検体を用いて基準値を設定した。8-OHdG は高感度 8-OHdG check (Institute for the Control of Aging) を用いて計測した。結果は平均±SD (範囲) で表し、統計は t-test を用いて $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

(3) 血清 NO_x、ADMA、8-OHdG 濃度の高値基準を対照計測値の (平均+1.5SD) 以上として求めた。また、脳脊髄液 (CSF) 8-OHdG、acrolein-lysine 濃度の高値基準も同様の方法で求めたが、各々8-OHdG check (Institute for the Control of Aging)、ACR Lysine-ELISA (NOF Corporation) にて計測した本研究者の過去の研究成果を用いた (Tsukahara H, et al. Redox Rep 2000; Tsukahara H, et al. Life Sci 2002)。

(4) 血清 NO_x、ADMA、8-OHdG 濃度の高値基準を用いて、4名の川崎病患者 (① 9 か月男性、② 1 歳 6 か月男性、③ 2 歳 4 か月女性、④ 5 歳 1 か月男性) の NO-ADMA 系、酸化ストレス環境を評価した。

(5) 「早期メチルプレドニゾロンパルスが無効であった痙攣重積型 HHV-6 脳症の 1 歳女児」 (岩田あや他、小児神経学会、米子)、「可逆性脳梁膨大部病変を有する脳症 (MERS) を合併した急性巣状細菌性腎炎の 6 歳男児」 (岡崎新太郎他、小児感染症学会、福井) で報告された患

者の血清、CSF 検体中の生体マーカー濃度を評価した。

(6) 種々の神経疾患患者 (19 人; 男性 10 人、女性 9 人) の血清検体中の生体マーカー濃度を評価した。

(7) 尿素サイクル異常に属するシトリン欠損症の患者 (乳児期に“肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎”を起こした後、現在は軽度の高シトルリン血症を呈するのみで見かけ上健常である) を対象に検討を加えた。

(8) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈シャントの患者を対象に検討を加えた。

(9) 酸化ストレスマーカー計測の迅速化 (ベッドサイド検査への応用) は実地臨床の上で重要である。8-OHdG については小型迅速検査機器 (Techno Medica) があり、100 μ l の検体量で計測できる。その有用性を評価した。

<倫理面への配慮>

被験者の保護者に研究の目的と内容を詳しく説明し、同意が得られた方のみを対象にした。検体はすべて暗号で表示しなおしてから検査を開始した。データ保存についても個人が特定されないように十分に配慮した。

C. 研究結果

(1) 健常者は成人 (9 名、男性/女性=6/3)、小児 (20 名、男性/女性=9/11) であった。血清 NO_x (μ M)、ADMA (μ M)、ADMA/NO_x は成人で 33.4 ± 16.2 (18.1~65.3)、 0.53 ± 0.13 (0.40~0.75)、 0.020 ± 0.012 (0.007~0.041)、小児で 38.2 ± 19.8 (18.1~65.3)、 0.69 ± 0.10 (0.40~0.75)、 0.024 ± 0.012 (0.006~0.060) であり、ADMA でのみ小児が成人よりも有意に高値であった。小児で性別比較したが、男性で 38.4 ± 17.3 、 0.69 ± 0.09 、 0.021 ± 0.009 、女性で 38.0 ± 22.5 、 0.69 ± 0.12 、 0.026 ± 0.017 であり、両群間に差はなかった。

(2) 健常者は成人 (10 名、男性/女性=5/5)、小児 (17 名、男性/女性=10/7) である。血清 8-OHdG (ng/ml) は成人で 0.15 ± 0.08 (0.03~

0.26)、小児で 0.19 ± 0.07 (0.09~0.34) であり、両群間に差はなかった。小児で性別比較したが、男性で 0.20 ± 0.08 、女性で 0.18 ± 0.05 であり、両群間に差はなかった。

(3) 血清 NO_x、ADMA、8-OHdG 濃度、CSF 8-OHdG、acrolein-lysine 濃度の高値基準は下記の通りであった。

- ・血清 NO_x $\geq 67.9 \mu\text{M}$
- ・血清 ADMA $\geq 0.84 \mu\text{M}$
- ・血清 8-OHdG $\geq 0.30 \text{ ng/ml}$
- ・CSF 8-OHdG $\geq 3.4 \text{ ng/ml}$

(Tsukahara H, et al. Redox Rep 2000)

- ・CSF Acrolein-lysine (ACR) $\geq 7.0 \mu\text{M}$
(Tsukahara H, et al. Life Sci 2002)

(4) 4名の川崎病患者であるが、① 9か月男性の発症4(治療直前)、6、13日目の血清 NO_x (μM)、ADMA (μM)、8-OHdG (ng/ml)、CRP (mg/dl) は 41.2、0.67、0.19、7.7; 144.0、1.08、0.24、8.8; 70.4、1.29、0.37、0.2 (ADMA/NO_x は 0.016、0.008、0.018) であった。② 1歳6か月男性の発症5(治療直前)、7、14日目の各値は 42.1、0.62、0.23、11.4; 89.6、1.21、0.66、5.4; 47.8、0.80、0.24、1.1 (ADMA/NO_x は 0.015、0.014、0.017) であった。③ 2歳4か月女性の発症7(治療直前)、9、17日目の各値は 50.3、0.61、0.14、16.5; 55.7、1.03、0.28、11.2; 98.1、0.87、0.22、0.1 (ADMA/NO_x は 0.012、0.018、0.009) であった。④ 5歳1か月男性の発症6(治療直前)、8、20日目の各値は 42.7、0.67、0.11、22.7; 64.2、0.78、0.33、19.5; 68.6、0.96、0.25、0.1 (ADMA/NO_x は 0.016、0.012、0.014) であった。経過中、全例で NO_x、ADMA 濃度、3例(75%)で 8-OHdG 濃度が高値を示した。

(5) 「痙攣重積型脳症の女兒」は入院前日に発熱して約3分間の全身痙攣をきたし、入院当日に再び全身痙攣をきたしてジアゼパム、チアミラル静注により約40分後に頓挫した患者である。入院当日、WBC $3,000/\mu\text{l}$ 、CRP 0.6 mg/dl で、頭部 CT、髄液検査で異常所見はなかった。血液中に HHV-6 が $48 \times 10^2 \text{ copies/ml}$ で検出さ

れた。入院当日よりメチルプレドニゾロンパルス療法を施行したが、入院5日目の MR 拡散強調画像で前頭葉・頭頂葉白質に高信号領域、EEG で全般性に高振幅徐波が見られ、その後、脳萎縮と著明な発達遅滞をきたした。入院当日の血清 NO_x、ADMA、8-OHdG、CSF-ACR は $21.7 \mu\text{M}$ 、 $1.18 \mu\text{M}$ (高値)、 0.46 ng/ml (高値)、 $7.8 \mu\text{M}$ (高値)、入院5日目の血清 NO_x、ADMA、CSF-ACR は $27.7 \mu\text{M}$ 、 $0.77 \mu\text{M}$ 、 $13.7 \mu\text{M}$ (高値) であった。

「MERS の男児」は入院前日に発熱して、入院当日に意識障害、不穏状態をきたした患者である。入院当日、WBC $22,800/\mu\text{l}$ 、CRP 14.7 mg/dl で、髄液検査で異常所見はなかった。MR 拡散強調画像で脳梁と皮質下白質に左右対称性に高信号領域が見られ、高振幅徐波が断続的に出現していた。尿培養で腸球菌が検出され、入院5日目の造影 CT、入院11日目の DMSA シンチにより急性巣状細菌性腎炎と診断された。抗生剤を静脈内投与した。入院4日目に意識は清明になった。3か月後に撮影された MR 拡散強調画像では異常所見は認められなかった。入院当日の血清 NO_x、ADMA、CSF-ACR は $16.1 \mu\text{M}$ 、 $0.56 \mu\text{M}$ 、 $5.6 \mu\text{M}$ であった (高値は見られなかった)。

(6) それぞれの疾患とその患者の血清 NO_x、ADMA 濃度 (ともに μM) を示す。ADEM (13歳女性) 27.3 、 0.56 、脳出血 (11月女性) 32.6 、 0.51 、無菌性髄膜炎 (3歳男性; 9歳男性) 13.2 、 0.57 ; 9.5 、 0.68 、てんかん (4歳男性; 7歳男性; 7歳男性; 13歳女性) 69.7 (高値)、 0.66 ; 36.4 、 0.57 ; 78.4 (高値)、 0.77 ; 25.6 、 0.53 、点頭てんかん (6月女性) 54.6 、 0.76 ; 胃腸炎関連けいれん (1歳男性; 4歳女性) 67.9 (高値)、 0.52 ; 141 (高値)、 0.60 ; 熱性けいれん (1歳男性; 1歳女性; 2歳女性) 62.4 、 0.81 ; 19.0 、 0.66 ; 22.5 、 0.55 、良性乳児けいれん (1歳男性) 40.3 、 0.58 、解離性障害 (9歳女性; 13歳女性) 20.0 、 0.59 ; 16.8 、 0.55 ; A型インフルエンザ (せん妄) (13歳男性) 13.2 、 0.45 ; 急性脳症 (1歳男性) 68.1 (高値)、 0.48 であった。脂肪酸代謝異常スクリーニング検査で異常

を呈したものはなかった。

(7) シトリン欠損症の患者では対照と比べて（平均値のみ表示）、血中 NO_x、ADMA に差はないが、血中コレステロール (213 対 169 mg/dL)、酸化型 LDL (82 対 25 U/L)、SOD (1.49 対 1.06 U/mg protein in RBC)、catalase (3.60 対 2.96 pmol/mg protein in RBC)、尿中 ACR (481 対 272 nmol/mg Cr)、8-OHdG (67 対 19 ng/mg Cr) が有意に高かった。

(8) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈シャントの患者では対照と比べて（平均値のみ表示）、血中 ADMA (0.82 対 0.63 μM)、ADMA/NO_x (0.052 対 0.023)、ET-1 (3.0 対 1.9 pg/ml) が有意に高く、NO_x (22 対 30 μM) が有意に低く、血中 TBARS (5.0 対 3.9 mM)、尿中 ACR (331 対 255 nmol/mg Cr)、8-OHdG (26 対 19 ng/mg Cr) が有意に高かった。シャント率は血中 ADMA、ADMA/NO_x と有意な正の相関を示した。

(9) 急性白血病患児では尿中 8-OHdG が異常高値を示し、頸部リンパ節腫脹を呈する良性疾患との鑑別の点でも有用であった（日本小児科学会）。また、重症インフルエンザ脳症（死亡）の脳脊髄液では 5.5 ng/ml と対照 (<0.5 ng/ml) に比較して著しい高値を示した。

D. 考察

研究 (1)、(2) では、小児、成人における血清 ADMA、NO_x、8-OHdG の基準値が設定された。小児では健常でも血清 ADMA 濃度が高いことに注意する必要がある。研究 (3) では、それらの結果に基づいて高値基準が設定された。研究 (4) では、その高値基準を用いて急性血管炎症候群（または全身性炎症反応症候群：SIRS）の代表である川崎病患者の NO-ADMA 系、酸化ストレス環境が評価され、この疾患の急性期で NO、ADMA 両系が活性化し、酸化ストレスも亢進していることが明らかになった。

研究 (5)、(6) では、各種神経疾患について検討がなされた。重い合併症を残した「痙攣重積型脳症の女児」でのみ病初期の ADMA 濃度が高かった。この患者では血清 8-OHdG、CSF 中 ACR

濃度も高く、酸化ストレス亢進と合併症発生が関連することが示唆された。これらのマーカーにより神経疾患の合併症発生が予知できる可能性が示唆された。

研究 (7)、(8) では、肝機能低下により酸化ストレスが亢進すること（肝臓がレドックス制御の重要臓器であること）が示された。シトリン欠損症患者の約 1/10 は成人期に重篤な肝障害（脂肪肝、線維化）、精神神経障害（てんかん、意識障害、統合失調症、うつ病）を発症する。患者では乳児期以降の silent phase でも脂肪代謝障害、酸化ストレス亢進が存在することが示されたが、そのことが成人期の再発症の機序と関連すると考えられた。また、先天性肝内門脈-静脈シャントの患者を対象にした検討では、シャント自体が NO-ADMA 系での ADMA 優位、酸化ストレス亢進、血管内皮機能不全をもたらすことが示唆された。

研究 (9) では、8-OHdG の迅速検査が実地臨床で有用である可能性が示された。

E. 結論

血中 NO_x、ADMA、8-OHdG 濃度の基準値が設定された。これらの生体マーカーの計測により、小児疾患の NO-ADMA 系、酸化ストレス環境が低侵襲的に経時的に評価できることが例示された。8-OHdG については迅速検査への道が開かれた。今後も疾患対象を増やして検討を進めたい。

なお、今回計測された生体マーカーはヒト以外の動物にも使用でき、動物モデルを用いた Translational Research に有用である。この方面の研究も開始する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kawatani M, Tsukahara H, Mayumi M. Evaluation of oxidative stress status in children with pervasive developmental disorder and attention deficit hyperactivity disorder using urinary-specific biomarkers. Redox Rep 16: 45-6, 2011.

- (2) Nagasaka H, Yorifuji T, Takatani T, Okano Y, Tsukahara H, Yanai H, Hirano K, Hui SP, Hirayama S, Ito T, Chiba H, Miida T. CD36 deficiency predisposing young children to fasting hypoglycemia. *Metabolism* 60: 881-7, 2011.
- (3) 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* 29: 737-43, 2011.
- (4) 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* 103: 220-5, 2011.
- (5) Tsukahara H, Fujii Y, Hayashi Y, Morishima T. Multiple biomarkers for oxidative stress in patients with brain disorders. *J Neurol Sci* 313: 196, 2012.
- (6) Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, Ishida T, Washio K, Miyamura T, Yamashita N, Oda M, Morishima T. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2012.

2. 学会発表

- (1) 山本倫子, 塚原宏一, 宮村能子, 鷺尾佳奈, 藤井洋輔, 中村亮介, 森島恒雄. 小児血液腫瘍患者における尿中 8-Hydroxy-deoxyguanosine 排泄の計測. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 (8 月) .
- (2) 八代将登, 藤井洋輔, 斉藤有希恵, 長岡義晴, 津下 充, 山下信子, 塚原宏一, 松川明博, 森島恒雄. インフルエンザ感染におけるレドックス制御蛋白チオレドキシン (TRX) の治療効果. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 (8 月) .
- (3) 塚原宏一, 吉本順子, 宮島悠子, 長岡義晴, 林 優子, 山田睦子, 山下信子, 長坂博範, 森島恒雄. 酸化ストレスマーカーの臨床応用 - 最近の進歩. 第 23 回腎とフリーラジカル研究会, 徳島, 2011 年 (10 月) .
- (4) 塚原宏一. 酸化ストレスの生体マーカー - 最近の進歩. 第 43 回小児感染症学会学術集会, 岡山, 2011 年(10 月).
- (5) 塚原宏一. 小児科領域におけるレドックスマーカー検査の現況. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山, 2011 年 (11 月) .

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
シトリン欠損症の実態調査と診断方法および治療法の開発
（分担）研究報告書

シトリン欠損症の遺伝カウンセリングツールの開発

研究分担者 玉置（橋本）知子 兵庫医科大学 遺伝学教室 教授

研究要旨：シトリン欠損症はその頻度が本邦ではきわめて高く、自然歴がきわめて多様である。遺伝カウンセリングを行うための情報提供を目的とし、遺伝情報を的確に提供できるツールの整備を行った。1) 本症の基本的知識を的確に知るため、GeneReviews のシトリン欠損症の項目（Kobayashi, K and Saheki T 著）の和訳、2) up-to-date 情報を知る目的で、平成 23 年 10 月に開催された「The AASPP-international Symposium on Citrin Deficiency in Matsumoto」を DVD に記録した。本疾患に対応する臨床遺伝専門医、小児科、内科、精神科医に、この疾患の多様性の理解をはかることは「無症状期」とされる患者の診断治療を的確に行い、患者の状態を医原性に悪化させる機会を減らすことにつながると期待される。

A. 研究目的

遺伝カウンセリング：シトリン欠損症についての多面的な臨床経過・症状が岡野班研究によって明らかにされた。患者さんの今後の症状や治療・ケアやご家族の再発に関する情報を適切に伝え、悩みに応え今後に向かう自律的な決断を援助する総合的な医療サービスが遺伝カウンセリングであり、岡野班研究成果を最も必要とするのは患者さんやご家族である。よって研究成果を適切に患者さんやご家族に還元するための遺伝カウンセリングの基盤整備を分担研究の目的とした。

B. 研究方法

遺伝カウンセリング：遺伝カウンセリングについては、①遺伝カウンセリングで提供すべき情報 ②遺伝カウンセリングを担う人材の確保と教育、の両面の整備が必要である。②については、専門医認定制度による「臨床遺伝専門医」および、非医師の「認定遺伝カウンセラー」（全国で 9 大学に養成のための修士課程あり）がある。よって②により人材が少ないながらも養成されている現状を考え、本疾患情報の提供がより緊急性が高いことから、本研究では①を行った。本疾患がきわ

めて多面的であるため、遺伝カウンセリング対応には膨大な資料の読み込みが不可欠ではあるとは言っても、臨床現場では現実的ではない。よって本岡野班研究成果を臨床現場で直ちに検索できる資料集を作成した。

（倫理面への配慮）

遺伝カウンセリング：資料の収集とまとめであるため、個人情報や個人に対する倫理面の配慮は特に必要としない。遺伝カウンセリングの施行には、遺伝性疾患への偏見等の払拭につながる基本的な態度を保つことは自明である。

C. 研究結果

遺伝カウンセリング：1) 本研究班が共催にて開催したシトリン欠損症国際シンポジウム(The AASPP - International Symposium on Citrin Deficiency in Matsumoto) の内容が、シトリン欠損の多面性（頻度が低い注目すべき合併症を含む）と自然歴、治療の提案、本邦における保因者の率・遺伝子変異のタイプや診断に際する問題点を網羅し、すべて遺伝カウンセリングに必須な情報であった。しかし、内容が多岐に

わたるため、遺伝カウンセリング担当医には、受診した患者さん・ご家族に提供すべき情報の優先度が判断しがたい。よって、講演内容よりキーワード抽出し和訳、講演要旨、各講演に対するDVD記録に容易にアクセスできる資料を作成した（上記シンポジウム会長の許可を得ている）。本邦の講演者および関係学会に配布し、遺伝カウンセリングに使用する資料としていただく。

2) 英語でインターネット上に提出されているGeneReviewsは、一部の疾患には日本語訳がなされている（Gene Reviews Japan、著作権等はGRJの事務局が責任を持つ）が、本疾患については日本語訳がないため、日本語訳に着手した。しかし2012年1月、Sahekiらによって改版が提示されたため、改版の日本語訳を2012年からあらためて開始する状況となった。日本語訳終了までには未だ期間を要するが、完了後に著者の佐伯教授の確認を経て公開予定である。

D. 考察

遺伝カウンセリング：本岡野班の研究成果を、患者さん・ご家族に適切に還元するのが遺伝カウンセリングの目的である。しかし本疾患の多彩な臨床像や経過ゆえ、本疾患を専門としない担当医や臨床遺伝専門医等が直ちに最善の対応をすることは必ずしも容易ではない。本班研究の成果を簡便にまた適切に検索、使用することは、本疾患の遺伝カウンセリングの質の確保を通して患者さんご家族の福祉につながる。

E. 結論

遺伝カウンセリング：シトリン欠損症は、本邦では最も保因者頻度が高い常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性疾患であり、最も頻度が高い先天代謝異常症であることが判明した現在、正確な情報の把握と遺伝性への考慮を避けては本疾患の臨床は成立しがたい。しかし、現状では上記の認識は、明らかに不足している。患者さん・ご家族の今後の医療に向かう医療情報の整理、心理的支援、家族計画、家族の中の未発症者の検索等を通

して患者さん・ご家族が主体的にこの疾患と共生することへの支援には、遺伝カウンセリングが不可欠である。遺伝カウンセリングを担当する臨床遺伝専門医等に本岡野班研究成果を徹底することは極めて重要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. シトリン欠損症の遺伝カウンセリングに向けて—2011年AASPP国際シンポジウム The AASPP – International Symposium on Citrin Deficiency in Matsumoto 資料集—
厚労科研「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」班 編（2012年2月14日）

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

シトリン欠損症の治療法の開発
 （疾患モデルマウスを用いた食餌実験）

分担研究者 浅川 明弘
 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 社会・行動医学講座（心身内科学分野）准教授

研究要旨 シトリン欠損症における食欲低下機構について明らかにするために、シトリン欠損症のモデルマウスを用いて検討した。その結果、アラニンにショ糖の摂取を増加させる効果があり、治療に応用できる可能性が示唆された。

A.研究目的

シトリン欠損症患者は、新生児期（生後1歳まで）にNICCD（neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency）を経験し、見かけ上健康な時期を過ごし、成人期に重篤なCTLN2（成人発症II型シトリン血症）を発症する。NICCDでは多種アミノ酸血症・胆汁うっ滞・ガラクトース血症などの多彩な症状を、CTLN2ではシトリン血症と高アンモニア血症を伴う意識障害発作を引き起こす、診断が難しい疾患である。共通の症状または生活習慣は、糖質を嫌い、タンパク質・脂質に富む食事を好むという特異な食癖（図1）である。これまでの疾患モデルマウスを用いた実験結果から、シトリン欠損症では糖質投与で高アンモニア血症が起こり（図2）、糖質摂取によって食欲が低下し摂食できなくなることは明らかである。しかし、食欲低下作用の分子機構は未だ解明されていない。そこで、シトリン欠損症における食欲低下機構について明らかにすることを目的とした。

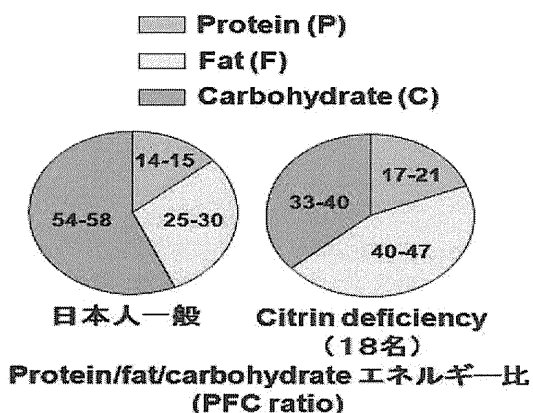


図1. シトリン欠損症の栄養摂取の特徴

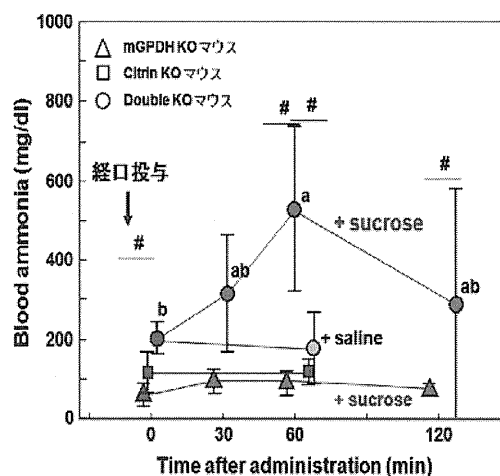


図2. Double KOマウス: Sucrose経口投与で血中アンモニア濃度上昇

B.研究方法

供試動物：次の4種類のマウスを用いた。シトリン欠損（citrin-KO；ヒトシトリン欠損症のほとんどの症状を呈さない）マウス・ミトコンドリアグリセロリン酸脱水素酵素欠損（mGPDH-KO）マウス・シトリンとmGPDH同時欠損（double-KO・citrin/mGPDH-KO；高アンモニア血症、高シトリン血症、低血糖、成長障害を呈すヒトシトリン欠損症モデル）マウス・野生型（wild）マウス
 飼料：組成の違う2種類の飼料を用いた。CE-2(P:F:C=29:13:58；343.1kcal/100g) AIN-93M(P:F:C=15:9:76；380.3kcal/100g)
 方法：実験1-5
 4種類のマウスに、20%ショ糖液と水を自由摂取させ、摂水量を比較した（実験1）。次に、糖の毒性に対してタンパク質の抑制効果を見るために、ショ糖摂取量と嗜好度に対するトリプトンの効果を検討した（実験2）。さらに、20%ショ糖溶液に添加したアミノ酸の飲用量への効果を比較した（実験3）。組成の違う飼料（CE-2とAIN-93M）の摂取量・体重への影響を検討した（実験4）。