

<臨床報告>

生後7カ月時に嘔吐と意識障害で発症した
グルタル酸血症Ⅱ型の一例

神奈川県立こども医療センター 内分泌代謝科
湊川真理、室谷浩二、花川純子、大戸佑二、朝倉由美、安達昌功

要旨

生後7カ月時に嘔吐と意識障害で発症したグルタル酸血症Ⅱ型の一児例を報告する。タンデムマス・スクリーニング導入以前の症例である。数日間の上気道炎症状の後、嘔吐、意識障害を呈した。脳症は否定的で、尿中有機酸分析、タンデムマス分析から、グルタル酸血症Ⅱ型と診断した。ImmunoblottingによりETFDH蛋白の発現を認めなかったことから、ETFDH遺伝子の変異解析を行い、複合ヘテロ接合体変異(Exon3にc.251C>T, p.A84V、および、Exon8にc.890G>T, p.W297L)を同定し、グルタル酸血症Ⅱ型と確定した。診断確定後、リボフラビン内服を継続して、定期的に外来経過観察中である。その後5年半の間に、インフルエンザウイルス感染、ロタウイルス胃腸炎などで計5回、各2~3日間の入院加療を行ったが、軽度の代謝性アシドーシスや低血糖を示すことはあるものの、重篤な急性代謝不全に陥ることはなく、毎回輸液療法のみで改善している。身体発育および精神運動発達は順調で、現在、普通学級に通学中である。初診時の対応、診断が適切になされたことが、予後の改善に役立ったと考えられる。

【はじめに】

グルタル酸血症Ⅱ型は、有機酸代謝異常症の一種で、別名、複合アシル-CoA脱水素酵素欠損症ともいわれる。ミトコンドリアの電子伝達フラビン蛋白(ETF)あるいはETF脱水素酵素の遺伝子変異が原因で起こる常染色体劣性遺伝形式の疾患である。これらの機能不全によりATP産生が障害されると共に、脂肪酸β酸化系酵素など複数の酵素の障害が惹起され、血中に中長鎖を中心としたアシルカルニチンが、また、尿中にエチルマロン酸やグルタル酸などの特徴的な有機酸が増加する¹⁾。

最重症の患児では、先天性の脳奇形や腎奇形が認められ、新生児早期から心筋障害が急速に進行し、呼吸障害や意識障害などの重篤な状態を呈するため、治療は困難である。一方、軽症~中等症の患児では、乳幼児期にかけて、低血糖症や代謝性アシドーシス、高アンモニア血症により嘔吐、意識障害や痙攣などを繰り返し、脳・筋障害や突然死を来すことがある。これらの患者では、早期治療により脳・筋障害を改善したり、突然死を防いだりすることが出来るため、早期診断が極めて

重要である。

今回われわれは、タンデムマス・スクリーニング導入以前に、嘔吐と意識障害で発症したグルタル酸血症Ⅱ型の一乳児例を経験したので報告する。

【症例】 7カ月 女児

【主訴】 嘔吐・意識障害

【妊娠・分娩歴】 妊娠経過に特記すべきことなし。在胎40週0日、頭位経陰分娩、体重3,122g(+0.8SD)、身長50.0cm(+0.3SD)、頭圍32.5cm(-0.3SD)、Apgar score 9/10で出生。哺乳良好で他に問題なく、日齢5に母と一緒に退院した。新生時カスリー検査に異常なし(タンデムマス分析は未施行)。

【既往歴】 特記すべきことなし

【発達歴】 定頸・あやし笑い4ヶ月、寝返り・座位6ヶ月。健診等で異常を指摘されたことはなし。

【家族歴】 血族婚なし、遺伝性疾患や新生児死亡などの家族歴なし。5歳姉：気管支喘息

【現病歴】 生後7ヶ月時、3日間咳嗽が続いていた。発熱なく活気あり、哺乳も良好であったため自宅で様子を見ていた。咳嗽出現4日目に嘔吐が

出現。離乳食や母乳を摂取しようとせず、その後嘔吐を繰り返し、開眼しなくなったため近医に受診した。近医受診時、採血等の痛み刺激に反応なく、開眼せず半昏睡の状態であった。血糖値80台と低血糖あり、肝腫大も認めため、当院に精査・加療目的で緊急転院となった。来院数日前より、両親と姉が下痢症状を訴えていたが、兎に下痢症状は認めなかった。

【入院時現症】全身状態不良。JCS 100-200 (採血時に声は出すが開眼せず、四肢の動きはほとんどなし)。体重9,015g (+1.5SD)。脈拍数150回/分、呼吸数40回/分、SpO₂ 100% (room air)、体温 37.3°C。頸部硬直なし。大泉門平坦。眼瞼結膜：貧血なし、黄疸なし、瞳孔両側2mm、対光反射迅速。咽頭発赤なし。呼吸音：清。心音：整・雑音なし。腹部：平坦・軟、右季肋下に硬い肝臓を3cm触知、脾腫大なし。麻痺はないが体動ほとんどなし。深部腱反射：亢進なし、減弱なし、左右差なし。

【検査所見】(異常値には下線を記す)

<血算> WBC 17400/ μ L (N 67%、L 30%)、RBC 351×10^9 / μ L、Hct 28.3%、Hb 9.8g/dL、Plt 35.8×10^9 / μ L

<生化学> Na 139mEq/L、K 4.3mEq/L、Cl 105mEq/L、Ca 8.7mg/dL、iP 5.5mg/dL、Mg 2.1mg/dL、TP 4.8g/dL、Alb 3.7g/dL、T-Bil 0.6mg/dL、D-Bil 0.2mg/dL、ChE 163IU/L、 γ GTP 14IU/L、AMY 15IU/L、胆汁酸 13.0 μ mol/L、AST 342IU/L、ALT 184IU/L、LDH 522IU/L、CK 882IU/L、BUN 14.1mg/dL、Cr 0.21mg/dL、Glu 60mg/dL、CRP 0.11mg/dL、NH₄ 79 μ mol/L、NSE 11.9 μ g/mL、Lac 20.0mg/dL、ビリビン酸 1.85mg/dL、AcAc 442 μ mol/L、3-OHBA 801 μ mol/L、Cu 37 μ g/dL、セルロプラスミン 9mg/dL、AFP 193.6mg/dL、HBs抗原 陰性、HBs抗体 陰性、HCV抗体 陰性

<凝固系> APTT 40.1sec、PT-INR 1.42、ATIII 30%、Fib 55mg/dL、D-dimer 0.54 μ g/mL

<血ガス(静脈)> pH 7.367、pCO₂ 31.4、HCO₃⁻ 17.6、BE -6.8mmol/L

<髄液検査> 細胞数 2/3 (Mono)、蛋白 24.0mg/ml、糖 71.5mg/dL、NSE 2.5ng/mL、Lac 19.7mg/dL、ビリビン酸 1.66mg/dL

<糞便検査> ロタウイルス陰性、アデノウイルス

ス陰性

<血漿アミノ酸検査> Aspartic acid 4.9nmol/mL、Hydroxyproline 34.5nmol/mL、Valine 71.9nmol/mL、Cystine 15.9nmol/mL、Isoleucine 16.9nmol/mL (低値)、Leucine 33.3nmol/mL (低値)、Monoethanolamine 26.1nmol/mL (高値)、Arginine 30.2nmol/mL

<尿中有機酸分析> ジカルボン酸尿、軽度ケトシス、Ethylmalonate、glutarate、2-OH-glutarateの排泄増加(図1)

<タンデムマス分析> 遊離カルニチンの低下、中鎖~長鎖アシルカルニチンの広範な上昇あり(表)

<脳波検査> 全般性に徐派の混入あり、発作性異常波なし

<頭部CT> 脳浮腫なし、出血病変なし、奇形なし、皮髄境界は月齢相当。

<頭部MRI> (入院翌日に施行) 拡散強調像を含め脳実質に異常信号を認めず、皮髄境界は月齢相当。頭蓋内異常を認めず。

<腹部超音波検査> 肝実質および両側腎皮質の輝度がびまん性に上昇。肝腫大軽度。Glycogen storage diseaseなどの代謝疾患の可能性が疑われる。

【入院後経過】

入院時、意識障害および嘔吐に加え、脳波検査で全般性徐派を認め、髄液検査で細胞数の増加がなかったことから脳症を疑って、総合診療科で精査・加療を行なった。入院翌日、頭部MRI検査(拡散強調像を含む)で異常を認めず、また、脳液も正常化していた。開眼し時折目が合うようになり意識も入院時に比べて改善傾向であった。髄液のNSE、乳酸、ビリビン酸等の上昇なく、脳症は否定的となった。代謝性アシドーシス、ケトン体の上昇、肝酵素上昇、凝固異常を認めたことから、何らかの要因による肝機能障害や代謝性疾患を疑い、アシドーシスの補正等行いながら、内分泌代謝科にコンサルトとなった。

当院来院時、低血糖および代償性の代謝性アシドーシスに加えて、凝固障害を合併し、意識レベルは傾眠傾向で、ほとんど開眼しなかった。入院後から低血糖に対してGIR 5.4mg/kg/minで輸液を開始したが、血糖値が安定せず、血糖値をモニター

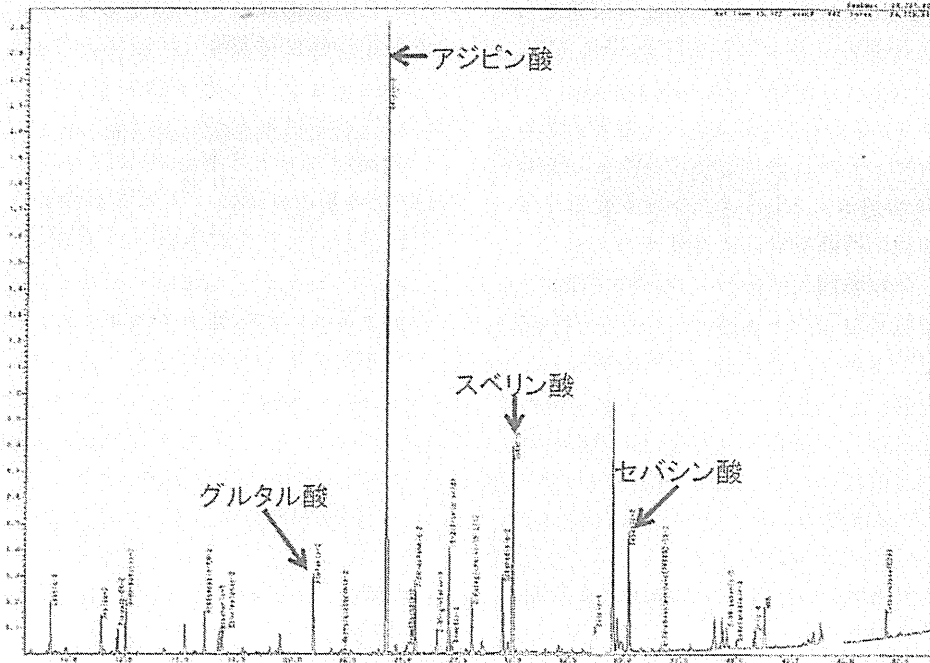


図1. 尿中有機酸分析

ジカルボン酸尿、軽度ケトーシス、グルタル酸等の排泄増加を認めた。アジピン酸、スベリン酸、セバシン酸は、全てジカルボン酸（2つのカルボキシル基をもつ有機化合物のこと）である。

表. タンデムマス分析

			下限値	上限値
C0	6.88 μ M	Low	10	60
C2	12.15 μ M		5	45
C4	0.53 μ M			1.4
C6	0.31 μ M	High		0.25
C8	0.45 μ M	High		0.35
C8:1	0.039 μ M			0.43
C8DC	0.076 μ M			0.25
C10	0.52 μ M	High		0.4
C10:1	0.1 μ M			0.28
C10DC	0.16 μ M			1.2
C12/C6:1DC	0.51 μ M	High		0.3
C12:1	0.15 μ M			0.15
C12DC	0.1 μ M			0.5
C14/C8:1DC	0.76 μ M	High		0.7
C14:1	0.47 μ M	High		0.4
C14-OH	0.039 μ M			0.12
C16	1.66 μ M		0.6	6.5
C16:1	0.67 μ M			0.785
C16-OH	0.025 μ M			0.12
C18	0.87 μ M		0.15	2.1
C18:1	1.21 μ M		0.3	3.2
C18:2	0.24 μ M		0.03	0.8
C18-OH	0.005 μ M			0.1
C18:1-OH	0.021 μ M			0.07
C8/C2	0.037	High		0.02
C8/C10	0.67			3

遊離カルニチン低下、中鎖～長鎖アシルカルニチン広範上昇を認めた。アミノ酸分析結果は、異常を認めないため表中から省いた。

しながらGIRの調整を行った。入院当日夜間から非代償性の代謝性アシドーシスとなり (pH 7.30、 pCO_2 38.9、 HCO_3^- 17.3、BE -6.7mmol/L)、炭酸水素ナトリウム投与 (6.6mEq) により補正を試みたが反応せず、それ以上の補正は行わず経過観察した。凝固障害は、ATⅢ 500Uの補充により改善し、その後、再燃することはなかった。

入院翌日、傾眠傾向ではあったが時折開眼し視線が合うようになった。入院3日目には自然経過で代謝性アシドーシスは改善し、GIR漸減したが血糖値も安定した。自分でガラガラを持って遊び、哺乳が可能になり、意識レベルはほぼ改善した。肝酵素異常は改善したが、肝腫大は持続した (図2)。意識障害が改善したため、入院3日目よりソリタ₃水の注入を開始。4日目よりミルクの注入を開始し以後漸増。6日目より直接哺乳を開始、7日目より自律哺乳とした。

急性期の尿中有機酸分析の結果、低ケトン性ジカルボン酸尿がみられた (図1) ことから、何らかの脂肪酸代謝の存在が疑われた。さらに、タンデムマス分析で血中遊離カルニチンの低下および

中～長鎖脂肪酸の著明な増加を認め (表)、尿中有機酸分析で有機酸代謝経路の脱水素反応の障害を反映するグルタル酸および γ -ヒドロキシグルタル酸の増加を認めた (図1) ことから、グルタル酸血症Ⅱ型と診断した。リボフラビン100mg/dayで内服を開始し、全身状態良好のため入院10日目に退院した。退院時、活気あり、座位保持可能、おもちゃで一人遊びができ、意識レベルは入院前と変わらぬ状態まで改善した。直母による哺乳や離乳食摂取も問題なく行える状態となった。

後日、島根大学小児科に依頼して分子遺伝学的解析を行った (図3)。ImmunoblottingによりETFDH蛋白の発現を認めなかった。ETFDH遺伝子の変異解析の結果、複合ヘテロ接合体変異 (Exon3にc.251C>T、p.A84V、および、Exon8にc.890G>T、p.W297L) を認めたことから、グルタル酸血症Ⅱ型と確定診断した。両親の保因者解析は希望されなかった。

【退院後の経過】

退院1ヶ月後、肝酵素は正常化し、肝腫大も認

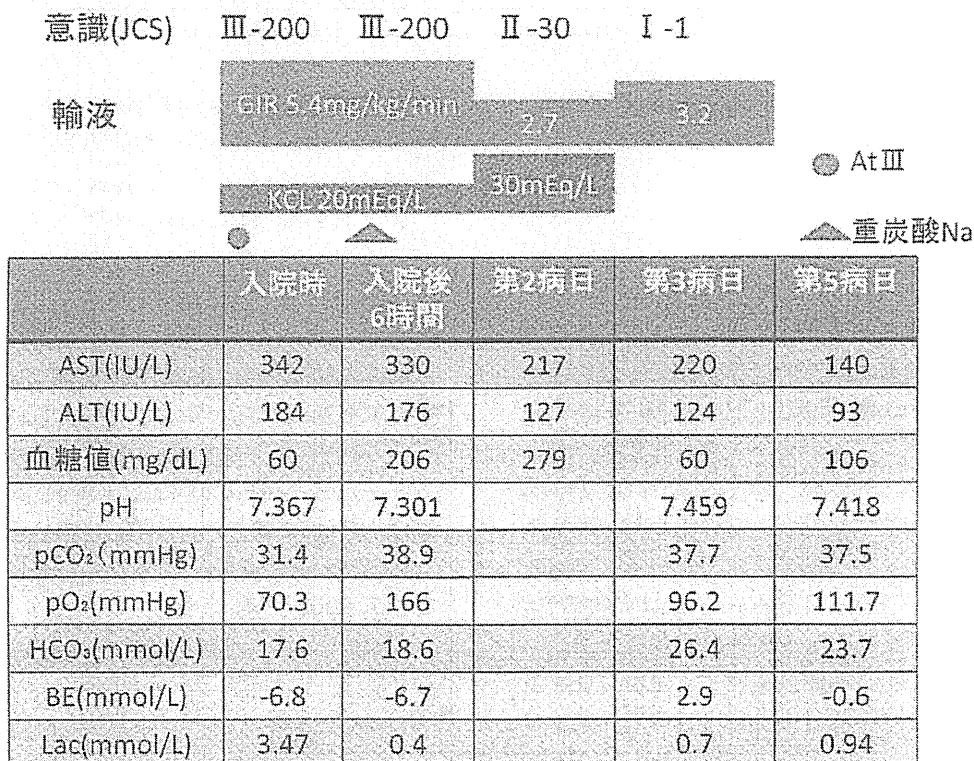


図2. 経過表

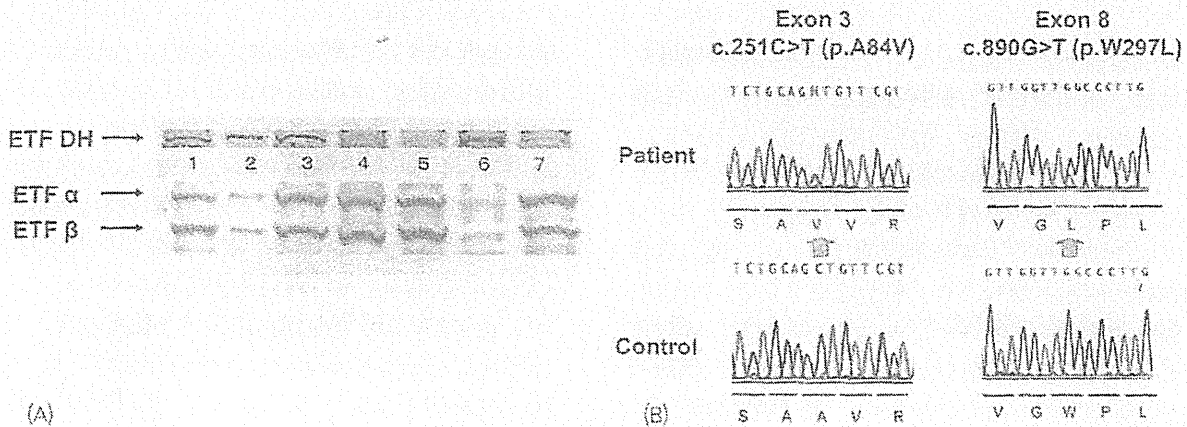


図3. 分子遺伝学的解析

(A) Immunoblotting

レーン1 & 3: コントロール・線維芽細胞、2: コントロール・肝臓、4 & 5: DH欠損患者・線維芽細胞、6: α2欠損患者・線維芽細胞、7: 本患者・線維芽細胞

