

C12, C14, C16, C18の各ACを5 μ Mの濃度で溶解させた。それぞれをpH6-AC溶液, pH7-AC溶液, pH7.4-AC溶液, pH8-AC溶液とした。

3) 健常者の血清

1名の健常者の血清にC2~C18のACをそれぞれ5 μ Mずつ添加したものを溶液Sとした。

【方法】

1) アシルカルニチン分析

AC分析は既報の方法に従った^{9), 5)}。概要は以下の通りで、検体10 μ lに内部標準 (Kit NSK-A/B; Cambridge Isotope Laboratories) を加えて乾固し、ブチル誘導体化した試料をタンデムマスによるAC分析した (API3000; Applied Biosystems)。各溶液を2-4回ずつ測定し、その平均値を用いた。

2) 溶液の保存環境

-80 $^{\circ}$ Cで保管している溶液C0を56日目, 42日目, 28日目, 21日目, 14日目, 7日目となるよう順次取り出し、冷凍 (-30 $^{\circ}$ C)、冷蔵 (4 $^{\circ}$ C)、室温 (21 $^{\circ}$ C) の環境で保存した後にAC分析した。

また同様に、pH6-AC溶液, pH7-AC溶液, pH7.4-AC溶液, pH8-AC溶液および溶液Sを、冷凍, 冷蔵, 常温で保存し、28日目, 14日目, 7日目の溶液をAC分析した。

3) 結果の解析

-80 $^{\circ}$ Cで保管していた各溶液を0日目 (100%) とし、測定値の変動を調べた。当施設のAC分析では、ACによっても異なるが変動係数が5~10%であることから、変動幅が \pm 20%を超えれば、有意な変化とした。

【結果】

1) 水溶液中の遊離カルニチン (図1)

溶液C0中のC0測定値は、常温, 冷蔵, 冷凍の保存条件に関わらず、0日目と比べて56日間は \pm 20%以内で推移した。なお、0日目のC0の実測値は9.99 μ Mであった。

2) pHの変化による影響 (図2)

冷凍状態では、pHに関係なく全てのAC値およびC0値の変動は \pm 20%以内であった (図2A)。

冷蔵状態では、pH6.0でのAC値とC0値は \pm 20%以内であった。しかしpH7.0, pH7.4で28日目に長鎖AC (C16とC18) が80%以下の値を示した。しかし、C0の変化は \pm 20%以内であった。pH8.0では、28日目にC4が120%以上に上昇し、C0値も130%を超えていた (図2B)。

常温状態では、図2Cに示すように、pH6.0, pH7.4, pH8.0で14日目からC12~C18の長鎖AC値が80%以下となり、いずれのpHであっても28日目には約50-30%程度まで低下した。またpH8.0では28日目にC2も60%まで低下してい

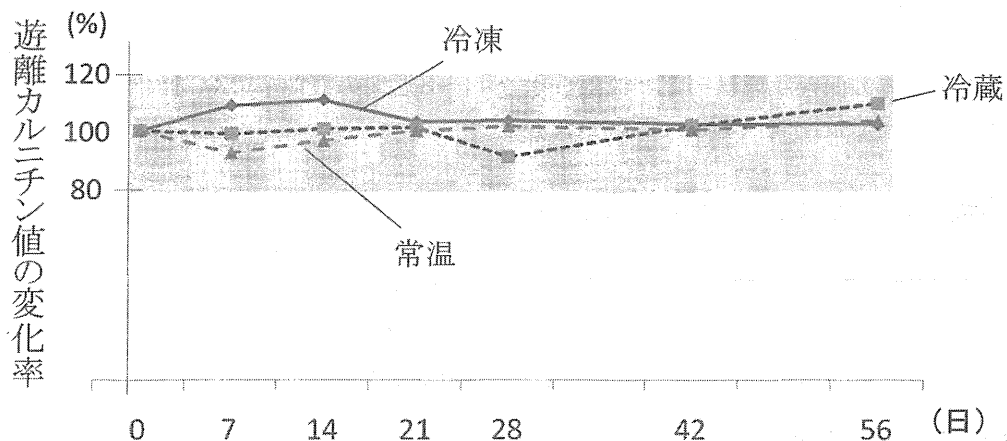


図1. 遊離カルニチン値の温度による影響
 冷凍, 冷蔵および常温とは、それぞれ-30 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C, 21 $^{\circ}$ Cを示す
 ■■■■は80~120%の範囲を示す

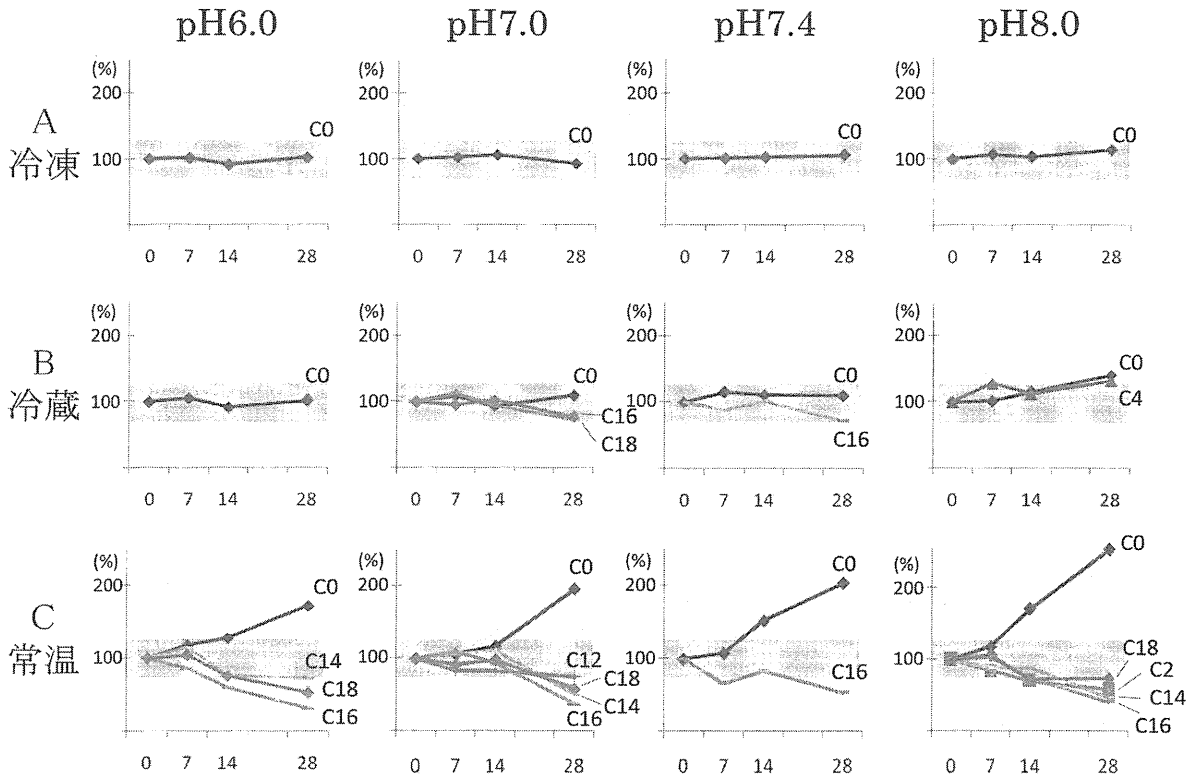


図2. pHの違いによる遊離カルニチン値とアシルカルニチン値の推移

■は80~120%の範囲を示す

アシルカルニチン (C2~C18) 値は28日目に±20%以上の変動を示したのだけ提示

た。一方で、C0値は14日目にはいずれのpHでも120%以上となり、28日目にはpH6.0で約170%に、pH7.0, 7.4では約200%に、pH8.0では250%を超える上昇を示した(図3)。

なお、pHによっても異なるが、0日目の実測値の平均は、C0 4.98 μ M, C2 11.33 μ M, C4 5.90 μ M, C6 5.23 μ M, C8 5.93 μ M, C10 4.99 μ M, C12 5.51 μ M, C14 4.19 μ M, C16 2.10 μ M, C18 2.64 μ Mであった。

3) 健常者血清中のカルニチンの安定性

冷凍状態ではC0および全てのAC値が±20%以内で推移した(図4-A)。冷蔵状態ではC6が7日目から80%以下となったが、C0は±20%以内で推移した(図4-B)。常温状態では7日目から短鎖~長鎖までの多くのAC値が80%以下となり、28日目には20-60%程度まで低下した。特にC2以外の短鎖~中鎖AC値の低下が著しかった。C0は7日目から120%以上となり、28

日目には130%以上となった(図4-C)。

なお、溶液Sの0日目の実測値は、C0 52.59 μ M, C2 23.08 μ M, C4 6.61 μ M, C6 5.92 μ M, C8 6.14 μ M, C10 5.53 μ M, C12 6.50 μ M, C14 8.23 μ M, C16 6.20 μ M, C18 4.39 μ Mであった。

4) 遊離カルニチン値と各アシルカルニチンの総和

図5に示すように、環境温度、pH、溶媒に関係なく、0日目を100%とした場合のC0値と総AC値の和の変動幅は±20%であった。

【考察】

液性検体によるアシルカルニチン測定には、冷凍保存された検体を使用すべきであることが示された。Fingerfutらは、常温保存された紙血は14日後から測定値に影響が出るという報告をしている⁹⁾。我々の研究で、常温に放置された血清中のAC値は1週間で80%以下に低下し、

