

まだ遺伝子変異が1アレルしか同定されていない症例 GK06,, GK44, GK51, GK83 について本法を用いて、各エクソンの欠失、重複の確認を行った。

### B) SCOT遺伝子

T2遺伝子と同様にエクソン17個に対してプローブを作成した。まだ遺伝子変異が1アレルしか同定されていない症例GS19, 20, 22について本法を用いて、各エクソンの欠失、重複の確認を行った。

これら疾患の遺伝子解析は岐阜大学の医学研究等倫理委員会の承認を得て、個人情報取り扱いに注意して行っている。

### 3) 過去5年間のケトン体代謝異常症に関する相談、活性測定、遺伝子解析の検討

今回この5年間(平成19年度から23年度)において岐阜大学にケトン体代謝に関する症例の相談件数、活性測定した症例数、遺伝子解析を行った症例数などについて集計した。

## C. 研究結果

### 1) 国内患者把握のためのアンケート調査

#### 1) 一次調査

本年度は515施設に1次調査を送付し380施設から回答を得た(回答率74%) (表1)。

HMG-CoA リアーゼ (HMGL) 欠損症は本邦にて数例の報告があるが、5例が症例として報告された。

HMG-CoA 合成酵素 (HMGS) 欠損症の報告は本邦ではこれまでなく、アンケートでもやはり症例として報告されなかった。 $\beta$ -ケトチオラーゼ(T2)欠損症は6例、SCOT欠損症は5例の報告があった。

送付先	515
返信	380(回答率74%)
症例無し	348
症例あり	29
HMGL欠損症	5
HMGS欠損症	0
T2欠損症	6
SCOT欠損症	5
severe KA	13
Non K hypoG	5

#### 2) 二次調査

HMG-CoA リアーゼ欠損症: 5例の1次調査の結果および有機酸スクリーニング、タンデムマススクリーニングを行っている施設、本研究班の研究協力者からの情報で追加4名の計9症例について2次調査を行った。1例は追跡の結果重複(2施設からの報告)であり、実際本邦での把握症例は8症例であった(表2)。そのうち2症例は現在追跡調査が不明であった。8例中4例が生後1-4日に低血糖、ほ乳不良、低体温、嗜眠などで発症し、代謝性アシドーシス、低血糖をきたし、その他の4例は生後3ヶ月~2歳2ヶ月に感染症にともなって嘔吐、痙攣、昏睡などで発症していた。発作回数は1例が1回に実で、多くの症例は診断してコントロール中にも発作がみられ、15歳でも発作を来していた。

この結果については平成23年度第53回日本先天代謝異常学会総会、第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム およびヨーロッパ先天代謝異常学会年会において班研究成果として発表し、日本および国際的にアピールした。

症例	生年	性別	家族歴	初回発作	発症時期	誘因	臨床症状	検査結果	診断時期	発作回数	最後の発作	現在の年齢	予後			
								pH	HCO3	血糖	NH3	AST	ALT	LDH		
MA	1990	F	なし	生後4日			ほ乳力低下, 多呼吸		生後6ヶ月	7回以上	10歳	20歳?				
ST	1995	M	なし	生後2日			低体温, 痙攣	7.27	1歳3ヶ月	5回以上	15歳	15歳	視力障害, 発達遅滞, てんかん			
MS	1995	M	なし	生後7ヶ月	感染(発熱)		嘔吐, 嗜眠, 痙攣 (Reye's-like)	7.15	生後7ヶ月	1回	生後7ヶ月	15歳	てんかん, 正常発達			
KY		F		生後1日			嘔吐, 傾眠	7.28					追跡不可能			
KE	1996	M	なし	1歳3ヶ月	感染(発熱)		昏睡, 痙攣 (Reye's-like)	7.19	1歳3ヶ月	3回	2歳	14歳4ヶ月	正常発達 (160cm 45kg)			
AS	1996	F	なし	2歳2ヶ月	発熱		傾眠, 痙攣	7.11	2歳2ヶ月				追跡不可能			
MO	1999	F	なし	生後2日			低血糖, ほ乳不良		1歳1ヶ月	5回以上	7歳	11歳	発達遅滞, てんかん			
MM	2006	M	なし	生後3ヶ月	上気道炎		嘔吐, 意識障害	7.204	生後3ヶ月	10回以上	4歳	4歳	正常発達			

2)  $\beta$ -ケトチオラーゼ (T2) 欠損症、SCOT欠損症のMLPA法

A) T2 遺伝子

1) これまで同定されたエクソン重複例、欠失例の検出。コントロール (図1A) エクソン2-4の欠失ホモ接合体例 (図1B)、エクソン8-9の重複例 (図1C)、人工的に作成したエクソン2-4欠失とエクソン8-9に重複のヘテロ接合体 (図1D) のMLPA増幅パターンを示した。十分に異常を検出でき、相対コピー数を示したプロット (図2A~D) においても異常を検出できた。

2) 一方のアレルの変異の同定できていない4名について本法を用いたところ、GK44でエクソン3-4を含む欠失をヘテロで同定できた (図3)。

B) SCOT 遺伝子

一方のアレルの変異の同定できていない3名について本法を用いたところ、GS20でエクソン17を含む欠失の存在がヘテロで示唆された。ほかの2症例では明らかな重複、欠失は認められなかった。

3) 過去5年間のケトン体代謝異常症に関する相談、活性測定、遺伝子解析の検討

表3にその結果を示す。今回集計したのは、症例に関してケトン体の検査結果の解釈、原因不明の反復性ケトーシス、原因不明の低血糖などの相談を含み、必ずしも活性測定依頼に直結しない相談をふくめた。

1) 相談件数の推移について：平成23年度は2月10日までの結果である。平成19年度、20年度

が6-7件であったのに対し、研究班を組織した平成21年度は14件と倍増し、さらにこの2年間は24-27件と急増しており、研究班での啓蒙活動、診断指針等の配布などが効果があったと考えられる。

2) 活性測定：相談があった場合、臨床像の確認によりケトン体利用障害のSCOT欠損、 $\beta$ -ケトチオラーゼ (T2) 欠損症が否定出来ない場合に活性測定を行った。活性測定で明らかな異常がない場合でも、Km変異等を考え、原因不明の重篤なケトアシドーシスの症例ではあえて遺伝子解析も行った。そのためT2、SCOTの遺伝子解析で異常のない症例が多くなっている。

3) HMG-CoA リアーゼ (HL)、HMG-CoA 合成酵素 (HS) の遺伝子解析：明らかな非ケトン性低血糖症例に対してはHMG-CoA 合成酵素の遺伝子解析を行ったが、変異をもつものは同定出来なかった。また有機酸分析にてHMG-CoA リアーゼ欠損症と考えられた2例についてHMG-CoA リアーゼの遺伝子解析を行い、遺伝子変異を同定している。

4) その他の遺伝子解析：1例においては3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素欠損症を疑って解析をおこなったが正常であった。また反復性低血糖の症例で、ケトーシスをきたす場合にグリコーゲン合成酵素欠損症を否定するために2例で本酵素遺伝子解析を行ったが結果は正常であった。

