

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 成育疾患克服等総合研究事業
(英語) Project for Baby and Infant Research of health and Development to Adrescent and Young adult
- 研究開発課題名 : (日本語) タンデムマス・スクリーニングへのオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の追加、およびムコ多糖症の新規スクリーニング法の開発および適応に関する研究
(英語) A study for adding the ornithine transcarbamylase deficiency to newborn screening using tandem mass spectrometry and for developing new method for newborn screening of mucopolysaccharidosis
- 研究開発担当者 (日本語) 島根大学医学部小児科 助教 小林弘典
所属 役職 氏名 : (英語) Hironori Kobayashi, Assistant Professor, Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine
- 実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 1** (日本語) 研究総括および OTC 欠損症に関する新生児マススクリーニングパイロット研究の運用
開発課題名 : (英語) Research control and operation of newborn mass screening pilot study on OTC deficiency
研究開発分担者 (日本語) 島根大学医学部・小児科 助教 小林 弘典
所属 役職 氏名 : (英語) Hironori Kobayashi, Assistant Professor, Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine
- 分担研究 2** (日本語) 患者登録およびパイロット研究における費用対便益評価
開発課題名 : (英語) Patient registration and cost benefit assessment in pilot study
研究開発分担者 (日本語) 島根大学・医学部小児科 特任教授 山口 清次
所属 役職 氏名 : (英語) Seiji Yamaguchi, Professor, Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine

- 分担研究 3** (日本語) OTC 欠損症に関する疫学調査、OTC パイロット陽性例に対する診断・治療体制の検討
- 開発課題名: (英 語) Prognosis of patients with urea cycle disorders, and pilot study of OTC deficiency screening in neonates
- 研究開発分担者 (日本語) 熊本大学・大学院生命科学研究部小児科学分野 准教授 中村 公俊
- 所属 役職 氏名: (英 語) Kimitoshi Nakamura, Associate Professor, Department of Pediatrics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences
-
- 分担研究 4** (日本語) ムコ多糖症 (MPS) II 型の自然歴調査、治療効果についての調査および、乾燥ろ紙血を用いた MPS II 型の確定診断法の確立
- 開発課題名: (英 語) Investigation of natural history and therapeutic effect of mucopolysaccharidoses (MPS) type II, and establishment of confirmed diagnostic method of MPS type II using dried blood spot of neonate
- 研究開発分担者 (日本語) 岐阜大学・医学部附属病院新生児集中治療部 准教授 折居 建治
- 所属 役職 氏名: (英 語) Kenji Orii, Associate Professor, Division of Neonatal Intensive Care Unit, Gifu University Hospital
-
- 分担研究 5** (日本語) 新規 MPS スクリーニング法の評価および MPS スクリーニング運用に関する検討
- 開発課題名: (英 語) Evaluation of new MPS screening method and operation on MPS screening
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人島根大学 医学部・小児科 嘱託講師 戸松俊治
- 所属 役職 氏名: (英 語) Shunji Tomatsu, Visiting Lecturer, Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine
-
- 分担研究 6** (日本語) MPS スクリーニングにおける新規 GAG 法の開発
- 開発課題名: (英 語) Development of new GAG method for MPS screening
- 研究開発分担者 (日本語) 島津製作所・分析計測事業部 MS ビジネスユニット 主任 箕畑 俊和
- 所属 役職 氏名: (英 語) Toshikazu Minohata, Assistant manager, MS Business Unit, Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

1. タンデムマススクリーニングへの OTC 欠損症の追加に関する研究

OTC 欠損症は尿素サイクル異常症のうち最も頻度が高い疾患であるにも関わらず、これまで新生児マススクリーニングへの適応が困難であった疾患である。本研究では申請者らが開発した簡易な検査法を現行のタンデムマスによる新生児マススクリーニングに追加するためのパイロット研究を実施する。今年度は、まずパイロット研究で用いるオロト酸の基準値を作成した。また、複数の施設、異なる分析機器でオロト酸測定が可能であるかを検討した。また、異常の検出精度を確認するため診断確定例のろ紙血を収集し、検討した。パイロット研究の精度管理については、オロト酸を含む精度管理用ろ紙血を作成中である。2017 年度には島根県、熊本県などの県で研究開始予定である。その他、広島県、長野県、大阪府、東京都の一部などでパイロット研究開始の手続きがすすんでいる。

中村公俊准教授（熊本大学・大学院生命科学研究部小児科学分野）のグループは肝移植をしていない国内の患者の予後調査をおこなった。尿素サイクル異常症患者の初発時の血中アンモニア値と予後の関係について、痙攣の有無、頭部画像検査の異常の有無、透析治療の必要性、肝移植の必要性、特殊ミルク治療の必要性について解析した。その結果、血中アンモニア値が $360 \mu\text{M}$ 以上の例では予後不良であった。

