

厚生労働行政推進調査事業費補助金
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

**新生児マススクリーニングのコホート体制、
支援体制、および精度向上に関する研究**

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口清次

平成 29 (2017) 年 3 月

(3 年目)

目 次

・ 総括研究報告

| | |
|--|---|
| 新生児マススクリーニングのコホート体制、支援体制、および精度向上に関する研究 (研究代表者：山口清次) | 3 |
|--|---|

・ 分担研究報告

| | |
|---|----|
| 1 . マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究 (分担：山口清次) --- | 13 |
| 1) 広島地域の発見症例 / 脂肪酸代謝異常症 3 疾患の診断実績 但馬 剛 | 26 |
| 2) コンサルテーション体制確立に関する取り組み、および患者コホート体制確立に関する 枠組みづくり 小林弘典 | 30 |
| 3) CPT2 酵素欠損症等疾患と突然死の関連について 高柳正樹 | 35 |
| 4) 遺伝子診断パネル運用システム 深尾敏幸 | 38 |
| 2 . マススクリーニング検査精度向上に関する研究 (分担：重松陽介) | 43 |
| 1) タンデムマス検査実施状況調査報告 (平成 27 年度検査結果) 花井潤師、福士 勝、石毛信之、田崎隆二 | 49 |
| 2) タンデムマス検査データ Web 解析システムの有用性について 花井潤師、福士 勝、石毛信之、田崎隆二 | 54 |
| 3) 東京都における LC-MS/MS 法を用いた二次検査法の検討 (第二報) 石毛信之、花井潤師、福士 勝、田崎隆二 | 57 |
| 4) 新生児スクリーニングの検査精度向上に寄与する外部精度管理の検討 - 日本マススクリーニング学会検査施設基準及び検査実施基準との関連で - 福士 勝、花井潤師、田崎隆二、石毛信之、但馬 剛、小林弘典、稲岡一孝、 星山慶子、川口耕一 | 61 |
| 3 . 外部精度管理体制の確立に関する研究 (分担：但馬剛) | 65 |
| 4 . 次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究 (分担：松原洋一) | 69 |
| 1) 愛知県における newborn SCID マススクリーニングの準備状況 小島勢二、小島大英、奥野友介、村松秀城、高橋義行 | 72 |
| 2) CPT2 欠損症の保因者頻度推定 呉 繁夫 | 76 |

| | |
|--|-----|
| 3) 原発性免疫不全症スクリーニングの現状と課題 | |
| 今井耕輔、寺田尚美、稲見有希、葉姿汶、山下基、森丘千夏子、満生紀子、 滝敦子、森尾友宏 ----- | 80 |
| 4) 脊髄性筋萎縮症における新児マススクリーニングの可能性 | |
| 斎藤加代子 ----- | 85 |
| 5. 治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究(分担:大浦敏博) ----- | 89 |
| 1) 日本人 PKU 患者の栄養状況について | |
| 岡野善行、大浦敏博、渡邊敏明、渡邊涼子、藤井里香、服部俊一、藤本浩毅、 野井香梨、岡本美紀、酒本和也、重松陽介、竹島泰弘、玉置知子 ----- | 96 |
| . 研究成果の刊行に関する一覧 ----- | 103 |
| . 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 107 |

研究課題

新生児マススクリーニングのコホート体制、支援体制、および精度向上に関する研究

研究代表者 山口清次（島根大学医学部特任教授）

研究要旨

タンデムマス（TMS）スクリーニング導入を機に、TMSスクリーニングのスムーズな導入と、新生児スクリーニング（NBS）体制の立て直しを目的として、以下の5つの分担研究、すなわち コンサルテーション・患者コホート体制に関する研究、スクリーニング検査精度向上に関する研究、外部精度管理体制の確立に関する研究、次世代のスクリーニングの在り方に関する研究、治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究を行い、今年度（2016年度）以下の成果を得た。

(1)患者全数登録コホート体制は、自治体の行政窓口を介する仕組みよりも、各自治体のNBS連絡協議会のメンバーが主体となって進める方が現実的であり、今後検討すべきである。

(2) TMS コンサルテーションセンターは年々定着し年間相談件数は100件前後であるが、さらにより広く周知して地域格差是正に貢献すべきである。

(3)長期追跡の意義を検討するために、今年度成人PKU患者の実態調査を行った。NBS開始後に診断された患者は、開始前の患者に比べて神経予後は明らかに良好であった。しかし、成人後に治療を中断して神経障害が出るケースが多いなど、成人後の診療体制が不十分なために起こる深刻な問題が提起された。

(4)TMSスクリーニングの臨床的効果を検証してゆくために、乳幼児突然死類似症状で発症した症例を収集したところ、CPT-2欠損症が20例中15例を占めた。TMSスクリーニングでは突然死の予防も重要な目的であり、CPT-2欠損症を一次対象疾患にして積極的に診断すべきである。

(5)NBS 対象疾患のテイラーメード治療を目的として genotyping を 2015 年 5 月以降(1 年 8 か月間) 62 例に行った。特に軽症型の病型の患者の治療についてエビデンスに基づいた診療が貢献することが期待される。

(6)検査施設における検査の実施状況を調査した。一次対象疾患の再採血率は0.31%、即精検率0.017%、総精検率は0.043%であった。偽陰性者を防ぐために一定の偽陽性率は、やむを得ないといわれている。偽陽性率は適正な範囲に入っていることが分かった。

(7)二次検査法として、LC-MS/MS による質量分析法を改変して非誘導体化サンプル処理でメチルマロン酸とホモシスチンを同時測定できる方法を開発した。これにより診断精度が向上するとともに、再採血の呼び出しを減らすことが期待される。

(8)TMS精度管理では、技能試験（PT試験）年3回と精度試験（QC試験）年1回が定着してきた。今年度、精度管理検体を外部委託した。精度が維持されコスト削減も期待される。

(9)各検査機関で測定したデータのweb自動解析システムを構築し、その有用性を検討した。各施設で、他施設とのデータの比較、患者データとの比較、カットオフ値の適正性などを、迅速・的確に評価できることが確認された。

(10)今後 NBS に導入を検討すべき疾患として、諸外国で検討されている原発性免疫不全症 (SCID) スクリーニングの情報を収集した。簡便な遺伝子検査である TREC 測定によって行われ、発症前に骨髄移植などの治療によって救命される。わが国では3施設 (名古屋大学、東京医科歯科大学、および国立成育医療研究センター) で検討されている。今後費用対効果等疫学的エビデンスによって導入が検討されるべきである。

(11) TMSスクリーニングによる発見頻度と、遺伝子変異から推定される発見頻度は必ずしも一致しない可能性がある。東北メディカルメガバンクにある全ゲノムシーケンズデータからCPT-2欠損症の疾患頻度を遺伝子変異から推定したところ、HMDBに記載されている遺伝子変異のみを対象として計算すると47万人に1人と計算され、島根大学小児科の患者変異リストに基づいて計算すると4.1万人に1人と計算された。TMS試験研究では28万人に1人であったが、CPT-2欠損症はNBSで見逃し例が多いことが知られ、臨床現場ではTMS試験研究のデータは低いという印象がもたれている。遺伝子変異からの頻度推定と、実際のスクリーニングでの頻度を比較することにより、TMSスクリーニングにおける疾患発見精度が検証できると思われる。

(12) 治療用特殊ミルクの安定供給が問題となっている。今年度米国のメディカル・フード制度について情報収集した。医療保険や償還の対象となっているが、その対象疾患、適応範囲は州によって異なっている。低たんぱく食品は患者家族の自己負担金の割合が多い傾向がある。わが国の治療用食品提供・支援体制構築に参考にして検討すべきである。

(13)PKU 患者の摂取している Phe 除去フォーミュラである A-1/MP- 1 の栄養素と微量元素、ビタミンについて検討したところ、ビオチン、セレン、およびマグネシウム、リン、ヨウ素、亜鉛の微量元素などが長期間の摂取で不足が起こりうる事が推測された。

研究分担者

重松陽介 (福井大学医学部客員教授)
 但馬剛 (国立成育医療研究センター研究所
 マスクリーニング研究室長)
 松原洋一 (国立成育医療研究センター研究所長)
 大浦敏博 (東北大学小児科非常勤講師)

A. 研究目的

2014年度より全国の自治体で新生児スクリーニング (以下、NBS) にタンデムマス (TMS) 法が導入され、今年度は3年目になる。TMS法のスムーズな導入とNBS体制の立て直しを目的として、本研究では、表1に示す分担研究を柱にして研究を進めた。

表1. 分担研究と研究分担者

| 研究分担 | 研究分担者 |
|-----------------------------|-------|
| 1. コンサルテーション・患者コホート体制に関する研究 | 山口清次 |
| 2. スクリーニング検査精度向上に関する研究 | 重松陽介 |
| 3. 外部精度管理体制の確立に関する研究 | 但馬剛 |
| 4. 次世代のスクリーニングの在り方に関する研究 | 松原洋一 |
| 5. 治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究 | 大浦敏博 |

B. 研究方法

1. 患者コホート・コンサルテーション体制に関

する研究

1) 患者登録コホート体制の検討

研究班で当初より続けている自治体を対象に2015年度の患者数と疾患の調査（一次調査）と、自治体から得られた診断医療機関の主治医を対象に患者の臨床所見を調査した（二次調査）。

2) TMS コンサルテーションセンター（TMS コンサルセンター）

TMS コンサルセンターにかかった2016年度の相談件数、内容等を調査した。

3) TMS スクリーニングの実施状況の調査

各地区のTMSスクリーニングの現状と課題を主だった自治体の中核医師を対象に調査した。

4) 成人PKU患者の実態調査

NBS事業における長期追跡の臨床的意義を確認する目的で、20才以上のPKU患者の生活実態について調査した。対象は、母子愛育会特殊ミルク事務局からアミノ酸またはペプチド粉末（A-1、またはMP-11）の供給されている患者の主治医に対して質問用紙で調査した。

5) TMS対象疾患のうち乳幼児突然死をきたした症例の収集

文献、学会報告、あるいはパーソナルコミュニケーションによって、乳幼児突然死をきたした症例を収集した。

6) TMSスクリーニングで発見された患者の遺伝子型の調査

TMSスクリーニングで発見された患者のうち同意の得られた症例について、次世代シーケンサーを用いた遺伝子型の解析を行った。

2. スクリーニング検査精度向上に関する研究

1) 検査施設における検査の実施状況の調査

NBS 検査及び TMS 検査の2016年度検査実施状況として、各スクリーニング実施機関に初回検査件数、再採血数、精検数、発見患者数などの調査を行った。一次対象疾患と二次対象疾患に分けて検討した。

2) 二次検査体制の構築と有用性の検討

ハイリスクスクリーニングにおけるアシルカル

ニチン分析法および LC-MS/MS 二次検査法の開発と有用性を検討した。

3. 外部精度管理体制の確立に関する研究

1) 技能試験（PT試験）と精度試験（QC試験）の体制の検討

外部精度管理をするための標準検体を作成しその有用性を検討した。

2) 精度管理データのweb自動解析システムの検討

TMS検査施設の外部精度管理の検査データのweb自動解析システムを構築し、その効果を検討した。

3) 精度管理合同委員会による精度管理体制の検討

日本マススクリーニング学会、NPO 法人タンドムマス・スクリーニング普及協会、国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室（以下 MS 研）の三者で構成する「精度管理合同委員会」を立ち上げその効果を検討した。

4. 次世代のスクリーニングの在り方に関する研究

1) 原発性免疫不全症スクリーニングの情報収集

名古屋大学と東京医科歯科で行っている基礎研究の実情を調査した。

2) 次世代シーケンサ（NGS）の応用の情報収集

将来NGSの導入の可能性について文献調査を行った。

3) 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定

東北メディカルメガバンクにおける健常人ゲノムコホート2049人を対象とし、その全ゲノムシーケンスデータからカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-2（CPT-2）欠損症の保因者頻度から患者頻度を推定した。

5. 治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究

1) 治療用特殊ミルク供給の諸外国の状況調査

諸外国のメディカル・フードの規制管理、種類、

供給体制、必要度、患者家族の負担の方法を調査した。

2) PKU 患者の摂取している栄養の問題の調査

現在 PKU 患者の栄養について、三大栄養素、微量金属、ビタミン類を評価した。血中セレン、ピオチン、あるいは尿中 3-ヒドロキシイソバレリン酸等について評価した。

C. 研究結果

1. 患者コホート・コンサルテーション体制に関する研究

1) 患者登録コホート体制の検討

(1) 一次調査 (自治体を対象): 2016 年度の調査 (2015 年度に発見された疾患と患者について) 自治体を対象にアンケート調査したが、協力可という回答率は 54%であった。(2015 年度調査は 63%)

(2) 二次調査 (医療機関を対象): 協力の得られた自治体の診療医療機関を対象として二次調査をしたところ 73 例 (回収率 100%) の情報が得られた (昨年は 96 例で回収率は 98%)

(3) 追跡調査: 2014 年に登録した患者のうち 10 例が発達遅滞を示した (昨年時点では 6 例が境界線以下の発達遅滞)。死亡例は、2 年目までに 3 例の死亡例が報告された (メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、TFP 欠損症)。3 年目の死亡例は 1 例のみであった (CPT-2 欠損症)。

2) TMS コンサルテーションセンター (TMS コンサルセンター)

2016 年度 (4 月 ~ 12 月) の相談件数は 67 件 (2015 年度は 12 か月間で 96 件) で、件数自体は例年と同程度であった。質問者は、小児科医が最も多く、次いで自治体関係者、病院事務部からの相談が続いた。内容は、診療に関するもの、精密検査の相談 (費用を含む) などが多かった。

3) TMS スクリーニングの各地区における実施状況

北海道地区、東北 6 県、新潟県、埼玉県、千葉

県、岐阜県、大阪市、兵庫県、広島県、福岡県、熊本県、長崎県、沖縄県の状況をアンケート調査した。TMS スクリーニング実施 (2014 年度) から 3 年目になり、年々軌道に乗りつつあることが分かった。

北海道と札幌市で市民向け小冊子 { 新生児マススクリーニングって何? } を発刊した。東北地区では中核医療機関が広域化していて青森県から仙台に受診する例がある。脂肪酸代謝異常症の確定診断の体制が十分でない。

新潟県から、検査機関または医療機関から家族への連絡システムがない、正しい採血手技の徹底が十分でないという課題があげられた。

兵庫県では、見逃し例の確認、正確な患者数の把握体制を検討中である。軽症例の治療指針が不十分であるなどが、課題としてあげられた。

この他、特殊検査 GC/MS 分析などの事務手続き、有機酸分析等の特殊検査の費用負担が明確になってない。行政担当者の移動に伴う連携がスムーズでないことがある、最終診断の確認体制が十分でない、などが課題として挙げられた。

4) 成人 PKU 患者の実態調査

対象 85 例で回収率は 100%であった。NBS 開始から 39 年目にあたるため、38 歳以上とそれ以下に分けて検討した。A 群 26 例 (20 ~ 25 才)、B 群 19 例 (26 ~ 31 才)、C 群 21 例 (32 ~ 37 才) および D 群 19 例 (38 才以上) の 6 年毎に 4 つのグループに分けた。

(a) 神経学的状況: NBS 開始前 (D 群) では、神経障害 (発達遅滞、境界域または精神疾患) が 19 例中 13 例 (68%) で、このうち発達遅滞は 6 例あった。開始後の群 (A ~ C 群) では神経障害は 66 例中 7 例 (11%) で、このうち発達遅滞は 1 例のみであった。

5) TMS 対象疾患のうち乳幼児突然死をきたした症例の収集

2016 年度までに計 20 例を収集した。内訳は、CPT-2 欠損症が 15 例で最も多く、次いで VLCAD 欠損症 2 例、MCAD 欠損症 2 例、およびグルタル酸血症 型 (GA2) が 1 例であった。20 例のうち TMS スクリーニングを受け

ていたのは3例のみで、それ以外はTMSスクリーニング開始以前の症例であった。

6) TMSスクリーニングで発見された患者の遺伝子型の調査

マススクリーニング対象疾患の genotyping を、2015年5月以降(1年8か月間)164例で行った。このうちガラクトース血症10例を除くとすべてTMSスクリーニング対象疾患であった。多かった疾患はプロピオン酸血症30例、メチルマロン酸血症17例、高フェニルアラニン血症15例、などであった。Genotyping のできたプロピオン酸血症のアレル22のうち16にPCCBのY435C変異が見い出された。そしてこの変異を持つ10例中8例はこの変異のホモ接合体であったが、少なくともこれらはすべてアシドーシス発作などの症状はなかった。

2. スクリーニング検査精度向上に関する研究

1) 検査施設における検査の実施状況の調査

TMS実施38施設中36施設(95%)から回答があった。初回検査件数は、全施設合計は983,765件であった。

(a)一次対象疾患:再採血数は3,064件(0.31%)、即精検数169件(0.017%)、再採血後精検数251件(0.026%)、総精検数420件(0.043%)であった。また、発見患者数は71例(調査時点)で発見頻度1:13,856であった。

(b)二次対象疾患:再採血数898件(0.09%)、即精検数36件(0.004%)、再採血後精検数42件(0.004%)、総精検数78件(0.008%)であった。また、発見患者数は9例で発見頻度1:109,307であった。

2) 二次検査体制の構築と有用性の検討

メチルマロン酸血症の鑑別診断法として、LC-MS/MSによる質量分析法を改変して非誘導体化サンプル処理でメチルマロン酸とホモシスチンを同時測定できる方法を開発した。これによりメチルマロン酸血症とホモシスチン尿症2型を効率的に鑑別できることを確認した。

またロイシン陽性者(メープルシロップ尿症疑

い)、アロイソロイシンの二次検査分析(昨年度報告済み)によって異化亢進状態での偽陽性を低減できることを確認した。

3. 外部精度管理体制の確立に関する研究

1) 技能試験(PT試験)と精度試験(QC試験)の体制の検討

2014~2015年度は日本赤十字社から入手した献血赤血球を洗浄後、各種指標物質を添加して、MS研で作製していた。2016年度から、測定キットや内部標準試薬を製造販売している国内専門業者に必要な仕様を提示し、試験用検体を外部委託した。納品された検体を検品した結果、新たに加えた指標についても、良好な測定値の得られることが確認された。コスト削減も期待される。

2) 精度管理データのweb自動解析システムの検討

TMS検査施設の外部精度管理、内部精度管理の検査データのweb自動解析システムを構築した。従来は各検査機関から送られたデータを主導で入力していたが、Web解析システム構築によって、他施設とのデータの比較、患者データとの比較、カットオフ値の適正性などを、各施設で迅速・的確に評価できることが確認された。

3) 精度管理合同委員会による精度管理体制の検討

「精度管理合同委員会」を2015年度に立ち上げた。2016年度からは年4回開催を定例化した。精度管理結果(PT試験3回、QC試験1回)を評価し、問題のあった施設の状況確認、と精度管理の方法の改善を進めた。

4. 次世代のスクリーニングの在り方に関する研究

1) 原発性免疫不全症スクリーニングの情報収集

原発性免疫不全症は放置されると致命的な疾患であり、約5万人に一人の頻度と考えられている。すでに米国をはじめとする諸外国では、簡便な遺伝子検査であるTREC測定によってスクリーニングが実施され、発症前治療が行われている。

3 施設（名古屋大学、東京医科歯科大学、および昨年度の協力者である国立成育医療研究センター）の独立した研究協力者らによって検討され、日本人においても患者群と健常群を明確に判別できることが実証された。測定に要する費用は1件当たり2,600～6,000円と計算された。

2) 次世代シーケンサ（NGS）の応用の情報収集
次世代シーケンサーは、原理的にはあらゆる遺伝性疾患の検出が可能である。米国では、2013年より4つの研究医療機関で倫理面を含めた検討が開始されている。現在のところ、1検体あたり十～数十万円のコストを要する。現時点では現行制度にそのまま組み込むことは難しいと考えられる。

3) 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定

東北メディカルメガバンクの2049人の全ゲノムシーケンズデータを用いて、CPT-2欠損症の疾患頻度の推定が可能かどうかを検証した。検討集団では、CPT-2遺伝子において34個のエクソン内SNPが検出された。HMDBに記載されている変異のみを対象として計算するとわが国の疾患頻度は47万人に1人と計算された。一方、島根大学小児科の患者変異リストに基づいて計算すると、疾患頻度は4.1万人に1名と計算された。

5 .治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究

1) 治療用特殊ミルク供給の諸外国の状況調査

米国では先天代謝異常症の治療に用いられる食品はメディカル・フードとして承認され、医療保険や償還の対象となっている。しかしその対象疾患、適応範囲は州によって異なっている。乳児用治療乳は多くの州で給付の対象となっているが、低たんぱく食品は適応外となっている州が少なくない。特に低たんぱく食品は患者家族の自己負担金の割合が多い傾向がある。

2) PKU患者の摂取している栄養の問題の調査

Phe除去フォーミュラであるA-1 / MP-11は、蛋白質を補充するとともに脂質、微量元素、ビタミンを供給し、小児だけではなく成人PKU患者にも必

要不可欠であることを示していた。微量元素、ビタミンについて検討したところ、ビオチン、セレンの摂取不足が示唆された。マグネシウム、リン、ヨウ素、亜鉛の微量元素についてもMP-11もしくはA-1の組成では欠乏する傾向があることが分かった。

D . 考察

2014年度にTMSスクリーニングがはじまり3年目になる。本研究班ではTMSスクリーニングの地域格差のないスムーズな導入、実際の現場での課題の整理と解決、今後のわが国のNBSの在り方に関する提言を主要な目標として、5つの分担研究に分けて研究を進めた。今年度の成果を以下に考察したい。

1 .患者コホート・コンサルテーション体制に関する研究

わが国のNBSが小児の障害発生予防を目的とした公的事業として行われている以上、発見された患者の全数登録とコホート体制の構築は重要な問題である。その意義として以下のことが挙げられよう： 対象疾患の正確な頻度の解明、 対象疾患の自然歴解明、 エビデンスに基づく診療技術向上、 稀少疾患の治療法向上、 稀少疾患を持つ患者家族のQOL向上、 および 事業評価と行政サービス向上などである。構築に当たっては、患者のプライバシーの保護、有効なフィードバックの方法、および現場での手続きの簡略化などの問題に配慮しながら進める必要がある。

本研究によると、一次調査（自治体に発見された疾患名と患者数と診断した医療機関を質問）では、回答率54%と年々回収率が低下傾向にあった。この理由として自治体として住民の個人情報保護のために慎重になること、小さい自治体で担当者の異動のために申し送りが不十分になること、 里帰り出産や家族の転勤などによる患者の把握に限界があることなどがあげられる。一方二次調査（小児科主治医を対象とした調査）の回

収率は90%以上であった。今後自治体を窓口とした患者全数登録でなく主治医を介した登録大祭が現実的である。

今年度、長期追跡の臨床的意義を検討するために、成人PKU患者の生活実態を調査した。その結果、予想された通り、NBS開始後に診断された患者では、開始前のそれに比べ明らかに神経障害が少ないことが明らかであった。しかしいくつかの深刻な課題が明らかになった。すなわち成人後に通院しなくなった患者が精神疾患を発症する例が散見されることである。せっかく高等教育（高校、大学など）を受け、就職発見されたにもかかわらず、途中で仕事ができなくなったり、マターナルPKUが発生する事例が少なくないことが分かった。これまで小児期の医療支援は充実していた半面、成人後の医療支援追跡体制に不備があったといわざるを得ない。また小児科から成人診療科への移行期医療の在り方についても取り組む必要がある。

また稀少疾患診療の地域格差をなくすためにTMSコンサルテーションセンターがスタートして3年目となるが、年間の相談件数は100件前後で推移しているが、まだ十分に周知されていない可能性もあり、患者追跡体制とともに充実させてゆく必要がある。各地区のTMSスクリーニング実施状況調査では、おおむね定着しつつあるが、確定診断のための特殊検査の進め方費用負担などの問題が残っている。

TMSスクリーニング導入による障害発生予防の効果を評価するための資料とする目的で、急性脳症や突然死様症状で発症したTMSスクリーニング対象疾患の事例を収集したところ、20例中15例がCPT-2欠損症であった。CPT-2欠損症は偽陽性偽陰性率が高いという理由で二次対象疾患（強制的対象疾患でない）とされているが、精度の高い診断指標が開発されたので、早急に一次対象疾患にリストされることが望ましい。

この他、無駄な治療をなくし効率的なテーラーメイド医療を目的として、発見された患者のうち同意の得られた患者について、NGSを用いた

genotypingを行っている。2015年5月～2016年12の期間内に62例を検査したが、軽症型の患者の診療に有用な情報が得られつつある。世界的に初めての試みであり、患者家族の理解と同意に基づく体制は、効率的な診療に貢献すると期待される。

2. スクリーニング検査精度向上に関する研究

TMSスクリーニング検査施設の検査実施状況を調査してきた。38施設中36施設（95%）から回答があり、初回検査件数は、全施設合計は983,765件であった。このうち一次対象疾患の再採血数は3,064件（0.31%）、即精検数169件（0.017%）、再採血後精検数251件（0.026%）、総精検数420件（0.043%）であった。集計された発見患者数は71例（調査時点）で発見頻度1:13,856であった。と計算された。見逃し例を避けるために一定数の偽陽性例はやむを得ないといわれているが、偽陽性が多いと患者家族にストレスとなり、現場で混乱することもありうる。再採血率0.31%は、悪くない数字であると思われる。2次検査法として、今年度LC-MS/MSを用いてメチルマロン酸とホモシスチンを同時測定する方法が開発された。このような技術が開発されると精度が高まり、再採血を減らせる可能性がある。

3. 外部精度管理体制の確立に関する研究

技能試験（PT試験）年3回と精度試験（QC試験）年1回が定着してきた。今年度から精度管理検体作成を外部発注したところ、精度もよく、コスト削減も期待される。またTMS検査施設の外部精度管理、内部精度管理の検査データのweb自動解析システムを構築しその有用性を検討した。これにより、他施設とのデータの比較、患者データとの比較、カットオフ値の適正性などを、各施設で迅速・的確に評価できることが確認された。精度管理合同委員会も今年度から年4回に定例化し、各施設の精度管理の評価、精度管理の簡便化、コスト節減について検討されるようになった。

4. 次世代のスクリーニングの在り方に関する研

究

今後検討すべき NBS 対象疾患の国内外の情報を集め検討した。米国をはじめとする諸外国では、原発性免疫不全症のスクリーニングが最も話題に上がっている。簡便な遺伝子検査である TREC 測定による方法で、現在わが国では 3 施設の独立した研究協力者らによって検討されている。治療は骨髄移植が中心となるが、費用対効果等の疫学的な評価を行い新規項目に追加されるかどうかは決定されることになる。

TMS スクリーニングでは、血中の代謝産物を測定してスクリーニングされるが、測定項目の測定感度の違いによって、実際の頻度と合致してない可能性がある。東北メディカルメガバンクの大規模ゲノムコホートデータを用いて、2014 年度に PKU の頻度を推定したところ 4.5 万人に 1 人で、TMS スクリーニング試験研究 (195 万人) のデータ 5.3 万人に 1 人とほぼ一致した。PKU に関しては TMS スクリーニングでほぼ確実に発見されることを示す。一方 CPT-2 欠損症は臨床現場では頻度が比較的高い疾患と認識されている。しかし TMS スクリーニング試験研究では 28 万人に 1 人というデータであった。偽陽性、偽陰性の高い測定法であったことも影響して実態よりも低く見積もられている可能性がある。今年度 PKU のケースと同じ手法で (東北メガバンクデータ) CPT-2 欠損症の頻度を推計したところ、計算法によって違うものの 47 万人に 1 人というデータ (HMDB に記載されている変異のみで計算) と 4.1 万人に 1 人というデータ (島根大学の患者変異リスト) であった。今後同様のアプローチによって TMS スクリーニングの限界などが明らかになる可能性がある。

5 .治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究

治療用特殊ミルクの安定供給が、最近大きな問題になっている。NBS によって発見された患者が年々蓄積し、成人例も増え、また TMS スクリーニングによる対象疾患の拡大などで供給量が増大し、これまでの乳業メーカーによるボランティア

に頼る仕組みでは維持できなくなりつつある。今年度米国で治療に用いられる食品はメディカル・フードの仕組みを検討した。医療保険や償還の対象となっているが、対象疾患、適応範囲は州によって異なっている。州によって低たんぱく食品などの患者家族の自己負担金の割合が多い傾向があることが分かった。今後成人後の継続治療、移行医療の問題とともに可及的速やかに検討すべき課題である。この他、PKU に使われる Phe 除去フォーミュラである A-1 / MP-11 の微量元素、ビタミンについて検討した。ビオチン、セレンなどの摂取不足のリスクが示唆された。治療用ミルク、治療食品による治療では、継続的に微量栄養成分に配慮する必要がある。

E . 結論

今年度の研究成果は以下のように集約される。

NBS で発見された患者のコホート体制確立には、自治体担当窓口よりも各自治体の NBS 連絡協議会を構成する主治医 (小児科医) 等が中心になって進める方が現実的であることが示唆された。長期追跡の意義を検討するために、成人 PKU 患者の生活実態を調査したところ、NBS の効果は顕著であるものの、患者の追跡管理が小児期に比べ、成人期にはほとんど整備されてないことが明らかになった。NBS にかかわるスタッフへの啓発と成人後の診療体制を検討する必要があることが分かった。稀少疾患の診療に地域格差をなくすためのコンサルテーション体制、精度管理体制も年々充実してきつつある。特に検査機関が参加する精度管理データの web 解析システムの有用性が確認され、今後迅速、的確な精度管理、コスト低減に役立つと思われる。NBS 対象疾患のテラード医療を目的として、NGS を用いた genotyping を行っているが、世界的に初めての試みである。無駄な治療を避け、効率的な診療に貢献すると期待される。

今後検討すべき NBS 対象疾患として、諸外国では、原発性免疫不全症のスクリーニングが最も話

題に上がっている。簡便な遺伝子検査である TREC 測定による方法で、現在わが国では 3 施設の独立した研究協力者らによって検討されている。わが国で新規項目に追加されるかどうか費用対効果等の疫学的な評価によってエビデンスに基づく決定が期待される。治療用特殊ミルクの安定供給の問題もクローズアップされているが、今年度米国のメディカル・フード精度の情報を検討した。医療保険や償還の対象となっているが、対象疾患、適応範囲は州によって制度が異なっていて、患者家族の自己負担金の割合が多いものがあることが分かった。今後治療用ミルク・食品の安定供給体制は、成人後の継続治療、移行期医療の問題とともに重要課題として検討すべきである。NBS の本来の目的を達成するためには長期にわたる支援が不可欠である。

F．健康危険情報

特になし

G．研究発表

分担研究報告書に記載

H．知的財産権の出願・登録状況

- 1．特許取得：特になし
- 2．実用新案登録：特になし
- 3．その他：なし

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 特任教授）

研究要旨

2014 年に TMS スクリーニングが全国導入され 3 年目となる。各地区の実施状況を把握するとともに、これまで整備されていなかった患者登録コホート体制の在り方について研究した。TMS スクリーニング自体は各地に定着しつつある。確定診断のための特殊検査の費用などの問題が残されている。TMS コンサルテーションセンターは超稀少疾患の診療に一定の機能を果たしていると思われる。地域格差是正のためにさらに周知すべきである。患者登録追跡体制の構築にあたり、自治体窓口では個人情報漏えいを危惧して情報が得られにくい面がある。患者全数登録のためには、各地区の連絡協議会などを通じて小児科医を窓口としたシステムが効果的であると思われる。また成人に達した PKU 患者の実態調査から、成人後に治療を中断すると精神症状がでるなど深刻な問題が提起された。成人後の治療継続、追跡の重要さが強調されるべきである。さらに CPT-2 欠損症が最も乳幼児突然死を引き起こす頻度の高いことが分かった。積極的にスクリーニングして、乳幼児期の突然死予防に生かすべきである。TMS スクリーニングによって発見されるようになった軽症プロピオン酸血症などについても、スクリーニング後の Genotyping の情報を蓄積して、効率的な診療に役立てることが望ましいと結論付けられた。

研究協力者

高柳正樹（帝京平成大学看護学科教授）

深尾敏幸（岐阜大学小児病態学教授）

小林弘典（島根大学小児科）

長谷川有紀（島根大学小児科講師）

山田健治（島根大学小児科）

但馬剛（国立成育医療センター研究所室長）

長尾雅悦（国立北海道医療センター副院長）

坂本修（東北大学小児病態学分野准教授）

高橋勉（秋田大学小児科教授）

長崎啓佑（新潟大学小児科）

入月浩美（新潟大学小児科）

大竹明（埼玉医科大学小児科教授）

荒尾正人（埼玉医科大学小児科）

村山 圭（千葉県こども病院代謝科部長）

伏見拓矢（千葉県こども病院代科）

窪田満（国立成育医療研究センター総合診療部長）

伊藤哲哉（藤田保健衛生大学小児科教授）

笹井英雄（岐阜大学小児病態学）

大塚博樹（岐阜大学小児病態学）

新宅治夫（大阪市立大学発達小児医学教授）

竹島泰弘（兵庫医科大学小児科学教授）

粟野宏之（神戸大学小児科学）

坊 亮輔（神戸大学小児科）

井上貴仁（福岡大学医学部小児科講師）

廣瀬伸一（福岡大学医学部小児科教授）

中村公俊（熊本大学小児科学分野准教授）

伊達木澄人（長崎大学小児科講師）

中富明子（諫早療育センター小児科）

知念安紹（琉球大学育成医学准教授）

川口耕一（TMS 普及協会東京オフィス）

青木菊麿（母子愛育会）

横山和紀（母子愛育会）

A . 研究目的

2014 年度から、わが国ではタンデムマス (TMS) 法を導入した新生児マススクリーニング (NBS) が始まった。同時にガスリー法は廃止された。本分担研究の目的は、TMS 法を導入した NBS (TMS スクリーニング) のスムーズな実施と効率化、および患者コホート体制構築に関する研究である。この目的のために、以下のような研究を行った。

TMS スクリーニングの各地区の実施状況と課題の調査、患者登録コホート体制の在り方の研究、

TMS コンサルテーションセンター (TMS コンサルセンター) の意義、TMS スクリーニング対象疾患の乳幼児死亡症例の収集、および対象疾患のテイラーメイド医療を目指した患者の遺伝子解析 (genotyping) の試みである。

B . 研究方法

1 . 各地区のタンデムマス・スクリーニング実施状況と課題の調査

北海道、札幌市、青森、宮城、仙台市、山形、秋田、福島、新潟、埼玉、千葉、岐阜、大阪市、兵庫、広島、長崎、九州 (福岡、福岡市、北九州、佐賀、熊本、熊本市)、沖縄の中核医師を対象に、2015 年の患者発見数、診断上の問題、地域の活動、と課題についてアンケート調査した。

2 . 患者登録・コホート体制の構築

昨年度と同様に、TMS スクリーニング発見患者について、自治体の把握している患者数の調査、および自治体から情報提供された診断医療機関を対象として患者の状況についてアンケート調査した。また患者長期追跡の意義を明らかにすることを目的として、成人 PKU 患者の生活実態調査を行った。母子愛育会特殊ミルク事務局から PKU 治療用アミノ酸粉末の A-1、または MP-11 の供給をしている 20 歳以上の成人 PKU 患者 85 例の主治医を対象に生活実態を調査した。調査項目は、発

(1) 北海道地区

育、発達状況、学歴、就職、結婚、および治療中断歴などの生活の問題点である。

3 . TMS コンサルセンターの効率化の検討

2014 年度から、NPO 法人タンデムマス・スクリーニング普及協会 (TMS 普及協会 : 03-3376-2550) 東京オフィスに設置された TMS コンサルセンターの活動状況と課題について検討した。

4 . TMS スクリーニング対象疾患の乳幼児突然死症例の収集

医学中央雑誌検索、学会発表、パーソナルコミュニケーションなどを通じて収集した。そして疾患の種類、死亡時期、臨床経過を調査した。

5 . TMS スクリーニング対象疾患の genotyping

TMS スクリーニングを中心とする NBS で発見された症例の主治医に呼び掛けて、同意の得られた小児を対象に NGS で genotyping を行った。遺伝子解析は AMED の支援を受けて、マルチプレックス PCR 法によって行った。遺伝子パネル疾患数は、2015 年 5 月 ~ 2016 年 6 月は 60 遺伝子、2016 年 7 月以降は 168 遺伝子に拡大した。

(倫理面への配慮)

患者コホート研究については、島根大学医の倫理委員会で承認されたものである (第 1622 号)。データ管理は当面島根大学 (研究分担者の所属機関) でオフラインのパソコンに情報を蓄積する。調査する患者情報は連結可能匿名化として、事務局では個人名を取り扱わない。

C . 研究結果

1 . 各地区のタンデムマス・スクリーニング実施状況と課題

各地区の TMS スクリーニング現状と課題について行ったアンケート結果を別添表に示している。

約 3 万 8 千人の出生のうち、8 例の TMS 疾患が

診断された。TMS スクリーニングは北海道と札幌市で行われ、市民向け小冊子{新生児マススクリーニングって何?}を発売した。また、第4回札幌市難病医療相談会(2016年1月)を開催した。

(2)東北地区

青森、岩手、山形、福島各県で発見された陽性者は東北大学を受診する体制となっている。現場の意見として、脂肪酸代謝異常症の確定診断の体制が十分でない。機器は岩手県、宮城県、福島県に設置されている。検査は、青森県、宮城県、山形県が宮城県の検査機関に委託し、岩手県と秋田県が岩手県の検査機関、福島県は単独で検査機関を持っている。

(3)関東甲信越地区

新潟県、埼玉県、千葉県からアンケートによると、おおむね順調に定着しつつある。メチルマロン酸血症で新生児期に生体肝移植を行ったケースがあった。新潟県からの意見として、検査機関または医療機関から家族への連絡システムがない、正しい採血手技の徹底が十分でないという課題があげられた。

