

表 1

疾患名	1990-1999				1976-1984			
	症例数	生存	死亡	不明	症例数	生存	死亡	不明
メチルマロン酸血症	65	44	17	4	47	14	22	11
プロピオン酸血症	30	14	14	2	18	8	4	6
イソ吉草酸尿症	4	4	0	0	6	4	1	1
ホロカルボキシラーゼ欠損症	10	9	1	0	3	3	0	0
グルタル酸尿症1型	3	3	0	0	2	2	0	0
グルタル酸尿症2型	4	4	0	0	0			
β ケトチオラーゼ欠損症	2	2	0	0	1	1	0	0
ジカルボン酸尿症	2	2	0	0	2	0	2	0
メープルシロップ尿症	1	1	0	0	0			
グリセロールキナーゼ欠損症	3	3	0	0	0			
メトロクロトニルCoAカルボキラーゼ欠損症	1	0	0	1	0			
3-ヒドロキシ3-メチルグルタコン酸尿症	3	2	1	0	0			
アルカプトン尿症	2	2	0	0	0			
フルクトースジフォスファターゼ欠損症	1	1	0	0	0			
高シュウ酸尿症	1	0	0	1	0			
HMG-CoA リアーゼ欠損症	1	1	0	0	0			
小計	133				79			

表 2

高乳酸血症									
高乳酸血症	31				32				
ミトコンドリア脳筋症	26				5				
ミトコンドリア病KSS	3								
ミトコンドリア病MELAS	36								
ミトコンドリア病MARF	1								
ミトコンドリア病Liegh	18								
ミトコンドリア病Peason	3								
ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症	21				16				
ピルビン酸カルボキシラーゼ異常症	1				5				
高乳酸血症coplex I異常症	1								
高乳酸血症CCO異常症	10				5				
NADH cytochrome c reductase異常症	1								
小計	152	97	50	5	66	41	23	2	

表 3

脂肪酸代謝異常									
全身性カルニチン欠損症	2								
脂肪酸代謝異常疑い	1								
極長鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症	1								
トランスロケース欠損症	1								
その他	4				2				
合計	294				147				

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

血液ろ紙を用いたGC/MSによる β 酸化異常症スクリーニング法の開発

研究要旨

脂肪酸 β 酸化異常症のスクリーニング法として、血液ろ紙を用いたGC/MSによる血中脂肪酸分析法を開発した。ろ紙血3mmパンチ5個をメチル化して、ヘキサンで抽出し、GC/MS（電子衝撃法/SIM法）で分析する。前処理の簡略化された方法である。内部標準nonanoic acid, tridecanoic acidをサンプルに加えメタノールと塩化アセチルでメチル化し、octanoic acid (C8), decanoic acid (C10), 4-decenoic (C10:1), 5-tetradecenoic acid (C14:1)を測定した。対象としてMCAD欠損症3例, VLCAD欠損症1例, グルタル酸尿症2 (GA2) 1例, ケトーシス5例, 正常対照5例を分析した。正常対照例でもC8, C10は測定可能であった。MCAD欠損症でC8, C10の増加とC10:1が検出され, GA2ではC10:1とC14:1, VLCAD欠損症ではC14:1が検出された。本法によって血液ろ紙検体を用いた β 酸化異常症のスクリーニングの可能性が示された。

研究協力者

木村正彦, 山口清次 (島根医科大学小児科)

研究目的

脂肪酸 β 酸化異常症は安定期には無症状で、感染・下痢あるいは長時間の飢餓時などに急性の代謝不全症状を呈する。早期診断されると発作予防が可能であるため、スクリーニングの意義が大きい疾患である。

脂肪酸 β 酸化異常症のスクリーニング法として、従来から尿有機酸分析やアシルグリシン分析があり、最近ではタンデムマススペクトロメトリー分析が広く行われるようになってきた。血中脂肪酸分析も従来から行われ、通常のガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC/MS) でも測定できるにもかかわらず、一般に普及していない。脂肪酸 β 酸化異常症の診断には複数のスクリーニング結果を総合に判断して、酵素活性測定などの特異的検査で確定診断に至ることが多い。われわれは血液ろ紙を用いて簡便で測定感度の高いGC/MSによる血中脂肪酸分析法を開発したので報告する。

研究方法

乾燥ろ紙血 (ガスリーろ紙) を直径3mmのパンチ小片5個を1.5mlのマイクロチューブにとり、内部標準としてnonanoic acid, tridecanoic acidをそれぞれ1nmol添加し、メタノール500 μ lを加えた。氷上で塩化アセチル10 μ lを加えて室温で40分間攪拌しメチル化した。ついで6%炭酸カリウム300 μ lを加えた。ヘキサンを150 μ l加え溶媒抽出したのちヘキサンの層をGC/MS分析した。上記の前処理は

マイクロチューブ一本で行った。GC/MS分析は島津QP5000で、DB-5キャピラリーカラムを用いて、イオン化は電子衝撃法 (EI法) で行った。気化室275 $^{\circ}$ C, インターフェイス300 $^{\circ}$ Cとし、カラム温度を45-225 $^{\circ}$ Cまで昇温して分析した。イオンの測定はSelective ion monitoring (SIM) モードで、octanoic (C8), decanoic (C10), 4-decenoic (C10:1), 5-tetradecenoic acid (C14:1)を測定した。

また本測定系の基礎データとして、1) 上記4種類の脂肪酸を含む標準液を用いて、0.01から0.5nmol/mlまでの直線性、および1nmol/ml溶液を用いて分析値の再現性 (5回測定)、2) 同一の血液ろ紙の3mm小片を1, 2, 5, 10枚にかえた時の標準曲線の直線性、および同一の血液ろ紙3mm小片5枚での分析値の再現性 (5回測定) をそれぞれの脂肪酸について検討した。

分析した検体は、中鎖アシル-CoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症3例および極長鎖アシル-CoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症3例, グルタル酸尿症2型1例, ケトーシス5例, 正常対照5例である。

研究結果

1) 4種類の脂肪酸を含む標準液の濃度を0.01から0.5nmol/mlまで変えた時、相関係数 r^2 は0.992~1.0と良好な相関を示した。1nmol/mlの標準液5回の測定では再現性 (Coefficient of variation: CV) は1.5~6.9%と良好であった。

2) ガスリーろ紙血3mmパンチを1~10個を用いた時の直線性 (相関係数) は、 r^2 が0.961~0.999であった。ガスリーろ紙血3mmパンチ5個を5回別々に分析した時の再現性は1.5~14.9%で

あった。健常児でもC8, C10は測定可能であった。MCAD欠損症3例全例においてC8, C10の増加が認められ、さらにC10:1が検出された。GA2ではC8, C10の増加がみられ、さらにC10:1とC14:1が検出された。VLCAD欠損症ではC14:1が検出された(表1)。

考察

脂肪酸β酸化には複数の反応が関与するため、その代謝異常症を正確に特定することはしばしば困難を伴う。そのため、血清カルニチン分析、尿中有機酸分析、アシルグリシン分析、アシルカルニチン分析、そして今回報告した血中脂肪酸分析などのスクリーニング法を組み合わせる必要がある。

脂肪酸β酸化異常症のなかで、MCAD欠損症では血中遊離脂肪酸は4-decenoic acid (C10:1)がみられ、VLCAD欠損症では5-tetradecenoic acid (C14:1)が特徴的に増加することは知られていた^{1, 2, 3)}。またGA2ではこの両者が増加するといわれる。今回開発した方法でも従来と同様の結果を得ることができた。本法はOnkenhoutらの方法2)を基礎にして改良を加えた方法である。すなわち、GC/MS分析でのイオン測定にSIM法を用いたこと、前処理をマイクロチューブ1本で行うことの2点で工夫した。これにより微量の検体で感度良く測定することが可能になり、手技も簡便になった。現在主

流となっているタンデムマス法は感度の面でまだ検討の余地があるが、今回の方法とタンデムマス法を組み合わせで診断すれば相補的な役割を果たすことが期待できる。本症スクリーニングに応用することにより、β酸化異常症の化学診断の精度を高めることができる。

参考文献

- 1) Morton H, Kelley RI. Diagnosis of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the neonatal period by measurement of medium-chain fatty acids in plasma and filter paper blood samples. *J Pediatr* 117: 439-442, 1990.
- 2) Onkenhout W, Menizelos V, van der Poel PFH, Van den Heuvel MPM, Poorthuis BJHM. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin Chem* 41: 1467-1474, 1998.
- 3) Martinez G, Jimenez-Sanchez G, Divry P, Vianey-Saban, Riudor E, Rodes M, Briones P, Ribes A. Plasma free fatty acids in mitochondrial fatty acid oxidation defects. *Clin Chim Acta* 267: 143-154, 1997.

表1. 血中遊離脂肪酸分析結果

疾患名		C8	C10	C10:1	C14:1	
VLCAD欠損症	(N=3)	1.8	2.1	nd	10.4	*
		4.1	3.1	7.9	19.8	*
		3.4	7.4	nd	74.1	
MCAD欠損症	(N=3)	7.6	5.0	1.0	nd	
		19.7	11.2	6.8	nd	*
		25.2	12.9	13.9	nd	*
グルタル酸尿症2型	(N=1)	18.5	30.8	1.4	24.7	
MCTミルク	(N=1)	119.7	9.7	nd	nd	*
ケトーシス	(N=5)	3.6-9.6	3.5-17.2	nd	nd	
正常対照	(N=5)	2.3-5.5	2.1- 4.9	nd	nd	

umol/L whole blood (* : umol/L serum)

nd: not detect

C8=octanoic acid; C10=decanoic acid; C10:1=4-decenoic acid; C14:1=5-tetradecenoic acid;

VLCAD=very long chain acyl-CoA dehydrogenase;

MCAD=medium chain acyl- CoA dehydrogenase; MCT=midium chain triglyceride

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による新生児代謝異常マススクリーニング
—パイロットスタディ地域の拡大と患者検体の分析による知見の蓄積—

研究要旨

有機酸代謝異常症と現行スクリーニング対象疾患以外のアミノ酸代謝異常症に対象疾患を拡大したESI-MS/MS新生児代謝異常マススクリーニングの有用性を検討するために、パイロットスタディ地域を昨年度までの福井県を中心とした体制から、本年度後半には広島県、徳島県にも拡大し、月間スクリーニング件数が約3,000検体と増加し、累積検査件数は44,653検体に達した。スクリーニングにより見いだされた患者は未だプロピオン酸血症1例のみであるが、この患者は早期治療により急性発症は経験することなくほぼ順調に経過している。シトルリンの持続的低値によりオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症とカルバミルリン酸合成酵素欠損症のスクリーニングを試みており、要再検率は約0.1%である。少数のこれら患者濾紙血でのシトルリン低値は確認できた。新生児期発症のシトルリン血症では、シトルリンの異常高値により容易にスクリーニング出来た。脂肪酸酸化異常症患者の新生児期濾紙血のアシルカルニチン分析を行って見たところ、急性発症時の典型的な異常とは異なることがあり、身長に対応する必要があると考えられた。

研究協力者

重松陽介（福井医科大学医学部看護学科）

研究目的

タンデム型質量分析計（ESI-MS/MS）による新生児濾紙血スクリーニングでは、現行のフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症以外に尿素サイクル異常症や有機酸代謝異常症もスクリーニングすることができる。これまで、本スクリーニングの技術的な検討を福井県を中心とした小規模なパイロットスタディで行ってきた。しかし、本スクリーニングの対象疾患の頻度は希であるため、早期発見・早期治療というマススクリーニングの有用性を確かめるには大規模なスクリーニングが必要である。今回、スクリーニング実施地域を更に拡大し、スクリーニングシステムがうまく機能するかどうかを検討した。また、対象疾患と診断された患者の新生児期血液濾紙を収集し、スクリーニングが確実に行えるかどうかにも更に検討した。

研究方法

(1)対象

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濾紙血、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濾紙血を、同意を取って分析して来た。平成11年度は、これらに加え、4月より広島県、また11月から徳島県においても、同

意が得られたも濾紙血の分析を行った。

スクリーニングを迅速に行う目的で、スクリーニング検査機関に郵送された血液濾紙を本スクリーニング用に一部切り離して登録番号をつけ、福井県と徳島県は週1回、広島県は週2回、ESI-MS/MS分析機関である福井医大小児科に郵送した。

引き続き、後方視的に患者の濾紙血も収集し分析した。

(2)分析方法

前処理：昨年度より採用した96穴マルチプレートを用いた前処理を行った。その手順は概略以下の通りである。血液濾紙は、打ち抜き範囲を目視し、手作業で打ち抜きを行った。血液濾紙打ち抜き片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した。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した。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した。シトルリン微量定量のために、新たに重水素標識シトルリンd3-citrullineを合成し、内部標準として使用した。

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1.4分、サンプル注入間隔は2.3分とした。分析イオンを選択することにより、特定のアミノ酸のみを定量した。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) 検体処理能力と分析検体数

96穴マイクロプレートを使用した前処理法を行うことで、1人で3-4プレートを約2-3時間で処理できた。この検体は、ESI-MS/MS自動分析（プレート1枚あたり約3時間）により1日で測定できた。年間検体処理能力は計算上約10万検体であるが、現時点では血液濾紙検体の収集数は月約3,000検体であり、これを、前処理1名と機器の維持整備・データ処理1名の2人体制で実施した。平成11年1月から12月までに22,476検体を分析し、平成9年4月のパイロットスタディ開始以来の分析検体数は44,653検体となった。

(2) 対象疾患と分析実績

尿素サイクル異常症のなかで、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症とカルバミルリン酸合成酵素欠損症については、シトルリンの持続低値でスクリーニングを試みている。前年度は内部標準としてd6-citrullineをシトルリンの定量を行い、標品の分析では2-200nmol/mlの濃度範囲において良好な直線性が得られたものの、サンプルの分析では再現性に問題がある場合があった。これは内部標準の重水素標識数と標識位置がMS/MS分析上不適切であるためと考えられたので、これを解決する目的でd3-citrullineを合成した。平成11年11月からこの内部標準を使用し、シトルリンの下限カットオフ値を7.9nmol/mlとし、再検査により持続性に低値を示す症例を要精検とした。再検査率は約0.1%であった。患者検体の測定では、生後2週目発症オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者の新生児期濾紙血シトルリン濃度は3.2nmol/mlであり、1歳時に急性発症したカルバミルリン酸合成酵素欠損症患者の新生児期濾紙血シトルリン濃度は5.3nmol/mlであった。

2例の新生児期発症シトルリン血症患者の新生児期濾紙血シトルリン濃度は共に1,000nmol/ml以上の著しい高値であった。

乳児期発症メチルマロン酸尿症2例の新生児期濾紙血propionylcarnitine濃度はカットオフ値より明らかに高値で、スクリーニング可能であった。

乳児期発症グルタル酸尿症II型患者の新生児期濾紙血アシルカルニチンプロファイルは、報告されている急性発症時のパターンと必ずしも同一ではなかったが、スクリーニングは可能であった。

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症I欠損症患者の濾紙血アシルカルニチン分析で、長鎖アシルカルニチンの著減が判明したが、新生児

期濾紙血での分析は未だ検討できていない。

(3) スクリーニングで見いだされた患者

これまで本スクリーニングで発見した患者はプロピオン酸血症1例のみである。患者は1歳10ヶ月の時点で、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、小柄ながらもほぼ順調に成長発達がみられている。

考察

マルチプレートを使用した前処理法を行い、MS/MS分析時間の短縮を計ることで、月間約3,000検体以上の処理を人員名で実施できる体制になった。スクリーニング地域が拡大し検体数が増加したことで、新たな疾患のスクリーニングにつながるものと期待している。スクリーニングの迅速性の観点からは、このパイロットスタディでは濾紙検体の送付体制に不十分な点があり、センター機関による集中分析体制でスクリーニングを実施する場合には改善すべきと考えられた。

持続的なシトルリン低値による尿素サイクル異常症スクリーニングでは、未だ患者は見いだされていない。カットオフ値の妥当性や、精検方法について今後検討する予定である。

今回の脂肪酸酸化異常症患者の新生児期濾紙血での検討で、発症前のアシルカルニチンのプロファイルが、報告されているような急性発症時のパターンと異なる場合のあることが明らかとなった。スクリーニング後の精査に向けて慎重に対応する必要があると考えられた。

スクリーニングされて来た患者の対応については、それぞれの重症度にあわせた治療法の選択やその時期についても検討が必要になると考えられる。スクリーニングで発見した患者での経験を踏まえ、更に検討していく必要がある。

結論

EESI-MS/MSによる新生児マススクリーニングは、大規模検体処理が可能であり、その特性を生かして検討を行っているが、新たな対象疾患について、スクリーニング後の診断手順などの課題についても検討を進めていく予定である。

文献

- 1) 重松陽介, 布瀬光子, 畑 郁江, 眞弓光文, 須藤正克, 田中幸枝. Electrospray Tandem Mass Spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 8:13-20,1998.
- 2) Shigematsu, Y., Hata, I., Kikawa, Y., Mayumi,

M., Tanaka, Y., Sudo, M., Kado, N. :
Modifications in electrospray tandem mass
spectrometry for a neonatal-screening pilot

study in Japan. J Chromatr B Biomed Sci App
731:97-103, 1999.

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

遺伝性ムコ多糖症の試験的スクリーニングの現状と問題点

研究要旨

遺伝性ムコ多糖症の早期診断システムの確立を目的として、岐阜県の6ヶ月児尿を用いたムコ多糖症の試験的スクリーニングを行った。方法は尿中GAG (glycosaminoglycan)をDMB法にて測定しクレアチニン比を算出した。cut off値を400 mg GAG/g creatinine に設定した。1993年10月から1999年12月までの結果は以下のとおりであった。1次スクリーニング数108,173検体、陽性は1877検体（1.7%）、2次スクリーニングは1436検体（再検率：77%）について行い、DMB法で陽性となった85検体は、精査として尿中GAGをCPC沈殿法にて分離しウロン酸を測定したところ、全て陰性であった。試験的スクリーニングの当初の目標数である100,000検体を測定したが、まだ患者は見出されていない。現行パイロットスタディの設定の見直しが求められた。

研究協力者

折居忠夫 （中部学院大学人間福祉学部）
祐川和子、山田美保 （岐阜大学医学部小児科）

研究目的

ムコ多糖症の治療法は、骨髄移植に続いて酵素補充療法が開発されつつあり、その効果に期待がもたれている。そして発症前の早期治療がより効果的であることが示されているが、乳児期早期に診断されるムコ多糖症は極めて少なく、早期診断システムの開発が待たれている。1993年10月から岐阜県の6ヶ月児尿によるスクリーニング法のパイロットスタディを継続して行い、適性の検討を加えてきた1) 2)。本年度も継続して実施するとともに、これまでの結果を基にして現行パイロットスタディ設定の見直しを行った。

研究方法および対象

1) 岐阜県の神経芽細胞腫マスキリーニングシステムによって収集され、インフォームドコンセントが得られた、6ヶ月乳幼児尿108,173検体をスクリーニングした。

2) 検査方法は、1次スクリーニングはDMB法にてGAGを測定し、クレアチニン比を算出した。GAG測定機器は93年から1995年7月まではCOBAS MIRA自動分析装置を使用し、以後はマイクロプレート法にて測定した3)。2次スクリーニングはDMB法とCPC沈殿/carbazol法を併用した。クレアチニンはJaffe法により測定した。

研究結果と考察

1) 6ヶ月児尿によるスクリーニング結果

1993年10月から1999年12月までのスクリーニング結果を表1に示す。検体数は年間約17,000あり、6年間で108,173名のGAGを測定した。1次スクリーニングでcut off値に設定した400 mg GAG/g Creatinine以上を示した陽性数は1877例（1.7%）であった。陽性者には採尿方法と容器を同封した尿再提出の依頼書を発送した。1436例から再検尿が届き（再検率：77%）、1次スクリーニングと同じDMB法にてGAGを測定した。2次スクリーニングで再陽性を示した85例は、同一尿を用いてCPC沈殿/carbazol法にて精査を行ったが、最終的には陽性例は0であった。

2) スクリーニング法の問題点

岐阜県において1993年以降に誕生し、ムコ多糖症と診断された症例はまだ確認されていない。出生前診断にてHunter病と診断された例が1例あるが、この症例は出生していない。したがってこれまでの試験的スクリーニング期間においては、陽性例が出て来なかったとも考えられるが、今回パイロットスタディの見直しを試みた。

1. cut off値の設定：先に約1000名の6ヶ月児尿中GAG/creatinineを測定し、平均値+2SD(400mg/g)をcut off値とした。この設定で1次スクリーニングの陽性率は年間1.2-2.6%であった。また1才以下のムコ多糖症13例の値は有意に高値を示し、cut off値の設定は適当であると判断してパイロットスタディを継続していた。しかし実際にcut off値の設定が適当であったか否かは、現時点では明らかではない。図1に3年間の月別GAG/creatinine測定値を示す。夏期の測定値が、他の季節の値より低い傾向が観察された。統計学的には夏期とその他の季節との間で有意な差は認めら

れなかったが、検体として原尿を利用した本法では、季節変動の影響が予測していたより大きかった可能性も考えられた。

2. 2次スクリーニング受検率：1次スクリーニング陽性数は6年間で1877例あり、その中の1436例(77%)は2次スクリーニングを行ったが、残り441例(23%)は再検査がなされておらず、未解決の状態であり、追跡調査が必要である。

3. 試験的スクリーニングの実施地域：現行パイロットスタディは岐阜県の1地域のみ行われており、本邦での全体像を把握できていないことは明らかであり、広範囲な地域での実施が求められる。

今後の方針として、問題点を基に現行スクリーニング法を再検討し、評価を行う。そしてさらに有効な早期診断システムを開発し、ムコ多糖症の効果的治

療へと結びつけて行きたい。

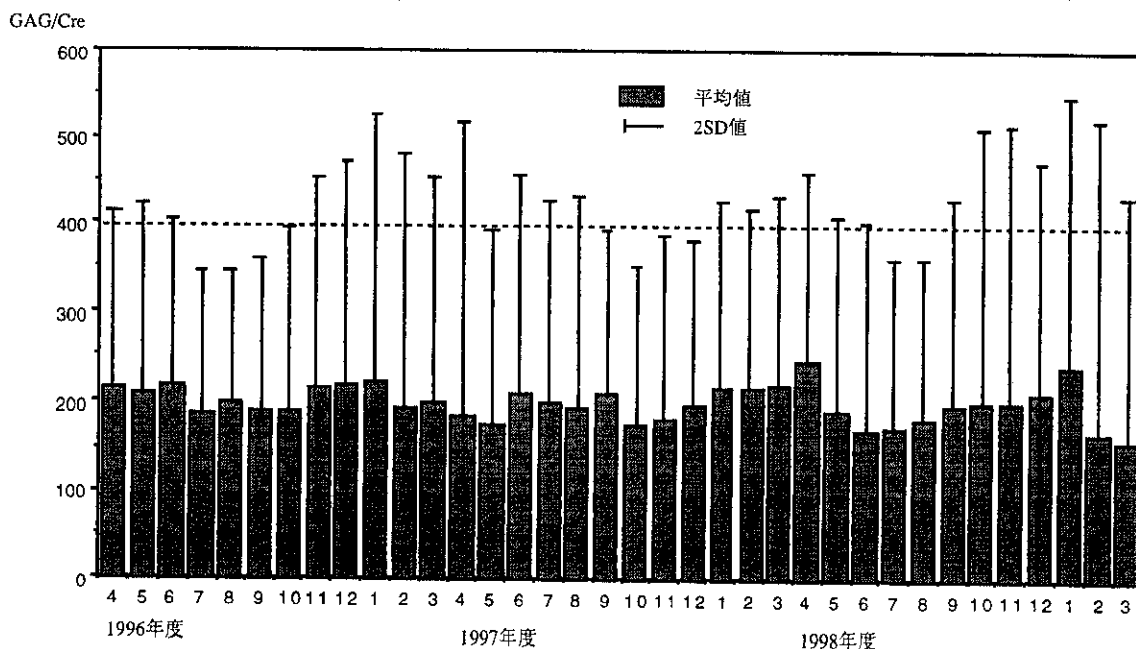
文献

1. Iwata S et al.: Mass screening test for mucopolysaccharidoses using the 1,9-dimethylmethylen blue method: Positive interference from paper diapers. Clin Chim Acta 1997; 264:245-250
2. 祐川和子, 他: ムコ多糖症マススクリーニングの導入に求められる条件の検討. 日本マススクリーニング学会誌1998; 8:47-51
3. 岩田晶子, 他: ムコ多糖症マススクリーニング: 自動分析法とマイクロプレート法の比較検討. 厚生省心身障害研究 新しいスクリーニングのあり方に関する研究平成6年度報告書 60-62

表1. ムコ多糖症マススクリーニング結果 (1993.10~1999.12: 岐阜県)

	例数	陽性数 (陽性率)	再検数 (再検率)	再検時陽性数 DMB法 (陽性率)	再検時陽性数 UA/Cre法 (陽性率)
93年度 (10月~3月)	9,449	248(2.6%)	204(82%)	7(3.4%)	0(0%)
94年度 (4月~3月)	17,001	400(2.4%)	338(85%)	17(5.0%)	0(0%)
95年度 (4月~3月)	17,137	257(1.5%)	197(77%)	6(3.0%)	0(0%)
96年度 (4月~3月)	17,212	207(1.2%)	145(70%)	15(10%)	0(0%)
97年度 (4月~3月)	17,552	215(1.7%)	181(85%)	17(9.0%)	0(0%)
98年度 (4月~3月)	17,342	316(1.8%)	210(66%)	12(5.7%)	0(0%)
93年度 (4月~12月)	12,480	234(1.8%)	161(69%)	11(6.8%)	0(0%)
総数	108,173	1877 (1.7%)	1436 (77%)	85 (5.9%)	85 (0%)

図1. 岐阜県における6か月乳幼児尿中のグリコサミノグリカンの月別測定値



分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

先天性ムコ多糖症の骨髄移植の効果とマスキングの意義

研究要旨

大阪市立大学小児科では、1995年より、尿濾紙を用いて生後1か月児を対象に先天性ムコ多糖症のマスキングを行ってきた。1995年7月～1999年12月の検体数は5,926、1次マスキング陽性率は3.0%、2次マスキング陽性率は0.17%で、まだ患者は発見されていない。近年、米国においてムコ多糖症型に対する酵素補充療法が開発され、効果が認められている。他方、骨髄移植が先天性ムコ多糖症の治療法として急速に普及してきた。骨髄移植の効果は病型により異なり、症例によっても様々に報告されている。骨髄移植後、我々の施設で長期間経過観察された3症例の臨床所見を解析し、移植の効果とマスキングの意義を検討した。MPS VIの1症例では移植の効果は著明であった。MPS IIの2症例では移植の効果に明らかな差があった。I型、II型、VI型は、尿中異常ムコ多糖排泄が著明であることから、マスキングで見つかりやすい。骨髄移植の効果においては、I型、VI型において最も良好であり、II型の軽症のものはこれに次ぐと考えられる。従って、早期発見による早期治療の効果が良好である患者の多くは、マスキングにより発見し得ると考えられ、マスキングは有用であると判断された。

研究協力者

田中あけみ (大阪市立大学医学部小児科)

研究目的

先天性ムコ多糖症の日本における患者頻度は約4万人に1人と考えられ、先天性代謝異常症の中では比較的頻度が高い。1981年ころより、先天性ムコ多糖症の有効な治療法として骨髄移植が注目されてきたが、近年急速に普及してきている。他方、1998年より、米国においてI型の酵素補充療法が始まり、日本においても平成12年には臨床治験が始められる予定である。こういった背景から、先天性ムコ多糖症のマスキングの必要性は高まりつつある。しかしながら、現在では、I型以外では、骨髄移植しか治療法はないうえ、病型、症例により効果が異なる。骨髄移植の効果度とマスキングの効果度について検討した。

また、1995年より1999年までの当施設で行ったマスキング結果もまとめた。

研究方法および対象

【症例】症例1：25歳 女性、MPS VI。14歳時、酵素活性正常の弟をドナーとして骨髄移植を受けた。
症例2：18歳 男性、MPS II 軽症型。9歳時、ヘテロ保因者の妹をドナーとして骨髄移植を受けた。
症例3：8歳 男児、MPS II 軽症型。6歳時、酵素活性正常の弟をドナーとして骨髄移植を受けた。

【骨髄移植の臨床効果の評価】移植前、および移植

後1～3年ごとに、以下の項目について検査を行い評価を行った。骨レントゲン、関節可動域、頭部MRIおよびMRS、知能テスト、脳波およびABR、心エコー、腹部エコー、聴力、角膜及び眼底検査。頭部MRIについては、T-1およびT-2強調画像を水平断、矢状断、冠状断について行い、ムコ多糖症特有の所見、篩状変化と白質の斑状のシグナル変化および脳室の拡大についてその程度を各々スコア化した。骨変型、関節拘縮、角膜混濁、難聴、巨舌、肝脾腫、心障害、知能、頭部MRIの各々の項目につき移植前と比べ、効果無し(0)、病状進行の停止(1)、改善(2)、著明に改善(3)、正常化(4)の5段階の評価を行った。

【ムコ多糖症マスキング】大阪市立大学附属病院新生児室および大阪市立総合医療センター新生児室で出産した乳児の月齢1か月児を対象とし、尿ろ紙を材料に、田中ら¹⁾の方法に従って行った。

研究結果

【骨髄移植の臨床効果の評価】骨変型については、症例1、2、3とも変化なく病状進行の停止(1)と考えられた。関節拘縮については、症例3では著明に改善(3)、症例1、2では改善(2)であった。角膜混濁は、症例2、3はもとより存在しない。症例1は角膜移植を受け、12年後も、移植角膜に混濁は発現しておらず、非移植側にも進行がなく、病状進行の停止(1)と考えられる。難聴については、症例1は正常化(4)し、症例2、3では改善(2)を

認めている。巨舌については、症例1, 3では正常化(4), 症例2では著明に改善(3)した。肝脾腫についても、症例1, 3では正常化(4)し、症例2では著明に改善(3)した。心障害については、全例に病状進行の停止(1)を認めた。知能については、全例がもとより知能障害はない。頭部MRIでは、症例1では移植前に存在した篩状変化も白質の斑状のシグナル変化も消失し、正常化(4)と判断された。症例2は、移植前に存在した斑状のシグナル変化および脳室の拡大は、ともに移植後7年たってもかわらず、病状進行の停止(1)のみと判断された。症例3では、移植前には篩状変化のみが認められたが、これがやや減少し、改善(2)を認めた。全体として、症例1は骨髄移植の効果が著明であった。症例2, 3は同じMPS II 軽症型と診断された症

例であるが、移植効果はずいぶん異なっていた。しかし、いずれの症例、いずれの所見においても、効果無し(0)と判断されたものはなかった。

【マス・スクリーニング】1995年1月～1999年12月の総検体数は5,926で、1次スクリーニング陽性検体は175(3.0%), 2次スクリーニング陽性検体は10(0.17%)であった。まだ患者は発見されていない。

文献

- 1) 田中あけみ, 梶田知子, 藤本昭榮, 新宅治夫, 一色玄。尿濾紙を用いた先天性ムコ多糖症のスクリーニング:コンドロイチナーゼA/C消化・DMB-マイクロプレート法。日本マス・スクリーニング学会誌 8(1):29-35, 1998

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

便色調カラーカード法による胆道閉鎖症のマススクリーニング
—茨城県方式—

研究要旨

1994年から栃木県では便色調カラーカードを使って、胆道閉鎖症の早期発見・早期手術を目的とした生後1か月乳児のマススクリーニングを行ってきた。この方法は、親にカラーカードを配布し、1か月健診時に児の便色調に該当する番号を記入して持参させるもので、1か月健診で本症に特有の淡黄色便を発見し、本症と診断された患児に対して生後60日以内に肝門部空腸吻合術を施行することを企図している。過去5年間の検査結果から、栃木県における便色調カラーカード法は、胆道閉鎖症の早期発見に有効なマススクリーニング法と結論された。茨城県でも、1998年から同様の便色調カラーカードを用いた胆道閉鎖症のマススクリーニングを開始し、1999年4月からは全国で始めて県の正式事業となった。茨城県では、生後1か月の他に遅発例発見のため生後2か月時にも再検する方式をとっているが、カード回収率(受検率)の向上が今後の課題である。

研究協力者

松井陽、須磨崎亮、大崎牧、長谷川誠
(筑波大学臨床医学系小児科)
牧たか子 (石岡市医師会病院小児科)
桃谷孝之 (自治医科大学小児科)

研究目的

便色調カラーカードを用いた胆道閉鎖症のマススクリーニングによって、胆道閉鎖症患児の手術成績および長期予後を改善できるか否かを推定する。

研究対象および方法

- 1)便色調カラーカード(以下カード)：カードは栃木県と同じものを用いた。生後約1か月の胆道閉鎖症患児および同月齢対照健康乳児の便カラー写真のうち、患児のものを1～3番、健康児のものを4～7番と番号をつけ、親が児の便色調に最も近いと思う色調番号を記入する欄を設けた。
- 2)スクリーニング・システム：各市町村で出生届提出時(一部市町村では母子手帳交付時)にカードを1か月用と2か月用の2枚配布した。親は、1か月健診前および2か月時、または淡黄色便が3日以上続いた場合に、記入したカードを居住地の保健所宛に郵送した。親が判定した色調番号が1～3番の場合は、所轄保健所の保健婦が家庭訪問を行い便色調を確認し、それでも異常なら、ただちに親と相談の上、患児を紹介すべき専門医を決定した。4～7番は正常と判定した。なお、1998年4月から1999年3月までは、準備期間として筑波大学でカードを回収し、1～3番の場合は保健所に

