

ルタル酸血症 2 型 (GA2)、CPT2 および MCAD 欠損症であった。

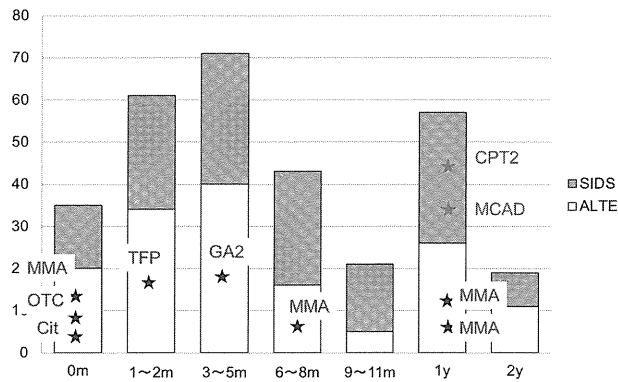


図2. SIDS/ALTE症例の年齢分布と発見された代謝異常症

4) タンデムマス検査における測定値の安定性に関する検討

血清などの液体試料中のアシルカルニチンの安定性を図3に示す。図3Aに示すように、常温におかれた資料では7日後からすでに長鎖アシルカルニチン値は低下し始め、時間とともにアシルカルニチン測定値は下がり、反対に遊離カルニチン値は上昇する傾向がみられた。すなわち液体試料を室温に放置するとアシルカルニチンは加水分解する可能性を念頭においてプロフィールを評価する必要がある。特に低カルニチン血症、あるいは長鎖脂肪酸代謝異常症の評

価には注意を要する。

一方ろ紙血中の AC の安定性については、過去に報告がある (表4)。

5) 精密検査法の開発向上

(1) 遺伝子検査への MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法の応用: CPT2 欠損症と CACT 欠損症の遺伝子の各エクソンにプローブをおいて設計した。一部エクソンにて反応不良が認められたが、プローブを再設計して、最終的には良好な MPLA 法を確立した。

(2) 中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症と極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症の酵素活性測定: 2001 ~ 2012年の間に、MCAD 欠損症はタンデムマス NBS 陽性群 24 例中 16 例、発症後精査群 12 例中 6 例を確定診断した。VLCAD 欠損症では、NBS 陽性群の 6 例全例、発症後精査群 38 例中 13 例を確定診断した。

(3) 宮城県のタンデムマス・スクリーニング精密検査の実態: 平成 24 年にタンデムマスを実施した初回件数は 13,176 件のうち 56 件に再検査依頼となった (0.42%)。精査となった症例は 6 例であった。6 例は以下のような結果であった。

① 症例 1: C5OH + C4DC 1.22 (>1) 精査によって、尿中有機酸分析 メチルマロン酸の極軽度増加。追加検査で血中ビタミン B12 118 pg/

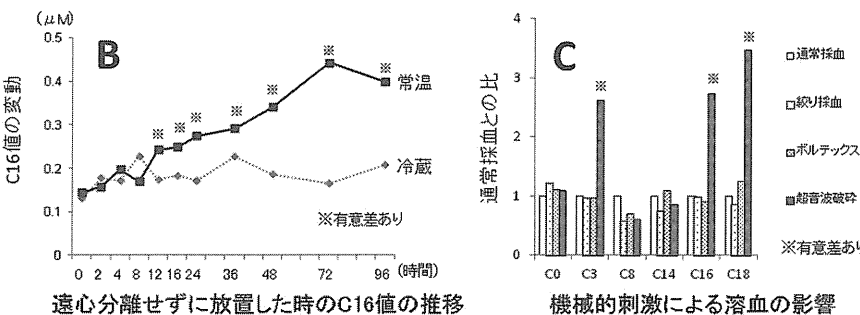
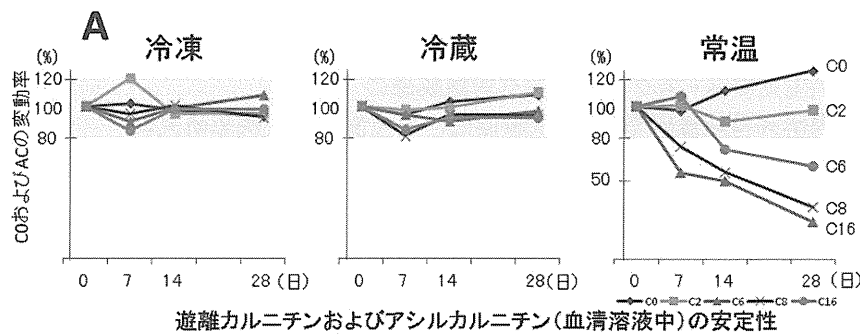


図3. 血清試料(液性検体) 中のアシルカルニチン測定値の安定性

表4. 血液ろ紙中のアシルカルニチンの安定性 (室温)

AC	半減期 (日)
C3	161
C4	301
C5	330
C6	346
C8	385
C10	408
C12	462
C14	630
C16	770
C18	990

Fingerhut et al: Anal Chem, 2009より引用改変

mL (180-914)、ホモシステイン 10.7 nmol/L のため「ビタミン B12 欠乏症」として治療を開始した。

②症例2: C3 9.93 (>8), C3/C2 0.381 (>0.25) で、精査の結果、血中ビタミン B12 84 pg/mL (180-914)、ホモシステイン 13.1 nmol/L、尿中有機酸分析 メチルマロン酸、メチルクエン酸の軽度排泄増加がみられたため、「ビタミン B12 欠乏症」として治療した。

③症例3: C3 8.25 (>8), C3/C2 0.266 (>0.25) で、精査にて血中ビタミン B12 288 pg/mL (180-914)、ホモシステイン 6.6 nmol/L、尿中有機酸分析 異常代謝産物を認めず、「偽陽性」と診断した。

④症例4: C0 7.15 (>8.6) のため、全身性カルニチン欠乏症の疑いありとして、精査した。タンデム再検における C0 は $14.0 \mu\text{mol/L}$ 、血清カルニチン $33.9 \mu\text{mol/L}$ 、遊離カルニチン $27 \mu\text{mol/L}$ 。尿中カルニチン $72.2 \mu\text{mol/L}$ 、遊離カルニチン $11.6 \mu\text{mol/L}$ であった。その後、母乳に人工ミルクを追加されたところ体重増加が良くなり、「栄養性カルニチン欠乏」としてとしてフォローアップしている。

⑤症例5: C3 9.26 (>8), C3/C2 0.61 (>0.25) であった。精査にて血中ビタミン B12 161 pg/mL、ホモシステイン 7.6 nmol/L、尿中有機酸分析 メチルクエン酸の排泄増加あり。遺伝子解析で、PCCB に p.T428I/p.Y435C を認め、「軽症プロピオン酸血症」と診断しカルニチン投与を開始した。

⑥症例6: C0 6.21 (>8.6) で、全身性カルニチン欠乏症(疑い)として精査した。血清カルニチン $37.2 \mu\text{mol/L}$ 、遊離カルニチン $30.5 \mu\text{mol/L}$ 。尿中カルニチン $26.0 \mu\text{mol/L}$ 、遊離カルニチン $6.0 \mu\text{mol/L}$ であった。その後、哺乳量(母乳)増加とともに体重増加もよく、「栄養性カルニチン欠乏症」としてフォローを中止した。

(4)千葉県タンデムマス・スクリーニングの再検と精密検査の実態:平成22~24年に千葉県でパイロットスタディーに参加した施設は、従来の代謝異常スクリーニングへの参加施設の約76%であった。この期間中の実施検査数は54,035検体であった。再採血率は0.53%であり、精密検査受診例は12例であった。確定診断した患者は「プロピオン酸血症」3例、「MCAD 欠損

