

図1. KSの標準曲線

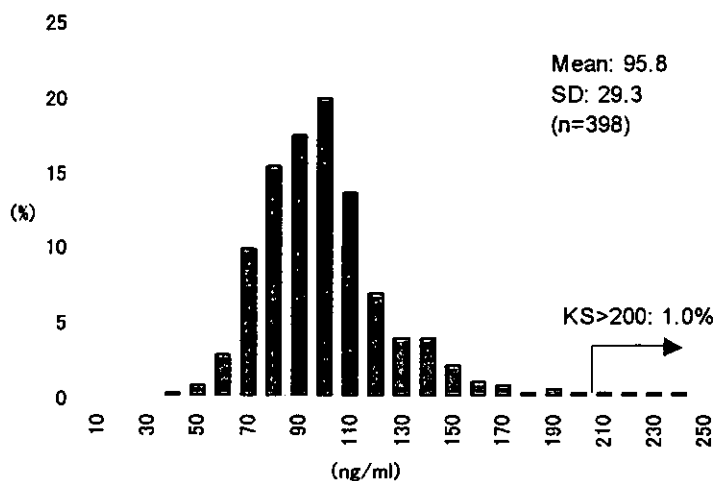


図2. 新生児濾紙血中KS濃度

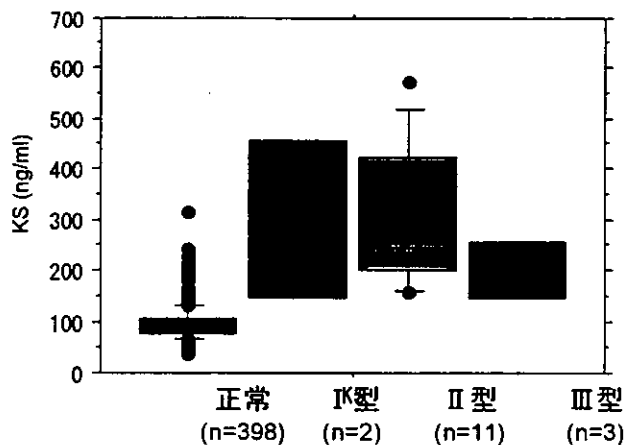


図3. ムコ多糖患者の濾紙血中KS濃度

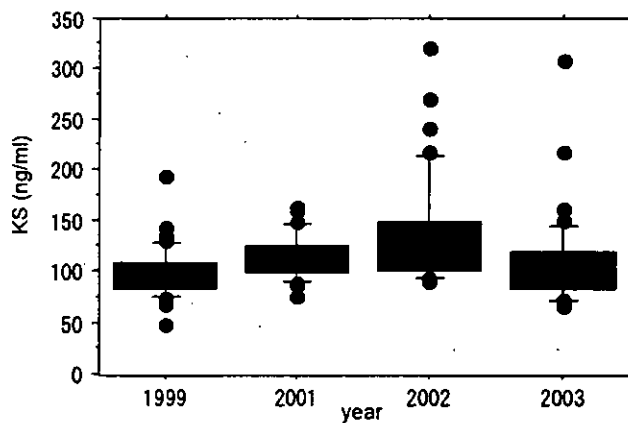


図4. 濾紙血中KSの保存安定性

表1. ムコ多糖症I型患者の新生児期のKS濃度

患儿	採血年齢	KS (ng/ml)	病型
HY	4日	86.6	I型
HS	5日	75.2	I型
	1歳5か月	265.0	

分担研究：新規疾患のマスクリーニング

ムコ多糖症の新生児マスクリーニングに関する研究

—特殊抗体を用いた血漿及び尿中ケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、  
コンドロイチン硫酸及びデルマトン硫酸の測定

研究要旨

ムコ多糖症の新生児マスクリーニングを行うために、昨年、各種のムコ多糖に対する特殊抗体とこれを応用した測定キットを開発した。患者と健常人で血漿、ろ紙血を検査材料として、測定キットで各種のムコ多糖を測定した。各種のキットはろ紙血から抽出した血漿においても、有用であった。特に、ケタラン硫酸に対する抗体を用いたキットは、そのみでムコ多糖症 II, III, IVA 型のスクリーニング検査に有用であったが、一部、偽陰性、偽陽性となる検体も存在し、他のキットを併用を考慮すべきと考える。

研究協力者

磯貝光治、下沢伸行、近藤直実（岐阜大学）

戸松俊治（セントルイス大学）

加藤 俊、宮浦修一、岡村和夫（生化学工業）

田中あけみ（大阪市立大学）

奥山虎之、松尾宣武（国立成育医療センター）

折居忠夫（中部学院大学）

研究目的

ムコ多糖症はリソソーム分解酵素の欠損もしくは活性低下により、ムコ多糖が体内に蓄積する疾患である。治療法として造血幹細胞移植の他、近い将来の酵素補充療法の開発といった治療法があるものの、いずれにせよ早期発見し、早期に治療を開始することが前提となる。しかし、乳幼児期の本疾患患者の発見は困難で、多くの患者は

症状とくに知能障害や骨変化が出現した後に診断され、その結果治療開始が遅れ、十分な治療効果が得られなかった。我々はこれまで、本研究班において、患者の早期発見を目的とした新生児のろ紙血を用いたマスクリーニングを行うための基礎データを収集してきた。今年度は、そのデータをもとに検体数を増やし、実際にマスクリーニングに有用であるか否かを検討した。

## 研究方法

昨年、我々とセントルイス大学及び生化学工業との共同研究で、ケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸に対して特異的に反応する特殊抗体を作成した。この抗体を用いてサンドイッチ ELIZA 法を応用して、グルコサミノグリカン (GAG) を測定するキットを作成した。本キットを用いて、岐阜大学と大阪市立大学、国立成育医療センターで経過観察中のムコ多糖症患者および健常人の血漿とろ紙血から抽出した血漿を材料として、検討した。

## 研究結果

ケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸に対して患者と正常人の尿と血漿を検体として、キットを用いてムコ多糖の測定を行った。患者の内訳は、ムコ多糖症 II 型のハンター病が 16 例、ムコ多糖症 IVA 型のモルキオ病 8 例、ムコ多糖症 III 型のサンフィリップ病が 2 例である。まず、ケタラン硫酸の測定では、血漿でムコ多糖症患者は IVA 型のモルキオ病だけでなくいずれの型でも正常人に比べ、明らかな高値をとった。しかし尿中では明らかな差は認めませんでした。ヘパラン硫酸では、血漿でムコ多糖症患者が高値をとる傾向があった。デルマトン硫酸では、ムコ多糖症患者と正常人で差を認めなかった。次に、ろ紙血から抽出した正常人とムコ多糖症患者の血漿を用いての測定結果と、血漿から直接測定した結果を比較した。これ

