

## Mass Screening of Carnitine Palmitoyltransferase Deficiency ; Its Significance as an Early Diagnosis of Sport-Related Hematuria and Rhabdomyolysis

Hidetoshi KANEOKA<sup>1)2)</sup>, Tetsuhiko YASUNO<sup>2)</sup>, Ayaka MORIGUCHI<sup>2)</sup>,  
Sayaka HIGASHI<sup>2)3)</sup>, Kaoru KOJIMA<sup>2)</sup>, Tomoko TOKUYASU<sup>1)2)</sup>,  
Mamoru TANAKA<sup>3)</sup>, Akira KIYONAGA<sup>3)</sup>, Yoshito MUKAINO<sup>3)</sup>  
and Takao SAITO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> School of Nursing, Fukuoka University

<sup>2)</sup> Division of Nephrology and Rheumatology, Department of Internal Medicine,  
School of Medicine

<sup>3)</sup> School of Sport Sciences

**Abstract :** Sport hematuria is recognized as a transient and benign disorder. However, reports have been accumulated that hard physical trainings, exhausting sports, military exercises, and severe infections resulted in rhabdomyolysis and, if not appropriately managed, in acute renal failure. The reports also demonstrated those patients deficient in carnitine palmitoyltransferase (CPT) could not generate sufficient amount of energy through  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids, which resulted in the repetitive non-traumatic rhabdomyolysis. In this study, we tried to establish methods to genetically screen out potential patients with CPT deficiency from athlete students quickly and easily. Three hundred and sixty-eight sport students were enrolled in this study with informed consents. Before and after wearing summer training camps, they were subjected to a dipstick urinalysis and urinary secretions of protein, creatinine, and myoglobin. Twenty-eight students secreted high amount of myoglobin. Four out of the 28 agreed with the genetic diagnosis of CPT deficiency. Eight pairs of PCR primers were designed to cover the coding region. Each PCR-amplified gene product was subjected to a direct DNA sequencing. No students carried any mutation related to the disorder.

**Key words :** Sport hematuria, Rhabdomyolysis, Carnitine palmitoyltransferase deficiency, Denaturing high performance liquid chromatography, Direct DNA sequencing, SNPs

### スポーツ血尿に潜在する横紋筋融解症の遺伝要因と そのマススクリーニング

兼岡 秀俊 <sup>1)2)</sup>	安野 哲彦 <sup>2)</sup>	森口 彩夏 <sup>2)</sup>
東 さやか <sup>2)3)</sup>	小島 薫 <sup>2)</sup>	徳安 智子 <sup>1)2)</sup>
田中 守 <sup>3)</sup>	清永 明 <sup>3)</sup>	向野 義人 <sup>3)</sup>
	斉藤 喬雄 <sup>2)</sup>	

別刷請求先 : 〒814-0001 福岡県福岡市城南区七隈7丁目45-1 福岡大学医学部看護学科 兼岡秀俊

TEL : 092-801-1011, 内線4380 FAX : 092-865-5117 e-mail : kaneokah@fukuoka-u.ac.jp

研究費 : 本研究は, 平成14年度~16年度, 福岡大学研究推進部研究チーム理工学・生命科学分野「急性腎不全の遺伝子研究」(代表者, 兼岡秀俊), 平成17年度~19年度, 同「急性腎不全の遺伝要因研究」(代表者, 兼岡秀俊), および平成18年度~19年度, 日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究C)「横紋筋融解と急性腎不全を来す先天性代謝疾患の迅速な遺伝子診断の確立と治療への応用」(研究代表者, 兼岡秀俊)の補助を受けた。

- 1) 福岡大学医学部看護学科
- 2) 医学部内科学第四 (現医学部医学科腎臓・膠原病内科学)
- 3) スポーツ科学部

要旨：一過性で後遺症を残すことなく改善すると考えられてきたスポーツ血尿に、長鎖脂肪酸 酸化に関与する酵素 carnitine palmitoyltransferase (CPT) の構造異常に基づく横紋筋融解症が潜在し、腎不全などの急性臓器不全に至る危険性が指摘されている。我々は、遺伝子解析を基にした CPT 異常症の迅速なマスキングと診断確定法を樹立することを目的として、本研究を開始した。368名のスポーツ学生生徒の協力を得て、激しい運動時の尿異常の出現についてマスキングを行った。激しい運動後に尿異常 (尿タンパクあるいは尿潜血陽性、尿中赤血球あるいは尿ミオグロビン高値) の見られた28名の対象者の中で、改めてインフォームド・コンセントを得て4名の CPT 遺伝子の解析を行った。本研究では遺伝子解析法として、新たに CPT 遺伝子の PCR 増幅遺伝子 DNA 配列直接決定法を開発した。即ち CPT 構造遺伝子を8区画に分け PCR を行い、その DNA 配列を直接決定することで、遺伝子クローニングを行うことなく CPT 遺伝子の全配列を決定した。この方法は、期待通り、短時間での正確な遺伝子診断に寄与した。対象者すべてが、既に報告のある single nucleotide polymorphisms を含む正常遺伝子型であり、変異遺伝子は検出されなかった。

キーワード：スポーツ血尿,横紋筋融解症,carnitine palmitoyltransferase (CPT) 異常症,denaturing high performance liquid chromatography,PCR 増幅遺伝子 DNA 配列直接決定法, single nucleotide polymorphisms (SNPs)

## はじめに

激しい運動の後に赤色尿を訴えるスポーツ選手は少ない。これら運動後尿異常は一般的には病的でなく、不可逆的な腎機能障害に陥ることのないスポーツ血尿として知られている。そのためスポーツ選手の中には、このような赤色尿をスティックなトレーニングの指標と捉える風潮も見られる。一方、運動時の血管内溶血によるヘモグロビン尿や横紋筋挫滅によるミオグロビン尿も、肉眼的血尿と考えている可能性も高い<sup>1)~4)</sup>。

解糖系によって供給されるエネルギーのみでは不足する激しい運動時の必要エネルギーは、ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸 酸化によって供給される。この酸化によるエネルギー供給が充分でない時に、しばしば横紋筋融解をきたす<sup>5)</sup>。近年、この長鎖脂肪酸 酸化に関わる酵素の先天異常が報告され、成人型 (筋型) carnitine palmitoyltransferase (CPT) 異常症では、激しい運動や重篤な感染症などに高度の横紋筋融解を来とし、時に急性腎不全に至り、適切な治療を得られない場合には、生命が脅かされることが明らかとなった<sup>6)~11)</sup>。この CPT 異常症の診断は、急性期の血清中のアシルカルニチンのタンデム質量分析や皮膚線維芽細胞の酵素活性の生化学的測定を行うことにより細胞生化学的に診断され、あるいはプラスミドを用いた遺伝子クローニングによる全遺伝子配列の決定による遺伝子診断によって、ともに週月を要し急性臓器不全への早急で適切

な治療の時機を失することが多い。

今回我々は、スポーツ学生生徒を対象とし、激しい運動の前後で尿検査を行い、前後の尿所見に差のあるものを対象に、CPT 遺伝子の解析を行った。当初、対象者が多数あることを予想し、denaturing high performance liquid chromatographyを応用した CPT 遺伝子変異のマスキング法を確立した。ただし結果として遺伝子解析の対象者は少数であったため、対象者全員について、スクリーニング法でなく PCR 増幅遺伝子 DNA 配列直接決定法により CPT 構造遺伝子の全配列を決定した。マスキング法については稿を改めて報告をする。

## 対象と方法

### 1. 対象

本研究は、福岡大学医に関する倫理委員会の承認を得た (受付番号171, 課題名「横紋筋融解による急性腎不全の遺伝解析と保因者のマスキング」, 平成15年5月14日承認)。対象とした大学は地域の総合大学であり、スポーツ科学部を拠点にスポーツ科学およびスポーツ活動が大変盛んで、全国大会レベル、時に国際大会レベルの学生が体育会スポーツ各部で活躍している。対象高等学校は同大学附属高等学校で、やはり全国大会レベルのスポーツ活動が盛んである。インフォームドコンセントを得て、368名のスポーツ学生生徒 (男子高校生274名, 男子大学生47名, 女子大学生47名) の協力を得

た ( 表 1 ) . 運動負荷は主に年間で最も負荷量の大きい夏期合宿とし, その開始前を負荷前, 終了時夕方を負荷後とし, それぞれ採尿を行った. 運動負荷量については各スポーツ活動に一任し, 均質化等量化は行っていない.

2. 一般尿定性試験, 尿生化学検査

尿定性試験は試験紙法 ( マルチスティック, パイエルメディカル社, 東京 ) で行い, 尿蛋白 ( + ) 以上, あるいは尿潜血 ( ± ) 以上の検体については, 直ちに尿沈渣検査を行った. 大学生については全例, 高校生については一般尿定性試験で上記尿沈渣試験の対象となった例について, 尿蛋白, 尿中ミオグロビン, 尿クレアチニン濃度を測定した ( シオノギバイオメディカル社, 大阪 ) . 尿蛋白 / 尿クレアチニン値, および尿ミオグロビン / 尿クレアチニン値を計算して標準化し, 尿蛋白排泄量, 尿中ミオグロビン排泄量の推定値とした.

3. CPT 特異的ポリメラーゼ連鎖反応法 ( polymerase chain reaction ; PCR )

CPT 特異的 PCR は, 我々が独自に開発した<sup>11)</sup>. すでに別稿に詳しく記載したが, CPT 構造遺伝子を重なりをもって 8 分画に分け, それぞれにプライマーを設定して PCR を行った. PCR 反応は, 熱変性反応は 94 °C, 1 分, 焼き戻し反応は 60 °C, 1 分, 伸延反応は 72 °C, 1 分で, 30 サイクル行い, 完了反応は 60 °C, 10 分, 1 サイクル行った. 必要に応じ, dimethylsulfoxide を添加した. 1 % agarose gel 上で, 適切な長さの PCR 増幅遺伝子産物を確認した<sup>12)</sup>.

4. PCR 増幅遺伝子 DNA 配列直接決定法 ( direct DNA sequencing of PCR-amplified gene products )

8 分画に分けた CPT 特異的 PCR 増幅遺伝子産物を鋳型とし, 該当する PCR プライマーをシーケンシングプライマー, BigDye Terminator v3.1 cycle se-

表 1 参加学生生徒の内訳

	性別	対象者数 ( 人 )	前後検尿受検者数 ( 人 )	尿蛋白増加者数 - / ± から + 以上へ	尿潜血増加者数 - から ± 以上へ	Mb/Cr ( ng/gCr ) 0.2以上 ( 人 )
大学附属高等学校						
	サッカー	男 40	39	10 ( 25.6% )	10 ( 25.6% )	3 ( 7.5% )
	硬式野球	男 33	32	3 ( 9.4% )	3 ( 9.4% )	0
	硬式テニス	男 27	27	5 ( 18.5% )	0	0
	軟式野球	男 26	24	2 ( 8.3% )	1 ( 4.2% )	2 ( 7.7% )
	バスケットボール	男 23	23	9 ( 39.1% )	8 ( 34.8% )	0
	弓道	男 23	23	3 ( 13.0% )	1 ( 4.3% )	0
	駅伝	男 18	17	3 ( 17.6% )	4 ( 23.5% )	4 ( 22.2% )
	剣道	男 14	14	2 ( 14.3% )	4 ( 28.6% )	1 ( 7.1% )
	軟式テニス	男 13	6	1 ( 16.7% )	1 ( 16.7% )	0
	バレーボール	男 12	11	4 ( 36.4% )	4 ( 36.4% )	0
	陸上	男 10	10	1 ( 10.0% )	3 ( 30.0% )	6 ( 60.0% )
	柔道	男 10	10	1 ( 10.0% )	0	0
	バドミントン	男 9	9	4 ( 44.4% )	1 ( 11.1% )	0
	水泳	男 5	5	0	1 ( 20.0% )	0
	空手	男 5	4	0	0	0
	卓球	男 4	4	0	1 ( 25.0% )	0
	ゴルフ	男 2	2	0	0	0
小計	男	274	260	48 ( 18.5% )	42 ( 16.2% )	16 ( 5.8% )
大学体育会						
	投擲	男 6	6	2 ( 33.3% )	2 ( 33.3% )	1 ( 16.7% )
		女 3	3	0	1 ( 33.3% )	1 ( 33.3% )
	スピードスケート	男 16	12	6 ( 50.0% )	1 ( 8.3% )	3 ( 18.8% )
		女 2	2	0	0	0
	バスケットボール	女 26	22	5 ( 22.7% )	4 ( 18.2% )	0
大学スポ - ツ科学部						
	一般学生	男 25	24	3 ( 12.5% )	6 ( 25.0% )	3 ( 12.0% )
		女 16	15	4 ( 26.7% )	0	1 ( 6.3% )
小計	男	47	42	11 ( 26.2% )	9 ( 21.4% )	7 ( 14.9% )
	女	47	42	9 ( 21.4% )	5 ( 11.9% )	2 ( 4.3% )
総計		368	344	68 ( 19.8% )	56 ( 16.3% )	25 ( 6.8% )

quencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California) を反応試薬とし、自動 DNA 配列決定装置 (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems – Hitachi 社, 東京) を用いて DNA 配列を決定した<sup>12)</sup>。

5 末端側からと 3 末端側から配列を決定し、同一配列であることを確認した。本法は 2 本鎖 DNA の配列を一度に決定することになるので、single nucleotide polymorphisms (SNPs) や変異遺伝子の存在を検出するが、ハプロタイプ遺伝子型は家系調査を行うことで初めて決定できる。

5. 熱変性ヘテロ二本鎖 DNA 解析法 (denaturing high performance liquid chromatography on PCR-amplified gene products; PCR-DHPLC) ヘテロ接合体遺伝子を PCR で増幅させた場合に産生される heteroduplex を高温で熱変性させ 1 本鎖 DNA としたあと緩徐に温度を下げてゆくと、典型的には homoduplex と heteroduplex が形成される。これらは HPLC 上で異なった移動度を示すため、SNP を含む変異遺伝子の簡便な検出に有用である。装置は、“WAVE” DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, Nebraska) を用いた。

## 6. 統計処理

集団は平均値 ± 標準偏差で表し、群間の比較は対応のある *t*-検定で検定した。p 値が 0.05 以下を統計学的に有意とした。

## 結 果

### 1. 運動負荷前後の尿定性検査

研究に参加した 368 名のスポーツ生徒学生の内、344 名については運動負荷の前後 2 回とも検尿を行った。運動負荷前後で、尿蛋白が (-) あるいは (±) から (+) となったものは 68 名 (19.8%)、尿潜血が (-) から (±) となったものは 56 名 (16.3%) であった (表 1)。この出現頻度は、年齢、性別に大きな差は見られなかったが、サッカー、バスケットボール、バレーボールなど集団球技に多い傾向があるなど、行うスポーツの種類により差が見られた。

運動負荷前に既に、尿定性試験で尿蛋白 (2+) 以上あるいは尿潜血 (2+) 以上のいずれかを認めた 9 名については、直ちに専門医受診を勧めた。

### 2. 運動負荷前後の尿タンパク量

より定量的な評価を行うために、尿蛋白濃度を尿クレアチニン濃度で除し、この補正值を尿蛋白推定量とした。尿蛋白定性試験と尿蛋白 / 尿クレアチニン値には、一定程度の相関が見られた (データ示さず)。運動負荷前後について、尿蛋白、尿中クレアチニン濃度を全て測定し得た 72 名について、尿蛋白濃度 / 尿クレアチニン値を比較した。負荷前は  $0.0282 \pm 0.0423 \text{g/mgCr}$ 、負荷後は  $0.0941 \pm 0.1144 \text{g/mgCr}$  で、有意に負荷後の蛋白尿の増加が認められ、運動負荷による一過性の腎障害が推定された ( $p < 0.0001$ ) (図 1)。

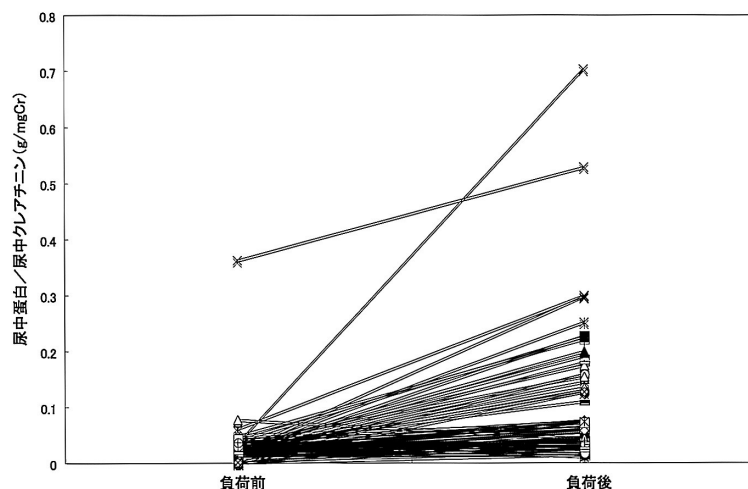


図 1 運動負荷前後の尿蛋白推定量

運動負荷前後の尿蛋白排泄量を推定するために、尿蛋白、尿中クレアチニン濃度を測定し得た 72 名について、尿蛋白濃度 / 尿クレアチニン値を比較した。負荷前は  $0.0282 \pm 0.0423 \text{g/mgCr}$ 、負荷後は  $0.0941 \pm 0.1144 \text{g/mgCr}$  であった ( $p < 0.0001$ )。

3. 尿タンパク量と尿中ミオグロビン量

横紋筋融解の指標の一つである尿中ミオグロビン排泄は、蛋白尿の一部である可能性もあるため、尿中蛋白排泄量と尿中ミオグロビン排泄量の間を調査した ( n = 305 ) . 図 2 に示すように、蛋白尿とミオグロビン尿の分布の間に正の相関が見られた (  $y = 0.1296x + 0.0951$  ) が、相関係数は  $R^2 = 0.0261$  と小さく、統計学的には有意でなかった .

4. 尿異常者の CPT 遺伝子構造

尿中ミオグロビンは、高校生では陸上競技選手、駅伝

選手に、大学生では投擲選手に排泄推定量が多い傾向がうかがえた ( 表 1 ) . 運動負荷前後の尿中ミオグロビン排泄量の分布を図 3 に示した . 正常尿中ミオグロビン排泄量についての詳しい検討はない . 今回の研究では、運動負荷後の分布は 0.2ng/mgCr を境として二峰性を示すことから、仮に正常尿中ミオグロビン排泄量を 0.2ng/mgCr 未満とし、検討し得た 188 名中、それ以上を示す 28 名を横紋筋融解疑いとした . ここで改めて遺伝子解析に関するインフォームドコンセントを得、同意した 4 名について PCR 増幅遺伝子 DNA 配列直接決定法により、CPT 遺伝子の解析を行った . その結果、4

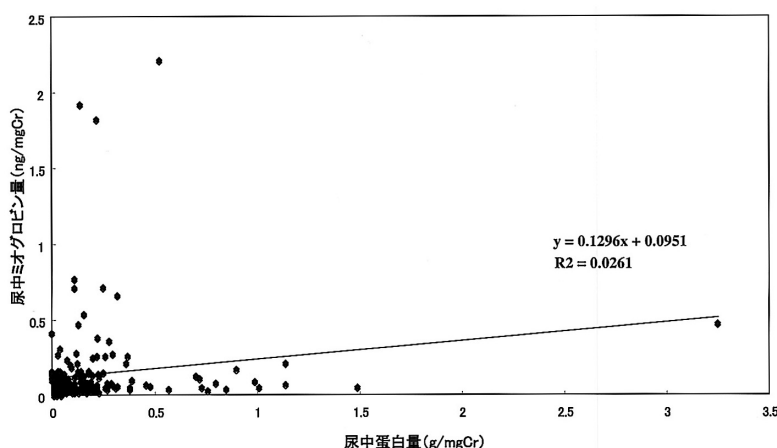


図 2 運動負荷前後の蛋白とミオグロビンの尿中排泄量の推定  
尿中蛋白排泄量と尿中ミオグロビン排泄量を尿中クレアチニン値で補正し検討した ( n = 305 ) . 蛋白尿とミオグロビン尿の間にわずかに正の相関が見られた .  
近似式 :  $y = 0.1296x + 0.0951$  , 相関係数 :  $R^2 = 0.0261$  .

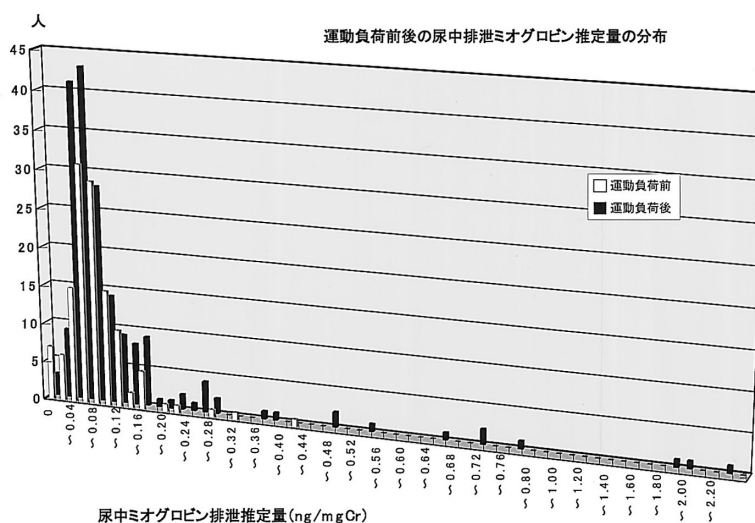


図 3 運動負荷前後のミオグロビン尿中排泄推定量  
尿中ミオグロビン排泄量は、運動負荷により増加した .



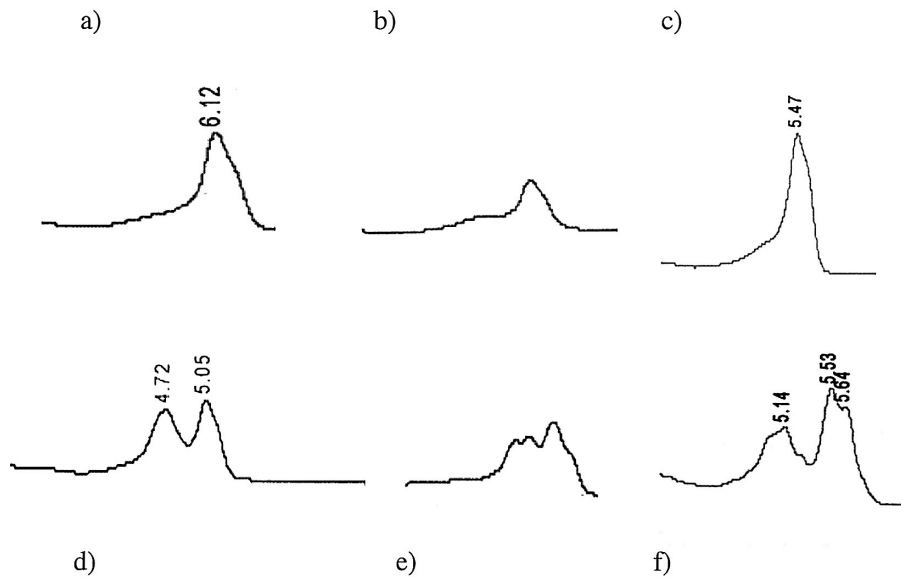


図4 熱変性ヘテロ二本鎖 DNA 解析法による CPT の3個の SNPs の検出

上段は、Phe352/Phe352, Val368/Val368, Met647/Met647 ホモデュプレックスの PCR-DHPLC (図4 a, b, c), 下段は Phe352/Cys352, Val368/Ile368, Met647/Val647 ヘテロデュプレックスの PCR-DHPLC (図4 d, e, f)。

人はいずれも正常遺伝子型であった(データ示さず)。

#### 5. PCR-DHPLC による CPT 遺伝子変異のマススクリーニングの試み

今回は遺伝子解析対象者が少数であったため、マススクリーニングとしてのデータは示せないが、図4に CPT 構造遺伝子の SNPs を示す。上段は、Phe352/Phe352, Val368/Val368, Met647/Met647 の homoduplex の PCR-DHPLC パターン(図4 a, b, c), 下段は Phe352/Cys352, Val368/Ile368, Met647/Val647 の heteroduplex のパターンを示す(図4 d, e, f)。Phenylalanine (TTT) と Cysteine (TGT) は codon 352で、Valine (GTC) と Isoleucine (ATC) は codon 368で、Methionine (ATG) と Valine (GTG) は codon 647で、お互いに SNP である。CPT 構造遺伝子における SNP はこれら3カ所、6変異のみが報告されている。homoduplex と heteroduplex の PCR-HPLC パターンの違いが明らかである。

#### 考 察

激しい運動後の尿異常はよく知られている。その出現は運動の強度と持続時間に比例するとされる。マラソンでの血尿の頻度は、Siegel らは18%と報告したが、多くは50~70%としている<sup>13)</sup>。杉沢と奈良は、100km 市民マラソン前後の尿検査で、完走した23人のランナーの内47.8%に尿潜血陽性を、65.2%にミオグロビン尿を認め

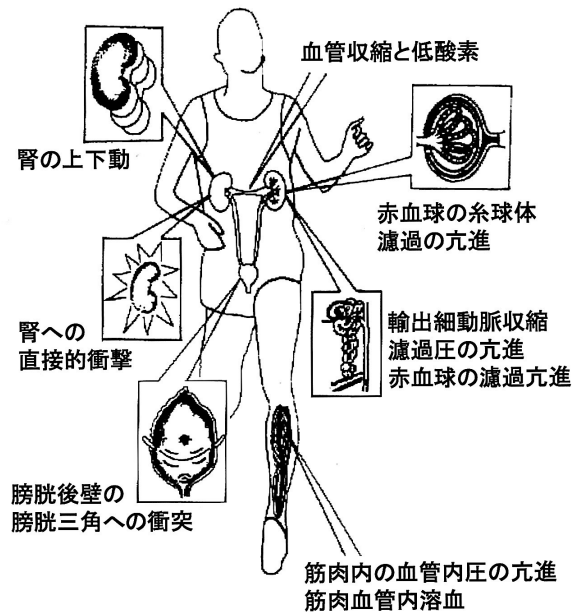


図5 激しい運動後の血尿の機序(文献1より一部改変)

ている<sup>14)</sup>。これら激しいスポーツ時の尿異常は、腎臓の激しい上下動、腎血管の収縮、赤血球の糸球体透過の亢進、糸球体濾過圧の亢進、糸球体細動脈の収縮、糸球体の低酸素、膀胱後壁の膀胱三角への繰り返す衝突あるいは下腿筋肉内血管での溶血と溶筋等が原因とされる(図5)。これらは一過性で腎障害を残さないことから、偽性腎症(pseudonephritis)とされてきた<sup>1)</sup>。ところが、1993年に Berkman らが激しい訓練後の若い兵士の<sup>7)</sup>、

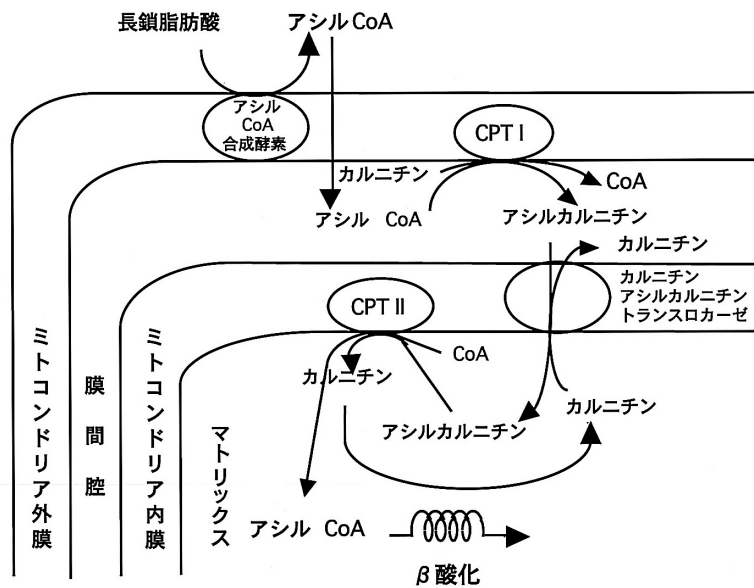


図6 ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸の移送に関する酵素と酸化

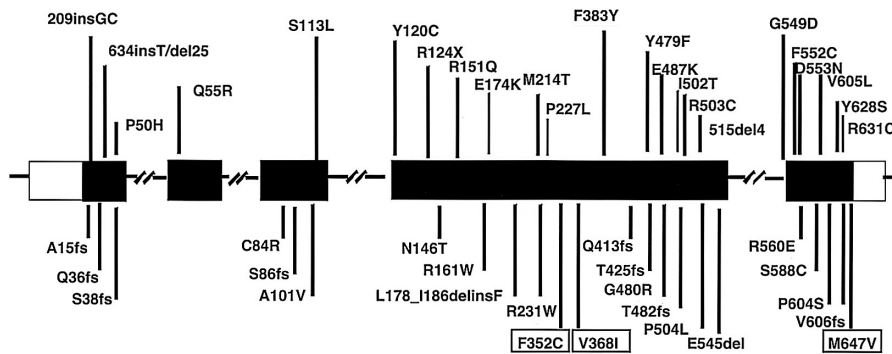


図7 代表的な CPT 異常症の変異部位

我々の知る限り, CPT 異常症の原因変異遺伝子はこれまでに60個が知られている. 352アミノ酸位と368アミノ酸位, 647アミノ酸位に3個の SNPs ( それぞれに2個の多型性, 本文参照 ) が存在する ( アミノ酸位を四角で囲んだ ).

1995年に Faigel が大学1年生のスポーツ選手の症例を報告して以来<sup>8)</sup>, 激しい運動の後に横紋筋融解症をきたし引き続きおこった急性臓器不全に, CPT 酵素の欠損症例の報告が相次いでいる<sup>9)・11)</sup>. 本邦では, CPT 異常症は新生児型 ( 全身型, 肝型 ) の高い死亡率から小児神経内科領域で注目されてきたが, 1歳以降の発症例は予後の比較的良好な成人型 ( 筋型 ) であることがわかってきている<sup>15)</sup>. 解糖系によるエネルギーのみでは不足する激しい運動時のエネルギーは, ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸酸化によって供給される. この酸化によるエネルギー供給が充分でない時に, しばしば横紋筋融解をきたす. 長鎖脂肪酸のミトコンドリア内移送に関する酵素異常の内, 最も頻度が高いものが CPT 異

常症である ( 図6 ). 時にこの成人型 CPT 異常症は高度の筋融解により時に急性腎不全や呼吸不全に至り, 診断が確定できずまた適切な治療を得られない場合, 生命が脅かされる<sup>5)・11)・16)・17)</sup>.