家庭訪問を依頼した。

- 3)対象：茨城県で98年4月1日から99年3月31日までに出生し、カードを回収できた児を対象とした。検査期間中の出生届出数とカード配布数は、各市町村からの報告により確認し、胆道閉鎖症患児の発生総数は、茨城県への小児育成医療申請数によって確認した。

研究結果

1)受検者

1998年4月1日から1999年3月31日までに、25,990枚のカードが配布され、1か月で9,080枚(34.9%)、2か月で6,585枚(25.3%)のカードが回収された。

2)検査結果

1か月で保健婦による家庭訪問を要した児は3名で、うち2名が医療機関で検査を受けたが胆道閉鎖症は否定された。また、2か月では2名が家庭訪問を受け、うち1名が医療機関受診し胆道閉鎖症と診断された。この児は、1か月では検査を受けていなかったが、遷延する黄疸と淡黄色便を心配した母親が2か月時に初めてカードを郵送した。一方、同時期に茨城県で発生した胆道閉鎖症患児は、この1名を含む4名であった。1名は、1か月時には便色調異常は認められなかったが、その後淡黄色便となり、2か月の検査を受ける前に胆道閉鎖症と診断された。残り2名は、親がカードを郵送していなかった。

3)胆道閉鎖症患児

検査期間中に茨城県で発生した4名の胆道閉鎖症患児を表に示す。

考察

便色調カラーカードを用いた胆道閉鎖症のマススクリーニングは、栃木県で1994年から続けられている。栃木県では1か月健診時に健診担当医がカードを回収しており、受検率は90%近くになっている。受検率を上げる目的で、97年4月からカードの回収先を栃木県保健衛生事業団とし先天性代謝異常等検査の乾燥ろ紙血液と郵送用封筒を共用しようとしたが、受検率に変化はなかった。茨城県では、カードの回収を郵送とし親が郵送費を自己負担しているが、受検率は1か月で34.9%、2か月で25.3%にとどまっている。これは簡便な検査であるので、保護者がカードを返送しなくて良いと判断している可能性も考えられる。1998年度は準備期間のため筑波大学でカードを回収したが、1999年度からはカードの郵送先を県内の各保健所に変更し、より一層保健所の協力を得ることで受検率の改善を期待した。しかし、効果は不十分で、カード配布を出生届時ではなく栃木県と同様に母子手帳交付時に行うこと、カード回収も1か月時は1か月健診担当医が行うことなどを現在検討中である。

栃木県でのマススクリーニングの感度は、これまでの結果では80~83%である。胆道閉鎖症には、生後1か月を過ぎてから淡黄色便を呈する遅発例が15%程度あるとされる。栃木、茨城両県における生後1か月での偽陰性例の便色は、生後30日では黄色であったが生後60日までに淡黄色となった。茨

城県では1か月での偽陰性患児を発見するために、2か月時にもカードを回収することにした。2か月時に患児1名が発見されたが、この児は1か月時には検査を受けていなかった。

このほか茨城県では、保健所の協力により便色調異常を報告した児を保健婦がまず家庭訪問するという新しい方策をとった。保健所に協力を求めたことで胆道閉鎖症に対する保健所の理解が深まり、積極的に患児とその家族を支援する動きがみられるようになった。

便色調カラーカード法による胆道閉鎖症のマススクリーニングは感度、特異度に優れているばかりでなく、費用便益効果にもおいてフェニルケトン尿症、クレチン症のマススクリーニングに勝るとも劣らないことがすでに示されている。また、カードの配布により保護者が子供の便色に関心を持つという効果も期待できる。スクリーニング・システムをさらに改良し、1日も早い全国的実施を目指したい。

文献

- 1) Matsui A et al. Lancet 1995,345:1181.
- 2) 松井 陽, 他.平成9年度本報告書, p64-6.
- 3) 松井 陽, 他.平成7年度本報告書, p76-8.
- 4) 松井 陽, 他.平成8年度本報告書, p214-6.
- 5) 久繁哲徳, 他.平成7年度本報告書, p103-6.
- 6) 松井 陽, 他.平成10年度本報告書, p383-5.

表

症例	生年月日	便色調番号		手術日齢
		1か月	2か月	
1	98/03/24	4	(3)	70
2	98/06/26	ND	3	75
3	98/06/10	ND	ND	57
4	98/11/02	ND	ND	65