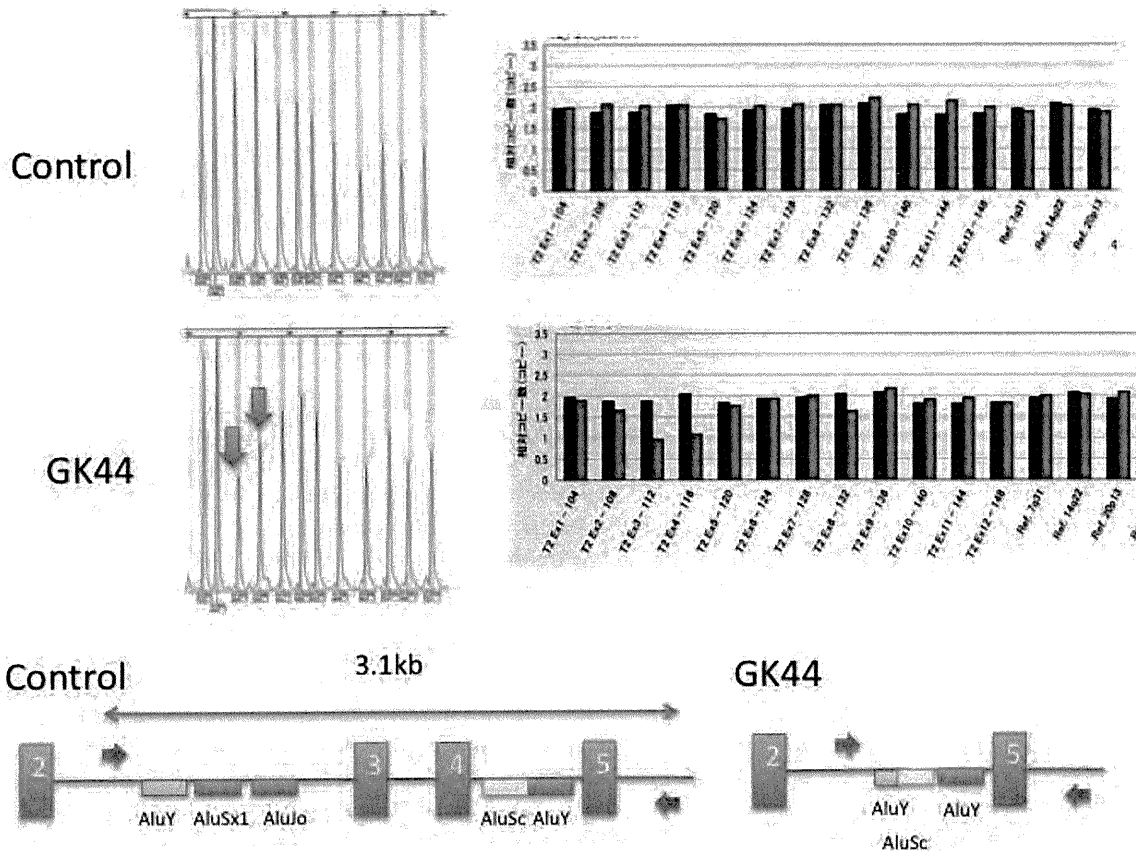


表3 過去5年間のケトン体代謝に関する日本からの相談と解析実績

年 度	相談件数	活性測定	遺伝子(T2)	遺伝子(SCOT)	遺伝子(HL)	遺伝子(HS)	その他
19	6	3		1(0)		1(0)	
20	7	3	2(2)	1(1)			1(0)
21	14	6	1(0)	1(0)		1(0)	
22	24	13	3(0)	3(2)			
23	27	7	1(0)		2(2)	1(0)	2(0)
計	78	32	7(2)	6(3)	2(2)	3(0)	3(0)

遺伝子解析における()内の数字は異常が同定された件数である。

#### D. 考察

本研究班は、平成21年度に難治性疾患克服事業の研究奨励分野として採択された「先天性ケトン体代謝異常症(β-ケトチオラーゼ欠損症、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症)の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究」をさらに拡大し、「先天性ケトン体代謝異常症(HMG-CoA合成酵素欠損症、HMG-CoAリアーゼ欠損症、β-ケトチオラーゼ欠損症、SCOT欠損症)の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究」として本年度調査研究を行ってきた。本年度は新たに対象疾患として加えたHMG-CoAリアーゼ欠損症について、我が国における症例把握、臨床経過と予後に重要な知見を得ることができた。その一方、HMG-CoA合成酵素欠損症と診断された例はなく、疑いの症例も1次調査で拾い上げなかった。この疾患についての啓蒙の必要性を感じた。

T2遺伝子変異の同定率は86症例中で最終的に96%(7アレル変異不明)である。β-ケトチオラーゼ欠損症では遺伝子内のエクソンを含む欠失挿入例として、エクソン2-4の欠失、エクソン8-9の重複、エクソン3-4の欠失がこれで同定されたが、すべてイントロン内のAlu配列での不均等組み換えによるものであった。遺伝子によってこのような遺伝子内の比較的大きな欠失、挿入変異の頻度は異なっているが、常にこのような変異を考慮する必要がある。遺伝子変異の同定率はSCOT欠損症では89%であり、6症例において1変異しか同定できていない。このためMLPA法にて多くの欠失、挿入の症例が同定されると考えられたが、1例でエクソン17を含む欠失が示唆されたにとどまった。

MLPA法は各エクソンの欠失、重複を同定するのに非常に有用な方法で、ジストロフィン遺伝子など既に臨床応用されているが、T2欠損症のような稀な疾患ではコマーシャルベースでの開発はされず、独自に作成することが必要であった。

表3に示すように今回過去5年間にケトン体について症例の相談を受けた件数、活性測定、遺伝子解析の件数をまとめてみると、本研究班が発足して、ケトン体の異常に対する関心が高まってきた

ことが明らかになった。今回は示していないが、個々の症例の主治医との検討、活性測定、遺伝子解析をとおして、非常に重篤なケトアシドーシスを来たしており、生理的なケトアシドーシスとは考えられないのにSCOT欠損ではない症例があり、これらの症例が他の酵素欠損なのか、臨床経過の追跡をふくめた検討が必要である

#### E. 結論

平成22-23年度難治性疾患克服研究事業、研究奨励分野の「先天性ケトン体代謝異常症(HMG-CoA合成酵素欠損症、HMG-CoAリアーゼ欠損症、β-ケトチオラーゼ欠損症、SCOT欠損症)の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究」班にて、1)国内患者把握のためのアンケート調査を1次、2次調査と行い、我が国のHMG-CoAリアーゼ欠損症の患者把握、臨床経過、予後について貴重な情報を得、また2)遺伝子診断法としてT2, SCOT遺伝子のMLPA法を確立し、3)過去5年間のケトン体代謝に関する患者相談の例数の検討をおこなった。これらは先天性ケトン体代謝異常症の臨床において大きく貢献していると考えられた。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

原著

1) [Fukao T](#), Sass JO, Kursula P, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Varic I, Zabot M-T, Kondo N. Clinical and molecular characterization of five patients with Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency *Biochimica Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* 1812:619-24, 2011

2) [Fukao T](#), Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, [Yamaguchi S](#), Kondo N. Three Japanese patients with beta-ketothiolase deficiency whoshare a mutation, c.431A>C(H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. *JIMD reports in press*

総説

1) 深尾敏幸：診療の秘訣 小児の診療における尿ケトン。Modern Physician 31:1126, 2011

## 2. 学会発表

1) Fukao T, Hori T, Boneh A, Kondo N. Establishment of MLPA method for ACAT1 gene and identification of intragene deletions and duplication caused by Alu sequence-mediated non-equal homologous recombination in beta-ketothiolase deficiency. 2011 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 30-September 2, 2011 (Geneva, Switzerland)

2) Fukao T, Yamaguchi S, Takayanagi m, Shigematsu Y, Ishige M, Tanaka T, Takahashi T, Ihara T, Murakami J, Ohtsu Y, Onigata K, Kosaka K, Yorifuji T, Kondo N. HMG-CoA lyase deficiency in Japan: Question-based follow-up study. 2011 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 30-September 2, 2011 (Geneva, Switzerland)

3) 深尾敏幸：先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握のための調査研究：第14回中部出生前医療研究会3月5日 名古屋 2011

4) 深尾敏幸, 堀友博, 近藤直実：β-ケトチオラーゼ欠損症の遺伝子診断：MLPA法の確立とエクソン欠失、重複の検出：第114回日本小児科学会学術集

会 4月15-17日 東京 2011

5) 深尾敏幸, 堀友博, 近藤直実：β-ケトチオラーゼ欠損症の遺伝子診断：MLPA法の確立とエクソン欠失、重複の検出。第53回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

6) 深尾敏幸, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介, 新宅治夫, 堀川玲子：日本人 HMG-CoA リアーゼ欠損症の臨床像：研究班におけるアンケート調査から。第53回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

7) 岡和田祥子, 加藤 寛幸, 勝又元, 古田千左子, 関根 裕司, 山内豊浩, 深尾敏幸. 急性胃腸炎を契機に発見された SCOT( サクシニル-CoA:3- ケト酸 CoA トランスフェラーゼ) 欠損症の1例. 第53回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

8) 長谷川有紀, 高橋知男, 佐野葉子, 中田節子, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレン・ジャミヤン, 長沼邦明, 山口清次：軽度の多呼吸を契機に GC/MS とタンデムマス・スクリーニングで診断された 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症の新生児例. 第38回日本マス・スクリーニング学会. 福井, 2011年10月

## G. H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

総合研究報告書

先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究

分担研究課題：サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症の長期経過に関する研究

研究分担者 新宅治夫 所属 大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学

研究要旨

「先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究」班において、典型的サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ（SCOT）欠損症の臨床経過、および典型的 SCOT 欠損症が疑われたが活性測定で軽症型であった症例の臨床経過を検討した。また典型的 SCOT 欠損症の長期経過に関して追跡調査をおこなった。

A. 研究目的

サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA-転移酵素（以下 SCOT）欠損症は、アセト酢酸をアセトアセチル-CoA に活性化する酵素の欠損で、乳児期に著しいケトアシドーシスで発症し死亡することもある常染色体劣性遺伝形式を取る先天性ケトン体代謝異常症である。本症の報告は世界でも少なく、本邦での報告は数例のみである。この報告例が少ない原因として非典型例が存在し、診断されていない例が多く存在する可能性が示唆されている。

そこで本研究の目的は、世界各地から SCOT 欠損症の報告例の臨床情報を集め、典型例と非典型例について比較検討し、早期診断と治療に寄与することである。

B. 研究方法

酵素活性の測定はリンパ球、皮膚繊維芽細胞、

用いて行った。出生前診断は胎児絨毛と培養羊水細胞を用いて酵素活性の測定により行った。症例 6 と症例 7 の兄妹例については自宅で尿ケトン体のチェックを行い、年に数回血中ケトン体の測定のために外来通院し、現在まで 17 年間経過観察を行った。

