

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15217

研究課題名(和文) シトリン欠損症の簡易スクリーニング法の確立と家系情報に基づく食嗜好パターンの探索

研究課題名(英文) Establishment of a simple screening method for citrin deficiency and exploration on food preferences

研究代表者

栗山 進一 (Kuriyama, Shinichi)

東北大学・災害科学国際研究所・教授

研究者番号：90361071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：東北大学 東北メディカル・メガバンク機構が小中学生の保護者に実施した調査票回答者を対象に、シトリン欠損症に特徴的な食嗜好を有する小児をスクリーニングした。方法は高たんぱく質・高脂質の食品をよく摂り、高糖質の食品をあまり摂らず、さらに高糖質の食品摂取後に体調が悪くなることをスコア化し、合計点の高い者を特定した。特定された者のうち同意を得た13名の唾液にて遺伝子解析を行った。遺伝子解析の結果シトリン欠損症の関連遺伝子のヘテロ保因者2名を発見したがホモ保有者は発見されなかった。本研究によって潜在的なシトリン欠損症患者は特定できなかったが、食嗜好による簡便なスクリーニング方法の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To detect citrin deficiency during the asymptomatic period, we distributed a parent-administered questionnaire, which focused on specific food preferences of disliking sweets and preferring high protein and high fat foods, to 62,895 children in elementary and junior high school.

We obtained 16,468 responses, and 84 children had these specific food preferences. After excluding children whose parents did not want a telephone contact and those without available contact details, we asked the parents of 32 children if they would allow their child to undergo a genetic test of the SLC25A13 gene. DNA extracted from the collected saliva of these 13 children was examined for 6 prevalent mutations in the SLC25A13 gene. Although two of these 13 children were heterozygous carriers, one child with c.851_854delGTAT and one with c.1177+1G>A, no homozygous carrier was detected. This result suggested that heterozygotes might have specific food preferences similar to citrin deficiency.

研究分野：分子遺伝疫学

キーワード：シトリン欠損症 スクリーニング 分子遺伝疫学 小児期 SLC25A13 食嗜好

1. 研究開始当初の背景

シトリン欠損症は、新生児肝内胆汁うっ滞症 (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: NICCD) 及び成人発症型シトルリン血症 (adult onset type citrullinemia: CTLN2) を含む疾患概念である。シトリン欠損症は SLC25A13 の遺伝子変異による常染色体劣性疾患で、ホモ接合体の有病率は理論上 1/17,000 である (Tabata, Sheng et al. 2008) 一方で、CTLN2 の発症頻度は 1/100,000 であり、確定診断を受けていない人々が相当数存在すると推測されている。また、ヘテロ接合体の保因者頻度は 1/65 と、諸外国に比較して多い。

シトリンはアスパラギン酸をミトコンドリア内から外に輸送し、グルタミン酸とプロトンを外から内に輸送するたんぱく質 (アスパラギン酸-グルタミン酸キャリア) であり、細胞質内の代謝系に寄与している。シトリンが欠損すると細胞質の糖質代謝が低下し、NADH が増加する。その結果、尿素合成に必要なアスパラギン酸が低下し、種々の代謝系が影響を受けてシトルリン血症と高アンモニア血症を引き起こすため、シトリンの欠損は生命に関わる重大な病態である (Saheki and Kobayashi 2002)。

NICCD では低出生体重、遷延性/遅発性黄疸や胆汁うっ滞などが認められる。一方で新生児マススクリーニングではメチオニン、フェニルアラニン、ガラクトースなどの高値により精査をして発見されることもあるが、新生児マススクリーニングで発見されるのは NICCD の約 40% となっている (Shigematsu, Hirano et al. 2002)。また、多くの場合は 6 か月～1 歳頃までに正常化したり、中には無症状のまま経過するケースもあるため見過ごされやすい。また、CTLN2 の発症時期は 10 歳代から 70 歳代と幅広く報告されており、特に NICCD 発症時期から CTLN2 発症時期の間は適応・代償期と呼ばれ、症状が軽減されるか無症候状態となるため発症時期を見据えた予防が困難である。CTLN2 の症状には意識障害や行動異常、肝機能障害、高アンモニア血症、うつ、てんかんなどが認められるために、精神疾患や肝障害などの別疾患として診断されている可能性もある。

シトリン欠損症では高たんぱく・脂質を好み、糖質を嫌うという特徴的な食癖があることが知られており、適応・代償期でも同様の食癖が認められている (Saheki, Kobayashi et al. 2008)。CTLN2 はしばしば偏食の矯正や飲酒などが誘因となって発症する場合もある。また、CTLN2 発症時には、炭水化物の多い食品の摂取や禁忌とされている高ブドウ糖輸液等の投与によって症状が悪化する可能性がある。そのため、乳幼児期に無症状だった人々や確定診断に至らなかった人々を CTLN2 発症前の見かけ上健康な時期に特定し、CTLN2 の発症を予防することや発症時に適切な処置を行うことは極めて重要である。

CTLN2 の早期の発症時期は 10 歳代であることから、学童期にシトリン欠損症を特定することは、その発症を予防するためには重要である。しかし、現在ではシトリン欠損症の確定診断には遺伝子検査が必要であり、簡易な方法で学童期のシトリン欠損症をスクリーニングする方法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小中学生を対象にシトリン欠損症の特徴的な食癖と小児期の臨床症状をアンケート票及び聞き取り形式により調査し、シトリン欠損症の特徴的な食癖に該当する小中学生に遺伝学的検査を実施することでシトリン欠損症を特定する一連のプロセスを踏まえて、シトリン欠損症のスクリーニング方法を検討することである。

3. 研究の方法

2012 年から 2015 年にかけて宮城県において公立の小中学校に在籍する子どもを対象に健康に関する調査票調査が実施された。調査対象は小学 2, 4, 6 年生、ならびに中学 2 年生で、回答者に重複が発生しないよう 2 年ごとに調査地域を変更した。新しい治療法開発・予防の研究にご協力いただける場合、また、子どもの診断に必要な場合は、遺伝子解析などの詳細な検査について説明のうえ、改めて研究協力をお願いすることがあることを記した文書と合せて、調査票は学校を通して配布された。調査票は保護者が回答後に郵送で返送した。調査票にて、「結果を希望」と回答し、連絡先と氏名を記入した保護者に対して郵送による結果回付を行った。その調査の一部として、シトリン欠損症のスクリーニングのための項目を調査票に付加した。調査票に付加する項目およびスクリーニング方法は、調査年度ごとにスクリーニング状況を確認しながら改定を行った。

(1) 2012 年度のスクリーニング法

甘味物の飲食傾向の有無からシトリン欠損症疑いの子どもをスクリーニングする。具体的には、「あなたのお子さんは羊羹 (ようかん) などの和菓子、甘い炭酸飲料、甘いジュースを全く食べない (飲まない)、または食べる (飲む) と具合がわるくなりますか。」で「はい」と回答している場合をスクリーニングした。

(2) 2013 年度のスクリーニング法

食嗜好の質問に対して以下のように回答があった場合をスクリーニングした。

「1. あんこの入った和菓子」または「2. リンゴジュース」の項目で「食べると具合が悪くなる」と回答している。

「1. あんこの入った和菓子」または「2. リンゴジュース」の項目で、「食べない」、もしくは「3. とりのから揚げ」「4. 枝豆」「5. ピーナッツ (落花生)」を「よく食べる」と

回答しているのが4項目以上当てはまると回答し、かつ出生時の体重が2,900g未満である。

(3) 2014年度以降のスクリーニング法

11項目の食品についてシトリン欠損症の嗜好について次の、のとおりにスコア化し、合計点の上位0.3%をスクリーニングした。

質問「あなたのお子さんの食べ物(飲み物)の好みについてお聞かせください。以下の食べ物(飲み物)について、あなたのお子さんにもっともあてはまる答えのボックスにひとつチェック☐をつけてください。また、1~11の食べ物(飲み物)のなかで、食べるとからだの具合が悪くなるものがあれば、かっこ()内に×を付けてください。」という項目に対して、

「1.羊羹」、「3.リンゴジュース」、「5.キャンディー」、「8.あんこの入った和菓子」、「11.キャラメル」について「非常によく食べる」と回答があった場合それぞれ1点とする。同様に「2.枝豆」「4.とりのから揚げ」「6.ポテトチップス」「7.ピーナッツ(落花生)」、「9.牛乳」、「10.チーズ」について「全く食べない」と回答があった場合それぞれ-1点とする。

「1.羊羹」、「3.リンゴジュース」、「5.キャンディー」、「8.あんこの入った和菓子」、「11.キャラメル」について「あまり食べない」もしくは「全く食べない」と回答があった場合それぞれ3点とする。同様に「2.枝豆」「4.とりのから揚げ」「6.ポテトチップス」「7.ピーナッツ(落花生)」、「9.牛乳」、「10.チーズ」について「非常によく食べる」もしくは「よく食べる」と回答があった場合それぞれ3点とする。

「1.羊羹」、「3.リンゴジュース」、「5.キャンディー」、「8.あんこの入った和菓子」、「11.キャラメル」について「食べる(飲む)」と具合がわるくなる」と回答があった場合それぞれ5点とする。

結果回付の際に、調査票にてシトリン欠損症の疑いとスクリーニングされた子どもの保護者に対して、シトリン欠損症に関する情報提供を行ったのち、電話にて本研究の主旨を説明し、遺伝子検査の実施および研究協力について意向を確認した。研究協力の意向があった子どもとその保護者には県内各所の東北大学関連施設に来てもらい、研究者が子どもと保護者に対面式でインフォームド・コンセントを行った。子ども本人から口頭による賛意を、保護者から書面にて代諾同意を得たのちに、本人から唾液採取を行い、SLC25A13領域における遺伝子変異の有無を調べた。

本研究は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て実施した。(No.2014-1-440)

4. 研究成果

2012年~2015年の調査票の解析対象は、それぞれ1,345人、3,969人、6,952人、4,202人で総計16,468人であった。そのうち、調査票にて特異的な嗜好があるとスクリーニングされたのは、2012年は18人、2013年は33人、2014年は19人、2015年は14人の総計84人であった。84人のうち、本研究への参加の意向を示し唾液採取を行ったのは13人であった。(図1)

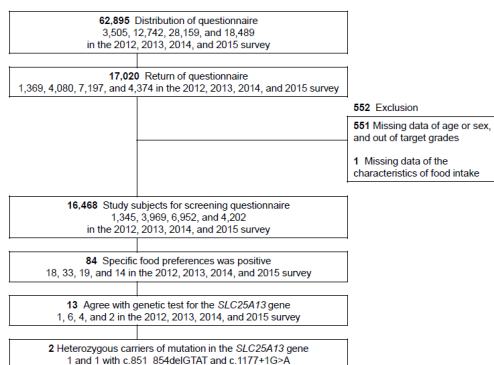


図1. 研究の概要

4年間で回答者の平均年齢は10.5歳(SD 2.2)、男子が49.4%で、出生体重の平均は3,026g(SD 450)であった。(表1)

表1. 調査票で回答された子どもの特性

	Total	2012 survey	2013 survey	2014 survey	2015 survey
N	16,468 (100.0)	1,345 (100.0)	3,969 (100.0)	6,952 (100.0)	4,202 (100.0)
Grade 2nd	4,451 (27.0)	317 (23.6)	1,098 (27.7)	1,867 (26.9)	1,169 (27.8)
4th	4,334 (26.3)	358 (26.6)	1,123 (28.3)	1,815 (26.1)	1,038 (24.7)
6th	4,336 (26.3)	375 (27.9)	1,014 (25.6)	1,784 (25.7)	1,163 (27.7)
8th	3,347 (20.3)	295 (21.9)	734 (18.5)	1,486 (21.4)	832 (19.6)
Boys	8,136 (49.4)	642 (47.7)	1,948 (49.1)	3,422 (49.2)	2,124 (50.6)
History of hospitalization	4,845 (29.4)	352 (26.2)	1,432 (36.1)	1,965 (28.3)	1,096 (26.1)
Birth weight, gram (N=14,849)	3,026 ± 450	No data	3,027 ± 432	3,023 ± 457	3,030 ± 457

遺伝子解析を行った子どもの13人の平均年齢は11.3歳、男子が6人で、出生体重の平均は2,786gであった。このうち、新生児黄疸の遷延の指摘や光線療法等の実施があったのは5人、乳児期の体重増加不良を指摘されたことがあったのは1人、日常的に易疲労感があると回答したのは2人であった。SLC25A13領域における6種類の高頻度遺伝子変異に対する解析の結果、11人は変異を認めず、2人が1種類の変異の保因者であった。この2人のうち、1人はMutationの、もう1人はMutationのヘテロ接合体保因者であった。ホモ保有者は発見されなかった。(表2)

表2. SLC25A13 領域における高頻度遺伝子変異に対する解析実施結果

No.	Sex	Age, y	Birth weight, gram ¹	BMI, kg/m ²	Easily fatigued ²	Neonatal jaundice ³	Poor hepatobiliary function ⁴	Survey year	Total score of questionnaire about food preferences ⁵	Gene mutation ⁶
1	Girl	15	3,100	18.8	Yes	No	No	2012	NA	Hetero [I]
2	Girl	13	2,600	16.8	No	No	No	2013	NA	No
3	Girl	10	2,900	18.1	No	No	No	2013	NA	No
4	Boy	14	2,200	14.5	No	No	No	2013	NA	No
5	Boy	8	2,900	14.5	No	Yes	No	2013	NA	No
6	Girl	9	2,500	15.3	No	Yes	No	2013	NA	No
7	Boy	10	2,200	15.9	No	Yes	Yes	2013	NA	No
8	Girl	15	3,300	24.7	No	No	No	2014	31	No
9	Girl	9	3,600	26.9	No	No	No	2014	42	No
10	Boy	15	3,100	28.2	Yes	Yes	No	2014	33	Hetero [II]
11	Boy	13	3,500	18.9	No	No	No	2014	28	No
12	Girl	8	1,700	13.4	No	Yes	No	2015	30	No
13	Boy	8	2,600	16.5	No	No	No	2015	30	No

< 引用文献 >

A. Tabata, J.S. Sheng, M. Ushikai, Y.Z. Song, H.Z. Gao, Y.B. Lu, F. Okumura, M. Iijima, K. Mutoh, S. Kishida, T. Saheki, K. Kobayashi, Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in SLC25A13 gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency, J Hum Genet, 53 (2008) 534-545.

T. Saheki, K. Kobayashi, Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD), J Hum Genet, 47 (2002) 333-341.

Y. Shigematsu, S. Hirano, I. Hata, Y. Tanaka, M. Sudo, N. Sakura, T. Tajima, S. Yamaguchi, Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan, Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 776 (2002) 39-48.

T. Saheki, K. Kobayashi, M. Terashi, T. Ohura, Y. Yanagawa, Y. Okano, T. Hattori, H. Fujimoto, K. Mutoh, Z. Kizaki, A. Inui, Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects, Journal of inherited metabolic disease, 31 (2008) 386-394.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Masako Miyashita, Mami Ishikuro, Masahiro Kikuya, Chizuru Yamanaka, Satoshi Mizuno, Masato Nagai, Yuki Sato, Taku Obara, Hirohito Metoki, Atsuo Kikuchi, Naoki Nakaya, Atsushi Hozawa, Ichiro Tsuji, Nobuo Yaegashi, Masayuki Yamamoto, Shigeo Kure and Shinichi Kuriyama. Development of a

Questionnaire Method of Screening for Citrin Deficiency in Schoolchildren. Journal of Pediatrics and Congenital Disorders. 2017;4:1-7, DOI 10.1620/tjem.236.123

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗山 進一 (KURIYAMA, Shinichi)
東北大学・災害科学国際研究所・教授
研究者番号：90361071

(2)研究分担者

呉 繁夫 (KURE, Shigeo)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10205221

(3)連携研究者

菊谷 昌浩 (KIKUYA, Masahiro)
東北大学・東北メディカル・メガバンク
機構・准教授
研究者番号：80361111

石黒 真美 (ISHIKURO, Mami)
東北大学・東北メディカル・メガバンク
機構・助教
研究者番号：10632242

菊池 敦生 (KIKUCHI, Atsuo)

東北大学・大学病院・助教
研究者番号：30447156

宮下 真子 (MIYASHITA, Masako)
東北大学・東北メディカル・メガバンク
機構・助手
研究者番号：70765429