

2. Materials and methods

The protocol for this study was approved by the Ethical Committee of Shimane University Faculty of Medicine.

2.1. Case

The index case was a boy born at 38 weeks gestation via vaginal delivery and weighing 2588 g. He was the second child of non-consanguineous parents, and his elder brother was healthy (Fig. 1).

His mother had no abnormalities during the pregnancy, including no HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet counts) syndrome or AFLP (acute fatty liver of pregnancy). On the 2nd day after birth, the boy suddenly became unconscious and hypotonic, accompanied by severe hypoglycemia and lactic acidosis. Despite various treatments, including continuous hemodiafiltration that was performed to address the potential of septic shock, his clinical condition deteriorated, and he died of heart failure on the 6th day. Postmortem blood AC analysis revealed the accumulation of 3-OH-ACs, suggesting that the boy had the lethal type of TFP deficiency. Gene analysis and Western blotting confirmed the diagnosis. Therefore, the parents underwent prenatal diagnoses for their subsequent 2 pregnancies (Cases 1 and 2).

After obtaining informed consent from the parents, AC analysis of the amniotic fluid was performed as well as gene analysis and Western blotting.

2.2. Amniotic fluid

Amniotic fluid was collected at 16 and 18 weeks of gestation for Cases 1 and 2, respectively. For comparison purposes, amniotic fluid samples were obtained after 15 weeks from 8 normal controls and from 2 heterozygotes for TFP deficiency who had both undergone prenatal genetic testing (heterozygote-A: c.442+614 A>G and heterozygote-B: c.1364T>G in the *HADHB* gene).

2.3. Gene analysis

Genomic DNA was extracted from the pellets of centrifuged amniotic fluid using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Both the *HADHA* and the *HADHB* genes, which encode TFP, were sequenced as previously reported [5].

2.4. Western blot analysis

Western blot analysis of cultured fibroblasts or amniocytes was performed using a rabbit polyclonal antibody raised against both the α - and β -subunits of TFP; this antibody was kindly provided by Dr. T. Hashimoto, Professor Emeritus, Shinshu University, Matsumoto, Japan. The signals were visualized using the ImmunoPure NBT/BCIP Substrate Kit™ (Promega, Madison, WI, USA), as previously described [6].

2.5. Acylcarnitine analysis

AC analysis was performed according to the modification of the method as reported [7]. Briefly, 10 μ L of amniotic fluid supernatant was obtained after centrifugation at 3000 rpm for 5 min. The sample was then subjected to butyl derivatization using API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometer (MS/MS) in combination with an SIL-HTc autosampler (Shimadzu, Kyoto, Japan).

3. Results

3.1. Gene analysis

Direct DNA sequencing of the index case revealed the compound heterozygote mutations c.1392+1G>A and c.1689+2T>G in the *HADHA* gene, both of which induce mRNA splicing errors. The same mutations were identified in Case 1, whereas no mutations were identified in Case 2.

3.2. Western blot analysis

Western blot analysis of TFP in the cultured amniotic cells showed that both the α - and β -subunits were detected in Case 2, but not in Case 1, whereas the very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD, EC 1.3.8.9) protein was expressed normally in both cases (Fig. 2).

3.3. Acylcarnitine analysis

AC analysis of the amniotic fluid of Case 1 demonstrated significant elevations of 3-hydroxy-ACs: C14-OH measured at 55 nmol/L (control, 3.9 ± 5.0 ; +10.3 SD), C16-OH measured at 120 nmol/L (control, 0.8 ± 1.5 ; +77.6 SD), C18-OH measured at 31 nmol/L (control, $3.2 \pm$

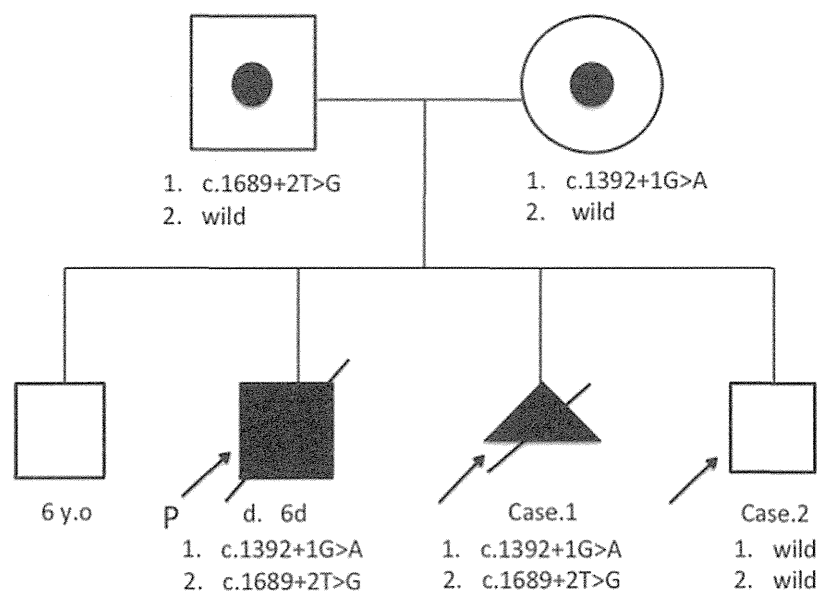


Fig. 1. Family tree The age of each patient and sibling is described for the time at which the amniotic fluid of Case 2 was obtained.

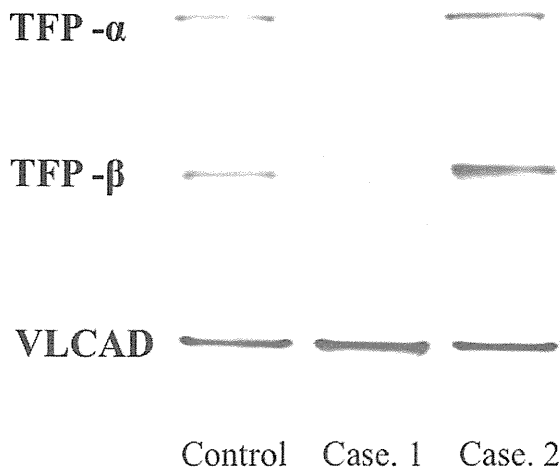


Fig. 2. Western blot analysis of mitochondrial trifunctional protein in the cells in the amniotic fluid. TFP- α and TFP- β were not detected in Case 1. Abbreviations: TFP- α and TFP- β , α - and β -subunits of TFP, respectively; VLCAD, very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase.

7.4; +3.5 SD), and C18:1-OH measured at 44 nmol/L (control, 4.6 ± 4.9 ; +7.9 SD), as shown in Table 1. Conversely, 3-hydroxy-AC levels were not elevated in Case 2 compared with the normal control. There was a marginal increase in the amounts of C14-OH (24 nmol/L; control 3.9 ± 5.0 ; +1.6 SD) and C16-OH (13 nmol/L; control 0.9 ± 1.5 ; +4.6 SD) in heterozygote-A, although these values were lower than those in Case 1. Meanwhile, the AC values of the specimen from heterozygote-B overlapped with those of the normal controls.

3.4. Follow-up

It was concluded that Case 1 was affected but that Case 2 was normal. Eventually, Case 1 was artificially aborted at 21 weeks of gestation after obtaining consent from the parents. The diagnosis was validated by AC analysis of umbilical cord blood. In Case 2, the pregnancy was continued, and a boy was born healthy at 38 weeks and 5 days of gestation.

4. Discussion

Our study clearly demonstrates that AC analysis using amniotic fluid can distinguish a fetus affected with TFP deficiency from a healthy fetus. In certain organic acidemias, such as methylmalonic acidemia, propionic acidemia and glutaric acidemia type 1, prenatal diagnosis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and MS/MS using

Table 1
Acylcarnitines in amniotic fluid of Case 1, Case 2 and heterozygotes.

	Amniotic fluid					Serum Index case
	Case 1	Case 2	Hetero zygote-A	Hetero zygote-B	Control	
C14	27	0	7.0	0	4.6 ± 3.4	1160
C14:1	21	0	3.0	0	5.8 ± 6.5	430
C14-OH	55	0	24	0	3.9 ± 5.0	310
C16	52	0	17	4.0	6.9 ± 8.6	6300
C16-OH	120	0	13	3.0	0.9 ± 1.5	3100
C18	14	10	0	0	2.9 ± 4.6	780
C18-OH	31	0	0	0	3.6 ± 7.8	760
C18:1-OH	44	0	0	8.0	5.1 ± 5.0	1900

Normal control values are the mean \pm SD (n = 9).

Unit of AC values: nmol/L.

Abbreviations: C14, myristoylcarnitine; C14:1, tetradecenoylcarnitine; C14-OH, hydroxy-tetradecenoylcarnitine; C16, palmitoylcarnitine; C16-OH, hydroxy-hexadecenoylcarnitine; C18, stearoylcarnitine; C18-OH, hydroxy-octadecenoylcarnitine; C18:1-OH, hydroxy-octadecenoylcarnitine.

amniotic fluid has been reported [8–11]. In contrast, the prenatal diagnosis of long-chain fatty acid oxidation disorders (FAODs) using MS/MS has not been considered as an optimal approach because ACs derived from long-chain fatty acids do not seem to accumulate in the fetus in response to the inhibition of β -oxidation via malonyl-CoA-mediated suppression of carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1 activity and seem to have limited excretion into the fetal urine and hence into the amniotic fluid due to poor solubility [12,13].

However, a recent report demonstrated that fatty acid oxidation is activated and plays a significant role even during the fetal periods [14–16], suggesting that the potential use of AC analysis to detect fetal FAODs is feasible. Although long-chain ACs are considered to be hydrophobic, the presence of a polar hydroxyl group can make ACs (C14:1, C16-OH, C18:1-OH) more soluble in amniotic fluid, thus making their detection in amniotic fluid feasible. Moreover, as identified in Case 1, unsaturated ACs such as C14:1 was elevated. Although it has been suggested that AC analysis using MS/MS is not appropriate for the prenatal diagnosis of long-chain FAODs, the results presented here show that ACs specific for other long-chain FAODs, such as VLCAD deficiency, could be detected during the prenatal period.

AC analysis of amniotic fluid has several advantages over gene analysis and Western blotting. AC analysis allows for the rapid detection of accumulated ACs in a small volume of amniotic fluid. Moreover, this analysis makes prenatal diagnosis feasible, even when the mutation of the index case cannot be identified and there are no issues related to contamination by maternal cells, in contrast to gene analysis. In our study, the AC values overlapped between heterozygotes and normal controls, although those with affected specimens were undoubtedly distinguishable from the heterozygotes and the controls. These findings suggest that the accurate diagnosis of milder cases may be complicated, although prenatal diagnosis may not be necessary in these cases.

Because only one case was studied in this report, additional studies need to be performed. Nevertheless, our study demonstrates that AC analysis can be used for prenatal diagnosis of TFP deficiency.

5. Conclusion

During prenatal diagnosis, misdiagnosis has to be avoided in all cases. Therefore, multiple approaches from several angles are desirable, and their results should be evaluated comprehensively. In this regard, combining AC analysis with genetic testing (gene sequencing) may result in more effective prenatal diagnoses of TFP deficiency and may avoid misleading results.

Acknowledgments

We thank Ms. M. Furui, N. Tomita, Y. Ito, T. Esumi and E. Mizuno from the Department of Pediatrics, Shimane University, for their technical assistance. Furthermore, we greatly appreciate the support offered by Dr. Keisuke Sato from Shizuoka Children's Hospital, and we thank Toru Otabe, from the Otabe Obstetrical and Gynecological Clinic, for providing clinical information. Lastly, we thank Dr. Takashi Hashimoto, Professor Emeritus of Shinshu University, Japan, for kindly providing the antibody against TFP.

References

- [1] Y. Uchida, K. Izai, T. Orii, T. Hashimoto, Novel fatty acid β -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.* 267 (1992) 1034–1041.
- [2] S. Ushikubo, T. Aoyama, T. Kamijo, R.J. Wanders, P. Rinaldo, J. Vockley, et al., Molecular characterization of mitochondrial trifunctional protein deficiency: formation of the enzyme complex is important for stabilization of both alpha- and beta-subunits, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 979–988.
- [3] U. Spiekerkoetter, Z. Khuchua, Z. Yue, A.W. Strauss, The early-onset phenotype of mitochondrial trifunctional protein deficiency: a lethal disorder with multiple tissue involvement, *J. Inher. Metab. Dis.* 27 (2004) 294–296.

- [4] J.A. Ibdah, Y. Zhao, J. Viola, B. Gibson, M.J. Bennett, A.W. Strauss, Molecular prenatal diagnosis in families with fetal mitochondrial trifunctional protein mutations, *J. Pediatr.* 138 (2001) 396–399.
- [5] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, S. Fukuda, H. Kobayashi, S. Yamaguchi, Study of deep intronic sequence exonization in a Japanese neonate with a mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 46–51.
- [6] J. Purevsuren, T. Fukao, Y. Hasegawa, H. Kobayashi, H. Li, Y. Mushimoto, et al., Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 372–377.
- [7] H. Kobayashi, Y. Hasegawa, M. Endo, J. Purevsuren, S. Yamaguchi, ESI-MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 855 (2007) 80–87.
- [8] Y. Hasegawa, M. Iga, M. Kimura, Y. Shigematsu, S. Yamaguchi, Prenatal diagnosis for organic acid disorders using two mass spectrometric methods, gas chromatography mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 823 (2005) 13–17.
- [9] S.I. Goodman, D.A. Gallegos, C.J. Pullin, B. Halpern, R.J. Truscott, G. Wise, et al., Antenatal diagnosis of glutaric acidemia, *Am. J. Hum. Genet.* 32 (1980) 695–699.
- [10] J.L. Van Hove, D.H. Chace, S.G. Kahler, D.S. Millington, Acylcarnitines in amniotic fluid: application to the prenatal diagnosis of propionic acidemia, *J. Inherit. Metab. Dis.* 16 (1993) 361–367.
- [11] D. Penn, E. Schmidt-Sommerfeld, C. Jakobs, L.L. Bieber, Amniotic fluid propionylcarnitine in methylmalonic aciduria, *J. Inherit. Metab. Dis.* 10 (1987) 376–382.
- [12] S. Eaton, Control of mitochondrial beta-oxidation flux, *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 197–239.
- [13] F. Boemer, M. Deberg, R. Schoos, J.-H. Caberg, S. Gaillez, C. Dugauquier, et al., Diagnostic pitfall in antenatal manifestations of CPT II deficiency, *Clin. Genet.* (2015) (in press).
- [14] D. Rakheja, M.J. Bennett, B.M. Foster, R. Domiati-Saad, B.B. Rogers, Evidence for fatty acid oxidation in human placenta, and the relationship of fatty acid oxidation enzyme activities with gestational age, *Placenta* 23 (2002) 447–450.
- [15] N.A. Oey, J.P. Ruiten, T. Attié-Bitach, L. IJlst, R.J. Wanders, F.A. Wijburg, Fatty acid oxidation in the human fetus: implications for fetal and adult disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 71–75.
- [16] U. Spiekeroetter, M. Mueller, E. Cloppenburg, R. Motz, E. Mayatepek, B. Buelmann, et al., Intrauterine cardiomyopathy and cardiac mitochondrial proliferation in mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 428–430.

症例報告

ホモシスチン尿症をともなったメチルマロン酸尿症の1例

山本 幹枝^{1)*} 安井 建一¹⁾ 渡辺 保裕¹⁾
古和 久典¹⁾ 山口 清次²⁾ 中島 健二¹⁾

要旨：症例は18歳女性である。幼少期より易疲労性があり、14歳で腎障害、15歳より精神症状をくりかえし歩行障害が出現した。18歳時に歩行障害が増悪し当科を初診。痙性対麻痺と腓骨神経麻痺をみとめ、尿中ホモシスチン、メチルマロン酸が著増していた。ホモシスチン尿症をともなうメチルマロン酸尿症コバラミンC型(methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type; MMACHC)の原因遺伝子であるMMACHC遺伝子に440G>A, 470G>Cの複合ヘテロ接合体型ミスセンス変異をみとめMMACHCと診断した。ヒドロキソコバラミン筋注療法により腎障害、歩行障害の改善をえた。MMACHC変異の報告は日本人にまれだが治療により症状改善が期待できるため重要な先天性代謝疾患である。

(臨床神経 2015;55:23-28)

Key words：コバラミン代謝異常, cobalamin (cbl) C, methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type (MMACHC), hydroxocobalamin, 亜急性連合性脊髄変性症

はじめに

ホモシスチン尿症をともなうメチルマロン酸尿症は先天性コバラミン代謝異常症の一病型で、コバラミン(cobalamin; cbl) C, D, F 遺伝子いずれかの変異による酵素欠損のため発症する¹⁾。このうちもっとも頻度の高いものは、ホモシスチン尿症をともなうメチルマロン酸尿症コバラミンC型(methylmalonic aciduria and homocystinuria, cbl C type; MMACHC)で中国や中南米諸国に多く、有病率は0.5人/10万人と報告がある²⁾。検索の範囲では、本邦におけるMMACHC遺伝子(OMIM 609831)変異の報告は中国人乳児期発症1例のみ³⁾で、日本人のMMACHC症例報告は遺伝子報告のない乳児期発症7例のみである^{4)~6)}。今回、思春期以降に症状が顕著となり新規のMMACHC変異をみとめ、治療介入によって症状の改善をえたMMACHCの1例を経験したので報告する。

症 例

症例：18歳、女性

主訴：歩行障害

発育・発達歴：出生時に異常はなく、初歩や初語に遅れはなかったが、幼少期より易疲労性があり、マラソンは遅い方だった。

既往歴：14歳時に腎障害をきたし、腎生検で糸球体腎炎

と診断されステロイドをふくむ多剤併用療法により改善をえて内服加療を受けていた。15歳時に抑うつ、不眠が出現し、対症療法により改善した。

家族歴：特記事項なし、血族婚なし。

現病歴：2010年1月(16歳)、全身倦怠感、活動性低下、感情失禁などが出現して更衣や摂食に介助が必要な状態となり当院精神科を受診。血清や髄液に異常所見はなく抗グルタミン酸受容体抗体は陰性で、頭部MRIで前頭葉萎縮、脳波で全般性徐波をみとめた。全身検索では卵巣嚢腫をふくむ腫瘍性疾患は否定的だった。認知機能はmini-mental state examination (MMSE) 25/30点、改定長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R) 25/30点と低下していた。精神症状とADLの急速な悪化から辺縁系脳炎をふくむ自己免疫性脳炎の可能性が否定できないと考えられ、治療的診断として施行されたステロイドパルス療法により精神症状は改善した。入院中に歩行障害が出現し、臥床による腓骨神経麻痺と廃用性萎縮の可能性と考えられ、リハビリにより一定の改善をみとめた。

2011年8月(18歳)に歩行障害が増悪して起立困難となり9月に当科初診となった。

入院時現症：身長164.5cm、体重59.3kg、体温36.8°C、血圧119/78mmHg、脈拍78回/分・整。胸腹部や皮膚、眼底に異常はなかった。神経学的には意識清明で、脳神経に異常をみとめなかった。上肢の筋力は正常であったが、両下肢はmanual muscle testing 4程度の筋力低下があり、近位部の筋ト

*Corresponding author: 鳥取大学医学部医学科脳神経医学講座脳神経内科学分野 (〒683-8504 鳥取県米子市西町36-1)

¹⁾ 鳥取大学医学部医学科脳神経医学講座脳神経内科学分野

²⁾ 鳥根大学医学部小児科

(受付日：2014年3月10日)

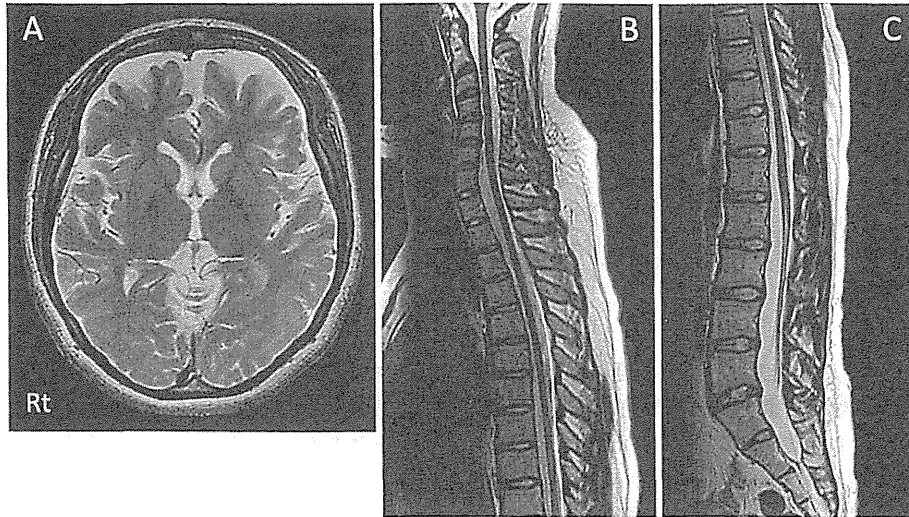


Fig. 1 Brain MRI (A) and Spinal MRI (B, C).