症」1例、メチルクロトニルグリシン尿症1例の計5例であった(発見頻度10,807に一人)。この他、母性メチルクロトニルグリシン尿症1例と抗生剤の投与症例によるカルニチン欠乏があった。このタンデムマス検査を受けてない症例で、極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症で突然死した症例を後方視的に診断した。保存されていた新生児期の血液濾紙でC14:1の異常高値が確認された。

6) 食事療法の改善に関する検討

フェニルケトン尿症(PKU)において、食事全体の低フェニルアラニン量を前提に、ビタミン・ミネラルを増量することは容易ではない。成長期以降のPKU患者の栄養不足に陥ることを予防するために、①ビタミン・ミネラルの総合サプリメントの利用、②低たんぱく、高ビタミン・ミネラルの食材の利用、③フェニルアラニン除去ミルクの摂取などの工夫が必要である。食事に対する意欲が湧くことを目的にレシピを作成した。

例えば、タコライス(チーズあり、なし)、夏野菜のキーマカレー、那須のひき肉はさみ揚げ、肉だんごと野菜のコンソメ煮、ボトフ風スープ、ミルク鍋(牡蠣あり、なし)、簡単かぼちゃグラタン、スイートポテト、イチゴジャムホットケーキ、洋ナシのパンナコッタ風などである。

7) 検査施設基準、検査実施基準の検討

地域格差、検査施設に格差のない同レベルで高品質な新生児スクリーニングを受けることを保証するために「検査施設基準」と「検査実施基準」(案)を作成した。

「検査施設基準」では、①検査機能として偽陰性例を最小化し、適正な偽陽性率と陽性的中率を確保できる能力を有していること、②精度保証体制として施設責任者、精度管理責任者および検査担当者などの責任体制の明確化、③施設規模と要件として検査施設は年間3万検体以上の検査を受託できる能力、④タンデムマス検査専任検査技術者の配置、⑤コンサルタント医師の設置、⑥全ての関係機関・関係者による密接な連携体制の確立を要件とした。

「検査実施基準」では、精度保証・精度管理基準、基準への適合度の評価方法、評価結果をもとに実施する改善方法を規定し、高品質・均質な検査の実施を目標とした。

D. 結論

わが国の新生児マススクリーニングにタンデムマス法の導入が今年度（平成24年度）～来年度にかけて全国に普及しつつある。タンデムマスの対象疾患の自然歴、マススクリーニングによる発見例の予後が発症後に診断された症例よりも良好であることも明らかになった。実際のマススクリーニングの中で再採血の問題、確定診断に至るまでの問題なども明らかになった。さらに検査の質の地域格差をなくし、質の維持向上を図るために検査施設基準、検査実施基準を提言した。小児の障害発生防止の目的を達成するために、タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの質の均てん化を図り質の向上を目指す必要がある。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S: Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. *Molecular Genetics and Metabolism* 107: 87-91, 2012 (September)
- 2) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 107: 237-240, 2012 (September)
- 3) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem* 10: Online, 2012 (November)
- 4) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N,

Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics: Online*, 2012 (December)

- 5) 花井潤師, 野町祥介, 高橋広夫, 三觜 雄, 佐々木純子, 磯部充久, 石毛信之, 穴澤 昭, 安片恭子, 木下洋子, 山上祐次, 酒本和也, 田崎隆二, 小林弘典, 山口清次, 重松陽介: タンデムマス・スクリーニングのカットオフ値－各指標の施設間差の検討－. *日本マス・スクリーニング学会誌* 22 (1): 49-60, 2012 (6月)
- 6) 山田健治, 虫本雄一, 高橋知男, 小林弘典, 長谷川有紀, 白田信光, 山口清次: 遊離カルニチンおよびアシルカルニチンの安定性の検討. *日本マス・スクリーニング学会誌* 22 (1): 29-34, 2012 (6月)
- 7) 山口清次: 新しい新生児マススクリーニング: タンデムマス法について. *臨床検査* 56 (7): 770-776, 2012 (7月)
- 8) 山口清次: タンデムマス法を導入した新生児マススクリーニングの現状. *小児科* 53: 1101-1110, 2012 (7月)
- 9) 山口清次: 新生児マススクリーニングの新たな展開 タンデムマス法の導入. *公衆衛生* 76 (11): 853-857, 2012 (11月)
- 10) 山口清次: 特殊ミルクが必要なのはどんな場合ですか?. *周産期医学* 42 (増刊号): 198-200, 2012 (11月)
- 11) 山口清次: メチルマロン酸血症. *小児内科* 44 (増刊号): 164-165, 2012 (11月)

2. 学会発表

- 1) Vu C-D, Ki C-S, Khanh N-N, Hoan N-T, Ngoc C-T-B, Thao B-P, Dung K-T-K, Liem N-T, Jamiyan P, Yamada K, Yamaguchi S: Phenotype and genotype of Vietnamese patients with maple syrup urine disease. *The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease.*

- Seoul, Korea, April 2012
- 2) Yamaguchi S: Current topics in diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease Symposium. Seoul, Korea, April 2012
 - 3) Prevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydroge (MCAD) deficiency. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
 - 4) Nguyen N-K, Chi D-V, Thi H-N, Phuong T-B, Bich N-C-T, Khanh D-K-T, Thanh L-N, Yamaguchi S: Glutathione synthetase deficiency (5 oxoprolinuria) in vietnamese patients :clinical manifestations and outcome. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
 - 5) Can T-B-N, Chi D-V, Ngoc K-N, Thi H-N, Phuong T-B, Thanh L-N, Khanh D-K-T, Yamaguchi S: Clinical features of propionic acidemia in vietnamese patients: A report of 7 cases. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
 - 6) Kobayashi H, Yamada K, Prevsuren J, Mushimoto Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Ito M, Yamaguchi S: Beneficial effect of bezafibrate on boy with the late-onset gluric aciduria type 2. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
 - 7) Takahashi T, Hattori M, Furui M, Yamada K, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasagawa Y, Fukuda S, Ohtake A, RJA W, Yamaguchi S: Chemical diagnosis of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase (MMSDH) deficiency: A first case report in east Asia. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
 - 8) Kobayashi H, Mushimoto Y, Hasegawa Y, Yamada K, Purevsuren J, Takahashi T, Minohata T, Iida J, Yamaguchi S: Acylcarnitine analysis by ESI-MS/MS with smaller amount of sample and rapid analytical time. 19th International Mass Spectrometry Conference. 京都, September 2012
 - 9) Prevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Application of in-vitro probe acylcarnitine assay using tandem mass spectrometry for the evaluation of mitochondrial fatty acid oxidation. 19th International Mass Spectrometry Conference. 京都, September 2012
 - 10) Yamaguchi S, Purevsuren J, Yamada K, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Takayanagi M, Fukuda S: Intracellular acylcarnitine profiling using in vitro probe assay at various C0 concentrations selectively identifies CPT-1 deficiency and primary carnitine deficiency. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. Birmingham, UK, September 2012
 - 11) Hasegawa-Omura Y, Kobayashi H, Takahashi T, Yamada K, Purevsuren J, Yamaguchi S: Thiamine deficiency (beriberi) in the modern life style of Japanese children: detection by urinary organic acids analysis. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual

- Symposium 2012. Birmingham, UK, 9 2012
- 12) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamada K, Takahashi T, Ichiyama T, Yamaguchi S: Effect of proinflammatory cytokines on mitochondrial fatty acid oxidation in development of acute encephalopathy. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. Birmingham, UK, September 2012
 - 13) Wanders RJA, Ruitter JPN, Ferdinandusse S, van Kuilenburg ABP, Waterham HR, Dacremont G, Yamaguchi S: Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase (MMSDH) deficiency: Identification of a new case using a newly developed assay. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. Birmingham, UK, September 2012
 - 14) Gupta D, Bijarnia S, Saxena R, Kohli S, Puri R, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Deb R, Verma IC: Characterization of mutations and prenatal diagnosis in maple syrup urine disease in indian patients: Identification of three novel mutations. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. Birmingham, UK, September 2012
 - 15) Gupta D, Bijarnia S, Saxena R, Kohli S, Puri R, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Sakamoto O, Deb R, Verma IC: Gene studies in propionic acidemia in indian patients: Report of seven mutations, including one novel splice site mutation, and prenatal diagnosis. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. Birmingham, UK, September 2012
 - 16) Yamaguchi S: Clinical pictures, diagnosis, treatment and prognosis of mitochondrial Fatty acid oxidation disorders. 12th Meeting of Paediatric Endocrinology and Inherited Metabolic Disease (The Subspecialty Group of Endocrinologic Hereditary and Metabolic Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association)., October 2012
 - 17) 長谷川有紀, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, 高橋知男, プレブスレン・ジャミヤン, 山口清次: GC/MS 法とタンデムマス法を用いた有機酸・脂肪酸代謝異常症の出生前診断. 第9回中国四国出生前医学研究会. 岡山, 2012年2月
 - 18) 小林弘典: タンデムマスではどんな疾患が見つかるのか? ~脂肪酸 β 酸化異常症と低血糖の関係を中心に~. 第3回信越・北関東小児内分泌セミナー. 高崎, 2012年2月
 - 19) 高橋知男, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, Jamiyan Purevsuren, 古居みどり, 大竹 明, Wanders RJA, 山口清次: 学校検診を契機に発見されたメチルマロン酸セミアルデヒド脱水素酵素欠損症の本邦初例. 第115回日本小児科学会学術集会. 福岡, 2012年4月
 - 20) 山田健治, 虫本雄一, 高橋知男, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: グルタル酸血症2型に対するベザフィブラートの有効性: in vitro probe assay の応用. 第115回日本小児科学会学術集会. 福岡, 2012年4月
 - 21) 山口清次, Purevsuren J, 小林弘典, 長谷川有紀: セレウス菌食中毒による急性脳症はミトコンドリア β 酸化障害を介して起こる. 第54回日本小児神経学会. 札幌, 2012年5月
 - 22) 山口清次: タンデムマス法を導入した新生児マススクリーニングの新時代. 第48回日本周産期・新生児医学会 講演. 埼玉, 2012年7月
 - 23) 福士 勝, 重松陽介, 山口清次: タンデムマス・スクリーニング分析法と精度管理の標準化と検査施設基準. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
 - 24) 花井潤師, 野町祥介, 高橋宏夫, 佐々木泰子, 佐々木純子, 磯部充久, 石毛信之, 穴澤 昭, 安片恭子, 木下洋子, 山上祐次, 酒本和也, 田崎隆二, 小林弘典, 山口清次, 重松陽介: タンデムマス・スクリーニングの標準化に向けて-対象疾患スクリーニング指標標準化のための評価法-. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
 - 25) 小林弘典: 対象疾患ごとのスクリーニング指標とカットオフ値の設定. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
 - 26) 重松陽介, 畑 郁江, 伊藤順庸, 新井田要, 但馬 剛, 田崎隆二, 新宅治夫, 小林弘典, 大浦敏博: CPT-1欠損症のスクリーニング指

- 標の妥当性の検討. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
- 27) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, プレブスレン・ジャミヤン, 長谷川有紀, 山口清次: 新生児ろ紙血で後方視的に診断された長鎖脂肪酸代謝異常症による突然死症例: タンデムマスを行っていない地域での発生例. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
- 28) 長谷川有紀, 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, プレブスレン・ジャミヤン, 長谷川有紀, 山口清次: タンデムマス・スクリーニングの臨床的効果: 脂肪酸代謝異常症の発症後診断症例数の比較. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
- 29) 小林弘典: タンデムマス・スクリーニングの従来のスクリーニングと分離する事の利点・欠点. 第39回日本マス・スクリーニング学会. 東京, 2012年8月
- 30) 長谷川有紀, 山口清次: 最近増加している小児の脚気(ビタミンB1欠乏症). 第59回日本小児保健協会学術集会. 岡山, 2012年9月
- 31) 小林弘典, 高橋知男, 山田健治, 長谷川有紀, 山口清次: ピボキシル基を含む抗菌薬によりカルニチン欠乏症をきたした24例の臨床像. 第64回中国四国小児科学会. 徳島, 2012年11月
- 32) 山口清次: 質量分析を応用した有機酸・脂肪酸代謝異常の診断と病態解析に関する研究. 第37回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2012年10月
- 33) 山口清次: 新生児発症型グルタル酸血症2型に対するベザフィブラートの有効性の検討: In vitro probe acylcarnitine assayの結果との関連性. 第37回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2012年10月
- 34) 長谷川有紀, Jamiyan Purevsuren, 山田健治, 高橋知男, 小林弘典, 山口清次: GC/MSによる有機酸分析の実際. 第37回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2012年10月
- 35) 川名修一, 中川勝博, 宮川治彦, 長谷川有紀, 山口清次: 生体代謝物の分析におけるGC/MSの有効性の検討. 第37回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2012年10月
- 36) 山口清次: 脂肪酸 β 酸化異常に対する新しい治療とカルニチンプロフィール. 第54回日本先天代謝異常学会 セミナー. 岐阜, 2012年11月
- 37) 大倉絵梨, 長沼邦明, 中田節子, 萩元緑朗, 佐野葉子, 多田明良, 山口清次: 新生児期に診断され, 良好な経過を示している3-ヒドロキシ-3メチルグルタル酸血症の1例. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 38) 山田健治, 小林弘典, 高橋知男, 長谷川有紀, プレブスレン ジャミヤン, 古居みどり, 詫間 浩, 常深泰司, 玉岡 晃, 山口清次: 成人期に発症した「骨格筋型」グルタル酸尿症2型の2例. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 39) 花川純子, 室谷浩二, 佐藤武志, 朝倉由美, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 安達昌功: ベザフィブラート内服と中心静脈高濃度糖輸液が有効であった幼児期発症ミトコンドリア三頭酵素欠損症の1例. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 40) 八木麻理子, 楠 典子, 李 知子, 栗野宏之, 但馬 剛, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 竹島泰弘, 飯島一誠: ベザフィブラートにより骨格筋症状が改善した極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症の1例. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 41) 山本琢磨, 榎本祐子, 小林弘典, 梅原敬弘, 山口清次, 的場梁次, 池松和哉: Metabolic autopsy を用いた突然死症例の検討 ~脂肪酸代謝異常症の観点から~. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 42) Tomatsu S, Suzuki Y, Orii T, Yamaguchi S, Mackenzie W, Bober M, Montano AM: Newborn screening and biomarkers for mucopolysaccharidoses. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 43) Gupta D, Mahay SB, Saxena R, Kohli S, Puri RD, Verma J, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Deb R, Verma IC: Genotype-phenotype correlation in Indian patients with maple syrup urine disease. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 44) Mahay SB, Verma J, Sharma S, Movva S,

Saxena R, Kohli S, Ramacandran V, Kotecha U, Puri RD, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Verma IC: Clinical, biochemical and molecular characterisation of biotinidase deficiency in patients from indian subcontinent. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月

- 45) 井原健二, 芳野 信, 保科隆之, 原田なをみ, 石井加奈子, 長谷川有紀, 渡辺順子, 山口清次, 原 寿郎: Ornithine transcarbamylase (OTC) 欠損症に潜在する凝固異常. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 46) 大塚博樹, 深尾敏幸, 森本将敬, 折居建治, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: 新生児期発症で GA2 と診断され, 生後5ヶ月より BEZ 投与を開始した二絨毛膜二羊膜双胎例. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 47) 高橋知男, 山田健治, プレブスレンジャミヤン, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: アスピリンと β 酸化機能の関連性の検討 :in

vitro probe assay による評価. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月

- 48) 長谷川有紀, 小林弘典, 高橋知男, 山田健治, プレブスレン ジャミヤン, 山口清次: 小児のビタミン B1 欠乏症の臨床的検討: 尿中有機酸分析の診断的有用性. 第54回日本先天代謝異常学会. 岐阜, 2012年11月
- 49) 山口清次: 小児科領域におけるタンデムマスと GC/MS の臨床応用: 最近の進歩. 第59回日本臨床検査医学会学術集会 シンポジウム. 京都, 2012年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