(B) ETFDH遺伝子解析

本患者において、Exon3にc.251C>T (p.A84V)、および、Exon8にc.890G>T (p.W297L) を認めた (複合ヘテロ接合変異)。

めなくなった。その後、リボフラビン内服を継続して、定期的に外来経過観察中である。6歳になるまでの5年半の間に、インフルエンザウイルス感染、ロタウイルス胃腸炎、急性気管支炎などで計5回、各2～3日間の入院加療を行った。軽度の代謝性アシドーシスや低血糖を示すことはあるものの、重篤な急性代謝不全に陥ることはなく、毎回輸液療法のみで改善した。身体発育および精神運動発達は順調で、10カ月でお座り、12カ月でははい・つかまり立ち、1歳2カ月で有意語、1歳3ヶ月で独歩可となった。現在、普通学級に通学中である。成長曲線を図4に示す。

回復後に行ったタンデムマス分析では、C8、C10、C12の中鎖アシルカルニチンの上昇を認めたものの、上昇の程度は急性期と比べて軽減していた。また、尿中有機酸分析ではエチルマロン酸およびアジピン酸の軽度排泄増加を認めたのみで全体として安定したプロファイルであった。

【考察】

今回われわれは、タンデムマス・スクリーニング導入以前に、嘔吐と意識障害で発症したグルタル酸血症II型の一乳児例を経験したので報告した。

本症例における意識障害の原因は、代謝性アシドーシスおよび低血糖によるものと考えられる。

横断的標準身長・体重曲線 女子(0-18歳) 2000年度版

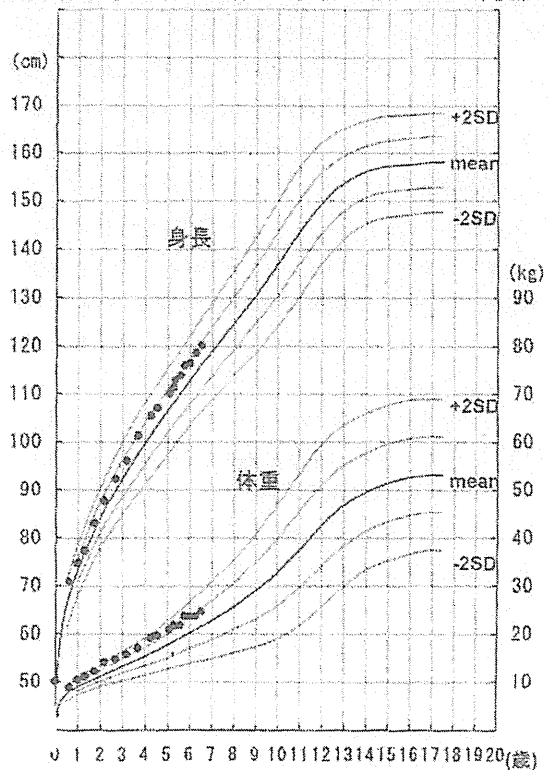


図4. 成長曲線

来院数日前より出現していた上気道症状や嘔吐を契機に哺乳困難から飢餓状態となり、アミノ酸異化過程および脂肪酸β酸化の障害からケトosisを呈し、非代償性の代謝性アシドーシスをきたしたと考えられる。低血糖および代謝性アシドーシスの改善に伴い、意識が改善したこと、他に意識障害の原因となりうる、脳症をはじめとする脳の器質的変化、てんかん、内分泌学的異常、電解質異常、心疾患、重篤感染症、高・低体温、低酸素血症等が除外されたことから、意識障害の原因は低血糖および代謝性アシドーシスに起因したものと結論される。

意識障害を主訴に来院した患児に対して、先天代謝異常症の存在を鑑別に置くことが重要である。グルタル酸血症Ⅱ型は、致死的な場合が多い新生児発症の重症型から、乳幼児期にストレスなどを契機に発症する病型、思春期以降に筋力低下等で発症する病型まで多様であるが、遅発型の病型に対する対応の遅れは重篤な転機に帰結する⁴⁾⁵⁾。そのため、いち早く本疾患を疑い、前駆アミノ酸摂取の制限、脂肪の過剰を避け、糖質を主体とした適切なエネルギー補給を行う必要がある。本症例では最初に脳症を除外した。アニオンギャップ増加型の代謝性アシドーシスや低血糖を認めたが、下痢や遷流量低下はなく、脱水症・低酸素血症・敗血症・心不全・腎不全など代謝性アシドーシスの原因となりうる全身状態の変化を認めなかった。このことから、何らかの代謝異常症がベースにあることが推測され精査を行うと同時に、高めのGIRでエネルギー補給を開始した。また、確定診断後はリボフラビンの内服と、感染などストレス時に入院・輸液療法を行った。その後、急性代謝不全の状態に陥ることなく経過しており、成長・発達は順調である。

意識障害を主訴に来院した患児に対し代謝異常症の存在が疑われた場合、急性期の血漿および尿の採取が望まれる。本疾患はタンデムマス分析および尿中有機酸分析により確定診断が可能である

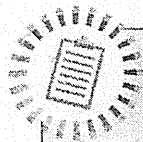
が、急性期を脱した安定期に採取した血漿および尿の分析では、診断がつかないことも珍しくない⁶⁾⁷⁾。本症例は、それほど強い代謝性アシドーシスではなく、乳酸やアンモニアの上昇も軽度であったことから、有機酸や糖の代謝異常症や尿素サイクル異常症、ミトコンドリア病等は否定的であり、脂肪酸やアミノ酸の代謝異常症が有力であった。最終的には、急性期の尿中有機酸分析とタンデムマス分析の結果より、本疾患と確定した。昨今、タンデムマス・スクリーニングが全国的に行われるようになってきたことから、グルタル酸血症Ⅱ型の多くが早期診断可能になったと考えられる。しかし、タンデムマス・スクリーニングで異常を指摘されないような症例もあると考えられ、意識障害や低血糖を認める症例では、本症を含む先天代謝異常症の存在を鑑別に置くことが重要である。

【謝辞】

タンデムマス分析、分子遺伝学的解析を担当していただきました島根大学医学部小児科の小林弘典先生、長谷川有紀先生、山口清次教授に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) 山口清次：グルタル酸血症Ⅱ型. 有機酸代謝異常ガイドブック, 診断と治療社, 72-78, 2011
- 2) 西本由郁, 他：グルタル酸血症Ⅱ型患者17例の臨床像と病因の検討. 日本先天代謝異常学会雑誌 21(2): 143, 2005
- 3) Yotsumoto Y et al.: Clinical and molecular investigations of Japanese cases of glutaric acidemia type 2. *Mol Genet Metab* 94(1): 61-67, 2008
- 4) Vockley J et al: Glutaric acieuria type 2 and newborn screening: commentary. *Mol Genet Metab* 93(1): 5-6, 2008
- 5) Pollard LM et al.: Diagnosis, treatment, and long-term outcomes of late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Child Neurol* 25(8): 954-960, 201



訪問看護師による経静脈的ビタミンD補充でくる病の顕著な改善を得た進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Byler病) の1例

さとうたけし
佐藤武志^{※1-1}

ひろやこうじ
室谷浩二^{※1}

はなかわじゅんこ
花川純子^{※1}

あさくらゆみ
朝倉由美^{※1}

こんどうおさむ
近藤 脩^{※2}

あだちまさのり
安達昌功^{※1}

要 旨

症例は現在19歳の男性。生後6カ月時に進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Byler病) と診断された。ビタミンD欠乏性くる病に対し、カルシトリオール的大量投与、および隔月の受診ごとにエルゴカルシフェロール800 IUの経静脈的投与を行ったが、骨変形と低カルシウム血症が増悪し、15歳時には歩行困難となった。入院のうえ、同量のエルゴカルシフェロール投与を週3回のペースで1.5カ月間行ったところ、顕著な改善が得られた。退院後は、地元の訪問看護師の協力を得て、本治療を週2回ペースで継続することで治療効果を維持できた。同時に明らかな成長率の増加が得られ、二次性徴も発来した。訪問看護師による脂溶性ビタミン経静脈的投与は、胆汁鬱滞性疾患におけるビタミンD欠乏性くる病の管理に有用であると考えられた。

[小児科臨床 66 : 2263, 2013]



KEY WORDS

進行性家族性胆汁鬱滞症1型, Byler病, 肝性くる病, 訪問看護師, 脂溶性ビタミン

はじめに

進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Progressive familial intrahepatic cholestasis-1, PFIC1) は、Byler病とも呼ばれ、胆汁の輸送を担うP型ATPase蛋白の機能低下に起因し、ATP8B1遺伝子異常による常染色体劣性遺伝疾患である¹⁾。乳児期から成長障害および胆汁鬱滞を呈し、最終的に胆汁鬱滞性肝硬変に至る。胆汁鬱滞による脂溶性ビタミン欠乏は内服によるビタミン補充に抵抗

性であり、管理に難渋することが多い²⁾⁻⁵⁾。

今回われわれは、大量の活性型ビタミンD剤投与にもかかわらず重度のくる病から歩行困難を来したPFIC1の男性に対し、訪問看護師による週2回の経静脈的ビタミンD補充を実施したところ、顕著な改善を得たため報告する。

症 例

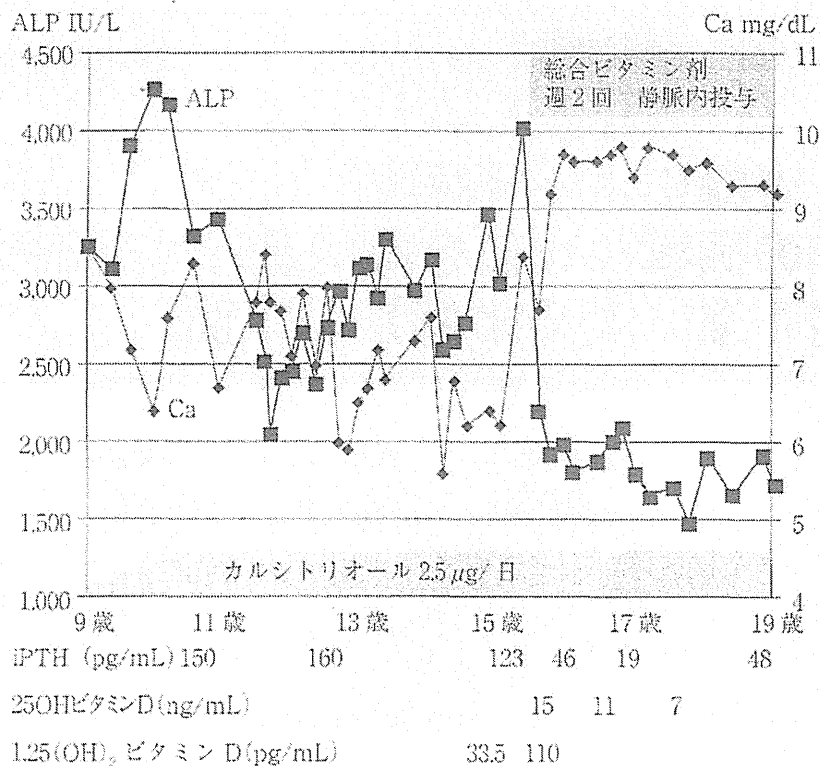
症例：現在19歳、男性

周産期歴：在胎41週3日、出生体重2,942 g.

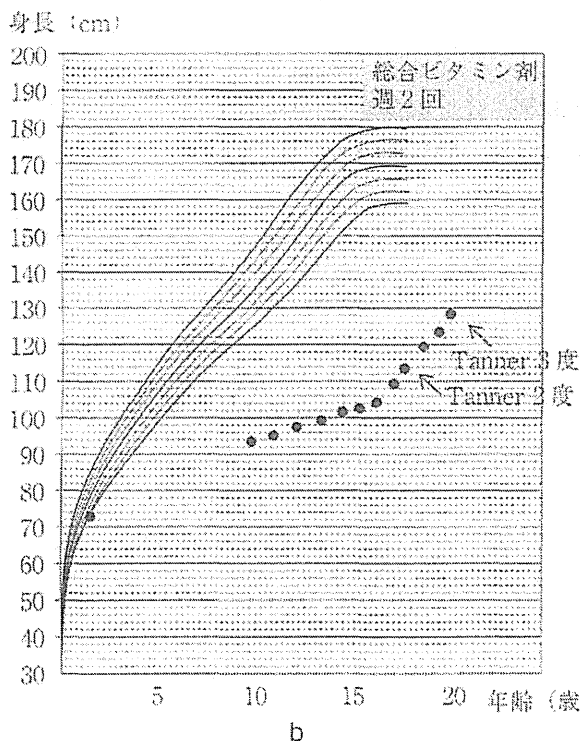
※1：神奈川県立こども医療センター 内分泌代謝科 (〒232-8555 神奈川県横浜市南区六ツ川2-138-4)

※2：仁厚会病院 内科

※1-1：現 慶應義塾大学医学部 小児科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35)



a



a : カルシトリオール2.5 μg/日と2か月ごとの総合ビタミン剤の経静脈的投与を行ったが、低カルシウム血症、iPTH高値、ALP高値は持続した。15歳時から週2回の総合ビタミン剤の経静脈的投与を行ったところ、Ca、iPTHは基準範囲内まで改善、ALPも低下した。血中25OHD値は低値のままであった。

b : 週2回の経静脈的ビタミンD補充開始後から身長著明な増加が認められ、同時に二次性徴の進行も認められた。

図1 血中ALP, Ca, iPTH, 25OH ビタミンD, 1,25 (OH)₂ ビタミンDの推移と成長曲線

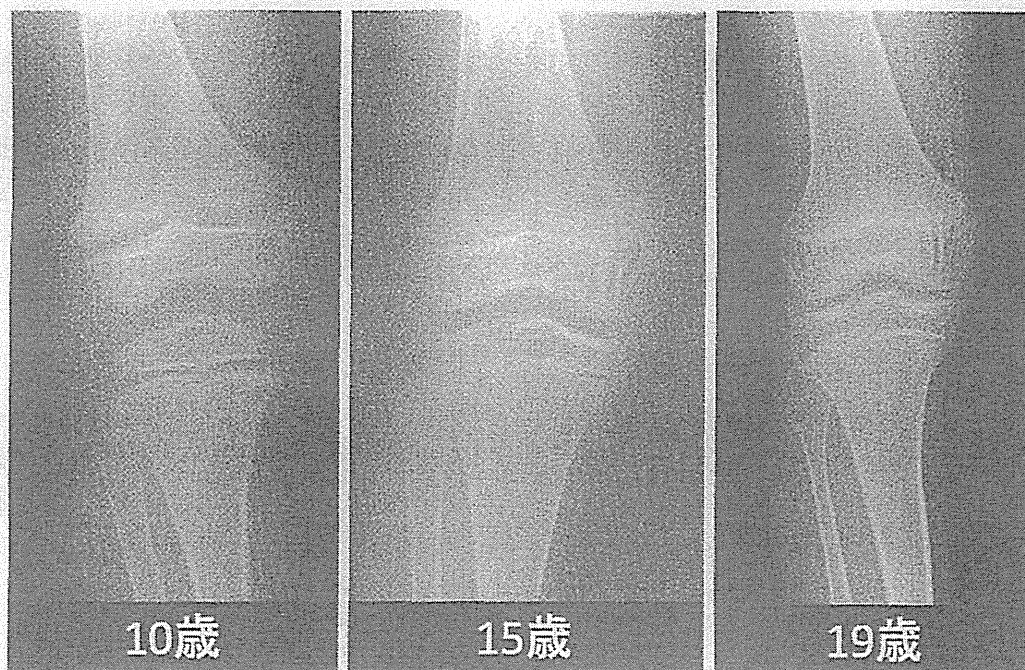


図2 右膝関節X線所見の推移

10歳時、カルシトリオール $2.5 \mu\text{g}/\text{日}$ 、乳酸カルシウム $1 \text{g}/\text{日}$ を内服していたが、下肢痛のため間欠的に車椅子を必要としていた。

15歳時、歩行困難となる。

19歳時、週2回総合ビタミン剤の経静脈的投与を行い、くる病所見は改善した。

低置胎盤のため帝王切開で仮死なく出生した。

家族歴：血族婚なし。母：難聴、知的障害。父：健康。姉：原因不明の胆汁鬱滞に対し、生後8カ月時に他院で肝生検を施行され、その1週間後に劇症肝炎を発症し死亡。16歳弟：健康。12歳弟：健康。

現病歴：3カ月健診で体重増加不良、肝腫大、黄疸を指摘されたが受診せず。6カ月健診で再び同症状を指摘され、当院に紹介受診。初診時、体重増加不良・黄疸・肝腫大・皮膚掻痒を認め、検査で胆汁鬱滞の所見（T-Bil $6.5 \text{mg}/\text{dL}$ 、D-Bil $4.9 \text{mg}/\text{dL}$ 、血中胆汁酸 $160.8 \mu\text{mol}/\text{L}$ ）を認めたが、 γGTP は基準範囲（ $8 \text{IU}/\text{L}$ ）であった。1歳11カ月に行った肝生検では、非特異的な肝障害および胆汁鬱滞の所見のみ認められた。尿中胆汁酸分析で抱合型胆汁酸（グリココール酸、タウロコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸）の異常高値を認めた。ATP8B1遺伝子解析は行っていないが、以上の所見から PFIC1と診断した。また、知的障害を認

めており、12歳時の知能指数は66であった。

その後の経過：初診時の段階で、ALP 高値（ $1,861 \text{IU}/\text{L}$ ）、インタクトPTH（iPTH）高値（ $160 \text{pg}/\text{mL}$ ）、25水酸化ビタミンD（25OHD）低値（ $< 4 \text{ng}/\text{mL}$ ）を認め、ビタミンD欠乏性くる病と考えた。ほかの脂溶性ビタミンの血中濃度も低値であった。くる病の治療として、当初はアルファカルシドールを使用したが発効せず、カルシトリオールの大量投与に変更した。しかし、くる病所見は改善せず次第に骨変形が増悪し、8歳時には下肢痛のため間欠的に車椅子が必要となった。この時期より低カルシウム血症も認めるようになったが、この時点でのカルシトリオール投与量は $2.5 \mu\text{g}/\text{日}$ であり、乳酸カルシウム（ $1 \text{g}/\text{日}$ ）も併用していた。11歳時から、外来受診時に総合ビタミン剤の静脈内投与を行ったが、受診が不定期でかつ2～3カ月ごと程度にしか受診できないという家庭の事情もあり、効果は認められなかった（図1、2）。

15歳時に、歩行困難となり、また無症候性の骨

折を認めたため、入院加療とし、総合ビタミン剤2バイアル、週3回の経静脈投与を開始した。1カ月半の入院加療で、骨痛の軽減・血中カルシウム濃度の正常化が得られ、歩行も可能となった。退院後も同様の治療の継続を模索したが、住居が遠方であるため当院への来院は困難と思われ、また近医に依頼した場合でも頻回の受診が守られる可能性は低いと予想された。そこで、地元の訪問看護ステーションに協力を依頼し、週2回の訪問看護を計画したうえで、その際に総合ビタミン剤を末梢静脈から投与することとした。退院後2カ月後から車椅子は不要となり、図1、2に示すように、血中25OHD濃度は低値であったが、ALPが低下し低カルシウム血症の再燃もなく、治療の有効性が維持された。年間成長率が1.3 cm (開始前) → 6.4 cm (1年目) → 7.7 cm (2年目) → 5.9 cm (3年目)と著明に改善した。また、15歳時には二次性徴は全く発来していなかったが、18歳時には、精巣サイズ6～8 cc、恥毛Tanner 2度程度の発達を認めた。

考 察

本症例は、カルシトリオールを最大2.5 μg/日まで増量したが、くる病の進行は抑制できなかった。PFIC1におけるくる病は、腸管からの脂溶性ビタミンの吸収障害が主因であり、また肝でのビタミンD25位の水酸化障害も加味され、多量のビタミンD経口投与に抵抗性を示す場合も少なくない。本症例では、約15年の経過で、歩行不能の状態まで増悪が認められた。治療後に成長速度が改善し、思春期徴候も進展したことから、著明な低身長と思春期遅発もくる病に由来していたことが推察される。

静脈注射や筋肉注射による脂溶性ビタミンの補充は、腸管での吸収障害の影響を避けることができる有用な方法である⁶⁾。本症例では、週2回の総合ビタミン剤投与により、短期間で顕著な効果が認められた。これは1週間当たりビタミンD 1,600 IUに相当し、1日当たりでは約230単位となる。経口摂取量の第6次改定日本人栄養所要量によれば、15～17歳男性でのビタミンDの所要量

と許容上限量は、それぞれ100 IU、2,000 IUとされている。したがって、所要量とほぼ同等のビタミンDを経静脈的に投与するだけで、肝性くる病の速やかな改善が得られることが理解される。

本症例は、両親および本人ともに理解力の問題があり、退院後の治療の継続は極めて困難であると予想された。このため、地元の訪問看護ステーションと協力し、週2回の訪問看護時に総合ビタミン剤を経静脈的に投与することとし、良好な治療効果を維持することができた。平成14年の通知(医政発093002)により、保健師助産師看護師法の解釈が変更され、それまで医師の直接監視下でのみ認められていた看護師の医療行為が、医療機関外でも認められることとなった。平成16年の診療報酬改定では「在宅患者訪問点滴注射管理指導料」が新設されている。これにより、医師が看護師に患家での点滴注射を指示し実施された場合には、上記の指導料と薬剤料が医療機関で算定できるようになっている。

家庭の事情によらない場合でも、一部であっても在宅で治療ができれば、通院回数が減り、患者家族の利便性につながると思われる。血管確保の困難性や輸液中の安静の問題から、乳幼児では困難を伴うことが予想されるが、血管確保が容易な年長児では、訪問看護を利用したビタミンD補充が有用な状況も少なくないと考えられた。

なお、本論文の要旨は第39回日本小児栄養消化器肝臓学会(2012年7月、大阪)において報告した。

文 献

- 1) Hori T, Nguyen JH, Uemoto S: Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9: 570~578, 2010
- 2) Skinner RK, Sherlock S, Wills MR et al: 25-hydroxylation of vitamin D in primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1: 720~721, 1977
- 3) Strople J, Lovell G, Heubi J: Prevalence of subclinical vitamin K deficiency in cholestatic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49: 78~84, 2009
- 4) Saito K, Matsumoto S, Kamoshita S et al: Pathology of chronic vitamin E deficiency in fatal familial intrahepatic cholestasis (Byler Disease). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 396:

319~330, 1982

5) Shnider BL, Magee JC, Sokol RJ et al : Efficacy of fat-soluble vitamin supplementation in infants with biliary atresia. Pediatrics 130 : 607~614, 2012

6) Perlmutter DH, Gross P, Grand RJ et al : Intramuscular vitamin E repletion in children with chronic cholestasis. Am J Dis Child 141 : 170~174, 1987

Intravenous supplementation of fat-soluble vitamins by visiting nurses twice a week in a male with vitamin D deficiency rickets due to progressive familial intrahepatic cholestasis-1, Byler disease

Takeshi Sato¹⁾, Koji Muroya¹⁾, Junko Hanakawa¹⁾, Yumi Asakura¹⁾,
Osamu Kondoh²⁾ and Masanori Adachi¹⁾

¹⁾ Department of Endocrinology and Metabolism, Kanagawa Children's Medical Center

²⁾ Department of Internal Medicine, Jinkohkai Hospital

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

原 著

非進行性肝型と考えられる糖原病 IV 型の 1 例

神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科¹⁾, 同 感染免疫科²⁾, 同 病理診断科³⁾,
東京女子医科大学医学部小児科⁴⁾, 自治医科大学医学部小児科⁵⁾

河野 香¹⁾⁴⁾ 安達 昌功¹⁾ 朝倉 由美¹⁾
室谷 浩二¹⁾ 鹿間 芳明²⁾ 赤城 邦彦²⁾
田中 祐吉³⁾ 福田冬季子⁵⁾ 杉江 秀夫⁵⁾

要 旨

糖原病 IV 型は, グリコーゲン分枝酵素の欠損により進行性肝障害を呈する予後不良な疾患である. 症例は現在 11 歳 6 か月の男児. 1 歳 2 か月時に偶然肝逸脱酵素上昇を指摘され, 肝脾腫も認めた. 高乳酸血症は認めなかったが, 肝生検組織の PAS 染色にてジアスターゼ抵抗性のアミロペクチン様物質を認め, 赤血球中グリコーゲン分枝酵素活性の低下を確認した. 経過中, 肝脾腫の消失とともに肝逸脱酵素も低下し, 現在は全く無症状であるため, 非進行性肝型の糖原病 IV 型と考えられた. 本疾患の臨床症状の多様性が再認識され, 肝腫大症例では常に本疾患を念頭に置く必要があると考えられた.

キーワード: 糖原病 IV 型, 非進行性肝型, 肝生検, PAS 染色

はじめに

糖原病はグリコーゲン代謝に関与する酵素の先天的な異常により, 組織にグリコーゲン (糖原) が貯蓄する疾患の総称である¹⁾²⁾. グリコーゲンの蓄積部位により, 全身型, 肝型, 筋型に分類される. 糖原病 IV 型 (OMIM #232500) は肝型糖原病のひとつであり, Andersen 病あるいはアミロペクチノーシスとも呼ばれる. グリコーゲンの分枝構造形成にかかわるグリコーゲン分枝酵素 (glycogen branching enzyme: GBE) の欠損により発症し¹⁾²⁾, 分枝した正常グリコーゲン分子が形成されず, 直線状のアミロースが僅かに分岐した程度のアミロペクチン様の異常グリコーゲン分子が形成される. この異常グリコーゲンが蓄積することにより臓器障害をきたし, 典型例では乳児期から肝障害が進行し, 多くは 5 歳までに肝硬変で死亡する. 今回われわれは, 偶然発見された肝逸脱酵素上昇を契機に糖原病 IV 型と診断されたが, 肝障害の悪化を認めず, 非進行性と考えられる症例を経験したため報告する.

症 例

患者: 現在 11 歳 6 か月の男児.
主訴: 肝逸脱酵素上昇.

家族歴: 父方祖父 早期胃癌. 血族婚なし. 3 歳年長の姉は健康.

既往歴: 特記事項なし.

発達歴: 独歩 11 か月, 発語 1 歳 6 か月.

現病歴: 1 歳 2 か月時, 体幹部の発疹および持続する発熱を主訴に, 近医より大学病院を紹介された. 血液検査にて, AST 1,291U/L, ALT 415U/L と肝逸脱酵素の上昇を認め, 精査目的で入院となった. 入院後翌日には解熱し, 発疹も消褪した. 入院後の血液検査にて, HA 抗体陰性, HBs 抗原陰性, HCV 抗体陰性, ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV6)-IgG 640 倍, HHV6-IgM 10 倍, EB ウイルス (EBV) は既感染パターンであった. セルロプラスミン値の低下なく, 抗核抗体も 40 倍未満であった. 肝生検でウイルス感染による肝炎が疑われ, グリチルリチン製剤が投与された. しかし, その後も AST/ALT 200~300U/L が持続するため, 2 歳 1 か月時に当院に入院となった.

入院時現症: 身長 80.9cm (-1.5SD), 体重 10.54kg (肥満度 -0.4%), 全身状態良好であった. 聴診上 3LSB に LevineII/VI の収縮期雑音を聴取した. 腹部は軽度膨満し, やや硬い肝臓を右肋骨下縁から約 6cm 触知, 脾臓を左肋骨下縁から約 1.5cm 触知した. 神経学的所見には異常を認めなかった.

入院時検査所見 (表 1): AST 221U/L, ALT 124U/L と高値が持続していたが, 胆道系酵素は正常域であった. 低血糖, アシドーシス, 高尿酸血症, 高脂血症は認めなかった. 抗核抗体, 抗平滑筋抗体, 抗 LKM-1 抗体も陰性であり, HHV6, サイトメガロウイルス,

(平成 25 年 3 月 14 日受付) (平成 25 年 8 月 21 日受理)
別刷請求先: (〒232-8555) 横浜市南区六ッ川2-138-4
神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科
安達 昌功

E-mail: madachi@mars.sannet.ne.jp

表1 当院入院時検査結果 (2歳時)

【血算】 WBC 11.100 / μ l RBC 465 万 / μ l Hb 9.2 g/dl Ht 29.5 % Plt 41.3×10^4 / μ l 【凝固線溶系】 PT 14.3 sec PT% 77.3 % PT-INR 1.20 APTT 33.5 sec Fib 216 mg/dl HPT 83.0 % 【血液ガス (静脈血)】 pH 7.357 PCO ₂ 43.2 mmHg HCO ₃ ⁻ 23.7 mmHg BE -1.8	【生化学】 TP 7.3 g/dl Alb 4.4 g/dl T-bil 0.2 mg/dl AST 221 U/l ALT 124 U/l ZTT 7.0 単位 TTT 15.4 単位 LDH 310 U/l ALP 870 U/l γ -GTP 79 U/l ChE 393 IU/l CK 81 U/l BUN 11.5 mg/dl Cr 0.19 mg/dl Na 140 mEq/l K 4.5 mEq/l Cl 103 mEq/l Ca 9.7 mg/dl P 5.3 mg/dl Fe 29 μ g/dl Ferritin 12.1 ng/ml	T-Chol 145 mg/dl TG 78 mg/dl CRP <0.1 mg/dl BS 75 mg/dl NH ₃ 47 μ mol/L 赤血球ホスホリラーゼ・キナーゼ活性* 患児 0.16 μ mol/min/gHb 対照 0.17 μ mol/min/gHb ブドウ糖負荷試験 (2.5g/kg, 経口投与) グルカゴン負荷試験 (空腹時筋注, 0.03mg/kg)																														
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>血糖 (mg/dl)</th> <th>乳酸 (mg/dl)</th> <th></th> <th>血糖 (mg/dl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>前</td> <td>92</td> <td>10.3</td> <td>前</td> <td>74</td> </tr> <tr> <td>30分</td> <td>178</td> <td>16.9</td> <td>30分</td> <td>113</td> </tr> <tr> <td>60分</td> <td>136</td> <td>19.0</td> <td>60分</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>90分</td> <td>121</td> <td>20.0</td> <td>90分</td> <td>62</td> </tr> <tr> <td>120分</td> <td>100</td> <td>16.7</td> <td>120分</td> <td>78</td> </tr> </tbody> </table>		血糖 (mg/dl)	乳酸 (mg/dl)		血糖 (mg/dl)	前	92	10.3	前	74	30分	178	16.9	30分	113	60分	136	19.0	60分	70	90分	121	20.0	90分	62	120分	100	16.7	120分	78
	血糖 (mg/dl)	乳酸 (mg/dl)		血糖 (mg/dl)																												
前	92	10.3	前	74																												
30分	178	16.9	30分	113																												
60分	136	19.0	60分	70																												
90分	121	20.0	90分	62																												
120分	100	16.7	120分	78																												

*洗淨赤血球にウサギ筋ホスホリラーゼ b を加え、活性化されたホスホリラーゼ a をグリコーゲンを基質として測定.

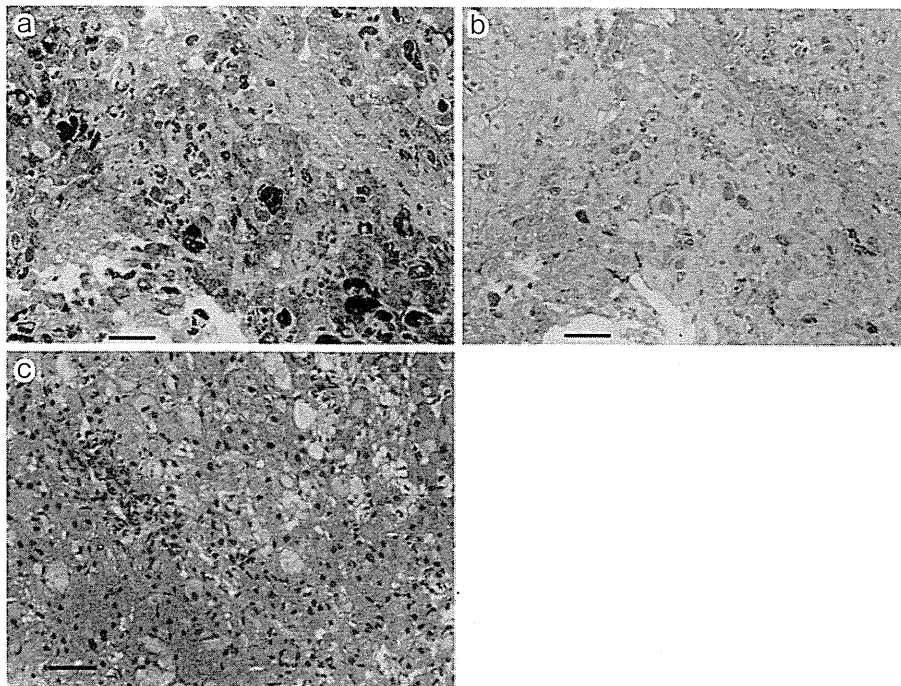


図1 肝生検の光学顕微鏡像 (bar : 100 μ m)

- a) PAS 染色:細胞質内に PAS (periodic acid-Schiff) 染色陽性の顆粒状物質の蓄積を認めた.
- b) ジアスターゼ処理後: PAS 陽性物質はジアスターゼ処理に部分的に抵抗性を示した.
- c) Azan 染色: 生検組織の一部に軽度の線維化が認められる.

表2 赤血球グリコーゲン分枝酵素活性測定結果

	Branching Enzyme ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{g Hb}$)	Phosphorylase b kinase ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g Hb}$)
正常対照 1	2.5	18.6
正常対照 2	3.2	21.3
正常対照 3	2.4	15.9
患児	0.3	22.6
陽性対照 (GSD IV 症例)	0.2	0.5 (PBK 欠損症症例)

対照として測定した赤血球ホスホリラーゼ・キナーゼ b 活性は正常であり、グリコーゲン分枝酵素活性のみが明らかな活性低下を示した。

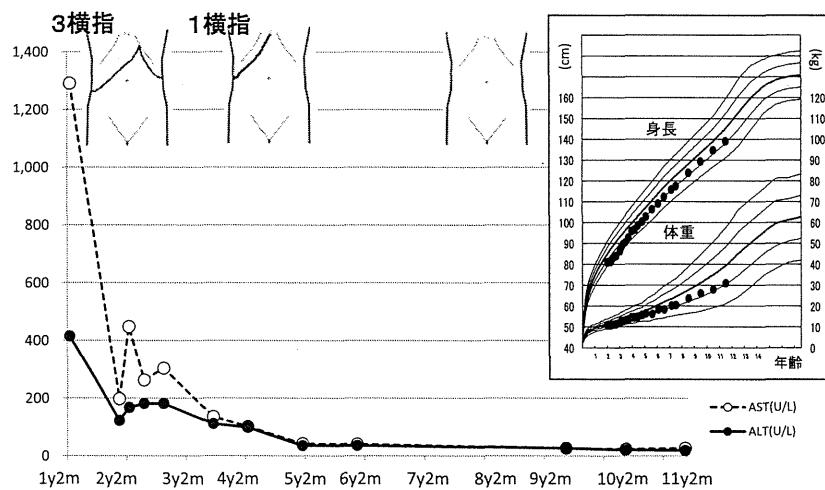


図2 肝腫大・肝機能検査の推移および成長曲線

肝逸脱酵素は徐々に低下し、5歳1か月時に正常範囲内となった。肝脾腫は8歳6か月時に改善した。身長・体重は-1SD前後を推移している。

EBVは既感染パターンであった。腹部超音波検査では実質輝度上昇を伴った肝腫大および脾腫を認めた。ブドウ糖負荷試験では、血糖・乳酸値とも正常反応を示し、空腹時グルカゴン負荷での血糖反応も正常であった。赤血球を用いてホスホリラーゼ・キナーゼを検討したが、正常活性であった。

経過：両親から同意を得て当院で再度行った肝生検にて、細胞質内にPAS (periodic acid-Schiff) 染色陽性でジアスターゼにやや抵抗性の顆粒状物質の蓄積が見られた(図1)。この時点で糖原病IV型がもっとも疑われたが、肝硬変の所見は軽微で、小葉構造は保たれており、門脈域への軽度のリンパ球浸潤と、Azan染色にて部分的な線維化を認める程度であった。次いで、赤血球中のグリコーゲン分枝酵素活性を測定したところ、対照酵素活性は正常範囲で、分枝酵素活性のみが明らかに低下しており(表2)、糖原病IV型の診断に至った。外来にて無治療で経過観察していたところ、徐々に肝逸脱酵素は低下し、5歳1か月時にはAST 43 U/L、ALT 36 U/Lと正常範囲となった。その後の再上

昇もなく、11歳6か月現在もAST 27 U/L、ALT 19 U/Lで、触診上の肝脾腫も消失した(図2)。成長発達を含め全く無症状であり、超音波検査による心機能評価にも問題を認めなかった。

考 察

本症例では18か月時に偶然肝脾腫と肝逸脱酵素の上昇が発見された。肝生検にて細胞質内のアミロペクチン様物質を確認し、酵素活性の測定にて糖原病IV型の診断に至った。しかし、肝脾腫の消失とともに肝逸脱酵素は正常化し、現在まで肝機能は正常に保たれている。以上の経過より本症例は非進行性肝型の糖原病IV型と考えられる。

糖原病IV型は、糖原病の約0.3%を占めるまれな常染色体劣性遺伝性疾患である。GBEは α -1,4結合のグルコース残基に1,6結合のグルコースを付加する酵素で、この酵素の欠損により分枝がほとんどないアミロペクチン様の異常グリコーゲンが蓄積する。この異常グリコーゲンは極めて難溶性で組織障害的に作用し、

多臓器の障害が引き起こされる。臨床症状は一様ではなく、現在、①古典型、②非進行性肝型、③致死的新生児神経・筋型、④乳児神経・肝型、⑤成人ポリグルコサン小体病 (adult polyglucosan body disease: APBD) の5つの病型が報告されている。古典型では、成長障害、肝脾腫を呈し、18か月までには肝硬変に進行し、生後5年以内に死亡する³⁾。特異的な治療はなく、肝硬変に対する対症療法が主であるが、肝移植による長期生存例も報告されている⁴⁾⁵⁾。非進行性肝型は非常に稀であり、現在のところ世界でも数例の報告に留まり、検索しえた範囲では本症例がわが国では最初の報告である⁵⁾。2009年に行われた国内の調査では、肝移植後の長期生存1名と3名の死亡例が確認されている。

GBE 遺伝子は3p14に座位し702個のアミノ酸よりなる⁶⁾。現在までに40近くの変異が報告されている⁷⁾。頻度が高い特定の変異は存在せず、GBE 遺伝子内のどこでも変異は生じうる⁸⁾。変異の部位と臨床症状との関連についてはR515C, F257L, R524Xが古典型、Y329Sが非進行性肝型との関連が報告されている。本症例では遺伝子検査は行っていないが、酵素活性がある程度保たれるようなミスセンス変異の存在が想定される。

本疾患の診断に際しては、以下の2点に注意する必要がある。1)他の肝型糖原病と異なり、高乳酸血症が顕著ではない。つまり、I型では空腹時に高乳酸血症が著明で、VI型(ホスホリラーゼ欠損)、VIII型(ホスホリラーゼ・キナーゼ欠損)ではブドウ糖負荷後に乳酸値の上昇を見るが、本症ではいずれにも該当しない。糖原病を疑った場合の診断アルゴリズムとして、Fernandesの方法がよく知られているが⁹⁾、それに準拠した場合、本症は診断に至らない。2)従って診断には肝生検が重要となるが¹⁰⁾、通常の病理検索では見逃されやすい。肝腫大を伴った肝機能障害の場合には、糖原病を鑑別に挙げ、できればPAS染色を念頭に置いた組織の固定を行い、必ずPAS染色およびジアスターゼ処理による消化PAS染色を実施する必要がある。

前述のように、本症の臨床症状は多様である。したがって、本症例でも、筋症状や神経症状が今後に現れる可能性は排除できない。非進行性肝型と考えられる場合でも、長期の経過観察が必要であることを、医療者及び本人・家族ともよく理解しておく必要があると考えられた。

結 語

非進行性肝型の糖原病IV型の1例を経験し、本症の臨床症状が多様であることが再認識された。本症は負荷試験で異常を示さず、肝組織のPAS染色および消化PAS染色によって診断が示唆されることがあり、肝腫大症例の場合には糖原病IV型を念頭に置いた鑑別を行う必要がある。

謝辞 赤血球中ホスホリラーゼ・キナーゼ活性を測定いただきました。大阪大学医学部小児科 酒井規夫先生に感謝申し上げます。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Shin YS. Glycogen storage disease: clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. *Semin Pediatr Neurol* 2006; 13: 115—120.
- 2) 杉江秀夫, 杉江陽子. 先天性代謝異常症 糖原病IV・V・VII型. *小児内科* 2003; 35 (増刊): 401—405.
- 3) 小林博司. 先天性代謝異常症 糖原病 肝型糖原病を中心に. *小児内科* 2009; 41 (増刊): 401—406.
- 4) McConkie-Rosell A, Wilson C, Piccoli DA, et al. Clinical and laboratory findings in four patients with the non-progressive hepatic form of type IV glycogen storage disease. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19: 51—58.
- 5) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *Journal of Human Genetics* 2013; 58: 285—292.
- 6) 新垣和也, 仲西貴也, 金城貴夫. 遺伝と代謝 糖質代謝異常症 糖原病IV型. *日本臨床. 別冊肝・胆道系症候群 I*. 2010: 482—485.
- 7) Li SC, Chen CM, Goldstein JL, et al. Glycogen storage disease type IV: novel mutations and molecular characterization of a heterogeneous disorder. *J Inherit Metab Dis* 2010; doi 10.1007/s10545-009-9026-5.
- 8) Moses SW, Parvari R. The variable presentations of glycogen storage disease type IV: a review of clinical, enzymatic and molecular studies. *Curr Mol Med* 2002; 2: 177—188.
- 9) Fernandes J, Huijting F, van de Kamer JH. A screening method for liver glycogen diseases. *Arch Dis Child* 1969; 44: 311—317.
- 10) Mizuochi T, Kimura A, Nishiura H. Liver biopsy is an important procedure in the diagnosis of glycogen storage disease type IV. *Pediatrics International* 2011; 53: 129—130.

A Case of the Non-progressive Hepatic form of Type IV Glycogen Storage Disease

Kaori Kawano^{1,4)}, Masanori Adachi¹⁾, Yumi Asakura¹⁾,
Koji Muroya¹⁾, Yoshiaki Shikama²⁾, Kunihiko Akagi²⁾,
Yukichi Tanaka³⁾, Tokiko Fukuda³⁾ and Hideo Sugie³⁾

¹⁾Department of Endocrinology and Metabolism, Kanagawa Children's Medical Center

²⁾Division of Infection, Immunology and Rheumatology, Kanagawa Children's Medical Center

³⁾Diagnostic Pathology, Kanagawa Children's Medical Center

⁴⁾Department of Pediatrics, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University

⁵⁾Department of Pediatrics, School of Medicine, Jichi Medical University

Glycogen storage disease (GSD) type IV is a heritable metabolic disorder caused by a defective glycogen branching enzyme (GBE) that frequently gives rise to cirrhosis. Our patient was 1 year old when he was found to have abnormal liver functions with hepatosplenomegaly. A histological examination revealed periodic acid Schiff (PAS)-positive amylopectin-like material in the hepatocytes that was partially resistant to diastase digestion. GSD-IV was suspected and confirmed by decreased GBE activity in the erythrocytes. Because the patient had no liver damage or hepatomegaly at 11 years of age, it was most likely the non-progressive hepatic form of GSD-IV. In conclusion, as GSD-IV has a wide spectrum of clinical features, physicians should note that PAS staining is essential for diagnosing GSD-IV.

Transcriptome Analysis of Adrenocortical Cells in Health and Disease

Tomohiro Ishii

Department of Pediatrics, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

INTRODUCTION

The human and mouse genome projects are historical landmarks in which the entire genomic sequence of these species was published.^{1–3} The projects identified 10,000 to 15,000 genes, far less than expected. Therefore, it was inferred that quantitative or qualitative variations in transcription, including the production, stability, degradation, and alternative splicing of RNA also contribute to phenotypic variation. Recently developed high-throughput techniques have helped identify nearly 40,000 predicted mRNAs in a mouse genome.³ A study that examined 55 different tissues reported that approximately 2000 transcripts were detected in all tissues, suggesting 5% of all mRNAs are ubiquitously expressed.⁴ In contrast, more than 4000 transcripts were expressed in only one tissue type, indicating 10% of mRNAs fulfill a specific function in a single tissue. The number of transcripts varies in each tissue. For example, approximately 10,000 of the 40,000 transcripts were expressed in the mouse eye,

but less than 6000 were expressed in the pancreas. More than 9000 transcripts were found in the adrenal glands, suggesting that over 7000 transcripts play a specific role in the adrenal cortex and medulla. In order to understand the significance of a set of transcripts, specific technology is required, especially that which relates to bioinformatics. This chapter provides an overview of transcriptome analysis, discusses recent progress, and introduces representative studies involving transcriptome analysis of adrenocortical cells.

STRATEGIES FOR DETERMINING A TRANSCRIPTOME

The transcriptome is the complete set of transcripts in a specific type of cells or tissue. In general, there are two strategies for determining a transcriptome (Table 11.1). cDNA microarray analysis is based on hybridization between fluorescent-labeled target cDNAs and probes representing known transcripts that are synthesized and spotted on the solid

TABLE 11.1 Comparison of Two Strategies for Determining Transcriptome

	cDNA Microarray	RNA-Seq
Technology	Hybridization	Next-generation sequencing
Quantification	Relative (ratio)	Absolute (molecule)
Unknown transcripts	Uncovered	Covered
Bioinformatics	Developed	In progress
Cost	Low	High

Abbreviation: RNA-Seq, RNA sequencing.

surface of a chip.⁵ Hybridization chips are custom-made or commercially available for different species and platforms. Comparing cDNA microarray data from different platforms is sometimes difficult. MicroArray Quality Control (MAQC) recommends standards and quality control metrics.^{6,7} National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) provides a public database of microarray data and allows only quality-controlled data to be uploaded. Microarray uses relative quantification in which the intensity of a feature is compared to that of the same feature under a different condition, and the identity of the feature is known by its position. In contrast, RNA sequence (RNA-Seq) has been recently developed based on a next-generation sequencing technique.^{8,9} RNA-Seq is not limited to defined transcripts that correspond to an existing genomic sequence. RNA-Seq can identify rare or tissue-specific splicing variants that have never been reported. Although RNA-Seq is a very promising method with the potential to overtake cDNA microarrays, the technology is still under active development. Understanding the strategy used to determine a transcriptome is essential for determining functional elements of cells or tissues and for

interpreting physiology and pathophysiology in health and disease, respectively.

DATA MINING

Generally, the goal of transcriptome analysis is to identify genes differentially expressed among different conditions, leading to a new understanding of genes or pathways associated with the conditions. Transcriptome analysis requires an appropriate statistical method with a multiple comparison test to interpret global changes in the expression of thousands of genes.¹⁰ Analysis of variance (ANOVA) is one of the traditional methods used to analyze the significance of differential expression by comparing the variance across replicate groups to the variance within replicate groups. Additionally, the application of a multiple comparison test, such as the Bonferroni correction or false discovery rate (FDR), is recommended.¹¹ The Bonferroni correction is too strict for maintaining a low false negative rate. FDR represents a reasonable approach and controls the yield of false positives and false negatives with a variable cut-off between 0.05 and 0.25.¹² In addition to statistical significance, fold change is also important for assessing the degree of differential expression as a measure of biological significance. A volcano plot is a popular graphical display of p values from a statistical test against fold changes on a logarithmic two-dimensional plot (Figure 11.1). It provides an easy method for identifying differentially expressed genes (DEGs) that are both statistically and biologically significant in the condition. Pathway or ontology analysis enables researchers to interpret DEGs in the framework of biological processes and systems, rather than in a traditional gene-centric manner. Comparing the list of gene profiles of interest against previously assembled lists of genes grouped by function or cellular localization can provide useful insights. Several pathway databases are

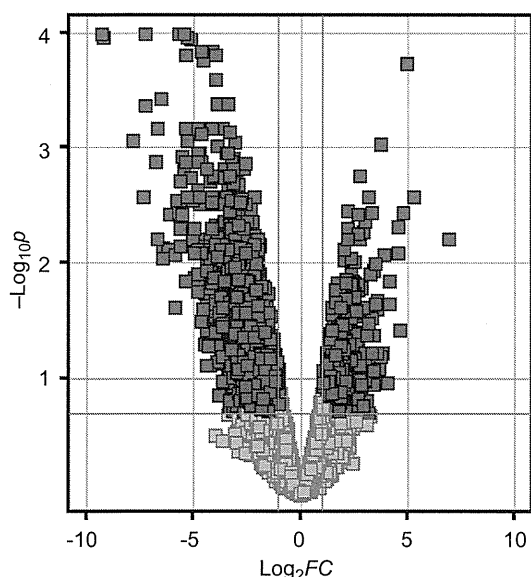


FIGURE 11.1 Volcano plot. Red squares indicate genes differentially expressed in adrenocortical cells of *Star*^{-/-} mice; grey squares indicate genes not differentially expressed; green lines show cut-off lines of fold change (FC) = 2.0 (x-axis) and *p* value modified by false discovery rate = 0.2 (y-axis).

available, including the Gene Ontology (GO) Consortium (www.geneontology.org)¹³ and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.genome.jp/kegg).¹⁴ Dedicated web-based applications for pathway analysis are available, including Ingenuity Pathways Analysis (IPA) and NextBio.^{15,16} The results of transcriptome analysis must be carefully interpreted, and conclusions must not be drawn without using an appropriate data mining technique.

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF ADRENAL GLANDS AND ADRENOCORTICAL CELL LINES UNDER ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE STIMULATION

Trophic hormone regulation is essential for adrenocortical cells to differentiate and produce sufficient amounts of steroid

hormones.¹⁷ Mineralcorticoid production by glomerulosa cells is controlled by renin and angiotensin, as well as by potassium level. Glucocorticoid synthesis by fasciculata cells is regulated by adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Lee and Widmaier reported the transcriptome of the adrenal glands in neonatal rats with or without chronic ACTH stimulation *in vivo*, using a rat cDNA microarray with 15,923 probes.¹⁸ ACTH induced significant changes in the expression of 214 genes with an FDR of 0.25 or less and a fold change of 1.5 or greater, including downregulation of genes associated with *de novo* cholesterol biosynthesis and cholesterol trafficking and upregulation of genes associated with intracellular metabolism and glucocorticoid inactivation (Table 11.2). These data demonstrate that the developmental effects of ACTH alter the expression of a broad range of genes involved not only in steroid hormone synthesis but also in cellular functions related to the growth and differentiation of the adrenal glands. Additionally, the negative effects of ACTH on the genes required for cholesterol synthesis and the production of active glucocorticoids suggest a key adaptive feature of the developing adrenal glands, which minimizes excessive exposure of other tissues, such as brain, to glucocorticoids.¹⁹ Schimmer *et al.* conducted transcriptome analysis of adrenocorticotropin action in the Y1 mouse adrenal tumor cell line *in vitro*, using a mouse cDNA microarray of 5655 probes.²⁰ ACTH affected the accumulation of 1289 transcripts (588 upregulated and 687 downregulated) with a FDR less than 0.05 (Table 11.3), a much larger number of genes than previously reported. The genes upregulated by ACTH were in the category of cholesterol biosynthesis, cholesterol mobilization, or corticosteroid biosynthesis and metabolism. As expected, ACTH regulated the expression of genes encoding transcription factors involved in the expression of steroidogenic enzymes and of signaling molecules involved in hormonal

TABLE 11.2 Genes Regulated by ACTH in Adrenal Glands of Neonatal Rats by cDNA Microarray

Functional Category	Gene	Description	FC	
Signal transduction	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6	
	<i>Pla2g1b</i>	Phospholipase A2, group IB	3.7	
	<i>Rdc1</i>	Chemokine orphan receptor 1	3.2	
	<i>Gria3</i>	Glutamate receptor, ionotropic. AMPA3 (alpha 3)	2.9	
	<i>Per2</i>	Period homolog 2	2.6	
	<i>Mtap2</i>	Microtubule-associated protein 2	2.5	
	<i>Pdk2</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 2	2.5	
	<i>Pak1</i>	p21 (CDKM1A)-activated kinase 1	2.4	
	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.3	
	<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2.2	
	<i>Il18</i>	Interleukin-18	2.0	
	<i>Ghr</i>	Growth hormone receptor	2.0	
	<i>Gprk5</i>	G protein-coupled receptor kinase 5	0.5	
	<i>Emb</i>	Embigin	0.48	
	<i>Gfra1</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor 1	0.45	
	<i>Inha</i>	Inhibin alpha	0.45	
	<i>Pdyn</i>	Prodynorphin	0.43	
	<i>Cd36</i>	cd36 antigen	0.4	
	<i>Sfrp4</i>	Secreted frizzled-related protein 4	0.37	
	<i>Tm4sf3</i>	Transmembrane 4 superfamily member 3	0.16	
	Transcription factor activity	<i>Dbp</i>	D site albumin promoter binding protein	3.8
	Cell growth/maintenance	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6
		<i>Pla2g1b</i>	Phospholipase A2, group IB	3.7
<i>Gria3</i>		Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	2.9	
<i>Ret</i>		Ret proto-oncogene	2.8	
<i>Apoc1</i>		Apolipoprotein C-1	2.6	
<i>Hpx</i>		Hemopexin	2.5	
<i>Mtap2</i>		Microtubule-associated protein 2	2.5	
<i>Cxcl10</i>		Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.3	
<i>Loc65042</i>		Tricarboxylate carrier-like protein	2.2	
<i>Il18</i>		Interleukin-18	2.0	
<i>Ghr</i>		Growth hormone receptor	2.0	

(Continued)