

先天性代謝異常遺伝子解析パネル開発に関する研究

業務主任者 小原 収 （公財）かずさDNA研究所 副所長

新生児タンデムマススクリーニングで見出された疾患状態にある新生児が、どのような遺伝的な原因で発症しているかを正確かつ迅速に同定できる遺伝子解析パイプラインを構築し、それを実稼働させられる体制を構築することを目指して研究を進めた。今年度は、本研究班として遺伝子パネルとして解析対象とする遺伝子セットを選定し、それらの遺伝子を一括して解析していくための遺伝子解析パネル実験系のデザインとその実運用に向けた予備検討を完了した。

A. 研究目的

近年の質量分析技術の向上に伴い、新生児タンデムマススクリーニングが現実のものとなり、実際の臨床現場でその威力を発揮している。しかし、スクリーニングによって得られた代謝産物異常の情報から遺伝的な発症原因を同定し、その知見を用いて質の高い診療を実現するためには、疾患発症遺伝子変異の同定を効率的に行うフォローアップ体制の確立が必要である。この目的の実現には、近年進歩の著しい次世代シーケンシング技術を診断に導入し、診療に使えるレベルの精度で安価な遺伝子解析パイプラインの構築が必須である。更に、マススクリーニングの知見からだけでは原因遺伝子の絞り込みが十分にできない場合も頻繁に見られるため、解析対象の遺伝子数を数10に増やした遺伝子解析パネル系の開発が求められている。本分担研究では、本研究班の専門医の方のこれまでの経験に基づいた遺伝子パネルに搭載する遺伝子情報の取得と、実際にそれが現実の診療現場で

活用できるまでに至る諸問題の解決を目的とする。

B. 研究方法

マススクリーニングで見出される疾患を始め、先天性代謝異常である事が明らかになった後、遺伝的な素因を調べるべき疾患関連性遺伝子のリスト化を研究班内で進めた。それに基づき、各遺伝子の構造を確認し、各パネル毎に全エクソンを増幅するためのプライマーデザインを進め、その合成が終わり次第、次世代シーケンサーでのシーケンシング工程の微調整を進めた。このプロセスは各遺伝子パネル毎に行わざるを得ないため、今年度はパネルデザインまでを、現時点で固まった遺伝子パネルについて行う事とした。

基本的な遺伝子解析方法は、将来の診療への応用性で最も大きなバリアーとなるであろうコスト面を重要視し、PCR法に依拠したアンプリコンシーケンシング法に依る事とした。そのための基本プロトコルや

シーケンシングデータ解析パイプラインは既にかずさ DNA 研究所で実績のあるものを基本とし、本研究班の目的に合うような改変を適宜加える事とした。

本研究班での取り組みが、我が国の他疾患領域でも進んでいる次世代シーケンサーを活用した遺伝子検査体制と歩調を揃えられるように、この遺伝子パネル解析パイプラインの構築に関しては、難治性疾患克服事業、疾患群毎の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究（遺伝子拠点研究）、「小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子解析ネットワークとエピゲノム解析拠点整備」班とも連携しながら研究を進めた。

倫理面への配慮

本研究では遺伝子解析を行うため、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って研究を進める。本分担研究者の施設では検体採取は行わず、現時点では、研究代表者の岐阜大学をハブとして検体送付を受ける体制としている。そのため、研究分担研究者及びかずさ DNA 研究所を含めた形の実験計画を岐阜大の倫理審査で承認していただき、それを受けて、かずさ DNA 研究所で岐阜大学からの検体を受け入れて遺伝子解析を行うという流れの実験計画を本分担研究者の所属するかずさ DNA 研究所の倫理審査委員会での承認を得た（別添 1）。かずさ DNA 研究所では匿名化された ID 情報で検体を管理し、連結可能とする情報は岐阜大学でのみ保管される体制である。

C. 研究結果

本研究班の検討の結果、最初に提案された 3 種類の遺伝子パネルに搭載されるべき

遺伝子リストを表 1 に示す。それぞれのパネル間に重複する遺伝子があるものの、それぞれのパネルに搭載されるべき遺伝子数は、マススクリーニングパネル 54 遺伝子、ケトン体代謝異常症パネル 53 遺伝子、糖原病パネル 69 遺伝子となった。現在、これに加えて追加パネルの検討も進行中である。

これらの 3 種類のパネルについては、搭載遺伝子のタンパク質コード領域エクソンを増幅するためのプライマーデザインを行った。この際、検査精度を向上させるために、増幅領域がゲノム上の他の領域に類似配列を持つかどうか、設計されたプライマーがヒトでの高頻度の 1 塩基多型を示す配列を含んでいないかをチェックするシステムを構築した上で、PCR プライマーとして利用するオリゴマー合成を行った。既にかずさ DNA 研究所で稼働している標準的なマルチプレックス PCR 法で増幅反応を行い、現在、イルミナ社の小型次世代シーケンサー MiSeq での配列解析とそのデータ解析を進めている。この予備検討が終了次第、ケトン代謝異常症パネルとマススクリーニングパネルについては、既に検体も岐阜大学から送付されているので、この 2 パネルについて先行して解析を進める予定である。

これらの疾患・目的別パネル遺伝子数は幸い 100 以下であったためにマルチプレックス PCR 法による解析を進めたが、並行して、先天性代謝異常症パネルと今後新生児における解析が必要とされる疾患遺伝子（約 500）を一度に解析できるハイブリダイゼーションキャプチャー系のデザインを行い、予備検討を行うためのキャプチャーオリゴマーの合成を行った。

表 1. 先天性代謝異常症 遺伝子解析パネル

Gene Symbols	マススクリーニング	ケトン体代謝異常	糖原病
ABCD4	ABCD4		
ACAA2		ACAA2	
ACAD10		ACAD10	
ACAD11		ACAD11	
ACAD8		ACAD8	
ACAD9		ACAD9	
ACADL		ACADL	
ACADM	ACADM	ACADM	
ACADS		ACADS	
ACADSB		ACADSB	
ACADVL	ACADVL	ACADVL	
ACAT1	ACAT1	ACAT1	
ACAT2		ACAT2	
ACSF3		ACSF3	
ACSM1		ACSM1	
ACSS2		ACSS2	
ADPGK			ADPGK
AGL			AGL
ALDH6A1		ALDH6A1	
ALDOA			ALDOA
ALDOB			ALDOB
ASL	ASL		
ASS1	ASS1		
AUH	AUH		
BCKDHA	BCKDHA		
BCKDHB	BCKDHB		
BDH1		BDH1	
BSG		BSG	
BTD	BTD		
CBS	CBS		
CPT1A	CPT1A	CPT1A	

Gene Symbols	マススクリーニング	ケトン体代謝異常	糖原病
CPT1B		CPT1B	
CPT1C		CPT1C	
CPT2	CPT2	CPT2	
CRAT		CRAT	
CROT		CROT	
DBT	DBT		
DECR1		DECR1	
DLD	DLD		
ECHS1		ECHS1	
ECI1		ECI1	
ENO3			ENO3
EPM2A			EPM2A
EPM2B			EPM2B
ETFA	ETFA		
ETFB	ETFB		
ETFDH	ETFDH		
FBP1			FBP1
G6PC			G6PC
GAA			GAA
GALE	GALE		
GALK1	GALK1		
GALT	GALT		
GAPDH			GAPDH
GBE1			GBE1
GCDH	GCDH		
GCH1	GCH1		
GCK			GCK
GK2			GK2
GPD1			GPD1
GPD2			GPD2
GSK3B			GSK3B
GYG1			GYG1
GYS1		GYS1	GYS1
GYS2		GYS2	GYS2
GYS2		GYS2	GYS2

Gene Symbols	マススクリーニング	ケトン体代謝異常	糖原病
HADH		HADH	
HADHA	HADHA	HADHA	
HADHB	HADHB	HADHB	
HCFC1	HCFC1		
HIBADH		HIBADH	
HIBCH		HIBCH	
HK1			HK1
HLCS	HLCS		
HMGCL	HMGCL	HMGCL	
HMGCS2		HMGCS2	
HSD17B10	HSD17B10	HSD17B10	
IVD	IVD		
LDHA			LDHA
LDHB			LDHB
LMBRD1	LMBRD1		
LPIN1			LPIN1
MAT1A	MAT1A		
MCCC1	MCCC1		
MCCC2	MCCC2		
MMAA	MMAA		
MMAB	MMAB		
MMACHC	MMACHC		
MMADHC	MMADHC		
MTAP			MTAP
MTHFR	MTHFR		
MTR	MTR		
MTRR	MTRR		
MUT	MUT		
OXCT1		OXCT1	
PAH	PAH		
PCBD1	PCBD1		
PCCA	PCCA		
PCCB	PCCB		
PCK1			PCK1
PCK2			PCK2

Gene Symbols	マススクリーニング	ケトン体代謝異常	糖原病
PFKL			PFKL
PFKM			PFKM
PFKP			PFKP
PGAM2			PGAM2
PGK1			PGK1
PGM1			PGM1
PHKA1			PHKA1
PHKA2			PHKA2
PHKB			PHKB
PHKG1			PHKG1
PHKG2			PHKG2
PKLR			PKLR
PKM			PKM
PLCH2			PLCH2
PPP1R3B			PPP1R3B
PPP1R3C			PPP1R3C
PRKAG2			PRKAG2
PRKAG3			PRKAG3
PRKCA			PRKCA
PTS	PTS		
PYGB			PYGB
PYGL			PYGL
PYGM			PYGM
QDPR	QDPR		
RBCK1			RBCK1
SLC16A1		SLC16A1	
SLC16A10		SLC16A10	
SLC16A11		SLC16A11	
SLC16A12		SLC16A12	
SLC16A13		SLC16A13	
SLC16A14		SLC16A14	
SLC16A3		SLC16A3	
SLC16A4		SLC16A4	
SLC16A5		SLC16A5	
SLC16A6		SLC16A6	

Gene Symbols	マススクリーニング	ケトン体代謝異常	糖原病
SLC16A7		SLC16A7	
SLC16A8		SLC16A8	
SLC16A9		SLC16A9	
SLC17A3			SLC17A3
SLC22A5	SLC22A5	SLC22A5	
SLC25A13	SLC25A13		
SLC25A20	SLC25A20	SLC25A20	
SLC2A1			SLC2A1
SLC2A10			SLC2A10
SLC2A11			SLC2A11
SLC2A12			SLC2A12
SLC2A13			SLC2A13
SLC2A14			SLC2A14
SLC2A2			SLC2A2
SLC2A3			SLC2A3
SLC2A4			SLC2A4
SLC2A5			SLC2A5
SLC2A6			SLC2A6
SLC2A7			SLC2A7
SLC2A8			SLC2A8
SLC2A9			SLC2A9
SLC37A4			SLC37A4
SLC5A12		SLC5A12	
SLC5A6	SLC5A6		
SLC5A8		SLC5A8	
SPR	SPR		
TAZ	TAZ		

D. 考察

今回の複数のパネル遺伝子診断に向けた遺伝子解析システムの本邦での稼働は、先天性代謝異常症の迅速な確定診断に確実に結実すると考えられる。疾患発症原因の特定は、あるケースには患者様の QOL の改善につながる事が代謝異常症では知られているので、この体制での検査体制の確立は一刻も早く実現しなければいけない課題であると考えられる。同時に、もしこれらの遺伝子検査が診療に有益であるとすれば、医療経済的にこれらの検査が十分に採算が取れる形で実現されなければならない。次世代シーケンシングの利用によって、これまでのキャピラリーシーケンシングよりは格段の低コスト化が実現できはするものの、その技術は欧米に依存しており、解析コストのほとんどが欧米メーカーの一存に委ねられている現状を変えていく必要がある。今後遺伝子解析が現実の診療現場で活かされる可能性の高さを考えると、本分担研究においても、先天性代謝異常症をモデルケースとしてどれだけ低コストで正確な遺伝子検査が実現できるかという問題を追及する必要がある。

E. 結論

本研究班に属される先天性代謝異常症の専門医の方々の経験に基づき、複数の遺伝子診断のための遺伝子パネルのデザインが出来上がった。その遺伝子群を一括して配列解析するためのアンプリコンシーケンシングの準備と予備検討もケトン体代謝異常

症パネルとマススクリーニング用パネルに関してはほぼ終了した。残りのパネルについても解析に用いる多数のオリゴマーの設計は終わり、予備検討に移行しつつある。更に、これらの複数のパネルを一挙に解析するためにハイブリダイゼーションによるアプローチのためのプローブデザインとそれらの合成も終了した。来年度からの実検査の稼働に向けて、ほぼ予定通りに技術的な準備を整えることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

小原 収. 遺伝子構造解析の現状とデータ解析アプローチ. 小児内科 46(10): 1545-1549, 2014.

2. 学会発表

1. ゲノミクスにおけるインベーションとイノベーション、小原収、第 18 回分子複合医薬研究会。2014 年 7 月 4 日
2. ヒト遺伝性疾患の構造バイオインフォマティクス、土方敦司、小原収、第 86 回日本遺伝学学会、2014 年 9 月 19 日
3. 臨床研究のための疾患遺伝子解析パイプラインの構築、小原収 第 56 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 20 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

別添1 倫理審査結果通知書

第3号様式(第10条)

平成27年1月9日

倫理審査結果通知書

研究責任者
技術開発研究部
部長 小原 收 様

かずさDNA研究所
所長 田畑 哲之 印

平成26年11月26日付けで申請のあった研究について、下記のとおり決定しましたので通知します。

記

審査事項	代謝系遺伝子パネルを用いた先天性代謝異常症の確定診断法の開発と、病態解明を目指す研究計画が、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に適合する研究であるかどうか
研究課題名	先天代謝異常症の遺伝子パネルを用いた診断に関する研究 研究計画書(平成26年11月26日作成)
研究実施の可否	(1) 承認 (2) 条件付承認 (3) 変更の勧告 (4) 不承認 (5) 非該当

(注) 本通知書には、倫理審査結果報告書(第2号様式)の(写)を添付するものとする。

第3号様式(第10条)

平成27年1月9日

倫理審査結果通知書

研究責任者
技術開発研究部
部長 小原 收 様

かずさDNA研究所
所長 田畑 哲之 印

平成26年11月5日付けで申請のあった研究について、下記のとおり決定しましたので通知します。

記

審査事項	先天性ケトン体代謝異常症の患者の臨床所見と遺伝子異常の関連を検討し、病態解明や治療法の開発を目指す研究計画が、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に適合する研究であるかどうか
研究課題名	先天性ケトン体代謝異常症の診断と遺伝子解析に関する研究 研究計画書(平成26年11月5日作成)
研究実施の可否	(1) 承認 (2) 条件付承認 (3) 変更の勧告 (4) 不承認 (5) 非該当

(注) 本通知書には、倫理審査結果報告書(第2号様式)の(写)を添付するものとする。

新しい新生児マススクリーニングの現状に関する研究 および脂肪酸代謝異常症に対するクリニカルクエスチョンの解明に関する研究

担当責任者 山口清次 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

タンデムマス・スクリーニング時代における、患者コホート、精度管理システム、および妥当性に関する研究を行った。診療技術の向上や診療技術の地域格差是正、患者QOLの向上、および行政サービスの向上等のためにもこれらの枠組みや継続的な取り組みは必須である。患者コホートは悉皆性を高めるための取り組みを続ける必要がある。精度管理体制については外部精度管理にくわえて内部精度管理支援を含めた体制を構築することが望まれる。二次対象疾患と分類されているCPT-2欠損症については技術の向上により一次対象疾患とする事が強く望まれる。

脂肪酸代謝異常症におけるカルニチン投与の是非を明らかにするための横断的調査での実態調査は、本研究班のテーマである診療ガイドラインの質を高めるためにも明らかにすべき課題であり、本研究で計画した国内の患者におけるガイドライン改定におけるエビデンスの強化につながる事が期待される。

協力者

高柳正樹（千葉こども病院小児救急総合診療科）

小林弘典（島根大学小児科助教）

長谷川有紀（島根大学小児科助教）

A. 研究目的

タンデムマス法で発見される疾患の頻度は、国内のパイロット研究によると、個々の疾患は数万ないし200万出生に1人以下の頻度で、二次対象疾患を含めると、対象疾患全体としては約9千人に1人と推定されている。いずれも超稀少疾患であり、その自然歴、最適な治療法、治療効果、およびタンデムマス導入による臨床的、医療経済的効果について不明な点が多い。また、一部では新生児マススクリーニング(NBS)の結果が出る前に急性発症して死亡する児や、NBSをうけて発見されたにも関わらず、後に発症する症例も知られている。

NBSは公的事業であり、それが小児の障がい発生防止に効率的に貢献しているかどうかの評価が必要である。本研究では、タンデムマスで発見された患者の正確な頻度、自然歴、臨床的効果を明らかにするために、患者登録システムを検討する。また、現在行われているタンデムマス・スクリーニング(TMSスクリーニング)で診断される疾患で、乳児期に急性発症した国内の報告を集積しTMSスクリーニングのあり方について検討した。

脂肪酸代謝異常症はTMSスクリーニングの対象疾患群の一つであるが、超稀少疾患であるため、全国的に症例を集積して診療ガイドライン作成が望まれる。先天代謝異常学会が主導して脂肪酸代謝異常症の診療指針の策定をすすめているが、現時点では十分なエビデンスが得られず、エキスパートオピニオンが中心と

なっている面がある。

例えば、脂肪酸代謝異常症の治療におけるカルニチン投与の是非については、専門家の中でも議論がある。すなわち、カルニチンは脂肪酸をミトコンドリア内に輸送するために必須の物質であるが、 β 酸化異常症では、カルニチン投与によって基質となる長鎖脂肪酸の負荷が大きくなって悪化するという考え方があり、最近、欧米から発表されたエキスパートオピニオンでは長鎖脂肪酸代謝異常症におけるカルニチン投与は原則禁忌とされているが、マウスを用いた実験データ以外にはエビデンスは十分ではない。

そこで我々は、脂肪酸代謝異常症におけるカルニチン投与の是非を明らかにするために、多施設におけるカルニチン投与の無作為割り付け試験を行い、治療効果を明らかにする臨床研究を行うことを前提として、国内における脂肪酸代謝異常症患者におけるカルニチンの使用の有無、使用状況、患者の臨床症状を調査する。

B. 研究方法

1. 新しい新生児マススクリーニングの現状に関する研究

a) 患者コホート体制確立に関する研究

図1に示すように、NBSの実施主体である67自治体を対象にして本研究への協力を依頼し、TMSスクリーニングによって発見された患者の疫学調査を下記の方法に従い実施した。患者コホート研究全体としては自治体から収集した情報をもとに、診断した医療機関等への追跡調査を行う予定であるが、現時点では医療機関からの回答の収集・解析が出来ておらず、自治体から得られたデータのみを用いて検討を行った。

本コホート研究は島根大学医学部、医の倫理委員会による承認（通知番号1622号）を受けて実施した。

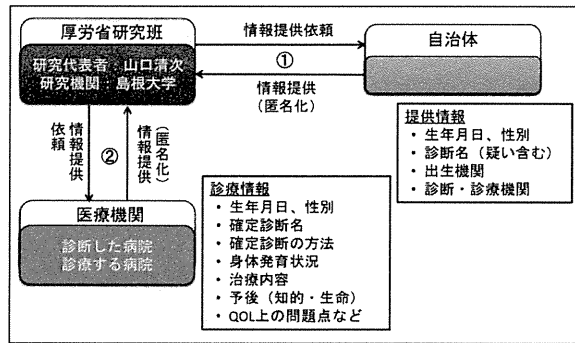


図1. 患者登録・コホート体制

b) タンデムマス・スクリーニングで発見される患者数の検討

2014年度からTMSスクリーニングが全国実施となった。研究する患者数を把握するために、わが国で1997～2012年に行われたTMSスクリーニングのパイロットスタディーの結果と、2012年、2013年の患者発見状況を調査した。

c) タンデムマス対象疾患の発症症例の検討

TMSスクリーニングの課題を検討することを目的として、対象疾患のうち急性脳症あるいは突然死で乳児期に発症した症例を収集して、発症時の年齢、発症形態、発症時の臨床背景、タンデムマス・スクリーニングの結果、転帰を検討した。

2. 脂肪酸代謝異常症患者に対するカルニチン投与の実態調査

図2示すような体制で、これまでにわが国で診断された脂肪酸代謝異常症の症例を、調査表を用いたアンケート調査を計画した。調査表は、島根大学小児科でこれまでに確定診断に関与した症例の主治医、および日本先天代謝異常学会宛てに送付し、本研究への協

力を要請した。本研究は横断的な調査であり、患者個人情報には取り扱わない事とした。

以上の調査を、島根大学医学部小児科(研究事務局)から、発送し集計する。本研究において、島根大学では各依頼先で匿名化された情報のみを取り扱い、患者を特定できる個人情報は扱わない。収集された調査票等は島根大学小児科で研究期間終了時まで保管し研究終了時に破棄する事とした。脂肪酸代謝異常症と確定診断されている各症例について下記の項目について調査を行う。

- ① 診断名
- ② 性別
- ③ 体重
- ④ 現在の治療内容および治療量
- ⑤ 過去の治療でカルニチンを使用した経験の有無、中止した場合はその理由
- ⑥ 遊離カルニチン値の定期的モニタリングの有無、有りの場合はその頻度
- ⑦ 最後に確認した遊離カルニチン値

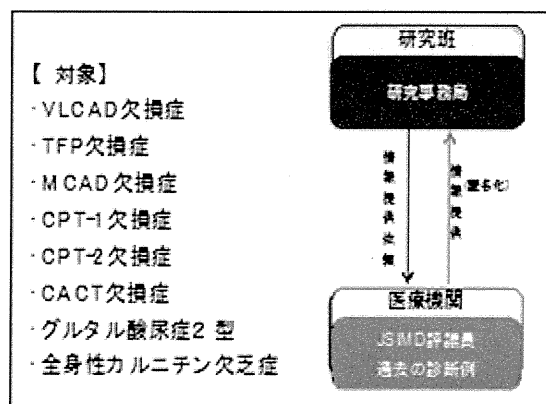


図2. カルニチン投与の実態調査計画

C. 研究結果

1. 新しい新生児マススクリーニングの現状に関する研究

a) 患者コホートに関する研究

タンデムマス・スクリーニングは2014年度から実施率が100%になったが、今回調査を行った2013年度は95.7%であった(図3)。調査票を発送した67自治体のうち54自治体(80.6%)から回答を得た。2013年度の発見患者数は、2015年1月末の時点で68例であった。このうち9例についてはタンデムマス・スクリーニング対象疾患ではないものが含まれていた。

b) タンデムマス・スクリーニングで発見される患者数の検討

1997～2012年の約195万人を対象としたパイロット研究によると、TMSスクリーニングの患者発見頻度は9千人に1人であった。TMSスクリーニングが普及し始めた2012年に1.4万人に1人、2013年に1.1万人に1人であった(表1)。

c) タンデムマス対象疾患の発症症例の検討

乳児期に突然発症して、乳児突然死症候群や急性脳症に類似した症状で発症した症例を5例収集した。表2に示すように、5例はいずれもカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II(CPT2)欠損症であった。発症年齢は7ヶ月から1歳1ヶ月であった。このうちTMSスクリーニングが始まっていなかった自治体での症例は2例、始まっていながら診断されなかった症例が2例であった。CPT2欠損症が2次対象疾患のため検査対象とされていなかった症例が1例あった。5例はいずれも感染症(発熱)を契機に急性発症し、5例中4例が初回のエピソードで死亡し、1例は救命されたが重症心障害児となった。

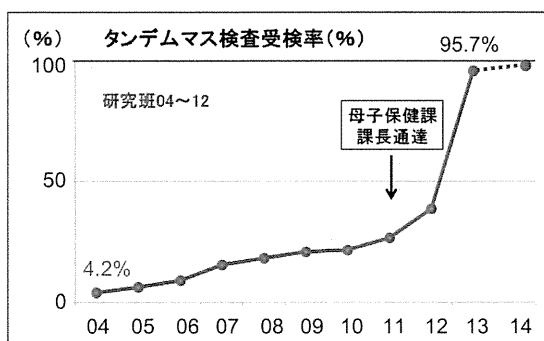


図3. タンデムマス・スクリーニングの普及率の変化
2014年度より100%に普及した

表1. タンデムマスの普及と患者数の発見率の変化

	平成24年度		平成25年度		1997-2012 パイロット
	人	頻度	人	頻度	頻度
PKU	20	55 k	25	43 k	1: 53 K
MSUD	3	365 k	3	263 k	1: 1,950 K
HCY	1	1,095 k	4	212 k	1: 650 K
Cit-1	1	583 k	2	432 k	1: 330 K
ASA	0	—	1	842 k	1: 980 K
MMA	1	583 k	6	144 k	1:110K
PROP	8	72 k	15	65 k	1:45 K
IVA	0	—	1	842 k	1:650 K
MCC-d	1	583 k	3	274 k	1:150 K
HMGL-d	0	—	0	—	—
MCD	0	—	0	—	1:650 K
GA1	0	—	3	274 k	1:280 K
MCAD-d	5	116 k	4	216 k	1: 390 K
VLCAD-d	0	—	9	93 k	1: 160 K
TFP-d	1	583 k	1	842 k	1: 110 K
CPT1-d	0	—	1	842 k	1: 980 K
	41	14K	78	11K	217/195万

表2. タンデムマス対象疾患で突然死または急性脳症で発症した症例

No.	TMSスクリーニング	発症時期	契機	転帰	最終診断
1	偽陰性	生後7か月	発熱	重症心身障害	CPT2欠損症
2	偽陰性	生後8か月	発熱	突然死	CPT2欠損症
3	2次疾患として処理	生後8か月	発熱	突然死	CPT2欠損症
4	開始前	生後9か月	発熱	突然死	CPT2欠損症
5	開始前	生後1才か月	発熱	突然死	CPT2欠損症

2. 脂肪酸代謝異常症患者に対するカルニチン投与の実態調査

平成27年2月に、島根大学医学部医の倫理委員会の

承認(倫理審査承認通知番号: 第1748号)を受け、3月以降に調査表を発送予定である。

D. 考察

TMS スクリーニングが 2014 年から全国規模で始まった。この事業が効率的に貢献するためには、患者の全数登録、コホート体制が不可欠である。2014 年度内に倫理委員会で承認を受けて全国自治体を対象に匿名化した患者の情報を調査した。2015 年 1 月時点で約 80%の参加率であり、来年度までには 100%に達することが予想される。100%に達した後、臨床データが蓄積されることによって、重症度別患者頻度、さらに患者の生活実態、治療法、転帰、或いは地域格差なども明らかにすることが期待される。さらに遺伝子変異の特徴を明らかにする研究、稀少疾患の治療法向上のための研究にも役立つ、結果として患者家族の QOL 向上にも役立つことが期待される。NBS 実施主体の自治体や社会全体に本研究の有用性を周知理解を求める必要がある。

今回の研究によって、発見患者数・患者頻度は、パイロットスタディーのそれに比べて低い傾向がみられた。この理由として、パイロットスタディーに参加していた検査機関は TMS 対象疾患に精通した施設が多く、診断に到達しやすかったことが考えられる。公的事業として始めると必ずしも全ての検査機関が精通しているわけではない可能性がある。今後継続的な研修体制として、偽陰性（見逃し）や偽陽性の少ない精度の高い検査レベルを維持する必要がある。

TMS 対象疾患のうち乳児期に急性発症した症例を 5 例収集した。これらはすべて CPT2 欠損症であった。現在 CPT2 欠損症は TMS スクリーニングで見逃し例が多かったことから 2 次対象疾患となってきた。早急診断指標を検討して 1 次対象疾患にして障害発症予防措置がとられるべきである。またこの他に、全身性カルニチン欠乏症も日本人では比較的頻度が高く治療による効果が明らかな疾患である。低栄養児などにおける偽陽性率の高さから 2 次対象疾患にされているが、1 次対象疾患にすべく引き続き検討する価値がある。

本研究において、クリニカルクエスションとして、TMS スクリーニング対象疾患の脂肪酸代謝異常症の治療として、カルニチン投与の安全性、有効性について研究を計画している。カルニチンはβ酸化の基質を供給するために、長鎖脂肪酸をミトコンドリアに転送する役割を持っている。脂肪酸代謝異常症患者に投与した時、ミトコンドリア内に蓄積した異常代謝産物を排出して代謝を改善するか、あるいは反対に、基質を供給することによってβ酸化に対して負荷になって悪化させるといった意見があり、現時点では世界的にコンセンサスが得られていない。これまで日本で診断された脂肪酸代謝異常症の患者の主治医や学会評議員等を対象にして、臨床経過をアンケート調査してエビデンスを出してゆきたい。このため今年度は倫理委員会の承認を受け、調査用紙など研究体制を整えたところである。カルニチン投与と骨格筋症状や心筋症状の関連性が明らかになれば、エビデンスに基づいた治療法確立が期待される。

E. 結論

TMS スクリーニングを導入した新しい NBS 時代に入った。この事業が広く国民の福祉に貢献するためには、これまでおろそかになっていた患者登録、コホート体制を確立することが不可欠である。今年度は現時

点で約 80%の全国自治体に参加していただいている。来年度は 100%の自治体の協力が得られるように努力して悉皆性のあるコホート体制を目指す。さらに TMS スクリーニングの 2 次対象疾患となっている CPT2 欠損症は乳児期に突然死、急性脳症で急性発症することの多い疾患であり、1 次対象疾患としてスクリーニングする必要がある。

さらに、本研究ではいくつかのクリニカルクエスションを立てて、エビデンスを出して診療レベル向上を図る。今年度脂肪酸代謝異常症に対するカルニチン投与の是非についてエビデンスを出す研究計画を立てた。国内で発見された患者の横断的実態調査によってガイドライン改定におけるエビデンスの強化につながる事が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in HADHB, which encodes the β-subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- 2) Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H: Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(2): 175-181, 2014 (May)
- 3) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A: Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)
- 4) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development*, inpress
- 5) 坊岡美奈, 比嘉明日美, 津野嘉伸, 熊谷健, 奥谷貴弘, 吉川徳茂, 城道久, 太田菜美, 八木重孝, 南佐和子, 井籠一彦, 山田健治, 山口清次: 胎児心不全で発症したミトコンドリア三頭酵素欠損症の 1 例. *日本周産期・新生児医学学会雑誌* 50(3): 1015-1021, 2014 (9 月)
- 6) 山口清次: 新しい新生児マススクリーニング: 周産期医療スタッフの役割. *日本周産期・新生児医学学会雑誌* 50(4): 1213-1216, 2015 (1 月)

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic disease. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014
 - 2) Yamaguchi S: Current topics in mass screening and collaboration studies with Asian countries. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014
 - 3) 坊 亮輔, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 管理に難渋している CPT-2 欠損症の 4 か月女児例. 第 93 回山陰小児科学会. 米子, 2014 年 9 月
 - 4) 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, 坊亮輔, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸代謝異常症の診断におけるろ紙血および血清アシルカルニチンプロファイルの差異に関する検討. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月
 - 5) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭: HIBCH 欠損症の同定と変異タンパク質の生化学的解析. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月
 - 6) 李知子, 鶴田悟, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 飯島一誠, 竹島泰弘: 黄疸を契機に診断に至った全身性カルニチン欠乏症の一例. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他

先天代謝異常症患者登録制度の運用とその研究利用について

担当責任者 奥山虎之（独）国立成育医療研究センター臨床検査部 部長

研究要旨

日本先天代謝異常学会が運用する患者登録制度（JaSMIn & MC-bank）の現状と問題点について検討した。登録患者数は700名以上で疾患数は40疾患以上であった。登録データを利用した研究も複数認められた。登録制度の立ち上げに協力をいただいた患者会への還元として、患者会フォーラムを開催した。登録患者数は全数登録に近い小児慢性特定疾患登録患者数と比較し、全体として4割程度であることが判明した。今後は、全数登録に近い登録数の確保を目指す方策が必要である。

協力者

徐 朱玟 （（独）国立成育医療研究センター 臨床検査部）
二階堂 麻莉 （（独）国立成育医療研究センター研究所 バイオバンク バイオリソース倫理室）

A. 研究目的

先行研究で確立した先天代謝異常症患者登録制度（JaSMIn & MC-bank）は、現在日本先天代謝異常学会の患者登録委員会が運用主体となり継続している。この登録制度は、患者本人あるいは保護者が自ら登録を行う自己登録制度であり、匿名化のプロセスがない実名による登録を前提としている。さらに、患者家族会の全面的な協力を得て登録事業を進めている。本研究の目的は、先天代謝異常症患者登録制度の登録状況と各種研究等への利活用状況を把握すること、全数登録に近い小児慢性特定疾病での登録数と比較し、全数登録に近づけるための方策を検討することである。

B. 研究方法

先天代謝異常症患者登録制度（JaSMIn & MC-bank）の登録状況を疾患別に調査・集計した。また、JaSMIn 患者リストを用いた研究を学会や論文発表から検索した。さらに、小児慢性特定疾患登録データをもとに、代表的疾患で登録数の比較を行った。

C. 研究結果

1. 先天代謝異常症患者登録制度（JaSMIn & MC-bank）の登録状況について
JaSMIn に登録された疾患と疾患別患者数を表1に

示す。疾患は、40疾患以上で、合計登録患者数は、昨年10月の段階で713名であった。

2. 先天代謝異常症患者登録制度（JaSMIn & MC-bank）を用いた研究状況
今年度、3件の学会発表が実施された。また、JaSMIn 登録患者データを利用した研究計画が本研究事業の中でも来年度実施される予定である。
3. 小児慢性特定疾患登録患者数との比較
比較的頻度の多い代表的な先天代謝異常症5疾患（フェニルケトン尿症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、メチルマロン酸血症、ムコ多糖症、副腎白質ジストロフィー）について登録患者数を比較検討した。表2に示すように、いずれの疾患でも JaSMIn 患者登録数は、小児慢性特定疾患の半数以下であった。小児慢性特定疾患登録患者数は、上記5疾患で616名、これに対して JaSMIn 登録患者数は257名、これは41%に相当した。
4. 第3回先天代謝異常症患者会フォーラムの実施
登録制度の立ち上げにおいて全面的な協力を得た患者会への還元として、第3回先天代謝異常症患者会フ

フォーラムを2014年11月9日に開催した。フォーラムでは、MC-bankの登録状況だけでなく、研究利用の現状や、治療法の進歩に関する最新の情報の紹介も行った(別紙)。

表1. JaSMIn の患者登録数 (2014年10月集計)