らは非常に強い相関を認めた。このことからろ紙血から抽出した血漿だけでもケタラン硫酸ムコ多糖症マスキングが可能となると考え、正常者から提供頂いたろ紙血の検体数を増やし検討した。小児を含めた正常人での血中ムコ多糖は年齢依存性があり、新生児期は低く、年齢を重ねると増加し、成人期以降は加齢と共に減少していく傾向がある。そのため、新生児を含めた年少児の血漿ケタラン硫酸の測定を集中的に施行したところ、同年代のムコ多糖症患者と正常児で、少数ながらも測定値の重なりがあり、偽陽性や偽陰性の発生が危惧された (図)。

## 考察

本研究で使用したケタラン硫酸の特殊抗体を使用したムコ多糖測定キットは、従来の測定法に比べ簡便でその有用性は高いと考える。しかし、本キットのみでは、新生児マスキングで全てのムコ多糖症患者をスクリーニングすることは難しい。今後は、さらに本キットによるスクリーニングに他の抗体を使用して、精度の高いスクリーニングを構築しなければならない。

## 結論

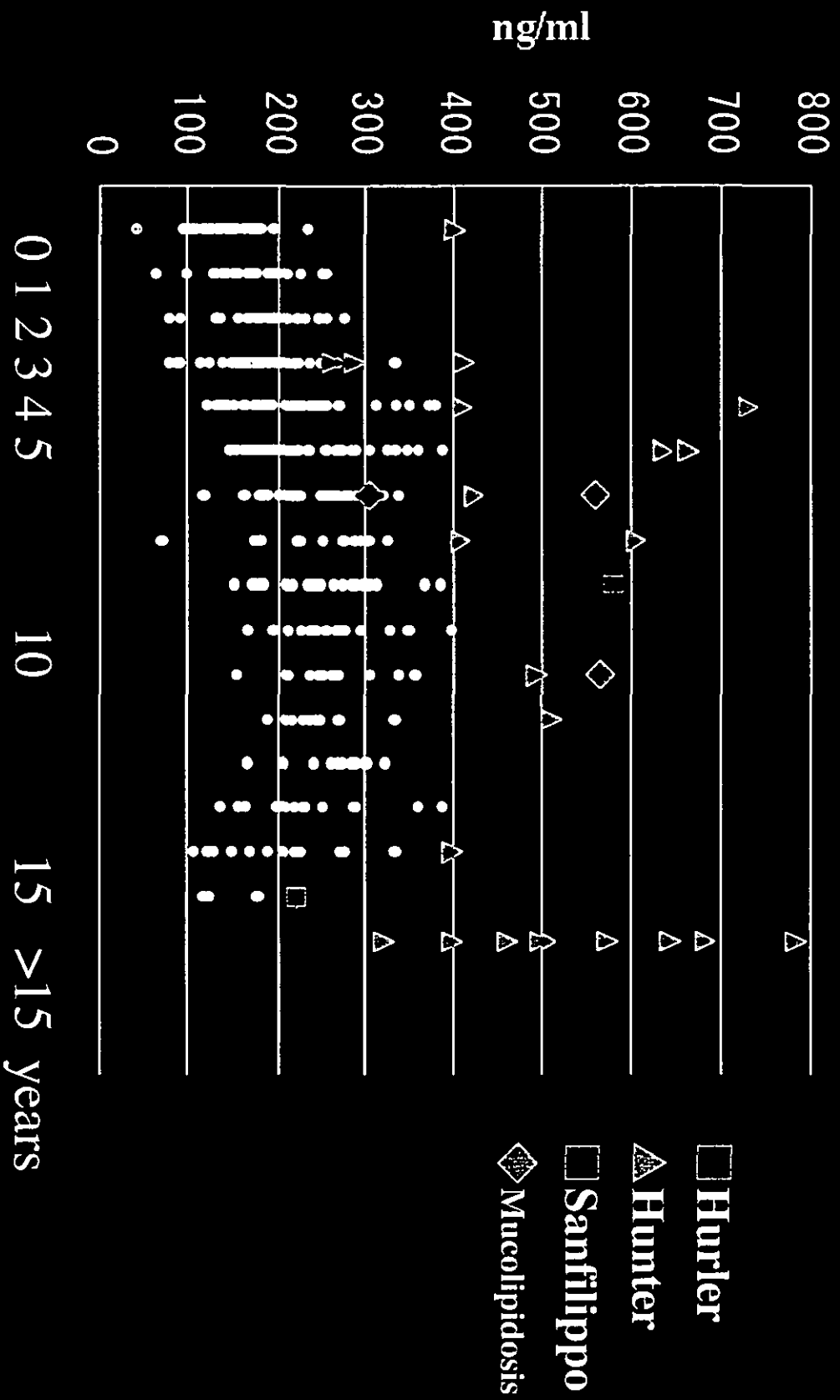
ムコ多糖特殊抗体とそれを用いたキットを作成し、新生児期マスキングにムコ多糖症を取り入れるためのデータ収集を行い検討した。特にケタラン硫酸に対する特殊抗体を用いてろ紙血を使用したマスキングは有用である結果を得た。

しかし、一部で偽陽性偽陰性を生じる可能性があり、他の抗体の使用などの検討を要すると考える。

#### 文献

- 1) 1) Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, Velez-Castrillon S, Fachel AA, Grubb JH, Cooper A, Thornley M, Wraith ED, Barrera LA, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Creer M, Noguchi A. : Development and testing of new screening method for keratin sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. Ped Res . 2004 Jan 7 [Epub ahead of print] Ed. 2000 Jan;82(1):F78.
- 2) Takahashi Y, Sukegawa K, Aoki M, Ito A, Suzuki K, Sakaguchi H, Watanabe M, Isogai K, Mizuno S, Hoshi H, Kuwata K, Tomatsu S, Kato S, Ito T, Kondo N, Orii T. Evaluation of accumulated mucopolysaccharides in the brain of patients with mucopolysaccharidoses by (1)H-magnetic resonance spectroscopy before and after bone marrow transplantation. Pediatr Res. 2001 Mar;49(3):349-55.
- 3) Iwata S, Sukegawa K, Kokuryu M, Tomatsu S, Kondo N, Iwasa S, Orii T. Glycosaminoglycans in neonatal urine. Arch Dis Child Fetal Neonatal

# KS Value in the Dried Filter Paper



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

ムコ多糖症のスクリーニングの実施に関する研究

研究要旨

ムコ多糖症スクリーニング： 1996年より、大阪市立大学付属病院にて出生した児について、希望者にのみ1ヶ月検診時に先天性ムコ多糖症のスクリーニングを行っている。方法は、尿濾紙よりムコ多糖を抽出し、ジメチルメチレンブルー呈色反応を行って吸光度を測定する。陽性検体は、コンドロイチナーゼAC消化後に、同様の反応を行う。再度陽性を示した検体について、原尿を用いて電気泳動を行う（再々検）。1996年～2003年の結果は、総検体数6461、再検数184、再々検数45であった。

