

分担研究：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

Wilson 病スクリーニングに対する遺伝子診断のまとめ

研究要旨

Wilson 病マススクリーニング・システムにおける ATP7B 遺伝子解析による遺伝子診断の方略とその位置づけについてまとめを行った。Wilson 病患者 55 例に対する遺伝子解析の結果、21 種類の変異が同定された。そして、エクソン 8, 11, 13 および 18 に全変異の約 90% が認められた。これらのエクソンより解析を行うことにより、効率の良い遺伝子診断が可能であると考えられた。また、遺伝子診断は尿中銅排泄量が増加していない年少例の診断に特に有用であると考えられ、3 歳児を対象とした本症のマススクリーニングにおいては、非侵襲的な確定診断法になりうると考えられた。

研究協力者

清水教一（東邦大学医学部小児科学第二講座）
竹下由紀子（東邦大学医学部小児科学第二講座）
逸見仁道（東邦大学医学部分子生物学研究室）
嶋武博之（東邦大学医学部分子生物学研究室）
岡田光正（東邦大学理学部生物分子学科）
青木継稔（東邦大学医学部小児科学第二講座）

研究目的

現在 3 歳児を対象とした Wilson 病マススクリーニング・システムの確立が検討されている。本研究にて筆者らは、本システムにおける ATP7B 遺伝子解析による遺伝子診断の有用性とその位置づけ、および効率の良い遺伝子解析の方略について、当教室における研究のまとめを行った。

研究方法

対象：日本人 Wilson 病症例 55 例。

方法：対象症例の末梢血より genomic DNA を抽出し、PCR 法を用いて ATP7B 遺伝子の各エクソンを増幅した。これらの PCR 産物に対してダイレクト・シーケンシングを施行し、塩基配列を決定して変異を同定した。ダイレクト・シーケンシングは ABI 社 373S あるいは 3700 オートシーケンサーを用いて行った。なお、遺伝子解析はすべて患者本人あるいは保護者の同意を得て行った。

研究結果

55 症例、110 アリルより 21 種類の変異が同定

された。R778L (21.8%)、2871delC (16.4%)、A874V (12.7%) および 2659delG (10.0%) などが頻度の高い変異であった。

変異の頻度をエクソンごとにまとめたところ、エクソン 8, 11, 13 および 18 の 4 エクソンに全変異の 89% が認められた。

症例

8 か月男児。感冒にて血液検査を施行し、その時に Wilson 病マススクリーニング・パイロットスタディに協力した。その結果、血清セルロプラスミン値低下を認め、本症を疑い精査を行った。肝機能、尿中銅排泄量は正常であったが、ATP7B 遺伝子解析にて、2299insC 変異を homozygous に認め、Wilson 病と診断された。遺伝子解析による家族内検索を行ったところ、9 歳の姉が発症前型 Wilson 病と診断された。

考察

Wilson 病の遺伝子変異は極めて多岐にわたり、また人種差が認められる¹⁾。今回の結果より、日本人 Wilson 病症例においては、エクソン 8, 11, 13, 18 の 4 エクソンより解析を行うことにより、効率の良い遺伝子診断が可能であると考えられた。また Wilson 病マススクリーニング・システムにおける遺伝子診断の位置づけを考えるために、3 歳児における尿中セルロプラスミン値測定による一次スクリーニングから、診断確定までの方略を検討した(図)。遺伝子診断は、特に尿中銅排泄量の増加しない年少例の診断確定に有用であることより、尿中および血清セルロ

ラスミン値より本症を疑われ、かつその年齢より尿中銅排泄量の増加が期待できない症例に対し、施行するのが良いと考えられた。

2. 遺伝子診断は年少例の診断確定に特に有用であると考えられた。

結論

1. 日本人 Wilson 病症例に対する ATP7B 遺伝子解析の結果より、エクソン 8, 11, 13, 18 から解析を行うことにより、効率良く遺伝子診断を行うことが可能であると考えられた。

文献

1) Shimizu N, Nakazono H, Takeshita Y, et al: Molecular analysis and diagnosis in Japanese patients with Wilson's disease. *Pediatr Int.* 41: 409-413, 1999

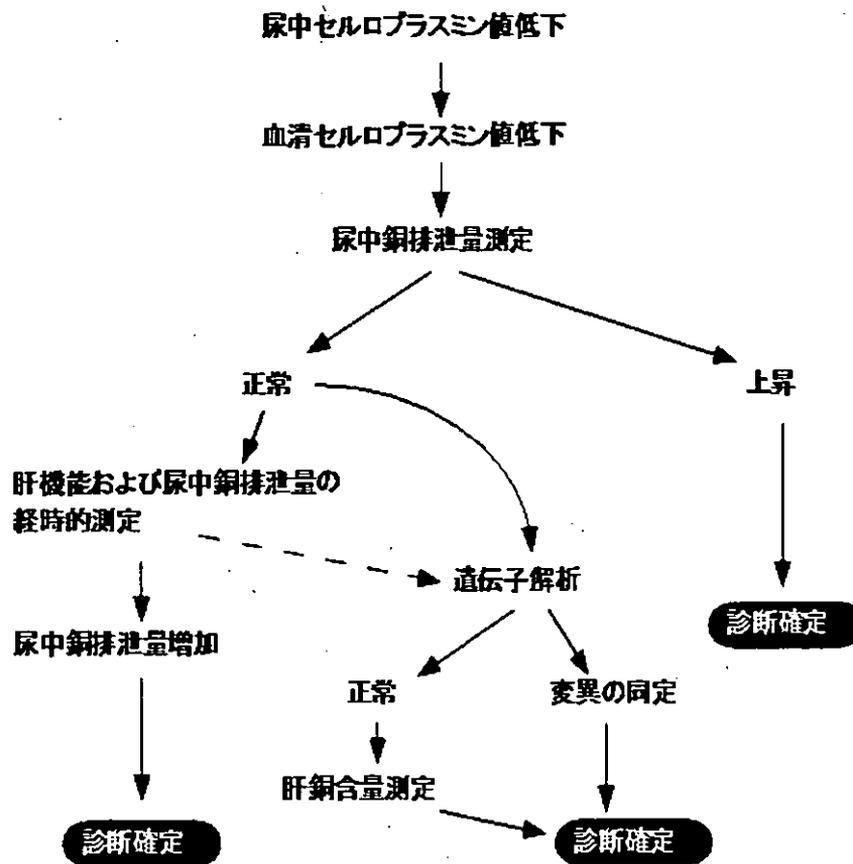


図. Wilson 病診断における遺伝子解析の位置づけ

分担研究：マスキング方法および新しい対象疾患に関する研究

尿中セルロプラスミン値測定を用いた Wilson 病マスキングについてのまとめ

研究要旨 平成13年から15年まで Wilson 病のマスキング実施に向けてのパイロットスタディを乳幼児、特に3歳児健康診査の検尿（以下3歳児検尿）において行った。地域は北海道、秋田および東京にて行った。3年間の累積は全体で30,346名、うち3歳児検尿受検者は26,996名であった。現在までに1名の保因者（遺伝子検査にて変異が見つかった）を発見し、現在も2名が精査中である。3年間を通じて3歳児検尿における Wilson 病マスキング希望者は90～100%であり、まれな疾患でありながら児の両親らの強い関心を得た。過去に小学生検尿のパイロットスタディ48,819名を行い2名の発症前患者を発見しており、今後3歳児検尿時のマスキングを継続しまた他地域にも広げることにより、Wilson 病全国マスキング確立へ向けて進みたい。

研究協力者

山口之利（東邦大学医学部第二小児科）
清水教一（東邦大学医学部第二小児科）
青木継稔（東邦大学医学部第二小児科）

研究目的

先天性銅代謝異常症の Wilson 病は早期発見・診断・治療が重要な疾患である。このためマスキング確立は重要である。過去に新生児マスキングろ紙血を用いたセルロプラスミン値測定をおよそ12万人に行ったが患者発見にいたらなかった。（のちに1名発見された）新生児期ではセルロプラスミンの値が正常値より低めでかつ不安定なため、カットオフ値を上げると再検査率が高くなってしまい、マスキングとしては不都合を生じた。そこで値の安定する乳幼児、学童の尿中セルロプラスミン値を用いたマスキングに切り替えた。過去（平成10～11年）に行っ

た学童検尿を用いた尿中セルロプラスミン測定による Wilson 病パイロットスタディでは48,819名から発症前患者2名を発見しており、有用性は証明できている。ただし学童期では肝不全型の発症の可能性があり、時期としては少し遅いので、現行の3歳児健診における一般検尿を利用した尿中セルロプラスミン測定による Wilson 病マスキングのパイロットスタディを実施した。

研究方法

対象は北海道、秋田、および東京都下4市を中心に現行の3歳児健康診査時に行われる検尿を利用し、尿中セルロプラスミン、尿中クレアチニンを測定した。東京都に関しては合わせて、東京小児科医会の協力を得て、外来での希望者を含めて採尿、検査を行った。マスキング協力施設を表1

に示す。尿中セルロプラスミン測定は ELISA キット (ニプロ) あるいはラテックス免疫比濁法 (ナスカ) にて測定し、尿中クレアチニン値で補正した値で比較検討した。スクリーニングのカットオフ値は 20~45ng/mg・Cr、あるいは全体の下位 5% タイルを指標に決定した。

研究結果

結果を表 2 に示す。北海道では合計 6,444 名中 10 名が精密検査となり、そのうち 1 名が遺伝子変異を確認した Wilson 病の保因者であることが判明した。もう 1 名は現在精査中である。北海道において再検査率が 4% と比較的高かったことは一部の検体に含まれていた細菌増殖防止用のグルコン酸クロルヘキシジン (ヒビテン) の濃度が高かったためかと考えられた。その後は再検査率 1~2% に落ち着いてきている。秋田では 9,313 名の検査で 0 名、東京では 3 歳児検尿 11,239 では現在までに 0 名であるが、小児科医会を通じた検尿で 1 名が現在精査中となっている。表 3 に 3 歳児検尿における Wilson 病スクリーニング希望者の受検率を示す。すべての地域において 90% 以上の高い受検率を示しており、現行の 3 歳児健康診査の受診率と相まってスクリーニングとしては妥当と考えられた。さらに 3 歳児の両親の Wilson 病に対する深い関心がみとれ、スクリーニングの重要性が再認識された結果となった。

考察

平成 13~15 年にかけて 3 歳児検尿を用いた Wilson 病スクリーニングを行った。また同時に東京小児科医会の協力を得て、外来

診療での希望者 (3 歳以外も) に対しても検尿を行った。3 年間の総数は 30,346 名のうち 26,967 名が 3 歳児検尿利用者であった。現在までに 1 名の Wilson 病保因者が発見された。これは今後の家族内検索や児の将来 (次世代に対して、早期発見、治療により全く無症状で過ごせる) にとって重要である。Wilson 病は本邦での全国調査において約 3,4000 人に 1 人とされており、今後発見される確率は高いと考えられる。もう一方でこの 3 年間を通じて 3 歳児健診受診者の Wilson 病スクリーニングに対する高い関心を示した点は重要と考えられた。すなわち、この 3,4000 人に 1 人というまれな先天性代謝異常疾患に対して、まれだから自分たちの子は違うといった考えではなく、先天性疾患といっても青年期や成人期になって発症することがある点などから受診者の関心が高いと考えた。過去に小学生検尿のパイロットスタディ 48,819 名を行い 2 名の発症前 Wilson 病患者を発見している。まれな疾患とはいえ現行のマスクリーニング対象疾患であるフェニルケトン尿症の頻度はおよそ 100,000 人に 1 人である点からも、早期発見、治療が重要である Wilson 病をスクリーニングすることは有用であり、意義深いと考え、今後も全国規模のスクリーニングに向け 3 歳児検尿を利用した検討を続けることが重要であると結論した。

参考文献

- 1) 青木継稔ほか; Wilson 病の全国追跡調査成績. 小児内科, 1991 (23) 1893-1898

分担研究：マスキング方法および新しい対象疾患に関する研究

Wilson病マスキング早期導入の必要性について— まとめ —

研究要旨

平成13・14・15年度3年間に、Wilson病マスキングに関する研究を行った。血液あるいは濾紙血を用いて、血中セルロプラスミンを指標としてスクリーニングする方法が最も良いが、新生児期あるいは乳児早期は生理的低セルロプラスミン血状態にあり、マスキングをこの時期に行うことが困難であるため、乳児後半期以降がよい。しかし、採血上の困難さがあるため、新鮮尿を用いて尿中セルロプラスミンを測定することによるWilson病のマスキングについてこの3年間検討した。対象年齢は、3歳児を中心とし、3年間5万検体以上のパイロット・スタディを実施した。尿を用いて尿中セルロプラスミン測定を行う方法についての基礎的研究を重ねた。その結果、Wilson病マスキングは有用であり、3歳児を中心とする尿中セルロプラスミン測定を指標として、本症のマスキングの早期導入が必要であると結論した。さらに、スクリーニング陽性者の取り扱いと確定診断法、確定診断された症例の治療方針の策定を行った。行政的に本症マスキングに際し、スクリーニング費用の一部を受益者負担（有料）としてもよいことを提言した。

研究協力者

青木継稔 (東邦大学医学部第2小児科)
山口之利 (東邦大学医学部第2小児科)
清水教一 (東邦大学医学部第2小児科)

研究目的

Wilson病は、遺伝性銅代謝異常症であり、常染色体劣性遺伝形式をとり男女両性に出現する。わが国における発症頻度は、出生約3.5万人に1人とされ、フェニルケトン尿症の約2.5倍である。発症・発見年齢は、2～50歳と幅広いが10～11歳にピークがある。発病様式は、個人差があり多様であるが、肝型、肝神経型、神経型に大別される。自然経過において症状発現の多様性、医師の本症に対する認識不足による診断の遅れなどにより、発症・発見あるいは診断時において、肝型は慢性肝炎・肝硬変あるいは肝不全、肝神経型は肝硬変に神経症状、神経型は神経症状が進行している。この発症・発見あるいは診断時年齢に治療を開始しても、不幸な転帰による死亡例が5～7%存在し、何らかの後遺症を有する者が50%以上存在する。一見、健常者に同じように見えるまで回復する症例もあるが、生活の質のレベルは制限されていることが多い。また、就職など社会復帰できない例も多い。

本症は、早期発見・早期治療および発症前治療開始による発症予防が可能である。筆者らによる家族内スクリーニングにより発見された発症前本症患者

(児)の30年以上の追跡管理の結果、治療コンプライアンスの問題はあるが、多くの症例は発症せずに通常の日常生活を営んでいる成績を得ている。発症後に治療を開始した症例では、日常生活や社会生活に制限を受けていたり、社会復帰できない例が圧倒的に多いことと極めて対照的である。したがって、本症を早期発見・発症前治療開始を目的としたスクリーニングの意義は大きいと考える。

本症のスクリーニングについて、(1)スクリーニング方法の開発および改良、(2)検査材料を血液とするかあるいは尿かを吟味すること、(3)対象年齢をいつにするか、(4)パイロット・スタディを実施すること、(5)スクリーニング陽性者の確定診断法を確立すること、(6)確定診断された症例の治療方針を策定すること、などを目的に研究を行った。

研究方法

1. マスキング方法：尿による尿中セルロプラスミン(Cp)を測定する方法を採用し、採尿条件、抗セルロプラスミン抗体とその測定方法などの基礎的検討を実施した。
2. 対象年齢：3歳児の新鮮尿(ヒビテン添加)を用い、郵送法を中心に検査センターに集めた。
3. パイロット・スタディの実施：東京都、北海道、秋田県、神奈川県などで実施し、平成13～15年度3年間に約6万名以上のパイロット・スタディを目標とした。

4. スクリーニング陽性者の確定診断法の確立および確定診断された症例の治療指針の策定：平成13・14年度の本研究班においてすでに報告済であるため省略する。

5. Wilson病マス・スクリーニングに対する方略について：Wilson病マス・スクリーニング研究協力者会議を開き検討を重ねて提言をまとめた。

研究結果

1. マス・スクリーニング方法について

マス・スクリーニング方法は、尿中Cpを指標として本症をスクリーニングすることが可能であると結論する。新鮮尿を用いヒビテンを添加することにより蛋白の劣化を防ぎ、4℃冷蔵可能であるが1週間以内に検査を行う必要がある。抗Cp抗体はポリクローナル抗体（モノクローナル抗体の供給不能：開発メーカーの撤退）でも十分に可能であり、免疫比濁法が簡便・安価で迅速である。幼児から学童における尿Cp測定による累積検査数は約10万検体を越え、3名の本症患者を発見してきた実績がある。

Cpを指標として、血液あるいは尿を用いて本症をスクリーニングする際、本症の症例の3～5%に低Cp血を示さない例があり、この3～5%は発見できないことを明確に説明するべきである。

2. 対象年齢について

3歳児健康診査において新鮮尿を採集するか予め容器を渡しておき郵送して貰う。3～5歳の間が、確定診断および治療開始時期を考慮すると最もよい。

3. パイロット・スタディについて

尿Cp測定にて本症をスクリーニングする際、カット・オフ値を定めるときバラツキが比較的多いためどうしても再検率を1%以内に必要がある。本症マス・スクリーニングの受検希望は、いずれの地域においても90%以上を越えて関心度は極めて高いことが判明している。

4. Wilson病マス・スクリーニングに対する研究協力者会議とその提言について

研究協力者会議にて本症のマス・スクリーニングに関する提言を以下のようにまとめた。

(1) Wilson病マス・スクリーニングを行政的に実施すべきである。

(2) 血液を用いることは採血上の問題があるため尿によるCp測定にてスクリーニングする方法を推奨する。

(3) 本症をスクリーニングした場合と、スクリーニングしなかった場合の治療成績は、明らかにスクリーニングした場合の方がよいという結論である。

(4) 発症頻度は、約3.5万人に1人であり、PKUの約2.5倍である。

(5) Cp測定を指標として本症をスクリーニングする際、約3～5%が血清Cp値正常を示す例があり、

見逃すことになるため、説明を十分に行い同意を得る必要がある。

(6) 費用便益やQOL改善の効果は極めて高いといえる。

(7) 本法は簡便かつ安価であるが、全国的にスクリーニングを行うに当たって、一部受益者負担にて開始することを提言する。

(8) スクリーニング陽性者の確定診断法を確立した。

(9) 確定診断された症例の治療指針を策定した。

以上を踏まえて、本症のマス・スクリーニングの早期導入を提言することとした。

考察

Wilson病スクリーニングの検討は、1960年代から始まっている。Scheinberg and Sternliebは、家族内ハイリスク者の本症スクリーニング法として低Cp血を指標にした。1976年、わが国において当時北海道大学医学部小児科の荒島らは、学童の尿中銅を指標としたスクリーニング法を発表した。1977年、筆者は、血中Cp測定を指標としたマス・スクリーニングを開発し発表した(Lancet, 1977)。1993年、抗ヒトCpモノクローナル抗体を作製してELISA法が、冷牟田らにより発表された。1997年、鈴木健ら(東京都予防医学協会)は、尿中Cp測定による本症のマス・スクリーニング法を開発した。さらに、1995年以降、私ども教室の清水らにより本症の遺伝子診断法を組み合わせる方法によるスクリーニング法を工夫した。

Wilson病マス・スクリーニングの対象および実施年月齢については、(1)ハイリスクグループ(家族内検索、原因不明の肝機能障害児)、(2)新生児、(3)3歳児を中心とした幼児、(4)学童初期などが検討されてきた。ハイリスクグループは、血中Cp値を指標として、尿中銅1日排泄量、血清肝酵素測定(AST・ALT)を参考とする。家族内検索により確実に、本症患者(者)を発見できるが、発端者の犠牲の上に成り立つものであることを忘れてはいけない。他の疾患などにて、診療を受け血液検査の結果、原因不明のAST・ALTの上昇を指摘されて、色々と精査の結果、本症が発見されることもある。本症に対する医師の認識の差が大きいため、認識不足の医師のところでは見逃されてしまう。新生児期は、本研究グループの過去の実績から、正常な新生児は生理的低Cp血状態にあること、Wilson病患者(者)の新生児期の低Cp血レベルの程度が不明なこと、約20万名に対するパイロット・スタディにおいて患児を発見できなかったこと、などの理由によりスクリーニング不可能であろうと判断した。3歳児と学童初期のいずれが適切かということであるが、5歳にて劇症型肝炎にて発症した例があること、

6歳にてジストニー型重篤な神経症状が発展した例および劇症型肝炎例の報告があること、などから5歳以前がよいと考えた。もちろん、5~6歳にて発症する例は極めて少ないと思われるため、小学校入学時の1年生(6歳児)をスクリーニング対象としてもよいが、3~5歳児が最も適切な時期ではないかと判断している。さらに、3~5歳のころは確定診断および治療開始の時期にも適切であると結論した。

スクリーニング方法は、血中Cp値を測定する方法が最適であるが、採血上の困難さがあるため、非侵襲的であり協力を得られ易い尿中Cp値を測定する方法を採用する。さらに、尿中銅/尿中クレアチニン比を併用することにより精度が上昇する。尿中銅を測定することにより、血中Cp値正常値を示す約3~5%の本症患者を発見することも可能となる。

尿を用いる本症のマス・スクリーニング法は、比較的安価であり、簡便であるが、全国的に行政レベルの事業とするにはある程度予算が必要となる。国家財政緊迫の折、欧米や韓国等にて実施されているマス・スクリーニングのように、一部を受益者負担とすることも良いと考えて提言することとした。

本症のマス・スクリーニングの対費用効果あるいは費用便益は、すでに報告したごとく有益であり、その効果は高い。さらに、患児(者)のQOL(生活の質)の改善にも極めて有効である。

結論

1. Wilson病マス・スクリーニングは有用であり、早期に実現する必要がある。

2. 対象年齢は、3~5歳が適切であるが、3歳児健診を利用することにより受検率が上昇する。

3. 方法は、新鮮尿を用いて尿中Cp値を指標とする。血中Cp値が正常を示す本症患者が約3~5%存在し、血中Cp値と尿中Cp値は相関するため、約3~5%のfalse negativeがあることを十分に説明して同意を得る。また、尿中Cp値のほか、尿中銅/クレアチニン比を同時測定するとfalse negativeを減少させることが可能と考える。

4. スクリーニング費用の一部は、受益者負担という方法も考慮されるべきである。

文献

- 1) 青木継稔、清水教一、山口之利、藤井秀樹、中園宏紀：マススクリーニングで発見されたウィルソン病患者(者)の治療指針(案)の策定に関する研究、平成12年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)分担研究報告書(第1/7)、p450-452、平成13年3月(2001)。
- 2) Brewer GJ: Wilson's disease. A clinician's guide to recognition, diagnosis and management. pp1-189, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, Massachusetts, 2001.
- 3) 青木継稔、山口之利: Wilson病に対する亜鉛療法。小児科、14(11): 1623-1630, 2002.

分担研究：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

オロット酸は代謝異常スクリーニングの良い診断マーカーではない？

研究要旨

オロット酸は従来、オルニチントランスフェラーゼ（OTC）欠損症などの診断用マーカー物質として、知られていた。OTC欠損症はメチルマロン酸血症などとともに、タンデム質量分析法（MS/MS）では、正確には診断できない先天性代謝異常症であるが、ガスクロマトー質量分析法（GC/MS）では容易に検出できることから、尿による新生児先天性代謝異常スクリーニングにおいても、有力な診断用マーカー物質になるものと、期待されていた。しかし、実際に新生児スクリーニングを実施してみると、本当によいマーカー物質であるのかどうか、今後に多面的な検討を必要とする課題であると考えられた。

研究協力者

吉田一郎、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、原千尋、田中正敏（久留米大学医学部GC/MS医学応用研究施設）

研究目的

新生児先天性代謝スクリーニングにおいて、どの物質を診断用マーカーにするかを定めることは、スクリーニングの有用性と密接に関連している。今回、先天性尿素サイクル異常や他の先天性代謝異常症のスクリーニングにおける尿中オロット酸の有用性について、検討することを目的とし、本研究を行った。

研究方法

新生児尿の採取方法、尿の前処理などについては、既報の本研究報告書のとおりである。1996年から、2003年にかけて、正常新生児46689名について、尿

によるスクリーニングを施行した。今回はオロット酸やウラシルについて、 $M \pm 5S$ の値をカットオフ値とし、特にオロット酸に関して新生児先天性代謝異常スクリーニングでの有用性について、検討した。オロット酸のカットオフ値は $25.27 \text{ mmol/mol Cr}$ 、ウラシルのカットオフ値は $13.96 \text{ mmol/mol Cr}$ であった。

研究結果

46689名についてのスクリーニング結果については、メチルマロン酸血症の8名をはじめとし、合計33例の異常児が発見され、全体としては1400人に1名という高頻度であった。オロット酸、ウラシルの排泄高値例では46689例中、オロット酸のみの異常高値例が29例、ウラシルのみが38例、オロット酸、ウラシルの両方の異常高値例が25例であった。これは上述のスクリーニング期間中のオロット

酸、ウラシルの一過性、あるいは持続性の異常排泄を意味している。ウラシルのみの高排泄の38例中、10例が持続高排泄例で、この中にはジヒドロピリミジン分解酵素欠損症1例、およびβ-ウレイドプロピオナーゼ欠損症2名が含まれていた。またオロット酸やウラシルの両者が共に高値排泄を示した25例中、19例が持続例で、持続例19例の中には、OTC欠損症、シトルリン血症(1型)、ジヒドロピリミジン脱水素酵素欠損症各1名が含まれている。またオロット酸あるいはウラシルの異常排泄を示した疾患で臨床症状を示すようになったのはOTC欠損症1名、シトルリン血症1名、ジヒドロピリミジン分解酵素欠損症1名の合計3名であった。なおオロット酸のみの排泄29例中、持続排泄例は6例で、この持続例の中に疾患は発見されていない。

考察

GC/MSはMS/MSでは検出できない数多くの代謝物質を検出できる大きな利点がある。たとえばその中には、乳酸、オロット酸、ウラシル、メチルマロン酸、メチルクエン酸、グリセロールなどの重要な代謝物質が含まれている。例えばメチルマロン酸血症ではGC/MSでないと正確には診断できないことは昨年度の本報告書で述べた。先天性代謝異常症の中では、頻度の点で我が国でもっとも重要と考えられるメチルマロン酸血症に関してはローリスクスクリーニングにはGC/MSが適しており、MS/MSはハイリスクスクリーニングにしか、使用できないと考えられる。以前、欧米でMS/MSのスクリーニングが

開始されたことにともない、我が国でもストレートにMS/MSによるスクリーニングを導入する意見があったが、我々の経験は、実際のエビデンスにもとづき、議論することの重要性を示唆するものである。GC/MSとMS/MSにおいて、メチルマロン酸血症の頻度で10倍以上の差があることは、メチルマロン酸血症のスクリーニングにおいて、どの物質を診断用マーカーにすることの違いによるともいえる。

一方、OTC欠損症に関して、MS/MSでは、従来、よいスクリーニングは実施できないと考えられており、事実、見逃し例も散見されることから、我々はGC/MSがOTC欠損症はじめオロット酸が診断マーカーになる先天性代謝異常症のよい診断マーカーであろうと期待していた。オロット酸が診断マーカーになる疾患は現在、新しく発見されつづけていることから、今回、感度や特異度の正確な計算は不能であるが、予想以上に一過性の新生児期オロット酸尿症の存在が明らかになったこと、診断のつけられない持続性オロット酸尿の存在など、スクリーニングに関してのノイズが大きく、オロット酸が新生児先天性代謝異常症スクリーニングのよい診断マーカーであるかどうか、今後の検討課題と考えられた。

文献、吉田一郎、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、原 千尋、田中正敏：新生児スクリーニングで発見され、ビタミンB12が著効したメチルマロン酸血症の2例。平成15年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)報告書、2003；p87-89

分担研究: マ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

尿メタボローム解析による迅速化学診断と新生児スクリーニング試験研究

研究要旨

(1) メタボロームを先取りした、ろ紙尿ウレアーゼ法による新生児スクリーニング試験研究を続行し、17,000 児を対象に、12 疾患、15 児を発見、検出率は 1 児/1,160 児であった。7 万児を対象とした全機関の成績では、20 疾患、49 児、1 児/1,450 児であった。

(2) ハイリスク児の化学診断の精度管理に参加すると回答したのは金沢医大を含む 5 機関にすぎなかった。これらに対し、日本人に多いプロピオン酸血症とオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の児の尿を用いて行った。その結果は、国際的には 30 年を経過しているにも拘らず、精度は不均一で、必ずしも良好ではなかった。

研究協力者

久原とみ子

(金沢医科大学総合医学研究所)

研究目的と方法

日本人にプロピオン酸血症 (PCCD)、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTCD) が多いことがハイリスク児尿の GC/MS 分析等で明らかになってきた。我々の Urease 法による尿のメタボローム解析では、100 以上の化合物を一斉に測定し、それぞれの異常度を数値化し、100 項目以上の疾患の化学診断を行っている。この方法で日本人に多いプロピオン酸血症軽症型 Y435C ホモの 2 例を発見し、治療開始した。モニターの結果二人とも治療が必要なことが確認された。この軽症型 PCCD 児と、典型的な OTCD 児の尿について国内の主な 5 機関に対し精度管理を行った。前者では methylcitrate が、後者では orotate が判断の重要な手がかりとなる。

研究結果と考察

指標物質はいずれも SSD 以上の高値にも拘らず、その異常を検出できた機関は、前者で 60% (Urease 法 100%、有機溶媒抽出法 33%)、後者でも 80% (Urease 法 100%、

有機溶媒抽出法 67%) であった。さらに病名判定が正しかったのは、前者で 40% (Urease 法 1、有機溶媒抽出法 1) であった。定量性について十分に検討している機関は少なく、通常検査における見逃しの可能性が示唆された。精度管理に参加しなかった大手コマーシャルラボでも 2 物質を定量していないばかりか、測定対象ともしていない。

尿の GC/MS 法は定量性を考慮し、総合判断が妥当であれば、無侵傷であるのみか、負荷試験や追加分析の必要もない。有機酸血症、特に PCCD や OTCD の新生児スクリーニングの二次検査やハイリスク児の確認には、見逃しを最小限にする基盤体制作りが不可欠と思われる。

ポストゲノムの 21 世紀はメタボロームとプロテオームの科学が生命科学の中心となる。このメタボローム研究の最も進んだ応用として、金沢医大の松本勇らの化学診断法が引用されている (Curr Opin Plant Biol 1999 [IF: 9.5]、Plant Cell 2001 [IF: 10.7])¹⁻³⁾。

ろ紙尿の新生児マスクリーニング試験研究は、このメタボロームを先取りしているため、確かに時期尚早の面もあり、理解する人は少ないし、前処理などの自動化も遅れた。しかし、尿の新生児スクリーニング

試験研究では、17,000 児を対象に、12 疾患、15 児を発見、検出率 1 児/1,160 児であった。久留米大学等も含めた全体では、7 万児を対象に、それぞれ 20 疾患、49 児、1 児/1,450 児であった。

結論と提言

- 1) 全国の患者や医師が自由に希望する機関に化学診断（分子診断、遺伝子診断）の検査申込みができるよう促す。
- 2) 国内の誰もが検査料の支払い等に煩わされないよう、学会や厚生労働省等で便宜を図る。
- 3) 国内で見逃し例や誤った化学診断例がないか、質量分析法、特にGC/MS法で確認する。
- 4) 現行の新生児マススクリーニングの確定は HPLC などではなく、GC/MS などの質量分析法で行う。

文献

- 1) Richard N. et al.: Curr Opin Plant Biol. 1999; 2: 83-85.
- 2) Roessner U. et al.: Plant Cell. 2001; 13: 11-29.
- 3) Matsumoto I., Kuhara T.: Mass Spectrom. Rev. 1996; 15: 43-57.

分担研究：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

有機酸血症マススクリーニングの研究： 血液ろ紙の GC/MS 分析によるグルタル血症 2 型の診断支援

研究要旨

欧米ではタンデムマスによる新生児マススクリーニングにより脂肪酸β酸化異常症が診断されるようになったが、グルタル酸血症 2 型 (GA2) の診断は困難なことが多いといわれている。われわれは過去 3 年間に血中遊離脂肪酸分析で 16 例の GA2 を診断した。安定期にも診断が可能であった。一方で、指標物質の増加は認めたものの診断に至らないものが 30 例あった。このなかには、非特異的な増加例、まだ確定診断に至っていない症例や他の脂肪酸β酸化異常症が含まれていた。遊離脂肪酸分析は GA2 の診断支援としてタンデムマスによる新生児マススクリーニングで疑わしい異常を呈した際、有用な検査であると考えられる。

研究協力者

木村正彦、長谷川有紀、山口清次
(島根大学小児科)

研究目的

脂肪酸β酸化異常症は安定期には無症状で、発作期にも通常の臨床検査では診断が困難なことが多い。近年、世界的にタンデムマススペクトロメトリーによるアシルカルニチン分析法がスクリーニング検査として行われている。しかし、脂肪酸β酸化異常症のなかでもグルタル酸血症 2 型 (GA2) の診断は難しいことが多く、欧米でも発見率が低い¹⁾。日本において GA2 は very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) 欠損症と carnitine palmitoyl transferase 2 (CPT2) 欠損症とならんで頻度の高い疾患である。われわれは GC/MS を用いた簡便な血中遊離脂肪酸分析法²⁾による GA2 の診断を試みた。アシルカルニチン分析データと組み合わせ、本法の有用性について検討した。

研究方法

2000 年 11 月から 2003 年 12 月末までに島根大学小児科に脂肪酸β酸化異常症を疑われ 568 検体（血液ろ紙 319、血清 249）の血中遊離脂肪酸分析法を依頼された。

分析の方法は既報の通りである²⁾。乾燥ろ紙血（ガスルーろ紙）を直径 3 mm のパンチ小片 5 個（全血 15 μl）、または血清 30 μl を 1.5 ml 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 1 nmol 添加し、メタノール 500 μl を加えた。氷上で塩化アセチル 10 μl を加えて室温で 40

分間攪拌しメチル化した。6%炭酸カリウム 300 μl を加え、反応を停止させた後、ヘキサンを 150 μl 加え溶媒抽出した後、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 1 本で行うことができる。GC/MS 分析は島津 QP5050A 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°C、インターフェイス 300°C とし、カラム温度を 45–225°C まで昇温して分析した。選択イオンモードで、octanoic (C8), decanoic (C10), 4-decenoic (C10:1), 5-tetradecenoic acid (C14:1) を測定した。正常対照では C8 2.3–8.7 μmol/L, C10 2.8–7.1 μmol/L, C10:1 と C14:1 は感度以下であった。今回、C8 は 10.0 μmol/L, C10:1 は 1.0 μmol/L, C14:1 0.6 μmol/L をカットオフとして、MCAD 欠損症は C8 と C10:1、VLCAD 欠損症は C14:1、GA2 は C10:1 と C14:1 の増加を診断の指標にした³⁾。

研究結果 (表 1、表 2、表 3)

GA2 16 例 (既知症例 1 例) を遊離脂肪酸分析にて化学診断した。そのうち 1 例は ETF-α 欠損症で、2 例はイムノプロットで蛋白の欠損が確認された。7 例は筋力低下のため筋生検を行い、筋線維内に脂肪浸潤が見られ、いずれもリボフラビンの投与で臨床症状が改善した。残りの 6 例は、遊離脂肪酸分析およびアシルカルニチン分析から、GA2 の所見がみられたため診断した。

GA2 では C10:1 が 2.4–83.1 μmol/L および C14:1 が 1.5–74.7 μmol/L であった。GA2 と診断された以外に C10:1 値が 1.0 μmol/L 以上かつ C14:1 値が 0.6 μmol/L 以上であったものは 30 例みられた (表 1)。GA2 と診断された 16 例では、遊離脂肪酸分析は安

定期を含めすべて異常が検出された。アシルカルニチン分析では2例で中鎖アシルカルニチンの増加がみられたもののGA2診断には至らなかった。有機酸分析では8/14と診断率が低かった(表2)。

30例のアシルカルニチン分析では、正常が18例、GA2が疑われた症例が4例、CPT2およびCPT2疑いが3例、mitochondrial trifunctional protein (MTP)欠損症が1例含まれていた(表3)。

考察

GA2はETF alpha, beta subunitあるいはETF ubiquinone oxidoreductaseの欠損が原因で起こる。確定診断に関しては酵素活性の測定が困難で、ETFのイムノプロットあるいは遺伝子検査によらなければならないことが多い。また、アシルカルニチン分析で指標となるC4, C5, C8:1, C8, C12, C14, C16, C5DCのアシルカルニチンが必ずしも増加していない場合もあり、化学診断も困難であり、実際に欧米でも発見率が低い。

今回、遊離脂肪酸分析を元に検討したGA2診断例では安定期においても指標物質であるC10:1とC14:1が増加していた。アシルカルニチン分析で非特異的な異常がみられたとき、遊離脂肪酸分析は鑑別診断を進めていく上で役立つと思われる。実際にGA2診断例でアシルカルニチン分析において中鎖アシルカルニチンの増加が2例みられた。

GA2以外でもC10:1とC14:1は増加する例がみられた。この群には非特異的な増加のほか、CPT2欠損症やMTP欠損症が含まれていた。また、GA2が疑われるが、確定診断に至らない症例がみられた。遊離脂肪酸分析で異常が出た場合は、再検査をしたり、ア

シルカルニチン分析を参考に確定診断まで持って行くことが重要である。

遊離脂肪酸分析は今回検討したGA2の他、昨年度報告したように VLCAD 欠損症および MCAD 欠損症の診断も可能である。脂肪酸β酸化異常症のスクリーニング法としてタンデムマスによるアシルカルニチン分析が有用であるが、アシルカルニチン分析で偽陰性を示す場合もありうる。遊離脂肪酸分析はこの診断を支援する手段として役立つと思われる。

文献

- 1) Abdenur JE, Chamoles NA, Schenone AB, Jorge L, Guinle A, Bernard C, Levandovskiy V, Fusta M, Lavorgna S. Multiple acyl-CoA-dehydrogenase deficiency (MADD): use of acylcarnitines and fatty acids to monitor the response to dietary treatment. *Pediatr Res* 50: 61-66, 2001.
- 2) Kimura M, Yoon HR, Wasant P, Takahashi Y, Yamaguchi S. A sensitive and simplified to analyze free fatty acids in children with mitochondrial beta oxidation disorders using gas chromatography/mass spectrometry and dried blood spots. *Clinica Chimica Acta* 316: 117-121, 2002.
- 3) 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.

表1. 遊離脂肪酸値

| | n | C10:1 | C14:1 |
|------------------|----|----------|----------|
| 患者 | 16 | 2.4-83.1 | 1.5-74.7 |
| 疑診あるいは 非特異的増加 | 30 | 1.1-9.4 | 0.6-11.3 |
| 正常 | | <1.0 | <0.6 |

表 2. グルタル酸尿症 2 型における検査の陽性率

| | 尿有機酸 | アシルカルニチン | 遊離脂肪酸 |
|-------|-------|----------|-------|
| N=16 | 8/14 | 12/14 | 16/16 |
| (安定期) | (2/4) | (2/4) | (6/6) |

表 3. 遊離脂肪酸分析で C10:1 と C14:1 の上昇を示したものの
グルタル酸尿症 2 型の診断に至らなかった 30 症例の
アシルカルニチン分析結果

| | |
|-------------------|------|
| 正常 | 18 例 |
| GA2 疑い (2 次性?) | 4 例 |
| 遊離カルニチンの低値 | 2 例 |
| CPT 2 欠損症疑い | 2 例 |
| CPT 2 欠損症 | 1 例 |
| LCHAD 欠損症/TFP 欠損症 | 1 例 |
| その他 | 2 例 |

分担研究：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

タンデム質量分析新生児マススクリーニング対象疾患とその診断精度に関する検討

研究要旨

タンデム質量分析新生児マススクリーニングの有用性・有効性検証を目指しパイロットスタディを継続する中で、対象疾患の選択やその診断精度について検討した。最近1年間の検体分析数は約3,900/月で、年間46,800新生児をスクリーニングした。パイロットスタディ開始時より約21万新生児をスクリーニングし、9種の対象疾患で計25人の患者を発見した。欧米でのMS/MSスクリーニングと比較し、フェニルケトン尿症とMCAD欠損症が少なく、プロピオン酸血症・グルタル酸尿症I型などの有機酸代謝異常症の頻度が比較的高かった。グルタル酸尿症II型の頻度も少なくないので簡便な確定診断方法の検討が必要と考えられた。グルタル酸尿症I型の治療評価のための検査指標については、更に検討が必要であった。MCAD欠損症スクリーニングのためには低いカットオフ値を用いる必要があり、十分な精度管理が要求される。シトリン欠損症のスクリーニングについては技術的にも倫理的にも解決すべき問題が認められた。

研究協力者

重松陽介（福井大学医学部看護学科）
畑 郁江（福井大学医学部小児科）

研究目的

タンデム質量分析計（MS/MS）を使用する新生児濾紙血スクリーニング・パイロットスタディは、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を対象疾患とするが、実際にこれらの疾患のどれをスクリーニングすることが我が国において意義があるのか、その有用性・有効性については、未だ検証が充分とは言えない。これらの点は、スクリーニング精度、患者頻度、治療効果などについて検討することで明らかにされなければならない。治療指針については、諸外国でも検討が進んでおり、我が国での経験を踏まえて更に検討する必要があるだろう。

研究者らが行っているMS/MSスクリーニングでは、ほぼ技術的な問題は解決されつつあるが、スクリーニング経験の無い対象疾患については、

精度や効率について更に検証が必要である。これまでのスクリーニング方の改良を行い、カットオフ値の妥当性についても検討を加えたので、本年度のスクリーニング実績を踏まえてスクリーニング精度などでの問題点を重点的に報告する。

研究方法

パイロットスタディ実施地域は、昨年度までの福井県、広島県、徳島県、大阪市、関連医療機関に、平成14年度後半から宮城県が加わった。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に用いた。分析方法は、サンプル処理を96穴マイクロプレート・バッチ処理で行うなど、既報1,2)のものに準じた。

研究結果と考察

2003年12月末までに約209,600の新生児をスクリーニングし、有機酸代謝異常症として7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例のグルタル酸尿症 I 型(GA-I)、脂肪酸酸化異常症として3例の中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (MCAD)、2例のグルタル酸尿症 II 型 (GA-II)、1例の極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (VLCAD)、アミノ酸代謝異常症として4例のシトリン欠損症 (CTRN)、2例のフェニルケトン尿症 (PKU)、1例のアルギニノコハク酸尿症(ASA)を診断することが出来た。即ち、我々のパイロットスタディでの患者発見頻度は約 8,400 新生児に1人であった。

表1に、我々のパイロットスタディと諸外国のスクリーニングでの疾患頻度を示した。欧米諸国での総患者発見頻度は我々の約2倍であるが、これは PKU と MCAD の頻度が我々の4倍から10倍と高く、総発見患者の約2/3を占めることによる。これに対して、我々のスクリーニングで頻度が高い疾患として、PA、GA-I、GA-II、CTRN が挙げられる。

これまで発見された7例の PA 患者は、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ (PCC) の残存活性や遺伝子変異の分析結果から多くは軽症型と判断される。これらの患者で高頻度で見いだされた PCC β 鎖の遺伝子変異 Y435C では変異酵素の残存酵素活性は高いと想定されるが、最近カットオフ値をわずかに越える指標値で発見された患者では、PCC α 鎖の重症型遺伝子変異 849insT と軽症型変異 C1775T の複合変異と同定され、残存酵素活性も14%と高い。本症スクリーニング用指標のこのカットオフ値を用いることで発見される軽症 PA 患者がどの程度の医学管理を必要とするのかについては、その自然歴に関する適切な調査研究を踏まえた検討が必要であろう。

GA-I は、PA とともに我が国において重要な有機酸代謝異常症と考えられ、2002年の2例に続き、2003年にも1例の患児が発見された。GA-I は、乳幼児期に大脳基底核線状体壊死を急性発症し、永続的な運動失調を来すのが特徴である。症例によっては出生後より筋緊張低下や発達遅延を呈する場合もあるが、このような臨床

症状は必ずしも遺伝子変異や生化学的指標の異常の程度とは相関しないことが知られている。我が国においても発症後診断された本症患者はほとんど全て重篤な神経学的後遺症を有している。これに対し、米国での大規模な臨床介入研究では、スクリーニングで発見された患児の大多数は、有熱疾患のコントロールと飢餓の防止により本症に特徴的な急性発症を免れている。本パイロットスタディで発見された3名の GA-I 患者も、上記の医療介入により19ヶ月から9ヶ月の観察期間において急性発症を免れている。

わが国での有機酸代謝異常症患者調査では最も頻度が高いとされているメチルマロン酸尿症は、本パイロットスタディで2例が見つかったが、いずれも新生児期発症型の重症例であり、治療の甲斐なく乳児期に死亡している。本症と診断された患者の保存新生児濾紙血の分析では、乳幼児期発症の軽症例でも設定されたカットオフ値を用いてスクリーニング可能であったが、メチルマロン酸高排泄型あるいは良性メチルマロン酸尿症では検出できなかった。海外の報告でもビタミンB12 反応性メチルマロン酸尿症で見逃しがあるとされている。ビタミンB12 反応性メチルマロン酸尿症の頻度が高い地域では、尿有機酸分析によるマススクリーニングが必要と考えられる。

脂肪酸酸化異常症である MCAD は、欧米では先天代謝異常症としては比較的頻度が高く、乳幼児突然死の原因疾患として注目され、MS/MS 新生児スクリーニング実施の意義を示す根拠とされている。一方、わが国では、本症と診断された患者は存在しなかったが、我々のパイロットスタディ開始後、我々の施設で、低血糖発作で発症した幼児患者をわが国における本症第1例と診断した。その直後、スクリーニングでも本症患者が見いだされた。残念なことに、本症第1例発見の時期より少し前に MS/MS スクリーニングを受けた新生児が、生後6ヶ月時に飢餓に伴う低血糖で乳児突然死ニアミス (ALTE) を経験

したことが判明した。この新生児の MCAD スクリーニング指標値をさかのぼって検討してみると、当時のカットオフ値が欧米で採用されている値に比べると高く、そのために見逃されたことが判明した。その後、世界的に見て最も低いカットオフ値を採用したが、昨年度にはそのカットオフ値をわずかに越える指標値を示した本症例を発見出来た。

MCAD のスクリーニングにおいては、カットオフ値を越えて再採血・再検査を行う場合、哺乳が順調に進んでいると、本症患者であっても指標値はどんどん低下していき、診断が困難になることが想定される。欧米では共通の遺伝子変異が知られているので、疑い例の診断に直接遺伝子検査が行われることもある。しかしながら、本研究などで発見されたわが国の患者では、そのような遺伝子変異を有しておらず、血清アシルカルニチン分析・尿有機酸高感度分析や酵素活性測定が疑い例での精密検査法として有用であろう。

脂肪酸酸化異常症として、わが国では VLCAD や GA-II も稀でないと考えられる。VLCAD は末梢白血球を用いた酵素活性測定が実用となっているので、疑い例の精密検査として重要である。一方 GA-II においては、二次的にミトコンドリア機能が低下している場合にも類似のアシルカルニチン異常が観察され、疑い例も比較的多いものの、簡便な精密検査法が無い。我々のパイロットスタディで発見された GA-II 患児や VLCAD 患児では、新生児期にはアシルカルニチンの変化が軽微で軽症例と判断されたものの、乳児期に飢餓に伴い低血糖発作を経験し、その時のアシルカルニチン異常は典型的な変化を示していた。MCAD 同様、新生児期のシルカルニチンの変化の程度はその後の経過とは必ずしも一致しないことに注意し、慎重に医療介入する必要がある。

アミノ酸代謝異常症では CTRN 患者が多く見いだされた。ただし、本症では新生児期にアミノ

酸異常が顕在化していない症例が少なからずあると考えられ、本パイロットスタディでも、新生児濾紙血では指標値がカットオフ値をわずかに下回り、2ヶ月後に胆汁鬱滞を呈して診断に至った“見逃し”例を経験した。このような場合でも、例えばシトルリン/セリン比を指標としてカットオフ値を設定すれば検出可能であるとする指摘があるので、今後の検討が必要である。

新生児期に検査異常を伴う CTRN 患者では、複数のアミノ酸値の異常やガラクトース高値を呈することが知られている。本パイロットスタディで経験した症例では、現行のマスクリーニングでフェニルアラニン高値 (TMS で 6.6mg/dl) より PKU 疑いとされていたが、本パイロットスタディで同時にシトルリン高値が認められることから、適切な診断が早期に得られた。本患児はその後の経過観察中に著しい低蛋白血症と凝固能異常を来し、入院治療が必要であった。本パイロットスタディの意義を示す1例と考えられた。

しかしながら、II 型シトルリン血症として診断される患者頻度や本パイロットスタディで発見される患者頻度と比較して、CTRN の遺伝子変異の検索による疾患頻度は更に高く、2万に1人とされる。このことは本症の遺伝子変異を有していても、生涯発病しなかったり、新生児期に肝機能異常を呈しても II 型シトルリン血症に至らないことが多いことを示している。本症の発症機序や発症予防法に関する知見が深まるまでは、本症を新生児期に検出することには色々な社会的問題が発生すると考えられるので、慎重な対応が求められるであろう。

本パイロットスタディで見いだされた PKU 患者については、フェニルアラニン値は現行のスクリーニングでの値とほぼ同様の値であり、それ以外には当該患者は発見されておらず、見逃しもなかった。本法は、PKU のスクリーニングにおいて、ガスリー法やその他の現行のスクリー

ニング法に比べより精度の高い方法であり、代用可能であることを示している。

ASA 患児は、新生児期に高アンモニア血症で急性発症しており、血漿アミノ酸分析でシトルリン高値が認められたことから I 型シトルリン血症が疑われていた。TMS スクリーニングで同時にアルギニノコハク酸濃度の上昇が確認され、ASA の化学診断が得られた。本症には確立した治療法が存在し、発見された患者も比較的順調に発育しているため、MS/MS スクリーニングの適切な対象疾患と考えられる。

以上のように、これまでの実績だけでも、MS/MS 新生児スクリーニングの意義は十分示唆されるところではあるが、対象疾患は個別には頻度も

低く、対象疾患毎の有用性を確認するにはスクリーニング規模と観察期間の両方を拡大して更に検討する必要があると考えられた。

文献

- 1) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M. J Chromatogr B 792(1):63-72, 2003.
- 2) 但馬剛, 佐倉伸夫, 夜船展子, Andi Dwi Bahagia Febriani, 西村裕, 坂本明子, 小野浩明, 木村正彦, 山口清次, 畑郁江, 重松陽介. 日本マススクリーニング学会誌. 13(1) : 39-45, 2003.

表 1. MS/MSスクリーニングに基づく国別の疾患頻度

| 国名 (スクリーニング数) | 日本 (210,000) | 米国 (1,200,000) | オーストラリア (340,000) | ドイツ (490,000) |
|------------------|-----------------|-------------------|----------------------|------------------|
| 疾患名 | | | | |
| PKU | 1:105,000 | 1:10,000 | 1:13,000 | 1:13,000 |
| MSUD | | 1:80,000 | 1:110,000 | 1:120,000 |
| CTRN | 1:41,900 | | 1:340,000 | |
| ASA | 1:210,000 | 1:320,000 | 1:250,000 | |
| PA | 1:30,000 | 1:150,000 | 1:180,000 | 1:160,000 |
| MMA | 1:105,000 | 1:130,000 | 1:60,000 | 1:80,000 |
| 3MCC | 1:300,000 | 1:110,000 | 1:60,000 | |
| GA-I | 1:70,000 | 1:86,000 | 1:180,000 | 1:160,000 |
| GA-II | 1:105,000 | 1:1,100,000 | | 1:490,000 |
| MCAD | 1:70,000 | 1:21,000 | 1:18,000 | 1:9,000 |
| VLCAD | 1:210,000 | 1:400,000 | 1:110,000 | 1:120,000 |

分担研究：マスキング方法および新しい対象疾患に関する研究

ムコ多糖症の新生児マスキングに関する研究
－ELISA キットによる新生児濾紙血中ケラタン硫酸の測定－

研究要旨

ムコ多糖症は、リゾソーム酵素の異常により、ムコ多糖が体内に蓄積する疾患である。近年、骨髄移植、酵素補充療法、遺伝子治療などの治療法が現実になりつつあるものの、これまで患者の早期診断は難しく、早期診断システムの開発が待たれている。今回、ケラタン硫酸(KS)に対する特殊抗体によるELISAキットを用い、新生児濾紙血中KSを測定し、新生児スクリーニングの可能性について検討した。その結果、

1. ELISAによる濾紙血中KS測定により、正常群と患者群との識別が可能と考えられた。
2. 新生児スクリーニングの濾紙血中KSは冷蔵保存で、数年間、安定であることが確認された。
3. I型ムコ多糖症患者2例について、新生児期の濾紙血中KSは正常値であった。

以上の結果から、少なくともI型ムコ多糖症患者では、新生児期にKSの上昇が認められず、新生児濾紙血KS測定によるマスキングは難しいと考えられた。

研究協力者

花井潤師、田上泰子、野町祥介、水嶋好清、藤田晃三（札幌市衛生研究所）
富士 勝（札幌市保健福祉局）
折居忠夫（中部学院大学）
加藤 俊、宮浦修一、岡村和夫（生化学工業）

症患者親の会、岐阜大学、国立成育医療センターからの供与されたムコ多糖症I、II、III型の検体16件、および、ムコ多糖症患者で、札幌市の新生児スクリーニングを受検していることが確認された患児2例である。試料は、いずれも、インフォームドコンセントを得て採取した濾紙血とした。

濾紙血中KSの測定は、生化学工業社製で開発されたELISAキットを用いた。

研究目的

ムコ多糖症は、リゾソーム酵素の異常により、ムコ多糖が体内に蓄積する疾患である。近年、骨髄移植、酵素補充療法、遺伝子治療などの治療法が現実になりつつあるものの、これまで患者の早期診断は難しく、早期診断システムの開発が待たれている。

昨年度の本研究報告において、磯貝らは、ムコ多糖に対する特殊抗体を利用したELISAキットを開発し、患者の血漿、尿中ムコ多糖を測定し、スクリーニングへの応用の可能性を報告した¹⁾。

今回、ケラタン硫酸(KS)に対する特殊抗体によるELISAキットを用い、新生児濾紙血中KSを測定し、新生児スクリーニングの可能性について検討した。

研究方法

対象は、正常群として、札幌市のマス・スクリーニングを受検した新生児398例、患者群として、ムコ多糖

研究結果

1. ELISAによるKS測定

モノクローナル抗体である抗KS抗体をコーティングしてあるマイクロプレートのウエルに3mmディスクの濾紙血を1枚パンチし、4時間インキュベーションし、濾紙血中KSの抽出と固相への結合を行った。洗浄後、第2抗体として、HRP標識したアビジンとビオチン化した同一の抗KS抗体の混合液を加え、1時間反応させた。洗浄後、HRPの発色試薬として、TMBを加え、30分間反応後、反応停止液を加え、450nmの吸光度を測定した。Standardは、ウサギ全血にサメ軟骨由来のKSを加え、調整した濾紙血を用いた。

その結果、測定レンジは、KS濃度として、12.5 ng/ml～800 ng/mlで、CVとしては、低濃度側で10%前後、高濃度側で5%程度であった(図1)。

2. 正常新生児の KS 濃度

新生児濾紙血 398 件の KS 測定の結果, KS 濃度はほぼ正規分布を示し, 平均±SD は, 95.8 ± 29.3 ng/ml であった。陽性率を1%と設定した場合, カットオフ値は 200 ng/ml であった(図 2)。

3. ムコ多糖症患者の KS 濃度

患者検体として, 2 歳から 30 歳のムコ多糖症 I 型 2 例, II 型 11 例, III 型 3 例の濾紙血の測定結果, I 型, II 型, III 型, いずれの患者も, 濾紙血中 KS 濃度は高値を示し, 正常新生児の 90%点, 約 130 ng/ml を上回っていた(図 3)。

4. 濾紙血中 KS の保存安定性

現在, ムコ多糖症として診断された患児について, 後方視的に新生児期の濾紙血中 KS を測定する場合の濾紙血中 KS の保存安定性について検討した。当所では, 新生児の濾紙血検体は, スクリーニング終了後, 約半年間-30℃で, その後, 約 5 年間冷蔵保存をしている。1999 年から 2003 年までの 5 年間の各 11 月第 1 週の検体 40 検体について, KS 濃度を測定した。

その結果, 一見, 古くなるにつれ, 低くなる傾向もあるが, 1999 年と 2003 年を比べるとほとんど差はなく, 全体としては, この程度の期間において, KS は濾紙血中で安定であることが確認された(図 4)。

5. ムコ多糖症患者の新生児期の KS 濃度

7 カ月と 2 歳 2 か月のムコ多糖症 I 型と診断された患児で, 札幌市の新生児スクリーニングを受検したことが確認された患児の新生児期のろ紙血中 KS の測定した。

その結果, 採血日齢, それぞれ, 4 日, 5 日の KS 濃度は, いずれも, 正常新生児のほぼ平均値で, 全くの正常であることが確認された。さらに, 後者については, 生後 1 歳 5 か月の時点で, 当所でハイリスクスクリーニングを受検しており, その時に採血した濾紙血中の KS 濃度は 265.0 ng/ml と上昇していた(表 1)。

考察

これまでの研究結果から, ムコ多糖に対する特殊抗体を用いた ELISA キットにより, 患者血漿中のムコ多糖を測定した結果, KS 濃度は, 尿中の KS の蓄積が知られているムコ多糖症 IV 型のみならず, I 型, II 型,

III 型の患者においても高値を示し, 早期診断のためのマス・スクリーニングの可能性が示唆されている^{1, 2)}。

今回, KS に対する特殊抗体による ELISA キットを用い, 新生児濾紙血中ケラタン硫酸を測定した結果,

1. ELISA による濾紙血中 KS 測定により, 正常群と患者群との鑑別が可能と考えられた。
2. 新生児スクリーニングの濾紙血中 KS は冷蔵保存で, 数年間, 安定であることが確認された。
3. 乳幼児期に発病した 2 例のムコ多糖症 I 型の患児について, 新生児期の濾紙血中 KS を測定したところ, いずれも正常値であった。

したがって, 少なくとも I 型ムコ多糖症患児では, 新生児期に KS の上昇が認められず, 新生児濾紙血 KS 測定によるマススクリーニングは難しいと考えられた。

新生児期の血中ムコ多糖は小児期に比べ濃度が低いことが知られていることから, 血漿や尿を用いる ELISA キットよりも高感度化が必要である。今回の KS キットは, 感度については十分であったが, 正常新生児の濾紙血 KS 濃度は高濃度側に分布が広がっており, 検討段階で, 二重測定において, ウエル間でばらつきがしばしば起こることが確認され, 血液由来成分との交差なのか, ELISA の性能によるものか今後の検討課題である。

今後, 新生児濾紙血を用いたスクリーニングの可能性を検討するため, KS 以外のムコ多糖に対する特殊抗体を用いた ELISA キットを開発し, スクリーニングの指標として有効かどうかを検討する予定である。

文献

- 1) 磯貝光治, 下沢伸行, 近藤直実, 他:平成 14 年度厚生労働科学研究(こども家庭総合研究事業)「新規疾患のマススクリーニング」報告書, 2002, 77-79.
- 2) 特許: WO 03/092601 A2.