

異常代謝産物を排泄するのにカルニチンが消費されるためである⁴⁾。カルニチン欠乏では安静時には症状がないものの、感染や飢餓などを契機に著しい低血糖におちいることもある¹⁰⁾。ビオチン欠乏をみた際にはカルニチン欠乏の有無についても同時に評価し、低値の場合にはカルニチンを補充する必要がある。

難治性湿疹を見た際には、ビオチン欠乏も念頭におくこと、またアレルギー用ミルクなどの特殊ミルクを使用する場合には代謝スクリーニングを行いビオチンやカルニチンの欠乏の有無を確認することが必要である。

[謝辞]

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)、及び文部科

学省科学研究費を受けて行なった。

文献

- 1) Watanabe T, Fukui T: Food Add Contam 15: 619-625, 1998
- 2) 渡邊敏明, 他: ビタミン 79: 445-452, 2005
- 3) 小澤和裕: 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 19: 50-56, 2005
- 4) Bary Wolf: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease 8th ed:3935-3962, 2001
- 5) Mock NI, et al: Am J Clin Nutr 65: 951-958, 1997
- 6) 樋口隆造, 他: 日本小児科学会雑誌 100:1908-1912, 1996
- 7) 西原修美: 日小皮会誌 20: 85-87, 2001
- 8) 真々田容子, 他: アレルギー 57: 552-557, 2008
- 9) 横田俊一郎: 小児内科 38増刊号: 106-107, 2006
- 10) Charles R. Roe, et al: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed: 2297-2326, 2001

<話題あれこれ>

第27回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 本学会は下記日程で開催します。

会期: 2010年5月29日(土) ~ 30日(日)

会場: 学術総合センター 東京都千代田区一ツ橋

〒101-0003 東京都千代田区一ツ橋2-1-2) TEL 03-4212-6321

会長: 赤澤 晃(東京都立小児総合医療センター アレルギー科)

参加費: 医師 7,000円 その他職種 5,000円

*学生(大学院生は除く)は無料です。学生証をご呈示ください。

プログラム(抄)

シンポジウム「アドヒアランスを向上させる患者教育のあり方」

座長: 大矢 幸弘(国立成育医療センター第一専門診療部アレルギー科)

座長: 亀田 誠(地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター小児科)

楠 隆(滋賀県立小児保健医療センター小児科), 嶋津 史恵(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 薬局), 二村 昌樹(国立成育医療センターアレルギー科), 岡本 聡子(NPO法人ふらっとスペース金剛)

招待講演

講師: Benjamin Francisco PhD. PNP. AE-C

座長: 赤澤 晃(東京都立小児総合医療センター アレルギー)

会長講演

講師: 赤澤 晃(東京都立小児総合医療センター アレルギー科)

座長: 森川 昭廣(群馬大学/希望の家附属北関東アレルギー研究所)

教育講演「やさしいアレルギー学」

講師: 齋藤 博久(国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部)

座長: 西間 三馨(独立行政法人 国立病院機構福岡病院)

セミナー「喘息の発症・進展と感染症-Friend or Foe?」

講師: 藤澤 隆夫(国立病院機構三重病院臨床研究部)

座長: 海老澤 元宏(独立行政法人 国立病院機構相模原病院臨床研究センター アレルギー疾患研究部)

連絡先: 学会事務局 国立成育医療センター専門診療部アレルギー科 後藤(大会担当)

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1

TEL 03-3416-0181 E-mail: nanchi27@procomu.jp

Two-Source Capture Recapture Methodを用いた日本における メチルマロン酸血症の発症率及び小児慢性特定疾患治療研究事業での 登録率の検討

顧 艶紅¹⁾, 小林弘典²⁾, 加藤忠明¹⁾, 長谷川有紀²⁾, 原田正平¹⁾, 山口清次²⁾

1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所成育政策科学研究部, 2) 島根大学医学部小児科

【要 旨】

小児慢性特定疾患治療研究事業（小慢事業）で登録したメチルマロン酸血症（MMA）患者を Source 1, 島根大学医学部小児科で登録した患者を Source 2とする, Two-Source Capture-Recapture Methodにより, MMAとして治療されている患者を対象として, 全国における患者数の推定, 発症率及び小慢事業での登録数に関する検討を行った. 1998-2008年に生まれ, 治療されているMMA患者の推定総人数は116 (95%信頼区間, 83-149) 人であった. この期間のMMAの発症率は約10万人対0.93 (95%信頼区間, 0.76-1.10) であった. タンデムマス・スクリーニングのパイロットスタディーの検査実績から計算した発症率と有意差はなかった. 推定総数に対する小慢事業への患者登録率は48.3%であった.

【キーワード】

小児慢性特定疾患治療研究事業, 疾病登録, メチルマロン酸血症, タンデムマス・スクリーニング, 疫学

【緒 言】

メチルマロン酸血症（MMA）はタンデムマス・スクリーニングの対象疾患で, 有機酸代謝異常症の中では頻度の高い疾患の一つであるが, 本邦における発症率は明らかではない.

今回, Two-Source Capture-Recapture Method (Two-Source CRM) を用いて, MMAとして治療されている患者を対象として, 全国における患者数の推定, 発症率及び小児慢性特定疾患治療研究事業（小慢事業）での登録率に関して検

討した. Two-Source CRM法は野生生物の個体数を推定するために生態学分野で用いられてきたが, 近年では保健医療分野でも広く利用されている¹⁻³⁾. これまでTwo-Source CRM法が用いられた代表的な報告としては, 患者数が多い糖尿病の患者総数推定に用いられた例がある¹⁾. 一方, Two-Source CRMを用いた我々自身の研究²⁾では, 年間発症例数の少ないMenkes病患者の発症数の推定が可能であった. そこで今回我々は, 有機酸代謝異常症の中では比較的頻度の高いMMAの患者総数の推定を試みた.

<連絡先>

顧 艶紅
〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
成育政策科学研究部
Tel: +81-3-3416-0181 (ext. 4271) Fax: +81-3-3417-2694
E-mail: gyh@nch.go.jp

【方 法】

1. Two-Source CRM

Two-Source CRM法は閉鎖的な個体群の動物の総数Nを推定するもっとも基本的なモデルである. n_1 頭の動物サンプルを個体群からとり, マークを付け, ただちにもとにいた場所に放つ.

マーク個体と未マーク個体が十分混じりあう時間を経過したのち、第2のサンプル n_2 頭の動物をとる。その結果 m 頭がマークされていることがわかったとする(図1)。Chapman法を用いて個体数の推定値を求めることができる⁴⁾。

$$N = \{(n_1 + 1)(n_2 + 1) / (m + 1)\} - 1 \quad (\text{図1}).$$

$$95\% \text{信頼区間} = N \pm 1.96 \sqrt{\text{Var}(N)},$$

$$\text{Var}(N) = \{(n_1 + 1)(n_2 + 1)(n_1 - m)(n_2 - m)\} / \{(m + 1)^2(m + 2)\}$$

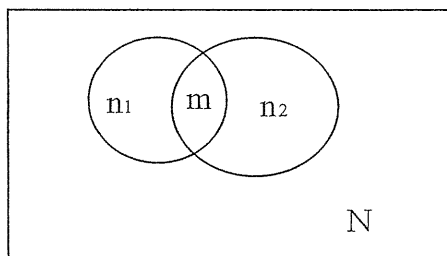


図1. Two-Source CRM法の図式

2. 研究対象とTwo-Source CRM照合用データの準備

今回の解析では小慢事業に登録した患者数を n_1 とし、島根大学医学部小児科で登録した患者数を n_2 、両者に含まれた患者数を m とした。

MMAの小慢事業での対象基準は「疾患名に該当すれば対象となる」である⁵⁾。 n_1 は小慢事業の登録データで治療を受けている患者でかつ研究目的にデータを使用することに対する同意者であった。一方、島根大学医学部小児科で登録した患者はタンデムマス・スクリーニングのパイロットスタディー、及び各地でハイリスク児に対する検査によって診断された患者で、中には軽症例と重症例が含まれる。両データの比較は表1に示す。従って、小慢事業の登録データと島根大学小児科の患者には死亡例が含まれていなかった。

照合のため、Source1とする平成21年度の小慢事業の電子データから、E71.1H(メチルマロン酸血症)として登録された新規・継続患者のデータを抽出した。抽出データ内での重複症例については、平成17年度以降小慢事業中央電子データに患者の生年月日が記入されているので、同地域の受給者番号と生年月日により照合し、単一化した。

1998年1月1日から2008年12月31日までに生まれ、性別、生年月日と医療機関所在地が入力されている患者を対象とした。

両Source間での照合は生年月日、性別、医療機関所在地(都道府県)を用いて行った。

3. 全国の出生数

全国の出生数は厚生労働省・人口動態統計によった⁶⁾。

4. 小慢事業での登録率の算出方法

小慢事業での登録者数を推定したMMA患者総数で割り、得たパーセント数を小慢事業での登録率とした。

【研究結果および考察】

全国で治療を受けているMMA患者の推定総数、発症率及び小慢事業での登録率は各々、116,10万対0.93, 48.3%であった(表2)。

タンデムマス・スクリーニングのパイロットスタディー結果から算出されたMMAの発症率は11.6万人対1.0(10万人対0.86)であり⁷⁾、本研究で推定したMMAの発症率の95%信頼区間内で、有意差はなかった。このMMAの全国発症率はタンデムマス・スクリーニングの費用対効果の研究に役立つ。

Two-Source CRM法は野生生物の個体数を推定するのに生態学分野で用いられてきたが、近年では保健医療分野でも広く利用されている¹⁻³⁾。以下の三つの条件を満たせば、Two-Source CRMが利用できる。①Source1とSource2が互いに独立的なものであること、②Source1とSource2が閉鎖的であること、③Source1とSource2の個体がそれぞれ同じ確率でキャッチされることである。

表1で示すように小慢事業の登録患者がより広範囲に分布している。Two-Source CRMにより推定される患者数を用いると、小慢事業の未利用者かつ島根大学小児科での未登録の患者 $N - (n_1 + n_2 - m)$ は42人になる。さらに、小慢事業で m の割合(m/n_1)は28.6%であり、同様に島根大学小児科で m の割合(m/n_2)は47.1%

表1. 1998年1月1日から2008年12月31日まで生まれたMMA患者における小慢事業の登録患者と島根大学小児科の登録患者属性の相違の比較

	Source1-小慢事業の登録患者	Source2-島根大学医学部 小児科での登録患者
人数	56	34
性別		
男	37	21
女	17	13
不明	2	0
新生児マススクリーニング		
あり	1	3
なし	40	16
不明	15	15
発症時期		
新生児期	33	17
乳児期	18	10
幼児期	3	5
未発症	0	1
不明	2	1
診断時の月齢		
範囲	該当項目なし	0-72
0		13
1-6		8
7-12		5
13-		6
不明		2
診断法		
尿中有機酸分析		
あり	48	32
無記入	8	2
尿中有機酸分析「あり」	48	32
遺伝子解析		
あり	8	9
なし	30	23
無記入	10	0
尿中有機酸分析「あり」	48	32
酵素活性分析		
あり	18	9
なし	22	23
無記入	8	0
患者が通った病院の 所在地 (都道府県)	岩手県, 宮城県, 秋田県, 山形県, 茨城県, 栃木県, 埼玉県, 千葉県, 東京都, 神奈川県, 岐阜県, 静岡県, 愛知県, 三重県, 大阪府, 兵庫県, 岡山県, 広島県, 山口県, 徳島県, 愛媛県, 香川県, 福岡県, 佐賀県, 宮崎県, 鹿児島県, 計26都道府県	北海道, 秋田県, 新潟県, 宮城県, 茨城県, 東京都, 神奈川県, 静岡県, 愛知県, 京都府, 大阪府, 兵庫県, 徳島県, 香川県, 島根県, 福岡県, 佐賀県, 計17都道府県

表2. 全国におけるMMAの推定患者総数, 発症率および小慢事業での登録率

項目	
MMA 患者が生まれた期間	1998年1月1日 - 2008年12月31日
Source1 - 小慢事業登録者数, n_1	56
Source2 - 島根大学医学部小児科での登録患者, n_2	34
Source1とSource2に含まれるMMA患者数, m	16
推定したMMA患者総数, N	116
推定したMMA患者総数 N の95%信頼区間	83-149
1998年1月1日 - 2008年12月31日の全国の出生数	12,466,389
全国におけるMMAの発症率	0.93 (対100,000)
全国におけるMMAの発症率の95%信頼区間	0.76-1.10 (対100,000)
全国における小慢事業での登録率, n_1/N	48.3% ($n_1/N * 100\%$)

であった。全体で m の割合 ($m/(n_1+n_2-m)$) も21.6%と高かったため、今回のTwo-Source CRM法で算出した患者総数推定値の精度は高く、妥当であると考えられる⁴⁾。

本研究の対象者の特徴としては、研究対象は治療を受けている症例であり、死亡患者数が含まれていなかった。また、患者によっては小慢事業での登録と島根大学医学部小児科での登録が同じ小児科医師により行われた可能性があり、Source1とSource2の個体がそれぞれ同じ確率でキャッチされるという条件は十分に満たされておらず、Chapman法の式の中の m 値の評価は過大傾向にある。この二つの原因で今回の推定値が過小評価されている可能性はある⁴⁾。本研究では小慢事業の登録患者に関する追跡調査が行われておらず、また、島根大学小児科の登録患者における小慢事業の利用率も不明であり、小慢事業の登録精度に関しては更なる検討が必要である。

われわれのTwo-Source CRM法を用いた先行研究では小慢事業での登録率において、1999-2003年にMenkes病は78%で、1994-2002年度に先天性甲状腺機能低下症は41.9%であった^{2,3)}。さらに先天性甲状腺機能低下症の小慢事業での登録率に地域の差がみられ、26.9-75.6%であった³⁾。本研究では全国におけるMMA患者の小慢事業への登録率は48.3%で、全体の半数以下であった。理由としては、市町村独自の乳幼児医療費助成などの制度が年々充実し、小慢事業より利用しやすくなったこと、また、疾患によっ

て、治療費用に差があることが考えられた。

【結 語】

Two-Source CRMを用いて、日本全国におけるMMA治療者の総数、発症率の推定及び小慢事業での登録率を算出した。小慢事業の登録データを活用するのにTwo-Source CRMは有用なツールの一つと考えられる。

【謝 辞】

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金の補助によって行われた。

【文 献】

- 1) LaPorte RE, McCarty DJ, Songer TJ, Bruno G, Tajima N.: Counting diabetes in the next millennium. *Diabetes Care* 16: 528-534, 1993.
- 2) 顧 艶紅, 加藤忠明, 原田正平, 榊村智美, 児玉浩子, 小沢 浩: 日本のMenkes病に関するTwo-source capture recapture methodを用いた発症率の検討. *日本先天代謝異常学会雑誌*22: 84-87, 2006.
- 3) Gu YH, Kato T, Harada S, Inomata H, Aoki K: Time-trend and geographic distribution of treated patients with congenital hypothyroidism relative to the number of available endocrinologists in Japan. *J Pediatr* 2010 in press.
- 4) Brenner H: Use and limitations of the cap-

- ture-recapture method in disease monitoring with two dependent sources. *Epidemiology*. 6: 42-48, 1995.
- 5) 倉辻忠俊 (監修) : 小児慢性特定疾患早見表 (登録管理用) 平成19年度版, 母子愛育会, 東京2008, p128.
- 6) 全国の出生数 (<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/eStatTopPortal.do>) 2010年1月にアクセス.
- 7) 山口清次 : 平成20年度厚生労働省科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業「タンDEMマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」総括・分担研究報告書. 2009, p7.
- 受付日 : 平成22年2月1日
受理日 : 平成22年4月5日

Incidence estimated by two-source capture recapture method and registration rate of methylmalonic acidemia in the medical aid program for chronic pediatric diseases of specified categories in Japan

Yan-Hong Gu¹⁾, Hironori Kobayashi²⁾, Tadaaki Kato¹⁾, Yuki Hasegawa²⁾
Shohei Harada¹⁾, Seiji Yamaguchi²⁾

1) Department of Health Policy, National Research Institute for Child Health and Development

2) Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine

幼児期に繰り返す嘔吐発作で発症したメチルマロン酸血症の同胞例

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野¹⁾, 島根大学医学部小児科²⁾, 東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野³⁾

栗野 宏之¹⁾ 八木麻理子¹⁾ 起塚 庸¹⁾ 小林 弘典²⁾
長谷川有紀²⁾ 山口 清次²⁾ 坂本 修³⁾ 大浦 敏博³⁾
竹島 泰弘¹⁾ 松尾 雅文¹⁾

要 旨

乳児期に全く症状を認めず、幼児期に繰り返す嘔吐発作、意識障害で発症したメチルマロン酸血症(以下 MMA)の同胞例を経験した。妹は1歳時より嘔吐発作を繰り返しており、3回目の嘔吐発作時に尿有機酸分析を行い MMA と診断された。姉は3歳時より嘔吐発作を繰り返し、周期性嘔吐症として経過観察されていたが、妹が MMA と診断されたことを契機に精査を行い化学的に MMA と診断された。さらに、メチルマロニル CoA ムターゼ遺伝子解析にて、p.G380E/p.G648D の複合ヘテロ接合変異を同定した。感染等のストレス時に嘔吐発作を繰り返す症例の中には、診断に至っていない MMA 例が潜在している可能性がある。

キーワード：メチルマロン酸血症、嘔吐発作、メチルマロニル CoA ムターゼ遺伝子

はじめに

メチルマロン酸血症(methylmalonic acidemia: 以下 MMA)はメチルマロニル CoA ムターゼ活性の低下により体内にメチルマロン酸を中心とする有機酸が蓄積する遺伝性疾患である。MMA は新生児期より嘔吐、体重増加不良、筋緊張低下、昏睡などの症状で発症することが多いとされている。しかし、近年タンデム質量分析などの検査が普及してきたことにより、感染や飢餓などを契機に間欠的に代謝性アシドーシスなどの発作を呈する軽症例の存在が明らかにされつつある。我々は乳児期には異常を認めず、幼児期より嘔吐発作を繰り返した MMA の同胞例を経験したので報告する。

症 例

症例 1: 1歳8か月、女児、第3子

主訴：意識障害、嘔吐

周産期歴：39週3日、3,316gにて仮死なく出生。

既往歴：1歳0か月時、1歳7か月時に意識障害を伴う嘔吐発作のため入院加療を要した。いずれも2~3日の輸液で軽快した。

家族歴：長姉(6歳)が周期性嘔吐症

現病歴：200X年12月31日より咳嗽、不機嫌を認

め、翌年1月1日より食欲低下、1月2日に嘔吐を繰り返すようになったため近医受診した。内服処方を受け一旦帰宅したが、その後もぐったりとしていたため1月3日にA病院受診。受診時、意識障害(JCSIII-300)があり、血液検査にて低血糖、代謝性アシドーシスを認めたため入院となった。

入院時現症：身長79.0cm(-0.8SD)、体重10.6kg(+0.1SD)と身体発育に異常を認めなかった。心音、整、心雑音なし。肺にラ音を聴取した。腹部は平坦、軟であり肝脾腫は認めなかった。

入院時検査所見(表1)：WBC(23,380/ μ L)、CRP(3.7mg/dl)の上昇を認めた。血液ガス検査(静脈血)にて pH7.183、BE-19.7mmol/L、 HCO_3^- 6.7mmol/L と代謝性アシドーシスを認めた。また高アンモニア血症(162 μ g/dl)、低血糖(30mg/dl台)、BUN異常高値(39mg/dl)も認めた。尿検査ではケトン(3+)であった。髄液検査に異常を認めなかった。

入院後の経過：入院後、低血糖、代謝性アシドーシスに対し、20%ブドウ糖投与、重炭酸ナトリウムによる補正を行ったところ低血糖、代謝性アシドーシスの改善を認めた。輸液による加療を継続したところ、意識障害は徐々に改善し、同日中にJCSII-20、翌1月4日には意識は清明となった。意識障害の原因検索のため頭部MRI、脳波検査施行したが、器質的疾患や脳炎、脳症等を疑わせる所見を認めなかった。後遺症は認めず、1月7日に軽快退院となった。

既往歴、急性期の低血糖、代謝性アシドーシス、高アンモニア血症から代謝異常症を疑い、発作時検体を

(平成21年6月5日受付)(平成22年1月13日受理)

別刷請求先：(〒650-0017) 神戸市中央区楠町7-5-1

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野
八木麻理子

E-mail: myagi@med.kobe-u.ac.jp

表1 症例1 入院時 (発作時) 検査所見

[静脈血ガス]		[血液生化学]	
pH	7.183	TP	6.3 g/dL
PCO ₂	17.9 mmHg	Alb	4.1 g/dL
B.E.	43.2 mmol/L	AST	43 IU/L
HCO ₃ ⁻	6.7 mmol/L	ALT	16 IU/L
		LDH	338 IU/L
[血液一般]		T.Bil	0.3 mg/dL
WBC	23,380 /μL	BUN	39 mg/dL
RBC	355万 /μL	Cre	0.45 mg/dL
Hb	9.8 g/dL	Glu	30台 mg/dL
Ht	30.8 %	Na	132 mEq/L
Plt	32.6万 /μl	K	5.4 mEq/L
		Cl	100 mEq/L
[血清]		Ca	8.1 mg/dL
CRP	3.7 mg/dL	アンモニア	162 μg/dL
[尿一般] (輸液開始後)		[髄液検査]	
比重	1.019	細胞数	1/3
潜血	(-)	タンパク	15 mg/dL
タンパク	(-)	糖	185 mg/dL
糖	(3+)		
ケトン	(3+)		

用いて尿有機酸分析を行った。その結果、メチルマロン酸、メチルクエン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸の著明な排泄増加、乳酸・ピルビン酸の排泄増加、およびケトーシスの存在を示す3-ヒドロキシ酪酸やアセト酢酸の著明な排泄増加を認め (図1 (a)), MMA と化学診断した。

退院後、非発作時に行った尿有機酸分析では、メチルマロン酸、メチルクエン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸の排泄増加を認めたが、アシドーシスやケトーシスを示す代謝産物は認めなかった (図1 (b))。また、濾紙血を用いたタンデム質量分析ではプロピオニルカルニチン (C3) /アシルカルニチン (C2) 比 0.35 (カットオフ値 0.22), プロピオニルカルニチン 7.74μM (カットオフ値 5.25) と上昇あり, MMA に特徴的な所見を認めた (表2)。

状態が回復した後、ビタミンB12に対する反応性の有無を検討するために、ビタミンB12 (一般名: コバミド, 商品名: ハイコバール) 投与前後の尿有機酸分析を行った。その結果、メチルマロン酸、メチルクエン酸の排泄の減少を認めた (表3)。しかし、ビタミンB12投与前のメチルマロン酸排泄量が 13,814.4μmol/mol・Creatinine と著明高値であり、ビタミンB12投与後も 4,628.3μmol/mol・Creatinine と 1,000 を下回っていないことから、ビタミンB12に対してある程度の反応はあるものの、その効果は乏しく、ビタミンB12非依存型MMA と考えられた。

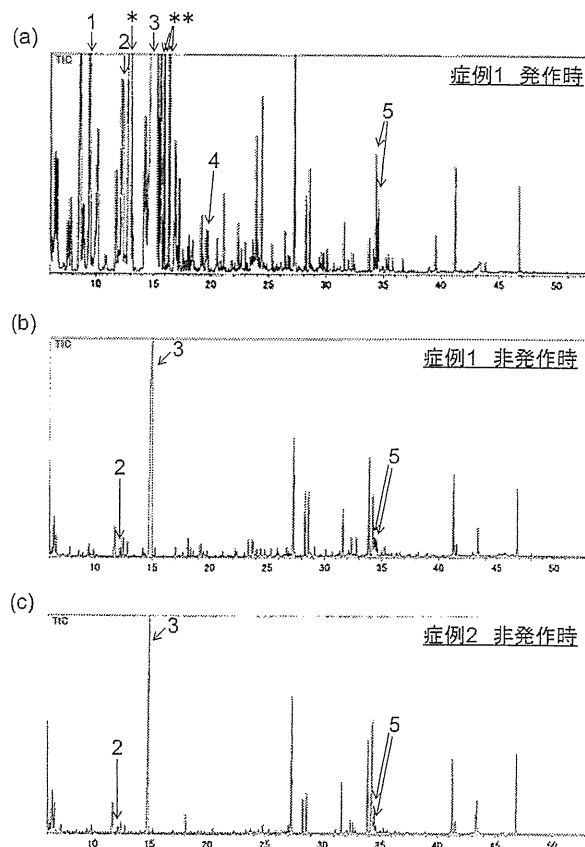


図1 尿有機酸分析

(a) 症例1, 発作時

1) 乳酸, 2) 3-ヒドロキシプロピオン酸, 3) メチルマロン酸, 4) プロピオニルグリシン, 5) メチルクエン酸などの著明な排泄増加を認める。また、ケトーシスを示す、3-ヒドロキシ酪酸 (*), アセト酢酸 (***) の著明な排泄増加を認める。

