

平成28年度厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

脳クレアチニン欠乏症候群の診断法に関する研究

分担研究者：新保裕子 神奈川県立こども医療センター 臨床研究所

**研究要旨**

代謝疾患のひとつクレアチン代謝異常症は、脳内のクレアチン欠乏をきたし、精神遅滞、言語発達遅滞、てんかん、自閉症、錐体外路症状を特徴とする。その先天性の原因として、クレアチン生成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)欠損症、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)欠損症、およびクレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症の3疾患が知られている。クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症は海外で100例以上報告されているが、日本では当センターで解析した6家系のみである。磁気共鳴スペクトル装置(MRS)で脳内クレアチン値の低下を確認することにより診断されるが、原因遺伝子の推定には、尿や血清中のグアニジノ酢酸、クレアチン/クレアチニン比を測定する必要がある。クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症では、尿中のクレアチン/クレアチニン比の上昇が認められることから、尿のスクリーニングが診断の手がかりとなる。クレアチン代謝異常症の診断を目的とし、今年度導入したオートサンブラー付の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-UV装置を用いて、クレアチン関連化合物の分析条件検討を行った。

**A. 研究目的**

クレアチン代謝異常症は、重度の精神遅滞を主要症状とし、てんかん、自閉症、重度の言語障害などの様々な臨床症状を有する疾患である。海外におけるクレアチン代謝異常症の報告は多いが、日本での報告は当院で解析した数例にとどまる。その先天性の原因として、クレアチン生成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)、およびクレアチントランスポーター(SLC6A8)の遺伝子の欠損が知られている[1-3]。臨床症状を有する患者の脳を磁気共鳴スペクトル装置(MRS)で調べて脳内クレアチン値の低下を

確認することにより診断されるが、原因遺伝子を特定する手掛かりを得るには、尿や血清中のクレアチン関連化合物（特にグアニジノ酢酸/クレアチニン比、クレアチン/クレアチニン比）を測定する必要がある。

2011年に当研究室において、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-UV検出器で陽イオンクロマトグラフィー用カラムを用いた生体試料中のクレアチン化合物の測定方法及びその方法を用いるクレアチン代謝異常症の患者のスクリーニング方法を開発した[4]。今までに本邦初症例を含むクレアチン代謝異常症7家系(SLC6A8欠損症:6家系、GAMT欠損:1家系)の診断を行った[5-8]。生体試料分析において、SLC6A8欠損症は尿

中のクレアチン/クレアチニン比が上昇、GAMT 欠損症は尿、血漿、髄液中のグアニジノ酢酸濃度上昇を特徴とする。

今年度は新しく導入したオートサンプラー付の HPLC 装置(Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000)を用いて、多検体の尿を解析するために、水系の移動相で 10 分以内にクレアチン関連化合物を分析できる条件を検討した。

尿のスクリーニング、脳内 MRS、遺伝子検査から早期診断、治療応用を目指す。

## B. 研究方法

1. HPLC 分析装置(Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000)、カラム(Shodex YS-50)を用いて評価した。

移動相としてギ酸水溶液を用いた。

標準品の調製：

CR クレアチン 0.01%，

GA グアニジノ酢酸 0.05%，

CN クレアチニン 0.01%

尿サンプルの調製：尿に等量のアセトニトリルで除タンパク後の上清を 10~100 倍水で希釈した。

## C. 研究結果

保持時間 10 分以内に CR, GA, CN が分離する移動相の条件を検討した結果、0.075%ギ酸水溶液で良好な結果が得られた(図 1)。

コントロール、SLC6A8 欠損症患者のサンプルのクロマトグラムを図 2 に示す。

標準試料を用いて検量線を作成し、クレアチン(CR)とクレアチニン(CN)の濃度を算出した。SLC6A8 欠損症患者のサンプルにおいて、CR/CN 比率が高値を示した(正常値：2.0 以下)。

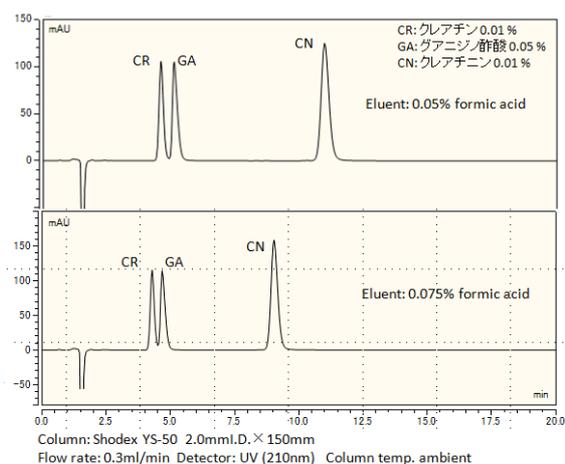


図 1. 移動相の検討 ギ酸 0.05%(上)、ギ酸 0.075%(下)条件下で標準品分析

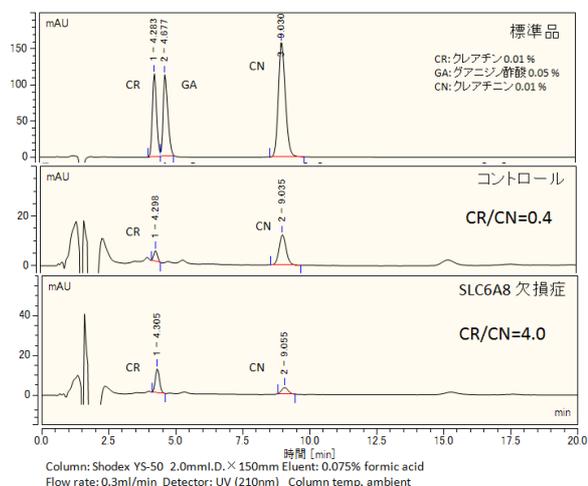


図 2. 標準品、コントロール、コントロール、SLC6A8 欠損症患者サンプルのクロマトグラム

## D. 考察

移動相中のギ酸の濃度を上げるだけで、分離能を変えず、分析時間を短くすることができた(図 1)。

## E. 結論

尿中のクレアチン関連化合物の HPLC 測

定は、クレアチン代謝疾患の診断に有用である。

#### References

- [1] S. Stockler et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man Am J Hum Genet 58 (1996) 914-922.
- [2] C.B. Item et al. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans Am J Hum Genet 69 (2001) 1127-1133.
- [3] G.S. Salomons et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome Am J Hum Genet 68 (2001) 1497-1500.
- [4] T. Wada et al. A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes Amino Acids 43 (2012) 993-997.
- [5] H. Osaka et al. Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness Mol Genet Metab 106 (2012) 43-47.
- [6] H. Kato et al. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8 Brain Dev (2013).
- [7] T. Akiyama et al. A Japanese adult

case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency JIMD Rep 12 (2013) 65-69.

- [8] F. Nozaki et al. A family with creatine transporter deficiency diagnosed with urinary creatine / creatinine ratio and the family history: the third Japanese familial case. No To Hattatsu 47 (2015) 49-52.

#### G. 研究発表

##### 1 . 論文発表

- 1) Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Kuhara T, Shibata T, Kobayashi K, Kurosawa K, Yoshinaga H. SSADH deficiency possibly associated with enzyme activity-reducing SNPs. Brain Dev. 2016 38(9):871-4.

##### 2 . 学会発表

- 1) H.Shimbo, K.Kurosawa, N.Okamoto, T. Wada.Molecular genetic study of 80 patients with ATR-X syndrome in Japan. The 13th International Congress of Human Genetics in 2016. 4月3-7日 京都
- 2) H.Shimbo, T.Yokoi, S. Mizuno, H. Suzumura, N. Aida, J. Nagai, K. Ida, Y. Enomoto, C. Hatano, K. Kurosawa. Structural brain abnormalities associated with chromosome 2p16.1 deletions. The 13th International Congress of Human Genetics in 2016. 4月3-7日 京都
- 3) H. Shimbo, S. Ninomiya, K. Kurosawa,

T. Wada. Two brothers with ATR-X syndrome due to low frequency of maternal somatic mosaicism with deletion of exons 2-5 in the *ATRX*. 58 回日本小児神経学会 平成 27 年 6 月 3-5 日 東京

4) H. Shimbo, T. Ohoshi, K. Kurosawa.

A patient with the deletion of 7p21.1 in *Saethre-Chotzen syndrome*. 58 回日本小児神経学会 平成 27 年 6 月 3-5 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし