

2. Materials and methods

2.1. Case

The 13-year-old girl was the first child of non-consanguineous parents, and was born at 42 weeks of gestation after an uneventful pregnancy. Her birth weight was 3032 g. One month after birth, an apparent life-threatening event (ALTE) developed; however, she showed normal growth and development. From the age of 3 years, she complained of pain in her leg muscles after walking over a long distance. From the age of 9 years, the frequency of intermittent acute muscle pain increased and even mild exercise occasionally caused severe discomfort in her leg muscles. The symptom was often triggered by infection and menstruation. She experienced bouts of muscle pain after hard exercise such as running on a school field day or hiking on a school excursion. After hard exercise, she felt difficulty in moving because of unusual severe pain in her generalized muscles. Serum acylcarnitine analysis performed at 10 years of age revealed slightly increased levels of long-chain acylcarnitine, on the basis of which very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency was suspected. However, her VLCAD activity was normal and the disorder had not been definitely diagnosed.

At the age of 13 years, she was admitted to Kobe University Hospital with severe myalgia over the whole body. On admission, hematological and biochemical investigations revealed markedly elevated serum creatine kinase (22,885 IU/L), aldolase (62.6 IU/L), and myoglobin (2960 ng/mL). Plasma free and total carnitine and total ketone bodies concentration were normal (Table 1). Echocardiography and electrocardiography did not reveal any evidence of a cardiomyopathy.

Table 1
Laboratory findings upon hospitalization.

<Blood biochemistry>		Reference range	
AST	529	IU/L	13–31
ALT	205	IU/L	8–34
LDH	909	IU/L	115–217
CK	22,885	IU/L	46–168
CK-MB	434	IU/L	0–25
Aldolase	62.6	IU/L	2.2–5.5
Myoglobin	2960	ng/mL	0–60
BUN	11	mg/dL	9–22
Cre	0.34	mg/dL	0.5–1.3
T.chol	167	mg/dL	146–219
TG	58	mg/dL	28–149
Glu	180	mg/dL	61–92
Lactic acid	19.1	mg/dL	3–17
Pyruvic acid	1.47	mg/dL	0.3–0.94
Total ketone bodies	39	μmol/L	26–122
Acetoacetate	24	μmol/L	13–69
β-hydroxy butyrate	15	μmol/L	0–76
Total carnitine	57	μmol/L	45–91
Free carnitine	45.7	μmol/L	36–74
Acylcarnitine	11.3	μmol/L	6–23
<Acylcarnitine analysis>		Reference range	
<i>(Blood spot)</i>			
C14:1	0.21	μM	<0.4
C14-OH	0.12	μM	<0.12
C16:1	0.15	μM	<0.785
C16:0-OH	0.18	μM	<0.12
C18-OH	0.066	μM	<0.1
C18:1-OH	0.15	μM	<0.07
<i>(Serum)</i>			
C14:1	0.4	μM	<0.1
C14-OH	0.2	μM	<0.1
C16:1	0.2	μM	<0.1
C16:0-OH	0.16	μM	<0.8
C18-OH	0.077	μM	<0.05
C18:1-OH	0.13	μM	<0.7

2.2. Methods

2.2.1. Urine organic acid and acylcarnitine analysis

Urine organic acid and blood acylcarnitine analysis from dried blood spots and serum were performed by GC/MS and ESI-MS/MS, respectively, as described in detail previously [4].

2.2.2. Cell culture

Fibroblasts from the patient were cultured in Eagle's minimum essential medium containing 10% fetal calf serum and antibiotics (100 μg/mL each of penicillin and streptomycin; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

2.2.3. Western blot analysis

Western blot analysis was performed following 12.5% SDS/PAGE [5] using rabbit polyclonal antibodies raised against purified MTP protein as the primary antibody. Bound antibodies were visualized using the ImmunoPure NBT/BCIP Substrate Kit (Promega, Madison WI, USA). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay protocol (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.2.4. Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from the patient's fibroblasts using a QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen GmbH Hilden, Germany). We designed 20 sets of primers for amplification of *HADHA* (one for each exon, including 5' and 3' splice sites), and 16 sets for amplification of *HADHB*. Each exon was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and directly sequenced as described previously [6].

3. Results

3.1. Urine organic acid and acylcarnitine analysis

Urine organic acid analysis performed at the same time revealed slight ketosis (as indicated by slightly increased excretion of 3-OH-butyrate), low-ketotic dicarboxylic aciduria (as indicated by increased excretion of adipate and suberate), and 3-OH dicarboxylic aciduria (as indicated by increased excretion of 3-OH-sebacate and 3-OH-dodecanedioate).

Acylcarnitine analysis of blood spots at the time of hospitalization revealed increases in the levels of long-chain 3-OH-acylcarnitines (C14-OH, C16-OH, C18-1-OH). The changes indicated an MTP deficiency. On the other hand, elevation of both long-chain acylcarnitines (C14-1, C16-1) and long-chain 3-OH-acylcarnitines (C14-OH, C18-OH) in serum suggested a VLCAD deficiency (Table 1). These findings strongly suggested long-chain fatty acid metabolism disorder, VLCAD or MTP deficiency, however, it was difficult to distinguish between the two. So acylcarnitine analysis was performed another four times, with inconsistent results: slightly increased levels of long-chain 3-OH-acylcarnitine (C16-OH, C18-1-OH), a feature of MTP deficiency, were noted on two occasions, while no abnormality was noted on the other two occasions. On the basis of these results and her clinical manifestations, we made a chemical diagnosis of a mild form of MTP deficiency, in which neither symptoms nor abnormal laboratory findings are noted during attack-free intervals.

3.2. Western blot analysis

Western blot analysis using samples extracted from the patient's skin fibroblasts detected neither α- nor β-subunits of MTP (Fig. 1), whereas both subunits were detected in control fibroblasts. These findings showed that the patient had an MTP deficiency.

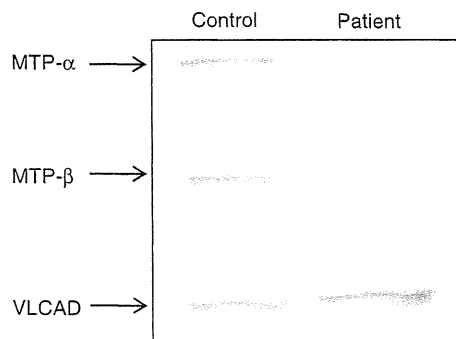


Fig. 1. Western blot analysis of cultured skin fibroblasts of mitochondrial trifunctional protein. MTP α - and MTP β - were not detectable in the patient's fibroblasts. MTP α - and MTP β -, α - and β -subunits of MTP, respectively; VLCAD, very long-chain acyl-CoA dehydrogenase.

3.3. Mutation analysis

Analysis of the genes encoding MTP component enzymes identified compound heterozygous mutations of c.520 C>T/c.1331 G>A (p.R141C/p.R411K) in the *HADHB* gene encoding long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (LCT), one of the enzymes constituting MTP. No mutation was found in the *HADHA* gene.

4. Discussion

Fatty acid metabolism plays an important role in energy supply in the body. Its pathways comprise intake of fatty acids from cell membranes, the fatty acid β -oxidation cycle, an electron transport chain, and production of ketone bodies. More than 20 enzymes and transporters are known to be involved in the metabolism.

MTP resides in the mitochondrial inner membrane, and is a multi-enzyme complex involved in the metabolism of long-chain hydroxyacyl-CoA. In MTP deficiency, β -oxidation of long-chain fatty acids is impaired; the deficiency is asymptomatic when the supply and demand of energy is in balance; however, if the energy supply is inadequate when the demand for energy is increased by infection, disease, exercise, or elongated intervals between meals, the body cannot handle the energy shortage. Symptoms occur in organs requiring large amounts of energy produced by the metabolism of fatty acids, such as the brain, cardiac muscle, liver, and skeletal muscle. The patient reported here began to repeatedly complain of leg pain after exercise at around the age of 3 years, and as she grew up, her muscle symptoms became more prominent. These findings led us to conclude that her clinical manifestations were of the muscular type of MTP deficiency. In addition, an ALTE occurred at the age of one month. It was assumed that this episode might also have been related to MTP deficiency.

MTP deficiency is a very rare disorder, and has thus far been reported in only about 50 patients (of whom 20 were classified as having the neuromyopathic phenotype) in Europe and North America, and in five patients (of whom only one had the neuromyopathic phenotype) in Japan. In many patients with the muscular type, the time from onset to definite diagnosis was long. Spiekerkoetter et al. investigated the clinical manifestations of 11 patients with muscular-type MTP deficiency and reported an average period from initial onset of the disorder to diagnosis of 5 years and 10 months [7]. In the one patient with muscular-type MTP deficiency reported in Japan, rhabdomyolysis began to repeatedly occur at the age of 15 years, and a definite diagnosis was made at the age of 23 years [8]. More recently, it has become possible to perform less expensive, more convenient, and highly accurate blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry, which has resulted in diagnosis of a fatty acid metabolism disorder in an increasing number of

patients. MTP deficiency is characterized by increased 3-OH-acylcarnitine (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1) in serum (or plasma) or blood spots, demonstrated by acylcarnitine analysis, whereas the analysis does not detect any abnormality when no episodic symptoms occur [9]. In our patient, we repeatedly performed blood acylcarnitine analysis and found no consistent results. In the first analysis, the profile from the blood spots indicated an MTP deficiency, while that from the serum indicated a VLCAD deficiency. It was difficult to distinguish between VLCAD and MTP deficiency on the basis of results from the first analysis. In the following analysis, a slight increase in the levels of long-chain 3-OH-acylcarnitines, a feature of MTP deficiency, was noted on some occasions, but no abnormality was detected on other occasions. Comprehensive evaluation of these acylcarnitine analysis results and her clinical manifestations were highly suggestive of MTP deficiency. Furthermore, diagnosis was confirmed by Western blot analysis and genetic analysis. When patients with recurrent myalgia and rhabdomyolysis are examined on the assumption that fatty acid disorder including MTP deficiency may be diagnosed, it is important to repeatedly perform acylcarnitine analysis using samples obtained while symptoms occur.

MTP is an octamer composed of four α -subunits that function as long-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenases (LCHADs) and long-chain enoyl-CoA hydratases (LCEHs), and four β -subunits that function as LCTs [10]. LCHAD and LCEH subunits are encoded by the *HADHA* gene, and LCT subunits are encoded by the *HADHB* gene. These two genes are adjacently located in the human chromosome region 2q23 [11], and consist of 20 and 16 exons, respectively [12,13]. The c.1331 G>A (p.R411K) mutation detected by the *HADHB* gene analysis in our patient is the same as that found by Orii et al. in two Japanese family lines with MTP deficiency, which they reported was mild in both patients [14]. On the other hand, the c.520 C>T (p.R141C) mutation has never been reported, and is therefore novel. Because the latter mutation was not detected in 50 normal controls and Arg141 is conserved in different species, we concluded that the c.520 C>T (p.R141C) mutation was a causative mutation.

Some investigators have compared the neuromyopathic phenotype of MTP deficiency with the lethal phenotype and found that the neuromyopathic phenotype is associated with better preserved enzyme activities and is more closely related to protein expression and clinical manifestations [15,16]. In our patient, the clinical manifestations fell into the category of the neuromyopathic phenotype, but Western blot analysis detected neither α - nor β -subunits of MTP. It has been reported that MTP exerts enzymatic activities in a stable manner only when the α - and β -subunits making up the octameric MTP are all normal, and that mutant proteins yield dominant negative effects to inhibit the activities of normal proteins [17]. However, the reason for this apparent discrepancy between the phenotype and the enzyme activities remains unclear.

5. Conclusion

In patients with recurrent muscular symptoms such as myalgia and rhabdomyolysis, a fatty acid metabolism disorder such as MTP deficiency should be a suspected etiology, even when tests performed during attack-free intervals frequently detect no abnormalities. For the purpose of diagnosing MTP deficiency in these patients, it is important to suspect the disorder on the basis of their past histories and to repeatedly perform acylcarnitine analysis when attacks occur. The biochemical findings in VLCAD and MTP deficiency can overlap, which occurred in our patient and suggest that suspected deficiency of either should lead to Western blot and genetic analysis to rule out both when appropriate. MTP deficiency is a rare disorder, and its rareness may be explained by the presence of patients with recurrent muscular symptoms in whom the disorder has not yet been diagnosed.

References

- [1] Y. Uchida, K. Izai, T. Orii, T. Hashimoto, Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/ 3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1034–1041.
- [2] R.J. Wanders, L. Ijlst, F. Poggi, J.P. Bonnefont, A. Munnich, M. Brivet, D. Rabier, J.M. Saudubray, Human trifunctional protein deficiency: a new disorder of mitochondrial fatty acid beta-oxidation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1992) 1139–1145.
- [3] L. Ijlst, R.J. Wanders, S. Ushikubo, T. Kamijo, T. Hashimoto, Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, *Biochem. Biophys. Acta* 1215 (1994) 347–350.
- [4] Y. Hasegawa, M. Iga, M. Kimura, Y. Shigematsu, S. Yamaguchi, Prenatal diagnosis for organic acid disorders using two mass spectrometric methods, gas chromatography mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 823 (2005) 13–17.
- [5] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76 (1979) 4350–4354.
- [6] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, S. Fukuda, H. Kobayashi, S. Yamaguchi, Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency, *J. Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 46–51.
- [7] U. Spiekerkoetter, M.J. Bennett, B. Ben-Zeev, A.W. Strauss, I. Tein, Peripheral neuropathy, episodic myoglobinuria, and respiratory failure in deficiency of the mitochondrial trifunctional protein, *Muscle Nerve* 29 (2004) 66–72.
- [8] H. Miyajima, K.E. Orii, Y. Shindo, T. Hashimoto, T. Shinka, T. Kuhara, I. Maetsumoto, H. Shimizu, E. Kaneko, Mitochondrial trifunctional protein deficiency associated with recurrent myoglobinuria in adolescence, *Neurology* 49 (1997) 833–837.
- [9] M. Kompare, B.R. William, Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders, *Semin. Pediatr. Neurol.* 15 (2008) 140–149.
- [10] T. Kamijo, T. Aoyama, A. Komiya, T. Hashimoto, Structural analysis of cDNAs for subunits of human mitochondrial fatty acid beta-oxidation trifunctional protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 818–825.
- [11] B.Z. Yang, H.H.Q. Heng, J.H. Ding, C.R. Roe, The genes for alpha and beta subunits of the mitochondrial trifunctional protein are both located in the same region of human chromosome 2q23, *Genomics* 37 (1996) 141–143.
- [12] U. Spiekerkoetter, B. Sun, Z. Khuchua, M.J. Bennett, A.W. Strauss, Molecular and phenotypic heterogeneity in mitochondrial trifunctional protein deficiency due to beta-subunit mutations, *Hum. Mut.* 21 (2003) 598–607.
- [13] K.E. Orii, K.O. Orii, M. Souri, T. Orii, N. Kondo, T. Hashimoto, T. Aoyama, Genes for human mitochondrial trifunctional protein alpha- and beta-subunits are divergently transcribed from a common promoter region, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8077–8084.
- [14] K.E. Orii, T. Aoyama, K. Wakui, Y. Fukushima, H. Miyajima, S. Yamaguchi, T. Orii, N. Kondo, T. Hashimoto, Genomic and mutational analysis of the mitochondrial trifunctional protein beta-subunit (HADHB) gene in patients with trifunctional protein deficiency, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1215–1224.
- [15] U. Spiekerkoetter, Z. Khuchua, Z. Yue, M.J. Bennett, A.W. Strauss, General mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency as a result of either alpha- or beta-subunit mutations exhibits similar phenotypes because mutations in either subunit alter TFP complex expression and subunit turnover, *Ped. Res.* 55 (2004) 190–196.
- [16] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, H. Kobayashi, H. Li, Y. Mushimoto, S. Fukuda, S. Yamaguchi, Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 372–377.
- [17] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, S. Fukuda, H. Kobayashi, S. Yamaguchi, Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 46–51.