(b) 症例1, 非発作時

2) 3-ヒドロキシプロピオン酸, 3) メチルマロン酸, 5) メチルクエン酸の排泄増加を認める。

(c) 症例2, 非発作時

2) 3-ヒドロキシプロピオン酸, 3) メチルマロン酸, 5) メチルクエン酸の排泄増加を認める。

表2 タンデム質量分析

	症例1 (非発作時)	症例2 (非発作時)	カットオフ値
C3 (μM)	7.74	7.98	< 5.25
C3/C2 比	0.35	0.46	< 0.22
C0 (μM)	23.45	18.23	10 ~ 60

C3: プロピオニルカルニチン

C2: アセチルカルニチン

C0: 遊離カルニチン

MMA と診断後、食事療法によるタンパク摂取制限は行わず、カルニチン内服を開始したところ、嘔吐発作なく経過している。

表3 ビタミン B12 投与前後の尿有機酸分析

	投与前	投与後
メチルマロン酸	13,814.4	4,628.3
メチルクエン酸-1	73.1	46.2
メチルクエン酸-2	54.1	31.7

(単位: $\mu\text{mol}/\text{mol} \cdot \text{Creatinine}$)

症例2: 6歳1か月, 女児, 第1子

主訴: 嘔吐発作の精査

周産期歴: 36週5日, 2,216g, 常位胎盤早期剝離のため緊急帝王切開にて出生。仮死は認めず, その後の発達も順調であった。

既往歴: 3歳0か月時より嘔吐発作を6回繰り返し, 入院や外来での治療を要した。毎回, 輸液のみで軽快し周期性嘔吐症と診断されていた。

家族歴: 妹(症例1)がMMA

現病歴: 6歳1か月時, 妹がMMAと診断された。3歳時より入院の上, 持続点滴を必要とする嘔吐発作を繰り返し認めていたため, 同疾患を疑い精査を行った。

身体所見: 身長117.7cm (+0.9SD), 体重19.3kg (-0.1SD)。心音・肺音に異常認めず, 腹部所見も異常を認めなかった。

検査所見: 尿有機酸分析ではメチルマロン酸, メチルクエン酸, 3-ヒドロキシプロピオン酸の排泄増加を認め(図1(c)), MMAと化学診断した。濾紙血を用いたタンデム質量分析においても, プロピオニルカルニチン/アシルカルニチン比0.46, プロピオニルカルニチン7.98 μM と上昇しており, MMAに特徴的な所見を認めた(表2)。

遺伝子解析結果: 症例1において, ビタミンB12非依存型MMAと診断したことから, メチルマロニルCoAムターゼ異常症を疑いメチルマロニルCoAムターゼ遺伝子解析を行った。その結果, 症例1, 2のいずれにもc.1139G>A(p.G380E)とc.1943G>A(p.G648D)の複合ヘテロ接合変異を同定し, メチルマロニルCoAムターゼ異常症によるMMAと診断した。また両親の解析も行ったところ, 父にはc.1139G>A(p.G380E)のヘテロ接合変異を, 母にはc.1943G>A(p.G648D)のヘテロ接合変異をそれぞれ同定し, 両親は保因者であった。

考 察

MMAはメチルマロニルCoAムターゼ活性の異常により発症する遺伝性疾患であり, アポ酵素であるメチルマロニルCoAムターゼ異常症と, メチルマロニルCoAムターゼの補酵素であるビタミンB12の代謝異常症に分類される。さらに, メチルマロニルCoAム

ターゼ異常症は, ムターゼ活性を認めない完全欠損症(mut^0)と, ムターゼ活性がある程度残存している部分欠損症(mut^-)とに細分される。臨床病型としては, 新生児・乳児期早期から急激な経過で発症し, 死亡率が高く神経学的予後が不良である重症型と, 乳幼児期以降に発症する軽症型に分類され, mut^0 の多くは重症型であり, mut^- は軽症型である¹⁾²⁾。近年, 「普段は正常だが, 感染や飢餓などの際に間欠的に代謝不全に陥り, 急性脳症様症状をきたした例」や, 「繰り返す嘔吐発作を契機に診断された例」が報告されており, 軽症型MMAは多彩な症状を呈することが明らかにされつつある^{3)~6)}。

本邦におけるMMAの頻度は, これまで約1/20万人と考えられていたが, 濾紙血を用いたタンデム質量分析によるマススクリーニングの結果から, 約1/9.6万人であるとの報告がなされている⁷⁾。これは無症状で経過している例, あるいは急性脳症や周期性嘔吐症として加療され, MMAの診断に至っていない例が潜在する可能性を示唆している。症例1では, 意識障害を伴う嘔吐発作を3回繰り返していたが, 初めの2回の発作では診断に至らなかった。また症例2も, 3歳から嘔吐発作を繰り返していたが, 周期性嘔吐症として加療されており, 妹がMMAと診断されたことを契機としてMMAの診断に至った。繰り返す嘔吐発作を認めた場合は, MMAなどの代謝異常症を鑑別診断に入れて, 血糖, アンモニア, 血液ガスを測定し, さらにタンデム質量分析や尿有機酸分析を行うことが診断するうえで重要である。また, 自験例では, 診断確定後, カルニチン内服や長期間の飢餓を避けるなどの生活指導を行うことによって, 嘔吐発作は認めていない。診断を確定することによって, カルニチン内服や感染などのストレス時の適切な処置を行い, 代謝不全の発症あるいは増悪の予防が可能であった。

MMA症例の中には, ビタミンB12代謝異常症のみならず, メチルマロニルCoAムターゼ異常症であっても, その補酵素であるビタミンB12に対して反応性を示す場合がある⁸⁾⁹⁾。自験例(症例1)においてビタミンB12への反応性を評価したところ, ビタミンB12投与によって尿中メチルマロン酸濃度は13,814.4 $\mu\text{mol}/\text{mmol} \cdot \text{Creatinine}$ から4,628.3 $\mu\text{mol}/\text{mmol} \cdot \text{Creatinine}$ へと低下した。

これまで, ビタミンB12投与によってメチルマロン酸濃度が1,000 $\mu\text{mol}/\text{mmol} \cdot \text{Creatinine}$ 以下に低下した場合や, 50%以上低下した場合などに, ビタミンB12に対する反応性があるとされてきた。しかしながら, これらの基準では真の反応を反映しているかどうか判断できないという議論もあり, 現時点では, MMAにおけるビタミンB12への反応性に関する定義はま

だ確立されていない。また、メチルマロン酸濃度が10,000 $\mu\text{mol}/\text{mmol} \cdot \text{Creatinine}$ 以上を呈しするMMA患者では、ビタミンB12への反応性を認める例は非常にまれではあるという報告もある¹⁰⁾。これらの報告を基に症例1におけるビタミンB12への反応性について検討した結果、投与前の尿中メチルマロン酸濃度が10,000 $\mu\text{mol}/\text{mmol} \cdot \text{Creatinine}$ 以上の著明高値であり、投与後も1,000 $\mu\text{mol}/\text{mmol} \cdot \text{Creatinine}$ を下回らないことから、ビタミンB12に対してある程度の反応性はあるものの、臨床的にはその効果は乏しいと考えた。

メチルマロニルCoAムターゼはメチルマロニルCoAムターゼ遺伝子によりコードされている。この遺伝子は6p21に存在し、13のエクソンからなる。MMAの原因となる変異は、これまで100以上も同定されており、本症例で認めたc.1943G>A (p.G648D)変異は本邦における複数の家系で同定されている。このc.1943G>A (p.G648D)変異をヘテロ接合変異でもつ患者は、mut⁻と報告されており、本症例の臨床症状と一致する¹¹⁾。一方、c.1139G>A (p.G380E)は現在まで報告のない新規の変異である。メチルマロニルCoAムターゼは2つのサブユニットからなり、各サブユニットは基質の結合部位である β/α barrelと、ビタミンB12結合部位の2つのドメインをもつ。p.G380EはN末端の β/α barrelドメインに位置するミスセンス変異であるが、この近傍には β/α ドメインの構造を変化させると考えられているp.A377Eというミスセンス変異が存在する¹²⁾。またp.A377Eを保有するMMA患者の表現型はmut⁰となることが報告されている¹³⁾。これらのことよりp.G380E変異は β/α ドメインの構造の変化に関与し、疾患の原因となる酵素活性低下をきたす変異であると結論した。

謝辞 本研究は厚生労働省科学研究費補助金を受けて行った。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 松原洋一. メチルマロン酸血症. 日本臨床 別冊 先天異常症候群辞典 (上). 2001: 97—99.
- 2) 大竹 明. 先天性代謝異常症. 小児内科 2003; 35: 367—372.
- 3) 四本由郁, 長谷川有紀, 山口清次, 他. インフルエンザ脳症の発症を機に発見されたビタミンB12反応型メチルマロン血症の3歳男児例. 小児科診療 2008; 71: 762—769.
- 4) 山田桂太郎, 深尾敏幸, 寺本貴英, 他. Reye症候群様の症状で発症したメチルマロン酸血症の1例. 小児科臨床 2005; 58: 395—399.
- 5) 長谷川有紀, 山口清次. インフルエンザ脳症に対する先天代謝異常スクリーニングの重要性. 小児科 2004; 45: 1611—1620.
- 6) 田代恭子, 猪口隆洋, 松下優美, 他. 質量分析法による新生児代謝異常マスマスクリーニングの重要性. 日本先天代謝異常学会雑誌 2008; 2: 78.
- 7) 木村正彦. 有機酸代謝スクリーニング. 小児科 2004; 11: 2003—2008.
- 8) Horster F, Baumgartner MR, Viardot C, et al. Long-term outcome in methylmalonic acidurias in influenced by the underlying defect (mut⁰, mut⁻, cblA, cblB). Pediatr Res 2007; 62: 225—230.
- 9) Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. N Engl J Med 1983; 308: 857—861.
- 10) Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR. Causes of diagnostic approach to methylmalonic acidurias. J Inherit Metab Dis 2008; 31: 350—360.
- 11) Kobayashi A, Kakinuma H, Takahashi H. Three novel and six common mutations in 11 patients with methylmalonic academia. Pediatric International 2006; 48: 1—4.
- 12) Thoma NH, Leadlay PF. Homology modeling of human methylmalonyl-Co-A mutase: A structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. Protein Science 1996; 5: 1922—1927.
- 13) Ledly FD, Rosenblatt DS. Mutations in mut Methylmalonic Acidemia: Clinical and Enzymatic Correlations. Human Mutation 1997; 9: 1—6.

Two Japanese Sisters with Methylmalonic Acidemia Showed No Symptoms in Infancy
but Presented Repetitive Vomiting in Early Childhood

Hiroyuki Awano¹⁾, Mariko Yagi¹⁾, Yo Okizuka¹⁾, Hironori Kobayashi²⁾,
Yuki Hasegawa²⁾, Seiji Yamaguchi²⁾, Osamu Sakamoto³⁾, Toshihiro Ohura³⁾,
Yasuhiro Takeshima¹⁾ and Masafumi Matsuo¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine

²⁾Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine

³⁾Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine

We report two Japanese sisters with methylmalonic acidemia (MMA). Neither showed any signs of metabolic decompensation in infancy. The elder sister had presented with repetitive vomiting since the age of three, and the younger sister since the age of one. At the age of one year and eight months, the younger sister had her third episode of repetitive vomiting with disturbance of consciousness. She was diagnosed with MMA after urine organic acid analysis. The elder sister was also suspected of having this disease, which was subsequently confirmed by urine organic acid analysis. *MUT* gene analysis revealed that both had compound heterozygous mutations of p.G380E and p.G648D.

Some patients with late-onset forms of MMA are asymptomatic in the stable stage ; however, stressful events can trigger relapsing episodes of metabolic decompensation such as vomiting. Physicians should consider screening for inherited metabolic disorders such as MMA in children with repetitive vomiting.

綜 説

タンデムマスによる 新生児マススクリーニング

こばやし ひろのり
小林 弘典*

やまぐち せいじ
山口 清次*

Key words

タンデムマス
新生児マススクリーニング
アミノ酸代謝異常症
有機酸代謝異常症
脂肪酸代謝異常症

要旨

最近、新生児マススクリーニング (NBS) の領域にタンデムマス法という新しい手法が普及しつつある。タンデムマスを導入すると現行 NBS の対象であるフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症を含むアミノ酸代謝異常症に加え、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症を一斉にスクリーニングすることができ、スクリーニング対象となる疾患は 20 種類以上となる。これまで行われてきたパイロット研究の結果によると、患者発見頻度は約 8,700 人に 1 人である。発見された患者は予後追跡中ではあるが、タンデムマスによる NBS の効果が証明されつつある。一方、それぞれの疾患が稀少疾患であるために、診断・治療における支援体制などの課題も明らかとなった。

はじめに

小児科医にとって新生児マススクリーニング (newborn screening : NBS) の重要性が広く認知されている。しかし、NBS が開始され 32 年が経過し、少子化などの社会状況の変化に伴って質的な変化も求められている。

最近、タンデムマス法という新しい機器を用いた NBS が広がっている¹⁾。対象となる疾患はアミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症であり、「拡大スクリーニング」といわれて注目されている。しかし、個々の疾患頻度は数十万人に 1 人というものが多く、一般小児科医にも馴染みの少ない稀少疾患である。本稿ではまずマススクリーニングに関する基本的な知識の整理と、タンデムマスによる新しい NBS の概要や対象疾患、今後の展望などを解説したい。

I 公共事業としての新生児マススクリーニング

NBS とは無治療で放置すると重篤な神経障害や生命の危険のある先天的な疾患を新生児期に発見し、早期介入することによって発病予防・障害予防を目指す社会事業である。NBS の検査は、社会全体の利益を目的として原則として全員が受けるべきものであり、この部分は通常の臨床検査とは性格が異なる。NBS とは診断、治療に始まり、発見された患者および家族のフォローおよびサポート、これらの定期的な評価、という要素が一体となったシステムである。現在、わが国において NBS 事業は乳幼児健診や予防接種事業と並んで、小児保健領域の 3 本柱の一つとして捉えられている。

このように公共の事業であるからには社会の状況や成熟度、検査方法の進歩などによって NBS への要求は変化していく。しかしながら、どんな疾患を対象とするかについては、社会全体として取り組む上での一定の要件がある。表

* 島根大学医学部小児科
〒 693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

表1 新生児マススクリーニングに求められる要件

- 1) 発症前に診断することができる
- 2) 有効な治療法がある
- 3) 児への負担が軽い
- 4) 検査精度が十分である
- 5) 費用対便益が一定以上認められる
- 6) 社会が許容できる範囲内のコストで検査が可能である
- 7) 希望すれば全員が受けることができる

表2 現行新生児マススクリーニングの対象6疾患

- フェニルケトン尿症 (PKU)
- メープルシロップ尿症 (MSUD)
- ホモシスチン尿症
- ガラクトース血症
- 先天性甲状腺機能低下症
- 先天性副腎過形成症

1にそれらの要件の私案を挙げた。NBSでは、数少ない罹患児を発症前に見つけるために多くの正常新生児にNBSに参加してもらっているので、NBSを拡大または縮小しようとする時には、これらの要件を満たすか否かを十分に検討する必要がある。

公共事業としてのNBSを考える上では費用対便益という評価指針もある。NBSによって障害を逃れることができたことによる医療費低減やその後の児の社会貢献などによる効果と、患者を発見するためにかかる費用を比較するための指標である²⁾。NBSの費用については、全員が受けるので無料が原則である。現行のNBS対象6疾患では採血・説明料は別として、検査費用は各自治体からの公的負担で行われ、結果としてほぼ100%の受検率を達成できている。一方、多くの施設ですで行われている聴覚スクリーニングは原則として検査費用は受益者負担であり、受検率は地域によっても差があるが平均すると82%である³⁾。

Ⅱ わが国における新生児マススクリーニングの歴史

わが国のNBS事業は1977年から全国で実施されるようになり、その後内分泌疾患の追加やヒスチジン血症の削除などを経て、現在は6疾患を対象として行われている(表2)。これまでに少なくとも1万人以上の小児が障害から救われてきたといわれており、その効果は社会にも広く認識されている。一方、NBSが開始さ

れてからの33年の間には、マススクリーニングの対象となる新たな疾患群の発見や、それらをスクリーニングするための技術的な革新もあった。本稿で取り上げるタンデムマスによる検査はその代表例である。

Ⅲ タンデムマス法の原理と特徴

タンデムマスとは本来は分析機器の名称である。タンデム型質量分析計の略であり、質量分析計(マス)が直列に2つ並んでいる(タンデム)装置である。臨床の間ではタンデムマスを用いて行うアシルカルニチン分析およびアミノ酸分析のことをタンデムマス法とよぶ。タンデムマスの利点は、微量のサンプルでも多項目の代謝産物を高感度に同時測定でき、かつ、これまでよりも短時間で分析できることである。使用するサンプルは現行のNBSと同じ乾燥血液ろ紙である。現行のスクリーニングでは原則として1疾患に対して1検体を必要とするのに対し、タンデムマスでは直径約3mmの血液ろ紙検体から20種類以上の疾患を一斉スクリーニングできる。

アシルカルニチンとは脂肪酸代謝や有機酸代謝の過程で蓄積したカルボン酸に対応するアシル基が血中のカルニチンとエステル抱合したものである。タンデムマスでは遊離カルニチン(C0)から炭素鎖18個のアシルカルニチン(C18)までのアシルカルニチンを分析し、異常があればその組み合わせによって化学診断を行う。アシルカルニチン分析では有機酸代謝異常症の一部や脂肪酸代謝異常症をスクリーニング

する。

タンデムマスによる先天代謝異常症のスクリーニング法が確立されたのは1990年代半ば以降である⁴⁾。このタンデムマスをNBSへ導入することで非常にまれな疾患をスクリーニング対象とすることができるようになった。すなわち、タンデムマスでは同じコストで多項目を一斉分析ができるので、各々の疾患頻度が非常に低くても、その頻度を累積することが可能になった。これによって、治療の効果が十分期待できる疾患であっても従来の検査法では費用対便益の面からNBS対象とならなかった疾患をスクリーニング対象とすることができるようになった。

IV タンデムマスで見つかる疾患

タンデムマス法でスクリーニング可能な疾患のうち、現状で新生児マススクリーニングに有用と考えられる疾患を表3に示した。

1. アミノ酸代謝異常症

アミノ酸異化過程の第1段階における酵素の異常で起こる疾患である。蓄積するアミノ酸が組織障害をきたすことが病態の中心となる。現行のNBSで行われているフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症が含まれる。その他にはシトルリン血症1型やアルギニノコハク酸尿症などの尿素サイクル異常症もこの中に含まれる。

2. 有機酸代謝異常症

アミノ酸の異化過程の中間代謝産物であるカルボン酸は有機酸といわれる。有機酸代謝異常症では、アミノ酸の異化過程に必要な代謝経路の障害により有機酸が蓄積する。プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症などは、新生児から乳児期に著明な代謝性アシドーシスや高アンモニア血症などの症状で発症することが多い。新生児期早期の発症例はNBSで診断される前に発症する

こともある。また、グルタル酸血症1型のように発作を契機に段階的な神経障害が進行する疾患もある。

3. 脂肪酸代謝異常症

脂肪酸 β 酸化系は炭水化物などからのエネルギー供給が低下した時に、脂肪酸(パルミチン酸など)からアセチルCoAを産生することでエネルギーを代償的に供給する経路である。脂肪酸代謝異常症ではこのような β 酸化系が作動しなくてはならない時に急性発症する。発症時期は哺乳間隔が開き始める乳児期から幼児期に多く、上気道炎や胃腸炎などの感染症罹患が契機となることが多い。急激な低血糖や横紋筋融解症、Reye症候群様の発症形態をとることも少なくない。

中鎖アシルCoA脱水素酵素(MCAD)欠損症は欧米での乳幼児突然死症候群(sudden infant death syndrome: SIDS)の原因の一つとして大きな関心を集めた⁵⁾。MCAD欠損症の自然歴では、患者の約50%が乳幼児期に低血糖を中心とする急性発作で発症するが、残りの50%の患者は生涯無症状で経過する。しかし、発症した患者の半数(25%)が初回の発作で死亡し、残りの25%の患者も重度の障害を残す。MCAD欠損症は白人では約1万人に1人の頻度といわれている⁶⁾。タンデムマスによるNBSが先んじて導入されている欧米では、MCAD欠損症の死亡例はほとんどなくなっている。ごく最近までわが国のMCAD欠損症例は非常に少ないと考えられていたが、タンデムマスによるNBSパイロット研究の結果、約13万人に1人の有病率であることが明らかとなった⁷⁾。

V わが国におけるパイロットスタディの成果

2009年末までには延べ104万人以上の新生児がタンデムマスによるNBSを受け、そのうち120人の患者が発見された⁷⁾。その内訳は、アミノ酸代謝異常症38人、有機酸代謝異常症

表3 タンデムマスによるマススクリーニングで見つかる主な疾患とそれらの発症時期および発症形態

	発症時期	発症形態
アミノ酸代謝異常症 フェニルケトン尿症 メーブルシロップ尿症 ホモシスチン尿症 シトルリン血症1型 アルギニノコハク酸尿症 シトルリン欠損症*	新生児～乳児 新生児～乳児 新生児～乳児 新生児～乳児 新生児～乳児 新生児～乳児	けいれん, 発達遅滞 アシドーシス 発達遅滞, 発育異常 呼吸・意識障害 呼吸・意識障害 一過性乳児肝炎様症状
脂肪酸代謝異常症 全身性カルニチン欠乏症 CPT-1 欠損症 CPT-2 欠損症* CACT 欠損症* VLCAD 欠損症 TFP (LCHAD) 欠損症 MCAD 欠損症 SCHAD 欠損症* グルタル酸血症2型 (MADD)*	新生児～学童 乳児 新生児～成人 新生児～乳児 乳児～成人 乳児～成人 乳児～幼児 新生児～乳児 新生児～思春期	Reye 症候群, SIDS Reye 症候群, 肝障害 Reye 症候群, 横紋筋融解症 Reye 症候群, SIDS 低血糖, 骨格筋・心筋障害 Reye 症候群, SIDS Reye 症候群, SIDS 低血糖 Reye 症候群, SIDS
有機酸代謝異常症 メチルマロン酸血症 プロピオン酸血症 マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 イソ吉草酸血症 β-ケトチオラーゼ欠損症* 3-MCC 欠損症 グルタル酸血症1型 HMGL 欠損症	新生児～乳児 新生児～乳児 新生児～乳児 新生児～乳児 乳児～幼児 新生児～乳児 乳児～幼児 新生児～乳児	アシドーシス, 発達遅滞 アシドーシス, 発達遅滞 湿疹, アシドーシス アシドーシス, 体臭 ケトアシドーシス発作 Reye 症候群, 筋緊張低下 アテトーゼ, 発達遅滞 Reye 症候群, 低血糖

MCC：メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ, HMGL：HMG-CoA リアーゼ, CPT-1：パルミトイルトランスフェラーゼ-1, CPT-2：パルミトイルトランスフェラーゼ-2, CACT：カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ, VLCAD：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素, TFP：ミトコンドリア三頭酵素, MCAD：中鎖アシル CoA 脱水素酵素, SCHAD：3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素, MADD：マルチプルアシル CoA 脱水素酵素欠損症

*：現時点で二次対象疾患と考えられる疾患。診断精度が十分でなかったり、治療法が確立していない。

51人, 脂肪酸代謝異常症31人であった。わが国における患者発見頻度は約8,700人に1人と計算されている。表4に示すように、タンデムマスによるNBSで発見された症例は、発症後に診断された症例に比べて予後良好である。これらの結果からは、事前に診断されることで多くの場合は急性代謝不全までの発展を阻止する

ことが可能になり、発症したとしても病態に応じた適切な対応が可能であることが推測される。

Ⅵ 各国および日本国内での導入状況

タンデムマスは欧米先進国を中心に1990年

表4 タンデムマス法による新生児マススクリーニングの効果

	スクリーニング発見例 (タンデムマス法)*	発症後診断例**
全患者数	43	138
有機酸代謝異常	30	110
正常	24 (83%)	36 (33%)
障害	4 (10%)	48 (43%)
死亡	2 (7%)	26 (24%)
脂肪酸代謝異常	13	28
正常	12 (92%)	15 (52%)
障害	1 (8%)	5 (20%)
死亡	0	8 (28%)

*：福井大学および厚生労働省研究班における試験研究の結果（1997～2006年）

**：島根大学小児科で発症後に診断された症例の予後調査結果（2001～2006年）

（山口清次，2010¹¹より一部改変）

代後半から広く普及した。とくに欧米諸国においては先に述べたMCAD欠損症が高頻度であったことも普及を後押しした⁶⁾⁸⁾⁹⁾。本邦では1997年から重松らがパイロット研究を開始し¹⁰⁾，2003年からは厚生労働省科学研究費補助を受けて5施設によるパイロット研究が始まった。2009年度は全出生のうち20%以上の新生児がタンデムマスによるNBSを受けており⁷⁾，今後も拡大すると予想される。

