

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790983

研究課題名（和文）末梢リンパ球とタンデムマスを用いた簡便な脂肪酸代謝異常症酵素診断法の確立

研究課題名（英文）Enzymatic evaluation of fatty acid oxidation by an *in vitro* probe acylcarnitine profiling assay using peripheral lymphocytes and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS).

## 研究代表者

虫本 雄一 (MUSHIMOTO YUICHI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：90467712

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、末梢リンパ球とタンデムマス質量分析を用いた脂肪酸β酸化能評価法によって、脂肪酸代謝異常症の中でも頻度が高い、中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症、グルタル酸血症 2 型 (GA2) の診断が可能であることを示した。線維芽細胞と比較して侵襲が少なく簡便なリンパ球を用いる本方法は、現在広がりつつあるタンデムマスによる新生児マス・スクリーニングにおいて、脂肪酸代謝異常症の補助診断として有用である。また、細胞内/外の遊離カルニチン比をみることで、カルニチントランスポーター異常症 (OCTN2 異常症) の診断にも応用が可能である。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we present an enzymatic evaluation for the diagnosis of Medium-chain acyl-CoA dehydrogenases deficiency (MCADD), very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (VLCADD) and Glutaric acidemia type 2 (GA2) that are frequent in fatty acid oxidation disorders, by an *in vitro* probe acylcarnitine profiling assay using peripheral lymphocytes and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS). Peripheral lymphocytes are easily available than fibroblasts and this method is helpful for confirmation of diagnosis of fatty acid oxidation disorder in newborn screening by MS/MS. Further, our results suggest that the ratio of intracellular carnitine/extracellular free carnitine is also useful for diagnosis of carnitine transporter deficiency (OCTN2 deficiency).

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：脂肪酸代謝異常症、タンデム質量分析計、新生児マススクリーニング、先天代謝異常症、酵素活性、遺伝子解析、脂肪酸β酸化

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 脂肪酸代謝異常症診断の重要性

脂肪酸代謝異常症では脂肪酸β酸化の障害により細胞中のエネルギー枯渇を引き起こす。日常の生活では無症状でも、胃腸炎や感冒罹患に伴う飢餓時に乳幼児突然死症候群や Reye 様症候群として発症することが多い。食事指導や、感染罹患時の早めの補液で簡単に予防ができるため、早期発見が疾患の障害予防、乳幼児突然死症候群の予防のために重要である。

(2) 現時点では脂肪酸代謝異常症の確定診断は容易ではない

脂肪酸代謝異常症では、患者であっても安定期にはタンデムマスで異常値を認めない場合がある。また、確定診断のための遺伝子解析や酵素活性測定はこれまでも行われているが、検査における専門技術が必要なことも多く、コストや時間もかかり容易ではない。

### (3) 脂肪酸β酸化能評価の有効性

脂肪酸代謝異常症は十分なエネルギー補給がある状態では発症しない。飢餓などの異化ストレスを患者に与えることには大きなリスクがあるが、線維芽細胞やリンパ球を使用すれば、安全かつ効果的に化学診断、代謝プロフィールを評価することが可能となる。また、従来の脂肪酸代謝異常症の酵素活性測定では、疾患毎に個別に行う必要があった。我々の方法では長鎖から短鎖までの脂肪酸を測定することにより、脂肪酸β酸化がどの部位で障害されているかを一度の検査で評価することが可能となる。

### (4) 一般診療におけるカルニチン欠乏症の重要性

タンデムマスによるアシルカルニチン分析の普及に伴い、臨床現場でカルニチン欠乏に遭遇する機会が多いことがわかってきた。カルニチンは、カルニチントランスポーター(OCTN2)により細胞質へ能動的に取り込まれ、長鎖脂肪酸がミトコンドリア脂肪酸β酸化を受ける際には必須の蛋白である。先天代謝異常であるカルニチントランスポーター異常症(OCTN2異常症)は早期に正しく診断されなければ、急性脳症、突然死を起すリスクがある。薬剤性、低栄養などによる2次性カルニチン欠乏症も正しく鑑別される必要がある。

## 2. 研究の目的

### (1) 脂肪酸β酸化能を簡便に評価する方法

を確立する

新生児マススクリーニングにおいて脂肪酸代謝異常症が疑われた症例全例に遺伝子解析を行うと、時間とコストがかかりすぎる。補助診断として脂肪酸β酸化能評価が有用であるが、培養皮膚線維芽細胞を用いる方法は、患者への侵襲性や結果がでるまでに約1ヶ月を必要とする問題がある。線維芽細胞の代わりにリンパ球を用いる方法を開発し、検査時間の短縮と患者への侵襲性を改善する。

(2) OCTN2 異常症患者のリンパ球を用いて、カルニチントランスポーターの機能を評価する。

末梢血リンパ球でカルニチントランスポーター異常症(OCTN2異常症、全身性カルニチン欠乏症)や二次性カルニチン欠乏症の補助診断、病態解析を簡便に行うことが可能となれば、的確な治療が可能になる。カルニチン欠乏状態では、それが1次性でも2次性でも筋力低下、けいれん、脳症などが起こりやすい。また遺伝性カルニチン欠乏症では、感染や飢餓を契機に急激な低血糖、急性脳症、突然死にいたることもある。臨床の場で簡便に診断できる方法の確立は極めて意義が大きい。

## 3. 研究の方法

(1) リンパ球とタンデムマス質量分析を用いた脂肪酸β酸化能評価法の確立

脂肪酸代謝異常症はβ酸化のいずれかの部位の障害であり、疾患毎に蓄積する脂肪酸の種類、パターンが異なってくる。タンデムマスでは短鎖から長鎖(C0からC18)までの脂肪酸をアシルカルニチンとして一度の検査で測定することが可能である。障害部位がより明らかとなるように、脂肪酸基質として大量の長鎖脂肪酸(C16、パルミチン酸)を加える。正常細胞ではβ酸化が最後まで進みC2の増加がみられるが、脂肪酸代謝異常症では酵素障害がある直前の脂肪酸の増加がみられる。

本方法では、採血された末梢血よりリンパ球を分離し、1wellに $3 \times 10^6$ 個の細胞となるように調整する。次に、SMEMに脂肪酸を含まないBSA 0.40%、L-carnitine 0.4mM、IL2 25U/ml、抗生剤を添加した培養液で、96時間培養する。培養後の上清を用いて、タンデムマス質量分析によるアシルカルニチン分析を行う。

(2) リンパ球とタンデムマスを用いた簡便なカルニチントランスポーター評価法への応用(図1)

血液中の遊離カルニチンは、カルニチントランスポーターによって細胞内に能動的に取り込まれる。1)の方法で96時間培養し

た後のリンパ球細胞を用い、Foch 法によって細胞内液を採取する。この細胞内液 20 $\mu$ l を用いてアシルカルニチン分析を行う。1) の培養液を細胞外液と見なし、細胞内/細胞外の遊離カルニチン比をみることで、カルニチントランスポーター機能を評価する。今回の研究では、培養液中の遊離カルニチン濃度を、生体内における生理的濃度 (20 ~ 60  $\mu$ M) の他に過剰量 (400  $\mu$ M)、あるいは欠乏状態 (10  $\mu$ M) で検討した。

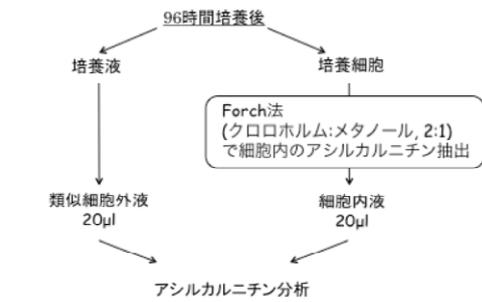


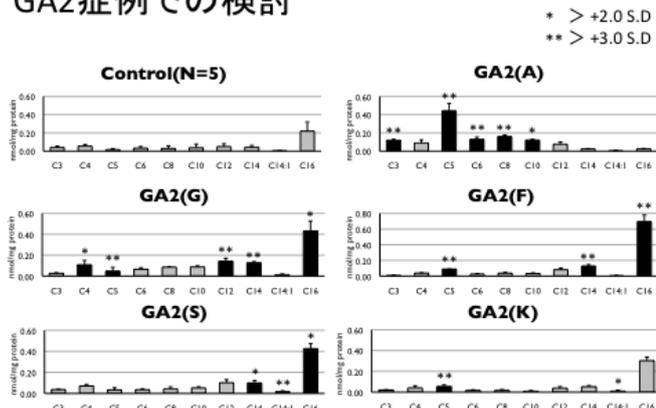
図1 細胞内および細胞外アシルカルニチンの同時測定法

#### 4. 研究成果

##### (1) 脂肪酸 $\beta$ 酸化能評価法による脂肪酸代謝異常症の診断

2年間で、中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 5 名、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 2 名、グルタル酸血症 2 型 (GA2) 5 名の解析をおこなった。コントロールと比較して、MCAD 欠損症では C6、C8、C8/C10 比が、VLCAD 欠損症では C14:1 が上昇していた。GA2 では、症例毎にパターンが異なるものの短鎖から長鎖のアシルカルニチンの蓄積がみられ、皮膚線維芽細胞と同様に診断が可能であることが確認できた (図 2)。MCAD 欠損症の 5 例中 4 例、VLCAD 欠損症の 2 例中 1 例、GA2 の 4 例中 1 例は新生児マス・スクリーニングで発見された症例であった。

図2 リンパ球を用いた in vitro probe assay: GA2 症例での検討

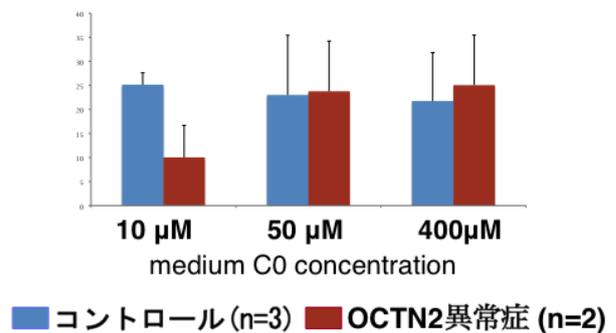


以上の結果より、線維芽細胞と同様にリンパ球でも脂肪酸  $\beta$  酸化能評価が可能であり、脂肪酸代謝異常症の診断に有用であることが明らかとなった。低侵襲で簡便なリンパ球を使用した本方法は、新生児マス・スクリーニングの補助診断として期待される。

##### (2) 細胞内/外の遊離カルニチン比を用いた OCTN2 異常症の診断

カルニチントランスポーター異常症 (OCTN2 異常症、全身性カルニチン欠乏症) 2 名とコントロール 3 名の解析を行なった。通常の脂肪酸  $\beta$  酸化能評価法では、異常代謝産物の増加をより顕著にする目的で高濃度のカルニチン (400  $\mu$ M) を培養液に添加している。しかし、OCTN2 異常症においては、細胞外のカルニチン濃度が高濃度 (400  $\mu$ M)、また生理的濃度 (50  $\mu$ M) ではコントロールと差を認めず、欠乏状態 (10  $\mu$ M) の条件でのみコントロールと比較して OCTN2 異常症で細胞内/細胞外遊離カルニチン比が低値となり診断が可能であった (図 3)。以上のことより、カルニチントランスポーターは細胞外遊離カルニチン濃度がより低い環境においてよく働き、その機能を評価できると考えられた。リンパ球を用いた脂肪酸  $\beta$  酸化能評価法を発展させたカルニチントランスポーター評価法は、今後臨床でよく遭遇するカルニチン欠乏症において二次性と先天代謝異常症である OCTN2 異常症との鑑別、またカルニチン代謝に関わる他の脂肪酸代謝異常症での評価にも有用であることが期待される。

図3 リンパ球における細胞内/細胞外の遊離カルニチン比



#### 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 10 件)

- ① 山口清次, 長谷川有紀, 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン・ジャミヤン: GC/MS 有機酸分析で発見される小児の後天性ビタミン欠乏症: ビタミン B1 欠乏症とピオチン欠乏症, ビタミン, 査読なし, 86, 2012, 32-36
- ② Hamajima T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Saito Y, Onigata K: Novel compound heterozygous mutations in the SBP2 gene: characteristic clinical manifestations and the implications of GH and triiodothyronine in longitudinal bone growth and maturation, Eur J Endocrinol, 査読あり, 166, 2012, 757-764  
DOI: 10.1530/EJE-11-0812
- ③ Fukuda S, Ogiso K, Mushimoto Y, Abe M, Yasuda Y, Yamaguchi S: Adenovirus serotype 31 infection in a newborn girl and review of the literature, Pediatr Int, 査読あり, 53, 2011, 408-411  
DOI: 10.1111/j.1442-200X.2010.03260.x
- ④ 虫本 雄一, 山口清次: 新生児突然死とその予防, 産婦人科治療, 査読なし, 102, 2011, 317-321
- ⑤ Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1, Mol Genet Metab, 査読有, 102, 2011, 343-348  
DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.11.159
- ⑥ Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type 2, J Chromatogr B, 査読あり, 8782, 2010, 1673-1679  
DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.03.029
- ⑦ Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial beta-oxidation: comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay, Brain Dev, 査読あり, 322, 2010, 362-370  
DOI: 10.1016/j.braindev.2009.06.001
- ⑧ 小林弘典, 李紅, プレブスレン・ジャミヤン, 虫本雄一, 長谷川有紀, 山口清次: タンデムマス導入による新生児マススクリーニングの新時代 タンデムマスによる新生児スクリーニングに対する in vitro probe

acylcarnitine profiling assay による脂肪酸  $\beta$  酸化能評価の有用性に関する検討, 日本先天代謝異常学会雑誌, 査読なし, 262, 2010, 50-54

- ⑨ 虫本雄一: 母体代謝疾患の新生児, 周産期医学, 査読なし, 402, 2010, 628-631  
虫本雄一, 山口清次, ロイシン, 小児内科, 査読なし, 422, 2010, 1084-1087
- ⑩ 虫本雄一, 竹谷健, 長谷川有紀, 小林弘典, 福井徹, 渡邊敏明, 山口清次: ステロイド抵抗性の難治性アトピー性皮膚炎として加療されていたピオチン欠乏の1例, アレルギーの臨床, 査読なし, 302, 2010, 543-547

〔学会発表〕(計 16 件)

- ① 虫本雄一, プレブスレン・ジャミヤン, 小林弘典, 長谷川有紀, 山田健治, 山口清次: In vitro probe assayによるカルニチントランスポーター機能評価法 原発性カルニチン欠乏症の酵素診断, 第53回日本先天代謝異常学会, 2011年11月26日, 千葉県千葉市 ホテルニューオータニ幕張
- ② 小林弘典, 山田健治, プレブスレン・ジャミヤン, 虫本雄一, 高橋知男, 長谷川有紀, 伊藤道德, 山口清次: ベザフィブラートが有効であった遅発型グルタル酸尿症2型の男児例, 第53回日本先天代謝異常学会, 2011年11月26日, 千葉県千葉市 ホテルニューオータニ幕張
- ③ 高橋知男, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, JamiyanPurevsuren, 古居みどり, 大竹明, WandersRJA, 山口清次: 高脂血症を契機に発見されたメチルマロン酸セミアルデヒド脱水素酵素欠損症の11歳男児例, 第53回日本先天代謝異常学会, 2011年11月26日, 千葉県千葉市 ホテルニューオータニ幕張
- ④ プレブスレン・ジャミヤン, 長谷川有紀, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, 市山高志, 山口清次: Effect of IAE related cytokines on mitochondrial fatty acid oxidation, 第53回日本先天代謝異常学会, 2011年11月26日, 千葉県千葉市 ホテルニューオータニ幕張
- ⑤ 長谷川有紀, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレン・ジャミヤン, 川名修一, 中川勝博, 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症の出生前診断の経験, 第53回日本先天代謝異常学会, 2011年11月26日, 千葉県千葉市 ホテルニューオータニ幕張
- ⑥ 山田健治, 小林弘典, 虫本雄一, プレブスレン・ジャミヤン, 長谷川有紀, 山口清次: グルタル酸尿症2型に対するベザフィブラートの効果 in vitro probe assayによる評価, 第53回日本先天代謝異常学会, 2011年11月25日, 千葉県千葉市 ホテルニューオータニ幕張

