

as exons 2–3 fusion), then to search for SECRIIs comprising three sequential exons (such as exons 1–2–3 fusion), four sequential exons, and so on. For example, if intron 12 is spliced out before the removal of introns 11 and 13, a SECRI comprising exons 12 and 13 is predicted to be amplified by a sense primer in intron 11 and an antisense primer in intron 13.

We designed PCR primers as shown in Supp. Table S1. Sense primers, ex1F to in16F, were used for amplification of exon 1 to exon 17, respectively. Antisense primers, in1R to ex17R, were for amplification of exon 1 to exon 17, respectively. To initiate cDNA synthesis from nuclear RNA, we employed additional SCOT-specific antisense primers, labeled in2R' to ex17R', that were located downstream from in2R to ex17R, respectively. Three separate cDNA synthesis reactions were carried out using mixtures of either in2R', in3R', in4R', in5R', and in6R' primers, of in7R', in8R', in9R', in10R', and in11R' primers, or of in12R', in13R', in14R' in15R', in16R', and ex17R' primers. The cDNA products then served as templates for PCR detection of various SECRIIs using in2R, in3R, in4R, in5R, and in6R antisense primers, in7R, in8R, in9R in10R, and in11R antisense primers, or in12R, in13R, in14R in15R, in16R, and ex17R antisense primers, respectively.

All primers listed in Supp. Table S1, except for ex1F, ex11F, ex12F, ex13F, ex13R, ex14R, ex15R, ex15R', ex17R, and ex17R', were complementary to intronic sequences. ex1F was placed upstream from the initiation codon on exon 1. ex17R and ex17R' were placed downstream from the termination codon on exon 17.

Nuclear RNA (2 µg) was reverse transcribed in 20 µl of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTPs, the mixture of the above antisense primers (10 pmol each) and 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Life Tech.) at 37°C for 1 hr. One microliter of this cDNA solution served as a PCR template. Specific exons were amplified using 30 pmol each of the above sense and antisense primers for 35 PCR cycles. Each cycle consisted of 1 min of denaturation at 94°C, 2 min of annealing at 60°C, and a 1-min extension at 72°C. The amplified fragments were detected following electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel and ethidium bromide staining. Sequences of amplified fragments were confirmed by direct sequencing.

### Analysis of Intron Removal Around Exons 11–14

Fibroblasts from a control and from the patient were grown to near confluence in six-well tissue-culture plates in DMEM with 10% FCS. The medium was then replaced by serum-free DMEM, and 5 µg/ml of Actinomycin D (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) was added to halt transcription. The incubation was terminated after 5, 10, 20, 40, or 60 min by adding 1 ml of ISOGEN solution. One well of each cell line was left untreated to serve as a baseline control. Total RNA using ISOGEN kit (Nippon Gene) from the different timepoints was treated with Deoxyribonuclease, as described above. cDNA synthesis reactions were carried out using a mixture of SCOT-specific antisense primers in13R', in14R', and ex15R' (Supp. Table S1). To check for residual genomic DNA in the RNA preparation, one PCR reaction was done without prior reverse transcription.

## Results

### Enzyme Assay and Immunoblot Analysis

SCOT activity in GS23's fibroblasts ( $0.4 \pm 0.9$  nmol/min/mg protein,  $n = 7$ ) was less than 10% of SCOT activity in control fibroblasts ( $4.5 \pm 1.2$  nmol/min/mg protein,  $n = 7$ ), whereas acetoacetyl-

CoA thiolase activity in the presence of potassium ion ( $9.4 \pm 2.6$  nmol/min/mg protein,  $n = 7$ ) was similar to that of controls ( $8.0 \pm 1.7$  nmol/min/mg protein,  $n = 7$ ). In immunoblot analysis, SCOT protein was not detected in GS23's fibroblasts, whereas SCOT protein was clearly detected in control fibroblasts (data not shown). These analyses thus confirmed SCOT deficiency in GS23.

### Gene Mutations

Sequencing of the SCOT gene in GS23 revealed an apparent homozygosity for a G to A mutation at the fifth nucleotide of intron 13 (c.1248+5g>a) (Fig. 1A). No other mutations were detected by sequencing of all exons and the exon–intron boundaries.

### cDNA Analysis

We first performed RT-PCR using total RNA with CHX-untreated fibroblasts. Amplification of the SCOT cDNA (c.-4 – 1586) from control fibroblasts produced a single fragment with the expected size of 1,590 bp (Fig. 1B, control CHX-, indicated by arrow 1). However, in GS23, there were two faint shorter fragments of approximately 1,450 bp (GS23 CHX-, indicated by arrow 2) and 1,100 bp (indicated by arrow 3). Sequence analysis of these fragments revealed that the 1,450 bp fragment (indicated by arrow 2) lacked exons 12 and 13 (Fig. 1C), whereas the 1,100 bp fragment lacked exons 8–13. Because skipping of exons 12 and 13 results in a frame-shift and skipping of exons 8–13 does not, we reperfomed RT-PCR using total RNA from CHX-treated and nontreated fibroblasts to confirm that the mRNA with skipping of exons 12 and 13 is a major transcript in GS23.

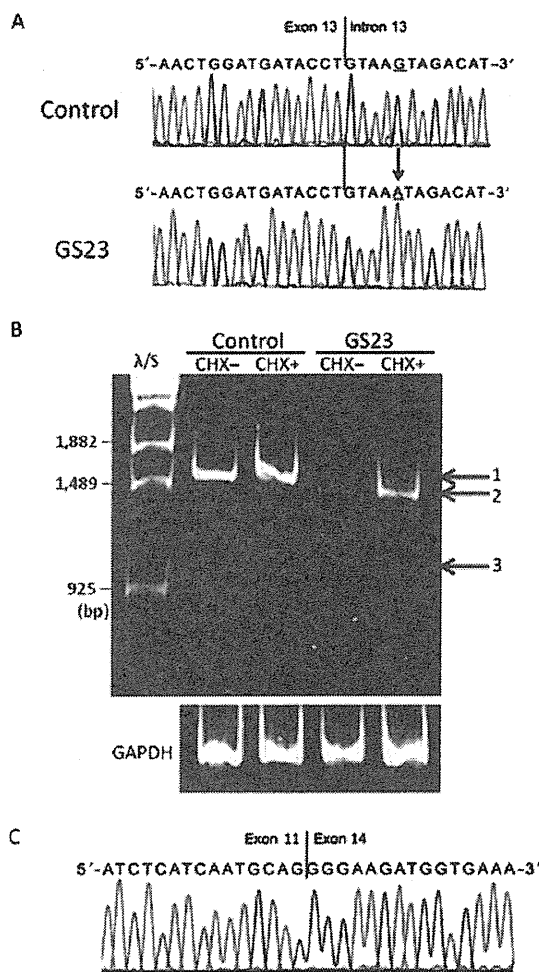
When we inhibited NMD by treating fibroblasts with CHX, the cDNA with skipping of exons 12 and 13 was amplified much more abundantly than the cDNA with exons 8–13 skipping in case of GS23 (Fig. 1B, GS23 CHX+), whereas no change was observed in the case of a control (Control CHX+). On the basis of this experiment, we concluded that the major transcript in GS23 had skipping of exons 12 and 13 and was subjected to NMD. On the contrary, mRNA with skipping of exons 8–13 is in-frame, and should be a minor transcript.

We considered that the mutation at the splice donor site of intron 13 (c.1248+5g>a) caused exons 12 and 13 skipping instead of solely exon 13 skipping. We tested a hypothesis that two exons were skipped because the upstream intron 12 was rapidly removed, similar to the model proposed by Takahara et al. (2002).

### Analysis of RNA Intermediates Encompassing Exons 12 and 13

To test this hypothesis, we analyzed splicing of heteronuclear RNA (hnRNA) in GS23 and control fibroblasts. As shown in Figure 2, a fragment with exon 12–intron 12–exon 13 (intron 12 retained) was detected in both controls and GS23, but a SECRI comprising exons 12 and 13 was clearly identified in only the two control fibroblasts but hardly detected in GS23 fibroblasts. Amplification of hnRNA using primers specific to exons 11 and 14 yielded no product in control fibroblasts but did detect a SECRI comprising exons 11 and 14 lacking exons 12 and 13 (Fig. 2).

These results indicate that (1) the skipping of exons 12 and 13 in GS23 may not be associated with an initial fusion of exons 12 and 13; but that (2) this splice-site mutation may alter the order of intron removal in SCOT RNA processing.



**Figure 1.** Genomic DNA analysis and RT-PCR analysis. **A:** An apparently homozygous point mutation from G to A was found at the fifth nucleotide of intron 13 (c.1248+5g>a) in GS23 as indicated by the arrow. **B:** RT-PCR analysis using RNAs from CHX-treated and CHX-untreated fibroblasts. SCOT cDNA (c.-4 - 1586) was amplified and electrophoresed on a 3.5% (w/v) polyacrylamide gel. In a control, a fragment with the expected size of 1,590 bp (indicated by arrow 1) was clearly detected. In GS23, a fragment with the expected size was hardly detected; however, two shorter fragments with the size of ca. 1,450 bp (indicated by arrow 2) and 1,100 bp (indicated by arrow 3) were detected. Sequence analysis of GS23's fragments revealed that the longer fragment had exons 12 and 13 skipping and the shorter one had skipping of exons 8–13. CHX: cycloheximide. **C:** Exons 12 and 13 skipping identified in GS23's cDNA.

### Determination of the Last Intron to be Spliced

Our strategy was to detect hnRNA-derived cDNAs that had a solitary intron, by definition, the last intron to be spliced; such molecules would be capable of being amplified with primers from that intron and a terminal exon, as described by Kessler et al. (1993). We first detected such cDNAs using the common sense primer in exon 1 (ex1F) and a series of antisense primers in introns 2–16 (in2R–in16R) and the antisense primer in exon 17 (ex17R). In control fibroblasts (Figs. 3A and 3C), SECRI comprising exons 1 and 2, exons 1–3, exons 1–7, exons 1–9, exons 1–11, and exons 1–17 were detected. Secondly, we used a common antisense primer on exon 17 (ex17R) and a series of sense primers from ex1F to in15F. In the two

controls, SECRI comprising exons 16 and 17, exons 15–17, exons 14–17, exons 13–17, exons 12–17, and exons 1–17 were detected. Intron 11 was the only possible solitary intron identified from both directions. These results suggested that the SECRI comprising exons 12–17 was ligated to the SECRI comprising exons 1–11 and that intron 11 removal was likely the final splicing event in controls. In addition, the amplification using a combination of in11F and ex17R produced a larger fragment including intron 12, as indicated by arrow 2 in Figure 3A, which suggested that the removal of intron 12 was also a late event. These findings are in accord with the result that no SECRI spanning exons 11–14 was amplified in controls (Fig. 2).

In the case of GS23 fibroblasts (Figs. 3B and 3D), the amplification pattern using the ex1F primer and a series of antisense primers from in2R to ex17R was similar to that of the control. However, the amplification pattern using the ex17R antisense primer and a series of sense primers from ex1F to in15F sense primers differed from that of controls. Several different pathways are possible and it is difficult to determine which pathway is the major one. Introns 7, 9, and 11 are possible last introns to be spliced in GS23 fibroblasts. In addition, a large sequence encompassing intron 11–exon 12–intron 12–exon 13–mutated intron 13 could also be spliced out lastly.

