

症例 13年間ジクロロ酢酸ナトリウム療法を続けた G291R 変異を有する ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症の 1 女児例

内藤 悦雄^{1),2)} 島川 清司¹⁾ 西村 美緒¹⁾

- 1) 徳島赤十字ひのみね総合療育センター 小児科
- 2) 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部
発生発達医学講座小児医学分野

要 旨

13年間ジクロロ酢酸ナトリウム (DCA) 療法を続けたピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) 欠損症の 1 女児例を経験した。遺伝子解析では E1 α サブユニット遺伝子の第291番目のグリシンからアルギニンへの変異 (G291R) を見いだしたので、遺伝子診断することができた。

生後11カ月時に高乳酸血症を伴った West 症候群を発症した。高乳酸血症の治療薬である DCA の投与により速やかな乳酸の低下をきたして、シリーズ発作が消失し、痙攣のコントロールができた。その後も DCA の継続投与により、臨床症状は安定した。

13歳時の肺炎を契機に人工呼吸器管理となり、気管切開も施行した。その後も時々肺炎に罹患しているが、臨床的には安定している。13年間の DCA 療法により血中乳酸値は低下した状態であり、DCA の副作用も認めていない。長期間 DCA 療法を継続しえた PDHC 欠損症例の臨床像は非常に貴重なので報告した。

キーワード：先天性高乳酸血症，ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症，遺伝子解析，E1 α サブユニット遺伝子変異，ジクロロ酢酸ナトリウム

はじめに

先天性高乳酸血症は種々の病因により生じるが、ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) は嫌氣的解糖系によりブドウ糖から産生されたピルビン酸をアセチル CoA に変換して TCA サイクルに送り込むので、エネルギー産生系においては非常に重要な酵素複合体である^{1),2)}。

この酵素複合体の機能障害によりミトコンドリア内での ATP 産生が低下して、組織がエネルギー不足に陥る。さらに過剰になったピルビン酸から生じた乳酸が蓄積して、乳酸アシドーシスが生じる。特にエネルギー消費量が多い中枢神経系と筋組織におけるエネルギー不足と乳酸アシドーシスによる細胞障害が本症の主病態である^{1),2)}。

本症の臨床像はおおまかに 3 群に大別される^{1),2)}。第 1 群は新生児期や乳児期早期に多呼吸、けいれん、意識障害、嘔吐などで発症し、重篤な乳酸アシドーシ

スを伴い、乳児期に死亡する症例であり、第 2 群は精神運動発達遅延、けいれん、筋緊張低下などの症状と高乳酸血症で乳幼児期に発見される症例である。第 3 群は軽度の筋緊張低下や失調と高乳酸血症で乳幼児期から学童期にかけて感染を契機に発見される。このタイプは男児に多く見られ、ビタミン B₁ に反応する症例も多い³⁾⁻⁷⁾。また、PDHC 欠損症の女児例では West 症候群を合併する頻度が高いことも報告されている⁸⁾。病因遺伝子が判明した PDHC 欠損症児の中では E1 α サブユニット遺伝子変異が大部分を占めており、これまでに約130例の変異が報告されている⁹⁾。

本症の治療としては乳酸の蓄積防止とエネルギー産生障害の改善を目的として、低炭水化物高脂肪食事療法や PDHC の活性化剤である DCA や PDHC の補酵素であるビタミン B₁ の大量投与などが行われている¹⁰⁾⁻¹³⁾。

症 例

乳幼児期：在胎40週5日に児頭骨盤不均衡のため帝王切開にて出生した。出生体重4110g, Apgar score 10点であった。生後2日目より哺乳力低下を認め、頭部CTおよびエコーにて頭蓋内出血、脳室拡大を指摘され生後10日目に徳島大学病院小児科に入院した。胎内感染症が疑われたため、各種検査を行うも病因は特定できずに臨床症状が安定したので、生後1ヵ月で退院した。その後外来で経過観察していたが、生後10ヵ月頃からの痙攣発作がシリーズ形成するようになり、脳波所見でも hypsarrhythmia が認められたので、生後11ヵ月時に West 症候群と診断された。治療のため再び徳島大学病院小児科に入院したが、この入院時の体重：9130g (8760)、身長：70cm (73.1)、胸囲：47cm (44.9)、頭囲：38cm (44.8) (-4.2SD) であり、明らかな小頭症が見られた。West 症候群の治療として

ビタミンB₆投与を開始した。投与量を20mg/kg/日に増量したところ発作は減少したが、肝機能障害が出現してきたので減量した。また、血中および髄液中の乳酸と血清アラニンの高値を認め、乳酸がさらに増加する危険性のために、ACTH を使用せずにバルプロ酸ナトリウムの投与を行なった¹⁰⁾。投与量を35mg/kg/日まで徐々に増量したが、発作およびシリーズ形成がさらに増加した。血中および髄液中乳酸の高値に対してはビタミンB₁を投与していたが、乳酸値は低下しなかった。そこで種々の高乳酸血症の治療薬として使用されているジクロロ酢酸ナトリウム (DCA) を両親の承諾を得た上で徳島大学方式^{10),11)}にて投与した。表1に示したように血中および髄液中乳酸・ピルビン酸値は速やかに低下した。さらに脳波所見の改善も得られ、シリーズ形成およびけいれん発作も消失した。

学童期：その後も DCA250mg/日とビタミンB₁10mg/日の継続投与によりけいれん発作のコントロールができていた。6歳の小学校入学時より当センターに入園となった。入園時の血液検査(表2)と6歳以降の乳酸・ピルビン酸値と肝機能検査値の変動(表3)を示した。その後も血中乳酸値は低下した状態が続いていた。臨床経過も安定していたが、13歳時に肺炎を契機として人工呼吸器管理となり、抜管困難のために気管切開を施行した。その後人工呼吸器から離脱ができて、呼吸状態の良い時には養護学校に登校できたり、呼吸状態の悪い時には人工呼吸器を再装着している。13年間も継続投与を行ってきたDCAの血中濃度は7.0~9.3μg/mlと安全域内である。DCAの副作用の早期発見の目安になる血液検査(AST,ALT,CK)の上昇もみられていない(表3)。

表1 DCA投与開始前後の乳酸・ピルビン酸値の変動(1歳時)

| 1993年 月/日 | 5/27 | 6/25 | 7/12 | 7/14 | 7/15 | 7/19 | 7/30 | 8/12 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 血中乳酸(mg/dl) | 34.0 | 69.0 | 65.1 | | 14.7 | 17.7 | 10.6 | 13.9 |
| 血中ピルビン酸(mg/dl) | 3.1 | 5.0 | | | | 1.1 | | 0.47 |
| 髄液中乳酸(mg/dl) | 42.5 | | | | | | 17.0 | |
| 髄液中ピルビン(mg/dl) | 3.9 | | | | | | 1.1 | |
| シリーズ数/日 | 4 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| けいれん発作数/日 | 80 | 200 | 40 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DCA投与量(mg/日) | - | - | - | 1000 | 750 | 500 | 500 | 250 |

表2 6歳時の血液検査

| | | |
|------------------------------|---------------|-------------------|
| WBC 9120 | AST 20 IU/L | BUN 12 mg/dl |
| RBC 487×10 ⁴ /ul | ALT 29 IU/L | CRNN 0.3 mg/dl |
| Hb 13.2 g/dl | ALP 290 IU/L | 血中乳酸 21.6 mg/dl |
| Plt 34.4×10 ⁴ /ul | CRP 0.2 mg/dl | 血中ピルビン酸 2.2 mg/dl |

表3 6歳以降の血液検査の経過

| 年齢 | 6 | 8 | 9 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--------------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| 乳酸(mg/dl) | 21.6 | 21.0 | 22.0 | 25.4 | 13.1 | 9.4 | 20 |
| ピルビン酸(mg/dl) | 2.2 | 2.0 | 1.8 | 2.4 | 1.4 | 1.0 | 2.7 |
| AST(U/L) | 20 | 22 | 24 | 18 | 18 | 14 | 17 |
| ALT(U/L) | 29 | 31 | 34 | 26 | 21 | 18 | 23 |
| CK(U/L) | - | - | - | - | 166 | 63 | 50 |
| DCA投与量(mg/日) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |

方 法

酵素活性の測定法

リンパ球培養株の樹立はすでに報告した方法¹⁵⁾により、EBウイルスに感染させて株化した。研究にはRPMI-1640、15%FBSで継代培養した細胞を用いた。培養リンパ球のPDHC活性は内藤ら¹⁵⁾

の方法により測定した。培養リンパ球のミトコンドリア電子伝達系酵素活性は内藤ら¹⁶⁾の方法により複合体 I+III 活性, 複合体 II+III 活性, 複合体 IV 活性を測定した。

血中 DCA 濃度の測定

血中 DCA 濃度は HPLC を用いた榊原ら¹⁷⁾の方法により測定した。

E1 α サブユニットの遺伝子解析法

培養細胞からゲノム DNA を抽出して, 既に報告した方法¹⁸⁾により, 11個の全エクソンの塩基配列を決定した。

結 果

酵素活性

PDHC 活性: 培養リンパ球の PDHC 活性は高濃度チアミンピロリン酸 (TPP) 存在下および低濃度 TPP 存在下ともに正常であった (表 4)。

表 4 培養リンパ球の酵素活性

| | ピルビン酸脱水素酵素複合体活性 (nmol/min/mg protein) | |
|------|--|-----------------|
| | 1 \times 10 ⁻⁴ mMTPP | 0.4mMTPP |
| 患児 | 3.42 | 4.08 |
| 正常対照 | 3.90 \pm 0.34 | 4.07 \pm 0.68 |

電子伝達系酵素活性: 培養リンパ球のミトコンドリア電子伝達系酵素活性の複合体 I+III 活性, 複合体 II+III 活性, 複合体 IV 活性は全て正常であったので, 電子伝達系酵素 (I~IV) 活性は正常と考えられた (表 5)。

表 5 培養リンパ球の酵素活性

| | ミトコンドリア電子伝達系酵素活性 (nmol/min/mg protein) | | |
|------|---|----------------|-----------------|
| | 複合体 I+III | 複合体 II+III | 複合体 IV |
| 患児 | 32.7 | 13.0 | 133.3 |
| 正常対照 | 36.6 \pm 10.2 | 15.5 \pm 6.1 | 93.8 \pm 15.8 |

E1 α サブユニットの遺伝子解析: 本患児の E1 α サブユニットのエクソン 9 の塩基番号 871 番目の G \rightarrow A への変異により, 291 番目のアミノ酸の半分がグリシン (GGA) からアルギニン (AGA) に置換していた (G291R) (G はグリシンを R はアルギニンを表わ

す) (図 1)。この変異を確認するために, サブクローニング法を行い, 本患児のエクソン 9 にはこの変異のクローン (塩基番号 871 番目が A) と正常のクローン (塩基番号 871 番目が G) の 2 種類が認められた (図 2)。

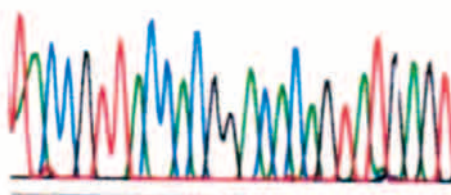
考 案

PDHC 欠損症の臨床像にはかなりの幅がある。重症例では新生児期や乳児期早期に乳酸アシドーシスなどで死亡し, 軽症例では幼児期から学童期まで正常に発達して感染を契機に発症する症例もみられる。著者はこれまでに約 100 例の PDHC 欠損症を診断してきたが, PDHC はピルビン酸からアセチル CoA への反応

A 正常対照の塩基配列

287 288 289 290 291 292 293 294 295
TAC CGT TAC CAC GGA CAC AGT ATG AGT

TACCGT TACCACGGACACAGTATCAGT
100 110 120



B 患児の塩基配列

287 288 289 290 291 292 293 294 295
TAC CGT TAC CAC A/GGA CAC AGT ATG AGT

TACCGT TACCACNGACACAGTATGAGT
100 110 120

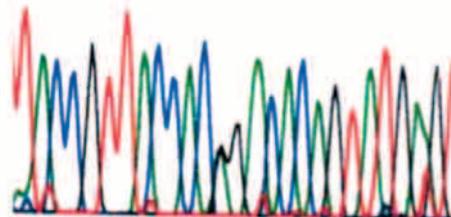
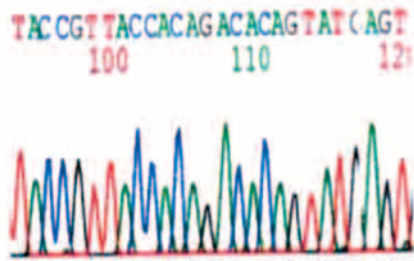


図 1 E1 α サブユニット (エクソン 9) の塩基配列 (上段の数字はアミノ酸番号を示す) (N: 2 種類の塩基の存在を示す)

A 患児の変異のクローンの塩基配列

287 288 289 290 291 292 293 294 295
TAC CGT TAC CAC AGA CAC AGT ATG AGT



B 患児の正常のクローンの塩基配列

287 288 289 290 291 292 293 294 295
TAC CGT TAC CAC GGA CAC AGT ATG AGT

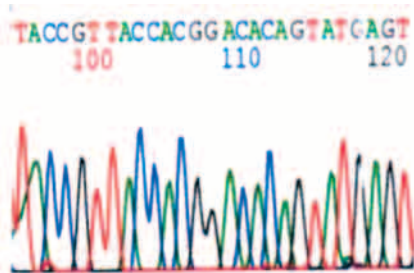


図2 患児のE1 α サブユニット(エクソン9)の塩基配列
(上段の数字はアミノ酸番号を示す)
(サブクローニング法)

を行うので、この酵素欠損症の特徴はピルビン酸の著増である。ピルビン酸の増加に伴い乳酸とアラニンも連動して増加し、乳酸/ピルビン酸 (L/P) 比は10前後と正常である。

今回報告した女兒例も DCA 投与前にはピルビン酸と乳酸は著増しており、L/P 比は正常(10.8)であり、血清アラニンも増加していた。これらの検査結果と臨床症状より本患児の病因は PDHC 欠損症の可能性が高いと考えられたので、培養リンパ球の PDHC 活性を測定したが、この酵素活性は正常であった。しかし PDHC 欠損症の病因で最も多く報告されている E1 α サブユニットは X 染色体上に存在する遺伝子なので、E1 α 異常症の女兒例では変異の X 染色体と正常の X 染色体の2種類を有している。しかし X 染色体の著しい不活化の偏りにより、正常の E1 α を有する X 染色体が主に発現した組織では、PDHC 活性が正

常値を示す症例も報告されている¹⁹⁾。したがって、本患児も PDHC 欠損症が強く疑われたため、E1 α サブユニットの遺伝子解析を行なった。この結果、本患児では G291R 変異を有する E1 α と正常の E1 α を有していることが判明した。この変異はアミノ酸置換であるが以下の理由で、本患児の高乳酸血症の病因と考えられた。(1)本患児の PDHC 活性は正常であったが、病因遺伝子を有している可能性があるとするれば、X 染色体上に存在する E1 α サブユニットである。その他のサブユニットは全て常染色体上にあるので、病因遺伝子にはなり得ない。(2) E1 α サブユニットのエクソン内の全塩基配列を決定したが、この変異以外は正常であった。この291番目のアミノ酸はラット、マウス、ブタでもグリシンであり、種を越えて保存されていたので、このアミノ酸は重要であると考えられた。