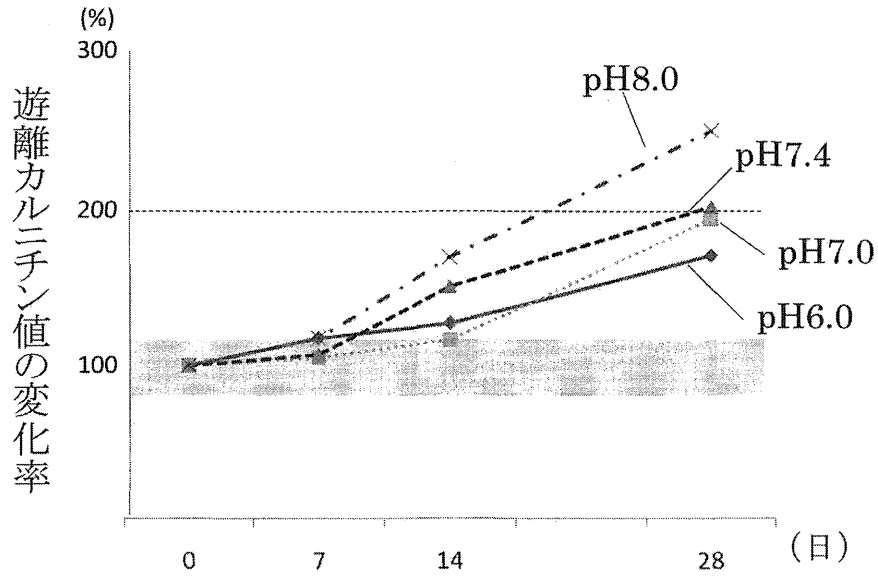


図3. 常温保管したバッファー液中のpHの違いによる遊離カルニチン値の変化
 は80~120%の範囲を示す

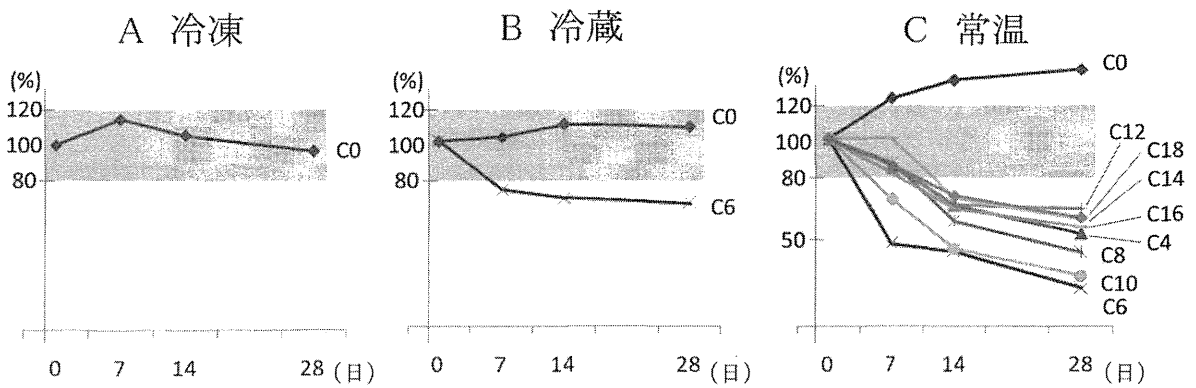


図4. 血清中の遊離カルニチン値およびアシルカルニチン値の推移
 は80~120%の範囲を示す
 アシルカルニチン値 (C2~C18) は28日目に±20%以上の変動を示したものだけ提示

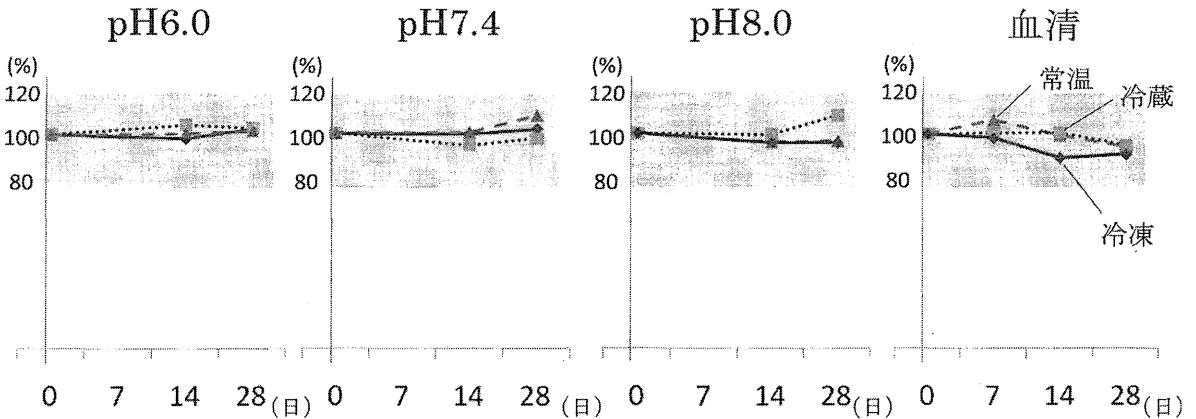


図5. 遊離カルニチン値と各アシルカルニチン値の総和の推移
 は80~120%の範囲を示す

ろ紙血以上に不安定であることが明らかになった。1ヶ月程度であれば冷蔵保存された検体でも多くのAC値は±20%以内であったが、pHなどの影響も考えると、冷凍保存の方が望ましい。

また液性検体中のアシルカルニチンは酵素などで代謝されるのではなく、加水分解されて低下することも示された。これはC0のみ添加した水溶液中のC0値は安定していたこと(図1)と、C0値と各AC値の総和は一定であったこと(図5)から推測される。つまり、AC混合液中のC0値の上昇はアシルカルニチンの加水分解を反映したものであり、C0値が一定で推移した場合、アシルカルニチンも安定していると考えられる。したがって、冷蔵でのpH7-AC溶液やpH7.4-AC溶液中の長鎖AC値低下(図2-B)は、C0値が一定であったことから、測定誤差であった可能性もある。逆に冷蔵でのpH8-AC溶液では見かけ上、各AC値は±20%以内で推移していたが、C0値が上昇していたことから、少なからずアシルカルニチンは加水分解されていたとも考えられる。

更に温度だけでなくpHの影響についても注意が必要である。今回の検討ではアルカリ性においてアシルカルニチンの加水分解は促進されると考えられた。これは冷蔵では溶液AC(pH 8.0)でのみC0値が上昇していたこと、常温でもアルカリ性が強くなる程、C0の上昇傾向が強かったことから推測される。全身性カルニチン欠乏症の疑いでカルニチンクリアランスを測定する場合には尿検体も用いられるが、尿は血液よりもpHの変動幅が大きい。そのため、血液検体よりもAC値やC0値は変動しやすいと考えられる。血清であっても、利尿剤の使用などによってアルカローシスに傾くこともあり、pHの影響も決して無視出来ない。

保存状態によって少なからずAC値は変動し、その結果、先天代謝異常症を見逃す可能性がある。脂肪酸代謝異常症では安定期にはほとんど異常を呈さないことがあると言われている⁶⁾。特にろ紙血で異常がなくても血清では長鎖AC値の上昇が見られる極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症もある⁷⁾。従って血清中のAC値低下

はわずかであっても看過できない。脂肪酸代謝異常症が強く疑われながらACプロフィールに異常が見られないケースでは、検体の保存状態についてもよく検討する必要がある。

一方で、C0値の見かけの上昇は、カルニチン欠乏症を見逃したり、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼI欠損症の偽陽性を増やす可能性がある。特に短鎖～長鎖の広範囲にアシルカルニチン値が高くなりやすいグルタル酸尿症2型や長鎖脂肪酸代謝異常症の急性期の検体を常温で放置した場合、より早期にC0が上昇すると考えられる。そのため2次性のカルニチン欠乏状態も隠してしまう可能性がある。同様に新生児の検体では、一般的に総AC値が高く、C0値が低いことから、アシルカルニチンの加水分解の影響が強くと考えられる。

今回用いた検体は、バッファー液や血清にACを添加した擬似的な検体であり、実際の患者検体とはAC測定値の推移が異なる可能性はある。今回の検討でも、水溶液中では長鎖AC値の方が早く加水分解されたのに対して、血清中では短鎖～中鎖の方が早く分解されるなど、溶媒の違いでAC値の安定性は変化する可能性が示唆された。また、主にバッファーを用いた溶媒中のC2やC16などは、設定した濃度とAC測定値の隔たりが大きく、実験手技や測定精度に問題があったかもしれない。

しかしながら、液体中のACは加水分解される事を考えると、乾燥状態であるろ紙血よりも、血清や尿中のACの方が保存環境の影響を強く受ける可能性が高い。また乾燥ろ紙血であっても、常温で長期間放置されるとAC値が変化するため⁸⁾、アシルカルニチン分析に用いられる全ての検体(ろ紙血、血清、尿)は冷凍で保管することを徹底しなければ、その診断的価値は大きく損なわれる。

【文 献】

- 1) 小林弘典, 山口清次: タンデムマスによる新生児マススクリーニング. 小児科 51: 1697-1703, 2010.
- 2) Strnadová KA, Holub M, Mühl A, et al:

- Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chem.* 53: 717-722, 2007.
- 3) Fingerhut R, Ensenaer R, Röschinger W, Arnecke R, Olgemöller B, Roscher AA: Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Anal Chem.* 81: 3571-3575, 2009.
- 4) 野町祥介, 仲島知美, 櫻田美樹, 他: タンデム質量分析計による非誘導体化法アミノ酸・アシルカルニチン一斉分析 現行のブチル誘導体化法との比較. 札幌市衛研年報 34: 37-47, 2007.
- 5) Hong Li, Seiji Fukuda, Yuki Hasegawa, et al: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial β -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain Dev.* 32: 362-370, 2010.
- 6) Charles P. Venditti, Charles A. Stanley: Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th ed, Richard EB, Robert MK, Hal BJ, Saunders, Philadelphia, 433-436, 2004
- 7) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 坂本修, 大浦敏博, 山口清次: 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症の2例=血清分析の必要性. 日本マス・スクリーニング学会誌 19: 255-259, 2009.

受付日: 平成23年12月15日
受理日: 平成24年2月7日

Storage temperature and pH affect the acylcarnitine and free carnitine value analyzed by MS/MS.

Kenji Yamada¹⁾, Yuuichi Mushimoto¹⁾, Tomoo Takahashi¹⁾, Hironori Kobayashi¹⁾, Yuki Hasegawa¹⁾, Nobuteru Usuda²⁾, Seiji Yamaguchi¹⁾

1) Department of Pediatrics, Shimane University faculty of Medicine

2) Department of Anatomy II, Fujita Health University School of Medicine

Abstract

Dried blood spots and serum are used for acylcarnitine (AC) analysis by tandem mass spectrometry. Storage condition of the samples may influence the quality of measurement of ACs. Herein, we determined the stability of AC measurements at different temperatures and pH in the serum and K-PBS containing various ACs.

AC and free carnitine (C0) values in serum were stable for at least 4 weeks at -30°C . In contrast, the C0 value increased whereas AC value decreased over 20% in the serum that were kept at 21°C for 7 days. There was a greater increase of C0 in alkaline condition at 21°C compared to those in neutral or acidic buffer. The data indicates that storage condition (i.e. temperature and pH) affects AC and C0 in the sample. Liquid samples like serum or urine for AC analysis should be stored at frozen. Inappropriate condition may lead to misdiagnosis of long chain fatty acid oxidation disorders or carnitine deficiency.

タンデムマス法を導入した 新生児マススクリーニングの現状

 やまぐち せいじ
 山口 清次*

要旨 新生児マススクリーニングにタンデムマス法が世界的に普及しつつある。わが国でも 2004 年以来厚生労働省の研究班で検討され、厚生労働省から課長通達が 2011 年に出され、全国に広がりつつある。これまでの研究成果を踏まえて、タンデムマス法導入の現状といくつかの課題について述べた。タンデムマス法による疾患の発見頻度は全体では約 1 万人に 1 人で、費用対効果は良好、また発症前診断による臨床的効果も良好なことが確認された。今後の検討課題として、患者の長期追跡体制、カウンセリング体制の充実、検査施設の適正配置、患者家族の QOL の向上などがあげられている。

はじめに

新生児マススクリーニング (mass-screening: MS) は、知らずに放置すると障害の起こるような先天性疾患を発症前に見つけて、障害を予防 (または軽減) する事業である。1950 年代にフェニルケトン尿症の治療ミルクが開発され、1960 年代にガスリーテストが発明されて以来、新生児 MS の概念が急速に広まった^{1)~3)}。

日本では 1977 年から新生児 MS が全国的に開始されて、これまでに 4,300 万人以上が新生児 MS を受け、1 万人以上の小児が障害から救われたといわれている。かくして新生児 MS による小児の障害予防効果は広く認識され、最近タンデムマス法の導入による対象疾患の拡大 (拡大スクリーニング) がトピックになっている⁴⁾⁵⁾。2004 年からタンデムマス法導入に関連した厚生労働省科学研究班が組織され、2011 年には厚生労働省課長通達が出され、全国自治体に広がりつつある。そこで、わが国のタンデムマ

表 1 これまでの新生児マススクリーニングの対象疾患と発見頻度

疾患	頻度	費用便益
1) フェニルケトン尿症	1:7 万	○
2) メープルシロップ尿症	1:50 万	△
3) ホモシスチン尿症	1:80 万	△
4) ガラクトース血症 (全体)	1:3 万*	△
(1 型)	(1:80 万)	
(2 型)	(1:60 万)	
5) 先天性甲状腺機能低下症	1:3,000	◎
6) 先天性副腎過形成	1:2 万	○

*: ガラクトース高値の多くは酵素欠損でなく、門脈奇形やシトリン欠損症などの 2 次性のもので、真の先天性ガラクトース血症はきわめてまれである。6 疾患全体での発見頻度 (約 1,600 人に 1 人の頻度)
 ◎: 費用便益がきわめて良好, ○: 良好, △: あまり良くない

ス法導入による新生児 MS の現状を述べたい。

I これまでのわが国の新生児マススクリーニングの状況

これまでわが国では 6 疾患を対象に新生児 MS が行われてきた (表 1)。日本人における各

* 島根大学医学部小児科
〒 693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

疾患の頻度，発見された患者の長期予後が明らかになりつつあり，費用便益も評価されてきた。

新生児 MS のシンボリックな疾患であるフェニルケトン尿症 (phenylketonuria : PKU) は，白人で1万人に1人の頻度であるが，日本人では7万人に1人と当初の予想よりも低いことがわかった。メープルシロップ尿症 (maple syrup urine disease : MSUD)，ホモシスチン尿症 (homocysteine : HCY) も日本人における頻度は数十万人に1人と著しく低いことが明らかになった。日本の出生数から試算すると後者2疾患は年間1~2名しか発見されず，対象疾患として疑問をもたれることもある。先天性甲状腺機能低下症は，3千人に1人ともっとも頻度が高く，治療効果もよく，また治療費が安価で費用対効果のもっとも優れた疾患である。

後述するタンデムマス法では，これまでの対象疾患であるアミノ酸代謝異常症3疾患 (PKU のほか MSUD, HCY) を含む20種類以上の疾患を1回の分析でスクリーニングできる。したがって個々の疾患はまれな疾患でも全体としての発見頻度はそれほど低くないため効率的になる。

II タンデムマス法とは

タンデムマスは，質量分析計を直列に2台並べた構造の分析機器で，正式には「タンデム型質量分析装置」という。アシルカルニチン類とアミノ酸をきわめて高感度で一斉分析できるため，新しい新生児 MS 検査技術として注目されている。使用する検体はこれまでと同じ血液濾紙でよく，1回の分析は2分程度で，約20種類以上の疾患をスクリーニングできる⁶⁾。対象疾患は，アミノ酸代謝異常症3疾患のほかに，尿素回路異常症，有機酸代謝異常症，および脂肪酸代謝異常症である。アミノ酸測定値に関しては，ガスリー法よりも検査精度が著しく優れており，偽陽性，偽陰性も少ない。1台のタンデムマスで1日に400~500検体の分析が可能で，

年間5万検体以上を検査できる。

III タンデムマス法の普及状況

1990年代中頃から，まず米国の一部で希望者を対象にタンデムマス検査が始まり，1997年頃からオーストラリア・サウスウェールズ州で公的事業として始まった。表2に示すように，2000年頃から米国の多くの州，ドイツ，台湾，韓国，シンガポールなどで始まり，この数年で多くの欧米諸国でも全国実施されるようになった⁷⁾⁸⁾。

日本では1997年から福井大学の重松陽介教授らがタンデムマス法によるスクリーニングを試験的に始め⁹⁾，2004年から厚生労働省の研究班が生まれ (班長：山口清次)，全国的にパイロットスタディを含む研究が行われてきた^{10)~12)}。厚生労働省研究班では，最初6カ所の施設でパイロットスタディが始まり，2011年には10カ所の検査施設で年間約28万人の新生児が検査を受けた¹²⁾。

IV タンデムマス法の対象疾患と頻度

タンデムマス法では，理論的に1回の検査で20種類以上の疾患が発見できるようになる (図1)。しかし新生児 MS の目的は「検査」ではなく「障害予防」である。したがってスクリーニング対象疾患は一定の要件に照らし合わせて対象疾患を設定する必要がある。

厚生労働省研究班では，見逃しが少なく発見された時治療効果が期待できる疾患を「1次対象疾患」として16疾患を提言している。その他の疾患については，現時点では見逃す可能性が相当あるもの，発見しても診断が難しいとか治療効果が不明な疾患を「2次対象疾患」としている。2次対象疾患については，引き続き研究として検討する。

表3に，タンデムマス法で発見できる疾患 (1

表2 世界のタンデムマス法導入状況 (2009年時点)

	全国実施 (公的实施)	一部実施 (パイロット研究等)
北米 欧州	米国, カナダ, ドイツ, スイス, 英国 オーストリア, オランダ, ベルギー, ルクセンブルク, スウェーデン, ノルウェー, ポルトガル, アイスランド	イタリア, スペイン, フランス, フィンランド, ポーランド, ロシア
アジア 太平洋	オーストラリア, ニュージーランド 台湾, 香港, シンガポール, イスラエル	日本 (パイロット, 30%) 韓国 (有料, 70%) 中国 (上海市, 杭州市) サウジアラビア, エジプト
中南米	コスタリカ, ウルグアイ	アルゼンチン, ブラジル, チリ, メキシコ

※日本では2011年に厚生労働省から積極的にタンデムマス法を導入するよう通達が出た。

次疾患と2次疾患を含む)とパイロットスタディによる発見頻度をあげた。新しく加わる対象疾患として、尿素回路異常症、有機酸・脂肪酸代謝異常症がある。

尿素回路異常症はアミノ酸から生ずるアンモニアの処理ができないために高アンモニア血症を起こす。有機酸代謝異常症はアミノ酸が中間代謝過程の酵素障害によって有機酸が体内に上昇し、重篤なケトアシドーシス、高アンモニア血症などをきたす。脂肪酸代謝異常症は、 β 酸化系に障害があるため、ブドウ糖からのエネルギー供給が低下した時、エネルギー産生不全に陥る。このためエネルギー依存度の高い骨格筋症状や心筋障害、肝障害、あるいは急性脳症、乳幼児突然死類似の発症形態をとることがある⁶⁾。

V タンデムマス法導入の効果

タンデムマス法の新たな対象疾患では、ふだん安定している時は無症状でも、感染などを契機として急性の経過をとる疾患が少なくない。

島根大学小児科では、このような症状で発症した患者についてガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)、あるいはタンデムマスによる検査の依頼を受けてきた。このように発症してから初めて診断された症例(島根大学で検査)と、タンデムマス法による新生児MSで発見された症例(大部分が発症前診断)のその後の転帰を比較した(表4)。

その結果、新生児MSで発見された有機酸代謝異常症39例のうち35例(90%)が正常発達をし、死亡は2例(5%)であった。これに対し、発症後に診断された有機酸代謝異常症108例のうち正常発達していたのは20例(18%)、死亡例は32例(30%)であった¹¹⁾。

脂肪酸代謝異常症では、新生児MSで発見された26例中23例(88%)が正常発達であったのに対し、発症後に初めて診断された症例44例のうち正常発達は23例(52%)であった。このことから、発症前に発見することの重要性が示された。

さらに発症後に診断された患者の多くは大病院、小児病院あるいは大規模病院から紹介さ

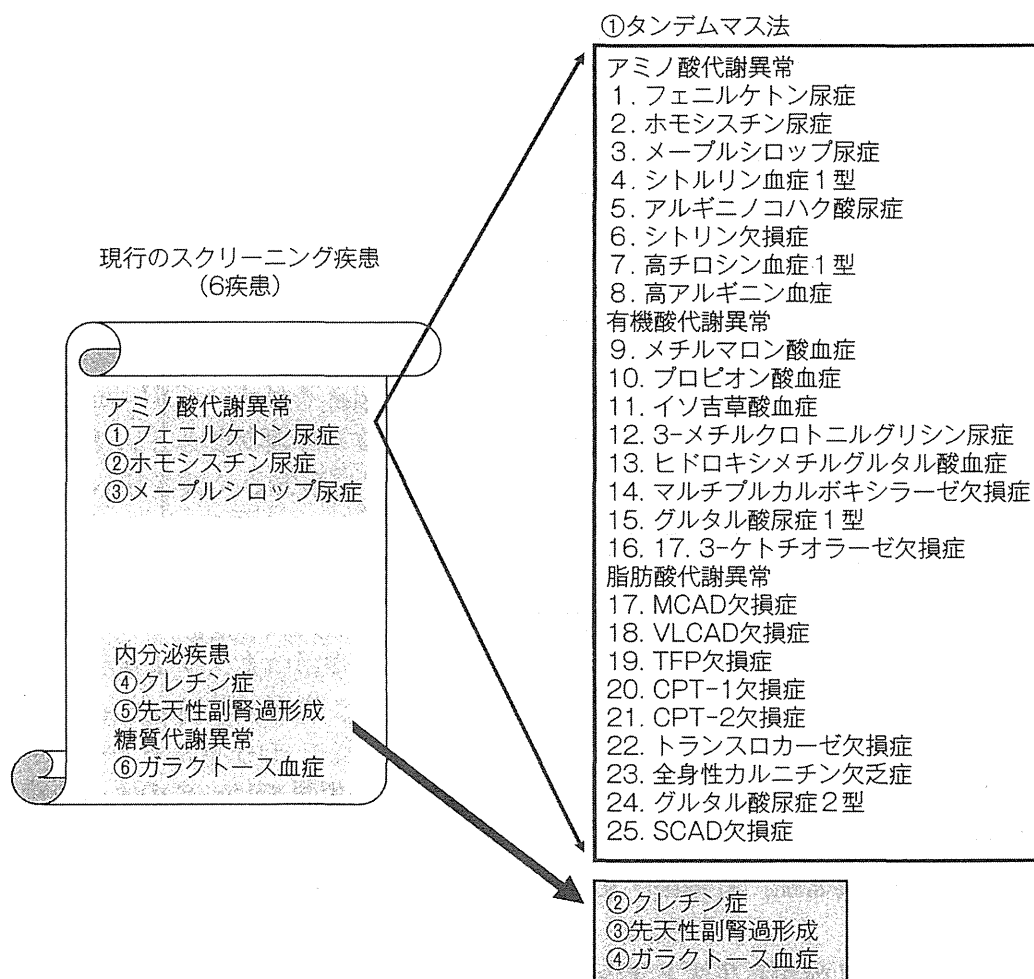


図1 タンデムマス法導入による対象疾患の拡大

れたものである。タンデムマス法が新生児 MS のみならず臨床検査としても普及すれば、一般病院の小児救急の場で代謝異常の可能性を念頭においた診療機会が多くなり、小児の難病である乳幼児突然死症候群 (sudden infant death syndrome: SIDS)、インフルエンザ脳症のような原因不明の急性脳症、あるいは Reye 症候群などの病態解明にも貢献する。また医療を効率化し、医療費低減にも役立つ。

VI 診療ネットワーク体制

新生児 MS が開始されると、いつどこで陽性例が発見されるかわからない。発見される病気

は稀少疾患であるため、小児科の専門医といえども、戸惑うかもしれない。しかしどこで発生しても、一定レベルの適切な対応がとれるような体制作りが不可欠である。かといって自治体ごとに稀少疾患の専門家をそろえることは非現実的である。そのためにはガイドライン、診療マニュアル^{13)~15)}などを充実する必要がある。

さらに各自治体では、中核医師、中核病院を指定して、そこが窓口となって全国の専門的施設と連絡をとって診療を進めるような体制が現実的であると研究班では提言している。ネットワーク体制に2012年時点で加わっている主な専門施設を図2に示した¹²⁾(専門施設は、年ごとに変わる可能性がある)。

表3 タンデムマス法対象疾患一覧と頻度

タンデムマスの対象疾患	主な臨床症状	発見頻度*
アミノ酸代謝異常症 (全体で1:2.7万)		
● 1) フェニルケトン尿症**	けいれん, 発達遅滞	1:6万
● 2) メープルシロップ尿症**	多呼吸, アシドーシス	1:156万
● 3) ホモシスチン尿症**	遅れ, 発育異常	1:78万
● 4) シトルリン血症 (1型)	興奮, 多呼吸, 昏睡	1:26万
● 5) アルギニノコハク酸血症	興奮, 多呼吸, 昏睡	1:40万
△ 6) シトルリン欠損症	乳児肝炎様症状	1:8万
有機酸代謝異常症 (全体で1:2.3万)		
● 1) メチルマロン酸血症	アシドーシス, 遅れ	1:12万
● 2) プロピオン酸血症	アシドーシス, 遅れ	1:5万
● 3) イソ吉草酸血症	アシドーシス, 体臭	1:52万
● 4) メチルクロトニルグリシン尿症	筋緊張低下, Reye 症候群	1:16万
● 5) ヒドロキシメチルグルタル酸血症	重症低血糖, 発達遅滞	—
● 6) 複合カルボキシラーゼ欠損症	湿疹, 乳酸アシドーシス	1:52万
● 7) グルタル酸血症 1型	アテトーゼ, 遅れ	1:18万
△ 8) 3-ケトチオラーゼ欠損症	重症ケトアシドーシス発作	—
脂肪酸代謝異常症 (全体で1:3.3万)		
● 1) MCAD 欠損症	Reye 症候群, SIDS	1:10万
● 2) VLCAD 欠損症	低血糖, 筋肉, 心障害	1:16万
● 3) 三頭酵素欠損症	Reye 症候群, SIDS	—
● 4) CPT1 欠損症	Reye 症候群, 肝障害	1:31万
△ 5) CPT2 欠損症	Reye 症候群, 筋肉症状	1:26万
△ 6) TRANS 欠損症	Reye 症候群, SIDS	—
△ 7) 全身性カルニチン欠乏症	Reye 症候群, SIDS	1:26万
△ 8) グルタル酸血症 2型	Reye 症候群, 低血糖	1:31万

1997~2011年まで計156万人検査の結果である(1997年より福井大学で開始, 2004年より厚生労働省研究班で開始)。

MCAD: 中鎖アシル-CoA 脱水素酵素, VLCAD: 極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素, CPT: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ, SCHAD: 短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素

●: 1次対象疾患, △: 2次対象疾患

*: パイロットスタディによる2011年時点までのデータ

** : 現行マススクリーニングの対象疾患(アミノ酸代謝異常症3疾患)

VII 陽性者に遭遇した時の対応

新生児MS陽性者に遭遇した時, 確定診断, 早期の治療開始が必要である。新生児MSの検査値がそのカットオフ値を大きく超えている場合は, できるだけ早く治療を開始する。一方検査値がカットオフ値付近にある場合, 再検査

せざるを得ないが, 長い将来に関わることなので確定診断をしておく必要がある。

確定診断の手順は, 表5に示すようにアミノ酸分析, GC/MSによる尿中有機酸分析, タンデムマス精密検査, 酵素活性測定, 遺伝子診断などが行われる¹⁰⁾。

1. アミノ酸代謝異常症

アミノ酸値に異常があり, アミノ酸代謝異常

症の疑われる時には、アミノ酸自動分析計で精密に評価することによって診断できる場合が多い。また高フェニルアラニン血症の場合、悪性高フェニルアラニン血症と鑑別するために血中尿中プテリジン分析を行う。またテトラヒドロピオプテリン (BH₄) 反応性高フェニルアラニン血症の病型を鑑別するために BH₄ 負荷試験を行う。

2. 有機酸代謝異常症

アシルカルニチンの異常から有機酸代謝異常症の疑われる場合は、GC/MS による尿中有機酸分析によってほとんどの症例が生化学診断される¹⁵⁾。さらに血中カルニチンを測定して遊離カルニチン欠乏の程度を評価する。

3. 脂肪酸代謝異常症

血液濾紙のみならず血清でアシルカルニチン分析をすることもある。全身性カルニチン欠乏症では、尿中カルニチン分析を行いカルニチンクリアランスを計算して診断される。脂肪酸代謝異常症の一部の疾患では、尿中有機酸分析で特異的な異常がみられる。中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency : MCAD) 欠損症では、ヘキサノイルグリシン、スベリルグリシンが検出され、またグルタル酸血症 2 型では、エチルマロン酸、グルタル酸、イソバレリルグリシンなどの特徴的な有機酸プロファイルがみられるので生化学的に確定診断される。長鎖脂肪酸の代謝異常では非ケトン性ジカルボン酸尿がみられる。

さらに末梢リンパ球や皮膚線維芽細胞を用い

表4 タンデムマス・スクリーニングの臨床的効果
発症前と発症後診断例の予後比較 (2001~2008 年の発見例)

疾患	新生児マススクリーニング (研究班)	発症後診断 (島根大学)
患者数	65	152
有機酸代謝異常症	39	108
正常発達	35 (90%)	20 (18%)
後遺症	2 (5)	56 (52)
死亡	2 (5)	32 (30)
脂肪酸代謝異常症	26	44
正常発達	23 (88%)	23 (52%)
後遺症	2 (8)	9 (20)
死亡	1 (4)	12 (28)

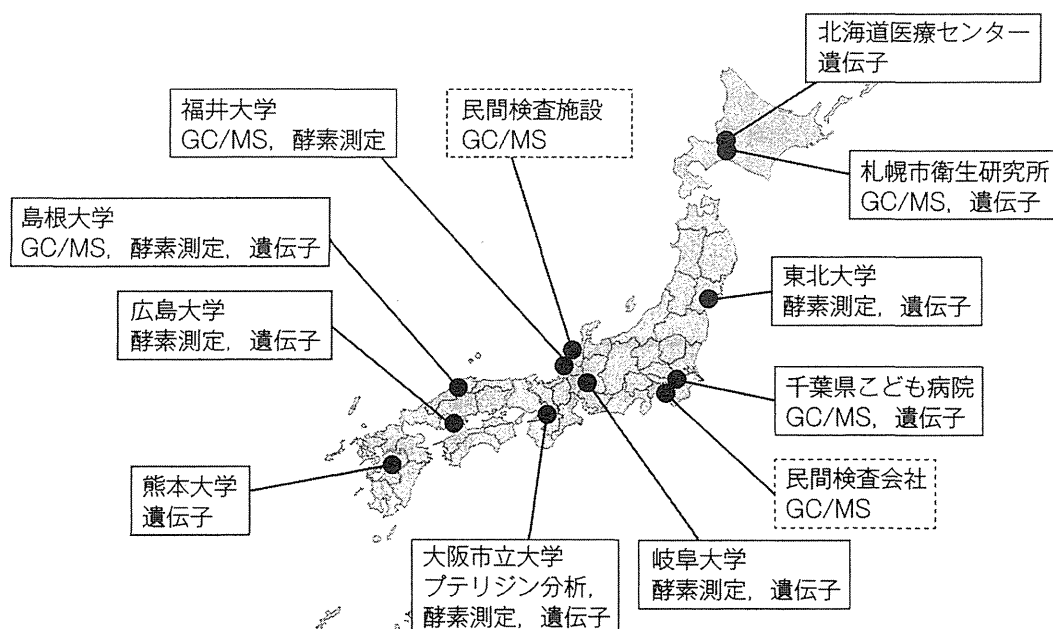


図2 確定診断のための特殊検査提供施設 (2012 年時点)

表5 確定診断のために必要な検査

疾患群	アミノ酸分析	有機酸分析 (GC/MS)	遺伝学的検査	その他
アミノ酸代謝異常症	◎	○	△	BH ₄ 負荷試験 プテリン分析
有機酸代謝異常症	△	◎	○	タンデムマス精査
脂肪酸代謝異常症	△	○	○~◎	タンデムマス精査

◎：確定診断に必須である。○：確定診断の参考になる。△：原則として不要
脂肪酸代謝異常症は、タンデムマス結果が典型的で臨床検査所見もそれを支持する所見があれば確定診断可能

表6 タンデムマス検査の費用計算

年間検査数		1万検体	3万検体	5万検体			
現行スクリーニング (6疾患) の試算		4,169	2,621	2,347			
同一施設で実施	先天性甲状腺機能低下症 先天性副腎過形成症 ガラクトース血症	3,412	2,016	1,795			
	タンデムマス検査費の加算分				1,656	788	768
	タンデムマスを加えた検査費用合計				5,068	2,804	2,563
	別の施設で実施	先天性甲状腺機能低下症 先天性副腎過形成症 ガラクトース血症	3,412	2,016	1,795		
タンデムマス検査費	2,490	1,350				1,284	
タンデムマスを加えた検査費用合計	5,902	3,366				3,079	

(単位：円)

- ・タンデムマス導入費用：タンデムマスの減価償却費 500万円/年 (5年間)
(年間検査数 5万検体の施設ではタンデムマスは2台で試算)
- ・タンデムマスの保守管理費用：200万円/年
- ・非誘導体化法による検査試薬、検査器具：250円/1検体
- ・人件費は年間検査数 1万人から 5万人で 750万円から 1,100万円/年間
- ・検査施設の維持管理費 (電気水道費用など) は 250万円/年間
- ・一方これまで行われてきたアミノ酸代謝異常症 3疾患の検査費 (約 600円) は不要になる。

て酵素活性測定¹⁷⁾の行われる場合もある。また最近では培養細胞とタンデムマス法を用いる *in vitro* probe assay によって酵素活性を評価する方法もある¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに血液や培養細胞で遺伝子診断も必要に応じて行われる。

以上のように確定診断のステップには特殊な検査が必要になるので、全国数カ所の専門施設に相談できるネットワークが構築されつつある。2012年4月の保険改訂で、タンデムマス検

査の対象疾患 16疾患に関する遺伝学的検査 (4,000点)、先天代謝異常検査 (1,200点) が部分的ではあるが保険でカバーされるようになった。

VIII タンデムマス検査にかかる費用と費用対効果

タンデムマス検査にかかる費用の試算を表6にあげた。タンデムマスは普及している機器は約3千万円余である。そして年間保守契約をす

表7 タンデムマス・スクリーニングと予防接種の費用対効果

	増分便益費用比 (BCR)	増分純便益 (NET)
タンデムマス	1.73~6.44	71~143 億円
水痘ワクチン	4.0 以上	522 億円
ムンプスワクチン	5.2	379 億円
ヒブワクチン	0.25~2.08	-322~477 億円
肺炎双球菌7価ワクチン	1.08	51 億円
HPV ワクチン (子宮頸癌)	1.94~4.90	305~1,263 億円

※タンデムマスの場合、設定する検査費用によって差がある。
1 検体あたり 2,000 円 (6.44 倍の便益)~8,000 円 (1.73 倍の便益) である。
(大日康史ほか, 2011²⁰⁾)

れば平均的に年間 200 万円程度かかる。さらにキット試薬は 1 検体あたり約 250~300 円である。減価償却費、人件費などを勘案してコスト計算すると、他のスクリーニングと同一施設内で行う場合、年間 1 万検体分析する施設ではタンデムマスによる増分が 1 検体あたり 1,656 円、年間 3 万検体を分析する施設では 788 円、年間 5 万検体の施設では 768 円と試算されている¹¹⁾。

タンデムマスだけを他の施設に委託する場合、増加分は年間 1 万検体の施設で 1 検体あたり 2,490 円、年間 3 万検体の施設で 1,350 円、年間 5 万検体の施設で 1,284 円と試算されている。このことから 1 台の機器で年間 3 万検体以上の分析ができることが不可欠である。効率化して浮いた予算は、他の小児の難病対策に振り向けるといった選択肢も生まれる。出生数の少ない自治体で安易にタンデムマスを購入すべきではない。一方、タンデムマス法を導入するとこれまで行われてきたアミノ酸代謝異常症 3 疾患の検査 (ガスリー法など) の費用約 600 円は不要になる。

新生児 MS 事業は公的事業として行われる以上、費用対効果を評価することも不可欠である。表 7 に研究班でまとめたタンデムマス・スクリーニングの費用対効果を予防接種のそれと比較している。タンデムマスによる新生児 MS

では、低く見積もっても、かけた予算の 1.73~6.44 倍の効果があると見積もられている²⁰⁾。費用対効果解析は、出生率や疾患頻度、社会環境の変化などが変数となるため、継続して評価する必要がある。

IX タンデムマス導入に伴ういくつかの課題

タンデムマス法の導入は新生児 MS の領域の大きな出来事であり、これを機にわが国の新生児 MS 体制を立て直す好機である。すなわち、少子化に伴ってこれまでの新生児 MS 体制に無駄が多くなり、患者追跡体制も機能しなくなっている面がある。いくつかの課題をあげたい²¹⁾。

1. 患者の長期追跡体制

平成 13 年度より新生児 MS 事業が自治体事業におろされ、個人情報扱いの制約のために、新生児 MS で発見された患者の長期予後がつかみにくい状況となっている。稀少疾患に対する診療技術向上のためにも、また新生児 MS 事業の福祉への貢献度、費用対効果の評価のためにも、発見された患者の長期的フォローアップは不可欠である。

2. カウンセリング体制の充実

タンデムマス対象疾患の中には、新生児期に発症して新生児 MS の結果が判明した時には

すでに発症していて間に合わないこともある。また日本人に多い軽症プロピオン酸血症では、無症状で経過し治療の必要かどうか明らかになっていない疾患もある。またメチルクロトニルグリシン尿症は無症状の患者も多く、また偶然母親の病気が見つかることがある。

また有機酸・脂肪酸代謝異常の中には、ふだんは正常と変わらぬ生活をしているのに何らかのストレスを契機に突然死のような形態で発症することもあり、生涯無症状で経過する患者もありうる。疾患の自然歴を明らかにしてゆく必要がある一方で、エビデンスに基づいたカウンセリング体制も重要である。

家族の受け取り方をよく理解しながら、正確な知識を伝え、必要以上のストレスから解放し、また適切な生活上の助言をして重篤な発作の予防に努める必要がある。

3. 検査施設の適正配置

タンデムマス機器の価格は安くなくまたその後の保守点検費用も必要である。また1台の機器で年間5万検体以上を分析する能力があり、1台の機器で多数検体を分析するほうが効率的であり、精度管理の面からも有利である。

表6に検査実費を試算した例を示している。わが国で新生児MS事業が開始されたところに比べ、少子化が進行し年間出生数が1万前後の自治体が多い。これら自治体が1台ずつ機器を購入することはムダが多くなることが予想される。タンデムマス法導入にあたっては、近隣の自治体と調整して、1台のタンデムマスで少なくとも年間3万検体以上の検体を分析することを提言している⁶⁾。

4. 精度管理

新生児MSは、新生児にとって生涯に1回きりの検査であり、一般臨床検査と異なり見逃しは絶対に許されない。定期的に標準検体を用いて検査値が保証されるべきである。「偽陽性」や「見逃し例」は極力なくさなければならない。実際には、同じサンプルを分析しても施設に

よって測定値が異なることを理解しておくべきである。すなわち、肝機能検査などのように画一的なカットオフ値を採用すると、検査値が低めに出る施設では見逃す危険が高くなり、反対の施設では偽陽性率が高くなる。各施設ごとに外部精度管理と、日常的に行う内部精度管理を継続的に行う必要がある。

5. 患者家族のQOLの向上

新生児MSの対象疾患は、超稀少疾患である。それだけに患者家族は、相談できる相手が少なく孤独に陥りやすい。患者家族会のような組織を通じて経験を話したり情報交換する場や、研究者との交流の場は効果的であると思われる。医師や研究者も患者家族の生の声を聞き、研究の方向性に反映させることもできるであろう。

おわりに

小児の病気は「治療よりも予防」というキーワードのもと、ワクチンの拡大とならんで新生児MSの拡大は世界的トレンドとなっている。Wilson病、重症複合免疫不全症(severe combined immunodeficiency: SCID)、リソソーム病(ムコ多糖症など)、および胆道閉鎖症(便カラーカード)などのスクリーニングも検討されている。これから長い人生を送る小児にとって、正常な発育発達をして成人し社会参加することを保証する体制として新生児MSは今後さらに拡充されるべきである。

本研究は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)を受けて行ったものである。

文献

- 1) 黒田泰弘: わが国における新生児マス・スクリーニングのあゆみ. 小児科診療 2000; 63: 1293-1302
- 2) 成瀬 浩, 山口清次: 新生児スクリーニングの30年. 臨床精神医学 2004; 33: 1453-1460
- 3) Dhondt JL: Neonatal screening: from the 'Gu-

- thrie age' to the 'genetic age'. *J Inher Metab Dis* 2007; 30: 418-422
- 4) McCabe LL, McCabe ERB: Expanded newborn screening: Implications for genomic medicine. *Ann Rev Med* 2008; 59: 163-175
 - 5) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代. *小児保健研究* 2006; 65: 725-732
 - 6) 重松陽介ほか: Electrospray tandem mass spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. *日本マス・スクリーニング学会誌* 1998; 8: 13-20
 - 7) Threll BL, Adams J: Newborn screening in North America. *J Inher Met Dis* 2007; 30: 447-465
 - 8) Padilla CD, Threll BL: Newborn screening in the Asia Pacific region. *J Inher Met Dis* 2007; 30: 490-506
 - 9) Shigematsu Y et al: Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J Chromat B* 2002; 776: 39-48
 - 10) 山口清次: わが国の 21 世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (子ども家庭総合研究事業) 「わが国の 21 世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究」(主任研究者: 山口清次) 平成 16~18 年度総合研究報告書, 2007
 - 11) 山口清次: タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (子ども家庭総合研究事業) 平成 19~21 年度総合研究報告書 (研究代表者: 山口清次), 2010
 - 12) 山口清次: タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業) 平成 23 年度報告書, 2012
 - 13) 北川照男ほか: タンデムマス導入にともなう新しいスクリーニング対象疾患の治療指針. 特殊ミルク改良開発部会 (編); 恩賜財団母子愛育会, 2007
 - 14) 山口清次: タンデムマス Q & A 2012. 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) 冊子, 2012
 - 15) 山口清次ほか: 有機酸代謝異常ガイドブック, 診断と治療社, 2011
 - 16) 北川照男ほか: タンデムマス・スクリーニングで異常が発見された時の対応. 特殊ミルク情報 2011; 47: 40-48
 - 17) Tajima G et al: Enzymatic diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-octenoyl-CoA production using high-performance liquid chromatography: a practical confirmatory test for tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *J Chromat B* 2005; 823: 122-130
 - 18) Okun JG et al: A method for quantitative acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using unlabelled palmitic acid: diagnosis of fatty acid oxidation disorders and differentiation between biochemical phenotypes of MCAD deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1584: 91-98
 - 19) SimKG et al: Quantitative fibroblast acylcarnitine profiles in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: phenotype/metabolite correlations. *Mol Genet Metab* 2002; 76: 327-334
 - 20) 大日康史, 菅原民枝: MS/MS マススクリーニングの費用対効果の予防接種との比較および国際比較. 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) 「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」(研究代表者: 山口清次) 平成 22 年度報告書, 2011: 123-125
 - 21) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. *日本先天代謝異常学会雑誌* 2011; 27: 36-41

A hemizygous *GYG2* mutation and Leigh syndrome: a possible link?

Eri Imagawa · Hitoshi Osaka · Akio Yamashita · Masaaki Shiina ·
Eihiko Takahashi · Hideo Sugie · Mitsuko Nakashima · Yoshinori Tsurusaki ·
Hirotomo Saitsu · Kazuhiro Ogata · Naomichi Matsumoto · Noriko Miyake

Received: 17 April 2013 / Accepted: 29 September 2013 / Published online: 8 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Leigh syndrome (LS) is an early-onset progressive neurodegenerative disorder characterized by unique, bilateral neuropathological findings in brainstem, basal ganglia, cerebellum and spinal cord. LS is genetically heterogeneous, with the majority of the causative genes affecting mitochondrial malfunction, and many cases still remain unsolved. Here, we report male sibs affected with LS showing ketonemia, but no marked elevation of lactate and pyruvate. To identify their genetic cause, we performed whole exome sequencing. Candidate variants were narrowed down based on autosomal recessive and X-linked recessive models. Only one hemizygous missense mutation (c.665G>C, p.W222S) in glycogenin-2 (*GYG2*) (isoform a: NM_001079855) in both affected sibs and a heterozygous change in their mother were identified, being consistent with the X-linked recessive trait. *GYG2* encodes glycogenin-2 (*GYG2*) protein, which plays an important role in

the initiation of glycogen synthesis. Based on the structural modeling, the mutation can destabilize the structure and result in protein malfunctioning. Furthermore, in vitro experiments showed mutant *GYG2* was unable to undergo the self-glucosylation, which is observed in wild-type *GYG2*. This is the first report of *GYG2* mutation in human, implying a possible link between *GYG2* abnormality and LS.

Introduction

Glycogen is a large branched polysaccharide containing linear chains of glucose residues. Glycogen deposits in skeletal muscle and liver serve as shorter-term energy storage in mammals, while fat provides long-term storage. Glycogen biosynthesis begins with self-glucosylation of glycogenins by covalent binding of UDP-glucose to tyrosine residues of the glycogenins and the subsequent extension of approximately ten glucose residues (Pitcher et al. 1988; Smythe et al. 1988). Glycogen particles are formed by the continued addition of UDP-glucose to the growing

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00439-013-1372-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Imagawa · M. Nakashima · Y. Tsurusaki · H. Saitsu ·
N. Matsumoto (✉) · N. Miyake (✉)
Department of Human Genetics, Yokohama City University
Graduate School of Medicine, Yokohama 236-0004, Japan
e-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp

N. Miyake
e-mail: nmiyake@yokohama-cu.ac.jp

H. Osaka
Division of Neurology, Clinical Research Institute, Kanagawa
Children's Medical Center, Yokohama 232-8555, Japan

A. Yamashita
Department of Molecular Biology, Yokohama City University
School of Medicine, Yokohama 236-0004, Japan

M. Shiina · K. Ogata
Department of Biochemistry, Yokohama City University
Graduate School of Medicine, Yokohama 236-0004, Japan

E. Takahashi
Division of Infection and Immunology, Clinical
Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center,
Yokohama 232-8555, Japan

H. Sugie
Department of Pediatrics, Jichi Medical University,
Tochigi 329-0498, Japan

glycogen chain by glycogen synthase, and introduction of branches every 10–14 residues by the glycogen branching enzyme (Krisman and Barengo 1975; Lerner 1953). To date, two glycogenin paralogues have been identified in human, glycogenin-1 (GYG1) and glycogenin-2 (GYG2). These proteins have been shown to form homodimers, heterodimers and larger oligomers (Gibbons et al. 2002). GYG1 (muscle form) is expressed predominantly in muscle while GYG2 (liver form) is expressed mainly in liver, heart and pancreas (Barbetti et al. 1996; Mu et al. 1997). Biallelic GYG1 abnormality is known to cause muscle weakness and cardiac arrhythmia in humans through GYG1 autoglucosylation failure (Moslemi et al. 2010). However, human disease due to GYG2 abnormality has never been reported.

Leigh syndrome (LS; MIM #256000) was first described as a subacute necrotizing encephalomyelopathy by Dr. Denis Leigh in 1951 (Leigh 1951). LS is a progressive neurodegenerative disorder with an estimated incidence of 1:40,000 live births (Rahman et al. 1996). Onset is usually in early childhood (typically before age 2) (Naess et al. 2009; Ostergaard et al. 2007). Clinical manifestations of LS are observed in the central nervous system (CNS) (developmental delay, hypotonia, ataxia, convulsion, nystagmus, respiratory failure and dysphagia), peripheral nervous system (polyneuropathy and myopathy) and extraneural organs (deafness, diabetes, cardiomyopathy, kidney malfunction and others) (Finsterer 2008). The neurological features depend on the affected regions and degree of severity. The presence of bilateral, symmetrical, focal hyperintense T2-weighted MRI signals in basal ganglia (mainly putamen), thalamus, substantia nigra, substantia ruber, brainstem, cerebellum, cerebral white matter or spinal cord is diagnostic of LS (Farina et al. 2002; Medina et al. 1990). Neuropathological studies revealed that these lesions reflect neuronal necrosis, gliosis and vascular proliferation (Brown and Squier 1996; Leigh 1951). In the majority of LS cases, lactate, pyruvate or the lactate/pyruvate ratio is increased in blood and cerebrospinal fluid (Finsterer 2008). To the best of our knowledge, 37 nuclear genes are known to be mutated in LS, in addition to some mitochondrial genes (Antonicka et al. 2010; Debray et al. 2011; Finsterer 2008; Lopez et al. 2006; Martin et al. 2005; Quinonez et al. 2013). Thus, inheritance patterns of LS include mitochondrial, autosomal recessive and X-linked recessive modes (Benke et al. 1982; van Erven et al. 1987).

We encountered a Japanese family with affected brothers showing atypical LS without marked elevation of lactic or pyruvic acid and unknown etiology. A unique genetic variant was identified by whole exome sequencing (WES), which may be associated with atypical LS phenotype in this family.

Materials and methods

Subjects

Peripheral blood samples of affected brothers diagnosed with LS and their parents were collected after obtaining written informed consent. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using QuickGene-610L (Fujifilm, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Lymphoblastoid cell lines derived from all family members were established. The Institutional Review Boards of Yokohama City University School of Medicine approved this study.

Causative gene identification

Whole exome sequencing was performed in two affected individuals (II-2 and II-3 in Fig. 1a) as described in the Supplementary methods. All candidate variants based on autosomal and X-linked recessive models were checked by Sanger sequencing in the parents and affected siblings. PCR products amplified with genomic DNA as a template were sequenced on an ABI3500xl autosequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). As the pedigree tree might also indicate mitochondrial inheritance of this disease and LS is known to be caused by mitochondrial genome mutations, we screened the entire mitochondrial genome by the algorithm reported previously (Picardi and Pesole 2012), using exome data (detailed in Supplementary methods).

Structure modeling

To evaluate the effect of the GYG2 missense mutation (c.665G>C, p.W222S in isoform a: NM_001079855) on its function at the molecular structural level, the mutated molecular structure was constructed, and the free energy change caused by the mutation was calculated using the FoldX software (version 3.0) (Guerois et al. 2002; Khan and Vihinen 2010). As crystal structure of human GYG2 is unavailable, that of human GYG1 (Protein Data Bank code; 3T7O) was used as a structural model. The mutation was introduced into one subunit of the GYG1 homodimer. The ligands included in the crystal structure of GYG1 were ignored in the calculation, because the FoldX energy function could not deal with the ligands. The calculation was repeated three times, and the resultant data were presented as an average value with standard deviations.

Preparation for mammalian expression vectors

Human glycogenin-2 isoform a cDNA clone (IMAGE Clone ID: 100008747) integrated in pENTR221 was purchased from Kazusa DNA Research Institute (Chiba, Japan). The

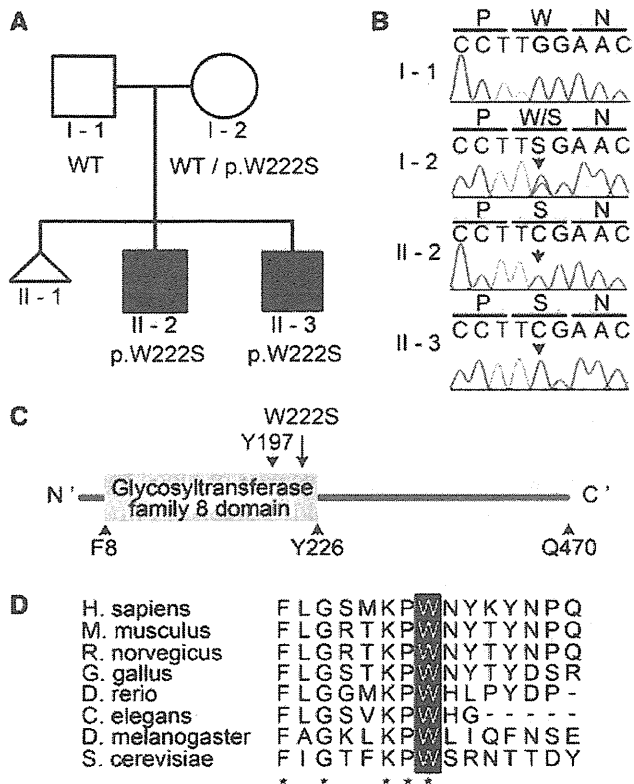


Fig. 1 Mutation Analysis of *GYG2*. **a** Pedigree of the family with a unique type of LS and a *GYG2* mutation (c.665G>C, p.W222S). *Square, circle and triangle* denote male, female and spontaneous abortion, respectively. *White and black symbols* indicate unaffected and affected individuals, respectively, while the affection status of the spontaneous abortion is unknown. **b** Electropherograms of a *GYG2* mutation. **c** The functional domain of human *GYG2* (isoform a). The substitution of p.W222S is located within the glycosyltransferase family 8 domain (yellow square). **d** The evolutionary conservation of the W222 in *GYG2*. *Red stars* indicate identical amino acids from *S. cerevisiae* to *H. sapiens*. Sequences were aligned using CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)

missense mutation (c.665G>C, p.W222S) was introduced by Site-directed mutagenesis using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Wild-type and mutant C' V5/6xHis tagged *GYG2* constructs were created using pcDNA-DEST40 (Invitrogen, Carlsbad, CA) by LR recombination in Gateway system (Invitrogen). To create the untagged construct, the last codon was altered to a stop codon by mutagenesis.

Self-glycosylation analysis

Glycosyltransferase activity of *GYG2* was measured as previously described (Lomako et al. 1988), with slight modifications. In brief, COS-1 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) containing 10 % heat-inactivated

fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) and 1 % penicillin–streptomycin (Sigma-Aldrich). As previously described (Mu and Roach 1998), the ~80 % confluent COS-1 cells (~1 × 10⁷) were transiently transfected by X-treamGENE9 DNA transfection reagent (Roche Applied Science, Foster City, CA) with 5 μg of either a wild-type Human *GYG2* (isoform a) expressing plasmid or the same plasmid into which the W222S encoding mutation had been introduced. After 24 h, the cells were collected and lysed in 300 μl of buffer consisting of 50 mM HEPES, 0.5 % Triton X-100, 1 × EDTA-free protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche Applied Science), 1 × phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) and 0.5 mM β-mercaptoethanol (Mu et al. 1997). After centrifugation at 14,000 rpm for 15 min, 10 μl of the soluble fractions were mixed with 10 μl of 2 × reaction buffer containing 100 mM HEPES (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 4 mM dithiothreitol (DTT) and 40 μM UDP-[¹⁴C]-glucose (250 mCi/mmol; PerkinElmer, Waltham, MA) (Cao et al. 1993). After incubation at 30 °C for 30 min, the reaction was stopped by addition of 20 μl of 2 × Laemmli sample buffer (Sigma-Aldrich) (Viskupic et al. 1992). 15 μl of each sample was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After treatment with Gel drying solution (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) for 30 min, gels were dried. Dried gels were then exposed on X-ray film for 2 weeks to detect the incorporation of UDP-[¹⁴C]-glucose into *GYG2*. In addition, the ¹⁴C-signal intensities were evaluated using an imaging analyzer, BAS2500 (Fujifilm). Three independent experiments were performed.

Western blot analysis

For the detection of *GYG2* protein, rabbit polyclonal anti-*GYG2* antibodies (1:500 dilution; Abcam Inc., Cat.#HPA005495, Cambridge, MA) and horse-radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (1:10,000 dilution; Jackson ImmunoResearch, Cat.#111-035-003, West Grove, PA) were used. Immunoblot chemiluminescence was performed using SuperSignal West Dura as substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The chemiluminescence signal images were captured by FluorChem 8900 (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Signal intensities were measured by AlphaEase FC (Alpha Innotech). Three independent experiments were performed.

Results

Clinical finding

Patient II-2 (Fig. 1a; Table 1) is a 26-year-old male born to non-consanguineous parents. His mother previously had a

Table 1 Clinical features of the presenting patients affected with LS

	II-2	II-3
Sex	M	M
Age (years)	26	19
Common clinical phenotype		
Psychomotor retardation	+	+
Failure to thrive	+	+
Swallowing difficulties	–	–
Spasticity	+	+
Rigidity	+	+
Pathological reflexes	+	+
Ataxia	+	+
Athetoid movements	+	+
Convulsions	+	+
Ophthalmoplegia	+	+
Strabismus	+	+
Gastrointestinal problems	+	+
Renal agenesis	NA	+
Pes equinovarus	+	+
Uncommon clinical phenotype		
Increase of ketone body	+	+

NA not assessed

spontaneous abortion. He was born at 39 weeks gestation without asphyxia after an uneventful pregnancy. His body weight was 3,680 g (+1.6 SD), his height was 50.0 cm (–0.5 SD), and his head circumference (HC) was 34.0 cm (–0.5 SD). His early developmental milestones were normal with head control and reach to toys at 4 months, roll at 6 months and grasp with two fingers at 7 months. At 10 months, he was referred to our hospital because of an inability to sit. His body weight was 9,120 g (\pm 0.0 SD), his height was 76.0 cm (+1.3 SD), and his HC was 48.0 cm (+1.4 SD). He could smile and swallow well. Bilateral strabismus was noted. No minor anomalies were noticed. Muscle tone was normal. Deep tendon reflexes were normal with negative Babinski sign. He showed athetoid movements of trunk and extremities. He showed pes equinovarus at traction response. Levels of lactate and pyruvate were normal with 12.2 and 0.89 mg/dl (L/P ratio = 13.7), respectively. Other laboratory examinations, including blood gas, blood sugar, ammonia, AST, ALT, BUN, Creatine, TSH, T3, T4, amino acids, and urine organic acid analyses were all normal. Electroencephalogram (EEG) showed no abnormalities. He was suspected to have dyskinetic cerebral palsy and referred to the division of rehabilitation. He could crawl at the age of 2. At 6 years, he experienced a loss of consciousness followed by generalized tonic–clonic convulsion with fever and was admitted to another hospital. He was diagnosed with bilateral infarction of the basal ganglia. Although EEG showed no abnormalities, clonazepam

was started with the suspicion of symptomatic epilepsy. At the age of 9, he was referred to us again. His weight was 19.1 kg (–4.5 SD), his height was 115.0 cm (–2.8 SD). He lost the ability to speak several words and switched handedness from right to left. He also showed other signs of regression: including spasticity with elevated deep tendon reflexes and positive Babinski sign. In addition, he suffered bilateral hip joint dislocations and the foot deformity became worse. Contractures were noted in all extremities. Brain magnetic resonance imaging (MRI) revealed a bilateral necrotic lesion of the globus pallidus (Fig. 2a, b). EEG and motor conduction velocities were normal. Laboratory examinations, including lactate and pyruvate, were all normal. At the age of 12, he was admitted with acute bronchitis, at that time he showed an increase of blood ketone bodies: acetoacetic acid, 720 μ mol/l; 3OHBA, 974 μ mol/l and urine ketone (+++). Blood levels of ammonia (18 μ mol/l), sugar (125 mg/dl) and lactate/pyruvate (5.1/0.29 mg/dl) were all within normal range. The values of blood ketone bodies returned to normal level with the cease of fever. Deficiencies of 3-ketothiolase and succinyl-CoA:3-oxoacid CoA transferase were ruled out by enzyme analysis using fibroblasts. His clinical symptoms and repeated MRI show the non-progressive course of his disease. Currently he is unable to sit or speak any words. Despite the addition of carbamazepine and lamotrigine, he still exhibits generalized tonic–clonic convulsion a few times a year. He also takes medicine for hypertonicity including dantrolene sodium, diazepam, baclofen and levodopa.

Patient II-3 (Fig. 1a; Table 1), the younger brother of II-2, was born uneventfully. He was born at 37 week's gestation without asphyxia after an uneventful pregnancy. His body weight was 3,668 g (+1.5 SD), his height was 50.0 cm (+0.5 SD), and his HC was 36.0 cm (–0.5 SD). He suffered from bacterial meningitis of unknown origin at 1 month of age. He became unconscious followed by convulsion and gastroenteritis at 1 year and 11 months. Brain MRI showed marked swelling of the basal ganglia (Fig. 2c, d). He was diagnosed with bilateral infarction of the basal ganglia. After this event, he became left handed. When he was 2 years old, surgery was performed to correct bilateral inner strabismus. He was referred to our hospital at the age of 4 for evaluation. His body weight was 11.0 kg (–2.2 SD), his height was 92.5 cm (–1.2 SD), and his HC was 49.5 cm (–1.3 SD). He could respond with a smile to his mother's voice. Motor milestones were delayed with no head control. No minor anomalies were noticed. Muscle tone was hypotonic. Deep tendon reflexes were exaggerated with positive Babinski sign and ankle clonus. He showed pes equinovarus. He showed a significant increase of blood acetoacetic acid of 1,270 μ mol/l and 3-OHBA of 3,270 μ mol/l. Levels of blood lactate and pyruvate were normal (6.2 and 0.48 mg/dl, respectively, L/P ratio = 12.9).

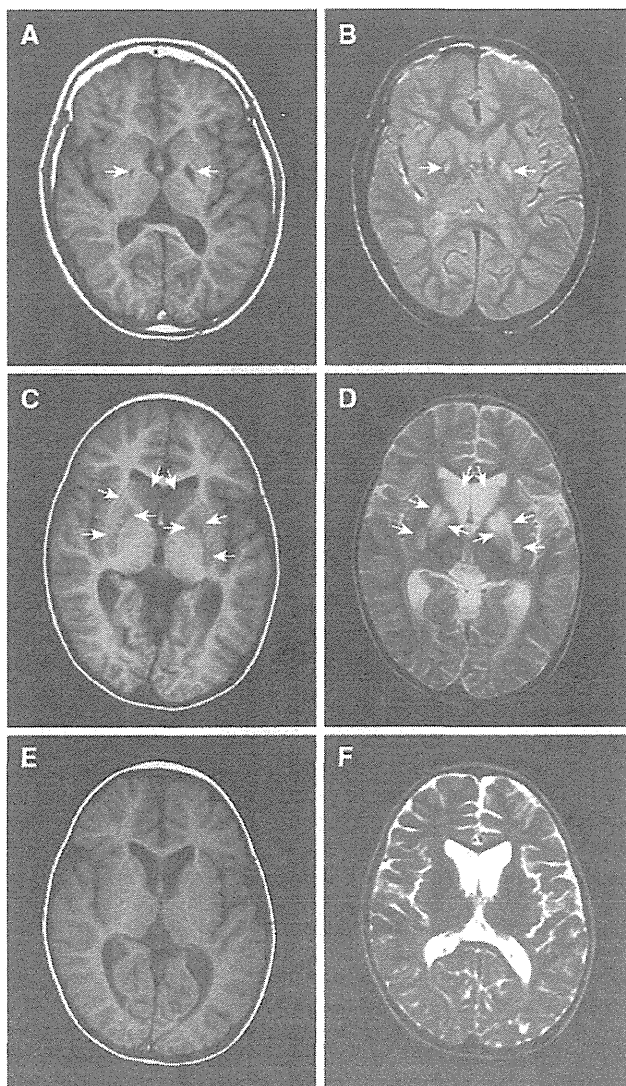


Fig. 2 Brain MRI of affected patients with a *GYG2* mutation. **a, b** (Patient II-2): T1 (**a**) and T2 (**b**) weighted brain magnetic resonance imaging (MRI) show necrotic lesion of bilateral globus pallidus (*arrows*). T2 elongation is observed at deep white matter at 1 year. **c–f** (Patient II-3): MRI at 1 year and 11 months shows swellings of caudate nuclei, globus pallidus, and putamen with the decreased T1 intensity (**c**) and increased T2 signals (**d**). *Arrows* indicate swollen lesions in basal ganglia. At 4 years (**e, f**), swelling of basal ganglia disappeared with continued mild high intensity in T2 weighted image (**f**)

Lactate and pyruvate levels of cerebrospinal fluid were slightly elevated with 11.3 and 1.11 mg/dl, respectively. Other laboratory examinations, including blood gas, blood sugar, ammonia, AST, ALT, BUN, Creatine, TSH, T3, T4, amino acids, and lysosomal enzymes were all normal. Urine organic acid analyses showed an increase of acetoacetic acid, 3-OHBA, and 3-OH-isovaleric acid. EEG showed no paroxysmal discharges. Muscle biopsy showed no specific abnormalities and no ragged red fibers. Staining for cytochrome c oxidase was normal (data not shown).

Brain MRI disclosed T2 elongation in the basal ganglia and cerebral deep white matter (Fig. 2e, f). At the age of 5, he showed lethargy with fever. At 6 years, he again showed lethargy. Biochemical analysis disclosed a significant increase of blood ketone bodies: acetoacetic acid, 1,337 $\mu\text{mol/l}$; 3-OHBA, 4,845 $\mu\text{mol/l}$ and urine ketone (+++). Blood levels of ammonia (28 $\mu\text{mol/l}$), sugar (78 mg/dl), lactate (5.1 mg/dl) and pyruvate (0.43 mg/dl) were all within normal range. Blood gas analysis revealed metabolic ketoacidosis with an increase of anion gap; 22.4 mEq/l (normal range 12 ± 2). His consciousness and biochemical measurements returned to normal within a few days with intravenous fluid infusion. Similar ketoacidosis attacks were repeatedly observed and agenesis of the left kidney and neurogenic bladder were recognized at the age of 8. He started intermittent urinary catheterization, and suffered from repeated urinary tract infections, resulted in chronic renal failure. Repeated brain MRI shows the progression of cerebral and cerebellar atrophy. He is now 19 years old and shows no gain of motor or intellectual abilities from the age of 4. He takes dantrolene sodium and diazepam for hypertonicity, and spherical charcoal, allopurinol for renal failure.

Identification of a *GYG2* variant by exome sequencing

A total of 2,433,011,483 bps (II-2) and 7,926,169,749 bps (II-3) were mapped to RefSeq coding DNA sequence (CDS). 83.3 and 96.0 % of CDS were covered by ten reads and more. We used only NGS data of II-3 for selecting candidate variants as the lower-quality NGS data of II-2 may lead to erroneous conclusion. Based on the hypothesis that this syndrome is inherited in an autosomal recessive or an X-linked recessive fashion, we focused on homozygous or compound heterozygous variants on autosomes and hemizygous variants on the X chromosome. While nine variants in four candidate genes were selected by in silico flow, only one hemizygous missense mutation in *GYG2* gene agreed with the familial segregation pattern (autosomal recessive or X-linked recessive) (Table S1, S2). The c.665G>C (p.W222S) in *GYG2* (isoform a: NM_001079855) was hemizygous in affected sibs and heterozygous in their mother, consistent with the X-linked recessive model, and was confirmed by Sanger sequence (Fig. 1b). The variant was absent in our in-house Japanese exome data ($n = 418$), the 1,000 Genomes database and ESP6500. Furthermore, no pathological variants in mtDNA were detected by exome sequence (Supplementary Results, Figure S1). In addition, a total of 21 LS patients (12 males and 9 females) were screened, but no pathological changes were found in *GYG2*.

GYG2 encodes *GYG2* proteins with at least five isoforms: isoform a (NM_001079855), isoform b (NM_003918),