### Detection of SECRI Flanked by Introns

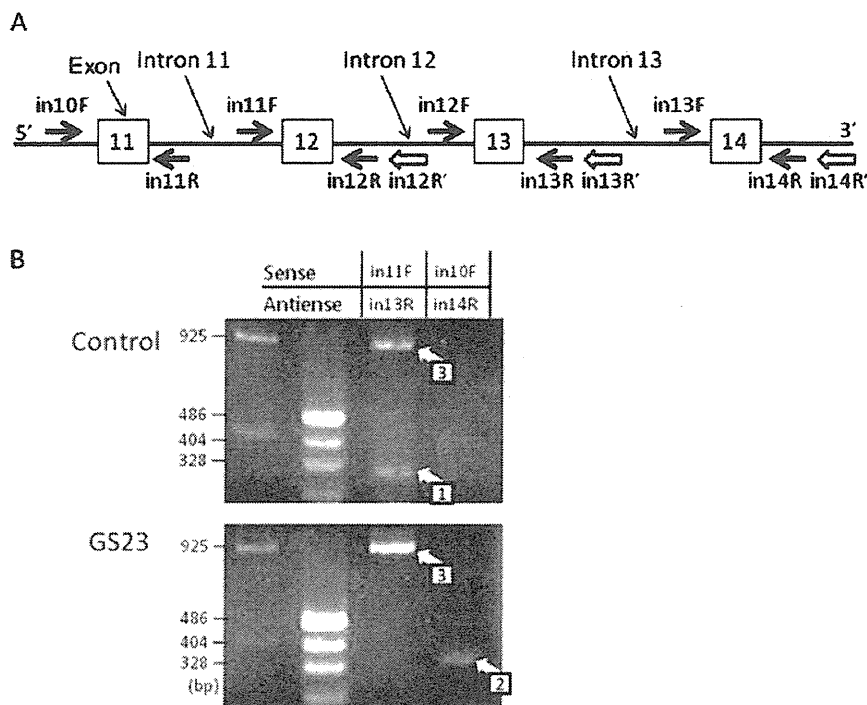
We also amplified SECRI flanked by introns. Figures 3E and 3F showed all such SECRI detected by PCR (also see Supp. Fig. S1). In controls, SECRI in which intron 11 was spliced out were not detected and products in which intron 12 was retained were detected (Fig. 3E). In the case of GS23, SECRI in which mutated intron 13 was spliced out were not detected (Fig. 3F).

### Comparison of Intron Removal Around Exons 11–14 Between Controls and GS23

According to the Kessler's original method [Kessler et al., 1993], several intron/exon primer pairs were used to amplify cDNA synthesized from total RNA from fibroblasts treated with Actinomycin D for different periods, although introns 11, 13, and 14 were too long to amplify intermediates including these introns (Fig. 4A).

### Control fibroblasts

When we placed primers in exon 11 (ex11F) and intron 12 (in12R), no PCR products were amplified, as expected from the facts that intron 11 is too long (6,272 bp) to amplify and intron 11 is the last intron to be spliced in controls. When the primers were placed in intron 11 (in11F) and exon 13 (ex13R), the product that retained intron 12 and a SECRI in which intron 12 was spliced out were detected at 0 min. The former was no longer detectable at 60 min but the latter was still detected at 60 min. When primers were placed in exon 12 (ex12F) and intron 13 (in13R), the major product retained intron 12 and the minor product was a SECRI in which intron 12 was spliced out. Both disappeared by 60 min. When primers were placed in intron 12 (in12F) and exon 14 (ex14R), a SECRI in which intron 13 was spliced out was detected at 0 min and disappeared by 60 min. When primers were placed in exon 13 (ex13F) and intron 14 (in14R), a SECRI in which intron 13 was spliced out was clearly detected at 0 min and decreased with time. Lastly, when primers were placed in intron 13 (in13F) and exon 15



**Figure 2.** Analysis of RNA intermediates encompassing exons 12 and 13. **A:** Positions of the SCOT-specific primers for analysis of RNA intermediates encompassing exons 12 and 13. **B:** RT-PCR. cDNA was synthesized with isolated hnRNA using a mixture of SCOT-specific antisense primers including 12R', 13R', and 14R'. PCR was done using the indicated primers. A fragment with arrow 1 was a SECRI in which intron 12 was spliced out. A fragment with arrow 2 had skipping of exons 12 and 13. Fragments with arrow 3 had a retention of intron 12.

(ex15R), a SECRI in which intron 14 was spliced out was faintly detected until 40 min in the control.

### GS23 fibroblasts

Intermediates that retained intron 12 remained with similar amounts for the full duration of the chase and no SECRI in which intron 12 was spliced out were detected, in either primer combinations of in11F/ex13R or ex12F/in13R. The SECRI in which intron 13 was spliced out were also not amplified in either combination of in12F/ex14R or ex13F/in14R. The SECRI in which intron 14 was spliced out was amplified with in13F and ex15R primers.

### Discussion

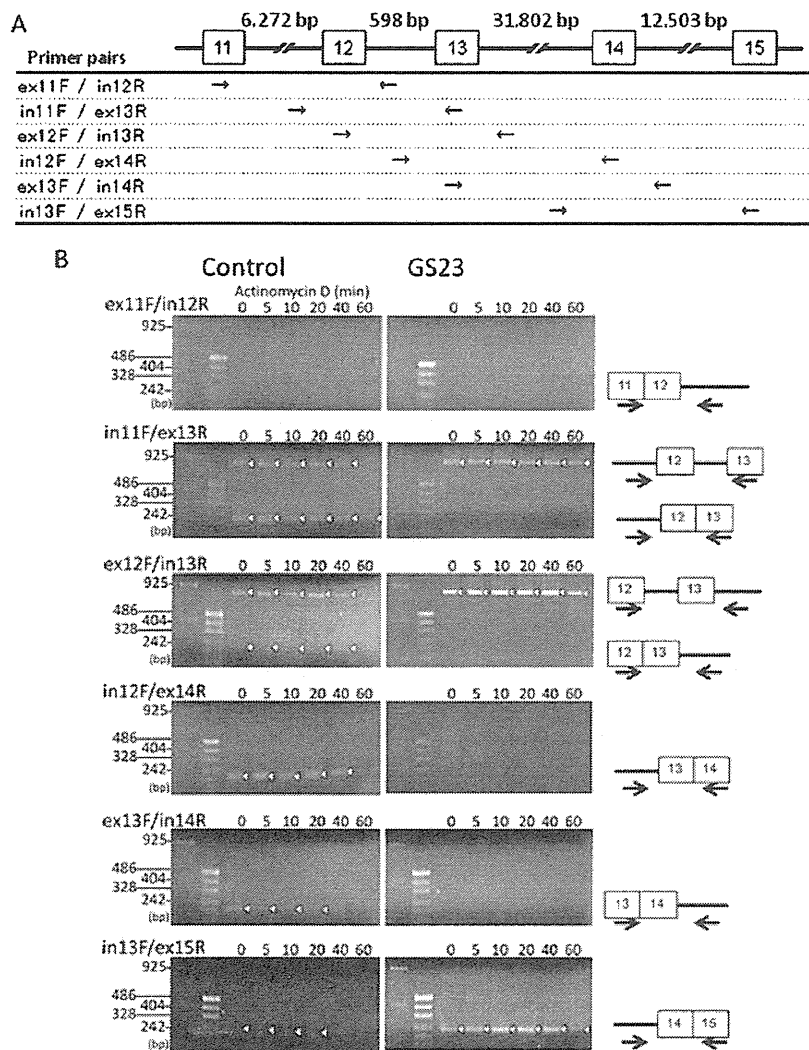
We identified an apparently homozygous mutation c.1248+5g>a in a SCOT-deficient patient. This mutation resulted in major aberrant mRNA with skipping of exons 12 and 13. It is well known that, among donor splice-site mutations, changes at the G residue at position 1 are most commonly described, followed by mutations at position 5. Mutations at these 2 positions are thought to significantly reduce the pairing of the donor splice site with the complementary site in the small nuclear ribonucleoprotein particle U1snRNP [Kramer, 1996]. Buratti et al. (2007) summarized 346 aberrant splice donor sites that were activated by mutations in 166 human diseases. Point mutations leading to cryptic splice donor site activation were most common in the first intron nucleotide, followed by the fifth nucleotide. Substitutions at position +5 were exclusively g>a transitions. In our case, the c.1248+5g>a mutation

accordingly resulted in a drastically reduced Shapiro and Senapathy score [Shapiro and Senapathy, 1987] at the authentic splice donor site of intron 13 from 79.0 (CT/gtaagt) to 64.6 (CT/gtaaat). Hence, it is predicted that c.1248+5g>a should cause aberrant splicing such as exon 13 skipping, but surprisingly, this mutation caused skipping of both exons 12 and 13.

In RT-PCR analysis using RNA from CHX-treated and CHX-untreated fibroblasts, we clearly showed that cDNA with skipping of exons 12 and 13 was the major transcript and was subjected to NMD. Both the cDNA with exon 13 skipping and the cDNA with exons 8–13 skipping should be minor and side transcripts because the former was not detected even in the CHX-treated condition and the latter is in-frame and had a relatively smaller amount than the major cDNA with skipping of exons 12 and 13 in the CHX-treated condition.

There are several reports of mutations at single-splice junctions that result in the skipping of two or more exons [Fang et al., 2001; Haire et al., 1997; Hayashida et al., 1994; Schneider et al., 1993; Takahara et al., 2002; Yamada et al., 2007]. The splicing order of introns can explain the events of aberrant splicing. Takahara et al. (2002) analyzed the molecular basis of skipping of exons 5 and 6 of COL5A1 due to a splice acceptor site of intron 5 mutation, by determination of the splicing order of introns 4, 5, and 6. They suggested that the acceptor-site mutation of intron 5 leads to the removal of the two downstream exons (exons 5 and 6), because those exons can be fused to a "single" exon, whereas the next downstream intron (intron 6) and the mutation-bearing intron (intron 4) remain in the transcript. Their finding could be applicable for a splice donor-site mutation, as the removal of the upstream intron creates a "single" exon that, if the next upstream intron is retained, allows





**Figure 4.** Analysis of intron removal around exons 11–14 using Actinomycin D. **A:** PCR primer combinations used for the analysis of intron removal. **B:** Total RNA was prepared from cultured fibroblasts after defined time intervals (0, 5, 10, 20, 40, and 60 min) of exposure to Actinomycin D, treated with DNase, reverse transcribed, amplified with indicated primer pairs, and electrophoresed on 2% agarose gels. Amplified fragments are indicated by arrowhead.

as follows: in control, intron 11 was the last intron to be spliced and intron 12 removal was also rather slow and occurred after intron 13 removal in the major pathway, although a minor pathway in which intron 12 splicing occurred before intron 13 was also present. In GS23, since intron 13 was mutated, retention of intron 13 occurred for a long time. This halt of intron13 splicing may result in intron 12 retention and intron 11 retention. This “splicing paralysis” [Schwarze et al. 1999] may be a molecular basis of two-exon skipping. This splicing paralysis could be solved by skipping of the whole intron 11–exon 12–intron 12–exon 13–mutated intron 13. The presence of all SECRI detected, as shown in Figure 3, is consistent with the above explanation.

According to recent studies, splicing occurs during transcription (co-transcriptional splicing) and introns are removed in a general 5'–3' order. However, as in our case, splicing does not always occur as a linear process starting at 5' end of the primary transcript.

Many different factors can influence the order of splicing of SCOT transcripts, including sequences at splice junctions, the length and sequences of introns, the sequences of adjacent exons, and RNA secondary structures. Supp. Table S2 summarizes the lengths of introns and exons in the SCOT transcript, and Shapiro and Senapathy's scores [Shapiro and Senapathy, 1987] of splice-site junctions. This analysis did not reveal a definitive factor that would explain the order of intron removal.

In summary, our study showed that (1) a single nucleotide substitution at the 5' splice site of intron 13 (c.1248+5g>a) in GS23's fibroblasts causes skipping of exons 12 and 13 predominantly, that (2) the formation of SECRI comprising exon 12 and 13 was not the cause of skipping of exons 12 and 13 in GS23's fibroblasts, that (3) the mutation resulted in retention of intron 13, thus causing the retention of introns 12 and 11, and this “splicing paralysis” was the molecular basis of two-exon skipping.

## Acknowledgment

We thank Paul Langman, Ph.D. for his kind assistance with English usage.

*Disclosure statement:* The authors declare no conflict of interest.