ムコ多糖症の診断： スクリーニング再々検の検体、当科外来依頼検体、他施設依頼検体については、ウロン酸量を測定し電気泳動を行う。異常パターンを示した患者については、末梢血を用いて酵素活性を測定し確定診断する。ウロン酸定量はカルバゾール硫酸法にて測定、電気泳動はセルロースアセテート膜上で行う。酵素活性は、末梢血リンパ球を用いて4MU人工基質にて測定する。スクリーニング検体からは患者は見つからなかった。当科外来からの検体は、臨床的にかなり疑わしい検体が多いため、7割以上が異常パターンであった。他施設依頼検体では、約4検体に1例が異常パターンであった。骨髄移植を行ったムコ多糖症患者においては、尿中ムコ多糖量（総ウロン酸量）が減少し、デルマトン硫酸の含量も低下して正常の泳動パターンに近づいた。

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）  
坂口（梶田）知子（同上）

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、近年急速に普及してきた。さらに、近年酵素補充療法が開発され、I型、II型については現実のものとなってきた。これに伴い、症状が顕性化する前に発見するために、スクリーニングが不可欠なものとなってきた。

前年度に引き続いてスクリーニング検査を押し進めると同時に、ムコ多糖症の診断の経

緯、骨髄移植を受けた患者の経過を検討した。

研究方法および対象

I、ムコ多糖症スクリーニング

【検体】 1か月児の濾紙尿を用い、ムコ多糖症のスクリーニングを検討した。

【方法】 検体収集法：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ヶ月検診時に尿を染み込ませた濾紙を持ってくるようにした。

スクリーニング法：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依頼し、精密検査としてウロン酸測定と電気泳動とを行った。

## II、ムコ多糖症の診断

2次スクリーニング陽性者、外来にてムコ多糖症が疑われた患者、および他施設よりムコ多糖症が疑われて送られてきた尿検体について、ムコ多糖を抽出してカルバゾール硫酸法にて沿うウロン酸量を測定し、セルロースアセテート膜にて電気泳動を行った。これにて異常パターンを示した患者については、外来受診を依頼し、末梢血リンパ球を材料として酵素活性を測定して確定診断を行った。

また、骨髄移植を受けた患者については、経時的に尿中ムコ多糖分析を行って臨床所見と照らし合わせて検討を行った。特にデルマタン硫酸は、小児期、成人期を通じて正常人では電気泳動上認められないことから、この含有量に着目して経過を観察した。

## 研究結果

### I、ムコ多糖症スクリーニング

図1に、1996年1月から2003年12月までのスクリーニングの結果を示した。検査総数は6461、再検査184(2.8%)、精密検査(電気泳動法)45(0.7%)であった。

### II、ムコ多糖症の診断

スクリーニング検体からは、現在までに患者は診断されていない。当科外来依頼検体では、臨床的に疑わしい患者がほとんどであるので、7割以上が異常パターンであった。他施設依頼検体では、約4分の1が異常パターンであった。

骨髄移植の効果は臓器によって異なり、巨舌、粘膜の肥厚、皮膚の肥厚、関節拘縮、肝臓の腫大、心筋の肥厚には効果が認められるが、角膜の混濁、心臓弁の肥厚、聴力障害には効果が少なく、知能障害、骨の変形にはほとんど効果が見られない。尿中ムコ多糖では、総ウロン酸量の低下とともに、デルマタン硫酸含量が有意に減少し、臨床効果の大きい患者でデルマタン硫酸減少率も大きい傾向があ

った。しかし、数年後には頭打ちとなり、正常パターンになることはなかった。図2に、ムコ多糖症II型患者の各年齢におけるデルマタン硫酸の含有率、および、骨髄移植を受けて1年以上たったムコ多糖症II型患者のそれを示した。黒丸が骨髄移植を受けた患者である。受けていない患者と比べ、デルマタン硫酸含有率は有意に低かった。

## 考察

ムコ多糖症に対する酵素補充療法が普及しつつある現在、症状が出る前に診断することが重要となってきた。適切な時期、適切な検体、安価で正確な方法を早急に検討しなければならない。当科においては、ジメチルメチレンブルー呈色反応を用いている。この方法は、簡便で安価であるが、擬陽性が多い。当面は、この方法にてスクリーニングを施行しているが、他の方法を検討する必要があると考えられる。

ムコ多糖症の患者診断は、一部の検査会社にて可能であるが、保険制度の適応とされていないことから、高額な費用負担が必要である。他方、大学等の研究施設においては、労力および費用の一方的負担となるため継続が困難になりつつある。診断検査に対する保険制度の適応が早急に実現されるべきである。

骨髄移植は、脳、骨組織では効果が少ない。脳については血液脳関門の存在、骨については血流に乏しい硬組織であることが効果を制限しているものと考えられた。酵素補充療法の効果は、骨髄移植の効果に準ずるものと推測され、脳への効果を期待するには血液脳関門を通過させる工夫と早期の治療が望まれる。骨に対しては、局所に高濃度に酵素を供給させる工夫が必要であると考えられた。スクリーニングは、症状が顕性化する以前、生後半年頃までに行うことが必要であると考えられる。

図1、スクリーニング権対数と再検数、再々検数の推移。

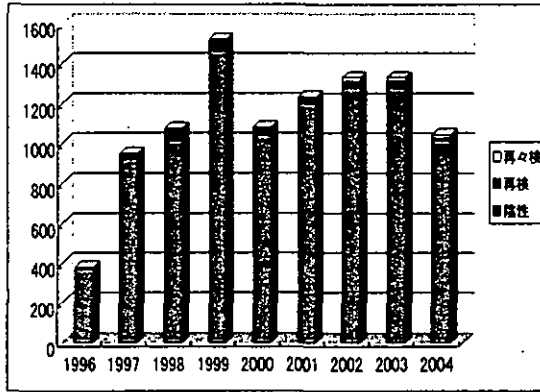
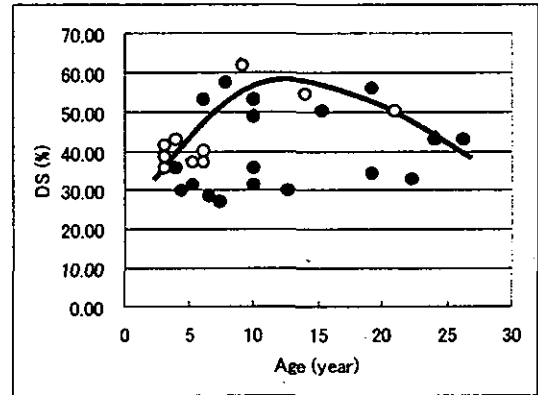