本症の診断は, 外傷や薬剤によらない原因不明の繰り返し高度の横紋筋融解に加え, 血中カルニチンの低値と尿中フリーカルニチンの上昇で疑われ, 皮膚線維芽細胞や生検筋組織, 末梢白血球における CPT 酵素活性の生化学的測定や, 発症時患者血清中のアシルカルニチンプロファイルをタンデム質量分析で解析する方法で行われてきた. そのため診断の確定には, 技能と設備, 時間を要する<sup>18)・19)</sup>. 直接的診断確定法は, 遺伝子診断である<sup>20)・21)</sup>. CPT 異常症の遺伝的特徴は, 遺伝子変異が

その構造遺伝子に広く分布していることであり、現在までに60の変異遺伝子が報告されている(図7) <sup>22,24)</sup>。稀な常染色体劣性遺伝病であるにもかかわらず、多くの症例では変異遺伝子のホモ接合体ではなく、トランスに位置する2個の変異遺伝子による複合ヘテロ接合体(compound heterozygote)である。そのため変異遺伝子の検出には、従来のサザンブロット法、制限酵素断片長多型検出法、配列特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法等の簡便な変異遺伝子検出法は利用できず、クローニングによる全遺伝子配列の決定が行われ、診断確定には設備、技能、労力と週月の時間を要してきた。今回その迅速な遺伝子型決定のため、我々は全構造遺伝子を8分画したCPT 特異的PCR増幅遺伝子産物のPCR-DHPLC法によるマスキングと同PCR増幅遺伝子のDNA配列直接決定法を導入した<sup>11,25)</sup>。対象者数が少なかったため前者については予備段階の結果のみを提示したが、後者は遺伝子クローニングを行うことなくCPT 遺伝子の全配列を決定しえた。この方法は、遺伝子クローニング法や、mRNAからcDNAライブラリーを作成しそれを鋳型としてDNA配列を決定する方法より<sup>26)</sup>、格段に実験手技が簡便・安価・迅速かつ再現性に優れた方法であった。

今回の検討で、運動負荷後の尿中ミオグロビン排泄量が0.2ng/mgCr以上を示す28名を横紋筋融解疑いとし、そのうち4名についてCPT 遺伝子の解析を行った。その結果、4人はいずれも正常遺伝子型であった。これら運動負荷後の横紋筋融解の原因は多く、上述 pseudonephritisによるであろう。ChenらはCPT 遺伝子のSNPの組み合わせの中にthermorabile phenotypeの存在とそのインフルエンザ脳症との関連を報告しており<sup>27)</sup>、SNPが必ずしも病的でないとはいえないことを示唆している。我々の4例のCPT 遺伝子型は、それに該当していない。一方、本症はMcArdle病やTarui病などの筋型糖尿病<sup>28)</sup>、さらには石川らの示す横紋筋融解をほとんど伴わない運動後急性腎不全<sup>29)</sup>との鑑別も必要であろう。それら遺伝性、非遺伝性疾患との迅速な鑑別のためにも、CPT 異常症の時機を失しない遺伝子診断法の確立が望まれており、我々の方法は極めて有用と考える。

今回の研究で反省すべき点が多い。尿定性試験と尿蛋白推定量との関係の解析、尿潜血と尿中赤血球数の関係の解析を行っていないが、いずれも厳密な意味での定量性はないため、過度の定量的な解析は誤解を生む。尿中ミオグロビン定量はいずれの検体も濃度が低いため、検出限界最小値に近い参考値があった。尿中蛋白排泄推定量は、年齢、性別に大きな差はなかったが、サッカー、バスケットボール、バレーボールなど集団球技選手に多い傾向があり、一方尿中ミオグロビンは、高校生では陸

上競技選手、駅伝選手に、大学生では投擲選手に排泄推定量が多い傾向がうかがえるなど、スポーツの種類により差が見られた。これらは、年齢、性差、スポーツの種類、体型や蓄積した筋肉量によるというよりも、負荷した運動の質と量の差によるであろう。今後対象は、年齢も均質で、むしろスポーツ選手などのような運動負荷に一定程度の耐性のある集団でない、一般学生集団が適当と考える。また一定の時間に均質で大量の負荷が期待できる運動、やはり長距離走や競歩、遠泳などを選ぶべきであろう。

## ま と め

一過性の生理的状态と考えられてきたスポーツ血尿に潜在する報告が増加してきたCPT 異常症の、遺伝子解析に基づく迅速なマスキング法の樹立を目指した。マスキング法としての熱変性ヘテロ二本鎖DNA解析法(PCR-DHPLC)、確定診断法としてのPCR増幅遺伝子直接DNA配列決定法は、いずれも有用であった。

## 謝 辞

脱稿に当たり、まずは研究に参加頂いたスポーツ生徒学生諸君およびその保護者の方々に深甚の謝意を捧げたい。また参加者に研究の意義をご伝達頂き、研究実施について多くのご便宜を頂いた、福岡大学附属大濠高等学校および福岡大学スポーツ科学部の教育職員の諸先生に深く感謝を申し上げる。

## 文 献

- 1) Abarbanel J, Benet AE, Lask D, Kimche D: Sports hematuria. *J Urol* 143: 887-890, 1990.
- 2) Cianflocco AJ: Renal complications of exercise. *Clinics Sports Med* 11: 437-451, 1992.
- 3) Cambrell RC, Blount BW: Exercise-induced hematuria. *Am Family Physician* 53: 905-911, 1996.
- 4) Jones GR, Newhouse I: Sport-related hematuria: A review. *Clin J Sport Med* 7: 119-125, 1997.
- 5) Roe CR, Ding J: Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* 8th ed, pp. 2297-2326, McGraw Hill (New York), 2001.
- 6) Sigauke E, Rakheja D, Kitson K, Bennett MJ: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review. *Lab Invest* 83: 1543-1554, 2003.
- 7) Berkman N, Meirou D, Katzir Z, Bar-On H: Acute



- renal failure due to carnitine palmitoyltransferase deficiency. *J Intern Med* 233 : 295-297, 1993.
- 8 ) Faigel HC : Carnitine palmitoyltransferase deficiency in a college athlete : a case report and literature review. *College Health* 44 : 51-54, 1995.
- 9 ) Kelly KJ, Garland JS, Tang TT, Shug AL, Chusid MJ : Fatal rhabdomyolysis following influenza infection in a girl with familial carnitine palmitoyl transferase deficiency. *Pediatrics* 84 : 312-316, 1989.
- 10 ) Keverline JP : Recurrent rhabdomyolysis associated with influenza-like illness in a weight-lifter. *J Sports Med Phys Fitness* 38 : 177-179, 1998.
- 11 ) Kaneoka H, Uesugi N, Moriguchi A, Hirose S, Takayanagi M, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Yasuno T, Sasatomi Y, Saito T : Carnitine palmitoyltransferase deficiency due to a novel gene variant in a patient with rhabdomyolysis and ARF. *Am J Kidney Dis* 45 : 596-602, 2005.
- 12 ) Kaneoka H, Hsu K-C, Takeda Y, Sharp GC, Hoffman RW : Molecular genetic analysis of HLA-DR and HLA-DQ genes among anti-U1-70kD autoantibody - positive connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 35 : 83-94, 1992.
- 13 ) Siegel AJ, Hennekens CH, Solomon HS, van Boeckel B : Exercise-related hematuria. Finding in a group of marathon runners. *J Am Med Ass* 241:391-392, 1979.
- 14 ) 杉沢利雄, 奈良正人 : スポーツによる横紋筋融解症 . 整形・災害外科 42 : 675-683 , 1999 .
- 15 ) Tamaoki Y, Kimura M, Hasegawa Y, Iga M, Inoue M, Yamaguchi S : A survey of Japanese patients with mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and related disorders as detected from 1985 to 2000. *Brain Development* 24 : 675-680, 2002.
- 16 ) Bertorini T, Yeh Y-Y, Trevisan C, Stadlan E, Sabin S, DiMauro S : Carnitine palmitoyl transferase deficiency : Myoglobinuria and respiratory failure. *Neurol* 30 : 263-271, 1980.
- 17 ) Ratliff NB, Harris KM, Smith SA, Tankh-Johnson M, Gornick CC, Maron BJ : Cardiac arrest in a young marathon runner. *Lancet* 360 : 542, 2002.
- 18 ) Rettinger A, Gempel K, Hofmann S, Gerbitz K-D, Bauer MF : Tandem mass spectrometric assay for the determination of carnitine palmitoyltransferase activity. *Analyt Biochem* 302 : 246-251, 2002.
- 19 ) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M : Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry : Difficulties in practical discrimination. *J Chromatogr B* 792:63-72, 2003.
- 20 ) Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M, Martin AL, Colombo I, Tarelli GT, DiDonato S : cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :661-665, 1991.
- 21 ) van der Leij FR, Huijkman NCA, Boomsma C, Kuipers JRG, Bartelds B : Genomics of the human carnitine acyltransferase genes. *Mol Genet Metab* 71 : 139-153, 2000.
- 22 ) Thuillier L, Rostane H, Droin V, Demaugre F, Brivet M, Kadhom N, Prip-Buus C, Gobin S, Saudubray J-M, Bonnefont J-P : Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT 2 ) deficiency. *Hum Mutat* 21 : 493-501, 2003.
- 23 ) Wieser T, Deschauer M, Olek K, Hermann T, Zierz S : Carnitine palmitoyltransferase deficiency. Molecular and biochemical analysis of 32 patients. *Neurol* 60 : 1351-1353, 2003.
- 24 ) Isackson PJ, Bennett MJ, Vladutiu GD : Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT 2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Mol Genet Metab* 89 : 323-331, 2006.
- 25 ) Wataya K, Akanuma J, Cavadini P, Aoki Y, Kure S, Invernizzi F, Yoshida I, Kira J, Taroni F, Matsubara Y, Narisawa K : Two CPT 2 mutations in three Japanese patients with carnitine palmitoyltransferase deficiency : functional analysis and association with polymorphic haplotypes and two clinical phenotypes. *Hum Mutat* 11 : 377-386, 1998.
- 26 ) Hoffman RW, Takeda Y, Sharp GC, Lee DR, Hill DL, Kaneoka H, Caldwell CW : Human T cell clones reactive against U small nuclear ribonucleoprotein autoantigens from connective tissue disease patients and healthy individuals. *J Immunol* 151:6460-6469, 1993.
- 27 ) Chen Y, Mizuguchi H, Yao D, Ide M, Kuroda Y, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Yamaguchi M, Kinoshita M, Kido H. : Thermolabile phenotype of Carnitine palmitoyltransferase variations as a predisposing factor for influenza-associated encephalopathy. *FEBS Lett* 579 : 2040-2044, 2005.
- 28 ) Chen Y-T. Glycogen storage diseases. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* 8th ed., pp. 1521-1551, McGraw Hill ( New York ), 2001.
- 29 ) 石川 勲 : 運動後急性腎不全 . 金沢医科大学出版局 ( 石川県内灘町 ), 2006 .

( 平成19. 5. 9 受付 , 19. 6.23 受理 )