(3)本患児の変異は両親の E1 α サブユニットのエクソン9には認められなかったので、この変異は突然変異により生じたものであった。以上のように本患児の G291R 変異の検出により確定診断ができた。また本患児の培養リンパ球の PDHC 活性が正常であったのは X 染色体の不活化の著しい偏りにより正常の E1 α を有する X 染色体が主に発現したためと考えられた。

本患児の中樞神経の細胞障害を来したメカニズムとしては次の事が考えられる。PDHC 活性が低下した細胞では、細胞内に大量の乳酸が産生され、ATP の産生低下をきたすが、PDHC 活性が正常な細胞ではこれらの乳酸を取り込んで十分量の ATP 産生がおこなわれている。しかしこれらの ATP は PDHC 活性が低下した細胞には輸送されないで、これらの細胞では ATP は欠乏状態になる。このように E1 α 異常症の女兒例の脳神経細胞では乳酸と ATP の分布が不均一状態になっていると推論され、このために脳神経細胞の機能障害をきたし、West 症候群の発症に関与していた可能性があると考えられた。

種々の先天性高乳酸血症の治療薬として投与されている DCA は乳酸・ピルビン酸代謝に直接作用している。このメカニズムとしては PDHC は生体内では活性型と不活性型とで存在するが、DCA の作用は不活性型に変換させる PDH キナーゼの作用を特異的に阻害することによって、結果として PDHC を活性化させる。すなわち生体内では DCA が PDHC を最大限に活性化させることにより乳酸・ピルビン酸を著明に低下させる。したがって、長期間の DCA 有効症例は

PDHC 活性が正常なミトコンドリア DNA 異常症では数多く報告されているが^{10),11)}, 長期間 DCA 療法を継続した PDHC 欠損症例はほとんど報告されていない。しかし本症例のようにある程度の PDHC 活性が期待できるような症例では DCA の副作用も認められていないので, DCA 投与を行ってみるべきである。

おわりに

13年間 DCA 療法を続けた G291R 変異を有する PDHC 欠損症の 1 女児例を報告した。高乳酸血症を伴って West 症候群を発症した患児に高乳酸血症の治療薬である DCA の投与により, シリーズ発作が消失し, けいれんがコントロールできた。長期間の DCA 療法により血中乳酸値は低下した状態であり, DCA の副作用も認めていない。