（倫理面への配慮）

家族の希望により出生前診断の目的と手技について説明し同意を得て実施した。

C. 研究結果

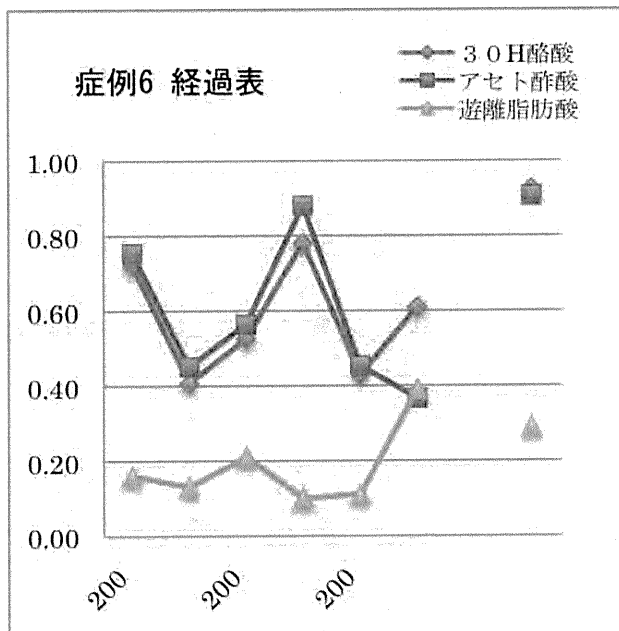
下表の症例 1～5 はこれまでに世界で報告された 5 例で、症例 6 は 1994 年我々が発見した本邦初例、症例 7 は、その次子で出生前診断にて本症と診断したが両親の希望で妊娠継続し出生した第 2 例、症例 8 は 1999 年幼児期に発症し酵素活性の測定により SCOT 欠損症と診断した本邦第 3 例である。

表. SCOT 欠損症 8 との症状・予後と残存活性

症例	1	2	3	4	5	6	7	8
性別	M	M	M	F	F	M	F	M
血族結婚	-	+	-	+	+	-	-	-
発症月齢	2d	7	1	20	10	6	3	17
初発症状								
ケトアシドーシス	+	+	+	+	+	+	+	+
多呼吸	+	+	+	+	+	+	-	-
嘔吐	-	-	-	-	+	+	-	+
筋緊張低下	-	-	-	+	+	+	-	+
発作間欠期								
臨床症状	-	-	-	-	-	-	-	-
持続性ケトシス	+	+		+	+	+	+	+
予後	死	死	生	生	生	生	生	生
年齢	6m	21m	4y	3y	4y	6y	3y	2y
SCOT 活性	0	<5	20	22	23	14	15	24

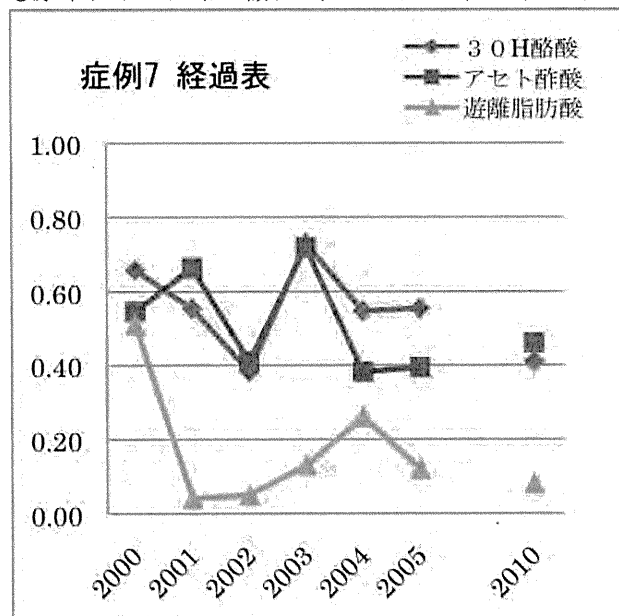
症例6と症例7は学童期を通じて無症状であったが、自宅で行っていた尿中ケトン体のチェックでは常に陽性であった。しかし、症例8では自宅で行っていた尿中ケトン体のチェック中に完全に尿ケトン体が陰性化し、血中総ケトン体の測定でも0.07~0.10 mmol/Lと全く正常値であったこともたびたび観察された。

【症例6】1993/9/16 生まれの男児で、周産期に異常なし。生後5ヶ月に胃腸炎に罹患し嘔吐で入院した。生後6ヶ月に嘔吐、筋緊張低下、多呼吸、末梢チアノーゼで発症し、重症の代謝性アシドーシス (pH7.08, BE-22.2, HCO35.1mmol/L) と尿ケトン強陽性を認めた。その他の血糖、乳酸、ピルビン酸、クレアチンキナーゼ、アンモニア、アミノ酸などの生化学的検査は正常であった。血中アセト酢酸 4.5 mmol/L, 3ヒドロキシ酪酸 7.7 mmol/L であった。アルカリ剤とグルコースの点滴でアシドーシスは4日後に改善した。しかし、ケトン血症 (アセト酢酸 1.2 mmol/L, 3ヒドロキシ酪酸 1.7 mmol/L) は持続した。尿のGCMSでは上記のケトン体の上昇以外特徴的な有機酸代謝の異常は認めなかった。これらの結果からケトン体代謝異常症が疑われたため、SCOT活性の測定を行い診断した。その後も胃腸炎などの感染症でケトン血症を認めたがいずれも入院又は外来で点滴を受け改善した。その後の経過は順調で、学童期に入っても尿中ケトンは常に陽性 (2+から3+) で、血中ケトン体も 0.86~1.83 (平均 1.25) mmol/L であったが、無症状に経過していた。現在16歳で普通の高校に進学しサッカーの選手としてクラブ活動も行っている。身長 175cm, 体重 56.5kg でやや細身。



【症例7】1995/10/19 生まれの女児で、症例1の妹のため出生前診断でSCOT欠損症と診断されていた。周産期に異常なく、生後4ヶ月の健診時に尿ケトン (4+) でケトン血症 (ケトン体 4 mmol/L) を認めたが無症状であった。その後も乳幼児期

を通じて無症状で経過していた。学童期に入っても尿中ケトンは常に陽性 (1+から3+) で、血中



ケトン体も 0.79~0.95 (平均 1.25) mmol/L であったが、無症状に経過し発達は正常であった。現在14歳で身長 159cm, 体重 46.8kg でやや細身。

【症例8】1997/8/5 生まれの男児で、周産期に異常なし。1歳5ヶ月に嘔吐と意識障害で救急へ搬送され、代謝性アシドーシス (pH 6.955, BE-30.7) で精査のため転院となった。頭部CTスキャン、脳波、髄液所見に異常を認めず。血液検査で乳酸値正常、アミノ酸分析、カルニチン分析で代謝異常の所見なし、有機酸分析でも著明なケトosisのみで特に異常な有機酸の増加は認めなかった。2回目の発作は、1歳8ヶ月に嘔吐はなかったものの意識消失にて救急へ搬送となり、アシドーシス (pH 7.124, BE -23.5) で、血中乳酸値は正常、血中ケトン体は、3ヒドロキシ酪酸 5.775 mmol/L, アセト酢酸 1.85mmol/L と増加し、尿中ケトン体は3+であった。アルカリ剤とグルコースの点滴で回復した。この症例は意識消失を伴う重度のケトアシドーシス発作を2回おこし、いずれも血糖、乳酸、アンモニア値はほぼ正常で、尿中有機酸分析でもケトン体の増加以外有機酸代謝異常の所見はなく、ケトン体代謝の異常症が疑われた。当科受診時は発作間欠時と考えられたが、血中ケトン体が高値であったためSCOT活性の測定を行い診断した。しかし、その後発作無く経過し、血中ケトンは完全に正常化し尿中ケトンも消失する時期があることが確認された。

#### D. 考察

SCOT欠損症は意識消失を伴う重度のケトアシドーシス発作をおこすが、血糖、乳酸、アンモニア値はほぼ正常で、尿中有機酸分析でもケトン体の増加以外有機酸代謝異常の所見がないため、診断されないこともある。本症は新生時

期から乳児期に発症し、残存活性の低いものは早期に発症し死亡している。残存活性が高い場合1歳を越えて発症する事もあり、また症状は比較的軽いと思われるが、症例8のように意識障害をきたす重症のケトアシドーシス発作を繰り返すこともあるため、少しでも本症が疑われた場合早期に酵素診断を行い、注意深い経過観察が必要と考えられた。しかし、症例8では間欠期に完全にケトン血症が正常化し尿ケトンが陰性化する時期があることが確認され、間欠時にケトン体の陰性かをもってSCOT欠損症を否定できないことが明らかとなった。

今回の兄妹例の長期フォローでは、外来での血中総ケトン体が常に高値（下左図）であるだけでなく、自宅でチェックしている尿中ケトン体も常に陽性の状態が続いていても、学童期には全く無症状で経過し、精神発達も全く正常であることが確認された。また身体発育もやや細身の傾向が認められたものの全く正常であった。

