

新しいマススクリーニングの開発に関する研究

昭和 59 年度研究報告総括

分担研究者 諏訪 城 三

(神奈川県立こども医療センター小児科)

研 究 計 画

先天性副腎皮質過形成症 (CAH: congenital adrenal hyperplasia), 先天性尿素サイクル異常症, 先天性胆道閉鎖症の三疾患群をとりあげ, 新生児マススクリーニングの必要性と可能性について, 前年度に引続き, 基礎的ならびに実用面について検討を進めることとした。特にCAHについては, 全症例の約90%をしめると考えられている21-水酸化酵素欠損(21-OHD: 21-hydroxylase deficiency)のマススクリーニングについて重点的研究をすすめることとした。

新生児マススクリーニングの対象となる疾患の条件として, 次のような項目を設定し, 上記三疾患群がこれら条件を満し得るかどうか, または満すための研究開発をすすめるべく計画した。

新生児マススクリーニングの対象条件

- (1) 発見が遅れると死亡したり, 障害を残す疾患である。
- (2) 効果的治療法があり, 早期発見で死亡や障害発生が防止できる。
- (3) 早期発見は症状の軽い, あるいは症状発現以前の新生児期に行う必要がある。
- (4) 発生頻度がある程度以上である (例えば数千ないし十数万出生に1人以上)。
- (5) 早期発見の検査法があり, それは簡便, 迅速, 正確, 安価であり, マスを対象にした検査が可能である。
- (6) 確定診断 (精密検査など) の方法がある。
- (7) マススクリーニングへの投資は公的・社会的に経済効率上の損失がないこと (cost benefit)。
- (8) 新しい疾患の追加で, 現行のマススクリーニング体系に混乱をおこさないこと。

研 究 経 過

先天性副腎皮質過形成症のマススクリーニング実施上の最も重点的研究課題は, 検査方法の検討であることは, 先年度の研究結果から明らかであったので, 本年度は 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) のRIA (radioimmunoassay) やEIA (enzymmoassay), HPLC (高速液体クロマトグラフィー) などについての測定法, 新生児, 特に未熟児についての偽陽性率の低下のための検討を中心として研究することとした。一部の地域におけるマススクリーニングの実績の評価と問題点および本症発生頻度の予測などを検討し, 確定診断のための迅速検査法としてのHPLCについての研究を行った。

尿素サイクルの先天性代謝異常についても, CAHと同様に, 方法の検討, 実用化の検討を行

った。

先天性痘道閉鎖症ではマスキリングの必要性と可能性について研究をすすめた。

研究協力者による会議は次の如く開いた。

昭和59年11月22日 代表者打合せ会議

昭和60年1月27日 研究成果報告ならびに今後の研究方針の検討

研究協力者数19名の協力で研究を進めた。

研究結果

1. 先天性副腎皮質過形成症 (CAH)

本症が新生児マスキリングの対象となり得るかについては、総合的検討が必要である。そこで、研究経過の項で述べた諸条件と照し合せて、過去の研究成果に加えて本年度研究成果の概要と意義について示し、残された研究課題にもふれてみることにした。

第一の条件(発見が遅れると死亡、障害発生)にCAHが適合することは厚生省心身障害研究「先天性副腎皮質機能障害の調査ならびに研究」の結果(特に全国アンケート調査による488例の分析結果)から明らかである。しかし、今まで教科書的にも明らかに記載のない知能障害、脳血管障害による痙れん・意識障害・不全麻痺などが、CAH 42例中それぞれ3例、2例存在することが諏訪より報告され、60年度にはCAHの障害発生についての研究班員の症例について集計する必要のあることが申合わされた。

第二の条件(効果的治療法がある)についても、すでに心身障害研究班によるCAHの治療指針がだされておき、本症が適合することも明らかである。

第三の条件(新生児期発見の必要性)について。大部分の症例はショック、性早熟などの症状発現後に受診しているのが現状であり、初診年令は過去5年間とそれ以前の症例で大きな差のないことが諏訪より示され、症状出現のみに頼っていたのでは新生児期の早期発見の改善は望み難く、マスキリングによる早期発見は十分意味をもつものと考えられた。

