

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

タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングの有用性の検討

研究要旨

タンデム質量分析計を用いてろ紙血を分析する新生児代謝異常マススクリーニングのわが国における有用性を明らかにするために、大量検体測定システムを改良し、対象地域を拡大した。約85,000新生児をスクリーニングし、プロピオン酸血症4例、メチルマロン酸血症1例、II型シトルリン血症1例を発見した。スクリーニング以外で診断されたプロピオン酸血症患児およびメチルマロン酸尿症患児の新生児期濾紙血の分析も総合して、アセチルカルニチンに対するプロピオニルカルニチンの比を用いたカットオフ値により、これら2疾患が軽症例も含め精度良くスクリーニングされることが示された。患者新生児濾紙血の分析により脂肪酸酸化異常症もスクリーニング可能であることが確認された。我が国においては、プロピオン酸血症を中心とした有機酸代謝異常症を主な対象疾患とし、更に脂肪酸酸化異常症も視野に入れた本スクリーニングを実施することが心身障害防止の観点から有用である。

研究協力者

重松陽介（福井医科大学看護学科）
畑郁江（福井医科大学小児科）

研究目的

現行の新生児マススクリーニングにおける対象疾患である3種のアミノ酸代謝異常症に加え、有機酸代謝異常症・脂肪酸酸化異常症・尿素サイクル異常症も対象疾患とするタンデム質量分析計（TMS）による新生児濾紙血スクリーニングは、世界的にも検討されてきており、いくつかの国では各々の疾患頻度をふまえて正規のスクリーニング法として実施されている。一方、我が国においては、これら対象疾患が実際にどの程度の頻度であるかについての調査が不足しており、またスクリーニングされた患者の治療や療育についての指針や実績も充分とはいえない。

そこで、TMSマススクリーニングでの大量検体測定システムを改良し、実施地域を更に拡大することで、スクリーニングシステムがうまく機能するかどうか、またどのような疾患がスクリーニングされてくるのか、そのスクリーニング精度は良好かなどについて検討した。更に、発症後に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できるかどうかについても検討した。

研究方法

福井県、広島県、徳島県において、文書による同意を得て、現行の新生児スクリーニングで作成された血液濾紙をスクリーニングした。またその他の地域で個別医療機関からも同意を得て血液濾紙を収集

しスクリーニングした。

測定は、サンプル処理に96穴マイクロプレートを用いたバッチ処理を行うなど既報の方法¹⁾に準じた。今回、TMS測定での分析モードをシトルリン測定や遊離カルニチン分析のために最適化した。また、TMSでの大量検体処理を目的として、オートインジェクターによるサンプル注入間隔は1.9分、TMS分析時間は1.3分と短縮した。カットオフ値については既報²⁾のものを用いたが、患者検体の分析結果などを踏まえ再検討を試みた。

研究結果

2001年1月末までに85,220の新生児をスクリーニングし、4例のプロピオン酸血症、1例のメチルマロン酸血症、1例のII型シトルリン血症を診断することが出来た。短鎖アシルCoA脱水素酵素異常症のアシルカルニチン異常（炭素数4のアシルカルニチン増加）を示した極小未熟児が1例いたが、精密検査前に死亡しており確定診断に至らなかった。

患者の後方視的分析においては、脂肪酸酸化異常症としては、極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症（VLCADD）、中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症（MCADD）、長鎖ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素欠損症（LCHADD）各1例、複合アシルCoA脱水素酵素異常症（グルタル酸尿症II型）（MADD）2例の新生児期濾紙血検体が収集できた。VLCADD、MCADD、LCHADDでは、それぞれの指標アシルカルニチンがカットオフ値（対照平均値+3SD）を大幅に越えて増加していた。MADDでは、1例でのアシルカルニチン異常は典型的であったが、他の1

例では、短・中鎖アシルカルニチンの増加が軽度で非典型的であった。ただし、一連のアシルカルニチンのカットオフ値を用いてスクリーニングは可能であった。

アシル基炭素数5のヒドロキシアシルカルニチン(OH-C5)の増加が診断指標となる疾患である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症(HMG)の2例と複合カルボキシラーゼ欠損症(MCD)の2例で新生児期濾紙血が分析できた。前者の1例ではOH-C5は比較的低値であったもののカットオフ値

(mean+3SD)の約3倍であった。後者の1例ではプロピオニルカルニチンはプロピオン酸血症用のカットオフ値を超えていなかった。

プロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症の診断指標となるプロピオニルカルニチンは、アセチルカルニチンに対するイオン強度比を用いると適切なカットオフ値(mean+6SD)が設定できた(Fig.1)。

4例のプロピオン酸血症患者は、特殊ミルクを用いた低蛋白食とカルニチン投与により、全例順調に成長発達が見られている。

アミノ酸代謝異常症では、新生児期発症OTC欠損症患者2名の新生児期濾紙血シトルリン濃度はそれぞれ3.2, 4.3nmol/mlであり、グルタミン高値を伴っていた。1歳時に急性発症したCPS-1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。本パイロットスタディにおいて、シトルリン低値の要再検査率は0.08%であるが、患者発見には至っていない。

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1,000 nmol/ml以上の著しい高値であった。本パイロットスタディでスクリーニング出来たⅡ型シトルリン血症では、濾紙血シトルリン値は1,022 nmol/mlであり、メチオニンとアルギニン高値、およびガラクトース高値も伴っていた。

考察

欧米でのTMSスクリーニングの主たる対象疾患はフェニルケトン尿症(PKU)と中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(MCADD)である。PKUの欧米での頻度はおよそ1:10,000~1:20,000であり、MCADも同様の頻度である。これに対して、我が国においてはPKUが約1:80,000であり、MCADは筆者らが化学診断した1例のみである。

我々は本パイロットスタディで85,220の新生児をスクリーニングし、4例のプロピオン酸血症患者を見出した。その頻度は計算上およそ1:21,000となる。これは、これまでの我が国の患者集計に基づく

頻度約1:500,000³⁾の約25倍という非常に高い頻度であり、我が国のPKUの頻度を上回る。この乖離は、全国集計の困難さだけでなく、疾患の重症度の差異に基づく可能性がある。即ち、本スクリーニングで見出された患者は軽症例(酵素活性6~8%)が多く、これまで本症と診断されていなかったタイプの患者群とも考えられる。

このような現象はカナダにおけるメチルマロン酸尿症のマスクリーニングでも見られている⁴⁾。即ち、尿中メチルマロン酸排泄増多を指標に新生児マスクリーニングを行ったところ、多くの軽症例が発見され、それら軽症例の中には厳格な食事治療が行われなかったにも関わらず経過観察中何ら症状を呈さなかったものがあつた。このような無症状の患者はスクリーニングをしない限り診断されることはないであろう。

また一方で、残存酵素活性が10%以上あるプロピオン酸血症患者でも、急性発症した場合、重篤な神経学的後遺症を残すことが報告されている⁵⁾。このことは、MCADDにおける突然死の防止と同様の対策が、これら軽症プロピオン酸血症患者にも必要であることを示している。

我々のこのパイロットスタディで、我が国におけるTMSスクリーニングの主要対象疾患の1つはプロピオン酸血症であり、その頻度からだけでもTMSスクリーニングの実施は有意義であることを明らかにした。分析例が増えるに従い、それ以外の疾患を持つ新生児もスクリーニングされつつある。プロピオン酸血症以外にも、患者濾紙検体分析により診断可能な疾患を確認できたが、脂肪酸酸化異常症の軽症例での精度については、諸外国の経験から問題が指摘されている。今後これらの点についてもスクリーニング規模を拡大することで検討し、本スクリーニングの有用性を更に明らかにしていきたい。

謝辞

本パイロットスタディ実施にあたり多大なるお力添えを戴いた広島大学医学部小児科学佐倉伸夫助教授、徳島大学医学部小児科学黒田泰弘教授、伊藤道徳助教授に深謝いたします。また、患者の新生児濾紙血の収集にご協力戴いた関係各位にも深謝いたします。

文献

- 1) 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 Chromatogr B. 731:97-103, 1999.
- 2) 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雑誌. 8;13-20, 1998.

3) 高柳正樹. 有機酸代謝異常症の全国調査. 平成11年度厚生科学研究報告書(第1/6). 391-393, 2000.

4) Sniderman LC, Lambert M, Giguere R, Auray-Blais C, Lemieux B, Laframboise R, Rosenblatt DS, Treacy EP. Outcome of individuals with low-moderate methylmalonic aciduria detected through a neonatal screening program. *J Pediatr* 134;675-680, 1999.