疾患群	疾患名	登録数
尿素サイクル異常症	アルギニノコハク酸尿症	7
	OTC欠損症	30
	シトルリン血症	11
	シトルリン欠損症	52
	NAGS欠損症	1
アミノ酸代謝異常症	CPS1欠損症	3
	フェニルケトン尿症	93
	BH4欠損症	2
	ホモシスチン尿症	6
	メーブルシロップ尿症	6
ペルオキシゾーム病	OAT欠損症	2
	副腎白質ジストロフィー	32
有機酸代謝異常症	グルタル酸血症	6
	メチルマロン酸血症	26
	プロピオン酸血症	13
	イノ昔草酸血症	2
	L-2ヒドロクシングタル酸尿症	1
	3-ヒドロキシシ-3-メチルグルタル酸血症	1
	3-メチルクロトニル-CoAカルボキシラーゼ欠損症	4
脂肪酸代謝異常症	VLCAD	3
	MCAD	2
	CPT欠損症	3
	TFP欠損症/LCHAD	1
ライゾゾーム病	ムコ多糖症	76
	ムコリビドーシス	4
	Pompe病	29
	Fabry病	37
	ニーマンピック病C型	8
	Gaucher病	28
	GM1,GM2ガングリオシドーシス	9
	異染性白質ジストロフィー	12
	ガラクトシアリドーシス	1
	クラッペ病	1
糖質代謝異常症	glut-1欠損症	12
	糖原病(Pompe病以外)	23
金属代謝異常症	Menkes病	5
	Wilson病	75
ミトコンドリア病	Leigh脳症、MELAS、PDHC異常症の他	84
その他	診断名未確定	2
	合計	713

表2. JaSMIn と小児慢性特定疾病における登録患者数比較

疾患名	JaSMIn (2014年10月現在)	小児慢性特定疾病 (2013年登録者数)
フェニルケトン尿症	93	235
OTC欠損症	30	78
メチルマロン酸血症	26	74
ムコ多糖症	76	154
副腎白質ジストロフィー	32	75
	257	616

D. 考察

日本先天代謝異常学会が主導する先天代謝異常症患者登録制度(JaSMIn & MC-bank)は、登録患者数が700名を超えている。短期間でこれだけの登録数を獲得できた背景には、多数の患者会の協力があつたことは指摘できる。

JaSMInは、患者あるいはその保護者が、個人を特定できる情報と疾患の臨床情報とともに登録するシステムである。登録の際に、氏名・住所などの個人を特定できる情報が、患者登録委員会の委員に共有されることについての同意を患者あるいはその保護者から得ているため、研究者は、先天代謝異常症患者を対象とした調査研究などを効率よく行うことができる。

一方、登録患者数が十分でなければ、研究利用に適したデータベースとは言えない。これに対して、小児慢性特定疾病登録事業は、医療費助成の対象となることもあり、ほぼ全数の患者が登録する全数登録に近い患者登録制度である。今回、JaSMIn登録患者数を小児慢性特定疾病登録と比較したところ、多くの疾患でJaSMIn登録数は、小児慢性特定疾病登録患者数の40%前後であることが判明した。

今後、JaSMInの登録数を増やすことを検討する必要性が示された。

E. 結論

先天代謝異常症患者登録制度(JaSMIn & MC-bank)の研究利用における有用性を示唆する結果が得られた。今後は、登録数をより増やす方策を検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
 - 1) 中島英規、前田堂子、鈴木恵美子、渡辺倫子、小須賀基通、奥山虎之、重松陽介、原田正平. 二次検査応用に向けた LC-MS による疾患マーカー分子分離分析系確立. 第 41 回日本マススクリーニング学会. 広島、2014.8.23
 - 2) 徐ジュヒョン、二階堂麻莉、奥山虎之. 先天代謝異常症患者登録制度『JaSMIn & MC-bank』の構築の運用. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014.11.15
 - 3) 清水教一、小川絢子、三寫典子、小西弘恵、徐ジュヒョン、奥山虎之、青木継稔. MC-Bank 登録患者からみた日本人 Wilson 病患者の実態に関する検討. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014.11.15
 - 4) 中島英規、原田正平、石毛信之、穴澤昭、小須賀基通、藤本純一郎、山口清次、重松陽介、奥山虎之. 新生児マススクリーニングにおける LC-MS による二次検査法開発. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014.11.14

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

第3回

先天代謝異常症 患者会フォーラム

お互いの状況を知り合い、より良い未来に向けて手をつなぎましょう

2014.11.9 (日)
10:00～16:00



【第1～2部】10:10～12:10

- 先天代謝異常症患者登録制度『JaSMIn』
- 登録情報の利用(ムコ多糖症/Wilson病/尿素サイクル異常症/Fabry病/副腎白質ジストロフィー)
- 海外での新薬開発における患者登録情報の利用と患者会の役割

【意見交換会】12:20～13:50

- ラウンドテーブルディスカッション
昼食をいただきながら、テーブルごとに決められたテーマについて、参加者同士で意見を交換します。

【第3部】14:00～14:50

- ポスターセッション
先天代謝異常症臨床情報バンク『(旧)MC-Bank』解析結果を各担当者がポスターの前で報告します。
報告対象疾患：計17疾患(ムコ多糖症/Pompe病/Fabry病/副腎白質ジストロフィー
尿素サイクル異常症/有機酸代謝異常症/Krabbe病/異染性白質ジストロフィー
ニーマンピック病C型/glut-1欠損症/Wilson病/Gaucher病/GM1,GM2-ガングリオシドーシス
フェニルケトン尿症/小児神経伝達物質病/シトリン欠損症/脂肪酸代謝異常症)

【第4部】15:00～15:50

- 総合討論 & みんなでリラクゼーション
- *本プログラムは当日の都合により変更される可能性があります。ご了承ください。

会場参加
要事前申し込み
先着200名/参加費1000円



事前参加
申し込み
方法

日本先天代謝異常学会ホームページ http://jsimd.net/JaSMIn_MC-Bank.html

- ①【参加申込書】に必要事項を記入し、先天代謝異常症患者会フォーラム事務局にお送りください。(メール/FAX/郵送、どちらでも可能)
- ②会場参加/インターネット参加、どちらも【参加申込書】による事前登録が必要です。
- ③【参加申込書】は、先天代謝異常症患者会フォーラム事務局または日本先天代謝異常学会ホームページ(上記)から入手可能です。
- ④参加登録の締め切りは10月末日までです。

先天代謝異常症患者会フォーラム事務局
 担当：徐 朱玫(そしゆひよん)
 二階堂 麻利(にかいどうまり)
 (独)国立成育医療研究センター 臨床検査部
 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1
 TEL: 03-3416-0181 (内線 7736)
 FAX: 03-6734-1946
 E-mail: jasmin-mcбанк@ncchd.go.jp

主催：患者会フォーラム実行委員会

共催：成育医療研究開発費「成育希少疾患の症例登録と遺伝学的診断に関する研究」(研究代表者：深見真紀)

厚生労働科学研究委託業務難治性疾患等克服研究事業「新生児タンタムスクリーニング対象疾患の診療ガイドライン改訂、診療の質を高めるための研究」(研究代表者：深尾敏幸)

厚生労働科学研究委託業務難治性疾患等克服研究事業「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」(研究代表者：村山圭)
成育代謝異常症研究会(代表世話人：奥山虎之)

尿素サイクル異常症

担当責任者 遠藤文夫 熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野 教授

研究要旨

OTC 欠損症や CPS1 欠損症などの尿素サイクル異常症に対する治療として、近年シトルリン内服が導入されるようになった。シトルリン内服はアルギニン内服に代わりうる治療法であるが、我が国の治療の現状に関する報告はない。我々は日本におけるシトルリン治療の現状についてアンケート調査を行った。

協力者

中村公俊 熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野 准教授
松本志郎 熊本大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター 講師

A. 研究目的

尿素サイクルは主に肝臓においてアンモニアから尿素を産生する経路であり、オルニチン、シトルリン、アルギニノコハク酸、アルギニンの4つのアミノ酸から構成されている。この代謝過程の先天性な異常が尿素サイクル異常症である。尿素サイクル異常症では、窒素の排泄が減少し、高アンモニア血症を示す。OTC 欠損症や CPS1 欠損症などの尿素サイクル異常症に対する治療として、近年シトルリン内服が導入されるようになった。シトルリン内服はアルギニン内服に代わりうる治療法であるが、我が国の治療の現状に関する報告はない。我々は日本におけるシトルリン治療の現状についてアンケート調査を行った。

B. 研究方法

先天代謝異常学会から食品としてのシトルリンを供給している25施設（大学病院8施設、こども病院8施設、その他9施設）にたいして、担当医を対象としたアンケート調査を行った。そのなかで、患者背景（年齢、疾患名、発症時期）、シトルリン（投与量、開始時期）、症状、検査データ（AST、ALT、アンモニア）、治療（蛋白負荷量、アルギニン投与量、安息香酸ナトリウム投与量）について調査した。本研究は熊本大学倫理委員会の承認

C. 研究結果

対象となった患者数は1990年10月～2014年2月までにシトルリンを投与された尿素サイクル異常症患者60名で回答率は73%であった。その結果、解析対象となった患者数は44名であった。疾患別の内訳は OTC 欠損症男性14名、OTC 欠損症女性19名、CPS1 欠損症10名であった。（1名は疾患名不明）シトルリンの平均投与量は OTC 欠損症男性 88.6±

59.6mg/kg/d、OTC 欠損症女性 115.9±34.2mg/kg/d、CPS1 欠損症 108.0±65.0mg/kg/d であった。OTC 欠損症男性5名、OTC 欠損症女性3名、CPS1 欠損症2名が肝臓移植を受けていた。シトルリン投与の結果、OTC 欠損症男性では有意な体重増加(+1.0SD)、アンモニア値の減少(-61μg/dl)、摂取タンパク量の増加(0.2g/kg/d)、アルギニン投与量の減少(-136mg/kg/d)を認めた。また、臨床症状や検査値の改善を認めた。嘔吐を示す患者の中では38%に嘔吐回数の減少がみられた。また、血清ASTは19%に改善を認めた。

D. 考察

尿素サイクル異常症の薬物治療として、蛋白異化を抑制するため、ブドウ糖電解質液の十分な輸液(60-100kcal/kg/d)、高血糖の際はインスリンを併用、同時に alternative pathway を用いた窒素の排泄の促進が試みられる。薬物治療として、アルギニンとシトルリン、安息香酸ナトリウムやフェニル酪酸ナトリウムなど使用される。今回の調査では、シトルリン投与後に、嘔吐の頻度、高アンモニア血症が改善し、蛋白摂取量が増加した。また体重のSDスコアが改善した。シトルリンはアンモニアの排泄とアルギニン補充の作用が考えられるため、全身状態の改善や体重の増加につながっていると考えられた。尿素サイクル異常症では、安息香酸ナトリウムやフェニル酪酸ナトリウムの投与、血液透析、食事療法やアミノ酸療法など様々な治療が試みられる。シトルリンを投与することによって尿素サイクル異常症の治療効果をさらに高める可能性が考えられる。

E. 結論

は日本におけるシトルリン治療の現状についてアンケート調査を行ったところ、シトルリン投与後、嘔吐の頻度、高アンモニア血症が改善し、蛋白摂取量が増加していることが明らかになった。また体重のSDスコアが改善していた。シトルリンを投与することによって尿素サイクル異常症の治療効果をさらに高めることが考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

Nakamura K, Kido J, Mitsubuchi H, Endo F
Diagnosis and treatment of urea cycle disorders
in Japan. *Pediatr Int.* 56, 506-509 (2014)

Fujisawa D, Mitsubuchi H, Matsumoto S, Iwai M,
Nakamura K, Hoshide R, Harada N, Yoshino M, Endo
F Early intervention for late-onset ornithine

transcarbonylase deficiency. *Pediatrics
International* (2015 in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他