VII タンデムマスの導入にあたって今後の展望

ここまでタンデムマス法の新生児NBS導入における効果や意義などについて、わが国で行われてきたパイロット研究の成果を中心に述べてきた。しかし、一方ではパイロット研究によって浮き彫りになってきた問題点もある。ここではそれらの問題点を診断および治療の側面から述べる。

1. 診断における問題

タンデムマスは一度に多くの疾患をスクリーニングできる一方で、疾患によっては十分な検出感度ではない（見逃す）ものや、臨床的に重症例であっても、児の栄養状態、検体採取や保存の問題により見逃される（擬陰性）、または逆

に擬陽性の可能性もある。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-2 (CPT2) 欠損症や極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症などに代表される長鎖脂肪酸代謝異常症では、ろ紙血を検体とした分析では長鎖脂肪酸代謝をほとんど必要としない安定期では化学診断が難しい場合がある。よって、初回の検査で異常を指摘されても、経口哺乳が確立した後に再検査するところ紙血では見逃す可能性もある。一方、擬陽性の代表例としてピボキシル基を含むセフェム系抗菌薬の使用によるものが知られている。これにより C5 アシルカルニチンが高値となり、イソ吉草酸血症の擬陽性と診断されるケースが報告されている。

2. 軽症型患者の問題

タンデムマスではこれまで臨床的に問題になっていなかったごく軽症型の病型でも偶然に発見されることがある。軽症メチルマロン酸血症がその典型であり、これまでの追跡データからは臨床的な問題となる可能性は低いと考えられる¹¹⁾。NBSの理念からすると、このような軽症例はスクリーニングから除外されるべきかもしれない。軽症例として発見された児や家族には「もしかすると発症してしまうかもしれない」という不安だけを与えてしまう可能性や、生命

保険加入の際には病名がついているだけで加入できないなどの不利益を被ることも懸念され、今後の課題である。

3. スクリーニングの診断支援体制における課題

タンデムマスで発見される患児の頻度は約8,700人に1人と少なくないが、発見される個々の疾患は多くの一般小児科医にとっては馴染みのうすい稀少疾患である。タンデムマスによるNBS対象疾患のほとんどは精査や確定診断を進める際に、尿中有機酸分析や酵素活性測定、遺伝子解析といった診療報酬点数表未記載の検査を行わなければならない。現状ではこれらの検査は、研究を目的とする一部の施設に依存している。しかし、これらの疾患がNBSの対象となることを考えると、これらの特殊な検査をすべての新生児に安定かつ継続的に供給できる体制を整備する必要がある。

4. 母体疾患の偶発の発見

最近になって児のNBSを契機にして母体の代謝異常症が発見されるケースも報告されている¹²⁾。多くは無症状の母体から移行した異常代謝産物によって、非罹患の児において明らかな異常として指摘される。この場合児の再検を繰り返すうちに正常化する。代表的な疾患としては3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ(MCC)欠損症やイソ吉草酸血症、全身性カルニチン欠乏症などである。これらの疾患は重症度の幅が広く、成人期になると症状も目立たなくなる場合もあり、発見後の対応も非常に難しいことが少なくない。

5. 治療における問題

治療についても稀少疾患であるがゆえの問題がある。治療エビデンスの低さに加えて、しばしば診療報酬点数表未記載の特殊な治療を必要とすること、生活・食事指導、発作時には一般の小児科医の認識よりも迅速な対応を必要とする、など疾患によっては専門的な知識や経験を必要とすることもある。一例として、多くの有

機酸代謝異常症で使用するL-カルニチンなどは診療報酬点数表ではごく限定的な使用しか認められていない。発見された患児が全国どこでも一定の診断・治療の水準を保つためには、専門的な知識および経験をもつ医師における支援体制や診療報酬点数表診療内ですべての治療が行えるようなシステムの整備が望まれる。

6. 遺伝カウンセリングなど

スクリーニングで対象となる疾患は遺伝子病という側面をもつ。確定診断の際に遺伝子解析が必要であることも少なくないが、この際の適切な遺伝カウンセリングも必要になる。また、発端者の診断を契機に同胞を含めた家系における検索や次子における罹患の可能性などについても問題となることが多いし、先述のように児のスクリーニングを契機に母体の代謝疾患が診断されることもある。しかし現状では、遺伝カウンセリングを提供できる施設も限られていることに加えて、稀少な先天代謝異常症であるがゆえに適切な情報を提供できる施設はきわめて限られる。

おわりに

タンデムマスによるNBSは試験的な運用を終えて、まさに普及期に入ろうとしている。わが国のNBSは30年以上にわたって安定したシステムの上で運営されてきたが、否応なく大きな変化を求められている。タンデムマスの導入を契機に患者フォローアップ体制の整備や、診断・治療における問題点の解決、将来的には検査施設の集約化なども含めて、今後のわが国のNBSをよりよい方向に導くためのシステムの再構築を同時にすすめていく必要がある。その意味では、タンデムマスの普及は今後のNBSを発展させる上での試金石になるともいえる。これから、より多くの小児医の積極的なかわりが期待される。

文献

- 1) 山口清次：タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）平成 21 年度総括・分担研究報告書（研究代表者：山口清次），2010：61-67
- 2) 大日康史，菅原民枝，山口清次：タンデムマス法を用いた新生児マススクリーニングの費用対効果分析. 日本マス・スクリーニング学会誌 2007；17：27-34
- 3) 高田 哲：タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）平成 21 年度総合研究報告書（研究代表者：山口清次），2010：45-50
- 4) Rashed MS et al：Inborn errors of metabolism diagnosed in sudden death cases by acylcarnitine analysis of postmortem bile. Clin Chem 1995；41：1109-1114
- 5) Rinaldo P et al：Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Diagnosis by stable-isotope dilution measurement of urinary n-hexanoylglycine and 3-phenylpropionylglycine. N Engl J Med 1988；319：1308-1313
- 6) Venditti LN et al：Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency：a cost-effectiveness analysis. Pediatrics 2003；112：1005-1015
- 7) 重松陽介：タンデムマスによるマススクリーニングの効果の検討. 厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）平成 19-21 年度総合研究報告書（研究代表者：山口清次），2010：26-30
- 8) Wilcken B et al：Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. N Engl J Med 2003；348：2304-2312
- 9) Schulze A et al：Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry：results, outcome, and implications. Pediatrics 2003；111：1399-1406
- 10) Shigematsu Y et al：Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002；776：39-48
- 11) 坂本 修ほか：新生児タンデムマススクリーニングで発見される C3, C3/C2 高値例の検討. 日本マス・スクリーニング学会誌 2009；19：63-68
- 12) Lee NC et al：Diagnoses of newborns and mothers with carnitine uptake defects through newborn screening. Mol Genet Metab 2010；100：46-50

PEGylated Polyplex With Optimized PEG Shielding Enhances Gene Introduction in Lungs by Minimizing Inflammatory Responses

Satoshi Uchida¹, Keiji Itaka¹, Qixian Chen², Kensuke Osada², Takehiko Ishii³, Masa-Aki Shibata⁴, Mariko Harada-Shiba⁵ and Kazunori Kataoka^{1,2}

¹Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ³Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ⁴Laboratory of Anatomy and Histopathology, Faculty of Health Science, Osaka Health Science University, Osaka, Japan; ⁵Department of Molecular Pharmacology, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

Safety is a critical issue in clinical applications of nonviral gene delivery systems. Safe and effective gene introduction into the lungs was previously achieved using polyplexes from poly(ethyleneglycol) (PEG)-block-polycation [PEG-block-PAsp(DET)] and plasmid DNA (pDNA). Although PEGylated polyplexes appeared to be safe, an excess ratio of polycation to pDNA was needed to obtain sufficient transgene expression, which may cause toxicities shortly after gene introduction. In the present study, we investigated the combined use of two polymers, PEG-block-PAsp(DET) (B) and homo PAsp(DET) (H) across a range of mixing ratios to construct polyplexes. Although transgene expressions following *in vitro* transfections increased in parallel with increased proportions of H, polyplexes with B/H = 50/50 formulation produced the highest expression level following *in vivo* intratracheal administration. Higher proportions of H elicited high levels of cytokine induction with significant inflammation as assessed by histopathological examinations. Based on the aggregation behavior of polyplexes in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs), we suggested that rapid aggregation of polyplexes in the lung induced acute inflammatory responses, resulting in reduced transgene expression. B/H formulation of polyplex can help to improve gene therapy for the respiratory system because it achieves both effective PEG shielding of polyplexes and functioning of PAsp(DET) polycations to enhance endosomal escape.