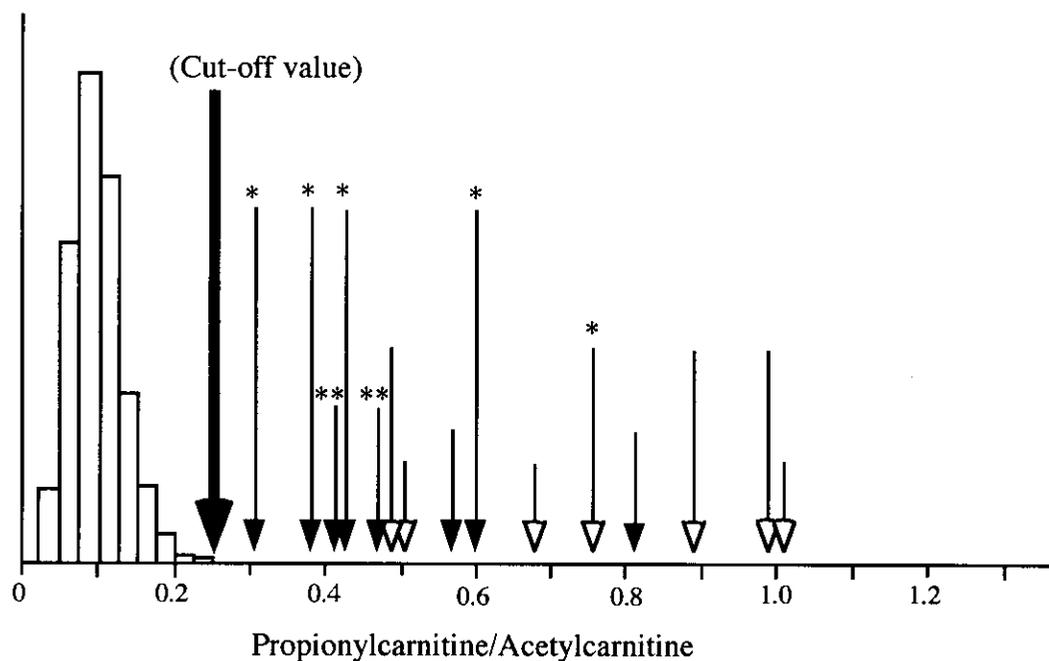


Fig.1 Distribution of the ratios of propionylcarnitine to acetylcarnitine in blood spots of control newborns and the ratios in those of the patients with propionic acidemia (black arrow) and methylmalonic aciduria (white arrow).

*; patients found in the present pilot study, **; patients found in the GC/MS screening pilot study

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

GC/MS法による新生児先天性代謝異常症スクリーニングの評価

研究要旨

現在、新生児の先天性代謝異常症のスクリーニングにおいてはガスリーテストにかわり、質量分析法、それも欧米では血液濾紙を用いるタンデム質量分析法（MS/MS法）が主流になりつつある。一方、我々は新生児尿をもちいてガスクロマトー質量分析法（GC/MS法）によるスクリーニングを施行し、MS/MS法を大きく上回る成績を得た。欧米において新生児スクリーニングにMS/MS法をもちいる主な理由は、スクリーニングの主な対象疾患として中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症（MCADD）とフェニルケトン尿症（PKU）が存在することであるが、MCADDは現時点では我が国には存在しない疾患であり、PKUは重要な疾患であっても、その頻度は欧米の10分の1以下である。一方、GC/MS法はMS/MS法では検出できない多くの重要な代謝物を検出、定量でき、MS/MS法では見逃しやすい、軽症型メチルマロン酸血症や発症前のオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症を診断、救命できることが、我々の研究で明らかになった。GC/MS法による新生児代謝異常スクリーニングは予想以上に、多くの患児を発見できることから、我が国での先天性代謝異常症の疫学を変え、さらに早期発見による早期治療を可能にすることや、先天性代謝異常症の見逃しを防止すること、次子の出生前診断が可能になることなどから、少子高齢化時代の我が国の小児保健行政に大きく貢献するものと考えられる。

研究協力者

吉田一郎

（久留米大学医学部ガスクロマトー

質量分析医学応用研究施設・小児科）

猪口隆洋，青木久美子，田代恭子，田代さとみ，

城後美佐，金子明代，田中正敏

（久留米大学医学部ガスクロマトー

質量分析医学応用研究施設）

研究目的

GC/MS法による新生児先天性代謝異常症スクリーニングの評価を目的として、本研究を施行した。さらに欧米での新生児スクリーニングの主流になりつつあるMS/MS法との比較を行った。

研究方法

1996年1月から2000年12月までのあいだに24,044名の新生児につき、GC/MS法による先天性代謝異常症スクリーニングを施行した。代謝異常物質の分析法の詳細は前々年度の報告書を参考にされたい。

研究結果

上述の期間中に表1に示すようなスクリーニング結果を得た。OTC欠損症疑いの2名および神経芽細胞腫2名（先天性代謝異常症ではないので）の合計4

名を除いた確定例だけでも約2,000名に1の割合で、患児が発見されている。本スクリーニングでもうひとつ、明らかになったことは新生児期には表2に示したように、一過性代謝異常が予想以上に存在するという点である¹⁾。本スクリーニングの感度は100%、特異度は98.8%であった。再検率は1.30%であったが、この再検の中には表2に示した一過性代謝異常を含んでいる。なお一過性代謝異常はその後のフォローで全例、正常化している。

発見された患児については、シトルリン血症の患児が著しい高アンモニア血症のために死亡しているが、スクリーニング実施後に発症し、重篤な経過を示したが救命でき、現在は順調に経過しているOTC欠損症1名を含めて²⁾その他の患児は順調に発育している。

考察

我々が本スクリーニングをスタートする前には、現行のガスリー法での先天性代謝異常症の頻度や、我が国でのメチルマロン酸血症やOTC欠損症の推定頻度から、4万人から8万人に1名の頻度で個々の先天性代謝異常症が発見されるものと考えていた。しかし、我々のスクリーニングの結果は予想を大きく上回り、表1に示したような多くの先天性代謝異常症が発見された。この発見率は我が国でのMS/MS

法による新生児先天性代謝異常症スクリーニングにおける発見率の約10倍であり³⁾、GC/MS法が我が国でのスクリーニングにおいては、MS/MS法よりも、威力を発揮することが示唆された。欧米でMS/MS法がスクリーニング手段として注目されているのは、分析時間が短いことに加えて、中鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症(MCADD)やフェニルケトン尿症(PKU)のような白人で高頻度に存在する疾患が存在するためであろう。もし、欧米においてこれらの疾患の頻度が低ければ、MS/MS法の価値は半減するものと考えられる。またMS/MS法の正確性にも大きな疑念があり、MS/MS法の導入以前には、MCADDの欧米での頻度は1万人に1名であったものが、導入後は約2万人に1名となったこと⁴⁾の意味をよく検討する必要がある。MS/MS法では患者であっても、哺乳状態がよければ5生日前後にはアシルカルニチンが正常化してしまうことや、新生児期には生理的低カルニチン血症が存在することが、スクリーニング上の大きな問題であろう。また我々がGC/MS法スクリーニングで発見した軽症型メチルマロン酸血症や金沢医大で発見された軽症型メチルマロン酸血症が血液濾紙によるMS/MS法では診断できなかったこと⁵⁾や、Naylorらも軽症型ビタミンB12反応性メチルマロン酸血症やOTC欠損症を含むその他の疾患をMS/MS法スクリーニングで見逃していること⁶⁾から、MS/MS法では軽症型メチルマロン酸血症やOTC欠損症を正確にスクリーニングできない可能性が高いものと考えられる。一般に新生児期発症のメチルマロン酸血症では予後が悪く、スクリーニングの恩恵を最も受けるのは、軽症型メチルマロン酸血症であろう。したがってメチルマロン酸血症の一次スクリーニングにはGC/MS法の方がすぐれており、MS/MS法ではメチルマロン酸血症のハイリスクスクリーニングが可能であるといえよう。ただし、GC/MS法では、サンプルが尿という問題があり、新生児期では腎の未熟性による一過性糖尿、一過性アミノ酸尿などが存在することから、ガラクトース血症やシスチン尿症をGC/MS法によるスクリーニングの対象疾患に含めることには問題がある。表3にGC/MS法の長所と短所をMS/MS法との比較の上で示したが、GC/MS法は我が国で比較的、頻度が高いと考えられる疾患を高感度でスクリーニングできる長所がある。一方、MS/MS法は欧米のみならず、韓国でもすでに導入しており、他のアジア諸国でも導入を検討中であり、我が国でも急いで導入を検討する必要のあることは、十分に