- ⑦ 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン・ジャミヤン, 山田健治, 高橋知男, 長谷川有紀, 御牧信義, 山口清次: タンデムマス法による新生児スクリーニングを契機に発見された母親のメチルクロトニルグリシン尿症, 第38回日本マス・スクリーニング学術集会, 2011年10月29日, 福井県福井市 AOSSA
- ⑧ 小林弘典, 虫本雄一, プレブスレン・ジャミヤン, 山田健治, 高橋知男, 長谷川有紀, 山口清次: 非誘導体化キットを用いた分析法と精度管理, 第38回日本マス・スクリーニング学術集会, 2011年10月29日, 福井県福井市 AOSSA
- ⑨ 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: タンデムマス法によるアシルカルニチン測定値の安定性の検討, 第38回日本マス・スクリーニング学術集会, 2011年10月29日, 福井県福井市 AOSSA
- ⑩ 長谷川有紀, 高橋知男, 佐野葉子, 中田節子, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレン・ジャミヤン, 長沼邦明, 山口清次: 軽度の多呼吸を契機にGC/MSとタンデムマス・スクリーニングで診断された3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症の新生児例, 第38回日本マス・スクリーニング学術集会, 2011年10月29日, 福井県福井市 AOSSA
- ⑪ 山口清次, 李紅, Jamiyan Purevusren, 古居みどり, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 深尾敏幸, 福田誠司: タンデムマスと培養細胞を用いるin vitro probe assayの応用 ベザフィブレードのミトコンドリアβ酸化異常症に対する効果の評価, 第36回日本医用マススペクトル学会, 2011年9月15日, 大阪府吹田市 ホテル阪急エキスポパーク
- ⑫ 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 他: 島根県における自治体主導のタンデムマス・スクリーニング, 第62回中国四国小児科学会/第19回中国・四国小児保健学会 合同学会, 2010年10月23日, 広島県広島市 アステールプラザ
- ⑬ 虫本雄一, 長谷川有紀, 小林弘典, プレブスレン・ジャミヤン, 山口清次: グルタル酸血症1型日本人症例の発症形態と臨床像のまとめ, 第52回日本先天代謝異常学会, 2010年10月22日, 大阪府大阪市 大阪国際会議場
- ⑭ Yuichi Mushimoto, Yuki Hasegawa, Hironori Kobayashi, Hong Li, Jamiyan Purevusren, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi: Clinical and genetic investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type1, Society of the study of inborn errors of metabolism (SSIEM) : annual symposium Istanbul 2010

年8月31日, The Istanbul Convention and Exhibition Center, Istanbul, Turkey

- ⑮ 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, プレブスレン ジャミヤン, 山口清次: 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた簡便な脂肪酸代謝異常症の酵素活性評価, 第113回日本小児科学会学術集会, 2010年4月23日, 岩手県盛岡市 盛岡市民文化ホール
- ⑯ 内田由里, 長谷川有紀, 虫本雄一, 高橋知男, 小林弘典, 山口清次: インフルエンザ脳症と代謝異常症の関連について, 第85回山陰小児科学会, 2010年4月4日, 島根県松江市 松江テルサ

〔図書〕(計7件)

- ① 虫本雄一: 診断と治療社, ビタミン<sub>12</sub>反応性メチルマロン酸血症(有機酸代謝異常症ハンドブック), 2011, 52
- ② 虫本雄一: 診断と治療社, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸血症(有機酸代謝異常症ハンドブック), 2011, 66-67
- ③ 虫本雄一: 診断と治療社, グルタル酸血症Ⅰ型(有機酸代謝異常症ハンドブック), 2011, 70-71
- ④ 虫本雄一: 診断と治療社, グルタル酸血症Ⅱ型(有機酸代謝異常症ハンドブック), 2011, 72-73
- ⑤ 虫本雄一: 診断と治療社, メバロン酸血症(有機酸代謝異常症ハンドブック), 2011, 82-83
- ⑥ 虫本雄一, 山口清次: 診断と治療社, シルビウス溝拡大、錐体外路症状、MRI 線条体異常、大脳皮質萎縮(先天代謝異常症 Diagnosis at a Glance), 2011, 107-108
- ⑦ 虫本雄一, 山口清次: 中山書店, 代謝性アシドーシス(見逃せない先天代謝異常症小児科臨床ピクシス), 2010, 11-13

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

虫本 雄一 (MUSHIMOTO YUICHI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 90467712

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし