

2名のうち1名は生後1カ月時から軽度の肝機能障害を認めていた児であるが、精密検査時の総セルロプラスミン濃度は正常下限、銅濃度は正常値以下であったが、その後の経過で肝機能の改善とともに総セルロプラスミン濃度、銅濃度とも正常となり、肝機能障害に基づく一過性低セルロプラスミン血症と考えられた。残りの1名は、精密検査時に総セルロプラスミン、ホロセルロプラスミンは正常値以下、血中銅濃度は正常下限であった。本患児は現在1歳5カ月であり、最終診断のために経過観察を行っている。

考察

これまでに徳島県および香川県で出生した新生児のうち保護者の同意が得られた約70,000名の新生児を対象としてウィルソン病マス・スクリーニング検査を行ったが、患者を見出すことはできなかった。そこで、徳島県小児科医会および徳島県保健環境センターの協力を得て、希望者を対象とした乳幼児ウィルソン病任意スクリーニング検査を1998年1月から実施した。1999年1月までに674名の受検者があったが、ウィルソン病患者は見いだされなかった。しかしながら、常染色体劣性遺伝の低セルロプラスミン血症もしくはウィルソン病保因者と考えられる1例が見いだされ、本症例は今後遺伝子解析等により確定診断を行う予定である。また、現在低セルロプラスミン血症が認められ、低年齢であるため確定診断するには至らず、経過観察が必要な1例が見いだされている。

この1年間のスクリーニング検査の実施により、問題となったのは再採血検査率が3.41%と高率であることおよび受検者数が少ないことである。再採血検査率を低下させるためには、カットオフ値を現在の10mg/dlから下げることが必要である。これまでの検討で初回検査が9mg/dl~10mg/dlの者は再採血検査で全例正常と判定され、カットオフ値を9mg/dlとしても良いかもしれない。しかし、血中

ホロセルロプラスミンのヒストグラムを見てみると大部分の例では血中ホロセルロプラスミン濃度が10mg/dl以上であり、検討例数が少ない現時点でカットオフ値を現時点で9mg/dlに変更することにより、ウィルソン病患者を見逃す可能性も否定はできない。このため、対象例数が増加し、カットオフ値について再検討行うまでは、現在のカットオフ値10mg/dlでスクリーニングを行うことが必要であろう。次に、受検者数が少ないことに対しては、希望者を対象とした任意スクリーニングである以上仕方のないことであるが、現在行っている検査実施機関でのポスターの掲示、説明文書の配付だけでは、保護者等に対するウィルソン病スクリーニング検査の意義が十分に伝わりにくいこと、本検査では採血が必要であり乳幼児に対して医療機関でこの検査のためにだけ採血を行うことの同意が得られにくいことが、受検率が低値である原因となっている者と思われる。今後地域における広報等により保護者に対してウィルソン病スクリーニング検査の意義を啓蒙していくことおよび検査の実施を医療機関受診時だけでなく、健診等の時期を利用して行うことも考慮していくことが必要であると考えられる。また、受検者が増加することによりウィルソン病患者が見いだされる可能性も高く、今後も本スクリーニング検査を継続していくことが重要と考えられる。

結論

乳幼児を対象としたウィルソン病任意スクリーニング検査を1998年1月から1999年1月まで674名に対して実施したが、患児は見いだされていない。しかしながら、これまでの検討により患児が見いだされた例も報告されており、今後受検者を増やしていくことにより、患者が見いだされる可能性も高く本スクリーニング検査を継続していくことは重要と考えられる。

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

開業医におけるウイルソン病の任意スクリーニング

研究要旨

我々は平成8年度の研究で、開業小児科医に感冒などの病気で受診する患児・保護者を対象とした、開業現場における任意のウイルソン病スクリーニングシステムの有用性を報告し、平成9年度は前年の8医院から20医院に拡大したスクリーニング事業について報告した。本年度は計834名が受診した過去20ヶ月にわたるスクリーニング結果を報告する。

研究協力者

遠藤文夫 (熊本大学医学部小児科学教室)
内野高子 (熊本市立熊本市市民病院新生児医療センター)
小池恵美子 (熊本市医師会検査センター)
松田一郎 (江津湖療育園)

研究目的

過去20ヶ月（平成7年10月～平成8年3月、平成8年8月～平成10年9月）にわたる小児科専門開業医でのウイルソン病スクリーニングの成績を報告する。

研究対象および方法

熊本ウイルソン病診療連絡会を設立し、熊本大学小児科を含め、熊本市で開業している小児科専門医院20施設で行った。熊本市医師会検査センターを検査機関とした。検査料として保護者から800円（検査実費500円+小児科医手数料300円）を徴収した。医院を感冒などで受診する患児とその保護者を対象とした。検査の説明や対象患者の選択は各医院の小児科医に一任した。検査を希望し同意と承諾が得られた保護者からは同意書に署名してもらった。通常の生化学検査の項目である血中セルロプラスミンを検査施設にオーダーする方法でスクリーニングを行った。熊本大学小児科はコーディネーターの立場から、PR用のポスターやチラシの作成や同意書と簡単な説明文書の作成などの事務的な準備と、検査センターと開業医との連絡業務、ならびにスクリーニング陽性者がでた場合の2次検査の機関としての働きをした。スクリーニングのカットオフ値は15mg/dLとした。

研究結果

計834名がスクリーニングを受けた。しかし、月を追うごとに減少する傾向がみられた。

年齢別では0から6才までが全スクリーニング受診者の87%で、そのうち1～3才が51%を占めた。また、スクリーニング受診者のセルロプラスミン濃

度の平均値は35.4mg/dLだった。発熱等の検査のついでにスクリーニングを受ける場合が多いため、セルロプラスミンはやや高めに出る傾向がみられた。年齢別にみると0-1才代でセルロプラスミン濃度が低くなる傾向が認められた。

カットオフ値15mg/dLは全体の1%未満に相当したが、一次スクリーニング陽性者はでていない。しかし、スクリーニングを行っている開業医の患者で5歳の男児が、軽度肝機能障害のためセルロプラスミン濃度を測定したところ、1.6mg/dLと低く、ウイルソン病の可能性が高いため現在精査中である。

考察

月を追うごとに受診者数が減少する理由として、1) ひとつの開業医を受診する層は固定されるくらいがあり、すでにスクリーニングを済ませてしまった層がかなりいたと推測される、2) 忙しい開業の合間に積極的にスクリーニングを勧める時間はないので、どうしても保護者からの希望がある場合に限られる傾向にあるが、その際、ウイルソン病の保護者への知名度の低さがネックになる、3) 800円の検査料金、などが考えられる。スクリーニング対象者の拡大のためには新規の開業医の参加ならびに総合病院小児科へのシステム導入が必要と思われるが、規模拡大のためには人件費や試薬代など経済的な制約が大きい。

結論

計834名のスクリーニング結果を報告した。

協力医院（アイウエオ順）

池沢医院・浦本医院・江上小児科医院・えとう小児科クリニック・管医院・木藤小児科・北野小児科内科医院・くどう小児科・桑原内科小児科医院・島添小児科医院・末藤小児科医院・杉野クリニック・瀬口医院・寺本医院・二宮小児科医院・はらぐちこどもクリニック・藤川医院・松本医院・みやざきこどもクリニック・渡辺医院

分担研究：効果的なマスキリーニング事業の実施に関する研究

乳幼児健診を利用したウイルソン病マスキリーニングの可能性と問題点

研究要旨

3才児健診を利用して行った、濾紙血ホロセルロプラスミン測定によるウイルソン病マスキリーニングについて、保護者や保健婦の意見をもとに再検討した。受検率は、75.1%と予想以上に高く、保護者の検査に対する関心も高かった。採血は、自己血糖測定用の穿刺器具を用いてほとんどトラブルなく行えたが、事前に採血法についての更に詳細な説明を行うべきであった。発見された1例のウイルソン病疑い例は、血中セルロプラスミン濃度、血清銅、尿中銅ともに正常との境界値を示し、肝機能も正常を維持している。ATP7B遺伝子の解析にて、Exon18にV1297Iの変異が片方のalleleのみに認められ、他の全てのExonには変異が認められなかったため、保因者である可能性が高いと考え、経過観察中である。今後のシステム化に向けては、採血を行う人員の確保が、最大の課題である。尿検査用の尿を利用したスクリーニングを、現在検討中である。