タンデムマススクリーニングの対象疾患を含む有機酸・脂肪酸代謝異常症の自然歴

研究要旨

2010～2012年に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症例の疾患内訳と自然歴を検討し、今回発見された症例における特徴を明らかにし、さらにこれまでに集計された症例も含め発症時期や予後についても検討した。

診断症例は計96症例であった。アミノ酸・有機酸代謝異常（OAs）が77症例、脂肪酸代謝異常症（FAODs）が19症例であった。このうち新生児マススクリーニングなど未発症時での診断例が31症例（32%）を占めた。

- A) 疾患内訳：OAs 77症例では、これまでと同様にメチルマロン酸血症と尿素サイクル異常症の頻度が高く、この2疾患で40症例（52%）を占めた。プロピオン酸血症では、同胞スクリーニングも含め同一家系の2家系5人が軽症型と診断され、学童期までの経過追跡が可能であった。その他、グルタル酸尿症1型とホモシスチン尿症を伴うメチルマロン酸血症でも同胞スクリーニングで兄弟が初めて診断された例がそれぞれ1家系あった。同胞スクリーニングで診断された症例はいずれも無症状であり、発症は環境要因も大きいことが示唆された。FAODs 19症例では、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症が7人と最も多かった。未発症で発見された7例中6例が新生児マススクリーニングで発見された症例で、これらの児は現在までいずれも発達は正常であった。
- B) 予後：2001年～2012年の発症後診断例で予後が明らかでない196例を検討した。OAs は144症例あり、うち正常発達をしたのは28例（19%）で、後遺症を残した例が76例（53%）、死亡例が40例（28%）であった。一方FAODs 52症例での正常発達は25例（48%）であり、いずれもスクリーニング診断例の8-9割が正常発達をしているのに比べて予後不良であった。

従来の報告どおり、新生児期に発症する重症のOAs、FAODsではスクリーニングが間に合わないが、それ以降の発症例や軽症例についてはタンデムマスによる新生児マススクリーニングによって正常発達を助け、障害予防に非常に有用であることが示唆された。また昨年診断された3-ヒドロキシ-3-メチルグルタコン酸（HMG）尿症は、RSV感染を契機に強い低血糖発作から急性脳症を発症していた。感染を契機に代謝不全を発症する有機酸・脂肪酸代謝異常症は多く、患児へのRSV感染予防の必要性が示唆された。

研究協力者

長谷川（小村）有紀（島根大学小児科助教）
小林弘典（島根大学小児科助教）
山田健治（島根大学小児科大学院生）
高橋知男（島根大学小児科大学院生）
プレブスレンジャミヤン（島根大学小児科）
山口清次（島根大学小児科教授）

A. 研究目的

タンデムマスによる新生児マススクリーニングが拡大する中で、スクリーニング疾患の選択は疾患の重症度と治療との費用対効果の検討に必須である。さらにスクリーニング開始後の自然歴に変化があるかを調査する事は、実際に発症予防にスクリーニングが有効かを評価する上でも重要である。2010年から2012年に当科で診断した有機酸代謝異常症（OAs）と脂肪酸代謝異

常症 (FAODs) の症例について、疾患の内訳と発症時期を明らかにし、また2001年から2011年に診断した症例について、スクリーニング診断例と発症後診断症例の予後を比較検討した。

B. 研究方法

1) 2010年から2012年に診断された有機酸代謝異常症 (OAs) の疾患内訳と発症時期

2010年1月から2012年12月の間に当科で診断された症例について、疾患の内訳と、発症例における各疾患の発症時期について検討した。

2) 2010年から2012年に診断された脂肪酸代謝異常症 (FAODs) の疾患内訳と発症時期

OAsと同様に、疾患の内訳と各疾患の発症時期を検討した。

3) 2001年から2011年に、発症後に診断された症例の発症時期と予後

OAsとFAODsの発症後診断例について、その発症時期と予後を明らかにし、スクリーニング診断例と予後について比較検討した。

(倫理面への配慮)

島根大学は分析施設であり、分析依頼はすべて家族の同意の下に行われていると判断している。当施設で疾患を集計する際には、年齢や初発症状の検討を行う際に個人が特定できないよう、個人情報保護に十分に配慮した。

C. 研究結果

1) OAsの疾患内訳と発症時期 (図1、表1)

対象は77症例であった。疾患の内訳は、1) メチルマロン酸血症 (MMA) 22例 (29%)、2) 尿素サイクル異常症 (UCD) 18例 (23%)、3) プロピオン酸血症 (PA) 14例 (18%)、4) グルタル酸血症1型 (GA1) 4例 (5%)、5) メチルクロトニルグリシン (MCG) 尿症3例 (4%)、他、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 (MCD)・HMG尿症などがそれぞれ1例などであった。これらのうち新生児マススクリーニングなどによる未発症での診断例は24症例 (31%)であった。なおGA1の未発症例は臨床症状を認めないものの、診断時に頭囲拡大と画像上、Sylvius裂拡大を認めていた。

発症後診断例53症例の発症時期は新生児期発症が19症例 (36%)で、乳児期とあわせて1歳

までに発症した例は29例 (55%)であった。

2) FAODsの疾患内訳と発症時期 (図1、表1)

対象は19症例あった。疾患の内訳は1) 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症7例 (37%)で最も多く、引き続いて2) グルタル酸尿症2型 (GA2) が6例 (32%)、3) 中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症2例 (11%)、以下カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT)-1欠損症、CPT-2欠損症、全身性カルニチン欠乏症 (OCTN2)、三頭酵素欠損症 (TFP) がそれぞれ1例ずつであった。未発症例は7例で、うち6例は新生児マス・スクリーニングで診断されていた。

発症後診断例12症例の発症時期は新生児期発症が5例 (42%)、幼児期が3例 (25%)、学童期以降が4例 (33%)で、幼児期以降の発症が半数以上を占めていた。

3) 2001年から2011年に発症後に診断された症例の発症時期と予後 (図2、表2)

11年間に発見された発症後診断例279例について、発症時期を検討した。OAsは171症例で、うち新生児期発症が45%を占めたのに対し、FAODs 108例では新生児期発症は18%のみで、乳幼児期発症が60%と最も多かった。

また発症後診断例の予後は、経過が明らかでない196例について検討した。OAs 144例では28例 (19%)が正常発達をしていたが、76例 (53%)が何らかの後遺症を残し、40例 (28%)が死亡していた。一方FAODs 52例では25例 (48%)が正常発達であったが、後遺症を残した症例が13例 (25%)、死亡例が14例 (27%)あり、予後良好とは言えなかった。

D. 考察

今回の3年間の検討では、OAs、FAODsともに発症後診断症例における発症時期は新生児期の発症が最も多かった (表1、図1)。OAsでは2001-2011年の11年間の検討と同様であったが、FAODsの11年間の検討では新生児期発症は18%であり、乳幼児期以降の発症例が多いというパターンとは異なっていた。この3年間ではグルタル酸血症2型が多く診断され、中でも新生児期発症例が多かったためと考えられる。この3年間が特別かもしれないが、新生児期発症例は急激に状態が悪化することが多く、他にも診断に至らないまま死亡している症例がいる可能性を示している。