第四の条件(発生頻度)について。過去の心身障害研究での全国アンケート結果では、3万ないし4万出生にCAHは1人であろうと推計されたが、諸外国での頻度は1万ないし1万5千出生に1人となっており、この差はアンケートもれだけではなく、死亡例、放置例などが本邦ではかなりあることも予測させる。札幌市、東京都の一部、静岡県西部地区などのマスキリング結果でみると、総スクリーニング数118,218のうち10例のCAH(21-OHD)が発見されており、頻度は $\frac{1}{11,821}$ となっており、これはPKUの約7~8倍、クレチン症よりやや少ない程度で、マスキリング対象疾患としては適当な頻度と考えられた。パイロット研究的なマスキリングは更に範囲や例数を増加させる必要もあり、各研究協力者のブロックないし地域毎での研究をすすめるよう次年度以後努力することとした。

第五の条件(スクリーニング検査法)について。この点が本年度研究の重点的項目であった。CAHのなかでは21-OHDが85~90%をしめるので、そのマスキリングに焦点がしぼられた研究がすすめられた。21-OHDでは血中17-OHPが高値をとることはすでに知られて

いる。生後4～7日の血中17-OHPを測定すれば本症の診断のきっかけがつかめる。この点は昨年の研究成果でも明らかにされていたが、諏訪らは正常成熟児の日令5における血清中17-OHPと、出生直後から経日的追跡のできた21-OHD5例の血清17-OHP（いずれもエーテル抽出法により、RIA測定）プロフィールから、日令4～7日では両者が明らかに区別できることを示した。すなわち採血時期は現行マスキリングと同じでよいことが示された。血中17-OHPの測定法にはRIA法とEIA法がある。RIA法には ^3H -17-OHPをトレーサーとする方法もあるが、 ^{125}I -17-OHPを用いる方が廃棄問題や手技上で優れている。しかしいずれにしてもRIA法は放射性同位元素を用いるため、EIA法の開発は研究に値する。これは、マイクロタイプレートを用いてのEIA法、すなわち高感度ELISA法（enzyme linked immunosolvent assay）を開発し、経済性、操作性でマスキリングに適していると報告した。成瀬もマスキリングにはRIAよりEIAの方が有効との考えに基き、EIAの改良を工夫した結果を報告した。EIA法はRIA法よりも、マスキリングに適していることは確実であり、札幌市（高杉）、静岡県西部地区（五十嵐）でのマスキリングで実用化されており、感度、簡易化、安定性など今後はより優れた改良法の研究が進められると期待される。新生児期採血の濾紙血中17-OHPを用いての21-OHDのマスキリングで最も問題になるのは測定法の特異性と低体重児の測定値である。RIAを用いるにしても、EIAであるにしても、検体に直接抗17-OHP抗体やトレーサーを加えて測定する直接法では、新生児血中17-OHPの真の値よりも高値として測定されてしまい、特に未熟児などの低出生体重児ではfalse positiveとしてスクリーニングされる率が高くなる。これは17-hydroxypregnenolone（17-OH Δ_5 ）の遊離形や硫酸抱合体（17-OH $\Delta_5\text{S}$ ）が新生児で高濃度に存在することと、17-OHP抗体と交差反応をすることのためによると考えられている。これを解決する一つの方法として、検体をエーテル抽出した後に測定すると真の値に近い測定が可能であることは全研究者の一致するところであった。また17-OH $\Delta_5\text{S}$ は合併症のない低体重児では成熟新生児より高値とはいえず（諏訪）、21-OHDで高値をとる傾向はあるがスクリーニングには17-OHPの方が優れており（矢田）、未熟児や低体重児ではストレス、合併症などの影響も加わって17-OHPそのものが高くなる可能性がある（大浦、諏訪）ことも分った。従って未熟児や低体重児のスクリーニングは更に慎重な検討が必要と考えられた。17-OHPの測定値としては抽出法が直接法より優れているとはいえ、有機溶媒を用いる点で、マスキリングの方法としては問題があり、実際面では両法の組合せの工夫も検討課題であろう。17-OHP測定でのもう一つの工夫は特異的抗体の作成である。高杉は抗17-OHP抗体7種を用いて、直接法と抽出法による17-OHP測定を行い、各抗体間には特異性で大きな差があることを示した。このことはより良い（交差反応の少ない）抗体が作れる可能性を示すものではあるが、精度管理やcut off値の設定などでは同一抗体を用いなければならないことを示すものでもあり、抗体の統一の検討も必要課題となった。神戸川もより特異的な17-OHP抗体作成の研究をすすめていることを報告した。胎児副腎皮質の影響が残存している日令5日頃の血中17-OHPを用いるCAHのマスキリングではcut off pointの検討が必要であり（加藤）、札幌市の実態でも17-OHP 5ng/ml（抽出法、

EIA測定)以上をcut off pointとすると約1%が再採血になるという(松浦)。そこで、松浦らは濾紙血17-OHPがcut off 値をこえたものではcortisolも測定し、17-OHP/cortisol比を用いるとCAHを見落すことなく再採血率を下げるができる可能性がある結果を報告した。五十嵐は、静岡県西部地区でのマススクリーニングは1984年4月以降EIAを用いており、その結果は7カ月間に8,497名を検査し再採血65名(0.76%)、患者0の結果を示し、cut off pointの工夫の実状を示した。以上の如く、検査方法では更に工夫を要する点はいくつか残されてはいるが、実用化の段階に近づいており、今後は実際応用を行いながらの研究もすすめることも必要な時期になったといえる。

第六の条件(確定診断)について。CAHの確定診断の可能なことは臨床経験から異論はない。しかし、無症状のCAHがマススクリーニングで要精検となった場合、迅速な確定診断法を研究しておくことは非常に重要である。診断未定のままコーチゾールを予防投与を続けることの是非も慎重に討議されねばならない。HPLCは血中各種ステロイドを特異的に迅速に分析することが可能であり、田苗、矢田、入江らはそれぞれの有用性について報告した。HPLCは用い方によっては一次スクリーニングでも利用可能であり、研究の発展が期待される。

第七の条件(cost benefit)については、スクリーニングにどの方法をとるかによっても異なるが、患者頻度が1万出生に1人とするならば、クレチン症よりやや経済効率は悪いとはいえ、PKU以上であろうことは推測できる。

第八の条件(現行スクリーニングへの組入れ)について。CAHのスクリーニング方法の研究は最初からこの条件をはずれないことを前提にすすめているので問題はほとんどないと考えられるが、再採血率の問題、産科医の関心と理解を得ること、検査センターの整備などの配慮も必要であろう。最も重要なことは要精検児の診療が行える医療施設の水準は相当に高いことが要求されるので、従来のシステムとどのように噛み合わせるかが工夫されねばなるまい。

2. 尿素サイクル異常症など

先天性尿素代謝異常症は、アンモニア NH_3 →(カルバミールリン酸合成酵素CPS)→カルバミールリン酸CP→(オルニチントランスカルバミラーゼOTC)→シトルリンCit→(アルギニノコハク酸AS→(アルギニノコハク酸分解酵素ASL)→アルギニンArg→(アルギナーゼ)→オルニチンOrn→CPの尿素サイクルにおけるいずれかの酵素欠損、すなわちCPS欠損症、OTC欠損症、Cit血症(AS欠損)、ASL欠損症(AS尿症)、高Arg(アルギナーゼ欠損)が知られている。

わが国における尿素代謝異常症の頻度は不明な点も多いが、過去10年間に34症例の報告があり、その約70%はCPS欠損症とOTC欠損症といわれている(北川)。重症例は早期に死亡している可能性もあり、軽症例では食事療法も成功しており、本症群に対する治療研究の進歩がみられる。

北川は、Naylor・Guthrieらのenzyme-multiple auxotroph法による血中Cit, Orn濃度およびASL活性を同時に検査する方法で2年間に225,934例の新生児濾紙血スクリーニング

を行った結果を報告。再検率 0.06%, 精検数 9 例であったが患児は発見できなかった。しかし、スクリーニング陰性であった 1 例が 9 カ月時に高アルギニン血症（アルギナーゼ欠損症）であることが判明したとし、Nayl or 法のみによるスクリーニングは不適當であり、更に改良法の開発が必要であろうとした。

川村は、昨年報告した新しい原理に基づく簡易迅速測定法を改良し、レザズリン-レゾルフィン反応を利用した高感度蛍光測定法を報告し、血中 Orn, Arg, AS の微量測定を可能とした。この方法により 4,100 例の新生児の濾紙血中 Orn 定量を行い、陽性者はみつからなかったが cut off point を設定した。多数例での検討が期待された。

多田は、アミテスト（昨年度報告）をベッドサイド検査として用いることにより、高アンモニア血症を契機として診断された 4 例のプロピオン酸尿症を報告（2 例生在, 2 例死亡）。嘔吐、哺乳力低下などの症状を有する新生児のハイリスクスクリーニングとして血中アンモニア測定は尿素サイクル異常症のみならず有機酸代謝異常症発見にも有用であるとした。

中島は尿中オロト酸測定法について、昨年度の HPLC 法は感度の点で問題があったので本年度は Adachi 法に準じた比色法およびガスクロマトグラフィー質量分析機を用いた方法（GCMS 法）を用いて検討した。この方法により 3～6 カ月乳児の尿中オロト酸を測定することにより高アンモニア血症をきたす OTC 欠損症, Cit 血症, 高 Arg 血症などの尿素サイクル異常症のほかリジン尿性蛋白不耐症なども発見できる可能性があるとした。