(5)関西・西日本地区

兵庫県では、おおむね順調に推移しているが、見逃し例の確認、正確な患者数の把握体制を検討中である。課題として、軽症例の治療指針を示してほしい、特殊検査 GC/MS 分析などの事務手続きに時々問題が提起される。特殊検査の費用を自治体に要請中である。大阪市、広島県はおおむね順調に推移しているという報告であった。

(6)九州・沖縄地区

長崎県では、有機酸分析等の特殊検査の費用負担が明確になってない。他の県からも同様の意見

があった。この他の課題として、行政担当者の移動に伴う連携がスムーズでないことがある、最終診断の確認体制が十分でない、などが挙げられた。

2. 患者登録・コホート体制の構築

(1)一次調査(自治体からの回答率):2016年度調査(2015に発見された患者と疾患について)自治体を対象にアンケート調査したが、協力可という回答率は54%あった。(2015年度調査63%)

(2)二次調査(医療機関からの回収率):協力の得られた自治体の医療機関を対象として二次調査をしたところ73例(回収率100%)の情報が得られた(昨年は96例、回収率は98%)

(3)追跡調査:2014年に登録した患者のうち12例が発達遅滞を示した(昨年時点では6例が境界線以下の発達遅滞)。死亡例は、2年目までに3例の死亡例が報告された(メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、TFP欠損症)。3年目の死亡例は1例のみであった(CPT-2欠損症)。

(4)成人PKU患者の実態調査:85例に調査して回収率は100%であった。今年度NBS開始から39年目にあたるため、38歳以上とそれ以下に分けて検討した。A群26例(20~25才)、B群19例(26~31才)、C群21例(32~37才)、およびD群19例(38才以上)の6年毎に4つのグループに分けた。

a. 神経学的状況:図1に示すように、D群では19例中2例が精神症状、5例が境界域、6例が精神遅滞であった。一方C群では21例中4例が境界域、1例が精神遅滞であった。そしてB群では明瞭な遅滞の患者はなく、A群では26例中2例が境界域であった。

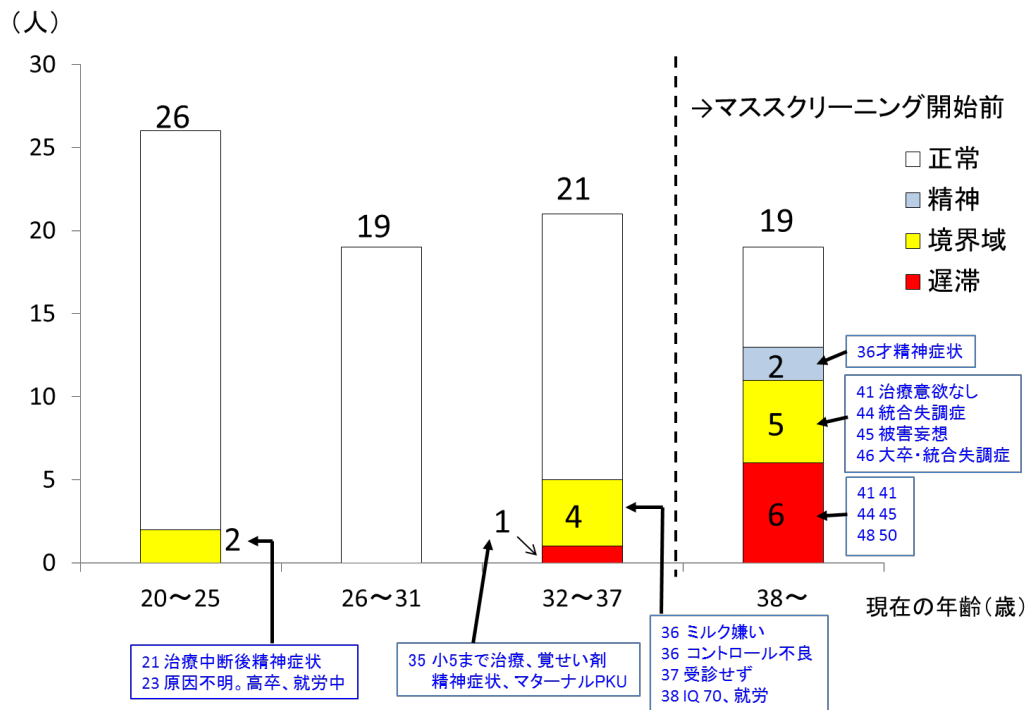


図1. 成人 PKU 患者の神経学的状況 (N=85 例)

b. 最終学歴:返事のあった61例中55例(90%)は、大学、高校または専門学校を卒業していた。養護学校卒業6例のうち5例は38歳以上(NBSの開始前)、4例は知的障害、1例は器質性精神病、1例は37才でNBS開始後にもかかわらず未受験例であった。

c. 就労状況:85例中9例が就労不可という状態であった。9例全例が38歳以上で、9例中7例は知的障害または精神疾患のため就労不可であった。1例は境界域で就労せず、もう1例は知能正常であるが気管切開中のため就労できないという状況であった。

3. TMS コンサルセンターの効率化の検討

2016年度(4月~12月)の相談件数は67件(2015年度12か月間で96件)で、件数自体は例年と同程度であった。表1に示すように、質問者は、小児科医が最も多く、次いで自治体関係者、病院事務部からの相談が続いた。内容は、診療に関するもの、精密検査の相談(費用を含む)などが多かった。

4. TMS スクリーニング対象疾患の乳幼児突然死症例の収集

昨年度までに16例を収集し、今年度4例を追加して収集した。計20例のうちCPT-2欠損症が15例で最も多く、次いでVLCAD欠損症2例、MCAD欠損症2例、およびグルタル酸血症型(GA2)が1例であった。20例のうちTMSスクリーニングを受けていたのは4例のみで、それ以外はTMSスクリーニング開始以前の症例であった。

5. TMS スクリーニング対象疾患の genotyping

NBS 対象疾患の genotyping を行ったのは、2015年5月以降(1年8か月間)で164例であった。このうちガラクトース血症9例を除くとすべてTMS法対象疾患であった。多かった疾患は、プロピオン酸血症30例、高フェニルアラニン血症12例、メープルシロップ尿症10例であった。

このうち genotype の確定した11例のプロピオン酸血症において、アレル22のうち16にPCCBのY435C変異が見いだされた。そして11例中8例はこの変異のホモ接合体であったが、少なくともこれらはすべてアシドーシス発作などの症状

はなかった。

表1. TMS コンサルセンターの質問者と質問内容 (2016年4月～12月)

| 相談内容 | | 相談者 | |
|-------------|----|----------|----|
| 数値データについて | 2 | 小児科医師等 | 34 |
| 検査・検査基準について | 15 | 産婦人科医師等 | 2 |
| 精密検査の相談・依頼 | 11 | 法医学医師等 | 1 |
| 診断・治療方針 | 18 | 検査機関 | 4 |
| 検体採取法に関して | 2 | 助産師 | 1 |
| 再採血・再検査 | 0 | 自治体 | 14 |
| 検体輸送 | 1 | 医療機関事務局等 | 11 |
| 検査費用 | 8 | 計 | 67 |
| 検体保存 | 1 | | |
| その他 | 9 | | |
| 計 | 67 | | |

D. 考察

2014年度からNBSにTMSが導入されて3年目となる。対象疾患の種類は多いが、個々の疾患は超稀少疾患で、専門家のいるところとそうでないところで地域格差の生じることが危惧される。東北のように県を超えて中核医療機関が設定されているところもあるが、おおむね各自治体の中核医療機関を中心に機能しているものと思われる。またTMSコンサルセンターの年間相談件数も一定数があり、定着しつつあるものと思われる。まだTMSコンサルセンターのことが十分に知られてないところもあり、効果的に利用できるよう周知活動が必要である。

患者登録追跡体制の研究では、第一段階として自治体を窓口にして疾患名と患者数を把握する体制としてきた。しかし自治体では患者の個人情報漏えいを危惧する傾向が強まり、年々協力自治体は減少している。2014年度87%、2015年度63%、および今年度(2016年度)54%であった。行政部署である自治体を介した患者全数登録には限界があると思われる。成人PKU患者の調査は主治医である小児科医を対象に行ったが100%の回収

率であった。このことから今後の患者登録体制を考えると、主治医である小児科医を介した登録コホートが望ましいかもしれない。

成人PKUの生活実態調査から、まずNBSの開始前と開始後では明瞭に神経予後に差がみられた。またNBSで発見された患者で成人後にみられる神経疾患は知的障害というよりも精神疾患が多いことがわかった。PKUそのものは自覚症状に乏しいが、成人後も食事療法などの治療を中断してはならないということを示している。

乳幼児突然死を起こしたTMSスクリーニング対象疾患のうち大部分がCPT-2欠損症であることが判明した。しかしTMSスクリーニング開始前の症例が大部分を占めているので、今後はTMSスクリーニングの効果が期待される。CPT-2欠損症は、当初偽陰性、偽陽性が多かったためにTMS法対象疾患のうち二次対象疾患に分類されたため、自治体によってはCPT-2欠損症の所見がみられても患者家族に伝わらないという危惧がある。新しい効果的な診断指標が開発された現在、一刻も早く一次対象疾患として積極的に発見に努めることが重要である。

最後にNBS対象疾患のgenotypingという試み

は世界的にも珍しい研究である。2015年5月以降これまでに62例の検査が行われた。これまでのところ、日本人特有の軽症プロピオン酸血症には日本人特有のコモン変異があり、その変異のホモ接合体では治療は必要ないであろうという結論が導き出されている。今後は種々の疾患の genotype と臨床経過の情報とつぎ合わせてゆけば、テイラーメイド医療の開発が期待される。

E. 結論

2014年にTMSスクリーニングが全国導入され3年目となるが、いくつかの課題を抱えつつも各地に定着しつつある。超稀少疾患のため陽性者の診療には地域格差の生ずることが危惧されるが、TMSコンサルテーションセンターが一定の機能を果たすことが期待される。患者登録追跡体制の構築にあたり、各地区の連絡協議会などを通じて小児科医を窓口としたシステムが効果的である。NBSで発見されずすでに成人となっている患者の実態調査から、小児期は正常でも成人後に治療を中断すると精神症状がでるなど深刻な問題がある。疾患によって治療継続を強調されるべきである。さらにCPT-2欠損症が最も乳幼児突然死を引き起こす頻度の高いことが分かった。積極的にスクリーニングを進め、障害発生を予防すべきである。軽症プロピオン酸血症など治療の要否に結論の出ない疾患もある。genotypingの情報を蓄積して、エビデンスに基づく効率的な診療に役立てることができる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Djouadi F, Habarou F, Le Bachelier C,

Ferdinandusse S, Schlemmer D, Benoist JF, Boutron A, Andresen BS, Visser G, de Lonlay P, Olpin S, Fukao T, Yamaguchi S, Strauss AW, Wanders RJA, Bastin J: Mitochondrial trifunctional protein deficiency in human cultured fibroblasts: effects of bezafibrate. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 39(1): 47-58, 2016

2) Bo R, Hasegawa Y, Yamada K, Kobayashi H, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: A fetus with mitochondrial trifunctional protein deficiency: Elevation of 3-OH-acylcarnitines in amniotic fluid functionally assured the genetic diagnosis. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 6: 1-4, 2016

3) Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Takahashi T, Purevsuren J, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Ohkubo T, Yokota T, Watanabe M, Tsunemi T, Mizusawa H, Takuma H, Shioya A, Ishii A, Tamaoka A, Shigematsu Y, Sugie H, Yamaguchi S: Clinical, biochemical and molecular investigation of adult-onset glutaric acidemia type II: Characteristics in comparison with pediatric cases. *Brain & Development* 38(3): 293-301, 2016

4) Takahashi T, Hasegawa Y, Yamada K, Bo R, Kobayashi H, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: Metabolic survey of hidden inherited metabolic diseases in children with apparent life-threatening event (ALTE) or sudden unexpected death in infancy (SUDI) by analyses of organic acids and acylcarnitines using mass spectrometry. *Shimane Journal of Medical Science* 32(2): 61-68, 2016

5) Yamamoto F, Nakamagoe K, Yamada K, Ishii A, Furuta J, Yamaguchi S: A case of

very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with novel compound heterozygous mutations. *Journal of the Neurological Sciences* 368(15): 165-167, 2016

- 6) Purevsuren J, Bolorma B, Narantsetseg C, Batsolongo R, Enkhchimeg O, Bayalag M, Hasegawa Y, Shintaku H, Yamaguchi S: The first Mongolian cases of phenylketonuria in selective screening of inborn errors of metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 9: 71-74, 2016
- 7) Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Purevsuren J, Mushimoto Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: Efficacy of bezafibrate on fibroblasts of glutaric acidemia type II patients evaluated using an in vitro probe acylcarnitine assay. *Brain & Development* 39(1): 48-57, 2017
- 8) 山口清次: .テクノロジーの進歩 タンデムマス・スクリーニング. *小児科診療* 79(6): 745-752, 2016
- 9) 山口清次: 周産期領域の新しい検査法 新生児編 タンデムマス. *周産期医学* 46(6): 800-801, 2016

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S, Hasegawa Y, Shibata N, Kobayashi H, Yamada K, Bo R, Taketani T, Chi DV, Thu NN: Diversity of disease distribution and genetic background of inherited metabolic disease of organic and fatty acids in Asian countries. *The 13th International Congress of Human Genetics*. Kyoto, Japan, April 2016
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects: A causative muscular disease detectable by mass spectrometric procedure (GC/MS and MS/MS). *15th Asian*

and Oceanian Myology Center Annual Scientific Meeting 2016. Hsinchu, Taipei, May 2016

- 3) Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S: The effect of riboflavin is limited in Japanese patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD). *Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2016*. Roma, Italy, September 2016
- 4) Yamaguchi S, Hasegawa Y, Furui M, Yamada K, Bo R, Kobayashi H, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Nishino I: Clinical and genetic aspects of 50 Japanese cases of VLCAD deficiency. *Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2016*. Roma, Italy, September 2016
- 5) 山口清次: ミトコンドリア 酸化異常症の診断・治療の進歩と臨床的意義. 第104回東海臨床遺伝・代謝懇話会. 名古屋, 2016年2月
- 6) 小林弘典, 長谷川有紀, 山田健治, 坊亮輔, 竹谷健, 山口清次: タンデムマス・スクリーニング対象疾患に対するコンサルテーションセンターの利用状況. 第119回日本小児科学会. 札幌, 2016年5月
- 7) 山口清次, 長谷川有紀, 古居みどり, 山田健治, 坊亮輔, 小林弘典, 竹谷健, 福田誠司, 深尾敏幸: 日本人極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 50 例の臨床遺伝的検討. 第119回日本小児科学会. 札幌, 2016年5月
- 8) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症の診断治療の進歩. 第98回山陰小児科学会. 米子, 2016年9月
- 9) 山田健治, 坊亮輔, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 竹谷健: R1 トレーサー法による酸化能評価と in vitro probe アッセイの

比較：ベザフィブラートの反応性について.
第 58 回日本先天代謝異常学会. 東京, 2016
年 10 月

された CPT-2 欠損症の 1 例～. 第 23 回日本
SIDS・乳幼児突然死予防学会. 津, 2017 年 3
月

- 10) 山口清次, 長谷川有紀, 後藤雄一, 坂井千
香, 若松延昭, 長友太郎, 大竹明, 村山圭,
岸和子, 竹谷健: 尿中有機酸分析による
ECHS1 異常症の簡便な代謝スクリーニング:
Leigh 脳症の病因検索に向けて. 第 58 回日
本先天代謝異常学会. 東京, 2016 年 10 月
- 11) 坊 亮輔, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀,
山口清次, 竹谷 健: CPT-2 欠損症による突
然死の予防～新生児スクリーニングで発見

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

別添表. 2015年度各地区のIMSスクリーニングの現状と課題（アンケートまとめ）

| 地区 (記入者) | 出生数 (検査数) | 発見症例 (N) | 診断上の問題 | 地区の啓発活動 | 課題 (改善点) | その他 |
|---------------|--------------|--------------|---|-----------------------------------|--|--|
| 北海道 (長尾雅悦) | 21,877 | VLCAD欠損症 (2) | C14:1境界線に近い値、感染時有意上昇。酵素活性性 29%、PCCB Y435：ヘテロ1例；ホモ1例 | ・市民向け小冊子「新生児スクリーニングって何?」(北海道公衆衛生) | <ul style="list-style-type: none"> ・体重増加不良、哺乳不足によるC8、C10の上昇例 | <ul style="list-style-type: none"> ・2例ともに遺伝子診断で確定診断 |
| | | 軽症PROP (2) | | | | |
| 札幌市 (長尾雅悦) | 16,474 | MAT欠損症 (1) | 複合ヘテロ | ・第4回札幌市難病医療相談会 (2016年1月) | <ul style="list-style-type: none"> ・要精査例 10例中3例がC5-OH。低体重児のポテン欠乏? | |
| | | CTLN1軽症例 (1) | 変異1つ | | | |
| 青森県 (坂本修) | 10,127 | PCD (1) | 複合ヘテロ | | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 ・Cit軽度上昇例が多い | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 ・Cit軽度上昇例が多い |
| | | VLCAD欠損症 (1) | ・C14:1/C2のみで診断、哺乳とともに低下。複合ヘテロ。 | ・特になし | | |
| 宮城県 (坂本修) | 9,341 | CTLN1軽症型 (2) | ① Cit (初回 77.67) カットオフ 80 では見逃しかも (再検時 Cit 362) | ・特になし | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 ・FAODに関して再検の体制 | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 ・FAODに関して再検の体制 |
| | | MCAD欠損症 (1) | ② 血中アンモニア 44~54、I才時 229 | ・特になし | | |
| 仙台市 (坂本修) | 9,521 | 軽症PROP (1) | | ・特になし | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 ・FAODに関して再検の体制 | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 ・FAODに関して再検の体制 |
| | | CTLN1軽症型 (1) | | ・特になし | | |
| 山形県 (坂本修) | 9,384 | PKU (1) | 確定診断・フォローは山形大学 | ・特になし | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 | <ul style="list-style-type: none"> ・FAODに関して再検の体制 |
| | | PROP (1) | | | | |

| 地区 (記入者) | 出生数 (検査数) | 発見症例 (N) | 診断上の問題 | 地区の啓発活動 | 課題 (改善点) | その他 |
|------------------------|--------------|---------------|---|------------------------------------|---|--------|
| 秋田県 (野口篤子) | 5,861 | なし | 精査例なし | ・特になし | | おおむね順調 |
| 福島県 (坂本修) | 15,706 | 高 Met 血症 (2) | いとこ例 | ・特になし | | おおむね順調 |
| | | 高 Phe 血症 (1) | | | | |
| | | CTLN1 (1) | | | | |
| | | CTLN1 軽症型 (1) | | | | |
| PROP (2) | | | | | | |
| 新潟県 (入月浩美、 長崎啓祐) | 18,308 | 高 Phe 血症 (1) | ・この他に2次性ピオチン欠乏あり | ・母子保健関係事業検討会 (年1回開催) | ・検査機関または医療機関から家族への連絡システムがない ・正しい採血手技等の周知が不十分 | 課題改善中 |
| 埼玉県 さいたま市 (大竹明) | 56,077 | PKU (1) | 同胞例 | ・マス・スクリーニング報告/検討会 ・埼玉県母子保健運営協議会 | | おおむね順調 |
| | | シトリン欠損症 (2) | Cit 204、Phe 120、Gal 8.7 Cit 249、Phe 150 | | | |
| | | 軽症 PROP (3) | = Y435 ホモ = Y435 ヘテロ | | | |
| | | その他 | ・GA2 疑い例 (1) 無治療 ・一過性 C5-OH(1) 有機酸正常 ・低カルニチン(1) 母菜食主義 | | | |

| 地区 (記入者) | 出生数 (検査数) | 発見症例(N) | 診断上の問題 | 地区の啓発活動 | 課題(改善点) | その他 |
|---------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------------------------------|--|--|--------|
| 岐阜県 (大塚博樹、 笹井英雄、深 尾敏幸) | 15,464 (17,083) | MMA(1) | ・新生児期横紋筋融解、頑固な嘔吐。1才3か月現在、DQ75、体重増加不良 | ・特になし | ・C5-OH 上昇例の取り扱い い | おおむね順調 |
| | | その他 | C5 上昇(母親の抗菌薬) C5-OH 上昇(LBW) | | | |
| 兵庫県 (竹島泰弘) | 12,140 (神戸市) 30,835 (兵庫県) | MMA(2) | | ・兵庫県全体の病院対象に症例調査実施 ・新生児先天代謝異常検査医師等研修会(3回) | ・見逃し例の確認 ・患者数を正確に把握する体制作り(行政との連携・倫理的課題) ・擬陽性例の臨床的背景(飢餓、LBW など) ・軽症例に対する治療方針 | おおむね順調 |
| | | MCG 尿症(1) | | | | |
| | | VLCAD 欠損症(1) | | | | |
| | | | | | 針 ・精査時、タンデムマス・尿有機酸分析の保険適応の事務手続きの問題 ・月2回目以降のタンデムマス・尿有機酸分析のコストの行政からの支援要請 | |

| 地区 (記入者) | 出生数 (検査数) | 発見症例(N) | 診断上の問題 | 地区の啓発活動 | 課題(改善点) | その他 |
|-----------------------------------|--------------|----------------|--|--|--|--------|
| 広島県 広島市 (但馬剛) | 24,686 | 高 Phe 血症(2) | Cit 著明高値(697) 血漿 2402 シトリン欠損症(1) MCG 尿症(1) MCAD 欠損症(2) その他 ・ MCG 母体出生児(1) ・ C5-OH 軽度城症例(2) | ・「子どもの先天性代謝異常」講演会(広島県小児難病相談室主催) | ・ C3=4.8(<3.6)、C3/C2 = 0.22 (<0.22)で精査しなかった症例、乳児期中旬から症状(母親 B12 欠乏が原因と判明) | おおむね順調 |
| | | PKU(1) | | | | |
| | | 軽症 PROP(1) | | | | |
| | | その他 | | | | |
| | | 母親 MCG 尿症 | | | | |
| | | 一過性高 Met 血症 | | | | |
| 長崎県 (伊達木澄人) | 11,566 | PKU(1) | | ・長崎県北小児科医学会講演「新生児マススクリーニングに関する最近の話題」 | ・有機酸分析等の費用負担 ・軽症型に対するガイドライン | |
| | | その他 | | | | |
| | | | | | | |
| 熊本、福岡、福岡市、北九州、佐賀、熊本、熊本市 (中村公俊) | 71,347 | MAT 欠損症(1) | | 九州先天代謝異常症ネットワーク会議 2015 | ・年度内のスムーズな確定診断体制 ・最終診断の追跡体制 ・行政担当者の移動等に連携体制の問題 | おおむね順調 |
| | | HCY(1) | | | | |
| | | MMA(1) | | | | |
| | | その他 | | | | |
| | | 一過性高 Met 血症 | | | | |
| 沖縄 (知念安昭) | 17,252 | CPT2/CACT 欠損症? | 遺伝子検査結果待ち | ・沖縄県医師会医学会 沖縄県の TMS スクリーニング導入 ・沖縄県小児科医学会 TMS 説明会 | ・検査異常値発生時の検査機関と医療機関の連携が不十分? | おおむね順調 |
| | | | | | | |

| 地区 (記入者) | 出生数 (検査数) | 発見症例(N) | 診断上の問題 | 地区の啓発活動 | 課題(改善点) | その他 |
|---------------------|--------------------|---------------|------------------------------|-----------------------|---------|--------|
| 千葉県 千葉市 (村山圭) | 47,763 (46,086) | PKU | | ・千葉県新生児マススクリーニング連絡協議会 | | おおむね順調 |
| | | 高Phe血症(2) | | | | |
| | | MMA(1) | 12月下旬検体、診断判明が1/6ですすでに発症し、肝移植 | | | |
| 大阪市 (新宅治夫) | 22,351 | PKU(1) | | | | |
| | | PKU-BH4反応型(1) | | | | |
| | | 高Phe血症(1) | | | | |
| | | MMA-CbIC(1) | 総ホモシスチン増加。生後1か月から治療開始 | | | |

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科 特任教授）

広島地域の発見症例 / 脂肪酸代謝異常症 3 疾患の診断実績

研究協力者 但馬剛（国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室 室長）

研究要旨

広島地域では、MCAD欠損症・VLCAD欠損症・CPT-2欠損症・ビタミンB12反応性メチルマロン酸血症の確実な発見を重点課題として、初回陽性例に即精検や二次検査を適用した結果、この1年間に4例（MCAD=1, VLCAD=2, VB12欠乏症=1）が診断された。他地域陽性例の酵素・遺伝子診断では、MCAD=10例, VLCAD=15例を診断した。二次対象疾患とされているCPT-2欠損症は診断依頼が少なく、多くの地域で対象疾患から除外されている現状の影響が推測された。CPT-2欠損症による急死例は多数確認されており、一次対象疾患化が急務である。

研究協力者

原 圭一（呉医療センター小児科・医長）

香川礼子（広島大学小児科・大学院生）

津村弥来（広島大学小児科・研究員）

岡田 賢（広島大学小児科・講師）

（呉医療センター）を行った。メチルマロン酸血症を確実に捕捉するため、C3 陽性例は初回濾紙血を福井大学小児科へ郵送し、メチルマロン酸・総ホモシステインを測定した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は国立病院機構呉医療センター倫理委員会にて承認された書面による説明・同意手続きの上で実施した。

A．研究目的

前 2 年間に引き続き、脂肪酸代謝異常 3 疾患（MCAD 欠損症・VLCAD 欠損症・CPT-2 欠損症）ビタミン B12 反応性メチルマロン酸血症の見逃し防止を重点課題としながら、広島県・広島市出生のマススクリーニング陽性例の診断確定・経過観察に取り組んだ。脂肪酸代謝異常症 3 疾患については、国内各地の陽性例についても確定検査を行い、発症リスク評価の基礎となる情報集積を進めた。

B．研究方法

広島市医師会臨床検査センターと連携して基準値を調整しながらスクリーニング検査を実施。MCAD・VLCAD・CPT-2 各欠損症は初回陽性後即精査とし、酵素活性測定（広島大学）と遺伝子解析

C．研究結果

1．広島地域の発見例（2016 年 1～12 月：表 1）

(1)脂肪酸代謝異常症 3 疾患（数字は症例数）

罹患例：MCAD(1), VLCAD(2)

保因者：VLCAD(1)

偽陽性：MCAD(1), VLCAD(1), CPT-2(1)

(2)メチルマロン酸血症

初回 C3 陽性 1 例について、濾紙血二次検査でメチルマロン酸・総ホモシステインが軽度増加、精査血清にてビタミン B12 低値が判明し、補充療法を開始した（表 2）。

(3)その他の疾患

高フェニルアラニン血症（軽症例 1）

メープルシロップ尿症（軽症例1）

高メチオニン血症（未確定2：軽度高値）

シトルリン血症1型（罹患例1：著明高値）

グルタル酸血症2型（偽陽性2）

2．他地域出生例の診断実績（2016年1～12月）

罹患例：MCAD(10), VLCAD(15), CPT-2(0)

保因者：MCAD(0), VLCAD(10), CPT-2(1)

偽陽性：MCAD(0), VLCAD(1), CPT-2(1)

発症例：MCAD(1), VLCAD(1), CPT-2(2)

D．考察

1．脂肪酸代謝異常症3疾患

広島では自治体事業化以降、極端な母乳主義を採用している特定の産科施設の出生児に VLCAD 欠損症・CPT-2 欠損症の偽陽性が多発していたが、2016 年は激減した。真の罹患児が出生して母乳不足のまま放置された場合に急性発症する危険があることを繰り返し説明し、ミルク併用開始時期が早くなったことが要因と考えられる。

他地域出生例について、VLCAD 欠損症では陽性例に占める保因者の比率が高く、MCAD 欠損症では保因者と確定したケースはなかったが、残存活性は保因者に近いレベルまで連続的に分布しており、いずれも罹患者の偽陰性が生じる可能性は低いと考えられた。一方、両疾患に劣らない患者頻度が期待される CPT-2 欠損症の診断例がなかったことは、「二次対象疾患」であることを理由に陽性判定をしていない地域が多数あることが影響しているものと推測される。実際に本研究班の調査で、CPT-2 欠損症による急死例が多数確認されており、一次対象疾患化による全国一律のマススクリーニング実現が急務である。

2．メチルマロン酸血症

ビタミン B12 によって治療可能な病型の罹患例は、表 2 に示す通り現行の指標では上昇度が小さく、再検すると基準値を下回る可能性がある。初回濾紙血による二次検査（メチルマロン酸・総ホモシステイン濃度測定）は、発症前のビタミン B12 補充開始に有用であることが改めて示された。

E．結論

現行マススクリーニングの対象疾患中、比較的高頻度かつ安価な治療介入で高い臨床効果が見込まれる MCAD 欠損症・VLCAD 欠損症・ビタミン B12 反応性メチルマロン酸血症について、初回陽性後の即精検や二次検査の実施は、罹患児の確実な捕捉に有用である。CPT-2 欠損症も同じ方針を応用して罹患児が救われるよう、一次対象疾患化が強く望まれる。

F．健康危険情報

特になし

G．研究発表

1．論文発表

- 1) Hara K, Tajima G, Okada S, et al: Significance of *ACADM* mutations identified from newborn screening of MCAD deficiency in Japan. *Mol Genet Metab* 118 (1): 9-14, 2016.
- 2) Tajima G, Hara K, Tsumura M, et al: Screening of MCAD deficiency in Japan: 16 years' experience of enzymatic and genetic evaluation. *Mol Genet Metab* 119 (4): 322-328, 2016.
- 3) 但馬剛, 原圭一, 津村弥来, 他: CPT-2 欠損症の新生児スクリーニング: 偽陰性発症例の経験と新たな指標による診断体制の構築. 特殊ミルク情報 52 (印刷中).

2．学会発表

- 1) Tajima G, Hara K, Tsumura M, et al: Screening of MCAD deficiency in Japan: 15 years' experience of enzymatic and genetic evaluation. 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, April 3-7, 2016.
- 2) 但馬剛, 津村弥来, 香川礼子, 他: 脂肪酸代謝異常症陽性例への対応: 見逃し例を出さないために. 第43回日本マススクリーニング学

会学術集会，札幌市，2016年8月26-27日

- 3) 但馬剛，香川礼子，前田康博，深尾敏幸：新生児マススクリーニングで発見されたプロピオン酸血症例の全国アンケート調査．第43回日本マススクリーニング学会，札幌市，2016年8月26-27日
- 4) 原圭一，但馬剛，香川礼子，他：カルニチントランスポーター異常症のマススクリーニング：カルニチン補充を要したヘテロ保因者と考えられる1例．第43回日本マススクリーニング学会，札幌市，2016年8月26-27日
- 5) 香川礼子，原圭一，但馬剛，他：マススクリーニング初回陽性・再採血正常の後に発症したビタミンB12欠乏症の乳児例．第43回日本

マススクリーニング学会，札幌市，2016年8月26-27日

- 6) 但馬剛，香川礼子，前田康博，深尾敏幸：プロピオン酸血症例の全国調査：発症後診断例とマススクリーニング発見例の比較検討．第58回日本先天代謝異常学会，東京，2016年10月27-29日
- 7) 香川礼子，但馬剛，原圭一，他：新生児マススクリーニングでシトルリン著増を認め、無症状で経過中の1例．第58回日本先天代謝異常学会，東京，2016年10月27-29日

H．知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 広島地域のタンデムマス法によるマススクリーニング結果 (2016年1月~2016年12月)

| 指標項目 | 陽性 | 対象疾患・鑑別疾患 | 偽陽性 | |
|--------------|----|---|-----|---|
| フェニルアラニン | 1 | 高フェニルアラニン血症 (軽症例) | 1 | |
| 分枝鎖アミノ酸 | 1 | メープルシロップ尿症 (軽症例) | 1 | |
| メチオニン | 2 | 未確定: 軽度高値が持続 (症状なし) | 2 | |
| シトルリン | 1 | シトルリン血症 1 型 (シトルリン著明高値も症状なし) | 1 | |
| C3 | 1 | メチルマロン酸血症 + ホモシスチン尿症 (ビタミン B12 欠乏症の疑い) | 1 | |
| C8 | 1 | MCAD 欠損症 (軽症例) | 1 | |
| C10 (C8~C16) | 2 | グルタル酸血症 2 型 | 0 | 2 |
| C14:1 | 2 | VLCAD 欠損症 保因者 | 1 | 1 |
| | | VLCAD 欠損症 | 2 | |
| C16, C18:1 | 10 | CPT-2 欠損症 | 0 | 1 |

表 2. ビタミン B12 投与で発症を防ぎ得た偽陰性例 (2012 年, 2015 年) と 2016 年発見症例の比較

| 診断年次 | 2016 年 | | 2015 年 | | 2012 年 | |
|--------------|---|----------------------|---|----------------------|---|---------------------|
| 診断名 | VB12 欠乏症 (未確定) | | VB12 欠乏症 | | コバラミン代謝障害 (Cb1D) | |
| 臨床経過 | 母) 妊娠後期 貧血に対し VB12 投与を受けていた 生後経過: 混合栄養にて発育良好 精査後 VB12 投与を開始 | | 胃切除母体より出生 完全母乳栄養 5 か月~ 成長発達停滞 9 か月 溶血性貧血による黄疸 VB12 投与で軽快も 大脳萎縮・発達遅延を遺残 | | 生後経過良好 12 か月 ノ口胃腸炎時 重度アシドーシス + 高アンモニア血症 血液浄化療法を受け回復 後遺症なし VB12 投与にて経過良好 | |
| 生化学 検査所見 | 初診時検体にて 血清 C3 2.71 μM 尿中 MMA 軽度増加 血漿 tHcy 42.2 μM 血清 VB12 81pg/mL | | 急性期検体にて 血清 C3 6.7 μM 尿中 MMA 著増 血漿 tHcy 131 μM 血清 VB12 感度以下 | | 急性期検体にて 血清 C3 14.5 μM 尿中 MMA 著増 血漿 tHcy 5 μM 血清 VB12 597pg/mL | |
| NBS 所見 | C3 (< 3.6 μM) | C3/C2 (< 0.22) | C3 (< 3.6 μM) | C3/C2 (< 0.22) | C3 (< 3.6 μM) | C3/C2 (< 0.25) |
| 初回 | 4.88 | 0.23 | 4.84 | 0.22 | 4.79 | 0.23 |
| 再検 | 2.58 | 0.23 | 3.01 | 0.22 | (再検対象とせず) | |
| 初回検体 二次検査 | MMA (< 1.0 μM) | tHcy (< 5.0 μM) | MMA (< 1.0 μM) | tHcy (< 5.0 μM) | MMA (< 1.0 μM) | |
| | 5.2 | 33.6 | 6.7 (後方視的データ) | 5.5 | 11.0 (後方視的データ) | |

分担研究課題

マスキングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 特任教授）

コンサルテーション体制確立に関する取り組み、 および患者コホート体制確立に関する枠組みづくり

研究協力者 小林弘典（島根大学医学部小児科 助教）

研究要旨

1. コンサルテーション体制等の整備に関する研究: タンデムマスによる NBS において、全国における診療の質を確保する目的、NBS 検査施設における分析や判定等に関するサポートを目的としてコンサルテーションセンターおよびホームページの整備等が行われている。今年度はコンサル団専用データベースを作成し、コンサル団メンバーが過去の全ての回答例などを容易に確認する事が出来るシステムを構築した。メンバーの構成が変わっても安定的に質の高い回答を提供する事に貢献することが期待される。

2. 患者のコホート体制整備に関する研究: 本研究は自治体から陽性例の情報を得る事を出発点とする疫学研究であり、患者保護者の同意を必要としないデザインとして実施した。昨年の研究では、このデザインでは個人情報保護条例のために情報提供が得られない自治体が少なくない事が明らかになったが、本年度も同様の結果が予想される。一方、本研究で得られた正確かつ継続的な患者情報は死亡例や発達障害の発生率など、NBS の質を向上させるために必須である事も明らかになった。今後は NBS 受検の同意を取得する際に、陽性時のフォローアップに対する同意を取得するなどの、現状に即した解決策を模索する必要がある。

A. 研究目的

1. コンサルテーション体制等の整備に関する研究

2014 年度から全国実施となり 3 年目になるタンデムマス・スクリーニング（以下、TMS スクリーニング）において、地域間、施設間での検査結果の解釈や診断・治療水準の確保、NBS 検査施設における分析や判定等に関するサポートを目的として、67 自治体からの委託業務の一環として NPO 法人 タンデムマス・スクリーニング普及協会によりコンサルテーションセンターの運営およびホームページによる情報提供等が行われている。本研究ではこれらの事業の 2016 年度における実績および今後の課題等について評価を行

い、TMS スクリーニングの質的向上のためのサポート体制の検討および整備を目的とする。

2. 患者のコホート体制整備に関する研究

タンデムマス法で発見される疾患の頻度は、全体としては約 9 千人に 1 人といわれるが、個々の疾患は数万から 200 万出生に 1 人以下の頻度であり、超稀少疾患といえる。わが国全体で患者数を把握し追跡していくことで、自然歴や最適な治療法、治療効果、およびタンデムマス導入による臨床的、医療経済的効果を検討する事ができる。NBS は公的事业であり、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を評価するシステムが必要であるが、現状ではそのために必要な、発見された小児の患者コホート体制は構築さ

れていない。本研究では、2014 年度よりタンドムマスで発見された疾患の正確な頻度、自然歴、臨床的效果を明らかにするために、疫学研究としてのコホート体制の構築を目指し、その中での課題等について検討を行っている。

B. 研究方法

1. コンサルテーション体制等の整備に関する研究

コンサルテーションセンターについては、前年度に引き続き、自治体、医師、検査機関、産科等医療機関を対象として質問を受け付けている。年度毎に改訂している一次受付センターマニュアルで即答出来ない質問については、質問者が専用のフォーマットに記入した内容をメールで受付し、日本マススクリーニング学会から推薦を受けたコンサルテーション医師団もしくは技師団の中で議論された内容を、受付センターを通じて文章で回答している。これらの質問件数、内容について検討を行った。

また、コンサルテーションセンターの利用者の為のコンテンツ充実やコンサル医師団、コンサル技師団が迅速かつ的確な回答を行うための支援ツールのあり方を検討した。

2. 患者のコホート体制整備に関する研究

2014 年度、2015 年度に初回登録を行った症例については継続調査を行った。また、本年度の初回調査については、これまで同様、今年度自治体が把握している 2015 年度出生児の NBS 陽性例に関する情報提供を求め、提供を受けた情報を元にして各精密医療機関の中でこれらの情報から患者を照合し、研究班事務局に匿名化された患者情報の提供を依頼した。

各施設に対して行った調査内容は以下の通りであった。

1)自治体への調査 2015 年度陽性例の情報

診断名（疑い含む）

患者生年月日および性別

出生医療機関

診断した病院（精密医療機関）

フォローアップ病院、主治医

2)初回登録例に対する調査(2015 年度陽性例)

確定診断名（病型）

患者の出生体重

確定診断した方法

診断時の症状の有無

その他（自由記載、特記すべき臨床所見）

3)2013、2014 年度の NBS 陽性例に対するフォローアップ調査

身体発育状況（体重、身長）

発達状況(正常範囲か、軽度遅滞、中等度遅滞、重度遅滞)

治療状況（方法と効果）

その他（自由記載、特記すべき検査異常や QOL 上の問題点等）

（倫理面への配慮）

本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)を受けて行っている。また、本研究の意義を周知するために、研究班ホームページを開設し、本研究の目的、意義、収集する疫学情報の内容、本研究によって来される効果、などを公表している。

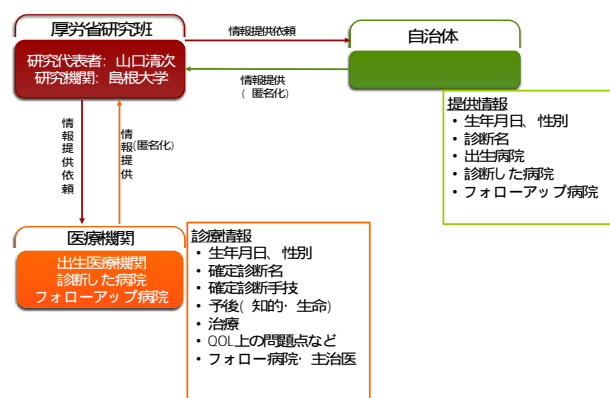


図 1. コホート研究体制

C. 研究結果

1. コンサルテーション体制等の整備に関する研究

表 1. コンサルセンターへの問合せ内容(2016年)

| カテゴリー | 数 | ジャンル | 数 |
|----------|----|-------------|----|
| 小児科医師等 | 34 | 数値データについて | 2 |
| 産婦人科医師等 | 2 | 検査・検査基準について | 15 |
| 法医学医師等 | 1 | 精密検査の相談・依頼 | 11 |
| 検査機関 | 4 | 診断・治療方針 | 18 |
| 助産師 | 1 | 検体採取法に関して | 2 |
| 自治体 | 14 | 再採血・再検査 | 0 |
| 医療機関事務局等 | 11 | 検体輸送 | 1 |
| | | 検査費用 | 8 |
| | | 検体保存 | 1 |
| | | その他 | 9 |
| 計 | 67 | 計 | 67 |

2016年4月から12月におけるコンサルセンターに対する問い合わせの質問者内訳および質問内容の分類を表1に示した。質問者の内訳は前年度と同様に、小児科および自治体からの問い合わせが大半を占め、初年度に多かった検査機関からの問い合わせは少ない傾向が維持された。一方、今年度は医療機関の事務からの問い合わせが11件とこれまでになく増加した。これは精密検査時のアシルカルニチン分析もしくは尿中有機酸分析を行う際の相談内容に関する比率は昨年と大きな変化はみられず、検査結果の解釈や診断・治療、およびその過程で必要となる精密検査に関する問い合わせが多くを占めた。

コンサルテーションセンターの利用者がより必要な情報にたどり着ける事を目指し、過去にコンサルセンターに質問があったうちで、複数回問い合わせのあったものや単回であっても重要と思われる内容を抽出し、過去の回答例として供覧出来るようHPを改変した。また、この際疑い病名を十分に承知していなくても目的の情報に到達出来るよう各指標からの見出しとした(図2)。

測定指標：C0
対象疾患：■ 全身性カルニチン欠乏症 (OCTN2異常症)

▼小児科医師等、医療関係者の方へ

C0低値によるタンデムマス再検査 (全身性カルニチン欠乏症の疑い)
全身性カルニチン欠乏症診断のための、遊離カルニチン分画排泄率の求め方

▼検査機関の方へ

測定指標：C8
対象疾患：■ グルタル酸血症2型

▼小児科医師等、医療関係者の方へ

グルタル酸血症2型疑いの患児のフォローアップについて

▼検査機関の方へ

その他

▼小児科医師等、医療関係者の方へ

Critical sampleが少量の場合の優先的な検査項目について
EDTA抗凝剤入り試験管で採血された血液での検査について
カルニチン代謝異常症の検査および診断の進め方について
低カルニチン血症と低血糖
尿素サイクル異常の疑いの新生児の検査
低血糖発作発症児の特殊分析や治療方針について

図 2. コンサルセンターHP (抜粋)

次に、回答するコンサル医やコンサル技師が過去の事例を引用したり、過去のコンサル医・技師団の見解を確認する作業を容易にするため、コンサル団専用のデータベース(コンサル団DB)を作成し、インターネット経由でアクセス出来るようなシステムを構築した。コンサル団DBにはコンサル医・コンサル技師が固有のパスワードでログインする事が可能であり、過去の電話応対事例やコンサル団の回答例などが容易に検索出来るように主に疾患毎の分類で情報を整理している(図3)。



図 3. コンサル団専用 DB (抜粋)

2. 患者のコホート体制整備に関する研究

本研究に対して情報提供が得られた自治体数を表 2 に示す。今年度は最終的な集計が終了していないが、現時点では協力が得られた自治体は 36 であり、協力不可の数も 2014 年度よりも多い。協力不可と回答があった自治体においては、全て各自治体の個人情報保護条例に抵触する事が原因という事であった。一方、各医療機関に対する二次調査については表 3 に示す通りほぼ 100%の回収率であった。

二次調査のうち、2 年目、3 年目のフォローアップ調査についても現時点では集計中であるが、3 年目になる 2014 年調査症例について、発達状況について注目してみると 2 年目の調査で 6 例の発達遅滞(境界域以上)であったのに対して、3 年目の本年では 12 例が発達遅滞と報告を得た。同様にフォローアップ 3 年目となる集団において、2 年目調査までに 3 例の死亡例(メチルマロン酸血症;日齢 40、プロピオン酸血症;新生児期、TFP 欠損症;1 歳 4 か月)であったが、3 年目調査では 1 例の CPT-2 欠損症患者の死亡例が確認された。CPT-2 欠損症例については感染症罹患時の急性発作が死因であった。

表 2. 自治体からの回答内容

| | 2014 年 | 2015 年 | 2016 年 |
|------|--------|--------|--------|
| 未回答等 | 8 | 12 | 22 |
| 協力不可 | 1 | 13 | 9 |
| 協力可 | 58 | 42 | 36 |

集計中(2017/2/8 現在)

表 3. 一次調査と二次調査の回答率

| | 2014年 | 2015年 | 2016年 |
|---------------------|-------|-------|-------|
| 一次調査への回答率 | 87% | 63% | 54% |
| 陽性者 (自治体から得た患者数) | 98例 | 73例 | 調査中 |
| 二次調査への回答率 | 98% | 100% | 調査中 |
| 確定診断例 | 80例 | 60例 | 調査中 |

D. 考察

1. コンサルテーション体制等の整備に関する研究

コンサルセンターに対する問い合わせの件数は、昨年の同期間と比べると 107 から 67 件と減少している。その内容の内訳については、依然として精密検査を行う立場の小児科医からの問い合わせが多く、その内容も精密検査や治療を含む初期対応などに関する問い合わせが中心であった。その部分については昨年度と変化はなく、対象となる疾患が超稀少疾患である故に、一小児科医が多く多くの患者の診断に立ち合う場面が少なく、結果として個人としての経験値を蓄積しにくい事が推測される。一方、全体の問い合わせ件数が減少傾向であるのは、2015 年末に日本先天代謝異常学会編で出版された「新生児マススクリーニング対象疾患等診療ガイドライン 2015」などが入手出来る様になり、知識の整理や診断の手順が周知されてきた事が要因である可能性もある。尚、このガイドラインは 2016 年末からはインターネット上でも参照可能となっており (<http://jsimd.net/pdf/newborn-mass-screening-disease-practice-guideline2015.pdf>)、今後

はこれらをコンサルテーションセンターの HP でも積極的に周知していく事が重要と思われた。

コンサル団専用 DB については、今後時間とともにコンサル団の構成メンバーが変更することになっても、過去の回答や学会としての見解などを蓄積する事ができる。また、過去の回答例などを引用することも容易になり、質の高い回答を短時間、かつ継続的に作成するために有用であると考えられる。

2. 患者のコホート体制整備に関する研究

NBS の患者コホートが悉皆性の求められる事業である点を考えると、本研究における患者登録のデザインは自治体からの情報提供が出発点になっているため、個人情報保護条例の解釈により研究班等に患者情報の提供ができない自治体がある場合は正確な疫学情報を得る事が難しい。一方、医療機関からの二次調査の回収率は 100% に近い。仮に全ての自治体から協力が得られるシステムを構築出来た場合、疾患の正確な頻度、自然歴、臨床的效果を明らかにするために十分な患者コホートになり得る。本研究で明らかになったように、正確な患者数を把握して継続的に調査を行うことで、これまで考えられていた患者発見頻度などが必ずしも正確ではなかったこと、経時的調査によって、NBS 発見例のなかでも経時的に発達遅滞を呈する症例が増える傾向がある事、発見例の中にもその後のフォローアップ中に死亡の転帰をとる症例がある事など、スクリーニングの質を向上させるために重要な情報が得られる。今後は

すべての自治体の個人情報保護条例をクリア出来るような同意の形式を作成し、NBS の受検同意の際に陽性時のフォローアップに対する同意を予め取得するなど、現状に即した同意の形式などを検討し実施していく事が望まれる。

E. 結論

1. コンサルテーション体制等の整備に関する研究

コンサルテーションセンター主な利用者である精密検査を行う小児科医に対して、専門的な知識がなくとも必要な情報に到達できるよう HP 上の構造や検索を工夫した。また、コンサル団専用 DB はコンサル団の構成メンバーが替わっても継続的に質の高い回答を作成するために有用であり、今後のデータ蓄積が望まれる。

2. 患者のコホート体制整備に関する研究

本研究のデザインは患者保護者の同意を必要としない疫学研究であったが、このデザインでは個人情報保護条例のために情報提供が得られない自治体が少なくない事が明らかになった。一方、患者コホートによって得られる情報は NBS の質を向上させるために必須である事も明らかになった。今後は NBS 受検の同意を取得する際に、陽性時のフォローアップに対する同意を取得するなどの、現状に即した解決策を模索する必要がある。

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 特任教授）

CPT2 酵素欠損症等疾患と突然死の関連について

研究協力者 高柳正樹（帝京平成大学地域医療学部看護学科 教授）

研究要旨

医学中央雑誌の検索システムを利用した検索結果や学会報告などから、CPT2欠損症による突然死症例を収集した。昨年報告した症例以外には1例の収集漏れが見出された。突然死をきたした症例の家系には同胞の突然死も多く報告されていることから、そのような症例を合わせるとさらに多くの突然死症例が存在すると考えられる。CPT2欠損症以外の疾患による突然死症例も収集して報告した。早急に新生児拡大マススクリーニング（TMSスクリーニング）の検査項目にCPT2欠損症を追加することが必要であると考えられた。

A．研究目的

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2(CPT2)欠損症死をきたすことがよく知られている。今回 CPT2 欠損症にて突然死をきたした症例を収集して、全国で何例ぐらいの症例が存在するかを考察する。

B．研究方法

医学中央雑誌の検索機能を利用して、CPT2 酵素欠損症および新生児タンデムマススクリーニング対象疾患と突然死の関連について検討した。

検索項目：

突然死、SIDS（乳幼児突然死症候群）、CPT（カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ）、MCAD（中鎖脂肪酸脱水素酵素）、VLCAD（極長鎖脂肪酸脱水素酵素）、グルタル酸血症、高アンモニア血症を検索ワードにして検索した。

検索期間を 2015、2016 年とした。

結果：症例報告まで検索したが、1 例の論文もヒットしなかった。

期間を 5 年前に再設定して、検索漏れの論文があ

るかチェックしたところ渡邊の論文がヒットした。

（倫理面への配慮）

本研究は既出の論文を検索することにより行われるので、基本的に個人の情報保護などの倫理的問題は生じないものとする。

C．研究結果

症例報告まで検索したが、201、2016 年では 1 例の論文もヒットしなかった。

期間を 5 年前に再設定して、検索漏れの論文があるかチェックしたところ渡邊の論文がヒットした。

昨年度の研究を整理して CPT2 酵素欠損症で突然死の 15 症例の報告をまとめて表 1 に示した。これまでに収集できた CPT2 酵素欠損症以外の TMS スクリーニング対象疾患になっている疾患で突然死の報告 5 症例をまとめて表 2 に示した。

D．考察

高柳が診断した 17 家系 20 症例の検討では、表

兄弟が死亡している家系が2家系認められ合計3症例が突然死している。確定診断はついていないが CPT2 酵素欠損症で突然したものと思われる。(日本マススクリーニング学会誌 vol18:p43-49,2008)

報告にならない、または診断がついていない先天代謝異常症による突然死症例は、今回報告した症例数の5-10倍になるのではと推測される。今後小児の死亡例全例に Child Death Review が地域で行われるように、関係者が連携して体制を構築していく必要があると思われる。

E. 結論

CPT2 酵素欠損症による SUD(sudden unexpected death)：予期出来ない突然死，ALTE(apparent life-threatening event)：乳幼児突発性危急事態の症例は数多いものと思われる。新生児のタンデムマススクリーニングに CPT2 酵素欠損症を対象疾患として取り込んでいくことは喫緊の課題と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 高柳正樹、山本重則、小川恵美、他。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 酵素欠損症 17家系 20症例の臨床像について。日本マススクリーニング学会誌 vol18:p43-49,2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. CPT2 酵素欠損症で突然死した症例

| 症例 | CPT2欠損症に対する新生児マススクリーニングの結果 | 死亡した年齢 | 発症経過 |
|----|----------------------------|--------|-----------------------------------|
| 1 | TFP欠損症の疑い | 生後8カ月 | 正常発達だったが突然死した。 |
| 2 | 異常なし CPT2再検で正常 | 7カ月 | 発熱後急性脳症 |
| 3 | 開始前 | 9カ月 | 発熱、胃腸症状、意識障害 |
| 4 | 開始前 | 8カ月 | 発熱、ぐったり、意識障害 |
| 5 | 開始前 | 1歳1カ月 | 発熱、感冒症状、意識障害 |
| 6 | 開始前 | 6か月 | 死亡数日前から感冒症状。医療機関受診 帰宅途中に心肺停止 |
| 7 | 開始前 | 11か月 | 数日前より感冒症状 午前中ぐったりしていて午後死亡 |
| 8 | CPT2と診断 | 1歳3か月 | 上気道炎罹患時自宅で突然死 |
| 9 | 開始前 | 9か月 | |
| 10 | 開始前 | 1歳1カ月 | |
| 11 | 開始前 | | 男子 ライ様症候群 |
| 12 | 開始前 | | インフルエンザ感染後、痙攣、多臓器不全、死亡 |
| 13 | 開始前 | | 双生児症例 |
| 14 | 開始前 | | 症例13と双生児 |
| 15 | 開始前 | 1歳1か月 | 死亡6日前に低血糖、痙攣重積入院加療。当日痙攣重積で搬送され死亡。 |

表2. タンデムクススクリーニング対象疾患の突然死症例

| 症例 | 新生児マススクリーニング | 死亡した年齢 | 発症経過 | 最終診断 |
|----|--------------|--------|--------------|---------------|
| 1 | 開始前 | 9か月 | 正常 | グルタル酸血症 2型 |
| 2 | 開始前 | 1か月 | 自宅で就寝中に死亡 | VLCAD欠損症 |
| 3 | 開始前 | 8カ月 | 発熱、胃腸症状、意識障害 | MCAD |
| 4 | 開始前 | 1歳8カ月 | 発熱、ぐったり、意識障害 | MCAD |
| 5 | 開始前 | 1歳5か月 | 意識障害、痙攣 | VLCAD欠損症 |

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 特任教授）

遺伝子診断パネル運用システム

研究協力者 深尾敏幸（岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授）

研究要旨

2014年から全国でタンデムマス(TMS)による新生児マススクリーニング(NBS)が開始され、対象疾患は6疾患から少なくとも19疾患に増加した。先天代謝異常症は遺伝子変異により酵素の残存活性に変化をきたすので、遺伝子変異を同定した上でフォローアップを行うことは本人の臨床的重症度を推測する上でも有用である。本研究事業と協力し、我々は日本医療研究開発機構(AMED)の難治性疾患実用化研究事業として、二次対象疾患を含めた遺伝子診断パネルを用いて疾患の遺伝子解析を行い、研究班で運用する仕組みを構築した。遺伝子型を評価したうえでの臨床経過、治療反応性、予後をフォローすることでデータの蓄積を進め、遺伝子変異によって同一疾患であってもその診療ガイドラインを個別化できる可能性もある。

その他の研究協力者

笹井英雄（岐阜大学医学部附属病院新生児集中治療部 医員）

大塚博樹（岐阜大学医学部附属病院小児科 医員）

A．研究目的

2014年から全国でTMSによるNBSが開始され、対象疾患は6疾患から少なくとも19疾患に増加した。遺伝性疾患においては、genotype-phenotype correlationがみられる疾患が多い。先天代謝異常症においては遺伝子変異により酵素の残存活性に変化をきたすので、遺伝子型を評価することは臨床像、治療反応性、予後を考える上で重要である。しかし、これまで一部の疾患を除けば、遺伝子変異を検討した上での調査研究は行われていない。

NBSの1次対象疾患となった疾患については遺伝学的検査およびそれに対する遺伝カウンセリング料が保険算定されているが、保険点数が低いためにこれで請け負ってくれる検査会社がなく、

実際問題として遺伝子変異同定をこの保険診療として行うことが難しい。一部の疾患については、個々の専門家が、自分の研究室で時間をみつけてPCR、シーケンスをサービスで行っているのが現状であった。

NBSという公的なスクリーニング対象疾患に対して、遺伝子解析による確定診断が公的に提供されていないことは、変異の差による臨床像の差、治療反応性の差、予後の差などを評価できず、マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究において障害となると考えられる。

近年、次世代シーケンサー(NGS)にかかるコストは年々減少しており、場合によっては従来の古典的なキャピラリーシーケンスとほぼ変わらない程度まで安価になりつつある。そこで、かずさDNA研究所と協力してNGSを用いた遺伝子パネルによる診断システムを構築し運用を開始した。

B．研究方法

AMED の班研究として、二次対象疾患も含めた遺伝子パネルを用いて疾患の遺伝子解析を行い、下記のフロー（図1）に示すように研究班で運用する仕組みを構築した。先天代謝異常学会の患者

レジストリシステムである JaSMIn への登録も促していくことで、今後の患者情報のフォローも視野に入れたシステムである。

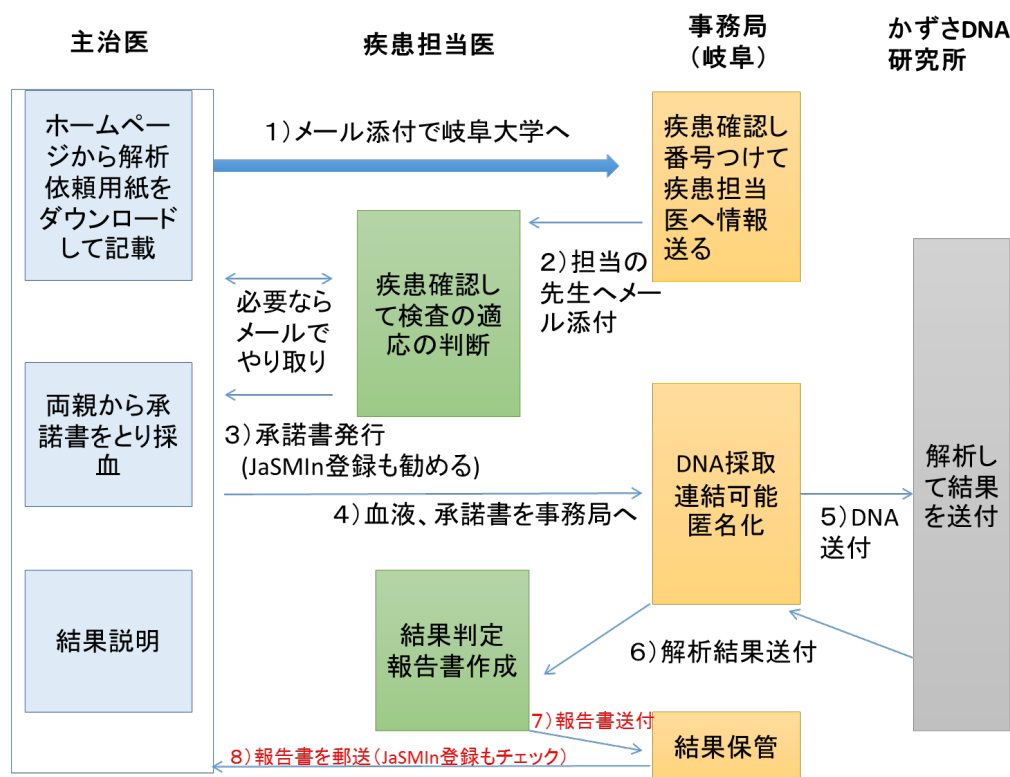


図1. 遺伝子診断パネルの解析フロー

2015年5月から(<http://www.jsiem.com/>)で受付を開始し、疾患群ごとに適切な疾患担当医へ割り振ることで、主治医への専門的なアドバイスも可能となっている。疾患担当医を以下に示す。

藤田保健衛生大学医学部小児科 中島葉子、伊藤哲哉
ガラクトース血症

大阪市立大学大学院医学系研究科発達小児医学 濱崎考史
フェニルケトン尿症、関連疾患

熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野 松本志郎、中村公俊
メーブルシロップ尿症、アルギニノコハク酸尿症
シトルリン血症1型、OTC欠損症、CPS欠損症、NAGS欠損症

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 坂本修
国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室 但馬剛
東京慈恵会医科大学小児科学 小林正久
メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、イソ吉草酸血症
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症、ホモシスチン尿症
CPT1欠損症、CPT2欠損症、CACT欠損症、シトリン欠損症

島根大学医学部小児科 小林弘典、長谷川有紀
岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 笹井英雄、深尾敏幸
HMG-CoAリアーゼ欠損症、β-ケトチオラーゼ欠損症、OCTN2欠損症
メチルクロトニルグリシン尿症、グルタル酸尿症I型、グルタル酸尿症II型
三頭酵素欠損症、VLCAD欠損症、MCAD欠損症

当初、ライブラリ調整コストが比較的安価であるマルチプレックスPCR法にて計60遺伝子を含む遺伝子パネルで運用を開始した。その後、システムが安定して軌道に乗ったため、2016年7月からはシーケンス効率がより優れているCapture probe法へ検査方法を移行した。同時に、NBS対象疾患の鑑別としてあがることの多いケトン体・脂肪酸代謝異常症や糖原病の遺伝子もまとめて

検査が可能となる計168遺伝子を含む遺伝子パネルへ拡張した。具体的な遺伝子名を図2に示す。

60遺伝子 ～2016年7月

- ABCD4, ACADM, ACADVL, ACAT1, ASL, ASS1, AUH, BCKDHA, BCKDHB, BTM, CBS, CPS1, CPT1A, CPT2, DBT, DLD, ETFB, ETLF, ETLFDH, GALE, GALK1, GALT, GCDH, GCH1, HADHA, HADHB, HCFC1, HLCS, HMGCL, HSD17B10, IVD, LMBRD1, MAT1A, MCCC1, MCCC2, MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC, MTHFR, MTR, MTRR, MUT, NAGS, OTC, PAH, PCBD1, PCCA, PCCB, PTS, QDPR, SLC22A5, SLC25A13, SLC25A20, SLC52A1, SLC52A2, SLC52A3, SLC5A6, SPR, TAZ

168遺伝子 2016年7月～ Capture probe法へ移行 (ケトン体・脂肪酸代謝異常症パネル、糖原病パネルと合体)

- ABCD4 ACAA2 ACAD10 ACAD11 ACAD8 ACAD9 ACADL ACADM ACADS ACADSB ACADVL ACAT1 ACAT2 ACSF3 ACSM1 ACS2 ADPGK AGL ALDH6A1 ALDOA ALDOB ASL ASS1 AUH BCKDHA BCKDHB BDH1 BSG BTM CBS CPS1 CPT1A CPT1B CPT1C CPT2 CRAT CROT DBT DECR1 DLD ECHS1 ECI1 ENO3 EPM2A ETFB ETLF ETLFDH FBP1 G6PC GAA GALE GALK1 GALT GAPDH GBE1 GCDH GCH1 GCK GK2 GPD1 GPD2 GSK3B GYG1 GYS1 GYS2 HADH HADHA HADHB HCFC1 HIBADH HIBCH HK1 HLCS HMGCL HMGCS2 HSD17B10 IVD LDHA LDHB LMBRD1 LPIN1 MAT1A MCCC1 MCCC2 MMAA MMAB MMACHC MMADHC MTAP MTHFR MTR MTRR MUT NAGS NHLRC1 OTC OXCT1 PAH PCBD1 PCCA PCCB PCK1 PCK2 PFKL PFKM PFKP PGAM2 PGK1 PGM1 PHKA1 PHKA2 PHKB PHKG1 PHKG2 PKLR PKM PLCH2 PPP1R3B PPP1R3C PRKAG2 PRKAG3 PRKCA PTS PYGB PYGL PYGM QDPR RBCK1 SLC16A1 SLC16A10 SLC16A11 SLC16A12 SLC16A13 SLC16A14 SLC16A3 SLC16A4 SLC16A5 SLC16A6 SLC16A7 SLC16A8 SLC16A9 SLC17A3 SLC22A5 SLC22A5 SLC25A13 SLC25A20 SLC2A1 SLC2A10 SLC2A11 SLC2A12 SLC2A13 SLC2A14 SLC2A2 SLC2A3 SLC2A4 SLC2A5 SLC2A6 SLC2A7 SLC2A8 SLC2A9 SLC37A4 SLC52A1 SLC52A2 SLC52A3 SLC5A12 SLC5A6 SLC5A8 SPR TAZ

図2. 遺伝子診断パネルによる解析対象遺伝子

C. 研究結果

2015年度は62症例を解析した。JaSMINへの登録は約半数程度の結果であった。

2015年度(2015/5/1-2016/3/31)

62症例

(2014/1/1以降に出生の児)

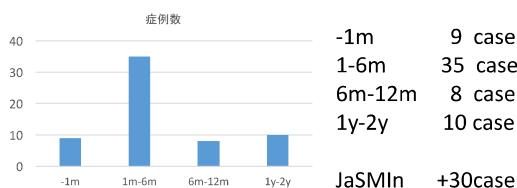


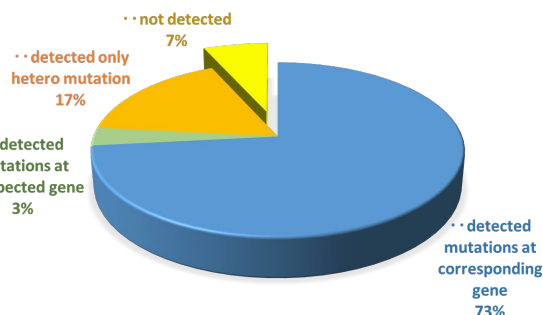
図3. 2015年度 解析対象 症例数

疾患の内訳は次の表1に示す通りである。

表1. 2015年度 解析対象 疾患内訳

| 臨床暫定診断 | 症例数 |
|-----------------------------|-----|
| プロピオン酸血症 | 13 |
| メチルマロン酸血症 | 10 |
| 全身性カルニチン欠乏症 | 7 |
| メチルクロトニルグリシン尿症 | 6 |
| VLCAD欠損症 | 5 |
| 高フェニルアラニン血症 | 3 |
| MCAD欠損症 | 3 |
| シトルリン血症I型 | 3 |
| OTC欠損症 | 2 |
| シトルリン欠損症 | 2 |
| グルタル酸血症I型 | 2 |
| CPS-I欠損症/NAGS欠損症 | 1 |
| アルギニノコハク酸尿症 | 1 |
| ガラクトース血症 | 1 |
| 軽症型マルチプルカルボキシルセ欠損症/経度ヒオチン欠乏 | 1 |
| 三頭酵素欠損症 | 1 |
| メープルシロップ尿症 | 1 |
| 計 | 62 |

対象症例のうち、図4に示すように多くの症例で責任遺伝子に変異を同定できた。



- 56/60=93.3%

図4. 2015年度 解析結果 変異同定率

2016年度は新規症例に加えて過去の典型例の解析も行っており、解析症例数は順調に増加している(12月22日時点で102症例。経過中であるが、JaSMIN登録はおよそ半数程度となっている)。

2016年度 (2016/4/1-2016/12/22)

102症例

(2014/1/1以前に出生の児も含む)

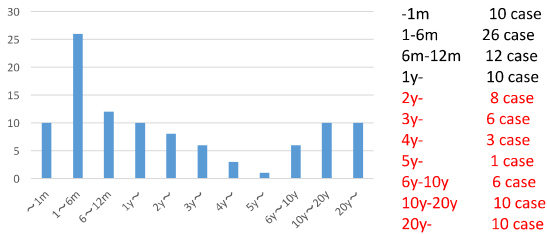


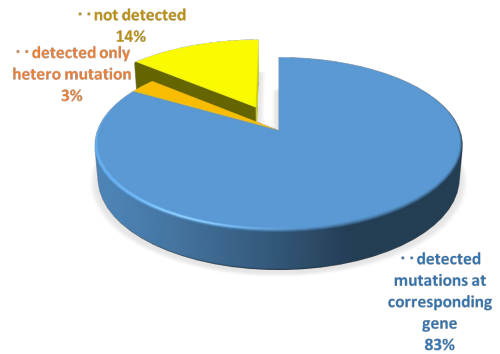
図 5. 2016 年度 解析対象 症例数

同様に疾患の内訳を次の表 2 に示す。

表 2. 2016 年度 解析対象 疾患内訳

| 臨床暫定診断 | 依頼症例総数 (~2016.12.22) |
|------------------|-------------------------|
| プロピオン酸血症 | 17 |
| 高フェニルアラニン血症 | 12 |
| メープルシロップ尿症 | 10 |
| VLCAD欠損症 | 9 |
| ガラクトース血症 | 9 |
| メチルマロン酸血症 | 7 |
| メチルクロトニルグリシン尿症 | 6 |
| MCAD欠損症 | 5 |
| CPT2欠損症 | 4 |
| シトルリン血症1型 | 4 |
| グルタル酸血症1型 | 4 |
| 全身性カルニチン欠乏症 | 3 |
| CPS1欠損症 | 3 |
| マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 | 2 |
| ホモシスチン尿症 | 2 |
| 一過性高メチオニン血症の疑い | 2 |
| OTC欠損症 | 1 |
| アルギニノコハク酸尿症 | 1 |
| CPT1欠損症 | 1 |
| 計 | 102 |

まだ解析中の症例を多く含み、結果は中途であるが、対象症例のうち、図 6 に示すように多くの症例で責任遺伝子に変異を同定できている。



• 30/36=83.3%

図 6. 2016 年度 解析結果 変異同定率

この遺伝子診断パネル運用システムでは、遺伝子型 - 表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) のデータを蓄積していくことが重要な目的であるが、その 1 例を表 3 に示す。

表 3. genotype-phenotype correlation の例

| No. | Age (at the consulting) | Clinical Tentative Diagnosis | Identified Gene | Allele | Allele |
|-----|-------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| 55 | 5m | PA | (Under examination) | | |
| 48 | 2m | PA | n.d. | n.d. | n.d. |
| 49 | 1m | PA | PCCA | G497R | n.d. |
| 14 | 1m | PA | PCCB | T428I | Y435C |
| 16 | 2m | PA | PCCB | Y435C | Y435C |
| 20 | 1m | PA | PCCB | Y435C | Y435C |
| 21 | 1m | PA | PCCB | Y435C | Y435C |
| 38 | 2m | PA | PCCB | C365Y | Y435C |
| 39 | 1m | PA | PCCB | Y435C | Y435C |
| 47 | 1m | PA | PCCB | T428I | Y435C |
| 50 | 1m | PA | PCCB | Y435C | Y435C |
| 56 | 8m | PA | PCCB | Y435C | R499* |
| 61 | 5m | PA | PCCB | T428I | Y435C |
| 2 | 1y3m | MMA | MUT | IVS2+5G>A | c.1864_1865insA |
| 7 | day25 | MMA | MUT | R369H | L494* |
| 9 | 1m | MMA | MUT | R369H | G648D |
| 22 | 1m | MMA | MUT | IVS2+5G>A | R727* |
| 26 | day17 | MMA | MUT | IVS2+5G>A | R727* |
| 28 | day29 | MMA | MUT | E117* | R581* |
| 34 | 2m | MMA | MUT | G426R | R581* |
| 37 | 1y0m | MMA | MUT | c.1180_1181insGTCA | n.d. |
| 44 | 1y0m | MMA | MUT | N120K | R581* |
| 46 | 1y0m | MMA | MUT | Q35* | IVS2+5 G>A |

プロピオン酸血症 (PA) であると NBS から診断された症例の多くで PCCB 遺伝子に Y435C 変異をホモで持つ症例が同定できた。そして、これらの症例は少なくとも現時点では一度もアシドーシス発作を起こしておらず、Y435C は残存活性を持った軽症変異であることが推測される。

D. 考察

疾患ごとに、genotype-phenotype correlation のデータを多く蓄積していくことで、遺伝子型から臨床経過、治療反応性、予後との関連性が明らかとなり、その診療ガイドラインを個別化できる

可能性がある。

現在、NBS 対象疾患のうち、1 次対象疾患については 3880 点の保険点数がついており、この遺伝子診断パネルのシステムを恒常的に成り立たせるには保険医療制度の中で遺伝子検査を行っていくことが必要になってくる。DNA 解析を行うか、さ DNA 研究所が、本年度に衛生研究所の資格を取得したため、今後は保険請求の仕組みを含む形でのシステム運用も検討している。

E. 結論

遺伝子診断パネルの運用を開始し、NBS 対象疾患の genotype-phenotype correlation のデータ蓄積・解析を開始した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akagawa S, Fukao T, Akagawa Y, Sasai H, Kohdera U, Kino M, Shigematsu Y, Aoyama Y, Kaneko K. Japanese Male Siblings with 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency (HSD10 Disease) Without Neurological Regression. *JIMD Rep.* Jun 16, 2016

2) Erdol S, Ture M, Yakut T, Saglam H, Sasai H, Elsayed A, Otsuka H, Fukao T. A Turkish Patient With Succinyl-CoA:3-Oxoacid CoA Transferase Deficiency Mimicking Diabetic Ketoacidosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening.* Vol.4 Jun 3, 2016 DOI: 10.1177/2326409816651281

3) Otsuka H, Sasai H, Aoyama Y, Elsayed A, Vassiliki K, Martin L, Oliver JS, Fukao T. Exon 10 skipping caused by a novel mutation (c.949G>A) located in an exonic splice enhancer site in *ACAT1* gene. *Mol Med Reports.* 2016 in press

4) Abdelkreem E, Otsuka H, Sasai H, Aoyama Y,

Hori T, Mohamed A, Shaimaa M, Fukao T. Beta-Ketothiolase Deficiency: Resolving Challenges in Diagnosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening* . Vol 4, 2016 DOI: 10.1177/2326409816636644

5) 笹井英雄、深尾敏幸

MTHFD1 欠損症 pp.276-282

別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ(36) 免疫症候群(第 2 版) 日本臨牀社, 2016

2. 学会発表

1) Sasai H, Otsuka H, Fujiki R, Ohara O, Nakajima Y, Ito T, Kobayashi M, Tajima G, Sakamoto O, Matsumoto S, Nakamura K, Hamazaki T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T: Japan-wide gene panel study for target metabolic diseases in newborn mass screening using tandem mass spectrometry. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, 6-9 September, Rome, 2016

2) 笹井英雄、藤木亮次、小原収、中島葉子、伊藤哲哉、小林正久、但馬剛、坂本修、松本志郎、中村公俊、濱崎考史、小林弘典、長谷川有紀、深尾敏幸: 本邦における新生児マススクリーニング対象先天代謝異常症の遺伝子パネル解析. 第 58 回 日本先天代謝異常学会総会 10 月 27-29 日 東京、2016

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

なし

分担研究課題

マススクリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学 客員教授）

研究要旨

日本マススクリーニング学会（学会）技術部会によるタンデムマス・スクリーニング実施状況調査では、事業化当初に比べ再採血率が減少し、想定通りの数の対象患者が発見されていたものの、カットオフ値の設定や再採血率の点での改善を要すると考えられる検査施設も見られた。外部精度管理システムの検討が進み、学会の定めた検査施設基準に基づく精度管理を実施出来る体制が整った。運用を更に深化させ意義ある精度保証体制となるように検討がすすんでいる。これまでに経験した見逃し例を含めた対象疾患患者のスクリーニング指標データを収集した上で、見逃しが生じないようなスクリーニング指標およびカットオフ値の改善に取り組み、LC-MS/MS法を用いた二次検査法を更に改良した。今後、二次検査法の導入に向けた取り組みが重要であることを指摘した。