理解できる。しかし、対象疾患の人種別頻度、MS/MS法の正確性など、まだまだ残された課題は多い。

今後、GC/MS法によるスクリーニングでは対象疾患をよく考えて限定し、MS/MS法では診断できない疾患や見逃しやすい疾患でかつ、我が国での頻度が高い疾患を対象疾患とすれば、有意義なスクリーニングが可能となり、我が国の小児保健行政に大きく貢献するものと考えられる⁷⁾。

文献

- 1) Inokuchi T, Yoshida I et al.: Neonatal ketosis is not rare: experience of neonatal screening using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 2001, in press
- 2) 猪口隆洋, 吉田一郎他, GC/MS法による新生児代謝異常マススクリーニングで発症前に発見されたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の1例, 2001, 日本先天代謝異常学会誌, in press
- 3) 重松陽介, タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングの有用性, 平成12年度厚生科学研究(子ども家庭総合事業) マススクリーニングの見逃し等を予防するシステムの確立に関する研究, 研究班全体会議, 平成13年2月10日
- 4) Chace DH, Diperna JC et al., Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium. *Acta Paediatr Suppl* 432: 45-7, 1999
- 5) 重松陽介, 畑郁江他, ESI-MS/MS新生児代謝異常マススクリーニング, 地域拡大と患者検体分析による知見の蓄積, 日本マススクリーニング学会誌 8: 13-20, 1998
- 6) Naylor E.W.; The results of screening 600,000 newborns using automated electrospray tandem mass spectrometry in the United States. In 26th Annual Meeting of Japanese Society for Mass-screening. October 9-10, Sendai, Japan, 1988
- 7) 猪口隆洋, 吉田一郎他, ガスクロマトー質量分析法による先天性代謝異常症の新生児マススクリーニング4年9ヶ月の経験, 日本先天代謝異常学会誌, 2001, in press

表1. 試験機寒中発見された疾患および異常

期 間：1996年1月～2000年12月

検体数：24,044

・シトルリン血症	1例
・グリセロールキナーゼ欠損症	2例
・OTC欠損症	1例
・OTC欠損症疑い（酵素活性見測定）	2例
・2-ケトアジピン酸尿症	5例
・神経芽細胞腫	2例
・メチルマロン酸血症	1例
・プロピオン酸血症	2例

表2. 一過性の排泄異常例

期 間：1996年1月～2000年12月

検体数：24,044

・3-OH-酪酸	52例
・乳酸	38例
・HVA, VMA	9例
・ガラクトース	16例
・シスチン	8例
・4-OH-PLA	18例
（一過性チロジン血症）	

表3. GC/MS法の長所と短所

長所 ・MS/MS法では検出できない診断上重要なマーカーであるメチルマロン酸，オロト酸，グリセロール，メチルクエン酸，乳酸などを正確に検出できる。
 ・わが国に頻度が高いと考えられるメチルマロン酸血症やOTC欠損症の発見に適した方法である。

短所 ・MS/MS法に比して，分析時間が長い。
 ・従来のろ紙を利用できない。

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

尿ウレアーゼ法・安定同位体希釈法・GC/MS法による プロピオン酸血症，尿素回路異常症，ホモシスチン尿症などの多項目スクリーニング

研究要旨

如何に感度と特異度にすぐれた分析法であっても，定量精度の検討と向上なくして，定量の自動化，診断の自動化，精度管理は難しい。そこで，安定同位体標識化合物（Stable isotope, SIと略）等の内標準物質を用い，また，GC/MSのconditioningを検討，改善して，定量性の向上および高精度の自動定量を図った。また，この簡易尿ウレアーゼ法・安定同位体希釈法・GC/MS法によりプロピオン酸血症（PCCD），高アンモニア血症，ホモシスチン尿症のハイリスク（HR），および新生児スクリーニング（LR）試験研究を行った。その結果，1) orotateの回収率の高い本法はuracil，orotateが増加する高アンモニア血症，即ちOCT以降の尿素回路異常症4疾患，HHH症候群，LPIのスクリーニングに極めて有用であること，lysineとornithineの同時定量はLPIとHHH症候群の鑑別に役立つことを再確認した。uracil，orotateが増加する高アンモニア血症の鑑別には一部，本法で定量できないcitrulline，argininosuccinate，arginine，homocitrullineをアミノ酸分析計あるいはFAB/MSで分析する必要があるもののその短所は，本法が有機酸，アミノ酸その他の一斉分析が可能であることから補って余りあると思われる。

2) Met，Hcys，methylmalonate，orotateの同時定量はホモシスチン尿症，一過性ビタミンB12欠乏症，一過性葉酸欠乏症の鑑別化学診断および，治療効果判定に有用であった。

3) 1万人の新生児の試験研究の結果，未発症のPCCD 1例を発見した。この新生児ろ紙尿のmethylcitrate増加度は平均値の+18SD，平均値の6.5倍で，同時に測定した100種以上の尿中物質の定量あるいは半定量値よりPCCDと化学診断した。その後，許可を得て入手した児のガスリー血のpropionylcarnitineの増加度が平均値の+3SD，平均値の2.1倍と判明し，両者の比較から異常度判定はろ紙尿がろ紙血よりはるかに容易であることがわかった。児のPCC残存活性は8%であったが，最近PCC残存活性が11%（但しfibroblasts）あっても乳児期に突然死する例が報告されており，10%を越える症例ではろ紙血での判定はろ紙尿より困難となる可能性が示唆された。本症例はその後，遺伝子解析でも診断が確定，治療下に良好に経過している。本疾患は従来の見解と異なりケトーシス発作がなくとも神経学的異常が進行することがあり，早期発見が必要との認識が米国で高まっている。現在の日本のろ紙尿，ろ紙血での試験成績から推定すると，重症型の新生児期発症例を除いても，PCCDは70例/120万人/年が発見できると推定される。

研究協力者

久原とみ子，大瀬守眞，大土井千恵，
井上義人，新家敏弘

（金沢医科大学総合医学研究所
人類遺伝学研究部門 生化学）

松本勇 （株）ミルス生命科学研究所

研究目的

早期診断，早期治療が有効で，発生率の高い有機酸血症であるPCCDや高アンモニア血症の患児が新生児期に0.1ml尿を用いた簡易尿ウレアーゼ法¹⁾により確実に検出できるかどうかを，HRおよびLRの診

断支援の実績をもとに検討した。

研究対象および方法

平成10，11年度²⁾に引き続き，ろ紙尿の簡易尿ウレアーゼ法・安定同位体希釈法・GC/MS法によりLR試験研究および，すでに発症した患者を対象とした診断支援を行った。GC/MSのconditioningを検討，改善し，内標準物質として用いるSI等の添加量を減量し，定量精度を上げることに成功した。また，Homocystineなど分解しやすい化合物が検出できることはGC/MSのconditioningが良好であることを意味するので，このことを確認した上で

GC/MS測定した³⁾。creatinineはGC/MSではcreatinineとcreatineの和となるが、この定量性は非常に良好であった。尿量は100 μ l使用したが、必要に応じて2~10倍希釈した。

内標準に用いた化合物、および尿100 μ l中の添加量は以下の通りである⁴⁾。100 nmol: [²H₃] creatinine, 5 nmol: [²H₃] methylcitrate, 2,2-dimethylsuccinate, 2-hydroxyundecanoate, heptadecanoate, 4 nmol: [¹⁵N₂] uracil, [¹⁵N₂] orotate, 10 nmol: [²H₃] methionine, [²H₈] homocystine, [²H₃] leucine, [²H₅] phenylalanine, [²H₄] tyrosine, [²H₄] cystine, 50 nmol: [²H₅] glycine, [²H₄] lysine。 [²H₃] leucine は3種の分枝鎖アミノ酸定量用で3種の対応するヒドロキシ酸も同時測定するので、メープルシロップ尿症がスクリーニングできる。 [²H₅] phenylalanine, [²H₄] tyrosine はPhe, Tyr 定量用で芳香族アミノ酸由来のカルボン酸も一斉に分析するので、高フェニルアラニン血症やチロシン症がスクリーニングできる。

研究結果および考察

GC/MSは感度と特異度にすぐれた分析法であるが多種類の化合物を一斉分析するウレアーゼ法で、しかも発症前であるため、診断の指標物質の異常度の小さい新生児スクリーニングにおいては、特に定量精度の検討と改善が常に求められる⁴⁾。逆に言えば、GC/MSはこのような改善の余地を有し、向上しうる分析法である。そのような装置あるいは分析法でなければ定量の自動化、診断の自動化、精度管理は難しいし、改善の余地は少ない。

高アンモニア血症はuracil, orotate, lysine, ornithineをターゲットとした。AlaやGluの測定値も参考にした。uracil, orotateが増加する高アンモニア血症、即ちOCT以降の尿素回路異常症4疾患、HHH症候群、LPIのスクリーニング、および、同時に定量しているlysine, ornithineの値より、LPI, HHH症候群の鑑別化学診断ができた。uracil, orotateが増加する高アンモニア血症の鑑別化学診断にはcitrulline, argininosuccinate, arginine, homocitrullineのアミノ酸分析計あるいはFAB/MS⁵⁾での分析が必要である。orotateの回収率が有機溶媒抽出法より3倍も高い本法では、図1に示すようにorotateの異常増加度が明白である。

Homocystine (Hcys) のGC/MS分析は常にHcysが定量できる前処理・GC/MS条件下であることを確認していれば、ろ紙尿でも原尿と同様に定量でき、また治療中でもその増加を確認できた。また、ホモシスチン尿症I型のみでなく、各型の鑑別化学

診断ができた³⁾。

LRにおいて1万人の新生児を検査しPCCD 1例を発見した。この新生児ろ紙尿のmethylcitrateの増加度は平均値+18SD ([²H₃]methylcitrateを内標に使用時)、+33SD (2-hydroxyundecanoateを使用時)で、同時に測定した100種をこえる尿中物質の定量値あるいは半定量値よりPCCDと化学診断した。その後、児のガスリー血を許可を得て分析したが、propionylcarnitineの増加度は+3SD、平均の2.1倍であった⁶⁾。このように異常度の判定はろ紙尿がろ紙血よりはるかに容易であった。児のPCC残存活性は8%で、遺伝子解析からも診断が確定し、治療下に無症状で良好に経過している。最近PCC残存活性が11% (但しfibroblasts) あっても乳児期に突然死する例が報告されており⁷⁾、10%を越える症例ではろ紙血での判定はろ紙尿での判定より困難となる可能性が示唆された。

米国ではPCCDはケトーシス発作がなくとも神経学的異常が進行すること、従って早期発見が必要であることが認識されてきた⁸⁾。現在の日本のろ紙尿、ろ紙血でのマススクリーニング試験成績から (後述のように我が国のろ紙尿のGC・MS分析で4万人を対象にPCCD 3例が、ろ紙血のタンデムマス⁶⁾で8万人を対象に4例が発見されているので)、PCCDは重症型の新生児期発症例を除いても、また、ろ紙尿のGC・MS分析では精査目的で入院する必要もなく、70例 / 120万人 (1年間の出生児数) が毎年、発見できると推定される。

金沢医科大学の (同一機関でのNICUが含まれない) 1万人を対象とした新生児スクリーニング試験研究成績ではPCCD 1例, MMA 2例, ハートナップ病1例, シスチン尿症1例, その他2例の合計7例が発見され、発見率は1人 / 1,500人であった。一方、久留米大学、島根医科大学、千葉県こども病院を含めた4機関全体では昨年10月末までに4万人を対象に、PCCD 3例 (2例は久留米) 尿素回路異常症2例 (久留米) 高フェニルアラニン血症1例 (島根) など重要な疾患を含む19例が発見され、発見率は1人 / 2,000人と極めて高値であった。

簡易尿ウレアーゼ法の発見率はテクニカルには金沢医科大学も含めて改善の余地があることを考慮すると今後、より多種の疾患が発見されてくるものと予測され、心身障害発症予防に有効な方法と考えられる。

最後に、真に臨床医学に役立つためにGC・MS装置の安定性の向上、ガードカラムの導入などハード面の、また、より正確な自動ピーク判定などソフト面の一層の向上をメーカーに要望する。

謝辞

金沢医科大学でろ紙尿を用いて発見したPCCD児のろ紙血のタンデムマス分析に対し福井医科大学の重松陽介先生に、酵素解析および遺伝子解析に対し広島大学の佐倉伸夫先生、京都大学の依藤亨先生にそれぞれ感謝致します。

文献

1. I. Matsumoto, T. Kuhara: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 15: 43-57 (1996)
2. T. Kuhara et al: Pilot study of gaschromatography-massspectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J. Chromatogr. B*, 731: 141-147 (1999)
3. T. Kuhara, M. Ohse, C. Ohdoi, S. Ishida: Differential Diagnosis of Homocystinuria by Urease-treatment, isotope-dilution and gas chromatography-massspectrometry. *J. Chromatogr. B*, 742: 59-70 (2000)
4. T. Kuhara: Diagnosis of inborn errors of

metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-massspectrometry. *J. Chromatogr. B*, in press, (2001)

5. 井上義人, 新家敏弘, 彭海, 松本勇, 久原とみ子: 先天性代謝異常症の化学診断 (HHH症候群の鑑別診断) -尿中ホモシトルリンのFast atom bombardmentタンデム質量分析法 (FABMS/MS) による同定-. *金医大総医研年報* 8: 146-153 (1997)
6. 重松陽介: タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングの有用性平成12年度厚生科学研究-マススクリーニングの見逃し等を予防するシステムの確立に関する研究-研究班全体会議. 2001. 2. 10
7. C. Perez-Cerda, B. Merinero, et al: An unusual late-onset case of propionic acidemia: biochemical investigations, neuroradiological findings and mutation analysis. *Eur. J. Pediatr.* 157: 50-52 (1998)
8. W.L. Nyhan, C. Bay, E.W. Beyer, M. Mazi: Neurologic nonmetabolic presentation of propionic acidemia. *Arch. Neurol.* 56: 1143-1147 (1999)

Table. 1 Differential Chemical Diagnosis in Four Cases with Hyperammonemia

Cases		n in mean + n SD : GC/MS*				FAB/MS
		Uracil	Orotate	Lys	Orn	
OCT	1st	84	5208	-	-	
	Proteine(-)	21	574	-	-	
	LRLT	-	-	-	-	
Citrullinemia		9	334	-	-	Cit ↑ ↑
LPI**		15	214	40	-	
HHHsyndrome***		7	34	-	10	Homocitrulline ↑

* creatinine+creatine **Lysinuric protein intolerance

***Hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuriasyndrome

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

有機酸代謝異常GC/MSスクリーニングにおける尿ろ紙，血液ろ紙の実用性

研究要旨

有機酸代謝異常スクリーニングの分析手法として，タンデムマス，GC/MSが検討されている。検体搬送としての乾燥尿ろ紙，血液ろ紙を用いるGC/MS分析のシステムを確立した。大部分の有機酸，アミノ酸が，乾燥尿ろ紙で少なくとも28日間は室温保存で安定なことがわかった。また血液ろ紙で，VLCAD欠損症，MCAD欠損症，グルタル酸尿症2型がGC/MSで診断可能なことも示した。ろ紙検体を用いたGC/MS分析法の確立により，タンデムマスで偽陰性となった症例，タンデムマスで診断できない症例の診断も可能になり，さらに有機酸スクリーニングを外国などへも展開することが可能となる。

研究協力者

山口清次，木村正彦，付暁巍，
伊賀三佐子，吉井和子，遠藤由紀子
(島根医科大学小児科)

C10:1, C12, C14, C14:1をターゲットにして分析した。GC/MS分析は，DB5キャピラリーカラムを用いて，オープン温度45℃～225℃で分析した³⁾。データ処理は有機酸分析と同様「GC/MSデータ自動処理・自動診断システム」で行った。

研究目的

有機酸代謝異常スクリーニングの化学診断にGC/MSが広く応用されてきた。乾燥尿ろ紙，乾燥血液ろ紙を用いるGC/MS分析が可能となれば，スクリーニングを展開してゆく上で大いに役立つ。そこで，乾燥尿ろ紙，乾燥血液ろ紙を用いたGC/MS法を検討した。

研究方法

1) ろ紙

乾燥尿ろ紙のためにAVANTEC社VMAろ紙（5 x 5 cm）を用いた¹⁾。血液ろ紙はガスリーろ紙を用いた。

2) 標準尿の作製

尿ろ紙中の化合物の安定性を検討するために標準尿を作製した。正常児の尿に計25種類の有機酸， α ケト酸，アミノ酸を加えて作製した。

3) 尿ろ紙を用いるGC/MS分析

上記のろ紙には1.2mlの検体をしみ込ませることができる。乾燥尿ろ紙に1.2 mlの蒸留水をしみ込ませて遠心してろ液を回収して，分析した。ウレアゼ・TMS法または溶媒抽出/オキシム・TMS法で前処理してGC/MS分析した。データ処理は島根医大小児科と島津製作所で共同開発した「GC/MSデータ自動処理・自動診断システム」²⁾で行った。

4) 血液ろ紙の血中遊離脂肪酸分析

ガスリーろ紙の3 mmのパンチ3枚を用いて，既報の方法でメチル化して，GC/MSマスフラグメントグラフィー（GC/MS/SISM）で脂肪酸C8, C10,

研究結果

1) 尿ろ紙中の化合物の安定性

標準尿とその乾燥ろ紙のクレアチニン濃度を比較したところ，図1に示すように，極めて良好な相関がみられた。また乾燥尿ろ紙を室温放置してクレアチニン値の安定性をみたところ，少なくとも28日後の値は信頼できると考えられた。

2) 有機酸，アミノ酸の安定性については，図2に示すように，尿ろ紙で室温放置しても，検査した17種類の化合物に関しては28日時点で最大30%の変動であり，スクリーニングには差し支えない範囲で安定していると思われた。

3) α ケト酸は乾燥尿ろ紙で保存後溶媒抽出法で検討した。その結果図3に示すように，検討した9種類のうち3種類を除いて28日間は保存されることが分かった。不安定な3種類の α ケト酸は，succinylacetone (SCA)，p-OH-phenylpyruvate (PHPP)，phenylpyruvate (PP) でありつた。SCAの上昇が特異的な疾患である高チロジン血症1型の診断はむずかしいが，他の α ケト酸血症の診断は可能であると考えられる。実際にメープルシロップ尿症，ビルビン酸血症の診断の可能なことは確認した（データは示していない）。

4) 尿ろ紙で送られた外国からの検体の分析経験

表1に示すように，最近2年間に上記の乾燥尿ろ紙を用いて北京（中国），ニューデリー（インド）から647検体の分析依頼を受けた。溶媒抽出法で分析

したところ、41例の患者が診断された。この経験から、尿ろ紙を郵送する方法でGC/MS分析による有機酸代謝異常スクリーニングが可能なが示された。

5) 血液ろ紙による脂肪酸代謝異常診断

表2に示すように、極長鎖アシル-CoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症6例 (日本人), 中鎖アシル-CoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症3例 (外国人), およびグルタル酸尿症2型1例 (GA2) (日本人) の血中遊離脂肪酸分析を行った。その結果, VLCAD欠損症ではC14:1脂肪酸の上昇が全例に認められた。MCAD欠損症3例では全例にC10:1の上昇が認められた。3例中1例はタンデムマスで偽陰性となった症例であった。GA2症例では遊離脂肪酸C8, C10, C10:1, C14:1のいずれも上昇がみられた。

考察

有機酸代謝異常症のマススクリーニングが世界的に検討されている。分析方法としてタンデムマスとGC/MSがあり, それぞれに長所と短所がある。しかし現在ランニングコストの安さ, 血液ろ紙が使用できる点, 脂肪酸代謝異常診断に向いていることなどの点から, タンデムマスが主流になりつつある⁴⁾。しかし偽陰性の問題, スクリーニング疾患の範囲の問題なども課題として残る。タンデムマスで発見された症例の確定診断, 治療, 病態評価, および偽陽性, 偽陰性をカバーする意味でも, GC/MS分析手法を用意しておくことは意義が大きい。そして, ろ

紙を用いる検体搬送ができればよりさらに有用である。また尿ろ紙, 血液ろ紙が実用化すれば外国など遠隔地からの依頼にも対応でき, 有機酸代謝スクリーニングをよりグローバルに展開できる。

文献

- 1) Fu X-W, Iga M, Kimura M, Yamaguchi S: Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. *Early Human Development* 58: 41-55, 2000.
- 2) Kimura M, Yamamoto T, Yamaguchi S: Automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system. *Tohoku J exp Med* 188: 317-334, 1999.
- 3) 木村正彦, 山口清次: 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。平成11年度厚生科学研究補助金 (子どもの家庭総合事業) 分担研究報告書 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), p394-395, 2000.
- 4) 重松陽介, 布瀬光子, 畑郁江, 真弓光文, 須藤正克: 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.

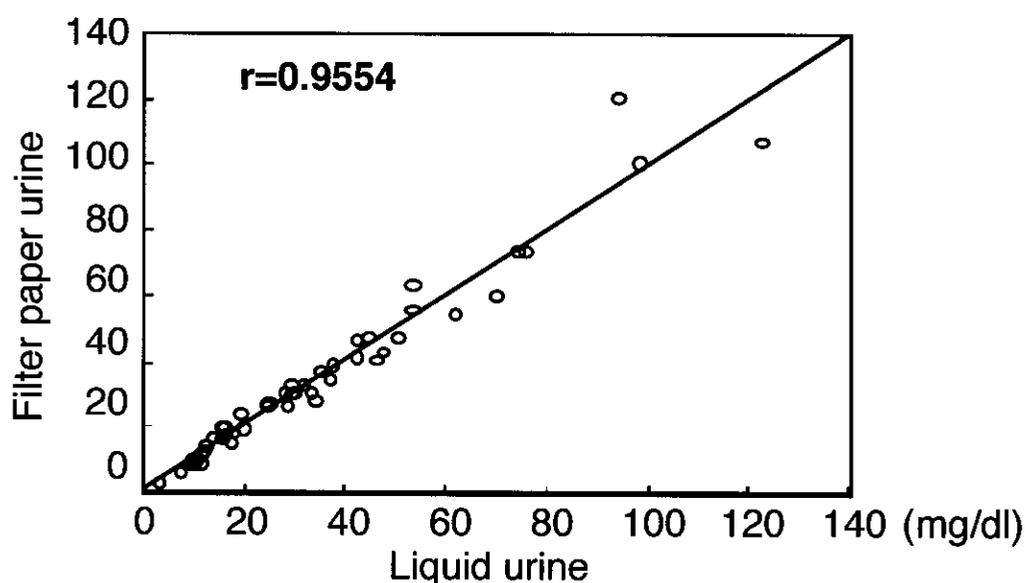


図1。原尿と尿ろ紙でのクレアチニン値の比較測定法はJaffe法

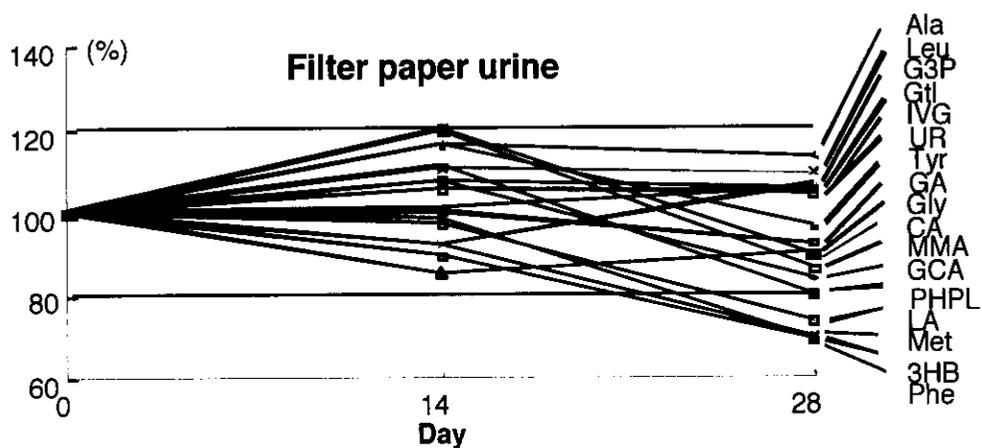


図2。乾燥尿ろ紙中の有機酸，アミノ酸の安定性

略字：Ala, alanine; leu, leucine; G3P, glycerol-3-phosphate; Gtl, galactitol; IVG, isovaleryl-glycine; UR, uracil; Tyr, tyrosine; GA, glutarate; Gly, glycine; CA, citrate; MMA, methylmalonate; GCA, glycerate; PHPL, p-OH-phenyllactate; LA, lactate; Met, methionine; 3HB, 3-OH-butyrate; Phe, phenylalanine.

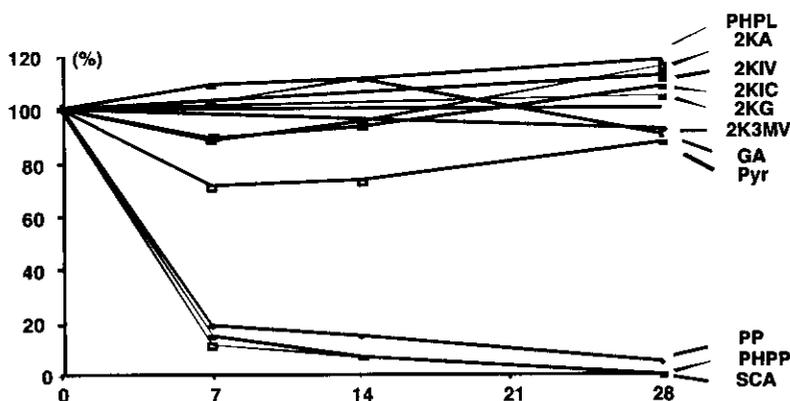


図3。乾燥尿ろ紙でのαケト酸の安定性

略字：PHPLA, p-OH-phenyllactate; 2KA, 2-ketoadipate; 2KIV, 2-ketoisovalerate; 2KIC, 2-ketoisocaproate; 2KG, 2-ketoglutarate; 2K3MV, 2-keto-3-methylvalerate; GA, glutarate; Pyr, pyruvate; PP, phenylpyruvate; PHPP, p-OH-phenylpyruvate; SCA, succinylacetone.

表1. 外国から乾燥尿ろ紙で郵送された検体のGC/MS分析結果

Disorders	number
Methylmalonic	18
Propionic acidemia	6
OTC deficiency	4
Phenylketonuria	3
3-Methylglutaconic aciduria	1
Lactic aciduria	3
Alkaptonuria	1
Maple syrup urine disease	2
Glutaric aciduria type 1	1
5-Oxoprolinemia	1
β-Keto thiolase deficiency	1
Total (disorders)	41
Total (screening)	(657)

1999.1.~2000.12.

表2. 脂肪酸代謝異常症例の血液ろ紙中の遊離脂肪酸分析

	C8	C10	C10:1	C14:1
VLCAD欠損症	7.7	4.4	nd	17.2
	7.7	5.8	nd	24.7
	7.2	5.3	nd	116.0
	3.4	7.4	nd	74.1
	7.6	5.0	nd	147.0
	4.5	5.1	nd	24.5
MCAD欠損症	2.7	4.3	1.5	nd
	19.7	11.2	6.8	nd
	25.2	12.9	13.9	nd
グルタル酸尿症2型	18.5	30.8	1.4	24.7
MCTミルク授乳中	13.1	33.7	nd	nd
ケトーシス (n= 5)	3.6-9.6	3.5-17.2	nd	nd
正常 (n=10)	2.3-8.7	2.8-7.1	nd	nd

μmol/L whole blood nd: not detect

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

有機酸代謝異常症の全国調査 2

研究要旨

先天性有機酸代謝異常症のマススクリーニングの有効性を検討するためには、疾患の負担の評価がきわめて重要である。昨年度の本研究にて全国の患者数の集計を行った。本年度は集計された症例の生命予後、生活の質などに焦点を当て調査を行った。メチルマロン酸血症、ビタミンB₁₂不応型やプロピオン酸血症においてはその生命予後のみならず、生活の質においてもきわめて低下が認められた。この面からみても有機酸代謝異常症の国民に対する疾患負担はきわめて大きいものと考えられた。

研究協力者

高柳正樹（千葉県こども病院 第二小児科部長）

研究目的

われわれはこれまで新生児の尿を用いて、先天性有機酸代謝異常症のマススクリーニングの可能性について検討を加えてきた。特にスクリーニングの有効性については各種の検討を行い報告している。有効性の評価には疾患の負担の評価がきわめて重要であり、疾患の発生頻度ならびに予後についての情報が求められる。昨年度は疾患の発生頻度について調査報告を行ったが、本年度は昨年度報告された症例について生命予後および生活の質についてアンケート調査を行った。

研究方法

昨年度の調査により回答をいただいた発生頻度の多い順に5疾患につき調査を行った。すなわちメチルマロン酸血症67例、プロピオン酸血症32例、ホロカルボキシラーゼ欠損症11例、イソ吉草酸尿症5例、グルタル酸尿症Ⅱ型4例の各主治医に対して第二次調査依頼表を送付した。調査内容はまず生命予後、死亡年齢、ビタミン反応性について行った。生存症例については生活の質について評点尺度方を用いて各主治医に評価を依頼した。さらに最近一年間の入院回数を調査した。

研究結果

アンケートの回収率は以下のとおりであった。メチルマロン酸血症 47/67例、プロピオン酸血症 23/32例、ホロカルボキシラーゼ欠損症 8/11例、イソ吉草酸尿症 3/5例、グルタル酸尿症Ⅱ型 2/4例、合計119症例中86例（77.2%）の回答率であった。疾患別の生命予後の集計表を表1に示した。生命予後の不良の疾患はメチルマロン酸血症、ビタミンB₁₂

不応型、プロピオン酸血症でありその死亡率はそれぞれ40%、44%であった。メチルマロン酸血症、ビタミンB₁₂反応型、ホロカルボキシラーゼ欠損症、イソ吉草酸尿症は生命予後良好でその生存率はそれぞれ100%、91%、100%であった。

予後不良のメチルマロン酸血症、ビタミンB₁₂不応型、プロピオン酸血症でカブランマイヤー法を用いて生存曲線を作成した（図1）。この対象症例としたのは1990年以後に生まれたそれぞれ21症例、10症例である。メチルマロン酸血症、ビタミンB₁₂不応型、プロピオン酸血症の5年生存率はそれぞれ50%、70%ときわめて不良であった。いずれの疾患においても死亡症例は3才までに発生しており、それ以後には一名の死亡症例もない。

評点尺度方を用いた生活の質についての評価のまとめを表2に示した。これにおいてもメチルマロン酸血症、ビタミンB₁₂不応型、プロピオン酸血症においては他疾患に比してその評価は低く報告された。グルタル酸尿症Ⅱ型の症例の評価も低値であった。

最近一年の入院回数の分析をおこなったが特徴ある結果を得られなかった。

考察

昨年の報告で先天性の有機酸代謝異常症の発生頻度は、各疾患を合すると少なくとも2名/10万人以上と考えられ、その疾患負担はきわめて大きい事が明らかになった。今回の調査において疾患が各個人に与えている負担もきわめて大きいことが判明した。まだスクリーニングが大規模に行われていない時期にこのような疾患が与えている負担を正確に評価しておくことは、スクリーニングの効果を科学的に評価する際に重要な必須の資料となりうる。

今回の調査からみても有機酸代謝障害症はおおきな疾患負担を国民に与えているものと考えられた。

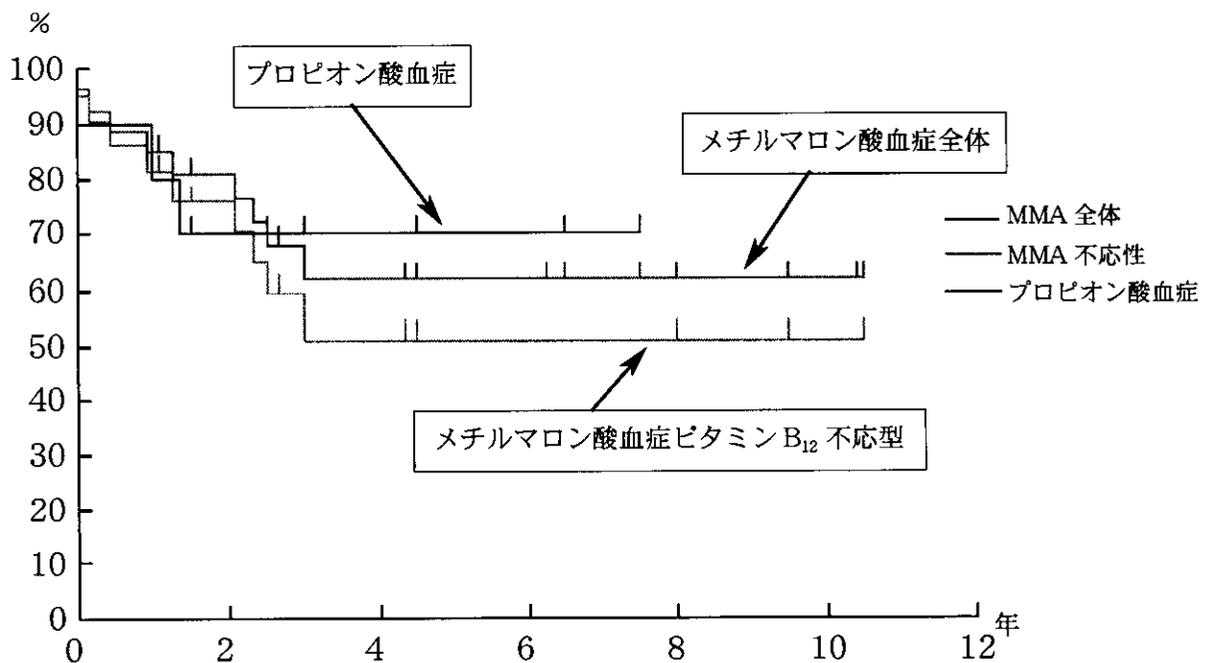
表1 各疾患における生存率

	症例数	生存者数	死亡者数	不明	生存率
メチルマロン酸血症全体	67	43	20	2	64
メチルマロン酸血症ビタミンB ₁₂ 反応型	12	12	0	0	100
メチルマロン酸血症ビタミンB ₁₂ 不応型	35	20	14	1	57
プロピオン酸血症	32	16	14	2	50
ホロカルボキシラーゼ欠損症	11	10	1	0	91
イソ吉草酸尿症	5	5	0	0	100
グルタル酸尿症II型	4	2	2	0	50