以上の如く尿素サイクル異常症あるいは高アンモニア血症をきたす先天性代謝異常症は、新生児死亡例や確定診断不明のまま死亡する例の多いこともあり、その頻度は不明な点も多いが、早期診断がマススクリーニングで可能になれば治療可能な疾患であるので、今後のマススクリーニング法の開発が待たれる疾患である。

3. 先天性胆道閉鎖症（CBA）

本症発生頻度は 1 万出生に 1 人と確定されており、生後 60 日以内に手術を行えば 70～80% で黄疸消失と 5 年以上生存が期待できるという。しかし現実に生後 60 日以内に手術を受けているのは極めて少なく（約 30%）、臨床症状から本症を早期発見することには限界があるとされている。マススクリーニングの必要性がここにあるが、その開発研究は方法論の検討段階にあるのが現状である。

鴨下は乾燥血液濾紙から胆汁酸を抽出し、酵素蛍光法により定量する方法を昨年度報告したが、本年度は検査時期と有効性について検討した。日令 5～7 日の濾紙採血の場合 CBA 33 例中陽性 27 例（感度 81.8%）、特異性（真性陰性数を偽陽性数+真性陰性数で除したもの）98.5%、有効性（真性陰性数+真性陽性数を総対象数で除したもの）98.5%であった。cut off point は血中総胆汁酸 $58 \mu\text{mol}/\ell$ とした。更に感度を高めるためには生後 3～4 週の採血が必要で、他のマススクリーニングとの併用システムが作られれば本症発見率はより高まるであろうとした。

入野野は、尿浸染濾紙血ビリルビン測定と血液濾紙中抱合型 1 次胆汁酸を測定することによるマススクリーニングを検討した。尿濾紙郵送法は安価で手技も簡便に実施できるとしたが、角田

の同様検討では尿中ビリルビン半定量法はウロペーパーB 試験では室温放置で陽性検体も陰性化するものが多いので不適當であるとし、新生尿でのイクトテスト法でも必ずしも陽性例をすべて発見できるとは限らないとした、血中グリココール酸定量法はCBAの大部分で上昇し本症発見に有用ではあるが、肝炎、高カロリー輸液による肝障害例でもグリココール酸上昇をみるといい（角田）、HPLCによる胆汁酸分析法も本症発見には有用ではあるが、出生時体重の少ないものは偽陽性を示す率が高いことも考慮する必要があるという（入戸野）。

4. システムの検討

現行の新生児マススクリーニングに新しい項目を追加する場合、現システムに混乱を起こすことなく円滑な組入れができるよう十分な検討をしておく必要がある。安達は、昨年に引き続き本年度は採血担当の産科医療機関の立場から現行スクリーニングの実態と問題点、新疾患追加に際して望まれる事項を、神奈川県下400医療機関にアンケート調査した。大多数（82%以上）の機関が新疾患の追加に賛同、協力的意向を示していた。しかし、対象疾患の見直し（入替え）検討の必要を示すものもあり、現行システムの大きな変動をきたさない範囲での配慮が必要とされた。

5. まとめ

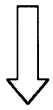
先天性副腎皮質過形成症は新生児濾紙血によるマススクリーニングの対象疾患として、すべての条件に適合するものであるが、検査方法で、特に低出生体重児の場合には工夫を要する点が残されている。しかし一部の地域でのマススクリーニングの実績では効果が期待される段階まで研究は進んでおり、今後はパイロットスタディを地区数や例数を増加して行うことが必要となってきた。

尿素サイクル異常症と先天性胆道閉鎖症のマススクリーニングは多くの点で検討課題が残されているとはいえ、可能性と必要性のあるものと考えられ、今後の研究の進展が望まれる。

発 表 論 文

- 1) K.Asayama, S.Amemiya, S.Kusano and K.Kato, : Growth—Hormone—Induced Changes in Posteparin Plasma Lipoprotein Lipase and Hepatic Triglyceride Lipase Activities, *Metabolism* 33 : 129~131, 1984.
- 2) 立花克彦, 勝又規行, 前坂機江, 諏訪城三, : ^{125}I -17OH-Progesteroneを用いた血中17-OH-ProgesteroneのRIAの検討, *ホルモンと臨床* 32巻 : 649~652, 1984.
- 3) 諏訪城三 : 先天性代謝異常・クレチン症のマススクリーニング, *こども医療センター医学誌* 13巻 : 76~79, 1984.
- 4) 諏訪城三, : 副腎皮質ホルモン療法と製剤の評価—小児科領域の疾患—, *月刊薬事* 26巻 : 1683~1685, 1984.