特 集

新生児医療の最前線—産婦人科医が知っておきたい新生児の新知识

新生児突然死とその予防

The prevention of sudden neonatal death

虫本 雄一
MUSHIMOTO Yuichi

山口 清次*
YAMAGUCHI Seiji

島根大学医学部小児科学教室 *教授

先天代謝異常症の一部に、乳幼児突然死症候群に類似した発症形態をとる疾患がある。アミノ酸・有機酸代謝異常症では哺乳後の蛋白負荷時に、脂肪酸代謝異常症では哺乳が確立する前や感染罹患に伴う経口摂取不良時に発症しやすい。近年、ガスリー法にかわるタンデムマスによる新しい新生児マススクリーニングが拡大しつつある。新生児突然死の病態解明、また先天代謝異常症による新生児突然死の予防が期待されている。

Key Words

乳幼児突然死症候群, SIDS, 新生児マススクリーニング, タンデムマス, 新生児

はじめに

新生児期は、子宮内環境から子宮外環境への適応の時期である。胎内で保たれていた均衡が崩れると、もともと存在していた疾患が突然に顕在化し、呼吸障害、哺乳低下、痙攣、意識障害、そして突然死をきたすこともある。

早期新生児期に突然死を起こしうる病態を表1に示す¹⁾。B群溶連菌の早発型は急激に発症する。

また、重篤な心奇形であっても出産後早期には必ずしも明らかな症状がない場合があり、動脈管が閉鎖した途端に状態が悪化し死亡することはよく知られている。一方、乳幼児突然死症候群(SIDS; sudden infant death syndrome)は、「それまでの健康状態および既往歴からその死亡が予測できず、しかも死亡状況調査および解剖検査においもその原因が同定されない、原則として、1歳未満の児に突然の死をもたらした症候群²⁾」であるが、SIDSの原因はいまだに解明されていない。

表1 早期新生児期に突然死を起こしうる疾患

- 1) 感染 B群溶連菌(GBS)、単純ヘルペスなど
- 2) 先天性心疾患 動脈管(PDA)依存型の心奇形、不整脈(QT延長症候群など)
- 3) 先天代謝異常症(とくに有機酸・脂肪酸代謝異常症)
- 4) 母体薬物使用の禁断症状
- 5) 窒息その他の事故
- 6) 無呼吸を起こしうる奇形、腫瘍、上気道・中枢神経系の異常
- 7) 犯罪

(仁志田博司, 1999¹⁾より一部改変)

近年、乳幼児突然死の原因として一部の先天代謝異常症、とくに有機酸・脂肪酸代謝異常症などが注目されている³⁾。これらは発症前に診断すれば、突然死を予防することが可能となる。そこで、SIDS様症状で発症する先天代謝異常症とその発症機序、診断、また新生児スクリーニングの重要性について述べたい。

新生児突然死の予防のための タンデムマス・スクリーニング

近年、タンデムマスによる新しい新生児マススクリーニングが拡大しつつある⁴⁾。タンデムマス

法では、血液ろ紙を利用した一回の検査で表2に示すような疾患をスクリーニングできる⁵⁾。現行の新生児マススクリーニング(ガスリー法)対象疾患であるアミノ酸代謝異常症3疾患に加えて、約20疾患以上が検出可能である。わが国でのこれまでのパイロット研究によると、個々の疾患頻度は少ないが、全体の発生頻度は約9,000人に1人である⁴⁾⁶⁾。

タンデムマスによる新生児マススクリーニングは、1997年からパイロット研究が開始された。2003年からは厚生労働省科学研究費補助をうけ、現在は約20%の新生児が検査をうけており、今

表2 タンデムマス・スクリーニングで見つかる主な疾患

	タンデムマスの対象疾患	発症時期	主な臨床症状	発見頻度 ⁺	感度
アミノ酸代謝異常	1)フェニルケトン尿症*	新〜乳	けいれん、発達遅滞	1:6万	○
	2)メープルシロップ尿症*	新〜乳	多呼吸、アシドーシス	—	○
	3)ホモシスチン尿症*	新〜乳	遅れ、発育異常	—	○
	4)高チロシン血症1型	新〜乳	肝・腎不全	—	▲
	5)シトルリン血症(1型)	新〜乳	興奮、多呼吸、昏睡	1:40万	○
	6)アルギニノコハク酸血症	新〜乳	興奮、多呼吸、昏睡	1:80万	○
	7)アルギニン血症	新〜乳	興奮、多呼吸、昏睡	—	▲
	8)シトルリン欠損症	新〜乳	一過性乳児肝炎類似症状	1:9万	▲
有機酸代謝異常	9)メチルマロン酸血症	新〜乳	アシドーシス、遅れ	1:11万	○
	10)プロピオン酸血症	新〜乳	アシドーシス、遅れ	1:4万	○
	11)3-ケトチオラーゼ欠損症	新〜乳	ケトアシドーシス発作	—	▲
	12)イソ吉草酸血症	新〜乳	アシドーシス、体臭	1:40万	○
	13)メチルクリトニグリシン尿症	新〜乳	筋緊張低下、ライ症候群	1:13万	○
	14)HMG血症	新〜乳	ライ症候群、低血糖	—	○
	15)複合カルボキシラーゼ欠損症	新〜乳	湿疹、乳酸アシドーシス	1:40万	○
	16)グルタル酸血症1型	新〜幼	アテトーゼ、遅れ	1:20万	○
脂肪酸代謝異常	17)MCAD欠損症	乳〜幼	ライ症候群、SIDS	1:13万	○
	18)VLCAD欠損症	乳〜成	低血糖、筋肉、心障害	1:20万	○
	19)TFP(LCHAD)欠損症	新〜成	ライ症候群、SIDS	—	○
	20)CPT1欠損症	新〜乳	ライ症候群、肝障害	1:27万	○
	21)CPT2欠損症	新〜成	ライ症候群、筋肉症状	1:30万	▲
	22)TRANS欠損症	新〜乳	ライ症候群、SIDS	—	▲
	23)全身性カルニチン欠乏症	乳〜幼	ライ症候群、SIDS	1:20万	▲
	24)グルタル酸血症2型	新〜乳	ライ症候群、低血糖	1:16万	▲
	25)SCHAD欠損症	新〜乳	低血糖発作	1:80万	▲

略字(疾患名)：HMG=3-OH-3-メチルグルタル酸；VLCAD=極長鎖アシル-CoA脱水素酵素；MCAD=中鎖アシル-CoA脱水素酵素；LCHAD=長鎖3-OH-アシル-CoA脱水素酵素；CPT=カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ、TRANS=トランスロカーゼ；SCHAD=短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素。

発症時期：新=新生児；乳=乳児期；成=成人期。

*現行マススクリーニングの対象疾患、+ 発見頻度は、2008年時点でのパイロット研究の結果。

○：一次対象疾患(おおむね発見できる、治療効果も期待できると判断される疾患)

▲：二次対象疾患(現時点では、見落とし例や治療効果が不確実な可能性のある病気)

(山口清次、2009⁶⁾による)

後も拡大すると考えられる⁷⁾。

■ ■ ■ 新生児突然死を起こす代表的な先天代謝異常症

新生児突然死、または SIDS 様症状で発症する代表的な先天代謝異常症を表 3 に示す³⁾。

タンデムマス・スクリーニングでは、有機酸代謝異常症と脂肪酸代謝異常症、および一部の尿素サイクル異常症(アルギニン血症、シトルリン血症、シトルリン欠損症、アルギニノコハク酸尿症)を含むアミノ酸代謝異常症が対象となる。

■ ■ ■ 先天代謝異常症における突然死の発症機序

アミノ酸・有機酸・脂肪酸代謝異常症の原因は、先天的な酵素障害による有毒物質の蓄積あるいはエネルギー不足による臓器障害である。胎児期には母体の代償機構が働いているため、出生後に新生児の体内で急速に代謝不全が起こると推定される。

新生児期の突然死の起こる機序として、1)低血糖発作、2)アシドーシス、高アンモニア血症などによる代謝不全による組織毒性がある。

1. 低血糖発作

体内でのエネルギー供給源の変化を図 1 に示す⁸⁾。生体はエネルギー源として食事からのグルコースを利用しているが、炭水化物からのエネルギー供給が不足したときは、①グリコーゲンやアラニンなどからの糖新生、②脂肪酸代謝からのケトン体産生を順番に使用する。

低血糖は、糖新生系異常症や脂肪酸代謝異常症でみられる症状である。通常、新生児期は3~4時間ごとに授乳を行うため低血糖は起こりにくい。しかし、重度の酵素活性障害がある場合には、授乳開始前の早期、または出生直後から経口哺乳が確立するまでの間に発症することもある。

2. 代謝不全による組織毒性

血中アンモニアや乳酸などの急激な上昇による

表 3 新生児突然死を起こす可能性がある先天代謝異常症

1. 脂肪酸代謝異常症
a) 中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症
b) 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症
c) カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT 1) 欠損症
d) カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2 (CPT 2) 欠損症
e) アシルカルニチントランスロカーゼ (TRANS) 欠損症
f) 全身性カルニチン欠乏症
g) ケルタル酸血症 2 型
2. 有機酸代謝異常症
a) 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル酸 (HMG) 血症
b) プロピオン酸血症
c) メチルマロン酸血症
3. アミノ酸代謝異常症
a) ヌーブルシロップ尿症
b) 尿素サイクル異常症
4. 糖新生系異常症
a) 糖原病 I 型
b) フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ (FDPase) 欠損症
5. その他
a) グリセロールキナーゼ欠損症
b) 副腎過形成

(山口清次, 2009³⁾ より一部改変)

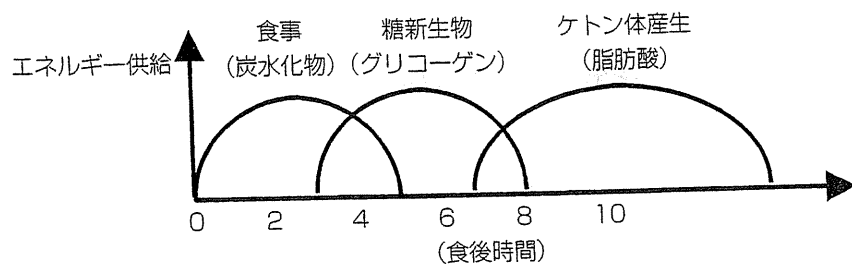


図1 体内のエネルギー供給源の変化

食事からの糖分摂取に引き続き、グリコーゲンからの糖新生が生じる。これらのエネルギー供給が減ると、脂肪酸酸化によるケトン体産生が始まる。脂肪酸代謝異常症は脂肪酸酸化の障害である。とくに長期間の飢餓や感染時など、エネルギー需要の亢進を契機に代謝不全を発症する。

(山口清次：母子保健情報, 2006⁹⁾による)

表4 先天代謝異常症の診断のために必要な検査と検体

検体	検体量	保存方法	測定
尿	最低2ml	冷凍	尿中有機酸分析 アミノ酸分析
血液ろ紙(カスリー)	最低1スポット	冷凍	アシルカルニチン分析*
血清	最低0.5ml	冷凍	アシルカルニチン分析* アミノ酸分析
ヘパリン末梢血	5~10ml	冷蔵	酵素活性、遺伝子解析
皮膚生検	米粒大	常温 ホルマリンにつけない	酵素活性、遺伝子解析
胆汁	1ml	冷凍	アシルカルニチン分析*
臓器(肝、脳、腎)	約1g	冷凍 ホルマリンにつけない	酵素活性、遺伝子解析

(山口清次, 2009¹⁾より一部改変)

代謝不全が考えられる。蛋白負荷が発症の契機となるアミノ酸・有機酸代謝異常症では、出生直後よりも哺乳後から急激に症状が悪化することが多い。

活性測定や異常代謝産物の同定による生化学的診断を組み合わせることが多い⁹⁾。出生前診断の前提として、母親(発端者)の遺伝子診断を行っておく必要がある。

■■■ 出生前診断について

出生前診断の適応にはより慎重な対応が必要となる。タンデムマス・スクリーニングの対象疾患(表2)においては、出生後の診断により多くのケースが発症前から治療を開始することができる。グルタル酸血症2型の新生児型のような出生後早期に発症し重篤になる疾患では、出生前診断の適応となる場合もある。

出生前診断の際には、遺伝子検査のほか、酵素

■■■ 突然死に遭遇したときの対応

新生児突然死に遭遇した際、先天代謝異常症診断するために保存すべき検体を表4に示す³⁾。皮膚線維芽細胞があることで確定診断がつく症は多く、可能な限り採取したい。また、線維芽細胞や臓器が得られた場合には、ホルマリン固定を行わないことが重要である。正確な診断は次回についての遺伝相談や予防にも役立つ。

■ ■ ■ 先天代謝異常症を見逃さないために

先天代謝異常症の新生児期発症では、呼吸障害や哺乳力低下、嘔吐、けいれん、意識障害など、非特異的な症状を示すことが多い。Sepsis work upで感染徴候がなく、画像検査で特異的所見がみられない場合には、背景疾患として先天代謝異常症を念頭におく必要がある。代謝異常症を見逃さないために最初に行うべき検査は、血液ガス、血糖、アンモニア、乳酸、肝機能などである¹⁰⁾。最近の血液ガス分析では乳酸の測定ができるものが多いが、アンモニアの検査も忘れてはならない。最初の検査で異常を認めた場合には表4に示した検査を行い、鑑別を進めていく。

■ ■ ■ 早期診断、発症前診断の重要性

有機酸・脂肪酸代謝異常症について、タンデムマス・スクリーニングで発症前に診断された症例と、発症後に診断された症例の転帰を表5に示す。新生児スクリーニングで診断された患者では、有機酸代謝異常症の89%、脂肪酸代謝異常症の88%が正常な発育をしていた。一方、発症後に診断

表5 発症前診断例と発症後診断例の予後比較 (2001年～2008年の発見例)

疾患	新生児スクリーニングで発症前に診断	発症後に診断
患者数	66	152
有機酸代謝異常症	40	108
正常発達	35(89%)	20(18%)
後遺症	3(7%)	56(52%)
死亡	2(4%)	32(30%)
脂肪酸代謝異常症	26	44
正常発達	24(88%)	23(52%)
後遺症	1(4%)	9(20%)
死亡	1(4%)	12(28%)

*福井大学と厚生省研究班のパイロットスタディ。

**島根大学で診断した症例。

(山口清次, 2001⁷⁾による)

された症例での正常発達は、有機酸代謝異常症の18%、脂肪酸代謝異常症の52%であった⁷⁾。これらの結果からは、発症後に診断、治療するよりも、発症前に発見する重要性を示している。

SIDSの剖検例についてタンデムマスを行った結果、313症例中14例(4.4%)に脂肪酸代謝異常症が発見された報告もある¹¹⁾。新生児突然死の病態解明、撲滅のためにも新しいタンデムマスによる新生児マススクリーニングの普及が求められる。

文 献

- 仁志田博司：新生児の突然死。日本未熟児新生児学会雑誌 11：21-25, 1999.
- 中山雅弘, 中川 聡, 青木康博ほか：乳幼児突然死症候群(SIDS)診断の手引き 改訂第2版。J Jap SIDS Res Soc 6：73-97, 2006.
- 山口清次：新生児突然死の予防：タンデムマスによる早期発見。日本周産期・新生児医学会雑誌 45：973-976, 2009.
- 重松陽介, 畑 郁江：タンデムマスによる新生児マススクリーニング。小児内科 42：1200-1204, 2010.
- 山口清次：新しい新生児マススクリーニング タンデムマス Q & A 2009。厚生労働省科学研究(子ども家庭総合研究事業)研究班, p19-22, 2009.
- Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, et al：Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. Journal of chromatography B 776：39-48, 2002.
- 山口清次：タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究。厚生労働省科学研究(子ども家庭総合研究事業)研究班, 平成21年度総括・分担研究報告書(研究代表者 山口清次), p5-15, 2010.
- 山口清次：乳幼児突然死症候群(SIDS)と先天代謝異常症。母子保健情報 53：39-45, 2006.
- 長谷川有紀, 山口清次：先天代謝異常症の出生前診断。周産期医学 38(増刊)：161-164, 2008.
- 藤浪綾子, 高柳正樹：救急外来で見逃してはならない先天代謝異常症。小児科診療 69：1574-1578, 2006.
- Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, et al：Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. J Pediatr 132：924-933, 1998.

シンポジウム：先天代謝異常症マス・スクリーニングのこれから

タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題

山口 清次

島根大学小児科

はじめに

わが国の新生児マススクリーニングは1977年より全国実施が始まり、これまでに約4,200万人の新生児が検査を受け、約1万6千人に異常が発見され、少なくとも1万人以上の小児が障害から免れたと考えられている。現在6種類の疾患が対象となっているが、タンデムマスを導入して対象疾患を拡大し、より多くの小児を障害発生から守ろうという動きがある。これを拡大スクリーニング (expanded newborn screening) といい、欧米先進国を中心に世界的に普及しつつある。わが国でも近い将来全国実施される可能性が高い¹⁾。

わが国では2004年より厚生労働省研究班で、タンデムマスによる疾患発見頻度、導入の効果、診療支援体制の整備、費用対効果、精度管理等について検討されてきた。この研究成果をもとに拡大スクリーニングの諸問題について述べたい。

I. タンデムマスの対象疾患の設定

新生児マススクリーニングでは、できるだけ多くの疾患を発見すればよいものではない。対象疾患には満たすべき一定の要件がある。すなわち、見逃しが無いこと、治療法があること、早期発見によって障害予防ないし軽減できること、身近にアクセスできる診療体制が整っていること、費用対効果のすぐれていることなどである。

現在の対象疾患は、アミノ酸代謝異常3疾患、およびガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症 (CH)、先天性副腎過形成症 (CAH) であるが、拡大スクリーニングでは図1に示すように、アミノ酸代謝異常3疾患の部分が、1回のタンデムマ

ス検査によって16疾患に拡大される。この16疾患を「1次対象疾患」としている。内訳は、アミノ酸代謝異常5疾患、有機酸代謝異常7疾患、および脂肪酸代謝異常4疾患である。

この他にも約10疾患が発見できるが、「現時点では見逃しがありうる」、「治療効果が明確にされていない」、あるいは「費用対効果が明らかでない」などの理由で、引き続き検討すべき「2次対象疾患」としている。2次対象疾患に関しては、研究班では発見されたら原則として伝える方針としているが、患者家族の「知りたくない権利」があるので検査する前に同意を取る必要がある。すでに全国実施されている欧米諸国では、「2次対象疾患」は検査しないように計器を設定し、万一発見されても無視する方針をとっている²⁾。

II. 採血時期の問題

タンデムマス検査による疾患の発見頻度は、表1に示すように、1次、2次対象疾患を合わせると約9千人に1人である。現時点で設定している1次対象疾患に限ると約1万1千人に1人である。欧米での発見頻度は4千～5千人に1人なので、わが国での頻度は半分以下である。このちがいの要因として、民族差、測定方法の違い、あるいは採血時期の違いについて検討を要する。欧米では採血時期が生後2～3日であるのに対し、わが国では生後5～6日である。

アミノ酸代謝異常、有機酸代謝異常は哺乳によるタンパク負荷によって患者を検出しやすくなるが、脂肪酸代謝異常では逆である。すなわち生後日数が経つほど測定値が低くなる可能性がある。従って脂肪酸代謝異常を見逃さないためには、現

在よりも採血時期を早める必要があるかもしれない。

Ⅲ. 発見精度の向上のための診断マーカーの検討

アミノ酸代謝異常では、疾患に特異的なアミノ酸値が診断指標となることが多いが、有機酸、脂肪酸代謝異常では必ずしも疾患特異的なアシルカルニチンだけでは異常が検出できないこともある。例えば、プロピオン酸血症で上昇するプロピオニルカルニチン (C3) は、患者で常に高値がみられるとは限らず、C3/C2、C3/C4、あるいはC3/C16などの診断マーカーを設定することによって異常

が発見されることがある。また採血してからの日数または検体保存状況によっては、真の値よりも低い値をとることもある。見逃しをなくすために陽性者の診断マーカーを探索する必要がある³⁾。

Ⅳ. 発見された患者の追跡

タンデムマスで発見される疾患は稀少疾患であり、小児科医師でもなじみが薄いことが多い。最適な治療法がまだ明確でないこともある。タンデムマスの対象とする疾患に対する診療技術向上のためにも、また新生児マススクリーニング事業の評価を明らかにするためにも、マススクリーニング事業において、患者の長期的フォローアップ

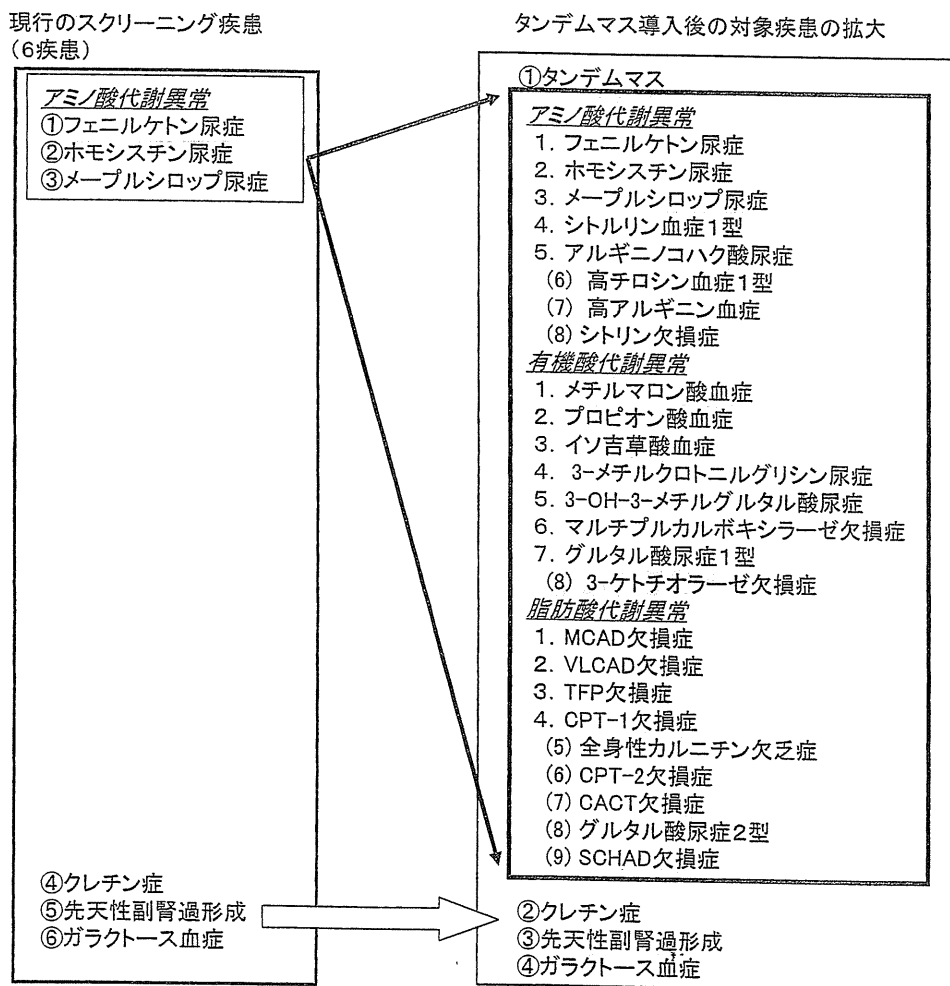


図1. タンデムマス導入による“拡大スクリーニング”

アミノ酸代謝異常、有機酸代謝異常、脂肪酸代謝異常を1回の分析でスクリーニングできる。先天性甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成症、ガラクトース血症は、現在のところタンデムマスで検出できないため、従来の方で検査する必要がある。

表1. タンデムマスによる新生児マススクリーニングの結果 (パイロットスタディ)

	発見数 (カッコ内は2010年)	頻度	一次対象疾患 (16疾患)
アミノ酸代謝異常	42 (4)	1:3.0万	28
1) フェニルケトン尿症*	21 (2)	1:6万	21
2) メープルシロップ尿症*	1 (1)	1:127万	1
3) ホモシスチン尿症*	0	0	0
4) シトルリン血症(1型)	5 (-)	1:25万	5
5) アルギニノコハク酸血症	1 (-)	1:127万	1
※ 高チロジン血症1型	0	0	-
※ アルギニン血症	0	0	-
※ シトルリン欠損症	14 (1)	1:9万	-
有機酸代謝異常	56 (9)	1:2.3万	56
6) メチルマロン酸血症	11 (-)	1:12万	11
7) プロピオン酸血症	28 (5)	1:5万	28
8) イソ吉草酸血症	3 (-)	1:42万	3
9) メチルクロトグリシン尿症	8 (2)	1:16万	8
10) HMG血症	0	0	0
11) MCD	2 (1)	1:63万	2
12) グルタル酸血症1型	6 (1)	1:21万	6
※ βケトチオラーゼ欠損症	0	0	-
脂肪酸代謝異常	39 (7)	1:3.2万	25
13) MCAD欠損症	13 (5)	1:10万	13
14) VLCAD欠損症	8 (-)	1:16万	8
15) TFP(LCHAD)欠損症	0	0	0
16) CPT1欠損症	4 (-)	1:32万	4
※ 全身性カルニチン欠乏症	5 (-)	1:25万	-
※ CPT2欠損症	4 (1)	1:32万	-
※ CACT欠損症	0	0	-
※ グルタル酸血症2型	4 (1)	0	-
※ SCHAD欠損症	1 (-)	1:127万	-
計	141 (20)		109
発見頻度		1:9千	1:1.16万
スクリーニング新生児数 1997~ (2010年のみ)	1,266,824 (236,115)		

太字の疾患名は、対象疾患としている16疾患。*印は、現在対象となっているアミノ酸代謝異常症3疾患。
HMG = 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸、MCD = マルチプルカルボキシラーゼ欠損症、
MCAD, VLCAD = それぞれ中鎖、極長鎖アシル-CoA脱水素酵素、TFP = 三頭酵素、
LCHAD = 長鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素、SCHAD = 短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素。

は不可欠である。これまでのマススクリーニングでは、個人情報保護などを理由に協力が不十分な場合も多く、全国横断的に患者の臨床経過が把握されているとはいえない。

V. 軽症の病型、超重症病型の患者への対応

タンデムマス対象疾患の中には、日本人患者の自然歴が十分に明らかになってない疾患もある。プロピオン酸血症は、欧米では、大部分が乳児期早期に重篤な症状で発症するため、マススクリーニングの効果が疑問視されている。これに対して、日本人のプロピオン酸血症では半数以上が軽症型

で、無症状で経過している。メチルクロトニルグリシン尿症は欧米では無症候性疾患とみなされているが、日本人患者では、目立った症状がなくても生化学検査異常を示したり、障害児の中に見つかったりする⁹⁾。現時点で無症候性であっても長期間みてゆくうちに何らかの症状が出てくる可能性は否定できない。

また有機酸・脂肪酸代謝異常の中には、ふだんは正常と変わらぬ生活をしているのに何らかのストレスを契機に急性症状をきたすことがある。あるいは、悪化するようなエピソードに“運よく”遭遇せず小児期を過ごし、生涯無症状で経過する患

者もありうる。

マススクリーニングで異常が発見された時、「ふだん正常と変わらぬ生活をできるが、何かのストレスが加わった時、生命にかかわるような発作を起こすかもしれません。しかし生涯無症状で過ごされる可能性もあります」という説明をした時、患者家族はどのように受け止めるであろうか。神経質な家族ならば、必要以上のストレスを感じながら生活するかもしれない。一方、楽天的な家族は長い間無症状で生活しているうちに「治療は不要である」と考えるようになり、忘れた頃に重篤な発作に遭遇するかもしれない。診療を担当する医師は注意深く説明する必要がある。

VI. 確定診断

新生児期に異常が発見された時、長期にわたって治療することになる。このため、必要に応じて確定診断は不可欠である。表2に示すように、アミノ酸代謝異常ではアミノ酸分析等で確認できることが多い。一方、有機酸・脂肪酸代謝異常症では、GC/MS分析、精密タンデムマス分析、酵素診断あるいは遺伝子診断がしばしば必要となる。しかし現状では、稀少疾患のために検査の頻度は低く特殊な検査と見なされている。このため保険診療になってない項目が多く、一部の研究機関のボランティアに頼っているところである。長い眼でみるとこの体制は不安定であり、継続的サービスが続けられるよう保険診療などによってサポートする必要がある。また精度の高い診断技術開発も進める環境が望まれる。

VII. 診療支援

タンデムマスで発見される疾患は稀少疾患であるが、いつどこで、どのような疾患が発見するかわからない。発見された時、紹介を受ける小児科医は必ずしも専門知識を持ち合わせているとは限らない。日本のどこで発見されても一定レベル以上の診療が受けられる環境作りが必要である。このため、診療ガイドブックを作成したり、あるいは診療現場で困った時コンサルタントできるような全国的ネットワークが作られるとよい⁹⁾。さらに小児科医のみならず、産科医療機関スタッフ、保健師、検査技術者などを対象とした啓発なども考えてゆくべきである。また特殊な治療薬、医療器具などを使いやすいように保険診療などによるサポートも必要である。

VIII. 費用対効果

新生児マススクリーニングを国民の税金による公的事業として行う以上、費用対効果を評価することは不可欠である。タンデムマスでは1回の検査で多種類の疾患が発見できるが、疾患によっては数年に1人しか見つからないものの早期発見治療が非常に効果的な疾患もある。表3に研究班でまとめたマススクリーニングの費用対効果を予防接種のそれと比較している。現時点では、低く見積もっても、予算の1.73～6.44倍の効果があると見積もられている。水痘、ムンプスのワクチンは4.5倍の効果があると計算されているが、ヒブ髄膜炎ワクチンについてはまだエビデンスは確定

表2. 確定診断のために必要な検査

	アミノ酸分析	有機酸分析 (GC/MS)	タンデムマス分析 (精密)	酵素測定・遺伝子解析	その他
アミノ酸代謝異常	◎	○	○	△	BH4負荷 プテリン分析
有機酸代謝異常症	○	◎	○	△～○	—
脂肪酸代謝異常症	△	○	○	○～◎	—

◎: 確定診断に必須である。○: 確定診断に参考になる。△: 原則として不要。

表3. タンデムマス・スクリーニングと予防接種の費用対効果分析

	増分便益費用比 (BCR)	増分純便益 (NET)
タンデムマス・スクリーニング	1.73~6.44	71~143億円
水痘ワクチン	4以上	522億円
ムンプスワクチン	5.2	379億円
ヒブ髄膜炎ワクチン	0.25~2.08	-332~477億円

平成22年度厚労科研報告書⁹⁾より抜粋

表4. タンデムマス検査実費試算の例

年間検査数	検査実費
50,000 /年	1,030円
30,000 /年	1,220円
10,000 /年	2,500円

平成21年度厚労省科学研究費報告書より抜粋。
 ※検査実費は、試薬、人件費または償却費等であり、
 家族への説明、検体採取、結果判定等にかかる経費
 は含まれていない。

していない。費用対効果解析は、出生率や疾患頻度、社会環境の変化などが変数となるため、継続して評価する必要がある⁹⁾。

IX. 検査施設の適正配置

タンデムマス機器の価格は現時点では約3千万円で、またその後の保守点検費用として年間約200万円必要であると予想される。スクリーニング検査用の機器としてはこれまでに比べ高価な機器である。またタンデムマス分析と結果判定に一定の熟練が必要であるが、1台の機器で年間5万検体以上を分析する能力がある。従って、1台の機器で多数検体を分析の方が効率的であり、また機器の精度管理の面からも有利である。表4に検査実費を試算した例を示している。

これまで自治体単位で新生児マススクリーニングが行われてきたが、少子化が進行した結果、自治体によって年間出生数が5千~9万とばらつきが大きくなっている。研究班は、タンデムマス導

入にあたって、1台のタンデムマスで少なくとも年間3万検体以上の検体を分析できるよう近隣の自治体と調整することを提言している⁹⁾。

X. 精度管理

マススクリーニングは、原則として「正常な新生児」を対象に行われる。それゆえ、一般の臨床検査と異なり見逃しは絶対に許されない。定期的に標準検体を用いて検査値が保証されるべきである。さらに日内変動、季節変動、施設間の変動を極力少なくすべきである。このためには、検体処理方法、分析条件などを標準化して、正常値を共有すべきである。

また検査値の精度管理のみならず、異常の発見された小児が適正に確定診断され、適切な診療を受けているか、マススクリーニングのアウトカムが良好なものかどうかについても精度管理が行われるべきである。

XI. 患者家族のQOLの向上

新生児マススクリーニングが始まった時、早期発見早期治療によって障害発生予防ができるということで患者家族は一生懸命食事療法を厳守し、障害から免れたことは事実である。しかし「食事療法」一つとっても患者家族にとって容易なことではない。育ち盛りの小児が、友達が食べるものを自分だけ我慢しなければならない。また定期的に病院に通い、そして検査を受け食事をより厳しく指導されることもある。時には食事の献立に途方にくれることもある。年が長ずると生命保険加

入が制限される事例があったり、不当な差別、いじめにあうこともある。これらは、実際に生活する患者家族からきいて初めてわかることであり、診療する側の教科書的な発想では忘れがちである。

患者家族との継続的な交流を通じて、生の声を聞き、研究の方向性に反映させることもでき、そして患者家族にとっては専門にしている医師との交流を通じて困っていることを相談でき、稀少疾患に関する新しい知見を知ることによって勇気付けられるかもしれない。結果的にはこれが治療効果の改善にも結びつく。今後マススクリーニングの効果を挙げるためには、患者家族との交流が非常に重要である。

XII. おわりに

2001年にマススクリーニング事業が国から自治体に委譲されて以来、日本の全体像が把握しにくくなり、新知見の普及、適切な指導が困難になっている面がある。患者家族は情報の少ない中で不安な生活をしているケースもある。担当する医師も情報不足の中で診療していて、診療が適切かどうか把握できない。

検体採取の産科機関、検査を担当する検査施設、診療を担当する小児科医、情報を把握し実践を担当する行政や保健師、および家族会などの継続的な連携によって、マススクリーニング事業の効果を最大限に発揮することができる。タンデムマスが1990年代に発明されて以来、欧米を中心に数年前から普及し、日本でも導入が目前となっている。タンデムマス導入はわが国の新生児マススクリーニング体制を立て直す好機である。

文 献

- 1) 山口清次：タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代。小児保健研究 65 (6) : 725-732, 2006
- 2) Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF: Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatr* 2003;111:1399-406.
- 3) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, et al. Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J Chromat B* 2002;776:39-48.
- 4) Yorifuji, T, Kawai, M, Muroi J, Mamada M, Kurokawa K, Shigematsu Y, et al. Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. *Hum Genet* 2002;111:161-5.
- 5) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也, 大浦敏明, 大和田操, 青木菊磨, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介, 大浦敏博：タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報 42: 28-53, 2006
- 6) 山口清次：厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」（研究代表者山口清次）平成19-21年度総合研究報告書，2010年

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变化

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变化を検討した。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、新生児マススクリーニング

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

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)によるマススクリーニング・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、致死性である。乳幼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

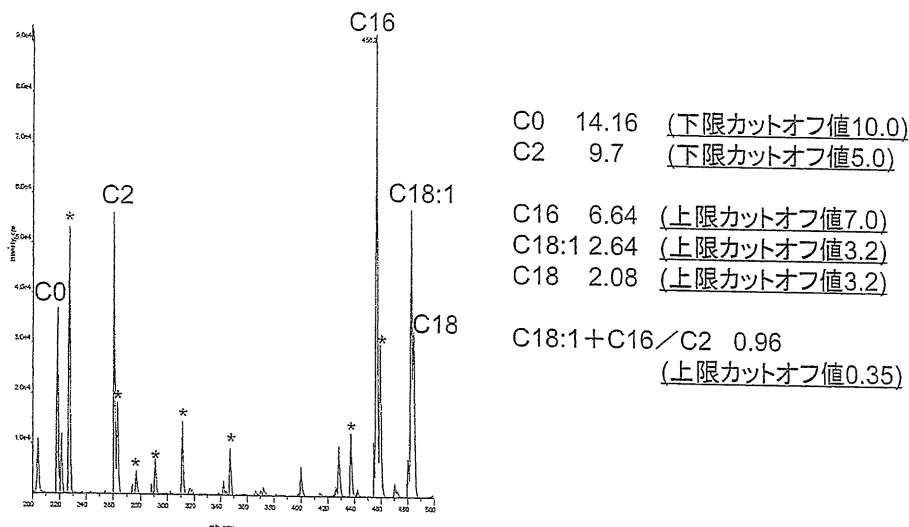


図1 生後12時間後のろ紙血アシルカルニチンプロファイル
 横軸は m/z 値, 縦軸は相対量を示した. 図右に各アシルカルニチンの定量値 (μmol/l) と括弧内に上限または下限カットオフ値を示した. *は内部標準物質. C0, C2 に比較して C16, C18:1, C18 などの長鎖アシルカルニチンが高く, (C18:1+C16)/C2 も上昇しており, CPT2 欠損症に特徴的なパターンである.

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℃, 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, 筋トーンス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

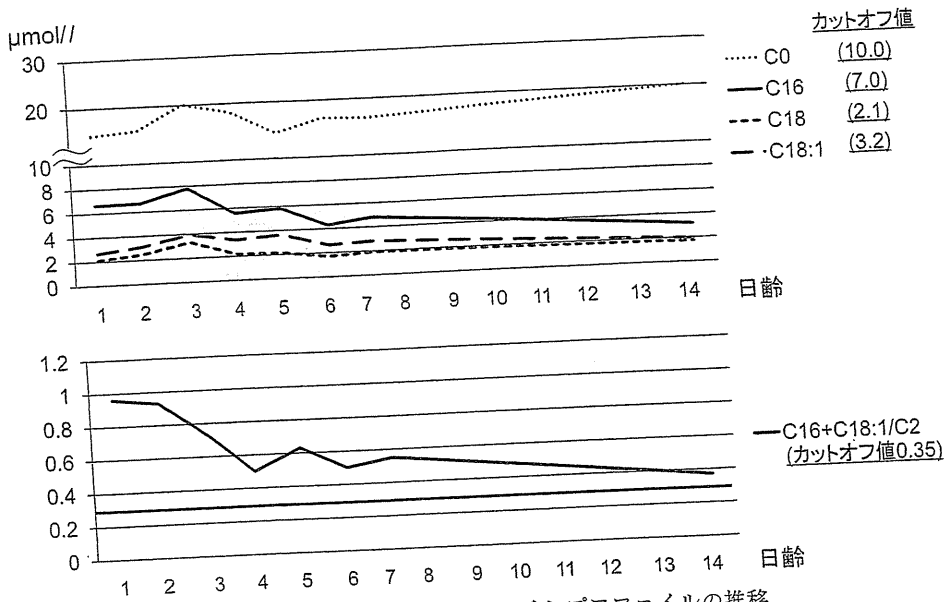


図2 血液ろ紙アシルカルニチンプロファイルの推移
 上段の図では横軸は日齢、縦軸は各アシルカルニチン量。括弧内に上限または下限カットオフ値を示した。C16, C18, C18:1はいずれも日齢3にピークとなり、その後漸減した。遊離カルニチンは明らかな低値を認めない。下段の図は (C16+C18:1)/C2 を縦軸に示した。図中にカットオフ値を直線で示した。出生直後が最も高く、日齢14まで上限値を超えている。

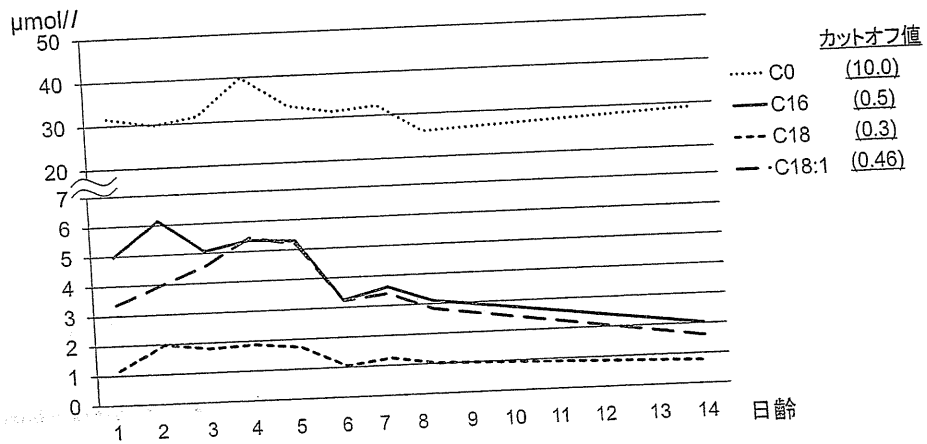


図3 血清アシルカルニチンプロファイルの推移
 横軸は日齢、縦軸は各アシルカルニチン量。括弧内に上限または下限カットオフ値を示した。日齢1より明らかな長鎖アシルカルニチンの増加を認める。C16, C18, C18:1は日齢4にピークとなりその後低下した。遊離カルニチンは明らかな低値を認めない。

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²⁵⁾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1~2²⁶⁾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 Inherit 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

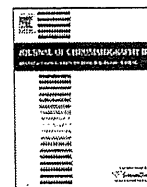
Kazuo Kubota¹⁾, Toshiyuki Fukao²⁾, Tomohiro Hori¹⁾, Hironori Kobayashi³⁾,
Michinori Funato¹⁾, Yuki Hasegawa³⁾, Seiji Yamaguchi³⁾ and Naomi Kondo¹⁾

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.



Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS

Katsuhiko Nakagawa*, Shuichi Kawana, Yuki Hasegawa, Seiji Yamaguchi

Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine, 89-1 En-ya-cho, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2010

Accepted 12 February 2010

Available online 21 February 2010

Keywords:

Gas chromatograph–mass spectrometer

Organic acidurias

Sample preparation

Solvent extraction

Trimethylsilylation

Flash-heater derivatization

ABSTRACT

GC/MS is widely used for the analysis of urinary organic acids for the chemical diagnosis of organic acidurias such as methylmalonic acidemia, propionic acidemia, isovaleric acidemia, glutaric aciduria type I, and multiple carboxylase deficiency. In this study, a rapid and simple preparation method for this analysis was developed in order to improve the laboratory productivity and the working environment. The solvent extraction and trimethylsilyl derivatization steps of the conventional method were improved by reducing the volume of urine sample and extraction solvent and by applying the flash-heater derivatization, respectively. The new method was successfully applied to the chemical diagnoses of five organic acidurias.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Due to the expanding newborn screening by electrospray ionization–tandem mass spectrometry, gas chromatograph/mass spectrometry (GC/MS) will be extensively employed for the chemical diagnosis of organic acidurias [1]. For infants with the positive screening result and high-risk infants with a family history of those diseases, the chemical diagnostic method by GC/MS is indispensable [2–4], because a simultaneous analysis of urinary organic acids using GC/MS provides a wide range of metabolite profiling, which is very important for the diagnosis.

However, the major disadvantage of the GC/MS method is that the sample preparation is the most labor intensive and time consuming work of this analysis [5,6]. For the sample preparation, solvent extraction of organic acids in the urine, followed by trimethylsilyl (TMS) derivatization is commonly used [2,7]. There are several disadvantages in such an approach, for example, the time required for the extraction step, and the evaporation of the relatively large volume of extraction solvent, and for the subsequent derivatization reaction, the constant attention that the operators must pay to in performing these procedures, and the exposure of the operators to toxic reagents such as the extraction solvent and the derivatization reagent.

We developed a rapid and simple sample preparation method by improving the conventional solvent extraction and trimethylsilyl

derivatization procedures [7]. The volume of extraction solvent and the number of extraction cycles were reduced for the solvent extraction procedure, and a flash-heater derivatization technique [8–15] was used for the TMS derivatization procedure, by injecting derivatization reagent together with the extract into the GC/MS.

The developed method was applied to urine samples obtained from patients with organic acidurias to demonstrate the effectiveness of this method.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Since the target compounds possess different properties, certain representative compounds were chosen from commercially obtainable compounds to validate this method, namely: lactic acid, 3-hydroxy-propionic acid, 2-hydroxy-isovaleric acid, 3-hydroxy-isovaleric acid as hydroxyl fatty acid; 3-hydroxy-butyric acid as ketone body; methylmalonic acid, ethylmalonic acid, glutaric acid, adipic acid, sebacic acid and suberic acid as dicarboxylic acid; and 4-hydroxy-phenyllactic acid as aromatic acid. In addition to these, isovalerylglycine and phenyllactic acid were also chosen. All the compounds except 2-hydroxy-isovaleric acid (Japan Sigma–Aldrich Chemical Co., Tokyo, Japan) and isovalerylglycine (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Osaka, Japan) were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan).

Margaric acid (MGA) and tetracosane (C₂₄) for internal standard, urease for decomposition of urea, ethyl acetate for solvent extraction, hydrochloric acid for adjusting pH of urine and N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + 1% trimethyl-chlorosilane

* Corresponding author. Tel.: +81 75 823 1410; fax: +81 75 841 9326.

E-mail addresses: nk@shimadzu.co.jp (K. Nakagawa), s.kawana@shimadzu.co.jp (S. Kawana), yukirin@med.shimane-u.ac.jp (Y. Hasegawa), seijiyam@med.shimane-u.ac.jp (S. Yamaguchi).