図2、ムコ多糖症 II 型患者における年齢とデルマタン硫酸含有率の変化。白丸：重症型、灰丸：軽症型、黒丸：骨髄移植施行後。



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

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

研究要旨

栃木県では1994年、茨城県では1998年、札幌市では2001年、岩手県では2002年から、胆道閉鎖症の早期発見・早期手術を目的として、はがき大で3種類の異常および4種類の正常色調便をカラー印刷した、便色調カラーカード（以下、カード）を使用してマススクリーニングを行ってきた。この方法は、カードを母子手帳に挟み込んで保護者に配布し、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。4地域で出生した児330,667人のうち216,301人（65.4%）に本検査を行った結果、発症頻度は出生8,065人に1人、感度67.9%、特異度100%、陽性適中率15.6%であった。同一期間中にこの4地域で発生した本症の患児41名の生後60日以内の早期手術率は64.2%、手術時日齢は $59.7 \pm 26.0$ 、患児本人の肝による無黄疸5年生存率は71.4%で、年全国登録の45.6%、 $70.9 \pm 30.9$ 、52.7%をいずれも凌駕する成績だった。今後、カードの品質管理および改良、栃木県方式の普及を図ることによりさらに本検査の効果を上げることが期待できる。我々の結果は、本検査を全国的に実施することにより、胆道閉鎖症の手術成績および長期予後を著明に改善できることを強く示唆するものである。

研究協力者

松井 陽（筑波大学臨床医学系小児科）  
須磨崎 亮（筑波大学臨床医学系小児科）  
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）  
水嶋 好清（札幌市衛生研究所）  
米沢 俊一（もりおかこども病院小児科）

績および長期予後を改善できるか否かを推定する。

2) 栃木県、茨城県、岩手県、札幌市における実施方法における共通または個別の問題点を明らかにしその解決策を検討する。

研究方法

【栃木県】生後1か月の患児および同月齢対照健康児の便のカラー写真をカードに印刷し、患児の淡黄色便3種類に1-3番、健康児の便4種類に4-7番と番号を付け、母子手帳にカードを挟み込んで1994年から配布した。親は1か月健診直前に児の便とカードを比色して、最も近いと思う便色調番号を選んで記入した。1か月健診時（またはそれ以前）に、担当医はカードを回収して番号を確認した。保護者がカードを持参し

研究目的

1) 栃木県における結果をもとに、カードを用いた胆道閉鎖症のマススクリーニング（以下、本検査）により、胆道閉鎖症患児（以下、患児）の手術成

なかった場合には、担当医が予備のカードを手渡して受検させた。親の申告した番号が1から3のどれかであった場合または3と4の間と書いてあった場合を陽性とした。陽性者にはその場で健診担当医が黄疸の有無、便色調を診察の上、異常があれば自治医科大学小児科胆道閉鎖症マスキニング部へ電話またはFAXで連絡し、相談の上、精査計画を組んだ。親の申告した番号が4から7のどれかであった場合には、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を経て、小児科医からは直接、自治医科大学胆道閉鎖症マスキニング部へ、1週間毎にカードをまとめて郵送した。この2施設では郵送されたカードの中に陽性者が混入していないか改めて点検した。99年からは便色調印刷部分を親の手許に残して、残り部分を切り取って提出できるようにして、生後1か月以降に淡黄色便を発症する遅発例の発見に努めた。以下、他県（市）について栃木県との主要な差異を記載する。

【茨城県】色調部分については栃木県と同一の監修を受けて製作されたカードを生後1か月用、2か月用の2種類作り、母子手帳交付時にこれに挟み込んで1998年から配布した。親は1か月健診直前、および生後2か月時に便色調番号を記入し、管轄保健所の宛先が印刷されたカードの裏面に50円切手を貼って郵送した。親が異常色調を申告した場合には、当該保健所の保健師が家庭訪問して児を診察し、黄疸、便色調異常の有無を確認の上、電話またはFAXで筑波大学小児科の担当医に連絡して、指示を仰いだ。2001年の4月からは生後2か月用のカード配布をやめて、検査を生後1か月時のみとした。その代わりに便色調印刷部分を親の手許に残して、色調報告部分を切り取って郵送できるようにした。さらに2003年10月からは、1か月健診時まで親がカードを郵送していない場合には、健診担当医がカードを回収して茨城県総合健診協会を経て、あるいは直接に茨城県児童福祉部へ郵送するように変更した。

【札幌市】2001年から同様に製作されたカードを母子手帳に綴じ込んで配布した。1か月健診時にカードの色調部分を親の手許に残し、報告部分は健診担当医が札幌市衛生研究所に郵送することで回収された。生後1か月を過ぎて便色調が淡黄色に変化してきた場合には親の手許にある便色調印刷部分を使って確認し、異常が疑われれば札幌市衛生研究所へ直接連絡できるようにした。

【岩手県】2002年から同様に製作されたカードを母子手帳に綴じ込んで配布した。1か月健診時にカードの色調部分を親の手許に残し、報告部分を健診担当医が回収して岩手県予防医学協会に郵送した。児が県外で健診を受けた場合には、親がカードをもちおかこども病院へ直接郵送した。

#### 研究結果（表）

【栃木県】1994年8月1日から2001年7月31日までの8年間に出生児135,143名のうちの115,266名（85.3%）がこのマスキニング検査を受けた。この期間に栃木県に育成医療を申請し、本県で出生しかつ胆道閉鎖症と診断された患児は14名で、本症発生率は出生9,653人に1人（135,143/14）であった。患児14名全員が本マスキニングを受検しており、このうち、1か月健診以前または健診時に淡黄色便を呈してマスキニング陽性となった患児は11名で、感度は78.6%だった。11名のうち3名は1か月健診を受ける前に看護師または医師によって淡黄色便を発見されていた。マスキニング陽性だった11名は、日齢平均53.9、（中央値45）で肝門部空腸吻合術手術（以下、手術）を受け、うち8名が2004年3月現在、黄疸なく生存していた。マスキニング陰性だった3名は日齢平均65.3（中央値64）で手術を受け、うち2名が現在も黄疸なく生存していた。患児14名全体の手術時日齢の平均値は56.4（中央値53）で、うち9名（陽性児8名、陰性児1名）が生後60日以内で手術を受け、10名が現在も肝移植を受けずに黄疸なく生存していた。一方、マスキニングで

異常便色調番号を記入された児は 69 名であり、そのうち 11 名が胆道閉鎖症と診断されたので、陽性適中率は 15.9%、特異度は 100%だった。生後 60 日以内に手術を受けた患児の割合（以下、早期手術率）は 64.2%、本人の肝臓で黄疸なく 5 年生損した患児の割合（以下、無黄疸 5 年生存率）は 80.0%だった。

