

201231070A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Menkes 病・occipital horn 症候群の実態調査、 早期診断基準確立、治療法開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25(2013)年3月31日

研究代表者 児玉浩子

目 次

I. 総括研究報告	
Menkes病・occipital horn症候群の実態調査、早期診断基準確立、治療法開発に関する研究	1
児玉浩子（帝京大学医学部小児科）	
II. 分担研究報告及び研究成果発表	
1. micro PETを用いたメンケス病モデルマウスにおける銅キレート剤の効果に関する研究	6
新宅治夫（大阪市立大学大学院医学研究科・発達小児医学）	
2. 早期新生児期の尿 HVA/VMA 比の基準値の検討	10
八木麻理子（神戸大学大学院医学研究科・小児科学）	
3. Congenital abnormalities in Japanese patients with Menkes disease	14
Yan-Hong Gu (Department of Health Policy, National Research Institute for Child Health and Development)	
III. 平成 24 年度活動報告	
1. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) Annual Symposium 2012 (2012.9.4-7, Birmingham, UK)	18
2. The American Society of Human Genetics 62th Annual Meeting 2012 (2012.11.6-10, San Francisco, USA)	28
3. 第 54 回日本小児神経学会総会 (2012.5.17-19, 札幌)	29
4. 平成 24 年度「厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業」公開シンポジウム 「難病・希少疾患を理解し克服する」 【テーマ】難病・希少疾患の理解と克服	30
(2013.2.11, 帝京大学医学部, 東京)	
5. 平成 25 年度第一回メンケス病家族会(関西支部)	64
(2013.4.28, 大阪市立大学医学部, 大阪)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	66

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）

総括研究報告書

**Menkes 病・Occipital horn 症候群の実態調査、早期診断基準確立、
治療法開発に関する研究**

児玉 浩子（帝京大学医学部小児科・客員教授）

研究要旨

Menkes病およびoccipital horn症候群はATP7A遺伝子異常症であるが、発症頻度は不明で、有効な治療法がない難治性疾患であった。私達は、平成22年度の研究でMenkes病の発症頻度は男子出生100万人に約8人で、女子例が2例見られた。Occipital horn症候群の発症頻度は男子出生の約68万人に1人であることを明らかにした。平成23年には詳細な二次調査を行い、神経症状発症前の特徴を明らかにし、早期診断ポイントを明らかにした。また、銅の皮下注射とノックピン経口投与の併用療法である新規治療の検討では、モデルマウスの研究で銅の代謝動態への効果を明らかにした。さらに、7例のMenkes病患者、1例のoccipital horn症候群で新規治療を開始した。最終年度である今年度は、モデルマウスの長期治療の検討と新規治療を開始しているMenkes病およびoccipital horn症候群の治療効果・副作用を検討した。脱落者はいなかった。さらに、“Menkes病およびoccipital horn症候群の早期診断基準および治療のガイドライン”案を作成し、日本小児神経学会承認の手続きを行う予定である。両疾患のホームページを更新し、これらの成果を社会に発信した。さらに、患者家族会と定期的に交流し、患者家族の不安や悩みに対して支援した。

研究分担者：小川 英伸 帝京大学医学部小児科・准教授

研究分担者：新宅 治夫 大阪市立大学大学院医学研究科小児科・教授

研究分担者：清水 教一 東邦大学小児科・准教授

研究分担者：黒澤 健司 地方独立行政法人神奈川県立病院機構・神奈川県立こども医療センター 遺伝科・部長

研究分担者：顧 艶紅 独立行政法人・国立成育医療研究センター研究所・上級研究員

研究分担者：八木 麻理子 神戸大学大学院医学研究科・助教

A. 研究目的

本年度の研究目的：今までの研究成果を踏まえて下記の目的で研究は進めた。 ①遺伝子型と表現型の関係をさらに解析する。

②神経症状発症前の特徴を解析し、早期診断法を確立する。

③Menkes 病モデルマウスである macular マウスで、併用療法の長期治療効果を判定する。

④両患者での新規治療の治療効果と副作用を明らかにする。

⑤公開講座やホームページで、両疾患の理解および本研究の成果を世間に周知させる。

B. 研究方法

1. 早期診断のための症状の把握

患者を診療した経験のある主治医には、2次アンケートとして、詳細な病歴を調査した。特に神経症状発症前の臨床的特徴なども詳細に調査した。その際に遺伝子診断が可能であること、Menkes 病友の会の存在なども通知した。さらに、全国アンケート調査の2次調査で、出生時の体重、身長、頭囲を正常児と比較した。また、小奇形の有無を調査した。

得られた知見について随時メンケス病・オクチピタルホーン症候群のホームページ等で公表した。

(<http://www.pediatric-world.com/menkes/index.html>)

2. 遺伝子型と表現型の関連の解析

新たに遺伝子解析を希望する当該疾患患者で、文書での同意を得た後に、ATP7A 遺伝子のゲノム解析を行い、遺伝子変異を同定した。今までの遺伝子解析結果と臨床症状の関連を解析した。

3. 新規治療法（ジスルフィラム経口投与とヒスチジン銅皮下注射の併用療法）の効

果の検討

①Macular マウスを用いての新时期治療の効果の解析

モデルマウスを用いて、ノックピン経口投与と銅注射の併用療法を長期間（2 か月以上）行い、個体としての活動性・体重増加などを評価した。さらに、解剖し、各臓器の銅濃度、銅酵素活性などを検討した。銅濃度および銅酵素活性測定はすでに習熟している。同時に各臓器の組織学的検討、肝機能や腎機能を解析し、副作用の有無を明らかにした。

②患者への新規治療効果の評価

文書で同意が得られた7例の Menkes 病患者および1例の occipital horn 症候群患者で、治療効果と副作用の有無を経時的に検討した。すでに確立している治療効果評価法（骨密度、尿 VMA/HVA、尿デオキシピリジノリン値、血液・尿カテコラミン分画、頭部 MRS など）および全身状態や神経学的所見で治療効果を明らかにするとともに副作用の有無を詳細に検討した。

（倫理面への配慮）

モデルマウスを用いた Menkes 病治療法開発の研究は、帝京大学動物実験倫理委員会の承認をすでに得ている（番号；帝医動07-035）。また、実験を担当する藤澤千恵は獣医で獣医博士を取得しており、実験動物に対する動物愛護に関しても十分に配慮し、実験を行った。

Menkes 病および occipital horn 症候群患者の遺伝子解析および生化学的診断も、帝京大学医学部倫理委員会の承認をすでに得ている（2007年、帝京医倫認証済み）。

Menkes病患者でノックピン経口投与と銅皮下注射の併用療法に関しても、帝京大学医学部倫理委員会の承認をすでに得ている（帝京医倫08-114）。口頭で詳細に説明し、文書で同意を得たのちに、治療を開始した。

遺伝子解析および治療を希望する患者家族には上記倫理委員会承認内容に準じて対応する。また、遺伝カウンセリング有資格者である共同研究者（黒沢健司医師）が必要に応じて遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

1. 早期診断のための方策

在胎週数に対する出生時の体重、身長、頭囲は対象児と差がなかったが、65例のMenkes病患者の26.6%は小奇形を合併しており、これは全国の先天奇形の発症率である1.9%より有意に高かった。主な小奇形は、高口蓋、小頭症、脳または肺のう胞、房室ブロック、眼裂狭小、停留睾丸であった。これら奇形を合併する児では本症を疑う必要があると考えられた。