研究協力者

花井潤師（札幌市衛生研究所・課長）
石毛信之（東京都予防医学協会・主査）
福士 勝（札幌 IDL・所長）
田崎隆二（化学及血清療法研究所・検査係長）
畑 郁江（福井大学医学部小児科・准教授）

A．研究目的

タンデム型質量分析計を用いた先天性代謝異常症等検査（タンデムマス・スクリーニング）が自治体事業として全国実施されているが、自治体より委託された検査施設（指定検査施設）での分析技術や対象疾患病態理解に基づいた対応は未だ改善が必要な状況である。これに対して、日本マススクリーニング学会（以下、「学会」と成育医療研究センター・マススクリーニング研究室（以下、「マス研」）が精度管理や実務研修などの事業を行っており、精度管理については 2015 年 3 月に新生児スクリーニング精度管理合同委員会（以下「NBS 合同委員会」）が設置され、協議が行われている。研究分担者は、これらの組織の協力を得て、全国の検査施設の分析技術や精度管理に関する情報を収集する一方、新たなスクリーニ

ング精度保証技術（second-tier test：初回濾紙血を用いた“二次検査法”）を開発してきた。前年度までの研究成果を踏まえ、引き続き以下の課題を検討した。

学会技術者部会を通じて、指定検査施設の分析データを収集し、スクリーニング指標とカットオフ値が機能しているかを確認する。

指定検査施設での分析精度を向上させるため、施設基準で規定された精度を評価できる外部精度管理法論を学会技術者部会やマス研と NBS 合同委員会の場で検討する。

指定検査施設での再採血検査率のデータなどを踏まえ、偽陽性率を低減させるためのスクリーニング指標やカットオフ値を再検討する。新規指標とそのカットオフ値を適用した場合に生じる再採血率増加に対応するため更に二次検査法を開発し、患者検体を用いてその有用性を検証する。

B．研究方法

(1-1)検査施設の検査実施状況調査（研究協力者・花井の報告書「タンデムマス検査実施状況調査報告（平成 27 年度検査結果）」に詳述）

(1-2)検査施設の正常新生児検査値分布と発見

患者データに基づくカットオフ値の検証（研究協力者・花井の報告書「タンデムマス検査データ Web 解析システムの有用性について」に詳述）

(2)学会検査施設基準適合レベルを検証できる外部精度管理法の開発（研究協力者・福士の報告書「新生児スクリーニングの検査精度向上に寄与する外部精度管理の検討」に詳述）

(3)脂肪酸酸化異常症のスクリーニング指標の見直し

分担研究者が関与している検査施設での偽陽性率の分析データを中心とし、成育医療研究センターの但馬剛分担研究者の酵素活性測定データも加えて、指標の妥当性を検討した。

(4)二次検査法の有用性の検討

花井研究協力者を中心とした学会技術者部会が収集した再採血率や精密検査率から二次検査の必要度を判定した。福井大学小児科でのタンデムマス・スクリーニングおよびハイリスクスクリーニングにおけるアシルカルニチン分析法および LC-MS/MS 二次検査法は既報の通りである。東京都予防医学協会での LC-MS/MS 二次検査については研究協力者・石毛の報告書「東京都における LC-MS/MS 法を用いた二次検査法の検討(第二報)」に詳述されている。

C. 研究結果

(1-1)検査施設の検査実施状況調査（研究協力者・花井の報告書に詳述）

(1-2)検査施設の正常新生児検査値分布と発見患者データに基づくカットオフ値の検証（研究協力者・花井の報告書に詳述）

(2)学会検査施設基準適合レベルを検証できる外部精度管理法の開発（研究協力者・福士の報告書に詳述）

昨年度の NBS 合同委員会における外部精度管理検討課題は、各検査施設からの分析生データを収集する目的を明確にし、簡潔で適切な方法を確立する。各検査施設の分析精度を確認できる検査用濾紙血を作成し、分析値の統計学的評価法を模索することであった。

については、検査施設での検査精度に問題が生じている場合に何が問題なのかを指摘できるデータの収集が目的であることを確認した。そのための Web データ収集システムにおいては、必要な項目のみのデータ収集とすることで作業負担を最小限とするよう改良された。

については、スクリーニング指標のカットオフ値レベルの濃度についての分析精度を重視すること、そのために必要な標品無添加で指標物質濃度が充分低い合成血を作成出来る機関に検査用濾紙血作成を委託することとした。検査用濾紙血の指標濃度レベルについては研究協力者の報告書を参照されたい。このような検査用濾紙血を作成出来たので、その分析により、低濃度レベルでの CV による精度評価、また検量線作成などによる施設間差の評価と標準化の可能性が検討できることになった。

(3)脂肪酸酸化異常症スクリーニング指標の見直し

表 1 に見直し内容を示した。詳細は重松らの論文³⁾を参照されたい。

VLCAD 欠損症と MCAD 欠損症については、既報^{S1)}に示したとおりの再採血率の高さを背景に見直されており、但馬らの検討⁴⁾などにより、その精度が確認されている。CPT1 欠損症と CPT2 欠損症については、重松らの既報^{S2,2)}に詳細が記述されている。

表 1. 改定が推奨されるスクリーニング指標とカットオフ値

| 対象疾患 | スクリーニング指標と陽性判定法 |
|----------|---|
| VLCAD欠損症 | C14:1 > 0.4 μM かつ C14:1 > C10 かつ C14:1 > 12 かつ C14:1 > C14 |
| MCAD欠損症 | C8 > 0.3 μM かつ C8/C10 > 1 |
| CPT1欠損症 | C0/(C16+C18) > 100 かつ C0 > 80 μM |
| CPT2欠損症 | (C16+C18:1)/C2 > 0.62 かつ C16 > 3.0 μM |

(4)二次検査法の有用性の検討

表2に、花井研究協力者報告書から全国の検査施設での状況を抜粋再掲した。再採血がほとんどないという検査施設もあったが、対象疾患スクリ

ーニングごとの再採血率としては比較的高い0.05%以上という施設が多く見られた。これ以外の指標では再採血率は比較的低かった。

表2. 検査施設毎の再採血率の調査結果

| 陽性となった指標 | 再採血率の分布 (%) | 再採血率 > 0.1% (施設数) | 再採血率 > 0.05% (施設数) |
|----------|-------------|-------------------|--------------------|
| C3&C3/C2 | 0~0.61% | 6 | 22 |
| C5 | 0~0.26% | 10 | 18 |
| C5-DC | 0~0.24% | 3 | 16 |
| Leu | 0~0.23% | - | 9 |

これらのスクリーニング指標での陽性例に対する二次検査法は既に昨年度報告したが、C3及びC3/C2の指標でのスクリーニングの妥当性を検証するため、表3に関連対象疾患患者での上記指標、及び新指標の分析値を示した。

メチルマロン酸血症の範疇に入れられるビタミンB12代謝異常および欠乏の患児では、C3とC3/C2の指標では必ずしもスクリーニングできていなかった。新指標としてC3/Met比及びMet低

値を採用するとスクリーニング可能であったが、この指標を採用するといわゆる“ホモシスチン尿症3型”もスクリーニング可能であった。これらの患児の初回新生児濾紙血での二次検査法として、図1に示したLC-MS/MS分析法を開発した。昨年度報告した方法では試料の誘導体化が必要であったが、この方法では質量分析法を改変し非誘導体化サンプル処理で簡便に測定できるようになった。

表3. メチルマロン酸血症およびホモシスチン尿症2型・3型のスクリーニング指標と患者データ

| (新生児濾紙血分析) | | C3 | C3/C2 | C3/Met | Met | メチルマロン酸 | 総ホモシステイン |
|-----------------------|-------|-------------------|-------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | (μM) | | | (μM) | (μM) | (μM) |
| 上限カットオフ値 | | 3.5 | 0.25 | 0.25 | 80 | 1.0 | 5.0 |
| 下限カットオフ値 | | | | | 9.27 | | |
| cbIC | 患者1 | 10.30 | 1.10 | 1.60 | 6.40 | 59.7 | 34.8 |
| | 患者2 | 15.01 | 1.10 | 0.46 | 32.50 | 44.4 | 17.0 |
| cbID | 患者1 | 4.79 | 0.23 | 0.21 | 23.00 | 11.0 | (-) |
| ビタミンB12欠乏症 | 患者1 | 3.59 | 0.21 | 0.34 | 10.65 | 6.7 | 5.5 |
| | 患者2 | 2.14 | 0.45 | 0.35 | 6.12 | 5.5 | 11.8 |
| | 患者3 | 2.53 | 0.23 | 0.28 | 9.00 | (-) | (-) |
| MTHFR欠損症 | 患者1 | 0.62 | 0.13 | 0.13 | 4.98 | 0.5 | 49.2 |
| ホモシスチン尿症 3型(病型未確定) | 患者2 | 0.45 | 0.05 | 0.07 | 6.63 | 0.8 | 10.6 |
| | (患者3) | 0.77 | 0.09 | 0.17 | 4.61 | 1.3 | 10.4 |
| | (患者4) | 0.53 | 0.09 | 0.08 | 6.7 | 0.7 | 28.7 |

【 LC-MS/MS analysis 】

LC column : lmtakt Scherzo SS-C18
mobile phase : [A] 0.5% Formic acid
[B] (0.5M NH₄-Formate & 0.5M NH₄OH)/MeOH (1:9)
MRM mode : negative ion mode for 4.3 min → positive ion mode
flow rate : 0.5ml/min
analysis time : 15 min

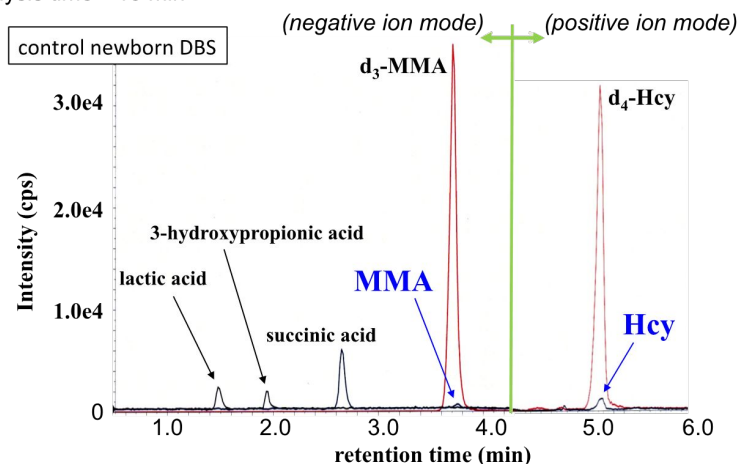


図1 LC-MS/MS法による濾紙血中メチルマロン酸・総ホモシステイン分析

ロイシン陽性によるメープルシロップ尿症スクリーニングでは、アロイソロイシンの二次検査分析（昨年度報告済み）により異化亢進状態での偽陽性を低減できた。

D. 考察

全国の検査実施状況調査では再採血率の低下、前年と同等の発見患者数が確認された。再採血率については、見逃しが起こらないようにカットオフ値が適切に設定されているという前提が重要である。しかし、今回の調査では、非患者新生児での測定値の施設間差を適切に反映してカットオフ値が設定できているとはいえない検査施設が存在していた。また、再採血がほとんど存在しないという検査施設も存在し、このような施設でのカットオフ値の設定が適切かどうか更に調査が必要と考えられた。ともあれ、このような問題点を明らかに出来るシステムは開発されたので、今後はそのデータ解析を踏まえた検査施設への精度保証体制を深めていく必要がある。

新生児スクリーニングでの偽陽性の発生や対象疾患患児の急性発症の点で、新生児の重篤な飢餓状態は見逃すことが出来ない問題である。母乳

栄養推進においては新生児の的確な状態把握を踏まえた栄養法を実施することが望まれる。脂肪酸酸化異常症スクリーニングにおいて、飢餓による異化亢進は偽陽性となることが多い。今回提唱した脂肪酸酸化異常症スクリーニングの新指標を用いると、異化亢進状態を容易に把握することが出来るが、検査施設で単に陽性でないとして放置するだけでよいのかは議論の余地がある。コンサルタント医師を含めたスクリーニング協議会での検討課題とされるべきである。

非患者新生児の家族に無用の不安を与えないためには偽陽性は少ないことが望ましい。偽陽性率を一定程度に下げると統計学的指標を用いてカットオフ値を上げると見逃しの原因になりかねない。見逃し例を含め、対象疾患と診断された患児の新生児濾紙血での指標値を元にして、スクリーニング指標とそのカットオフ値を更に開発すべきである。今回患者データを収集するシステムは出来上がったので、現行の指標のカットオフ値を評価していく必要がある。一方、見逃しが生じないように新たに開発された指標とそのカットオフ値の設定については、初回濾紙血の二次検査分析が前提になる。今回報告したメチルマロ

ン酸血症関連疾患のスクリーニングに関しては、新指標を採用すると偽陽性率が高くなるので、二次検査対応が必須である。二次検査の精度管理法や分析経費の問題を解決し、この二次検査実施体制を早急に整備する必要がある。

E. 結論

外部精度管理・内部精度管理のためのシステム整備が進んだ。更にその運用についても検討を深めていく必要がある。見逃しのないスクリーニングとするための新指標とカットオフ値の適用がすすむように、二次検査法の実施を具体化させる必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 重松陽介：質量分析法による新生児マススクリーニングの実相．J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 64(4);1-5,2016.
- 2) 重松陽介，湯浅光織，畑郁江：CPT2 欠損症の新生児スクリーニング新指標検討の経緯．特殊ミルク情報 52: 12-15, 2016.
- 3) 重松陽介：タンデムマス・スクリーニングのスクリーニング指標の改訂．日本マススクリーニング学会誌，27(1)（印刷中）2017.
- 4) Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M: Screening of MCAD deficiency in Japan: 16years' experience of enzymatic and genetic evaluation. Mol Genet Metab. 119:322-328, 2016.
- 5) Deswal S, Bijarnia-Mahay S, Manocha V, Hara K, Shigematsu Y, Saxena R, Verma IC: Primary carnitine deficiency - A rare treatable cause of cardiomyopathy and massive hepatomegaly. Indian J Pediatr. 2016 Sep 1. [Epub ahead of print]

- 6) Akagawa S, Fukao T, Akagawa Y, Sasai H, Kohdera U, Kino M, Shigematsu Y, Aoyama Y, Kaneko K: Japanese male siblings with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 Disease) without neurological regression. JIMD Rep. 2016 Jun 16. [Epub ahead of print]
- 7) Gupta D, Bijarnia-Mahay S, Kohli S, Saxena R, Puri RD, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Sakamoto O, Gupta N, Kabra M, Thakur S, Deb R, Verma IC: Seventeen Novel Mutations in PCCA and PCCB Genes in Indian Propionic Acidemia Patients, and Their Outcomes. Genet Test Mol Biomarkers. 20(7):373-82, 2016.
- 8) 野崎 章仁，楠 隆，重松 陽介，佐々木 彩恵子，熊田 知浩，柴田 実，林 安里，森 未央子，日衛嶋 郁子，井上 賢治，藤井 達哉：食事摂取量低下とピボキシル基含有抗菌薬 2 日間投与による二次性低カルニチン血症．日本小児科学会雑誌．120(9);1371-1374, 2016.

1-2. 参考論文

- S1) 重松陽介，畑 郁江：アシルカルニチンプロファイルを参照した脂肪酸酸化異常症スクリーニング陽性判定の重要性．日本マススクリーニング学会誌．2(1)；67-73，2015．
- S2) 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．カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-I 欠損症のスクリーニング指標の妥当性の検討．日本マススクリーニング学会誌．23(1);93-97.2013.

2. 学会発表

- 1) 湯浅光織、畑郁江、河北亜希子、他：重篤なケトアシドーシスの治療中に眼球運動障害を呈した -ケトチオラーゼ欠損症の 1 例．第 57 回日本先天代謝異常学会 大阪市，2015 年 11 月

- 2) 湯浅光織、畑郁江、林泰平、重松陽介、西村裕：新生児スクリーニングでのメチオニン値異常に着目した LC-MS/MS 二次検査法の有用性の検討．第 58 回日本先天代謝異常学会．東京，2016 年 10 月
 - 3) 香川礼子、但馬剛、原圭一、佐倉伸夫、小林正夫、田中藤樹、長尾雅悦、重松陽介：新生児スクリーニングでシトルリン著増を認め、無症状で経過中の 1 例．第 58 回日本先天代謝異常学会．東京，2016 年 10 月
 - 4) 磯崎由宇子、湯浅光織、畑郁江、重松陽介：4 歳未満で BH4 治療を開始した軽症フェニルケトン尿症 2 例の臨床経過．第 58 回日本先天代謝異常学会．東京，2016 年 10 月
 - 5) 原圭一、但馬剛、香川礼子、岡田賢、岡野里香、重松陽介、栢田紗季、森岡千代美、吉井千代子：カルニチントランスポーター異常症のマススクリーニング カルニチン補充を要したヘテロ保因者と考えられる 1 例．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
 - 6) 香川礼子、原圭一、但馬剛、重松陽介、栢田紗季、森岡千代美、吉井千代子：マススクリーニング初回陽性・再採血正常の後に発症したビタミン B12 欠乏症の乳児例．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
 - 7) 湯浅光織、畑郁江、米野聖子、重松陽介：メチオニン低値を指標としたホモシスチン尿を伴う疾患群のスクリーニングシステムの検討．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
 - 8) 但馬剛、津村弥来、香川礼子、岡田賢、原圭一、佐倉伸夫、畑郁江、重松陽介：タンデムマス・スクリーニング検査での疑問を解決しよう 脂肪酸代謝異常症陽性例への対応 見逃し例を出さないために．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
- H．知的財産権の出願・登録状況
なし。

分担研究課題

マスキリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部 教授）

タンデムマス検査実施状況調査報告（平成 27 年度検査結果）

花井潤師（札幌市衛生研究所・保健科学課主査）

研究要旨

日本マスキリーニング学会技術部会が中心となり、平成27年度の新生児マスキリーニング（NBS）検査およびタンデムマス・スキリーニング（TMS）検査結果について、実施状況調査を行った。その結果、TMS実施状況調査では、全施設合計の再採血率、総精検率のうち、一次対象疾患の再採血率が前年度に比べやや低くなったほかは、前年と同じ率であった。一次対象疾患の発見患者数は前年度（76名）に比べやや少ない171例であったが、二次対象疾患の発見患者数は18例と同数だった。

研究協力者

福士 勝（札幌イムノダイアグノスティック
ラボラトリー・所長）
石毛信之（東京都予防医学協会・主査）
田崎隆二（化学及血清療法研究所・検査総轄）

A．研究目的

日本マスキリーニング学会技術部会では、各施設の内部精度管理の充実に向けて、タンデムマス検査 Web 解析システムの運用による測定値分布やカットオフ値の施設間差の解消を支援するとともに^{1,2)}、昨年度に引き続き³⁾、平成 27 年度検査結果について各施設の NBS、TMS スキリーニング検査の実施状況調査を行い、検査の現状と課題について考察した。

B．研究方法

NBS 検査及び TMS 検査の平成 27 年度検査実施状況として、各スキリーニング実施機関に初回検査件数、再採血数、精検数、発見患者数などの調査を行った。

（倫理面への配慮）

該当なし

C．研究結果

1．NBS 検査実施状況調査

(1) 一次疾患全体の集計結果

NBS 検査実施機関 41 施設中、37 施設から回答があった（回答率 90.2%）。

NBS 検査全体の合計再採血数は 29,207 件（2.97%）、即精査数 962 件（0.098%）、再採血後精査数 2,376 件（0.242%）、総精査数 3,338 件（0.339%）であった。PPV は平均 17.9%と良好な割合であった（図 1、表 1）。

2．TMS 検査実施状況調査

(1) 一次対象疾患全体の集計結果

TMS 実施 38 施設中 36 施設（95%）から回答があった。

初回検査件数は、全施設合計で 983,765 件であった。一次対象疾患の全施設合計は、再採血数 3,064 件（0.31%）、即精検数 169 件（0.017%）、再採血後精検数 251 件（0.026%）、総精検数 420 件（0.043%）であった。また、発見患者数は 71 例（調査時点）で発見頻度 1:13,856 であった（図 2、表 2）。

(2) 二次対象疾患全体の集計結果

二次対象疾患群の全施設合計は、再採血数 898 件 (0.09%)、即精検数 36 件 (0.004%)、再採血後精検数 42 件 (0.004%)、総精検数 78 件 (0.008%) であった。また、発見患者数は 9 例で発見頻度 1:109,307 であった(図 3、表 3)。

(3) 平成 26, 27 年度の比較

TMS 検査実施状況のうち、再採血率及び発見患者数について、平成 26, 27 年度の集計結果を比較した。その結果、一次対象疾患全体の再採血率は平成 26 年度には 0.35% だったものが、平成 27 年度には 0.31% とやや低下した。また、一次対象疾患全体の発見患者数は、平成 26 年度には 76 例だったものが、平成 27 年度には 71 例とほぼ同数であった(図 4)。

D. 考察

昨年³⁾と同様に、平成 27 年度 TMS 結果について、スクリーニング実施状況調査を行った結果、再採血率は前年度に比べやや低い傾向を示したが総精検率は変化がなかった。

今回の結果により、各施設の内部精度管理の実施により、昨年度と同等の検査精度で TMS 検査が実施されていることが確認された。

E. 結論

TMS では、検査の指標が多種類であるとともに、タンデムマス検査機器の精度の影響により測定値が変動しやすいことから、各施設での内部精度管理が極めて重要である。各検査施設に対しては、タンデム検査 Web 解析システムを利用した定期的な検査データの確認とともに、TMS 検査実施状

況の定期的な全国調査結果をもとに、検査精度のさらなる向上と施設間差の解消のための支援を実施する体制づくりが必要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 花井潤師, 福士 勝、石毛信之、他: タンデムマス・スクリーニングにおける精度管理の現状と今後の課題 - 内部精度管理の充実に向けた取り組み -, 日本マススクリーニング学会誌, 25(1), 57-66, 2015.

2) 花井潤師, 福士 勝、石毛信之、他: タンデムマス検査データ Web 解析システムについて. 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業(健やか次世代育成総合研究事業))「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 72-74, 2016.

3) 花井潤師, 福士 勝、石毛信之、他: 平成 26 年度タンデムマス検査実施状況調査報告について. 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業(健やか次世代育成総合研究事業))「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 67-71, 2016.

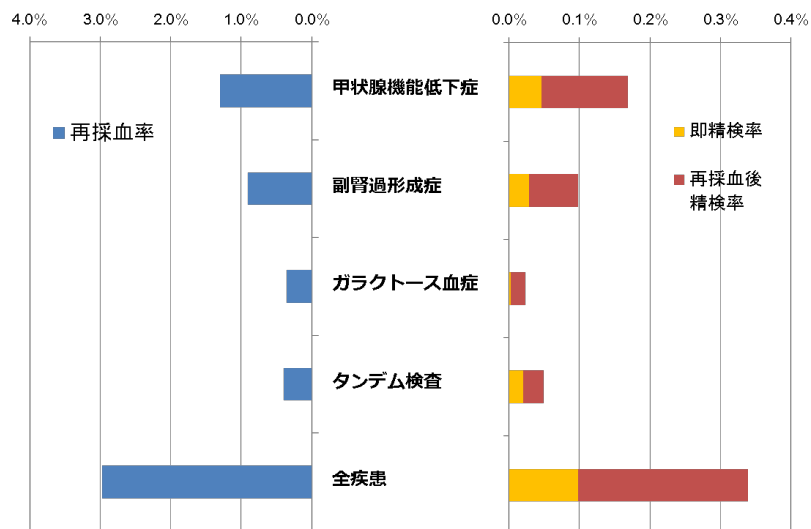


図1. 新生児マススクリーニング検査 平成 27 年度 疾患別集計結果

表 1. 新生児マススクリーニング検査 平成 27 年度 疾患別集計結果

| 全施設集計結果 | 検体数 | 再採血数 | 即精検数 | 再採血後精検数 | 総精検数 | 発見患者数 | 再採血率 | 即精検率 | 再採血後精検率 | 総精検率 | 発見頻度 | PPV |
|----------|---------|--------|------|---------|-------|-------|--------|--------|---------|--------|----------|--------|
| 甲状腺機能低下症 | 983,765 | 12,845 | 458 | 1,201 | 1,662 | 458 | 1.306% | 0.047% | 0.122% | 0.169% | 1:2,148 | 27.56% |
| 副腎過形成症 | 983,765 | 8,921 | 276 | 688 | 967 | 44 | 0.907% | 0.028% | 0.070% | 0.098% | 1:22,358 | 4.55% |
| ガラクトース血症 | 983,765 | 3,486 | 28 | 197 | 225 | 15 | 0.354% | 0.003% | 0.020% | 0.023% | 1:65,584 | 6.67% |
| 代謝異常症 | 983,765 | 3,955 | 200 | 290 | 490 | 79 | 0.402% | 0.020% | 0.029% | 0.050% | 1:12,453 | 16.12% |
| 全疾患 | 983,765 | 29,207 | 962 | 2,376 | 3,338 | 596 | 2.969% | 0.098% | 0.242% | 0.339% | 1:1,651 | 17.86% |

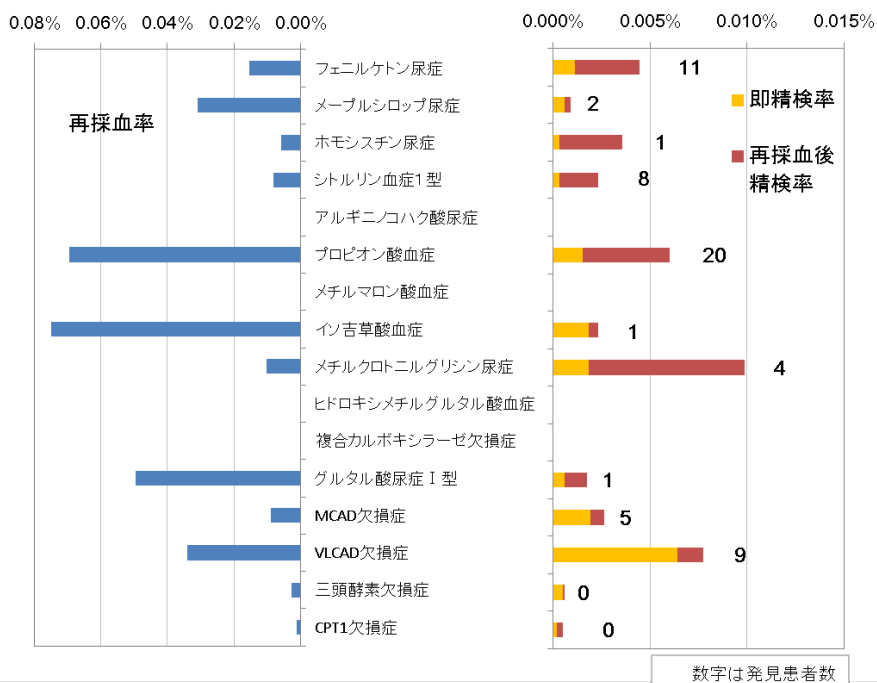


図 2. タンデムマス検査 平成 27 年度 疾患別集計結果 (一次疾患)

表 2. タンデムマス検査 平成 27 年度 疾患別集計結果 (一次疾患)

| 全施設集計結果 | 項目 | カットオフ値 | | 再採血数 | 即精検数 | 再採血後精検数 | 総精検数 | 発見患者数 | 再採血率 | 即精検率 | 再採血後精検率 | 総精検率 | 発見頻度 | PPV |
|-----------------|--------------|---------|--------|-------|------|---------|------|-------|--------|--------|---------|--------|-----------|--------|
| | | 初回検査 | 即精査 | | | | | | | | | | | |
| フェニルケトン尿症 | Phe | 138.77 | 547.78 | 152 | 11 | 33 | 44 | 11 | 0.015% | 0.001% | 0.003% | 0.004% | 1:89,433 | 25.00% |
| メーブルシロップ尿症 | Leu+Ile | 343.71 | 594.32 | 304 | 6 | 3 | 9 | 2 | 0.031% | 0.001% | 0.000% | 0.001% | 1:491,883 | 22.22% |
| ホモシスチン尿症 | Met | 67.23 | 160.50 | 58 | 3 | 32 | 35 | 1 | 0.006% | 0.000% | 0.003% | 0.004% | 1:983,765 | 2.86% |
| シトルリン血症1型 | Cit | 75.85 | 264.50 | 80 | 3 | 20 | 23 | 8 | 0.008% | 0.000% | 0.002% | 0.002% | 1:122,971 | 34.78% |
| アルギニコハク酸尿症 | Cit | 79.07 | 259.40 | | | | | 0 | | | | | | |
| プロピオン酸血症 | C3 | 3.79 | 8.04 | 683 | 15 | 44 | 59 | 20 | 0.069% | 0.002% | 0.004% | 0.006% | 1:49,188 | 33.90% |
| メチルマロン酸血症 | C3/C2 | 0.24 | 0.26 | | | | | 9 | | | | | | |
| イソ吉草酸血症 | C5 | 0.98 | 4.76 | 737 | 18 | 5 | 23 | 1 | 0.075% | 0.002% | 0.001% | 0.002% | 1:983,765 | 4.35% |
| メチルクロトニルグリシン尿症 | C5-OH | 0.98 | 1.98 | 101 | 18 | 79 | 97 | 4 | 0.010% | 0.002% | 0.008% | 0.010% | 1:245,941 | 4.12% |
| ヒドロキシメチルグルタル酸血症 | | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 複合カルボキシルーゼ欠損症 | | 0 | | | | | | | | | | | | |
| グルタル酸尿症 型 | C5-DC | 0.28 | 1.00 | 487 | 6 | 11 | 17 | 1 | 0.050% | 0.001% | 0.001% | 0.002% | 1:983,765 | 5.88% |
| MCAD欠損症 | C8 | 0.29 | 0.49 | 88 | 19 | 7 | 26 | 5 | 0.009% | 0.002% | 0.001% | 0.003% | 1:196,753 | 19.23% |
| VLCAD欠損症 | C14:1 | 0.35 | 0.76 | 335 | 63 | 13 | 76 | 9 | 0.034% | 0.006% | 0.001% | 0.008% | 1:109,307 | 11.84% |
| 三頭酵素欠損症 | C16-OH | 0.09 | 0.07 | 28 | 5 | 1 | 6 | 0 | 0.003% | 0.001% | 0.000% | 0.001% | - | - |
| CPT1欠損症 | C0/(C16+C18) | 76.82 | 91.67 | 11 | 2 | 3 | 5 | 0 | 0.001% | 0.000% | 0.000% | 0.001% | - | - |
| 全体 | 2015年度検体数 | 983,765 | | 3,064 | 169 | 251 | 420 | 71 | 0.31% | 0.017% | 0.026% | 0.043% | 1:13,856 | 16.90% |

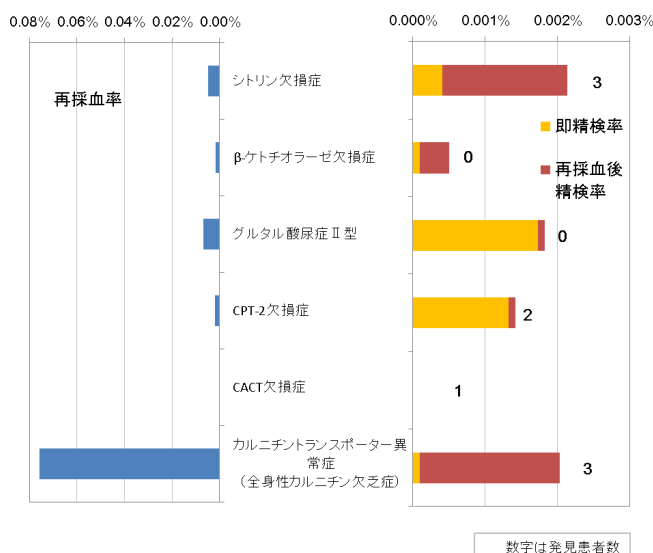


図 3. タンデムマス検査 平成 27 年度 疾患別集計結果 (二次疾患)

表 3. タンデムマス検査 平成 27 年度 疾患別集計結果 (二次疾患)

| 全施設集計結果 | 項目 | カットオフ値 | | 再採血数 | 即精検数 | 再採血後精検数 | 総精検数 | 発見患者数 | 再採血率 | 即精検率 | 再採血後精検率 | 総精検率 | 発見頻度 | PPV |
|--------------------------------|----------------|---------|------|------|------|---------|------|-------|--------|--------|---------|--------|-----------|--------|
| | | 初回検査 | 即精査 | | | | | | | | | | | |
| シトルリン欠損症 | Cit | 53.00 | | 48 | 4 | 17 | 21 | 3 | 0.005% | 0.000% | 0.002% | 0.002% | 1:327,922 | 14.29% |
| β-ケトチオラーゼ欠損症 | C5-OH | 0.87 | | 16 | 1 | 4 | 5 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| グルタル酸尿症 型 | C8 | 0.29 | | 68 | 17 | 1 | 18 | 0 | 0.007% | 0.002% | 0.000% | 0.002% | - | - |
| CPT-2欠損症 | (C16+C18:1)/C2 | 0.60 | 0.53 | 20 | 13 | 1 | 14 | 2 | 0.002% | 0.001% | 0.000% | 0.001% | 1:491,883 | 14.29% |
| CACT欠損症 | C16 | 3.92 | 4.39 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | - | - | - | - | 1:983,765 | - |
| カルニチントランスポーター異常症 (全身性カルニチン欠乏症) | C0 | 8.41 | | 746 | 1 | 19 | 20 | 3 | 0.076% | 0.000% | 0.002% | 0.002% | 1:327,922 | 15.00% |
| 全体 | 2015年度検体数 | 983,765 | | 898 | 36 | 42 | 78 | 9 | 0.09% | 0.004% | 0.004% | 0.008% | 1:109,307 | 11.54% |

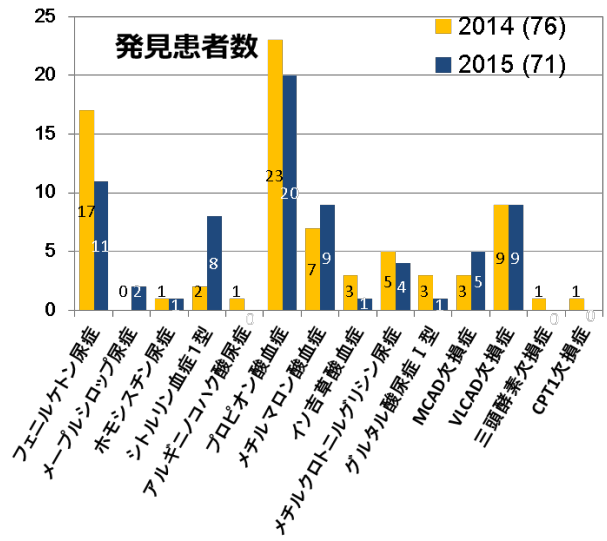
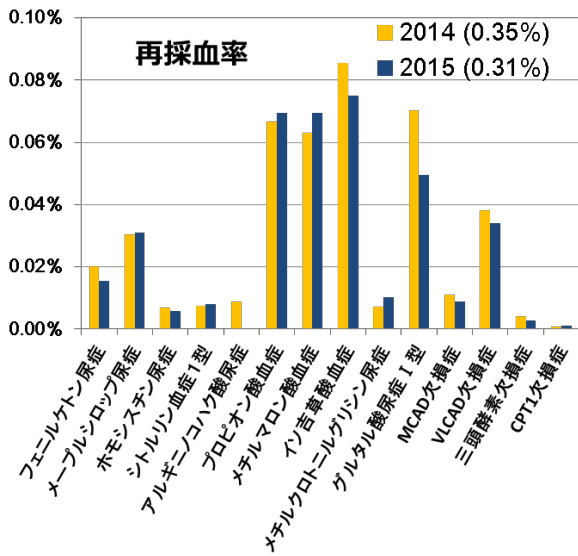


図4. タンデムマス検査実施状況 (2014, 2015 年度の比較)

分担研究課題

マスキング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部 教授）

タンデムマス検査データ Web 解析システムの有用性について

花井潤師（札幌市衛生研究所・保健科学課主査）

研究要旨

これまで、タンデムマス・スクリーニング（以下、TMS）検査データの各指標について、測定値分布やカットオフ値を登録・表示可能なTMS検査データWeb解析システムを構築し運用を開始した。今年度の追加機能により、TMSで見つかった患者最小値について、自施設での検査値の推定が可能となり、より具体的なカットオフ値の適正性の検証が可能となった。

研究協力者

福士 勝（札幌イムノダイアグノスティック
ラボラトリー・所長）

石毛信之（東京都予防医学協会・主査）

田崎隆二（化学及血清療法研究所・検査総轄）

A．研究目的

タンデム質量分析計を用いる新生児マスキング（タンデムマス・スクリーニング、以下 TMS）は、全国の自治体で実施されており、検査施設は 40 か所となっている。TMS は多指標、多疾患のスクリーニングであることから、各疾患に応じた適切なカットオフ値の設定が必要であり、全国均質な精度の高いスクリーニングを目指す上からも、施設間差の解消は重要な課題である。

昨年度、TMS 検査データの各指標について、測定値分布やカットオフ値を登録、表示、可能な TMS 検査データ Web 解析システム（以下、Web 解析システム）の構築し運用を開始した¹⁾。今年度はスクリーニング発見例および偽陽性例等の検査データを登録し、施設間差を踏まえて、カットオフ値の妥当性を検証することが可能なツールを追加した。

B．研究方法

Web 解析システムは、クラウドサーバ上に構築し、ブラウザを用いてデータ更新や解析結果を随時表示できるシステムとして開発した¹⁾。今年度は以下の機能を追加した。

- 精密検査で診断が確定した患者または保因者、異常が認められなかった偽陽性例の TMS 検査データの登録、確認
- Zスコアを用いた患者最小推定値
- 患者最小 Zスコアとカットオフ値 Zスコア
- 複数指標判定の二次元プロット
- 施設別の測定値表示
（倫理面への配慮）

精密検査で診断が確定した患者および異常が認められなかった偽陽性例の登録については、TMS 検査データ、診断名、検査年月のみで、個人情報は一切含まれておらず、自施設以外の検査データの施設を特定することはできない。

C．研究結果

今年度追加された主な機能を以下に示す。

1．Zスコアを用いた患者最小推定値

TMS で発見された患児の測定値は、各施設の測定値分布やカットオフ値が異なることから、患者

の測定値を各施設の測定値分布のばらつきで標準化することで、相互比較が可能となる。一般的に、標準化で用いる Z スコアは正規分布となる測定値に適用されるが、TMS で扱う指標の多くは正規分布を示さないことから、測定値の分布によらない標準化が可能な正規四分位範囲 (normalized IQR, NIQR) を用いて Z スコアを計算するノンパラメトリックな手法²⁾を適用した。具体的な手順を以下に示す。

各施設の中央値、四分位点から NIQR を求め、患者データ、カットオフ値の Z スコアを計算した。

全患者データの Z スコアのうち、対応する施設のカットオフ値 Z スコアを上回る中で最小の Z スコアを「患者最小 Z スコア」として抽出した。

患者最小 Z スコアから、各施設の中央値、NIQR から「患者最小推定値」を逆算し、施設ごとにプロットした。このことにより、各施設が「患者最小推定値」を当該施設のカットオフ値で適切に陽性と判定できるのか、他施設との比較から目視的に判断することが可能となる (図 1)。

2. 患者最小 Z スコアとカットオフ値 Z スコア

患者最小推定値がカットオフ値とどれくらい離れているかを示す指標として、各施設のカットオフ値 Z スコアを計算し、患者最小 Z スコアと比較した。Z スコアはほぼ標準偏差と同じ尺度と考えられることから、カットオフ値 Z スコアと患者最小 Z スコアの差は、すなわち何 SD 離れているかを推定できるものである (図 2)。

3. 二次元プロット

TMS 検査において、複数指標で判定を行う 5 疾患について、患者および偽陽性例の両指標を二次元プロットした。さらに、各指標のカットオフ値の最小・最大を表示して、患者データ等と比較可能とした (図 3)。

D. 考察

我が国の TMS は年間検体数が 2 万件に満たない施設が約半数あり、全国均質なスクリーニング精度の確保が重要な課題である。

各検査施設では、Web 解析システムを利用する

ことで、正常値分布やカットオフ値を他施設と比較し、自施設の正常値分布やカットオフ値の施設間差を確認することが可能となった。さらに、今年度の追加機能により、TMS で見つかった患者データについて、自施設での検査データを推定することにより、より具体的なカットオフ値の適正性の検証が可能となった。

今後、Web 解析システムの解析結果と技術部会で実施しているスクリーニング実施状況調査の結果などから、偽陽性の原因が TMS 検査上の問題なのか、カットオフ値の設定の問題なのかを推定し、適切な助言を行うことにより、検査精度の向上と施設間差の解消に結び付くことが期待される。

E. 結論

Web 解析システムを利用することで、各検査施設では、測定値分布やカットオフ値を他施設と比較することが可能となり、施設間差の原因分析やその解消が可能となる。今後、当研究班、学会技術部会、NBS 合同委員会等が協働して、内部精度管理支援を行う体制づくりを構築し、より精度の高い施設間差のない TMS に取り組んでいきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 花井潤師, 福士 勝、石毛信之、他: タンデムマス検査データ Web 解析システムについて. 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金 (成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業 (健やか次世代育成総合研究事業)) 「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 72-74, 2016.
- 2) 平井昭司, 総論 分析の信頼性, ぶんせき, 2010, 1, 2-9

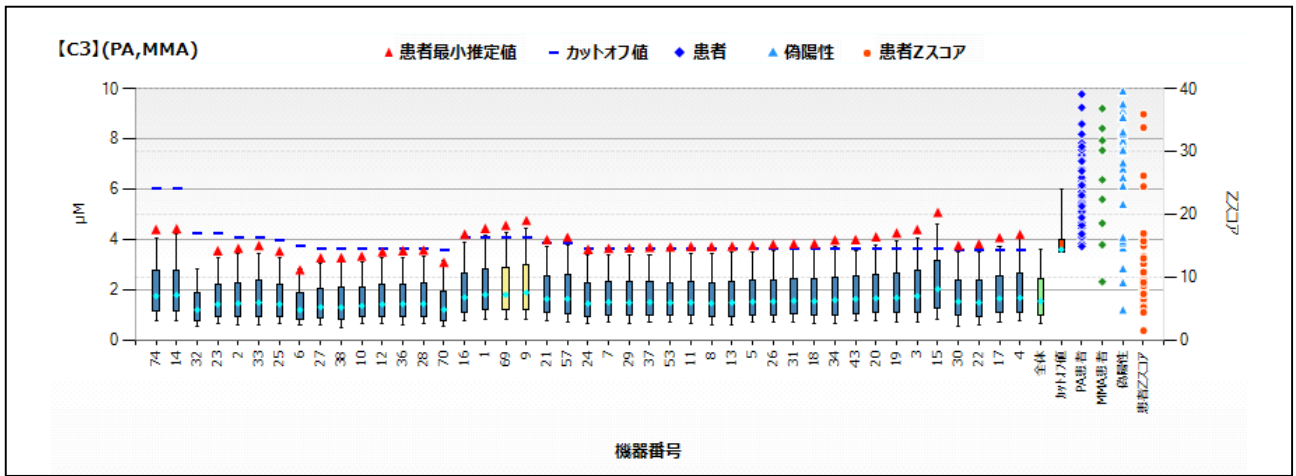


図1 . 患者最小推定値 出力結果(C3 アシルカルニチン)

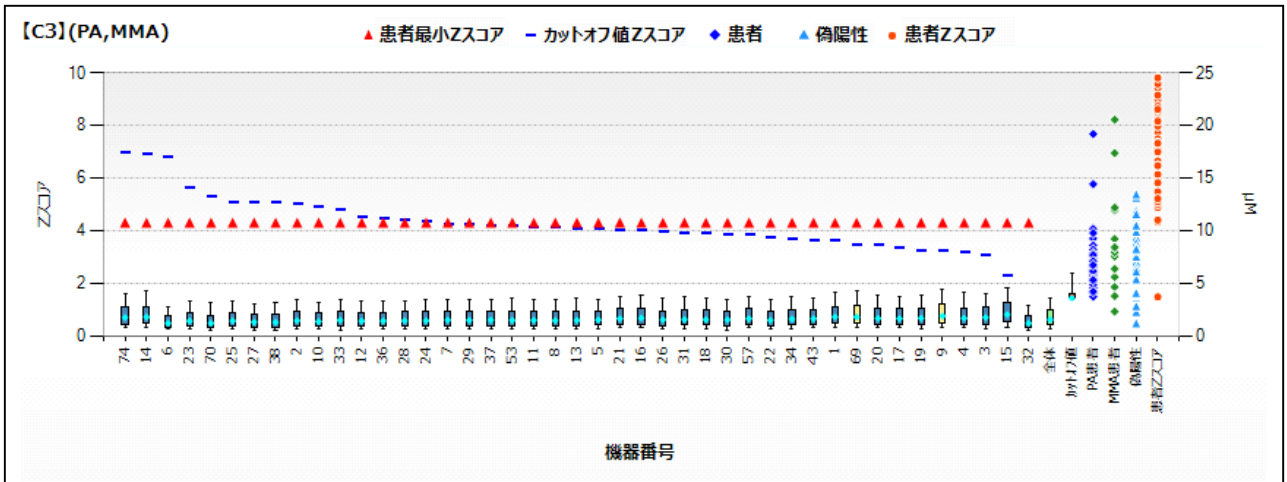


図2 . カットオフ値 Z スコア 出力結果(C3 アシルカルニチン)

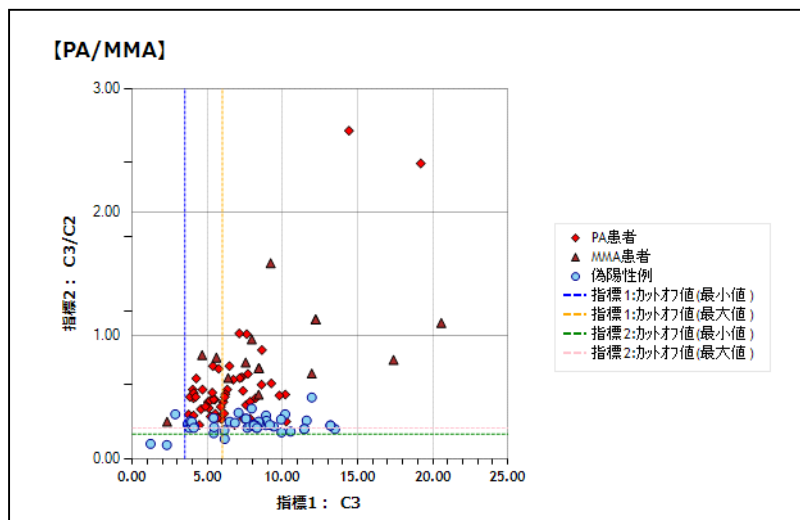


図3 . 二次元プロット出力結果

分担研究課題

マススクリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部小児科・客員教授）

東京都における LC-MS/MS 法を用いた二次検査法の検討（第二報）

石毛信之（東京都予防医学協会・主査）

研究要旨

メチルマロン酸（MMA）ならびに3-メチルクロトニルグリシン（3MCG）は、それぞれメチルマロン酸血症ならびに3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症（MCCD）患者の尿で排泄が増加する有機酸のひとつである。これらを液体クロマトグラフ-タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて新生児マススクリーニング（NBS）のろ紙血で定量する二次検査法について検討した。ろ紙血MMAは、メチルマロニルCoAムターゼ欠損症のみならずビタミンB12（VB12）欠乏症においても陽性となり、これらの症例の治療経過も反映して測定値が増減することが確認された。一方、ろ紙血3MCGは、C5-OH著明高値による即精査例では著明高値となり、C5-OH高値となる有機酸代謝異常症の鑑別に有用であった。また、未診断のMCCD母親による児のC5-OH高値例ではろ紙血3MCGの上昇は認められなかった。さらに、C5-OH値の上昇程度が低いMCCD罹患患者、本症保因者、未診断のC5-OH軽度高値遷延例は、初回ろ紙血3MCG値のみでは判別が困難であった。

研究協力者

氏名（所属・職名）

花井潤師：札幌市衛生研究所・主査

福士 勝：札幌イムノダイアグノスティック
ラボラトリー・所長

田崎隆二：化学及血清療法研究所・検査総轄

れた例、ならびに有機酸代謝異常症を疑う症状を呈した例のろ紙血を対象（表1）とし、分離カラムに Scherzo SS-C18 (Imtakt)を用いた LC-MS/MS 法(既報)¹⁾にて MMA あるいは 3MCG を定量した。その結果について、担当医師から開示された臨床経過と併せて評価した。

A．研究目的

LC-MS/MS 法を応用し、新生児マススクリーニング（NBS）のろ紙血メチルマロン酸（MMA）ならびに 3-メチルクロトニルグリシン（3MCG）を定量し、二次検査法としての有用性について検討することを目的とした。

B．研究方法

2008-2016 年度の東京都における新生児マススクリーニングでメチルマロン酸血症/プロピオン酸血症、あるいは 3-メチルクロトニルグリシン尿症(MCCD)等を疑って要再採血・要精査と診断さ

C．研究結果

本法を用いて分析した LC-MS/MS クロマトグラムを図 1、定量データを表 2-4 に示した。

1) MMA 定量について

2015 年 4 月から 2016 年 12 月までに C3 & C3/C2 高値でメチルマロン酸血症/プロピオン酸血症疑いで要再採血となった 12 例のうち 4 例が精査となった。これらのろ紙血 MMA を後方視的に定量した。MMA が検出されたのは要精査例のうちの 2 例のみで、そのうちの 1 例では暫定カットオフ値を越えた（表 2、図 2）。これら 2 例は後の各種検査によって栄養性のビタミン B12（VB12）欠乏症と

判明し、VB12 補充によって MMA ならびに各種生化学検査は速やかに正常化した。一方、メチルマロン酸血症の既診断例ならびに有機酸代謝異常症を疑う依頼検査例で C3&C3/C2 高値であった有症状例では、ろ紙血 MMA 値は治療経過中の C3 ならびに血中アンモニアの増減とほぼ一致していた(表 3、図 3)。

2) 3MCG 定量について

2008 年から 2016 年 12 月までに C5-OH 異常高値で即精査となった MCCD 罹患者 3 例のろ紙血 3MCG は健常新生児の 100 倍程度の著明高値を呈した。また、C5-OH がカットオフ値(1.00nmol/mL)近傍で MCCD 罹患者と診断された 1 例の初回ろ紙血 3MCG はその暫定カットオフ値(0.10nmol/mL)程度の値であり、再採血時以降もほぼ同レベルの値で推移していた。一方、母親が未診断の MCCD の児と診断された例では、3MCG は健常者レベルであり、その母親では著明高値が認められた(表 4、図 4)。MCCD 罹患者はいずれも無症状で経過しているが、そのうちの 2 例のろ紙血 3MCG ならびにろ紙血・血清 C5-OH の経時変化を図 5 に示した。3MCG はろ紙血 C5-OH 上昇に伴って次第に上昇傾向にあった。

D. 考察

MMA 定量はメチルマロニル CoA 欠損症のみでなく、VB12 欠乏症の診断にも有用であった。3MCG 定量は C5-OH 著明高値による即精査例については C5-OH 高値となる疾患の鑑別に有用で、未診断の MCCD 母親による児の C5-OH 高値例ではろ紙血 3MCG の上昇は認められなかった。一方、C5-OH 値の上昇程度が低い MCCD 罹患者、保因者、未診断の C5-OH 軽度高値遷延例は、初回ろ紙血 3MCG 値

のみでは判別が困難であった。

E. 結論

これらの検査法は新生児スクリーニングの二次検査法として有用であることに加えて、患者の治療経過観察にも効果的と考えられた。両法ともにさらに分析項目を追加して症例を蓄積し、NBS の偽陽性率を低減させて検査に関連する費用や時間ならびに受検者家族の心的負担を軽減、ならびに罹患者においては早期診断の一助となるように検討を重ねたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 石毛信之、花井潤師、福士 勝、他：東京都における LC-MS/MS 法を用いたイソ吉草酸血症の二次検査法の検討。平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業(健やか次世代育成総合研究事業))「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 75-78, 2016.

2. 学会発表

1) Second tier test for isovaleric acidemia using LC-MS/MS in Tokyo, Japan. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2016, Rome, Italy, 2016/9/6-9.

2) LC-MS/MS 法によるろ紙血メチルマロン酸定量の有用性の検討。第 58 回日本先天代謝異常学会総会, 東京都新宿区, 2016/10/27-29.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 検討対象

- メチルマロン酸血症/プロピオン酸血症が疑われて要再採血となった8例ならびに要精査となった3例(再採血例1-12)
- メチルマロン酸血症の既診断例5例(症例1-5)
- 有機酸代謝異常症を示唆する症状を来した依頼検体のうち、C3 & C3/C2の著明高値を認めた2例(症例6, 7)
- MCCDと診断された3例(症例8-10)
- MCCD保因者と診断された1例(症例11)
- C5-OH高値の児の精査の結果、母親がMCCDと診断された2例(症例12,13)
- C5-OH高値が遷延して診断が得られていない1例(症例14)

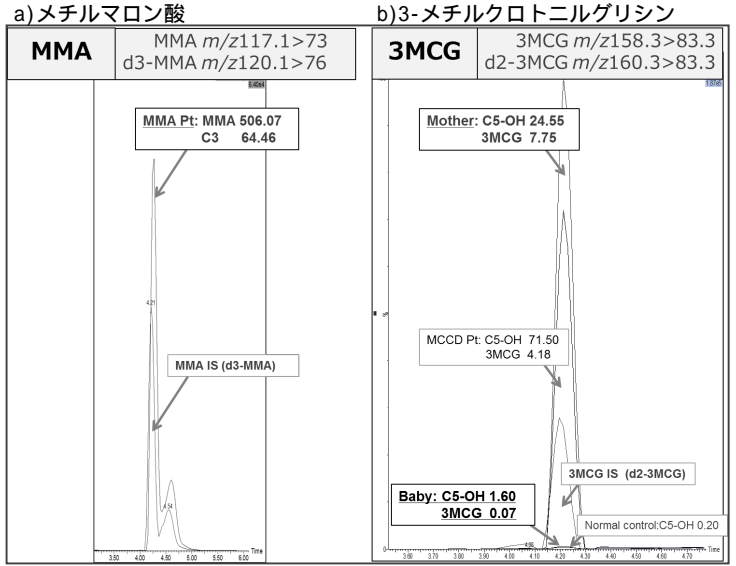


図 1 LC-MS/MS クロマトグラム

表 2 C3 & C3/C2 の高値で要再採血となった例の分析結果

| 再採血例 | 初回採血 | | | | 再採血 | | | 最終判定 |
|-----------------|------|-------|--------|----------|------|-------|--------|------|
| | C3 | C3/C2 | C3/Met | MMA | C3 | C3/C2 | C3/Met | |
| Controls (n=10) | 2.70 | 0.14 | 0.08 | N/D-0.53 | — | — | — | 正常 |
| 1 | 3.91 | 0.26 | 0.16 | N/D | 0.76 | 0.11 | 0.03 | 正常 |
| 2 | 4.12 | 0.27 | 0.16 | N/D | 1.66 | 0.19 | 0.04 | |
| 3 | 6.10 | 0.30 | 0.23 | N/D | 1.33 | 0.17 | 0.04 | |
| 4 | 4.18 | 0.26 | 0.20 | N/D | 1.79 | 0.19 | 0.09 | |
| 5 | 3.81 | 0.25 | 0.18 | N/D | 2.57 | 0.18 | 0.10 | |
| 6 | 4.63 | 0.28 | 0.19 | N/D | 2.66 | 0.21 | 0.12 | |
| 7 | 4.37 | 0.28 | 0.12 | N/D | 2.29 | 0.15 | 0.07 | |
| 8 | 4.66 | 0.26 | 0.20 | N/D | 2.23 | 0.21 | 0.08 | |
| 9 | 3.82 | 0.27 | 0.19 | 4.41 | 4.12 | 0.26 | 0.14 | 陽性 |
| 10 | 5.08 | 0.32 | 0.29 | N/D | 6.46 | 0.25 | 0.33 | |
| 11 | 3.74 | 0.26 | 0.34 | 1.75 | 4.72 | 0.34 | 0.18 | |
| 12 | 5.44 | 0.25 | 0.23 | N/D | 6.03 | 0.93 | 0.22 | |

表 3 メチルマロン酸血症患者の分析結果

| 症例 (診断年齢/日齢) | C3 (nmol/mL) | C3/C2 | MMA (nmol/mL) | Urine MMA |
|-----------------|-----------------|-------|------------------|-----------|
| 1 (9years) | 121.0 | 1.39 | 343.3 | |
| 2 (13years) | 64.46 | 0.97 | 506.1 | |
| 3 (1years) | 26.3 | 1.14 | 92.7 | |
| 4 (4years) | 14.6 | 0.53 | 45.8 | (↑↑↑) |
| 5 (1years) | 51.3 | 0.84 | 38.6 | |
| 6 (day 11) | 49.95 | 4.24 | 506.2 | |
| 7 (day 8) | 16.85 | 1.44 | 891.6 | |

Cut off value: C3 3.6 nmol/mL, C3/C2 0.25, C3/Met 0.25
MMA 3.0 nmol/mL

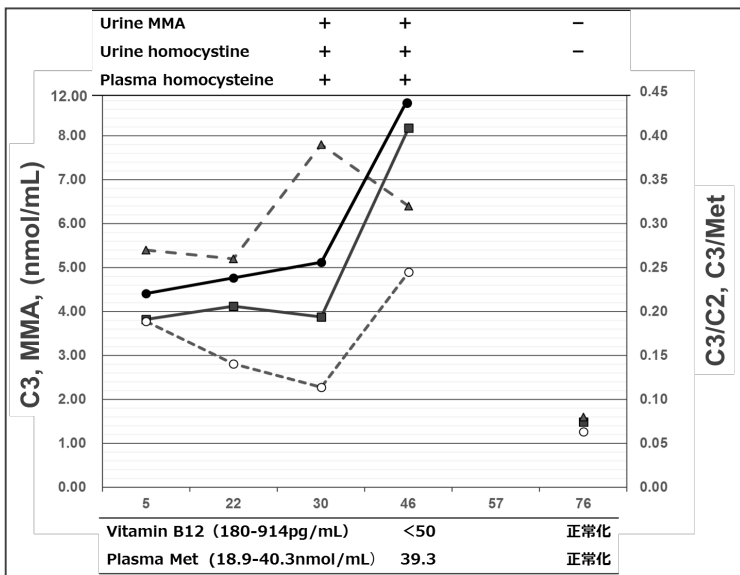


図 2 Vitamin B12 欠乏症例の検査データの時系列 (再採血例 9)

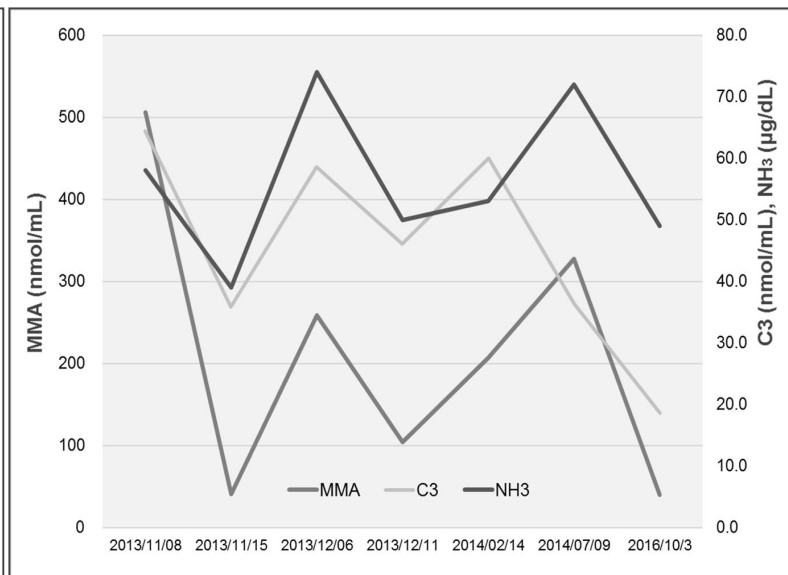


図 3 メチルマロン酸血症患者の検査データの時系列(症例 2)

表 4 対象症例の初回ろ紙血 3MCG の分析結果

| 症例 | C5-OH (nmol/mL) | C0 (nmol/mL) | 3MCG (nmol/mL) |
|-----------------|-----------------|--------------|----------------|
| Controls (n=18) | 0.22 | 24.5 | N/D-0.07 |
| 8 罹患者 | 10.38 | 6.36 | 3.13 |
| 9 罹患者 | 8.77 | 16.77 | 4.59 |
| 10 罹患者 | 1.05 | 16.40 | 0.09 |
| 11 保因者 | 1.09 | 23.48 | 0.28 |
| 12 児: 正常 | 10.34 | 4.70 | 0.07 |
| 母: 罹患者 | 24.63 | 3.97 | 10.38 |
| 13 児: 正常 | 5.62 | 8.28 | 0.05 |
| 母: 罹患者 | 24.55 | 5.98 | 7.75 |
| 14 C5-OH高値遷延例 | 1.05 | 13.00 | 0.05 |

Cut off value: C5-OH 1.00 nmol/mL, C0 < 8.00 nmol/mL
3MCG 0.10 nmol/mL (mean+4SD)

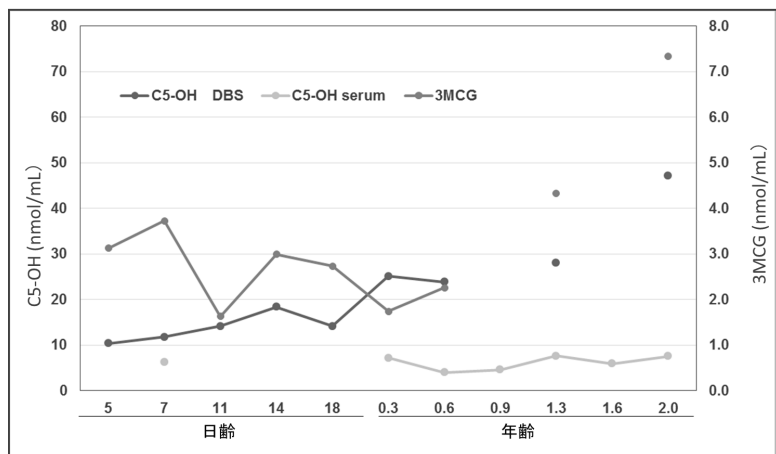


図 4 MCCD 患者の検査データの時系列 (症例 8)

分担研究課題

マスキング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学 客員教授）

新生児スクリーニングの検査精度向上に寄与する外部精度管理の検討
-日本マスキング学会検査施設基準及び検査実施基準との関連で-

研究協力者 福士 勝（札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー 所長）

研究要旨

新生児スクリーニング外部精度管理プログラムが検査施設の検査能力と技能の向上に寄与できるようにするため、適切な外部精度管理用濾紙血検体の仕様、検査施設の測定方法および外部精度実施機関の評価方法を検証した。外部精度管理では、定期的な技能試験および精度試験により、検査施設の検査の流れと検体測定に問題がないかどうかを評価し、問題がある場合は、その解決のために相互の協議と必要な助言や指導を行わなければならない。そこで、より効果的な技能試験および精度試験の実施を可能とする濾紙血検体の仕様と作成、検査施設の検査実施方法、外部精度管理機関の評価方法を作成した。

研究協力者

花井潤師（札幌市衛生研究所）
田崎隆二（化学及血清療法研究所）
石毛信之（東京都予防医学協会）
但馬 剛（国立成育医療研究センター）
小林弘典（島根大学）
稲岡一孝（大阪府立母子保健総合医療センター）
星山慶子、川口耕一（NPO 法人タンデムマス・スクリーニング普及協会）

法および外部精度実施機関による評価方法を日本マスキング学会が提唱する新生児スクリーニング検査施設基準および検査実施基準の規定を参考に検討した。

A．研究目的

新生児スクリーニング検査施設の検査能力と技能のレベルアップに貢献できる外部精度管理プログラムを再構築する。

B．研究方法

外部精度管理として実施される技能試験（Proficiency Test：PT）及び精度試験（Quality Control Test：QC）に必要な濾紙血液検体の仕様、検査施設における検査の実施方

C．研究結果

1）外部精度管理の目的

検査施設の検査の流れと検体測定に問題が起こっていないかを定期的にモニタリングを行い、問題がある場合その解決のために相互に協議を行い、必要な助言・指導により検査施設のレベルアップを図る。

2）PT 及び QC の実施方法とその評価

PT では人工的に調製された正常及び陽性を含む濾紙血検体の受付から検査、判定、報告までのスクリーニングの各ステップにおける処理が正しく行われているかどうかを評価することにより、検査施設の技能と技量の改善に寄与する。

QC はタンデムマス・スクリーニング対象疾

患の指標であるアミノ酸 (AA) とアシルカルニチン (AC) の 4 濃度の濾紙血検体を 10 日間 2 重測定したデータを分散分析法により精確度を評価する。さらに、AA, AC 測定値の施設間差の評価により標準化の可能性を検討する (表

1)。
3) PT 及び QC 用濾紙血検体の濃度レベル
上記 1) の目的に適合する評価を可能とするため、PT と QC に使用する濾紙血検体の指標の種類及び濃度レベルを表 2 に示す仕様とした。

表 1. 外部精度管理における PT 及び QC 検体の測定と評価方法

| 項目 | PT | QC |
|---------|------------------------------|----------------------------------|
| 実施回数(年) | 3 回 | 1 回 |
| 測定検体数 | 10 検体 (19 疾患) 正常検体を含む | AA/AC21 指標 4 濃度: 正常 ~ 異常高値 |
| 測定方法 | ルーチン検査で実施 一次検査/確認検査/2 次検査 | ルーチン検査で実施 一次検査: 2 重測定/10 日間測定 |
| 結果報告 | 既定様式 正常/陽性判定結果 | 検査施設測定ファイル 濃度値+イオン強度 |
| 評価 | 正確な判定能力 | 正確度・精密度、施設間差 |

表 2. 外部精度管理用 PT 及び QC 検体の種類と濃度レベル

| |
|--|
| <p>1. PT 用検体</p> <p>1) PT 検体調製用原料血液: 新生児スクリーニング一次対象 19 疾患の指標が正常検体の中央値よりも低値の血液を使用する。</p> <p>2) PT 検体で添加する物質は内分泌 2 疾患の TSH、17-OHP、代謝異常疾患のガラクトース、アミノ酸代謝異常 5 疾患のアミノ酸 5 種類、有機酸代謝異常 7 疾患・脂肪酸代謝異常 4 疾患のカルニチン 13 種類とする。</p> <p>3) PT 検体で添加する物質の濃度は全検査施設のカットオフ値の 1.5 倍以上とする。</p> <p>4) 全対象疾患が陰性の正常検体も調製する。</p> <p>2. QC 用検体</p> <p>1) QC 検体調製用原料血液: アミノ酸は 5 から 10 $\mu\text{M/L}$ 以下、FC は 2.0 $\mu\text{M/L}$ 以下、短鎖 AC では 1 $\mu\text{M/L}$ 以下、中鎖 AC は 0.05 以下、長鎖 AC は 0.5 $\mu\text{M/L}$ 以下、3 ヒドロキシカルニチン及びジカルボキシルカルニチンでは 0.05 μM 以下の血液を調製する。</p> <p>2) QC 検体に添加する物質はアミノ酸は 5 種類、カルニチンは 16 種類とする。</p> <p>3) QC 検体で添加する物質の濃度は正常新生児下限から中央値、正常上限、カットオフ値、即精検の 4 レベルとする。</p> |
|--|

4) PT 及び QC 用紙血検体の作成

表 2 の条件を満足する検体を図 1 に示した原料血液の前処理、検定、指標物質の添加、濾紙への滴下により PT および QC 濾紙血検体を作成した。

D. 考察

2014 年に外部精度管理実施機関として NPO 法人タンデムマス・スクリーニング普及協会が指定

され、その実務機関を国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室として PT および QC が開始されたが、外部精度管理用濾紙血検体、検査施設での測定、外部精度管理機関における解析と評価方法などで改善の要望があった。そこで、NPO 法人と日本マススクリーニング学会による NBS 精度管理合同委員会が設置され、日本マススクリーニング学会検査施設基準に適合する

外部精度管理が検討されてきた。

新生児スクリーニング外部精度管理の目的は「定期的なPTおよびQCにより検査施設の検体受付から結果報告までの検査の流れと検体測定技能に問題がないかどうかを評価すること、問題がある場合は相互に協議を行うことにより問題点を解決して適切なスクリーニングが実施できるようにすること」とした。そこで、この目的を達成するためPTおよびQCに使用する濾紙血検体の要件と作成方法、検査施設における検査実施方法、外部精度管理機関における評価方法を確立した。

PTによる外部精度管理は検査施設での検査がルーチン検査と同一検査手順で行われていることを前提として検体受付から検査、判定、報告までの各ステップの処理が正確に行われているかどうかを評価している。しかし、現状では検査施設におけるPT検体測定がルーチン検査とは異なる手順で測定と判定が行われている実態がある。適切なPTの評価には検査施設が通常の検査手順に基づいて最終判定された結果を報告することが重要である。すなわち、検査施設での一次検査（シングル測定）陽性検体の確認検査（2重測定）二次検査が実施されている場合はその結果を含めてルーチンの新生児検体の検査手順に基づいて最終判定された結果を報告することをすべて

の検査施設に徹底することが重要である。

QCによる外部精度管理はタンデムマス・スクリーニング対象疾患の指標物質のみを測定と評価の対象としている。測定はPTと同様にルーチン検査と同時に行い、2重測定を10日間繰返し行った全データを用いて分散分析により各指標の精確度を評価することとした。2014年と2015年度のQCデータでは精確度は使用する内部標準物質のメーカー間による相違よりも各検査施設の質量分析システムの保守管理などの測定機器の寄与が大きい傾向にあることから、測定値だけでなく同時報告される信号強度データの解析も含めて精確度の評価が可能な方法の検討も行われることが必要となる。今後もより効果的な外部精度管理の実施のため、PTおよびQCの改善のための検討の継続が必要である。

E. 結論

外部精度管理はPTとQCにより実施し、PTは検査施設のスクリーニング対象疾患の検出能力を評価し、QCは検査施設の検査指標の測定時の正確度、精密度、施設間差を評価することとした。適切な評価が可能なPT検体およびQC検体の濃度レベル、測定方法、測定数及び繰り返し測定回数を設定した。

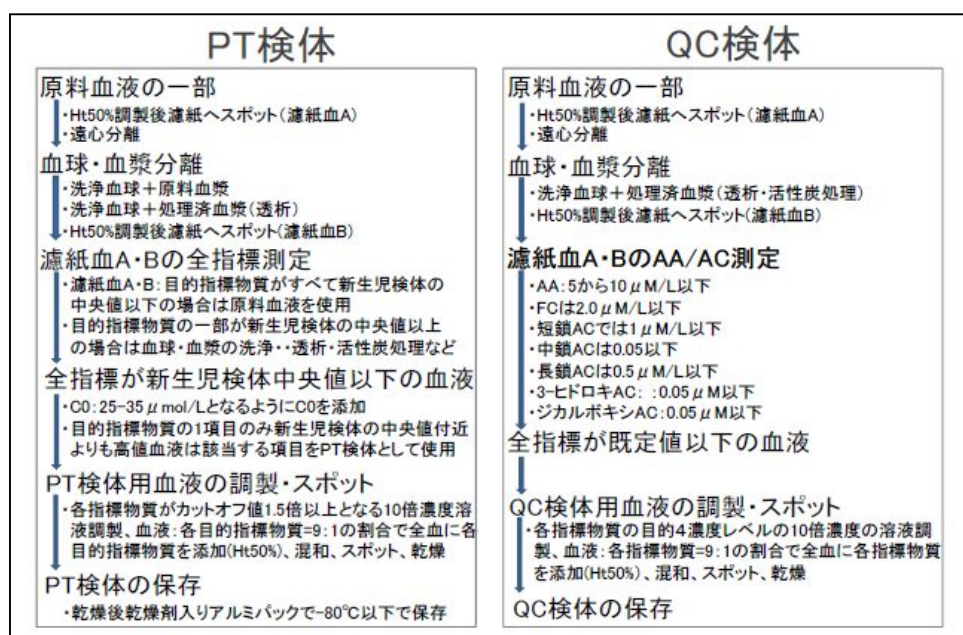


図1. 外部精度管理用PT及びQC検体の作成

分担研究課題

外部精度管理体制の確立に関する研究

研究分担者 但馬剛(国立成育医療研究センター研究所マスキング研究室 室長)

研究要旨

タンデムマス法導入後の新生児スクリーニング外部精度管理試験として運用を開始している年3回の技能試験(proficiency testing: PT) + 年1回の精度試験(quality control: QC)について、前2年度の実践から課題を抽出して改善を進めている。PTは理念と実態に乖離が生じており、目的と実施方法を一体として再検討する必要がある。QCは変動係数を主な指標としているが、今後は検出限界・定量限界・定量範囲なども評価できるようにしていく方針である。また、精度管理の土台である、関係諸部門の連携が不十分な自治体をピックアップして、体制の再構築を促す必要がある。

研究協力者

中島英規（国立成育医療研究センター研究所
マスキング研究室・研究員）

志村明子（同上・臨床検査技師）

相崎潤子（同上・臨床検査技師）

前田堂子（同上・研究補助員）

後藤温子（同上・研究補助員）

小澤仁子（同上・共同研究員）

いて今年度の試験を実施した。

C．研究結果

1．試験実施スケジュール

PT×3回/年（第1,2,4四半期）+QC×1回/年（第3四半期）という実施スケジュールは従来通りとした。

2．試験用検体の作製

前年度まではMS研にて、日本赤十字社から入手した献血赤血球を洗浄後、各種指標物質を添加して作製していたが、複数項目の比が用いられる指標など、適切な検体の実現が困難であった。また、一部の指標物質は極めて高額であり、少量購入ではコストダウンが難しいという問題もあった。これらの解決策として、各自治体の検査機関向けに測定キットや内部標準試薬を製造販売している国内専門業者に必要な仕様を提示し、それに従って作製された検体を購入して使用することとした。納品された検体を検品した結果、前年度までは準備困難であった指標についても、良好な測定値が確認された。

3．PT実施方式

PTは従来、「対象疾患の軽度陽性者を模した検

A．研究目的

全国各自治体でタンデムマス法の導入が進んだ前2年間、外部精度管理については、年3回の技能試験(proficiency testing: PT) + 年1回の精度試験(quality control: QC)を新たな枠組みとして、実際に運用しながら課題を抽出してきた。今年度は、これらの課題解決を目標に、試験実施方式の見直しを行った。

B．研究方法

前2年度に行われた外部精度管理試験について、日本マスキング学会、NPO法人タンデムマス・スクリーニング普及協会、国立成育医療研究センター研究所マスキング研究室（以下MS研）の三者で構成する「精度管理合同委員会」にて検討し、合意された改革案に基づ

体を送付して、受付から結果報告までの一連の業務全体の精確さを評価する試験」というコンセプトで構成されており、タンデムマス法の導入以降も引き継がれている。また、前年度に実施した「対象疾患から任意の 9 疾患分の異常検体と正常検体から成る 10 検体を 1 組として、各検査機関での平常業務と同じ手順で作業を行う」という実施方法は今年度も踏襲した。結果報告は前年度まで、指定書式への手書き・郵送としていたが、今年度から電子ファイル化し、電子メールでの提出へ変更した。記載項目についても改訂を加えた。

4 . QC 実施方式

QC は「タンデムマス分析の精密度を評価する試験」として新設されたものである。各対象疾患の指標となるアミノ酸・アシルカルニチンを 3 段階の濃度 (LowMiddle, Middle, High) で添加した濾紙血検体および無添加 (Low) 検体の 4 枚を 1 組として、10 業務日連続で二重測定した結果を専用サーバーシステムへ登録させて分析する、という基本的な枠組みが前年度までに取り決められ、今年度も継続した。評価方式については、前 2 年度に試みた様々な方法を再検討した結果、今年度は変動係数 (CV) に絞り込むこととした。

5 . ブラインド検体による試験

各自治体の協力産科施設から、検査機関に情報を伏せて試験検体を送付する「ブラインド試験」については、2005 年度から取り組んできたが、前年度の時点でも参加は全体の 1/3 程度に留まっていた。全国実施への見通しが立たない状況が続いているため一旦中止、今後の再検討課題とした。

D . 考察

1 . PT の現状と課題

PT 運用の実際は、「各自治体で常用しているものとは異なる専用濾紙で作製された試験検体が」「9 疾患分一斉に届けられ」「専用の書式に結果を入力して」「電子メールで返送する」という、

すべてが日常業務とは懸け離れた特殊な作業で構成されている。また、各指標の基準値設定や、使用している測定キット・タンデムマス機種・内部標準試薬・分析メソッド、一部の疾患では確認検査・二次検査実施の有無など、各検査機関で様々な相違が存在する。PT では従来、「基準値を軽度超える検体」を「正しく陽性判定できる」ことを求めており、この点は現行の PT でも同様のままとしているが、上述のような条件下では、精度よく分析できていても陽性とならない検査機関は十分に生じうるところである。しかし現在、PT 試験検体を「正常」と判定することは、挽回不能な失態と受け止められているのが実情である。

以上のような各種要因から、PT は本来の目的達成からはまだ遠いと評価せざるを得ない。これまでのコンセプトを維持するのであれば、年に数回、任意の 1 疾患の試験検体をブラインドサンプルとしてスクリーニングさせる方式が最適と考えられる。その実現には行政・産科施設・検査機関・精査医療機関の理解と協力が不可欠であり、まず日本マススクリーニング学会としての合意を形成した上で、関係各方面に働きかけていく必要がある。また、ブラインド試験を短期間で実現するのは困難と予想されるため、PT の目的を再検討して、その達成に実効性のある評価方法の策定が求められる。

2 . QC の現状と課題

PT とは違って QC の目的は明確であり、課題は技術的な側面が主体である。そのひとつである「質の高い試験検体の作製」については、専門性の高い業者の製品を利用することで、安定的に確保できる見通しが得られた。引き続き解決を図るべき課題として、以下のような点が精度管理合同委員会で議論に挙がっている。

- ・ 日常業務への影響を軽減するため、1 日の測定回数を増やして測定日数を短縮する
- ・ 測定濃度を増やして、検出限界・定量限界・定量範囲の評価を可能にする

- ・ サーバシステムの利便性向上、特に内部精度管理支援ウェブシステムとの連携性を持たせて、重複のない効率的なデータ収集を図る

3. スクリーニング実施体制の地域格差是正

タンデムマス法導入以前の新生児スクリーニング検査業務は、主として各自治体の公的検査機関によって担われてきた。これらの検査機関で業務に当たる技術者には、新生児スクリーニングが「臨床検査」ではなく、罹患児の障害発生を防ぐために、再採血や精査の要否を自ら判断することや、的確な判断を下すために、産科施設や精査医療機関と緊密な協力関係を築くことまで、自らの責務と任じる職業倫理が共有されてきた。

しかしながら、高額かつ操作の習熟が容易ではないタンデムマス分析機器の導入を迫られた時点で、域外の検査機関へ業務を委託する自治体が相次ぐようになった。後継は隣接自治体の公的検査機関が受託するケースが多かったが、これをビジネスチャンスと捉えた民間検査業者も参入するようになり、著しく低い価格での落札が実際に起こっているようである。日本マススクリーニング学会や当研究班では、適正と考える検査業務経費を提示しているが、このような落札事例が生じるのは、行政側に必要経費の積算ができる技官がないことが一因であると推察される。上述したような単なる臨床検査を超える責務まで、高い職業倫理を持って担う技術者を確保・維持しようとするれば、必要なコストはさらに高くなる。従って、一部の地域ではすでに、良質な新生児スクリーニングを提供するための基礎的条件の崩壊が進んでいると考えられる。警鐘の意を込めて、研究分担者が実際に遭遇した事例を提示したい。

自治体 A の総合病院小児科から、研究分担者が確定検査を提供している新生児スクリーニング対象疾患の陽性例について、診断依頼があった。罹患児であると判定され、結果を報告したところ、「自治体 A で初めて発見された症例として、域内の学会で報告したい」という相談を受けたので、「自治体 A では既に、発症患者 1 例と、新生児ス

クリーニング陽性 2 例が診断されている」と回答した。このような情報共有の欠如の背景として、これら 4 例がすべて異なる医療機関で診療されていたことに加えて、中心となるべき専門医がおらず、精査医療機関もはっきりせず、連絡協議会も存在していないという、当該地域の体制不備が明らかとなった。このような状況でも、スクリーニング検査機技術者が「ハブ」として機能していれば、担当医間での情報共有は進むはずであるが、自治体 A では遠隔地の民間検査業者に委託されており、精査医療機関との協力関係の希薄さが推察された。

E. 結論

タンデムマス法の全国導入から 3 年が経過する中、外部精度管理試験については、年間 PT×3 回 + QC×1 回という一定の方式を構築し、運用を繰り返しながら課題の抽出を進めた。今後、より実効性の高い外部精度管理を目指して改良を進めるが、このような「狭義の」外部精度管理の基礎となる、各自治体での新生児スクリーニング体制の実態を調査し、関係諸部門の連携確保に取り組む必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 但馬剛：新生児スクリーニングの外部精度管理－実施状況と今後の展望．恩賜財団母子愛育会新生児スクリーニング検査技術者等研修会，東京，2016 年 6 月 24 日．
- 2) 中島英規：質量分析装置の臨床応用における標準物質の重要性．日本医用マススペクトル学会第 1 回東部会，千葉市，2016 年 6 月 25 日．
- 3) 但馬剛：我が国の新生児スクリーニングシス

テムと外部精度管理. 日本マススクリーニン
グ学会検査技術者等基礎研修会, 東京, 2016

年 12 月 16 日.

分担研究課題

次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

研究要旨

近年技術革新が著しい遺伝子解析法を用いて診断可能な疾患を中心に、そのNBSへの応用の可能性を検討した。具体的には、すでに欧米各国でNBSが実施されている原発性免疫不全症と、最近画期的な治療法が開発された脊髄性筋萎縮症について検討した。また、マススクリーニング対象疾患の候補選定に必要な疾患頻度推定を目的として、東北メディカルメガバンクの大規模ゲノムコホートデータを用いた保因者頻度および疾患頻度の推定を試みた。

研究協力者

呉 繁夫（東北大学大学院医学系研究科・教授）
小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科・教授）
斎藤加代子（東京女子医科大学
附属遺伝子医療センター 教授）
今井耕輔（東京医科歯科大学・准教授）

シークエンズデータからカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2（CPT2）欠損症の保因者頻度と患者頻度を推定した。
（倫理面への配慮）
本分担研究そのものでは直接的に患者および検体・患者個人情報扱わない。

A．研究目的

時代とともに開発される新しい技術を取り入れ、小児の障害予防の対象疾患を拡大していくことは、NBSに課せられた重要な使命の一つである。本分担研究の目的は、近年技術革新が著しい遺伝子解析法を用いて診断可能な疾患を中心に、そのNBSへの応用の可能性を検討することである。

B．研究方法

1. 遺伝子解析を用いた原発性免疫不全症の新生児スクリーニング
名古屋大学及び東京医科歯科大学で行われたパイロット研究をもとに検討をおこなった。
2. 次世代シークエンサーによるマススクリーニングの可能性に関する検討
文献的な調査を中心に検討を行った。
3. 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定
東北メディカルメガバンクにおける健常人ゲノムコホート 2049 人を対象とし、その全ゲノム

C．研究結果

1. 遺伝子解析を用いた原発性免疫不全症の新生児スクリーニング
原発性免疫不全症は放置されると致死的な疾患であり、約 5 万人に一人の頻度と考えられている。すでに米国をはじめとする諸外国では、簡便な遺伝子検査である TREC 測定によってスクリーニングが実施され、発症前治療が行われている。3 施設（名古屋大学、東京医科歯科大学、および昨年度の協力者である国立成育医療研究センター）の独立した研究協力者らの検討によって、TREC 測定が適切な精度で実施可能であり、日本人においても患者群と健常群を明確に判別できることが実証された。測定に要する費用は 1 件当たり 2,600～6,000 円と試算された。今後、愛知県における大規模なパイロットスタディが開始される予定である。
2. 次世代シークエンサーによるマススクリーニングの可能性に関する検討

次世代シーケンサーは、原理的にはあらゆる遺伝性疾患の検出が可能である。米国では、2013年より4つの研究医療機関で倫理面を含めた検討が開始されている。現在のところ、1検体あたり十～数十万円のコストを要する。現行制度にそのまま組み込むことは難しいと考えられた。

3. 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定

NBSの対象疾患を検討するにあたっては、当該集団における疾患頻度情報が極めて重要である。今回、東北メディカルメガバンクの2049人の全ゲノムシーケンズデータを用いCPT2欠損症の疾患頻度の推定が可能かどうかを検証した。検討集団では、CPT2遺伝子において34個のエクソン内SNPが検出された。このうちHMDBに記載されている変異のみを対象として計算するとわが国の疾患頻度は47万人に1人となった。一方、島根大学小児科の患者変異リストに基づいて計算すると、疾患頻度は4.1万人に1名となった。変異データベースに掲載されている病因変異のさらなる検証によって、より精度の高い推定が可能と考えられた。

D. 考察

わが国における原発性免疫不全症のマススクリーニングを実施できる技術的な体制はすでに整備されていると考えられた。欧米各国ではすでにスクリーニング開始されて救命される新生児が増加していることに鑑み、わが国でも早急に実施に向けた検討を始めるべきではないかと思われる。

脊髄性筋萎縮症については、新たなNBS対象疾患として将来的に有力な候補であると考えられた。

健常人ゲノムコホートデータを用いた保因者頻度、患者頻度の推定が可能であることが示された。

E. 結論

原発性免疫不全症のNBSに関して、国内で一定規模のパイロット研究を実施すべき時期に来ているものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. *Am J Med Genet A*. 167A(2):407-11, 2015.
- 2) Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 60(5):1297-307, 2015.
- 3) Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod*. 30(3):499-506, 2015
- 4) Suzuki E, Izumi Y, Chiba Y, Horikawa R, Matsubara Y, Tanaka M, Ogata T, Fukami M, Naiki Y. Loss-of-function SOX10 mutation in a patient with Kallmann syndrome, hearing loss, and iris hypopigmentation. *Horm Res Paediatr* 84:212-216, 2015.
- 5) Nakano E, Geisz A, Masamune A, Niihori T, Hamada S, Kume K, Kakuta Y, Aoki Y,

- Matsubara Y, Ebert K, Ludwig M, Braun M, Groneberg DA, Shimosegawa T, Sahin-Tóth M, Witt H. Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 309(8):G688-94, 2015
- 6) Aoki Y, Niihori T, Inoue SI, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *J Hum Genet.* 61(1):33-9, 2016.
- 7) Shima H, Tanaka T, Kamimaki T, Dateki S, Muroya K, Horikawa R, Kanno J, Adachi M, Naiki Y, Tanaka H, Mabe H, Yagasaki H, Kure S, Matsubara Y, Tajima T, Kashimada K, Ishii T, Asakura Y, Fujiwara I, Soneda S, Nagasaki K, Hamajima T, Kanzaki S, Jinno T, Ogata T, Fukami M; Japanese SHOX study group. Systematic molecular analyses of SHOX in Japanese patients with idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet.* 61(7):585-91, 2016.
- 8) Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saito H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet.* 61(6):547-53, 2016.
- 9) Miyake H, Yamada S, Fujii Y, Sawai H, Arimori N, Yamanouchi Y, Ozasa Y, Kanai M, Sago H, Sekizawa A, Takada F, Masuzaki H, Matsubara Y, Hirahara F, Kugu K. Nationwide survey for current clinical status of amniocentesis and maternal serum marker test in Japan. *J Hum Genet.* 2016 Jun 30. doi: 10.1038/jhg.2016.67. [Epub ahead of print]
- 2 . 学会発表
- 1) 「希少遺伝性疾患研究の最前線」第22回日本家族性腫瘍学会学術集会 愛媛県松山市 2016年6月3日
- 2) 「小児科医が知っておきたい希少疾患の基礎知識と最近の話題」第8回日本小児科学会 長野地方会 長野県上田市 2016年6月26日
- 3) 「Rare Disease Research in Japan」第61回日本新生児成育医学会・学術集会 東京都 2016年11月16日
- 4) 「新生児におけるゲノム医療 Genomic medicine for newborns」第61回日本新生児成育医学会・学術集会 大阪府 2016年12月1日
- 5) 「新生児スクリーニングの基本概念」日本マススクリーニング学会検査技術者等基礎研修会 東京都 2016年12月16日
- H . 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究課題

次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

愛知県における新児 SCID マスクリーニングの準備状況

研究協力者 小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究要旨

重症複合型免疫不全症（SCID）は、すでに欧米各国においてNBSの対象疾患となっている。本研究では、わが国における実施を念頭に、名古屋大学でパイロット研究を実施した。

研究協力者

小島大英（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

奥野友介（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

村松秀城（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

高橋義行（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

A．研究目的

重症複合型免疫不全症（SCID）は、NBS 対象疾患としての基準を満たしており、すでに欧米各国では実際にスクリーニングが実施されている。わが国における実施に向けて名古屋大学においてパイロット研究を実施した。

B．研究方法

日齢 4～7 の新生児 213 名を対象として TREC 法によるスクリーニングを実施した。陽性コントロールとして SCID 患者 9 名から得られた検体を用いた。また、陽性者を対象とする精密検査法について検討した。

C．研究結果

（スライドを参照のこと）

TREC 法によって簡便迅速にスクリーニングが実施できた。陽性検体はすべて同定することができた。解析対象とした 213 名の新生児には陽性例は認められなかった。

スクリーニング陽性者を対象とした精密検査として、次世代シーケンサーによる遺伝子診断法を確立した。

D．考察

TREC 法は欧米各国の新生児スクリーニングですでに広く用いられている手法であるが、今回の検討によってその適性が確認された。本研究により、実際にマススクリーニングを実施できる技術的基盤が整備されたものと考えられる。今後、愛知県内においてパイロット研究を進める予定である。

E．結論

わが国においても SCID の NBS についてパイロット研究を遂行し、その導入可否を検討すべきである。

新生児マススクリーニング

《現行の19疾患》

| | | |
|-------------|-----------------|---------------|
| フェニルケトン尿症 | アルギニノコハク酸尿症 | 複合カルボキシラーゼ欠損症 |
| メープルシロップ尿症 | メチルマロン酸血症 | グルタル酸血症1型 |
| ホモシスチン尿症 | プロピオン酸血症 | MCAD欠損症 |
| ガラクトース血症 | イソ吉草酸血症 | VLCAD欠損症 |
| 先天性甲状腺機能低下症 | メチルクロトニルグリシン尿症 | TFP/LCHAD欠損症 |
| 先天性副腎過形成症 | ヒドロキシメチルグルタル酸血症 | CPT1欠損症 |
| シトルリン血症1型 | | |

厚生労働省雇用均等・児童家庭局
母子保健課長通達（平成23年3月31日）に記載された疾患

《新たに追加予定2疾患》

重症複合免疫不全症
ボンベ病

2017年4月から愛知県で任意検査として追加予定

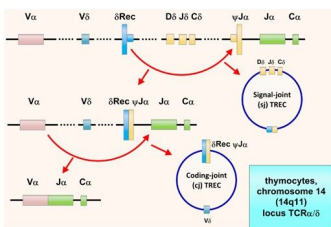
重症複合免疫不全症

severe combined immunodeficiency (SCID)

- 乳児期より重症日和見感染症を発症する先天性免疫不全症である。
- SCIDは、出生時には無症状なことが多いが、感染症が難治化しやすく、早期に診断し、適切な治療を受けなければ、1歳までに死亡する。
- 出生頻度はおよそ5万人あたり1人と推定され、16種類の原因遺伝子が知られている。(Bousfiha et al. 2015 J Clin Immunol)
- 感染症に罹患する前に、造血幹細胞移植を行えば根治可能である。

TREC (T-cell receptor excision circles)

胸腺における、T細胞受容体(TCR)の遺伝子再構成の副産物として生じる環状DNAで、胸腺からの成熟T細胞産生量を推測するための高感度なマーカーとなる。安定した物質で、乾燥ろ紙血で測定が可能である。



Cossu et al. 2010 Ital J Pediatr

マススクリーニングの広がり

- 北米
米国 カナダ
- 欧州
オランダ フランス ドイツ イタリア スウェーデン
イスラエル スペイン
- アジア
台湾
- その他
オーストラリア

Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States

| | 人数(人) | |
|-----------------|---------|-----------|
| スクリーニングを受けた新生児数 | 3030083 | |
| スクリーニング陽性数 | 1265 | (1/2400) |
| SCID患者数 | 52 | (1/58000) |
| 非SCID T細胞減少症 | 411 | (1/7400) |

(Kwan et al. 2014 JAMA)

名古屋大学小児科でのパイロット研究

【目的】

TRECを用いたSCIDの新生児スクリーニングの有用性を検討し、それを実際に導入するための基礎的検討を行う。

【対象】

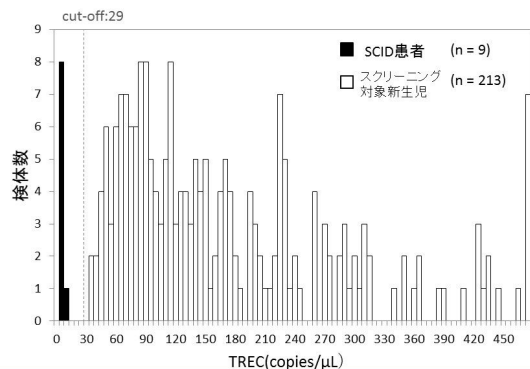
日齢4～7の新生児

【方法】

名古屋大学医学部附属病院小児科に保存されているSCID患者検体のTREC値を測定し、健常小児と比較する。

日齢4～7の新生児の乾燥濾紙血中のTREC値を測定解析する。

TREC測定結果



スクリーニング陽性者に対する精密検査

スクリーニング陽性者は、迅速な診断確定のための精密検査が必要である。

- ◆ T細胞数測定 (ナイーブT細胞)
- ◆ 原因遺伝子検査

Radiosensitive Genotypes among SCID Patients

| | | | |
|-------|--------|------|-----------------|
| IL2RG | CD3E | ADA | DCLRE1C* (NBN*) |
| JAK3 | CD247 | AK2 | PRKDC* |
| IL7R | PTPRC | RAG1 | LIG4* |
| CD3D | CORO1A | RAG2 | NHEJ1* |

* Radiation sensitivity

SCIDには、放射線感受性のある疾患も含まれ、適切な前処置を選択することが必須である。

移植前の迅速で正確な遺伝子診断が必須

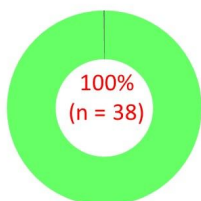
次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

1. 原発性免疫不全症に関連する 349遺伝子の網羅的遺伝子解析
2. スーパーコンピューターによる 変異解析
3. 遺伝子診断



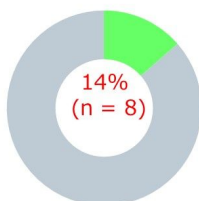
本遺伝子診断システムの性能

遺伝子診断が得られていた
原発性免疫不全症患者(n = 38)



全例で遺伝子変異の同定に成功

遺伝子診断が得られていない
免疫不全症疑い患者(n = 59)



8例で新たに遺伝子診断が得られた

原発性免疫不全症患者の効果的な遺伝子診断システムの確立に成功

D Kojima et al. 2016 JACI

米国での新生児スクリーニングにおける非SCID T細胞減少症

| 疾患 | 人数 |
|-----------------------|-----|
| 症候性T細胞減少症 | 136 |
| DiGeorge | 78 |
| Trisomy 21 | 21 |
| Ataxia telangiectasia | 4 |
| その他 | 33 |
| 二次性T細胞減少症 | 117 |
| 心奇形 | 30 |
| 多発奇形 | 23 |
| 消化器奇形 | 15 |
| third spaceへのloss | 15 |
| 先天性白血病 | 4 |
| その他 | 30 |
| 早産のみ | 29 |
| Variant SCID | 12 |
| 不明 | 117 |

Kwan et al. 2014 JAMA

DiGeorge症候群

- 胚形成初期における第3および第4咽頭嚢の異常形態発生が原因
- 胸腺低形成による易感染性
- 副甲状腺低形成による低Ca血症
- 特異的顔貌
- 先天性心疾患

症状に個人差が大きく、SCIDと同様に診断される前に感染症で死亡する症例もある。

DiGeorge症候群

- 多くの症例で染色体22q11.2欠損が原因



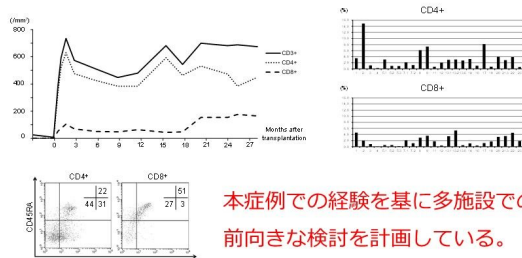
我々の確立した網羅的遺伝子解析ではコピー数解析により22q11.2欠失も検出可能



- 治療法は胸腺移植が標準的だが、世界でも実施可能な施設は1~2施設である。

DiGeorge症候群に対する臍帯血移植

名古屋大学小児科では、DiGeorge症候群に対する非血縁間臍帯血移植に世界で初めて成功し、良好な免疫能再構築を確認した。

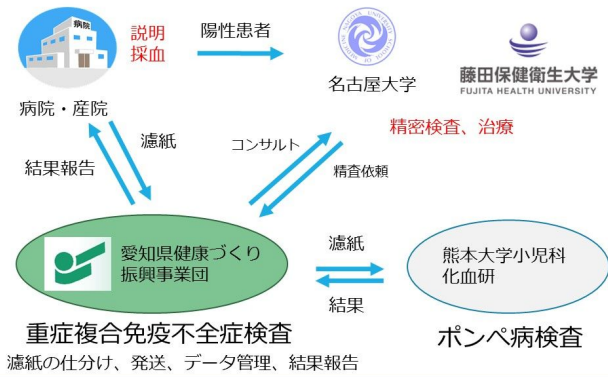


D Kojima et al. 2016 JACI

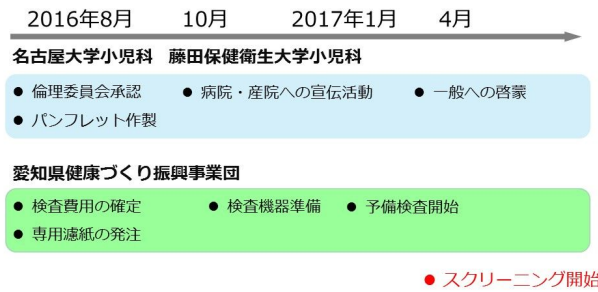
SCID・ポンペ病 マススクリーニング

- 愛知県健康福祉部児童家庭課も了解済み
- 事務局：愛知県健康づくり振興事業団
- 事業費：保護者負担

新しい新生児マススクリーニング



ロードマップ



実施手順

1. 産婦人科施設にて保護者へ説明
2. 同意を得られた新生児から、通常のろ紙血採取と同時に専用ろ紙で2スポット余分に採血

| 新しい新生児スクリーニング検査用採血ろ紙 | | | |
|----------------------|-------|--------|------|
| 検体種別 | 初回採血 | 再採血 | 検体番号 |
| 医療機関名 | | | |
| フリガナ | | | |
| 母氏名 | | | |
| フリガナ | | | |
| 児氏名 | | | |
| | 性 | 男・女・不明 | |
| 出生日 | 年 月 日 | 在胎週数 | 週 |
| 採血日 | 年 月 日 | 出生体重 | g |
| 備考 | 採血時間 | | |

実施手順

1. 産婦人科施設にて保護者へ説明
2. 同意を得られた新生児から、通常のろ紙血採取と同時に専用ろ紙で2スポット余分に採血
3. 専用ろ紙を通常のろ紙血と一緒に、愛知県健康づくり振興事業団へ送付
4. 事業団から結果連絡（検体受付翌々水曜日）
5. 一定期間ごとに事業団から産婦人科施設へ費用請求

検査費用

- 検査費用、郵送費、事務手数料等
計6000円（税込）
- 採血費用は、各施設で設定。
- 再検査費用も含む。精密検査等は医療保険で対応。

今後の課題

- 早産児おけるTRECの最適なカットオフ値の設定。
- 継続的に本マススクリーニングを行うためには、多くの保護者の同意が必要。
- 初年度目標検査数 10000件
(愛知県年間出生数 65000人)



分担研究課題

次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

CPT2 欠損症の保因者頻度推定

研究協力者 呉 繁夫（東北大学大学院医学系研究科 教授）

研究要旨

新たなNBS対象候補疾患を検討するにあたり、当該疾患の日本人における頻度情報は不可欠である。今回、東北メディカルメガバンクにおける健常人コホートにおける全ゲノムシーケンズデータをもとに、CPT2欠損症の保因者頻度を推定することを試みた。

A．研究目的

新たな NBS 対象候補疾患を検討するにあたり、当該疾患の日本人における頻度情報は不可欠である。従来はこれまでに報告された症例数をもとに推定されてきたが、未診断症例（特に早期死亡例など）が含まれないなどのバイアスがある。

今回、東北メディカルメガバンクにおける健常人コホートにおける全ゲノムシーケンズデータをもとに、保因者頻度および患者頻度を推定することを試みた。

B．研究方法

東北メディカルメガバンクにおける健常人ゲノムコホート 2049 人を対象とし、その全ゲノムシーケンズデータからカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2（CPT2）欠損症の保因者頻度と患者頻度を推定した。CPT2 欠損症は、現在のタンデムマススクリーニング一次対象疾患にはなっておらず、二次対象疾患として一部地域でスクリーニングが行われている。

（倫理面への配慮）

東北大学の倫理委員会で承認を受けている。

C．研究結果

（スライドを参照のこと）

Human Mutation Database に収載されている CPT2 遺伝子変異をもとに解析すると、日本人における保因者頻度は約 342 人に一人となり、疾患頻度は 47 万人に一人と推定された。

一方、島根大学の患者変異リストに基づくと日本人における保因者頻度は約 102 人に一人となり、疾患頻度が 4.1 万人に一人と推定された。

D．考察

今回の 2 つの解析結果が大きく異なる要因は S12F 変異のホモ接合体の浸透率（発症するか否か）をどうとらえるかによるところが大きい。

E．結論

健常人ゲノムコホートデータを用いた保因者頻度、患者頻度の推定が可能であることが示された。今後、最適なゲノム参照パネルのサイズの検討とともに、CPT2 欠損症においては、さらに多くの変異解析と S12F 変異の発現解析が重要と考えられる。

CPT2欠損症 の 保因者頻度推定

東北大学小児科
東北メディカル・メガバンク
呉 繁夫

先天代謝異常症を含む稀少難病の 患者数把握の方法

- 1) 医療機関へのアンケート調査
 - ・未診断者数が把握できない
 - ・悉皆性に問題
- 2) 新生児スクリーニング
 - ・先天代謝異常症26疾患
 - ・副腎過形成+クレチン症
- 3) 一般集団のゲノム解析による保因者頻度推定
 - ・日本人ゲノム・レファレンス・パネル (ToMMo)
 - ・Hardy-Weinberg法則より罹患者頻度を推定
(保因者頻度)² x 1/4 = 疾患頻度

東北メディカル・メガバンク機構設立の経緯

平成23年3月11日 東日本大震災



- 多くの病院が被災
- 沿岸部の医師不足の深刻化
- カルテ等の流失
- 住民への長期的な健康影響

大学病院 ⇒ 緊急の医師派遣
2ヶ月間で延べ1500名の派遣
医学系研究者が中・長期的に
できることはないのか？

復興に向けて

- 被災地の復興・再生には「核（エンジン）」が必要
- 東北地方の発展に資する新たな目標を設定
- 日本のライフノベーションをリードする新規拠点機能を設定して被災地の復興と活性化に貢献

東北大学医学系研究科の災害対策本部
2011年3月25日



地域支援仙台センター

- 10数種の詳細検査
- 詳細検査を受けられたい希望される方にはMRI調査のご案内



地域支援センター

- 地域住民コホートの精密な健康調査の拠点
- 三世代コホート家族の健康調査の拠点
- GMRC 171名（相乗り型も担当）



東北メディカル・メガバンク機構

- 機構長 山本 雅之
副機構長 呉 繁夫、木下賢吾
総務・企画事業部 新井 知彦（部長）
長村 風二（副部長）
布施 昇男（副部長）
コホート事業部 呉 繁夫（部長）
栗山 達一（副部長）
清元 秀泰（副部長）
バイオバンク事業部 塚本 直子（部長）
鈴木 洋一（副部長）
ゲノム・オミクス解析事業部 山本 雅之（部長）
木下 賢吾（副部長）
安田 純（副部長）
長崎 正昭（副部長）
事務部門 小林 志雄（事務総括）
機構長特別補佐 八重樫 伸生（東北大学病院長）
田中 博



合計約380名のスタッフ(GMRC / TCFを含む)

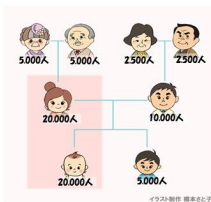
東北メディカル・メガバンク計画における 地域住民コホート・三世代コホート

- 地域住民コホート：
 - ・成人に協力依頼
 - ・8万人規模

- ① 集団型特定健診参加型調査
- ② 地域支援センター型健康調査



- 三世代コホート：
 - ・妊婦さんに協力依頼
 - ・子、親、祖父母の三世代
 - ・7万人規模での実施



世界初の世代横断的子どもゲノムコホート

日本人ゲノムレファレンス・パネル

- ・東北メディカル・メガバンク事業で作成した日本人のゲノム多型データ (Nagasaki M, Nat Commun, 2015)

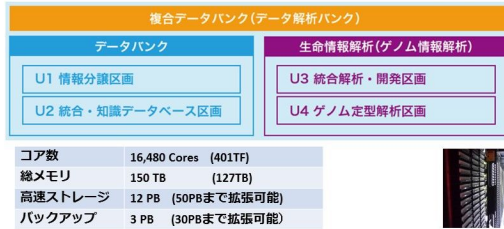
- ・宮城県のゲノムコホート15万人のうち、2049名分の全ゲノム・シーケンス・データを基に作成（現在3000名終了し、来春公開予定）

複合データバンクとしてのスーパーコンピュータの役割

スーパーコンピュータは目的に応じてU1からU4の4つの区画に分かれ

- U1とU2はデータバンクとしての役割
- U3とU4はゲノム情報解析としての役割

を担っている。また、テープストレージでバックアップを行っている



2KJPNのCPT2遺伝子変異

・160個のSNP、small del/ins

- ・このうち、**34**個がエクソン部に存在するSNP
 - ・アミ/酸の変わらないSNP **10**個
 - ・ミスセンス変異 **23**個
 - ・ナンセンス変異 **1**個(p.Q36X)

ミスセンス変異のうち
 アレル頻度>5%、CADDスコア<15を除くと17個へ

2KJPN内のCPT2遺伝子変異リスト

| 変異 | アレル数 | SIFT | Polyphen2 | CADD |
|------------------------|------|------|-----------|-------|
| exon1:c.C106T:p.Q36X | 1 | . | . | 36 |
| exon3:c.C338T:p.S113L | 2 | D | D | 34 |
| exon4:c.C365T:p.S122F | 16 | D | B | 23.7 |
| exon4:c.T470C:p.V157A | 1 | D | P | 24.2 |
| exon4:c.C673T:p.R225C | 1 | D | D | 34 |
| exon4:c.G697A:p.E233K | 1 | T | B | 24.8 |
| exon4:c.C959T:p.S320L | 1 | D | D | 29.8 |
| exon4:c.G1049A:p.R350H | 1 | D | D | 32 |
| exon4:c.T1148A:p.F383Y | 1 | T | P | 18.01 |
| exon4:c.G1408T:p.A470S | 1 | T | P | 23.5 |
| exon4:c.T1423C:p.F475L | 1 | T | D | 18.35 |
| exon4:c.T1465C:p.C489R | 1 | D | D | 23.1 |
| exon4:c.G1489A:p.G497S | 1 | D | D | 33 |
| exon4:c.C1559T:p.P520L | 7 | T | B | 21.7 |
| exon4:c.A1634C:p.E545A | 28 | D | D | 26 |
| exon5:c.C1678T:p.R560W | 2 | D | D | 35 |
| exon5:c.G1813C:p.V605L | 1 | D | P | 29.6 |
| exon5:c.C1820G:p.S607C | 1 | D | P | 28.9 |

CPT2欠損症の疾患頻度推定

変異リスト全て~保因者68名

$$(68/2049)^2 \times 1/4 = 1/3,600$$

2KJPN内のCPT2遺伝子変異リスト

| 変異 | アレル数 | SIFT | Polyphen2 | CADD | HGMD |
|------------------------|------|------|-----------|-------|------|
| exon1:c.C106T:p.Q36X | 1 | . | . | 36 | |
| exon3:c.C338T:p.S113L | 2 | D | D | 34 | ○ |
| exon4:c.C365T:p.S122F | 16 | D | B | 23.7 | |
| exon4:c.T470C:p.V157A | 1 | D | P | 24.2 | |
| exon4:c.C673T:p.R225C | 1 | D | D | 34 | |
| exon4:c.G697A:p.E233K | 1 | T | B | 24.8 | |
| exon4:c.C959T:p.S320L | 1 | D | D | 29.8 | |
| exon4:c.G1049A:p.R350H | 1 | D | D | 32 | |
| exon4:c.T1148A:p.F383Y | 1 | T | P | 18.01 | ○ |
| exon4:c.G1408T:p.A470S | 1 | T | P | 23.5 | |
| exon4:c.T1423C:p.F475L | 1 | T | D | 18.35 | |
| exon4:c.T1465C:p.C489R | 1 | D | D | 23.1 | |
| exon4:c.G1489A:p.G497S | 1 | D | D | 33 | ○ |
| exon4:c.C1559T:p.P520L | 7 | T | B | 21.7 | |
| exon4:c.A1634C:p.E545A | 28 | D | D | 26 | |
| exon5:c.C1678T:p.R560W | 2 | D | D | 35 | |
| exon5:c.G1813C:p.V605L | 1 | D | P | 29.6 | ○ |
| exon5:c.C1820G:p.S607C | 1 | D | P | 28.9 | |

CPT2欠損症の疾患頻度推定

1)変異リスト全て~保因者68名

$$(68/2049)^2 \times 1/4 = 1/3,600$$

2)HGMD~保因者5+1名(342名に1人)

$$(1/342)^2 \times 1/4 = 1/468,000$$

CPT2患者16名の変異解析結果 (島根大学小児科)

| 変異 | allele | case | family | ホモ2人有=1家系 |
|------------------------|--------|------|--------|------------------------------------|
| 1148T>A (F383Y) | 10 | 8 | 6 | ホモ1人有 |
| 520G>A (E174K) | 5 | 4 | 3 | ホモ1人有 |
| 338C>T (S113L) | 3 | 2 | 2 | ホモ1人有 |
| 365C>T (S122F) | 2 | 1 | 1 | ホモ1人有 --- 中国では3%持っているらしい SNPかもしれない |
| 151A>G (R51G) | 1 | 1 | 1 | |
| 370C>T (R124X) | 1 | 1 | 1 | |
| 452G>A (R151Q) | 1 | 1 | 1 | |
| 647A>G (Q216R) | 1 | 1 | 1 | |
| 745delG fs (X264) | 1 | 1 | 1 | |
| 1429C>T (R477W) | 1 | 1 | 1 | |
| 1508G>A (R503H) | 1 | 1 | 1 | |
| 1737del C (V579fsX579) | 1 | 1 | 1 | |

2KJPN内のCPT2遺伝子変異リスト

| 変異 | アレル数 | SIFT | Polyphen2 | CADD | HGMD | 島根変異アレル |
|------------------------|------|------|-----------|-------|------|---------|
| exon1:c.C106T:p.Q36X | 1 | . | . | 36 | | 0 |
| exon3:c.C338T:p.S113L | 2 | D | D | 34 | ○ | 3 |
| exon4:c.C365T:p.S122F | 16 | D | B | 23.7 | | 2 |
| exon4:c.T470C:p.V157A | 1 | D | P | 24.2 | | 0 |
| exon4:c.C673T:p.R225C | 1 | D | D | 34 | | 0 |
| exon4:c.G697A:p.E233K | 1 | T | B | 24.8 | | 0 |
| exon4:c.C959T:p.S320L | 1 | D | D | 29.8 | | 0 |
| exon4:c.G1049A:p.R350H | 1 | D | D | 32 | | 0 |
| exon4:c.T1148A:p.F383Y | 1 | T | P | 18.01 | ○ | 10 |
| exon4:c.G1408T:p.A470S | 1 | T | P | 23.5 | | 0 |
| exon4:c.T1423C:p.F475L | 1 | T | D | 18.35 | | 0 |
| exon4:c.T1465C:p.C489R | 1 | D | D | 23.1 | | 0 |
| exon4:c.G1489A:p.G497S | 1 | D | D | 33 | ○ | 0 |
| exon4:c.C1559T:p.P520L | 7 | T | B | 21.7 | | 0 |
| exon4:c.A1634C:p.E545A | 28 | D | D | 26 | | 0 |
| exon5:c.C1678T:p.R560W | 2 | D | D | 35 | | 0 |
| exon5:c.G1813C:p.V605L | 1 | D | P | 29.6 | ○ | 0 |
| exon5:c.C1820G:p.S607C | 1 | D | P | 28.9 | | 0 |

CPT2欠損症の疾患頻度推定

1) 変異リスト全て～保因者68名

$$(68/2049)^2 \times \frac{1}{4} = 1/3,600$$

2) HMDB～保因者5+1名(342名に1人)

$$(1/342)^2 \times \frac{1}{4} = 1/468,000$$

3) 島根リスト～保因者19+1名(102人に1人)

$$(1/102)^2 \times \frac{1}{4} = 1/41,000$$

結 語

1. HMDBにあるCPT2遺伝子変異を持つ日本人保因者頻度は、約342人に1人(疾患頻度**47万人に1人**)
2. 患者変異リストに基づく日本人保因者頻度は、102名に1人(疾患頻度**4.1万人に1名**)
3. 今後、ケ/ム参照パネルのサイズ、多くのCPT2欠損症の変異解析、S122F変異の発現解析、などが必要
4. S122F変異のホモ接合体(約6万人に1名)の浸透率?

分担研究課題

次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

原発性免疫不全症スクリーニングの現状と課題

研究協力者 今井耕輔（東京医科歯科大学小児科 准教授）

研究要旨

原発性免疫不全症は致死的な先天性疾患であるが、発症前に発見して治療を開始することによってその予後を大きく改善することが可能である。本研究では、本疾患に対する海外での NBS の実施状況を把握するとともに、東京医科歯科大学においてパイロット研究を実施した。

研究協力者

寺田尚美（東京医科歯科大学小児科）
稲見有希（東京医科歯科大学小児科）
葉姿汶（東京医科歯科大学小児科）
山下基（東京医科歯科大学小児科）
森丘千夏子（東京医科歯科大学小児科）
満生紀子（東京医科歯科大学小児科）
滝敦子（東京医科歯科大学小児科）
森尾友宏（東京医科歯科大学小児科）

2016 年 5 月から 12 月にかけて東京医科歯科大学で出生した 213 名の新生児を対象に、TREC 法及び KREC 法を用いてスクリーニングを実施した。

C．研究結果

（スライドを参照のこと）

KREC 法および TREC 法で得られる結果は出生体重、出生週数に影響を受けないものと考えられた。市販のキットと自家製キットのいずれにおいても適切な結果が得られることを確認した。

A．研究目的

原発性免疫不全症は致死的な先天性疾患であるが、発症前に発見して治療を開始することによってその予後を大きく改善することが可能である。欧米各国ではすでに NBS 対象疾患となっている。

本研究では、海外での状況を把握するとともに、東京医科歯科大学においてパイロット研究を実施した。

B．研究方法

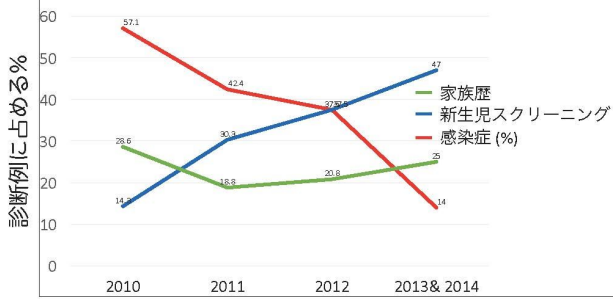
D．考察

原発性免疫不全症を対象として NBS を実施するにあたっての技術的な課題や結果報告までの日数には問題がないと考えられた。

E．結論

原発性免疫不全症の NBS に関して、わが国における、より大規模なパイロット研究を実施する準備が整備された。

米国ではすでに感染で発見されるよりも新生児マススクリーニングで発見されるSCIDの方が多くなっている→感染症なしで移植できる！



*Data from Primary Immune Deficiency Treatment Consortium (PIDTC)



Courtesy of Prof. Notarangelo LD Boston Children's Hospital

PIDスクリーニング各国の状況：18ヶ国



原発性免疫不全症(PID)の早期発見にご協力ください

原発性免疫不全症(PID)は生まれつき感染に弱い稀な病気で、1万人~5万人に1人、BCGやロタワクチンなどの細菌生ワクチンで感染したつたり、通常は早くに治るようなかぜが長引いたり、結核に感染することもある重い病気です。そのため、生後早期に診断し、感染症の予防や治療を行うことが重要です。当院では、全国の大学と共同でその早期診断法を確立しましたが、まだ日本人での正常値がわかりません。そこで、

あなたのお子様が生まれて、約5日後に行われる、新生児マススクリーニング検査の際に、0.1ml~3.0ml(2~3滴)程度の血液をいただけませんか。

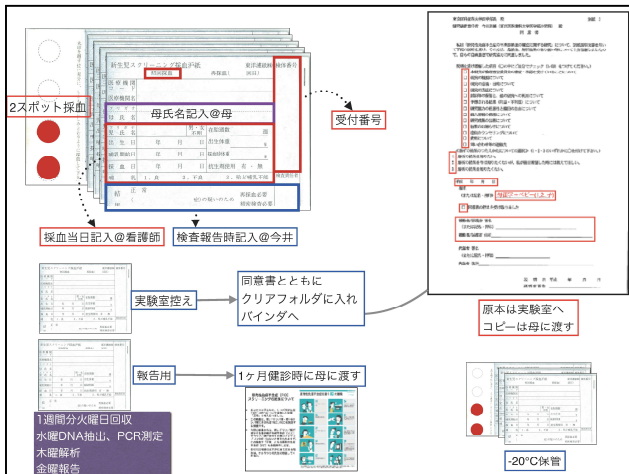
- ご協力いただける方は、医師による詳しい説明がございます。説明書をご覧いただき、御同意いただける場合には同意書に御署名をお願いします。
- お話しいただけるかどうかは任意です。御話し合いたい場合でもあなたのお子様に不利な事は一切ありません。
- 個人情報を保護することが義務づけられています。
- 本研究(研究課題名：原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究)は、本学倫理委員会(承認番号：1560)の承認を受けております。
- お申込みは、下記にお電話/お寄せください。

東京医科歯科大学小児科
 連絡先：〒113-8531 東京都文京区湯島3-1-45
 電話：03-3833-2474 FAX: 03-3833-0373
 訪問：おむすび組医師：寺岡雅晴

- ・月1回マザーズクラス(母親学級)で、新生児について、ワクチンについて、など話す中で、研究の説明と説明書の配布
- ・生後1~2日目(月水金)に新生児科医・小児科医による母への説明と同意書の取得(産科からは、有料になれば口頭説明要らない、と)
- ・生後4日目に採血



3. TMDU院内パイロットスクリーニング



1ヶ月健診で配布、間に合わなければ郵送

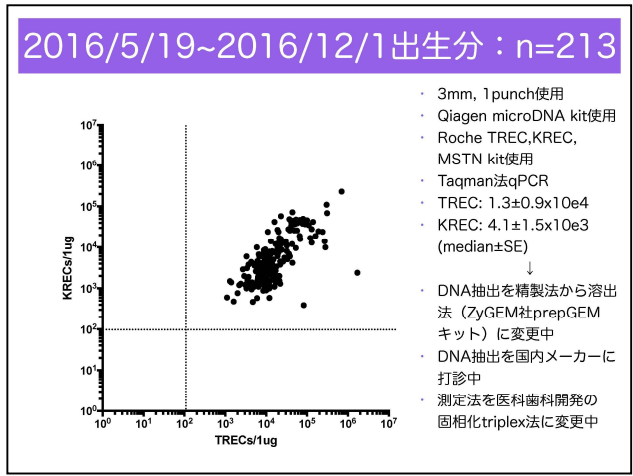
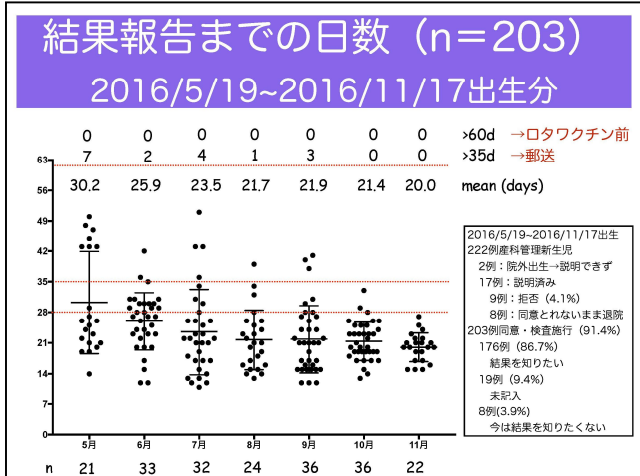
原発性免疫不全症 (PID) スクリーニングの結果について

- あなたのお子さんの、リンパ球新生能 (TREC,KREC)について検査した結果「正常」と考えられました。
- この検査は、若いリンパ球・若いリンパ球に含まれるTREC,KRECを測定する検査です。
- 今回の結果からは、若いリンパ球が減少する重症複合免疫不全症 (SCID) やリンパ球が減少する無ガンマグロブリン血症ではないと考えられますがこの検査で「正常」となる原発性免疫不全症 (PID) も多数存在します。
- 右の10の徴候のどれかにあてはまる場合は、かかりつけの先生にご相談ください。

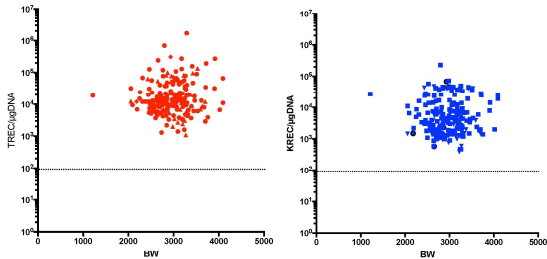
原発性免疫不全症を疑う10の徴候

- 01 呼吸器感染症が頻りに繰り返す
- 02 肺炎を繰り返す
- 03 肺結核を繰り返す
- 04 皮膚感染症を繰り返す
- 05 生後10ヶ月以内の腸炎を繰り返す
- 06 生後10ヶ月以内の慢性腸炎を繰り返す
- 07 生後10ヶ月以内の慢性下痢を繰り返す
- 08 生後10ヶ月以内の慢性嘔吐を繰り返す
- 09 生後10ヶ月以内の慢性発熱を繰り返す
- 10 生後10ヶ月以内の慢性体重減少を繰り返す

これらの徴候のうち1つ以上当てはまる場合は、産科医師や小児科医師にご相談ください。専門の医師に相談して下さい。この中で、90%程度に当てはまる場合は、重症複合免疫不全症や無ガンマグロブリン血症を疑います。

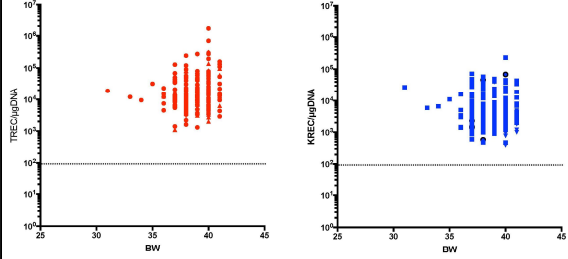


出生体重とTREC,KREC (n=208)

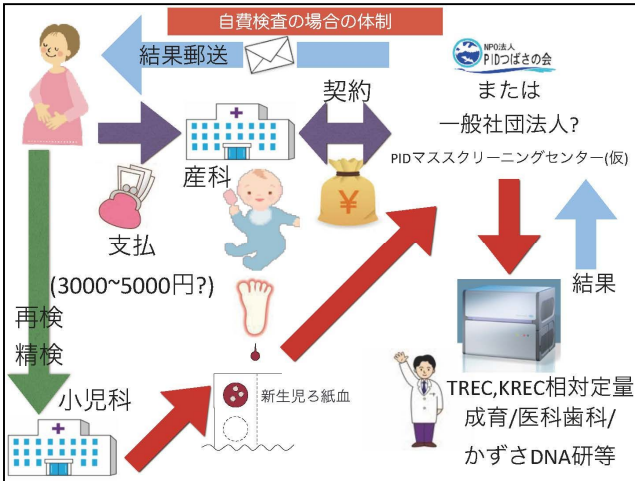


median 2968g (1214-4090g)
体重とTREC,KRECには相関はなさそう

出生週数とTREC,KREC (n=208)



median 39w (31-41w)
週数とTREC,KRECには相関はなさそう



4. 正常値設定とPID-NBS用キット作成

EnLite™ Neonatal TREC system

PUNCHING → **ELUTION** → **AMPLIFICATION** → **MEASUREMENT**

1.5mmパンチで打ち抜き、直接黒色の96穴プレートに入れる

Elution bufferを入れて、boil 45分

試薬を入れて FRET法で測定
通常のPCR プローブがハイマシんで増幅
プリすると光る

FDA承認
測定時間：200分 (ハズオンは60分)
定価：41万円/312検体=1315円/TREC
1プレート768検体

EnLite-TRECでの予備検討の結果

- n=476
- 東京医科歯科大学出生新生児濾紙血：n=88
- 岐阜大学から提供の新生児紙血 (岐阜大学から提供)：n=389
- β actin
 - median: >608
 - range: 17-608
- TREC
 - median: 64
 - range: 11-473
 - TREC<10: 0
 - TREC<20: 7 (1.47%)
 - 1例は β actinも17

TREC,KRECキット化

| 用途 | A | B | C | D | E | F | G | H |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 検査対象 | TREC KREC | TREC KREC | TREC KREC | TREC KREC | TREC KREC | TREC KREC | TREC KREC | TREC KREC |
| 固相化pPrMix | | | | | | | | |

FAM, HEX, Cy5

既発売の再生医療用ウイルスキット(特許取得済み)・開発中の呼吸器感染症ウイルスキットと同様の方法で、TREC, KREC, RNasePの固相化プライマープローブキットを作成

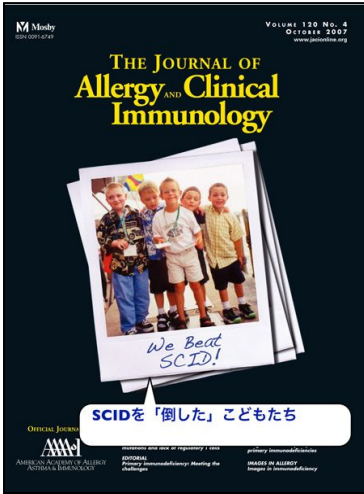
各社のリアルタイムPCR装置に対応

in houseのプライマープローブ (防衛、医科歯科改良版)、既発売のRoche社のキット (TREC, KREC)、Perkin Elmer社のキット (TREC, FRET法) との比較

EnLite, Roche, TMDU kitのTRECの比較 n=65

| Method | Median | Range |
|-----------------|--------------|-------|
| TREC-FRET法 | 58.0 ± 9.9 | |
| TREC/KREC qPCR法 | 235.7 ± 21.7 | |
| TREC/KREC qPCR法 | 299.9 ± 32.8 | |

TMDU出生新生児紙血を使用
p<0.0001, ANOVA
NS: Roche vs TMDU
TMDUkitも既発売法と同等
Perkinが低いのはPCR機械の増幅効率の問題?



皮下注 γ -グロブリン補充療法を行う乳児 (IDF, 2008)

分担研究課題

次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

脊髄性筋萎縮症における新児マススクリーニングの可能性

研究協力者 斎藤加代子（東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 教授）

研究要旨

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy: SMA）は、予後不良の下位運動ニューロン病である。近年、その病態分子機構の解明に基づく画期的な治療薬が開発されたため、新たなNBS対象疾患の候補として検討を行った。

A．研究目的

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy: SMA）は、予後不良の下位運動ニューロン病である。近年、その病態分子機構の解明に基づく画期的な治療薬が開発された。治療開始にはあたっては可能な限りの早期介入が必須であり、NBSの可能性が示唆される。本研究ではその最新の知見と国際共同治験の状況を調査した。

B．研究方法

東京女子医大で実施されている国際共同治験の成果と付随情報について検討した。

C．研究結果

（スライド参照のこと）

国際共同治験では SMA 治療薬の劇的な効果が確認されており、また新生児早期からの治療が予後に大きく影響を与えることが示唆された。

SMA の遺伝子診断にはすでに簡易迅速検査法が開発されており、マススクリーニングに応用可能

と考えられた。

D．考察

NBS 対象疾患の満たすべき基準として、Wilson & Junger の基準が知られている（WHO 1968）。SMA に関しては、画期的な治療法が出現したことにより、費用便益以外の基準をすべて満たす可能性が高いと考えられる。現在まだ臨床治験中のため薬価も定められていないため源氏手での判断は難しい。また、長期的な治療効果については知られておらず、今後の経過を注意深く見守るべきであると考えられる。

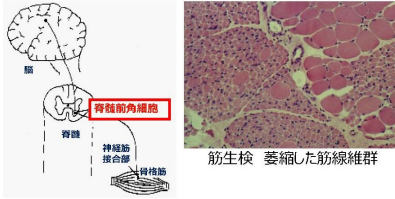
E．結論

新たな NBS 対象疾患として、脊髄性筋萎縮症（SMA）の可能性を検討した。現在はまだ治療薬が治験段階であるが、将来的に有力な候補疾患と考えられた。

脊髄性筋萎縮症

(spinal muscular atrophy: SMA)

脊髄前角細胞の変性による
筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする下位運動ニューロン病
I型は乳児期に呼吸不全で死亡
II型は生涯歩行不可能
III型は歩行機能喪失



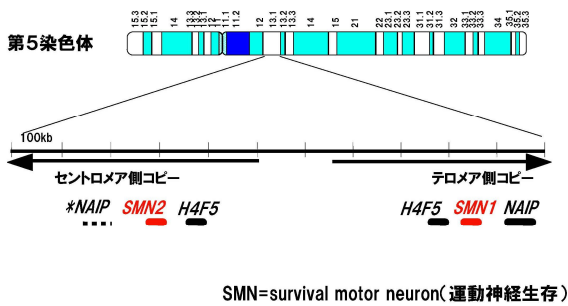
SMAの分類

| 型 | 発症 | 最高到達運動機能 |
|---------------|------------------------------|--------------------|
| 0 超重症 | 胎児期 | |
| I 重症 | 0-6m Werdnig-Hoffmann 病 | Never sit |
| II 中間 | <18m Dubowitz病 | Never stand |
| III 軽症 | 18m< Kugelberg-Welander 病 | Stand & walk alone |
| IV 成人型 | 20y< | |

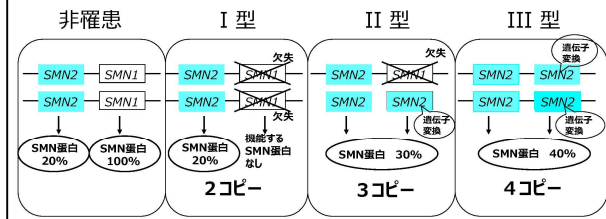
国際SMA協会,1992

SMAの遺伝子=SMN遺伝子

フランス: Lefebvre と Melki, 1995



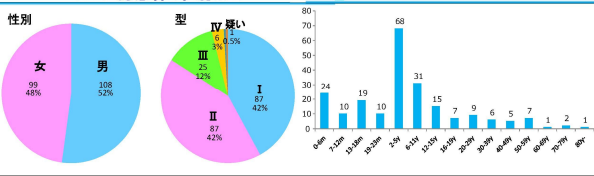
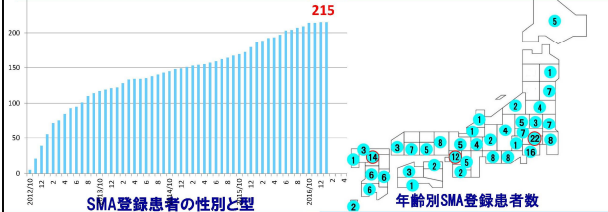
SMAにおける型とSMN2遺伝子コピー数



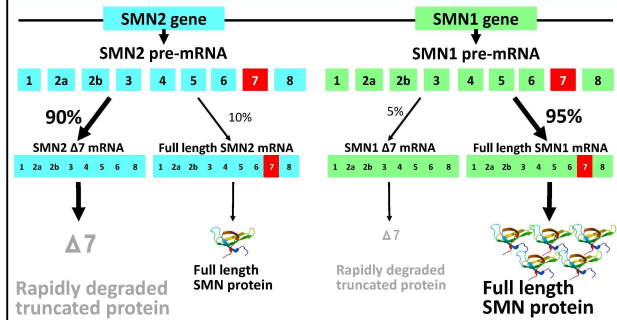
SMN2のコピー数の増加は臨床症状の軽減化につながる

Wirth, et al.2006を改変

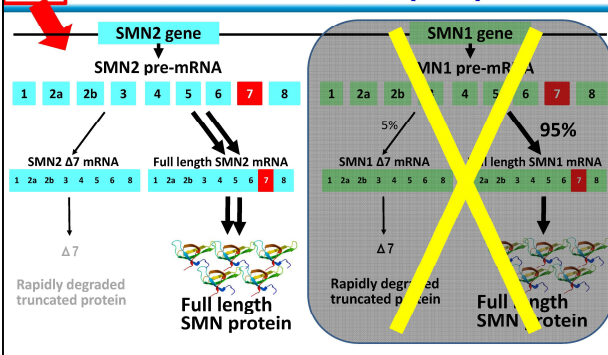
月別SMA登録患者数 2016年12月現在



難病の新規治療開発 脊髄性筋萎縮症のゲノム治療 SMN蛋白質の産生



難病の新規治療開発 脊髄性筋萎縮症のゲノム治療 SMAにおけるアンセンス核酸薬(AON)治療



小児SMAに対するIONIS-SMNの有効性と安全性評価 国際共同治験(CS3b, CS4)

15 countries, 36 study locations



Japan

Tokyo Women's Medical University

Tokyo, Tokyo Metropolitan Prefecture, Japan

Contact: 81-3-3353-8111

Principal Investigator: Kayoko Saito, MD

Hyogo College of Medicine

Nishinomya-shi, Hyogo, Japan

Contact: 81-798-45-6006

Principal Investigator: Yasuhiro Takeshima, MD



小児SMAに対するIONIS-SMNの有効性と安全性評価 国際共同治験 (CS3b, CS4)

15 countries, 36 study locations

Japan

Tokyo Women's Medical University

Tokyo, Tokyo Metropolitan Prefecture, Japan

Contact: 81-3-3353-8111

Principal Investigator: Kayoko Saito, MD

Hyogo College of Medicine

Nishinomya-shi, Hyogo, Japan

Contact: 81-798-45-6006

Principal Investigator: Yasuhiro Takeshima, MD



Labouring to breathe and near death as a baby, Cameron Harding, nearly 3, receives a drug that keeps his motor neurons alive, allowing him significant muscle movement.

BIOMEDICINE

Antisense rescues babies from killer disease

Spinal muscular atrophy drug may herald treatments for other genetic brain illnesses

SCIENCE sciencemag.org

16 DECEMBER 2016 • VOL 354 ISSUE 6315

sciencemag.org on December 16, 2016

Publications highlight robustness of test and need for SMA newborn screening

Clinical Chemistry 61:2
412-419 (2015)

Molecular Diagnostics and Genetics

Newborn Blood Spot Screening Test Using Multiplexed Real-Time PCR to Simultaneously Screen for Spinal Muscular Atrophy and Severe Combined Immunodeficiency

Jennifer L. Taylor,¹ Francis K. Lee,^{1*} Gauri Khushnood Vaidyanathan,¹ John F. Stangor,¹ Mei Liu,² John P. Carulli,³ Chao Sun,⁴ Steven F. Dibrovski,⁵ W. Harry Hannon,⁶ and Robert F. Vogt¹

Available in PubMed Central

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

ELSEVIER

Newborn screening for spinal muscular atrophy: Anticipating an imminent need

Han C. Phan, MD^{1,*}, Jennifer L. Taylor, PhD², Harry Hannon, PhD³, and Rodney Howell, MD, FAAP, FAACOG⁴

¹Department of Pediatrics, Emory University, Atlanta, GA

²Research Scientist, Atlanta, GA

³Neonatal Screening Laboratory, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA

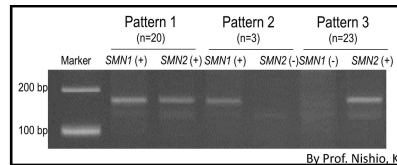
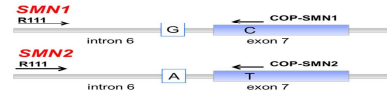
⁴Sandler School of Medicine, University of Miami, Miami, FL

Competitive oligonucleotide priming PCR (COP-PCR)

Kato N et al. Kobe J Med Sci 2014;60:E78-E85.

SMA screening system using dried blood spots on filter paper:

Application of COP-PCR to the SMN1 deletion test

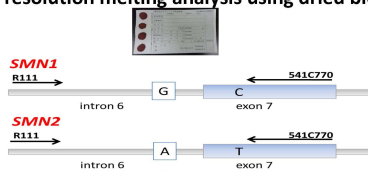


By Prof. Nishio, Kobe University

High-Resolution Melting Analysis

Sa'adah N, et al. Clin Lab 2015;61(5-6):575-80.

A Rapid, accurate and simple screening method for spinal muscular atrophy: high-resolution melting analysis using dried blood spots on filter paper.



Real-time PCR

By Prof. Nishio, Kobe University

まとめ

- 乳児期発症のSMA患者対象の国際共同治験第3相中間解析において規定の主要評価項目を達成した。
- nusinersenの投与乳児の運動機能評価において、治療を受けなかった群に比べて統計的に有意な改善を示した。
- SMAにおける新生児マススクリーニング実施、早期治療介入により、SMAの予後を改善する可能性を示唆する。

分担研究課題

治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究

研究分担者 大浦敏博（東北大学小児科非常勤講師・仙台市立病院副院長）

研究要旨

米国では先天代謝異常症の治療に用いられる食品はメディカル・フードとして承認され、医療保険や償還の対象となる。しかし、その対象疾患、適応範囲は州によって異なっている。乳児用治療乳は多くの州で給付の対象となっているが、低たんぱく食品は適応外となっている州が少なからずあるのが問題となっている。患者家族の自己負担金の割合が多いのも低たんぱく食品であった。我が国では乳児用治療乳（特殊ミルク）は医薬品と登録品に2分されているが、将来的にはメディカル・フードとして一括して、医師の処方箋で購入できるようにすべきである。低たんぱく食品は高額であり、患者の経済的負担を軽減する対策が必要である。

A．研究目的

1953年ビッケルらはフェニルケトン尿症（PKU）の患児にフェニルアラニン制限食を実施し、その重篤な症状が改善することを初めて報告した。その後、他のアミノ酸・有機酸代謝異常症などにおいても食事療法が有効であることが明らかにされ、食事療法は先天代謝異常症の治療法の一つとして認められるようになった。食事療法の基本は自然たんぱく質の摂取を制限し、有害となる栄養成分を除去した特殊ミルクと低たんぱく食品を用いて不足分の栄養素を賄う治療法である。先天代謝異常症の食事療法に用いる食品は米国ではメディカル・フードとして提供され、医療保険や償還制度の対象となっているが、州ごとに適応が異なっている。今回、米国のメディカル・フードの供給と経済的支援制度、患者負担について調査を行い、我が国での医療用食品の安定供給に向けて政策提言に資する比較研究を行う。

B．研究方法

資料による文献調査を行う。

（倫理面への配慮）

該当しない。

C．研究結果

1．メディカル・フードとその規制管理について
米国ではメディカル・フード（Medical Food；医療食）というカテゴリーがある[1]。メディカル・フードとは「医師の指示の下に、経口もしくは経腸的に投与されるように処方された食品で、科学的に明らかにされた原則に基づき、栄養学的必要性が医学的評価により立証された疾患や病状に対して、特定の栄養管理を行うための食品」と定義される。その起源は、1941年に米国食品医薬品局（FDA；Food and Drug Administration）が栄養素の強化食品を区別するために設置した「特別用途食品 Foods for Special Dietary Use（FSDU）」の制度化に遡る。メディカル・フードは1972年以前には「薬品」として位置付けられていたが、その食品開発を促進させるために1972年に「特別用途食品」として定義づけられることになった。1983年には、希少疾病を治療する薬品の開発・商品化を促進させる目的で「希少疾病医薬品法（Orphan Drug Act）」が制定された。1988年に希少医薬品法は改正され、メディカル・フードは「特別用途食品」ではなく、正式に上記の定義が採用され、「稀少疾患用医療食品」の一部として扱われるようになった。表1にメディカル・フードと医薬品の相違点を列挙した[2]

表1. 米国のメディカル・フードと医薬品の相違点

| 分類 | メディカルフード | 医薬品 |
|-------|------------------------|--|
| 管理規制 | Orphan Drug Act (1988) | Federal Food, Drug and Cosmetic Act (1977) |
| 対象者 | 患者 | 患者 |
| 成分 | 栄養成分（普通食には含まれない） | 多くは合成品、栄養成分にもなり得る |
| 製品基準 | 食事療法上の必要性 | 患者にとって安全かつ有効 |
| 安全基準 | 食品成分としての安全性 | FDAによる承認が必要 |
| 科学的要件 | 臨床的妥当性、専門家による評価 | 臨床前及びⅠ、Ⅱ、Ⅲ相臨床試験が必要 |
| 医師の指示 | 必要 | 必要（医師の処方箋） |
| 投薬 | 経口もしくは経腸的 | すべての投与方法 |
| 販売 | 病院、薬局 | 病院、薬局 |

Morgan SL et al. Nutr Rev 2006; 64 (11): 495-501より一部改変

1歳以降の小児や成人に用いられるメディカル・フードは特定の病状を治療することが目的であるため、Nutrition Labeling and Education Act of 1990（栄養表示と栄養教育に関する法令）で義務付けられる nutrition labeling（栄養表示）、health claims（健康強調表示）や nutrient content claims（栄養素成分含有表示）は免除されている。しかしメディカル・フードは Good Manufacturing Practices（医薬品適正製造基準）の要件を準拠しなくてはならない。低たんぱく食品などのメディカル・フード（乳児用粉乳は除外）は市販前の審査は必要なく、FDAに登録する必要はない。すべての食品製造業者と同じく、メディカル・フードを製造するメーカーはFDAに登録し、FDAの検閲を受けなくてはならない[3]

一方、先天代謝異常症等の治療に用いられる乳児用調製粉乳はFDAにより規制され、exempt infant formula（例外乳児用調製乳）として分類されている。例外乳児用調製乳とは先天代謝異常症、低出生体重児や医学的、栄養学的に問題のある乳児向けの調製乳である。乳業メーカーはその粉乳が治療の対象としている病状の詳細な記載、一般調製粉乳と異なっている理論的根拠、使用の対象となる特定の疾患名を示さなくて

はいけない。新規の例外乳児用調製乳は市販の90日前にメーカーからFDAに通知することが義務付けられている[3]

2. メディカル・フードの種類

メディカル・フードは、広義には有害なアミノ酸を除去したたんぱく質（アミノ酸）を含む食品（メディカル・フォーミュラなど）と通常の食品の代替物として用いる低たんぱく食品に大別される（表2）。の代表的食品はPKUに用いるフェニルアラニン除去ミルクであり、一般的に小売店では市販されていない。は低たんぱくの米や小麦粉、パン、パスタなどである。米国ではアミノ酸、ビタミン、カルニチンなどもdietary supplements（栄養補助食品）としてメディカル・フードに含まれるが本稿では言及しない。表3に米国で市販されているメディカル・フォーミュラの製造業者リストを示す。我が国との大きな違いは乳児用粉乳以外にも、1歳以降、小児や成人にも用いられる粉乳や、粉末・液状・棒状の様々なメディカル・フードがあることである[3]

表 2. 米国におけるメディカル・フードの種類

| |
|--|
| ① たんぱく代替食品 (medical formulas, protein substitutes, medical protein) |
| a. 乳児用 |
| 有害なアミノ酸を除去したたんぱく質 (アミノ酸) を含む食品。多くは成長と発達に必要なすべての栄養素を含有する (PKU に対するフェニルアラニン除去ミルクなど)。 |
| b. 1 歳以降～青年期・成人用 |
| i. 有害な栄養成分を除去し、他の必要な栄養成分を含む食品 |
| ・水、ジュースなどに溶かして用いる粉末製品や粉乳 |
| ・そのまま飲める液状の製品 |
| ・棒状の製品 (Bar) |
| ii. 個別の成分からなる食品 |
| ・有害なアミノ酸を除去したアミノ酸混合末、錠剤、Bar、スポーツ飲料 |
| ・ビタミン、微量元素製剤 |
| ・中鎖脂肪酸 (液体、粉末) |
| ② 低たんぱく食品 (modified low protein foods) |
| ・離乳期以降の乳児から成人まですべての年齢層の先天代謝異常症に用いられる |
| ・通常の食品の代替物として用いるたんぱく質含量の少ない食品 |
| ・小麦粉、シリアルやパン、クッキー、クラッカー、ピザ生地などオーブンで焼いた食品、ピーナッツバター、肉やチーズの代替え食品、パスタ、米などがある |

3. 供給体制

米国では先天代謝異常症に用いられるメディカル・フードの医療保険の適応に関して統一した補償の範囲は決められておらず、州によって様々である。Patient Protection and Affordable Care Act (患者保護並びに医療費負担適正化法) は費用分担なしに医療保障政策に新生児スクリーニング事業を含むよう義務付けているが、国の政策は治療に関する費用については義務づけていない [3]。全米 50 州のうち、先天代謝異常症に用いるメディカル・フードに対する保険適応を法的に義務付けているのは 38 州だけである [4][5]。これらの州では、法律を制定し医療保険によりメディカル・フードの費用をカバーさせる制度を作っている。しかし、適応範囲に関する政策は州によって異なり、例外や除外規定も存在する。適応疾患として PKU のみを対象としているのが 6 州、PKU 以外にもいくつかの先天代謝異常症を対象に含めているのが 16 州、すべての先天代謝異常症を対象としているのは 16 州であった [5]。また、18 州では成人患者への適応がない [4]。メディカル・フードを管轄する法的制度を持っている州のほとんどで乳児用治療乳 (メディカル・フォーミュラ) は医療保険の対象とされているが、低たんぱく食品が保険適応となっているのは 3/4 の

州にすぎない。また、一部の州では新生児スクリーニングプログラムの一環としてメディカル・フードへの支払い、提供を行っている。

メディカル・フードの法的義務付けを承認していない 12 州では低所得者に対する公的医療保険である Medicaid (メディケイド) を通じてか、もしくは州の他の専用財源を用いて通常 PKU の治療に対してのみ支援を行っている。これらの州では低たんぱく食品に対する保険適応や償還は認めていない。

米国のメディカル・フードに対する医療保険・償還制度は、州ごとの不均一な適応範囲、思春期以降の患者に対する給付の停止、妊娠中の治療に対する補償の拒否、メディカル・フードの種類による適応の制限、さらには支給額に上限を設定するなど継ぎはぎ細工になっているのが現状である [3]。

4. 患者・家族が必要としている医療用品

Berry らはメディカル・フードを使用している 305 名の 18 歳未満の先天代謝異常症患児の両親を対象に、メディカル・フードの種類、購入先、医療保険の種類と適応範囲、自己負担分 (out of pocket, OOP) についてアンケート調査を行った [6]。この論文では医療用品をメディカル・フ

ード（特定の有害な栄養成分を除去した食品；乳児用粉乳、粉末、bar など）、低たんぱく食品（modified low-protein foods；低たんぱくパン、パスタなど）、栄養補助食品（dietary supplements）、乳幼児用給餌用品（feeding supplies）と分類している。

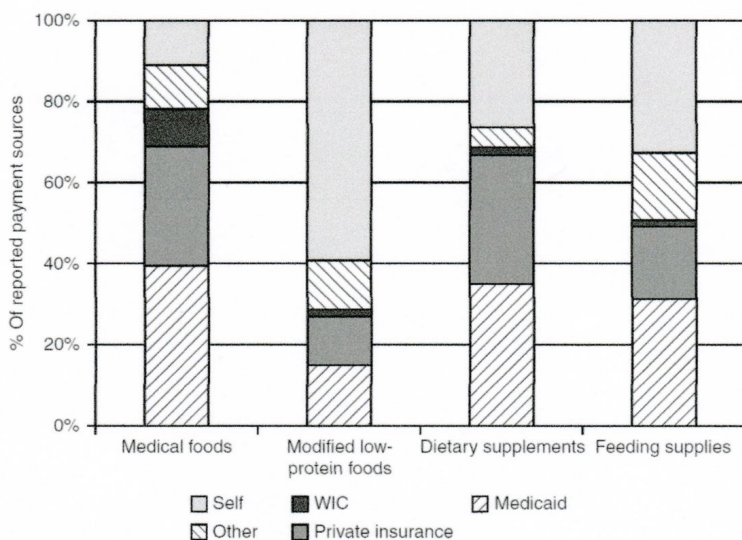
医療保険の加入状況では305名中3家族のみが加入していなかった。25%は医療保険による補償を受けるため複数の資金源を保有していた。メディケイド（55%が加入）と民間医療保険（52%が加入）が、部分的にもしくは全額補償される医療保険の一般的な資金源であった。

医療用品の購入先については、使用する製品ごとに様々なルートで購入していることが明らかとなった。メディカル・フードに関しては、薬局（34%）、病院・診療所（18%）、保健局（14%）、医療用品販売店（12%）であった。栄養補助食品は2/3以上の家族が薬局から購入していた。対照的に低たんぱく食品は、41%がインターネット経由、16%が健康食品店、14%が直接製造業者から

購入していた。乳幼児の給餌用品の購入先に関しては薬局（32%）、医療用品販売店（17%）、診療所（18%）であった。

多くの患者は栄養療法のために複数のカテゴリーの製品を必要としている。305名の患者が必要としている製品をカテゴリー別に示すと、メディカル・フードが84%の患者で必要とされ、以下低たんぱく食品が59%、栄養補助食品が50%、乳幼児用給餌用品が50%であった。

図1にカテゴリー別に掛かった費用の支払い源を示した。メディケイドはメディカル・フードの40%、栄養補助食品の35%、給餌用品の31%をカバーしていることが分かる。民間医療保険もメディカル・フードの30%、栄養補助食品の32%をカバーしている。自己負担金に注目すると低たんぱく食品では60%が自己負担であった。その他のカテゴリーにおける自己負担の割合はメディカル・フード11%、栄養補助食品26%、給餌用品33%がとなっている。



Medicaid, 低所得者向け公的医療保険；WIC, 女性・乳幼児向け特別栄養補給支援制度

Berry SA et al. Genet Med. 2013; 15 (12):978-982

図1 医療用品別費用の支払い源の割合

5. 患者・家族の負担

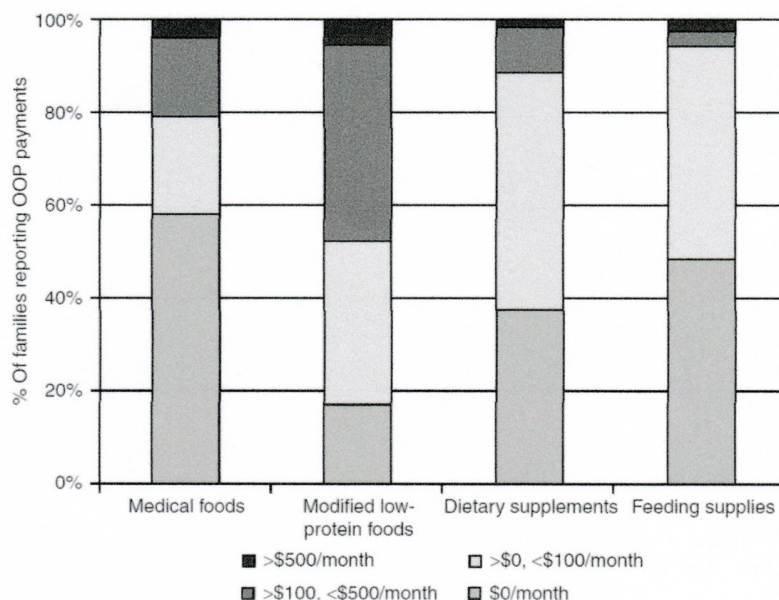
図2に1か月間に掛かる自己負担金の額を製品別に示した。1か月の出費額の中で自己負担金の割合が最も多いのは低たんぱく食品で、患者全体

の48%で月100ドル以上の自己負担となっている。以下、100ドル以上の自己負担の割合は、メディカル・フードで21%、栄養補助食品で11%、給餌用品で6%であった。また、月500ドル以上

の自己負担の割合は、メディカル・フードで4%、低たんぱく食品で5%、栄養補助食品で2%、給餌用品で3%であった。

米国では狭義のメディカル・フード（乳児用の治療用粉乳や離乳期以降のたんぱく質代替食品）や栄養補助食品は多くの場合医療保険の対象となっている。これらは先に示したように薬局や医

療機関など、医療施設から購入されることが多く、保険でカバーされやすい理由であると推測される。一方、低たんぱく食品に関しては未だ州により適応外であることが多く、その結果自己負担金が多い。購入先の多くがインターネット経由や製造業者など医療施設以外が多いことも保険適応になりにくい理由と推測される。



OOP, out of pocket (自己負担金)

Berry SA et al. Genet Med. 2013; 15 (12): 978-982

図 2. 医療用品別 1 か月間に掛かる自己負担金

D. 考察

米国では、先天代謝異常症の治療に必要な食品はメディカル・フードとして認められているが、対象となる疾患や医療保険・償還制度の適応範囲は州ごとに異なっている。乳児用の治療乳（medical formula）に対してはほとんどの州で給付の対象となっていることが明らかになったが、低たんぱく食品は未だ適応になっていない州も多く、大きな問題となっている。

我が国の先天代謝異常症用の治療乳は、2品目が医薬品として保険収載され、22品目は登録特殊ミルクとして特殊ミルク事務局より主治医に無料で提供されている。登録品の対象年齢が20歳未満という問題はあるが、医師の指示の元に患者に届けられる優れた方法であると言える。しか

し、離乳期以降に必要な低たんぱく食品の供給に関して公的補助はなく、全額患者の自己負担となっている。2009年にPKU親の会連絡協議会で行われた18歳以上の患者に対するアンケート調査によれば、低たんぱく食品に掛かる支出は回答者41名の内、18名(44%)が月10,001~20,000円、7名(17%)が20,001~40,000円、1名が40,001~60,000円であった[7]。米国でも低たんぱく食に関しては自己負担が多く、図1に示す様に支払い源の60%になっている。しかし、残り40%の支払いは医療保険でカバーされている訳で、我が国でも今後治療に必要な低たんぱく食品も医療保険や償還制度の対象とすべきであると考えられる。

米国ではメディカル・フードとして1歳以降の

たんぱく代替食品として粉末、液状、棒状の製品が存在している。さらに治療用粉乳についても乳児用のみではなく、小児用、成人用と年齢別の治療乳が開発されている（表 3）。年齢により必要エネルギー、たんぱく摂取量も変化することを考えれば、合理的な製品であると言える。食事療法

は年長児になるに従って、コンプライアンスが不良となりやすい。たんぱく代替食品や低たんぱく食品の選択肢が増えることは、コンプライアンス向上にも役立つと考えられ、我が国でも開発されることが望ましい。

表 3. 米国のメデイカルフードと製造業者

| Company | Medical Foods with Protein | | |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---|
| | For Infants | For Children, Adolescents, and Adults | Medical Foods Modified to be Low in Protein |
| Abbott Nutrition | ○ | ○ | |
| Applied Nutrition | | ○ | ○ |
| Cambrooke Foods, Inc. | | ○ | ○ |
| Dietary Specialties | | | ○ |
| Ener-G Foods, Inc | | | ○ |
| Mead Johnson Nutrition | ○ | ○ | |
| Nutricia, North America | ○ | ○ | ○ |
| PKU Perspectives | | ○ | ○ |
| Solace Nutrition | | ○ | |
| Taste Connection | | | ○ |
| Vitaflo | | ○ | ○ |

Camp KM et al. Mol Genet Metab. 2012; 107: 3-9

先天代謝異常症早期発見のための新生児スクリーニングは国際的に最も成功した公衆衛生事業である。我が国では 1977 年から国家事業として全国的に開始され、2011 年度からはタンデムマス法の導入により、対象疾患が拡大された。早期発見・早期治療により患児は障害を免れることが可能となったが、先天代謝異常症の多くは合併症を防ぐために、生涯治療を継続しなくてはならない。治療の基本は食事療法であり、20 歳以降も治療用粉乳（特殊ミルク）低たんぱく食を継続する必要がある。我が国の治療用特殊ミルクは医薬品と登録特殊ミルクに分けられているが、乳業メーカーの負担の大きさを考えると一括してメデイカル・フードとして承認し、医療保険で賄われるのが良いと考えられる [8]。その際、メデイカル・フードの規制は米国同様、医薬品として

ではなく、食品として行うべきであろう。低たんぱく食品は高額であり患者家族負担が大きい。今後、特殊ミルクの安定供給体制を構築するだけではなく、低たんぱく食などの医療用食品についても患者負担軽減策を講じるべきであろう。

E. 結論

米国では先天代謝異常症に用いる食品はメデイカル・フードとして認められ、その中でも乳児用治療乳はほとんどの州で医療保険の対象となっている。しかし、低たんぱく食品に対する保険適応は州によって異なり、問題となっている。我が国の乳児用治療乳は医薬品と登録品に 2 分されているが、将来的にはメデイカル・フードとして一括し、医師の処方箋で購入すべきであろう。さらに治療に不可欠な低たんぱく食品に対して

も、患者家族の経済的負担軽減策を講じる必要がある。

【参考文献】

- [1] 森臨太郎、大西香世．諸外国における特殊ミルクに関する経済的支援制度の比較研究．厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業（健やか次世代育成総合研究事業）「新生児マススクリーニングのコホート体制、支援体制、および精度向上に関する研究」．平成 26 年度総括・分担報告書（研究代表者 山口清次）：104 - 108 頁、平成 27 年 3 月．
- [2] Morgan SL et al. Medical Foods: Products for the Management of Chronic Diseases. *Nutr Rev* 2006 Nov; 64 (11): 495-501.
- [3] Camp KM et al. Nutritional Treatment for Inborn Errors of Metabolism: Indications, Regulations, and Availability of Medical Foods and Dietary Supplements Using Phenylketonuria as an Example. *Mol Genet Metab*. 2012 Sep; 107(1-2): 3-9.
- [4] 日本小児科連絡協議会栄養委員会 治療用ミルク安定供給ワーキンググループ委員会報告：特殊ミルク安定供給のためのワークショップ．日本小児科学会雑誌 第 117 巻（5 号）941 - 952 頁、2013 年．
- [5] Huntington K et al. Medical Food for Treatment of Inborn Errors of Metabolism and State Legislative Mandates. *Top Clin Nutr*. 2009; 24 (4): 289-306
- [6] Berry SA et al. Insurance coverage of medical foods for treatment of inherited metabolic disorders. *Genet Med*. 2013 Dec; 15(12): 978-982.
- [7] 大浦敏博．患者の QOL 向上に関する研究．厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業．タンデムマス導入による新生児マススクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究．平成 23 年度総括・分担研究報告書（研究代表者 山口清次）：87-89 頁、平成 24（2012）年 3 月．
- [8] 大浦敏博．治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究．厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業．新生児マススクリーニングのコホート体制、支援体制、および精度向上に関する研究．平成 27 年度総括・分担研究報告書（研究代表者 山口清次）：121 - 129 頁、平成 28（2016）年 3 月．

F．健康危険情報

なし。

G．研究発表

1．論文発表

- 1) 大浦敏博．治療用特殊ミルクの現状と安定供給上の課題．日本マススクリーニング学会誌 第 26 巻（3 号）93-96 頁、2016 年．

2．学会発表

- 1) 大浦敏博．特殊ミルクの現状と安定供給上の課題．第 38 回日本臨床栄養学会総会/第 37 回日本臨床栄養協会総会（第 14 回大連合大会）大阪、2016 年 10 月 8 日．
- 2) 大浦敏博．先天代謝異常症と食事療法について～特殊ミルクの役割～．第 43 回日本マススクリーニング学会公開市民公開講座「こどもの夢を叶える健やかな成長を支えよう」札幌、2016 年 8 月 27 日
- 3) 大浦敏博．PKU～生涯にわたっての治療を考える～．第 58 回日本先天代謝異常学会スポンサーセミナー 東京、2016 年 10 月 28 日．

分担研究課題

治療用特殊ミルクの効率的運用に関する研究

研究分担者 大浦敏博（仙台市立病院 副院長）

日本人 PKU 患者の栄養状況について

研究協力者 岡野善行（おかのこどもクリニック 院長）

研究要旨

フェニルケトン尿症(PKU)の食事療法では、蛋白質の摂取を厳しく制限しながら、エネルギー量および三大栄養素、微量栄養素を健常者とほぼ等しく摂取することが求められている。今回、推奨蛋白量の 80%以上をフェニルアラニン(Phe)除去ミルクと A-1/MP-11 から得ている幼児から成人 PKU 患者の栄養評価では、推奨量のカロリーと蛋白質が摂取され、良好な血中 Phe 値が得られていた。しかしながら、Phe 除去ミルクに無添加のセレン、ビオチンの摂取量は推奨量/目安量のそれぞれ 25.0 と 18.1%と著明に少なく、有添加のマグネシウム、亜鉛、ヨウ素、リンにおいても 70～80%と摂取不足を認めた。エネルギーの 51%、炭水化物の 38%、脂質の 67%、蛋白質の 82% が Phe 除去ミルクと A-1 / MP-11 由来であった。微量元素、ビタミンでは、自然食品からは推奨量/目安量の 50%以下しか摂取できず、その多くを Phe 除去ミルクと MP-11 に依存していた。Phe 除去ミルク、A-1 / MP-11 は蛋白質を補充すると共に、脂質、微量元素、ビタミンを供給し、小児だけではなく成人 PKU 患者にも必要不可欠であることを示していた。血中セレンは PKU 患者では基準値より低下しており、血中 Phe 値の低い良好なコントロールの患者ほど血中セレンは低下していた。血中総カルニチン、尿中遊離ビオチンは基準値より低下している症例が多く、ビオチン不足で増加する尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸は基準値より増加していた。今回の栄養評価では、成人 PKU 患者での Phe 除去ミルクの栄養学的な重要性を認めるとともに、セレン、ビオチンの摂取不足と体液中での低下を明らかにした。Phe 除去ミルクへのセレン、ビオチン、カルニチンの添加と A-1、MP-11 の微量元素の組成について再検討の必要性を示唆している。

研究協力者

大浦敏博（仙台市立病院、副院長）

渡邊敏明（大阪青山大学、教授）

渡邊涼子（大阪青山大学、教授）

藤井里香（大阪府立大学、大学院生）

服部俊一（大阪市立大学附属病院、管理栄養士）

藤本浩毅（大阪市立大学附属病院、管理栄養士）

野井香梨（大阪市立大学附属病院、管理栄養士）

岡本美紀（おかのこどもクリニック、管理栄養士）

酒本和也（大阪市環境保健協会）

重松陽介（福井大学・客員教授）

竹島泰弘（兵庫医科大学、教授）

玉置知子（兵庫医科大学、名誉教授）

A．研究目的

フェニルケトン尿症（PKU）では学童から成人での治療の中断や不十分な治療により、高フェニルアラニン（Phe）血症による精神神経症状、行動異常、EEG や MRI の異常を来すことが報告されている。現在では良好な血中 Phe 値を生涯維持することが求められている。PKU の食事療法では、蛋白質の摂取を厳しく制限しながら、エネルギー

量および三大栄養素、微量元素の摂取を健康成人とほぼ等しくすることが目標となる。そのため、わが国では Phe 除去ミルク、Phe 除去アミノ酸粉末 (A-1) や低 Phe ペプチド粉末 (MP-11) が使用されている。

前年度では、古典型 PKU 患者の食事療法とその栄養バランスについて検討した。食事療法は 2010 年度版日本人の食事摂取基準をもとに、性別、年齢別の推奨蛋白量の 80-85%以上を Phe 除去代替物で補い、20%を自然蛋白から摂取することを原則とした。この食事療法では、摂取エネルギーは性別、年齢別の摂取基準の $100.6 \pm 18.4\%$ 、蛋白質は推奨量の $106.4 \pm 18.7\%$ 、Phe 摂取量は $9.8 \pm 2.2 \text{ mg/kg/day}$ で、蛋白・脂肪・炭水化物 (PFC) 比率は $9.5 : 23.9 : 66.6\%$ とやや低脂肪高炭水化物の傾向があったが、三大栄養素はほぼ推奨量等を満足しており、血中 Phe 値もほぼ良好に維持することができていた。しかしながら、微量元素とビタミンでは Phe 除去ミルクに添加されていないセレン、ビオチンは推奨量の 25.0%と 18.1%しか摂取できておらず、Phe 除去ミルクに添加されているマグネシウム、亜鉛、ヨウ素、リンは推奨量/目安量の 80%以下で摂取不足を認めていた。今年度は各栄養素の由来、すなわち、自然食品もしくは Phe 除去ミルク/ A-1/ MP-11 からの摂取量の割合を検討した。また、その摂取量が推奨量/目安量に比較して大幅に低下していたセレンとビオチン、そして、カルニチンについて PKU 患者で測定し、基準値と比較検討した。

B . 研究方法

栄養評価は前年度に報告したように、古典型 PKU と診断された患者 14 人 (男 9 人、4 才から 38 才) について、2010 年度版日本人の食事摂取基準をもとに、性別、年齢別の推定エネルギー必要量 (中程度身体活動レベル) と三大栄養素、微量元素、ビタミンを評価した。そして、三大栄

養素と微量元素、ビタミンの由来を検討した。血中 Phe の測定は濾紙血を用い、大阪市環境保健協会での新生児マススクリーニング測定システムであるタンデムマス法により定量的に測定した。遊離もしくは蛋白結合の血中、尿中ビオチンの測定はマイクロプレイトを用いた *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 によるマイクロバイオロジカルアッセイで測定した。尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸の測定は 2-nitrophenyl- hydrazine hydrochloride による誘導体化後、HPLC で測定した。血清セレンは LSI メディエンス (Tokyo) にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の栄養調査と栄養評価はフェニルケトン尿症の通常の臨床医療上、必要な範囲内で行われている。そして、ヘルシンキ宣言および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守して施行した。担当医師は、本試験の実施にあたっては倫理的な配慮と人権擁護へ十分な配慮を行い、試験内容について十分説明した上で、患者本人もしくは代諾者の同意を得ている。同意後であっても、本人/代諾者の意思によりいつでも中止が可能で、参加中止に伴う不利益は受けない。また、個人が同定できる形ではいかなる状況においても公表しないと説明している。

C . 研究結果

1 . 摂取カロリーと三大栄養素の由来

各栄養素の由来では、摂取エネルギーの $49.4 \pm 8.9\%$ が Phe 除去ミルクと A-1 / MP-11 から得られ、炭水化物で $37.7 \pm 10.2\%$ 、脂質で $66.7 \pm 9.7\%$ 、蛋白で $82.1 \pm 5.5\%$ が Phe 除去ミルクと A-1 / MP-11 から得られていた。

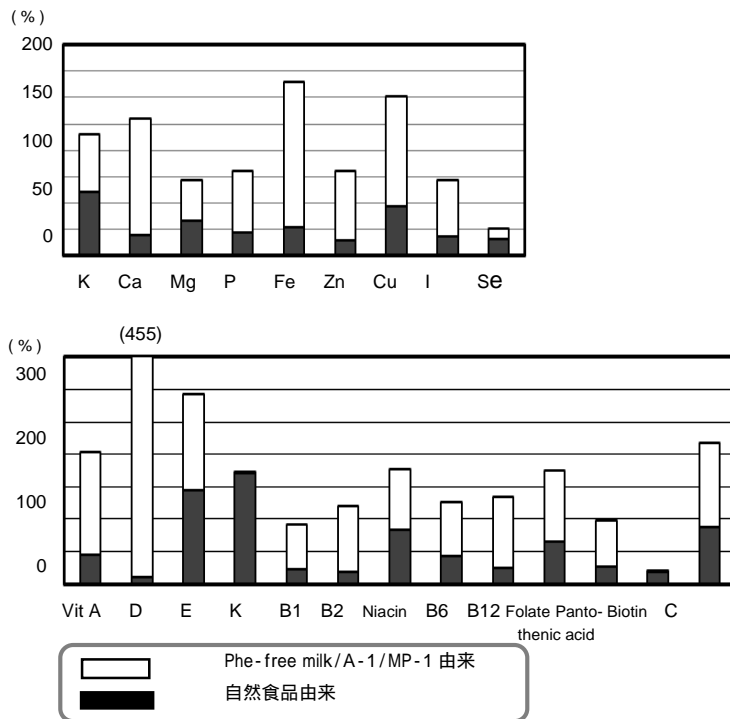


図 1. 微量元素とビタミンの推奨量/目安量に対する自然食品と Phe 除去ミルク/A-1/MP-11 からの摂取量

2. 日本人の食事摂取基準と微量元素とビタミン

微量元素とビタミンの摂取量を日本人の食事摂取基準（2010 版）の推奨量もしくは目安量と比較検討した（図 1）。微量元素では、幼児～成人の PKU 患者でセレンの摂取量が推奨量の $25.3 \pm 16.2\%$ と著明に低下しており、マグネシウム（ $71.5 \pm 19.0\%$ ）、亜鉛（ $79.5 \pm 21.0\%$ ）、ヨウ素（ $71.0 \pm 17.5\%$ ）の摂取量が推奨量の 80% 以下に、リン（ $79.7 \pm 16.0\%$ ）が目安量の 80% 以下に低下していた。ビタミンでは Phe 除去ミルクに添加されていないビオチンが推奨量の $18.1 \pm 13.5\%$ と著しい不足を生じていた。しかしながら、その他のビタミンでは全般的に食事摂取基準の推奨量もしくは目安量を満たしていた。また、耐容上限量を超えた患者はいなかった。微量元素とビタミン摂取の由来では、自然食品からは大部分の微量元素は推奨量もしくは目安量の 50% 以下にしかすぎず、その多くを Phe 除去ミルクと MP-11 から得ていた。

3. 体内セレンとビオチン量について（図 2）

血中セレン濃度を測定した PKU 患者 11 人全員がセレンの基準値（ $10.6-17.4 \mu\text{g/dl}$ ）より低下し、その平均値は $5.66 \pm 2.12 \mu\text{g/dl}$ であった。血中総ビオチン量と遊離ビオチン量は解析した 9 人の中で基準値（ $1.6-3.7 \text{ ng/ml}$ 、 $0.4-1.1 \text{ ng/ml}$ ）より低下していたのは、それぞれ 4 人と 2 人のみであった。しかしながら、尿中遊離ビオチンの測定では 9 人中 8 人で基準値（ $4.4-25 \mu\text{mol/mol creat}$ ）より低下し、その平均値は $1.48 \pm 1.66 \mu\text{mol/mol creat}$ であった。ビオチンの欠乏により上昇する尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸は測定した PKU 患者全員で基準値（ $3.3-12.0 \text{ nmol/mol creat}$ ）より増加していた。

D. 考察

PKU の食事療法は繊細さが要求されるそして困難な治療法の一つである。PKU 患者に根源的な欲求であり楽しみのひとつである食事を制限する必要があるため、患者のコンプライアンスによってコントロールに大きな差ができる。

今回、年齢・性別相当の推奨エネルギー量と推

奨蛋白質量の 80% - 85% 以上を自然蛋白質の代わりに Phe 除去アミノ酸代替物で摂取することを指導した。14 名の PKU 患者のうち 1 人を除いてほぼ目標とする血中 Phe 値 (10 mg/dl 以下) を達成することができていた。その PKU 患者の栄養評価では摂取エネルギーの約 50% を Phe 除去ミルクと A-1/MP-11 から得ている。炭水化物では摂取量の 62% が自然食品由来であるのに対し、蛋白質では 18%、脂質では 33% にすぎない。すなわち、幼児から成人の PKU 患者では、蛋白質のみならず脂質も主に Phe 除去ミルクから供給されており、Phe 除去ミルクは Phe 除去蛋白質を補うのみならず、

低脂肪を補うためにも必要である。

一般の市販調整粉乳では牛乳を原料として使用することから、これらの原料由来の微量成分が含まれている。一方、Phe 除去ミルクでは精製原料 (アミノ酸粉末など) を使用することが多く、そのため、乳児に必要とされている量のビタミンやミネラルなどの微量元素を添加している。しかしながら、ビオチン、セレン、カルニチンなどの微量成分については食品添加物として調整粉乳への添加が日本では認められていなかったために、Phe 除去ミルク、A-1、MP-11 には含まれていない。(ビオチンは 2014 年に、セレンは 2016 年

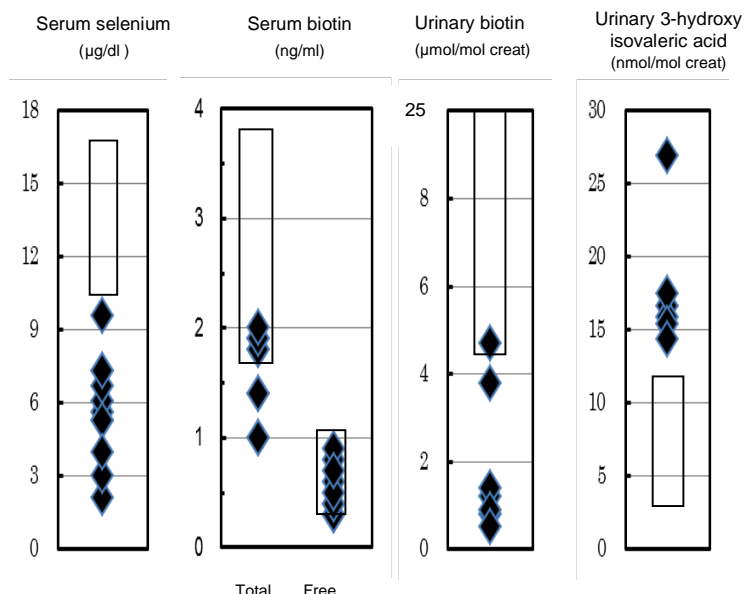


図 2 . PKU 患者の血中セレン、血中総/遊離ビオチン量、尿中遊離ビオチン量、尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸量

にその制限はなくなった。Phe 除去ミルク、A-1/MP-11 には現在も無添加である)。乳児期の PKU 患者ではビオチン、セレンは母乳や一般粉乳から供給される。しかしながら、幼児から成人 PKU 患者では高蛋白質食品に多く含まれるセレン、ビオチンは低蛋白食療法のため、著しい低下を来している。

今回の栄養評価の結果では、4 才から成人までのすべての年代にわたってビオチンの摂取量は推奨量の $18.1 \pm 13.5\%$ と低下していた。PKU 患者での血中、尿中ビオチンの測定では、血中での総ビオチン、遊離ビオチンの低下は明らかではなかつた。

しかしながら、尿中の遊離ビオチンは著明に低下しており、しかも、ビオチン依存性酵素である 3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ活性も低下し、尿中 3-ヒドロキシイソ吉草酸の増加が認められた。すなわち、PKU 患者ではビオチン摂取量の低下による体内ビオチン不足を生じていた。ビオチン欠乏症では食欲不振、皮膚の乾燥、びらん、脱毛、運動失調、筋緊張低下、発育遅延など様々な症状を呈する。わが国では調製粉乳にビオチンの添加が認められていなかったことから、アレルギー用ミルクや先天代謝異常症用ミルクの使用により、ビオチン欠乏症による皮

膚症状、脱毛などの症状が報告されている。PKU 患者においても頑固な皮疹がビオチンの投与により軽快した症例が経験されている。ビオチン欠乏症は、催奇形性に関与しているという報告もなされている。妊娠を希望する成人期の女性 PKU 患者は母性フェニルケトン尿症の発症予防のために、より厳格な一般蛋白の制限されることから、ビオチン欠乏症による催奇形性について留意する必要がある。Phe 除去ミルクにビオチンを早急に添加する必要がある。

セレンは必須微量元素であり、魚介類、肉類、穀物、卵などに含まれており、通常の食生活をしている日本人では欠乏は生じない。しかしながら、低蛋白食療法を行う PKU 患者では血中 Phe の低下が報告され、長期の経静脈栄養や経腸栄養施行患者ではセレン欠乏症が報告されている。今回の栄養評価では、4 才から成人のすべての年代にわたってセレンの摂取量は推奨量の $25.3 \pm 16.2\%$ と低下している。また、PKU 患者の血中セレン濃度の測定では基準値を大幅に下回っており、セレン摂取量の不足によるものと考えられた。

セレン欠乏症の症状は心筋障害、不整脈や心筋症による心不全をはじめ、皮膚症状、筋症状、毛髪の変化などが一般的に報告されているが、PKU 患者での症状の発現はまれである。セレン摂取量の低下と血中濃度の低下は thyroxine の血中濃度の上昇、glutathione peroxidase 活性低下による酸化ストレス状態をもたらすと報告されている。PKU 患者の種々の酸化ストレスマーカーによる評価では酸化ストレス状態にあることが強く示唆されている。そして、セレン補充を行った PKU 患者では glutathione peroxidase 活性の回復と酸化ストレスマーカーの改善が明らかにされている。また、母性 PKU ではより低い血中 Phe 値でコントロールするために、より強い蛋白制限食となり、血中セレン濃度の低下が著しいことが指摘されている。

今回の分析結果では、ほとんどの微量元素で自然食品からの供給は 50%以下に留まり、Phe 除去ミルク、A-1/MP-11 からの供給に大きく依存して

いる。ビタミン類はビオチンを除いて、Phe 除去ミルクに豊富に含まれているため、自然食品からの供給不足を十分に補っている。すなわち、PKU 患者では微量元素、ビタミンの摂取を Phe 除去ミルクと MP-11 におおきく依存しており、小児だけではなく成人 PKU 患者にも Phe 除去ミルクと MP-11 は必要不可欠であることを示していた。そして、その組成を最適にすることは非常に重要である。

Phe 除去ミルクは新生児から乳児期に、母乳もしくは一般粉乳と併用されることを前提にして、その栄養素が構成されているミルクである。そのため、離乳後の幼児から成人 PKU 患者の食事療法に対して、Phe 除去ミルク単独では良好な栄養状況を達成できるとは言えない。近年、海外では Phe 除去ミルク以外に幼児～学童用や成人用のアミノ酸代替物が作製されており、微量元素、ビタミン類を補強添加されていることが多い。また、サプリメントとして別に供給され、栄養学的に良好な改善を認めている。

E．結論

今回の患者の栄養評価では、Phe 除去ミルク、A-1 / MP-11 は蛋白質を補充すると共に、脂質、微量元素、ビタミンを供給し、小児だけではなく成人 PKU 患者にも必要不可欠であることを示していた。微量元素、ビタミンでは患者のビオチン、セレンの摂取不足と体液での低下は著しく、早急に Phe 除去ミルクに添加される必要がある。もしくは、薬剤、サプリメントとして投与されるべきである。マグネシウム、リン、ヨウ素、亜鉛の微量元素についても MP-11 もしくは A-1 の組成を見直し、補充強化される必要がある。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

1) Okano Y, Hattori T, Fujimoto H, Noi K, Okamoto M, Watanabe T, Watanabe R, Fujii R, Tamaoki T.; Nutritional status of patients with phenylketonuria in Japan. Mol Genet Metab Rep. 8:103-110 (2016).

2 . 学会発表

1) 岡野善行、渡邊敏明、渡邊涼子、藤井里香、服部俊一、藤本浩毅、野井香梨、岡本美紀；フェニルケトン尿症患者の栄養評価と体液中セレン、

カルニチン、ピオチン、3-ヒドロキシイソ吉草酸について .第 58 回 日本先天代謝異常学会、東京、2016 年 10 月 27 日～29 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|---------------|-------|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|---|---------|---------|------|
| Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Takahashi T, Purevsuren J, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Ohkubo T, Yokota T, Watanabe M, Tsunemi T, Mizusawa H, Takuma H, Shioya A, Ishii A, Tamaoka A, Shigematsu Y, Sugie H, Yamaguchi S | Clinical, biochemical and molecular investigation of adult-onset glutaric acidemia type II: Characteristics in comparison with pediatric cases | Brain & Development | 38(3) | 293-301 | 2016 |
| Takahashi T, Hasegawa Y, Yamada K, Bo R, Kobayashi H, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S | Metabolic survey of hidden inherited metabolic diseases in children with apparent life-threatening event (ALTE) or sudden unexpected death in infancy (SUDI) by analyses of organic acids and acylcarnitines using mass spectrometries | Shimane Journal of Medical Science | 32(2) | 61-68 | 2016 |
| Yamamoto F, Nakamagoe K, Yamada K, Ishii A, Furuta J, Yamaguchi S | A case of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with novel compound heterozygous mutations | Journal of the Neurological Sciences | 368(15) | 165-167 | 2016 |
| Purevsuren J, Bolorma B, Narantsetseg C, Batsolongo R, Enkhchimeg O, Bayalag M, Hasegawa Y, Shintaku H, Yamaguchi S | The first Mongolian cases of phenylketonuria in selective screening of inborn errors of metabolism | Molecular Genetics and Metabolism Reports | 9 | 71-74 | 2016 |
| Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Purevsuren J, Mushimoto Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S | Efficacy of bezafibrate on fibroblasts of glutaric acidemia type II patients evaluated using an in vitro probe acylcarnitine assay | Brain & Development | 39(1) | 48-57 | 2017 |
| 山口清次 | . テクノロジーの進歩 タンデムマス・スクリーニング | 小児科診療 | 79(6) | 745-752 | 2016 |
| 山口清次 | 周産期領域の新しい検査法 新生児編 タンデムマス | 周産期医学 | 46(6) | 800-801 | 2016 |
| Hara K, Tajima G, Okada S, et al. | Significance of ACADM mutations identified from newborn screening of MCAD deficiency in Japan. | Mol Genet Metab | 118 (1) | 9-14 | 2016 |
| Tajima G, Hara K, Tsumura M, et al. | Screening of MCAD deficiency in Japan: 16 years' experience of enzymatic and genetic evaluation | Mol Genet Metab | 119 (4) | 322-328 | 2016 |
| 但馬剛, 原圭一, 津村弥来, 香川礼子, 岡田賢, 栢田紗季, 森岡千代美, 吉井千代子, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介 | CPT-2 欠損症の新生児スクリーニング: 偽陰性発症例の経験と新たな指標による診断体制の構築 | 特殊ミルク情報 | 52 | 16-22 | 2016 |
| 重松陽介 | 質量分析法による新生児マススクリーニングの実相 | J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. | 64 | 1-5 | 2016 |

| | | | | | |
|--|--|--|---------|----------|------|
| Tajima G, Hara K, Tsumura M, et al. | Screening of MCAD deficiency in Japan: 16years' experience of enzymatic and genetic evaluation | Mol Genet Metab | 119 | 322-328 | 2016 |
| Deswal S, Bijarnia-Mahay S, Manocha V, et al. | Primary carnitine deficiency - A rare treatable cause of cardiomyopathy and massive hepatomegaly. | Indian J Pediatr | 53 | 914-916 | 2016 |
| Akagawa S, Fukao T, Akagawa Y, et al. | Japanese male siblings with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-Co A dehydrogenase deficiency (HSD10 Disease) without neurological regression. | JIMD Rep | Epub | | 2016 |
| Hara K, Tajima G, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M | Significance of <i>ACADM</i> mutations identified from newborn screening of MCAD deficiency in Japan | Mol Genet Metab | 118 (1) | 9-14 | 2016 |
| Gupta D, Bijarnia-Mahay S, Kohli S, Saxena R, Dua Puri R, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Sakamoto O, Gupta N, Kabra M, Thakur S, Deb R, Verma I-C | Seventeen Novel Mutations in PCCA and PCCB Genes in Indian Propionic Acidemia Patients, and Their Outcomes | Genetic Testing and Molecular Biomarkers | 20 (7) | 373-382 | 2016 |
| Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T | A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. | Am J Med Genet A | 167A(2) | 407-11 | 2015 |
| Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T | Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis | Dig Dis Sci | 60(5) | 1297-307 | 2015 |
| Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. | Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. | Hum Reprod | 30(3) | 499-506 | 2015 |
| Suzuki E, Izumi Y, Chiba Y, Horikawa R, Matsubara Y, Tanaka M, Ogata T, Fukami M, Naiki Y | Loss-of-function SOX10 mutation in a patient with Kallmann syndrome, hearing loss, and iris hypopigmentation | Horm Res Paediatr | 84 | 212-216 | 2015 |
| Nakano E, Geisz A, Masamune A, Niihori T, Hamada S, Kume K, Kakuta Y, Aoki Y, Matsubara Y, Ebert K, Ludwig M, Braun M, Groneberg DA, Shimosegawa T, Sahin-Tóth M, Witt H | Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis. | Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol | 309(8) | G688-94 | 2015 |
| Aoki Y, Niihori T, Inoue SI, Matsubara Y | Recent advances in RASopathies. | J Hum Genet | 61(1) | Sep-33 | 2016 |
| Shima H, Tanaka T, Kamimaki T, Dateki S, Muroya K, Horikawa R, Kanno J, Adachi M, Naiki Y, Tanaka H, Mabe H, Yagasaki H, Kure S, Matsubara Y, Tajima T, Kashimada K, Ishii T, Asakura Y, Fujiwara I, Soneda S, Nagasaki K, Hamajima T, Kanzaki S, Jinno T, Ogata T, Fukami M | Japanese SHOX study group. Systematic molecular analyses of SHOX in Japanese patients with idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis | J Hum Genet | 61(7) | 585-91 | 2016 |

| | | | | | |
|---|--|---------------------|--|---------|------|
| Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saito H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F | Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. | J Hum Genet | 61(6) | 547-53 | 2016 |
| Miyake H, Yamada S, Fujii Y, Sawai H, Arimori N, Yamanouchi Y, Ozasa Y, Kanai M, Sago H, Sekizawa A, Takada F, Masuzaki H, Matsubara Y, Hirahara F, Kugu K | Nationwide survey for current clinical status of amniocentesis and maternal serum marker test in Japan | J Hum Genet | doi: 10.1038/jhg.2016.67 [Epub ahead of print] | | 2016 |
| 大浦敏博、岡野善行、坂本修 | シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症の臨床像・診断と治療・フォローアップの留意点 | 特殊ミルク情報 | 51 | 6~11 | 2015 |
| 大浦敏博 | シトリン欠損症 | 小児科診療 | 79(6) | 805-811 | 2016 |
| 大浦敏博 | ホモシスチン尿症 | 小児内科 | 48(増刊) | 57-63 | 2016 |
| 大浦敏博 | 治療用特殊ミルクの現状と安定供給上の課題 | 日本マススクリーニング学会誌 | 26(3) | 53-56 | 2016 |
| Okano Y, Hattori T, Fujimoto H, Noi K, Okamoto M, Watanabe T, Watanabe R, Fujii R, Tamaoki T | Nutritional status of patients with phenylketonuria in Japan | Mol Genet Metab Rep | 8 | 103-110 | 2016 |
| Mori T, Imai K, Oboshi T, et al | Usefulness of ketogenic diet in a girl with migrating partial seizures in infancy | Brain & Development | 38(6) | 601-604 | 2016 |