一般にSCOT欠損症の場合、アシドーシス発作時の遊離脂肪酸、血中ケトン体の同時測定は診断上非常に有用であり、非発作時においても食後2時間などケトン体が本来低いはずの時間帯で著しく高い場合はケトン体利用障害の可能性がある。生理的なケトアシドーシスでは遊離脂肪酸もケトン体と同様に高くなるが、ケトン体利用障害ではケトン体の値は遊離脂肪酸の値と比して高く、空腹やストレス早期から遊離脂肪酸(FFA)と総ケトン体(TKB)の比は0.3以下となる。この兄妹例のFFA/TKB比の経過では、ほぼ常に0.3を下回る低値となっている（下右図）。このような状況では感染症などのストレスにより容易にケトアシドーシスが発症すると考えられる。しかし、この兄妹例では学童期に入って発熱を伴う感染症に罹患しても、一度もアシドーシス発作を認めない。このように一定の年齢に達した患者が

ケトアシドーシスを伴いながらもほとんど発症しない事実から、逆に乳幼児期の早期発見と予防的な治療により乳幼児期を無事に経過すれば、その後はほとんど無治療で良好な発育発達が望めると考えられる。

## E. 結論

ケトアシドーシスを認め少しでも本症が疑われた場合早期に酵素診断を行い、注意深い経過観察が必要と考えられた。しかし、乳幼児期を過ぎればある程度のケトアシドーシスが持続していても発育発達にはあまり影響せず正常に成長することが確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

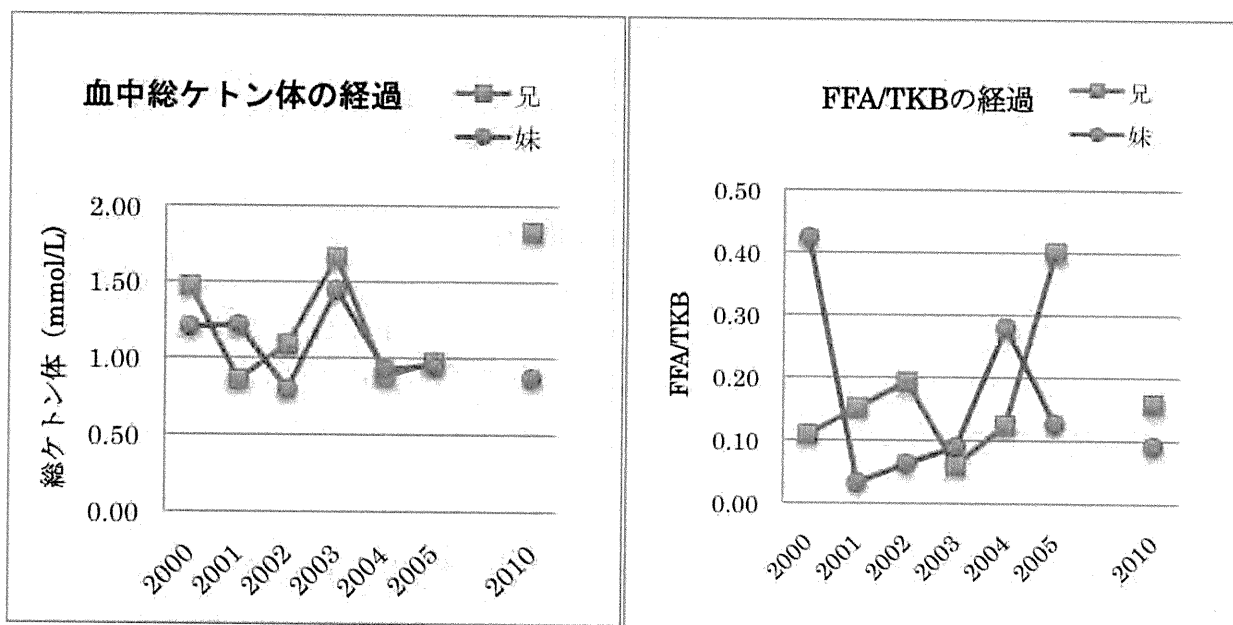
### 2. 学会発表

深尾敏幸、山口清次、重松陽介、高柳正樹、新宅治夫、堀川玲子 「先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究」班

先天性ケトン体代謝異常症(T2欠損症、SCOT欠損症)の診断指針-日本での診断された症例の検討から 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21~23日、大阪、2010

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究

分担研究課題：SCOT 欠損症が疑われたが SCOT 活性から否定された症例に関する研究  
重篤なケトアシドーシス症例に対するグルコースインスリン療法

研究分担者 堀川 玲子（国立成育医療研究センター 内分泌代謝科）

## 研究要旨

小児ケトン性低血糖症には重症のケトアシドーシスを来す症例がある。本研究ではこれらの臨床像を明らかにし、治療の要点と問題点を検討した。

初年度は、SCOT 欠損症が強く疑われた症例について、その臨床像を検討した。SCOT 欠損症は、新生児期もしくは乳幼児期に、著しいケトアシドーシスをきたし、多呼吸、意識障害で発症する。我々は臨床像および発作時経過から SCOT 欠損症を強く疑い、活性測定を行ったが、確定診断に至らなかった症例を経験した。重篤なケトアシドーシスを呈し、臨床所見が本症に合致するが酵素診断が確定しない症例では、酵素活性に影響を及ぼす因子の異常や他の代謝異常などの可能性もあり、さらに今後の検討が必要と考えられた。

2 年度は、重症ケトアシドーシスを呈する症例に対する有効な治療法について検討することを目的とし、グルコースインスリン療法の有用性を検討した。対象は重症または頻回のケトン性低血糖症にて当院を受診した 20 例。うち 5 例が精査にて基礎疾患を診断された。速やかな糖輸液による初期治療の重要性が示された一方、インスリン分泌不全やミトコンドリア機能不全を伴った症例に対しては、代謝改善のためにインスリンや IGF-I のアナボリックホルモン併用が有効であることが示された。

## A. 研究目的

ケトン性低血糖症は、小児救急外来で比較的高い頻度で経験される。幼少児で比較的食が細かい場合、空腹時間が長時間になるとケトン血清低血糖を来すことは稀ではなく、多くの症例ではアシドーシスは軽度で、救急外来での糖輸液のみで回復するが、なかには重症のケトアシドーシスを来す症例がある。これらの中には、代謝性疾患など基礎疾患を有するものがあり、特に $\beta$ ケトチオラーゼ欠損症や SCOT 欠損症は重症代謝不全をおこすため、鑑別診断が重要である。

本研究では、初年度に SCOT 欠損症が疑われた症例の臨床像と診断過程を検討し、次年度にはケトン性低血糖症症例に対する有効な治療法について検討することを目的とし、グルコースインスリン療法の有用性を検討した。

## B. 研究方法

初年度研究対象口方法：SCOT 欠損症が疑われた 11 ヶ月男児例について、その臨床経過を詳細に検討した。

2 年度対象と方法：国立成育医療研究センター救急外来受診者のうち、重症及び反復する嘔吐・低血糖がありケトン性低血糖症と臨床診断された症例について、過去 3 年間に診療依頼のあったものは 12 例あった。また、他院から紹介された同様の症状有りケトン性低血糖症が疑われた症例は、3 年間で 8 例あった。この 20 症例の診断、臨床経過と治療法の有効性を、診療録から後方的に検討した。

## C. 研究結果



## 初年度研究結果

【症例】11ヶ月 男児

【主訴】呼吸速迫

【家族歴】特記すべきことなし。

【現病歴】胎児期・周産期は異常なし。新生児代謝異常検査正常。母乳栄養、7ヶ月より離乳食開始。発達正常。

11ヶ月時、断乳2日後より嘔吐、食欲低下、微熱あり、その後多呼吸、頻脈あり。

【入院時検査所見】著明な代謝性アシドーシスと軽度脱水を認めた。高乳酸血症、高アンモニア血症、明らかな低血糖は認めず。ケトン体、遊離脂肪酸は、FFA 2115 $\mu$ Eq/L, ACAC 2456  $\mu$ mol/L, 3-HB 9044  $\mu$ mol/L, TKB 11500  $\mu$ cmol/Lと異常高値。遊離脂肪酸／総ケトン体比 0.18。

【経過】糖輸液、アルカリ療法施行にて重症代謝不全は改善。著明なケトアシドーシス、乳酸正常、アンモニア正常であり、血中アミノ酸分析、濾紙血によるタンデムマス、尿中有機酸分析では特異的所見なく、SCOT欠損症が疑われた。リンパ球・皮膚線維芽細胞でのSCOT活性を測定したが低下なく、確定診断には至らなかった。

症例は食事指導のみでその後の成長発達は正常、ケトン性代謝不全もなく経過している。発作間欠期のケトン体は正常である。

## 2年度研究結果

重症または頻回のケトン性低血糖症を呈した対象20例のうち、基礎疾患を有していたものは5例あった。診断は、糖原病9型1例、糖原病1b型1例、シトリン欠損症（シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞）1例、複合型下垂体機能低下症2例であった。

救急外来における低血糖治療後の血糖頂値は、157 $\pm$ 35mg/dlで、最高値は290mg/dlであった。糖原病1b型では、血糖値180mg/dlにおけるインスリン分泌能は2 $\mu$ U/ml未満であった。初期の尿中ケトン体は2~3+であった。初期輸液のブドウ糖濃度は5~7.5%で、特にアシドーシスの進んで重症例ではブドウ糖10%の輸液によりケトシ

スの改善がみられた。一方、糖原病1b型と最終診断された症例では、初期に重症ケトアシドーシスを呈し、この際の輸液中糖濃度を4%としたところ血中乳酸値が10mmol/lまで上昇した。輸液中のブドウ糖を除いたところ、乳酸値は5mmol/lに低下した。

