

分担研究課題

新技術を応用した有機酸血症治療法の開発

研究分担者 宮崎 徹（東京大学大学院医学系研究科教授）

研究要旨

小児の先天性代謝疾患であるプロピオン酸血症 Propionic Acidemia: 以下 PA) は、Propionyl-CoA carboxylase (PCC) が欠損もしくは機能が低下する劣性遺伝病である。特定のアミノ酸・脂肪酸の代謝不全により中間代謝産物が蓄積するため、出生後ミルク摂取によりケトアシドーシスを呈し最悪の場合死に至る。PA の治療法はカルニチンを併用した栄養制限療法が主であるが、低栄養による様々な副作用の併発などにより予後は必ずしも良くない。最近肝移植が一定の効果をあげているが、長期的予後の判定は今後の課題であり、患者にとり侵襲は小さくない。従って、新たな根治的治療法の開発が望まれる。私たちは PCC・鎖 (PCCA) 遺伝子をノックアウトすることにより、PA モデルマウスを確立した。さらに、このマウスの肝臓に正常の 10-15% の PCC 酵素活性を戻すことにより症状が著しく改善することを証明した。この成果をもとに本申請研究では、非ウイルス性のナノ・ミセルを用い、患者胎児の肝臓に PCC 遺伝子をデリバリーする胎児治療法を提案し、その効果と安全性についてモデルマウスを用い実証する。そのために、3 年間で以下の研究項目について研究する：(1) 胎児治療による酵素補填の効率、(2) ナノ・ミセルにより補填した酵素遺伝子の発現持続性の検討、(3) 生存率の改善効果の検討・判定。

A. 研究目的

プロピオン酸血症 (Propionic Acidemia: 以下 PA) の治療法は栄養制限療法が主であるが低栄養による副作用により予後は良くない。また肝移植については長期的予後が不明であり患者への侵襲も大きい。新たな根治的治療法の開発は、患者並びに患者家族によって切望されている。ここでは、PA に対し、ナノ・ミセルを用い、患者胎児の肝臓に欠損している PCC 遺伝子を補填する胎児治療法を提案し、その効果についてモデルマウスで実証することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) ナノ・ミセル型遺伝子ベクター作製・最適化
 遺伝子発現プラスミド DNA をポリエチレングリコールの外殻で被ったものがナノ・ミセルベクターの基本形である (図 1 参照)。DNA とポリエチレ

ングリコールの量比、コンドロイチン硫酸 (細胞取り込み効率を上昇すると言われている) の必要性、他の親水性外殻の使用の検討など本使用目的への最適化を行う。

2) GFP 発現ベクターを用いた胎児肝臓での発現に関する予備実験

妊娠メスマウスを麻酔下で腹側より子宮を露

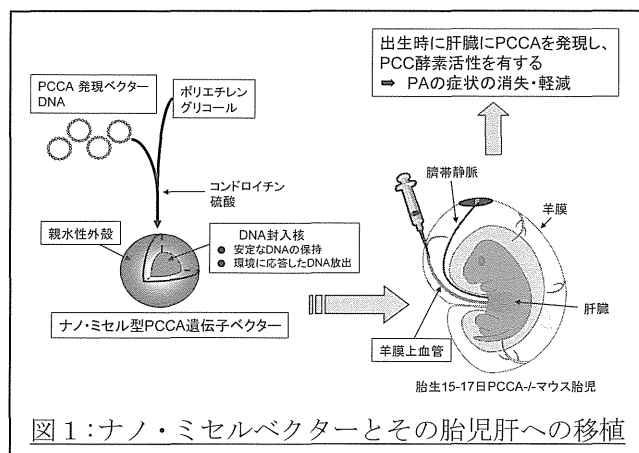
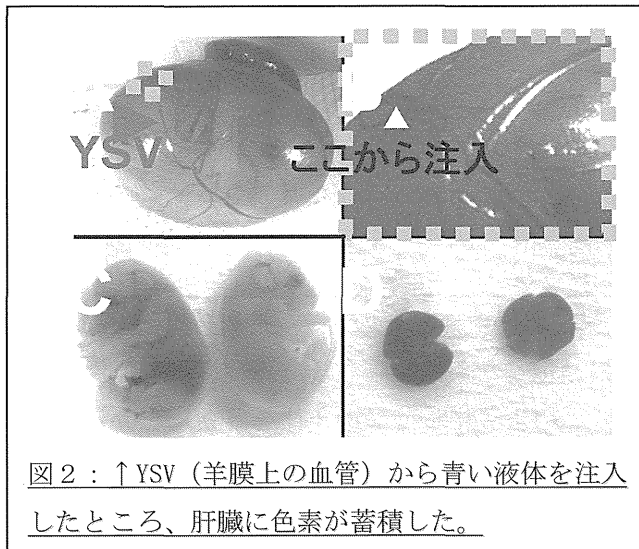


図 1: ナノ・ミセルベクターとその胎児肝への移植

出し子宮壁を一部切開する。羊膜上血管 (Yolk-sac vessel: 図 2) を確認後、GFP 発現ベクター-DNA を封入したナノ・ミセルベクターを注入する。注入後肝臓での GFP 発現を組織学的に解析する。結果をもとに、低毒性で、出生時に十分な発現があり、多くの肝細胞で長期間にわたり発現する条件を決定し、プロトコルを最適化する。

3) PCC^{-/-}マウスの胎児治療法確立

上記 GFP を用いた予備実験によって、最適化された条件により、PCC^{-/-}マウス胎児に PCC 発現ベクターを封入したナノ・ミセルを導入し、PA の治



療効果を判定する。

▶ 発現解析: 出生後 24 時間毎に、導入した PCC の発現を肝臓の免疫染色、RT-PCR によって解析する。また、肝臓における PCC 酵素活性を測定する。

以上の解析結果から、PA 胎児治療の最適プロトコルを確立する。

(倫理面への配慮) 組換え DNA 実験に対しては、東京大学「医学部組換え DNA 実験安全委員会」において、承認がおりている。動物実験に際しては、学内動物実験審査委員会において承認されている。また、実験動物に与える苦痛を最小限にするなど、動物愛護上の配慮等を十分に行う。

C. 研究結果

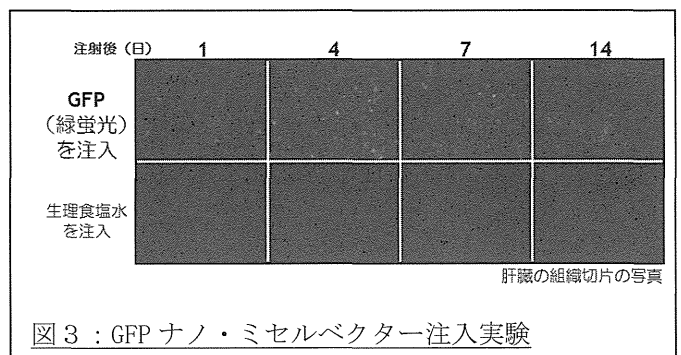
1) 胎児肝臓へのナノ・ミセルデリバリー効率・導入した遺伝子の発現持続性上昇の検討: 22 年度に、DNA とポリエチレングリコールの量比、コンドロイチン硫酸の濃度等の検討により、

ナノ・ミセルベクターの条件検討を行い、PCC^{-/-}マウス胎児治療のための最適化ベクターの条件を見出した。23 年度はさらに、GFP 発現 DNA を包埋したナノ・ミセルベクターの、羊膜上血管からの注入する量を、10 μ l~300 μ l (DNA 濃度に換算して 1mg/ml に固定してある) で検討し、肝臓における GFP の発現で検討した。また、注入速度については 100 μ l/分~1ml/分で検討した。その結果、量は 100~150 μ l、速度は 150~200 μ l/分が、デリバリー効率と導入した遺伝子の発現持続性への効果と、およびレシピエント胎児に対するダメージの少なさの面で、最適であることが確認された。

2) PCC^{-/-}胎児への PCC 遺伝子デリバリーの施行・効果の検討:

22~23 年度前半に GFP 発現ベクターを用いた胎児肝臓での発現に関する予備実験を行った。GFP ナノ・ミセルベクターを E17 マウス胎児に羊膜上血管より注入した。注入後肝臓での GFP 発現を組織学的に解析した結果、この方法ではほぼ肝臓特異的にナノ・ミセルベクターを取り込ませる事ができ、さらに GFP の発現は出生後 2 週間以上維持されることを確認した (図 3)。

PCC^{-/-}マウスコロニーの拡大による recipient の確保した後、平成 24 年度は、以上の予備実験をもとに、さらに条件検討を加えながら、PCC ナノ・ミセルベクター (CAGGS-PCCA ベクターをナノ・ミセルに包埋したもの) を、PCC^{+/+}オスと交配した PCC^{+/+}メス子宮中の E17 マウス胎児に、羊膜上血管より注入し、移入 PCCA 遺伝子の発現、PCC 活性の補填度、さらに PCC^{-/-}新生仔の生存について詳細に検討した。昨年度 (23 年度) も一部試みたが、本年度はさらに実施例を増やし、発現と生存時間について詳細な解析を行った。ナノ・ミセルベクター移入後、



メスマウスの腹壁を縫合し、E19.5 まで飼育したのち、帝王切開法にて胎児を摘出し、仮親に飼

育させた。確率上、1/4 の割合で新生児中に PCC^{-/-}が存在するはずである。

通常 PCC^{-/-}マウスは出生後 36 時間以内に重度のケトアシドーシスを発症し死亡する。ナノ・ミセルベクターを移入された PCC^{-/-}新生仔は 72 時間程度生存したものが 5 匹、96 時間程度生存したものが 6 匹、120 時間程度生存したものが 3 匹認められた。それぞれのマウスの肝臓における PCC (PCC α 鎖 : PCCA) 遺伝子の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR にて解析した。生後 5 日目の野生型マウス (WT) の肝臓における発現を 100% として換算したものを図 4 に示す。96 時間生存群と 120 時間生存群における PCCA mRNA 発現レベルは KO (PCCA の発現欠損) マウスに比べて有意な増加 ($p < 0.05$) を示す。以前我々は肝臓特異的に PCCA 遺伝子を野生型の 20% 程度発現させたトランスジェニックマウスで PCC^{-/-}マウスの病態を、生存も含め完全にレスキューしている。この 20% が疾患レスキューのクリティカルライン (C. P.) となると考えられるが、今回ナノ・ミセルを移入した PCC^{-/-}マウスではいずれもこのラインに達しなかった。しかし、10~20% の発現によって明らかに生存時間は延長している。

D. 考察

22 年度の研究結果から、(1) 羊膜上血管よりナノ・ミセルを注入すると、効率よく胎児肝臓に集積させることができること、(2) 注入後 1 日で、すでにナノ・ミセルで包埋したベクターからのタンパク質発現が起こること。すなわち、出生前遅くとも一日前に注入処置を行えば治療目的に使用可能であること、(3) ナノ・ミセル由来のタンパク質発現は、本来のナノ・ミセルベクターの特徴である“徐放性”を反映し、長期に渡って認められること、(4) ナノ・ミセル注入による副作用 (胎児の死亡や肝臓障害、母体への影響など) は現在のところ認められないこと、が明らかになり、PCC 発現ベクター DNA を包埋したナノ・ミセルは PA 治療に応用可能であることが示唆された。それに基づき、23 年度に、その移入法に関して条件検討を行い、胎児肝臓へのナノ・ミセルデリバリー効率と導入した遺伝子の発現持続性、

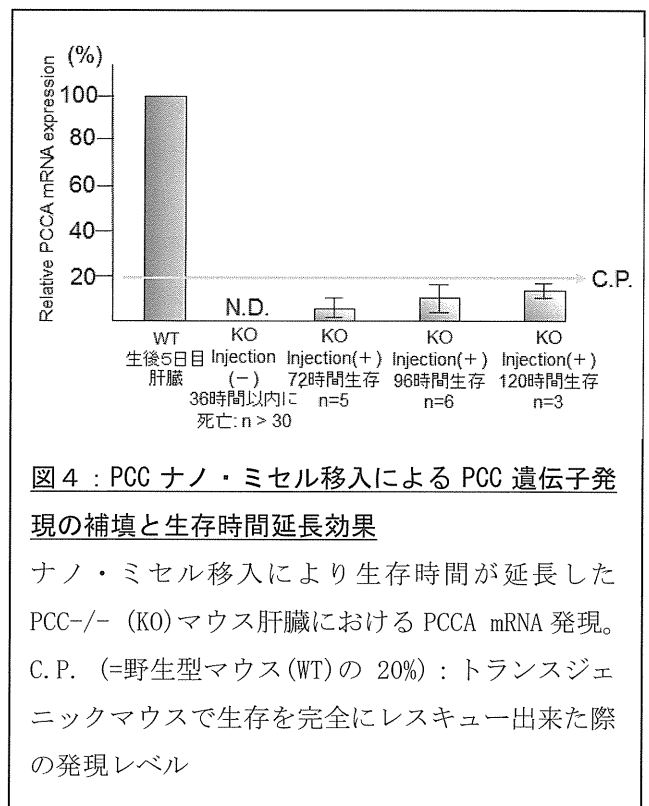


図 4 : PCC ナノ・ミセル移入による PCC 遺伝子発現の補填と生存時間延長効果

ナノ・ミセル移入により生存時間が延長した PCC^{-/-} (KO) マウス肝臓における PCCA mRNA 発現。C. P. (=野生型マウス (WT) の 20%) : トランスジェニックマウスで生存を完全にレスキュー出来た際の発現レベル

それに加え胎児へのダメージを最小限に止める最適化した条件を確立した。

このようにして最適条件を確立したナノ・ミセルベクターの作製法・移入法を用い、24 年度に PCC^{-/-}の胎児で PCC 酵素活性の補填を試みた。移入が成功し、肝臓での PCC 発現補填が行われた PCC^{-/-}マウスでは、いずれも、疾患レスキューラインとなる、正常の内臓酵素活性の 20% という目標には届かなかった。しかし、通常生後 36 時間以内にケトアシドーシスによって全例死亡する PCC^{-/-}マウスが、ナノ・ミセル移入によって最長 120 時間程度まで生存することを確認した。今後その補填効率を上昇させる必要がある。現在、(1) 現在の E17 より早期、まだ肝細胞の増殖が強い時期に注入し、ナノ・ミセルの取り込み率を向上できないか、(2) α 鎖だけでなく β 鎖の発現ベクターも同時に移入して酵素活性を向上できないか、(3) 発現ベクターのプロモーターを変更する必要はないか、(4) 新生児期に全身性に静注し発現にブーストをかけられないか、などについて順次検討を行っている。今後これらを検討し、補填する酵素活性を向上させ、PA の胎児治療の完成を目指したい。

E. 結論

ナノ・ミセルを用いた、胎児肝臓に対する遺伝子デリバリーの条件検討を中心に基礎的な予備実験によって移入条件の最適化を行い、PA のモデルマウスに対して胎児治療を試みた。残念ながら致死率改善までは到達できなかったが、PCC 酵素活性の補填と生存時間延長に成功することが出来た。今後さらに検討を重ね、補填効率を高め、

PA の胎児治療法完成を目指したい。

F. 研究発表

(巻末に別掲載)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究課題

検査体制、精度管理体制の質的向上に関する研究
—検査前・検査時・検査後の体制整備とその標準化の必要性—

研究分担者 原田正平（独立行政法人国立成育医療研究センター研究所室長）

研究要旨

現行 6 疾患の新生児マススクリーニング外部精度管理に加え、タンデムマス・スクリーニング（TMS）の外部精度管理を十分な水準を担保して導入するため、検査前・検査時・検査後の検査体制、精度管理体制それぞれの現状と改善すべき点を検討した結果、新しい精度管理体制のためには次のような改善、整備、最終的には地域格差を最小とするための標準化が必要であると考えられた。検査前の体制としては、検査後ろ紙血の長期保存を前提とした新しい採血用ろ紙の導入、標準的足底採血手順の普及啓発、検査中ではブランドサンプル導入など現行外部精度管理の強化、検査施設への適切な指導、TMS用外部精度管理検体の改善、実証実験、検査中、後を含めた専用コンピュータネットワーク体制の確立、地域の連絡協議会やコンサルタント医師の確保などであった。

研究協力者

河地 豊（愛知県健康づくり振興事業団）
稲岡一考（大阪府立母子保健総合医療センター）
渡辺倫子（日本公衆衛生協会）
鈴木恵美子（日本公衆衛生協会）
武田智子（日本助産師会・助産所部会長）

A. 研究目的

平成 19～21 年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）「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」の分担研究「新生児マススクリーニングの精度管理体制に関する研究」を行い、1）現行 6 疾患のマススクリーニングの質的向上には、ブラインドサンプル（BLS）導入の全国展開、実施要綱や説明と同意書の標準化が必要であること、2）タンデムマス・スクリーニング（TMS）の精度管理には米国疾病予防管理センター（CDC）の精度管理検体に加え、日本公衆衛生協会・新生児スクリーニング研究開発センター（NSRD センター）で作製中の精度管理検体が利

用可能なことを明らかとした。

平成 22 年度からは、TMS の全国展開のため検査体制、精度管理体制全体の問題点を明らかにし、その質的向上を図るため、検査前及び検査中精度管理に寄与するバーコード付き採血用ろ紙の開発、採血現場でとくに重要な役割を有する助産師の全国組織との連携、検査中精度管理のための TMS 用外部精度管理検体の開発、BLS 導入の検討を通しての各地域のシステムの見直し、精度管理のためのコンピュータネットワークの利活用、広義のコンサルタント医師委嘱のための体制整備に着手し、一定の成果を得た。

平成 23 年度から、それぞれの実証実験を開始予定としたところ、平成 23 年 3 月 31 日付けの厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知「先天性代謝異常の新しい検査法（タンデムマス法）について」（雇児母発 0331 第 1 号）の中で、「各都道府県等におかれては、タンデムマス法を用いた新生児マス・スクリーニング検査の導入を積極的に検討する等適切に対応していただくようお願いする」「検査精度の維持向上を図る精度

管理実施体制の整備が必要である」とされたことから、平成 22 年度までの研究成果を基に、より実務的な検査体制、精度管理体制作りを検討した。

スクリーニング全体の精度管理と情報管理を継続的に行うためには、スクリーニング検査機関での検査精度の維持向上に限定した「狭義の精度管理」、すなわち「検査時の精度管理」だけでなく、検査前・検査時・検査後の精度管理体制を確立し、その維持向上を図ることが必要である（図 1）。

そこで、平成 23、24 年度は検査前・検査時・検査後の新しい精度管理体制の確立を目的として研究を行ったので、平成 22 年度の成果と合わせて報告する。

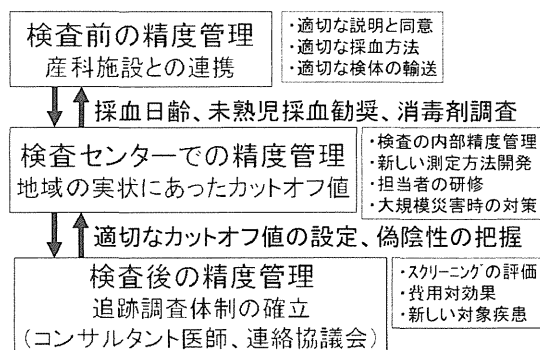


図1 スクリーニング全体の精度管理と情報管理

B. 研究方法

1. 検査前の精度管理

1) バーコード付き採血用ろ紙の開発

平成 22 年度に過去に行われた採血用ろ紙の記載内容の比較調査、新規採血用ろ紙の試案、バーコード内容の検討を行い、その結果及び平成 24 年度に行った、全国 44 スクリーニング検査施設の TMS 導入の進捗状況調査を基に、平成 24 年度版採血用ろ紙を試作し、44 施設に評価を依頼した。

2) 各地域での助産師の役割の検討

平成 22 年度に、日本助産師会・助産所部会の地域代表者と情報交換を行い、論点を整理した。そこで明らかになった問題点の解消のため、情報提供、現状調査、連携体制確立のための検討を行った。

3) ろ紙採血の標準化

日本マス・スクリーニング学会誌に掲載されている「6. 濾紙血の採取法・採血時間・保存法」（第 8 巻 Supplement2: 24-27、1998）中の標準採血手順に加え、欧米で標準的な考え方となっている採血担当者の針刺し事故防止を考慮した新標準ろ紙採血手順書（試案）を作成した（図 2）。

スクリーニング検査機関 45 施設を対象とし、各地でのろ紙採血手順の周知状況、新標準採血手順書と比較しての項目の有無についてアンケート調査を行った（平成 23 年 8 月）。全 45 施設から回答を得た。

4) 人為的に作成した不適切検体

現行の外部精度管理用ろ紙血検体作成手順に準じて、ろ紙血中の甲状腺刺激ホルモン（TSH）濃度が約 12~14 mIU/L（全血値）となるように調整した血液を作成した（ヘマトクリット 55%）。

調整した血液を以下のような手順で採血用ろ紙に滴下、数時間以上自然乾燥させ、人為的に不適切検体を作成し、それぞれの検体の TSH 値を Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA 法）で測定した（平成 23 年度研究）。

- 全血 50 μ l を 1 回で滴下。
- 全血 50 μ l を少量ずつ全量滴下。
- 全血 50 μ l を 1 回で滴下後、直ちに全血 20 μ l を 1 回で追加滴下。
- 全血 50 μ l を 1 回で滴下後、10 分程度乾燥させ全血 50 μ l を 1 回で追加滴下。
- 全血 25 μ l を 1 回で滴下。
- 全血 50 μ l を少量ずつ、乾燥させながら時間をかけ全量滴下。
- a~f では血液を滴下後、ろ紙は水平に保持して数時間自然乾燥させた。
- 全血 50 μ l を 1 回で滴下後、直ちにろ紙を垂直に保持して数時間自然乾燥させた。

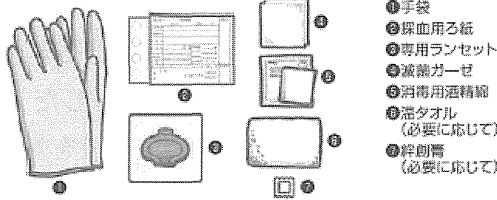
5) 「説明と同意書」の解析

平成 21 年 9 月末の時点でタンデムマス・スクリーニングを公式に実施、または試験運用実施中の 18 施設に、使用している「説明と同意書」の提供を依頼し、16 施設から提供を受けた。

新生児マススクリーニングろ紙採血手順：通常日齢4～6日に実施する。

監修：独立行政法人 国立成育医療研究センター 奥田 正平 先生

STEP 1 採血に必要な器具を準備します



- ①手袋
- ②採血用ろ紙
- ③専用ランセット
- ④滅菌ガーゼ
- ⑤消毒用酒精綿
- ⑥湿タオル
(必要に応じて)
- ⑦絆創膏
(必要に応じて)

※採血用ろ紙に母子氏名・出生日など必要事項を記入しておきます。

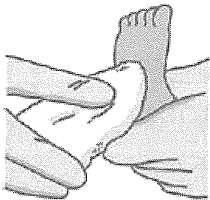
STEP 2 採血者は、手指衛生を実施した後に、手袋を着用します

STEP 3 足底の適切な採血部位を選択します



- ハイライト域内が、推奨穿刺部分です。
- 新生児の足底中央部への穿刺は、神経・腱・軟骨が損傷する可能性があります。親指中間部から踵後部まで、第4指と第5指の間から踵後部まで結んだ領域が、穿刺に適切な領域となります。また、湾曲部は穿刺部位として利点がないことより穿刺はしません。

STEP 4 哺乳後2時間前後、沐浴後に採血します



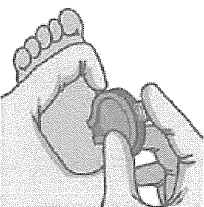
※沐浴が難しい場合には、42℃未満の湿タオルにて3～5分間加温します。

- 採血部位を温めることで血液循環が7倍向上します。

STEP 5 消毒用アルコール等で採血部位を消毒し自然乾燥するまで待ちます

- アルコールが残っていた場合、溶血の原因になります。
- アルコールが残っていた場合、血液が皮膚表面を流れ広がりがりうまく採血ができないことがあります。

STEP 6 ランセットを用いて穿刺し、使用後すみやかにランセットを鋭利器材廃棄容器に廃棄します

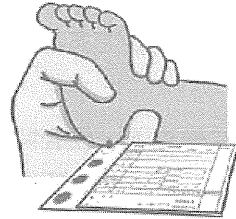


- 採血部位の皮膚に指で圧を加えて伸展した状態で穿刺すると、血液が得られやすくなります。
- 踵底面から2mm以上深く穿刺した場合には、骨を損傷し、感染をおこす恐れがあります。
- リスク対策のため、足底穿刺専用ランセットを用いるのが望ましいです。