2. 遺伝子型—表現型の関連の解明

今までの解析も含めて60例のMenkes病患者および2例のoccipital horn症候群患者の遺伝子解析を行った。occipital horn症候群はsplice-site変異とmissense変異であることを明らかにした。Splice-site変異はリアルタイムRT-PCRで残存活性が存在することが確認された。遺伝子解析結果は遺伝カウンセリングを行い、患者家族に報告した。

3. 新規治療法（ノックピン経口投与とヒスチジン銅皮下注射）の確立

①モデルマウスを用いた新規治療の長期的効果および副作用の解明

体重増加は併用療法群で対象群に比べて有意に増加していた（平均体重増加：併用療法群 $20.33 \pm 0.34\text{g}$ 、対照群 $18.64 \pm 0.49\text{g}$ ）。小脳および血清の銅濃度、小脳チトクロームCオキシダーゼ活性は併用療法群で対象群に比べて有意に改善を示した。短期併用療法群の血算、肝機能、腎機能および血液一般生化学検査に異常は認められなかったが、長期併用療法群の一部で肝機能異常が認められた。今後の課題と考えられた。

②モデルマウスでの新規治療での銅の脳への取り込みと保持の研究

マクマウスでの ^{64}Cu を用いたmicroPETの実験では、ノックピン投与マクマウスでは、Cuの脳への取り込みが、ノックピンを投与していないコントロールマクマウスに比べて、有意に多かった。さらにCuが長時間脳に保持された。すなわち、ノックピン併用で、銅の脳への移行・保持が、画像検査においても証明することが出来た。

③患者への新規治療の実施

治療を開始した患者は全例治療を継続することが出来、脱落例はいなかった。7名のMenkes病患者（3歳～15歳）でヒスチジン銅皮下注射とノックピン経口投与の併用療法の効果と副作用を検討した。6例は男児、1例は女児であった。7例ともヒスチジン銅の皮下注射をすでに行っている患者であった。ヒスチ

ジン銅は原則今までの投与量で行った。ノックピンは 30mg/日から開始し、徐々に増量し、約 10mg/kg/日で現在経過を観察している。反応は症例により異なった。血清銅およびセルロプラスミン値がノックピン併用により上昇し、ヒスチジン銅を減量できた症例も見られたが、ノックピン併用でこれらの血清値に変化がない症例もあった。しかし、活動性、神経発達、骨密度などが有意に改善した例もあり、治療効果の症例による相違の理由を明らかにすることが今後の課題と考えられた。

これらの成果を学術英文論文として投稿し、受理された。

4. 広報活動：

①公開シンポジウムを本年度も平成25年2月11日に帝京大学で開催した。今回は、従来の関係者（主治医、患者家族など）に加えて、帝京大学薬学部の薬物送達学研究室、創薬化学・有機化学研究室などの研究者も参加し、新規治療方法の評価を重点的に行った。Menkes病患者家族会代表の方にも講演していただき、患者家族の抱えている問題点や医療関係者への要望を聞くことが出来た。さらに患者家族と話し合う場を設け、お互いの情報交換を行った。

②メンケス病家族会との会合を平成25年4月28日に大阪市立大学で開催した。患者家族会の今後の活動に関して支援した。

D. 考察

発症前の詳細な症状が明らかになり、早期診断法を確立することができた。早期診断法のガイドラインを日本小児神経学会で承

認してもらい予定である。今後は、初期に認められる症状で早期診断が可能であることを小児科医・産科医に周知させる必要があると思われる。

私たちが提案したヒスチジン銅皮下注射とノックピン経口投与の併用療法はモデルマウスでは、体重増加、血清銅・脳内銅値の上昇、脳のチトクロームCオキシダーゼ活性の改善、カテコラミン代謝の改善が認められ、有効な治療と考えられた。これらの結果は、銅が脳血液関門を通過して神経細胞に輸送され、銅酵素であるチトクロームCオキシダーゼに利用されていることを示唆している。すなわち、当初に期待した効果が見られていると言える。しかし、長期治療で一部に肝機能異常が出現した。これについては、今後さらに検討する必要がある。

患者での新規治療の研究成果では、血清銅およびセルロプラスミン値がノックピン併用により上昇し、ヒスチジン銅を減量できた症例も見られたが、ノックピン併用でこれらの血清値に変化がない症例もあった。しかし、活動性、神経発達、骨密度などが有意に改善した例もあり、治療効果の症例による相違の理由を明らかにすることが今後の課題と考えられた。

E. 結論

神経症状発症前の特徴を明らかにし、早期診断ポイントを明らかにした。

新規治療として私たちが提案した銅皮下注射とノックピン経口投与の併用療法のモデルマウスでの研究では、銅の代謝動態は改善した。7例の Menkes 病患者、1例の occipital horn 症候群での新規治療効果は

症例により異なった。治療効果の症例による相違の理由を明らかにすることが今後の課題と考えられた。

また、Menkes 病および occipital horn 症候群の診療指針を日本小児神経学会に提案し、承認される準備を行っている。

詳細は、本研究事業で立ち上げた両疾患のホームページに掲載している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

本報告書の p14-29, p66-68 に掲載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究課題：「micro PETを用いたメンケス病モデルマウスにおける銅キレート剤の効果に関する研究」

分担研究者

新宅 治夫（大阪市立大学医学部小児科・教授）

研究要旨

我々は小動物用 PET (microPET) イメージングによるメンケス病モデルマウスを用いた新規治療法の開発と評価を行った。正常マウスとして C3H/He マウスを、メンケス病モデルマウスとしてマクラマウスを用いた。銅キレート剤の腹腔内投与 30 分後に $^{64}\text{CuCl}_2$ を静注し、全身 PET 撮像を 4 時間行った。正常マウスと比較し、メンケス病モデルマウスの脳および肝臓への銅集積は少なく腎臓での著明な銅集積を認めた。ジスルフィラムはメンケス病モデルマウスの脳および肝臓での銅集積を増加し、腎臓での銅集積を減少させた。D-ペニシラミンはメンケス病モデルマウスの尿中への銅排泄を促進し、脳・肝臓・腎臓での銅集積を減少させた。メンケス病では、脳での銅欠乏・腎臓での銅蓄積など全身臓器での銅分布異常が存在し、ジスルフィラムはメンケス病における銅分布異常を改善すると考えられた。メンケス病におけるマススクリーニングが期待されており、同時にメンケス病の新規治療法の確立は重要である。PET イメージングは、メンケス病の病態生理を理解し新規治療法を開発・評価する上で有用であった。

分担研究者

新宅 治夫（大阪市立大学小児科・教授）

研究協力者

武田 泰輔（大阪市立大学小児科・大学院）

野村 志保（大阪市立大学小児科・大学院）

二宮 英二（大阪市立大学小児科・大学院）

若原 良平（大阪市立大学小児科・病院講師）

藤岡 弘季（大阪市立大学小児科・非常勤講師）

野崎 聡（理化学研究所・研究員）

和田 康弘（理化学研究所・研究員）

渡辺 恭良（理化学研究所・チームリーダー）

C3H/He マウス及びメンケス病モデルマウスであるマクラマウス（帝京大学から供与）を使用した。①C3H/He マウス、キレート剤投与あり②C3H/He マウス、キレート剤投与なし③マクラマウス、キレート剤あり④マクラマウス、キレート剤投与なしの 4 群にマウスを分け、①と③ではキレート剤腹腔内投与 30 分後に $^{64}\text{CuCl}_2$ を尾静脈から投与した。②と④では $^{64}\text{CuCl}_2$ のみを投与した。 $^{64}\text{CuCl}_2$ 投与直後から 4 時間連続、および 24 時間後から 1 時間 microPET (Focus220, Siemens, USA) にて撮像した。銅キレート剤は脂溶性のジスルフィラムと水溶性の D-ペニシラミンの 2 種類を用いてそれぞれ単独投与と両者併用投与についてそれぞれ検討した。撮影終了後に解剖し、脳・腎臓をスライスして、imaging plate にて *in vitro* でも解析した。

A. 研究目的

メンケス病に対する 2 種類の銅キレート剤（脂溶性；ジスルフィラム、水溶性；D-ペニシラミン）が銅の体内分布に与える影響について調べた。microPET というモダリティを用いることで、画的にかつ、銅の体内動態について解析した。

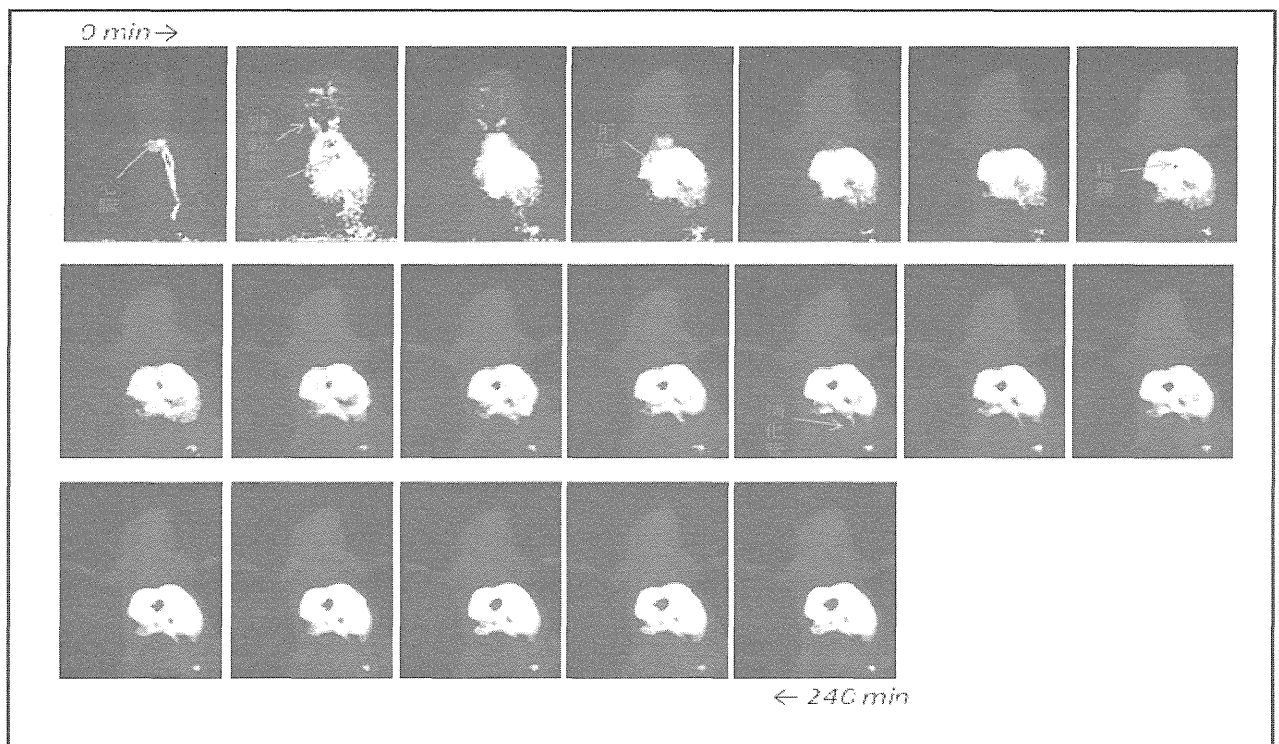
B. 研究方法

C. 研究結果

投与された $^{64}\text{CuCl}_2$ は尾静脈から静脈系を介して、心臓へ入り、その後心臓から全身に駆出され

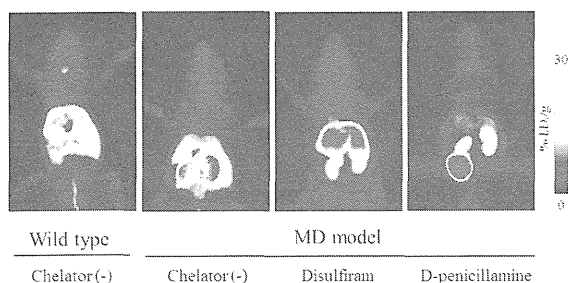
た。その後ほとんどの銅は肝臓へ蓄積し、一部は胆汁への排泄がみられた (図)。脳での $^{64}\text{CuCl}_2$ 取

りおよび肝臓での銅集積を増加し、腎臓での銅集積を減少させた。D-ペニシラミンはマクラマウスの尿



り込みは直後から上昇しはじめて、24 時間もまだわずかに増加していた。脳内での銅取り込みの解析では、④群ではマウス脳でほとんど取り込みがみられず、②群では一定の取り込みが認められ、脳室内に多くみられた。①群と③群では著明に $^{64}\text{CuCl}_2$ 取り込みが同程度に増加していた。In vitroでの解析でも同様な結果が得られた。

Coronal section of the whole-body PET image 4 hours after $^{64}\text{CuCl}_2$ injection



正常マウスと比較し、マクラマウスの脳および肝臓への銅集積は少なく腎臓での著明な銅集積を認めた。ジスルフィラムはマクラマウスの脳お

中への銅排泄を促進し、脳・肝臓・腎臓での銅集積を減少させた。

D. 考察

メンケス病では脳での銅欠乏・腎臓での銅蓄積など全身臓器での銅分布異常が存在し、microPET という新しいモダリティを用いた実験でメンケス病に対する銅・キレート剤併用療法の効果を確認した。ATP 7A の機能にかかわらず、ジスルフィラムは脳の銅取り込みを改善すると共に腎臓への蓄積も改善すると考えられた。また D-ペニシラミンはマクラマウスの尿中への銅排泄を促進し、脳・肝臓・腎臓での銅集積を減少させると考えられた。さらに両キレート剤の併用療法は銅の脳への移行と腎からの排泄を相殺すること無く有効に作用することが明らかとなった。

E. 結論

メンケス病におけるマススクリーニングが期待されており、同時にメンケス病の新規治療法の確立は重要である。PET イメージングは、メンケ

ス病の病態生理を理解し新規治療法を開発・評価する上で有用であった。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 新宅治夫：メンケス病、大関武彦、他編、今日の小児治療指針、第15巻、pp. 216、2012年2月15日

2. 学会発表

1) Hiroki Fujioka, Taisuke Takeda, Shiho Nomura, Eiichi Ninomiya, Chie Fujisawa, Hiroko Kodama, Haruo Shintaku: Effect of disulfiram on mental status with a patient of Menkes Disease. the 2010 SSIEM Annual Symposium Istanbul, 2010. 8. 31-9. 3

2) Haruo Shintaku, Development of dopanime neurons and serotonin neurons in an aspect of neurobiochemistry. 11th International Child Neurology Conference, Cairo, 2010. 5. 2-7

3) 武田泰輔, 野村志保, 二宮英一, 藤岡弘季, 野崎聡, 和田康弘, 渡辺恭良, 新宅治夫：microPET imagingによるヒスチジン銅、ジスルフィラム併用療法の効果検討、第55回日本未熟児新生児学会、神戸、2010. 11. 5-7

4) 武田泰輔, 野村志保, 二宮英一, 藤岡弘季, 野崎聡, 和田康弘, 渡辺恭良, 新宅治夫：microPET imagingによるヒスチジン銅、ジスルフィラム併用療法の効果検討、第114回日本小児科学会、東京、2011. 8. 11-13

5) 二宮 英一, 武田 泰輔, 野村 志保, 藤岡 弘季, 齊藤 三佳, 野崎 聡, 和田 康弘, 渡辺 恭良, 新宅 治夫：microPET imagingによるMenkes病モデルマウスをもちいたヒスチジン銅、ジスルフィラム併用療法の効果検討、第

56回日本未熟児新生児学会、東京、2011. 11. 13-15

- 6) 武田泰輔, 藤岡弘季, 野村志保, 二宮英一, 野崎聡, 和田康弘, 渡辺恭良, 新宅治夫：microPET imagingによるメンケス病モデルマウスをもちいたヒスチジン銅、ジスルフィラム併用療法の効果検討、第53回日本先天代謝異常学会、幕張、2011. 11. 24-26
- 7) 野村志保, 野崎聡, 武田泰輔, 二宮英一, 濱崎考史, 藤岡弘季, 林中恵美, 和田康弘, 藤澤千恵, 児玉浩子, 渡辺恭良, 新宅治夫：小動物用PETを用いたメンケス病モデルマウスでの銅キレート剤投与効果に関する研究, 第115回日本小児科学会、福岡 2012. 4. 20-22
- 8) Taisuke TAKEDA, Shiho Nomura, Eiichi Ninomiya, Chie Fujisawa, Hiroko Kodama, Haruo Shintaku : The effects of disulfiram in mouse model of Menkes disease, Joint 12th ICNC and 11th AOCCN, Brisbane, Australia, 2012. 5. 27-6. 1
- 9) Shiho NOMURA, Satoshi NOZAKI, Taisuke TAKEDA, Eiichi NINOMIYA, Satoshi KUDO¹ Takashi Hamazaki, Hiroki FUJIOKA¹, Emi HAYASHINAKA³, Yasuhiro WADA, Chie FUJISAWA, Hiroko KODAMA, Yasuyoshi WATANABE, Haruo SHINTAKU : Effects of chelators on copper biodistribution in Menkes disease model mice by using microPET, SSIEM 2012, Birmingham, 2012. 9. 3-7
- 10) Shiho NOMURA, Satoshi NOZAKI, Taisuke TAKEDA, Eiichi NINOMIYA, Satoshi KUDO¹ Takashi Hamazaki, Hiroki FUJIOKA¹, Emi HAYASHINAKA³, Yasuhiro WADA, Chie FUJISAWA, Hiroko KODAMA, Yasuyoshi WATANABE, Haruo SHINTAKU : MicroPET imaging is useful to evaluate the effect of disulfiram on copper biodistribution in the kidney of Menkes disease model mice. (Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging) SNMMI 2013,

Vancouver, 2013. 6. 8-12

- 11) 野村志保, 武田泰輔, 二宮英一, 藤岡弘季,
野崎聡, 和田康弘, 廣木伴子, 藤澤千恵, 児
玉浩子, 渡辺恭良, 新宅治夫: 小動物用PET
イメージングによるメンケス病モデルマウス

を用いた新規治療法の開発と評価、第49回日
本周産期新生児医学会、横浜、2013. 7. 14-16

- H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

研究課題：「早期新生児期の尿HVA/VMA比の基準値の検討」

分担研究者

八木 麻理子（神戸大学大学院医学研究科小児科学、助教）

研究要旨

Menkes 病に対する銅補充療法は、生後早期に開始することにより中枢神経障害を予防、あるいは軽減できるとされており、早期診断・早期治療は重要だが、新生児期のスクリーニング方法は確立されていない。Menkes 病では、銅酵素である dopamine- β -hydroxylase (DBH) の活性が低下する結果、尿 HVA/VMA 比が上昇しており、これを利用してスクリーニングが可能 (cutoff 値:4) であること報告されている。本研究では、早期新生児期の Menkes 病のスクリーニング方法として尿 HVA/VMA 比を利用するために、在胎 32 週～41 週で出生した Menkes 病非罹患児 112 例を対象として、早期新生児期の尿 HVA/VMA 比の基準値を検討した。尿 HVA/VMA 比が 4 を超える危険因子として、人工換気療法 (odds ratio ; 21.94、CI; 2.82-247.03; p=0.004) が明らかになった。人工換気療法を施行されなかった 92 名における尿 HVA/VMA 比は、 2.47 ± 0.67 (0.73-4.34) であり、cutoff 値を超えたのは 2 例 (2.2%) であった。尿 HVA/VMA 比は、早期新生児期においても Menkes 病のスクリーニングのために利用できる可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

Menkes 病患者に対する銅補充療法は、生後 2 か月以内に開始することにより中枢神経障害を予防あるいは軽症化できる場合があることから、早期診断および早期治療は非常に重要である。しかし、新生児期には Menkes 病の特異所見は乏しく、母体由来の銅が欠乏する生後 2～3 か月以降に難治性けいれんや発達の遅れなどの神経学的所見が顕在化した後、診断に至る例が多い。Menkes 病では、銅酵素である dopamine- β -hydroxylase (DBH) の活性が低下し dopamine から norepinephrine への水酸化が障害された結果、それぞれの代謝産物である homovanillic acid (HVA) が上昇、vanillylmandelic acid (VMA) が低下する。このことを利用して、月齢 6 の乳児 (n=21, 554) と比較すると Menkes 病症例では尿 HVA/VMA 比が高値 (cutoff 値: 4) を示すことが報告されている。しかし、健常新生児の尿 HVA/VMA 比のデータ

はなく、新生児期の Menkes 病のスクリーニングへの尿 HVA/VMA 比の応用の可否は不明である。そこで本研究は、早期新生児期の尿 HVA/VMA 比の基準値を検討することを目的として本研究を実施した。

B. 研究方法

(1) 対象

対象は、2011 年 11 月～2012 年 11 月に神戸大学医学部附属病院 NICU に入院した、在胎 32～41 週にて出生した新生児で、日齢 6 までに採尿できた 112 例である。診療録より、出生体重、性別、アプガースコア (1 分値/5 分値)、人工換気療法の有無、黄疸の有無、採尿時の投与薬剤等についての臨床情報を得た。尚、本研究は神戸大学医学倫理委員会の承認を得、保護者より書面による同意を得て行った。

(2) HVA、VMA の測定

尿 HVA、尿 VMA の測定は、high performance liquid chromatography (HPLC) 法にて行った。

(3) 統計処理

尿 HVA/VMA の値によって 2 群に分類し、比較検討した。単変量解析は、t 検定あるいは Cochran-Cox 検定にて行った。多変量解析はロジスティック回帰分析にて行った。それぞれ $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判断した。

C. 研究結果

(1) 尿 HVA、VMA、HVA/VMA 比

112 例の尿 HVA 濃度は、 $26.48 \pm 43.69 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$ ($5.08\text{--}330.65 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$) であった。112 例中 6 例が著明高値を示した。尿 VMA 濃度は、 $7.33 \pm 2.72 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$ ($3.9\text{--}23.7 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$) であった (Figure 1)。

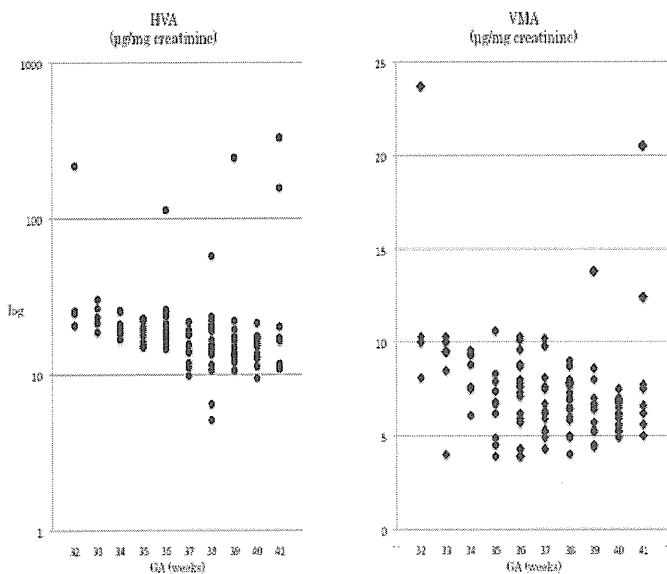


Figure 1. 尿HVA、および、尿VMAの在胎週数別分布 (n=112)

尿 HVA/VMA 比は、 3.31 ± 3.79 ($0.73\text{--}29.10$) であった (Figure 2)。尿 HVA、VMA、HVA/VMA 比のいずれも在胎週数との有意な関連は認められなかった。

HVA/VMA ratio

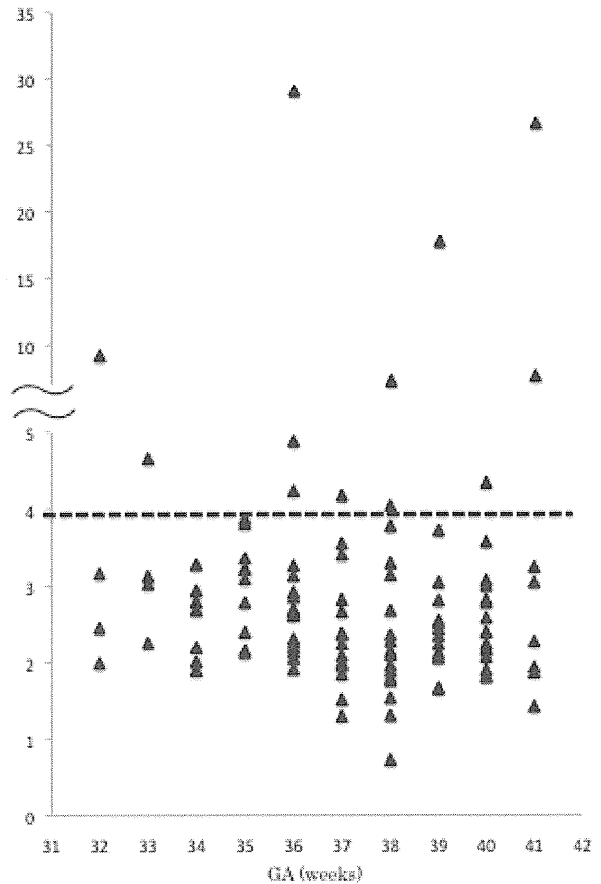


Figure 2. 尿HVA/VMA比の在胎週数別分布 (n=112)

(2) 尿 HVA/VMA 比高値群と低値群の比較

Menkes 病スクリーニングのための cutoff 値として報告されている、尿 HVA/VMA 比=4 を超える群を尿 HVA/VMA 比高値群 (n=12)、4 以下の群を尿 HVA/VMA 比低値群 (n=100) として 2 群の比較検討を行った。単変量解析の結果、尿 HVA/VMA 比高値群でアプガースコア 1 分値・5 分値が有意に低く、採尿時に経腸栄養を開始されていた割合も有意に少なかつ

Table 1. 尿HVA/VMA比高値 (>4.0) 群と低値 (≤4.0) 群の比較

	HVA/VMA ratio > 4.0 (n=12)	HVA/VMA ratio ≤ 4.0 (n=100)	p value
	mean ± SD or n	mean ± SD or n	
gestational age (weeks)	37.3 ± 2.9	37.2 ± 2.4	NS
birth weight (g)	2529 ± 534	2649 ± 528	NS
male/female	9 / 3	64 / 36	NS
age at enrollment (day)	4.0 ± 0	4.0 ± 0.60	NS
Apgar score 1 min	6.17 ± 2.52	7.89 ± 1.48	<0.05
Apgar score 5 min	7.67 ± 1.78	8.96 ± 0.89	<0.05
jaundice (yes/no)	2 / 10	34 / 66	NS
ventilation (yes/no)	10 / 2	10 / 90	<0.01
administration of dopamine (yes/no)	6 / 6	0 / 100	<0.01
administration of other drugs (yes/no)	8 / 4	10 / 90	<0.01
feeding at enrollment (yes/no)	6 / 6	96 / 4	<0.05

た。一方、人工換気療法、dopamine あるいはその他の薬物投与の割合は、尿 HVA/VMA 比高値群で有意に高かった (Table 1)。

さらに、単変量解析にて危険率 5%未満であった因子について多変量解析を行った。その結果、人工換気療法が尿 HVA/VMA 比を上昇させる独立した危険因子であることが明らかになった (odds ratio ; 21.94、CI; 2.82-247.03 ; p=0.004) (Table 2)。

Table 2. 新生児期早期に尿HVA/VMA比を上昇させる危険因子

variables	Odds ratio	95%CI	p value
Apgar score 1 min	1.09	0.31-1.85	0.841
Apgar score 5 min	0.55	0.49-7.92	0.336
ventilation (yes)	21.94	2.82-247.03	0.004
administration of dopamine (yes)	35.06×10 ⁴	0.40-∞	0.996
administration of other drugs (yes)	3.63	0.34-32.28	0.248
feeding at enrollment (no)	0.74	0.03-10.71	0.836

(3) 人工換気未実施例 (n=92) における尿 HVA/VMA 比

尿 HVA/VMA 比が 4 を超える危険因子である人工換気を行わなかった 92 例のみを対象として検討した結果、尿 HVA/VMA 比は、 2.47 ± 0.67 (0.73-4.34) であった。尿 HVA/VMA 比が 4 を越えたのは、92 例中 2 例 (2.2%) (4.17、4.34) であった。

D. 考察

Menkes 病では銅補充療法を生後 2 か月以内に開始することにより、その中枢神経障害を予防あるいは軽症化できるとされており、早期診断が非常に重要だが、新生児期のスクリーニング方法は確立されていない。Matsuo らは 15 例の Menkes 病患者 (4-171 か月) と 21,554 例の 6 か月乳児の尿 HVA/VMA 比を比較し、Menkes 病患者では尿 HVA/VMA 比が上昇していること、cutoff 値を 4 とすることでスクリーニングが可能であることを報告した (Matsuo, et al. *J Inherit Metab Dis.* (2005))。本研究では、尿 HVA/VMA 比を早期新生児期の Menkes 病スクリーニングに応用するために、健常新生児における尿 HVA/VMA 比の基準値を検討した。在胎 32 週以上 42 週未満の早期新生児 112 例を対

象に検討した結果、人工換気療法の実施が有意に尿 HVA/VMA 比をさせることが明らかになった。単変量解析では、アプガースコア (1 分値、5 分値) 低値、カテコラミン投与、カテコラミン以外の薬剤投与、経腸栄養未開始が尿 HVA/VMA 比の上昇に対する危険因子であったことも考慮すると、生後急性期の病態が尿 HVA/VMA 比の上昇に影響を及ぼすことが考えられた。早期新生児期の尿 HVA/VMA 比を Menkes 病のスクリーニングに用いる場合は、出生直後の人工換気を要するような重篤な状態を脱し、安定した時期に採取した尿検体を用いて測定し評価する必要があると考えられた。

尿 HVA/VMA 比を上昇させる危険因子である人工換気療法を実施していない 92 例について検討した結果、尿 HVA/VMA 比は 2.47 ± 0.67 であり、cutoff 値として報告されている 4 を越えたのは 2 例 (2.2%) のみであった。早期新生児期においても、尿 HVA/VMA 比を Menkes 病のスクリーニングに用いることが可能であることが示唆された。

E. 結論

早期新生児期においても、尿 HVA/VMA 比を Menkes 病のスクリーニングに応用することが可能だが、出生直後の急性期を脱し、ある程度安定した時期に採取した尿検体を使用する必要がある。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定

2. 学会発表

1. 八木麻理子、李知子、栗野宏之、森岡一朗、児玉浩子、竹島泰弘、家族歴に Menkes 病を認める新生児 3 例の臨床像の検討. 第 54 回日本小児神経学会総会. 2012 年 5 月 17 日-19 日、札幌.
2. Mariko Yagi, Noriko Kusunoki, Tomoko Lee, Hiroyuki Awano, Tomoyuki Yokota, Akihiro

Miwa, Akio Shibata, Ichiro Morioka, Yasuhiro
Takeshima, Kazumoto Iijima. Standard value
of urine HVA/VMA ratio in the early neonatal
period to screen for Menkes disease.
American Society of Human Genetics 2012
Annual Meeting、2012年11月6日-10日、San
Francisco.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Original article

Congenital abnormalities in Japanese patients with Menkes disease [☆]

Yan-Hong Gu ^{a,*}, Hiroko Kodama ^b, Tadaaki Kato ^a

^a Department of Health Policy, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

^b Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Received 19 July 2011; received in revised form 26 January 2012; accepted 27 January 2012

Abstract

Menkes disease (MNK) is an X-linked recessive disorder. Incidence of live-born infants with MNK is 2.8 per million live births in Japan. The aim of this study was to observe congenital malformations (CMs) in MNK patients. Subjects comprised 35 Japanese male patients with classical MNK who received copper histidine treatment. Patient clinical data were obtained anonymously from medical records or medical record summaries by pediatrician's retrospective review through a survey. We observed 21 different CMs in 14 patients. Eight of these had a single CM, while six had multiple CMs. The most frequent CM was higher arched palate with other CMs found in five patients. There was no relationship between CMs and mutations in the *ATP7A* gene. Using Mann–Whitney *U* tests, age at death was also significantly lower in MNK patients with CMs ($P < 0.05$), compared to those without CMs, even though there was no significant difference of age onset, age at diagnosis and age at start of treatment with copper histidine between both groups of patients. Sudden death occurred in three MNK patients with CMs only: two with congenital heart disease, and one with microphallus.

© 2012 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Copper; Inherited metabolic disease; Menkes disease; Congenital malformations; Japanese

1. Introduction

Menkes disease (MNK, #OMIM 309400) is an X-linked recessive disorder. The combined frequency of live-born MNK patients in Denmark, France, the Netherlands, the United Kingdom, and West Germany

was 1 per 298,000 live-born babies in the period 1976–1987 [1]. Incidence of live-born infants with MNK is 2.8 per million live births from 1990 to 2003 in Japan [2]. In Japan, three to four individuals with MNK are born every year [2]. Onset of MNK occurs within three months of birth in 52.2%, and within 4–9 months after birth in 47.8% of patients with MNK [2]. While most classical MNK patients die by the age of three years, some survive until their teens with continued treatment [3]. The gene responsible for MNK is *ATP7A* (GenBank L06133.1), which is located at chromosome Xq13.3 and encodes a copper-transporting ATPase (*ATP7A*) [4–6]. Mutations in the *ATP7A* gene or other abnormalities in the genome or chromosomes associated with the *ATP7A* gene were found in most, but not all MNK patients [7–11]. In affected cells, copper transport by *ATP7A* from the cytosol to the Golgi apparatus is

Abbreviations: MNK, Menkes disease; CMs, congenital malformations

[☆] This study was supported by the Japan Foundation for Pediatric Research 2009, the Mother and Child Health Foundation of Japan, and Specified Disease Treatment Research Program of Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H23/nanchi/ippan/091).

* Corresponding author. Address: Department of Health Policy, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan. Tel.: +81 3 3416 0181x4271; fax: +81 3 3417 2694.

E-mail address: gyh@nch.go.jp (Y.-H. Gu).

disturbed, resulting in a reduction of copper efflux, and consequent reduction of activities of copper-dependent enzymes. This can lead to neurological symptoms, hair changes and abnormalities of connective tissue including arterial tortuosity, bladder diverticula, gastrointestinal polyps and abnormalities of bone. As orally-administered copper cannot be absorbed due to ATP7A dysfunction and accumulates in the intestine, a copper deficiency in various tissues arises. Subcutaneous injections of copper–histidine complex, the currently accepted mode of treatment, may prevent neurological degeneration in some patients when treatment is initiated soon after birth and prolong lifespan of patients [3]. However, the current treatment does not help to alleviate connective tissue disorders caused by low activity of a copper enzyme – lysyl oxidase.

To date, congenital malformations (CMs) in MNK patients have not been reported details. In OMIM (<http://omim.org/entry/309400>) head and neck of MNK patients were described as microcephaly, brachycephaly, Wormian bone and pudgy cheeks. The present study analyzed CMs in MNK patients, which were considered to be unassociated with complications caused by reduced activity of copper enzymes, such as lysyl oxidase under current knowledge, and observed the relationship between CMs and the genetic mutation. We compared lifespan of treated MNK patients with and without CMs.

2. Methods

2.1. Subjects

A total of 35 Japanese MNK patients were investigated in the study. These patients were referred to the Department of Pediatrics of Teikyo University School of Medicine from 18 prefectures for counseling, copper histidine treatment, and biochemical and/or molecular pre- and post-natal diagnosis of MNK during 1990–2009 [7–10,12–15]. These patients were treated for classical MNK, which was diagnosed by clinical examination, measurement of the copper concentrations in cultured cells, and/or genetic mutation as previously reported [7–10,12–15]. Genetic analysis performed in the 5'-upstream region, each of the 23 exons, and the adjacent intronic sequences of the *ATP7A* genes, as described previously [7]. In Japan MNK patients were supported by medical aid programs [16], and received detail examinations including head magnetic resonance imaging and computed tomography scan.

Three pairs of patients were siblings, while the remaining patients were unrelated. Patient mortality status included dead ($n = 23$), alive (10) and unknown (2). Preparation of copper-histidine complex was according to the same protocol [3]. The dose of copper histidine parenterally administered for one time was that could

keep serum copper and ceruloplasmin within a normal range. The period of treatment with copper histidine was 26–183 (mean \pm SD: 64.2 ± 39.9 months, $n = 17$) months.

2.2. Clinical data and data analysis

Clinical data for all patients were anonymously obtained from medical records or medical record summaries by retrospective review of pediatrician in charge of.

The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Board of the Teikyo University School of Medicine. All participants provided a signed written informed consent.

To compare age differences between patients with CMs and those without CMs, the Mann–Whitney *U* test was performed, using the statistical package PASW[®] Statistics 17.0 (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, IL, USA).

3. Results

Among the 35 MNK patients, we observed a total of 21 different CMs in 14 MNK patients (Table 1). Eight of these (8/14, 57.1%) had a single CM, while six (6/14, 42.9%) had multiple CMs. Eight CMs (8/21, 38.1%) were minor, and the others (13/21, 61.9%) were major anomalies. The minor anomalies included higher arched palate, single transverse palmer crease, flat occiput, micrognathia, congenital microblepharia, undescended testis at birth, microphallus and accessory spleen (Table 1). Most frequent CMs were higher arched palate (five patients), single transverse palmer crease (three), micrognathis (two), flat occiput (two), and congenital microblepharia (two) (Table 1).

Age at onset, age at diagnosis, age at start of treatment with parenteral copper histidine, age at death, and age of alive patients (on August 31, 2009) are presented in Table 2. A comparison of MNK patients with CMs and those without CMs revealed no significant differences in age at onset, age at diagnosis, and age at start of treatment with parenteral copper histidine, but age at death was significantly different between these two groups ($P < 0.05$, Table 2).

Two unrelated patients with the same mutation (R986X) were both born at 38 gestational weeks weighing more than 2500 g. They both received parenteral copper histidine treatment at 6.5 months of age. One had CMs and died at 32.5 months due to a bladder hemorrhage (Patient 3 in Table 1). The other had no CMs and died at 59.0 months due to apnea. Another two patients were siblings who had a mutation of Del 2429-2430delTT. Both were born at 36 gestational weeks and weighed approximately 2300 g. The younger brother, who was diagnosed prenatally with having a

Table 1
Spectrum of congenital malformations (CMs) and mutations in the *ATP7A* gene in 14 patients with classical MNK.

Patient number	Congenital malformations	Cause of death	Age at death (Month)	Mutation in the <i>ATP7A</i> gene [References]
1	Higher arched palate, congenital microblepharia, entropion, flat occiput, and single transverse palmer crease	Unknown	17.0	IVS20+5G>A [7,9]
2	Higher arched palate, micrognathia, patent ductus arteriosus, and accessory spleen	Sudden death	34.5	2491insA (F781FS826X)
3	Higher arched palate and single transverse palmer crease	Bladder hemorrhage	32.5	3101C>T (R986X) [7–9,12]
4	Higher arched palate and undescended testis at birth	Unknown	Unknown	1730G>T (E529X) [7–9]
5	Higher arched palate, hypertrophic pyloric stenosis and hydrocele	Alive	–	Not found, 46 XY [15]
6	Single transverse palmer crease, congenital microblepharia and flat occiput, hypoplastic corpus callosum, aplasia of inferior vermis	Stomach hemorrhage	57.5	IVS9+12insAATTG [9]
7	Cystic malformation in white matter of brain	Infectious disease	22.5	2429-2430delTT (S761FS770X) [9]
8	Congenital complete A–V block	Sudden death	45.0	IVS9+5G>C [8,9]
9	Microphallus	Sudden death	13.0	Not found
10	Club foot	Infectious disease	19.5	4177T>A and 4178A>T (S1344R and I1345F) [7,9]
11	Cystic malformation in lung	Infectious disease	22.5	1474delC [9]
12	Micrognathia	Infectious disease	43.0	2298-2299insAluYa5a2 [9,10]
13	Cystic malformation in arachnoid mater	Alive	–	Not detected yet
14	Cerebellar hypoplasia	Infectious disease	186.0	Not found

CM (Patient 7 in Table 1), died at 22.5 months due to sepsis and overall bad health from a tumoral lesion in his stomach. His older brother did not have any CMs, but died at 69 months of age from an infectious disease.

No relationship was found between CMs and genetic mutation (Table 1).

4. Discussion

In OMIM (<http://omim.org/entry/309400>) head and neck of MNK patients were described as microcephaly, brachycephaly, Wormian bone and pudgy cheeks. Horn et al. mentioned high-arched palate as one of the MNK symptoms [17]. However, to date, CMs in MNK patients have not been reported details yet. This is the first documentation of CMs in MNK patients in detail. This information can be added to what we know about MNK patients, which is that they often exhibit kinky hair, hypopigmentation, a higher arched palate, micrognathia, flat occiput and single transverse palmer crease. These minor and major anomalies presenting at birth are as clues for early diagnosis of MNK.

In this study, higher arched palate was most observed, and micrognathia and flat occiput were also observed. Along with the fact that microcephaly, brachycephaly, and pudgy cheeks described in MNK patients, it is considered that abnormal craniofacial

growth and development occurred during pregnancy, although flat occiput was often considered as subjective judgment.

The main causes of death among MNK patients with or without CMs were infectious disease and abnormalities of connective tissues, such as hemorrhage and rupture of abdominal aorta (Tables 1 and 2). However, sudden death occurred in MNK patients with CMs only, especially in patients with congenital heart disease (Table 1). Moreover, MNK patients often exhibit connective tissue complications associated with lower activities of copper enzymes, such as osteoporosis, bladder diverticula, gastroesophageal reflux disease, which require surgical treatment [14,18,19]. It was reported that micrognathia made intubation and anesthesia extremely problematic [18,19], such that surgical intervention for MNK patients with CMs is avoided or difficult, although micrognathia was a minor CM. MNK is a rare disease, although we did not have enough number of patients to do statistical analysis, it was easy to understand that some CMs, such as congenital heart disease and micrognathia, lead to an inevitably shorter lifespan in these patients compared to patients without CMs. Pediatricians should pay extra attention to complications and CMs when treating MNK patients.

As some MNK patients do not have mutations in the *ATP7A* gene (Table 1) [7–9,11], we wonder if CMs in

Table 2

Median age (range) at onset, diagnosis, start of parenteral copper histidine treatment, at death and cause of death in MNK patients who had died.

Congenital malformation	Median age (range) months					Cause of death (number of patients)
	At onset*	At diagnosis*	At start of treatment with parenteral copper histidine*	At death**	Of alive patients (as of August 31, 2009)	
Yes (<i>n</i> = 13) ^a	2.0 (0.0–9.0) (<i>n</i> = 13)	6.0 (3.0–12.0) (<i>n</i> = 12)	7.0 (3.0–15.0) (<i>n</i> = 13)	32.5 (13.0–186.0) (<i>n</i> = 11)	68.5 (<i>n</i> = 1)	Infectious disease (4); Infectious disease and hemorrhage (1); sudden death (3); bladder hemorrhage (1); stomach hemorrhage (1); unknown (2); (<i>n</i> = 12)
No (<i>n</i> = 21)	2.5 (0.0–6.0) (<i>n</i> = 18)	4.5 (0.0–33.0) (<i>n</i> = 18)	6.5 (0.5–34.0) (<i>n</i> = 19)	49.5 (38.0–97.0) (<i>n</i> = 8)	42.0 (17.0–104.0) (<i>n</i> = 9)	Infectious disease (5); central apnea (2); respiratory failure (1); rupture of abdominal aorta (1); sputum obliteration in cannula (1); unknown (1); (<i>n</i> = 11)

^a Data from patients who received prenatal diagnoses were excluded, with the exception of data pertaining to median age at death and cause of death in patients with CMs.

* $P > 0.05$, Mann–Whitney U test.

** $P < 0.05$, Mann–Whitney U test.

MNK patients may provide some clues regarding the pathological causes of MNK. However, even if patients 1–5 had the same CM in Table 1, that is, a high arched palate, mutations in their *ATP7A* genes were not consistent. Therefore, there was no association between CMs and mutations in the *ATP7A* gene.

Acknowledgements

This study was supported by the Japan Foundation for Pediatric Research 2009, the Mother and Child Health Foundation of Japan, and Specified Disease Treatment Research Program of Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H23/nanchi/ippan/091).

References

- [1] Tonnesen T, Kleijer WJ, Horn N. Incidence of Menkes disease. *Hum Genet* 1991;86:408–10.
- [2] Gu YH, Kodama H, Shiga K, Nakata S, Yanagawa Y, Ozawa H. A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003: incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to earlier diagnosis. *J Inher Metab Dis* 2005;28:473–8.
- [3] Sarkar B, Lingertat-Walsh K, Clarke JT. Copper-histidine therapy for Menkes disease. *J Pediatr* 1993;123:828–30.
- [4] Chelly J, Tümer Z, Tønnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, et al. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet* 1993;3:14–9.
- [5] Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, et al. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* 1993;3:20–5.
- [6] Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 1993;3:7–13.
- [7] Gu YH, Kodama H, Murata Y, Mochizuki D, Yanagawa Y, Ushijima H, et al. *ATP7A* gene mutations in 16 patients with Menkes disease and a patient with occipital horn syndrome. *Am J Med Genet* 2001;99:217–22.
- [8] Gu YH, Kodama H, Sato E, Mochizuki D, Yanagawa Y, Takayanagi M, et al. Prenatal diagnosis of Menkes disease by genetic analysis and copper measurement. *Brain Dev* 2002;24:715–8.
- [9] Gu YH. Epidemiological, pathological, and therapeutic studies on Menkes disease in Japanese patients (in Japanese). *Nihon Senten Taisha Ijou Gakkai Zasshi* (Tokyo) 2007;23:8–15.
- [10] Gu Y, Kodama H, Watanabe S, Kikuchi N, Ishitsuka I, Ozawa H, et al. The first reported case of Menkes disease caused by an Alu insertion mutation. *Brain Dev* 2007;29:105–8.
- [11] Tümer Z, Møller LB, Horn N. Mutation spectrum of *ATP7A*, the gene defective in Menkes disease. *Adv Exp Med Biol* 1999;448:83–95.
- [12] Ozawa H, Kodama H, Kawaguchi H, Mochizuki T, Kobayashi M, Igarashi T. Renal function in patients with Menkes disease. *Eur J Pediatr* 2003;162:51–2.
- [13] Sasaki G, Ishii T, Sato S, Hoshino K, Morikawa Y, Kodama H, et al. Multiple polypoid masses in the gastrointestinal tract in patient with Menkes disease on copper-histidinate therapy. *Eur J Pediatr* 2004;163:745–6.
- [14] Shiihara T, Kato M, Honma T, Kimura T, Matsunaga A, Kodama H, et al. Progressive sliding hiatal hernia as a complication of Menkes' syndrome. *J Child Neurol* 2002;17:401–2.
- [15] Ito H, Mori K, Sakata M, Naito E, Harada M, Minato M, et al. Pathophysiology of the transient temporal lobe lesion in a patient with Menkes disease. *Pediatr Int* 2008;50:825–7.
- [16] Gu YH, Kato T, Harada S, Sato Y, Kakee N. Medical aid program for chronic pediatric diseases of specified categories in Japan: current status and future prospects. *Pediatr Int* 2008;50:376–87.
- [17] Horn N, Tümer Z. Menkes disease and the occipital horn syndrome. In: Royce PM, Steinmann B, editors. *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*. New York: John Wiley and Sons Inc.; 2002. p. 651–85.
- [18] Mitsumizo S, Nakashima M, Totoki T. Anesthetic management for an infant with Menkes disease with Osteoporosis and Micrognathia (in Japanese). *Rinsho Masui* (Tokyo) 2000;24:731–2.
- [19] Sato R, Okutani K, Higashi T, Satou M, Fujimoto K, Okazaki K. Case report: respiratory care for anesthesia in a patient with Menkes syndrome and micrognathia (in Japanese). *Masui* (Tokyo) 2009;58:103–5.

09. Disorders of Trace Elements and Vitamins (1)

O-050

A NOVEL THERAPY, COMBINATION THERAPY WITH INJECTIONS OF COPPER AND ORAL ADMINISTRATIONS OF DISULFIRAM, IN PATIENTS WITH MENKES DISEASE AND OCCIPITAL HORN SYNDROME

Kodama H¹, Ogawa E², Hiroki T²

¹*Teikyo Heise University, Tokyo, Japan*

²*Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan*

The current therapy for Menkes disease (MD) is a parenteral administration of copper-histidine. However, the treatment is less effective for neurological disturbance and connective tissue disorders. Disulfiram, a lipophilic chelator, has shown beneficial effects in the macular mouse, an animal model of MD. These results led us to treat MD and OHS patients with disulfiram in combination with copper-histidine. Disulfiram was orally administered in two patients with MD and a patient with OHS after approval of the ethical committee of Teikyo University Hospital, with maintenance dosage of 100 mg/day. Supplementation of copper-histidine was unaltered during the study period in patients with MD. Serum levels of copper and ceruloplasmine tended to increase in a MD patient, and he showed enriched emotional expression and behavior more often after disulfiram administration. Bone mineral content was increased by disulfiram administration in the MD and OHS patients. No adverse effect was found. These results suggest that copper-disulfiram complex is transported to neurons resulting in neurological improvement. Moreover, the therapy may be effective for the connective tissue disorders in MD and OHS patients.