## D. 考察

SCOT欠損症疑い例では短期間の経過で著明なケトアシドーシスとなった。断乳直後の体調不良から発病しており、この時期は代謝疾患が嗅性発症する可能性があり、注意を要する。発作時の血液pHは7.074, HCO<sub>3</sub> 6.5 mEq/Lと著明なアシドーシスで、ケトン体は11,000  $\mu$ cmol/L以上であり、遊離脂肪酸／総ケトン体比も0.18である。しかも急性期有機酸分析では特異的な有機酸は検出されず、昨年度研究班で作成した診断指針でも強くSCOT欠損を疑う症例である。重篤な発作はその1回で、その後の経過では発作はなく、また間欠期のケトン体も低く、残存活性を有するSCOT欠損症との鑑別が必要である。

今後このような症例の蓄積も重要であり、本症例についても、通常活性測定では異常は認められていないが、十分な解析を行っておくことが新たな疾患単位の確立などにむけて必要と考えられる。

また、2年度の研究で対象となった20例のうち、精査にて基礎疾患を有することが明らかとなったのは5例、25%であり、診断確定の重要性が示された。今回の検討では、ケトン性低血糖症においては適切な糖輸液により速やかな状態の改善が認められた。特に重症のケトアシドーシスにおいては、10%糖輸液がケトアシドーシス改善に有効であった。先天代謝異常症における代謝不全においては、一部のミトコンドリア異常症など特殊な病態を除き、輸液中糖濃度は10%が推奨されている。今回の症例でも、初期治療における糖輸液の重要性が示された。救急においては、生理食塩水の比較的大量輸液をマニュアルに従って漫然とおこなうと、ケトシスも低血糖も改善せず危険なこともあるため、血糖値と（尿中）ケトン体

のチェックは必須である。特に小児においては、かつての1号輸液（ブドウ糖 2.6%）にあるような糖の添加を早急に考慮すべきであると考えられる。

今回の検討では、救急外来において、低血糖に気付かれた後の糖負荷により血糖値が急上昇している症例が認められた。この原因として、以下の2点が考えられた。1) ブドウ糖急速静注量の過剰、2) インスリン反応性の低下。特に低血糖が遷延していたと思われた糖原病 1b型の症例では、インスリン分泌反応が低下しており、このような症例ではケトosis改善のためにも高濃度糖輸液にインスリン投与を併用することも必要である。一方、重症代謝不全においては、ミトコンドリア機能が一過性に低下し、糖の処理が出来ずに糖負荷が乳酸産生を亢進させてしまうことが考えられる。重症低血糖を回避しつつ代謝不全からアナボリックな状態へ移行させるためには、糖負荷と同時にインスリンのようなアナボリックホルモンの投与を考慮すべきであると考えられ、インスリンの他、IGF-I のようなアナボリックホルモンの有用性が示唆された。

## E. 結論

重症ケトアシドーシスを呈する症例では稀少疾患である SCOT 欠損症や $\beta$ ケトチオラーゼ欠損症や、それに類似した新たな疾患が含まれている可能性があり、一例一例の詳細な解析と症例の蓄積が重要と思われる。

また、比較的頻度の高い小児ケトン血性低血糖症には、重症ケトアシドーシスを呈する例や頻回に発作を繰り返す例が見られ、代謝/内分泌性基礎疾患を有する例が存在することから、背景にある疾患の検索は必須である。速やかな糖輸液による初期治療の重要性が示された一方、インスリン分泌不全やミトコンドリア機能不全を伴った症

例に対しては、代謝改善のためにインスリンや IGF-I のアナボリックホルモン併用が有効であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Fukao T, Horikawa R, Naiki Y, Tanaka T, Takayanagi M, Yamaguchi S, Kondo N: A novel mutation (c.951C>T) in an exonic splicing enhancer results in exon 10 skipping in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. *Mol Genet Metab* 100:339-344, 2010

### 2. 学会発表

1) 深尾敏幸、山口清次、重松陽介、高柳正樹、新宅治夫、堀川玲子 「先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究」班

先天性ケトン体代謝異常症(T2 欠損症、SCOT 欠損症)の診断指針—日本での診断された症例の検討から 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21~23日、大阪、2010

2) 宮下健悟、山本晶子、西垣五月、水野裕介、野田雅裕、内木康博、堀川玲子 Glycogen storage disease type 1b の8例の臨床像と生体肝移植予後。第53回日本先天代謝異常学会総会（千葉、2011年11月26日）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

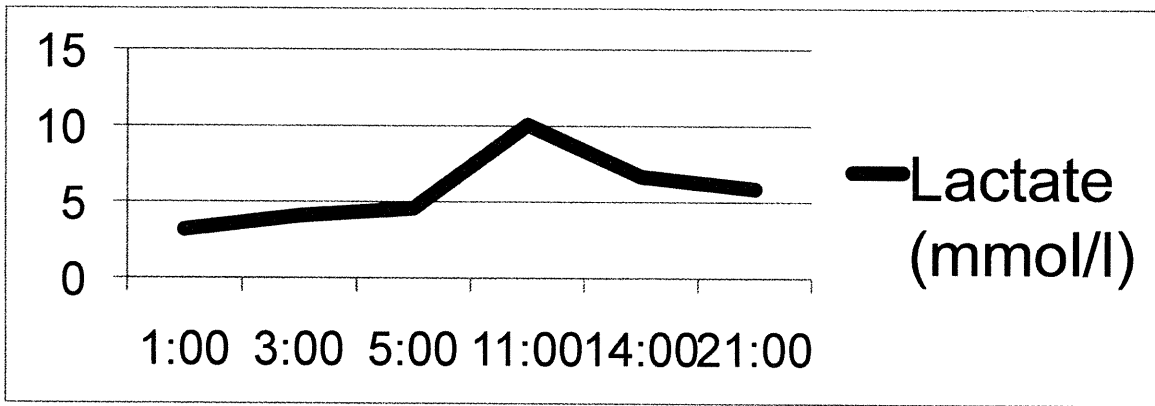
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



総合研究報告書

先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究

分担研究課題：HMG-CoA リーゼ欠損症の化学診断

研究分担者 重松陽介（教授） 所属：福井大学医学部

研究要旨

「先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究」班の分担研究「HMG-CoA リアーゼ欠損症の化学診断」において、1) HMG-CoA リアーゼ欠損症の有機酸、アシルカルニチン解析結果を検討した。血中アシルカルニチン分析では、C5OH アシルカルニチン（3-hydroxyisovaleryl carnitine）が増加していた。尿有機酸分析では、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸と3-ヒドロキシイソ吉草酸をはじめとする疾患特異的な有機酸が確認された。2) これらの診断指標を用いて、新生児マススクリーニングおよびハイリスク・スクリーニングで確実に化学診断出来るか検討した。濾紙血中の C5-OH カルニチン（3-ヒドロキシイソバレリルカルニチン）を指標としたスクリーニングでは、尿有機酸分析で3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症やピオチン欠乏の例が化学診断され、HMG-CoA リアーゼ欠損症は発見されなかった。HMG-CoA リアーゼ欠損症は希な疾患であるので、診断精度の確認のためには更に大規模な検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) リアーゼ欠損症（本症）においては、代謝ブロックの部位である HMG-CoA から上流の3-メチルクロトニル-CoA までのアシル CoA が蓄積する。そのうち3-ヒドロキシイソバレリル CoA と3-メチルグルタリル CoA がそれぞれカルニチンと結合し、3-ヒドロキシイソバレリル (C5OH) カルニチンと3-メチルグルタリル (C6DC) カルニチンが増加することになる。その増加の程度は、ロイシンの異化代謝の亢進状況によって変化すると考えられるが、まだ不明の点が多い。本症の尿有機酸の異常については既に報告されているところではあるが、アシルカルニチンの変化と関連づけた分析は少ない。また、新生児スクリーニングおよびハイリスク・スクリーニングにおいて、疾患関連アシルカルニチンの変化から確実に化学診断に結びつけられるかは明らかになっていない。このようなスクリーニングから化学診断へのプロセスを検討するために、既診断例での確認とスクリーニングでの適用を試みた。

B. 研究方法

タンデムマス・スクリーニング試験研究及びハイリスク・スクリーニングでの濾紙血・血清アシルカルニチン分析は既報の方法を用いて行った。

尿有機酸分析では、0.1mgクレアチニン含有尿に内部標準としてtropic acid 0.02mgを加え、酸性条件で酢酸エチルを用いて抽出操作を行い、溶媒相を窒素気流下で濃縮乾涸した。乾涸残渣はTMS誘導体化し、ガスクロマト・質量分析 (GC/MS) 法で分析し、内部標準量を用いて定量した。

既に本症と診断されている患者の血液濾紙、血清、尿を収集し、分析に供した。

ハイリスク・スクリーニングでは、特に低出生体重児や、低血糖を経験した小児の検体が分析された。

C. 研究結果

1) 既診断例での分析結果

1歳時に急性発症した本症患者のその後6年間の複数尿の分析では、3-hydroxy-3-methylglutaric acid、3-methylglutaconic acid、3-methylglutaric acid、3-methylcrotonylglycine、3-hydroxyisovaleric acidが経過を通じて観察され、他の1例では、急性発作時に3-hydroxy-3-methylglutaric acidと3-hydroxyisovaleric acidが観察されていた。発作間歇期のアシルカルニチン分析ではC5-OHアシルカルニチンが2例とも上昇していた。ただし、急性発症時の分析では、著しいカルニチン低値がみられ、C5-OHアシルカルニチンの上昇が明らかでなかった。

## 2) スクリーニングにおける化学診断

タンデムマス・スクリーニング試験研究では約5.2万新生児をスクリーニングし、ハイリスク・スクリーニングでは約620検体を分析した。タンデムマス・スクリーニング試験研究では4例でC5-OHカルニチン上昇がみられ、3例が早産低出生体重児で、1例が3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症であった。ハイリスク・スクリーニングでは、23例でC5-OHカルニチン上昇がみられ、そのうちの多くの乳児期早期の早産低出生体重児では、尿有機酸分析で3-ヒドロキシイソ吉草酸の軽度排泄増多がみられ、軽度のビオチン欠乏状態と診断した。また、数例の食事アレルギー治療用ミルクを摂取している乳児で、3-ヒドロキシイソ吉草酸のみならず3-メチルクロトニルグリシンも著しく増加していたが、ビオチン補充により有機酸排泄は速やかに正常化した。尿有機酸分析でHMG-CoAリアーゼ欠損症と診断された症例はなかった。

## D. 考察

今回検討できた患者は乳児期に急性発症している比較的重症例であるが、無症状間歇期においてもC5OHカルニチンの上昇がみられたので、新生児期のろ紙血アシルカルニチン分析においても、これらを指標としてスクリーニングすることが可能であろうと考えられた。事実、乳児期早期に急性発症した本症患者の新生児期濾紙血の分析が本研究班の別の分担研究者により分析され、C5OHカルニチンの上昇が確認されている。ただし、急性発症時の検体を分析するハイリスク・スクリーニングにおいては、著しい低カルニチン血症（遊離カルニチンC0の低値）のためC5OHカルニチンが必ずしも異常増加と判定されない可能性がある。このような状況への対応としては、軽症型β-ケトチオラーゼ欠損症のスクリーニング指標として提案したC5OH/C0比を追加指標として採用しておく必要があると考えられた。

尿有機酸分析については、本症に特異的な異常有機酸が複数確認された。これらの複数の異常有機酸を検出することで本症を容易に化学診断できるものと考えられた。ただし、病期（急性発症時か無症状間歇期か）により、あるいは重症度（軽症例か重症例か）により、異常有機酸の種類や排泄量が変わる可能性があり、特に軽症例では注意が必要と考えられるが、本症は希少疾患であり、更に注意深くハイリスク・スクリーニングでの分析結果判定を行う必要があると思われた。

## E. 結論

HMG-CoAリーゼ欠損症の化学診断は、ハイリスク・スクリーニングでは、本症の特徴的な臨床症状を参考にしながら、血中C5OHカルニチン及びC5OH/C0比の上昇とともに尿中の本症に特異的な異常有機酸の増加を確認することで可能である。新生児期スクリーニングにおいても、濾紙血中C5OHカルニチンの上昇を指標にし、尿有機酸分析で化学診断することが可能である。

ただし、本症は希少疾患であり、軽症型での分析実績がないので、非特異的な臨床症状を呈する事例においても、本症に関連した指標の軽微な変化にも着目し、慎重に診断を進める必要性を指摘しておきたい。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

1) 1)白崎仁幸子, 河北亜希子, 吉川利英, 安富素子, 畑郁江, 重松陽介, 眞弓光文, 大嶋勇成 厳格な食物除去によりクレアチンキナーゼ高値と低カルニチン血症を呈した食物アレルギーの1例. 日本小児アレルギー学会誌. 25(2); 133-137, 2011.

### 2. 学会発表

1) 深尾敏幸, 山口清次, 重松陽介, 高柳正樹, 新宅治夫, 堀川玲子 「先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究」 班先天性ケトン体代謝異常症(T2欠損症、SCOT欠損症)の診断指針-日本での診断された症例の検討から 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21~23日、大阪、2010

2) 重松陽介:タンデムマスを導入した新しい新生児マススクリーニング タンデムマス・スクリーニングの実際とピットフォール. 第114回日本小児科学会学術集会. 2011, 8. 東京

3) 北岡千佳, 伊藤順庸, 犀川太, 米澤克隆, 畑郁江, 重松陽介, 深尾敏幸: 断乳と感染を契機に重篤なケトアシドーシス発作を来したサクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ(SCOT)欠損症の1例. 第301回日本小児科学会北陸地方会. 2011, 3. 金沢.

## G. H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 総合研究報告書

先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究

### 分担研究課題

タンデムマス・有機酸診断、診断指針作成、症例スクリーニング

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科学）

### 研究要旨

「先天性ケトン体代謝異常症（HMG-CoA 合成酵素欠損症、HMG-CoA リアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT 欠損症）の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究」班の分担研究で、我々は日本を含むアジアにおける $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の有機酸、アシルカルニチン分析所見を検討し、日本人症例の代謝プロフィールの特徴を明らかにした。また、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA（HMG-CoA）リアーゼ欠損症の新生児例をタンデムマス・スクリーニングで発見した。従来発症後の症例を4例診断しているが、発症前の新生児期に診断した症例は初めてであった。本症例は正常発達を獲得している一方、過去の症例はいずれも何らかの障害を残しており、新生児期に発見することの重要性が明らかになった。さらに生化学診断が困難な SCOT 欠損症などのケトン体代謝異常症の酵素学的診断法を確立するために、*in vitro* probe assay 法開発の基礎的検討を行った。安定同位体ラベルのケトン体を負荷したが、現時点では診断は困難であると結論付けた。

### 研究協力者

長谷川有紀、小林弘典、虫本雄一、ジャミヤン・プレブスレン、山田健治、高橋知男

（以上 島根大学小児科）

重松陽介（福井大学看護学科）

深尾敏幸（岐阜大学小児科）

### A. 研究目的

先天性ケトン体代謝異常症のうち、 $\beta$  ケトチオラーゼ（T2）欠損症は、尿中有機酸分析および血中アシルカルニチン分析による生化学診断が行われる。本症は間欠的に起こるケトーシス発作を主徴であり安定期には正常な生活をし知能も正常なことが多い。しかしいったん重篤なケトアシドーシス発作が起こると死亡したり、後遺症として中枢神経障害を起こす可能性がある。このため、早期診断により体質を知っておく必要がある。このためには新生児マススクリーニングで発症前に診断できることが望ましいが、日本人症例は少ない。そこで、ア

ジア諸国を含めた T2 欠損症患者の代謝プロフィールを比較検討した。

また重篤なケトーシスを主徴とするケトン体代謝異常の中には、サクシニル-CoA : 3 ケト酸トランスフェラーゼ (SCOT) 欠損症も知られているが、SCOT 欠損症の代謝プロフィールはケトン体増加のみであり、特異的生化学診断は困難である。そこで、培養細胞とタンデムマスを用いる *in vitro* probe assay 法によるケトン体代謝異常の酵素診断測定系を確立するための基礎実験を行った。

さらに HMG-CoA リアーゼ欠損症は稀な疾患であるが、新生児タンデムマス・スクリーニングによる障害予防が可能と期待されている。わが国ではこれまでスクリーニングで診断された症例はなかったが、今回、新生児期に診断された症例を経験した。これまでの診断症例と比較し、早期発見に関するスクリーニングの有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1) $\beta$ ケトチオラーゼ (T2) 欠損症の代謝プロフィールの検討

2001年から2011年までに島根大学 (尿中有機酸分析、および血中アシルカルニチン分析)、福井大学 (主にアシルカルニチン分析)、岐阜大学 (酵素、遺伝子解析) で診断した症例の尿中有機酸所見と血中アシルカルニチン所見を、日本人患者8名とアジア諸国32名 (内訳: 中国6例、インド11例、ベトナム14例、タイ1例) と比較検討した。

### 2) IVP assay法によるケトン体代謝異常診断の基礎的検討

培養皮膚線維芽細胞とタンデムマスを用いる IVP assay法で、ケトン体である3-OH-酪酸を負荷して培養し、培養液中のアシルカルニチンの変化について検討を行った。細胞は正常対照と SCOT欠損症例、およびT2欠損症例を用いて比較した。なお、22年度は通常の3-OH-酪酸を25mMで負荷して分析を行い、この結果を踏まえて23年度には安定同位体の3-OH-酪酸を5mMで負荷するなど、分析方法の検討も行った。

### 3) HMG-CoAリアーゼ欠損症 (HMG尿症) におけるタンデムマス・スクリーニングの有用性の検討

2011年末までに島根大学で診断された4症例の予後と比較し、スクリーニングの有用性を検討した。

## C. 研究結果

### 1) $\beta$ ケトチオラーゼ (T2) 欠損症の代謝プロフィールの検討

(a) 代謝プロフィールの異常頻度: 表1に示すように、日本人症例は尿中有機酸で特徴的な異常である2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸 (2M3HB) の上昇を検出したのは、8例中5例に認められた。しかし同時に見られるチグリルグリシン (TG) の明らかな上昇は1例のみであった。さらにタンデムマスによる血中アシルカルニチン分析では、本症に特徴的なC5:1またはC5-OHの上昇が認められたのは8例中1例のみであった。

一方、アジア諸国の患者では32例中、尿中有機酸分析を行った29例全例で2M3HBの著明な上昇を認め、TGも29例中28例で上昇を認めた。血中アシルカルニチン分析では分析を行った28例のうち、C5:1の上昇を22例で、C5-OHの上昇を20例で認めた。両方が上昇していたのは28例中19例であった。

#### (b) 異常代謝産物の排泄量の比較 (表1)

2M3HBの排泄量は、日本人症例ではガスクロマトグラムのピーク面積比による定量で4.0~33.9 (正常<1.3) であったのに対し、アジア諸国の患者では21.1~950.4以上と著明な高値を示した。

アシルカルニチンの排泄量も、日本人症例ではほとんど異常値を示さなかったが、アジア諸国の症例ではC5:1濃度が0.22~1.21  $\mu\text{mol/L}$  (正常<0.2)、C5-OH濃度は1.03~2.93  $\mu\text{mol/L}$  (正常<1.0) であった。

### 2) in vitro probe (IVP) assay法によるケトン体代謝異常診断の基礎的検討

培養皮膚線維芽細胞とタンデムマスを用いる IVP assayは、脂肪酸 $\beta$ 酸化能を評価する方法である。グルコースフリー、遊離脂肪酸フリーのメディアウムに脂肪酸などの基質を添加して96時間後の培養液中に分泌されたアシルカルニチンを測定して、 $\beta$ 酸化のどこが障害されているのかを診断する。この方法を応用して、ケトン体である3-ヒドロキシ酪酸を負荷して、アセチルCoAの生成量をアセチルカルニチン量をマーカーとして測定すればケトン体利用能を評価できるのではないかと考え、基礎実験を行った。

ナチュラルな3-ヒドロキシ酪酸を添加した IVP assay (図1) も、安定同位体ラベルの3-ヒドロキシ酪酸を負荷した場合 (図2) も、SCOT欠損症やT2欠損症などのケトン体代謝異常症でもアセチルカルニチンの生成には正常と差がみられなかった。

### 3) HMG-CoAリアーゼ欠損症 (HMG尿症) におけるタンデムマス・スクリーニングの有用性の検討

島根大学ではこれまでに4例のHMG尿症を診断した。2011年に診断された新生児症例は多

呼吸と軽度のアンモニア高値を契機に尿中有機酸分析で診断された。症状は自然軽快したが、日齢5のガスリーろ紙血を用いてタンデムマス分析を行ったところ、C5-OHの有意な上昇を検出した。一方、2010年以前に診断した3症例はいずれも強い低血糖から意識障害やけいれんを生じており、てんかんや発達遅滞などの後遺症を残していた。

#### D. 考察

2年間の研究で、 $\beta$ ケトチオラーゼ (T2) 欠損症は日本人症例は稀であり、一方、アジア諸国、特に南アジアで先天代謝異常の中でも頻度の高いことが明らかとなった。また、代謝プロフィールは日本と、アジア諸国では大きく異なっており、日本人症例では尿中有機酸分析でも血中アシルカルニチン分析でも、異常検出頻度はアジア諸国の患者に比べて明らかに低かった。これは日本人症例では生化学診断が困難なことを示しており、タンデムマス・スクリーニング対象疾患としては、新生児期に見逃す可能性が高く、早期診断の方法を検討する必要がある。 $\beta$ ケトチオラーゼ欠損症の生化学診断において、その代謝プロフィールは民族差があると思われる。

また IVP assay 法によるケトン体利用能評価は、現時点では困難であった。しかし、疾患に特徴的なケトン体利用パターンがあるため、今後も培養条件等を検討して研究を重ね、診断に役立てたい。

HMG 尿症はこれまでに新生児期にタンデムマス法で発見された例はなかった。今回、新生児期のろ紙血で診断が可能なが示された。本症例の長期的予後を注意深くフォローして、タンデムマス法による新生児スクリーニングの効果を明らかにしたい。

#### E. 結論

平成22-23年度難治性疾患克服研究事業、研究奨励分野の「先天性ケトン体代謝異常症 (HMG-CoA合成酵素欠損症、HMG-CoAリアーゼ欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、SCOT欠損症) の発症形態と患者数の把握、診断治療指針に関する研究」班の分担研究として、1) 日本を含むアジアにおける  $\beta$ -ケトチオラー

ゼ欠損症の有機酸、アシルカルニチン分析の検討から、日本人症例およびアジア諸国の症例の特徴を明らかにした。2) 生化学診断が困難なSCOT欠損症などのケトン体代謝異常症について、in vitro probe assayを用いてケトン体利用能の評価を試みた。3) HMG-CoAリアーゼ欠損症の新生児でタンデムマス・スクリーニングにより診断可能であった症例をわが国で初めて経験した。長期的なフォローアップによって、本疾患に対するタンデムマス・スクリーニングの有用性をさらに明らかにしたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. *Molecular Genetics and Metabolism* 102(3): 343-348, 2011 (March)
- 2) Fukao T, Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, Yamaguchi S, Kondo N: Three Japanese patients with beta -ketothiolase deficiency whoshare a mutation , c.431A>C(H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. *JIMD reports*, in press
- 3) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀 友博, 小林弘典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2欠損症のろ紙血血清のアシルカルニチンプロファイルの経時的変化. *日本小児科学会雑誌* 115(5): 956-960, 2011 (5月)
- 4) 山口清次, 重松陽介, 河地 豊, 福士 勝: 新生児マス・スクリーニング検査施設基準日本マス・スクリーニング学会制定 (2010年3月). *日本マス・スクリーニング学会誌* 21(3): 207-209, 2011 (12月)



- 5) Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of Chromatography B* 878(13-14): 942-948, 2010 (April)
- 6) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain & Development* 32: 409-411, 2010 (May)
- 7) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial  $\beta$ -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development* 32: 362-370, 2010 (May)
- 8) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type2. *Journal of Chromatography B* 878: 1673-1676, 2010 (Jun)
- 9) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat Stress Deteriorates Mitochondrial  $\beta$ -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Disorders. *Journal of Chromatography B* 878(20): 1669-1672, 2010 (Jun)
- 10) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique. *Journal of Chromatography B* 878: 3113-3118, 2010 (November)
- 11) 虫本雄一, 竹谷健, 長谷川有紀, 小林弘典, 福井徹, 渡邊敏明, 山口清次: ステロイド抵抗性の難治性アトピー性皮膚炎として加療されていたビオチン欠乏の1例. *アレルギーの臨床* 30(6): 543-547, 2010 (6月)
- 12) 虫本雄一, 山口清次: ロイシン. *小児内科* 42(7): 1084-1087, 2010 (7月)
- 13) 小林弘典: 新生児拡大マススクリーニングータンデムマス法-. *小児科臨床* 63(10): 2063-2069, 2010 (10月)
- 14) 北川照男, 松田一郎, 大和田操, 岡野善行, 大浦敏博, 青木菊麿, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介: タンデムマス法による新生児マススクリーニングで見つかる有機酸・脂肪酸代謝異常症の理解のために. *特殊ミルク情報* 46: 34-43, 2010 (11月)

## 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T, Fukuda S: A hypolipidemic drug, bezafibrate, can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. Denver, USA, April 2011
- 2) Fukao T, Yamaguchi S, Takayanagi M, Shigematsu Y, Ishige M, Tanaka T, Takahashi T, Ihara T, Murakami J, Ohtsu Y, Onigata K, Kosaka K, Yorifuji T, Kondo N: HMG-CoA lyase deficiency in Japan: Question-based follow-up study. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Geneva, Switzerland, August 2011
- 3) 山口清次: ベザフィブレードのミトコンドリア  $\beta$  酸化異常症に対する治療 -in vitro probe assay による評価-. 第53回日本小児神経学会総会. 横浜, 2011年5月

- 4) 山口清次, 李紅, Purevsuren J, 古居みどり, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 深尾敏幸, 福田誠司: タンデムマスと培養細胞を用いる *in vitro* probe assay の応用: ベザフィブレードのミトコンドリア  $\beta$  酸化異常症に対する効果の評価. 第 36 回日本医用マススペクトル学会年会. 大阪, 2011 年 9 月
- 5) 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン・ジャミヤン, 山田健治, 高橋知男, 長谷川有紀, 御牧信義, 山口清次: タンデムマス法による新生児スクリーニングを契機に発見された母親のメチルクロトニルグリシン尿症. 第 38 回日本マス・スクリーニング学会. 福井, 2011 年 10 月
- 6) 長谷川有紀, 高橋知男, 佐野葉子, 中田節子, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレン・ジャミヤン, 長沼邦明, 山口清次: 軽度の多呼吸を契機に GC/MS とタンデムマス・スクリーニングで診断された 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症の新生児例. 第 38 回日本マス・スクリーニング学会. 福井, 2011 年 10 月
- 7) 深尾敏幸, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介, 新宅治夫: 日本人 HMG-CoA リアーゼ欠損症の臨床像: 研究班におけるアンケート調査結果から. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 東京, 2011 年 11 月
- 8) 虫本雄一, プレブスレン ジャミヤン, 小林弘典, 長谷川有紀, 山田健治, 山口清次: *In vitro* probe assay によるカルニチントランスポーター機能評価法: 原発性カルニチン欠乏症の酵素診断. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 東京, 2011 年 11 月
- 9) Nguyen K-N, Vu D-C, Nguyen H-T, Bui T-P, Can N -T-B, Khu D -T-K, Nguyen L -T, Yamaguchi S, Hasegawa Y, Purevsuren J, Kobayashi H: Methylmalonic acidemia in Vietnamese patients : Clinical characteristics and outcome. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 東京, 2011 年 11 月
- 10) Yamaguchi S: Heat Stress and Acute Encephalopathy in Childhood due to Inherited Organic and Fatty Acid Disorders. International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases. Taipei, Taiwan, March 2010
- 11) Fukao T, Nguyen H-T, Nguyen N-T, Vu D-C, Can N -T-B, Pham A -T-V, Nguyen K -N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Bui T-P, Koning K-E-N, Wanders R -J-A, Koning T -D, Nguyen L -T, Yamaguchi S, Kondo N: A common mutation R208X identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 12) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Fukuda S, Yamaguchi S: Clinical and genetic investigation of 12 Japan cases of glutaric acidemia type1. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 13) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Li H, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Developed diagnostic method for carnitine cycle disorders using *in vitro* acylcarnitine probe assay. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 14) Yamaguchi S: Pediatric emergency and nutritionally treatable inborn errors of metabolism. 7th Asia -pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Lecture. Indonesia, October 2010
- 15) Yamaguchi S: Expanded newborn screening in JAPAN, and the benefit for collaboration with developing countries. 7th Asia -pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Symposium. Indonesia, October 2010
- 16) Yamaguchi S: Organic acidemia and its treatment in JAPAN. 7th Asia -pacific regional meeting of the international

society for neonatal screening,  
Symposium. Indonesia, October 2010

- 17) 八木麻理子, 栗野宏之, 辻雅弘, 但馬剛, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 竹島泰弘, 松尾雅文: 幼児期より筋痛を繰り返し、横紋筋融解症を契機に診断に至った三頭酵素欠損症の一例. 第 47 回日本小児神経学会近畿地方会. 大津, 2010 年 2 月
- 18) 深尾敏幸, 山口清次, 長谷川有紀, 小林弘典, Thao B-P, Hoan N-T, Nhan N-T, 近藤直実:  $\beta$ -ketothiolase 欠損症: ベトナムにおけるコモン変異の同定. 第 113 回日本小児科学会. 岩手, 2010 年 4 月
- 19) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀友博, 青木雄介, 小林弘典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: CPT2 欠損症同胞の初期カルニチン治療における血清、尿中アシルカルニチンの推移. 第 113 回日本小児科学会. 岩手, 2010 年 4 月
- 20) 長谷川有紀, 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン ジャミヤン, 山口清次: 乳幼児期に嘔吐発作で発症した有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の検討. 第 52 回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010 年 10 月
- 21) 深尾敏幸, 山口清次, 重松陽介, 高柳正樹, 新宅治夫, 堀川玲子: 先天性ケトン体代謝異常症 (T2 欠損症、SCOT 欠損症) の診断指針-日本での診断された症例の検討から. 第 52 回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010 年 10 月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

表 1.  $\beta$  ケトチオラーゼ欠損症の代謝プロフィールの民族的特徴

国	Case No.	年	診断年齢	状態	GC/MS		MS/MS		
					2M3HB < 1.3	TG 0.0	C5:1 < 0.2	C5-OH < 1.0	C0 >20
日本	1	01	8m	A	<u>31.5</u>	nd	<u>0.02</u>	<u>0.12</u>	<u>59.64</u>
	2	06	3y4m	A	<u>23.6</u>	nd	<u>0.01</u>	<u>0.11</u>	<u>20.44</u>
	3	08	3y4m	A	<u>21.8</u>	nd	<u>0</u>	<u>0.12</u>	<u>24.51</u>
	4	08	3y8m	A	<u>4.0</u>	nd	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>X</u>
	5						<u>0.06</u>	<u>0.52</u>	
	6						<u>0.05</u>	<u>0.54</u>	
	7						<u>0.13</u>	<u>0.43</u>	
	5	-	(>20y)	S	<u>33.9*</u>	<u>140.6*</u>	<u>0.85</u>	<u>3.61</u>	
中国	1	05	5m	A	<u>129.2</u>	<u>80.0</u>	<u>0.24</u>	<u>nd</u>	<u>27.05</u>
	2	05	1y1m	S	<u>67.0</u>	<u>30.0</u>	<u>0.29</u>	<u>1.30</u>	<u>44.57</u>
	3	06	1y1m	A	<u>125.9</u>	<u>29.4</u>	<u>0.70</u>	<u>1.68</u>	<u>17.94</u>
	*4	07	2y6m	?	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>0.19</u>	<u>0.25</u>	<u>22.87</u>
	5	08	14y10	?	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>0.60</u>	<u>0.35</u>	<u>32.24</u>
	6	05	?	S	<u>72.9</u>	<u>384.6</u>	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>X</u>
インド	1	02	6m	A	<u>950.4</u>	<u>853.5</u>	<u>0.66</u>	<u>2.98</u>	<u>12.3</u>
	2	07	7m	A	<u>83.5</u>	<u>OR</u>	<u>0.01</u>	<u>0.16</u>	<u>22.5</u>
	3	03	7m	A	<u>31.4</u>	<u>128.8</u>	<u>0.29</u>	<u>1.03</u>	<u>16.2</u>
	4	05	1y1m	S	<u>76.7</u>	<u>trace</u>	<u>0.22</u>	<u>0.91</u>	<u>29.7</u>
	5	05	2y5m	A	<u>32.0</u>	<u>-</u>	<u>0.02</u>	<u>0.57</u>	<u>5.61</u>
	6	07	11y5m	S	<u>43.5</u>	<u>185.1</u>	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>X</u>
	7	07	?	S	<u>21.1</u>	<u>42.8</u>	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>X</u>
	8	05	?	S	<u>160.5</u>	<u>64.0</u>	<u>0.32</u>	<u>2.69</u>	<u>31.3</u>
	9	09	?	S	<u>40.19</u>	<u>381.32</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>
	10	10	2y5m	A	<u>23.93</u>	<u>15.7</u>	<u>0.11</u>	<u>0.54</u>	<u>13.45</u>
	11	10	10m	A	<u>70.18</u>	<u>155.0</u>	<u>0.44</u>	<u>2.93</u>	<u>50.19</u>
ベトナム	1	05	3m	A	<u>203.1</u>	<u>228.0</u>	<u>0.42</u>	<u>1.10</u>	<u>19.92</u>
	2	06	3m	S	<u>53.7</u>	<u>OR</u>	<u>0.19</u>	<u>1.09</u>	<u>30.92</u>
	3	06	6m	A	<u>120.1</u>	<u>207.8</u>	<u>0.60</u>	<u>2.73</u>	<u>34.07</u>
	4	06	7m	A	<u>132.7</u>	<u>101.7</u>	<u>0.78</u>	<u>1.92</u>	<u>28.95</u>
	5	08	11m	A	<u>419.1</u>	<u>192.7</u>	<u>0.89</u>	<u>2.46</u>	<u>26.19</u>
	6	08	2y9m	A	<u>73.9</u>	<u>472.1</u>	<u>0.53</u>	<u>1.52</u>	<u>34.87</u>
	7	09	3y1m	S	<u>34.1</u>	<u>168.2</u>	<u>1.20</u>	<u>2.35</u>	<u>18.07</u>
	8	09	?	A	<u>118.7</u>	<u>212.7</u>	<u>0.44</u>	<u>1.38</u>	<u>23.91</u>
	9	10	1y0m	A	<u>80.8</u>	<u>129.54</u>	<u>0.23</u>	<u>0.94</u>	<u>29.07</u>
	10	10	10m	A	<u>27.0</u>	<u>62.79</u>	<u>0.19</u>	<u>1.90</u>	<u>27.43</u>
	11	10	?	A	<u>256.27</u>	<u>342.17</u>	<u>0.49</u>	<u>2.61</u>	<u>11.22</u>
	12	10	6m	A	<u>201.41</u>	<u>22.00</u>	<u>0.40</u>	<u>1.76</u>	<u>13.63</u>
	13	11	8m	A	<u>97.20</u>	<u>80.78</u>	<u>15.56</u>	<u>13.81</u>	<u>18.90</u>
	14	11	1y3m	A	<u>43.32</u>	<u>86.00</u>	<u>0.28</u>	<u>1.96</u>	<u>20.46</u>
タイ	1	07	1y	?	<u>x</u>	<u>x</u>	<u>1.21</u>	<u>2.83</u>	<u>23.69</u>

A=急性期

S=安定期

2M3HB=2-me-3-OH-butyrate;

TG=tiglylglycine

x = 検査せず

OR=振り切れ(over range)

- = 検出感度以下

? = 詳細不明