研究協力者

重松陽介、畑 郁江（福井医科大学小児科）

研究目的

ウイルソン病は、現在のマスキリーニング対象疾患の一部より発症頻度が高く、また、早期治療により、疾患の進展を防止することが可能なことから、マスキリーニングの実施が検討されてきた。我々は、スクリーニング実施時期として、生理的な血中セルロプラスミン濃度の分布と最小発症年齢から、3才頃が最適かと考え、昨年度、3歳児健診を受診した児を対象に、濾紙血ホロセルロプラスミン濃度についてのスクリーニングを行った。本年度からの研究では、今までの研究結果をふまえて、健診を利用したマスキリーニングのシステム化の可能性について検討することを目的としている。

研究方法

福井市保健センターにおける3歳児健診を受診した児のうち、検査に同意した児について、3歳児健診の会場で濾紙血を採取し、血中ホロセルロプラスミン濃度を測定した。採血は、自己血糖測定用穿刺器具を用い、指先を穿刺した。測定結果が低値を示したものには通知を郵送し、福井医科大学小児科で精査を行った。マスキリーニング実施期間終了後、その実施方法や結果について、保護者や福井市保健センターの保健婦らの意見をもとに、再評価を行った。さらに今年度は、実際にマスキリーニングとしてシステム化可能かどうかを考慮し、来年度からのスクリーニング実施にむけての計画を行った。また、昨年度のスクリーニングで、1例のウイルソン

病疑い例が発見されたが、その症例について、その後の経過観察を行った。診断確定のための遺伝子診断を札幌市衛生研究所に依頼して実施した。

研究結果

マスキリーニング実施期間の5ヶ月間に、3歳児健診を受診した児は1053名で、そのうち791名がスクリーニングを受け、受検率は75.1%であった。採血は、ほとんどの児が協力的でトラブルなく実施できた。スクリーニング終了後に保護者から寄せられた意見が2件あった。1件は採血手技に関するもので、採血針の交換が行われていたかどうか保護者には確認できなかったとのことであった。もう1件は、スクリーニングを受けられなかった方からのもので、5ヶ月間という限定された期間での実施が、受ける側にとって不公平と感じられたとのことであった。

濾紙血ホロセルロプラスミン濃度測定の結果、1例のウイルソン病疑い例を発見した。この児は、初診時、濾紙血ホロセルロプラスミン5.5mg/dl、血清セルロプラスミン13.5mg/dl、血清銅68 μ g/dl、尿中銅0.11 μ g/mgCr、1.43 μ g/kg/dayと正常との境界値と考えられる値を示し、肝機能は正常であった。6ヶ月後のフォローアップにおいても、血清セルロプラスミン19.4mg/dl、血清銅67 μ g/dl、尿中銅0.12 μ g/mgCrと同様の値を示し、肝機能も正常を維持している。遺伝子診断の結果、Exon18にV1297Iの変異が片方のalleleのみに認められたが、他の全てのExonについては変異が認められなかった。

考察

保護者から敬遠されがちな採血が必要な検査であったにもかかわらず、比較的高い受検率であった。個別相談などで保護者に対応した保健婦からも、保護者の検査に対する関心の高さが感じられたという感想がきかれた。

採血手技に関しては、自己血糖用穿刺器具を用いることで、予想以上にトラブルなく実施でき、小児の集団での採血において、有効な方法と考えられた。しかし、保護者にとっては見慣れない方法であるため、手技についての誤解を生じることもあると思われる。事前にもう少し詳細な説明を行っておくべきであったと考えられた。

1例のウイルソン病疑い例については、検査データの経過と遺伝子診断の結果から、保因者である可能性が強いと考えている。しかし、ウイルソン病患者の中に、全てのExonに変異のみつからない患者が存在すること、児の年齢がまだ3才であることから、この症例がウイルソン病患者である可能性が完全に否定されるわけではないため、定期的に経過をみていくことにしている。本症例のような場合、スクリーニング時には全く無症状であるため、保護者に精査や長期の経過観察の必要性を理解してもらうのが困難なケースもあると思われる。マススクリーニングを行っていくと、このような症例は多くみつかることになると予想されるため、ATP7B活性の測定なども含め、確実な診断の方法について、早急に検討する必要があると考えられる。

3歳児健診の利用は、健診の受診率が高いためにとりこぼしが少ないこと、セルロプラスミンの測定値が成人レベルに近づくために偽陽性や偽陰性が少ないこと、学校検診での実施に比べて早期発見が可

能であることなどの理由から、ウイルソン病マススクリーニングを行う機会として最適と考えている。そこで、今回の結果をふまえて、システム化が可能かどうかを検討した。上述したように、方法としては十分に実施可能と考えられる。しかし、実際には、採血を行う人員の確保が大きな問題となる。乳幼児に対して医師以外が採血を行うということに対する抵抗感、人員数の問題、予算の問題などがあり、保健婦や看護婦による実施は、当面はかなり困難な状況である。そのため、我々は、非侵襲的な方法として、尿中セルロプラスミン測定によるスクリーニングを考えている。福井市保健センターでは、3歳児健診において全例に尿検査を行っているため、その尿を利用することにより、児に負担をかけることなく、人員確保の問題も少なく、実施可能ではないかと思われる。ただし、尿中セルロプラスミン測定においては、検体保存による測定値の低下が早く、また、郵送が不可能なため、本県のような地方都市で、今後、多施設において実施していく場合には、検体の回収が問題となる。そのような点について更に検討したうえで、実施を試みる予定である。

結論

3歳児健診を利用したウイルソン病マススクリーニングを、濾紙血ホロセルロプラスミン濃度の測定によって行うことは、有効な方法ではあるが、人員確保など解決すべき問題点が多く、現時点では、実施が困難な状況である。今後、尿中セルロプラスミン測定によるデータも蓄積することにより、マススクリーニングのシステム化に最適な方法を検討していく必要がある。

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

札幌市におけるウィルソン病のマスキング

研究要旨

札幌市では新生児濾紙血液セルロプラスミン測定によるウィルソン病のマスキングを1995年4月から実施している。また、マスキング陽性者の確認検査法としてウィルソン病責任遺伝子ATP7Bの直接塩基配列解析も併せて行っている。マスキングの検査法は1998年8月までは酵素免疫測定法により、1998年9月以降はネフロメトリーにより行った。1998年12月までに66,078名の検査を行い、92名(0.13%)が再採血、1名が要精密検査となったが患児は発見されなかった。また、1997年4月以降は要再採例の一部についてウィルソン病責任遺伝子;ATP7Bの直接塩基配列解析を行い、確認検査法としての有用性を認めた。

研究協力者

荒島真一郎 (北海道教育大学札幌校)
福士 勝、田上泰子、山口昭弘、
小田浩道、藤田晃三 (札幌市衛生研究所)

研究目的

現行の先天性代謝異常症等の新生児スクリーニングシステムでウィルソン病のスクリーニングが可能かどうかを検討する。

研究対象および方法

対象は札幌市内の産科医療機関で出生し、保護者が先天性代謝異常症等のマスキング検査を希望した生後4日から7日の新生児で、その乾燥濾紙血液検体を検査試料とした。

検査方法は1995年4月から1998年8月までは(以下前期と省略)抗セルロプラスミンポリクローナル抗体を用いるワンステップ競合法酵素免疫測定法(札幌IDL社製)を、1998年9月以降は(後期と省略)ネフロメトリー(ベアリング社製)を用いた。また前期では再検査法としてラテックス凝集自動分析法(札幌IDL社製)を用いた。

新生児濾紙血液セルロプラスミンのカットオフ値は、前期では4mg/dl血清、後期では5mg/dl血清とした。カットオフ値よりも低値を示す例には、生後1ヶ月での再採血を行い再検査を行った。

ウィルソン病責任遺伝子ATP7Bの直接塩基配列解析は乾燥濾紙血液からDNAを調製し、PCR直接塩基配列解析法によりATP7Bの遺伝子変異の検出を蛍光オートシーケンサー(日立SQ5500型)を用いて行った。

研究結果

1995年4月から1998年8月までの前期では、

60,169名の新生児を検査した。その結果、58名(0.096%)が再採血となり、1名(在胎週数36,出生時体重2,250g)が生後1ヶ月時で引き続きセルロプラスミン値が2.5mg/dlと低値を示したため、精密検査となった。しかし、生後2ヶ月ではセルロプラスミン値は17.1mg/dlと正常化した。1998年9月から12月の後期では5,899名の検査を行った。その結果、34名(0.576%)が再採血の対象となったが、生後1ヶ月の時点では全例5mg/dl以上となり精密検査対象者はいなかった。前期、後期とおして66,078名の新生児スクリーニングの結果は、再採血が92名(0.13%)、要精密検査が1名であり、患児は発見されなかった。再採血対象者92名中62名は出生体重2500g以下の低出生体重児であった。