表2 各疾患における評点尺度法による生活の質の評価

	症例数	平均得点	標準偏差
メチルマロン酸血症ビタミンB ₁₂ 反応型	17	69.1	23.7
メチルマロン酸血症ビタミンB ₁₂ 不応型	11	92.3	8.7
プロピオン酸血症	13	68.8	23.2
ホロカルボキシラーゼ欠損症	8	87.5	10.7
イソ吉草酸尿症	3	88.3	
グルタル酸尿症II型	2	80	

図1 メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症における生存曲線



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

遺伝性ムコ多糖症マススクリーニングの試験的研究成績と課題

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ヶ月児尿を用いた試験的スクリーニングを継続して行い、本年度はじめて1例の患児をスクリーニングした。1993年10月から2001年1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126,732検体、陽性は2,453検体（1.9%）、2次スクリーニングは1,880検体（再検率：77%）について行い、DMB法で再陽性となった157検体（0.1%）は、精査として尿中GAGをCPC沈殿法/カルバゾール法にて再検査したところ、1例（0.0008%）が陽性となった。確定診断の結果、陽性例は中間型Hunter病患児であった。早期発見による早期治療効果を期待する。これまでの研究結果と今後の課題について報告する。

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、岩田晶子、山田美保、
吉田真弓（岐阜大学医学部小児科）

研究目的

ムコ多糖症の治療法は、骨髄移植に続いていくつもの亜型については酵素補充療法の治療が進められつつあり、効果が期待されている。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ヶ月乳幼児を対象としたスクリーニング法の試験的研究を行い、適性の検討を加えてきた。本年度も継続して実施し、さらに今後の課題を考察した。

研究方法および対象

1) 岐阜県の神経芽細胞腫マススク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ヶ月乳幼児尿を、本年度は13,600検体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¹⁾。2次スクリーニングはDMB法とCPC沈殿/カルバゾール法を併用した。クレアチニンはJaffe法により測定した。

研究結果

1) 岐阜県の6ヶ月児尿によるスクリーニング
1993年10月から2001年1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、8年間で126,732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 クレアチニン以上を示した陽性数は2,453例（1.9%）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。1,880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157例（0.1%）は、同一尿を用いてCPC沈殿/カルバゾール法にて精査を行い、最終的に1例の陽性例が認められた。

2) 陽性例の精査

2次スクリーニングで明らかに陽性であった症例は、生後8ヶ月時に外来受診、尿中GAG分析と原因酵素活性測定結果から、MPS II型(Hunter病)と診断された（表2）。受診時の臨床所見は肝臓2横指触知、蒙古斑、軽度椎体変化、僅かに顔貌異常が見られたが、関節拘縮、心臓超音波所見、ABR、耳鼻科眼科所見には異常は認められなかった。成長発達（DQテスト）は運動8ヶ月、操作8ヶ月、言語（理解）8ヶ月、言語（表出）6ヶ月、社会性10ヶ月、食事7ヶ月であり、特に成長発達遅滞は認められない。以上より臨床型は中間型であろうと判断した。

3) 骨髄移植実施までの経過

骨髄移植を希望されたが、家族にはドナー対象者はおらず、骨髄バンクへドナー検索を依頼した。骨髄バンクへの登録からドナー同意確認までの経過を表3に示す。診断後治療までに4～5月を要した。

考察

遺伝性ムコ多糖症の治療は、現在根治療法として骨髄移植が施行されているが、酵素補充療法も治験

段階までに開発が進み、また遺伝子治療への期待も高まってきている。早期診断を目的として岐阜県の乳幼児を対象に行ってきたマススクリーニング試験的研究は、8年を経て本年度はじめてHunter病患児を発見した。本症例は家族はもちろん、これまでの検診でも気付かれることはなく、マススクリーニングにより早期診断が可能であったと考えられる。治療として骨髄移植を選択したが、骨髄バンクからのドナー同意が得られるまでに4~5ヶ月を要した。以上の結果から今後の課題として、

- 1) 治療時期を踏まえたスクリーニング時期と方法を再検討する、

- 2) 経済的効率を考慮した複数疾患群スクリーニング法の確立、
 - 3) 効果的治療法開発と治療指針の検討、
- が考えられ、更なる研究の展開が望まれる。

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

表1. 岐阜県における遺伝性ムコ多糖症マススクリーニング結果 (1993.10-2001.1)

	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)
1993年度 (10月-3月)	9,449	248(2.6%)	204(82%)	7(3.4%)	0(0%)
1994年度 (4月-3月)	17,001	400(2.4%)	338(85%)	17(5.0%)	0(0%)
1995年度 (4月-3月)	17,137	257(1.5%)	197(77%)	6(3.0%)	0(0%)
1996年度 (4月-3月)	17,212	207(1.2%)	145(70%)	15(10%)	0(0%)
1997年度 (4月-3月)	17,552	215(1.2%)	181(84%)	17(9.4%)	0(0%)
1998年度 (4月-3月)	17,342	316(1.8%)	210(66%)	12(5.7%)	0(0%)
1999年度 (4月-3月)	17,439	347(2.0%)	252(73%)	33(13.1%)	0(0%)
2000年度 (4月-1月)	13,600	463(3.4%)	353(76%)	50(14.2%)	1(0.3%)
総数	126,732	2453(1.9%)	1880(77%)	157(8.3%)	1(0.0008%)

表2. 陽性例のリンパ球酵素活性測定による確定診断

nmol/mg/hr	症例	対照
Iduronate-sulfatase	n.d	6.5±1.7
iduronidase	16	28±7

表3. 骨髄移植の登録から実施までの経過

2000.8.9 (9ヶ月)	ドナー検索依頼書提出
2000.9.4	コーディネート開始依頼
2000.9.4	コーディネート開始通知
2000.10.4	3次検査実施案内通知
2000.10.11	3次検査
2000.11.16	患者の最終同意確認
2000.12.13 (1歳2ヶ月)	ドナーの最終同意確認
2001.2	移植予定

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

当施設における先天性ムコ多糖症6年間のまとめ

研究要旨

当施設では、1993年より尿濾紙を検体としてジメチルメチレンブルー呈色反応による先天性ムコ多糖症のスクリーニング法を検討し、1995年よりは当院及び関連病院にて出生した乳児を対象にスクリーニング検査を行ってきた。方法は、新生児病棟を退院時、スクリーニング検査のパンフレットと検査用濾紙を配布し、検査希望者は、1ヶ月検診時に尿を付けた濾紙を持ってくるようにした。ジメチルメチレンブルー呈色反応にて+2SD以上のもの（1次スクリーニング陽性）については、さらに濾紙をコンドロイチナーゼA/Cで消化し、反応を行った（2次スクリーニング）。消化後も正常値にならなかった乳児には、原尿を提出するよう指示し、ウロン酸測定と電気泳動とを行った。1995年1月～2000年12月での検体数は7,829、1次スクリーニング陽性は3.0%、2次スクリーニング陽性は0.31%で、患者は見つからなかった。検体数および擬陽性者の数は、季節を通じて大きな変化はなかった。

研究協力者

田中あけみ（大阪市立大学大学院医学研究科
発達小児医学）

た1996年には、コンドロイチナーゼA/C消化（2次スクリーニング）により擬陽性検体を除く方法を考案した。最終陽性者は、原尿よりムコ多糖を抽出してウロン酸測定と電気泳動とを行った。

研究目的

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。我々は、早期の骨髄移植がより大きな効果をもたらすことから、1991年より早期診断のためのスクリーニング法の検討を始めた。他方、1998年より、米国においてムコ多糖症I型の酵素補充療法の治験が始まり、さらに、II型、IV型、VI型、VII型についても酵素製剤の開発が進められている。こういった背景から、先天性ムコ多糖症のマススクリーニングの有用性は高まりつつあり、当施設においてもその方法について検討を重ねた。

【研究対象】

当初は、神経芽細胞腫のスクリーニング検体を利用することを考え、1995年に、これを用いてのパイロットスタディを大阪市の保健所を通じて行った。しかし、インフォームドコンセントの取得の煩雑さ、および、スクリーニング時期としてより早期が好ましいのではということから、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カ月児の検査希望者を対象とした。

研究方法および対象

【検体】

大阪市においては、神経芽細胞腫のスクリーニングに濾紙尿を用いていることから、この検体を利用することを検討した。

【方法】

濾紙よりのムコ多糖の抽出：ムコ多糖は水溶液には抽出されなかったため、検討した結果、アルカリ溶液による抽出が適当であった。

測定方法：ジメチルメチレンブルー呈色反応により、抽出液のムコ多糖を測定した。1993年より、96穴マイクロプレートとマイクロプレートリーダーを導入することにより、測定の能率化を図った。ま

研究結果

表1に、1995年1月から2000年12月までのスクリーニングの結果を示した。患者はまだ見つかっていない。コンドロイチナーゼA/C消化の2次スクリーニングにより、要精査検体を1/10に減らすことができた。

図1に、2000年1月から12月までの毎月の検体数と男女別の擬陽性者数を示した。擬陽性者数の季節変動や男女差はなかった。

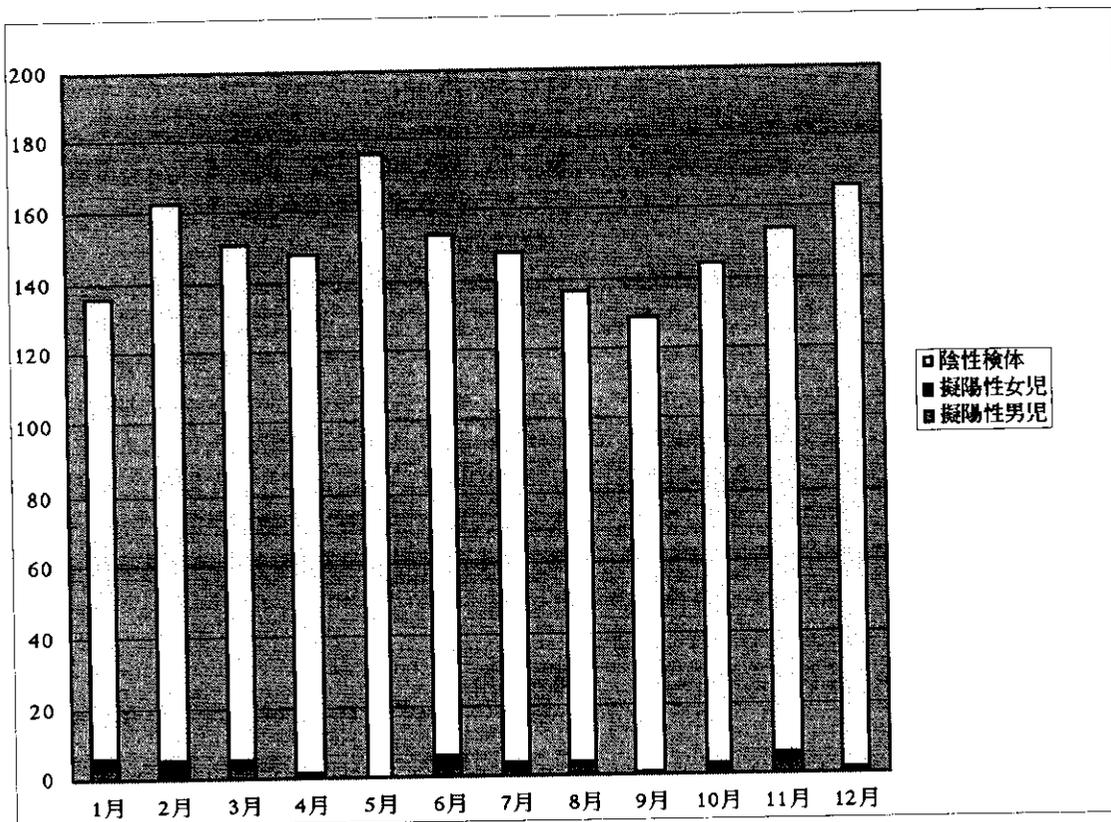
考察

ジメチルメチレンブルー呈色反応によるムコ多糖症のスクリーニングは、ある程度の擬陽性、擬陰性の発生は免れない。より効果的な方法の開発が待たれる。

表1

年	検体数	1次スクリーニング陽性者数 (%)	2次スクリーニング陽性者数 (%)
1995	2,095	31 (1.5)	施行せず
1996	380	10 (2.6)	0 (0.0)
1997	950	29 (3.0)	0 (0.0)
1998	1,077	62 (5.6)	2 (0.19)
1999	1,523	59 (3.9)	7 (0.46)
2000	1,805	43 (2.3)	9 (0.50)
総計	7,829	234 (3.0)	18 (0.31)

図1



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 －栃木県および茨城県方式－

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6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 (筑波学園病院小児科)
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)：生後約1か月の胆道閉鎖症患児および同月齢対照健康児の便カラー写真をカードに印刷し、患児の便に1～3番、健康児の便に4～7番と番号をつけ、親が児の便色調に最も近いと思う番号を選んで記入する欄を設けた。
2) スクリーニング・システム：栃木県では、各市町村で母子手帳交付時にカードを配布し、1か月健診時に健診担当医が回収した。親の判定が1～3番の場合は、担当医が実際に児の便色を確認し異常であればただちに自治医科大学小児科マススクリーニング部へ電話連絡し、親と相談の上患児を紹介すべき専門医を決定した。4～7番の場合は正常と判定した。健診時に回収されたカードは、週末にまとめて各健診担当医療機関から栃木県保健衛生事業団へ郵送され、ここで再度便色番号の確認が行われた。茨城県では、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。1か月および2か月時(または淡黄色便が3日以上続いた場合)に、親がカードを居住地の保健所宛に郵送した。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、異常と判断されたらただちに専門医を紹介した。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：栃木県では、94年8月1日から00年7月31日までに出生しカードを回収できた児を対象とし、検査期間中の出生児総数は、同時期に先天性代謝異常症等のマススクリーニングを受けた児の数とした。茨城県では、98年4月1日から00年10月31日までに出生しカードを回収できた児を対象とし、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た。また、両県とも胆道閉鎖症患児の発生総数は、県への小児育成医療申請によって確認した。

研究結果

1) 受検者：上述の検査期間中に、栃木県では出生児115,826名のうち99,179名(85.6%)が、このマススクリーニング検査を受けた。茨城県では、配布された1か月用カード68,936枚のうち26,235枚(38.1%)、2か月では69,069枚中19,074枚(28.5%)のカードが回収された。
2) 検査結果：栃木県では、1か月健診時に便色調異常を報告した58名のうち胆道閉鎖症と診断された児は9名であった。同時期に栃木県で発生した胆道閉

鎖症の患児はこの9名を含む12名で、1名は出生前診断のため受検しておらず、2名は1か月健診時には異常は認められなかった。したがって感度81.8%、陽性適中率15.5%、特異度、陰性適中率はほぼ100%であった。患児9名中8名は生後60日以内に肝門部空腸吻合術を受け、7名で黄疸が消失している。茨城県では、1か月で便色異常を報告した児11名のうち胆道閉鎖症患児は1名、新生児肝炎1名であった。2か月では便色異常8名中4名が胆道閉鎖症と診断されたが、このうち3名は1か月では受検しておらず、1名は1か月では正常であった。その他1か月では正常便でその後淡黄色便となり2か月の検査前に胆道閉鎖症と診断された患児を含め、茨城県では、胆道閉鎖症患児12名中検査を受けていたのは6名であった。

3) 胆道閉鎖症患児：検査期間中に両県で発生した胆道閉鎖症患児を表1、2に示す。

4) 栃木、茨城両県の比較を表3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85%以上である。さらに、97年4月からは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て各医療機関から栃木県保健衛生事業団でカードを回収することにより、ここでダブルチェックを行うことができるシステムになっている。茨城県では、郵送費自己負担で親がカードを郵送しているが、受検率は1か月で38.1%、2か月で28.5%にとどまっている。カードの郵送先を県内の各保健所とし保健所の協力を得ることで受検率の向上を期待したが効果は不十分で、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。両県における1か月での偽陰性患児の便色は、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。カードの配布により保護者が乳児の便色に関心を持ったこと、受検の機会が生後1か月と2か月の2回あったことが発見につながった。

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。

カードの母子手帳添付、1か月担当医によるカード回収、保健婦による陽性児の家庭訪問を基本にシステムを改良し、全国的実施を目指すべきスクリーニング法である。

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, p383-385.