STEP 7 最初の一滴は、滅菌ガーゼで拭き取ります

- 1滴目には組織液が多く含まれる可能性があり、検査値に影響を与える恐れがあります。

STEP 8 ろ紙に適切な量の血液を採取します



図：適切な採血量

	良い例	悪い例
液		
裏		

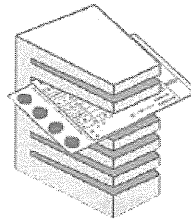
※流出した血液が満状になるように足底を保持し、穿刺部位にろ紙が接触しないよう注意しながら、ろ紙に印刷された円の中心部を目安に血液を吸着させます。
※図の「良い例」のように、採血用ろ紙の裏面まで十分しみ通るのが、適切な採血量です。この際、決して重ね(二重)付けしてはなりません。

- 踵を握る強さを緩めると毛細血管に血液がたまり、再度握った時に血液が押し出されます。ただし、過度な絞り操作を実施した場合には、溶血や組織液混入等の原因になるため注意が必要です。
- 穿刺部位を開くようにして両端から押すと血液を得やすくなります。

STEP 9 滅菌ガーゼを用いて圧迫止血をします

- 必要に応じて絆創膏を用いても構いませんが、新生児による剥離の可能性があるので、止血を確認後すみやかに外します。

STEP 10 ろ紙を自然乾燥させます



※採血後、ろ紙は汚染されないように取り扱い、高温多湿を避け、直接日光に当たらない場所で、水平に保持した状態で自然乾燥(室温2～3時間)させます。

STEP 11 専用の封筒に入れ、スクリーニング検査機関に検体を送付します

※遅くとも採血の翌日には送付します。数日以上保管は厳禁です。

Reference:
Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI: Procedures for the Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens; Approved Standard- Sixth Edition, CLSI document H04-A6 Vol.28 No.25, 2008
奥田 正平. 新生児の検査-基準値マスターブック.Neonatal Care 2006年 春季増刊:14-19, 2006
梅根俊寛. 遠隔地の採血法-採血時期-保存法. 日本マス・スクリーニング学会誌, Vol.8 (Supplement 2): 24-27, 1995

図2 新生児マススクリーニングろ紙採血手順

それぞれの施設の「説明と同意書」に含まれる以下の項目の有無を解析した。

現行6疾患、タンデムマス・スクリーニングで追加される対象疾患、新しい検査法（タンデムマス法）、個人情報保護、検査費用、新生児マススクリーニング・システム、検査済みろ紙血の保管、検査申込書・同意書、保管などの同意の撤回、検査に関するQ&A（よくある質問：Frequently Asked Questions、FAQ）、頁数。

2. 検査時の精度管理

1) タンデムマス・スクリーニング用外部精度管理ろ紙血検体

平成22年度までに検討した方法に従い、平成23年度は、アミノ酸10種類、アシルカルニチン14種類を添加したタンデムマス・スクリーニング用外部精度管理ろ紙血検体を作成した。

それぞれ無添加、低・中・高濃度の4種類の検体を作成し、タンデム質量分析計（以下、タンデムマス）を有するスクリーニング検査15施設、パイロット研究実施3大学、タンデムマス関連4会社、計22施設に検体を送付、測定を依頼し、その測定値について解析した。

2) タンデムマススクリーニング外部精度管理用標準溶液

平成24年度は、血液のマトリックスの影響を受けない標準溶液を作製し、目標濃度値と実測値の差異、機器間差を検討した。

標準溶液作製は、アミノ酸標準物質（Val, Leu, Met, Phe, Tyr, Cit, Ser, Arg, ASA）9種類およびアシルカルニチン標準物質（C0, C2, C3, C4, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18）11種類を、最小表示0.01mgの電子天秤により正確に秤量し、アミノ酸は蒸留水、アシルカルニチンはメタノールで溶解した。それぞれ溶解した物質を目的の濃度（目標値）になるように希釈混合し、一般新生児ろ紙血検体中の測定平均値程度の目標値と1/10倍、1/100倍の3濃度を作成した。

測定は、国立成育医療研究センター（LCMS-8030 島津製）、大阪府立母子保健総合医療センター（LCMS-8030 島津製およびAPI3200 ABSCIEX製）、島津製作所（LCMS-8030 島津製）のタンデムマスで行った。

3) ブラインドサンプル導入

現行外部精度管理と本法について示した（表1）。

表1 現行外部精度管理とBLSの精度管理（試行）

	現行の精度管理	ブラインドの精度管理(試行)
参加形態	全ての自治体	検査施設、自治体、連絡協議会等の自由意思
報告	・検査施設に毎月 ・施設長に3ヶ月毎 ・自治体と厚生省に年1回	・施設と協力医療機関にその都度 ・自治体として参加の場合、要求があれば自治体にも報告
対象疾患	現行6疾患	現行6疾患
検体送付元	NSRDC	自治体内の協力医療機関
送付枚数	・毎月10枚、120枚/1年	1枚/1回、2回/1年、送付月は不定
検体内容	正常と異常検体	・正常と異常検体 ・異常検体は、各検査施設で設定したカットオフ値以上、かつ各施設で設定した即精査カットオフ値以下

NSRDC:新生児スクリーニング研究開発センター

現行外部精度管理は、平成 23 年度は全 45 検査施設で実施し、合わせて外部精度管理検体 5,400 枚（異常値検体 3,690、正常値検体 1,710）を NSRD センターから送付した。各施設のカットオフ値に従って異常・正常を判定し、その結果を NSRD センターに報告する方式で行った。平成 24 年度は対象施設が 44 施設となった。

BLS については、44 施設中 15 施設が自主的に参加し（平成 24 年度は 2 施設休止）、地域の協力医療機関 37（医師数 41）であり、自治体 3 か所、連絡協議会 2 か所の協力も得ている。

3. 検査後の精度管理

1) 全国のスクリーニング体制整備状況予備調査

45 検査機関及びその地域でスクリーニングの検査結果について相談可能な医師 67 名に、平成 22 年 12 月にアンケート調査を行った。

調査項目は、検査機関には、現行マススクリーニングの対象疾患、コンサルタント医師、TMS 機器の導入状況、TMS のコンサルタント医師、TMS の導入予定、医師にはコンサルタントとしての経験、所属学会、その地域での TMS 導入に関する認識を調査した。

2) 専用コンピュータ・ネットワーク

平成 22 年度は実験的ネットワークの第一段階として、無料のメーリングリスト・システムを利用した情報交換システムを構築し、平成 23 年度はスクリーニング検査機関と外部精度管理機関（日本公衆衛生協会・新生児スクリーニング研究開発センター）との連携を図るための、専用コンピュータ・ネットワークの有すべき機能とその構築費用について検討した。

平成 24 年度はそれらをふまえ、現行の外部精度管理 6 項目（Phe, Met, Leu, Gal, Tsh, 17-OHP）について、検査施設からの回答に用いる新生児スクリーニング精度管理報告シート（以下報告シート）の電子ファイル版をインターネットで配布、この電子ファイルを介してデータ収集と解析を行うシステムを構築した。

次いで、TMS として開始された、有機酸代謝異

常症・脂肪酸 β 酸化異常症のスクリーニング検査の外部精度管理に拡張可能な電子版報告シートを作製した。対象項目は 22 物質（Phe, Leu+Ile, Met, Tyr, Cit, Ser, C0, C2, C3, C4, C5, C5-OH, C5-DC, C8, C10, C14, C16, C16-OH, C18, Gal, 17-OHP, TSH）と想定した。