要精密検査となり、生後2ヶ月でセルロプラスミン値が正常となった例について、ATP7Bの全21エクソンについて直接塩基配列解析法により遺伝子変異の検索を行ったが変異は認められなかった。また、日本人ウィルソン病患者36家系についてその遺伝子変異解析を行い、欧米人と共通な3つの変異と日本人に特異的な10個の変異がエクソン8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18にあり、第一ステップとしてこれら変異の集中する8つのエクソンを直接塩基配列解析することにより70%以上の変異を検出できることが明らかとなった。

考察

新生児期での血中セルロプラスミン測定によるウィルソン病スクリーニングの可能性に関して、われわれはレトロスペクティブな研究ではあるが、幼児期発症例について保存された新生児濾紙血液のセルロプラスミンを測定しその低値を証明している。しかし、1994年から1997年に行われた厚生省心身障害研究での青木らの報告によると、全国8施設で15万

人規模の新生児スクリーニングでは患児が発見されないこと、治療開始も3歳から5歳の幼児期で十分であること、3歳以降ではセルロプラスミンがほぼ一定レベルとなること等から、幼児期でのスクリーニングが有用であるとされている。しかしながら、幼児期のスクリーニング検体をいつ採取するか、どのようなシステムで採血するか等、依然解決されていない問題も多い。また、現行の新生児先天性代謝異常症等スクリーニングではほぼ100%の受検率を達成しているが、幼児期でこのような受検率を確保できる採血システムを確立するのは現状ではかなり難しいと思われる。実際に、札幌市の現状では幼児期、特に3歳児健診時や開業医での採血システムを構築することが難しいことから、新生児期でもセルロプラスミン低値を示す可能性が高い早期発症型のウィルソン病の検出を目的として、新生児先天性代謝異常症等のスクリーニングの対象疾患の一つとして実施している。新生児6万名余りのスクリーニングでは患児は発見されていないが、発生頻度から考慮しても10万人以上のスクリーニングを行わなければ、どのようなタイプの患児が、どのような頻度

で検出するかは明らかにできないものと思われる。一方、新生児期スクリーニングで発見されるウィルソン病患児は未発症であり、その確定診断には血中銅、尿中銅排泄量、肝銅含有量に加えて、その責任遺伝子であるATP7Bの遺伝子変異解析が有効とされている。そこで、スクリーニング陽性例については、第一ステップとして、変異の集中するエクソン8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18の8つのエクソンの直接塩基配列解析を行い、この段階で変異が検出されない場合は残りの全エクソンの解析を行うことにより、確定診断を効率的に行うことができるものと思われる。

結論

ウィルソン病の新生児期マススクリーニングの有用性を確認するには同一地域で10万人以上の検査数が必要であり、さらにスクリーニング数を増やして検討が必要である。未発症例の確定診断にはその責任遺伝子であるATP7Bの遺伝子変異の検出が有効である。

分担研究：効果的なマスキリング事業の実施に関する研究

乳幼児期以降を対象としたウイルソン病マスキリング その2

研究要旨

本年度は乳幼児期以降を対象に濾紙血セルロプラスミンを測定してウイルソン病マスキリングを行った。愛知県および三重県の2病院の協力のもと、採血機会のあった児または検査希望者を対象に、保護者の同意書を得てから濾紙採血を行った。濾紙を郵送後、 -80°C に保存し、セルロプラスミンをELISA法で測定し 10mg/dl 未満を再検として再検後も 10mg/dl 未満の時、再採血を依頼した。'97年5月から'98年6月までの13カ月間で、対象者数は873名、年齢の平均は3.4歳であった。濾紙血セルロプラスミン値は $17.1 \pm 5.2\text{mg/dl}$ 、範囲は $2.6 \sim 39.2\text{mg/dl}$ で初回検査陽性数は35名、4.0%であった。その内、再採血ができたのは5名であった。再検者の再採血の機会がなかなか得られなかったことが問題点であった。

研究協力者

坂 京子 (名古屋市立大学医学部小児科)
小林正紀 (名古屋市立守山市民病院小児科)
杉山成司 (市立四日市病院小児科)
一木 貴 (愛知県厚生連海南病院)

研究目的

ウイルソン病のマスキリングを目的に昨年度に引き続き本年度も乳幼児期以降を対象に濾紙血セルロプラスミンを測定し検討した。

研究対象および方法

対象者の保護者への説明用ポスター、説明文、同意書を作成し愛知県の海南病院および三重県の市立四日市病院の協力を得て採血機会のあった児または検査希望者を対象に、同意書を得てから濾紙採血を行った。セルロプラスミンの測定方法は、濾紙を郵送後、 -80°C に保存し、採血後、1ヶ月以内にニッシュウ株式会社の作成したキットを用いてELISA法で測定した¹⁾。セルロプラスミン値が 10mg/dl 未満を再検として同じサンプルの再検後も同様に 10mg/dl 未満の時、再採血を依頼した。

研究結果

検討期間はセルロプラスミン測定の準備ができた'97年5月から'98年6月までの13カ月間で、対象者数は873名であった。対象年齢の平均は3.4歳で範囲は24日から23歳までであった(図1)。

濾紙血セルロプラスミン値は $17.1 \pm 5.2\text{mg/dl}$ 、範囲は $2.6 \sim 39.2\text{mg/dl}$ であった。セルロプラスミ

ン測定値のヒストグラムを図2に示す。対象数873名中、初回検査陽性数、すなわち再検例は35名、4.0%であった。図3に対象年齢とセルロプラスミン値を示す。昨年度と同様、低年齢ほど再検者が多いことはなかった。また再検者の平均年齢は6.8歳で1ヶ月未満の児は3名のみであった。35名の再検者の内、34名は追跡調査の結果、現時点ではウイルソン病の可能性は少ない。なお、日令24の児はセルロプラスミン値が 2.6mg/dl と低値であったが生後2カ月の再検で 16mg/dl へ上昇した。再採血ができたのは5名で2回とも低値であったのは1名でクレチン症で治療中の患児でその後のセルロプラスミン値は 22mg/dl へ上昇した。

考察とまとめ

対象年齢が24日から23歳までと幅があったがカットオフ値を 10mg/dl 未満としたところ再検率は4.0%であった。また低年齢者ほど再検率が高いこともなかった。しかし、再検者の再採血の機会がなかなか得られなかったことは問題点であった。肝障害以外でセルロプラスミン低値例も多くみられ、濾紙の保存、測定までの期間なども影響したと思われる。

文献

- 1) 池田英紀、他：抗ヒト活性型セルロプラスミンモノクローナル抗体キットの基礎的検討。平成8年度厚生省心身障害研究「効果的なマスキリングの施策に関する研究」p135~137、1977.