## References

- Attanasio C, David A, Neerman-Arbez M. 2003. Outcome of donor splice site mutations accounting for congenital afibrinogenemia reflects order of intron removal in the fibrinogen alpha gene (FGA). *Blood* 101:1851–1856.
- Baric I, Sarnavka V, Fumic K, Maradin M, Begovic D, Ruiters JP, Wanders RJ. 2001. A new case of succinyl-CoA:acetoacetate transferase deficiency: favourable course despite very low residual activity. *J Inher Metab Dis* 24:81–82.
- Berget SM. 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270:2411–2414.
- Berry GT, Fukao T, Mitchell GA, Mazur A, Ciafre M, Gibson J, Kondo N, Palmieri MJ. 2001. Neonatal hypoglycaemia in severe succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 24:587–595.
- Buratti E, Chivers M, Kralovicova J, Romano M, Baralle M, Krainer AR, Vorechovsky I. 2001. Neonatal hypoglycaemia in severe succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 24:587–595.
- Buratti E, Chivers M, Kralovicova J, Romano M, Baralle M, Krainer AR, Vorechovsky I. 2001. Neonatal hypoglycaemia in severe succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 24:587–595.
- Buratti E, Chivers M, Kralovicova J, Romano M, Baralle M, Krainer AR, Vorechovsky I. 2001. Neonatal hypoglycaemia in severe succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 24:587–595.
- Cornblath M, Gíngel RL, Fleming GA, Tildon JT, Leffler AT, Wapnir RA. 1971. A new syndrome of ketoacidosis in infancy. *J Pediatr* 79:413–418.
- Fang LJ, Simard MJ, Vidaud D, Assouline B, Lemieux B, Vidaud M, Chabot B, Thirion JP. 2001. A novel mutation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promotes skipping of two exons by preventing exon definition. *J Mol Biol* 307:1261–1270.
- Fukao T, Song XQ, Watanabe H, Hirayama K, Sakazaki H, Shintaku H, Imanaka M, Orii T, Kondo N. 1996. Prenatal diagnosis of succinyl-coenzyme A:3-ketoacid coenzyme A transferase deficiency. *Prenat Diagn* 16:471–474.
- Fukao T, Song XQ, Mitchell GA, Yamaguchi S, Sukegawa K, Orii T, Kondo N. 1997. Enzymes of ketone body utilization in human tissues: protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA):3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatr Res* 42:498–502.
- Fukao T, Mitchell GA, Song XQ, Nakamura H, Kassovska-Bratinova S, Orii KE, Wraith JE, Besley G, Wanders RJ, Niezen-Koning KE, Berry GT, Palmieri M, et al. 2000. Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT): cloning of the human SCOT gene, tertiary structural modeling of the human SCOT monomer, and characterization of three pathogenic mutations. *Genomics* 68:144–151.
- Fukao T, Shintaku H, Kusubae R, Zhang GX, Nakamura K, Kondo M, Kondo N. 2004. Patients homozygous for the T435N mutation of succinyl-CoA:3-ketoacid CoA Transferase (SCOT) do not show permanent ketosis. *Pediatr Res* 56:858–863.
- Fukao T, Sakurai S, Rolland MO, Zabol MT, Schulze A, Yamada K, Kondo N. 2006. A 6-bp deletion at the splice donor site of the first intron resulted in aberrant splicing using a cryptic splice site within exon 1 in a patient with succinyl-CoA: 3-Ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. *Mol Genet Metab* 89:280–282.
- Fukao T, Kursula P, Owen EP, Kondo N. 2007. Identification and characterization of a temperature-sensitive R268H mutation in the human succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene. *Mol Genet Metab* 92:216–221.
- Fukao T, Ishii T, Amano N, Kursula P, Takayanagi M, Murase K, Sakaguchi N, Kondo N, Hasegawa T. 2010. A neonatal-onset succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT)-deficient patient with T435N and c.658-666dupAACGTGATT p.N220\_I222dup mutations in the *OXCT1* gene. *J Inher Metab Dis* 33:636.
- Fukao T, Sass JO, Kursula P, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Baric I, Zabol MT, Kondo N. 2011. Clinical and molecular characterization of five patients with succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1812:619–624.
- Haire RN, Ohta Y, Strong SJ, Litman RT, Liu Y, Prchal JT, Cooper MD, Litman GW. 1997. Unusual patterns of exon skipping in Bruton tyrosine kinase are associated with mutations involving the intron 17 3' splice site. *Am J Hum Genet* 60:798–807.
- Hawkins JD. 1988. A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res* 16:9893–9908.
- Hayashida Y, Mitsubuchi H, Indo Y, Ohta K, Endo F, Wada Y, Matsuda I. 1994. Deficiency of the E1 beta subunit in the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex due to a single base substitution of the intron 5, resulting in two alternatively spliced mRNAs in a patient with maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1225:317–325.
- Hernan I, Gamundi MJ, Planas E, Borrás E, Maseras M, Carballo M. 2011. Cellular expression and siRNA-mediated interference of rhodopsin cis-acting splicing mutants associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(6):3723–3729.
- Kassovska-Bratinova S, Fukao T, Song XQ, Duncan AM, Chen HS, Robert MF, Perez-Cerda C, Ugarte M, Chartrand C, Vobecky S, Kondo N, Mitchell GA. 1996. Succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT): human cDNA cloning, human chromosomal mapping to 5p13, and mutation detection in a SCOT-deficient patient. *Am J Hum Genet* 59:519–528.
- Kessler O, Jiang Y, Chasin LA. 1993. Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA. *Mol Cell Biol* 13:6211–6222.
- Kramer A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* 65:367–409.
- Longo N, Fukao T, Singh R, Pasquali M, Barrios RG, Kondo N, Gibson KM. 2004. Succinyl-CoA:3-ketoacid transferase (SCOT) deficiency in a new patient homozygous for an R217X mutation. *J Inher Metab Dis* 27:691–692.
- Maniatis T, Reed R. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416:499–506.
- Maquat LE. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 118:1773–1776.
- Merron S, Akhtar R. 2009. Management and communication problems in a patient with succinyl-CoA transferase deficiency in pregnancy and labour. *Int J Obstet Anesth* 18:280–283.
- Mitchell GA, Fukao T. 2001. Chapter 102. Inborn errors of ketone body catabolism. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, editors. *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th edition). New York: McGraw-Hill. p2327–2356.
- Niezen-Koning KE, Wanders RJ, Ruiters JP, Ijlst L, Visser G, Reisma-Bierens WC, Heymans HS, Reijngoud DJ, Smit GP. 1997. Succinyl-CoA:acetoacetate transferase deficiency: identification of a new patient with a neonatal onset and review of the literature. *Eur J Pediatr* 156:870–873.
- Perez-Cerda C, Merinero B, Sanz P, Jimenez A, Hernandez C, Garcia MJ, Ugarte M. 1992. A new case of succinyl-CoA: acetoacetate transferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 15:371–373.
- Pretorius CJ, Loy Son GG, Bonnici F, Harley EH. 1996. Two siblings with episodic ketoacidosis and decreased activity of succinyl-CoA:3-ketoacid CoA-transferase in cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 19:296–300.
- Rolland MO, Guffon N, Mandon G, Divry P. 1998. Succinyl-CoA:acetoacetate transferase deficiency. Identification of a new case; prenatal exclusion in three further pregnancies. *J Inher Metab Dis* 21:687–688.
- Sakazaki H, Hirayama K, Murakami S, Yonezawa S, Shintaku H, Sawada Y, Fukao T, Watanabe H, Orii T, Isshiki G. 1995. A new Japanese case of succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA-transferase deficiency. *J Inher Metab Dis* 18:323–325.
- Schneider S, Wildhardt G, Ludwig R, Royer-Pokora B. 1993. Exon skipping due to a mutation in a donor splice site in the WT-1 gene is associated with Wilms' tumor and severe genital malformations. *Hum Genet* 91:599–604.
- Schwarze U, Starman BJ, Byers PH. 1999. Redefinition of exon 7 in the COL1A1 gene of type I collagen by an intron 8 splice-donor-site mutation in a form of osteogenesis imperfecta: influence of intron splice order on outcome of splice-site mutation. *Am J Hum Genet* 65:336–344.
- Shapiro MB, Senapathy P. 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15:7155–7174.
- Snyderman SE, Sansaricq C, Middleton B. 1998. Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA-transferase deficiency. *Pediatrics* 101:709–711.
- Song XQ, Fukao T, Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Ugarte M, Wanders RJ, Hirayama K, Shintaku H, Churchill P, Watanabe H, Orii T, Kondo N. 1997. Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase (SCOT): development of an antibody to human SCOT and diagnostic use in hereditary SCOT deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1360:151–156.
- Song XQ, Fukao T, Watanabe H, Shintaku H, Hirayama K, Kassovska-Bratinova S, Kondo N, Mitchell GA. 1998. Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency: two pathogenic mutations, V133E and C456F, in Japanese siblings. *Hum Mutat* 12:83–88.
- Takahara K, Schwarze U, Imamura Y, Hoffman GG, Toriello H, Smith LT, Byers PH, Greenspan DS. 2002. Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-alpha1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I. *Am J Hum Genet* 71:451–465.
- Tildon JT, Cornblath M. 1972. Succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA-transferase deficiency. A cause for ketoacidosis in infancy. *J Clin Invest* 51:493–498.
- Williamson DH, Bates MW, Page MA, Krebs HA. 1971. Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J* 121:41–47.
- Yamada K, Fukao T, Zhang G, Sakurai S, Ruiters JP, Wanders RJ, Kondo N. 2007. Single-base substitution at the last nucleotide of exon 6 (c.671G>A), resulting in the skipping of exon 6, and exons 6 and 7 in human succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene. *Mol Genet Metab* 90:291–297.

## 総 説

### 脂肪酸代謝異常症, ケトン体代謝異常症の最近の進歩

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学, 同 連合創薬医療情報研究科医療情報学専攻

深 尾 敏 幸

キーワード: 脂肪酸β酸化系異常症, ケトン体代謝異常症, 新生児マススクリーニング, タンデムマススクリーニング, カルニチン, ケトン体

#### はじめに

脂肪酸のβ酸化系は遊離脂肪酸から心筋や骨格筋のエネルギーの多くを産生しているとともに, 肝臓においてケトン体を産生することで, 血糖コントロールにおいても重要な役割を果たしている<sup>1)2)</sup>.

1980年代から1990年代前半にかけて脂肪酸β酸化系異常症が次々と報告され, とくに中鎖アシル-CoA脱水素酵素(MCAD)欠損症が乳幼児突然死症候群, Reye様症候群の原因疾患として注目された<sup>3)</sup>. 1990年代前半からタンデムマスによるアシルカルニチン分析が開始され, 脂肪酸代謝異常症のスクリーニングに有用であることから, 1990年代後半からオーストラリア, 米国の一部で公的事業としてタンデムマスが新生児マススクリーニングに導入され, 2000年以降ドイツ, 台湾などでも公的事業としてタンデムマススクリーニングが始まった. 日本においては, 1997年に福井大学の重松陽介先生らによるパイロット研究が始まり, 2005年からは福井大学を含む全国5か所にパイロット研究が広がった<sup>4)</sup>.

現在タンデムマスをを用いた新生児マススクリーニングが, 日本において多くの自治体で開始もしくは開始に向けて準備が進められている<sup>4)5)</sup>. これまでの6疾患のスクリーニングから, 新たなスクリーニングでは1次対象疾患だけでも19疾患が対象疾患となる. 乳幼児期に突然の強い低血糖発作, Reye様症候群での発症や乳幼児突然死症候群と密接に関連する脂肪酸代謝異常症をはじめ, 著しい代謝性アシドーシス, 高アンモニア血症などで発症する有機酸代謝異常症などがその新

たな対象疾患となっている. これらの疾患が初回発作を来す前に診断に至り, 重篤な初回発作を防ぐことができれば, 患者さんの予後を大きく変えることができると期待されている.

本稿では, 脂肪酸代謝異常症, そして関連するケトン体代謝異常症について, 新生児マススクリーニングの視点を入れながら概説したい.

#### 脂肪酸酸化とケトン体代謝

##### 1) 意義

肝臓における脂肪酸β酸化系とそれに続くケトン体代謝系は, 炭水化物からのエネルギー供給が低下したときに血糖を維持するために重要な代謝系である. 特に骨格筋量が不十分で, アラニンからのグルコース供給が十分でない乳幼児期においては重要である. それは長鎖脂肪酸酸化系異常症やケトン体産生障害が, 乳幼児期に著しい低血糖発作をきたすことから明らかである. グルコースが不足した時に, 以下で述べるようなホルモン系の作用により脂肪酸β酸化が亢進し, ケトン体が産生され, これが肝外組織でグルコースの代替エネルギーとして用いられることで, 低血糖になることを防いでいる. 一方学童期以降は, 骨格筋量が増してアラニンからのグルコース供給が十分となり, 血糖維持に対するケトン体への依存度が低下してくるため, 脂肪酸代謝異常症やケトン体産生異常症でも低血糖発作を来しにくくなる. 同様にケトン体産生が亢進しにくくなることから, ケトン体利用障害におけるケトアシドーシスの危険性も少なくなる.