【茨城県、札幌市、岩手県および全体】本症発生率は全体で 8,065 人に 1 人だった。受検率は生後 1 か月時点で 42.2%と著明に低かったが、札幌市、岩手県では施行開始から短期間で栃木県と同等の 83~90%の水準に達していた。本検査の感度は 60~78%、特異度はいずれも 100%、陽性適中率は 12~20%だった。全体で早期手術率は 61%、手術時日齢の平均は 59.6、中央値は 55、無黄疸 5 年生存率は 71.4%に達した。

#### 考察

今回はまず本検査の栃木県における 9 年間の歩みを総括した。結果は、受検率、感度、特異度、陽性適中率ともに一定の水準を維持していた。感度が 78.6%であるのは、生後 1 か月を過ぎて便が淡黄色になる遅発例の存在を考えると妥当である。カードの色調部分を親の手許に残すのは、こうした遅発例を生後 1 か月以後にも発見するのに有効なことが実例から示唆された。全体的に見ても約 33 万人の出生児のうち 21 万 6 千人（65%）というまだまだ改良の余地がある受検率ではあるが、それでも本検査による早期手術率は 64.2%、平均手術時日齢は  $59.7 \pm 26.0$  と全国登録のそれぞれ 45.6%、 $70.9 \pm 33.9$ （2002 年日本胆道閉鎖症研究会）を、また患児本人の肝による無黄疸 5 年生存率 71.4% は全国登録の 52.7%（1994 年日本胆道閉鎖症研究会）を、いずれも凌駕する成績であった。我々の結果は、本検査を全国的規模で施行することにより本症患児の手術成績および長期予後を著明に改善できることを強く示唆するものである。

次に各県・市における本検査の実施方法を比較検討した結果、共通の問題点として、

1. カード色調の品質管理が容易ではない

2. 3 番と 4 番の中間の色を申告する患児がいるが、個別の問題点として、  
3. 茨城県の受検率が低いことが明らかになった。

カードの色調は本検査の効果を決定する最大の要因である。カードは基本的に毎年、同じの版型を用いて、同じ日に、同じ監修者の監督の下に、同じ用紙に印刷される。印刷機はコンピューター管理されているが、一万枚を超えるカラー印刷の色調は、印刷工だけでなく、その日の気温、湿度、印刷工程（最初の方か最後の方か）、監修者（の執念）などによって左右される。今後は便のカラー写真を、色調の内部標準とともに撮影して色調の品質管理を実施しなければならない。

3 番（異常）と 4 番（正常）の中間色が欲しいという要望はスクリーニング開始当初から有って、患児の中には 4 番と申告されているながら、実は 3 番と 4 番の中間であると親が思っていることや、その旨がカードに書かれている場合もあった。しかし反面、偽陽性が増える可能性もあってこれらの中間色を設けることはしなかった。しかしスクリーニングの基本は、多少の偽陽性は容認しても偽陰性を極力減らすことにあるので、色調カードを改版する際にはこれらの中間色を設定したい。

茨城県で受検率が低いことは、本検査を他の都道府県に実施する際に注意深く検討する必要がある。茨城県と他の県・市の実施方法における差異は、カードの回収を 1 か月健診担当医ではなく、親の郵送に任せた点にある。神経芽細胞腫のマスクリーニングのように化学物質を定量する場合には、検体を郵送する方法でも親は検査に参加するであろう。これに対して本検査では、4 から 7 番が正常だと保健師から言われれば、結果が目に見えて明らかである場合が大部分なだけに、50 円切手を貼って郵送する気にならないかもしれない。しかし茨城県ではこのマスキングを受けなかった患児が 23 名のうち 13 名（56.5%）もいることと、早期手術率が低く、平均手術時日齢が大きいことが関連

していると思われる。従ってカードの回収は1か月健診担当医が行い、親がカードを持参しなかった場合には、担当医が予備のカードを渡す配慮が必要である。

このマスキングの長所は、ほぼ100%と受検率の高い1か月健診の機会と、異常便色調の情報源として児の便を日常的に観察できる母親を判定に利用している点、および番号によって便色調を表現している点にある。一方、短所として、本症には生後30日以降に淡黄色便を発症する遅発例があるため、1か月健診で検査を行う限り偽陰性をゼロにすることはできない。しかし現在行っているように、カードの色調部分を親の手許に残すなどの工夫によって、便色調に対する保護者の関心を高めて遅発例の発見を容易にする波及効果を期待できる。また食事を変更すればよいフェニルケトン尿症、甲状腺ホルモンを内服すればよいクレチン症と異なり、胆道閉鎖症の予後改善には、手術成績のよい外科医を選択する必要がある。胆道閉鎖症のマスキングには、そうした外科医を紹介できる利点がある。

便色調カラーカードを用いた胆道閉鎖症のマスキングは、患児1人の1健康生存年延長当たりにかかる費用(QALY)が8万円であり、この値は世界的に医療経済効果の認められたフェニルケトン尿症、クレチン症のマスキングと匹敵することが判明している(平成7年度報告書)。わが国における小児肝

移植の大半を本症患者が占めること、ドナーとして健

康な保護者を必要とすること、免疫抑制剤の長期服用による副作用を考える時、厚生労働省は本マスキングを一日も早く全国的規模で導入して、本症患者の長期予後およびQOLを改善すべきである。

#### 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し、黄疸無く肝移植なしにQOLの良い長期生存を期待できる。以上からわが国では、便色調カラーカード法による胆道閉鎖症のマスキングを、早急に全国的規模で実施すべきである。

#### 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.
- 9) 松井 陽、他.平成13年度本報告書.
- 10) 松井 陽、他.平成14年度本報告書 p117-119.

	栃木県	茨城県	札幌市	岩手県	全体
調査期間	7年	5年	22ヶ月	10ヶ月	
出生児数	135,143	155,152	28,989	11,383	330,667
受検者数	115,226	65,468	26,173	9,434	216,301
受検率	85.3%	42.2%	90.3%	83.4%	65.4%
発生患児数	14	23	3	1	41
頻度	1/9,653	1/7,052	1/9,663	1/11,383	1/8,065
受検患児数	14	10	3	1	28
真陽性	11	6	2	0	19
感度	78.6%	60.0%	66.7%	0	67.9%
特異度	100%	100%	100%	100%	100%
陽性者数	69	30	16	7	122
陽性適中率	15.9%	20.0%	12.5%	0	15.6%
早期手術例	9	13	3	0	25
早期手術率	64.2%	56.5%	100.0%	0	61.0%
手術日齢平均値	56.4	61.8	57.3	64	59.7
手術日齢中央値	53	54	58	64	55
無黄疸5年生存例	8 (10)	2 (4)	ND	ND	10(14)
無黄疸5年生存率	80.0%	50.0%	ND	ND	71.4%

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

分担研究：神経芽細胞腫マスキリーニング・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）

研究要旨

神経芽細胞腫 HPLC 法マスキリーニングの評価およびその改善を目的として、(1)疫学的評価に関する研究班と(2)臨床的プログラム改善に関する研究班において研究がすすめられた。(1)では、神経芽細胞腫死亡推移の検討とスクリーニング中止後の死亡率変化の推定、人口動態調査死亡票を利用した平成7年以降生まれの全国乳児コホートを対象とした神経芽細胞腫死亡における受検・未受検の比較研究、また付随するケース・コントロール研究の企画、および受検確認法の妥当性確認の疫学研究が実施された。スクリーニング受検群の神経芽細胞腫死亡率は、未受検群にくらべ統計学的に有意に低いものであり、累積死亡の差は100万人あたり20～30人であった。

(2)では、山本班員を中心に、神経芽細胞腫マスキリーニングを臨床的観点から評価し、過剰診断の原因をなす予後良好な腫瘍の発見を減少させ、早期発見が利益をもたらす予後不良な腫瘍を発見する方法を見いだすため、腫瘍の生物学的特徴等による分類を用い多数例の検討を複数行った。分類法は報告によって一致しなかったが、6ヶ月マスキリーニング発見例中に予後不良な性格を持つ腫瘍が含まれ、早期発見により利益を得ているとの見解は一致していた。マスキリーニングの実施時期を遅くしても予後不良例の早期例を発見できる可能性があると考えられた。

研究協力者

・疫学的評価に関する研究

藤田利治（国立保健医療科学院疫学部）

片野田耕太（国立健康・栄養研究所）

祖父江友孝（国立がんセンター）

佐藤俊哉（京都大学大学院医療統計学）

西 基（北海道医療大学生命基礎科学）

山本圭子（埼玉県立児医療センター）

・臨床的評価に関する研究

山本圭子（埼玉県立小児医療センター）

中河原章（千葉県がんセンター生化学）

林 富（東北大学小児外科小児腫瘍学）

金子道夫（筑波大学小児外科）

浜崎豊（静岡こども病院病理科）

檜山英三（広島大学小児外科）

田中丈夫（国立呉病院医療センター小児科）

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、神経芽細胞腫マスキリーニングが、1984年から全国規模で導入されていたが、その有効性の

疫学的根拠については議論がある。その評価では、死亡減少の大きさと過剰診断治療での不利益の大きさの2点が、重要な視点となる。

そこで、疫学的評価班では、マスキングによる神経芽細胞腫死亡減少を疫学的に評価することを主たる目的とした。臨床的評価班では、実施時期を遅くするなどマスキングの方法を変更することによって、過剰診断を減少させ、かつ、死亡率低下をもたらすため、予後不良な腫瘍を早期に発見する方法を見いだすことを目的とした。

## 研究方法及び結果

### (1) 疫学的評価に関する研究

#### ①わが国における神経芽細胞腫死亡率の推移

人口動態統計・死亡の資料を用いて、副腎の悪性新生物（神経芽腫）とリンパ性白血病とを比較した。神経芽腫の4歳以下での死亡率の減少傾向は白血病と同等もしくは大きかったが、5-9歳ではそのような減少はみられなかった。4歳以下において神経芽腫の死亡率減少をもたらした要因はHPLC法マスキング以外には考えられなかった。また、2004年以降マスキングを中止した場合の死亡率の変化を予測した。神経芽腫マスキングを中止すると、未受検者割合が直ちに上昇して、4歳以下の死亡率はこれに敏感に反応して上昇すると考えられた。

#### ②全国乳児コホートを対象とした神経芽細胞腫死亡における受検未受検の比較研究 平成7年～12年に出生した全児を対象に、マスキング受検群と未受検群での

神経芽細胞腫死亡を比較した。死亡は、平成7年～13年までの人口動態調査死亡票から特定され、受検・未受検は各検査事業主体がもつ受検者リスト等で確認された。その結果、当該コホートで特定された神経芽細胞腫死亡は106例であり、うち17例が生後6ヶ月未満の死亡例、また生後6ヶ月以降の死亡例であるが生後6ヶ月以前に発見されていた例が11例（いずれも未受検）あった。これらを除いた78例において、受検確定例が46例、未受検確定例が27例、検査事業主体調査回答拒否および受検者リスト既処分による不明例が5例であった。不明例をすべて受検群とした場合、生後6ヶ月以降の死亡率は、受検群で0.234/10万人年、未受検群で0.831/10万人年であり、死亡率比は0.281(95%信頼区間:0.176～0.448)であった。群間の累積死亡の差は、100万人あたり20～30人と推定された。

#### ③神経芽細胞腫スクリーニング評価のための妥当性研究としてのケース・コントロール研究

上記②研究でのバイアス評価など妥当性確認のサブ研究として、神経芽細胞腫死亡をケース、それ以外の死亡をコントロールとし、生年・性別・地域をマッチしたケース・コントロール研究が平成14年に計画された。マスキング受検・未受検の神経芽細胞腫死亡への影響を評価する上で、重要な疫学研究と位置付けられるものである。しかしながら、平成15年7月30日「神経芽細胞腫マスキング検査のあり方に関する検討会」の「検査事業をいったん休止することが適切」との報告書の影響を受け、当ケース・コントロール研究を行うために不可欠な人口動態調査死亡票の目

的外使用申請が認められず、実施不能となった。

#### ④神経芽細胞腫スクリーニング受検確認の妥当性研究

上記の全国乳児コホート研究②において採用された自治体検査機関の受検者リストでの受検・未受検特定法の妥当性の確認をする研究である。1999-2001年生まれの北海道旭川市および埼玉県三郷市在住幼児452名を対象として、受検者リストに基づく受検率（標本受検率）を算出し、当該地域における全体の受検率（母受検率）と比較した。また、郵送調査により保護者の受検有無に関する記憶を調べ、受検者リストの情報と比較した。標本受検率は86.5%（95%信頼区間：83.4-89.7）で母受検率86.7%と有意な差はみられなかった。郵送調査に回答した保護者における記憶は、受検者リスト情報を真とした場合、感度94.0%、特異度77.8%であった。

#### （2）臨床的評価に関する研究

##### ①マススクリーニング発見神経芽腫の無治療経過観察共同研究計画

6か月マススクリーニングの発見例が複数の施設で治療せずに観察され、自然退縮・成熟する神経芽腫が存在することは知られているが、症例の選択基準や無治療をやめて手術を実施する基準等が明確でないため、自然退縮・成熟する腫瘍の6か月マススクリーニング発見例中の頻度が明らかでなかった。一定の条件によって無治療経過観察を行い80%の例が手術せずにすむ事を証明するために110例が必要であることが算出された。共同研究を実施する計画であったが、マススクリーニング休止のため