図1：対象者の年齢分布

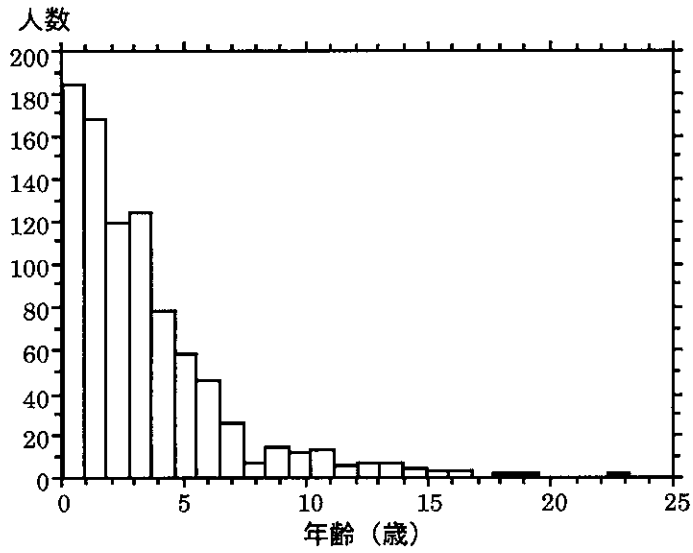


図2：セルロプラスミン値のヒストグラム

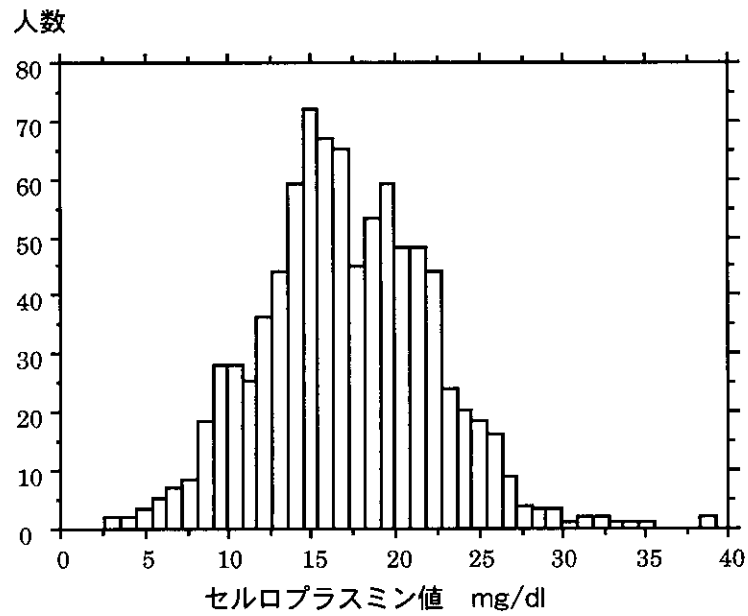
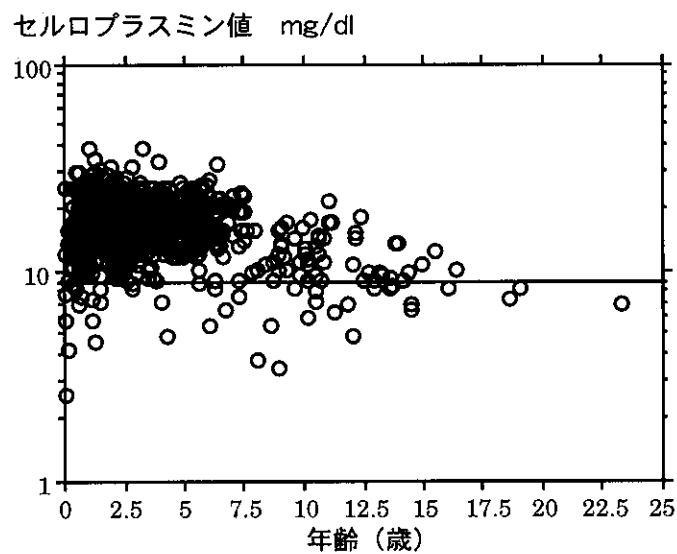


図3：対象年齢とセルロプラスミン値



分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

3歳児を中心とした尿中セルロプラスミン値（対クレアチニン比）の検討

研究要旨

Wilson病マスキングの方法として、尿中セルロプラスミン蛋白測定（ELISA法）が開発された。今回、基礎的な検討として、幼児新鮮尿を用いて活性型セルロプラスミン値を対クレアチニン比にて求めた。また、既にWilson病と診断されている患者7例の同値と比較検討した。両群間に統計学的有意差が認められなかったがカットオフ値を高く設定することにより区別が可能と判断された。カットオフ値の設定により、3.8～4.7%の再検率になるものと推定された。

研究協力者

山口之利、青木継稔、清水教一、坂本真理子
（東邦大学医学部第2小児科）
森田嘉一、橋詰直孝
（東邦大学医学部大橋病院臨床検査部）

ツキが強く、平均値で比較するとWilson病比較群と対象コントロール群との間に有意な傾向は認められた。実際にスクリーニングを行う上でカットオフ値を決めることに関して、標準偏差-1SDおよび-2SDにて検討したところ、両方とも2-5歳群にて2名（3.9%）、6-12歳群にて3名（4.5%）、13-15歳群にて1名（3.8%）、16歳以上群にて1名（4.7%）の再検率であった。再検率はやや高いものの今後症例数を増やしていくことによりバラツキをおさえていけばスクリーニングに有効と考えられた。

研究目的

先天性銅代謝異常症であるWilson病のマスキング法の確立を目的として、尿中セルロプラスミン蛋白の測定（対クレアチニン比）を3歳児を中心として検討した。

結論

3歳を中心とした尿中活性型セルロプラスミン値測定は、さらなる検討が必要だが濾紙血と同様にスクリーニングに有用と考えられた。

研究方法

対象コントロール群は、Wilson病以外にて東邦大学第二小児科入院中あるいは外来通院中の患者165名である。ただし、明らかな腎疾患は除いてある。また、当科にてFollow up中のWilson病患者7名を比較群とした。対象の年齢別人数は、コントロール群にて、2-5歳が51名、6-12歳が67名、13-15歳が26名、16歳以上が21名であった。Wilson病患者群では、3歳、9歳が各1名、16歳以上が5名であった。方法は、患児の尿（1回尿）をすみやかに4℃に保存し、活性型セルロプラスミン値を測定し、対クレアチニン比にて比較検討した。尿中セルロプラスミンの測定はELISA法にておこなった。

研究結果および考察

対象コントロール群の年齢別尿中活性型セルロプラスミン値は、それぞれ2-5歳が 61.88 ± 140.02 ng/mg Cr、6-12歳が 49.15 ± 179.49 ng/mg Cr、13-15歳が 23.86 ± 41.74 ng/mg Cr、16歳以上が 12.56 ± 18.75 ng/mg Cr、またWilson病比較群では、 0.05 ± 0.09 ng/mg Crであった。各年齢群とWilson病比較群との間に統計学的有意差は認められなかった。これは各群とも測定値にバラ

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

尿セルロプラスミン測定によるウイルソン病マス・スクリーニングの試み

研究要旨

尿中セルロプラスミン測定によりウイルソン病をスクリーニングする方法が有効との報告が数施設よりなされた。この方法は検体採取の簡便さからマス・スクリーニングに適した方法と思われる。秋田県でもこの方法を用いて3才児を対象としたマス・スクリーニングの試みを開始し問題点などを検討した。尿中セルロプラスミンは保存状態により測定値が低下しやすく、特に検査機関より遠くの地域では尿検体の回収・輸送方法が大きな問題となるものと思われた。実際に本スクリーニングを施行するための問題点を検討した。

研究協力者

高田五郎、高橋 勉、荘司靖子
(秋田大学医学部小児科)

研究目的

ウイルソン病を尿中セルロプラスミン(CP)測定によりスクリーニングする方法が数施設より報告され、本法によりウイルソン病患者が発見された。この方法は検体採取の簡便さからマス・スクリーニングに適した方法と思われ、秋田県でも3才児を対象としたウイルソン病マス・スクリーニングを検討した。

研究方法、結果および考案

まず3才から12才児の尿を対象に尿CPをELIZA法にて測定した。その結果、尿CP値は98.6 (SD: 76.9) ng/mg Cr (n=30) と他施設の報告とほぼ同様のデータが得られた。次に、実際にマス・スクリーニングを実施するうえでの問題点を検討した。3才児健診は現在は県内69自治体で実施されているが、まず秋田市での検討を行った。秋田市では、尿検体は当日朝に自宅でプラスチック容器に採尿し

持参する形式をとっている。一般検査に使用後の尿検体を回収し4℃で保存し、翌日にセルロプラスミン測定を行う方法で本スクリーニングを行う方式を検討した(図1)。問題点は検体採取後から検体回収までの7～8時間の検体の保存状態にばらつきがある点が考えられた。次に秋田市以外の68自治体に関して検討した。最大の問題点は尿検体輸送方法と考えられた。まず尿を郵送で輸送する方法の尿セルロプラスミン値の劣化に関して検討した。尿検体のセルロプラスミンおよびクレアチニンを測定後、4℃に保存したものと、秋田県内各地から郵送で輸送した同一検体に関して、48時間後に再びセルロプラスミンおよびクレアチニンを測定し初期値からの低下に関して検討した(図2)。その結果、検体郵送によるセルロプラスミン値の低下は著明であり郵送での輸送は困難であることがわかった。今後、セルロプラスミンの劣化を防ぐ方法が開発されれば本方法も実施可能と思われる。したがって現時点では県内68自治体からクール宅配便などを用いる輸送が現実的な方法と思われた。今後、実際にスクリーニングを進めさらに問題点を検討したい。

図1：ウイルソン病マス・スクリーニング実施の流れ

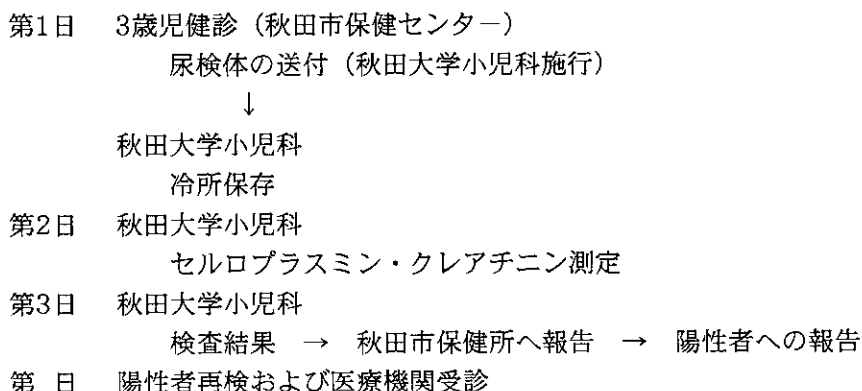
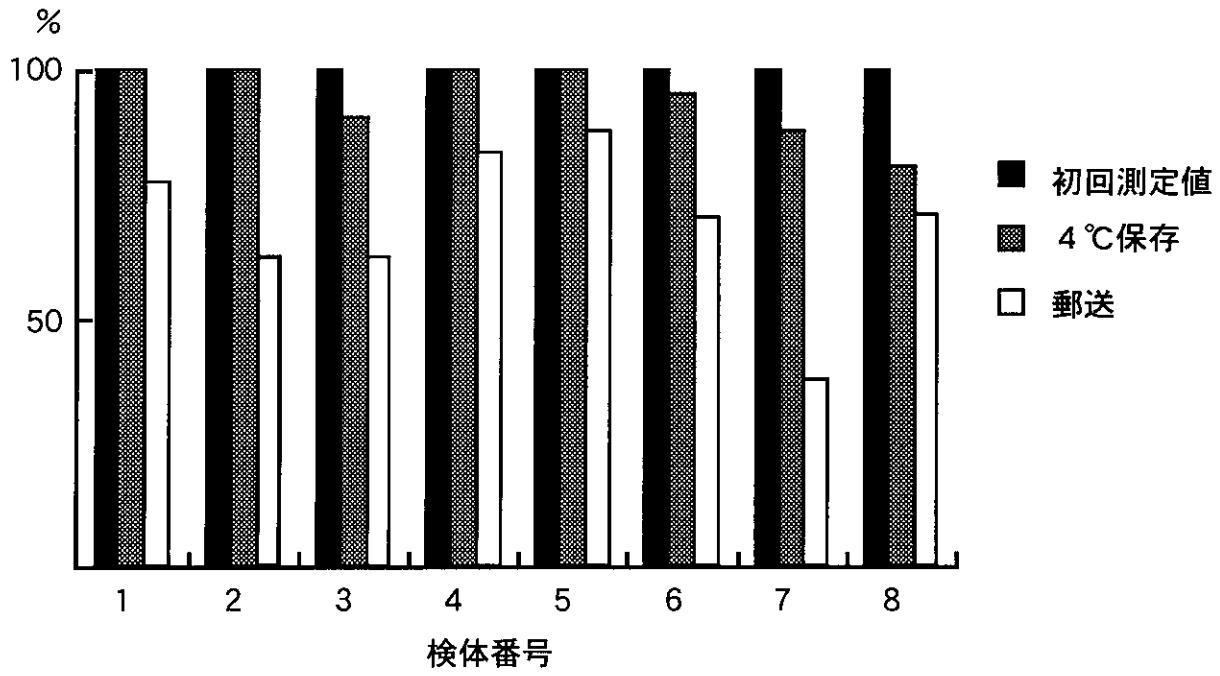


図2：郵送による尿セルロプラスミン値の変化



分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

尿によるウィルソン病のスクリーニングに関する研究（第2報）

研究要旨

わが国では学校検尿が普及しており、その尿のセルロプラスミン(以下CP)を測定すれば、Wilson病を発症前にスクリーニングすることが可能と考えてこれを試験的に行なった。東京都の一部の小学校に対して、腎臓検診のための尿の一部を本症のスクリーニングに使用することの許可を求め、協力の得られた学校の児童22,639名の尿CPを、抗ヒト活性型モノクローナル抗体を用いたELISA法キットで測定した。その結果、15ng/ml以下を示したのは148例(0.7%)で、その138例の尿を再検査したところ、12例(0.1%)が15ng/mlまたは15ng/mg creat.以下であった。その10例を精密検査したところ、1例の尿CPは0.9ng/mg creat.、尿銅262ng/mg creat.、血清CP $9\mu\text{g/dl}$ でWilson病と思われた。その肝機能やエコーの所見は正常で、KayserFleischer角膜輪は無かったが、遺伝子解析で本症と診断され、本法の有用性を証明した。

研究協力者

北川照男、鈴木 健 (東京都予防医学協会)
大和田 操 (日本大学小児科)

研究目的

小学生および成人の随時尿を用いて年齢別および男女別尿CP値について検討し、Wilson病患者29名のCP値と比較した。同時にスクリーニングにおけるcut-off値についても検討した。また、平成9年度に引き続き、東京都の一部の小学生の健康診断のために採尿された尿の一部を用いて、本症をスクリーニングすることに協力が得られた74校の学童22,639例の早朝尿を対象として、試験的スクリーニングを行なった。

研究方法および材料

- 1) 小学生(70名)、成人(96名)の随時尿における年齢別および男女別CP値について検討した。
- 2) 小学生2,000名の早朝尿を用いて、スクリーニングにおけるcut-off値について検討した。
- 3) Wilson病患者29例の尿CPおよび尿銅を測定して、健常人の値と比較した。
- 4) 健康診断のために採尿された学童22,639名の早朝尿を対象として、試験的スクリーニングを行なった。
- 5) 尿CPはELISA法キット(株 ニッショー)を用いて測定し、尿クレアチニンはYaffe法で、また、尿銅は原子吸光法により測定した。

研究結果

- 1) Wilson病患者における尿CP値

図1に示すように、26歳から64歳までのWilson病患者29名の随時尿のCPは、その1例が320ng/ml、362.4ng/mg creat.の著しい高値を示していた。しかし、その他の28例の尿CPの平均値は、 $8.6\pm 8.3\text{ng/ml}$ 、 $7.1\pm 8.3\text{ng/mg creat.}$ の低値を示した。尿CPが高値を示した1例を除くと、その全例が27.5ng/ml以下であり、29例中24例(82.8%)が27.5ng/ml以下であった。

2) 小学生および成人随時尿の年齢別および男女別CP値

ヒトの尿CPを年齢別にみると、表1に示すように、小学生、成人の尿CPの平均値は何れの場合も100ng/mg creat.以上の値を示し、Wilson病患者の値とは著しい差が認められた。また、加齢と共にCP値が上昇し、7~30歳未満と30歳以上の群とは何れも統計学的に有意差が認められたが、30歳以上の群間では有意差は認められなかった。

一方、小学生および成人の男女間には何れも統計学的な有意差は認められなかった。

3) スクリーニングに用いるcut-off値の検討

小学生2,000名の早朝尿のCP値を測定し、15ng/mlから5ng/ml毎に35ng/mlまで5群に分けて、各群における陽性数と2,000例の中に占める比率を算出した。表2に示すように、一次スクリーニングのCP値が15ng/ml以下のものを再採血した場合、再採血率は約1%になり、25ng/ml以下のものでは4.9%、30ng/ml以下のものでは9.6%となった。前述したWilson病患者のCP値からみると、15ng/ml以下のものを再採血し、それ以上を再採血しないとすると、約1/4のWilson病患者が見逃されることになり、25ng/ml以下では見逃しが約10%に

低下し、30ng/ml以下では3.5%となり、ほぼ全例を把握することができると思われた。

以上の成績から、今回の試験的スクリーニングでは、見逃し率はやや高いものの、再採血率が低くて学校の協力が得られ易い15ng/mgをcut-off値に設定した。

4) 小学生児童の尿CPによるWilson病の試験的スクリーニング

小学生児童22,639名の尿CPによるWilson病の試験的スクリーニングのその平均値は、103.3±72.2ng/mlであって、表3に示すように、15ng/ml以下を示したのは148例(0.7%)であり、平均値は8.2±4.4ng/mlであった。二次スクリーニングでは148例中138例の尿が提出され、そのうち再度15ng/mlまたは15ng/mg creat. 以下を示したものは12例で、その尿の平均値は9.2±5.5ng/mlおよび10.3±6.5ng/mg creat. であった。この12例中の10例について精密検査を実施したところ、1例の尿CPが、1.6ng/mlおよび0.9ng/mg creat. と著しい低値を示し、Wilson病と思われたが、他の9例の平均値は73.4±44.5ng/mlおよび41.63±5.5ng/mg creat. であった。

5) 試験的スクリーニングで発見された患児の経過

尿CPが異常に低かった11歳の男児の血清CPは、2.7mg/dl、血清銅は9μg/dl、尿銅は262ng/mg creat. で、Wilson病が強く疑われた。しかし、血清生化学検査ではヘパラスチンテストが52%と低値を示した以外はどれも正常であった。また、理学的には体格および栄養は正常範囲で、肝脾腫はなく、眼科的にKayser-Fleischer角膜輪は認められず、腹部エコー検査でも肝硬変は認められなかった。以上の所見から、本症がWilson病であることを確認するために、遺伝子の解析を札幌市衛生研究所に依頼した。

その結果、これまでに日本人のWilson病において多く報告されている遺伝子変異、即ちExon8のR778LおよびExon9のA803T変異の複合ヘテロ接

合体であることが確認された。

考察

Wilson病を早期発見する事が可能か否かを検討するために、活性CPを測定するELISA法で10万例を超える新生児濾紙血液でのパイロットスタディが行なわれたが、現在までに1例の患児も発見されていない。新生児期では、正常でもCP値が低値を示すことに問題があり、スクリーニングを行なうには適切な時期でないと指摘されている。最近では、幼児の血液CPをスクリーニングして、発症前のWilson病患者が相次いで発見されている。しかし、幼児は一般に採血を嫌うので、血液による本症のスクリーニングを普及するのは困難と思われた。我々は、健康人の尿にCPが排泄され、Wilson病患者の尿ではそれが低いことを知り、これまでに尿CP測定によるスクリーニング法を検討してきた。他方、わが国では健康診断を目的とした学童の尿検査が毎年施行されているので、その尿を使用すれば全国的規模でのスクリーニングが可能と考え、我々は、協力が得られた74校、22,639名の学童の尿CPについて試験的スクリーニングを行い、1例の患児を発見して、本法の有用性を証明した。

しかし、学童では既に発症している患者も多いので、幼児の尿を用いてスクリーニングする必要があると考えており、今後はこの点について検討する予定である。

文献

- 1) 大和田 操、鈴木 健、似鳥 嘉一 他：Wilson病のマス・スクリーニングに関する研究(第2報) - 尿中セルロプラスミンを中心として - 日本先天代謝異常学会誌 1995; 11: 122
- 2) 鈴木 健、笹嶋 薫、穴澤 昭 他：尿によるWilson病のスクリーニングの研究 日本マス・スクリーニング学会誌 1997; 7: 108

図1 : Wilson病患者の尿CP値

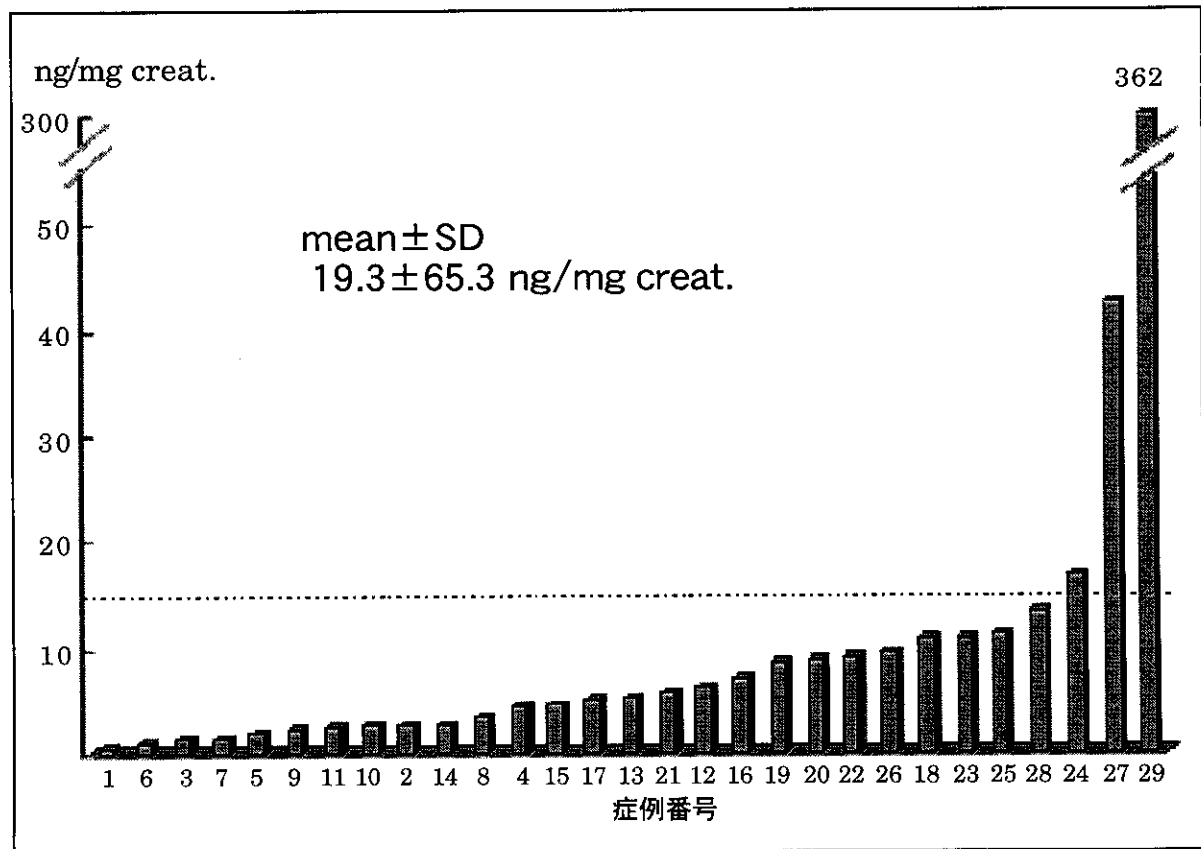
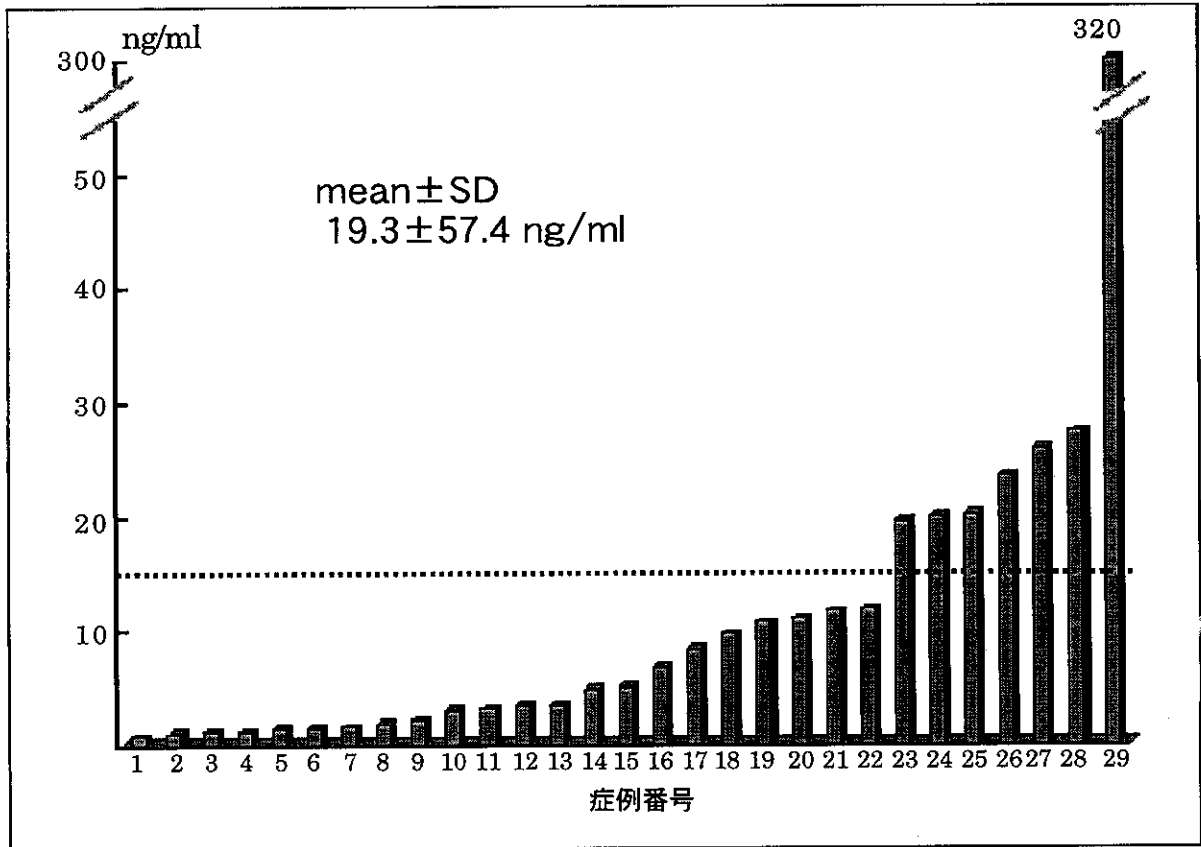


表1. 年齢別・男女別尿CP値

年齢	n	尿CP値
7～30歳未満	92	106.4±65.4ng/mg creat.
30～40歳未満	36	134.5±69.2 ng/mg creat.
40～50歳未満	23	173.1±65.7 ng/mg creat.
50～60歳未満	17	183.9±87.2 ng/mg creat.
小学生男女別尿CP値		
男児	21	121.7±58.0 ng/mg creat.
女児	49	102.9±74.8 ng/mg creat.
成人男女別尿CP値		
男性	76	143.9±71.7 ng/mg creat.
女性	22	151.8±122.3 ng/mg creat.

表2. 一次スクリーニングにおけるcut-offの検討

小学生2,000例の中で尿CPが15-35ng/ml以下のものの症例数とその比較

尿CP値の区分 ng/ml	症例数	%
15以下	19	0.9
20以下	29	2.4
25以下	59	4.9
30以下	94	9.6
35以下	140	16.2

表3. 試験的マス・スクリーニング成績
(小学生22,639例を対象として)

	陽性	陰性	未受検
一次	148 (0.7%)	22,491 (99.3%)	0
二次	12 (0.1%)	126 (0.6%)	10 (0.04%)
三次	1 (0.004%)	9 (0.04%)	2 (0.001%)

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

ウィルソン病診断の新しい方法、ATP7B活性の測定に関する検討

研究要旨

Wilson病は、ATP7B遺伝子により産生される銅輸送膜蛋白（P-type ATPase）の障害により生じると考えられる。本研究において筆者らは、Wilson病症例、Menkes病症例とその母親、および正常コントロールにおける細胞膜銅依存性ATPase活性の測定を行い、本法がWilson病の新しい診断法になりうるか否かを検討した。培養リンパ球細胞より膜成分を抽出し、銅依存性ATPase活性をATPの酸化的リン酸化の変化により測定した。その結果、Menkes病症例において銅依存性ATPase活性はコントロールの約30%程度に、Wilson病症例においては約45～60%に低下していた。本法がWilson病（Menkes病も含みうる）の新しい診断法になりうる可能性が示唆された。

研究協力者

清水教一、宇野久仁子、山口之利、青木継稔
（東邦大学医学部第2小児科）
逸見仁道、嶋武博之
（東邦大学医学部分子生物学）

研究目的

Wilson病は、肝臓、角膜および中枢神経などに銅の過剰な蓄積を認め、種々の臓器の障害を生じる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。その病態の中心は、肝臓における銅輸送膜蛋白ATP7B(P-type ATPase)の障害による銅の排泄障害であると考えられる。現在、血中あるいは尿中のセルロプラスミン値測定による本症のマスキング・システムの確立が検討されており、パイロットスタディが全国の施設にて行われている。しかし、これらの検索により発見される年少例は、確定診断が困難なことが多く、一次スクリーニングより確定診断までをスムーズに行う事のできるシステムを完成することが必要である。筆者らは、Wilson病の非侵襲的確定診断法を開発することを目的として、末梢血細胞の細胞膜における銅依存性ATPase活性の測定法を検討した。Wilson病症例、銅欠乏性の遺伝性銅代謝異常症であるMenkes病および正常コントロールにおける測定結果を比較し、銅依存性ATPase活性の測定が、Wilson病の新しい診断法になりうるか否かを検討した。

研究方法

対象は古典的Menkes病症例1例とその母親（保因者）、Wilson病症例5例、および正常コントロール2例であった。
方法（銅特異的ATPase活性測定）：1)上記した対

象のリンパ球をEB virusにて不死化し培養した。2)細胞を溶解し、膜成分を抽出した。3)Sodium azide、ZnSO₄、Ouabainにて非特異的にATPase活性を阻害した。4)ATPおよびCuSO₄を加え、37℃60分反応させ銅特異的ATPaseを活性化した。5)発色剤を加えA820nmを測定することにより、ATPの酸化的リン酸化の変化を測定した。

研究結果

1. 正常コントロールとして用いた培養リンパ球のATPase活性は、3種類のATPase阻害剤を加えることにより、前値の約20%に低下した。次に銅を加え反応させることにより、ATPase活性は上昇し、前値（阻害剤投与前）の約150%に達した。
2. Menkes病症例および保因者においてもコントロール同様ATPase阻害剤の投与により、ATPase活性は前値の約20%に低下した。銅負荷により共に活性は上昇したが、保因者にて前値（阻害剤投与前）の約80%、Menkes病症例にては約60%の上昇にとどまった。
3. 正常コントロールにおける銅負荷後の値を100%として、Menkes病、その保因者およびWilson病5症例のATPase活性を比較した。その結果、Menkes病症例は正常コントロールの $29.1 \pm 4.2\%$ に、保因者は $48.2 \pm 1.9\%$ に低下していた。Wilson病5症例は、それぞれ 46.8 ± 4.1 、 47.5 ± 4.6 、 48.2 ± 1.9 、 53.2 ± 7.4 、 56.1 ± 3.3 および $60.5 \pm 0.3\%$ と、Menkes病症例程ではないものの、やはり明らかに低い値を呈していた。

考察

正常コントロールの培養リンパ球において、ATPase阻害剤により低下したATPase活性が銅の投

与により上昇することより、銅特異的ATPaseの活性は、銅負荷前後の酸化的リン酸化の変化をみることにより測定が可能であった。銅輸送P-type ATPaseである、ATP7Aおよび7B蛋白の機能を、本法を用いて解析することができると考えられた。

今回、Wilson病症例5例において、その培養リンパ球における銅刺激によるATPase活性の上昇、すなわち銅特異的ATPase活性は、正常コントロールの約45-60%と明らかに低下していた。これは、ATP7B蛋白の機能障害を反映していると考えられる。本法はWilson病の原因となっている蛋白の機能を直接測定する方法であり、本症の診断に極めて有用であると考えられた。本研究においては培養リンパ球を使用した。現在末梢血より分離した白血球を用いて同様の実験を行っており、より簡便・敏速な測定が可能となると考えられる。

本法の問題点は、ATP7Aと7B蛋白の活性を同時に測定しており、両者を区別することができない点にある。また、銅刺激による活性上昇の程度が

Menkes病にて正常の約30%、Wilson病では約45-60%と、リンパ球における銅代謝にはATP7A蛋白がより強く機能していると推察された。Wilson病の診断をより正確・確実に行うには、選択的にATP7B蛋白の活性を測定する方法の開発が望まれる。今後、ATPase阻害剤の工夫や、抗ATP7A蛋白抗体などを用いてATP7A蛋白と7B蛋白の活性を分離する方法を検討する予定である。

結論

Wilson病、Menkes病、Menkes病保因者および正常コントロールの培養リンパ球の細胞膜における銅依存性のATPase活性を測定した。Menkes病症例において、銅依存性ATPase活性はコントロールの約30%程度に低下していた。Wilson病症例においては、約45-60%であった。これらの結果より、本法がWilson病(Menkes病も含みうる)の新しい診断法になりうる可能性が示唆された。

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

ESI-MS/MS新生児マススクリーニングの再検討

研究要旨

タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常症マススクリーニングについて、前処理法や分析法の改良により、6万検体/年/台以上の処理能力が可能となった。これまで1年10ヶ月のパイロットスタディで約23,000検体を処理し、1例のプロピオン酸血症患者を発見し、低蛋白食とカルニチン投与により良好な治療効果を得ている。さらにスクリーニング対象を拡大し、このマススクリーニングの有用性を実証していく予定である。なお、後方視的な検討により、スクリーニング対象疾患の多くは診断可能であることが確かめられているが、今回合成した安定同位体標識シトルリンを用いるシトルリン微量定量法での尿素サイクル異常症のスクリーニングについては、未だ症例での測定経験が無いので更に検討を行う予定である。

このスクリーニング法は、新生児血液濾紙を使用し、現行マススクリーニングの対象疾患のアミノ酸代謝異常症もスクリーニング出来るので、正規の新生児マススクリーニング事業として早期に採用されるべき方法と考えられる。

研究協力者

重松陽介

(福井医科大学小児科)

研究目的

現在新生児マススクリーニングに用いられている方法では、各々の疾患について診断指標物質をそれぞれ血液濾紙小片1個を用いて別個の検査法で測定している。このような方法では、上記以外の疾患をスクリーニング対象に追加しようとする場合、診断指標物質測定のための手間と費用が増える上、対象疾患の個々の頻度が極めて希であるので、スクリーニングの効率も低下する。これに対して、1回の測定で多数の疾患を診断できる方法を用いれば、上述の問題点は解決できる。このような測定が可能な方法の1つとして、エレクトロスプレー・タンデム型質量分析法(ESI-MS/MS)が挙げられる。この研究の目的は、ESI-MS/MS法を採用した場合の問題点と有用性について、スクリーニング対象疾患と検体処理能力の点から検討し、現行のスクリーニング事業に追加採用できるかどうかを明らかにすることである。

研究方法

(1) 分析対象

ESI-MS/MS法では、新生児ろ紙血を分析検体として使用する。平成9年度より開始したパイロットスタディでは、福井県内の現行新生児マススクリーニングで採取されたろ紙血、及び福井県以外の協力医療機関で出生した新生児より採血されたろ紙血を、同意を取得して、分析している。平成10年度も引

き続き同じ形式でパイロットスタディを行った。また、後方視的に、患者のろ紙血も収集し分析した。対象疾患は表1の通りである。

(2) 分析方法

前処理：ESI-MS/MS法では、ろ紙血中のアシルカルニチンとアミノ酸を測定する。それらを血液濾紙から抽出し誘導体化する前処理法の原則は、ESI-MS/MS法を試みている諸外国の検査機関においても変わらないが、今回、処理の迅速化を目的としてマイクロプレートを用いた方法を検討した。血液ろ紙の打ち抜きは、打ち抜き範囲を確認する必要があるため、手作業で行った。血液ろ紙打ち抜き片各1個を96穴マイクロプレートに入れ、内部標準を含むメタノールで抽出し、抽出液は別の96穴マイクロプレートに移す。これを特製のマイクロプレート用ノズルを備えたドライサーモバスにより窒素気流下で乾涸し、誘導体化試薬を加え、密閉蓋でシールし加熱誘導体化する。誘導体化試薬は同様に窒素気流で乾涸し、分析用50%アセトニトリル溶液に再溶解する。

MS/MS分析：検体は、96穴マイクロプレート対応のオートインジェクタで連続注入し分析した。1検体のMS/MS分析時間は1.3分、サンプル注入間隔は2.3分である。MS/MS分析は表2に示した条件で行った。分析感度向上を目的に、CIDの衝突エネルギー条件の最適化を行った。アミノ酸分析において、シトルリンの微量分析のために重水素標識シトルリンを合成し、専用のスキャンモードを設定した。分析データの処理、及び診断判定は既報の通りの方法で行った。

研究結果

(1)検体処理能力

今回、マイクロプレートを使用した前処理法を採用した。96穴マイクロプレート1枚分の検体の処理時間は約1.5時間であるが、待ち時間に併行して複数枚のプレートの処理が行えるので、大量のろ紙検体の処理でも、処理時間はあまり増えず、手間もかからなかった。

MS/MS分析時間は96穴マイクロプレート1枚あたり約4時間である。午前中に検体前処理を行い、測定を開始し自動運転による分析を行うと、1日8時間の勤務条件で1人の担当者によりプレート3枚の分析が可能であった。

(2)ESI-MS/MS分析方法

現行スクリーニングの対象疾患であるアミノ酸代謝異常症のスクリーニング指標アミノ酸及びアルギニンの定量精度が良好であることは、既に報告してあるので省略する。

シトルリンの定量については、2-200nmol/mlの濃度範囲において良好な直線性が得られた。この方法による対照新生児のシトルリン濃度は、 16.7 ± 6.2 nmol/mlであった。現在、シトルリンの下限カットオフ値を7.0nmol/mlとしてスクリーニングを行っている。

アルギニノコハク酸尿症の診断にアルギニノコハク酸濃度をモニターしているが、重水素標識内部標準が得られないので、アルギニン測定の内標準を流用して半定量を行っている。対照新生児ではアルギニノコハク酸濃度は極めて低いので正常範囲が設定できないものの、患者血液濾紙の分析では感度よく定量出来ることが確認できた(図1)。

イソ吉草酸血症のスクリーニングに炭素数5のアシルカルニチン濃度を指標としているが、ピボキシル型抗生剤を服用すると同じ分子量であるピバロイ

ルカルニチンが生じて偽陽性となる。このようなケースが特定の医療機関を中心に増加しており、この方法でのスクリーニングに支障が生じている。

(3)疾患の発見頻度

これまで約23,000の新生児をスクリーニングし、1例のプロピオン酸血症を発見した。患者は診断時無症状で、特殊ミルクを使用した低蛋白食とL-カルニチン服用により、急性発症することなく順調に成長発達がみられている。

考察

今回採用した前処理法は、血液ろ紙の打ち抜き範囲を確認しなければならないため、完全自動処理法ではないが、以前の試験管法と比べ、手間と時間が大幅に軽減され、短時間で大量の検体処理が可能であることが確認できた。これまでのパイロットスタディでは年間約12,000新生児の分析を行ってきたが、この前処理法とMS/MS分析法を用いれば、その6倍程度の大量処理が可能であるので、今後分析数を増やし、更にESI-MS/MS新生児マススクリーニングの有用性を検討していきたい。

更に多くの患者がスクリーニングされて来た場合、それぞれの重症度にあわせた治療法の選択やその開始時期についても検討が必要になると考えられる。諸外国での成果も参考にしながら、スクリーニングの質を向上させていかねばならないと考えている。

結論

ESI-MS/MSによる新生児マススクリーニングは、現行のアミノ酸代謝異常症のスクリーニングにおいても測定精度向上という利点があり、更に多くの治療可能な代謝異常症のスクリーニングができると考えられるので、積極的に推進されるべきものであることを更に明らかにしていきたい。

表1 ESI-MS/MSによるスクリーニング対象疾患

<有機酸代謝異常症>	<アミノ酸代謝異常症>
メチルマロン酸尿症	フェニルケトン尿症
プロピオン酸血症	メープルシロップ尿症
イソ吉草酸血症	ホモシスチン尿症
グルタル酸尿症I型・II型	シトルリン血症
3ヒドロキシ3メチルグルタル酸尿症	アルギニノコハク酸尿症
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	アルギナーゼ欠損症
脂肪酸酸化異常症	カルバミルリン酸合成酵素欠損症
(アシルCoA脱水素酵素欠損症など)	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症

Table 2 Scan functions in ESI-MS/MS for neonatal screening

Order	Scan function	Collision energy (eV)	Scan Range (m/z)	Time (sec)	Target analytes
1	precursor ions of m/z 85	-30	250-500	2.0	acylcarnitines
2	product ions of m/z 459	-30	140-174	0.5	argininosuccinic acid
3	neutral loss of m/z 161	-26	231	0.1	arginine
4	neutral loss of m/z 163	-26	237	0.1	arginine-13C6
5	neutral loss of m/z 102	-18	140-242	1.0	amino acids*
6	neutral loss of m/z 56	-12	128-136	0.3	glycine
7	neutral loss of m/z 119	-18	185-197	0.3	ornithine
8	neutral loss of m/z 162	-26	228-240	0.3	citrulline

*alanine, valine, leucine, glutamine, phenylalanine, tyrosine

図1 アルギニコハク酸ブチルエステル疑似分子イオン(m/z 459)のプロダクトイオンスペクトル：
 [A] アルギニコハク酸尿症患者ろ紙血、[B] アルギニコハク酸標品。スクリーニングでは、
 構造式中に示したm/z172とm/z144の2つのプロダクトイオンの強度をモニターする。