Received 3 December 2011; accepted 22 January 2012; advance online publication 14 February 2012. doi:10.1038/mt.2012.20

INTRODUCTION

Nonviral techniques for gene introduction using plasmid DNA (pDNA) have attracted attention for many clinical uses. Although the definition of gene therapy includes genetic modification of

deficient cells, gene introduction using pDNA chiefly involves providing functional proteins and peptides through transgene expressions. The sustained synthesis of proteins and peptides, which enables the synchronization of the kinetics of signaling receptor expression and bioactive factor availability,¹ is a key advantage of its application in many chronic diseases.

Among various gene introduction routes, pDNA-containing nanoparticle inhalation, a direct, noninvasive technique, is a promising practical system that makes target cells more accessible. Gene introduction into the respiratory system has numerous applications for treating severe lung diseases, such as cystic fibrosis, pulmonary hypertension, and lung cancer,² and it can systemically deliver proteins and peptides. However, because immune responses of the respiratory system are particularly sensitive to foreign materials, the safety of the delivery systems is extremely important for successful gene introduction. To realize the promise of gene therapy, it is essential to achieve adequate safety to avoid undesirable responses.

pDNA is generally incorporated into nanoscale formulations by complexing it with cationic lipids or polymers, which provides greater stability and functionality.³⁻⁵ The safety of nanoscale particles (nanotoxicology) has been vigorously investigated in various fields.⁶ Many studies revealed that the toxicity of these particles in target tissues, typically the lungs, are primarily mediated by inflammatory responses that occur after nanoparticle-induced oxidative stress.^{7,8} These responses are sensitive to the physicochemical properties of nanoparticles, including their size, chemical composition, surface structure, solubility, shape, and aggregation.⁹⁻¹¹ For delivery into the lungs, a biodegradable formulation of nanoparticles composed of poly(lactic-co-glycolic acid) significantly lowered the inflammatory responses compared with nonbiodegradable forms, although both had comparable hydrodynamic diameters.¹²

These safety issues motivated us to optimize pDNA-containing particle structure for gene introduction into the lungs. Polyplexes from our original cationic polymer, poly{N⁺-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} [PAsp(DET)] and pDNA,

Correspondence: Kazunori Kataoka, Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp or Keiji Itaka, Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: itaka-ort@umin.net

is promising because they are safe and biocompatible.^{13,14} We have already achieved therapeutic outcomes in monocrotaline-induced pulmonary hypertension animal models using a system based on PAsp(DET).¹⁵ PAsp(DET) possesses high-transfection efficiency because of its pH-selective membrane destabilization and concomitantly enhanced endosomal escape.¹⁶ Furthermore, it is biodegradable under physiological conditions. Because of rapid degradation of PAsp(DET) to nontoxic forms after gene introduction, it does not induce persistent tissue damage and cumulative toxicity, which may perturb cellular homeostasis in a time-dependent manner.¹⁷

However, pDNA polyplexes from cationic polymers inevitably have a high surface positive charge, which causes undesirable responses in the body, such as polyplex aggregation and tissue damage. Poly(ethyleneglycol) (PEG) has often been used to shield polyplexes. Because of its hydrophilic and flexible nature, PEG increases steric stability, prevents nonspecific interactions with surrounding molecules, and eventually reduces toxicity.^{18–23} In our previous studies on *in vivo* administrations including the lungs, we used pDNA polyplexes of a micellar structure surrounded by PEG palisade, that were formed by complexing pDNA with a block copolymer composed of PEG and PAsp(DET) [PEG-block-PAsp(DET)].^{15,24,25} These PEGylated polyplexes achieved safe gene introduction without inducing severe inflammation, leading to the effective treatment of rat pulmonary hypertension model using adrenomedullin-expressing pDNA.¹⁵ However, PEG also tends to reduce transgene expressions by preventing cellular uptake of polyplexes and hampering their intracellular processing.^{26,27} Indeed, to obtain sufficient transgene expressions using the PEGylated polyplexes, we needed higher mixing ratios of cationic polymers to pDNA (N/P ratios) to enhance the expressions. The higher N/P ratios, however, caused some toxicities, especially shortly after gene introduction.

In the present study, we investigated the optimal conditions to break out of the dilemma of PEG, by focusing on the intravital behavior of polyplexes in lung. We used a PEGylation strategy by mixing PEGylated and non-PEGylated forms of polycations in the construction of polyplexes-containing pDNA.²² We found that the optimal combination of two forms, PEG-block-PAsp(DET) (B) and homo PAsp(DET) (H), was effective in achieving high transgene expression in lungs with minimal toxicity, by balancing effective PEG shielding and functions of the polycation. Furthermore, we acquired new insights into the mechanisms that mediate the inflammatory responses induced by polyplexes in the lungs.

RESULTS

In vitro and *in vivo* transfection using polyplexes with B/H formulations

For preparation of polyplexes with B/H formulations, the polymer solutions of PEG-block-PAsp(DET) (B) and homo PAsp(DET) (H) were first mixed at different ratios, and then added to pDNA solutions. We conducted *in vitro* transfections toward mouse embryonic fibroblasts and HuH-7 cells using CpG-depleted pDNA-expressing luciferase (pCpG-ΔLuc); the transgene expression was increased in parallel with increased proportions of H (Figure 1) at an N/P ratio of 8. In contrast, cell viability, evaluated by an MTT assay, was reduced slightly with increased proportions of H.

For *in vivo* administration, the polyplexes-containing luciferase-expressing pDNA were injected intratracheally using a microspray, and the luciferase expression was evaluated after extracting the lung tissue, followed by homogenization to obtain the proteins. Polyplexes with B/H = 50/50 formulation exhibited a significantly higher expression in the lungs compared with polyplexes with B/H = 100/0 and 0/100 formulations (Figure 2). These data were in contrast with the results of *in vitro* transfections (Figure 1). To evaluate the toxic effect of polyplexes, we measured

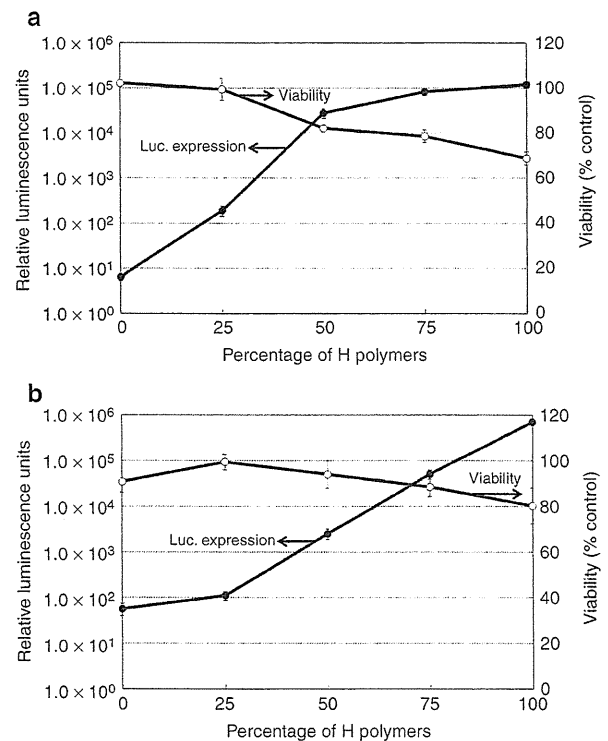


Figure 1 *In vitro* transfection to (a) mouse embryonic fibroblast (MEF) or (b) HuH-7 cells. Luciferase expression (closed circle) and viability (open circle) was measured 48 hours after transfection. The data were expressed as the means \pm the standard errors of the mean (SEM) ($N = 5$).

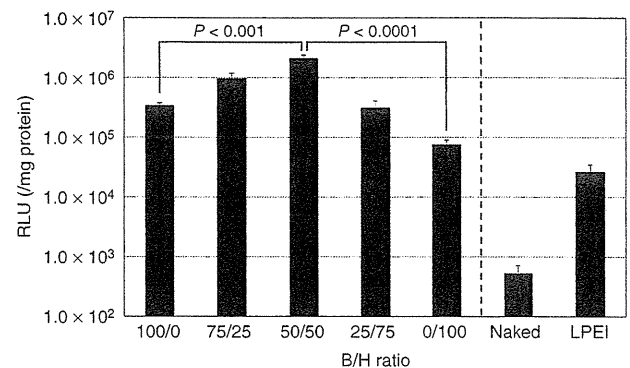


Figure 2 Luciferase expression in lung tissue 48 hours after polyplex administration. The data were expressed as the means \pm SEM ($N = 5$). RLU, relative luminescence units.