

## 考察

岐阜県の6ヶ月乳幼児を対象に行ってきた遺伝性ムコ多糖症マススクリーニング試験的研究において、1例のHunter病児を発見したが、その経過を踏まえると、より早期の診断システムの構築が求められる。新生児血液ろ紙の利用が注目されるところである。スクリーニング方法として利用出来そうな方法を挙げてみると、

1つはリソソーム膜タンパク質に対するLAMP抗体を用いた方法。これは数年前から注目されており、Hopwoodがオーストラリアのパイロットスタディの後に抗体を世界に提供すると言われていた。現在また抗体(キット)の入手が出来ない状態ではある。

2つめは蓄積物質に対する抗体を用いた検出法。ムコ多糖症ではDSやHSに対する抗体検出法が考えられる。

3つめは血液ろ紙で直接原因酵素活性を測定する

方法<sup>2)</sup>。基質特異性が高い酵素は高感度検出が可能で、スクリーニングに利用出来るとの論文報告がなされている。

血液ろ紙によるスクリーニング法開発は今後の検討課題と考える。

## 文献

- 1) Iwata S et al.: Mass screening test for mucopolysaccharidoses using the 1,9-dimethylmethylene blue method: Positive interference from paper diapers. Clin Chim Acta 1997; 264: 245-250.
- 2) Chamoles NA et al: Hurler-like phenotype: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. Clin Chem 2001; 47: 2098-2102.

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（1993.10-2001.12）

	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 (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%)
2001年度(4月-12月)	12,320	315 (2.5%)	242 (77%)	45 (18.6%)	0 (0%)
総数	142,894	2,453 (1.9%)	1,880 (77%)	157 ( 8.3%)	1 (0.0007%)

表2：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
2000.8.31	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 (麻疹罹患のため延期)
2001.5	移植実施 (拒絶)
2002.2 (2歳4ヶ月)	未治療 (再移植か酵素補充療法を選択予定)

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

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  
－実施上の問題点とその対策－

研究要旨

栃木県では1994年から、胆道閉鎖症の早期発見・早期手術を目的として、便色調カラーカード法による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、本症に特有の淡黄色便を発見し患児に対して生後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7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および長期予後の改善に極めて有効なマススクリーニング法であると結論され、茨城県でも1998年から同様のカラーカードを用いたマススクリーニングが開始された。茨城県では受検率が低迷しているが、栃木県との比較により問題点が明らかとなった。栃木県方式を基本とした本法による胆道閉鎖症マススクリーニングを一日も早く全国的に実施すべきである。

研究協力者

松井陽，須磨崎亮，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)

茨城県では、1998年4月から検査を開始しているが、2000年度の受検率は、1か月42.1%，2か月32.5%にとどまっていた。茨城県でスクリーニング開始後に発生した胆道閉鎖症患者は14例であったが、検査を受けていたのは7例で、うち1か月で受けていたのは4例のみであった。生後60日以内に手術を受けたのは7例、黄疸が消失したのは7例であった。

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り、胆道閉鎖症患者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。

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年から続けられており良好な成果を上げている。栃木県と茨城県ではカードの配布方法、回収方法が異なるが、受検率、患児の発見率、早期手術のいずれをとっても栃木県の方法が茨城県に比べ優れていることが明らかであった。2001年度から、茨城県でも母子手帳交付時にカードを配布し、母子手帳に貼付するように変更した。回収方法も、1か月時は1か月健診担当医が行うことを検討中である。胆道閉鎖症には約15%の遅発例が存在するため、生後1か月での感度を100%に近づけることは困難である。茨城県では、1か月での偽陰性患児発見を目的に2か月時にもカードを回収することにしてはいたが、実際に2か月で発見された3例は、1か月では検査を受けておらず、家族が1か月健診後に児の黄疸や淡黄色便を心配して2か月で初めてカードを郵送していた。また、1か月で正常と判定された3例は、2か月のカードを出す前に便色の変化に家族が気づいて保健所もしくは医療機関に相談していた。検査の意義と必要性の理解を徹底し1か月での受検率を上げることにより、2か月まで

研究方法

生後約1か月の胆道閉鎖症患者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番と番号を付けた。1か月健診直前に、親が児の便と比色して最も近いと思う便色の番号を選んで記入した。栃木県では母子手帳にカードを挟み込んで配布し、1か月健診時に担当医がこれを回収して番号を確認した。健診担当の産科医からはガスリー濾紙と共に栃木県保健衛生事業団へ、小児科医からは自治医科大学へカードを郵送した。茨城県では、出生届提出時（又は母子手帳交付時）にカードを1か月用と2か月用の2枚配布し、1か月及び2か月時（又は淡黄色便が3日以上続いた場合）に、親が記入したカードを居住地の保健所宛に費用自己負担で郵送した。

研究結果

栃木県では1994年8月1日から2001年7月31日までに出生児の86.9%が検査を受けた。

に患児を発見することが可能であると考えられ、茨城県でも回収は1か月のみに統一し1か月健診時にカード郵送を確認することとした。なお、茨城県では保健所の協力により便色異常を報告した児を保健婦が家庭訪問するという方策を採ったことにより、胆道閉鎖症に対する保健婦の理解が深まった。便色調カラーカード法による胆道閉鎖症のマスキリングは、感度、特異度に優れている。カードの印刷は安価で、判定にも特別の技術を必要としない。胆道閉鎖症は予後不良の疾患で、肝硬変に進行して肝臓移植を必要とする患者は、年間約100人発生する。以上から、患者のQOL改善を加味した費用便益効果において、本法はフェニルケトン尿症、クレチン症のマスキリングに勝るとも劣らないことがすでに示されている。我が国における小児肝臓移植の大半を本症患者が占めること、及びそれによる医療費の高騰を考える時、厚生労働省は本症の早期発見を目指すマスキリングを一日も早く全国的に導入すべきである。

## 結論

便色調カラーカードを用いた胆道閉鎖症のマスキリングを導入することによって、胆道閉鎖症の早期発見及び黄疸消失率を改善できる。そのことは、本症の長期予後、患児の長期予後の改善につながるものと強く期待できる。以上から本法は、栃木県方式を基本にシステムを改良し、早急に全国的実施を目指すべきスキリング法である。

## 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 p64-66.
- 3) 松井陽, 他: 平成7年度本報告書 p76-78.
- 4) 松井陽, 他: 平成8年度本報告書 p214-216.
- 5) 久繁哲徳, 他: 平成7年度本報告書 p103-106.
- 6) 松井陽, 他: 平成10年度本報告書 p383-385.
- 7) 松井陽, 他: 平成11年度本報告書 p403-404.
- 8) 松井陽, 他: 平成12年度本報告書 p563-565.

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

ろ紙尿の簡易ウレアーゼ法による新生児スクリーニング試験研究  
ープロピオン酸血症と高乳酸血症の検出感度、特異性についてー

### 研究要旨

先天代謝異常症（IEM）には患者の尿や血液に蓄積した低分子量の化合物を同定することでその病因を特定できるものがあり、同定にGC/MS法が用いられた場合、その手法の厳密さ故に確定診断とされることが多い。ろ紙尿を用いるウレアーゼ前処理・GC/MS法の特異度は高く、カットオフ値の設定も容易である。ろ紙尿の新生児スクリーニング試験研究で、無症状のプロピオン酸血症（PCCD）1例を発見し、予測通りにPCCDの迅速・高精度発症前診断に役立つことを確認した。本児の尿methylcitrateは2-hydroxyundecanoate（2HUD）がISの場合でも対数正規下5SD高値と特異度は高かった。より定量精度の高い安定同位体希釈法では14.7SD高値と特異度はさらに上がった。PCC活性が6.9%に低下していること、PCCβ鎖に点突然変異が検出され、本法の信頼性の高いことが証明された。PCCDの発生率は1～2万人に1人と相当高いものと推定される。