Brain MRI (3.0 T) shows diffuse cerebral atrophy without white matter change. Spinal MRI shows mild diffuse spinal atrophy without intramedullary signal change. A: T₂-weighted brain MR images (axial, 3.0 T, TR 5,000.0 ms, TE 93.6 ms). B: T₂-weighted upper spinal MR image (sagittal, 3.0 T, TR 2,910.0 ms, TE 108.0 ms). C: T₂-weighted lower spinal MR image (sagittal, 3.0 T, TR 2,910.0 ms, TE 108.0 ms).

Table 1 Differential diagnosis of homocystinuria.

	Absence Enzyme	tHcy	metionine	Megalo-blastic anemia	MMA	Mental retardation	Skeletal anomaly	Thrombosis	Lens subluxation
Classical homocystinuria	CBS	↑↑	↑↑	-	-	+	+	+	+
Cobalamin metabolism error	Cbl C, D, F	↑	→~↓	+	+	+	-	±	-
	Cbl E, G		→~↓	+	-	+	-	±	-
Methylmalonic aciduria									
	+								
	-								
Folnic acid metabolism error	MTHFR		→~↓	-	-	+	-	±	-
This case		↑	↓	-	+	+	-	-	-

CBS; cystathionineβ-synthase, Cbl C, D, F; combine deficiency of adenosylcobalamin and methylcobalamin, Cbl E, G; methylcobalamin deficiency, MTHFR; 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase, MMA; methylmalonic aciduria

又スが亢進、遠位部は低下し、下垂足を呈して足関節の背屈が困難であった。両側膝蓋腱反射は亢進、アキレス腱反射は低下し、両側 Babinski 反射が陽性だった。感覚系では表在覚、振動覚、位置覚に異常はなかったが、Romberg 徴候をみとめた。上肢の失調はなかったが下肢に感覚性運動失調をみとめた。Gowers 徴候は陰性で、歩行では痙性はめだたず鶏歩をともなう失調性歩行で両下腿装具と歩行器を要した。不随意運動、自律神経障害や髄膜刺激徴候はみとめなかった。

検査所見：血液検査では RBC 3.98 × 10⁹/μl, Hgb 10.6 g/dl, Hct 32.5%, MCV 81.8 fl の軽度正球性貧血をみとめ、BUN

27 mg/dl, Cre 2.09 mg/dl の腎障害があったが、電解質や肝機能に異常はなかった。甲状腺機能、ビタミン B 群は正常範囲であった。末梢神経伝導速度検査では両腓骨神経 MCV と両腓腹神経 SCV の導出が不良で、脳波は基礎波が 7 Hzθ 波で広汎性に棘徐波の混入をみとめた。高次脳機能検査では MMSE 28/30 点、HDS-R 25/30 点、Wechsler adult intelligence scale は IQ 53 で、見当識、計算、処理速度の障害がめだった。頭部 MRI では両側前頭葉を中心に軽度の萎縮をみとめたが白質病変はなかった (Fig. 1A)。脊髄 MRI では全体が軽度萎縮していたが髄内信号変化はなかった (Fig. 1B, C)。脳血流 SPECT

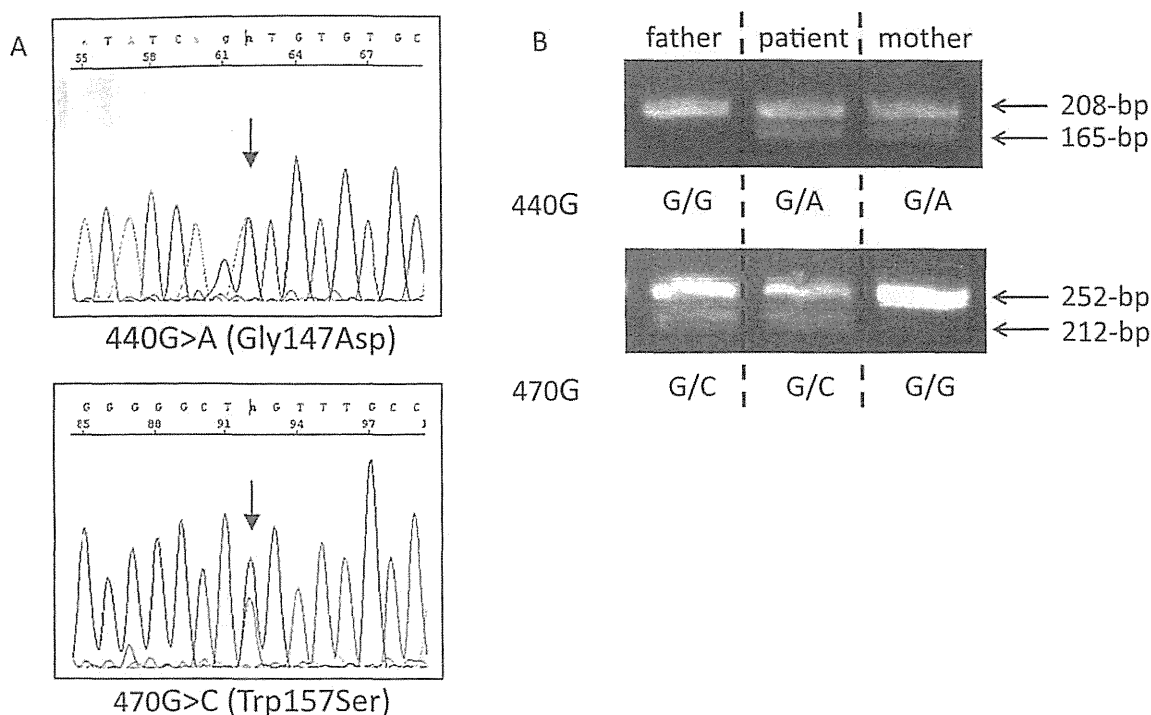


Fig. 2 MMACHC gene analysis.

A: Sequencing of exon4 from *MMACHC* gene revealed the two mutated allele 440G>A and 470G>C in the patient's genomic DNA. B: The result of PCR-RFLP. A 252-bp fragment including two mutations was amplified using the designed the sense oligonucleotide primer (5'-CCC'TTCCTGTGCTCAGAAT-3') and the antisense primer (5'-AGATAGGGACCGTCGTCGTGAT-3'). C: The 252-bp fragment derived from the wild-type allele is digested by *Hpy*188I into 208-, 28- and, 16-bp fragments, whereas the fragment from the 440G>A mutated allele is digested by *Hpy*188I into 165-, 43-, 28- and, 16-bp fragments. The patient and her mother have the 208- and 165-bp allele, indicating they have both the wild type and 440G>A mutated alleles. The 252-bp fragment derived from the wild-type allele is not digested by *Ban*II, whereas the fragment from the 470G>C mutated allele is digested by *Ban*II into 212- and 40-bp fragments. The patient and her father have 252- and 212-bp alleles, indicating they have both the wild type and 470G>C mutated alleles.

では萎縮部位での血流低下をみとめた。

診断：一般身体所見，神経学的所見より亜急性連合性脊髄変性症などの脊髄，末梢神経障害の可能性を考えたが血清ビタミンB12は正常であった。先天性をふくむビタミンB群関連疾患の可能性を考え血漿アミノ酸分析をおこなったところ，血漿ホモシステイン 22.0 nmol/ml（基準値：検出感度以下）と高値，血漿メチオニン 8.7 nmol/ml（基準値：18.9～40.5 nmol/ml）と低値で，尿中ホモシステイン 135.0 nmol/mgCr（基準値：検出感度以下）と排泄増加をみとめた。血漿総ホモシステイン（tHcy）は 243.4 μmol/l（基準値：3.7～13.5 μmol/l）と異常高値で，ホモシステイン尿症と診断した。ホモシステイン尿症の鑑別として，血漿メチオニン値の上昇や血清葉酸値の低下がなく古典的ホモシステイン尿症や葉酸代謝異常症は否定的であった（Table 1）。尿中有機酸分析にて尿中メチルマロン酸 330.8 μmol/mmol・Cr（基準値：検出感度以下）と排泄増加をみとめ，ホモシステイン尿症をともなうメチルマロン酸尿症と診断した。コバラミン代謝異常症のうち Cbl C, D, F のいずれかの酵素欠損が原因と考えられ（Table 1），*MMACHC* 遺伝子の検索をおこなったところ（オーファンネットジャパン），

エクソン4領域に 440G>A, 470G>C の二つの変異をみとめた（Fig. 2A）。倫理委員会の承諾をえて，それぞれの変異部位を特異的に切断する制限酵素（*Hpy*188I, *Ban*II）による PCR-RFLP 法をもちいて両親の遺伝子検査をおこなったところ，440G>A 変異が母由来，470G>C 変異が父由来の複合ヘテロ接合体型ミスセンス変異であることが確認された（Fig. 2B）。470G>C 変異は新規の変異であったことから，健常対照者 100 例の DNA を検索したが，父，母由来の両変異ともみとめなかった。なお，両親の血漿 tHcy 値は父が 14.5 μmol/l，母が 8.1 μmol/l といずれも正常であった。

治療経過：診断確定後におこなったビタミン B12 補充療法の経過を Fig. 3 に示す。ヒドロキソコバラミン（OHChl）の筋注を 1 mg/日にて開始後，すみやかに生化学的な改善をみとめた。通院頻度，筋注回数の観点から週 3 回に減量したところ血漿 tHcy 値が上昇し，1 回投与量を 2 mg に増量し良好な経過をえている。臨床的には易疲労性の改善や感情の安定化がみられ，リハビリの併用で松葉杖歩行となった。また，糸球体腎炎に対して投与されていた経口ステロイド薬を中止しても歩行や腎機能の増悪はなかった。腓骨神経 MCV は右

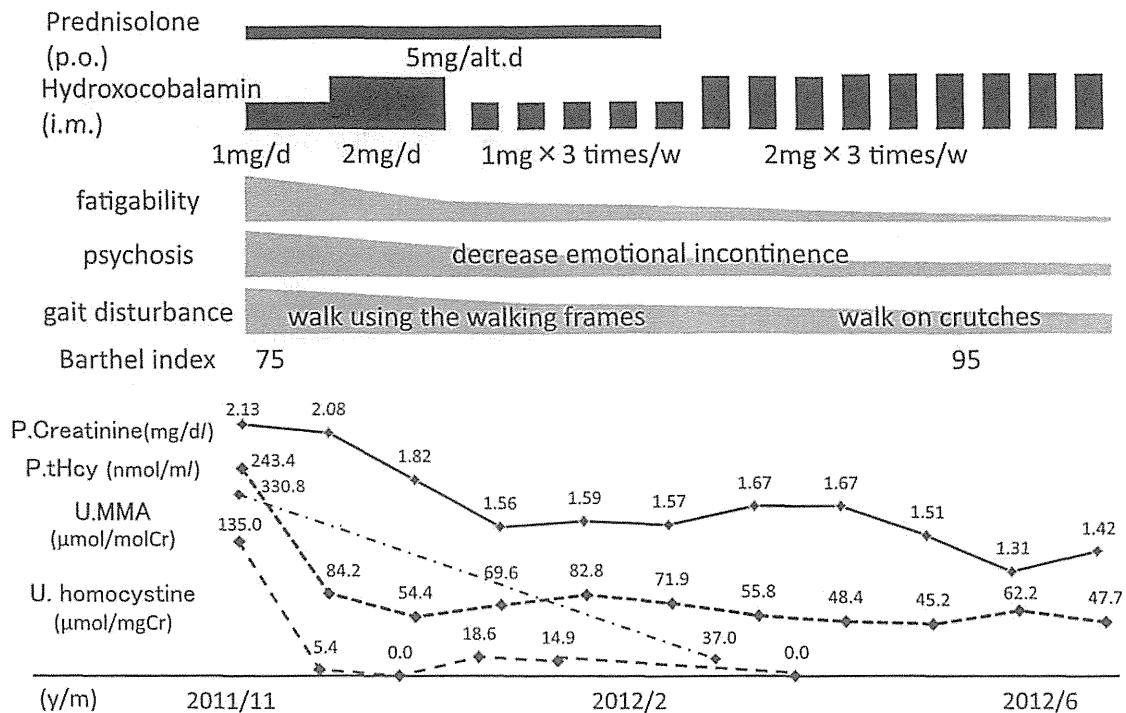


Fig. 3 Clinical course.

After administration of hydroxocobalamin (OHcbl) at 1 mg/day by an intramuscular injection, her biochemical data improved dramatically. After intramuscular injections reduced from every day to three times a week because of social reasons, plasma tHcy levels were increased. Therefore, quantity of injection was increased to 3 mg/times, and her clinical state recovered. She was improved to a crutch walk from a state requiring use of wheelchair. Furthermore, her fatigue was reduced, and her feelings were stabilized. p.o.; per os. i.m.; intramuscular injection. alt.d; alternative day. d; day. w; week. P.; blood plasma. U; urine.

38 m/s, 左 43.7 m/s, MMSE 29/30, HDS-R 30/30 と末梢神経伝導速度, 認知機能にも改善をみとめたが, 脳波は著変がなかった。

考 察

ビタミン B12 治療により, 生化学的・臨床的な改善をえた MMACHC の思春期発症例を報告した。本症例は幼少期は易疲労性があった程度で, 思春期以降で糸球体腎炎を発症し, 動揺する精神症状と歩行障害を呈した。歩行障害の原因として身体所見より亜急性性連合性脊髄変性症をうたがったが血清ビタミン B12 は正常範囲であり, コバラミン代謝産物の測定によりホモシスチン尿症をとまなうメチルマロン酸尿症と診断した。

本疾患では MMACHC 酵素欠損によりメチルコバラミン, アデノシルコバラミンの両者が補酵素として働くビタミン B12 代謝経路が障害され, 血漿 tHcy, メチルマロン酸が上昇する⁹⁾。症状は非特異的で全身におよび, 認知障害, 精神症状, 亜急性性連合性脊髄変性症様神経症状などの中枢神経障害, 網膜色素変性症, 視神経萎縮などの眼症状, 心筋症, 糸球体腎炎などの腎障害, 貧血や血栓症といった血液・血管系障害などを呈する²⁾。本例における易疲労性, 腎障害, 精神

症状はいずれも本疾患の一症状と考えられた。

本症の治療として, 一般にビタミン B12 製剤としてもちいられるメチルコバラミンは, アデノシルコバラミン作用をもたないため効果が乏しく, OHcbl の非経口投与が推奨されているが, 確立したプロトコールはない。海外の症例報告によれば, OHcbl の筋注・静注をおこなった例では精神症状や認知機能を中心に症状の改善がみられているが^{10)~16)}, 経口投与では効果が乏しい¹⁷⁾。また, シアノコバラミン (CNCbl) の投与をおこない症状の改善がわずかであった症例報告もある¹⁸⁾。乳児期早発例では奇形をとまないビタミン B12 治療に不応であることがしばしばみられる一方で, 幼児期以降の遅発例では治療に良好な反応を示す例が多く²⁾, 本例も既報告を参考に OHcbl 筋注療法を開始し良好な経過をえた。

本例では糸球体腎炎にステロイドがもちいられ, 腎機能の改善をえている。海外でも一部の症例で自己免疫性疾患をうたがわれステロイド治療を施されているものの, 有効であったとの報告は 6 例中 1 例のみであった^{10)12)14)17)~19)}。本例におけるステロイドの薬効機序は不明だが, 本疾患に起因した非特異的な炎症に対する抗炎症効果の可能性も考えられた。精神症状に一定の効果を示したステロイドの作用機序も同様に不明であった。

本例では MMACHC 遺伝子に二つの変異をみとめた。母由

来の440G>A変異はこれまでに6例の報告があり、うちホモ接合体型変異が3例、重複変異(271dupA)との複合ヘテロ接合体型変異が3例でいずれも早期乳児発症の重症例であった²⁰⁾²¹⁾。一方、父由来の470G>C変異は既報告がなく、健常者で施行した同様のPCR-RFLP法では同変異をみとめず、病的意義を持つ変異の可能性が示唆された。また、本例が440G>A変異を有するにもかかわらず遅発例であることから、470G>C変異によるMMACHC蛋白はある程度の酵素活性を有するものと考えられた。MMACHC複合ヘテロ接合体型ミスセンス変異は日本人と遺伝的に近い民族である中国東北部に報告が多いが、本症例と同様の遺伝子変異の報告は中国人においてもみとめなかった²²⁾。

本疾患は近年になって普及しつつあるタンデムマス法による新生児マス・スクリーニングで診断可能であるが、未だ全国的な実施にはいたっていない。タンデムマス法実施以前には、古典的ホモシスチン尿症が呈する血中メチオニン高値しか検出されないため本症は見逃されていた可能性が高く、軽症の未診断成人例が存在する可能性がある²³⁾。全身におよぶ非特異的な症状のため診断は容易でないが治療により症状改善が期待できる疾患であり、高tHcy血症を有する遺伝子未同定症例やメチルコバラミン不応性の亜急性性連合性脊髄変性症例などにおいては本疾患を念頭において精査する必要がある。

本報告の要旨は、第92回日本神経学会中国・四国地方会で発表し、会長推薦演題に選ばれた。

本論文の要旨はICP2013 (Melbourne) で発表した。

謝辞：共同診療賜りました鳥取大学医学部小児科 岡田 晋一先生に深謝いたします。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) 佐藤一清. 別冊日本臨牀領域別症候群シリーズ No.19 先天代謝異常症候群 (下巻). 大阪: 日本臨牀社: 1998.
- 2) Carrillo-Carrasco N, Venditti CP. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. II. Complications, pathophysiology, and outcomes. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:103-114.
- 3) 吉井啓介, 内木康博, 堀川玲子ら. MMACHC 遺伝子の新規変異によりメチルマロン酸血症 (MMA) を呈した1例 (会). *日先天代謝異常学会誌* 2007;23:98.
- 4) 川上 清, 永山 淳, 前園恵慈ら. 骨髄像が診断に有用であったコバラミンC病の1例 (会). *日小児会誌* 2003;107:1280.
- 5) 矢追博章, 野上恵嗣, 吉澤弘行ら. 肺動静脈瘻を合併した高ホモシスチン尿症を伴う CblC 型メチルマロン酸血症の1例 (会). *日小児会誌* 2012;116:453.
- 6) 原田英明, 岩下弘子, 神田 洋ら. 新生児発症の高アンモニア血症・高グリシン血症を伴ったメチルマロン酸尿症・ホモシスチン尿症症候群の一例. *日先天代謝異常学会誌* 2001;17:143.
- 7) 清水宜治, 松尾清巧, 高橋陸夫ら. ホモシスチン尿症を伴うメチルマロン酸血症. *日小児会誌* 1984;88:860.
- 8) 董 貴章, 付 愛蓮, 大倉隆司ら. VB₁₂ 代謝異常による巨赤芽球性貧血を伴うメチルマロン酸尿症—ホモシスチン尿症の3症例. *日本先天代謝異常学会誌* 1987;3:25.
- 9) Carrillo-Carrasco N, Chandler RJ, Venditti CP. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. I. Clinical presentations, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:91-102.
- 10) Gold R, Bogdahn U, Kappos L, et al. Hereditary defect of cobalamin metabolism of juvenile onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:107-108.
- 11) Augoustides-Savvopoulou P, Mylonas I, Sewell AC, et al. Reversible dementia in an adolescent with cblC disease. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:756-758.
- 12) Bodamer OA, Rosenblatt DS, Appel SH, et al. Adult onset combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Neurology* 2001;56:1113.
- 13) Van Hove JL, Van Damme-Lombaerts R, Grünwald S, et al. Cobalamin disorder Cbl-C presenting with late-onset thrombotic microangiopathy. *Am J Med Genet* 2002;111:195-201.
- 14) Roze E, Gervais D, Demeret S, et al. Neuropsychiatric disturbances in presumed late-onset cobalamin C disease. *Arch Neurol* 2003;60:1457-1462.
- 15) Boxer AL, Kramer JH, Johnston K, et al. Executive dysfunction in hyperhomocystinemia responds to homocysteine-lowering treatment. *Neurology* 2005;26:1431-1434.
- 16) Wang X, Sun W, Yang Y, et al. A clinical and gene analysis of late-onset combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, in China. *J Neurol Sci* 2012;318:155-159.
- 17) Brunelli SM, Meyers KE, Guttenberg M, et al. Cobalamin C deficiency complicated by an atypical glomerulopathy. *Pediatr Nephrol* 2002;17:800-803.
- 18) Ben-Omran TI, Wong H, Blaser S, et al. Late-onset cobalamin-C disorder. *Am J Med Genet A* 2007;143A:979-984.
- 19) Powers JM, Rosenblatt DS, Schmidt RE, et al. Neurological and neuropathologic heterogeneity in two brothers with cobalamin C deficiency. *Ann Neurol* 2001;49:396-400.
- 20) Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, et al. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet* 2006;38:93-100.
- 21) Morel CF, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations. *Mol Genet Metab* 2006;88:315-321.
- 22) Liu MY, Yang YL, Chang YC, et al. Mutation spectrum of MMACHC in chinese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *J Hum Genet* 2010;55:621-626.
- 23) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子ら. 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経* 2013;53:191-195.

Abstract

A case of late-onset cobalamin C disease (methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type)

Mikie Yamamoto, M.D.¹⁾, Kenichi Yasui, M.D.¹⁾, Yasuhiro Watanabe, M.D.¹⁾,
Hisanori Kowa, M.D.¹⁾, Seiji Yamaguchi, M.D.²⁾ and Kenji Nakashima, M.D.¹⁾

¹⁾Division of Neurology, Department of Brain and Neurosciences, Faculty of Medicine, Tottori University

²⁾Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine

We report the case of an 18-year-old Japanese woman with cobalamin (cbl) C disease. She was born between non-consanguineous parents, and had easy fatigability from a childhood. At 14 years old, she developed renal failure, and had repeated psychosis during 2 years. At 16 old, she developed her gait disturbance and her symptoms fluctuated, but the cause of gait disturbance was unclear. At 18 years old, she was admitted with worsening of gait disturbance. Physical examination revealed spastic paraparesis and bilateral peroneal nerve paralyzes. Homocystinuria and methylmalonic aciduria were detected, although serum vitamin B12 was within normal range. Gene mutation analysis revealed Gly147Asp (440G>A) and Trp157Ser (470G>C) in the *MMACHC* gene as a compound heterozygous mutation. We diagnosed her as having late-onset cbl C disease, and her gait disturbance and renal failure improved after intramuscular hydroxocobalamin administration. Although late-onset cbl C disease is rare in Japan, it is important to consider this congenital disease because symptoms are expected to improve by medical intervention.

(*Rinsho Shinkeigaku (Clin Neurol) 2015;55:23-28*)

Key words: cobalamin metabolic disorder, cobalamin (cbl) C, methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type (*MMACHC*), hydroxocobalamin, subacute combined degeneration of spinal cord

症例報告

スクリーニング後に発症した カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II 欠損症

市立宇和島病院小児科¹⁾、島根大学医学部小児科²⁾
桑原 優¹⁾ 岡本 典子¹⁾ 城賀本敏宏¹⁾
元木 崇裕¹⁾ 中野 威史¹⁾ 林 正俊¹⁾
山田 健治²⁾ 小林 弘典²⁾ 山口 清次²⁾

要 旨

我々は、タンデムマス・スクリーニング初回検査でC16-OH 高値(三頭酵素欠損症疑い)を指摘されたが、再検時に正常と判定されたためフォローが中止され、9か月時にインフルエンザ罹患を契機に突然死した症例を経験した。

本症例は救急搬送時の検査結果から先天代謝異常症が疑われた。死後、急性期のろ紙血のタンデムマス分析でC0の低値が確認された。急性期の血清のタンデムマス分析で長鎖アシルカルニチンの上昇等の所見を認め、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II (CPT2) 欠損症と診断された。最終的に遺伝子検査により本症と確定診断された。

本疾患はタンデムマス・スクリーニングで発見可能な疾患であるが、診断精度の問題などから二次対象疾患であり、自治体によってはタンデムマス検査を受けているにも関わらず見過ごされる可能性がある。しかし、CPT2欠損症は診断指標が見直されており、本症例の新生児期のガスリろ紙血で後方視的に検査したところ、新しい指標では日齢5の検体で異常と判定された。本疾患を一次対象疾患とする事が望まれる。

キーワード：CPT2欠損症、アシルカルニチン分析、新生児マススクリーニング、診断、二次対象疾患

はじめに

新生児マススクリーニングにタンデムマス検査が普及するようになり、従来のフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシステイン尿症に加えて、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症、アミノ酸代謝異常症などが加わり、1回の検査で少なくとも20疾患以上をスクリーニングすることが可能になった。

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II (CPT2) 欠損症はタンデムマス検査で発見できる疾患の1つで、常染色体劣性遺伝形式をとる長鎖脂肪酸代謝異常症であるCPT2は、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に輸送する仕組みの中で、ミトコンドリア内に取り込まれたアシルカルニチンをアシル-CoAに変換する酵素である。CPT2欠損症では、アシルカルニチンからアシル-CoAへの変換が障害され、ミトコンドリア内のアシルカルニチンの蓄積とアシル-CoAの減少をきたす。β酸化が障害され、エネルギーの産生が障害さ

れる結果、低ケトン性低血糖症に伴う種々の症状をきたす(図1)。臨床型は大きく新生児期発症型、乳幼児期発症型、および遅発型(骨格筋型)の3つに分類される。新生児期発症型は、けいれん、不整脈、無呼吸で発症し、しばしば脳、腎臓の奇形を伴い、高い致死率を示す。乳幼児期発症型は生後15か月頃までに、発熱、感染、空腹を契機に起こる低血糖や痙攣などの急性発作で発症する。いわゆるReye様症候群様症状を呈したり、突然死することさえある。遅発型は、思春期・成人期に長時間の空腹や運動によって横紋筋融解を反復する¹⁾⁻³⁾。

本疾患は、タンデムマス・スクリーニングでは、遊離カルニチン(C0)低値と長鎖アシルカルニチン、とりわけC16の高値もしくは(C16+C18:1)/C2比の高値が特徴的な所見とされる。CPT2欠損症は本邦におけるマススクリーニングパイロット研究の報告によると、26万人に1人の発見頻度である。しかし、本疾患は現在、二次対象疾患に分類されているため、自治体によっては検査対象とされていない地域が存在する。

今回、我々はタンデムマス・スクリーニング初回検査で一次対象疾患である三頭酵素欠損症疑いとなった

(平成26年4月18日受付)(平成27年2月17日受理)
別刷請求先：(〒792-0042) 新居浜市本郷3丁目1-1
市立宇和島病院小児科 桑原 優

表2 救急搬送時のアシカルニチン分析結果

アシカルニチン	ろ紙血 (測定値)	ろ紙血 (cut off 値)	血清 (測定値)	血清 (cut off 値)
C0	13.51	10	47.46	10
C2	3.51	5	10.69	4
C4	0.26	1.4	1.25	1.85
C6	0.18	0.25	0.017	0.46
C8	0.018	0.35	0.031	1
C10	0.057	0.4	0.14	0.8
C14 : 1	0.15	0.4	0.21	0.1
C16	4.54	7	3.03	0.5
C18	1.63	2.1	0.97	0.3
C18 : 1	3.76	3.2	3.91	0.46
(C18 : 1 + C16)/C2	2.37	0.35	0.65	0.36

単位：μmol/l

表3 新生児期ろ紙血のアシカルニチン分析結果

アシカルニチン	日齢5	日齢15	ろ紙血 (cut off 値)
C0	25.77	23.44	9
C14 : 1	0.19	0.11	0.3
C16	6.11	3.33	6.0
C16-OH	0.095	0.064	0.08
C18 : 1	4.57	2.54	2.8
(C18 : 1 + C16)/C2	3.03	1.86	0.6

単位：μmol/l

死後に、ろ紙血を取り寄せ、後方視的にアシカルニチン分析を行った。

有機酸分析を行った。

アシカルニチン分析(ろ紙血：当院搬送時)(表2)：C0 低値，C2 低値，C18 : 1 高値を認め、[C16 + C18 : 1]/C2 高値を認め、C16 4.54nmol/mLなどはカットオフ値以下であるが全般に長鎖アシカルニチンの高値を認め、CPT2 欠損症などの長鎖脂肪酸代謝異常症が強く示唆される所見であった。尿中有機酸分析でも脂肪酸代謝異常症を示唆する非ケトン性ジカルボン酸尿を認めた。さらに詳細な検討を行うため、当院搬送時の血清でアシカルニチン分析を行ったところ、長鎖アシカルニチンの著明な上昇、特にC16、C18 : 1の上昇を認め、CPT2 欠損症に特徴的な所見が得られた(表2)。確定診断のため、患児と両親のCPT2 遺伝子検査を行ったところ、患児はE174K/E174K ホモ接合性変異を認め、両親にE174K のヘテロ接合性変異を認めた。この変異は日本での乳幼児期発症型と遅発型で、好発変異として報告されており⁹⁾、CPT2 欠損症と確定診断した。

また、新生児期ガスリーろ紙血を用い、後方視的にアシカルニチン分析(表3)を行った。日齢5のろ紙

血では、C16 6.11nmol/mL(基準値、<6nmol/mL)と上昇、(C18 : 1 + C16)/C2 3.03(基準値、<0.6)は基準値の5倍以上と、CPT2 欠損症に特徴的な所見が得られた。一方、日齢15の検体では、(C18 : 1 + C16)/C2 は1.86 (<0.6)と高かったが、C16 は3.33nmol/mL (<6nmol/mL)であり、特にC16 の値は新生児期の基準値を下回る結果であった。

考 察

本患児は、タンデムマス・スクリーニングを受けていながら、CPT2 欠損症と診断されず9か月時にインフルエンザを契機に、突然死の経過をとった。また、本症例は新生児期に三頭酵素欠損症が疑われ再検されたが、再検時には正常と判定されたためフォローオフとなっていた。タンデムマス・スクリーニングにおける課題を提起すると思われるので、この原因について検討したい。

本邦におけるタンデムマス・スクリーニングにおける対象疾患は、一次対象疾患と二次対象疾患に分類されている。一次対象疾患には、見逃し例がきわめて少

表4 マスクリーニングの対象となる一次対象疾患と二次対象疾患

一次対象疾患	二次対象疾患
アミノ酸代謝異常	
1. フェニルケトン尿症 2. ホモシスチン尿症 3. メープルシロップ尿症 4. シトルリン血症 5. アルギニノコハク酸尿症	1. シトルリン欠損症
有機酸代謝異常	
1. プロピオン酸血症 2. メチルマロン酸血症 3. グルタル酸血症Ⅰ型 4. イソ吉草酸血症 5. 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸血症 6. マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 7. メチルクロトニルグリシン尿症	1. β ケトチオラーゼ欠損症 2. グルタル酸血症Ⅱ型
脂肪酸代謝異常症	
1. CPT1 欠損症 2. VLCAD 欠損症 3. MCAD 欠損症 4. TFP 欠損症	1. CPT2 欠損症 2. CACT 欠損症 3. 全身性カルニチン欠乏症

ないもの、一部に超重症型があるものの、早期発見・早期治療により障害発生予防に効果が期待できると判断される疾患が該当する。一方、二次対象疾患には、現時点では見逃す可能性があったり確定診断が必ずしも容易でなかったり、また治療効果が確実でないとは判断される疾患が該当している（表4）。2010年時点でCPT2欠損症は二次対象疾患に分類された。しかし、その後診断指標に関して検討が行われ、CPT2欠損症は $[C16+C18:1]/C2$ 比を導入することで診断精度が十分なものになり、治療効果からも一次対象疾患として対応する事が推奨されている⁹⁾。本症例でも初回検査時のC16は基準値をわずかに上回る程度であり、また再検時には基準値以下になっていた。しかし、 $[C16+C18:1]/C2$ 比は2回とも明らかに基準値を上回っており、 $[C16+C18:1]/C2$ 比の有用性が確認された。二次対象疾患は自治体によっては新生児マスクリーニングの対象疾患とされていない。本症例はタンデムマス・スクリーニングでCPT2欠損症を含めない自治体での検査を受けた。今後もこのような自治体で出生した場合は、本症例と同様に新生児期にタンデムマス・スクリーニングを受けていながら乳児期以降に急性発症する可能性がある。CPT2欠損症はカルニチン補充や発熱・食欲不振時の早期のブドウ糖輸液により、急性発作を防ぐことが可能で、乳幼児期発症型であれば十分その治療効果を望めることもあり、CPT2欠損症を全ての自治体でスクリーニング対象とする事

が望まれる。

次に再検時には正常と判定された理由について考えてみたい。久保田らはCPT2欠損症患児の出生後のアシルカルニチンプロファイルの推移についてろ紙血と血清で検討した結果、血清での検査の方がより確実に異常を指摘できる、と報告している⁶⁾。これは、ろ紙血の長鎖アシルカルニチンは日齢3にピークとなり、再検が行われる生後2週頃には、減少傾向にあり、正常範囲となる可能性があるのに対して、血清中の長鎖アシルカルニチンは少なくとも生後2週頃までは異常値を示すためである。本症例ではCPT2欠損症は二次対象疾患のため指摘されなかったが、初回検査では長鎖アシルカルニチンの広汎な上昇の結果としてC16-OHの軽度上昇がみられ、三頭酵素欠損症疑いとなったと考えられる。再検時（日齢15）にはC16-OHを含め他の長鎖アシルカルニチンも初回採血時よりも減少しており、さらにろ紙血での再検であったため、正常と判定されたものと考えられる。CPT2欠損症は、その他の長鎖脂肪酸代謝異常症としてマスクリーニング陽性となることがある事を念頭に置く必要がある。長鎖脂肪酸代謝異常症を疑う際の精密検査や新生児マスクリーニングの再検時には、血清で検査を行うことが正確な診断につながると思われる。新生児マスクリーニングでは脂肪酸代謝異常症のろ紙による再検を安易に繰り返さず、直接精密検査として血清のアシルカルニチン分析を行う方が望ましいように思われる。対象

疾患の設定、診断指標の設定は自治体によって異なるが、見逃し例を極力減らすことは今後の検討課題と考えられる。

結 語

新生児マススクリーニングでC16-OHの一過性高値を呈し、生後9か月に突然死したCPT2欠損症の1例を経験した。

初回検査でCPT2欠損症を検査対象とした施設で検査が行われていれば、早期診断し救命できた可能性があり、本疾患を一次対象疾患へと変更することが望まれる。

また、本疾患の精密検査は血清のアシルカルニチン分析を行うことがより重要であると考えられた。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 山口清次. タンデムマス・スクリーニングガイドブック. 東京: 診断と治療社, 2012.
- 2) 北川照男, 山口清次, 高柳正樹, 他. タンデムマス導入に伴う新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報 2006; 42: 22.
- 3) Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 495—520.
- 4) 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.
- 5) 重松陽介. タンデムマス診断精度向上・維持, 対象疾患設定に関する研究. 平成22年度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) 分担研究報告書.
- 6) 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变化. *日児誌* 2011; 115: 956—960.

Deficiency in Carnitine Palmitoyltransferase-2 after Tandem Mass Screening: A Case Study

Yu Kuwabara¹⁾, Michiko Okamaoto¹⁾, Toshihiro Jyogamoto¹⁾,
Takahiro Motoki¹⁾, Takeshi Nakano¹⁾, Masatoshi Hayashi¹⁾,
Kenji Yamada²⁾, Hironori Kobayashi²⁾ and Seiji Yamaguchi²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Uwajima City Hospital

²⁾Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine

We describe an unusual case of a pediatric patient whose level of 3-hydroxy-hexadecanoyl carnitine was above the upper cutoff value according to an initial tandem mass screening test (TMST). Follow-up was not possible, because the patient died suddenly of influenza at the age of 9 months although the second TMST was normal. Laboratory findings suggested that he may have had a congenital metabolic disorder. Post-mortem, the free carnitine value was below the cutoff value in the acute phase. Serum analyses showed an increase in the level of long-chain acylcarnitine. We diagnosed carnitine palmitoyltransferase (CPT2) deficiency, which was confirmed by genetic analyses. TMST can detect CPT2 deficiency, but this is considered to be a second-line investigation because diagnostic accuracy is not high, thus, CPT2 deficiency can be misdiagnosed or overlooked. However, the diagnostic robustness of TMST for CPT2 deficiency has been revised. By retrospectively examining blood spots of our patient 5 days post-mortem, we were able to detect abnormalities in the new markers of this deficiency. We hope that mass screening for CPT2 deficiency can become a first-line investigation in all examination centers in Japan in the near future.

タンデムマス・スクリーニングにおける精度管理の現状と今後の課題 —内部精度管理の充実に向けた取組み—

花井潤師¹⁾、福士 勝²⁾、石毛信之³⁾、田崎隆二⁴⁾、山口清次⁵⁾、重松陽介⁶⁾

1) 札幌市衛生研究所, 2) 札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー, 3) 公益財団法人東京都予防医学協会, 4) 一般財団法人化学及血清療法研究所, 5) 島根大学小児科, 6) 福井大学医学部看護学科健康科学

【要 旨】

日本マススクリーニング学会技術部会が中心となり、タンデムマス・スクリーニング（以下、「TMS」）の施設間差の解消と内部精度管理の充実を図るため、各検査施設にMicrosoft EXCELで作成した内部精度管理ツールを送付し、平成25年度の正常値分布およびTMS実施状況の調査を行った。その結果、TMSの指標ごと、施設ごとの正常値の分布とカットオフ値の比較や再採血率と精査率などのTMS実施状況の比較により、それぞれの施設ごとの特徴や問題点などが明らかとなった。これらの解析結果は、各施設での適正なカットオフ値の設定に向けて、有用な情報になると考える。今後も各施設の正常値分布調査を継続的に実施していくには、より簡便な検査データの収集と結果のリアルタイムの解析が必要であり、Webベースのデータベース構築と解析システムの整備が必要である。

日本マススクリーニング学会誌 25(1): 57-66, 2015

【キーワード】

タンデムマス・スクリーニング, 内部精度管理, カットオフ値, 正常値分布

緒 言

タンデム質量分析計を用いる先天性代謝異常マス・スクリーニング（以下、タンデム・マススクリーニング：「TMS」）は、平成26年中に、すべての自治体で導入された。TMSはこれまでの新生児スクリーニング検査とは異なり、多項目指標測定による多種類の対象疾患のスクリーニング検査である。このため、各指標ごとのカットオフ値を設定するとともに、その適正さを評価する必要がある。さらに、タンデム質量分析

計の測定値は変動しやすく、検査・解析には担当者の熟練が必要であることから、検査施設における内部精度管理が極めて重要である。

今回、日本マススクリーニング学会技術部会（以下、「技術部会」）では、施設間差の解消と内部精度管理の充実を図るため、スクリーニング検査施設にMicrosoft EXCELで作成した内部精度管理ツールを送付し、平成25年度の各指標の正常値分布とカットオフ値、並びに、TMS検査実施状況の調査を行い、TMS検査の現状と課題について検討したので報告する。

受付日：平成27年2月6日 受理日：平成27年3月23日

<連絡先> 花井 潤師

〒003-8505 札幌市白石区菊水9条1丁目

札幌市衛生研究所

Tel:011-841-7672 Fax:011-841-7073

E-mail: junji.hanai@city.sapporo.jp

方 法

(1) 内部精度管理ツール

内部精度管理ツールは、「一括ヒストグラム作成シート」、「集計・解析シート」、「月別集計シート」の3つからなり、Microsoft EXCEL 2010

を用いて、マクロ付のワークシートとして作成した。このうち、「一括ヒストグラム作成シート」は、ヒストグラム作成ワークシートを改良して作成し¹⁾、取り扱う指標はアミノ酸7種 (Val, Leu+Ile, Met, Phe, Cit, Tyr, Arg)、アシルカルニチン類14種 (C0, C2, C3, C5, C5-DC, C5-OH, C8, C10, C14:1, C16, C16-OH, C18, C18:1, C18:1-OH)、アシルカルニチン比5種 (C3/C2, C14:1/C2, C0/(C16+C18), (C16+18:1)/C2, C8/C10) の計26項目とした。また、TMS検査の対象疾患と測定指標を表1に示した。

(2) 正常値分布調査

平成26年5月、技術部会から各検査施設に「一括ヒストグラム作成シート」を配布し、各施設では平成25年度の初回検査データ(患者検体及び不備検体は除く)から集計一覧表を出力し、メール添付として技術部会に返送した。集計一覧表のデータは、「集計・解析シート」を

用いて解析した。

(3) TMS検査実施状況調査

平成26年9月、技術部会から各検査施設に、平成25年度のTMS実施状況として、初回検査数、再採血数、精密検査数(即精査数+再採血後精査数)、発見患者数を調査した。

結果

1. 内部精度管理ツール

内部精度管理ツール相互の関連性を図1に示した。「一括ヒストグラム作成シート」は、1回の処理で26項目の測定指標について、各施設所有のデータベースから検査データを取り込み、各指標のヒストグラムと基礎統計量のほか、各指標の1, 10, 50, 90, 99パーセンタイル(以下、%値)について、集計一覧表を出力した。

「集計・解析シート」は、集計一覧表のデータを取り込み、各施設のデータを指標ごとのシートに貼り付け、正常値分布を箱ひげ図(図2)として集計チャートに出力した(図3)。また、タンデム質量分析器の種類、内部標準物質やタンデムマス検査用キットなどの測定条件のほか、カットオフ値、中央値、99%値を基準に並べ替えすることで、指標ごとの特徴の分析が可能であった。

「月別集計シート」は、「集計・解析シート」を利用し、月別の各指標の集計一覧表を取り込み、指標ごとに月別の正常値分布を箱ひげ図(図4)として出力可能であった。

2. 正常値分布調査

41施設中34施設(83%)から回答があった。解析の結果、Leu+Ileu, C3, C5-DC, C14:1/C2比において、99%値がカットオフ値を上回っている施設があり、カットオフ値の設定が適正ではない施設があることが確認された(図5)。

3. TMS検査実施状況調査

(1) 一次対象疾患全体の集計結果

41施設中33施設(80%)から回答があった。初回検査件数は、全施設合計で862,879件で

表1. 対象疾患と測定指標

	疾患名	測定指標
一次対象疾患	フェニルケトン尿症	Phe
	メープルシロップ尿症	Leu+Ile, Val
	ホモシスチン尿症	Met
	シトルリン血症1型	Cit
	アルギニノコハク酸尿症	
	プロピオン酸血症	C3, C3/C2
	メチルマロン酸血症	
	イソ吉草酸血症	C5
	メチルクロニルグリシン尿症	C5-OH
	ヒドロキシメチルグルタル酸血症	
	複合カルボキシラーゼ欠損症	
	グルタル酸血症I型	C5-DC
	MCAD欠損症	C8, C8/C10
	VLCAD欠損症	C14:1, C14:1/C2
	三頭酵素欠損症	C16-OH, C18:1OH
CPT1欠損症	C0/(C16+C18)	
二次対象疾患	シトルリン欠損症	Cit, Phe, Met
	β-ケトチオラーゼ欠損症	C5-OH
	グルタル酸血症II型	C8, C10
	CPT-2欠損症	C16, (C16+C18:1)/C2
	CACT欠損症	
カルニチントランスポーター異常症(全身性カルニチン欠乏症)	C0	

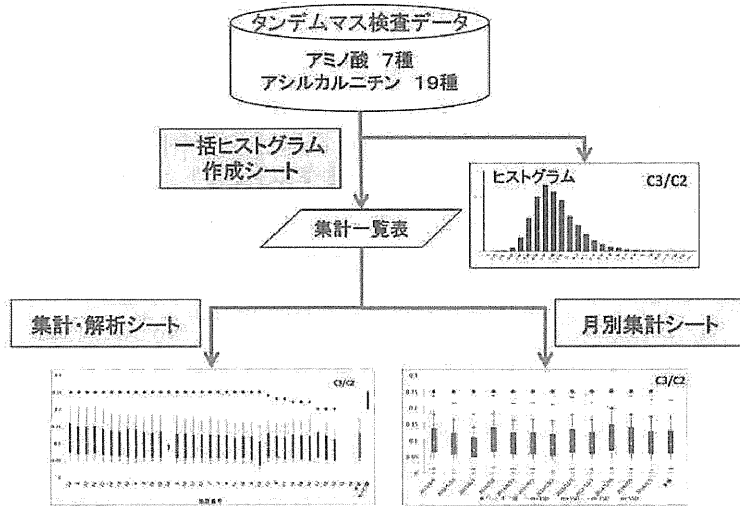


図1. 内部精度管理ツールの関連性

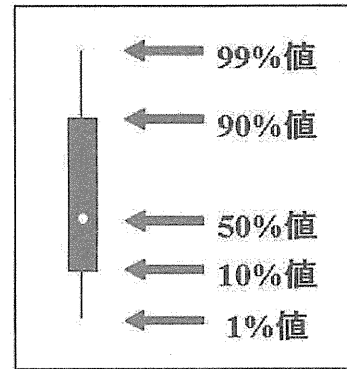
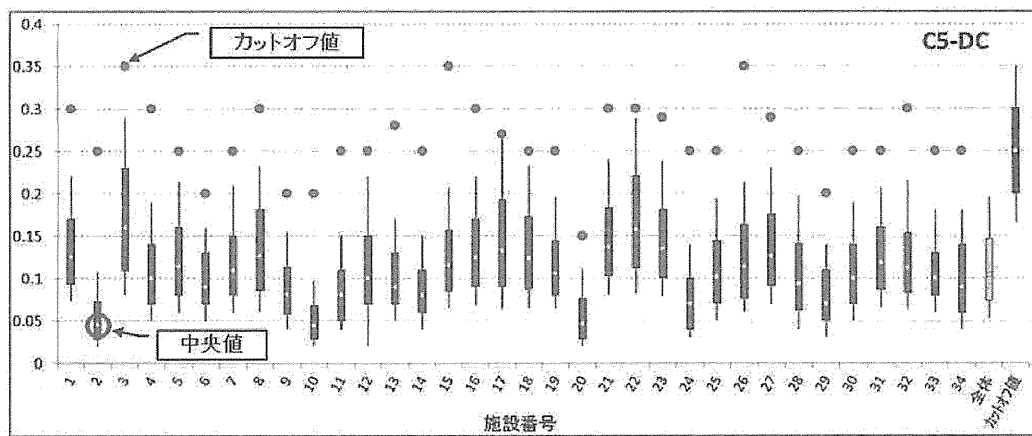


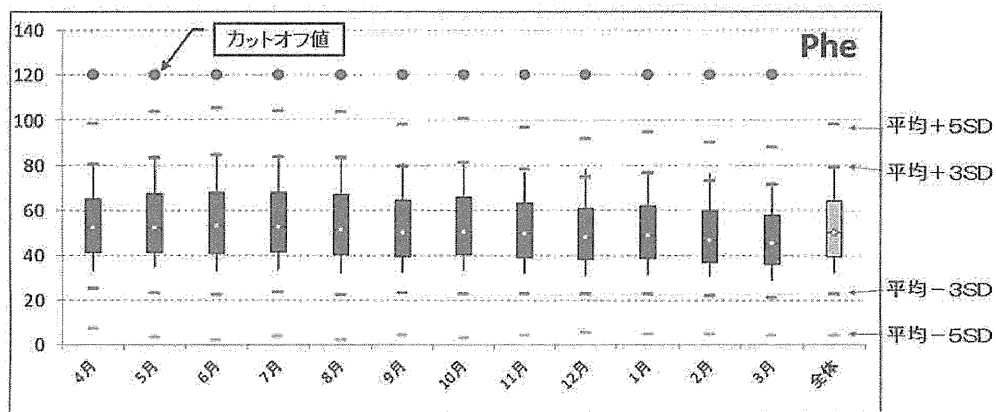
図2. 箱ひげ図の定義



■施設番号: 各施設の%値 □全体: 全施設の%値の平均 ■カットオフ値: 全施設のカットオフ値の%値

Y軸の単位: μM

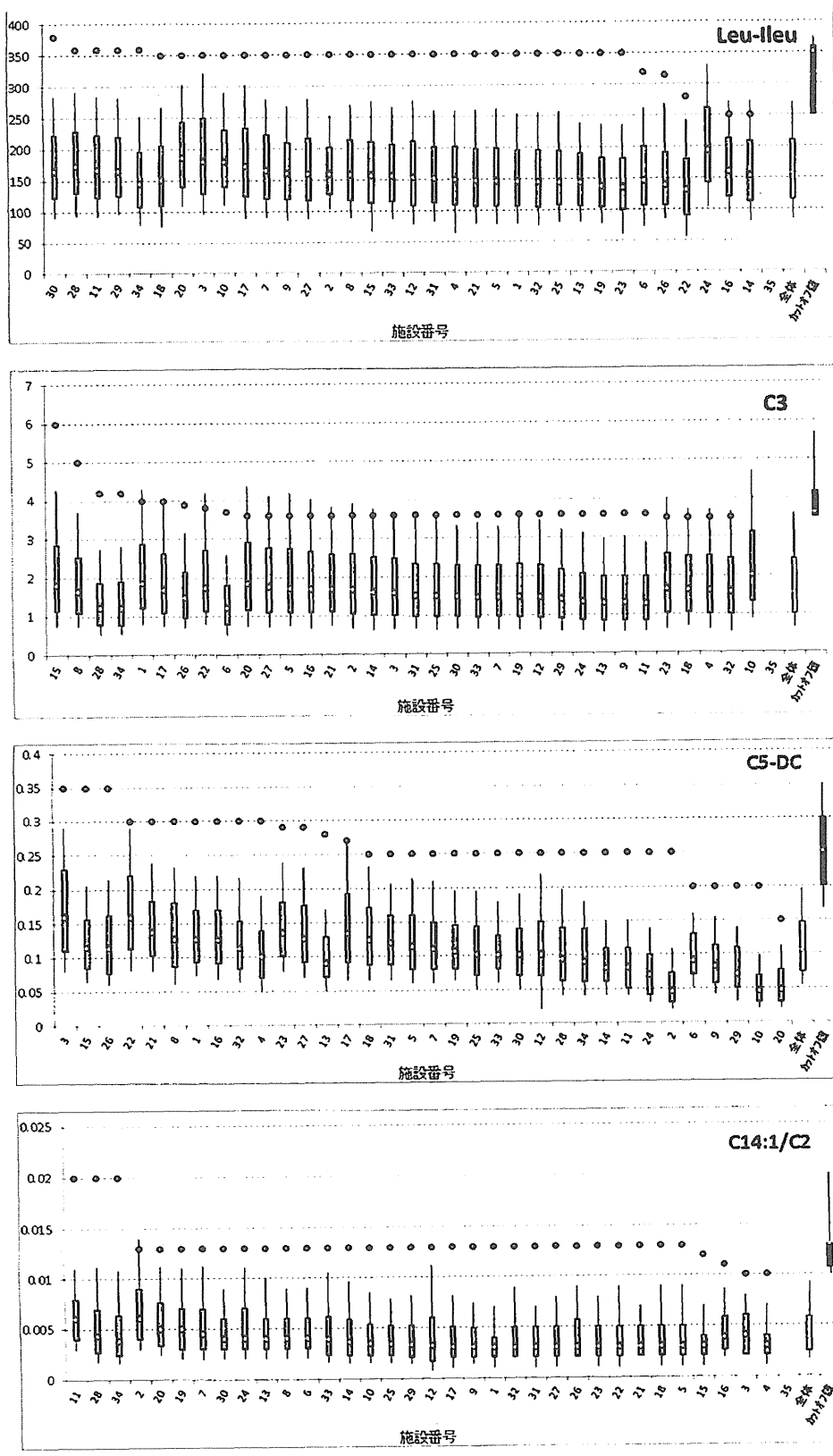
図3. 集計チャート出力イメージ



■月: 各月の%値 □全体: 各月の%値の平均

Y軸の単位: μM

図4. 月別集計シート出力イメージ



■施設番号: 各施設の%値 □全体: 全施設の%値の平均 ■カットオフ値: 全施設のカットオフ値の%値

図5. 正常値分布に施設間差の認められた指標

あった。一次対象疾患（以下、「一次疾患」）の全施設合計は、再採血数3,386件（0.39%）、即精査数155件（0.018%）、再採血後精査数253件（0.029%）、総精査数408件（0.047%）であった。また、発見患者数は54例で発見頻度1：15,979であった（図6、表2）。また、二次対象疾患群での全施設合計は、再採血数1,121件（0.13%）、

即精査数23件（0.003%）、再採血後精査数49件（0.006%）、総精査数72件（0.008%）であった。また、発見患者数は14例で発見頻度1：61,634であった（図7、表3）。

各施設ごとの集計結果において、再採血率が0.6%を上回ったのは8施設であった。また、総精査率が0.1%を上回ったのは4施設であった

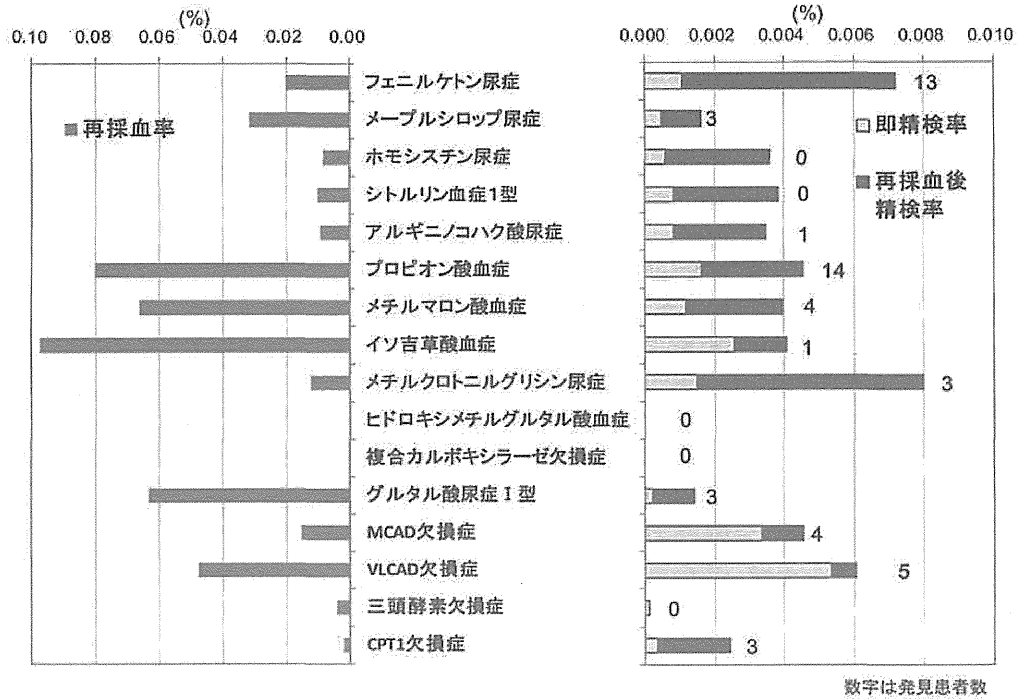


図6. 平成25年度タンデムマス検査実施状況（一次対象疾患の再採血率・精検率）

表2. 平成25年度タンデムマス検査実施状況（一次対象疾患全体集計）

項目	初回検査	即精査	陽性数	再採血		即精査		再採血後精査数	総精査数	発見患者数	陽性率	再採血率	即精査率	再採血後精査率	総精査率	発見頻度	PPV
				数	率	数	率										
フェニルケトン尿症	Phe	138.64	476.87	241	172	9	53	62	13	0.03%	0.020%	0.001%	0.006%	0.007%	1 : 66,375	21.0%	
メープルシロップ尿症	Leu+Ile	345.61	532.87	1,785	274	4	10	14	3	0.21%	0.032%	0.000%	0.001%	0.002%	1 : 287,626	21.4%	
ホモシステイン尿症	Met	68.64	178.37	103	73	5	26	31	0	0.01%	0.008%	0.001%	0.003%	0.004%	-	-	
シトルリン血症1型	Cit	77.30	260.91	148	87	7	26	33	0	0.02%	0.010%	0.001%	0.003%	0.004%	-	-	
アルギニノコハク酸尿症	Cit	76.91	259.50	136	80	7	23	30	1	0.02%	0.009%	0.001%	0.003%	0.003%	1 : 862,879	3.3%	
プロピオン酸血症	C3	3.82	7.27	10,516	691	14	25	39	14	1.22%	0.080%	0.002%	0.003%	0.005%	1 : 61,634	35.9%	
メチルマロン酸血症	C3/C2	0.24	0.23	622	570	10	24	34	4	0.07%	0.066%	0.001%	0.003%	0.004%	1 : 215,720	11.8%	
イソ吉草酸血症	C5	1.00	4.27	880	641	22	13	35	1	0.10%	0.097%	0.003%	0.002%	0.004%	1 : 862,879	2.9%	
メチルクロトニルグリシン尿症	C5-OH	0.98	1.88	123					3								
ヒドロキシメチルグルタル酸血症		0.96	1.50	119	105	13	56	69	0	0.01%	0.012%	0.002%	0.006%	0.008%	1 : 287,626	4.3%	
複合カルボキシラーゼ欠損症		0.96	2.00	118					0								
グルタル酸尿症1型	C5-DC	0.27	0.13	1,172	547	2	10	12	3	0.14%	0.063%	0.000%	0.001%	0.001%	1 : 287,626	25.0%	
MCAD欠損症	C8	0.29	0.48	383	131	29	10	39	4	0.04%	0.015%	0.003%	0.001%	0.005%	1 : 215,720	10.3%	
VLCAD欠損症	C14:1	0.36	0.75	531	413	46	6	52	5	0.06%	0.049%	0.005%	0.001%	0.005%	1 : 172,576	9.6%	
三頭酵素欠損症	C16-OH	0.07	0.22	212	34	1	0	1	0	0.02%	0.004%	0.000%	-	0.000%	-	-	
CPT1欠損症	C9(C16+C18)	79.10	25.00	30	18	3	18	21	3	0.00%	0.002%	0.000%	0.002%	0.002%	1 : 287,626	14.3%	
2013年度検体数	862,879	合計	36,117	3,386	155	253	408	54	4.19%	0.39%	0.018%	0.029%	0.047%	1 : 15,979	13.2%		

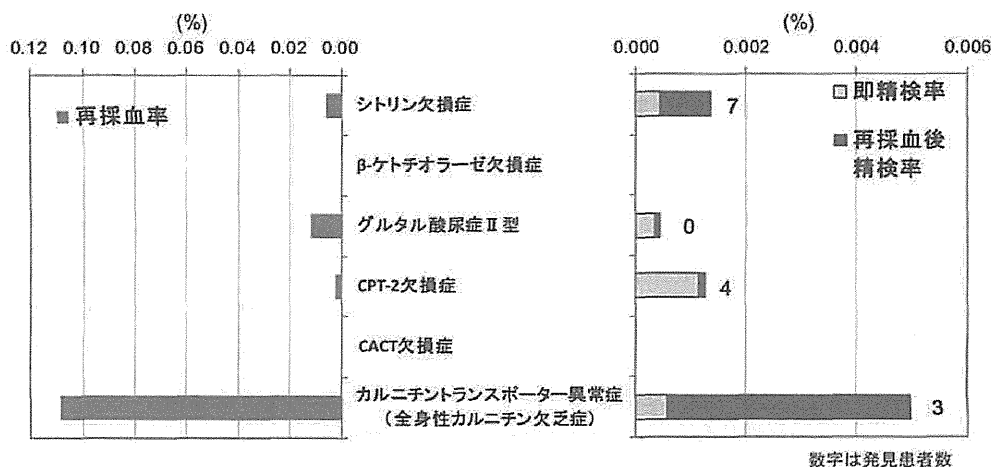


図7. 25年度タンデムマス検査実施状況 (二次対象疾患の再採血率・精検率)

表3. 平成25年度タンデムマス検査実施状況 (二次疾患全体集計)

項目	カットオフ値平均 (gM)	検査結果											発見頻度	PPV			
		初回検査	即精査	陽性数	再採血数	即精検数	再採血後精検数	総精検数	発見患者数	陽性率	再採血率	即精検率			再採血後精検率	総精査率	
シトリン欠損症	Cit	65.36		178	51	4	8	12	7	0.02%	0.006%	0.000%	0.001%	0.001%	1 : 123,268	58.3%	
β-ケトチオラーゼ欠損症	C5-OH	0.92		132	6	1	1	2	0	0.02%	-	-	-	-	-	-	
グルタル酸尿症Ⅱ型	C8	0.29		323	104	3	1	4	0	0.04%	0.012%	0.000%	0.000%	0.000%	-	-	
CPT-2欠損症	(C16+C18)/C2	0.47	0.81	121	24	10	1	11	4	0.01%	0.002%	0.001%	0.000%	0.001%	1 : 215,720	36.4%	
CACT欠損症	C16	3.11	6.67	85,883	0	0	0	0	0	9.95%	-	-	-	-	-	-	
カルニチントランスポーター異常症 (全身性カルニチン欠乏症)	C0	7.72	3.33	2,569	939	5	38	43	3	0.30%	0.109%	0.001%	0.004%	0.005%	1 : 287,626	7.0%	
2013年度検体数		862,879		合計	90,160	1,121	23	49	72	14	10.45%	0.13%	0.00%	0.01%	0.01%	1 : 61,634	19.4%

(図8, 表4).

(2) 一次疾患検査指標の施設別結果

一次疾患の各指標について、施設別の再採血率等を比較した結果、以下の指標について、施設間差が比較的大きいことが確認された (図9).

- ① C5 : 一部の施設で即精査率が高かった.
- ② C5-OH : 再採血から精査になる割合が高かった.
- ③ C14:1 : 総精査率が高い施設は再採血せず即精査としている施設であった.
- ④ C0/(C16+C18) : 再採血率は低いにもかかわらず、総精査率が高い施設で多い傾向であった.

考 察

「集計・解析シート」を用いて、各指標の正常値分布を比較することで、タンデムマス検査における以下の解析が可能となった.

- ① カットオフ値と99%値の比較によるカット

オフ値の適正さの確認

- ② 箱ひげ図の分布の幅の比較による測定値のばらつき度合い (精密度) の確認
- ③ 中央値の比較により、測定値の正しさ (正確度) の確認

これらの解析により、いくつかの指標において、カットオフ値の設定が適正でない施設やばらつきの多い施設が複数存在することが確認された。このうち、カットオフ値と99%値の比較については、99%値がカットオフ値を上回る場合は、陽性率が1%を上回り、一つの指標で判定する場合には、再採血率が1%を超えることを意味している。したがって、カットオフ値と99%値がこのような関係を示す指標を有する施設にあっては、内部精度管理や外部精度管理などの結果を詳しく分析して、カットオフ値設定の適正さについて、検討すべきである。

現時点では、TMSを開始したばかりの施設も含まれており、担当者のタンデムマス検査への