

機関番号 : 11301

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591214

研究課題名 (和文)

先天代謝異常症の治療法選択を支援する  $^{13}\text{C}$  呼気試験による酵素活性評価システム

研究課題名 (英文)

Evaluation system of residual enzymatic activity by  $^{13}\text{C}$ -breath test, which improves treatment of patients with inborn error of metabolism

研究代表者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 10205221

研究成果の概要 (和文) :

高グリシン血症の酵素診断を目的とした[1- $^{13}\text{C}$ ]グリシン呼気試験、およびフェニルケトン尿症の診断を目的とした [1- $^{13}\text{C}$ ]フェニルアラニン呼気試験の開発を行った。どちらの方法においても、正常対照に比し患者群では有意に低い $^{13}\text{CO}_2$ 排出を認め、その信頼性が示された。 $^{13}\text{C}$ 呼気試験は、安全でかつ残存酵素活性の程度が評価できるため、予後の予測や治療法の選択に役立つ有用な検査と考えられた。

研究成果の概要 (英文) :

We devised a  $^{13}\text{C}$ -breath test, which measures  $^{13}\text{CO}_2$  concentration in breath after administration of  $^{13}\text{C}$  labeled substrates. We firstly developed [1- $^{13}\text{C}$ ]glycine breath test for enzymatic diagnosis of hyperglycinemia. Patients with hyperglycinemia expired significantly less  $^{13}\text{CO}_2$ , suggesting feasibility of enzymatic diagnosis of hyperglycinemia. We secondly devised [1- $^{13}\text{C}$ ]phenylalanine breath test for enzymatic diagnosis of phenylketonuria, and found that significantly less  $^{13}\text{CO}_2$  was expired in patients with phenylketonuria. Similar results were obtained in  $^{13}\text{C}$ pyruvate breath test in pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Thus far,  $^{13}\text{C}$ -breath test is safe and useful facilitating better treatment of patients with inborn error of metabolism.

交付決定額:

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・小児科学

キーワード: 小児代謝、栄養学、先天代謝異常症の in vivo 診断法

## 1. 研究開始当初の背景

大部分の先天代謝異常症は、酵素をコードする遺伝子の変異により発症する。遺伝子検査法の進歩により、先天代謝異常症においても遺伝子診断は広く行われるようになった。酵素欠損症の場合、残存酵素活性の程度は、予後の予測や治療法の選択に極めて有用な情報となるが、遺伝子診断のみで残存酵素活性の推定は困難であるため、現在でも酵素診断の重要性は失われていない。その酵素診断が現在、消滅の危機に瀕している。

我が国の現状をみると、① 酵素診断のみでは研究として成り立たず、酵素診断を依頼可能な施設が急速に減少。② 酵素活性測定には放射性同位元素など特殊な技術が必要で、後継施設の育成が困難。③ フェニルケトン尿症や高グリシン血症のように酵素診断を行うには、肝生検などの侵襲的手技が必要な疾患があり、さらに酵素診断の実施を更に困難にしている。以上の理由から、残存酵素活性を評価できる、技術的習熟が不要、多くの施設で実施可能、非侵襲的、などの性質を備えた新しい酵素診断システムの確立が望まれている。

## 2. 研究の目的

$^{13}\text{C}$ 呼気試験は、 $^{13}\text{C}$ で標識された基質を被検者に投与しその分解産物として生体内で生成する $^{13}\text{CO}_2$ 濃度を測定することで、生体内酵素活性を評価する方法である。安定同位体 $^{13}\text{C}$ は、 $^{14}\text{C}$ と異なり放射線被曝の恐れが無く、小児にも安全に使用することが出来る。 $^{13}\text{CO}_2$ はそれ以上代謝を受けない安定な最終産物で、ほぼ全量が呼気中に排出されるため定量に適する。対象の酵素自身が脱炭酸反応を行う場合が最適であるが、そ

れ以外の酵素でも脱炭酸反応が直近の下流に存在する場合、 $^{13}\text{C}$ 呼気試験が利用できる。最近、ピロリ菌感染症の診断法として $^{13}\text{C}$ 尿素呼気試験が普及し、多くの病院で赤外分光法を利用した $^{13}\text{CO}_2$ 濃度測定装置を既に保有している。検査手技が容易なため、 $^{13}\text{C}$ 化合物と標準化されたプロトコールがあれば、多くの病院内で簡便に $^{13}\text{C}$ 呼気試験により酵素活性を実施出来る。更に、標準化されたプロトコールを確立することで異なる施設間での結果比較も可能となる。本研究では、アミノ酸代謝異常症などの先天代謝異常症を対象に安定同位体 $^{13}\text{C}$ で標識したアミノ酸などの基質を用いた $^{13}\text{C}$ 呼気試験の方法を確立し、実施プロトコールを作成する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

高グリシン血症、フェニルケトン尿症などの酵素欠損症の呼気試験を確立のため、

- ①  $^{13}\text{C}$ 化合物の種類と投与量
- ② 呼気検体の採取時間と回数
- ③ 呼気試験の実施時間（観察時間）
- ④ 正常対照者における個人差の程度

などの条件を検討する。その後、検討した条件を取り入れた呼気試験プロトコール作成する。

本研究計画は、東北大学医学部倫理委員会により承認されている。説明文書中は、①研究への協力は任意であること、②希望すればいつでも研究協力を中止できること、③検査の具体的な方法、④研究結果はその結果が誰のものか分からないようにして学術発表する可能性があること、を含む。実施に当たっては、説明文書を用いて試験内容を十分に説明した後、同意書に署名頂く事で研究への参加意思を確認した。

#### 4. 研究成果

はじめに、高グリシン血症の<sup>13</sup>C呼気試験法を確立した。欠損酵素であるグリシン開裂酵素 (GCS) はグリシンの脱炭酸反応を含み、<sup>13</sup>Cで標識されたグリシンを用い呼気試験を行ったところ、患児における<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の排出は正常対照より極めて低値で、診断に有用であった。更に、高グリシン血症の多くの症例で信頼できる検査である事を確認した。次に、フェニルケトン尿症の酵素診断を目的として、<sup>13</sup>C呼気試験の条件検討を行った。体重1 kg当たり10 mgの<sup>13</sup>Cフェニルアラニン (最大100 mg) を経口投与後、呼気中に排出される<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を赤外分光法で定量することにより、欠損酵素であるフェニルアラニン水酸化酵素の酵素活性を推定することが可能であった。多くの正常対照者において呼気試験を実施し、プロトコルの調整を行った。その結果、フェニルケトン尿症患者において、排出される<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>が正常対照に比べ、有意に低い事を確認し、フェニルアラニン水酸化酵素活性を推可能である事が示唆された。また、<sup>13</sup>Cピルビン酸呼気試験を用いたピルビン酸脱水素酵素欠損症の酵素診断においても、高グリシン血症やフェニルケトン尿症と同様な結果をえた。

以上の結果から、<sup>13</sup>C呼気試験を用いた先天代謝異常症の酵素診断は、残存酵素活性の評価に有用と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- 1) Kure S. Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia) Brain & Development

(2011年、印刷中) 査読有

- 2) Suzuki Y, Kure S, Oota M, Fukuda M. Nonketotic Hyperglycinemia: Proposal of a Diagnostic and Treatment Strategy. Pediatric Neurology 2010;43:221-224. 査読有.
- 3) 呉 繁夫. 「アミノ酸・有機酸代謝異常症を見逃していませんか？」小児内科. 2010 ; 42 : 1183-1186. 査読無
- 4) 呉 繁夫. 「非ケトーシス型高グリシン血症」小児疾患診療のための病態生理. 小児内科 2009; 41:355-357. 査読無
- 5) 呉 繁夫. 「小児医学最近の進歩—グリシン脳症—」小児科, 2009 ; 50 : 583-58. 査読無

[学会発表] (計6件)

- 1) 呉 繁夫「PKU研究から生まれた基本概念—新生児スクリーニング、Phe制限食、BH4反応性」第5回成育代謝異常症研究会、国立成育医療センター (東京)、2011年3月4日
- 2) 呉 繁夫「PKUに対するBH4療法—有効性の発見と治療の現状」第52回先天代謝異常学会総会、大阪国際会議場 (大阪府)、2010年10月23日
- 3) 呉 繁夫「グリシンおよびフェニルアラニン代謝異常症の病態解明と治療法開発に関する研究」第52回先天代謝異常学会総会、大阪国際会議場 (大阪府)、2010年10月21日
- 4) 呉 繁夫「フェニルケトン尿症に対するテトラヒドロピオプテリン療法」第113回日本先天代謝異常症学術集会、盛岡市民ホール (盛岡市)、2010年4月23日
- 5) Kure S. “Glycine encephalopathy” International Symposium on Epilepsy in

Neurometabolic disease, “Epilepsy in Neurometabolic Disease”. March 26-28, 2010, Taipei, Taiwan.

- 6) 呉 繁夫「遺伝生化学—先天代謝異常症入門」第1回遺伝医学セミナー入門コース、ぶらざ菜の花（千葉市）、2010年2月18日

〔図書〕（計3件）

- 1) 高柳俊光、呉 繁夫 「日齢2より筋緊張低下、無呼吸を呈した男児」．「症例から学ぶ先天代謝異常症」 遠藤文夫、山口清次、高柳正樹、深尾敏博編、診断と治療社、東京、33-35頁、2010年
- 2) 呉 繁夫 「高グリシン血症」小児科臨床ピクシス No.23、「見逃せない先天代謝異常症」、五十嵐隆、高柳正樹編、中山書店、249-251頁、2010年
- 3) 呉 繁夫 「BH4 反応性フェニルアラニン水酸化酵素欠損症」、「ビタミン総合事典」日本ビタミン学会編、朝倉書店 509-511頁、2010年

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

[http://plaza.umin.ac.jp/~ped-thk/pgroup\\_sententaisya.html](http://plaza.umin.ac.jp/~ped-thk/pgroup_sententaisya.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10205221

(2) 研究分担者

大浦 敏博 (OHURA TOSHIHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10176828

(3) 連携研究者 なし ( )

研究者番号：