一方、高乳酸血症についてもその発生頻度は高いことが知られている。しかし、その成因は多彩である。試験研究で乳酸高値の児1例を発見した。乳酸は対数正規下7.0SD高値と明瞭に健常と区別できた。その後、徳島大学の黒田教授により本例の成因がpyruvate dehydrogenase（PDH）のα欠損症と判明した。本法で乳酸尿症の成因を特定できるのは発症頻度の高いマルチプルカルボキシラーゼ欠損症などの数項目であり、その意味で高乳酸血症に対しては例外的に本法は大半においてスクリーニングというべきである。それにも拘わらず、尿を用いるウレアーゼ前処理・GC/MS法で検査することによってこれらの成因以外の原発性高乳酸血症の可能性が極めて高いという情報と二次的な高乳酸血症を呈する多種の有機酸血症を除外できるという情報が得られ、その後の鑑別診断を有効に進めることが出来るので、心身障害発症予防や医療費の有効利用の面での意義は大きい。

### 研究協力者

久原とみ子（金沢医科大学総合医学研究所）

### 研究方法

ろ紙尿を用いる22項目の新生児スクリーニング試験研究は両親のインフォームドコンセントを得、郵送されてきた新生児ろ紙尿を検体として用いた<sup>1,2)</sup>。

### 研究結果と考察

1) プロピオン酸血症（PCCD）は発生率が高く、残存活性が11%でも思春期以降に神経症状で発症する例や、ケトーシス発作がなくても神経障害が進行するなどの報告が欧米からなされ、患者の新生児期発見の重要性が高まっている。我々は13,000児の試験研究で無症状のPCCD児1例を発見し、予測通り、PCCDの迅速・高精度発症前診断が出来たことを証明できた<sup>3)</sup>。本児の尿methylcitrateは対数正規下5SD高値（2HUDがISの場合）、あるいは14.7SD高値（安定同位体希釈法）と本法の特異度は高かった。クレアチニンとクレアチンの和を用いた場合で

も、それぞれ、4.2SD、8.6SD高値であり、健常とは明瞭に区別できた。本児には食餌療法を開始、必須アミノ酸の制限を行うので、methylcitrate濃度を定期的に測定するなど、モニターしている。リンパ球PCC活性は6.9%、PCCβ鎖のY435Cホモ接合体であることが明らかにされ、本試験研究の手法の信頼性の高いことが証明された。京都大学の依藤博士らは久留米大学の吉田博士らや、欧米で先行しているろ紙尿の新生児スクリーニング法（MS法を用いるがタンデムMS法とよばれる）で行った福井医科大学の重松博士らの成績とも併せて、本変異ホモ接合体の存在は43児/120万児と予測した。他の変異も考慮すると我が国でのPCCDの発生率は60～70児/120万児となり、現行の狭義IEM4疾患のどれよりも高い。

2) 高乳酸血症の発生頻度は高くその成因は多彩である。試験研究で乳酸高値の児1例を発見した（乳酸は7.0SD高値）。その後、徳島大学の黒田博士らにより本例の成因がpyruvate dehydrogenaseのα

欠損症と判明し、本法の有用性が確認された。本法で乳酸尿症の成因を特定できるのは数項目であり、その意味で高乳酸血症に対しては例外的にスクリーニングというべきであるが、それでも本法の有用性は高い。なぜならこれらの成因以外の原発性高乳酸血症の可能性が極めて高いという情報と、二次的な高乳酸血症を呈する多種の有機酸血症を除外できるという情報が得られ、本例のように、その後の鑑別診断を有効に進めることが出来、迅速に成因が特定できるからである。

3) 試験研究で前述のPCCD1例、高乳酸血症1例、ピリミジン代謝異常症1例、軽度持続型メチルマロン酸尿症3例、ハートナップ病1例、 $\alpha$ -アミノアジピン酸尿症2例等を発見した。発見率は約1/1,090人であった。同じ手法で久留米大学の吉田博士らは高アンモニア血症、ホモシスチン尿症など多種の疾患を発見している。本法では多くの児を従来の二次スクリーニング以上の精度で検出でき、Evidence-based laboratory medicine (EBLM) に対応できる21世紀に相応しいものとする。

#### 結論

尿のGC/MS法は確定診断、診断支援のみならず治療開始後のモニタリングにも、また、後天性のピオチン、葉酸、ビタミンB12などの欠乏症による病態の検出にも広くEBLMとして活用できる。

尿のGC/MS法は高アンモニア血症の成因である尿素回路異常症のN-acetylglutamate synthase欠損症や、carbamoylphosphate synthase欠損症を

スクリーニングできない、あるいはこれらを鑑別できない、また、高乳酸血症の成因が多種類あって、鑑別が容易でないと多くの成書に記載されている。しかし、このような症例においても尿の簡易ウレアーゼGC/MSによる検査をしたほうがよい。鑑別できる高アンモニア血症や高乳酸血症などの多くの成因と、更にはそれ以外の多種の疾患を除外できるという情報が得られれば、残りの疾患を対象に鑑別診断を有効に進めることが出来、診断の確定に至る症例が現在よりはるかに増えることが期待できるからである。

#### 文献

- 1) 久原とみ子, 松本勇: GC/MSによる尿中代謝物一斉分析—マススクリーニングへの応用の試み. Proc. Jap. Soc. Biomed. Mass Spectrom. 20: 45-51, 1995.
- 2) T. Kuhara: Diagnosis of inborn errors of metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B 758: 3-25, 2001.
- 3) T. Kuhara, M. Ohse, Y. Inoue, T. Yorifuji, N. Sakura, H. Mitsubuchi, F. Endo, J. Ishimatu: Gas chromatographic-mass spectrometric newborn screening and diagnosis of propionic acidemia by targeting methylcitrate in dried filter-paper urine samples. J. Inher. Metab. Dis. in press, 2002.

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究  
GC/MSによる新生児スクリーニングで発見されたホモシスチン高値をともなうメチルマロン酸血症

## 研究要旨

我が国におけるメチルマロン酸血症の頻度が予想外に高いことが、本研究で明らかになった。その頻度は約5,000名に1名と、我が国での甲状腺機能低下症に匹敵する高頻度であった。また軽症型や良性メチルマロン酸血症と考えられていた患者の中にホモシスチン高値をともない、ビタミンB<sub>12</sub>の大量投与で画期的に改善する病型の含まれることが明らかになった。軽症型や良性メチルマロン酸血症はタンデム質量分析法（MS/MS法）では見逃されやすく、ガスクロマトー質量分析法（GC/MS法）でないとは正確には診断できない。

従来、先天性代謝異常症は小児疾患のなかでは稀なものとの位置付けがなされていたが、本研究の結果、スクリーニング方法が適切であれば、決して稀ではなく、従来は原因不明の死亡とされていた新生児、乳幼児の成因が明らかになり、早期発見、早期治療によって健常児と同じく順調に成育することが明らかになった。このようなことから、GC/MS法による新生児先天性代謝異常スクリーニングは少子高齢化時代の我が国の小児保健行政への貢献が極めて大きいと考えられる。

## 研究協力者

吉田一郎

（久留米大学医学部医学教育学，  
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，城後美佐，  
金子明代，松本かおり，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による新生児先天性代謝異常症スクリーニングの有用性を検討することが、本研究の目的である。今回は特に、GC/MSスクリーニングにおけるメチルマロン酸血症の意義について報告する。

## 研究方法

1996年から2001年12月までの間に九州北部地区において、31,535名の新生児をスクリーニングした。サンプルは、4～6生日の新生児尿をもちいて、ウレアーゼ法をもちいて処理した後、GC/MS用のサンプルとした。代謝物質の分析方法は平成10年度の報告書を参考されたい。

## 研究結果

表1に示したように31,535名の中から、グリセロールキナーゼ欠損症を含む25名の患児を発見した<sup>1)</sup>。全体としての発見率は1/1,260であり、メチルマロ

ン酸血症は約5,000名に1名であった。発見されたメチルマロン酸血症の6名の中で、最初はいわゆる良性メチルマロン酸血症症状と考えられたが、後に血中ホモシスチン高値を伴うことが判明し、ビタミンB<sub>12</sub>の大量投与で劇的に改善したメチルマロン酸血症の一例が含まれていた。この患者は在胎38週、頭位分娩、生下時体重は3,042g。5生日尿でメチルマロン酸、メチルクエン酸の増加があり、26日に採取した尿でメチルマロン酸、メチルクエン酸、ホモシスチンの増加を認めた。1ヶ月健診までは、体重増加良好で経過を観察していた。3ヶ月頃より、体重増加、筋緊張低下が出現したため、ビタミンB<sub>12</sub>の投与（1mg/日）を開始したところ、筋緊張低下は消失し、血中のホモシスチン高値は正常化し、尿中メチルマロン酸は消失するなど、臨床症状、検査所見とも著しい改善を認めた（表2）。

## 考察

現在、世界的には新生児代謝異常スクリーニングはガスリー法からMS/MS法へと変わりつつある。これは所用時間が短い、従来の血液濾紙を利用できること、分析機器や維持のための費用は別として、測定のための費用が安価という理由によるものであるが、正確性によるものではないことは今までの報告書で述べたとうりである。事実、今回の我々のスクリーニング結果によっても、スクリーニングによる患者発見数という立場からは、GC/MS法が

MS/MS法よりも遥かにすぐれたスクリーニング手段であることが理解されよう。

今回のスクリーニング結果で特筆すべきことの一つは、メチルマロン酸血症の頻度の高いことが明らかになったことである。約5,000名に1名という頻度は従来の予想を大きく上回るものであり、また1,260名に1名の割合で疾患が発見されたことは、先天性代謝異常症が小児疾患中、決して稀ではないことを示唆している。

今回、ホモシスチンの高値をともなったメチルマロン酸血症患児の場合には、最初は尿中メチルマロン酸値も低く、全く無症状であったことから、良性メチルマロン酸血症の可能性が高いと判断し、経過を観察していた。しかし、3生月頃から体重増加、筋緊張低下が出現し、ビタミンB<sub>12</sub>の大量投与を開始したところ、臨床症状、検査所見ともに見違えるような改善を示し、現在は全く健常児と同じレベルに達している。このことは一見、良性のメチルマロン酸血症と考えられる患者の場合においても、ビタミン B<sub>12</sub>の代謝異常によるホモシスチン高値をともなうメチルマロン酸血症の可能性を考えておくことの重要性を示唆するものである。メチルマロン酸血症のスクリーニングにおいては、プロピオニルカルニチンを診断マーカーにするかぎり、MS/MS法では良性型や軽症型メチルマロン酸血症を見逃しやすいことは、前年度の報告書で述べたとうりである。メチルマロン酸血症スクリーニングにおけるGC/MS法の長所はメチルマロン酸というもっとも検出しやすい物質を診断マーカーとしていることであり、現時点ではGC/MS法がメチルマロン酸血症

スクリーニングのためのもっとも優れた方法といえよう。またメチルマロン酸血症の頻度がGC/MS法をもちいる場合には、約5,000名に1名という高頻度で、MS/MS法での約6万人に1名という結果と大きく異なることが判明した<sup>2)</sup>。このようなことから、GC/MS法によるスクリーニングの対象疾患をメチルマロン酸血症のみに限定しても本スクリーニングが十分に意義のあるものであることが理解されよう。しかし、本研究でのスクリーニング数はまだ3万名あまりとサンプルサイズが小さいので、今後とも多方面にわたる経験の集積が必要であろう。

## 結論

GC/MS法は新生児先天性代謝異常スクリーニングにおいて、多くの患者を発見できる優れた方法であり、GC/MS法では約5,000名に1名の割合いでメチルマロン酸血症を発見できる。また良性メチルマロン酸血症と考えられる患者の中には、ビタミンB<sub>12</sub>に対して画期的に反応するホモシスチン高値をともなうメチルマロン酸血症が含まれていることが明らかになった。

## 文献

- 1) Dipple KM, Zhang YH et al.: Glycerol kinase deficiency: Evidence for complexity in a single gene disorder. Hum Genet 109: 55-62, 2001.
- 2, 平成13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効率的実施及び開発に関する研究，研究班全体会議，平成12年2月2日

表1：試験期間中発見された疾患

期 間：1996年1月～2001年12月  
検体数：31,535

・ 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
・ 神経芽細胞腫	2例
・ メチルマロン酸血症	6例
・ プロピオン酸血症	2例
・ メープルシロップ尿症	1例
・ 2-ケトアジピン酸尿症	7例
・ ジヒドロピリミジン脱水素酵素欠損症	1例
・ ジヒドロピリミジン分解酵素欠損症	2例

表2：ビタミンB12治療前と治療後の変化

	治療前 (H13.10.24)		治療後 (H13.11.07)	
<b>【症状】</b>				
体重増加	8.9	→	45.1	(g/日)
筋トーン	低下	→	改善	
<b>【検査値】</b>				
血中ホモシステイン	64.2	→	4.9	(nmol/ml)
尿中メチルマロン酸	182.50	→	n.d.	(nmol/mol Cr.)
メチルクエン酸	28.05	→	5.98	(nmol/mol Cr.)

S.O. (久留米大学小児科 I.D. 442624-0)



分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

有機酸・脂肪酸代謝異常スクリーニングの検討：日本人患者の発症形態と予後の調査

## 研究要旨

有機酸・脂肪酸代謝異常の新生児マススクリーニングの予後改善効果を検討するために、日本人の有機酸代謝異常154例、 $\beta$ 酸化異常症患者71例を対象に、発症時期、臨床経過、予後を調査した。1) 有機酸代謝異常症：新生児期に発見された症例は全体の25%、乳児は35%、1才以降は40%であった。正常予後は新生児例の0.5%、乳児19%、1才以降37%であった。死亡例は、新生児例の53%、乳児28%、1才以降11%であった。2)  $\beta$ 酸化異常症：新生児発症例は13%、乳児例46%、2才以降41%であった。正常予後は、新生児例の22%、乳児64%、2才以降98%であった。死亡例は、新生児例の56%、乳児12%、2才以降0%であった。両疾患ともに新生児期発症症例の予後は不良であったが、乳幼児期以降に発症した症例の予後はおおむね良好であった。特に $\beta$ 酸化異常症は乳児期中期より急性脳症、突然死様の発症形態をとることが多いといわれているので、新生児マススクリーニングによって、発症前に診断しておけば、のちの発症予防、障害予防に有効である。

## 研究協力者

山口清次，堀大介，玉置由子，長谷川有紀，  
木村正彦（島根医科大学小児科）

## 研究目的

有機酸・脂肪酸代謝異常の新生児マススクリーニングの予後改善効果を検討すること。

## 研究方法

### 1) 有機酸代謝異常症：

島根医科大学小児科でGC/MSによって発見した有機酸代謝異常154例を対象に、分析依頼票および主治医に対するアンケート調査などによって調査した。

### 2) $\beta$ 酸化異常症：

1985～2001年の間に発見された日本人患者71例を対象に、アンケート調査を行なった。71例中30例は島根医科大学小児科において診断に関わった症例であり主治医から必要な臨床情報を得た。

### 3) 調査項目：

発症時期、発症時の臨床所見、臨床経過、予後を調査した。

## 研究結果

### 1) 有機酸代謝異常症：

表1に示すように、新生児期に発見された症例は全体の25%、乳児35%、1才以降40%であった。正常予後は新生児例の0.5%、乳児19%、1才以降37%であった。死亡例は、新生児例の53%、乳児28%、1才以降11%であった。「正常予後群」、「死

亡群」以外は種々の後遺症を残して生存した群である。図1に示すように発症時期は疾患によって異なるが、代表的な有機酸血症であるメチルマロン酸血症、プロピオン酸血症は新生児期早期に発症する症例が多かった。また図2に示すように、診断された時期と予後を見ると、新生児期に診断された症例は必ずしも予後がよいとはいえなかった。むしろ年長になって診断された症例に予後のよい症例が多かった。

### 2) $\beta$ 酸化異常症：

表1に示すように、新生児発症例は13%、乳児46%、2才以降41%であった。正常予後は、新生児例の22%、乳児64%、2才以降98%であった。死亡例は、新生児例の56%、乳児12%、2才以降0%であった。 $\beta$ 酸化異常症の発症形態を見ると、新生児期発症の症例では筋緊張低下、嘔吐、多呼吸、など新生児期の非特異的的症状で発症し短時間のうちに全身状態が悪化する例が多かった。一方、乳児期の症例では、急性脳症、ALTE（またはSIDS）様の急性症状で発症する症例が多かった。また乳幼児期以降の症例では（特に学童期以降）骨格筋症状が主症状であった。発症時期と予後の関係を見ると、図4に示すように、新生児発症の症例は死亡例が多く、乳幼児期以降の発症例ではほとんどの症例が正常な発達を示した。しかし筋痛、脱力など骨格筋症状が間欠的に起こる症例が少なくなかった。

## 考察

発症形態は、有機酸代謝異常症は乳児期早期から

急性症状で発症する症例が多かったのに対し、β酸化異常症では乳児期、乳幼児期以降に急性脳症様または骨格筋症状で発症する症例が多かった。β酸化異常症の発症形態は年齢によって一定の特徴がみられることが示された。

両疾患ともに新生児期に発症した症例の予後は不良であったが、乳幼児期以降に発症した症例の予後はおおむね良好であった。すなわち乳児期以降に発症する可能性のある患者を、新生児マススクリーニングによって発症前診断できれば、のちの発症予防、障害予防にきわめて有効である。特にSIDSや原因不明の急性脳症の予知にも役立つ可能性が高く、現在の社会的要請にも合致する<sup>1)</sup>。

最近タンデムマスが新しい新生児マススクリーニング技術として世界的に普及しつつある<sup>2)</sup>。従来ガスリー法で行なわれていたアミノ酸代謝異常をカバーするのみならず、有機酸代謝異常、β酸化異常症の多くの疾患をスクリーニングすることが可能である。タンデムマスを第一次スクリーニングとして、アミノ酸分析計、GC/MS有機酸分析<sup>3)</sup>による精密検査体制を整えた新生児マススクリーニングを検討すべき

である。

### 結論

有機酸代謝異常、β酸化異常症は新生児期の発症例では予後は良くないが、乳児期以降に発症する症例は予後は悪くない。最近世界的に普及しつつあるタンデムマスを中心とした有機酸代謝異常、β酸化異常症の新生児マススクリーニングの意義は大きく、少子化社会における社会的要請に応えることになる。

### 文献

- 1) 山口清次ら：ミトコンドリアβ酸化異常症の病態と臨床的特徴。小児科 42：70-82, 2001.
- 2) 重松陽介ら：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.
- 3) 山口清次, 木村正彦：GC/MS技術を応用した微量尿分析による有機酸代謝異常の多疾患診断・スクリーニング。小児科 40: 1226-1232, 1999.

表1. 有機酸代謝異常症、β酸化異常症の発症時期と予後

発症時期		新生児	乳児期	乳幼児以降
有機酸代謝異常	患者割合	25 %	35 %	40 %
	正常	0.5 %	19 %	37 %
	死亡	53 %	28 %	11 %
β酸化異常	患者割合	13 %	46 %	41 %
	正常	22 %	64 %	98 %
	死亡	56 %	12 %	0 %

「新生児期」とは生後1ヶ月未満。「乳児期」とは生後1ヶ月～2才。「乳幼児期以降」とは生後2才0ヶ月以降（成人発症例も含む）。

「正常」とは精神発達が正常ないしほぼ正常。「死亡」とは若年死亡。

図1：有機酸代謝異常症の発症時期と予後 ○ 正常 △ 回復 × 死亡

診断名	出生時	1m	6m	12m	2y	// 6y
Methylmalonic acidemia	●●△△×× ●●△△×× ●●△△××	●●△△ △△△△ △△△△	●●△△ △△△△ △△△△	△	●	●●
Propionic acidemia	△△ △ ×	△△×	×	●△		
OTC deficiency	△△×× △△×× ×	●	●△		●	△× ×
Multiple carboxy. deficiency	● ×	●	●●	●		
Pyroglutamic aciduria	△ △		× ×			
HMG lyase deficiency			●	●		
Glutaric acidemia type I		△ △				
Glutaric acidemia type II			●●			

図2：有機酸代謝異常症の診断時期と予後

○ 正常    △ 後遺症    × 死亡

診断名	出生時	1m	6m	12m	2y	6y
Methylmalonic acidemia	△△△△ △△△△	●△ △△	●△△△ △△△△	●△△△ △△△△	●△△△ △	●●●● ●△△
Propionic acidemia	△△ ×	●△ △×	△× ×	△	● △	
OTC deficiency	△△ ××	△	×	●	●● △△	△△ ××
Multiple carboxy. deficiency	●×	△	●●		△	
Pyroglutamic aciduria		△			×	△
HMG lyase deficiency				●	●	
Glutaric acidemia type I			△			△
Glutaric acidemia type II			●			●

図3：β酸化異常症の発症時期と臨床症状

○ 神経学的症状    ● 急性脳病    □ 持続脳病

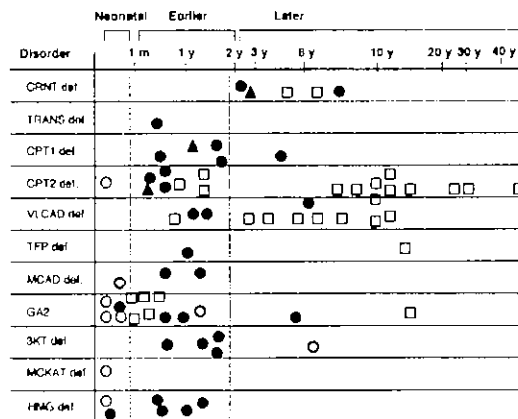
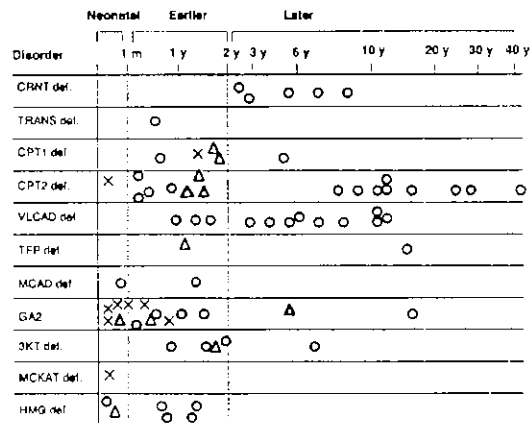


図4：β酸化異常症の発症時期と予後

○ 正常    △ 後遺症    × 死亡



分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

### 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展開

#### 研究要旨

タンデム質量分析計による新生児代謝異常マススクリーニングの大量検体測定システムを改良し、大量検体処理をより安価に行うことが可能になった。更に対象地域を拡大し、開始以来約118,000新生児をスクリーニングし、プロピオン酸血症 (PA) 5例、メチルマロン酸血症 (MMA) 2例、Ⅱ型シトルリン血症 (CTRN2) 3例、フェニルケトン尿症1例、中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症 (MCAD) 2例を発見した。PAおよびMMAのスクリーニングにはアセチルカルニチン/プロピオニルカルニチン比を用いたカットオフ値が有用であった。MCADのスクリーニングにおいて諸外国で採用されているカットオフ値を採用すると見逃しが生じることが判明した。CTRN2のスクリーニングにおいてはシトルリン値のカットオフ値の設定は困難であったが、他のアミノ酸値との組合せでスクリーニングが可能かどうか検討が必要と考えられた。

#### 研究協力者

重松陽介  
畑郁江

(福井医科大学看護学科)  
(福井医科大学小児科)

と同様、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<sup>1)</sup>に準じた。1件体当たりの測定時間1.9分を採用し、実用性を確認した。試料のブチルエステル誘導体化は、ブタノールとacetylchlorideとの混合溶液を用いて行った。処理に用いる機器について、ステンレス製とプラスチック製のものを作成し、その耐腐食性を比較した。

カットオフ値については既報<sup>2)</sup>のものを、新たに診断した症例での値などを参考にして、再検討した。

#### 研究目的

我々は、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のパイロットスタディを、我が国で唯一のセンターとして実施してきた。しかしながら、未だ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。

今回、大量検体を迅速にかつ安価に処理するために、TMSマススクリーニングでの検体処理及び測定システムの改良が可能か検討した。その中で、実施地域を更に拡大し、検体搬送システムの問題点を検討した。また、スクリーニングで発見された患者や、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の分析を行うことで、対象疾患毎のスクリーニング指標値のカットオフ値の妥当性について検討した。

#### 研究結果

検体処理において、ブタノール/acetylchloride混合溶液を誘導体化試薬として使用した場合、塩酸ブタノール試薬を用いる時と比べ、誘導体化効率には差がなかったが、溶液乾涸に用いる器具がステンレス製の場合腐食が激しく、調整されたサンプルに不純物が混入し、分析感度を低下させる傾向が認められた。プラスチック製のノズルを有する乾涸機器の場合は、このような問題は生じなかった。

このようにして調整したサンプルを、オートサンブラーを使用して1件体当たり測定時間1.9分で夜間運転分析を行っても、支障なく大量検体処理が可能であった。

2001年12月末までに約118,000の新生児をスクリーニングし、5例のプロピオン酸血症 (PA)、2例のメチルマロン酸血症(MMA)、3例のⅡ型シトル

#### 研究方法

これまで実施してきた福井県、広島県、徳島県に加え、大阪市の協力医療機関においても、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。昨年度まで

リン血症(CTRN2), 2例の中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(MCAD), 1例のフェニルケトン尿症(PKU)を診断することが出来た。

PA・MMAのスクリーニングについて, 既報通りプロピオニルカルニチンのアセチルカルニチンに対するイオン強度比を指標とし0.25というカットオフ値を用いると, 再検率は0.06%であった。尿のGC/MSスクリーニングで見出されたMMA患者での値は, “良性”型と考えられる症例でこの指標がカットオフ値以下であり, それ以外の患者ではカットオフ値以上であった。一方, この比が0.28で, 極軽度の尿中メチルマロン酸排泄を示す新生児がスクリーニングされたが, メチルマロニルCoAムターゼ活性は正常であった。ビタミンB<sub>12</sub>大量投与によりメチルマロン酸排泄は見られなくなったので, B<sub>12</sub>関連異常が示唆された。

診断された5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。

MCADのスクリーニング指標としてC8アシルカルニチン濃度を用い, そのカットオフ値を暫定的に0.3 nmol/ml (mean+3SD)とした。1例のMCAD患者についてはこれが0.62 nmol/mlであり, 陽性と判定されるべきであったが, 手動での再確認作業中に誤って見逃され, 生後7か月時に低血糖を伴って急性発症し, 救急蘇生処置が施行され救命された。他の1例では, この値は4.12 nmol/mlと非常に高値であり, 診断後直ちにカロリー補充と低脂肪食療法が開始され, 以降一度も急性発症を経験していない。

CTRN2のスクリーニング指標として, シトルリン濃度を用い, カットオフ値を50 nmol/mlとすると, 3例ともスクリーニング出来た。乳児期以降に本症と診断した3症例の新生児期濾紙血を分析した結果, 2例では新生児期にはこのシトルリンのカットオフ値では陽性にならなかった。これらの6症例で, ガラクトース高値を示したり, メチオニン・チロシン・フェニルアラニン・アルギニンといったアミノ酸の高値を示す症例が多かったが, シトルリン高値との関係において一定の傾向は見られなかった。

## 考察

欧米でのTMSスクリーニングの主たる対象疾患がPKUとMCAD(ともに頻度が1:10,000~1:20,000)であるのに対し, 我が国ではプロピオン酸血症(頻度がおよそ1:22,000)であることは前年の研究報告の中で指摘した<sup>2)</sup>。このことは本年度のパイロット

スタディでもPA患者が診断されていることで支持された。

一方MCADについては, 我が国では前年度我々が化学診断した1例が知られるのみであったが, 本年度2例の本症がスクリーニングされた。その頻度は約1:60,000となり, MCADは我が国でも決して稀でないことが示唆された。そのカットオフ値について, 最近の欧米の研究<sup>3)</sup>で1.2nmol/mlが採用されているようであるが, この値は我々が経験した症例の値を考慮するとやや高すぎるように見える。一方で我々の0.3 nmol/mlという値も再検率からするとやや低いと考えられる。米国の生後2日目採血で0.5 nmol/mlのカットオフ値が採用されている<sup>4)</sup>ので, 今後このレベルを検討すべきと考えられた。

CTRN2については, 患者のDNA分析から疾患頻度は約1:20,000程度と考えられ, 前述したPAの頻度と類似している。本症は新生児期の治療に関し確立したものがないことや, 多くの症例で生涯発症しない可能性も指摘されていることから, 新生児スクリーニングの意義について議論がある。しかしながら, かなりの症例が新生児・乳児期に胆汁鬱滞性肝機能障害で発症したり, 現行の新生児スクリーニングでガラクトース高値として見出されている現状からすると, シトルリン高値から容易に本症の診断に結びつけられるTMSスクリーニングの有用性は特筆すべきものであろう。ただし, 新生児期にはシトルリンがカットオフ値を越えない症例もあり, カットオフ値がやや低めに設定されているので再検率が上がる要因となる。シトルリン以外のアミノ酸値の変化と組み合わせたスクリーニング法の検討が必要と考えられた。

上記疾患以外にもカットオフ値を適切に設定する必要が考えられる。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。

## 文献

- 1) 重松陽介, 平野聡子, 畑郁江, 他: 日本マス・スクリーニング学会雑誌, 2001; 11: 57.
- 2) 重松陽介, 畑郁江. 平成12年度厚生科学研究報告書. 2001; 545.
- 3) Clayto PT, Doi M, Ghafari S, et al.: Arch Dis Child, 1998; 79: 109.
- 4) Marsden D, Zytkevicz T, Larson C, et al.: Inher Metab Dis, 2000; 23 (Suppl): 1-4.

## マスクリーニングの効率的実施及び開発に関する研究

### 分担研究：神経芽細胞腫スクリーニング・プログラムの疫学評価

分担研究者 林邦彦（群馬大学医学部保健学科教授）

#### 研究要旨

平成13年度厚生科学研究・子ども家庭総合研究事業「マスクリーニングの効率的実施及び開発に関する研究（主任研究者：徳島大学医学部長・黒田泰弘・課題番号H13-子ども-006）」のなかで、分担研究「神経芽細胞腫スクリーニング・プログラムの疫学評価」を行う。今年度は、神経芽細胞腫マスクリーニングの効果を疫学的に検証するためのサンプル・サイズ計算、平成7年以降生まれの新生児を対象に人口動態統計・死亡票に基づき実施されている全国前向き追跡研究についての中間解析（平成11年末までの神経芽細胞腫死亡）、およびHPLC法マスクリーニング効果と治療の時代的効果の代数的な分離の試算を実施した。

観察対象コホートを受診群と未受診群に分け、各群の神経芽細胞腫死亡を比較することにより、マス・スクリーニングの効果を疫学的に検出するためには、検出力0.9とするとき2,328万人年の総観察人年が必要であった。また、平成7年～平成11年の人口動態統計死亡票に基づく中間解析の結果、確定できた総観察人年は、954万人年であった。平成11年末までの神経芽細胞腫死亡は、受診者群で15件、未受診者群で9件、受診確認中の例が7件であり、6か月以降における神経芽細胞腫瘍の死亡率は、受診者群で0.181/10万人年（95%信頼区間0.089～0.272）、未受診群で0.727/10万人年（0.252～1.202）であった。現在、平成12年の人口動態統計死亡票の閲覧許可を申請中であり、必要サンプルサイズである2,328万人年を満たすには、平成14年末までの死亡追跡が必要となる。また、神経芽細胞腫の死亡の年代推移に基づき、HPLC法導入の効果と、治療の年代効果を、代数的に分離し推定することも試みられ、HPLC法を使用したマスクリーニングによる減少の割合は約50%、それ以外の因子による減少は約8%と推定された。

#### 研究協力者

武田康久（山梨医科大学保健学II）  
西基（札幌医科大学公衆衛生学）  
山本圭子（埼玉県立小児医療センター）  
片野田耕太（東京大学大学院医学系研究科）

#### 研究協力機関

厚生労働省児童家庭局母子保健課  
厚生労働省大臣官房統計情報部

#### 研究目的

神経芽細胞腫は、小児の固形腫瘍としては、脳腫瘍に次いで頻度が高いものである。わが国では生後6か月の乳児を対象に、神経芽細胞腫マスクリーニングが1984年から全国規模で実施され、1990年頃にはマスクリーニングに利用される尿中腫瘍マーカーの測定は、より感度の良いHPLC法で行われるようになっている。

この神経芽細胞腫マスクリーニングの効果につ

いて検討した代表的な大規模疫学研究としては、Quebec Neuroblastoma Screening Project研究や25道府県後向き研究などがある。しかしながら、疫学的評価について未だ国際的にコンセンサスが得られているとは言いがたい。

そこで、全国のすべての乳児を対象に、前向きに神経芽細胞腫死亡を追跡観察する本研究が、厚生省児童家庭局母子保健課、および厚生省大臣官房統計情報部の協力を得て、平成7年生まれ小児コホートから開始された。今年度報告では、前向きコホート研究における必要サンプル・サイズ、平成11年末までの人口動態統計・死亡票に基づく神経芽細胞腫瘍死亡の中間解析、またHPLC法マスクリーニング効果と治療の時代的効果の代数的な分離の試算について報告する。

#### 研究方法および結果

1. 必要サンプル・サイズの計算

未受診群における神経芽細胞腫死亡率を1.1人/10万人年、 $\alpha$ =片側0.05、 $\beta=0.10$ もしくは0.30（検出力0.9もしくは0.7）、スクリーニングにより神経芽細胞腫死亡頻度が40%減少、受診率を0.80と仮定した場合、ハザード比に基づき算出された対象総数は、2,328万人-年（ $\beta=0.1$ ）、1,214万人-年（ $\beta=0.3$ ）であった。また、累積死亡比に基づき算出された対象総数は、548万人（ $\beta=0.1$ ）、319万人（ $\beta=0.3$ ）であった。

## 2. 全国前向きコホート研究の中間結果

各年の出生コホートにおける受診数は、スクリーニング受診者リストに基づいて、神経芽細胞腫検査実施主体（都道府県・政令市・特別区）から厚生省児童家庭局母子保健課へ報告される受診者数によった。また、各年度の出生数からスクリーニング受診者数を引いた数を、未受診者群の数とした。神経芽細胞腫患者およびスクリーニング受診の特定は、厚生省児童家庭局母子保健課において、小児慢性特定疾患（悪性新生物）医療意見書、および神経芽細胞腫マススクリーニング検査陽性者予後調査から確認した。

平成7年～平成11年生コホートにおける、平成11年末までの神経芽細胞腫死亡は、56件である。このうち、確定観察対象期間外の死亡（観察期間を超えた時点での死亡）が5件、生後6か月までの死亡の例が15件、また6か月までの臨床的発見の例が5件あった。これらは、スクリーニング効果検証の解析対象

から除外した。生後6か月以降における神経芽細胞腫瘍の死亡率は、受診者群で0.181/10万人年（95%信頼区間 0.089～0.272）、未受診群で0.727/10万人年（0.252～1.202）であった。

## 3. HPLC法の効果における代数的分離の試算

人口動態統計に基づき、HPLC法の効果と治療の効果を代数的な式を導入することで分離し、HPLC法マススクリーニングの死亡率低下に及ぼす効果を推定した。

その結果、HPLC法を使用したマススクリーニングによる減少の割合は約50%、それ以外の因子による減少の割合は約8%と推定された。

## 考察および結論

現時点で、全国前向き研究で確定された観察人年は、954万人年であった。受診群の未受診群に対する死亡率比は、0.249（0.109～0.568）であり、現在受診の有無を確認中である7例がすべて受診していたと仮定した場合でも、0.381（0.176～0.824）であった。しかしながら、全観察が4年間以下と短いこと、また未だ総観察人年は必要最小観察人年の41%（954人年/2,328人年）であることから、今後の継続観察が必要であることが明らかとなった。算出された必要最小サンプル・サイズからは、人口動態統計・死亡票により平成14年末までの死亡の確認が必要と考えられた。

分担研究：神経芽細胞腫スクリーニング・プログラムの疫学的評価

人口動態統計・死亡票による評価

研究要旨

神経芽細胞腫マス・スクリーニングの効果を疫学的に検証することを目的として、平成7年以降に生まれた全国新生児全数を対象に、前向き追跡研究を実施している。小児慢性特定疾患意見書などの受診記録によって確認された生後6か月時神経芽細胞腫マス・スクリーニング受診の有無から、観察対象コホートを受診群と未受診群に分け、各群の神経芽細胞腫による死亡を比較するものである。この群間比較によって、マス・スクリーニングの効果を疫学的に検出するため必要となるサンプル・サイズ算出を行った。

現在、平成12年の人口動態統計死亡票の閲覧許可を申請中であるが、今までに人口動態統計死亡票により確認された神経芽細胞腫死亡（平成7年1月1日～平成11年12月31日の死亡）に基づいて、中間解析を行った。その結果、観察が確定できた観察人年は、平成7年生コホート414万人年、平成8年生コホートで301万人年、平成9年生コホートで179万人年、平成10年生コホートで60万人年、総観察人年は954万人年であった。また、平成11年12月31日までの死亡において、受診者群の死亡が15件、未受診者群の死亡が9件、受診確認中の例が7件であり、6か月以降における神経芽細胞腫瘍の死亡率は、受診者群で0.181/10万人年（95%信頼区間 0.089～0.272）、未受診群で0.727/10万人年（0.252～1.202）であった。受診群の未受診群に対する相対死亡危険（死亡率比）は、0.249（0.109～0.568）であり、現在受診の有無を確認中である7例がすべて受診していたと仮定した場合、0.381（0.176～0.824）であった。

研究協力者

林邦彦（群馬大学医学部保健学科）  
武田康久（山梨医科大学保健学II）  
西基（札幌医科大学公衆衛生学）  
山本圭子（埼玉県立小児医療センター）  
片野田耕太（東京大学大学院医学系研究科）

研究協力機関

厚生労働省児童家庭局母子保健課  
厚生労働省大臣官房統計情報部

研究目的

神経芽細胞腫は、小児の固形腫瘍としては、脳腫瘍に次いで頻度が高い。わが国では生後6か月の乳児を対象に、神経芽細胞腫マス・スクリーニングが、1984年から全国規模で実施されている。1990年頃には、マス・スクリーニングに利用される尿中腫瘍マーカーの測定は、TLC法に替わって、より感度の良いHPLC法で行われるようになってきている。

しかしながら、神経芽細胞腫マス・スクリーニングの集団としての効果（effectiveness）は、現在まで疫学的に実証されているとは必ずしも言えない。国際的なコンセンサス会議において有効性エビデン

スの欠如について問題点が指摘され<sup>1)</sup>、また、TLC法とGC法を用いて北米で実施された前向き疫学研究、Quebec Neuroblastoma Screening Project研究<sup>2),3)</sup>では、有効性に否定的な報告がなされている。そのため、現在コンセンサス会議<sup>4)</sup>では、神経芽細胞腫スクリーニングを公衆衛生の政策としては支持しないと、結論付けている。

一方、神経芽細胞腫の発生・死亡の頻度は小さく、スクリーニングの効果を疫学的に検証するには、きわめて大きな集団を対象にする必要がある。

Quebec Neuroblastoma Screening Project研究のようにスクリーニング実施地域と未実施地域を比較する地域間比較ではなく、大規模な同一集団内での、神経芽細胞腫スクリーニングを受診した小児と未受診の小児を比較することは（集団内同時比較）、わが国で実施された25道府県後向きコホート研究以外では、殆ど行われてこなかった。このような大規模な観察的疫学研究は、現在マス・スクリーニングを全国規模で実施中のわが国でしか実施できないともいえる。

この25道府県後向きコホート研究<sup>5)</sup>では、未受診群に対する受診群の神経芽細胞腫死亡の相対危険は



0.547 (95%信頼区間: 0.306~0.976) と統計学的に有意に低く、また年齢別の相対危険も、6か月~1歳未満で0.324, 1~4歳で0.567であった。また、進行期神経芽細胞腫(病期ⅢおよびⅣ)の発生も、1~4歳の相対危険0.339 (95%信頼区間: 0.257~0.620) と、有意に減少していた。この結果は、大規模な多地域集団を対象に、HPLC法でのスクリーニングの有効性を、初めて疫学的に検討したものと見える。

しかしながら、25道府県後向き研究では、東京・大阪の大都市部地域は対象となっておらず、対象外地域との転入・転出、対象外地域の医療機関での受診・受療、またスクリーニング受診の有無や神経芽細胞腫患者の発生・死亡の確認方法が必ずしも統一されていないなどの問題もあった。そこで、全国のすべての乳児を対象に、前向きに追跡観察する本研究が、厚生省児童家庭局母子保健課、および厚生省大臣官房統計情報部の協力を得て、平成7年生まれの小児から開始された。

本報告では、前向きコホート研究における必要サンプル・サイズの算出、および平成7年1月1日から平成11年12月31日までに発生した神経芽細胞腫瘍死亡にもとづいての、中間的解析の結果を報告する。

### 必要サンプル・サイズの計算

・ハザード比による算出法

事象発生件数(神経芽細胞腫死亡数)を $d$ 、 $i$ 番目の対象における観察時間を $t_i$ とすると、ハザード $\lambda$ の最尤推定量は、

$$\hat{\lambda} = \frac{d}{\sum t_i}$$

である。未受診群および受診群の観察人-年を $m_0$ ,  $m_1$ , 事象発生件数(神経芽細胞腫死亡数)を $cb_0$ ,  $cb_1$ , ハザードを $\lambda_0$ ,  $\lambda_1$ とし、両群のハザードの比を $\Delta (= \lambda_1 / \lambda_0)$ , 観察人-年の比を $r (= m_1 / m_0)$ とし、 $cb_0$ ,  $cb_1$ がそれぞれポアソン分布に従う時、帰無仮説 $\Delta=1$ のもとハザード比を検出するために必要となる未受診群の最小例数は、

$$n_0 = \frac{d_0}{\lambda_0} = \frac{\{Z_\alpha(\Delta r + 1) + Z_\beta(1+r)\sqrt{\Delta}\}^2}{(1-\Delta)^2(\Delta+r)\lambda_0}$$

となる。

・累積死亡差による算出法

生後6ヶ月の小児の固定コホートを設定し、ある十分な観察期間後における、未受診群および受診群の累積死亡(割合)を $\pi_0$ ,  $\pi_1$ とし、両群の累積死亡の差を $\Delta (= \pi_1 - \pi_0)$ , 対象例数の比を $r (= m_1 /$

$m_0)$ とすると、帰無仮説 $\Delta=0$ のもと累積死亡差を検出するために必要となる未受診群の最小例数は

$$n_0 = \frac{\{Z_\alpha\sqrt{(r+1)\pi(1-\pi)} + Z_\beta\sqrt{r\pi_0(1-\pi_0) + \pi_1(1-\pi_1)}\}^2}{(\pi_0 - \pi_1)^2}$$

となる。

ここで、未受診群における神経芽細胞腫死亡率を1.1人/10万人年、 $\alpha$ =片側0.05、 $\beta$ =0.10および0.30(つまり検出力0.9および0.7)、スクリーニングにより神経芽細胞腫死亡頻度が40%減少し(ハザード比もしくは累積死亡比=0.6)、受診率を0.7~0.85と仮定し、統計学的に神経芽細胞腫死亡頻度の減少を検証するために、必要となる受診者・未受診者の総数の算出結果を、付1に示す。例えば、未受診者の割合が20%の場合、ハザード比に基づき算出された対象総数は、2,328万人-年( $\beta=0.1$ )、1,214万人-年( $\beta=0.3$ )であった。また、累積死亡比に基づき算出された対象総数は、548万人( $\beta=0.1$ )、319万人( $\beta=0.3$ )であった。

### 前向きコホート研究の方法

#### 1) 観察対象集団および観察期間

対象コホートの定義は、理論的には、平成7年以降において、スクリーニング対象年齢である生後6か月時点で神経芽細胞腫が未発生のわが国在住の全小児となる。しかし、操作的には、平成7年1月1日以降にわが国で生まれた新生児を観察対象集団とした。生後6か月を観察起点とし追跡観察期間を累積する動的コホートを形成した(図1)。ただし、生後6か月以前に、マス・スクリーニング以外の方法で神経芽細胞腫が発見された小児(6か月既発症児)は、コホート・メンバーから除くものとする。観察期間の算出においては、同一年の出生コホート・メンバーはすべて年央に出生し、追跡観察期間はその6か月後から開始したものとした。出生コホート・メンバー数は、厚生省人口動態統計(出生)から把握した。

#### 2) 対象集団における受診・未受診数

各年の出生コホートにおける受診群の数は、年度ごとにスクリーニング受診者リストに基づいて、神経芽細胞腫検査実施主体(都道府県・政令市・特別区)から厚生省児童家庭局母子保健課へ報告される受診者数によった。また、各年度の出生数からスクリーニング受診者数を引いた数を、未受診者群の数とした。

#### 3) 神経芽細胞腫患者同定とスクリーニング受診

厚生省児童家庭局母子保健課において、小児慢性特定疾患(悪性新生物)医療意見書、および神経芽

細胞腫マス・スクリーニング検査陽性者の予後調査から、神経芽細胞腫患者とそのマス・スクリーニング受診の有無を確認した。

#### 4) 神経芽細胞腫の死亡の同定

人口動態統計調査・死亡票により、平成7年1月1日以降、わが国で発生した神経芽細胞腫の死亡を補足した（現時点では、平成7年1月1日～平成11年12月31日の5年間）。死亡時年齢が20歳未満で、原死因符号が①心臓、後隔及び胸膜の境界部病巣

(C38.1, C38.2, C38.8), ②末梢神経及び自律神経系 (C47.0～C47.9), ③後腹膜及び腹膜

(C48.0, C48.1, C48.2, C48.8), ④副腎 (C74.1, C74.9), ⑤その他及び部位不明 (C76.0～C76.8)

の悪性新生物であるものを選び出した。選び出された死亡票において、「死亡の原因」、手術「部位及び主要所見」、解剖「主要所見」の記述から、「神経芽細胞腫」による死亡を同定した。なお、人口動態統計の使用転写は、総務庁の指定統計調査・調査票使用許可のもと、厚生省大臣官房統計情報部において行われた。

#### 前向きコホート研究の中間結果

##### 1) 追跡観察人年

神経芽細胞腫の死亡を指標に、追跡観察された人年は、平成7年生コホート414万人年、平成8年生コホートで301万人年、平成9年生コホートで179万人年、平成10年生コホートで60万人年であり、総観察人年は954万人年であった（表1）。

算出した必要最小サンプル・サイズは、相対死亡危険 $\alpha=0.6$ ,  $\beta=0.05$ ,  $\beta=0.1$ の仮定のもと、2,328万人年（ $\beta=0.3$ とすれば1,214万人年）であり、4歳12か月までの追跡観察により観察人年を満たすためには、平成14年末までの追跡観察が必要となる。平成14年末までの死亡確認により、総観察人年は2,572万人年となると予想され、必要観察人年を得るには、平成14年末までの死亡確認が必要となる。

##### 2) 神経芽細胞腫瘍による死亡

平成7年～平成11年生コホートにおける、平成11年12月31日までの神経芽細胞腫による死亡は、56件であった。このうち、確定観察対象期間外の死亡（観察期間を超えた時点での死亡）が5件、生後6か月までの死亡の例が15件、また6か月までに臨床的に発見された例が5件であった。これらの例は、スクリーニング効果検証のための解析対象から除外した。

各出生コホートごとに、年齢別の死亡件数をみると、平成7年生コホートでは、6か月～1歳未満で1件、1歳で8件、2歳で7件、3歳で4件であった。平成8年生コホートでは、6か月～1歳未満で0件、1歳

で4件、2歳で5件であった。平成9年生コホートでは、6か月～1歳未満で0件、1歳で2件、また、平成10年生コホートでは、6か月～1歳未満で0件であった（表2）。

##### 3) 受診群・未受診群別の神経芽細胞腫の死亡

スクリーニング受診者群と未受診者群別に、上記の神経芽細胞腫の死亡をみると、受診者群の死亡が15件（6か月～1歳未満で0件、1歳で5件、2歳で9件、3歳で1件）、未受診者群の死亡が9件（6か月～1歳未満で1件、1歳で5件、2歳で1件、3歳で2件）、受診確認中の例が7件（6か月～1歳未満で0件、1歳で4件、2歳で2件、3歳で1件）であった（表2）。

生後6か月以降における神経芽細胞腫瘍の死亡率は、受診者群で0.181/10万人年（95%信頼区間

0.089～0.272）、未受診群で0.727/10万人年

（0.252～1.202）であった。受診群の未受診群に

対する相対死亡危険（死亡率比）は、0.249

（0.109～0.568）であり、現在受診の有無を確認

中である7例がすべて受診していたと仮定した場合、

0.381（0.176～0.824）であった（表3）。

また、1歳～3歳11か月における死亡率は、受診

群で0.241/10万人年（0.119～0.363）、未受診

者群では0.865/10万人年（0.266～1.465）であっ

た。なお、6か月～1歳の死亡は、未受診群における1例のみであり、死亡率および相対死亡危険の算出は行わなかった。

#### 考察

米国予防サービス特別委員会（USPSTF）の基準では、スクリーニングの効果評価のための研究設計としては、無作為比較試験（randomized controlled trial, RCT）が最も検証力が強いとされている。その意味では、RCTの実施が望まれる。しかしながら、現在すでにスクリーニングが全国規模で実施されており、受診・未受診を無作為に割り付けるRCTの実施は倫理的観点から困難である。また、そのための費用と時間を確保することも困難である。以上のようなRCTの利点と欠点を考えた場合、スクリーニング評価のための次善の研究デザインとして、比較的短期間に、費用が少なく、比較的検証力が強い研究が求められることになる。

こうした問題点を考慮して、国際的にもスクリーニングの効果評価に分析疫学的研究として利用されている、前向きコホート研究（prospective cohort study）として、わが国のHPLC検査によるスクリーニングについて評価するため、全国新生児前向き研究を開始した。また、当研究では、スクリーニング効果を評価する上でのバイアスである健康度の偏りを排除するため、効果の指標として集団の死亡率を

用いている。

本報告において、平成11年死亡までに確定観察できた総観察人年は約954万人年であった。研究開始時に算出した必要最低観察人年2,328万人年を満たすには、あと3年間の継続観察が必要となる(表1)。少なくとも、平成12年、13年の死亡まで補足できれば、総観察人年は2151万人年(4歳12か月までであれば、2032万人年)となり、マス・スクリーニングの効果を統計学的に実証するに足る観察人年がほぼ得られると考えられた。

本中間解析では、1～3歳における神経芽細胞の死亡率は、受診者群で0.241/10万人年、未受診群で0.865/10万人年であった。25道府県後向き研究の結果では、受診群1～4歳0.282/10万人年、未受診群1～4歳0.498/10万人年であり、それと比較すると、本中間解析結果の受診群ではほぼ同様の値でといえるが、未受診群では若干高いものであった。このことは、本研究では未だ観察期間が短いため4歳での死亡が観察できずその影響が考えられるほか、後向き研究では未受診群の患者の発生・死亡が同定されにくくスクリーニングの効果が過小評価されている可能性も示唆された。この点は、今後の本研究において追跡観察が継続されることによって、明らかになると考えられる。

### 結論

1) 現時点で観察が確定できた観察人年は、954万人年であった。計画時の必要最小サンプル・サイズに比較すると、あと2～3年の継続追跡観察が必要である(平成14年末までの死亡の確認が必要である)。

2) 平成11年12月31日までの死亡において、受診者群の死亡が15件、未受診者群の死亡が9件、受診確認中の例が7件であり、6か月以降における神経芽細胞腫瘍の死亡率は、受診者群で0.181/10万人年(95%信頼区間 0.089～0.272)、未受診群で0.727/10万人年(0.252～1.202)であった。

3) 受診群の未受診群に対する相対死亡危険(死亡率比)は、0.249(0.109～0.568)であり、現在受診の有無を確認中である7例がすべて受診していたと仮定した場合、0.381(0.176～0.824)であった。

### 文献

- 1) Murphy SB, et al: Do children benefit from mass screening for neuroblastoma? Lancet, 337: 344-346, 1991.
- 2) Woods WG, et al: A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. Lancet, 348: 1682-1687, 1996.
- 3) Woods WG, et al: The effect of neuroblastoma screening on population based mortality. Med Pediatr Oncol, 31: 249-250, 1998.
- 4) Philip T, et al: Report of the 1998 Consensus Conference on Neuroblastoma Screening. Med Pediatr Oncol, 33: 357-359, 1999.
- 5) 久繁哲徳ら：神経芽細胞腫スクリーニングの評価－1. 死亡率を指標とした検討－. 厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)平成11年度総括報告書, 2000.

図1. 全国前向き動的コホートの設定 (●→ 生後6か月からの実観察期間)

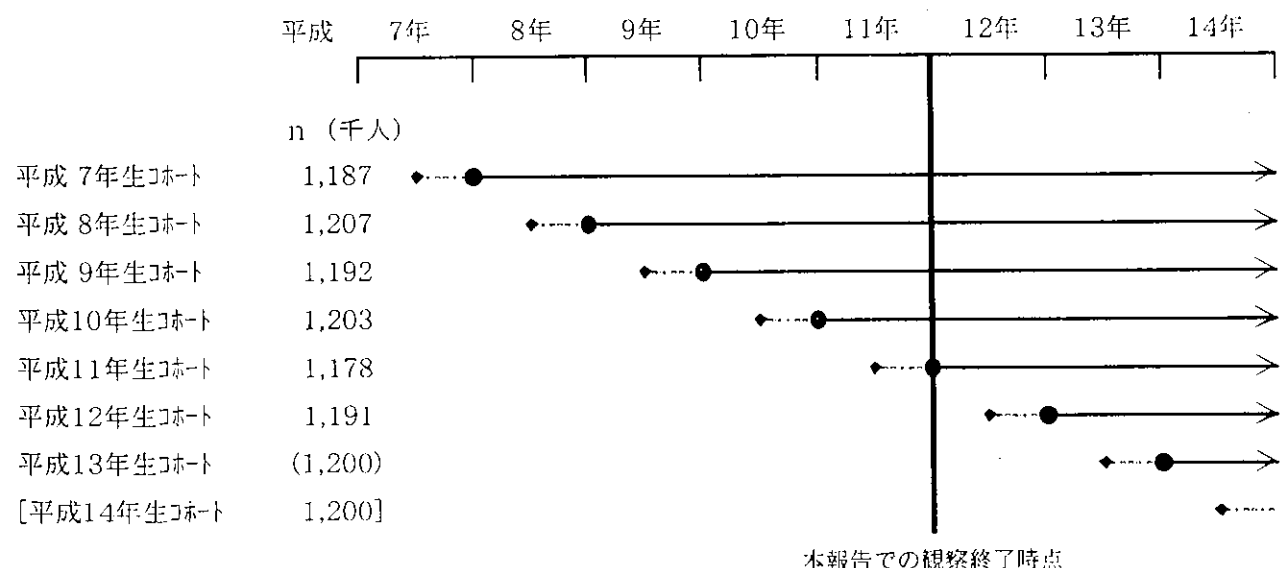


表1：出生コホート別出生数と追跡観察人年

	出生数 (千人)	(受診群, 未受診群)			
		追跡観察人年 (万人年)		予定追跡観察人年 (万人年)	
		平成11年12月31日 までの死亡		平成14年12月31日 までの死亡*	
平成7年生	1,187	414	(365, 49)	533	
平成8年生	1,207	301	(258, 43)	541	
平成9年生	1,192	179	(156, 24)	538	
平成10年生	1,203	60	(52, 8)	420	
平成11年生	1,178	—	—	300	
平成12年生	1,191	—	—	180	
平成13年生	1,200	—	—	60	
平成14年生	1,200	—	—	—	
計		954	万人年	2,572	万人年

\*：4歳11か月までの追跡観察

表2：出生コホートごとの神経芽細胞死亡件数（受診群, 未受診群, 受診確認中）

	6か月～1歳未満	1歳	2歳	3歳
平成7年生	1 (0, 1, 0)	8 (4, 3, 1)	7 (5, 1, 1)	4 (1, 2, 1)
平成8年生	0 (0, 0, 0)	4 (1, 2, 1)	5 (4, 0, 1)	—
平成9年生	0 (0, 0, 0)	2 (0, 0, 2)	—	—
平成10年生	0 (0, 0, 0)	—	—	—
計	1 (0, 1, 0)	14 (5, 5, 4)	12 (9, 1, 2)	4 (1, 2, 1)

表3：スクリーニング受診有無別の神経芽細胞腫死亡率

	総人年 (万人年)	死亡率 (95%信頼区間) (/10万人年)		相対死亡危険 受診/未受診		確認中が受診と仮定	
6か月以降の 全観察期間							
受診群	830	0.181	(0.089~0.272)	0.249	(0.109~0.568)	0.381	(0.176~0.824)
未受診群	124	0.727	(0.252~1.202)	—	—	—	—
1歳～3歳							
受診群	623	0.241	(0.119~0.363)	0.278	(0.118~0.656)	0.408	(0.182~0.917)
未受診群	92	0.865	(0.266~1.465)	—	—	—	—