また脂肪酸の酸化は効率的なエネルギー産生系として重要である. 心筋ではほとんどすべての栄養源を利用することができるが, なかでも脂肪酸β酸化系が主要なエネルギー供給源である. ケトン体を利用するた

連絡先住所: (〒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

深尾 敏幸

めに必要なサクシニル-CoA:3-ケトン酸 CoA トランスフェラーゼ(SCOT)も心臓で最も強く発現しており<sup>6)</sup>, ケトン体も重要なエネルギー源と考えられる. 脂肪酸β酸化系が強く障害される場合, 心筋はこの重要な心筋自体の脂肪酸β酸化系と肝臓から供給されるケトン体という両方のエネルギー源を失うことになる. カルニチン回路異常症, 長鎖β酸化系異常症の重症型では, 新生児期に心筋症, 不整脈で死亡することからも心筋における脂肪酸β酸化系の重要性が理解できる. 骨格筋では安静時のほとんどのエネルギーは脂肪酸β酸化でまかなわれており, 激しい運動時にグリコーゲン代謝にスイッチされる. しかしさらに運動が持続すると再び脂肪酸代謝にスイッチされる. これは筋型糖原病においてセコンドウインド現象として知られている. 比較的残存活性のあるカルニチン回路異常症, 長鎖β酸化系異常症では, 心筋障害や低血糖をきたさず, 幼児期以降の筋痛, 横紋筋融解が主症状となる. 一方ケトン体産生障害やケトン体利用障害では, 骨格筋や心筋自身のβ酸化系は正常であり, 骨格筋や心筋における代謝障害は一般には認められない.

一般的に脳には脂肪酸のβ酸化系はなく, もっぱらグルコースと肝臓で産生されたケトン体などの直接のエネルギー源の供給を受ける必要があると考えられていたが, 最近の研究によると, 星状細胞にはβ酸化系やケトン体産生系酵素が存在し, 肝臓と同様の調節機構を受けてケトン体を産生し, 乳酸とともに神経細胞にケトン体をエネルギーとして供給しているようである<sup>7)</sup>. 脳における脂肪酸β酸化, ケトン体産生系に関する報告は少なく, 今後のさらに検討が必要である. 神経系におけるケトン体の代謝は, ケトン食が難治性てんかんに効果があること<sup>8)</sup>, さらに神経変性疾患などにも有効であるという報告もあり<sup>10)</sup>, もっと注目すべき分野と考えられる.

2) 代謝経路

脂肪酸β酸化系は, 肝臓においてケトン体産生系とつながった代謝系で, 4つのステップが存在する(図1). 1)脂肪組織から切り出された長鎖遊離脂肪酸が, カルニチン回路を利用して肝細胞のミトコンドリア内にはいるステップ, 2)内膜結合型の極長鎖アシル-CoA脱水素酵素(VLCAD)と三頭酵素(TFP)からなる長鎖のβ酸化系というステップ, 3)ミトコンドリアマトリックス内の中鎖~短鎖のβ酸化系のステップ, 4)β酸化系から生成される大量のアセチル-CoAからHMG-CoAを介してアセト酢酸が産生されるケトン体産生系というステップである.

産生され血中に放出されたケトン体は肝外組織において取り込まれ, 3-ヒドロキシ酪酸は再びアセト酢酸に変換された後, SCOTによってアセトアセチル-CoA

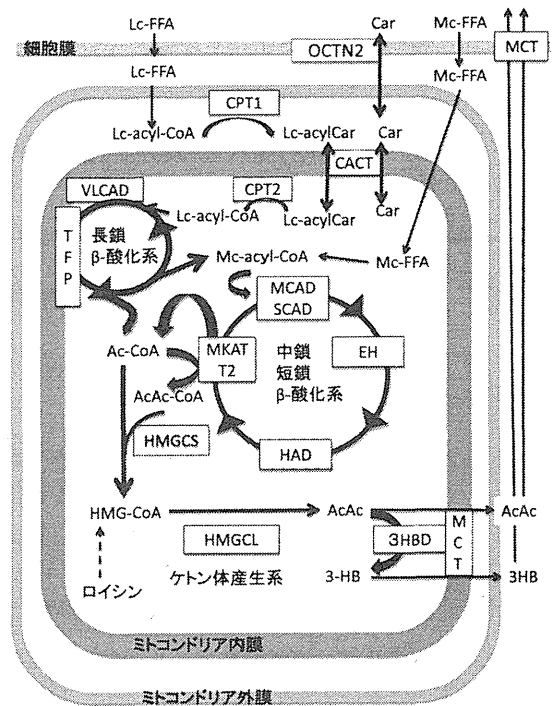


図1 肝細胞におけるミトコンドリア脂肪酸β酸化系とケトン体産生系. 酵素の略語については本文参照. β酸化系は長鎖であれ中鎖, 短鎖系であれ, 1回転でアセチル-CoA (Ac-CoA) が1つ産生される. MCTはモノカルボン酸トランスポーターでミトコンドリア膜にも細胞膜にも存在する. Lc-FFA, 長鎖遊離脂肪酸; Lc-acylCar, 長鎖アシルカルニチン; Lc-acyl-CoA 長鎖アシル-CoA; Mc-FFA, 中鎖遊離脂肪酸; Mc-acyl-CoA 中鎖アシル-CoA; Car, カルニチン; AcAc-CoA, アセトアセチル-CoA; HMG-CoA, 3-ヒドロキシメチル-3-グルタリル-CoA; AcAc, アセト酢酸; 3HB, 3-ヒドロキシ酪酸

と活性化され, アセチル-CoA となってTCAサイクルを介してエネルギーとなる. これがケトン体利用系である.

それぞれのステップについてももう少し詳細に記載する.

(a) カルニチン回路

上述のように長鎖脂肪酸はそのままミトコンドリア内膜を通過できない. そのためにカルニチン回路が存在し, 3つの酵素から成り立っている. すなわち長鎖脂肪酸は, ミトコンドリア膜間腔(外膜と内膜の間)でいったんアシル-CoAに活性化され, 次いでカルニチンバルミトイルトランスフェラーゼ1(CPT1)によってアシルカルニチンとなり, ミトコンドリア内膜を貫通するカルニチンアシルカルニチントランスポーラーゼ(CACT)によってミトコンドリア内に運び込まれ, そこで内膜に結合したカルニチンバルミトイルトランス



フェラーゼ2 (CPT2) によって再びアシル-CoAに変換される。そして初めてミトコンドリア膜結合型の長鎖β酸化系に接続される。CPT1には肝臓で主に発現するCPT1A, 筋肉で発現するCPT1B, 脳で発現するCPT1Cが知られているが、これまで欠損症の報告はCPT1Aのみである。カルニチン代謝にはそのほか細胞膜でカルニチンの取り込みにカルニチントランスポーター (OCTN2) が必要である。

#### (b) 長鎖β酸化系

β酸化系はアシル-CoA脱水素酵素, エノイル-CoAヒドラーゼ, 3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素, 3-ケトアシル-CoAチオラーゼという4ステップからなる。ミトコンドリア内膜に結合した長鎖のβ酸化系はVLCADと、そのほかの3つの酵素活性をもつTFPからなる系である。この系の発見には日本人研究者が大きく貢献している<sup>111)12)</sup>。

#### (c) 中鎖, 短鎖脂肪酸β酸化系

ミトコンドリアマトリックスに存在し, 中鎖アシル-CoA脱水素酵素(MCAD), 短鎖アシル-CoA脱水素酵素(SCAD), エノイル-CoAヒドラーゼ(EH), 3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素(HAD), 中鎖3-ケトアシル-CoAチオラーゼ(MKAT), アセトアセチル-CoAチオラーゼ(T2)から成る。アセトアセチル-CoAチオラーゼ(T2)はケトン体利用のチオラーゼと同じチオラーゼである。

#### (d) ケトン体産生系

脂肪酸β酸化系は大量のアセチル-CoAを産生し, これがチオラーゼ反応でアセトアセチル-CoAとなり, このアセチル-CoAとアセトアセチル-CoAがHMG-CoA合成酵素の働きで重合してHMG-CoAが産生される。このHMG-CoA合成酵素(HMGCS)は細胞質の酵素とは全く異なったミトコンドリアの酵素である。HMG-CoAからHMG-CoAリアーゼ(HMGCL)によってアセト酢酸が産生され, 一部はβヒドロキシ酪酸脱水素酵素(3HBD)反応によって3-ヒドロキシ酪酸に変換されて血中に放出される。

#### (e) ケトン体利用系

肝臓外組織はこの3-ヒドロキシ酪酸, アセト酢酸というケトン体を取り込んで, ミトコンドリアで3-ヒドロキシ酪酸は3HBD反応でふたたびアセト酢酸に変換されたのち, SCOTによってアセトアセチル-CoAに活性化され, そしてT2によりアセチル-CoAとなり, TCAサイクルを経てエネルギーとなる。

#### (f) モノカルボン酸トランスポーター (MCT)

上記ケトン体産生系と利用系において, アセト酢酸, 3-ヒドロキシ酪酸ともにマイナス荷電があり, 細胞膜やミトコンドリア膜を通過するためにモノカルボン酸トランスポーター (MCT) を必要とする<sup>13)</sup>。

MCTには水素イオン共役のSLC16Aファミリーに属するMCTs(MCT1~MCT4など)とNaイオン共役のSLC5Aに属するSMCT1, SMCT2が存在する<sup>14)</sup>。ともに乳酸, ピルビン酸, 分枝鎖αケト酸などと同じトランスポーターをケトン体も用いる。腎臓で近位尿細管の管腔面でSMCT1, SMCT2が乳酸, ケトン体などの再吸収系を形成している。上述の星状細胞と神経細胞の関連においては, 星状細胞がMCT2とSMCT2が発現しているのに対し神経細胞はMCT1とSMCT1を発現することが知られており, 星状細胞から神経細胞への乳酸, ケトン体の供給に関連していると考えられる<sup>13)~15)</sup>。ケトン体の放出, 取込みにおいては, これらの乳酸, 分枝鎖ケトン酸などの他のモノカルボン酸との競合となるため, これら他のモノカルボン酸の存在はケトン体代謝に影響を与える。

#### 3) 調節機構

脂肪酸β酸化系およびケトン体産生は, 血糖維持機構の一部としてホルモンにより産生の調節を受けている<sup>16)</sup>。主に脂肪組織からの遊離脂肪酸動員時のホルモン感受性リパーゼレベル, 肝細胞への脂肪酸の取り込みレベルである。さらにケトン体産生においては, 肝細胞でのミトコンドリアHMGCSレベルでも調節されている。インスリンは脂肪酸β酸化およびケトン体産生に抑制的に働き, グルカゴン, カテコールアミンは促進的に働く。

インスリンが十分分泌されている状態では, 食後のパターンがそうであるように, 低遊離脂肪酸, 低ケトン状態となる。また病的状態として高インスリン血症低血糖症がある。一方グルカゴン, カテコールアミンの産生亢進状態(飢餓, 発熱, 精神的および肉体的ストレス状態)は, 血中遊離脂肪酸, ケトン体ともに増加する。病的状態として脂肪酸β酸化およびケトン体産生系の異常があれば, 遊離脂肪酸は高値にも拘らず, ケトン体が産生されず, 高遊離脂肪酸, 低ケトン性低血糖をきたす。この血糖, 遊離脂肪酸, ケトン体の関係を理解することは低血糖の病態理解に重要である。

#### 長鎖脂肪酸β酸化異常症の一般的事項

長鎖脂肪酸β酸化系疾患群にはカルニチン回路異常, 長鎖β酸化系異常症を含む。疾患にかかわらず発症形態によって大きく3つの病型に分けられる<sup>17)</sup>。また治療も共通点が多い<sup>18)</sup>。そこで3つの病型と基本治療について述べ, その後個々の疾患について概説する。

##### 1) 基本3病型

(a) 新生児発症: 新生児期から乳児期早期に発症し, しばしば心筋障害を伴い高い致死率を示す。出生

後の適応ストレスによって、痙攣、心筋肥大、不整脈、無呼吸で発症し、非ケトン性低血糖症、高アンモニア血症、肝逸脱酵素およびCKの上昇がみられる。疾患によっては、脳、腎臓の奇形を伴い胎児期からの異常が示唆される症例もある。このタイプは新生児マスキリーニングで結果が判明したとき既に発症している可能性が高い。どの3病型でも遊離脂肪酸は動員されているのに対してケトン体の産生が障害されるため遊離脂肪酸/総ケトン体比は高くなる。

(b) 乳幼児型：新生児期には症状がみられないかもしくは嘔吐、哺乳低下など非特異的な症状が一過性にみられ回復し、その後しばらくは症状に気づかれないことが多い。生後数か月から2歳ごろまでに感染、下痢などに伴って、筋力低下、急性脳症様発作、あるいは突然死のような形態で発症する。急性期には非ケトン性低血糖症、高アンモニア血症、トランスアミナーゼ、CKの高値を示す。いわゆる肝臓型とも呼ばれ肝腫大(脂肪肝)を示すことが多い。発作時に肥大型心筋症を示すこともある。この初回発作を防ぐことが新生児マスキリーニングで診断する大きな目的となる。

(c) 遅発型(骨格筋型)：発症時期は、幼児期、学童期あるいは成人期になって初めて運動やストレス時に筋痛、横紋筋融解症で発症する。ミオグロビン尿、高CK血症(トランスアミナーゼ高値を伴う)を示す。腎不全を来さなければ生命予後は良好と考えられている。CKは数千から数万IU/Lにまで上昇する。乳児型の患者も治療によって低血糖発作をきたさなくなると、その後は骨格筋型の所見を示すようになる。

## 2) 基本的な治療法

長鎖脂肪酸酸化異常症における治療法の概略は以下の様である<sup>18)19)</sup>。

(a) 食事間隔の指導：低血糖発作を防ぐためには、頻回の食事などによって食事間隔に注意する必要がある。目安として新生児期は3時間以内、6か月まで4時間以内、1歳まで6時間以内、3歳まで8時間以内、4歳以上で10時間が推奨されている。

(b) MCTミルク、オイルの使用：長鎖脂肪酸代謝異常症では、中鎖～短鎖脂肪酸の代謝系が正常であるので中鎖脂肪酸の代謝は可能で、MCTミルク、オイルの使用は理にかなっている。症状、一般検査で異常のない症例では必ずしもMCTミルクを用いる必要はないと考えられるが、安全面を考えれば、必須脂肪酸強化MCTフォーミュラ(明治721)を用いて、母乳もしくは調整粉乳とMCTミルクを1:1の混合で投与する。低血糖時はMCTミルクのみにする。生後5か月以降はMCTミルクの割合を20%程度にする。離乳後はMCTオイルが利用できる。臨床症状がある場合はより強い食事介入が必要となる<sup>18)</sup>。

(c) コーンスターチ：糖原病で用いられるように、消化管からの吸収が緩やかな糖質であり、離乳後食事間隔が延びる場合、寝る前に2歳で20g(80kcal)程度を各種経腸栄養用のフレーバーで味付けして飲ませることは有効である。

(d) ストレス時の対応：発熱、下痢嘔吐など代謝ストレスがかかるような時にはできる限り脂肪酸代謝系が活性化されないようにするべきであり、糖分を十分にとるよう指導し、必要に応じて早期にグルコース輸液が望ましい。異化状態をさけて同化の方向に向けるために、中途半端な輸液にならないように注意する。グルコース投与量を6~8mg/kg/minとし、必要ならばインスリン併用(GI療法)も考慮する。発作時も原則的に同様である。

(e) L-カルニチン投与について：長鎖脂肪酸代謝異常症に対するL-カルニチンの投与については議論がある。L-カルニチン投与がβ酸化を促進させ、酵素異常のある患者にストレスになるという考え方である。一般原則は遊離カルニチンが低下していれば、補うのは理にかなっているということである。遊離カルニチンが15mmol/L以下にならないようにする。OCTN2欠損症では大量のL-カルニチン投与が必須である。

(f) その他：過剰な運動は横紋筋融解を引き起こすので避けることが望ましい。運動20分前に、MCT 0.5g/kgをとると運動後の代謝も改善し、通常の運動による筋痛、横紋筋融解が抑えられるという報告もある<sup>18)</sup>。

## 疾患各論

表に各疾患についてまとめてある。順に日本人症例の検討を含めて概説する。

### 1) カルニチン回路の異常症

(a) OCTN2欠損症(原発性全身性カルニチン欠乏症)：OCTN2はカルニチンの細胞膜での取り込みに重要なトランスポーターで、腎臓におけるカルニチンの再吸収の主要なトランスポーターである<sup>20)</sup>。OCTN2欠損は原発性全身性カルニチン欠乏症をきたす。長鎖脂肪酸酸化系異常症の乳幼児期発症型となるが、進行性心筋症、筋力低下で発症することも多い。日本の研究者が病態解明に貢献した疾患の1つである<sup>20)21)</sup>。日本において兄2名が8歳、2歳で死亡した家族歴をもつ5歳と6歳の兄弟例で、肥大型心筋症とミオパチーを呈し、カルニチン3g/日投与で血清フリーカルニチンレベルは低いものの30年間フォローされ健在であるという報告がある<sup>22)</sup>。このことから早期診断、早期L-カルニチン投与が重要な疾患である。

(b) CPT1欠損症：CPT1A欠損症が通常CPT1欠

損症と呼ばれる。肝臓において長鎖脂肪酸はミトコンドリア内に取り込まず、ミトコンドリア膜間腔でのアシルカルニチンが産生できないため、遊離カルニチンの欠乏も生じない。このため血中の遊離カルニチンは高く、長鎖アシルカルニチンは低値となり、CACT欠損症やCPT2欠損症とは異なったパターンと成る<sup>29)</sup>。CPT1欠損症では、原則肝臓における長鎖脂肪酸の酸化が障害されるが、心筋や骨格筋の長鎖脂肪酸酸化は障害されないため、一般には乳幼児期発症型（肝臓型）となるが、中には発症時期が早く新生児期の場合もある。タンデムマスによる新生児マススクリーニングでは1次疾患に分類され、初回発作以前に診断し、基本的な治療方針により治療すれば一般に予後はよいと考えられる<sup>29)</sup>。

(c) CACT欠損症：次のCPT2欠損症とともに、長鎖アシルカルニチンが形成されるにもかかわらず、ミトコンドリア内で長鎖アシル-CoAに変換できない疾患であり、臨床的、代謝的にこの2つの疾患は区別できない。また骨格筋、心筋も同様に障害されることからCPT1Aとは異なった病態をとる<sup>29)</sup>。すなわち遊離カルニチンが欠乏し、長鎖アシルカルニチンが蓄積する。CACT欠損症は全般的に新生児期発症型が多いようである<sup>29)</sup>。

(d) CPT2欠損症：上述の3つの病型をとりうるが、日本ではCPT2欠損症11例の報告で乳幼児発症型が7例、遅発型4例と遅めの発症が多い<sup>29)26)</sup>。CPT2欠損症、CACT欠損症では、タンデムマスによる新生児マススクリーニングでは、新生児期に見逃し例があることから2次疾患に分類されているが、C16+C18:1/C2比をとることで多くの症例でスクリーニングが可能と思われる<sup>29)</sup>。初回発作以前に診断し、基本的な治療方針により治療すれば、重篤な低血糖発作を防ぎ、予後はよいと考えられる。

## 2) 長鎖β酸化系異常症

### (a) VLCAD欠損症

日本人のVLCAD欠損症では、上記の3つの病型のうち成人発症の骨格筋型が多い。マススクリーニング結果によると頻度は13万人に1人である。新生児マススクリーニングでは1次疾患であり、日本人における変異について残存活性の程度に対する検討が比較的進んでおり、遺伝子変異解析が病型の推定に役立つ可能性がある<sup>29)31)</sup>。

欧米においては<sup>17)</sup>、新生児マススクリーニングで診断された症例は、10年までのフォローアップを通して無症状のまま経過している症例が多い。一部の症例で、強い運動後の筋症状を示す症例も報告されている。VLCAD欠損症患者数は、マススクリーニング以後に増加傾向にあるので、発症しない軽症型も多く診断さ

れている可能性がある。

日本においても症例が蓄積され、遺伝子型と臨床病型の関係がさらに明らかになれば、一部の症例では乳幼児期の食事制限が軽減できると思われる。

### (b) TFP欠損症

日本においてはタンデムマスのパイロットスタディでは症例はみつかっておらず、まだ日本人における頻度は不明である。これまでに日本で5例の報告があり、そのうち2例が新生児発症型、2例が乳幼児期発症型、1例が骨格筋型であり<sup>29)</sup>、比較的早期発症例が多い可能性がある。

欧米においても<sup>17)</sup>、半数が新生児スクリーニング時に臨床症状がみられ致死的な経過をとる症例が多い。それでも新生児スクリーニングはTFP欠損症の発症率や死亡率を低下させており<sup>32)</sup>、新生児期発症以外の症例ではスクリーニングは有効である。本症の特徴的な事項として、罹患胎児の母（母は保因者）の約5人に1人がAcute fatty liver of pregnancy (AFLP)やHypertension, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet (HELLP)症候群をきたすといわれており、注意が必要である<sup>17)</sup>。

本症では長期経過のなかで不可逆性進行性末梢神経障害、網膜障害が問題となり、これらは新生児スクリーニング、早期治療によっても防げないとされている<sup>17)</sup>。この合併症はTFP欠損症に特徴的である。

### 3) 中鎖～短鎖脂肪酸β酸化系異常症群

中鎖以降のβ酸化系異常症では、MCAD欠損症が代表的であり、エノイル-CoAヒドラーゼ欠損症の報告はなく、中鎖3-ケトアシル-CoAチオラーゼの欠損症は1例が報告されているが、遺伝子レベルでの確認がなされていない。ここでは以下の3疾患について述べる。

#### (a) MCAD欠損症

脂肪酸β酸化系異常症の代表的疾患で、前述のように乳幼児突然死症候群をきたすことから注目された疾患である<sup>3)</sup>。欧米では新生児スクリーニングでの頻度は1万人に1人の高頻度であり、実際マススクリーニング以前の発症頻度が約3万人に1名程度であることから、本症患者の半数以上は生涯無症状で過ごすと考えられている<sup>30)</sup>。稀に新生児期に発症するが、おおくは3歳以前(中央値で1～1.5歳)の乳幼児期に、感染や長時間飢餓を契機に、嘔吐、意識障害、痙攣など急性脳症様発作をきたし、突然死したり神経学的後遺症を残す。マススクリーニング導入以前は、診断症例の約1/4が発作時死亡し、1/3まではいかないが多くの症例で発達遅滞、行動異常など神経学的後遺症を認めていた<sup>30)</sup>。マススクリーニング導入以後、新生児期早期発症による死亡を除くと、発症例は著しく低下している<sup>30)</sup>。

脂肪酸β酸化系異常症

疾患名	原因遺伝子	日本人での頻度(文献5)	NBS対象	臨床病型	急性発作の特徴	急性発作時所見						
						血糖	FFA	TKB	FFA/TKB	NH3	CK	AST, ALT
OCTN2欠損症	SLC22A5 (OCTN2)	26万人に1人	2次	多くは乳幼児期発症型	長鎖脂肪酸酸化異常症の乳幼児期発症型参照。低血糖発作でなく、進行性心筋症や筋力低下で発症することも多い。	↓	↑	↓	↑↑	↑	↑	↑
CPT1欠損症	CPT1A (肝臓型アインザイム)	31万人に1人	1次	多くは乳幼児期発症型	新生児～幼児期に発症。尿管管性アシドーシスを呈することがある。筋症状は通常ない	↓	↑	↓	↑↑		⇒	↑
CACT欠損症	SLC25A20 (CACT)	不明数例の報告あり	2次	長鎖脂肪酸β酸化異常症基本3病型 1. 新生児期発症型 2. 乳幼児期発症型 3. 遅発型	基本3病型の本文記載参照	重症型、中間型では						
CPT2欠損症	CPT2	26万人の1人	2次			↓	↑	↓	↑↑	↑	↑	↑
VLCAD欠損症	ACADVL	16万人に1人	1次			骨格筋型では						
TFP欠損症	HADA, もしくは HADB	不明日本で5症例報告あり	1次			⇒	↑	↓	↑↑	⇒	↑↑	↑
MCAD欠損症	ACADM	10万人の1人	1次	多くは乳幼児期発症型(新生児期発症型もある)	感染、長時間の飢餓を契機に嘔吐、意識障害、痙攣などで発症。乳幼児突然死のパターンをとることもある。	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑
SCAD欠損症	ACADS		対象外		本症自体は無症状と考えるのが妥当とされている。							
HAD欠損症	HADH	127万人に1人	対象外	多くは高インスリン血症性低血糖型、まれにReye様症候群型	新生児期から3歳までに低血糖、痙攣、てんかんで発症し、低血糖は食事とは関連なく、高インスリン血症が認められる。	↓	↓	↓		軽度↑	⇒	⇒

ケトン体代謝異常症

ミトコンドリアHMGCS欠損症	HMGCS2	日本で報告なし	対象外		感染、長時間の飢餓を契機に低血糖性昏睡	↓	↑	↓	↑↑	⇒	⇒	↑→
HMGCL欠損症	HMGCL	日本で8家系報告あり	1次	半数新生児期発症、のこりは乳幼児期発症	感染、長時間の飢餓を契機に嘔吐、意識障害、痙攣などで発症。Reye様症候群	↓	↑	↓	↑↑	↑	⇒	↑
SCOT欠損症	OXCT1	日本で7家系報告有り	対象外	半数新生児期発症、のこりは乳幼児期発症	感染、長時間の飢餓を契機に嘔吐、意識障害、痙攣などで重症ケトアシドーシス	↓ → ↑	↑	↑↑	↓↓	⇒	⇒	⇒
T2欠損症	ACAT1	日本で7家系報告有り	2次	多くは乳幼児期発症	感染、長時間の飢餓を契機に嘔吐、意識障害、痙攣などで重症ケトアシドーシス	→ ↑ ↓	↑	↑↑	↓↓	↑ →	⇒	⇒

FC. 遊離カルニチン; AC. アシルカルニチン; アシルカルニチン分析の下線は新生児マススクリーニングで指標となるマーカー

アシルカルニチン分析	有機酸分析	急性期治療	間欠期治療	予後
FC ↓ AC ↓	発作時非ケトン性ジカルボン酸尿	急性期 L-カルニチン投与、低血糖、高アンモニア血症に対する治療	経口 L-カルニチン (100 ~ 400mg/kg/日)	診断されて、L-カルニチン継続治療を受ければ、良好
FC (C0) ↑ ↑ C0/(C16+ C18) ↑ ↑	発作時非ケトン性ジカルボン酸尿	低血糖、高アンモニア血症に対する治療	飢餓予防、頻回は乳、MCTミルク、コーンスターチの利用。	重篤な低血糖発作をきたさなければ予後は良好
FC(C0) ↓, C16 ↑ C18 : 1 ↑. C16 + C18 : 1 / C2 ↑ (2 疾患の区別は できず)	発作時非ケトン性ジカルボン酸尿	急性期 低血糖に対する治療、高アンモニア血症に対する治療	長鎖脂肪酸 β-酸化系の治療法の原則に従う。本文参照 TFP 欠損症はしばしば新生児発症重症型をとるため、早期の食事介入が必要とされ、母乳やMCTミルクでなく、必須脂肪酸強化MCTフォーミュラを主とするのが安全である。	重症早期発症型の予後は厳しい。中間型(乳幼児期発症)では、発作による低血糖などの後遺症がなければ、良好。 骨格筋型(成人発症)では生命予後は良好と考えられる。 TFP 欠損では長期経過のなかで末梢神経障害、網膜障害をきたし、それを現在防げない。
C14 : 0 ↑, C14 : 1 ↑, C16 ↑, C18 : 1 ↑	発作時非ケトン性ジカルボン酸尿			
C16 : 0 ↑ C16 : 1 ↑, C18 : 0 ↑, C18 : 1. C16-OH ↓, C18-OH ↑	発作時 非ケトン性ジカルボン酸、3ヒドロキシカルボン酸尿			
C6 ↑, C8 ↑, C10 ↑	ヘキサノイルグリシン、スベリルグリシン排泄増加、NKDC	急性期 低血糖、高アンモニア血症に対する治療	飢餓の予防が重要、頻回は乳、コーンスターチの利用、MCTは使用しない。	初回発作で突然死することが比較的多い。3~4歳以降は急性低血糖発作はまれ。しかし成人での発症死亡例もまれがある。
C4 ↑	エチルマロン酸排泄増加	無治療	無治療(空腹を避けるのは一般的注意)	予後良好
C4-OH ↑	3-ヒドロキシグルタル酸の排泄増加	低血糖症の治療、ジアゾキサイド	低血糖症の予防、ジアゾキサイド	低血糖症による後遺症をきたしている症例が多い。
非特異的	非ケトン性ジカルボン酸尿	低血糖症の治療	空腹を避け、異化亢進時糖質の補給	これまでの報告例は予後良好。低血糖発作の後遺症の有無による。
C5-OH ↑, C6-DC ↑	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸、3-メチルグルタコン酸、3-メチルグルタル酸などの特徴的有機酸排泄(診断値あり)	低血糖症の治療	空腹を避け、異化亢進時糖質の補給。軽度の蛋白制限(自然蛋白1.5~2.0g/kg/日)、L-カルニチン30~100mg/kg/日	低血糖発作の後遺症で、てんかん、発達遅滞をきたしている症例が多い。成人発症例もあり、10歳以降も注意必要
非特異的	ケトン性ジカルボン酸尿	ケトアシドーシスの治療(グルコースの十分な輸液)	空腹を避け異化亢進時に糖質の補給	ケトアシドーシスの後遺症なければ予後良好。10歳以降は発作をきたしにくくなる。
C5 : 1 ↑, C5-OH ↑ (典 型例) 本文参 照	2-メチル-3ヒドロキシ酪酸、チグリルグリシン(典型例) 本文参照	ケトアシドーシスの治療(グルコースの十分な輸液)	空腹を避ける。異化亢進時糖質の補給。軽度の蛋白制限(自然蛋白1.5~2.0g/kg/日)、L-カルニチン30~100mg/kg/日	ケトアシドーシスの後遺症なければ予後良好。10歳以降は発作をきたしにくくなる。

日本においても急性発症して診断された症例7例中1例が突然死、4例が神経学的後遺症をきたし、2例のみが正常発達をしているのに対し、新生児マススクリーニングのパイロット研究で発見された症例は9名全例が無症状のまま経過している<sup>39)30)</sup>。このことからMCAD欠損症はスクリーニングして発症させないことが重要であることは明らかである。

#### (b) HAD欠損症

疾患名に混乱があり、文献検索において注意を要する。短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素(SCHAD)欠損症と記載されたり、本酵素は基質特異性からは中鎖～短鎖の3-ヒドロキシアシル-CoAを基質にすることから中鎖～短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素(M/SCHAD)欠損症と記載されることもある。現在では単純に3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素(HAD)欠損症と記載されることが多い。本症では高インスリン血性低血糖症をきたす<sup>37)</sup>。本酵素蛋白はグルタミン酸脱水素酵素に対して抑制作用があり(酵素機能としてではなくmoonlighting機能)、本酵素蛋白の完全欠損はその抑制作用がなくなることから、膵臓β細胞におけるグルタミン酸脱水素酵素活性が促進し、高インスリン血性低血糖症をきたすという機序が提唱されている<sup>38)</sup>。残存活性があり、HAD蛋白が残存する症例では、脂肪酸代謝異常に基づくReye様症候群をきたしたという報告がある<sup>39)</sup>。

#### (c) SCAD欠損症

欧米において高頻度にスクリーニングで見つかったが、スクリーニングでみつかった症例は無症状であり、これまでSCAD欠損症として報告されてきた多彩な症状、所見は本症と無関係である可能性が高いとされている<sup>40)</sup>。現在日本を含め多くの国でスクリーニング対象疾患から外れている。

#### 4) ケトン体産生系疾患群

低血糖を防ぐために、飢餓時、ストレス時にケトン体産生が起こるべき状態で、ケトン体産生ができないために、非ケトン性低血糖症をきたしてしまう。臨床像としては低血糖性痙攣、昏睡などである。診断治療指針は<http://www.ketone.jp/>に掲載されている。

#### (a) ミトコンドリアHMGCS欠損症

脂肪酸β酸化由来のHMG-CoAは産生されないが、ロイシン由来のHMG-CoAは産生されるため全くケトン体が産生できないわけではない。生後7か月～6歳に、異化の亢進する胃腸炎などで低血糖発作をきたす<sup>41)</sup>。低血糖発作時の遊離脂肪酸/総ケトン体比はかるく20を超えている。長鎖脂肪酸酸化系異常症と異なり、骨格筋所見(筋痛、高CK血症、ミオグロビン尿)は通常ない。報告例ではわずか1～2回の発作で診断されているが、アシルカルニチン分析や尿有機酸分析で

特徴的所見がないため見逃される可能性が高い<sup>41)</sup>。アシルカルニチン分析に異常をきたさないため、新生児マススクリーニングでは見つけることはできない疾患である。

#### (b) HMGCL欠損症

HMG-CoAからケトン体を生成する反応が障害される疾患である。HMG-CoAはβ酸化のみならずロイシン代謝経路からも由来しているため、ケトン体産生の障害と共に、ロイシン中間代謝産物の蓄積がみられる。日本ではこれまでに8家系が報告されている<sup>42)~44)</sup>。本症の急性期には重篤な低血糖発作と、高アンモニア血症、アシドーシス、肝機能障害などがみられ、いわゆるReye様症候群様の臨床症状を呈する。発作中に死亡したり、その後遺症としててんかんや発達障害、脳白質病変を来すことが多い。発作間欠期は無症状である。ケトン生成が障害されているため、低血糖発作時の遊離脂肪酸/総ケトン体比は非常に高い。この疾患においては新生児マススクリーニングの1次対象疾患になっているが、約半数は新生児期とくに生後1週以内に最初の低血糖発作をきたす。しかしそのほかの半数は乳児期に飢餓、感染などに伴って発症するため、マススクリーニングによって重篤な発作を防げる可能性がある。他のケトン体代謝異常症と異なり、10歳を超えても強い低血糖発作が起こったり、成人で発症した例なども報告されており、フォローが重要である<sup>45)46)</sup>。

#### 5) ケトン体利用系疾患群

この疾患群については2007年の本誌の総説<sup>1)</sup>に詳細を記載しておりそちらを参照願いたい。とくに重要な点についてのみ記載する。

通常ケトン体産生の高まる飢餓、発熱などのストレス時に、肝臓においてケトン体は産生されるにもかかわらず、肝外組織でケトン体が代謝できないために、ケトアシドーシスを発症する。一般には低血糖を来すより早くアシドーシスが進行し、低血糖を示す例は少ない。一方ストレス反応により高血糖を呈することもある。

通常、発作時には血液ガスでpH<7.1、BE-20近い著しいケトアシドーシスで、多呼吸を伴う。急性期症状としては、意識障害、多呼吸、嘔吐などである。発作間欠期は全く無症状である。これら疾患のケトアシドーシス発作治療においては、初期治療に続き(できるだけ早く糖をいれること)、維持輸液量を10%ブドウ糖濃度と適切な電解質濃度の輸液として持続投与する。経過を観察して血糖は正常上限値を目標に管理する。血糖が高めになれば、インスリンを0.025～0.05U/kg/時で開始することも考慮する。アシドーシスの補正はpHが著しく低い場合(pH<7.1など)に考慮する。重要なのは十分な糖質でケトン体産生を抑えるこ

とである。診断治療指針は、<http://www.ketone.jp/>に掲載されている。

#### (a) SCOT 欠損症

SCOT 欠損症はケトン体であるアセト酢酸からアセトアセチル-CoA への反応が障害される。新生児期に約半数が発症し、残りは生後5~6か月から2歳ごろに感染症や飢餓に伴って発症する。本症では特徴的なアシルカルニチンパターンはなく、タンデムマスによる新生児マススクリーニングではスクリーニングされない。残存活性のないタイプでは、肝外組織ミトコンドリアにおけるケトン体の利用が全くできず、持続性ケトosis、ケトン尿がみられ、診断的価値がある<sup>47)</sup>。しかし残存活性を持つタイプでは、発作時のケトアシドーシスは残存活性のない症例と同様に重篤であるが、発作間欠期は持続性ケトosisが認められない<sup>48)49)</sup>。予後は重篤なケトアシドーシス発作中の死亡もしくは後遺症が残るかどうかにかかっている。

#### (b) $\beta$ ケトチオラーゼ (T2) 欠損症

ケトン体利用におけるアセトアセチル-CoA のアセチル-CoA への開裂とイソロイシンの中間代謝が障害される。新生児期の発症はまれで、これまで世界で100例近い症例の蓄積の中で1例のみが新生児期に軽度のケトアシドーシスで診断されている<sup>50)</sup>。ほとんどは生後5~6か月から2歳頃に感染症や飢餓に伴って重篤なケトアシドーシスで発症する。本症の予後も初回発作時の死亡や後遺症がなければ良好である。このため新生児マススクリーニングで診断されると、大きな発作を未然に防ぐことが可能な疾患であり、予後を改善できる疾患である。