謝辞: 患児が呼吸不全状態の際に, 人工呼吸管理や気管切開術を施行して頂いた徳島赤十字病院小児科と耳鼻科の緒先生方に深謝致します。

文 献

- 1) 内藤悦雄: ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症. ミトコンドリアとミトコンドリア病 日本臨床増刊 60: 751-754, 2002
- 2) Robinson BH, Lactic acidemia (disorders of pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase), in: Scriver CR, Beaudet AL (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, 8th edn., McGraw-Hill, New York, 2275-2295, 2001
- 3) Naito E, Ito M, Takeda E et al: Molecular analysis of abnormal pyruvate dehydrogenase in a patient with thiamine-responsive congenital lactic acidemia. *Pediatr Res* 36: 340-346, 1994
- 4) Naito E, Ito M, Yokota I et al: Biochemical and molecular analysis of an X-linked case of Leigh syndrome associated with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 20: 539-548, 1997
- 5) Naito E, Ito M, Yokota I et al: Thiamine-responsive lactic acidemia: role of pyruvate dehydrogenase complex. *Eur J Pediatr* 157: 648-652, 1998
- 6) Naito E, Ito M, Yokota I et al: Diagnosis and molecular analysis of three male patients with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *J Neurol Sci* 201: 33-37, 2002
- 7) Naito E, Ito M, Yokota I et al: Thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase deficiency in two patients caused by a point mutation (F205L and L216F) within the thiamine pyrophosphate binding region. *Biochim Biophys Acta* 1588: 79-84, 2002
- 8) Naito E, Ito M, Yokota I et al: Gender-specific occurrence of West syndrome in patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Neuropediatrics* 32: 295-8, 2001
- 9) Lissens W, De Meirleir L, Naito E et al: Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) α subunit gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum Mutat* 15: 209-219, 2000
- 10) 内藤悦雄, 伊藤道徳: 先天性高乳酸血症の治療: ジクロロ酢酸ナトリウム療法. 日本先天代謝異常学会雑誌 13: 305-310, 1997
- 11) 内藤悦雄, 黒田泰弘: ミトコンドリア異常症に対する薬物法と治療法とその効果. 小児科 40: 1055-1060, 1999
- 12) Naito E, Ito M, Yokota I et al: Concomitant administration of sodium dichloroacetate and thiamine in West syndrome caused by thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *J Neurol Sci* 171: 56-59, 1999
- 13) 内藤悦雄, 黒田泰弘: ジクロロ酢酸ナトリウム療法. 医学のあゆみ 199: 273-274, 2001
- 14) 宮崎雅仁, 橋本俊顕, 村川和義, 他: 点頭てんかんにおける中枢神経系での乳酸・ピルビン酸代謝に関する検討. 脳と発達 24: 85-88, 1992
- 15) 内藤悦雄, 伊藤道徳, 横田一郎, 他: 見逃されやすいビタミン B₁ 反応性ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の酵素診断法に関する研究. 日本小児科学会雑誌 99: 915-919, 1995
- 16) 内藤悦雄, 伊藤道徳, 横田一郎, 他: 培養リンパ

- 球を用いたミトコンドリア電子伝達系酵素異常症の酵素診断法に関する研究. 日本小児科学会雑誌 98:1693-1698, 1994
- 17) 榑原洋一, 中村 元, 床枝康伸, 他: ジクロロ酢酸による先天性ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) 欠損症の治療—ジクロロ酢酸の血中動態について— 日本小児科学会雑誌 91:3656-3661, 1987
- 18) Matsuda J, Ito M, Naito E et al: DNA diagnosis of pyruvate dehydrogenase deficiency in female patients with congenital lactic acidemia. J Inher Metab Dis 18:534-546, 1995
- 19) Dahl HHM: Pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency: male and female differ yet again. Am J Hum Genet 56:553-557, 1995

A Female Patient with Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency Caused by a Point Mutation of G291R Treated with Administration of Sodium Dichloroacetate for 13 Years

Etsuo NAITO^{1),2)}, Seishi SHIMAKAWA¹⁾, Mio NISHIMURA¹⁾

1) Division of Pediatrics, Tokushima Red Cross Hinomine Medical and Rehabilitation Center

2) Department of Pediatrics, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima, Graduate School

A female patient with pyruvate dehydrogenase complex deficiency caused by a point mutation of G291R has been treated with administration of sodium dichloroacetate (DCA) for 13 years.

At 11 months, infantile spasms occurred in association with elevated blood and CSF lactate concentrations; these symptoms disappeared when lactate concentrations were lowered by treatment with DCA. After then, DCA therapy was continued, and her condition remained relatively stable. At 13 years old, she developed pneumonia and generalized muscle weakness, and was placed on mechanical ventilation and practiced in tracheostomy. She has continued oral DCA treatment till now, and she shows stable condition without elevated blood lactate and any side effects of DCA.

Key words: congenital lactic acidemia, pyruvate dehydrogenase complex deficiency, genetic analysis, mutation in the E1 α subunit, sodium dichloroacetate

Tokushima Red Cross Hospital Medical Journal 12:59-64, 2007
