

原 著

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

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学¹⁾, 同 連合創薬医療情報研究科医療情報学専攻²⁾, 島根大学医学部小児科³⁾

久保田一生¹⁾ 深尾 敏幸¹⁾²⁾ 堀 友博¹⁾ 小林 弘典³⁾
船戸 道德¹⁾ 長谷川有紀³⁾ 山口 清次³⁾ 近藤 直実¹⁾

要 旨

我々は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)2欠損症の血液ろ紙、血清のアシルカルニチンプロファイルの出生後からの経時的変化を検討した。症例は日齢0の男児。切迫早産のため在胎37週0日、帝王切開にて出生した。姉がCPT2欠損症のため本症例もブドウ糖輸液を行い注意深い観察を行った。血液ろ紙、血清のアシルカルニチンプロファイルを経時的に分析し、以下の所見と姉がCPT2欠損症と酵素診断されていることから本症例は無症状であったがCPT2欠損症と化学診断した。血液ろ紙におけるC16-アシルカルニチン(C16)、C18:1アシルカルニチン(C18:1)、C18-アシルカルニチン(C18)は日齢3にピークとなり、カットオフ値を超えていたがその後カットオフ値以下となった。(C16+C18:1)/C2は生後14日までカットオフ値を超えており、スクリーニング指標として有用と考えられた。血清でもC16、C18:1、C18は日齢3にピークとなり、その後徐々に低下したが、日齢14まで常にカットオフ値を超えており、ろ紙血よりも血清におけるアシルカルニチン分析の方が確実に異常を指摘できた。ろ紙血による現行の採血時期における脂肪酸代謝異常症のスクリーニングでは、我々の症例のようにすでにC16、C18、C18:1がカットオフ値を下回り偽陰性となる可能性がある。このようなCPT2欠損症例を見逃さないためにはスクリーニング時期をより早期に設定する必要性が示唆された。

キーワード：CPT2欠損症，脂肪酸β酸化障害，アシルカルニチン，
タンデムマススペクトロメトリー，新生児マスキューニング

はじめに

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)2欠損症は、常染色体劣性遺伝形式を示し、ミトコンドリア脂肪酸β酸化障害をきたす疾患の1つである。ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化系は肝臓ではブドウ糖からのエネルギー供給が低下したときなどに作動してアセチル-CoAやケトン体など代替エネルギーを産生する。また脂肪酸β酸化系は心臓や骨格筋においては安静時のエネルギー産生において重要である。長鎖脂肪酸が細胞質からミトコンドリア内に輸送される際にカルニチンシャトルが必要である。長鎖脂肪酸が活性化されたアシル-CoAはミトコンドリア外膜に存在するCPT1により、アシルカルニチンとなる。アシルカルニチンはカルニチンアシルカルニチン

トランスロカーゼによりミトコンドリア内膜を通過し、CPT2により再びアシル-CoAへ変換される。CPT2に異常があるとミトコンドリア内でアシルカルニチンからアシル-CoAへの変換が障害され、β酸化を受けることができず、アシルカルニチンが蓄積する。このように脂肪酸代謝が十分に行われず、エネルギー産生が低下することで発症する。

CPT2欠損症は本邦におけるタンデム型質量分析計(以下タンデムマス)によるマスキューニング・パイロット研究などの報告によれば、比較的頻度の高い脂肪酸酸化異常症である¹⁾。

臨床型は大きく出生前発症型、乳幼児発症型、軽症型(骨格筋型)の3つに分類される。出生前発症型は腎異形性、大脳奇形、顔貌異常など認め、致死的である。乳児発症型は低ケトン性低血糖の発作として発症し、乳幼児突然死やReye様症候群と関連がある。軽症型(骨格筋型)は成人期に偶発性横紋筋融解症で発症する²⁾。

我々は以前1歳3か月にReye様症候群で発症したCPT2欠損症例を経験した³⁾。今回その次子で、出生

(平成22年3月23日受付)(平成23年1月17日受理)

別刷請求先：(〒501-1194)岐阜市柳戸1-1

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

久保田一生

E-mail: kubotak@gifu-u.ac.jp

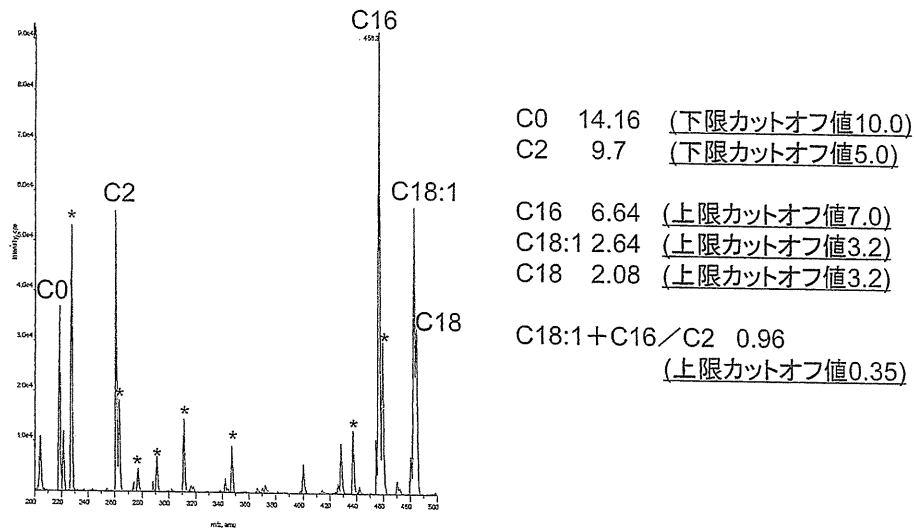


図1 生後12時間後のろ紙血アシルカルニチンプロファイル
横軸はm/z値, 縦軸は相対量を示した. 図右に各アシルカルニチンの定量値(μmol/l)と括弧内に上限または下限カットオフ値を示した. *は内部標準物質. C0, C2に比較してC16, C18:1, C18などの長鎖アシルカルニチンが高く, (C18:1+C16)/C2も上昇しており, CPT2欠損症に特徴的なパターンである.

直後から経過観察し, 生後12時間後から経時的に血清, ろ紙血のアシルカルニチン推移を観察し, CPT2欠損症と化学診断できた症例を経験した. タンデムマスによる新生児スクリーニングの実施時期を考える上で貴重な経験であると考え報告する.

症 例

在胎週数37週0日, 出生体重2,600g, 男児.

家族歴: 姉がCPT2欠損症で当科にて加療中. 姉は1歳3か月にReye様症候群にて発症した. 発作時の有機酸分析にて低ケトン性ジカルボン酸尿, アシルカルニチン分析にてCPT2欠損症が疑われた. 線維芽細胞を用いたCPT2活性がコントロールの16%と低下しておりCPT2欠損症と診断した. ゲノムレベルでの遺伝子解析では父由来のCPT2遺伝子にE174K変異が同定されたが, 母由来の変異は同定されなかった³⁾.

母親の妊娠経過: 次子妊娠にあたり, 遺伝相談を実施した. 姉で母由来の変異は同定されておらず, 出生前に遺伝子解析を行っても保因者か患者かの区別がつけられないこと, 新生児期に十分なグルコースの補給で新生児期発症を予防できる可能性が高いことを説明し, 両親の希望で出生前検査は行わずに妊娠は継続された. 妊娠36週6日, 切迫早産にて入院. 翌日緊急帝王切開となった.

出生後の経過: アプガースコア1分9点, 5分10点で仮死なく出生. 体温36.8°C, 呼吸数54回/分, 心拍数134回/分, 血圧59/30mmHgで活気は良好であった. 大泉門は平坦, 肺野は清, 心音は整, 腹部は平坦

で軟, 筋トーン低下や外表奇形を認めなかった. 血液生化学検査では, アンモニア値は出生後157μg/dlとやや高値であったが, 生後3日には100μg/dl以下となり一過性であった. 血糖値は46mg/dlと著明な低血糖(40mg/dl以下)は認めず, その後も低血糖は認めなかった. その他, 胸部レントゲンではCTR47%で心拡大はなく, 心臓, 腎, 頭部超音波検査では異常を認めなかった.

出生後10%グルコースにてグルコース注入速度(GIR)4.8mg/kg/minの糖補充を開始した. 両親の承諾のもと出生後早期に遺伝子解析を実施したところ患児もE174K変異をヘテロでもつことが判明し, 注意深い観察をおこなった. 日齢1に10ml×8回/日から経管栄養を開始し, 以後1回哺乳量を10mlずつ増量し, 輸液は漸減していった. 日齢5に経静脈栄養を中止し自律哺乳とした.

方 法

日齢1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14にろ紙血, 血清を採取し, タンデムマスによるアシルカルニチン分析を島根大学において, 既報の方法にて行った⁴⁾.

結 果

生後12時間(日齢1)での血液ろ紙のアシルカルニチンの結果は, C16は6.64μmol/L, C18:1は2.64μmol/L, C18は2.08μmol/Lと長鎖アシルカルニチンが高値であったがカットオフ値以下であった. しかし, (C18:1+C16)/C2は0.96とカットオフ値を超えて高

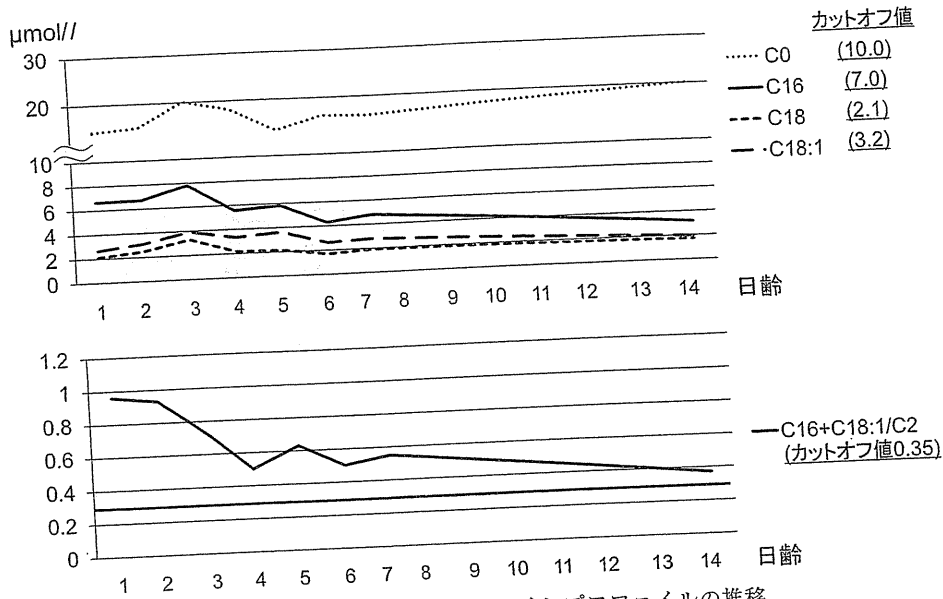


図2 血液ろ紙アシルカルニチンプロファイルの推移

上段の図では横軸は日齢，縦軸は各アシルカルニチン量。括弧内に上限または下限カットオフ値を示した。C16, C18, C18:1 はいずれも日齢3にピークとなり，その後漸減した。遊離カルニチンは明らかな低値を認めない。下段の図は (C16+C18:1)/C2 を縦軸に示した。図中にカットオフ値を直線で示した。出生直後が最も高く，日齢14まで上限値を超えている。

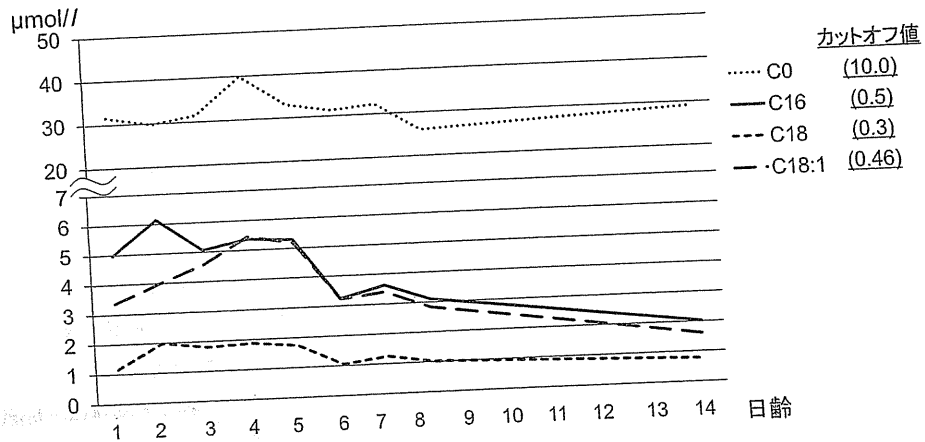


図3 血清アシルカルニチンプロファイルの推移

横軸は日齢，縦軸は各アシルカルニチン量。括弧内に上限または下限カットオフ値を示した。日齢1より明らかな長鎖アシルカルニチンの増加を認める。C16, C18, C18:1 は日齢4にピークとなりその後低下した。遊離カルニチンは明らかな低値を認めない。

値¹⁾であった(図1)。

血液ろ紙アシルカルニチンプロファイルの推移を示す(図2)。C16, C18, C18:1 はいずれも日齢3にピークとなり，その後漸減した。遊離カルニチンは日齢3に20.1μmol/Lまで上昇した後，若干の低下傾向を示したが，カットオフ値以下にはならなかった。CPT2欠損症のスクリーニング指標である (C16+C18:1)/C2 の値の変化は，特に出生直後が最も高い結果となっており，以後徐々に低下しているが，日齢14まで上限

値を超えていた。

次に血清カルニチンのプロファイルを示す(図3)。日齢1の結果にて，C16は4.97μmol/L，C18:1は3.36μmol/L，C18は1.16μmol/Lと長鎖アシルカルニチンの増加が認められ，姉がCPT2欠損症と酵素診断されていることを考えてCPT2欠損症と化学診断した。血清C16, C18, C18:1は日齢4にピークとなりその後低下した。血清中遊離カルニチンは日齢4の39.87μmol/Lをピークに低下傾向となった。

考 察

CPT2欠損症では、血清中アシルカルニチン分画においてC2の低下、C16, C18, C18:1などの長鎖アシルカルニチンの上昇や(C16+C18:1)/C2の上昇をスクリーニング指標にして精査、診断に結びつける。

本症例における血液ろ紙ではC16, C18, C18:1の長鎖アシルカルニチンは日齢3にピークとなったが、上限カットオフ値をやや超える程度であった。しかし、血清中のC16, C18, C18:1は少なくとも日齢14まではカットオフ値を超えており、血清でのアシルカルニチン分析のほうが血液ろ紙に比較してより確実に異常を指摘できることが分かった。(C16+C18:1)/C2の値に関しては、血液ろ紙においては日齢14までカットオフ値を超えていた。血液ろ紙でスクリーニングを行う場合を行う場合、(C16+C18:1)/C2をより重視すべきであると考えられた。

遊離カルニチンは新生児期早期には低下を認めなかった。しかし、遊離カルニチンの低値を伴う二次性カルニチン欠乏が乳幼児発症型CPT2欠損症の患児でみられる²⁹⁾ため今後注意が必要である。患児の姉も発症時に遊離カルニチンの著明な低値を認めていた。

カルニチン欠乏がみられた場合はL-カルニチンの補充が重要である。また、カルニチン欠乏が明らかになる前に予防的な投与を考慮してもよいと思われる。

CPT2欠損症を含む先天代謝異常症のタンデムマススクリーニングは欧米をはじめとして各国で新生児マススクリーニングに導入されており、脂肪酸酸化異常症の早期発見に寄与している。血液ろ紙による新生児マススクリーニングの施行時期は、アメリカでは日齢1~2³⁰⁾に行われ、本邦におけるパイロットテストには日齢4~6のろ紙血が利用されている。本症例の結果では、血液ろ紙では長鎖アシルカルニチンのピークが日齢1~3にあり、その後減少していた。このことから日齢4~6に採取したろ紙血によるタンデムマススクリーニングでは、すでに長鎖アシルカルニチンは低下し始めており偽陰性となる可能性がある。そのため、本邦におけるスクリーニング採血時期を海外と同様にさらに早い時期に行う必要があるのではないかと考えられる。一方で血清アシルカルニチンではいずれの時期でもカットオフ値を超えていた。血液ろ紙分析でカットオフ値を超えていたC14:1アシルカルニチンが経過観察中にカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症症例が報告されており⁷⁾、スクリーニングの再検査や経過追跡には血清アシルカルニチン分析を行うことがよいと考えられる。

また、本症例においては出生時にCPT2欠損症を疑わせるような症状は認めなかったが、生後12時間後の

検体からすでにCPT2欠損症を示唆するアシルカルニチンプロファイルであった。特に本患者で同定されているCPT2遺伝子のE174K変異は、日本人成人型で同定された変異で、10%程度の残存活性を持っている変異である⁸⁾。母由来の変異は同定されていないが、少なくともCPT2の残存活性をもつために姉は新生児型でなく、乳幼児期発症型になったと考えられる。このような残存活性を持つ症例において、さらに持続的に糖補充をしていたにもかかわらず生後12時間からすでに血液ろ紙、血清のいずれにおいても異常が指摘された。

新生児早期からタンデムマス解析で異常を指摘できることから、新生児タンデムマススクリーニングの普及により、このような症例の発症前診断が可能となり、早期の治療的介入、指導により、発症の回避が可能になると思われた。

結 語

CPT2欠損症の血液ろ紙、血清のアシルカルニチンプロファイルの経時的変化を観察した。生後12時間後の検体からすでにCPT2欠損症を示唆するアシルカルニチンプロファイルであった。ろ紙による現行の採血時期におけるスクリーニングでは、すでにカットオフ値を下回っている可能性があり、スクリーニング時期をより早期に設定する必要があるのではないかと考えられた。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, et al. Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination. *J Chromatogr B* 2003; 792: 63-72.
- 2) Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 495-520.
- 3) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, et al. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221: 191-195.
- 4) Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, et al. A retrospective ESI-MS/MS analysis of newborn blood spots from 18 symptomatic patients with organic acid and fatty acid oxidation disorders diagnosed either in infancy or in childhood. *J Inher Metab Dis* 2007; 30: 606.
- 5) Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Dis-

- orders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006 ; 15 : 77—85.
- 6) Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina : 1997-2005. *J Inherit Metab Dis* 2006 ; 29 : 76—85.
- 7) 虫木雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 他. 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症の2例 : 血清分析の必要性. *日本マス・スクリーニング学会誌* 2009 ; 19 : 255—259.
- 8) Wataya K, Akanuma J, Cavadini P, et al. Two CPT2 mutations in three Japanese patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency : functional analysis and association with polymorphic haplotypes and two clinical phenotypes. *Hum Mutat* 1998 ; 11 : 377—386.

Carnitine Palmitoyltransferase-2 (CPT2) Deficiency : Time-dependent Changes of Acylcarnitine Profiles in Dried Blood Spots and Serum after Birth

Kazuo Kubota¹⁾, Toshiyuki Fukao^{1,2)}, Tomohiro Hori¹⁾, Hironori Kobayashi³⁾,
Michinori Funato¹⁾, Yuki Hasegawa³⁾, Seiji Yamaguchi³⁾ and Naomi Kondo¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University

²⁾Medical Information Science Division, United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information,
Gifu University

³⁾Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine

We analyzed time-dependent changes of acylcarnitine profiles in dried blood spots and serum samples after birth in a CPT2-deficient patient. The boy was born at 37 weeks gestation via Caesarean section. Since his sister had CPT2 deficiency, he was carefully followed with intravenous glucose infusion from birth to day 6. Although he had no clinical symptoms, he was also diagnosed as CPT deficiency based on the family history and acylcarnitine analyses. In the acylcarnitine analyses using dried blood spots, peak levels of C16, C18, and C18 : 1 acylcarnitines, which are the usual screening markers for CPT2 deficiency, were above their upper cutoff values on day 3. However, their levels decreased and were under the cutoff values thereafter. The ratio C16 + C18 : 1/C2 was above the upper cutoff values until day 14, indicating that the ratio is a useful screening marker for CPT2 deficiency. In contrast, for acylcarnitine analyses using serum, although the peak levels of C16, C18, and C18 : 1 acylcarnitines were also detected on day 3, their levels declined gradually but still were above their upper cutoff values until day 14. These facts indicate that acylcarnitine analyses using serum detected this abnormality more effectively than using dried blood spots. Therefore, screening for fatty acid oxidation using dried blood spots on day 5 may result in a false-negative result since the values of C16, C18, and C18 : 1 acylcarnitines were under their cutoff values in our CPT2 deficient patient. Screening earlier than on day 5 may be considered to detect CPT2-deficient patients like this case.