T2 欠損症は、日本のタンデムマス・スクリーニングで2次対象疾患にリストされている。日本のT2欠損症はこれまで7家系9症例が報告されているが、日本では1例を除いて残存活性を持つ変異を少なくとも1アレルに持ち、軽症変異型である<sup>51)52)</sup>。この軽症変異型では発作間欠期の尿有機酸所見が軽微で見逃される可能性のあること、また発作時でさえ、特徴的な有機酸の1つであるチグリルグリシンが検出されない場合があること、タンデムマスによるアシルカルニチン分析で特徴的なC5:1, C5-OHのアシルカルニチンが上昇しない症例もあることがわかっている<sup>51)52)</sup>。このようにT2欠損症では、完全欠損ではアシルカルニチン分析で明らかな異常が認められるが、残存活性を持つタイプは新生児マススクリーニングで見逃し例となる可能性が高いため、2次スクリーニング疾患になっている。

実際にアメリカ、オーストラリアなどでは新生児マススクリーニングによって診断された症例がその後発作を来さずに経過している。一方アメリカにおいて新

生児タンデムマススクリーニングで見逃され、のちにケトアシドーシス発作を来して診断された症例が報告され、注意喚起がなされている<sup>53)</sup>。

残存活性がなく典型的な症例は新生児マススクリーニングでC5:1, C5-OHの高値で検出され、尿有機酸分析ではほぼ確実に診断可能であり、必要最小限の介入で重篤な発作を来さないで正常発達が可能であることから、このような症例だけでも見つけるというスタンスもあっていいのではないかと考える。逆に新生児タンデムマススクリーニングを受けているから、乳児期以降に重篤なケトアシドーシスを来した症例で、T2欠損症は否定的であるとは言えないことに注意が必要である。

#### 終わりに

脂肪酸代謝異常症とケトン体代謝異常症は、著しい低血糖を伴う脳症様症状、もしくは著しいケトアシドーシス発作で発症する疾患であり、タンデムマススクリーニングにより発症前から介入することで予後を変えうる疾患が多い。今後スクリーニングが広く行われるにあたり、その診断治療ガイドラインの整備が必要となってくると考えられる。また脂肪酸 $\beta$ -酸化系障害に対してベザフィブラート投与が有効であるということが細胞レベル、および臨床レベルで報告されてきており<sup>54)~56)</sup>。今後どのような症例に対して使用していくのかの検討が必要である。

謝辞 ご校閲いただきました岐阜大学近藤直実教授、鳥根大学山口清次教授に深謝いたします。本稿の機会を与えていただきました日本先天代謝異常学会理事長の遠藤文夫先生に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 深尾敏幸. ケトン体代謝異常症：特にアセトン血性嘔吐症と鑑別すべきサクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症を中心に. 日本小児科学会雑誌 2007; 111: 723-739.
- 2) Mitchell GA, Fukao T. Chapter 102 Inborn errors of ketone body metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (8th edition). New York: McGraw-Hill, 2001: 2327-2356.
- 3) Matsubara Y, Narisawa K, Tada K, et al. Prevalence of K329E mutation in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene determined from Guthrie cards. Lancet 1991; 338: 552-553.
- 4) 山口清次. タンデムマスを導入した新生児スクリーニングの新時代. 小児保健研究 2006; 65: 725-732.
- 5) 山口清次. 総括研究報告書 タンデムマス導入に

- よる新生児マススクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業 平成23年度総括・分担研究報告書. 2012 : 3-14.
- 6) Fukao T, Song XQ, Mitchell GA, et al. Enzymes of ketone body utilization in human tissues : protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A (CoA) : 3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases. *Pediatr Res* 1997 ; 42 : 498-502.
  - 7) Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, et al. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 1991 ; 56 : 1376-1386.
  - 8) Guzmán M, Blázquez C. Ketone body synthesis in the brain : possible neuroprotective effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 ; 70 : 287-292.
  - 9) McNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem* 2012 ; 121 : 28-35.
  - 10) Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev* 2009 ; 59 : 293-315.
  - 11) Izai K, Uchida Y, Orii T, et al. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 1027-1033.
  - 12) Uchida Y, Izai K, Orii T, et al. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 1034-1041.
  - 13) Morris ME, Felmlee MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters : characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J* 2008 ; 10 : 311-321.
  - 14) Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J* 2008 ; 10 : 193-199.
  - 15) Martin PM, Gopal E, Ananth S, et al. Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na<sup>+</sup>-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. *J Neurochem* 2006 ; 98 : 279-288.
  - 16) Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism : on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 ; 70 : 243-251.
  - 17) Spiekerkoetter U. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders : clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010 ; 33 : 527-532.
  - 18) Spiekerkoetter U, Lindner UM, Santer R, et al. Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects : consensus from a workshop. *J Inherit Metab Dis* 2009 ; 32 : 498-505.
  - 19) Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R. Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects : results from a workshop. *J Inherit Metab Dis* 2009 ; 32 : 488-497.
  - 20) Nezu J, Tamai I, Oku A, et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 91-94.
  - 21) Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, et al. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mol Genet* 1999 ; 8 : 2247-2254.
  - 22) Kishimoto S, Suda K, Yoshimoto H, et al. Thirty-year follow-up of carnitine supplementation in two siblings with hypertrophic cardiomyopathy caused by primary systemic carnitine deficiency. *Int J Cardiol* 2012 ; 159 : e14-15.
  - 23) Longo N, Amat di, San Filippo C, et al. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006 ; 142C : 77-85.
  - 24) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, et al. Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain Dev* 2010 ; 32 : 409-411.
  - 25) Yasuno T, Kaneoka H, Tokuyasu T, et al. Mutations of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) in Japanese patients with CPT II deficiency. *Clin Genet* 2008 ; 73 : 496-501.
  - 26) 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.
  - 27) Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Waterham HR, et al. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Mol Aspects Med* 2004 ; 25 : 521-532.
  - 28) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀 友博, 他. カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2欠損症のろ紙血血清のアシルカルニチンプロファイルの経時的変化. *日児誌* 2011 ; 115 : 956-960.
  - 29) Fukao T, Watanabe H, Orii K, et al. Myopathic form of very-long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency : evidence for temperature-sensitive mild mutations in both mutant alleles in a Japanese girl. *Pediatr Res* 2001 ; 49 : 227-231.
  - 30) Takusa Y, Fukao T, Kimura M, et al. Identification and characterization of temperature-sensitive mild mutations in 4 VLCAD deficient patients with non-severe childhood form. *Mol Genet Metab* 2002 ; 75 : 227-234.
  - 31) Ohashi Y, Hasegawa Y, Murayama K, et al. A new diagnostic test for VLCAD deficiency using



- immunohistochemistry. *Neurology* 2004 ; 62 : 2209—2213.
- 32) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, et al. Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab* 2008 ; 95 : 46—51.
- 33) Sander J, Sander S, Steuerwald U, et al. Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. *Mol Genet Metab* 2005 ; 85 : 108—114.
- 34) Schatz UA, Ensenauer R. The clinical manifestation of MCAD deficiency : challenges towards adulthood in the screened population. *J Inherit Metab Dis* 2010 ; 33 : 513—520.
- 35) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, et al. A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) : c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD. *Mol Genet Metab* 2009 ; 96 : 77—79.
- 36) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, et al. Clinical and Molecular Aspects of Japanese Children with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Mol Genet Metab* in press.
- 37) Martins E, Cardoso ML, Rodrigues E, et al. Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency : the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. *J Inherit Metab Dis* 2011 ; 34 : 835—842.
- 38) Li C, Chen P, Palladino A, et al. Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 31806—31818.
- 39) Bennett MJ, Russell LK, Tokunaga C, et al. Reye-like syndrome resulting from novel missense mutations in mitochondrial medium- and short-chain l-3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase. *Mol Genet Metab* 2006 ; 89 : 74—79.
- 40) van Maldegem BT, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2010 ; 33 : 507—511.
- 41) Aledo R, Mir C, Dalton RN, et al. Refining the diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2006 ; 29 : 207—211.
- 42) Muroi J, Yorifuji T, Uematsu A, et al. Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) deficiency. *Hum Genet* 2000 ; 107 : 320—326.
- 43) 高橋朋子, 関口隆憲, 岡村和美, 他. 生後3か月で発症した3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA リアーゼ欠損症の1例. *日児誌* 2008 ; 112 : 1249—1254.
- 44) 深尾敏幸. ケトン体代謝異常症の患者調査. 酵素遺伝子診断. 総合研究報告書 先天性ケトン体代謝異常症(HMG-CoA 合成酵素欠損症, HMG-CoA リアーゼ欠損症,  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症, SCOT 欠損症)の発症形態と患者数の把握, 診断治療指針に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成22~23年度総合研究報告書. 2012 : 17—21.
- 45) Reimão S, Morgado C, Almeida IT, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency : Initial presentation in a young adult. *J Inherit Metab Dis* 2009 Feb 24. doi : 10.1007/s10545-009-1048-5.
- 46) Leung AA, Chan AK, Ezekowitz JA, et al. A Case of Dilated Cardiomyopathy Associated with 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A (HMG CoA) Lyase Deficiency. *Case Report Med* 2009 ; 2009 : 183125.
- 47) Sakazaki H, Hirayama K, Murakami S, et al. A new Japanese case of succinyl-CoA : 3-ketoacid CoA-transferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1995 ; 18 : 323—325.
- 48) Fukao T, Shintaku H, Kusubae R, et al. Patients homozygous for the T435N mutation of succinyl-CoA : 3-ketoacid CoA transferase (SCOT) do not show permanent ketosis. *Pediatr Res* 2004 ; 56 : 858—863.
- 49) Fukao T, Ishii T, Amano N, et al. A neonatal onset succinyl-CoA : 3-ketoacid CoA transferase (SCOT)-deficient patient with T435N and c.658-666dupAACGTGATT p.N220\_I222dup mutations in the OXCT1 gene. *J Inherit Metab Dis* 2010 ; 33 : 636.
- 50) Fukao T, Scriver CR, Kondo N. The clinical phenotype and outcome of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency (beta-ketothiolase or T2 deficiency) in 26 enzymatically proved and mutation-defined patients. *Mol Genet Metab* 2001 ; 72 : 109—114.
- 51) Fukao T, Zhang G-X, et al. The mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency in Japanese patients : urinary organic acid and blood acylcarnitine profiles under stable conditions have subtle abnormalities in T2-deficient patients with some residual T2 activity. *J Inherit Metab Dis* 2003 ; 26 : 423—431.
- 52) Fukao T, Maruyama S, Ohura T, et al. Three Japanese patients with beta-ketothiolase deficiency whoshare a mutation, c.431A>C(H144P) in ACAT1 : subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. *JIMD reports* 2012 ; 3 : 107—115.
- 53) Sarafoglou K, Matern D, Redlinger-Grosse K, et al. Siblings with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency not identified by newborn screening. *Pediatrics* 2011 ; 128 : e246—250.
- 54) Bonnefont JP, Bastin J, Laforêt P, et al. Long-term follow-up of bezafibrate treatment in patients with the myopathic form of carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency. *Clin Pharmacol Ther* 2010 ; 88 : 101—108.
- 55) Bonnefont JP, Bastin J, Behin A, et al. Bezafibrate for an inborn mitochondrial beta-oxidation defect. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 838—840.
- 56) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, et al. Bezafib-

brate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders : Evalu-

ation by in vitro probe acylcarnitine assay. Mol Genet Metab 2012 in press.

---

## ORIGINAL ARTICLE

# Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes

Jun Kido<sup>1</sup>, Kimitoshi Nakamura<sup>1</sup>, Shirou Matsumoto<sup>1</sup>, Hiroshi Mitsubuchi<sup>1</sup>, Toshihiro Ohura<sup>2</sup>, Yosuke Shigematsu<sup>3</sup>, Tohru Yorifuji<sup>4</sup>, Mureo Kasahara<sup>5</sup>, Reiko Horikawa<sup>6</sup> and Fumio Endo<sup>1</sup>

Many reports have been published on the long-term outcome and treatment of hepatic glycogen storage diseases (GSDs) overseas; however, none have been published from Japan. We investigated the clinical manifestations, treatment, and prognosis of 127 hepatic GSD patients who were evaluated and treated between January 1999 and December 2009. A characteristic genetic pattern was noted in the Japanese GSD patients: most GSD Ia patients had the g727t mutation, and many GSD Ib patients had the W118R mutation. Forty-one percent (14/34) of GSD Ia patients and 18% (2/11) of GSD Ib patients of ages  $\geq 13$  years 4 months had liver adenoma. Among subjects aged 10 years, 19% (7/36) of the GSD Ia patients and none of the GSD Ib patients had renal dysfunction. The mean height of male GSD Ia patients aged  $\geq 18$  years was  $160.8 \pm 10.6$  cm ( $n=14$ ), and that of their female counterparts was  $147.8 \pm 3.80$  cm ( $n=9$ ). Patients with hepatic GSDs develop a variety of symptoms but can survive in the long term by diet therapy, corn starch treatment and supportive care. Liver transplantation for hepatic GSDs is an important treatment strategy and can help improve the patients' quality of life. *Journal of Human Genetics* (2013) 0, 000–000. doi:10.1038/jhg.2013.17

**Keywords:** adenoma; glycogen storage disease; g727t; height; hepatocellular carcinoma; liver transplantation; renal dysfunction; W118R

## INTRODUCTION

Glycogen storage diseases (GSDs) are inherited metabolic diseases caused by the deficiency of enzymes regulating glycogenolysis or gluconeogenesis. As glycogen primarily accumulates in the liver and muscle, the disorders of glycogen degradation affect the liver, muscles or both. Hypoglycemia is the main symptom of hepatic GSDs, whereas muscle weakness or elevated muscle enzyme is the main symptom of myopathic GSDs. Hepatic GSDs, except for GSD IXa, are autosomal recessive, and GSD IXa is an X-linked recessive disorder. GSD Ia, GSD III and GSD IXa account for 80% of hepatic GSDs.

GSD Ia (Mendelian Inheritance in Man (MIM) no. 232200) is caused by a deficiency of glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) in the endoplasmic reticulum. GSD Ib (MIM no. 232220) is caused by a deficiency of glucose-6-phosphate transporter, which leads to the dysfunction of glucose-6-phosphatase in the endoplasmic reticulum.

GSD Ia is the most common GSD, and its frequency is 1/100 000 to 1/400 000 births in the general Caucasian population; GSD Ib is much less frequent than GSD Ia. The manifestations of GSD Ia are short stature, hypoglycemia, hepatomegaly, hyperlipidemia, hyperuricemia, hyperlactacidemia, hepatoadenoma, renal disorder<sup>1,2</sup> and

hepatocellular carcinoma.<sup>3,4</sup> Most GSD Ib patients have neutropenia and neutrophil dysfunction in addition to these symptoms. GSD III (MIM no. 232400) is caused by a deficiency of the debranching enzyme, which consists of amylo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.33) and oligo-1,4-1,4-glucantransferase (EC 2.4.1.25). The incidence of GSD III has been reported to be 1 per 83 000 live births in Europe and 1 per 100 000 live births in North America.<sup>5</sup> There are two major GSD III subtypes: GSD IIIa, which affects both the liver and muscle and accounts for 80% of all GSD III cases, and GSD IIIb, which affects only the liver and comprises approximately 15% of them.<sup>6</sup> The manifestations of GSD III are similar to those of GSD Ia, and many patients with GSD IIIa have hypertrophic cardiomyopathy.<sup>7</sup>

GSD IV (MIM no. 232500) is caused by a deficiency of amylo-1,4 to 1,6-transglucosidase (EC 2.4.1.18), which leads to the absence of branched glycogen. GSD IV, which is the most severe type of GSD, represents 0.3% of all GSDs.<sup>8</sup> This disease rapidly progresses to cirrhosis early in life and causes death between 3 and 5 years of age because of liver failure.<sup>9</sup> If signs of GSD IV, such as cervical cystic hygroma, are detected,<sup>8</sup> the patients are likely to die in the neonatal period. The effective treatment for progressive GSD IV is liver

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan; <sup>2</sup>Division of Pediatrics, Sendai City Hospital, Sendai, Japan; <sup>3</sup>School of Nursing, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan; <sup>4</sup>Department of Pediatric Endocrinology and Metabolism, Children's Medical Center, Osaka City General Hospital, Osaka, Japan; <sup>5</sup>Department of Transplantation Surgery, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan and <sup>6</sup>Department of Endocrinology and Metabolism, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Correspondence: Dr K Nakamura, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto City, Kumamoto Prefecture 860-8556, Japan.

E-mail: nakamura@kumamoto-u.ac.jp

Received 27 November 2012; revised 14 February 2013; accepted 15 February 2013

transplantation.<sup>10</sup> GSD VI (MIM no. 232700), which is rarer and milder than the other hepatic GSDs, is caused by a deficiency of glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1) in the liver. GSD IXa (MIM no. 306000) is caused by a deficiency of phosphorylase kinase  $\alpha 2$  (PHKA2)—a subunit of phosphorylase kinase (EC 2.7.11.19), which consists of four subunits, namely,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ . The clinical course of GSD IXa is benign, and most adult patients are asymptomatic.<sup>11</sup> With aging, clinical and biochemical abnormalities gradually disappear. The other subtypes of GSD IX include subtypes caused by a deficiency of phosphorylase kinase  $\beta$ , phosphorylase kinase  $\gamma$  or  $\delta$ , or muscle phosphorylase kinase. The Fanconi–Bickel syndrome, GSD XI (MIM no. 227810), is caused by a deficiency of glucose transport 2 and is characterized by hepatorenal glycogen accumulation and proximal renal tubular dysfunction.<sup>12</sup>

The treatment for these hepatic GSDs comprises the prevention of hypoglycemia. The basic treatment is the consumption of frequent meals and uncooked cornstarch.<sup>13–15</sup> Moreover, restriction of the intake of sugars, such as fructose, galactose, sucrose and lactose, is important mainly for GSD I.

Complete blood glucose control by these measures is unlikely to ameliorate complications, such as hyperuricemia and hyperlipidemia.<sup>16</sup> GSD patients are administered allopurinol for hyperuricemia and statin, fibrates or niacin formulations for hyperlipidemia.<sup>17,18</sup> Administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor or/and angiotensin receptor blocker, which have a renoprotective effect, is recommended for GSDs with possible renal complications.<sup>19</sup> Gene therapy can be an effective as a radical treatment measure for GSDs.<sup>20,21</sup> However, the definitive treatment of GSDs is only liver transplantation.<sup>22–25</sup>

Many reports have been published overseas on the long-term outcome and treatment of GSD patients.<sup>11,17,26–28</sup> However, no report has yet been published on the long-term outcome of GSDs in Japan, wherein GSD Ia with a mutation causing mild symptoms has been detected in many cases. We studied the current status of clinical manifestations, treatment, and long-term outcome of hepatic GSDs in Japan.

## MATERIALS AND METHODS

### Study patients

In 2009, we sent a questionnaire to 928 Japanese institutions, including the departments of pediatrics, endocrinology and metabolism, neonatology, genetics, and transplant surgery, asking doctors if they had diagnosed or provided medical care to hepatic GSDs patients. Each institution was the medical center for a locality and had 300 or more beds. Of the 928 institutions, 668 (72%) responded. Of these 668 institutions, 97 had treated patients with GSDs. A second questionnaire was then sent to these 97 institutions in 2009, and responses were received from 53 (55%) of them. On the basis of the received reports, 127 cases of GSDs diagnosed and treated between January 1999 and December 2009 were studied. We excluded patients who were not definitely diagnosed and considered patients visiting multiple institutions as single patients. The 127 cases of GSDs (types Ia, Ib, III, IV, VI, IXa and others) were diagnosed on the basis of clinical manifestations, family history, enzyme activity, metabolite analysis (75 g OGTT test or/and glucagon test) and/or DNA analysis. This study was approved by the ethical committee of the Faculty of Life Science, Kumamoto University.

The definition of clinical manifestations of GSD applied in this study was the same as that proposed by Smit *et al.*<sup>27</sup> In addition, we used the following definitions. Hyperlactacidemia was defined as a blood lactate level  $>2.2$  mmol l<sup>-1</sup>. Hyperuricemia was defined by a history of receiving drugs for hyperuricemia and/or blood uric acid level  $>420$   $\mu$ mol l<sup>-1</sup>. Hyperlipidemia was defined by a history of medical treatment for hyperlipidemia, blood total cholesterol level  $>5.9$  mmol l<sup>-1</sup>, or blood total triglyceride level  $>1.7$  mmol l<sup>-1</sup>. Mental retardation was diagnosed if the patient's intelligence quotient was

$<70$ , as per standardized tests, such as the Wechsler Intelligence Scale for Children and the Wechsler Adult Intelligence Scale. Proteinuria was defined by protein levels  $>30$  mg dl<sup>-1</sup> in 1 spot urea test or  $>500$  mg day<sup>-1</sup>. Renal dysfunction was defined by blood creatinine levels  $>90$   $\mu$ mol l<sup>-1</sup>. Increased susceptibility to infection was defined as a neutrophil count of  $<1500/\mu$ l and/or hospitalization more than three times a year because of infection.

### Statistical analysis

The age at onset of hepatic GSD patients was expressed in terms of the median and interquartile range, and the age of onset was analyzed by the Mann–Whitney *U*-test of IBM SPSS Statistics Version 19.<sup>29</sup> A *P*-value of  $<0.05$  was considered statistically significant. The height of hepatic GSD patients was expressed in terms of mean  $\pm$  s.d. values. Kaplan–Meier curves of estimated survival rate were generated by SPSS.

## RESULTS

### Age at onset and methods for definitive diagnosis of hepatic GSDs

Table 1 indicates the age, onset age and methods used for definitive diagnosis in each of the 127 cases of hepatic GSD. GSD Ib and GSD IV patients manifested symptoms earlier than those with other types of GSD (GSD Ia vs GSD Ib,  $P=0.001$ ; GSD Ia vs GSD IV,  $P=0.022$ ; GSD Ia vs GSD XIa,  $P=0.002$ ). Enzyme activity was measured in 50% (64/127) of the patients with GSDs, and genotype analysis was performed in 50% (63/127); genotypes could be identified in 40% (51/127) of the patients with GSDs. DNA analysis was performed in the case of 52 patients with GSD Ia, 7 patients with GSD Ib, 1 patient with GSD III, 1 patient with GSD VI, 5 patients with GSD IXa and 2 patients with GSD XI. Thereafter, identifiable mutations were detected at a rate of 79% (41/52) in GSD Ia patients, 86% (6/7) in GSD Ib patients, 40% (2/5) in GSD IXa patients and 100% (2/2) in GSD XI patients. Of the GSD Ia patients with recorded identifiable mutations, 81% (29/36) had g727t homozygote mutations and 17% (6/36) had compound heterozygotes with g727t mutations. Of the GSD Ib patients with recorded identifiable mutation, 83% (5/6) had homozygote or compound heterozygote mutations of W118R. Eight patients with GSD Ia, one patient with GSD IXa and one patient with GSD XI were diagnosed by DNA-based and enzymatic analyses.

### Clinical manifestations of hepatic GSD

Table 2 indicates the frequency of clinical manifestations in hepatic GSD patients. In GSD Ia patients, growth retardation (78%; 51/65), hypoglycemia (69%; 45/65), hyperuricemia (88%; 57/65) and hyperlipidemia (94%; 61/65) were observed at the frequency of  $>50\%$  (Table 2a). Convulsions (9%; 6/65), mental retardation (9%; 6/65), liver tumors (22%; 14/65), proteinuria (26%; 17/65), renal dysfunction (11%; 7/65) and increased susceptibility to infection (5%; 3/65) were not frequently observed (Table 2b). Of the 14 GSD Ia patients with liver tumors, 4 had a single adenoma, 9 had 3 or more multifocal adenomas and 1 patient had hepatocellular carcinoma with multiple adenomas. Only one patient with GSD Ia developed acute pancreatitis.

### Height of hepatic GSD patients

Figures 1a–d show the height of male and female hepatic GSD patients. The height of 56% (14/25) of the male GSD Ia patients aged  $<18$  years and 43% (6/14) of the male GSD Ia patients aged  $\geq 18$  years was below the third percentile. The mean height of male GSD Ia patients aged  $\geq 18$  years was  $160.8 \pm 10.6$  cm ( $n=14$ ; Figure 1a). Fifty-seven percent (4/7) of the male GSD Ib patients, 50% (2/4) of the GSD III patients aged  $<18$  years and 19% (6/32) of the male GSD IXa patients had heights below the third percentile (Figures 1b and c).