電子版報告シートの作製には、すでに日本マス・スクリーニング学会技術部会において施設間の情報交換に多用されている Microsoft EXCEL 2003 形式を採用した。また、新生児スクリーニング専用サーバーの代用として、比較的広告が少なく会員限定の運用が可能な無料サービス FreeML を選定し整備した。

（倫理面への配慮）

本年度の研究においては、患者、家族などの個人情報を取り扱う研究ではないことから、個人情報に対する倫理的な配慮は特に必要ではないと考えた。ただし、将来的に予想されるコンピュータ・ネットワーク稼働時の個人情報の保護等には、細心の注意を払い研究を進めた。

C. 研究結果

1. 検査前の精度管理

1) バーコード付き採血用ろ紙の開発と評価

(1) バーコード付き採血用ろ紙の開発

平成 22 年度の時点では、TMS については現行 6 疾患の検査施設以外に外部委託する実施主体が多くなることを想定し、採血部位だけをろ紙として、一部切り離しができるようにミシン目とその部分にバーコードを入れ、また切り離し後の汚染防止のためろ紙の周囲を厚紙で保護する様式の採血用ろ紙（22 年版）を考案した。

平成 24 年度に TMS 導入状況調査を行ったところ、タンデム法を実施している検査機関は、21 施設、平成 25 年度開始に向けての準備中が 15 施設、実施未定は 8 施設であった。回答した施設からタンデムマス法又は内分泌検査を再委託している例が 3 施設あった。

そこで以下の検討では、一部切り離し型の採血

用ろ紙ではなく、現行の採血用ろ紙と同じく採血部分は4スポットで片側のみ、ただし検査後の長期保存を想定して、採血部位だけをろ紙とし、一部切り離しができるようにミシン目とその部分にバーコードを入れ、また切り離し後の汚染防止のため採血部を覆うカバーをつけた様式の採血用ろ紙(24年版)を試作した。

(2) 24年版採血用ろ紙の評価

検査施設からの回答により、次のような問題点が明らかとなった。

(i) ろ紙の採血スポットの○印が裏面にも必要である。

(ii) 採血部を覆うカバーについての指摘が最も多く、(ア) 採血後にカバーが血液に付着する恐れがある、(イ) 検査終了後の保存時に、カバーをする必要性を明らかにすべき、(ウ) 採血時に扱いづらい、(エ) 乾燥時に扱いづらい、(オ) 検査時に扱いづらい。

2) 各地域での助産師の役割の検討

(1) 論点整理

現行6疾患についての適切な情報提供、保護者への説明と同意の場面などでの助産師の役割の再確認、TMS導入における助産師の役割の確認が必要。

(2) 対策

平成22年10月23日の日本助産師会主催の助産所開業セミナーでの研究分担者(SH)による講義、機関誌「助産師」への寄稿、本研究班との連携。

3) ろ紙採血の標準化

ろ紙採血手順書は、自治体の実施要綱に12施設で添付され、18施設では検査機関が独自に作成していた。手順書が無いのは3施設であった。

医療機関への周知は、毎年全医療機関に送付が5施設で、他施設では定期的に行われていなかった。

新標準ろ紙採血手順書と大きく異なる内容としては、手指衛生実施・手袋着用の記載は1施設のみ、最初の1滴(組織液)を拭き取ることの記載は2施設、止血方法の指示があるものが12施設

であった。

4) 人為的に作成した不適切検体

a) の条件でのTSH値を100%とすると、それぞれの条件でのTSH値(平均値)は次のようであった。

b) 95%、c) 153%、d) 234%、e) 47%、f) 113%。

g) の垂直保持では、検体の上部からパンチしたろ紙血片のTSH値は、93%、中央部98%、下部107%を示した。

5) 「説明と同意書」の解析

全体の頁数が1、2頁のものと、FAQを含んだ4、5頁の2タイプに区分された。

簡易な1、2頁のタイプには、検査済みろ紙血の保管や同意の撤回に関する項目が含まれていなかった。

現行6疾患の新生児マススクリーニングに、タンデムマス・スクリーニング対象疾患を加え、大きなシステム変更をせずに、従来と同じ費用で行っている施設では、簡易なタイプであった。

2. 検査時の精度管理

1) タンデムマス・スクリーニング用外部精度管理ろ紙血検体

検体を送付した22施設での、施設内での各測定項目の変動率は概ね10%以内であったが、新たにタンデムマスを稼働させた施設では、いくつかの項目で10%を超えていた。

22施設での各測定項目の平均値を100%とすると、施設間のばらつきは概ね±30%にあったが、今回新たに測定を依頼した施設では平均値を大きく外れる傾向にあった。しかし、従来からの参加施設でも、測定項目によっては±50%を超えるものがあった。

2) タンデムマススクリーニング外部精度管理用標準溶液

測定した結果、ほぼ目標値に近い測定値が得られ(n=6)、変動係数は(CV%)はほぼ5%以内であったが、C3、C4、C10、C5-DC、ASAでは目標濃度値と測定値が30%以上乖離していた。

標準溶液を 1/10 倍希釈・1/100 倍希釈し測定したところ、直線性を確認できたが、C8、C10、Met では 1/100 倍希釈の測定値が 2 から 4 となり直線性が悪かった。

3) ブラインドサンプル導入

(1) 現行 6 疾患の外部精度管理結果

平成 23 年度は異常値検体の見逃し 2 件、NSRD センターに報告する際の記入の誤りが 1 件あった。見逃しの 2 件は、一次検査では異常と判定したが、検査技術者の確認ミスにより二次検査が行われず、結果として、異常値検体として NSRD センターに報告されなかった。

平成 24 年度も、9 月までに見逃し 3 件（タンデム法により測定された施設での Phe 異常値検体 2 件、酵素法による Gal 異常値検体 1 件）、記入の誤り 2 件があった。見逃しの 3 件は、検査では異常と判定したが、NSRD センターへの報告書に記載されなかった。

(2) BLS 導入による精度管理（試行）

平成 17 年度からの累計は 137 検体（異常 69、正常 68）となった。この間、見逃しは平成 20 年 3 月の 1 検体のみであった。

未整備の地域連絡協議会の設置を主体的に働きかける施設が現れ、平成 17 年度以降、協議会の新規設置 1、協議会再開 1 といった、BLS 導入の副次的効果が認められた。

検体受付から結果報告までの日数を現行法と比較すると、BLS 異常値検体においては 2、3 日にピークがあり、現行の外部精度管理検体では 3、6～8 日にピークがみられ、現行の外部精度管理検体が一般新生児検体とは別扱いになっていることが示された（図 3）。

BLS 導入による精度管理（試行）では、現行 6 疾患を対象としているが、TMS 導入施設から「有機酸代謝異常の疑い」との連絡が協力医療機関にあった。医療機関が BLS であるに対応したので問題は生じなかった。

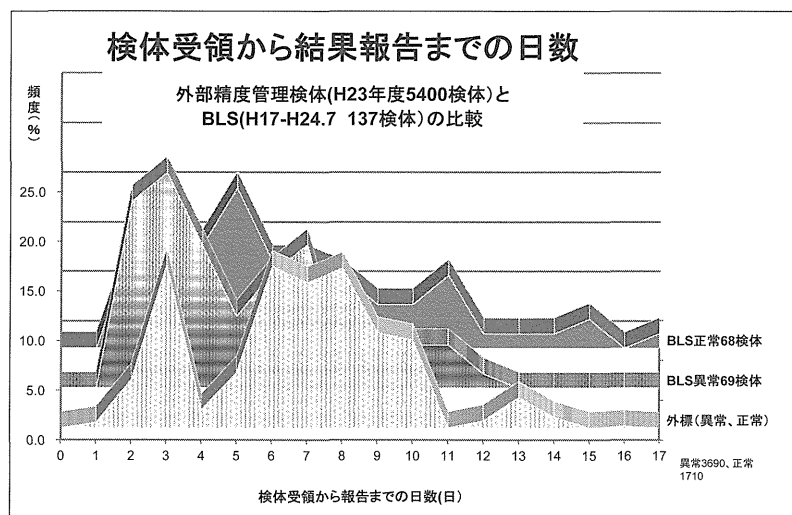


図 3 検体受付から結果報告までの日数

3. 検査後の精度管理

1) 全国のスクリーニング体制整備状況予備調査

検査機関 45 施設中 45 施設から回答があった。

正式にコンサルタント医師として委嘱しているか、あるいは要精密検査対象者の取り扱いなど

について医療相談できる医師を、合わせて（広義の）コンサルタント医師とした場合、20 施設（44%）のみから「有り」との回答があった。

45 名の医師からの回答があり、担当している検査機関は 30 施設であった。TMS のコンサルタント

としては、自分が兼任 16 名、他にいる 12 名、医師がいない 1 名であった。

2) 専用コンピュータ・ネットワーク

電子版報告シートとして、以下の 3 パターンを作成した。

(1) 方法 1 : (現行運用形態と同じ)

検査施設で必ず異常値として検出されるべき限界濃度を持つ異常値サンプルを含み、この検体についてのみ検体番号、異常物質名、測定値を報告する。

(2) 方法 2 : 「再採血想定検体：異常値として検出されるべきサンプル」と「確認検査想定検体：注意を要するが正常検体と判定すべきサンプル」の高濃度・中濃度の両検体を含み、検査施設のカットオフ値に加え、これらの検体番号・物質名・測定値・判定結果 (+/-) を報告する。

(3) 方法 3 : 方法 2 と同様に「再採血想定検体：異常値として検出されるべきサンプル」と「確認検査想定検体：注意を要するが正常検体と判定すべきサンプル」の高濃度・中濃度の両検体を含み、検査施設のカットオフ値に加えて異常値サンプル・正常サンプルも含め全検体・全項目の検体番号と測定値・判定結果を報告する。

D. 考察

平成 23 年 3 月 31 日付けの厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知「先天性代謝異常の新しい検査法 (タンデムマス法) について」(雇児母発 0331 第 1 号) をうけて、現行 6 疾患の新生児マススクリーニング外部精度管理に加え、タンデムマス・スクリーニング (TMS) の外部精度管理を十分な水準を担保して導入するため、検査前・検査時・検査後の検査体制、精度管理体制それぞれの現状と改善すべき点を検討した結果、新しい精度管理体制のためには次のような改善、整備が必要であると考えられた。

第一に検査前の体制整備として、新生児マススクリーニングの生命線となる、採血用ろ紙及び標準的採血手順については、次のように考えられた。

新たに TMS による一次対象疾患となる 13 疾患

については、暫定的なカットオフ値や 2 回目の採血 (再採血) 日齢、精密検査方法が提案されているものの、その疾患特性により、特に脂肪酸代謝異常症がスクリーニングで発見されなかった場合、無症状で数年を経過し、ある日突然発症して死亡など重篤な転帰をとることが予想されている。そうした偽陰性例を将来的に最小としていくためには、検査済みろ紙血を長期の保存後も測定可能な状態としておくことが必須の条件である。しかし、これまでの厚生労働科学研究の結果からは、保存場所の問題などから、数年単位の冷凍保存は限られた検査施設でしか予定されていないことが明らかとなっている。

そこで、保存場所を極力小さくし、また汚染を避けて保存するための、新しい採血用ろ紙 (24 年版) を試作し、44 検査施設の技術者の評価を受けたところ、保存のため小型化を図り、採血部分を切り離しても、取り扱うときに汚染させないようカバーをつけたことが、逆に、採血時、検査時等取り扱いの困難を来す恐れが明らかとなった。

採血部の切り離しタイプにカバーをつける工夫は、諸外国の採血用ろ紙では稀ではないことから、採血施設での早急な実証実験が必要と考えられた。

標準的採血手順 (図 2) を作成して全国の検査施設に啓発を図っている中で、今回は検討できなかったが採血器具の問題が明らかとなっている。スクリーニング開始当初は、世界でも日本でも、新生児の足底から専用の穿刺器具を使って、骨髄炎を起こさないような深さに穿刺することが常識であったが、これまでの検討で、ことに日本では手背からの採血や、穿刺に注射針を使うなど、採血担当者の針刺し事故防止に対する配慮や新生児の骨髄炎防止が想定されていない現状であった。

諸外国では図 2 に示した、針刺し事故防止を目的とした足底穿刺専用ランセットが一般的となっており、またそのことが法律で規定されている (例、米国の the Needlestick Safety and Prevention Act)。新生児マススクリーニング領

域だけの問題ではなく、少なくとも日本小児科学会、日本周産期・新生児医学会、日本産科婦人科学会、日本産婦人科医会など関連学会への情報提供、議論が必要と考えられる。

第二に検査中の精度管理、ことにタンデムマス・スクリーニング用の外部精度管理検体をどのように作成し、精度管理をどのような体制で行うべきかについては、結果を報告するための専用コンピュータネットワーク体制の確立、地域の連絡協議会、コンサルタント医師の委嘱も含め、引き続きの検討が必要と結論された。

現在、日本マス・スクリーニング学会技術部会で作成中の「新しい外部精度評価システムのあり方に関する報告書」、現在の外部精度管理機関である NSRD センターの今後のあり方とも合わせ、この点も早急に広く関係者で検討されるべき課題と考えられた。

現行の外部精度管理の質的向上のために検討してきたブランドサンプル（BLS）導入の成果として、現在各検査施設に送られている外部精度管理検体は明らかに「特別扱い」されて測定されており、その検査施設が一般新生児検体を取り扱ったときの水準を反映しているもので無いことが明らかとなった。しかし、同じ時期に行われた現行の外部精度管理において、異常検体の見逃しが発生しており、この両方の結果から、検査施設の水準が低下している恐れが十分考えられる。

これも今回は検討できなかったが、一般新生児検体の作業手順書の有無や作業の現状、人員配置、検査技術者の研修状況、関連学会への参加状況、検査水準を維持するに十分な費用がかけられているかの点で、わが国の検査施設の水準が危険水

域にある恐れもあり、TMS 導入に合わせて、適切な事業予算措置を前提とした、抜本的な改善策が行われることが期待される。

E. 結論

平成 23 年 3 月 31 日付けの厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知「先天性代謝異常の新しい検査法（タンデムマス法）について」（雇児母発 0331 第 1 号）を契機に、現行 6 疾患及びタンデムマス・スクリーニング対象疾患の外部精度管理を適切に行うため、検査前、検査中、検査後の各段階における現状、問題点、改善方法の調査研究を行い、全ての段階での改善、整備、最終的には地域格差を最小とするための標準化が必要であると結論された。

F. 研究発表

（巻末に別掲載）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題

新生児マススクリーニング事業の費用対効果の研究
- MS/MS マススクリーニングの費用対効果分析の国際比較 -

研究分担者 大日康史（国立感染症研究所感染症情報センター主任研究官）

研究要旨

【目的】これまでの日本におけるタンデムマススクリーニングの費用対効果分析の国際比較を行う。

【方法】社会的視点からの費用対効果分析を行っている研究に限定した文献検索を行う。

【結果】文献検索から 6 つの文献が、日本での研究と比較可能であると判断された。アメリカでのガラクトース血症が \$99,562 と非常に費用対効果が悪いのを唯一の例外として、他のすべてで費用対効果は優れていた。

【考察】日本での検討と最も条件が似ていたアメリカでの結果を日本の人口に置き換えると、増分便益費用比が 20.33 増分純便益が 278.7 億円と日本での検討を大きく上回った。

研究協力者

菅原民枝（国立感染症研究所
感染症情報センター）

A. 研究目的

これまでの日本におけるタンデムマススクリーニングの費用対効果分析から、増分便益費用比で 1.73～6.44、増分純便益で 71～143 億円とされているが、その国際比較を行う。

B. 研究方法

社会的視点からの費用対効果分析を行っている研究に限定した文献検索を行う。

C. 研究結果

社会的視点からの費用対効果分析を行っている研究に限定した文献検索から 6 つの文献¹⁻⁶⁾、8 つの費用対効果分析が、日本での研究と比較可能であると判断された。

費用対効果分析の結果としてアメリカでのガラクトース血症が \$99,562 と非常に費用対効果が悪いのを唯一の例外として、他のすべてで費用対効果は優れていた。

D. 考察

日本での検討と最も条件が似ている検討を行っているのはアメリカ²⁾であるが、そこでの対象疾患すべてでの結果を増分便益費用比、（出生人口 100 万人における）増分純便益に変換すると、増分便益費用比が 20.33 増分純便益が 278.7 億円と日本での費用対効果分析の結果を大きく上回っていた。これは、医療費や予後等における設定の違いに主に起因していると推察される。今後日本においても兆期予後の情報が蓄積されるに伴い、費用対効果分析も改訂されると期待される。

参考文献

1) Autti-Rämö I, Makela M, Sintonen H, Koskinen H, Laajalahti L, Halila R, et al. Expanding screening for rare metabolic disease in the newborn: an analysis of costs, effect and ethical consequences for decisionmaking in Finland. *Acta Paediatrica* 2005; 94:1126-36.

2) Carroll AE, Downs SM. Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* 2006; 117:S287-95.

3) Cipriano LE, Rupar CA, Zaric GS. The cost-effectiveness of expanding newborn screening for up to 21 inherited metabolic disorders using tandem mass spectrometry: results from a decision-analytic model. *Value Health* 2007; 10:83–97

4) Venditti LN, Venditti CP, Berry GT, Kaplan PB, Kaye EM, Glick H, et al. Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cost-effectiveness analysis. *Pediatrics* 2003; 112:1005–15.

5) van der Hilst CS, Derks TG, Reijngoud DJ, Smit GP, TenVergert EM. Cost-effectiveness of neonatal screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: the homogeneous population of The Netherlands. *Journal of Pediatrics* 2007; 151, 115–20, 20 e1–3

6) Pandor A, Eastham J, Chilcott J, Paisley S, Beverley C. Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *International Journal of Technology Assessment in Health Care* 2006; 22:321–6.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題

産科医療機関との連携向上に関する研究

研究分担者 平原史樹（横浜市立大学大学院医学研究科生殖生育病態医学教授）

研究要旨

2011年3月には厚生労働省から積極的導入の検討を促す通達があり、各地方自治体で本格的導入の準備がなされているが、その中において産科医療機関での調査の結果、タンデム・マススクリーニング検査に対しての知識が十分に浸透されているとはいえない状況であった。さらに本研究では産婦人科医師へのタンデム・マススクリーニングの認知に向けての啓発活動の効果と各医療機関において実際に母子に説明、検査を実施する役割を担っている職種の実態等を調査するとともに、24年度にはその実施状況の調査を行い検討した。その結果、タンデム・マススクリーニングの各都道府県での実施状況は相当数の実施状況が確認されたものの、いまだ行政側の方向性の定まらない点もみられ、今後の課題として産婦人科医、小児科医、検査機関、行政等との間での密接な協力が必要な点が示された。また職域での認知率向上の推進のみならず、看護協会・助産師会などにも働きかけすべての職域、領域で普及していくことも、重要と考えられた。

見出し語；産科医療機関、タンデム・マススクリーニング検査、認知浸透、実施率

研究協力者

平原史樹（横浜市立大学大学院医学研究科生殖生育病態医学（産婦人科学）教授）

山口瑞穂（横浜市立大学大学院医学研究科生殖生育病態医学（産婦人科学））

住吉好雄（横浜市立大学客員教授、日本産婦人科医会顧問）

高橋恒男（横浜市立大学附属市民総合医療センター総合周産期母子医療センター教授）

奥田美加（横浜市立大学附属市民総合医療センター総合周産期母子医療センター准教授）

菊池信行（横浜市立大学附属市民総合医療センター小児科部長・准教授）

浜之上はるか、尾堀佐知子
（横浜市立大学大学院医学研究科生殖生育病態医学（産婦人科学））

山上祐次（(財団法人) 神奈川県予防医学協会）

ング事業は 2001 年より国から地方自治体へと事業が移管され各自治体の施策にゆだねた形となった。その中でさらに多くの疾患を対象としたタンデム・マススクリーニング検査法が普及しつつあったが 2011 年 3 月には厚生労働省から積極的導入の検討を促す通達があり、各地方自治体で本格的導入の準備がなされている。

一方、既に 30 年以上経過した中で、既定の事業としての維持は行政側に多くの軸足が移管され、事業運営そのものも産科医療機関側が課題打開を求めて東奔西走して行動する局面は激減している。このような背景のもとタンデムマススクリーニングシステムの意義の理解、啓発、普及についての産科医療側では多くの課題が存在している。

本研究では産科医療機関との連携向上に関してその課題を明確化し、推進へ向けての課題とその解決への提言することを目的に産科医師のタンデム・マススクリーニングに関する情報の浸透度と課題の理解度を検討し、またその実施状況を

A. 研究目的

1977 年より開始された新生児マススクリーニ

合わせ検討した。

B. 研究方法

産科医師を対象に下記の関する項目を調査した。対象産科医師群として①神奈川県医会の研究会に出席した各階層の医師（病院勤務、診療所開業、分娩取り扱い有り、無しを含む）②県内の総合病院計 8 病院の勤務医、としタンデム・マススクリーニング実施前後でそれぞれ下記のアンケート形式で調査を行った。

実施時期は 2010 年 12 月-2011 年 12 月である。

(1) 回答者の属性

（経験年数、勤務形態、分娩取り扱いの有無）

(2) タンデム・マススクリーニング検査

検査内容についての認知：

(3) 上記で「知っている」と答えた場合

情報媒体の由来：

(4) 採血量の増減（従来の新生児マススクリーニングに比して）について：

(5) パイロットスタディの現状と認識：

分娩取り扱い施設の医師についてはさらに、

(6) 妊産婦への検査の説明、児の採血は実際誰が施行しているか：

また本研究ではタンデム・マススクリーニングの各都道府県での実施状況、課題等を日本産婦人科医学会とともに協力して調査し、各都道府県別に検討した。

C. 研究結果

①研究会にて行ったアンケート結果

全県導入前は認知率 51%であったが導入後は 79%まで認知率が向上された。情報媒体としては学会関連の会報や学会参加時に知識を得ることが多かった。全県導入前には県内でパイロットスタディが行われていることに対する認知率は 22%であったが、全県導入後は 83%に向上した。分娩を取り扱っている医師に施行の実際についてアンケートを行ったところ、説明は産婦人科医師と助産師がそれぞれ 1/3 ずつの割合を占め、

口頭での説明を行っていない施設も 2 割あることがわかった。採血については助産師が施行している施設が 5 割にのぼっていた。

②県内総合病院 8 施設の勤務医に行ったアンケート結果

全県導入前は認知率 47%、導入後は 68%にとどまった。知識を得た時期として「今年になってから＝導入が決まってから」の時期と答えた医師が 1/3 存在した。認知のきっかけとして「職場で同僚から知識を得た」と答えた医師が最多であった。実際の検査施行現場では産婦人科医が説明を行っている施設は 1 施設にとどまり、採血は助産師・看護師が行う施設と小児科医が行う施設が半々という結果になった。

平成 24 年度に調査した時点では多くの都道府県ですでにタンデム・マススクリーニングが実施されており、また平成 24 年度内か平成 25 年度に実施への準備を進めている自治体が多い一方で、行政側の方向性が定まっていない県も見られた。課題としてもこれらの意見が示された。

D. 結論

本調査ではタンデム・マススクリーニングの導入前後での産科医における新生児マススクリーニングに関する認識の概要の把握ができた。

全国各地での新生児マススクリーニングシステムは地方自治体-産科医団体-小児科医の協力により完備した提供体制が長年にわたり安定化してきており、産婦人科医各個人の関心が低下してきている。しかしながら日本産婦人科医学会ではその基幹事業として“本邦におけるマススクリーニング事業の推進と運営”を明確に位置付けている。そのため、全国レベルでもその機関誌、情報提供版でも反復して本研究代表者によるタンデム・マススクリーニングに関する情報、本邦での現況等が伝達されている。今回のアンケート結果では、これらの取り組みが認知率向上に寄与していることは明らかになった。また、総合病院では職場内での「横のつながり」によって知識が普及

されていることも明らかになり、これらの結果は今後全国的にタンDEM・マススクリーニング検査の知識を広めていく際に効率よくアナウンスを行うためのヒントになると思われる。

また、実際の現場では産婦人科医はもちろんのこと母児に直接接している看護師・助産師の知識普及が不可欠であり、積極的な啓発活動や、職場内での多職種間での情報共有などが知識普及のためには有効であると考えられる。

実施状況の検討からは全国的には相当数の実施状況が確認されたものの、いまだ行政側の方向性の定まらない点もみられ、また今後の課題として産婦人科医、小児科医、検査機関、行政等との間での密接な協力が必要な点が示された。

E. 研究発表

論文発表

1) 尾堀佐知子, 浜之上はるか, 奥田美加, 高橋恒男, 東條龍太郎, 明石敏男, 住吉好雄, 平原史樹 新生児タンDEM・マススクリーニング検査法の認知・浸透に関する調査. 関東連合産婦人科学会誌 48: 211, 2011

2) 山口瑞穂, 尾堀佐知子, 浜之上はるか, 奥田美加, 高橋恒男, 安達昌功, 菊池信行, 曾根田瞬, 田久保憲行, 石黒寛之, 山上祐次, 東條龍太郎, 明石敏男, 住吉好雄, 千歳和哉, 田中誠也, 平原史樹: 産婦人科医における新生児タンDEM・マススクリーニング検査法の認知・浸透状況に関する調査. 日本マススクリーニング学会誌 22: 39-44, 2012

追加研究 1

マスキリーニングの現状と必要性

研究協力者 野々山恵章（防衛医科大学校小児科学講座）

研究要旨

先天性免疫不全症は、免疫担当細胞が分化障害などにより欠損し、感染防御機構の破綻により易感染性を呈する疾患である。代表的な疾患として、重症複合型免疫不全症 (SCID)、伴性劣性無 γ グロブリン血症がある。いずれも早期発見すれば有効な治療法が確立している。しかし現状では、見逃し例が多く、重症化、難治化、死亡したりしている。したがって、早期発見により適切な治療を行う事が、予後の改善、根治に結びつき、重要である。

具体的な方法として、現行で採取されている新生児乾燥濾紙血を用い、T細胞新生能のマーカーとして T cell receptor recombination excision circles (TREC)、B細胞新生能のマーカーとして signal joint Kappa chain recombination excision circles (sjKREC) の定量を行った。その結果、健常新生児 (n= 26) では全員 TREC, sjKREC とともに 1 万コピー程度検出できたが、SCID では全例 (n=9) で検出感度以下 (100 コピー以下)、XLA 患者では全例 (n=35) で sjKREC が検出感度以下であった。

既に北米では 19 州で TREC による SCID の新生児スクリーニングが開始され、19 例が新生児期に確定診断され、造血幹細胞移植、遺伝子治療により根治している。日本でも次ぎに開始すべき新生児スクリーニングとして考えるべきである。

A. 研究目的

先天性免疫不全症は、早期治療により予後が劇的に改善するため、早期診断が重要である。しかし、現状では重症感染症に罹患してから発見されることが多く予後不良となっている。我々は、先天性免疫不全症である重症複合型免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, SCID) を、T細胞の発生過程で産生される T cell receptor excision circles (TREC)、伴性劣性無 γ グロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA) を、B細胞の発生過程で産生される signal joint Kappa chain (sjKREC) を、新生児期に採取される乾燥濾紙血 (ガスリー血) を用いてスクリーニングする方法を開発し、その有効性を検討した。

B. 研究方法

ヒト先天性免疫不全症は、早期治療により予後が劇的に改善するため、早期診断が重要である。しかし、現状では重症感染症に罹患してから発見されることが多く予後不良となっている。代表的な原発性免疫不全症として T細胞の発生障害である SCID、B細胞の発生障害である XLA を対象として、患者 (98 例)、健常人 (1732 例) の新生児期乾燥濾紙血を収集した。

収集した新生児期乾燥濾紙血から two punch の乾燥濾紙血を得て、genomic DNA を抽出した。すでに開発した TREC, sjKREC の real time PCR 法にてそれぞれのコピー数を測定した。

抽出した DNA 量を確認し一定とするために RNaseP も real time PCR 法により全検体で測定した。抽出した DNA 量のばらつきを無くすために、それぞれの検体における TREC, sjKREC のコピー数を RNaseP 量で補正した。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱う。臨床研究、遺伝子解析、PIDJ への登録に関しては、本人ないし親権者からの同意書を得た。

また、本研究は、小児感染症学会、防衛医大、理化学研究所、かずさ DNA 研究所の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

健常児から得た乾燥濾紙血で、TRECおよびsjkKRECは全例で1万コピー程度と測定可能であった。RNasePは健常児、SCID、XLAにて全て陽性であり、DNAは問題なく乾燥濾紙血から抽出できていた。

SCID患者では保存してあるガスリー血および患者末梢血から作製した乾燥濾紙血において、全例でTRECが陰性であった。一方、年齢一致の健常コントロールでは全て1万コピー程度と陽性であった(図1)。

XLAは患者では、sjkKRECは全例で検出感度以下であった。健常児では全例で10,000コピー程度検出できた(図2)。

以上、SCID患者では全例でTRECが陰性、XLA患者では全例でsjkKRECが陰性、健常児ではTREC, jkKRECともに10,000コピー程度検出され陽性であった。したがって、本方法は、SCID, XLAの新生児スクリーニングに応用可能であると考えられた。

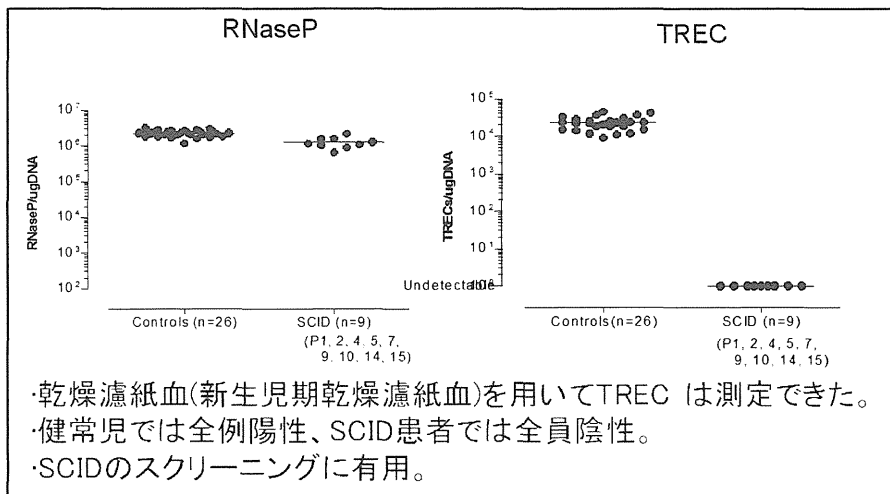


図1. ガスリー血を用いた TREC の測定

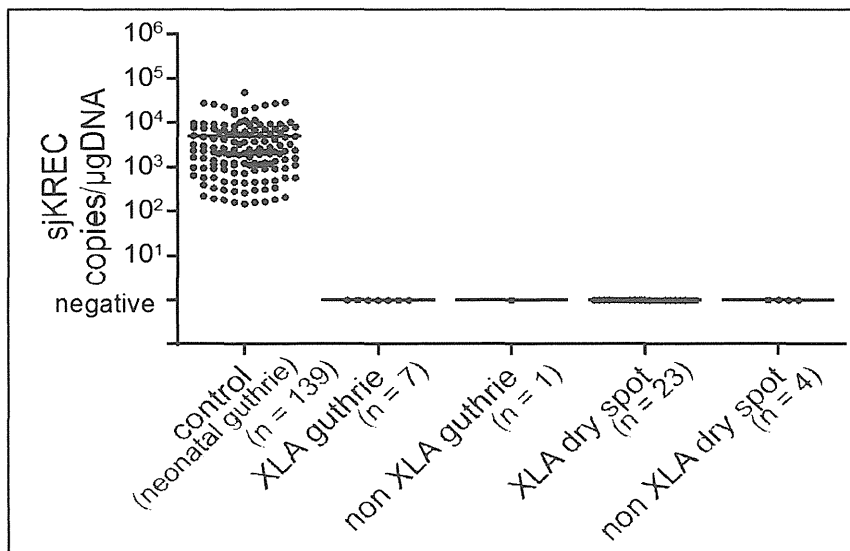


図2. sjkKREC 測定で B 細胞欠乏症の新生児スクリーニングが可能