山口清次教授（島根大学・医学部小児科）らは、NBS パイロット研究で発見された患者を前向きに追跡する方法を検討した。本研究では患者家族を対象にしたアンケート調査でなく、が患者の個人情報わからない状態で患者主治医を対象として調査を行うこととした。マススクリーニングの費用対便益の評価においては、研究協力者とともに解析に必要な情報を共有し、OTC 欠損症については費用対便益等を検討するための情報収集を開始した。

2. ムコ多糖症の新規スクリーニング法の開発および適応に関する研究

ムコ多糖症は酵素補充療法などの有望な治療法が整いつつあるにも関わらず、新生児マススクリーニング法が十分に検討されていない疾患である。折居建治准教授（岐阜大学・医学部附属病院新生児集中治療部）らのグループは、日本人に多くみられるムコ多糖症 II 型患者の治療開始以前の自然歴と酵素補充療法を長期おこなった状態での QOL について、2017 年度に調査を行うための準備を進めた。また、MPS スクリーニングにおいて GAG 法以外の方法として、蛍光基質である 4-MU を用いた酵素活性測定法を検討し、ムコ多糖症 I 型、ムコ多糖症 II 型の同時酵素活性測定法を確立した。

箕畑俊和（島津製作所・分析計測事業部 MS ビジネスユニット）らのグループでは、本研究での開発を予定している MSP スクリーニング法である GAG 法について、現在報告されている GAG 法を国内で実施する際の課題等を検討した。高感度機種および汎用機種を用いて検討した結果、汎用機種ではろ紙血中の GAG を分析するために必要な感度が確保出来ない事が明らかになった。

戸松俊治嘱託講師（国立大学法人島根大学 医学部・小児科）らのグループは箕畑俊和氏らのグループとともに GAG 法に用いる LC-MS/MS の性能評価を行った。また、ムコ多糖症 I 型、II 型の新生児マススクリーニングを行う際に有用な指標となる GAG についての検討を行った。既診断例の新生児期ろ紙血を後方視的に検討した結果、ヘパラン硫酸 (HS-OS, HS-NS) とデルマタン硫酸を組み合わせる事が効率的である事を明らかにした。

1. A study for adding the ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency to newborn screening using tandem mass spectrometry

OTC deficiency is one of the most common and severe defect of urea cycle disorders, it has been difficult to apply for newborn screening because of lacking screening test that had been validated. In this study, a pilot study will be carried out to add the screening method developed by applicants to the current newborn screening using tandem mass spectrometry.

First, we determine the reference value of orotic acid used in pilot study. We also investigated whether orotic acid can be measured in different laboratory or different analytical instruments. In order to investigate the detection accuracy of patient, we collect blood filter papers from the confirmed patients with OTC deficiency, and examined them. For the purpose of quality control of pilot study, dried blood spot sample for quality control containing orotic acid is being prepared. In 2017, we plan to start study in Shimane and Kumamoto. In addition, Hiroshima, Nagano, Osaka, part of Tokyo, etc. are beginning procedures for pilot study.

Kimitoshi Nakamura (Associate Professor, Department of Pediatrics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences) conducted a prognosis survey for UCD patients. Regarding the blood ammonia level at the onset of UCD patients, the presence or absence of convulsions, presence or absence of abnormality in head image examination, necessity of hemodialysis, necessity of liver transplantation, and necessity of special milk treatment. In these cases, it was found that the prognosis was poor in cases, and more patients needed these treatments, with blood ammonia level more than 360 μM .

Seiji Yamaguchi (Professor, Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine) designed the prospective patient registration study for the patients found in pilot study. In this study, rather than a questionnaire survey targeting patient families, we plan to conduct a survey on patients' physicians with the patient's personal information unknown. In order to evaluate the cost-benefit of newborn screening on OTC deficiency, we shared information necessary for analysis with research collaborators and started gathering information to determine cost-benefits of newborn screening of OTC deficiency.

2. A study of developing new method for newborn screening of mucopolysaccharidosis (MPS)
Newborn screening methods for MPS are now developing, even though promising therapies such as enzyme replacement therapy are being prepared.

Kenji Orii (Associate Professor, Division of Neonatal Intensive Care Unit, Gifu University Hospital) investigate and established the condition for simultaneous assay of multiple specimens from dried blood spot of newborn by measuring enzyme activity of MPS type I and MPS type II. A measurement system for measuring the enzyme activity using 4-MU substrate was set up and examination of the cutoff value was carried out. And Dr. Orii prepared to conduct a questionnaire survey in 2017 in order to investigate the natural history before the treatment of patients with mucopolysaccharidosis type II and the quality of life after long-term enzyme replacement therapy.

Toshikazu Minohata (Assistant manager, MS Business Unit, Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation) and his group validate the GAG method, which is a MPS screening method scheduled to be developed in present research, by using currently reported GAG assay method. As a result of comparison using high sensitivity LC-MS/MS and general purpose LC-MS/MS (common in NBS), it became clear that general purpose LC-MS/MS was insufficient in sensitivity for analyzing GAG in dried blood spot.

Shunji Tomatsu (Visiting Lecturer, Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine) conducted performance evaluation of LC-MS/MS used for GAG method together with Minohata group. He determined the useful indicator for newborn screening of MPS-I and MPS-II using GAG assay. It revealed that combination of heparan sulfate (HS-OS and HS-NS) and dermatan sulfate is efficient.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 20 件)

- 1) Auray-Blais C, Lavoie P, Tomatsu S, Valayannopoulos V, Mitchell JJ, Raiman J, Beaudoin M, Maranda B, Clarke JT. UPLC-MS/MS detection of disaccharides derived from glycosaminoglycans as biomarkers of mucopolysaccharidoses. *Anal Chim Acta*. 2016 936:139-48.
- 2) Tomatsu S, Azario I, Sawamoto K, Pievani AS, Biondi A, Serafini M. Neonatal cellular and gene therapies for mucopolysaccharidoses: the earlier the better? *J Inherit Metab Dis*. 2016 Mar;39(2):189-202. doi: 10.1007/s10545-015-9900-2. Review. PMID:
- 3) Simonaro CM, Tomatsu S, Sikora T, Kubaski F, Frohbergh M, Guevara JM, Wang RY, Vera M, Kang JL, Smith LJ, Schuchman EH, Haskins ME. Pentosan Polysulfate: Oral Versus Subcutaneous Injection in Mucopolysaccharidosis Type I Dogs. *PLoS One*. 2016 11(4):e0153136.
- 4) Sawamoto K, Suzuki Y, Mackenzie WG, Theroux MC, Pizarro C, Yabe H, Orii KE, Mason RW, Orii T, Tomatsu S. Current therapies for Morquio A syndrome and their clinical outcomes. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2016 4 (9): 941-951
<http://dx.doi.org/10.1080/21678707.2016.1214572>
- 5) Noguchi A, Nakamura K, Murayama K, Yamamoto S, Komatsu H, Kizu R, Takayanagi M, Okuyama T, Endo F, Takasago Y, Shoji Y, Takahashi T : Clinical and genetic features of lysinuric protein intolerance in Japan. *Pediatrics International* 58:979-983 (2016)
- 6) Nakamura K, Kido J, Matsumoto S, Mitsubuchi H and Endo F Clinical manifestations and growth of patients with urea cycle disorders in Japan *J Hum Genet*. 61, 613-616 (2016)

- 7) Kido J, Matsumoto S, Momosaki K, Sakamoto R, Mitsubuchi H, Inomata Y, Endo F, and Nakamura K :Plasma exchange and chelator therapy rescues acute liver failure in Wilson disease without liver transplantation. *Hepatol Res.* (2016) Mar 23. doi: 10.1111/hepr.12711.
- 8) Yoshida S, Kido J, Matsumoto S, Momosaki K, Mitsubuchi H, Shimazu T, Sugawara K, Endo F, Nakamura K : Prenatal diagnosis of Gaucher disease using next-generation sequencing. *Pediatrics International* 58:946-949 (2016)
- 9) Honda T, Itoh F, Nakamura K, Ohba T and Katabuchi H A case of gradually manifesting McCune–Albright syndrome with a 10-year follow-up. *Reprod Med Biol* (2016)
- 10) Tanaka K, Nakamura K, Matsumoto S, Kido J, Mitsubuchi H, Ohura T, Endo F Citrulline administration for urea cycle disorders in Japan. *Pediatrics International* (2016) Sep 10. doi: 10.1111/ped.13163
- 11) Kubaski F, Mason RW, Nakatomi A, Shintaku H, Xie L, van Vlies N, Church H, Giugliani R, Kobayashi H, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T, Fukao T, Montaña AM, Tomatsu S. (2017) Newborn screening for mucopolysaccharidosis: a pilot study of measurement of glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.* 40(1):151-158
- 12) Kubaski F, Osago H, Mason RW, Yamaguchi S, Kobayashi H, Tsuchiya M, Orii T, Tomatsu S. (2017) Glycosaminoglycans detection methods: applications of mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* 120(1-2):67-77.PMID:27746032
- 13) Khan S, Almeciga-Diaz CJ, Sawamoto K, Mackenzie WG, Theroux MC, Pizarro C, Mason RW, Orii T, Tomatsu S. Mucopolysaccharidosis IVA and glycosaminoglycans. *Mol Genet Metab.* 2017 120(1-2):78-95. PMID: 27979613
- 14) Kubaski F, Suzuki Y, Orii K, Giugliani R, Church HJ, Mason RW, Dũng VC, Ngoc CT, Yamaguchi S, Kobayashi H, Girisha KM, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Glycosaminoglycan levels in dried blood spots of patients with mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Mol. Genet. Metab.* 2017120(3):247-254
- 15) Kubaski, F.; Brusius-Facchin, AC.; Mason, RW.; Patel, P.; Burin, MG.; Michelin-Tirelli, K.; Kessler, RG.; Bender, F.; Leistner-Segal, S.; Moreno, CA.; Cavalcanti, DP.; Giugliani, R.; Tomatsu, S. Elevation of glycosaminoglycans in the amniotic fluid of a fetus with mucopolysaccharidosis VII. *Prenat Diagn.* 2017 37(5):435-439.
- 16) Mori H, Momosaki K, Kido J, Tamura H, Tanaka K, Matsumoto S, Nakamura K, Mitsubuchi H, Endo F, Iwai M Amelioration of Brain Damage by Glycine in Neonatal Rat Brain Following Hypoxia-Ischemia. *Pediatr Int.* 59:321-327 (2017)
- 17) Kido J, Kawasaki T, Mitsubuchi H, Kamohara H, Ohba T, Matsumoto S, Endo F, Nakamura K : Hyperammonemia crisis following parturition in a female patient with ornithine transcarbamylase deficiency. *World J Hepatol.* 9:343-348 (2017)
- 18) Mori H, Momosaki K, Kido J, Tamura H, Tanaka K, Matsumoto S, Nakamura K, Mitsubuchi H, Endo F, Iwai M Amelioration of Brain Damage by Glycine in Neonatal Rat Brain Following Hypoxia-Ischemia. *Pediatr Int.* 59:321-327 (2017)
- 19) Kido J, Matsumoto S, Sakamoto R, Mitsubuchi H, Endo F and Nakamura K* Pulmonary artery hypertension in methylmalonic academia. *Hemodialysis International* (in press)

20) Kido J, Mitsubuchi H, Ito F, Yoshida T, Matsumoto S, Sakamoto R, Endo F and Nakamura K: Advanced endometrial cancer in phenylketonuria. Medical Science Case Reports (in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

- 1) Kimitoshi Nakamura Educational program; Case Studies in Clinical Genetics: Lysosomal Storage Disease. The 13th International Congress of Human Genetics (2016) Kyoto, Japan, 2016.4.3-7
- 2) 山口由美, 亀井良哉, 宗像俊, 小田新, 廣間武彦, 長谷川有紀, 山田健治, 山口清次, 窪田満, 中村友彦: アミノ酸欠乏により血液濾過透析を要したカルバミルリン酸合成酵素 1 欠損症の疑いの 1 例, ポスター, 第 119 回日本小児科学会, 2016.5.13-15
- 3) 小林弘典, 古居みどり, 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・スクリーニング陽性例の前向き患者追跡調査, ポスター, 第 119 回日本小児科学会, 2016.5.13-15
- 4) 中村公俊: ファブリー病のマススクリーニング, 口頭, 第 119 回日本小児科学会 シンポジウム 新生児マススクリーニング, (2016), 5.13-15,
- 5) 中村公俊: 遺伝学的検査, 口頭, 第 12 回日本先天代謝異常学会セミナー, (2016) 7.16-17
- 6) 中村公俊: 専門医に求められる先天代謝異常症の診断・治療, 口頭, 第 6 回日本小児科学会 インテンシブコース, (2016) 8.20-21
- 7) 中村公俊: 九州・沖縄地区における専門医と非専門医の地域連携の構築, 口頭, 第 43 回日本マススクリーニング学会 シンポジウム 1 新生児マススクリーニングにおける地域連携、多業種連携, (2016) 8.26-27
- 8) 小林弘典, 山田 健治, 坊 亮輔, 長谷川有紀, 山口清次, 大山直子, 竹内一博, 城下友義, 井手野 晃: LC-MS/MS による血清中アシルカルニチンの定量分析の新規非誘導体化法の開発及び既存簡易測定法との比較検討, ポスター, 第 41 回日本医用マススペクトル学会年会, 2016.9.15-16
- 9) 小林弘典: 尿素サイクル異常症の新生児スクリーニング～タンデムマス・スクリーニングによる OTC 欠損症のパイロットスクリーニング, 口頭, 九州先天代謝異常症診療ネットワーク会議, 2016.10.8
- 10) 小林弘典: MPS スクリーニングにおける現状の理解, 口頭, 第 6 回ライソゾーム病早期診断ネットワーク会議, 2017.1.21

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし