

2. 新生児・乳児期におけるシトリン欠損症における患者調査：治療指針の作成に向けて

大阪市立大学大学院医学研究科 発達小児医学 武田 泰輔、岡野 善行

本研究に参加する患者 110 例を登録した。新生児胆汁うっ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。

3. シトリン欠損症マススクリーニングの可能性 (Feasibility of mass-screening for citrin deficiency)

仙台市立病院小児科 大浦 敏博

I. シトリン欠損症とは

シトリンは成人発症Ⅱ型シトルリン血症 (CTLN2) の原因遺伝子 *SLC25A13* の産物で、その機能はアスパラギン酸・グルタミン酸輸送体である。その後脂肪肝、特異なアミノ酸異常、ガラクトース血症を伴う新生児肝炎例においても本遺伝子異常が報告され、CTLN2 と異なる臨床像であることよりシトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) と命名された。シトリン欠損症とはこのように年齢依存性の二つの異なる臨床病型をもつ疾患で、わが国での頻度は約 1/17000 である。

II. 現行の新生児マススクリーニング (NBS) での発見例

75 例の NICCD 症例の後方視的解析では、現行の NBS でガラクトース、メチオニンやフェニルアラニン陽性を契機に発見された症例が 30 例 (40%) 存在した。NBS 陽性例で胆汁うっ滞、肝障害を認める場合は NICCD を疑う必要があるが、発症例の約 40% を発見出来るにすぎない。

タンデムマス法を用いたスクリーニングの場合は、最も鋭敏であるシトルリン値を指標に使うことが出来る。しかし、この方法でも発見率は 1/80000 であり、予想される頻度の 1/4 程度である。生化学的検査法の問題点は異常は一過性であり、必ずしも新生児期に上昇していないことである。

III. 治療法の進歩～早期診断の重要性

シトリンの機能が明らかとなり、肝細胞質内の NADH を増加させる高カロリー輸液やグリセオール投与は禁忌であること、飲酒や過剰な糖質の摂取を控え、低炭水化物食を行うことが治療、発症予防に有効であることなどが明らかとなってきた。また肝細胞質内の NADH の酸化を促すピルビン酸ナトリウムなどの開発も進められている。

シトリン欠損症は低炭水化物食事療法、薬物療法などにより CTLN2 の発症を予防できる可能性が出てきた。また、病気のことを知っておくことで、間違った食事を避け、禁忌となる薬剤の誤投与を防ぐことが出来る。その意味でシトリン欠損症を早期に診断することは、有意義であると考えられる。

IV. DNA testing

我々は Real-time PCR 法を用いて 6 種類の高頻度変異を簡便にスクリーニングするシステムを開発した。この方法を用いれば、患者の変異アレルの 91% が検出可能となる。従って、本症患者の約 80% は両アレルの遺伝子変異が検出され、確定診断可能と推察される。残り約 20% の患児は一方のアレルのみ変異が検出され、保因者との鑑別が問題となる。この場合、臨床症状の有無、他のスクリーニングの結果 (メチオニン、フェニルアラニン、ガラクトース、シトルリンなど) を合わせて判断するのが实际的であろう。また、患児の約 1% は両アレルとも高頻度変異を持たないため、本法では検出出来ない。DNA testing は発症前診断も可能であるため、有効性ととも倫理的問題も含めて検討しなくてはならない課題である。

共同研究者：呉 繁夫、菊池敦生、坂本 修 (東北大学小児病態学分野)；岡野善行 (大阪市立大学発達小児医学)；重松陽介 (福井大学医学部小児科)；小林圭子 (鹿児島大学大学院医化学分野)；佐伯武頼 (徳島文理大学健康科学研究所)

4. 慢性肝炎で発見されピルビン酸ナトリウムを投与し良好な経過が得られているシトリン欠損症の1例

- 1) 済生会横浜市東部病院 こどもセンター 肝臓・消化器部門
- 2) 東邦大学大森医療センター 小児科

乾あやの 1)、 藤澤知雄 1),2)

症例は8歳の女児。主訴は原因不明の肝機能異常。出生歴：在胎40週、2,440g、正常分娩にて出生。新生児黄疸は通常の経過。新生児マススクリーニングで異常は指摘されていない。既往歴：1～4歳、痙攣発作があり、てんかんと診断され抗痙攣薬を内服した。2歳から腹痛あり、5歳に先天性胆道拡張症と診断され、外科的切除術を行ったが、腹痛が軽快せず、反復性の膵炎を合併し身長伸びも悪かった。この頃よりトランスアミナーゼ(AST>ALT)の異常と低血糖発作(血糖値20～30mg/dl)がみられ、内分泌学的には異常は認められなかった。その後も同様の経過が続くため、8歳時に紹介となった。身長11.2cm(-2.1SD)、体重21.7kg(-0.9SD)、AST 84 IU/l、ALT 80 IU/l、GGT 210 IU/lであった。肝生検では新犬山分類でA2F3であり、電子顕微鏡検査では肝細胞質に極微小脂肪滴がみられた。食癖からシトリン欠損症を疑い、その後の検査で、シトルリン67.9nmol/ml、セリン/スレオニン=2.2、PSTI 303.1 ng/mlと判明し、遺伝子診断にて確定診断に至った。その後、ピルビン酸ナトリウム200mg/kg/dの内服を開始し、13歳の現在、肝機能は正常化し、身長は150cm(-0.8SD)、体重48kg(+0.2SD)、低血糖発作もなく、経過は良好である。

5. シトリン欠損症 (NICCD) の肝移植例の検討

大阪府立母子保健総合医療センター 位田 忍

症 例

【生後 3 ヶ月男児 (現在 8 歳)】

【主訴】遷延性の黄疸

【現病歴】

入院後 10 日で、PT の低下 (40%)、浮腫、低蛋白血症 (Alb 2.8) の進行を認めた。T-bil 7.8 / D-bil 5.3、血漿交換を週 3 回、80 日間施行も生後 6 ヶ月時、高チロシン血症分類不能型、肝不全のため生体肝移植となった。その後、生後 1 歳 3 ヶ月時 (2001/08/16)、SLC25A13 遺伝子変異検索でシトリン欠損症 (NICCD) と診断された。

入院時の肝機能や止血能、初期治療のソリタ T3 の輸液、ビタミン剤、脂肪製剤の投与は同時期に経験し肝移植をしなかった他の 3 症例と変わりなかった。

但し、胆汁うっ滞に対する脂肪制限の目的もあり、入院後に栄養を糖質の多い成分栄養剤のエレンタール P 中心に変更したことが、他の症例と異なり、さらにその後の感染症に罹患し、高カロリー輸液も行っていった。

【考察】

成分栄養剤や高カロリー輸液がシトリン欠損症 (NICCD) の増悪因子である糖分負荷となり、細胞質での NADH の上昇をきたし病状を進行させた可能性が考えられた。さらにその後の感染症も増悪因子であった可能性はある。表 1 に仙台市立病院小児科の大浦らのデータを示すが、シトリン欠損症患者は脂質が多く糖質の少ない食事を好み、この食事が本疾患に対して有益であると考えられる。本症例を経験した当時はそのような事実がわかっておらず、今までの胆汁うっ滞型肝機能障害の治療として糖質負荷が多くなったことが、肝不全進行の原因の一つと考えられた。

6. 成人型シトルリン血症の臨床像と治療—低炭水化物食と経口ピルビン酸の有効性

1)信州大脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究分担者：池田修一 1)

研究協力者：矢崎正英 1)

I.はじめに

成人型シトルリン血症(CTLN2)は、SLC25A13 遺伝子異常による肝型 aspartate-glutamate carrier (AGC) であるシトルリンの欠損に起因する常染色体劣性遺伝性疾患である(1,2)。本疾患には肝移植療法が奏功することが報告され、これまでに多くの患者が救命されている(3)。しかしドナー不足の問題などで、全員が平等に移植治療を受けることができず、現在食事療法含めた肝移植以外の治療法の確立が急務とされている。

今回、CTLN2 の臨床像と治療について、自験例での結果を基に報告する。

II 患者と臨床像

当院で経験した 26 名の CTLN2 患者の臨床像、治療について検討した。

患者の内訳は、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%)で肝癌を併発した。

26 名中、5 名が脳症の悪化による脳浮腫により死亡し、1 名が肝癌の全身転移で死亡している (全例肝移植未施行)。

III 治療について

1) 肝移植療法

当院では、1995 年から現在まで 12 名の患者に対し生体部分肝移植療法を施行してきた(3,4)。全例で術前認められた神経症状は術後消失した。

2) 非肝移植療法

食事療法 (低炭水化物食)

過去のシトルリン欠損患者の食事調査から、蛋白・脂質・炭水化物の熱量比(PFC 比)が $19 \pm 2\%:44 \pm 5\%:37 \pm 7\%$ であり、一般日本人の PFC 比($14-15\%:25-30\%:54-58\%$)に比べて、明らかに炭水化物を嫌忌していることが報告されている(5)。以前は食事中的蛋白を一日 40-50g に制限する病院肝臓食(肝不全食)を適用していた。その結果、食事中的炭水化物含量が著しく増加し(PFC 比 $10\%:15\%:75\%$)、病態を悪化させる可能性がある。自験例でも、病院肝臓食で脳症を頻回に起こしていた 51 歳男性患者に、低炭水化物・高脂肪食 (PFC 比 $15\%:40\%:45\%$) としたところ、血漿アンモニア値も低下し、脳症のコントロールが良好となった患者を経験している(6)。この結果をふまえて現在は、少なくとも PFC 比で、炭水化物比を 40-50%程度に制限する炭水化物制限食を推奨している(6)。これまで 10 名の患者に炭水化物を制限する食事を導入したが、肝癌の転移で死亡した患者を除いては、死亡患者は出

ていない。

3) 経口ピルビン酸ナトリウム

最近、肝細胞に蓄積した NADH を再酸化させる目的で(7)、ピルビン酸ナトリウムの有効性が着目されており、実際にモデルマウスや 13 歳の小児患者での有効性も報告されている(7,8)。しかしながら、成人患者での有効性は明らかではない。当科では、これまで 6 名の患者に対して、信州大学医学部倫理委員会の承認と、患者と家族への十分な説明と同意取得後に、4-9g/日の投与を行い、その有効性について検討中である。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。

IV まとめ

病因・病態が明らかになるにつれ、炭水化物制限による食事療法、あるいはピルビン酸ナトリウム療法などのシトリン欠損病態に則した治療法が確立されつつある。またこれまでの研究で本症患者にグリセロール投与が禁忌であることを明らかにすることもできた(9)。今後、これらの内科的治療法で、多くの患者が肝移植療法を回避できるように、有効性・安全性など検討していきたいと考えている。

文献

- 1) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, et al. The gene mutation in adult-onset type II citrullinemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nature Genet* 22: 159-163, 1999
- 2) Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, et al: Citrin and aralar1 are Ca^{2+} -stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J* 20: 5060-5069, 2001
- 3) Ikeda S, Yazaki M, Takei Y, et al: type II (adult onset) citrullinemia: clinical pictures and the therapeutic effect of liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 663-670, 2001
- 4) Yazaki M, Ikeda S, Takei Y, et al: Complete neurological recovery of an adult patient with type II citrullinemia after living related partial liver transplantation. *Transplantation* 62: 1679-1684, 1996
- 5) Saheki T, Kobayashi K, Terashi M, et al. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects. *J Inherit Metab Dis* 31:386-394,2008
- 6) Fukushima K, Yazaki M, Nakamura M, et al. Conventional diet therapy for hyperammonemia is risky in the treatment of hepatic encephalopathy associated with citrin deficiency. *Intern Med* 49:243-247,2010
- 7) Moriyama M, Li MX, Kobayashi K, et al. Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. *J Hepatol* 44:930-938,2006
- 8) Mutoh K, Kurokawa K, Kobayashi K, et al. Treatment of a citrin-deficient patient at the early stage of adult-onset type II citrullinemia with arginine and sodium pyruvate. *J Inherit Metab Dis* 2008 (Epub ahead of print)
- 9) Yazaki M, Takei Y, Kobayashi K, et al. Risk of worsened encephalopathy after intravenous glycerol therapy in patients with adult-onset type II citrullinemia (CTLN2). *Intern Med* 44:188-195, 2005.

7. 肝硬変となったシトリン欠損による乳児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) の一例

津山中央病院小児科 梶俊策

鳥取大学周産期小児医学 村上潤、長田郁夫

大阪大学小児科 虫明聡太郎、長谷川泰浩、

大阪大学小児外科 上野豪久

【症例】5ヶ月女児【家族歴】兄が新生児マススクリーニングで高ガラクトース血症あり、NICCD発症。母乳+ラクトレス乳で栄養され軽快、現在健康。[I]851del4と[II]IVS11+1G>Aの複合ヘテロ接合体。

【本例経過】ss41w、2514gで出生。高ガラクトース血症あり母乳+ラクトレス乳で栄養。胆汁鬱滞と体重増加不良増強し生後5ヶ月時当科紹介入院。黄疸著明著明。肝5cm触知。AST 471、ALT 97、ALP 6180、T/D.Bil 24.6/15.8、PT 32%、HPT 17%、Alb 2.9、TBA 232、PIVKAlI 269、TBA 232、CMV-IgM陽性、血中多種アミノ酸(Met、Tyr、Thr、Cit)高値。兄と同じ遺伝子異常あり。

前腕骨端にくる病所見あり。MCT乳+ケトン乳(4:1)に変更し、脂溶性ビタミン、ウルソ、フェノバル等投与。適宜FFP投与。6ヶ月からピルビン酸Na、カルニチン投与。NH₃、凝固系、Alb、ChEは改善傾向に転じたが肝脾腫増強、胆汁鬱滞増強、肝生検で肝硬変所見。

(7ヶ月時 T/D.Bil 25.7/22.1)、8ヶ月時内視鏡では食道静脈拡張あるも瘤形成なし。大阪大学にて肝移植適応と判定され準備開始。その後徐々に胆汁うっ滞改善し、移植延期となりインデラル、オメプラール併用し、17ヶ月現在T/D.Bil 1.1/0.5、PT 78%、AST 240、ALT 131、肝脾腫は継続し食道静脈拡張増強軽度ありRC(+)で経過観察中。

【考察】本児は経過良好の兄と同じ遺伝子異常で同様に栄養されたが重症化した。脂溶性ビタミン欠乏所見あり、胆汁鬱滞と脂質吸収障害増悪にはCMV感染の影響が推測された。この際栄養が糖質主体に傾いたであろう事も増悪因子と思われた。NICCDの多くは一過性の経過で改善するが、感染症などによる胆汁鬱滞増強時の中鎖脂肪酸等の栄養補助管理が大切と思われた。本例ではピルビン酸Na投与開始により無症候性低血糖が生じたが、糖利用能が改善したことが推測された。

(遺伝子診断をしていただいた鹿児島大学医化学 小林圭子先生、国立西札幌病院小児科 長尾雅悦先生に
深謝いたします)

8. 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

徳島文理大学健康科学研究所 佐伯 武頼

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、
- (2) TCA サイクル中間体濃度の低下、
- (3) Citrulline 濃度の上昇に代表できる尿素合成の異常、
- (4) Saccharopine dehydrogenase (NADP)の阻害に基づく Lysine 濃度の上昇、

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える。

**The AASPP-International Symposium
on Citrin Deficiency
in Matsumoto**

October 6 - 7 , 2011

Venue: Hotel Buena Vista, Matsumoto, Japan

Local Organizing Committee

Chairman of the symposium

Shu-ichi Ikeda (Shinshu University, Matsumoto Japan.)

Takeyori Saheki (Kumamoto University, Kumamoto Japan)

Yoshiyuki Okano (Osaka City University, Osaka Japan)

Toshihiro Ohura (Sendai City Hospital, Sendai Japan.)

Scientific Secretary

Masahide Yazaki

Department of Medicine (Neurology and Rheumatology)

Shinshu University School of Medicine

3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan.

Tel: +81-263-37-2673 Fax:+81-263-37-3427

E-mail: mayazaki@shinshu-u.ac.jp

TIME SCHEDULE

October 6 (The First day)		October 7 (The Second day)	
8:50	Opening Remarks (Shu-ichi Ikeda)	8:30	Global distribution in citrin deficiency (I) (Chunhua Zhang and Hock Lock Ngu) Jian-She Wang (China) Yuan-Zong Song (China) Beom Hee Lee (Korea)
9:00	Pathophysiology of citrin deficiency (Shu-ichi Ikeda and Takeyori Saheki) Takeyori Saheki (Japan) Akio Inui (Japan) Hironori Nagasaka (Japan) Laran T. Jensen (Thailand)	9:30	Coffee Break
10:30	Coffee Break	9:50	Global distribution in citrin deficiency (II) (Kiyoshi Hayasaka and Beom Hee Lee) Hock Lock Ngu (Malaysia) Duangrurdee Wattanasirichaigoon and Suporn Treepongkaruna (Thailand) David Dimmock (USA)
10:50	Animal and Cell Model of citrin deficiency (Akio Inui and Duangrurdee Wattanasirichaigoon) Mitsuaki Moriyama (Japan) Parith Wongkittichote (Thailand)	11:00	Reminiscence of Prof. Keiko Kobayashi – Discovery of citrin deficiency (Takeyori Saheki)
11:30	Improvement of diagnostic techniques (Jian-She Wang and Yuan-Zong Song) Shigeo Kure (Japan) Chunhua Zhang (Japan) Mei Deng (China)	11:15	Closing Remarks (Shu-ichi Ikeda)
12:30	Lunch (MEDIANO, 2F)	12:00	Excursion (Bus tour to Kamikochi)
13:30	Clinical characteristics in citrin deficiency (Shigeo Kure and Kendo Kiyosawa) Toshihiro Ohura (Japan) Kyoko Kobayashi (Japan) Michiharu Komatsu (Japan) Xiang-Ran Cai (China) Shu-ichi Ikeda (Japan)		
15:10	Coffee Break and Poster discussion		
15:40	Therapeutic approaches for citrin-deficient patients (I) (Yoshimitsu Fukushima and David Dimmock) Taisuke Takeda (Japan) Kiyoshi Hayasaka (Japan)		
16:20	Therapeutic approaches for citrin-deficient patients (II) (Toshihiro Ohura and Yoshiyuki Okano) Shin-ichi Miyagawa (Japan) Yoshiyuki Okano (Japan) Masahide Yazaki (Japan)		
19:00	Congress Dinner (Hotel BuenaVista, GRANDE 3F)	19:00	Farewell Dinner (The Bright Garden Reception House)

October 6, 2011

Opening Remarks (8:50)

Shu-ichi Ikeda (Shinshu University, Japan)

Pathophysiology of citrin deficiency (*Shu-ichi Ikeda, Shinshu University, Japan and Takeyori Saheki, Kumamoto University, Japan*)

9:00 Plenary Lecture

Overview of citrin deficiency: Pathophysiology and therapy for citrin deficiency based on the mouse model analysis

Takeyori Saheki (Kumamoto University, Japan)

9:30 O-1: Food intake control in Anorexia-Cachexia syndrome

Akio Inui (Kagoshima University, Japan)

9:50 O-2: Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin- deficiency even during the silent period

Hironori Nagasaka (Chiba Children's Hospital, Japan)

10:10 O-3: Genetic suppressors in citrin deficiency

Laran T. Jensen (Mahidol University, Thailand)

10:30 Coffee Break

Animal and Cell Model of citrin deficiency (*Akio Inui, Kagoshima University, Japan and Duangrurdee Wattanasirichaigoon, Mahidol University, Thailand*)

10:50 O-4: Analysis of hepatic metabolism in CTLN2 model mouse by using perfusion system

Mitsuaki Moriyama (Osaka Prefecture University, Japan)

11:10 O-5: Functional analysis of citrin mutations using a yeast model system

Parith Wongkittichote (Mahidol University, Thailand)

Improvement of diagnostic techniques (*Jian-She Wang, Fudan University, China, Yuan-Zong Song, Jinan University, China*)

11:30 O-6: **A simple and rapid genetic test for citrin deficiency**

Shigeo Kure (Tohoku University, Japan)

11:50 O-7: **Screening of citrin-deficient patients with Mass spectrometry**

Chunhua Zhang (MILS International, Japan)

12:10 O-8: **Identification of novel SLC25A13 variation/mutations in patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency**

Mei Deng (Jinan University, China)

12:30 **Lunch (Hotel Buena Vista, MEDIANO, 2F)**

Clinical characteristics in citrin deficiency (*Shigeo Kure, Tohoku University, Japan and Kendo Kiyosawa, Nagano Red Cross Hospital, Japan*)

13:30 O-9: **Clinical presentations of patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by Citrin deficiency (NICCD) in Japan**

Toshihiro Ohura (Tohoku University, Japan)

13:50 O-10: **Fatigue and quality of life in patients with citrin deficiency during adaptation and compensation stage**

Kyoko Kobayashi (Tokyo University, Japan)

14:10 O-11: **Nonalcoholic fatty liver disease in citrin deficiency**

Michiharu Komatsu, Eiji Tanaka (Shinshu University, Japan)

14:30 O-12: **Hepatic imaging features of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: Investigation of 18 patients diagnosed by SLC25A13 gene analysis**

Xiang-Ran Cai (Jinan University, China)

14:50 O-13: **A rare manifestation of the patients with citrin deficiency: chronic pancreatitis and hepatic cancer**

Shu-ichi Ikeda (Shinshu University, Japan)

15:10 Coffee Break and poster discussion

Therapeutic approaches for citrin-deficient patients (I) (*Yoshimitsu Fukushima, Shinshu University, Japan and David Dimmock, Medical College of Wisconsin, USA*)

15:40 O-14: **Efficacy of MCT-milk in NICCD**

Taisuke Takeda (Osaka City University, Japan)

16:00 O-15: **A therapy with medium-chain triglyceride MCT-supplemented formula in citrin deficiency**

Kiyoshi Hayasaka (Yamagata University, Japan)

Therapeutic approaches for citrin-deficient patients (II) (*Toshihiro Ohura, Sendai City Hospital, Japan and Yoshiyuki Okano, Osaka City University, Japan*)

16:20 O-16: **Liver transplantation for citrullinemia type II patients - Shinshu University experience**

Shin-ichi Miyagawa (Shinshu University, Japan)

16:40 O-17: **Sodium-pyruvate therapy for citrin-deficient patients in the adaptation period**

Yoshiyuki Okano (Osaka City University, Japan)

17:00 O-18: **Therapeutic approaches for patients with adult onset type II citrullinemia (CTLN2) - low carbohydrate diet and oral administration of sodium pyruvate**

Masahide Yazaki (Shinshu University, Japan)

19:00- Congress Dinner (Hotel Buena Vista, GRANDE: 3F)

Global distribution in citrin deficiency (I) (*Chunhua Zhang, MILS International, Japan and Hock Lock Ngu, Kuala Lumpur Hospital, Malaysia*)

8:30 O-19: Citrin deficiency: commonest cause of neonatal intrahepatic cholestasis in Chinese

Jian-She Wang (Children Hospital of Fudan University, China)

8:50 O-20: Clinical spectrum of citrin deficiency: experience on a Chinese cohort of seventy-six cases

Yuan-Zong Song (Jinan University, China)

9:10 O-21: Clinical and molecular genetic characteristics of Korean patients with citrin deficiency

Beom Hee Lee (University of Ulsan College of Medicine, Korea)

9:30 Coffee Break

Global distribution in citrin deficiency (II) (*Kiyoshi Hayasaka, Yamagata University, Japan and Beom Hee Lee, University of Ulsan College of Medicine, Korea*)

9:50 O-22: Diagnosis and follow-up of patients with citrin deficiency in Malaysia

Hock Lock Ngu (Kuala Lumpur Hospital, Malaysia)

10:10 O-23,24: Study of citrin deficiency in Thailand: an infantile period

Duangrurdee Wattanasirichaigoon and Suporn Treepongkaruna
(Mahidol University, Thailand)

10:40 O-25: Lessons from North American patients

David Dimmock (Medical College of Wisconsin, USA)

Closing Remarks

11:00 **Reminiscence of Prof. Keiko Kobayashi –Discovery of citrin deficiency**

Takeyori Saheki (Kumamoto University, Japan)

11:15 **Closing Remarks**

Shu-ichi Ikeda (Shinshu University, Japan)

12:00 **Excursion (including lunch)**

Bus tour to Kamikochi, Japan Alps National Park (<http://www.kamikochi.or.jp/english/>)

Please gather at lobby before GRANDE on 3F at 11:50.

19:00 **Farewell dinner (The Bright Garden Reception House)**

We will go to the Reception House by tour-bus directly from Kamikochi.

Poster Presentation

P-1: Prenatal diagnosis of citrin deficiency: SLC25A13 gene analysis in a family with fatal proband

Xiao-Mei Tang (Jinan University, China)

P-2: Identification of novel SLC25A13 splicing transcripts in human amniocytes: a transcriptome study

Zhan-Hui Zhang (Jinan University, China)

P-3: Variomics investigation of citrin deficiency: six-year experience in a Chinese Pediatric Center

Xin-Jing Zhao (Jinan University, China)

P-4: The characteristics of food intake in patients with type II citrullinemia

Mio Nakamura (Shinshu University, Japan)

P-5: Two patients with adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) successfully treated by liver transplantation from cadaveric donors in Japan

Akiyo Hineno (Shinshu University, Japan)

P-6: Clinical pictures of aged CTLN2 patients with onset after 65 years

Michiaki Kinoshita (Shinshu University, Japan)

P-7: Risk of low protein diet therapy in CTLN2

Kazuhiro Fukushima (Shinshu University, Japan)

P-8: A case of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) associated with pregnancy and protein-restricted diet

Yasuyuki Shimomura (Tsuyama Central Hospital, Japan)

P-9: Two children of whom intrahepatic cholestases were possibly evoked by viral infection at the age of four months

Shunsaku Kaji (Tsuyama Central Hospital, Japan)

ABSTRACTS

Plenary lecture

Overview of citrin deficiency: Pathophysiology and therapy for citrin deficiency based on the mouse model analysis

Takeyori Saheki

Institute of Resource Development and Analysis, Kumamoto University, Kumamoto

Citrin deficiency is a newly-established disease entity that encompasses adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and neonatal intrahepatic cholestasis (NICCD), and results from mutations in the SLC25A13 gene that encodes citrin. It was first described in Japan, but is now known as a panethnic disease. Citrin is a liver-type aspartate (Asp)-glutamate (Glu) carrier in the inner mitochondrial membrane responsible for the electrogenic exchange of Asp for Glu and a H⁺ ion, and supplies Asp to synthesize protein, nucleotide and urea in cytosol. Furthermore, citrin is an important component of malate-Asp shuttle transporting NADH reducing equivalent from cytosol to mitochondria. One of the most prominent characteristics of citrin deficiency is the unique food preference; citrin deficiency subjects like protein-/fat-rich foods and dislike carbohydrate-rich foods. This food preference seems to be closely related to the pathogenesis. The conventional treatment procedures for hyperammonemia such as high-carbohydrate diets, and glucose and glycerol infusion are harmful for citrin deficiency. Especially, glycerol infusion for brain edema has caused deterioration of many CTLN2 patients. To elucidate the pathophysiology of citrin deficiency, and to develop therapeutics, we created a citrin deficiency model, citrin (Ctn) and mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mGPD) double knockout (KO) mouse. The resultant Ctn/mGPD double KO mice showed citrullinemia, hypoglycemia, hyperammonemia which was enhanced by sucrose administration. The double KO mice disliked sucrose, and sucrose administration caused a dramatic increase in the hepatic glycerol 3-phosphate (G3P). Administration of ethanol or glycerol also dramatically increased the hepatic G3P of the double KO mice. We have found sodium pyruvate and some amino acids are effective for ameliorating pathophysiology of the double KO mice.

O-2

Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin- deficiency even during the silent period

Hironori Nagasaka^a, Yoshiyuki Okano^b, Hirokazu Tsukahara^c, Yosuke Shigematsu^c, Toru Momoi^d, Junko Yorifuji^d, Takashi Miida^e, Toshihiro Ohura^f, Keiko Kobayashi^g, Takeyori Saheki^h, Kenichi Hiranoⁱ, Masaki Takayanagi^a, Tohru Yorifuji^d