疾患名	新生児期		乳児期		幼児期		学童期～	
	出生時	1m	1y	1y	6y	6y		
有機酸・アミノ酸代謝異常								
尿素サイクル異常症(OTC欠損症等)	●●●●●		■	■	XXX XX	▲	XX	XXX
メチルマロン酸血症	●●●●●●●●●●	●	▲▲	X	■		◎◎	■◎
プロピオン酸血症	◎◎◎◎◎◎◎◎					◎	◎	
グルタル酸血症1型	◎		XX				◎	
MCC欠損症	◎◎◎							
その他	●MCD ●HMG ◎PKU		■Peroxisome		■4HIB		X IVA	
アルカプトン尿症								◎◎◎◎
MSUD	●●							
脂肪酸代謝異常								
VLCAD欠損症	◎◎					▲ ▲ ◎		▲ ▲
MCAD欠損症	◎◎							
グルタル酸血症2型	●●●●●●							▲
その他	◎CPT1 ◎TFP				X CPT2		▲OTCN2	

●: 新生児期急性発症 ▲: 間欠型・反復発作 X: 急性脳症・SIDS様
 ■: 発達遅滞 ○: その他 ◎: 未発症

図1. 2010～2012年に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症例の疾患と発症年齢

表1. 2010～2012年に診断された発症後診断例の初発時期

	新生児期	乳児期	幼児期	学童期以降
OA s (53例)	19例 (36%)	10 (19%)	12 (23%)	12 (23%)
FAOD s (12例)	5例 (42%)	0	3 (25%)	4 (33%)

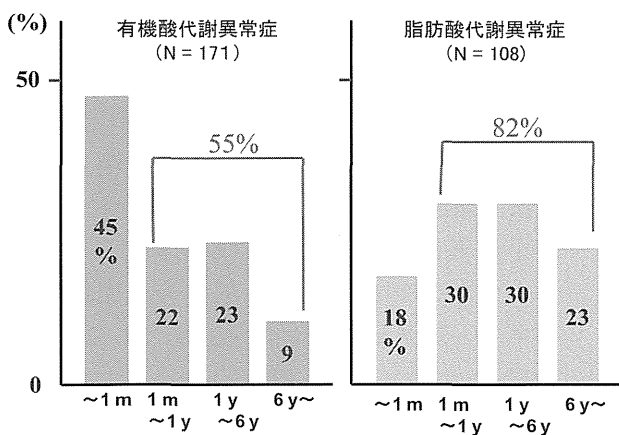


図2. 2001～2011年に診断された発症例全体の初発時期

また OAs では学童以降の診断例が23%を占めたが、これは UCD 症例が多かったことと、成人のアルカプトン尿症の診断例が多かったことが関係していた。

表2. スクリーニング診断例と発症後診断例の予後比較 (2001～2011年の診断例)

疾患	スクリーニング診断 (山口班: 重松先生)	発症後診断 (島根大学)
患者数	115	196
有機酸代謝異常症	70	144
正常発達	58 (83%)	28 (19%)
後遺症	12 (17)	76 (53)
死亡		40 (28)
脂肪酸代謝異常症	45	52
正常発達	40 (89%)	25 (48%)
後遺症	5 (11)	13 (25)
死亡		14 (27)

また、この3年間で同胞スクリーニングにより MMA 3例、PA 2例、GA1と VLCAD 欠損症でそれぞれ1例ずつ無症状例が発見された。PAの2例以外は同胞に何らかの症状がみられており、

同じ遺伝子変異であっても環境要因によって発症しない場合があり、同胞スクリーニングによって無症状時に診断されれば、以降の発症や障害予防に役立つと考えられた。

2001年から2011年までの11年間の予後については、発症後診断例では正常発達がOAsで19%、FAODsで48%であり、FAODsであっても必ずしも予後良好とはいえなかった。一方、同じ11年間のスクリーニング診断例では115例が診断され、OAsでは70例のうち58例(83%)が、FAODsでは45例のうち40例(89%)がそれぞれ正常発達を獲得しており(表2)、スクリーニングの予後改善効果が強く示唆された。

なお2011年度にHMG尿症が新生児期のタンデムマススクリーニングで診断された。本疾患はケトン体が産生されないために、感染時など経口摂取不良になると重度の低血糖を発症するが、本児には食事療法やカルニチン投与などが行われ、時に軽い低血糖発作はあるものの正常発達をしていた。しかし1歳6ヶ月時にRSV感染から代謝不全となり、急性脳症として低体温療法を行われた。患児の状態は徐々に改善しているが、これまでもRSV感染を契機に急激な意識障害を呈したグルタル酸尿症2型患児なども経験している。今後は死亡例についても、感染に関連した例がどの程度を占めるかなども検討すべき課題と考えられた。

E. 結論

タンデムマスによる新生児マススクリーニングは、有機酸・脂肪酸代謝異常症の患者の正常発達獲得に有用であることが強く示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S. : Clinical and molecular aspects of Japanese children

with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* 107: 237-40, 2012

- 2) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furuji M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S. : Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. *Mol Genet Metab.* 107: 87-91, 2012
- 3) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S. : Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem.* 405: 1345-51, 2012
- 4) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T. : Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: a previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131: e327-30, 2013
- 5) 山田健治, 虫本雄一, 高橋知男, 小林弘典, 長谷川有紀, 白田信光, 山口清次: 遊離カルニチンおよびアシルカルニチンの安定性の検討. *日本マス・スクリーニング学会誌* 22: 29-34, 2012
- 6) 小村(長谷川)有紀, 高橋知男, 佐野葉子, 中田節子, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, プレブスレンジャミヤン, 長沼邦明, 山口清次: 新生児期の軽微な代謝性アシドーシスを景気に診断された3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸(HMG)尿症の男児例. *日本マス・スクリーニング学会誌* 22: 250-54, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

乳幼児突然死症候群（SIDS）および乳幼児突発性危急事態（ALTE）様症状で 発症した先天代謝異常症の検討

研究要旨

新生児マススクリーニングで診断可能である先天代謝異常症の一部は、SIDS、ALTE 様の症状で発症することがある。2004年1月～2012年12月に当科で代謝解析を行った SIDS155例、ALTE152例のなかで、先天代謝異常症と診断した症例は SIDS で2例（中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ欠損症、CPT2欠損症）、ALTE で8例（メチルマロン酸血症4例、尿素サイクル異常症2例、グルタル酸尿症1型、TFP 欠損症1例）あった。また確定診断には至らなかったが、グルタル酸尿症2型や極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症、先天性カルニチン欠乏症などの先天代謝異常症が疑われた症例が少なくとも10例あった。タンデムマスの導入により新生児のマススクリーニングの対象疾患は20種類以上になる。新生児期の発症してない時期に発見して治療介入によって乳幼児の突然死、あるいは神経後遺症を予防できる可能性があり、タンデムマスのさらなる普及が期待される。

研究協力者

高橋知男、山田健治、小林弘典、
長谷川有紀、山口清次
（島根大学医学部小児科）

A. 研究目的

新生児マススクリーニング（MS）で診断可能である先天代謝異常症の一部は、安定している時には正常と変わらぬ生活をしながら、感染などのストレスを契機に、乳幼児突然死症候群（SIDS）または乳幼児突発性危急事態（ALTE）様の症状で発症することがある。先天代謝異常症の代表的な疾患として、有機酸代謝異常、脂肪酸代謝異常、アミノ酸代謝異常、糖新生系異常などがあり、主な病態は低血糖や毒性物質の急激な上昇による急性代謝不全と言われている。これらは、発症前に診断できれば、予防できる可能性がある。

SIDS、ALTE と背景疾患としての先天代謝異常症との関連性を明らかにするため、島根大学小児科に代謝検査を依頼され先天代謝異常と判明した症例について、臨床的特徴と、代謝プロフィールを検討した。

B. 研究方法

2004年1月～2012年12月に代謝解析を依頼された症例のうち、①生後7日以降～3歳未満の症例、②SIDS、ALTE が分析依頼理由であった症例、または病歴から当科でSIDS、ALTE とみなした症例を検討した。生後7日未満の早期新生児期の症例は、周産期の障害などが関与している可能性もあるため除外した。検索は、GC/MSによる尿中有機酸分析、MS/MSによるアシルカルニチン分析を行った。

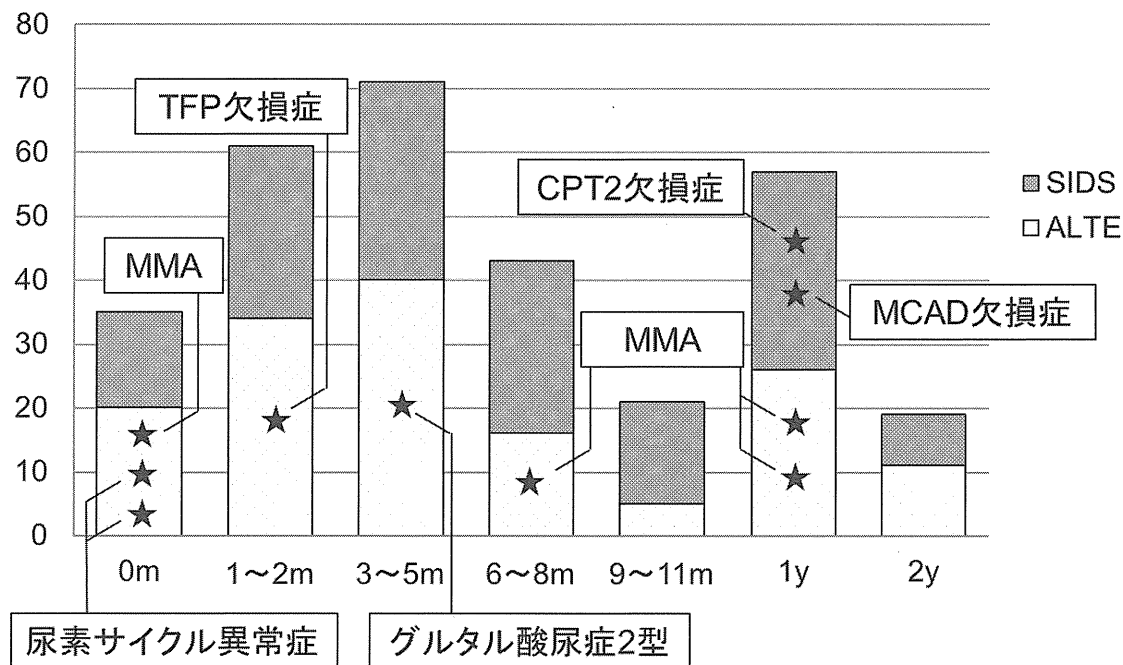
C. 研究結果

該当する症例は307例あり、SIDSは155例、ALTEは152例あった（図1）。その中で、先天代謝異常症と診断した症例はSIDSで2例（中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ欠損症、CPT2欠損症）、ALTEで8例（メチルマロン酸血症4例、尿素サイクル異常症2例、グルタル酸尿症1型、TFP 欠損症1例）あった（表1）。また、新生児期の既往に異常があった症例が6例あり（チアノーゼ、低血糖、哺乳不良）、代謝の不安定な時期に症状が出現したと考えられた。

検査所見は、アシドーシスが7例（pH 6.9～7.3）、ケトン体（尿、血中）陽性が4例、高アン

SIDS: 155例、ALTE152例

2004年1月～2012年12月



MMA;メチルマロン血症

図1. SIDS, ALTE 患者の年齢別内訳

モニア血症が8例 (147 ~ 2006 $\mu\text{g/dl}$)、肝機能異常が8例 (AST 52 ~ 353 IU/l、ALT 43 ~ 178 IU/l)、高CK血症が8例 (203 ~ 8077 IU/l)、低血糖が2例 (30 mg/dl、検出不能) あった (表1)。

D. 考察

1982年に SIDS やライ症候群に類似した症状で発症する症例の中から、ミトコンドリア β 酸化異常症である中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症が発見され、これを機に SIDS の一部には先天代謝異常症、特に脂肪酸代謝異常症などが潜在している可能性があるとして、社会的に注目されるようになった。

1998年の Boles らの報告によると、生前に「狭義の SIDS」と診断された313症例の後方視的検討結果から、14例 (4.4%) に脂肪酸代謝異常が同定された。さらに感染などを契機に突然死した症例では、約20%に脂肪酸代謝異常症が発見されたと報告している。また Donald らは、小児の原因不明の死亡症例7,058例から、タンデムマスによって66例に代謝異常症を発見しており、Lundemose らは0 ~ 4歳の突然死亡例の線維芽細胞の検索によって、79例中3例の β 酸化異常症を確認したと述べている。脂肪酸代謝異常症以

外の先天代謝異常症の可能性も考えると、SIDS 症例の中に先天代謝異常例は5 ~ 10%はあると考えられている。

一般検査の結果は、有機酸代謝異常における有機酸濃度の上昇のために、アニオンギャップ高値のアシドーシスや、脂肪酸代謝異常症の β 酸化に依存性の高い臓器、すなわち骨格筋や心筋、肝臓などの異常を反映したものと考えられた。また一部の検査は実施されておらず、全症例に対する検査の異常の割合は明らかでなかった。

検討した10例以外にも、試料不足などのために確定診断には至らなかったが、尿中有機酸分析とアシルカルニチン分析の結果から先天代謝異常症が疑われた症例が少なくとも10例あった。すなわち、グルタル酸尿症2型や極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症などである (表2)。

今回検討した先天代謝異常症10症例について、マススクリーニングにより、メチルマロン酸は C3、C3/C2 比が、シトルリン血症は Cit の上昇が、また TFP 欠損症は長鎖アシルカルニチン (特に C16:1-OH、C18:1-OH、C18-OH) の上昇が確認できており、新生児マススクリーニングが行われていれば、これらの症例は発症を予防できて

表1. SIDS または ALTE を主訴に検査されて代謝異常の発見された症例 (2004 ~ 2012 年)

	年齢	性別	臨床診断	病名	ケトン	pH	血糖	NH3	AST	ALT	CK
1	7d	女	ALTE	MMA	(-)	7.3	143	674	65	53	245
2	8d	女	ALTE	尿素回路異常症	?	7.0	nl	155	156	107	871
3	8d	女	ALTE	尿素回路異常症	(+)	nl	78	1035	36	16	284
4	1m	男	ALTE	TFP 欠損症	?	?	71	?	153	71	8077
5	4m	女	ALTE	グルタル酸血症 2 型	?	acidosis	79	2006	55	33	308
6	8m	男	SIDS	MMA	(+)	7.1	63	?	nl	nl	1084
7	1y0d	女	ALTE	CPT2 欠損症	?	7.37	98	147	353	178	203
8	1y8m	女	SIDS	MMA	(+)	7.2	30	162	40	43	560
9	1y8m	男	ALTE	MCAD 欠損症	?	7.2	UD	1640	80	40	107
10	1y10m	男	ALTE	MMA	(+)	6.9	88	188	52	17	100

※略字：MMA=メチルマロン酸血症；TFP=ミトコンドリア三頭酵素；CPT2=カルニチンパルニトイル基転移酵素 II；MCAD=中鎖アシル-CoA 脱水素酵素；nl=normal