不可能となった。

##### ②神経芽腫マススクリーニングにおける

###### DNA Ploidy の臨床的意義

DNA Ploidy の判定基準が確定していないため、判定が研究者によって異なり混乱がみられているため、神経芽腫518例の解析からDNA ploidy の判定基準を検討し、神経芽腫の場合、DNA index が1.19以下をdiploidy または near-diploidy, 1.20~1.80をhyperdiploidy, 1.81~2.2をtetraploidy または near-tetraploidy とすることが妥当であるとした。

##### ③生物学的特徴による分類を用いた神経芽腫マススクリーニングのターゲットについての検討

DNA Ploidy, N Myc 増幅を用いた3タイプへの分類をマススクリーニング実施前から実施後にいたる235例の神経芽腫に行った。DNA Ploidy の判定は②の研究結果を参考にした。タイプ1腫瘍はマススクリーニング発見例の75.9%をしめ予後良好で、1歳以上には少ないこと、タイプ3腫瘍はマススクリーニングで発見されず1歳以上に多く極めて予後不良であることが明らかとなった。タイプ2腫瘍はマススクリーニング発見例の24.9%をしめるが、1歳以上の臨床例でもみとめられ、マススクリーニング発見では早期例が多く予後良好（100%生存）で臨床例では予後不良（38%死亡）であった。6か月マススクリーニングではタイプ2腫瘍の発見が利益をもたらすと考えた。

##### ④マススクリーニング発見例の腫瘍特性からみた、マススクリーニング施行時期の検討への一考察

DNA Ploidy, N Myc 増幅, 1P 欠失,

NTRK1, Telomerase 活性を用いてマススクリーニング発見例・臨床例 249 例を 3 群に分類した。タイプ 1 はマススクリーニング例に多い予後良好群, 臨床診断例はタイプ 2 と 3 であった。1 歳以上の症例をマススクリーニング施行前と後で比較するとタイプ 1 は減少し, タイプ 2 は有意でないものの減少していた。マススクリーニングを再開するなら生後 10 か月頃が適当と考えられた。

⑤ マススクリーニング発見神経芽腫の生物学的指標よりみた性状 (リスク) 評価

病期, N Myc 増幅, Ha-Ras/trkA 発現および組織型を用い, マススクリーニング発見 208 例を検討し, 低リスク群 43%, 中間リスク群 34%, 高リスク群 23% に分類し, 約半数においてマススクリーニングによる早期治療が良好な予後に寄与しているとした。

⑥ 時期を遅くしたマススクリーニングの可能性に関する検討

進展神経芽腫共同治療研究班のデータから 1 歳以上の病期Ⅲ・Ⅳ神経芽腫 251 例を, N Myc 増幅群と非増幅群に分類した。年齢は N Myc 増幅群 (タイプ 3) では 1 歳にピークがあり急激に減少した。6 か月マススクリーニングで N Myc 増幅例の発見が少ない事を考慮すると N Myc 増幅群はマススクリーニングのターゲットにはなりにくいと考えられた。大部分がタイプ 2 と考えられる N Myc 非増幅群は増幅群に比較し, より年長まで分布することから, マススクリーニング実施時期を遅くしても臨床診断よりは早期に発見できると推定した。

⑦ 神経芽腫の生物学的特徴による分類と組織型

マススクリーニング発見・臨床診断 310 例について DNA Ploidy, N Myc 増幅による 3 タイプへの分類と組織型との関連を検討し, タイプ 1 腫瘍は予後良好型, タイプ 3 は予後不良型が多い, タイプ 2 は年齢が広く分布し, 組織型にも多様性があることがわかった。

考察

マススクリーニングの利益と不利益を勘案して評価する際に, もっとも基本的な利益の指標となるのが, スクリーニングによって当該疾患の死亡がどの程度減るのかを確認することであろう。神経芽細胞腫死亡ではその精確な推定のためには, 極めて大きなサンプル・サイズが必要となる。また, 生後 6 ヶ月前後の受検年齢後の転居移動の影響を無くすためには, 限られた地域での死亡の把握や受検・未受検比較ではなく, 全国規模での把握が必要であった。一方, わが国では, 1984 年の厚生省の検査事業化以来, 神経芽細胞腫マススクリーニングは全国で広く利用されてきており, 無作為化比較試験の実施は困難であった。そこで実施されたのが, 全国の全乳児コホートを対象にし, 神経芽細胞腫死亡をエンドポイントとした受検・未受検の比較研究である。その結果, 受検群において神経芽細胞腫死亡率は明らかに低いものであり, その累積死亡の差の大きさは, 100 万人あたり 20~30 人と推定された。また, これら累積死亡の大きさは先行研究の結果の多くと一致するものであり, 人口動態統計からの神経芽細胞腫死亡の経時推移や白血病死亡との比較でみられた 4 歳以下に限られた死亡減少傾向などと符合するものであった。

この観察研究は、世界的にも最も規模が大きく、また曝露（受検・未受検）やエンドポイント（神経芽細胞腫死亡）の把握の精度も高いものと考えられるが、比較可能性の観点から、ランダム化比較試験に比べて、様々なバイアスにより結果が影響される可能性もある。そのため、付随するサブ研究として2つの妥当性確認研究が計画された。スクリーニング受検確認の妥当性研究では、2地域の協力を得て、受検者リストから受検の有無を同定することに問題が無いことが確認された。また、自治体検査機関の受検者リストへの照会に基づく受検率は、転入歴の追跡および未受検、不明例の精査を行うことが重要であることが示されことから、全国乳児コホート研究のように全国規模で受検・未受検および神経芽細胞腫死亡の把握を行うこと、また住民票照会による転入歴の追跡が有用であったことが明らかとなった。

しかし、もう一方の妥当性確認研究であったケース・コントロール研究（および全国乳児研究における平成14年死亡の把握）は、「神経芽細胞腫マススクリーニング検査のあり方に関する検討会」の「いったん休止することが適切」との報告を理由に、人口動態調査死亡票の使用が不許可とされ実施できなかった。検討会が事業のいったん休止を適切とするため示した3条件のひとつが「神経芽細胞腫の罹患と死亡の正確な把握」であること、また事業休止後時間が経つと計画されたようなケース・コントロール研究は実施不能となることなどを鑑みると、大きな禍根を残した目的外使用申請不許可の判断といえるだろう。国民共有の財産として社会全体で活用していくべき指

定統計の目的外使用が認められなかった事態は、極めて遺憾なものと考えられ、マススクリーニング休止後の神経芽細胞腫死亡の監視に不安を残すものであった。

6か月マススクリーニング休止決定の理由は、死亡率低下が明らかでないことと過剰診断の存在である。もし今後、死亡率低下が証明されるならば、過剰診断を回避し6か月マススクリーニングと同等の死亡率低下をもたらす方法があるかどうかが問題である。神経芽腫に病期IVS という自然退縮する腫瘍があることはマススクリーニング開始前から知られていたが、マススクリーニングの実施から得られた情報によって神経芽腫の多様性を示す知見が蓄積された。現在、神経芽腫は自然退縮・成熟する可能性がある1歳未満に多い3N腫瘍と、癌遺伝子 N Myc が増幅したきわめて予後不良な1歳以上に多い2N腫瘍と、癌遺伝子 N Myc が増幅していないが予後不良な1歳以上に多い2N腫瘍の3タイプに大別されると考えられるようになった。過剰診断は6か月というマススクリーニング実施時期が予後良好な自然退縮・成熟の可能性のある多数の腫瘍の発見に繋がった事に起因すると思われる。過剰診断回避には今後、自然退縮・成熟する腫瘍の頻度、経過を明らかにし、実施時期を遅くする必要がある。

本研究で使用された神経芽腫分類の基準が報告間で一致していなかった。臨床的評価班研究③、⑥、⑦で使用された分類項目は N Myc の増幅と DNA Ploidy により3タイプに分類しており最も単純である。研究④ではこれらに 1P 欠失、NTRK1、Telomerase 活性を追加し、より詳細である

が基本的考え方は同一である。研究⑤では前2者と共通する項目は N Myc の増幅のみで、他に病期、Ha-Ras/trkA 発現、組織型によって、低リスク群、中間リスク群、高リスク群に分類している。今後、神経芽腫の自然史に関する理解を深め、時期を遅くしたマススクリーニングを検討するには、共通の分類基準を定めるべきである。その意味で、本研究班で DNA Ploidy 判定基準を提示した事は一步前進である。

多様性のある神経芽腫のなかで、N Myc 増幅のあるタイプ3腫瘍はマススクリーニングの主たるターゲットにはなり得ない。理由として、タイプ3腫瘍はカテコールアミン非分泌型が多い、6か月マススクリーニングで発見されたタイプ3腫瘍はマススクリーニング発見例の3%に過ぎないのに、臨床例は1歳をピークにしてその後急激に減少する、臨床例には病期IVが多く病期I・IIはまれである等があげられる。本研究で明らかになったように、タイプ2腫瘍は、6か月マススクリーニングで発見されており(マススクリーニング例の24%)、診断年齢が3歳をピークに5歳程度までに及び、予後不良なこと等から、今後時期を遅くしたマススクリーニングを考慮するとすればそのターゲットといえる。今回、タイプ分類と組織型について検討したが、さらに、タイプ2腫瘍の特徴を明らかにし、その予想される発見率、発見時病期、予後改善の可能性についての検討が必要である。

#### 結論

全国乳児コホートを対象に神経芽細胞腫死亡をマススクリーニング受検・未受検で比較したところ、受検群で明らかに死亡率

が低く、その累積死亡の差の大きさは、100万人あたり20~30人と推定された。

多様性がある神経芽細胞腫にマススクリーニングによる早期発見を考慮するには、タイプ2腫瘍をターゲットとして検討すべきである。

分担研究：神経芽細胞腫マススクリーニング・プログラムの疫学評価

我が国における神経芽腫死亡率の推移

研究要旨

人口動態統計の「副腎の悪性新生物」（小児では事実上すべて神経芽腫）による死亡と「リンパ性白血病」による死亡を比較したところ、神経芽腫の4歳以下での死亡率の減少傾向は白血病と同等もしくは大きかった。白血病の治療の進歩は、特にこの十数年の間、目を見張るものがあるが、神経芽腫治療において、白血病を上回るほどの進歩があったのであれば、5-9歳でも、神経芽腫の死亡率は白血病と同様に減少するはずであるが、1997年以前にはほとんど変化はなかった。4歳以下において神経芽腫の死亡率の減少をもたらした要因は、HPLC・MS以外には考えられなかった。神経芽腫マス・スクリーニングを中止した場合、我が国の4歳以下の神経芽腫（副腎の悪性新生物）による死亡率がどのように変化するか、諸疫学資料から推計した。1979-2000年の各年齢において高速液体クロマトグラフィー（HPLC）受検者の割合と死亡率との間の回帰式を求め、これを将来の各年・各年齢の推定受検者割合に当てはめ、2004年以降中止した場合の将来の死亡率を算出した。1979-2000年の1歳から4歳の各年齢の神経芽腫死亡率とHPLC受検者割合の間には有意に高い負の相関係数が存在した。2004年に中止した場合、2005年には1歳でスクリーニングを受けた児がゼロとなって死亡率が上昇し、2006年には同様に2歳の死亡率が上昇を始め、2008年に4歳以下の各年齢の死亡率は1980年代のレベルに戻った。神経芽腫マス・スクリーニングを中止すると、未受検者割合が直ちに上昇して、4歳以下の死亡率はこれに敏感に反応して上昇すると考えられた。

研究協力者

西基（北海道医療大学生命基礎科学講座）

人口動態統計に使用される国際死因分類（ICD）には、神経芽腫という項目はない。本稿では、神経芽腫による年齢別死亡数は、人口動態統計の副腎の悪性新生物である194.0（1979-1994年）とC74（1995-2000年）によった。小児では、「副腎の悪性新生物」の死亡の大部分が神経芽腫によるものであり、神経芽腫の死亡例の大部分は副腎原発の例である。以下、便宜上「副腎の悪性新生物」は「神経芽腫（NB）」と呼称する。

I 我が国における神経芽腫の死亡の変化

小児の悪性新生物の中では、白血病、特に急性リンパ性白血病の治療の進歩が際立っている。人口動態統計では「リンパ性白血病」（ICD9, 204；ICD10, C91）の死亡数が公表されているが、小児の場合、その大部分は急性リンパ性白血病である。「NBの治療の進歩」という因子について検討を試

みるべく、リンパ性白血病と対比した。

表1にNBとリンパ性白血病の死亡率の推移を示す。1-4歳でのNBの死亡率の改善の程度は、リンパ性白血病と同等もしくは大きい（1994-96年の死亡率は、NBの方が低かった）。ところが、5-9歳では、両者の傾向は全く異なる。リンパ性白血病は1-4歳におけるのと同様な死亡率の減少傾向を示しているのに対し、NBはほとんど変化がない。減少傾向が見え出したのは1997-99年になってからである。

II 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）受検者の割合とNB死亡率

既に報告した方法で1)、全国の各年齢層におけるHPLC受検者数の割合を算出した。各地の検査センターで測定法がHPLCに変更されたのは1988-92年前後である。表2に示す如く、1-4歳の集団において50%を超えたのは1992年、5-9歳の集団では1997年のことである。このことは、上述のように、1-4歳では1990年代に入ってから