- 5) Shimozawa, K. , Saisho, S. , Saito, N. , Yata, J, Igarashi, Y. , Hikita, Y. , Irie, M. , and Okada, K. : A neonatal mass-screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan, *Acta Endocrinologica* 107 : 513~518, 1984.
- 6) 成瀬浩, : 先天性副腎過形成に関するシンポジウム, *ホルモンと臨床* 33巻 : 55~58, 1985.
- 7) 五十嵐良雄, 下沢和彦, 疋田良典, 小川治夫, 川波和子, 竹広晃, 斎藤喜親, 税所純敬, 矢田純一, 入江実, 岡田和親, 吉沢邦重, 江口秀史, 杉山哲, 大西鐘寿, 神戸川明, : 先天性内分泌代謝異常の新生児マススクリーニング, *産婦人科の世界* 36 : 315~322, 1984.
- 8) 田苗綾子, 日比晶, 野崎佳枝, : 副腎性器症候群, *臨床検査* 8巻 : 541~548, 1984.
- 9) 田苗綾子, < 綜説 > 最近の小児内分泌学・糖尿病のトピックスから, *小児科診療* 4巻 : 1168~1178, 1984
- 10) Kazuo Abe, Nobuo Matsuura, Yachiyo Nohara, Hiroko Fujita, Kenji Fujieda, Takako Kato and Yuhei Mikami. : Prolactin Response to Thyrotropin-Releasing Hormone in Children with Gynecomastia, Premature Thelarche and Idiopathic Precocious Puberty, *Tohoku J. exp Med.* 142 : 283~288, 1984
- 11) Nonomura K, Fujieda K, Sakakibara N, Terasawa K, Matsuno T, Matsuura N and Koyanagi T. : Pituitary and gonadal function in prepubertal boys with hypospadias, *J. Urol.* 132 : 595~598, 1984
- 12) 藤枝憲二, 松浦信夫, 藤田仁子, 加藤敬子, 野原八千代, 三上裕平, : 乳房早発症, 身長化骨促進をきたした女兒の内分泌機能 cyproterone acetate の影響, *日独医報* 26巻 : 169~178, 1984.
- 13) H. Nakabayashi, M. Owada and T. Kitagawa, : A mild case of dihydropteridine reductase deficiency with residual activity in Erythrocytes, *J. Inher. Metab. Dis* 7 : 135~136, 1984.
- 14) 小倉成美子, 柿沼宏明, 大竹明, 高柳正樹, 中島博徳, 西牟田敏之, : 高アンモニア血症における尿中オロト酸排泄量の検討 I. 種々の疾患における尿中オロト酸排泄量 II. 尿濾紙を用いたスクリーニング方法の検討, *日本小児科学会雑誌* 88巻 : 1936~1942, 1984.
- 15) 入野博, : 先天性胆道閉鎖症のマススクリーニング, *小児科* 25巻 : 609~610, 1984.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究計画

先天性副腎皮質過形成症(CAH:congenital adrenal hyperplasia),先天性尿素サイクル異常症,先天性胆道閉鎖症の三疾患群をとりあげ,新生児マススクリーニングの必要性と可能性について,前年度に引続き,基礎的ならびに実用面について検討を進めることとした。特にCAHについては,全症例の約90%をしめると考えられている21-水酸化酵素欠損(21-OHD:21-hydroxylase deficiency)のマススクリーニングについて重点的研究をすすめることとした。

新生児マススクリーニングの対象となる疾患の条件として,次のような項目を設定し,上記三疾患群がこれら条件を満し得るかどうかが,または満すための研究開発をすすめるべく計画した。

新生児マススクリーニングの対象条件

- (1)発見が遅れると死亡したり,障害を残す疾患である。
- (2)効果的治療法があり,早期発見で死亡や障害発生が防止できる。
- (3)早期発見は症状の軽い,あるいは症状発現以前の新生児期に行う必要がある。
- (4)発生頻度がある程度以上である(例えば数千ないし十数万出生に1人以上)。
- (5)早期発見の検査法があり,それは簡便,迅速,正確,安価であり,マスを対象にした検査が可能である。
- (6)確定診断(精密検査など)の方法がある。
- (7)マススクリーニングへの投資は公的・社会的に経済効率上の損失がないこと(cost benefit)
- (8)新しい疾患の追加で,現行のマススクリーニング体系に混乱をおこさないこと。