

原 著

## 劇症肝不全として発症したミトコンドリア DNA 枯渇症候群の新生児例

順天堂大学小児科<sup>1)</sup>, 千葉県こども病院代謝科<sup>2)</sup>, 埼玉医科大学小児科<sup>3)</sup>

菅沼 広樹<sup>1)</sup> 鈴木 光幸<sup>1)</sup> 吉川 尚美<sup>1)</sup> 原 聡<sup>1)</sup>  
染谷朋之介<sup>1)</sup> 李 翼<sup>1)</sup> 久田 研<sup>1)</sup> 東海林宏道<sup>1)</sup>  
村山 圭<sup>2)</sup> 高柳 正樹<sup>2)</sup> 大竹 明<sup>3)</sup> 清水 俊明<sup>1)</sup>

### 要 旨

小児劇症肝不全の約半数は乳児期に発症し、死亡率は70~80%にも及ぶが、発症原因が明らかでないことも多い。新生児期に劇症肝不全で発症し、ミトコンドリア DNA 枯渇症候群が原因と考えられた女児例を経験したので報告する。日齢13より嘔吐を認め、日齢15に哺乳力低下と傾眠傾向があり入院した。血清トランスアミナーゼ値の上昇、高アンモニア血症、低血糖および高ビリルビン血症を認めた。著明な凝固機能異常と傾眠傾向(小児肝性昏睡分類Ⅱ度)から劇症肝不全と診断し、人工肝補助療法を開始したが、小児肝性昏睡分類Ⅳ度へと進行した。肝不全に対して肝移植を検討したが、平坦化した脳波所見から重篤な脳障害が残る可能性が高いと考えられたこと、また両親が肝移植を希望しなかったことから、内科的治療を継続した。日齢47、出血性ショックのために死亡した。剖検では肝重量は16gと著明に萎縮し、病理組織所見では、肝細胞が脱落していた。肝臓と心筋のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性を測定したところ、呼吸鎖複合体Ⅰ活性が低下しており、劇症肝不全の原因としてミトコンドリア呼吸鎖異常症が考えられた。肝臓のミトコンドリア DNA と核 DNA 量比が31.7%と低下していたためミトコンドリア DNA 枯渇症候群と診断した。新生児における原因不明の肝不全では、ミトコンドリア呼吸鎖異常症も念頭に置き、呼吸鎖酵素活性を測定することが診断に重要であると考えられた。

キーワード：劇症肝不全，ミトコンドリア呼吸鎖異常症，ミトコンドリア DNA 枯渇症候群，新生児

### はじめに

小児劇症肝不全は死亡率が高く、特に1歳以下では予後不良とされている。原因は代謝性25%、ウイルス性22%、薬剤性8%、自己免疫性2%、不明43%と小児では原因不明が最も多くなっている<sup>1)</sup>。また、ミトコンドリア呼吸鎖異常症はミトコンドリア呼吸鎖の機能障害によって引き起こされる疾患であり、5,000~7,000人に1人の頻度とされている。多臓器にわたり様々な症状を呈するが、主に骨格筋、心筋、中枢神経をはじめ、肝臓、腎臓、膵臓など広範囲な腹腔内の臓器も障害される。その中で肝不全を呈するミトコンドリア呼吸鎖異常症としては、ミトコンドリア DNA(mtDNA)枯渇症候群(MDS)、Pearson 症候群、Leigh 脳症などが知られている。MDSには大きく分けて筋型、脳筋型、肝脳型の3種の発症形式があり、中でも肝脳型では出生直後から6か月の間に症状が出現することが多い<sup>2)</sup>。

近年、罹患臓器を用いた呼吸鎖の酵素活性や Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE)でのイムノプロット法などの酵素解析により、診断が困難とされていたミトコンドリア呼吸鎖異常症の迅速な診断が可能となった。今回われわれは、MDSが原因と考えられた新生児劇症肝不全例を経験したので報告する。

### 症 例

症例：日齢15、女児

主訴：哺乳力低下、傾眠傾向

妊娠分娩歴：妊婦健診では異常を認めなかった。在胎38週3日、羊水過少を認めたため分娩誘発目的にK病院に入院し、翌日に経膈分娩となった。胎盤には梗塞等の異常は認めなかった。出生体重は2,254g、Apgar Scoreは1分値9点/5分値10点であった。妊婦健診での母体HBs抗原は陰性であった。栄養は人工乳であった。

家族歴：母親は2経妊0経産。これまでの流産の原因は不明である。近親者に代謝性疾患なし。血族結婚なし。

(平成22年6月30日受付)(平成23年4月9日受理)

別刷請求先：(〒113-8421)文京区本郷2-1-1

順天堂大学医学部小児科 菅沼 広樹

E-mail: hsuganu@juntendo.ac.jp

表1 入院時検査所見

〈血算〉		〈生化学〉		〈免疫血清〉	
WBC	24,300 / $\mu$ l	T-bil	37.7 mg/dl	IgG	824 mg/dl
RBC	$299 \times 10^4$ / $\mu$ l	D-bil	13.4 mg/dl	IgA	4 mg/dl
Hb	10.4 g/dl	AST	232 IU/l	IgM	44 mg/dl
Hct	31.6 %	ALT	141 IU/l	〈ウイルス検査〉	
Plt	$24.6 \times 10^4$ / $\mu$ l	LDH	561 IU/l	HBs Ag	(-)
〈血液ガス (動脈血)〉		$\gamma$ GTP	155 IU/l	HCV Ab	(-)
pH	7.354	TG	23 mg/dl	風疹 IgM	(-)
pCO <sub>2</sub>	34.4 mmHg	TBA	54.6 $\mu$ M/l	EB-VCA IgM	(-)
pO <sub>2</sub>	48.1 mmHg	ChE	483 IU/l	Real time PCR (血清)	
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	18.7 mmol/l	CRP	0.0 mg/dl	HSV-1	(-)
BE	-6.0 mmol/l	NH <sub>3</sub>	482 $\mu$ g/dl	HSV-2	(-)
〈凝固線溶系〉		乳酸	76.2 mg/dl	CMV	(-)
PT	<5 %	ビリルビン酸	2.63 mg/dl	VZV	(-)
APTT	>120 sec	フェリチン	13,664 ng/ml	HHV-6	(-)
HPT	<10 %			HHV-7	(-)

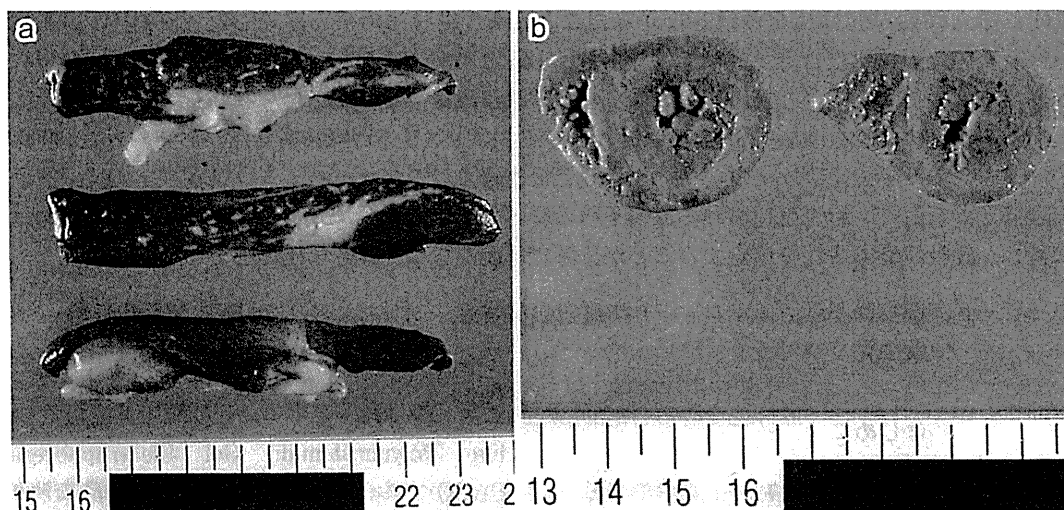


図1 剖検所見

- a, 肝臓：肝臓は16.9gと著明な萎縮があり，脂肪沈着を認めた。  
b, 心筋：心筋の肥厚を認めた。

現病歴：日齢13, 嘔吐と皮膚黄染を主訴に近医を受診した。ミノルタ経皮黄疸計では12.5mg/dlであった。翌日には嘔吐が頻回になり, 日齢15に哺乳力低下と傾眠傾向を認めたため近医を再診した。血液検査では血清トランスアミナーゼ値の上昇 (AST 283IU/l, ALT 183IU/l), 高アンモニア血症 (1.371 $\mu$ g/dl), 低血糖 (3mg/dl), 高ビリルビン血症 (T-Bil 42.3mg/dl) を認めたため, 精査加療目的に当院へ救急搬送となった。

入院時現症：体重2,431g, 心拍数180/分, 呼吸数38/分, 血圧61/43mmHg, 体温36.7 $^{\circ}$ C。全身状態は活気がなく, 四肢の硬直を認めた。皮膚は著明に黄染し, 腹部は膨隆していたが, 肝臓は触知できなかった。顔貌異常, 外表奇形は認めなかった。

入院時検査所見 (表1)：高ビリルビン血症, 血清トランスアミナーゼの上昇, 凝固機能異常 (PT:5%未満) を認めた。血中乳酸およびビリルビン値の著明な上昇と, 血液ガス分析では軽度の代謝性アシドーシスを認めた。

入院後経過：血液検査所見から急性肝炎重症型と診断した。さらに傾眠傾向 (小児肝性昏睡分類にてII度) を認めたため, 劇症肝不全と判断した。高ビリルビン血症に対する治療も兼ねて直ちに交換輸血を開始し, その後人工肝補助療法へと移行した。人工肝補助療法として, 持続的血液濾過透析を継続し, 血漿交換療法を連日行った。同時に, プロスタグランディンE2の投与を開始し, 劇症肝不全の原因としてウイルス性

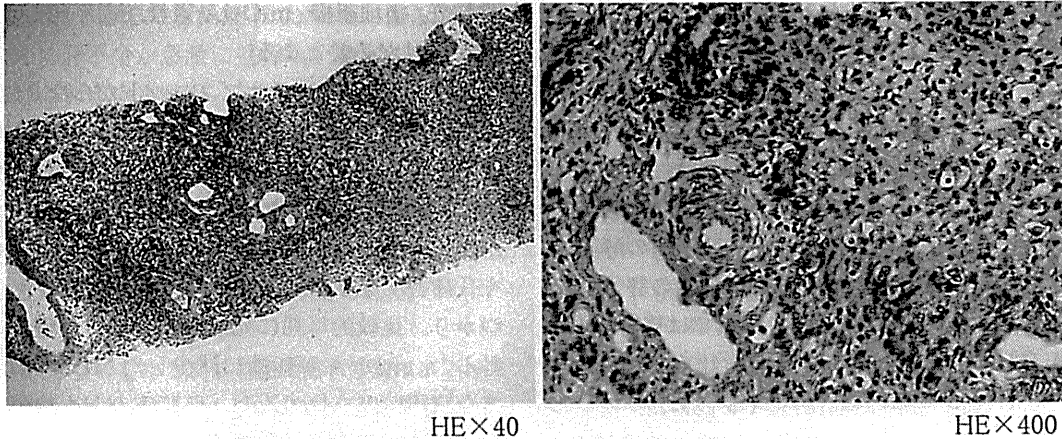


図2 肝臓組織所見 日齢47(入院第32病日)  
ほとんどの肝細胞は脱落し、組織球に置き換わっていた。

表2 ミトコンドリア呼吸鎖複合体の酵素活性

Liver	CoI	CoII	CoIII	CoIV	CS
% of normal	7.3	17.1	42.4	56.7	175.2
CS ratio (%)	4.1	9.7	23.8	31.7	
CoII ratio (%)	42.5		256.5	327.5	

Heart	CoI	CoII	CoIII	CoIV	CS
% of normal	13.7	48.1	49.1	39.6	79.8
CS ratio (%)	16.3	60.6	56.7	47.9	
CoII ratio (%)	24.1		85.0	71.6	

CoI : complexI CoII : complexII CoIII : complexIII  
CoIV : complexIV CS : citrate synthase

光化学的に呼吸鎖複合体I～IVの酵素活性とクエン酸合成酵素(CS)を測定し、CSとの相対活性を正常対照と比較した。肝臓と心臓において複合体Iの著明な低下を認め、CS比で20%以下となっていたため呼吸鎖複合体I欠損症と診断した。

または新生児ヘモクロマトーシスも否定ができないため、アシクロビルおよびデスフェラルの投与も開始した。凝固能異常による出血傾向に対し、ビタミンKとメシル酸ナファモスタットの投与を開始した。治療開始8時間経過した時点での脳波所見は低振幅徐波を示しており、また肝性昏睡はIV度に進行した。治療によりアンモニアおよび血清ビリルビンは速やかに低下したものの、凝固機能の改善は認めなかった。日齢21、入院第6病日に頭部MRIを施行したところ、T1強調像において対称性に淡着球から中心溝付近に異常高信号を認め、高アンモニア血症に伴う脳障害が示唆された。また腹部MRIでは肝萎縮を認めたが、ヘモクロマトーシスに特徴的なT2強調像での著明な低信号は認めなかった。両親に対して、平坦化した脳波所見から重篤な脳障害が残る可能性が高いと考えられること、また本邦における小児劇症肝不全の転帰<sup>1)</sup>に関して説明を行った上で、治療戦略の1つとして肝移植の可能

性を提示したが、移植の希望はなかった。内科的治療を継続したが、著明な凝固機能異常が遷延し、肺出血と消化管出血による出血性ショックのため日齢47に死亡した。入院後に行った検査(表1)では、ウイルス学的検査は陰性、尿中ウイルス培養陰性、その他にも遊離脂肪酸、有機酸/脂肪酸代謝異常症スクリーニング検査はそれぞれ正常であった。アミノ酸分析では、肝不全のために汎アミノ酸高値を認めた。新生児ウイルス関連血球貪食症候群(VAHS)も否定できなかったため、日齢40に骨髓生検を施行したところ、一部に空胞を伴うマクロファージの赤血球貪食像を認めたが、VAHSにみられる広範囲な血球貪食像は認めなかった。

剖検所見(図1)：肝臓は16.9gと著明に萎縮し、肝全体に脂肪滴を認めた。また、心臓では左心室壁の肥厚を認めた。両親の同意が得られず、脳組織の評価は施行しなかった。

肝臓組織所見(図2):ほとんどの肝細胞は脱落し、線維化を伴っていた。鉄染色は陰性であった。

ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性(表2):肝臓および心筋のミトコンドリア呼吸鎖複合体活性の測定を行った。光化学的に呼吸鎖複合体I~IVの酵素活性とクエン酸合成酵素(CS)の活性を測定し、CS及び複合体IIとの相対活性を正常対照と比較した。呼吸鎖の酵素活性は、Kirdyら<sup>9)</sup>の方法を用いて、酵素活性の評価はBernierら<sup>4)</sup>の基準を用いて行った。肝臓では複合体Iの著明な低下があり、複合体IIの低下も認めた。心筋では明らかな複合体I活性の選択的低下を認めた。

ミトコンドリアDNAの比較定量、及び遺伝子検査:肝臓及び心筋のDNAを精製したのち、real time PCRを用いて、ミトコンドリアDNA(mtDNA)量と核DNA(nDNA)量の比較定量(quantitative PCR)を、Heら<sup>5)</sup>の方法に基づき施行した。その結果、mtDNAの枯渇が判明した(mtDNA/nDNA 肝:31.7%, 心筋:26.1%, 35%未満を有意な低下とした<sup>6)</sup>)。そこで肝脳型MDSの代表的な責任遺伝子であるDGUOK, MPV17, POLGについて検査した。mtDNA複製に関与するDNA polymerase  $\gamma$ (POLG(143440G>A/))の遺伝子変異を片方のアレルに認めたが、同変異部位はイントロン領域でもあることから、本疾患の原因としての関連は低いと考えられた。現在のところ、肝臓と心筋に異常をきたすMDSとして報告があるのはPOLGだけである<sup>7)</sup>。

上記の結果から遺伝子異常は明らかにできなかったものの、MDSによる呼吸鎖複合体I欠損症に伴った新生児劇症肝不全症と診断した。MDSでは一次的には複合体IIの低下は生じないが、自験例では肝不全に伴い肝臓の複合体IIの活性が二次的に低下した可能性が高いと考えられた。

## 考 察

自験例では確定診断のため肝生検を考慮したが、生存中は凝固機能異常とともに著明な肝萎縮のために肝臓の針生検が施行できず診断に苦慮した。入院当初、代謝性アシドーシス、高乳酸血症、高アンモニア血症を認めていたため、肝不全症状を呈するミトコンドリア呼吸鎖異常症を疑い、剖検による肝臓組織を利用して呼吸鎖活性の検索を行ったところミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの欠損があり診断に至った。また複合体IIの低下もみられたが、MDSではmtDNAの支配領域に関係のない複合体IIまで2次的に低下してくることも多い<sup>8)</sup>。特に肝障害が進行するとミトコンドリア障害に加え、フリーラジカル等の産生も起こり複合体IIを中心とした2次的低下はよくみられる現象で<sup>9)</sup>、一次的なものとは区別しにくい場合もあり、臨床像、生化学検査、病理組織、mtDNA定量、遺伝子検査など多角的な検討が必要となる。

学検査、病理組織、mtDNA定量、遺伝子検査など多角的な検討が必要となる。

複合体Iは45個のサブユニットからなり、電子伝達系酵素の中で最も大きく、mtDNAとnDNAの両支配を受けている。このうち7個のサブユニットはmtDNAにコードされている。また、複合体I欠損症がnDNAの遺伝子異常の場合には、生後早期に呼吸不全や代謝性アシドーシス、フロッピーインファントで見つかり、比較的早期に死亡する乳児重症型が多いとされる<sup>10)</sup>。mtDNAが極端に減少したMDSでは、さまざまな臓器障害を呈するが、肝障害なども報告されている<sup>11)</sup>。軽度の肝腫大や脂肪化を伴う無症候性の症例から数週間で進行して肝不全に至る症例までである。臨床症状としては、筋緊張低下や嘔吐、成長障害、アシドーシス、低血糖を呈する。肝脳型MDSでは出生直後から6か月の間に症状が出現するとされ、84%が5か月以下の発症であったと報告されている<sup>2)</sup>。呼吸鎖異常症の約半数にmtDNA欠乏が存在するとされ、さらにその中の64%が新生児期に肝障害が存在していたとしている<sup>6)</sup>。呼吸鎖複合体活性の低下を認めた場合、MDSを疑う根拠になるため<sup>12)</sup>、自験例でもmtDNAを測定したところ、MDSの診断に至った。

mtDNAとnDNAのPCR比較定量は、組織内での比を正常コントロール群と比較するものであり、フレッシュな組織が採取されているのであれば通常は剖検後でも正確な数値が出る<sup>13)</sup>。しかし自験例のように広範な細胞脱落の場合にどのくらい誤差が出るかは不定であり、MDSか否かは最終的には遺伝子検索によると思われる。自験例では心筋も併せてmtDNA量が低下しているためMDSの可能性が極めて高いと考える。

高乳酸血症はミトコンドリア疾患に特徴的とされている。自験例では高乳酸血症を伴う代謝性アシドーシスが続いていたため、ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性を測定する契機となった。しかし、呼吸鎖複合体I欠損症の20%では血中乳酸値が正常であり、また髄液中の乳酸値も約23%が正常であると報告されている<sup>10)</sup>。従って、低血糖やケトアシドーシスなど検査所見などからミトコンドリア呼吸鎖異常症を疑うような症例では、乳酸値が正常でも確定診断のために肝生検を施行し、呼吸鎖活性を検索することが推奨されている<sup>14)</sup>。

また、ミトコンドリア呼吸鎖異常症では胎児期から何らかの異常を認め、流産や低出生体重児、胎児水腫を伴う症例が報告されている<sup>15)</sup>。自験例も低出生体重児のため、胎児期から子宮内発育遅延(IUGR)があったと考えられる。肝臓をはじめとした臓器障害は胎児期から存在していたものと推測され、出生後、肝臓の

ATP産生が低下している状況下で、哺乳による負荷が加わったため肝不全が急激に進行し、劇症肝不全にまで至ったものと考えられた。

ミトコンドリア呼吸鎖異常症はBN-PAGEによるイムノブロット解析により診断が迅速に行えるようになった。新生児における原因不明の肝不全では、ミトコンドリア呼吸鎖異常症も考え、呼吸鎖酵素活性を測定することが診断に有用であると考えられた。

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) 須磨崎亮, 乾あやの, 位田 忍, 他. 小児の急性肝不全の特徴. 肝・胆・膵 2007; 55: 197—205.
- 2) Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, et al. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 143—158.
- 3) Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, et al. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999; 52: 1255—1264.
- 4) Bernier FP, Boneh A, Dennett X, et al. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002; 59: 1406—1411.
- 5) He L, Chinney PF, Durham SE, et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA depletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e68.
- 6) Sarzi E, Bourdon A, Chrétien D, et al. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007; 150: 531—534.
- 7) Echaniz-Laguna A, Chassagne M, de Séze J, et al. POLG1 variations presenting as multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67: 1140—1143.
- 8) Sarzi E, Bourdon A, Chrétien D, et al. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007; 105: 531—534.
- 9) Thorburn DR, Chow CW, Kirby DM. Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion* 2004; 4: 363—375.
- 10) Smeitink JA, Loeffen JL, Triepels RH, et al. Nuclear genes of human complex I of the mitochondrial electron transport chain: state of the art. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1573—1579.
- 11) Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, et al. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 492—501.
- 12) Shamima R, Joanna P. Diagnosis of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Arch Dis Child* 2009; 94: 3—5.
- 13) Kaji S, Murayama K, Nagata I, et al. Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol Genet Metab* 2009; 97: 292—296.
- 14) Garcia-Cazorla A, De Lonlay P, Rustin P, et al. Mitochondrial respiratory chain deficiencies expressing the enzymatic deficiency in the hepatic tissue: a study of 31 patients. *J Pediatr* 2006; 149: 401—405.
- 15) Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001; 106: 4—17.

## A Case of Neonatal Fulminant Hepatic Failure Caused by Mitochondrial DNA Depletion

Hiroki Suganuma<sup>1)</sup>, Mitsuyoshi Suzuki<sup>1)</sup>, Naomi Yoshikawa<sup>1)</sup>, Satoshi Hara<sup>1)</sup>,  
Tomonosuke Someya<sup>1)</sup>, Tubasa Lee<sup>1)</sup>, Ken Hisata<sup>1)</sup>, Hiromichi Shoji<sup>1)</sup>,  
Kei Murayama<sup>2)</sup>, Masaki Takayanagi<sup>2)</sup>, Akira Ohtake<sup>3)</sup> and Toshiaki Shimizu<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, Juntendo University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Saitama Medical University

Half of the childhood cases of fulminant hepatic failure occur in infants. The mortality of neonatal fulminant hepatic failure is about 70%—80%, and the cause is unknown in many cases. The present report describes a case of fulminant hepatic failure in a female neonate who had mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. The patient had recurrent vomiting from the age of 13 days and was admitted to our hospital at the age of 15 days due to poor sucking ability and somnolence. Laboratory investigations revealed liver dysfunction, markedly increased ammonia levels, hypoglycemia, hyperbilirubinemia and coagulopathy. On the basis of these findings, the patient was diagnosed with fulminant hepatic failure. An exchange transfusion was immediately performed, and then plasmapheresis and continuous hemofiltration was started. Ammonia and bilirubin levels were corrected immediately by the treatment, but the coagulopathy did not improve. Although we had planned for hepatic transplantation, the patient's parents did not give their consent, and the results from EEG indicated that the patient was not a candidate for hepatic transplantation. Despite intensive care, the patient died at the age of 47 days. Autopsy findings showed an extremely atrophied liver (weight, 16g), and a histological examination revealed that most of the liver cells had disappeared. We examined the mitochondrial respiratory chain function of the liver and the heart. Liver and heart respiratory chain complex I activity was decreased. Therefore, we concluded that complex I deficiency was the cause of fulminant hepatic failure. Furthermore, because the ratio of mitochondrial DNA (mtDNA) to nuclear DNA in the liver was 31.7% by real-time PCR (a reduction of mtDNA copy number to <35% is the criteria for mtDNA depletion syndrome), the patient was diagnosed as having mtDNA depletion syndrome. Our findings indicate that mitochondrial respiratory chain function in neonates with unexplained hepatic failure should be examined.

## ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症における肝疾患の現状

(平成23年2月3日受付, 平成23年7月27日受理)

\*1千葉県こども病院代謝科

\*2埼玉医科大学小児科

藤浪 綾子\*1・村山 圭\*1・鶴岡 智子\*1  
山崎 太郎\*2・高柳 正樹\*1・大竹 明\*2

Key Words : ミトコンドリア呼吸鎖異常症, ミトコンドリアDNA枯渇症候群, ミトコンドリア肝症, 組織特異性

### 要 旨

ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症は, ATPの産生にもっとも関与する呼吸鎖(電子伝達系)に関わる障害であり, 先天代謝異常症の中では最も頻度が高い。我々はこれまで131例のミトコンドリア呼吸鎖異常症を診断した。そのうち肝症状が主症状であったミトコンドリア肝症は, 21例であった。酵素欠損の分類では, 複数の呼吸鎖複合体の欠損が最も多かった。また, 臨床症状では神経症状に伴い進行性の肝機能障害・肝不全を呈する症例が16例と最も多く, そのうちの12例はミトコンドリアDNA枯渇症候群であった。Reye症候群様の症状を呈するものも7例あった。ミトコンドリア肝症はMELASやLeigh症候群と同数等でありMRCDの中では非常に重要な疾患と位置づけられる。しかしMRCDの特徴である組織特異性により, 線維芽細胞などの培養細胞では診断がつきにくいいため, できるだけ肝臓を中心とした罹患臓器での酵素解析を行うべきである。

### はじめに

ミトコンドリアは糖質, 脂質, 蛋白質から生体に必要なエネルギー源であるATPを産生する細胞内小器官である。そしてATP産生を大きく担っているのがミトコンドリア呼吸鎖といわれる大分子の酵素複合体群である。“ミトコンドリア病”は, そのATPの産生にもっとも関与する呼吸鎖(電子伝達系)の障害, またはその反応である酸化リン酸化の障害によって引き起こされる疾患であり, ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症(MRCD)と称される。先天代謝異常症の中では最も頻度が高く, 有病率は少なくとも5,000人に1人と言われている<sup>1)</sup>。

ミトコンドリアは全ての細胞に存在するため, その

症状は多彩である<sup>2)</sup>。肝症状が全面に出てくるミトコンドリア肝症(Mitochondrial hepatopathy)もMRCDの1つであるが, 近年, 呼吸鎖酵素解析が広く行われるようになりしっかりと診断がなされ, その病態が明らかにされつつある。特に神経症状と進行性の肝障害を呈するミトコンドリアDNA枯渇症候群(MDS)は, その責任遺伝子がいくつか判明し分子レベルでの病態が明らかにされてきている<sup>3)</sup>。本邦でも我々が呼吸鎖酵素活性の測定をはじめた2007年から, ミトコンドリア肝症と診断される症例の報告が, 学会や論文等でみられてきている<sup>4)5)</sup>。我々はこの論文において, ミトコンドリア肝症について, MRCD全体の中での位置づけ, 酵素診断の分類, 臨床像, 病理像, 組織特異性等について考察を加え報告する。

### 対象と方法

Bernierらの提唱している診断基準<sup>6)</sup>では, Definite(確定例), Probable(疑い例), Possible(可能性例),

別刷請求先: 〒266-0007 千葉市緑区辺田町579-1  
千葉県こども病院代謝科  
藤浪 綾子



Unlikelyに分類される。我々はそのうち主に臨床症状や、乳酸値やアラニン値などの生化学所見で満たされるpossible（可能性例）までの症例を対象に、呼吸鎖の酵素活性及びBlue-native PAGEを用いたイムノプロット解析を行うことによって、probable（疑い例）、Definite（確定例）までひきあげることによって診断した。いずれも倫理委員会によって承認された承諾書に基づき、十分なインフォームド・コンセントを行った。

試料は、組織については $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存された肝や筋肉の一片をホモジナイズし、600Gにて遠心後の上清を用いて、また皮膚線維芽細胞については、ミトコンドリア分画を単離したあと、界面活性剤であるドデシルマルトシドまたはTriton Xによって可溶化し、酵素活性、およびBlue-native PAGEを用いたイムノプロット解析を行った。酵素活性は分光光度計を用い、光化学的に呼吸鎖I、II、III、IVおよび対象としてクエン酸合成酵素（Citrate Synthase；CS）を測定した。呼吸鎖酵素活性はCSおよびComplex IIとの相対比で表し、対照12人の平均に対する%で示した。

Blue-native PAGE解析は4～13%濃度勾配ゲルを用いて展開し、イムノプロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。呼吸鎖複合体に対する各種モノクローナル抗体を用いて行った。さらに酵素活性にて有意な低下を示した症例に対しては、ミトコンドリアDNA（mtDNA）の枯渇があるか否か調べる目的で、mtDNAの比較定量（Quantitative PCR；qPCR）を施行した。精製DNAを用いミトコンドリア（呼吸鎖I-ND4サブユニット）と核（脾のう胞性線維症遺伝子エクソン24）のDNAをreal time PCRで増幅しその量比を正常コントロールに対する%で表した。qPCRにてmtDNAが正常コントロールの35%以下である<sup>3)</sup>ミトコンドリアDNA枯渇症候群（MDS）と診断された症例に対し、肝型MDSの責任遺伝子の解析を行った。

## 結 果

### ①MRCD全体について

当院にて解析を行った355例中MRCD Probable以上と診断された症例は131例であった。男児69例、女児58例、不明4例であった。生後28日以内の新生児期発症は57例（44%）であり、生後1年以内の発症は94例（72%）であった。死亡例は61例（47%）であり、予後不良であることがうかがわれた。また、高乳酸血症を認めなかった症例も21例（16%）で確認された。131例のうち25例で肝機能異常を認めた。

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断となった131例の

臨床診断を図1に示す。もっとも多いのは、新生児期に難治性の高乳酸血症によって致命的経過をたどる致死性乳児ミトコンドリア病、もしくは一命は取り留めるものの重篤な後遺症を残すことの多い非致死性乳児ミトコンドリア病である。Leigh症候群とミトコンドリア脳筋症が23例で続き、それに次いでミトコンドリア肝症が21例となっている。また、131例の酵素診断を図2に示す。最も多かったのは複数の呼吸鎖複合体欠損で54例、次いでComplex I欠損症が50例、Complex IV欠損症が15例、Complex III欠損症が9例であった。このうち、Complex I欠損症の4例と複数の呼吸鎖複合体欠損の14例がQuantitative PCRにてMDSと診断された。

### ②ミトコンドリア肝症について

#### ②-1. 酵素診断の分類

131例のうち、ミトコンドリア肝症は21例を占めた。その21例と、他のCytopathyの合併症として肝障害を認めた4例の酵素診断を図3に示す。MRCD全体の比率と異なり、複数の呼吸鎖複合体欠損が最も多く16例、次いでComplex I欠損症で6例、Complex III欠損症が2例、Complex IV欠損症が1例であった。このうち、Complex I欠損症の3例と複数の呼吸鎖複合体欠損の9例がQuantitative PCRにてMDSと診断された。

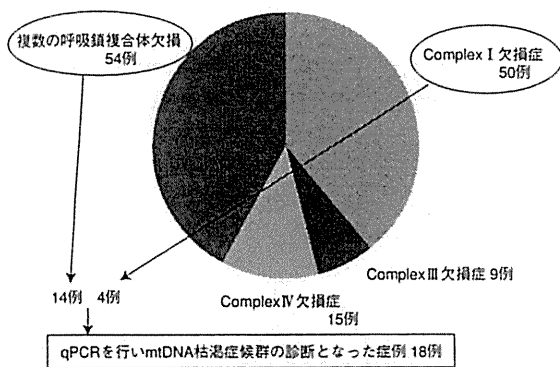
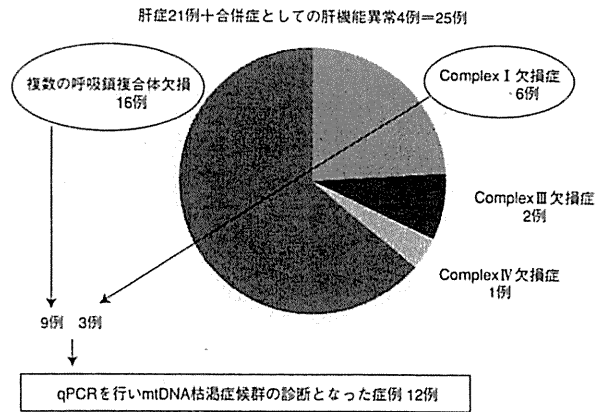
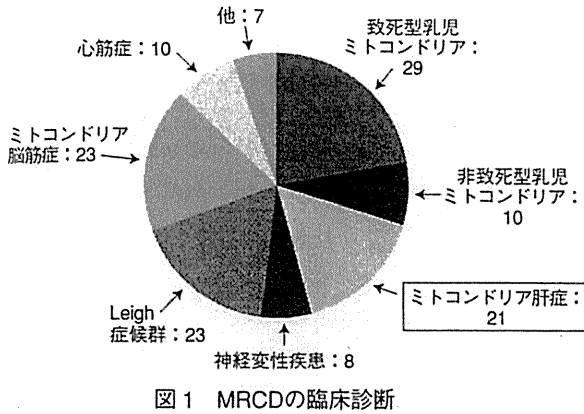
#### ②-2. 臨床像について

ミトコンドリア肝症の臨床像はLeeらによって分類されている<sup>7)</sup>。我々が診断した症例を同様に分類すると、Neonatal liver failureは0例、mtDNA depletionが12例、Delayed onset liver disease（Alpers-Huttenlocher）が1例、Pearson syndromeが0例、Villous atrophy syndromeが1例、Navajo neurohepatopathyが0例であった。そのほか、Leeらの分類になかったものとしてはReye症候群が7例、進行性の肝障害と神経症状を示す症例が2例、その他、心筋症や多臓器不全に伴う症例が2例であった。

#### ②-3. MDSについて

MDSと診断された12例の詳細を表1に示す。12例中10例が死亡しており、予後不良である事がわかる。症例4、6、7のように、明らかな高乳酸血症のない症例も認めた。組織所見では、大小脂肪滴、炎症細胞浸潤、門脈域の線維化がみられた。症例1、3、4、5で肝移植が施行されているが、症例3以外はすべて死亡している。また、11例のうち8例で遺伝子異常が検出され、症例1、2、4、5、6は確定診断となった。このうちdeoxyguanosine kinase（*DGUOK*）c.143-308\_169del335は全く血縁のない症例1、2（同胞例）





らは酵素活性の低下を認めた。肝型MDSの12例では全例が肝臓を測定し診断に至った。肝臓と線維芽細胞を測定した症例は4例であり、全例で線維芽細胞では活性の低下は認めなかった。肝臓と心筋を測定した症例は2例あり、どちらも心筋での酵素活性の低下を認めた。

### 考 察

MRCDは症状が多臓器、多岐にわたり、診断することが難しい。

我々がprobable以上と診断したMRCD131例において、肝障害がメインとなる症例は21例（16%）であった。これはMELASやLeigh症候群とほぼ同等の数であり、MRCD全体の中でも重要な疾患と位置付けられる。酵素診断ではComplex I 欠損症と複数の呼吸鎖複合体欠損が多くみられた。複数の呼吸鎖複合体欠損の主要原因はミトコンドリアDNA枯渇症候群であった。TCAサイクルから電子伝達系への入り口はComplex I だけでなくComplex IIもある。肝臓では1種類の呼吸鎖複体の酵素活性の低下では症状が出にくく、複数の呼吸鎖複体の酵素活性が低下してから症状が出現すると考えられる。ミトコンドリア肝症の臨床像としてReye症候群、神経症状に伴う進行性肝機能障害が多くみられ、とくに後者はMDSに特徴的であった。Reye症候群は上気道感染が先行し、回復期に嘔吐、痙攣、意識障害が発症する症候群であり、諸臓器に脂肪沈着を伴う急性脳症として知られる。MRCDはReye症候群と同様の所見を示し、臨床像だけでは見分けがつかない<sup>8)</sup>。

重症肝不全では二次的に呼吸鎖活性が低下する。呼吸鎖複合体の中で最も不安定なのはComplex IIであり、

と4に共通していた。この欠失について日本人100例200アレルの検索を行ったところ欠損が発見されなかった。

#### ②-4. 組織特異性について

呼吸鎖複体の異常が確認され、MRCDの診断に有用であった組織検体について、肝症がメインの症状であった21例の検討を行った。結果を表2に示す。肝臓と線維芽細胞を測定した症例は6例であり、全例、線維芽細胞では活性の低下は認めなかった。肝臓と筋肉を測定した症例はなかった。肝臓と心筋を測定した症例は1例であり、心筋での酵素活性の低下を認めた。肝臓を測定していない症例はそれぞれ、筋肉、線維芽細胞の酵素活性が低下していた。合併症として肝機能異常を認めた4例の酵素活性の結果を表3に示す。臨床診断はインフルエンザ脳症やロタウイルス脳症などであった。肝臓と筋肉、線維芽細胞を測定した症例はそれぞれ2例ずつであり、酵素活性の低下は認めなかった。肝臓と心筋を測定した症例も2例であり、こち

表1 肝型MDSの12例

No	性別	初期症状	予後	臨床経過	合併症	肝組織所見	血中乳酸/ ビルビン酸	遺伝子
1	F	低体温(1d)	D(8m)	ミトコンドリア ヘパトパチー	肝不全⇒肝移植 低血糖	大小脂肪滴 門脈線維化 炎症細胞浸潤	20.9/0.27	DGUOK (c.143- 308_169del335homo)
2	F	体重増加不良(3m)	D(2y)	肝不全 (s/o チロシン血症)	MR 体重増加不良	大小脂肪滴 門脈線維化 炎症細胞浸潤	不明	DGUOK (c.143- 308_169del335homo)
3	M	肝機能異常(2m)	A(2y)	肝不全	肝不全⇒肝移植	結節性肝硬変 広範囲な線維化	上昇	
4	F	経口不良(8d)	D(1y)	肝不全	肝不全⇒肝移植 MR, 体重増加不良	小脂肪滴 門脈線維化	2.9/0.14	DGUOK (L248P/c.143- 308_169del335)
5	M	体重増加不良 無胆汁便(3m)	D(2y)	肝不全	肝移植	炎症細胞浸潤 肝硬変	不明	MPV17 (451insC/S170F)
6	M	体重増加不良 嘔吐(8m)	A(2y)	肝不全	MR, GER 肝臓腫大	線維化 炎症細胞浸潤	LA(-)	MPV17 (451insC/S170F)
7	F	体重増加不良(4m)	D(7m)	肝不全	トーンズ低下 同胎が同じ症状で 死亡	小脂肪滴 門脈線維化	1.76/0.1	POLG (I1185T/A95V), SUCLG1 (P173A/-)
8	M	体重増加不良(4m)	D(4m)	心筋症, 脂肪肝	Floppy infant 肝腫大, 心肥大	大脂肪滴	不明	
9	M	体重増加不良(1m)	D(7m)	胆汁うっ滞	肝腫大	広範囲な線維化	不明	
10	F	無呼吸(3m)	D(8m)	ミトコンドリア ヘパトパチー	小腸症, 小脳萎縮 DIC, 筋うっ血	大脂肪滴	2.3/0.09	POLG (c.1949+44C>T/-)
11	F	経口摂取不良(15d)	D(1m)	ミトコンドリア ヘパトパチー疑い	高アンモニア血症, 高ビルビン酸血症, 低血糖	肝細胞の脱落 大小脂肪滴	8.46/0.30	POLG (c.1434-40G>A/-)
12	F	腸管機能不全(1m)	D(1y)	肝不全	体重増加不良, 低血糖, AFP上昇, 心筋症	大小脂肪滴 肝細胞周囲性線維化	26.3/1.22	

予後: D, death, A, alive

単位: mM

表2 ミトコンドリア肝症における酵素活性結果

肝障害がメインのミトコンドリア肝症 21例

Pt	性別	酵素診断	肝臓	筋肉	心筋	線維芽細胞
1	F	IV	N/D	N/D	N/D	↓
2	F	I, IV	N/D	↓	N/D	→
3	M	I, III, IV	↓	N/D	N/D	N/D
4	M	I, III, IV	↓	N/D	N/D	→
5	M	I, IV	↓	N/D	N/D	N/D
6	F	III	↓	N/D	N/D	N/D
7	F	III	↓	N/D	N/D	N/D
8	M	I, IV	↓	N/D	N/D	N/D
9	M	I, IV	↓	N/D	N/D	→
10	F	I, II, III, IV	↓	N/D	N/D	N/D
11	F	I, III, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	→
12	F	I, III, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D
13	M	I, II, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D
14	F	I, III, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D
15	M	I, II, III, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D
16	M	I, III, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	→
17	F	I, II, III, IV →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D
18	M	I, II, III →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D
19	F	I →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	→
20	F	I →mtDNA dep	↓	N/D	↓	→
21	F	I, III →mtDNA dep	↓	N/D	N/D	N/D

表3 臓器別酵素活性結果

合併症としての肝機能異常 4例

Pt	性別	酵素診断	肝臓	筋肉	心筋	線維芽細胞
1	M	Complex I deficiency	↓	N/D	N/D	→
2	M	Complex I deficiency	↓	→	↓	N/D
3	F	Complex I deficiency	↓	→	N/D	→
4	M	CoII def + mtDNA dep	↓	N/D	↓	N/D

二次的に呼吸鎖活性が低下する場合はComplex IIを中心に活性が低下してくることが知られている<sup>9)</sup>。このため、各複合体の活性を比較することにより、MRCDによる一次的な活性低下かその他の疾患による二次的な活性低下を判断することができる。また、中等度の酵素活性低下の場合、基礎疾患が隠れていることがあり、検索が必要である<sup>10)</sup>。我々が診断したMRCD疑い症例の中には、新生児期に胆汁うっ滞をきたす疾患として知られているシトリン欠損症 (NICCD) の診断に至った一例があった。酵素活性ではComplex I欠損症の診断となっており、NICCDではComplex Iの活性が低下するの、NICCDとMRCDの合併であるのか遺伝子検索を施行中である。

Spinazzolaらによると、肝型MDSの発症は生後すぐから6カ月の間であり、1年以内に死亡することが多いとされている<sup>11)</sup>。我々がまとめた結果からも、発症は生直後から8カ月までで、ほとんどの症例が1歳程度で死亡している。共通する症状は、継続する嘔吐、体重増加不良、筋緊張低下、低血糖、進行性神経症状であった。

肝生検の組織学的評価では脂肪変性、胆管増成、線維化、分葉構造の消失が見られるとされている。我々の検討でも大小脂肪滴、炎症細胞浸潤、門脈域肝線維化がみられることが多かった。シトリン欠損症 (NICCD) の組織所見は、胆汁うっ滞、脂肪変性、巨細胞性変化であり<sup>12)</sup>、組織所見のみではNICCDとの鑑別は難しいと考えられる。ミトコンドリア肝症は、乳児期の胆汁うっ滞性肝障害をきたしうる疾患として捉えて、検査を進めることが重要である。

肝型MDSをきたす責任遺伝子としてはPOLG, DGUOK, MPV17が多く、本邦での解析でも8例でこれらの遺伝子の異常を認めた。中でもDGUOK遺伝子における欠失 (c.143-308\_169del335) は全く血縁のない2家系に認めており、日本人における特異的な変異の可

能性があり、今後の蓄積が待たれる。

MRCDの大きな特徴の1つには組織特異性があることが知られている<sup>13)</sup>。報告によると、筋肉のミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性が低下している場合、線維芽細胞でも低下している症例は半分以下と言われている<sup>9)</sup>。また、肝臓や心筋の酵素活性が低下している時に筋肉の活性が下がっている症例は1/4以下と言われている。我々の検討では、肝臓で酵素活性が低下しているときに筋肉の酵素活性が低下している症例はなく (2例中0例)、線維芽細胞でも認めなかった (8例中0例)。ミトコンドリアDNA枯渇症候群においても、線維芽細胞で活性が低下している症例は認めなかった。このことより、線維芽細胞だけではなく症状のある組織 (ミトコンドリア肝症であれば肝臓) を検索する必要があるといえる。

治療については我々はミトコンドリアレスキュー薬として各種ビタミン剤や補酵素の投与を行っているが十分なエビデンスが確立しているものではない<sup>14)</sup>。しかし、ミトコンドリア肝症では肝トランスアミナーゼの改善が見られるなど効果がみられる<sup>9)</sup>。これは①肝臓が筋肉や心筋ほど多くのエネルギーを必要としていないこと、②経門脈的に薬物が肝細胞に行き渡ること、などが考えられる。栄養については、脂肪酸代謝異常症が否定されれば、解糖系の停滞を減らし有効にエネルギーを作るべく、糖質を減らし脂質を増やすのがよいとされる。Kaji<sup>9)</sup>らはMPV17遺伝子によるミトコンドリアDNA枯渇症候群に対し、Complex IIをターゲットにした薬物療法とケトン乳+MCTミルクにて肝トランスアミナーゼの改善と感染時の肝機能悪化を予防できたと報告している。また、ミトコンドリア肝症に対する肝移植の有効性は現時点では不定である<sup>9)</sup>。肝臓以外の症状を改善させるものではなく、神経症状を呈している症例や心筋症などの症例では適応外とされている。個々の症例に対して個別に検討していく必要があると

考えられる。

### おわりに

今回本邦で初めてミトコンドリア肝症の現状について報告をした。肝症に限らずMRCDは様々な症状を呈するため、常に疑って診断につなげていくことが重要となる。MELASやLeigh症候群と同様にミトコンドリア肝症も頻度は高く、きちんと診断していく必要があるが、組織特異性により線維芽細胞では診断がつきにくいいため、障害臓器である肝臓を検索することが重要である。

本研究において、常日頃より大変ご尽力いただいている埼玉医科大学小児科技師 原嶋宏子さん、および千葉県こども病院検査科の安嶋まさみさんに、深謝いたします。

### 文 献

- 1) Skladal D et al : Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 126 : 1905-1912, 2003
- 2) A. Munnich, P. Rustin : Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am. J. Med. Genet.* 106 : 4-17, 2001
- 3) E. Sarzi, A. Bourdon, D. Chretien, M. Zarhrate, J. Corcos, A. Slama, V. Cormier-Daire, P. Lonlay, A. Munnich, A. Rotig : Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* : 150 (5) : 531-534, 534. e1-6, 2007
- 4) Kaji S, Murayama K, Nagata I, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohtake A, Iwasa H, Nishiyama M, Okazaki Y, Harashima H, Eitoku T, Yamamoto M, Matsushita H, Kitamoto K, Sakata S, Katayama T, Sugimoto S, Fujimoto Y, Murakami J, Kanzaki S, Shiraki S: Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol Genet Metab* 97 (4) : 292-296, 2009
- 5) Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, Miyata R, Hatai Y, Murayama K, Ohtake A : Reye's syndrome caused by liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency, *Brain & Development* in press
- 6) F. P. Bernier, A. Boneh, X. Dennett, C. W. Chow, M. A. Cleary, D. R. Thorburn : Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59 (9) : 1406-1411, 2002
- 7) W. S. Lee, R. J. Sokol : Mitochondrial hepatopathies: advances in genetics and pathogenesis. *Hepatology* 45 (6) : 1555-1565, 2007
- 8) 木村昭彦 : ライ症候群. *肝・胆・膵* 55 : 229-235, 2007
- 9) D. R. Thorburn, C. W. Chow, D. M. Kirby: Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion* 4: 363-375, 2004
- 10) J. Hui MBBS, D. M. Kirby, D. R. Thorburn, A. Boneh : Decreased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in non-mitochondrial respiratory chain diseases. *Developmental Medicine & Child neurology* 48 : 132-136, 2006
- 11) A. Spinazzola, F. Invernizzi, F. Carrara, E. Lamantea, A. Donati, M. DiRocco, I. Giordano, M. Meznaric-Petrusa, E. Baruffini, I. Ferrero, M. Zeviani : Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inheret Merab Dis* 32 (2) : 143-158, 2009
- 12) Tazawa Y, Kobayashi K, Abukawa D, Nagata I, Maisawa I, Sumazaki R, Iizuka T, Hosoda Y, Okamoto M, Murakami J, Kaji S, Tabata A, Lu YB, Sakamoto O, Matsui A, Kanzaki S, Takada G, Saheki T, Iinuma K, Ohura T : Clinical heterogeneity of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency : case reports from 16 patients. *Mol Genet Metab* 83 : 213-219, 2004
- 13) D. R. Thorburn : Diverse powerhouse. *Nat Genet.* 36 (1) : 13-14, 2004
- 14) 村山圭, 森雅人, 大竹明 : ミトコンドリア病 (ミトコンドリア呼吸鎖異常症) *小児科臨床*, 63 : 2071-2079, 2010

### The clinical and molecular manifestation of mitochondrial hepatopathy in Japan

\*<sup>1</sup>Chiba Children's Hospital, dep of Metabolism

\*<sup>2</sup>Saitama Medical University, dep of Pediatrics

Ayako FUJINAMI\*<sup>1</sup>, Kei MURAYAMA\*<sup>1</sup>, Tomoko TSURUOKA\*<sup>1</sup>,  
Taro YAMAZAKI\*<sup>2</sup>, Masaki TAKAYANAGI\*<sup>1</sup>, Akira OHTAKE\*<sup>2</sup>

Mitochondrial respiratory chain complex deficiency is the most common group of inborn errors of metabolism. One hundred and thirty one patients were diagnosed to have MRCD out of 355 candidate patients, and twenty one patients of them were clinically diagnosed as the mitochondrial hepatopathy. Multiple complexes deficiency was most frequently seen among the all types of complexes deficiency. In 21 patients with hepatopathy, sixteen patients presented with the liver failure accompanied by neurological abnormalities. Twelve patients of them were diagnosed as mitochondrial DNA depletion syndrome. Seven patients presented with Reye like syndrome. Mitochondrial hepatopathy is very important disease in MRCD because it was as common as MELAS and Leigh syndrome in our experience. Mitochondrial hepatopathy is difficult to diagnose by cultured cell because of tissue specificity, therefore the enzymatic study should be examined using the affected organ tissue including liver.

## ミトコンドリア肝疾患と胆汁うっ滞

村山 圭\* 藤浪綾子\*\*

### はじめに

ミトコンドリア病（ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症：MRCD）は呼吸鎖（電子伝達系）または酸化リン酸化の障害であり、多彩な臓器症状を呈する先天代謝異常症である。その有病率は少なくとも 5000 人に 1 人とされている<sup>1)</sup>。脳症、筋症、心筋症などさまざまな臨床型を呈し、肝症状が全面に出てくるミトコンドリア肝症（mitochondrial hepatopathy）もまた MRCD のひとつである。近年、呼吸鎖酵素解析が広く行われるようになり、しっかりと診断がなされその病態が明らかにされつつある。とくに、神経症状と進行性の肝障害を呈するミトコンドリア DNA 枯渇症候群（MDS）は、その責任遺伝子がいくつか判明し分子レベルでの病態が明らかにされてきている。わが国でもわれわれが呼吸鎖酵素活性の測定をはじめた 2007 年から、ミトコンドリア肝症と診断される症例の報告が、学会や論文などでみられてきている<sup>2,3)</sup>。乳児期から胆汁うっ滞をきたす症例も多く含まれており、乳児胆汁うっ滞性肝疾患のなかの一端を占めることもわかってきた。本稿では、われわれが行ってきた診断データをもとにミトコンドリア肝症の現状、診断、トピックスを述べていきたい。

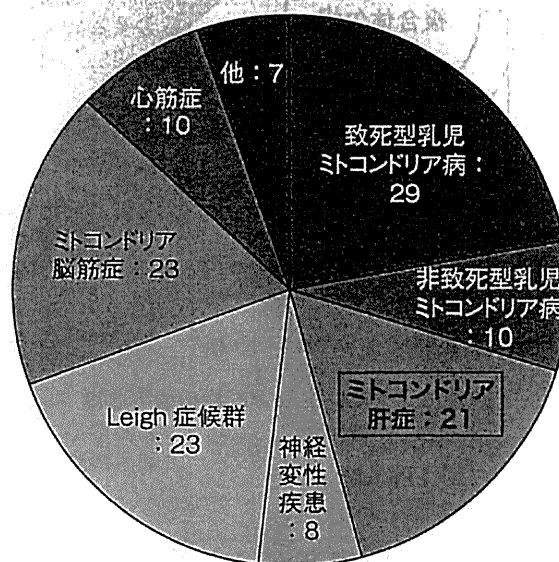


図 1 MRCD の臨床診断

### 1 MRCD の全体像について

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断となった 131 例の臨床診断を図 1 に示す。当院にて解析を行った 355 例中 MRCD の診断となった症例は 131 例であり、このうち 25 例で肝機能異常を認めた。MRCD の臨床診断のなかで最も多いのは、いわゆる新生児高乳酸血症といわれる致死性乳児ミトコンドリア病と非致死性乳児ミトコンドリア病で、Leigh 症候群とミトコンドリア脳筋症が 23 例で続き、それに次いでミトコンドリア肝症が 21 例となっている。この比率は海外でのミトコンドリア病のプロファイルと大きく変わりはない。

Murayama Kei Fujinami Ayako

\* 千葉県こども病院代謝科

〔〒266-0007 千葉市緑区辺田町 579-1〕

TEL 043-292-2111 FAX 043-292-3815

E-mail : kmuraya@mri.biglobe.ne.jp

\*\* 東京都立小児総合医療センター集中治療科

肝症 21 例 + 合併症としての肝機能異常 4 例 = 25 例

肝症 21 例 + 合併症としての肝機能異常 4 例 = 25 例

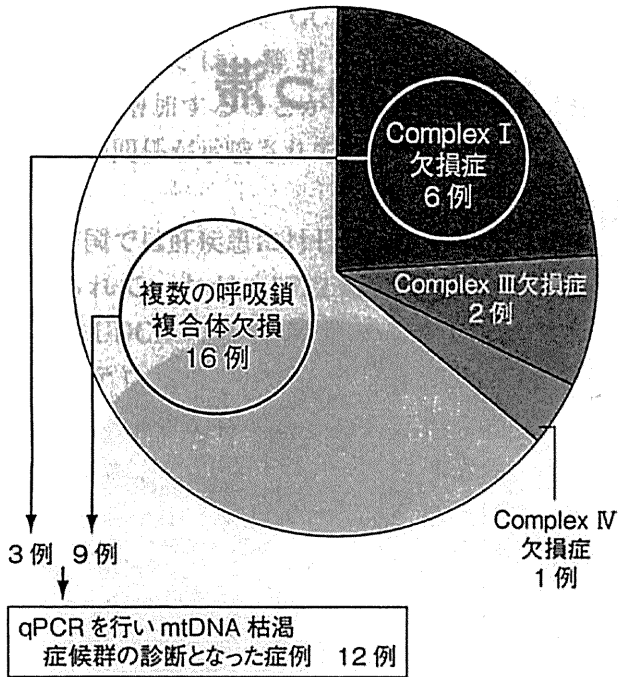


図 2 ミトコンドリア肝症の酵素診断

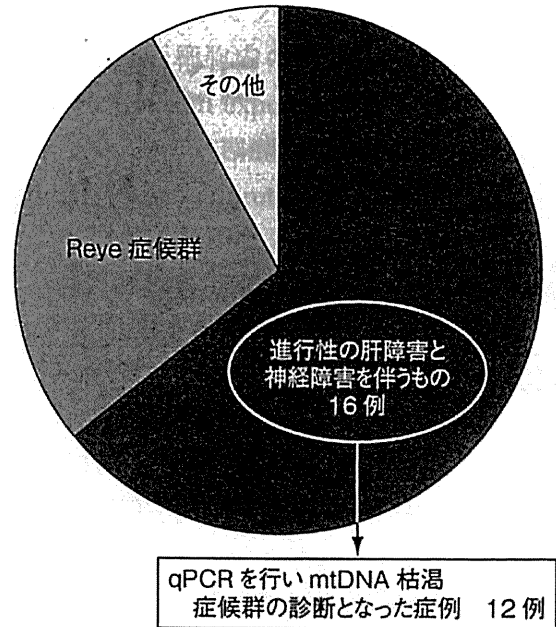


図 3 MRC のうち肝機能障害をした患者の臨床診断

## II ミトコンドリア肝症について

### 1. 酵素診断の分類

131 例のうち、肝症状が前面に出たミトコンドリア肝症は 21 例を占めた。その 21 例と、他の cytopathy の合併症として肝障害を認めた 4 例の酵素診断を図 2 に示す。MRC 全体の比率と異なり、複数の呼吸鎖複合体欠損が最も多く 16 例、次いで complex I 欠損症で 6 例とこれら 2 つで大部分を占めていた。このうち、complex I 欠損症の 3 例と複数の呼吸鎖複合体欠損の 8 例が quantitative PCR (qPCR) にて MDS と診断された。

### 2. 臨床像について

肝機能障害をきたした患者の臨床像を図 3 に示す。Reye (様) 症候群の診断となった症例が 7 例、神経症状に伴い進行性の肝機能障害・肝不全を呈する症例が 16 例であり、そのうち 12 例が MDS であった。そのほか、心筋症や多臓器不全に伴う症例が 2 例であった。MRC は Reye (様) 症候群をひき起こす背景として、非常に重要であ

ろう。

### 3. MDS について

MDS の概説については後述する。MDS と診断された 12 例の詳細を表に示す。12 例すべてが乳児期発症であり、ほぼすべてが乳児期に胆汁うっ滞を呈していた。呼吸鎖異常症の検索にたどり着くまでに、胆道閉鎖症、各種ウイルス性肝炎、シトリン欠損症、進行性家族性胆汁うっ滞 (PFIC)、各種代謝異常症の検索を行っているものが多く、各主治医とも非常に診断に難渋していた。また、主治医が MDS を疑って、複数のミトコンドリア脳筋症 (MELAS) の専門家に相談したにもかかわらず、否定され診断にたどり着かなかった症例も数例見かけた。MDS の 12 例中 10 例が死亡しており、予後不良であることがわかる。症例 4・6・7 のように、明らかな高乳酸血症のない症例も認めた。組織所見では、大小脂肪滴、炎症細胞浸潤、門脈域の線維化がみられた。症例 1・3~5 で肝移植が施行されているが、症例 3 以外はすべて死亡しており、予後は非常に悪いことがわかる。



表 肝型 MDS の 12 例

No (性)	初期症状	予後	臨床診断	合併症	肝組織所見	血中乳酸/ ビリルビン酸 (単位 mM)	遺伝子解析
1 (F)	低体温 (1日)	D (8か月)	ミトコン ドリア ヘパトパチー	肝不全⇒肝移植 低血糖	大小脂肪滴 門脈域線維化 炎症細胞浸潤	20.9/0.27	DGUOK (c. 143- 308_169del335homo)
2 (F)	体重増加不良 (3か月)	D (2年)	肝不全 (s/o チロシ ン血症)	MR 体重増加不良	大小脂肪滴 門脈域線維化 炎症細胞浸潤	不明	DGUOK (c. 143- 308_169del335homo)
3 (M)	肝機能異常 (2か月)	A (2年)	肝不全	肝不全⇒肝移植	結節性肝硬変 広範囲な 線維化	上昇	
4 (F)	経口不良 (8日)	D (1年)	肝不全	肝不全⇒肝移植 MR, 体重増加不良	小脂肪滴 門脈域線維化	2.9/0.14	DGUOK (L248P/c. 143-308_169del335)
5 (M)	体重増加不良 無胆汁便 (3か月)	D (2年)	肝不全	肝移植	炎症細胞浸潤 肝硬変	不明	MPV17 (451insC/S170F)
6 (M)	体重増加不良 嘔吐 (8か月)	A (2年)	肝不全	MR, GER 呼吸障害	線維化 炎症細胞浸潤	LA (-)	MPV17 (451insC/S170F)
7 (F)	体重増加不良 (4か月)	D (7か月)	肝不全	トーンヌ低下 同胞が同じ症状で 死亡	小脂肪滴 門脈域線維化	1.76/0.1	POLG (I1185T/A957V), SUCLG1 (P173A/--)
8 (M)	体重増加不良 (4か月)	D (4か月)	心筋症, 脂肪肝	floppy infant 肝腫大, 心肥大	大脂肪滴	不明	
9 (M)	体重増加不良 (1か月)	D (7か月)	胆汁 うっ滞	肝腫大	広範囲な 線維化	不明	
10 (F)	無呼吸 (3か月)	D (8か月)	ミトコン ドリア ヘパトパチー	小頭症, 小脳萎縮 DIC, 肺うっ血	大脂肪滴	2.3/0.09	POLG (c. 1949+44C>T/--)
11 (F)	経口摂取不良 (15日)	D (1か月)	ミトコン ドリア ヘパトパチー	高アンモニア血症, 高ビリルビン血症, 低血糖	肝細胞の脱落 大小脂肪滴	8.46/0.30	POLG (c. 1434-40G>A/--)
12 (F)	腸管機能不全 (1か月)	D (1年)	肝不全	体重増加不良, 低血糖, AFP 上昇, 心筋症	大小脂肪滴 肝細胞周囲性 線維化	26.3/1.22	

予後 D: death, A: alive, 1, 2, 5, 6 は同胞例

#### 4. 組織特異性について

ミトコンドリア病の大きな特徴のひとつは、組織特異性 (tissue specificity) である。この組織特異性は mtDNA の異常でも核 DNA の異常でも起こってくる。ミトコンドリア蛋白の 50% は組織特異性があるといわれている<sup>4)</sup>。筋肉と肝臓での呼吸鎖の酵素活性が異なってくることは、実際によくみられることである。自験例でも同様であり、肝機能異常を認めたミトコンドリア病 25 例のうち、22 例が肝臓を用いて診断できている。

とくに、肝不全を呈してくる肝型 mtDNA 枯渇症候群は 12 例全例が肝臓での診断であり、線維芽細胞などは正常活性であった。それゆえ、肝組織を用いた酵素解析が非常に重要になってくる。

### III ミトコンドリア DNA 枯渇症候群

ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (mitochondrial DNA depletion syndrome: MDS) は mtDNA の複製や核酸合成に関わる蛋白の異常によって、



mtDNA の量が低下した結果、complex II 以外の呼吸鎖 I・III・IV・Vの活性の低下がみられてくるミトコンドリア病の疾患群である (complex II は核 DNA のみコードしている)。脳肝型、脳筋型、筋型に分類される (肝型、筋型と簡便によぶことが多い)。いずれも核遺伝 (今のところ常染色体劣性のみ) である。mtDNA が減少するだけでミトコンドリアの数が減少するわけではない。ミトコンドリアはむしろ増加し、クエン酸合成酵素の活性が異常高値になる。

酵素欠損は、complex I + III + IV 欠損、complex I + III 欠損、complex I 欠損のパターンをとる。臨床症状と酵素診断から推定し、mtDNA の比較定量 (qPCR) を行えば診断は容易である。これまで筆者らは 12 例の肝型 MDS、6 例の筋型 MDS を診断してきたが、いずれも非常に重篤な症例ばかりである。ミトコンドリア病全体としても 10~20%程度は占めるものと思われる。

#### IV どのようなときにミトコンドリア肝症を疑うか？ 何をすべきか？

前述のとおり、MDS を中心にミトコンドリア肝症は、乳児胆汁うっ滞性疾患のひとつとして認識すべきである。では、どのようなときに本疾患を積極的に疑うべきか列挙したい。①神経症状など肝臓以外の症状を呈したとき (たとえば、発達遅滞、難聴、眼振、下痢、心筋症など)、②画像上あるいは病理組織において脂肪肝が認められたとき、③原因不明の進行性の肝障害を認めたとき、④Reye (様) 症候群など肝障害を伴う脳症のすべて、などであろう。高乳酸血症を認めなかったり、脂肪肝ではないときもそれだけで本症を否定してはいけなこともつけ加えておく。ミトコンドリア呼吸鎖異常症の日本語の総説である文献<sup>6)</sup>もぜひ読んでいただきたい。

診断は肝組織を用いた酵素解析を中心に行う必要がある。針生検で、十分な長さの肝組織は最低でも 2 本は必要になる。したがって、肝生検までに他の疾患の否定はある程度行っておきたい。肝組織は酵素活性を保つために、採取後速やかに -80℃以下に保存し、輸送は十分なドライア

イス下にて行うことが重要である。

#### V ミトコンドリア呼吸鎖異常症と新生児ヘモクロマトーシスとの関連

新生児ヘモクロマトーシスは、新生児期に鉄沈着を伴い肝不全を呈する予後不良な疾患であり、遺伝性ヘモクロマトーシスと違って責任遺伝子が同定されていない。最近、MDS の責任遺伝子のひとつである deoxyguanosine kinase (DGUOK) の異常により、新生児ヘモクロマトーシスの病像をとった複数例が報告された<sup>6)</sup>。呼吸鎖は鉄を豊富に含んでいる分子複合体であり、ヘモクロマトーシスを診てきた者にとっては、非常に興味深い。呼吸鎖異常と鉄代謝異常との関連は今後、徐々に明らかになってくるであろう。

#### おわりに

ミトコンドリア病はその中心は、従来の MELAS に代表される mtDNA 遺伝疾患から、核遺伝に伴う疾患の解明へと大きく変わりつつある。それに伴い、小児消化器・肝臓専門医、新生児科医、小児循環器科医、代謝専門医などにとっても非常に関わり深い疾患になってきた。今後は基礎医学も含めたそれぞれの専門家が知恵を出しながら、薬物治療、栄養療法などを考えていく必要がある。今のところ、Kaji らが報告<sup>2)</sup>したよう

#### Key Points

- ① ミトコンドリア肝症は乳児胆汁うっ滞性疾患のひとつである。
- ② ミトコンドリア肝症のなかでも進行性の肝障害に神経症状を伴っていたら、ミトコンドリア DNA 枯渇症候群を考える必要がある。
- ③ Reye (様) 症候群にもなることがある。
- ④ 診断には肝臓を用いたミトコンドリア呼吸鎖酵素解析が重要である。
- ⑤ 新生児ヘモクロマトーシスと呼吸鎖異常との関連が報告されはじめた。

に欠損酵素を明らかにしたうえで治療法を立てて、その効果をしっかりと評価していくことが、本症と向き合ううえで重要なことであると考え

#### 文 献

- 1) Skladal D, Halliday J, Thorburn DR : Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* **126** : 1905-1912, 2003
- 2) Kaji S, Murayama K, Nagata I, et al : Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol Genet Metab* **97** : 292-296, 2009
- 3) Arakawa C, Endo A, Kohira R, et al : Reye's syndrome caused by liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Brain Dev*, 2011 Mar 25 [Epub ahead of print]
- 4) Thorburn DR : Diverse powerhouses. *Nat Genet* **36** : 13-14, 2004
- 5) Pronicka E, Węglewska-Jurkiewicz A, Taybert J, et al : Post mortem identification of deoxyguanosine kinase (*DGUOK*) gene mutations combined with impaired glucose homeostasis and iron overload features in four infants with severe progressive liver failure. *J Appl Genet* **52** : 61-66, 2011
- 6) 村山 圭, 森 雅人, 大竹 明 : ミトコンドリア病 (ミトコンドリア呼吸鎖異常症). *小児科臨床* **63** : 2071-2079, 2010

## Ⅱ. 見落としてはならない重症疾患・対応に迷う疾患

# OTC欠損症

むら やま けい つる おか とも こ  
村 山 圭\*1 鶴 岡 智 子\*1\*2

\*1千葉県こども病院代謝科 \*2同・新生児科

**要旨** 新生児における高アンモニア血症の評価は決して簡単ではなく、注意が必要である。オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症をはじめとする、血中アンモニア値が $1,000 \mu\text{g/dL}$ を超えるような高アンモニア血症は、持続させると予後が重篤になってしまう。このため、速やかな治療の開始と的確な診断が大切である。治療はつねに血液浄化法を念頭におきながら、L-アルギニン、安息香酸ナトリウム、各種ビタミンの投与を適宜開始したい。日頃から血液浄化施設、新生児施設などとの連携について考えておくべきである。

**Key words** 尿素サイクル異常症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTC欠損症)、高アンモニア血症、血中アミノ酸分析、急性期の対応

### はじめに

新生児期に発症する先天性代謝異常症の中にはアミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症など、急激に発症し重篤な症状を呈する疾患が数多く知られている。これらの疾患の臨床症状は、嘔吐、けいれん、意識障害など非特異的なものが多い。さらに、急激な経過をたどり死亡してしまう症例や、糖分の輸液だけで軽快してしまう疾患もあり、最終的にきちんとした診断がされていないことが多いと思われる。先天性代謝異常症を見逃さないためには、first lineの検査として救急外来にて最初に行うべき検査項目をあらかじめ決めておくとよい。

本稿では、オルニチントランスカルバミラーゼ (ornithine transcarbamylase, 以下 OTC と略す) 欠損症の症例を呈示しながら、本症ならびに関連疾患の鑑別・初期対応を中心に述べていきたい。

### 症例呈示

First lineの検査でもっとも重要な検査項目は、血糖、血ガス (血液ガス分析)、血中 $\text{NH}_3$ である。一般的には、血液ガス分析の器械には電解質 (カルシウムイオンを含む)、血糖、さらには乳酸測定オプションがついているものが多く、さらに有益な情報が得られる。代謝緊急症 (metabolic emergency) が少しでも疑われる場合は、これらすべての検査を行いたい。また、OTC欠損症は高アンモニア血症に付随して代謝性アシドーシスをきたすことがよくあるため、代謝性アシドーシスがあるからといって有機酸代謝障害であると思いつ込んではいけない。ここで症例を呈示する。

**症例** 日齢3, 男児。

**主訴** 無呼吸, チアノーゼ, 筋緊張消失。

**家族歴** 特記事項なし。新生児期死亡例なし。母親は頭痛もち。

**現病歴** 在胎41週0日, 3,082 g, Apgar score 1分8点・5分9点, 近医産院にて出生。日齢3に無

呼吸，チアノーゼ，頻脈，筋緊張消失が出現．気管挿管，輸液，メイロン<sup>®</sup>，カルチコール<sup>®</sup>投与などの蘇生処置後，新生児施設に搬送された．

現 症 体温 37.8℃，血圧 52/30 mmHg，心拍 200回/分，呼吸：自発呼吸なく人工呼吸管理，胸腹部：異常所見なし．

緊急血液検査 (NICU入室時) 血液ガス分析：pH 7.059，PCO<sub>2</sub> 78.2 Torr，HCO<sub>3</sub> 21.6 mmol/L，BE - 10.4，アニオンギャップ 24.7，Na 144.3 mEq/L，K 8.05 mEq/L，Cl 98 mEq/L，Ca 0.92 mmol/L，血糖 90 mg/dL，NH<sub>3</sub> > 400 μg/dL，乳酸 121 mg/dL．

その後判明した血液検査 血算：WBC 23,000/μL，Hb 15.8 g/dL，Plt 44.1 × 10<sup>4</sup>/μL．生化学：TP 5.0 g/dL，Alb 2.8 g/dL，AST 139 IU/L，ALT 39 IU/L，LDH 862 IU/L，BUN 5.8 mg/dL，Cre 1.23 mg/dL，CK 1187 IU/L，CRP 0.05 mg/dL，NH<sub>3</sub> 1,936 μg/dL．

経 過 輸液(ブドウ糖の補充)，L-アルギニン静脈内投与 (250 mg/kg 2時間loading，その後同量を24時間投与)，安息香酸ナトリウム (250 mg/kg/日 分3)，レボカルニチン (エルカルチン<sup>®</sup> 100 mg/kg/日 分3) の経腸投与にて初期治療を開始．血中アミノ酸分析，尿中有機酸分析をただちに施行した．L-アルギニンloading後，血中NH<sub>3</sub>は851 μg/dL，K 6.17 mEq/Lと改善あるも，腹膜透析を施行した．これにより状態改善し，後に千葉県こども病院代謝科に転院となった．

診 断 血中アミノ酸分析にて，グルタミン異常高値，シトルリンピークを認めず．この時点でOTC欠損症かカルバミルリン酸合成酵素 (carbamoyl-phosphate synthetase-I，以下CPSIと略す) 欠損症に絞られ，かつ投与するL-アルギニン量が決定した (200～300 mg/dL)．翌日，尿中オロト酸の著明高値が判明し，OTC欠損症と化学診断された．遺伝子検索は状態が改善した後に行い，OTC領域を含むX染色体の欠失を認めた．

## 症例のツボ

本症例は，典型的な代謝危機状態 (metabolic crisis) を呈した症例である．first line検査である程度，疾患を予想し治療を始められるかがポイントとなる．まず緊急検査において，①高アンモニア血症，②混合性アシドーシス，③高カリウム血症，低カルシウム血症，が判明する．この時点では尿素サイクル異常症，有機酸代謝異常症，重症肝機能障害などを念頭におく必要がある．すなわち，各種ビタミン剤の投与 (または投与の準備) を行いたい．続く生化学検査にて判明する「Creが高いにもかかわらずBUNが非常に低い」という所見から尿素サイクル異常症とほぼ確信し，その時点で高アンモニア血症に対する治療を中心に据えたい．そして内科的治療と同時に，血液浄化法を念頭においた準備を行う必要がある．転院が必要であれば，L-アルギニンloading中に手はずを整えたい．

## 高アンモニア血症の原因

高アンモニア血症はさまざまな原因でおこる．新生児期におこる高アンモニア血症は大きく，①尿素サイクル異常症，②有機酸代謝異常症，③重症肝機能障害，④門脈一循環シャント，⑤ミトコンドリア障害，の五つに分類される．重度の高アンモニア血症はおもに，①②において認められることが多い．また，⑤のミトコンドリア障害はprimaryなミトコンドリア呼吸鎖異常症だけではなく，急性脳症・Reye症候群やマクロファージ活性化症候群など二次的ミトコンドリア障害をひき起こす幅広い疾患を包含する．とくに血中NH<sub>3</sub>値1,000 μg/dL以上を呈する高アンモニア血症の場合，初期治療の進めかたによって大きく予後が左右されてしまうため，代謝専門医や血液浄化の専門医など各専門施設との連携が重要となってくる．

## 高アンモニア血症の評価

新生児期の高アンモニア血症を見極めることは、決して簡単なことではないことを肝に銘じるべきである。一般に、新生児の血中NH<sub>3</sub>値は高めである。採血方法に関してZschockeらは、「駆血せずに採取した静脈血（または動脈血）を氷冷保存し、速やかに測定する」と述べている<sup>1)</sup>。また、採血部をしっかりと消毒することも重要である。簡易アンモニア測定装置（アミチェック™）については、読み取り部分が汚れているとNH<sub>3</sub>値の偽性上昇がおこってしまうため、定期的な点検・整備も必要である。われわれの施設に依頼される症例の中にも、分析の結果、実際には高アンモニア血症ではない可能性がきわめて高いものが含まれている。

高アンモニア血症の基準値について表1に示す。代謝性疾患を疑う血中NH<sub>3</sub>値は、新生児では200 μmol/L (339 μg/dL) 以上、乳児期以降では100 μmol/L (169 μg/dL) 以上とされている。一方で、組織中のNH<sub>3</sub>値は血液中より10倍も高いため、NH<sub>3</sub>の偽性上昇はよくおこる。このため、高値を呈する場合はより好条件で採取した良検体で再検することが大切である。

## 高アンモニア血症が判明した後の検査

前述したように、血中NH<sub>3</sub>値や血液ガス分析の結果だけでは、尿素サイクル異常症、有機酸代謝異常症、重症肝機能障害を区別することはできない。たとえば実際の尿素サイクル異常症では、肝機能障害、代謝性アシドーシス、高カリウム血症などをきたすことをよく経験する。これらの鑑別の流れを図に示す<sup>2)3)</sup>。

また、低いBUN値（とくに1桁）は尿素サイクル異常症を疑う重要な指標になる。全身状態が悪いにもかかわらず、BUN値が大して上がらない場合も同様である。

重症肝機能障害については、肝臓の大きさや

表1 高アンモニア血症の基準値 (NH<sub>3</sub>濃度: μmol/L = 0.59 × μg/dL)

新生児	健康	< 110 μmol/L
	一般状態の悪いとき 代謝性疾患の疑い	180 μmol/L まで > 200 μmol/L
乳児期以降	健康	50 ~ 80 μmol/L
	代謝性疾患の疑い	> 100 μmol/L

フェリチン値（ヘモクロマトーシスや血球貪食症候群では上昇する）などを参考にしつつ見極めていく。尿素サイクル異常症や有機酸代謝異常症では、トランスアミナーゼが何千にまで上昇することはほとんどない。門脈-大循環シャントについては、NH<sub>3</sub>もトランスアミナーゼもそれほど上昇しない。

高アンモニア血症の存在が確認されたならば鑑別のため、血清または血漿1 mLと尿5~10 mLおよび濾紙血を確保することが重要である。行うべき検査は緊急度からみた優先順に、①血中アミノ酸分析、②尿中有機酸分析、③尿中アミノ酸分析、④アシルカルニチン分析（タンデムマス・スクリーニング）、である。治療に関連してもっとも急ぐべき検査は①である。とくに、尿素サイクル異常症ではL-アルギニンの投与量を決めるため、後述するように血中アミノ酸分析の結果が必要となるからである。また、有機酸代謝異常症の場合の高アンモニア血症はあくまでも二次的であるので、ビタミンB<sub>12</sub>の投与など各疾患に応じた治療を行いながら高アンモニア血症への対応をすべきである。①でシトルリン値が低い場合は④の尿中オロト酸分析が必要となるが、CPSI欠損症でもOTC欠損症でも治療に変更はないので、それほど急は要しない。

各施設で行える検査の内容については日本先天代謝異常学会ホームページ (<http://square.umin.ac.jp/JSIMD/JSIMDsenmonshisetu.html>) に記載されているので参照していただきたい。