^aDivision of Metabolism, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan; ^bDepartment of Pediatrics, Osaka City Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; ^cDepartment of Pediatrics, Fukui University Hospital, Fukui, Japan; ^dDepartment of Pediatrics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; ^eDepartment of Clinical and Laboratory Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan; ^fDepartment of Pediatrics, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan; ^g Department of Molecular Metabolism and Biochemical Genetics, Kagoshima University Graduate School of Medicine and Dental Science, Kagoshima, Japan; ^hInstitute of Health Science, Tokushima Bunri University, Tokushima, Japan; ⁱDepartment of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan

Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) shows diverse metabolic abnormalities such as urea cycle dysfunction together with citrullinemia, galactosemia, and suppressed gluconeogenesis. Such abnormalities apparently resolve during the first year of life. However, metabolic profiles of the silent period remain unknown. We analyzed oxidative stress markers and profiles of amino acids, carbohydrates, and lipids in 20 asymptomatic children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin-deficiency aged 1–10 years, for whom tests showed normal liver function. Despite normal plasma ammonia levels, the affected children showed higher blood levels of ornithine ($p < 0.001$) and citrulline ($p < 0.01$)—amino acids involved in the urea cycle—than healthy children. Blood levels of nitrite/nitrate, metabolites of nitric oxide (NO), and asymmetric dimethylarginine inhibiting NO production from arginine were not different between these two groups. Blood glucose, galactose, pyruvate, and lactate levels after 4–5 h fasting were not different between these groups, but the affected group showed a significantly higher lactate-to-pyruvate ratio. Low-density and high-density lipoprotein cholesterol levels in the affected group were 1.5 times higher than those in the controls. Plasma oxidized low-density lipoprotein apparently increased in the affected children; their levels of urinary oxidative stress markers such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and acrolein-lysine were significantly higher than those in the controls. Results of this study showed, even during the silent period, sustained hypercitrullinemia, hypercholesterolemia, and augmented oxidative stress in children with citrin deficiency.

O-4

Analysis of hepatic metabolism in CTLN2 model mouse by using perfusion system

Mitsuaki Moriyama¹, Miharu Ushikai², Eishi Kuroda², Katsura Takano¹, Yoichi Nakamura¹, Keiko Kobayashi², Takeyori Saheki^{3,4}

¹Laboratory of Integrative Physiology in Veterinary Sciences, Osaka Prefecture University, Japan, ²Department of Molecular Metabolism and Biochemical Genetics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Japan, ³Institute of Resource Development and Analysis, Kumamoto University, Japan, and ⁴Institute for Health Sciences, Tokushima Bunri University, Japan

In humans, the mutations of *SLC25A13*, the gene encoding citrin, cause both adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and neonatal intrahepatic cholestasis, referred as human citrin deficiency. Citrin, a liver-type mitochondrial aspartate (Asp)-glutamate (Glu) carrier, plays significant roles in (i) exchanging mitochondrial Asp for cytosolic Glu and a proton, which is important in transferring cytosolic NADH reducing equivalents into mitochondria for the generation of ATP by oxidative phosphorylation via the malate-Asp shuttle; a process essential for aerobic glycolysis, (ii) supplying Asp for the formation of argininosuccinate during urea synthesis and (iii) exporting Asp as a substrate for phosphoenolpyruvate formation and the creation of glucose from 3-carbon precursors such as lactate (Lac). To understand the pathophysiology of CTLN2, we investigated hepatic metabolism of wild-type, citrin-knockout (KO), mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPD)-KO, and citrin/mGPD double-KO mice using liver perfusion system. Gluconeogenesis from Lac was dramatically decreased in the livers of citrin-KO and citrin/mGPD double-KO mice, however, when pyruvate was used as a substrate, no difference in the rate of gluconeogenesis was seen among four genotypes. The deficits in ureogenesis from ammonia in the liver of citrin/mGPD double-KO mice was accompanied by an increase in the perfusate lactate-to-pyruvate (L/P) ratio, which is similar to citrin-KO mice. The effect of high glucose load on ureogenesis was also investigated, since CTLN2 patients dislike carbohydrate-rich diet. Infusion of 25 mM glucose in the perfusate partially inhibited the ureogenesis from ammonia in the liver of citrin/mGPD double-KO mice. These results suggest that the severe metabolic disturbances present in citrin/mGPD double-KO mice, the model of citrin deficiency. We also discuss the alterations of the hepatic amino acid levels and tricarboxylic acid cycle intermediates.