表2. 確定診断に至らなかったが、先天代謝異常症が疑われた10症例

症例	年齢	性別	臨床診断	診断方法		疑い病名	代謝検査
				GC/MS	MS/MS		
1	14日	女	ALTE	○	○	GA2	短鎖～中鎖AC ↑
2	16日	男	ALTE	—	○	VLCAD欠損症, GA2	長鎖AC ↑
3	27日	男	ALTE	○	○	カルニチン欠乏症	C0 6.8
4	1か月	男	SIDS	—	○	カルニチン欠乏症	C0 13.97
5	1か月	男	ALTE	○	○	GA2	中鎖～長鎖AC ↑
6	4か月	女	ALTE	—	○	カルニチン欠乏症	C0 17.27
7	5か月	男	ALTE	—	○	GA2	中鎖～長鎖AC ↑
8	5か月	男	ALTE	○	○	VLCAD	長鎖AC ↑
9	1歳2か月	男	ALTE	—	○	GA2	短鎖～長鎖AC ↑
10	1歳4か月	男	ALTE	—	○	GA2	短鎖～長鎖AC ↑

GA2=グルタル酸尿症2型

AC=アシルカルニチン

VLCAD=極長鎖アシル-CoA脱水素酵素

いたかもしれない。

今回、先天代謝異常症が発見された症例は、発症前に診断されていれば、早期介入によって発症予防が可能であったかもしれない。近年タンデムマス法による新生児マススクリーニングが普及しつつあるが、一部地域では未だ実施されていない。先天代謝異常の発症前診断が可能になれば、SIDS、ALTE の発症予防に貢献できると考えられ、更なる普及が望まれる。

タンデムマスを導入した新生児 MS で対象疾患は20種類以上に拡大する。新生児期の発症していない時期に発見して治療介入によって乳幼児の突然死、あるいは神経後遺症を予防できる可能性がある。タンデムマスのさらなる普及が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 高橋知男, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE 様症状を契機に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の6例の検討. 第18回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会. 東京都, 2012年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

分担研究課題：効率的な体制、臨床的効果に関する研究

アシルカルニチン測定値に影響を与える外的因子

研究要旨

タンデムマス分析の検体として血液ろ紙や血清などが用いられるが、アシルカルニチン（AC）測定値は種々の影響を受ける。温度などの保存環境や溶血による影響を検討した。保存環境の影響については検体を冷凍（-30℃）、冷蔵（4℃）、室温（21℃）で保存して、ACおよび遊離カルニチン（C0）測定値の経時的変化を調べた。その結果、血清溶液中のACは冷凍、冷蔵であれば28日間は影響がなかったが、常温では、1週間で短鎖～長鎖ACが80%以下に低下した。常温保存28日後には各AC値は50%前後まで低下し、C0値は120%以上に上昇した。常温で放置された液性検体は1週間程度で測定値に影響が出るため、長鎖脂肪酸代謝異常症やカルニチン欠乏症などを見逃す恐れがある。一方、採血後の血液を常温で12時間以上放置した後に遠心して得た血清では、溶血のためC16やC18などの長鎖ACが上昇することが分かった。過度の溶血はAC測定値に影響するが、一般的な「絞り採血」程度であれば問題がないと考えられる。

研究協力者

山田健治、小林弘典、長谷川有紀、山口清次
（島根大学小児科）

A. 研究目的

タンデムマス法による新生児マススクリーニングでは検体として血液ろ紙が用いられるが、精査段階になると血清や尿などの液性検体を用いることがある。しかし検体の保存状態などは一定とは限らず、アシルカルニチン（AC）測定値は種々の影響を受けている可能性がある。

Fingerhutらは2009年に常温保存された、ろ紙血中のAC値の安定性について報告したが、血清などの液性検体への影響については報告がない。また、溶血なども測定値に影響すると推測されるが、その詳細は不明である。そこで我々は保管温度や期間、溶血などのAC測定値に影響する外的因子について検討した。

B. 研究方法

1) 血清溶液による検体保管温度の検討

健康者の血清に、AC（C2、C4、C6、C8、C10、C12、C14、C16、C18）を5μMずつ添加し、冷凍（-30℃）、冷蔵（4℃）、常温（21℃）にお

ける28日間のAC測定値の推移と変動幅を調べた。

2) 遠心分離せずに放置した検体の検討

健康者から採血した後に、遠心せずに常温および冷蔵で放置。0、2、4、8、12、16、24、36、48、72、96時間後に遠心分離し、その血清をアシルカルニチン分析した。

3) 機械的刺激による溶血の検討

健康者から通常の手技で採血した検体と、過度に駆血・圧迫した「絞り採血」による溶血検体、血液採取後にボルテックスミキサーや超音波破碎機を用いて溶血した検体のAC測定値を比較した。

C. 研究結果

1) 血清溶液による検体保管温度の検討

28日間の冷凍および冷凍保存では、C0およびAC値の変動幅は概ね±20%以内であった。一方で常温保存では、7日目からC2以外の短鎖～長鎖までの多くのAC値が保存前の値の80%以下となり、28日目には20-60%程度まで低下した。C0値は28日目に120%以上に上昇した（図1）。

2) 遠心分離せずに放置した検体の検討

遠心分離せずに放置した血液は、常温であつ

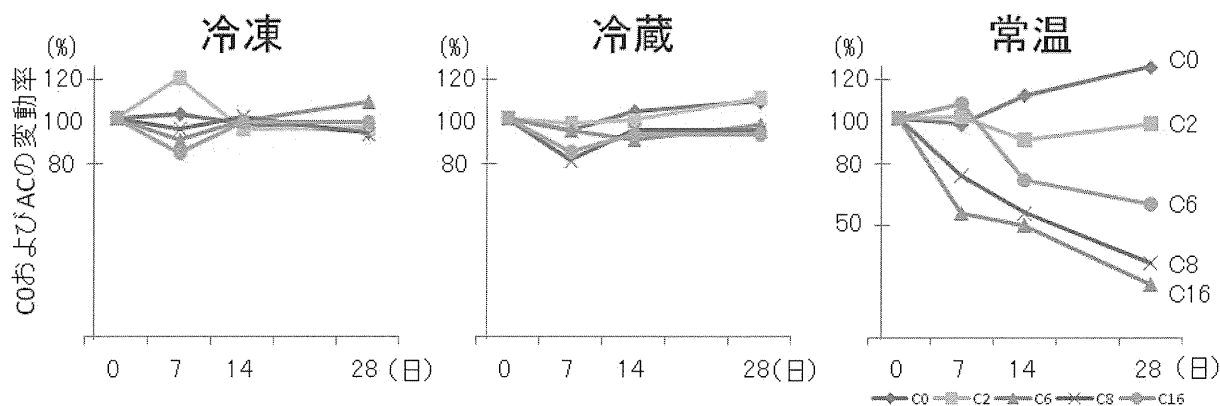


図1. 遊離カルニチンおよびアシルカルニチン（血清溶液中）の安定性

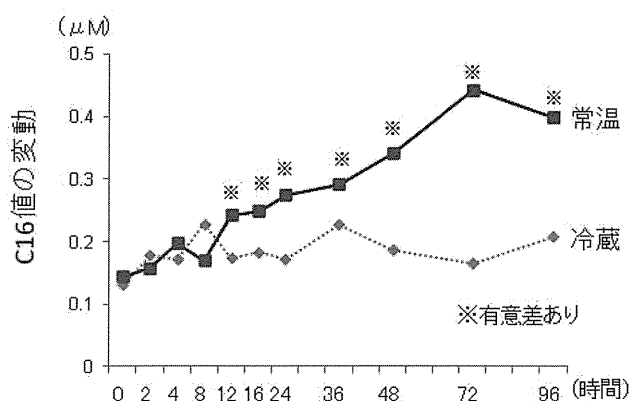


図2. 遠心分離せずに放置した時のC16値の推移

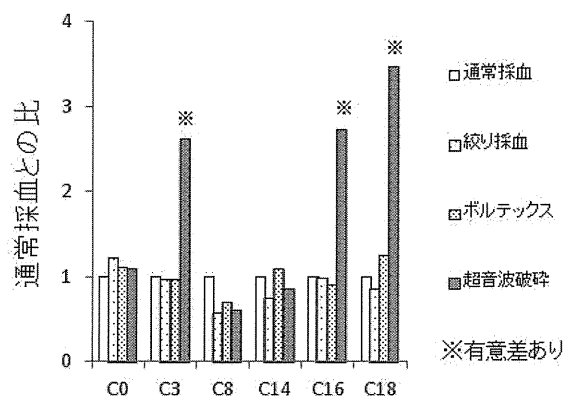


図3. 機械的刺激による溶血の影響

でも冷蔵であっても肉眼的に溶血し、血清は赤色に変化していた。しかし、冷蔵で放置した場合には96時間以内ならばAC測定値に明らかな影響を与えなかった。一方、96時間の常温放置された検体では短鎖（C2、C3）および長鎖（C16、C18、C18: 1）AC値は有意に上昇した。特に長鎖ACは早期（12時間以降）から有意に上昇した（図2）。

3) 機械的刺激による溶血の検討

絞り採血、ボルテックスミキサー、超音波破碎によって、いずれも血清は赤色に変化し、肉眼的に溶血が認められた。特にボルテックスミキサーと超音波破碎による溶血は非常に強かった。しかし、超音波破碎による溶血検体でのみ、長鎖AC（C16、C18）およびC3が有意に上昇し、絞り採血およびボルテックスミキサーによる溶血では、AC測定値に影響はなかった（図3）。

D. 考察

我々の研究で、血清、尿などの液性検体中のACは、ろ紙血よりも不安定であることが分かった。Fingerfutらは、常温保存されたろ紙血は14

日後から測定値に影響が出るという報告をしたが、血清は1週間の常温保存でAC値が低下し、C0が上昇傾向となった。一方で、冷凍、冷蔵保存であれば、少なくとも1ヶ月間は血清中のC0、AC値は変動しなかった。しかし、AC測定値は温度だけでなく、湿度やpHの影響を受けることも分かっており、保存環境の影響を最小限とするためには、密閉して冷凍保存することが重要である。

また、溶血は血清中の長鎖AC値に影響することが分かった。恐らく、溶血（細胞破壊）によって細胞内の長鎖ACが血清中に放散されたものと考えられる。遠心分離せずに常温で12時間以上放置した血液は、AC測定値に影響があるため、採血後は速やかに遠心分離すべきである。また、溶血した検体では長鎖脂肪酸代謝異常症の偽陽性に注意しなければならない。しかし、絞り採血による溶血程度であれば、ACは測定値に影響はない。

保存温度や期間、溶血などの外的因子は複雑に関連しながら血清AC測定値に影響していると考えられる。これは、遠心分離せずに放置し

た血液は、保管温度に関係なく溶血していたが、冷蔵保存の場合にはAC値への影響は少なかったことから推測される。また、ボルテックスミキサーによる溶血は肉眼的には強いものの、AC測定値には影響がなかった。この理由として赤血球の破壊よりも白血球や血小板の破壊のほうがAC測定値に影響している可能性もある。

E. 結 論

液性検体中のAC値は保存環境や溶血など様々な影響を受ける。適切に採取され、適切に保存された検体による分析を心がけることが最も重要である。検体の再採取が難しく、適切な検体がない場合には、種々の影響因子を考慮して、分析結果を理解する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山田健治ら, 遊離カルニチンおよびアシルカルニチンの安定性の検討. 日本マス・スクリーニング学会誌, 2012, 22 (1); p29-34

2. 学会発表

- 1) 山田健治, 小林弘典, Jamiyan Purevsuren, 高橋知男, 長谷川有紀, 山口清次. 血清中アシルカルニチン値の溶血の影響. 第39回日本マス・スクリーニング学会学術集会, 東京, 平成24年8月24日～25日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究課題：効率的な体制，臨床的效果に関する研究

確定診断技術の向上（GC/MS、酵素診断、遺伝子診断）
CPT2, CACT 欠損症のための MLPA 法の確立に関する研究

研究要旨

遺伝子診断体制を構築するにあたり、正確な遺伝子診断は重要な課題である。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、カルニチンアシルカルニチントランスフェラーゼ(CACT)欠損症は、新生児タンデムマススクリーニングにおいては見逃す可能性もあることから2次対象疾患となっているが、早期診断して重篤な低血糖発作をきたさないようにすることが重要である。これらの2疾患は臨床的には区別できない。本邦のCPT2欠損症における遺伝子変異解析の報告において、一方の変異アレルが同定されていない例が多いため、遺伝子内欠失の可能性が示唆され、今回臨床的に区別がつかないCPT2およびCACT欠損症の同時解析のためのMLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)プローブを独自に設計しMLPA法を確立した。

研究協力者

深尾敏幸（岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科／大学院医学系研究科小児病態学 教授）

青山友佳（岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科大学院生／岐阜医療科学大学保健学部 助教）

A. 研究目的

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法は、各エクソンのコピー数を調べて、遺伝子内の欠失というタイプの異常を検出できる方法である。CPT2欠損症、CACT欠損症は、タンデムマスによる新生児スクリーニングにおいては、見逃す可能性もあることから2次対象疾患にあげられているが、今後1次対象疾患にすべきという意見もある疾患である。その遺伝子診断の精度をより高めるためにMLPA法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

フリーソフトウェアでMLPAの最適なプローブをデザインするためのMLPA probe designというソフトを用いてCPT2遺伝子の5エクソン、CACT遺伝子の9エクソンおのおのにプローブを

設計し、独自のCPT2、CACT遺伝子MLPA法を作成した。

C. 研究結果

今回作成したMLPA法は、CPT2およびCACT遺伝子の各エクソンに1つずつプローブをおいた設計になっており、一部エクソンにて反応不良が認められて、プローブの再設計を行ったが、最終的には良好なMPLA法が確立できた。2009年に堀らの報告したCPT2欠損症例は、一方のアレルの変異が不明であったため。本MLPA法を行ってみたが、各エクソンの欠失は認められず。現在再度遺伝子変異の確認を行っている。

D. 考察と結論

CPT2欠損症、CACT欠損症は、新生児タンデムマススクリーニングにて2次対象疾患であり、その乳幼児期発症型を新生児期にスクリーニングして、ライ様症候群などの急性発作を防ぐことは非常に重要である。これら2疾患は臨床的、生化学的に区別がつかず、最終的には酵素診断、遺伝子診断での確定診断が必要である。また残存活性がある変異であるかどうかは、これらの疾患において程度 phenotype/genotype 相関があると考えられており、治療方針決定にも重要と考

えられている。今回その2疾患の遺伝子解析の精度をあげる MLPA 法の確立を行えたので、今後の2疾患の遺伝子診断に貢献できると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukao T, Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, Yamaguchi S, Kondo N. Three Japanese patients with beta- ketothiolase deficiency whoshare a mutation , c.431A>C (H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. JIMD reports 3: 107-115, 2012
 - 2) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S. Clinical and Molecular Aspects of Japanese Children with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. Mol Genet Metab 107 (1-2): 237-40, 2012
 - 3) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Taketani T, Fukao T, Fukuda S: Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorder: evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. Mol Genet Metab 107: 87-91, 2012
 - 4) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda, Yamaguchi S: Intracellular in vitro acylcarnitine cylvcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. Anal Bioanal Chem in press
 - 5) Hori T, Fukao T, Murase K, Sakaguchi N, Harding CO, Kondo N. Molecular basis of two exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in OXCT1 gene. Study on intermediates of OXCT1 transcripts in fibroblasts. Hum Mutat in press
- ### 6) 学会発表
- 1) 深尾敏幸：脂肪酸代謝異常症，ケトン体代謝異常症の最近の進歩. 日児誌 116: 1801-1812, 2012
 - 2) 大塚博樹, 深尾敏幸, 森本将敬, 折居建治, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実：新生児期にGA2と診断され，生後5か月よりBEZ投与を開始した二絨毛膜二羊膜双胎例. 第54回日本先天代謝異常学会総会. 岐阜, 2012年11月15日 -17日

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし