

# タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの試験研究 - 2006年度(2年目)実施成績 -

野町祥介 太田 優 坂上絵理奈 白井知美 太田紀之  
福士 勝 藤田晃三 矢野公一 長尾雅悦<sup>\*1</sup> 窪田 満<sup>\*2</sup>

## 要 旨

札幌市のタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディにおいて、2006年4月から2007年3月までの1年間で新生児代謝異常症等検査を受検した16,120件(前年度比743件増加)のうち15,897件(98.6%)がタンデム質量分析計による多項目検査を希望した。その結果、4例を精査とし、うち1例がグルタル酸尿症2型、2例がプロピオン酸血症であり、これらの患児を早期に見出すことができた。また、検査法をタンデム質量分析法に移行したアミノ酸代謝異常症3疾患(フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症)の検査においては、16,120件中2例を精査とし、うち1例が古典的フェニルケトン尿症であった。

## 1. 緒 言

札幌市では、2005年4月から、新生児マス・スクリーニング事業の効果を高めることを目的として、「札幌市 タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの研究実施要領」を制定し、新生児先天性代謝異常症検査の受検者のうち、保護者の署名による希望を得られたものを対象に、タンデム質量分析計による多項目検査(以下;タンデム検査)を研究事業として実施している<sup>1)</sup>。前報では開始1年目(2005年度)の検査実施成績について報告した<sup>2)</sup>が、今回それに引き続いて2年目(2006年度)の検査実施成績を報告する。

## 2. 方 法

検査方法は既報<sup>3)</sup>に従った。タンデム質量分析法によるアミノ酸代謝異常症3項目の検査(以下;3項目検査)は、2006年4月1日から2007年3月31日

までの1年間に札幌市衛生研究所で受け付けた新生児で、保護者が申込書により先天性代謝異常症等検査を申し込んだ16,120件を対象とし<sup>4)</sup>、タンデム検査は、そのうち保護者が申込書においてタンデム検査を合わせて希望した15,897件を対象とした。

データ整理はデータベース「タンデムマススクリーニングシステム」を用いて行った<sup>5)</sup>。

## 3. 結 果

### 3-1 タンデム検査希望率

新生児代謝異常症等検査の受検者数は16,120件(前年度比743件の増加)で、そのうち15,897件がタンデム検査を希望した。検査希望率は前年度と同じく98.6%だった。また、検査済み検体の10年間保存と研究等二次利用の承諾率は93.6%(15,094/16,120)で、前年度比で1.2%増であった。

\*1 独立行政法人国立病院機構西札幌病院小児科

\*2 手稲溪仁会病院小児科

### 3-2 検査データ

タンデム質量分析計により測定を行ったもののうち、採血日齢が4～6日であった15,389件について、全測定物質の平均測定値と標準偏差を表1に示す。

#### 3-2 陽性例

3項目検査における初回陽性例は5例で、そのうち1例を直接精査、残りの4例を再採血とした。再採血4例のうち1例が最終的に要精査となった。

タンデム検査における初回陽性例は54例で、そのうち1例を直接精査、残りの53例を再採血とした。再採血53例のうち3例が最終的に精査となった。また、初回正常であったが、低体重出生等の理由により再採血を行い、その時点で陽性となりさらに再採血を必要とした例が4例あった。これら4例はすべて最終的に正常であった。以上のタンデム検査における要再採血の内訳を表2にまとめる。

#### 3-3 要精査例と発見例

3項目検査、およびタンデム検査における要精査例の内訳を表3にまとめる。表中の症例 及び は3項目検査においてフェニルアラニン (Phe) 高値によりフェニルケトン尿症 (PKU) が疑われたものであり、うち1例がその後の精密検査等により古典的PKUと確定診断された。また、表中の症例 ~ はタンデム検査において代謝異常疾患が疑われたものであり、うち3例がその後の精密検査等により疑い疾患の通り診断された。その内訳は1例がグルタル酸尿症2型 (GA2)、2例がプロピオン酸血症 (PA) であった。また、これらの発見例の初回検査時の検査データを表1にまとめた。表1中で測定値がカットオフ値を超えている部分について網掛けにより表示している。

#### 3-4 代謝異常症依頼検査によるフォロー

要精査例については、当所の調査研究「代謝異常症依頼検査」によるフォロー検査<sup>6)</sup>を行った。その結果グルタル酸尿症2型例については尿中有機酸検査においてジカルボン酸の顕著な増加を認めた。またプロピオン酸血症の2例については、同様に尿中有機酸検査により、methylmalonateの増加を認めず、methylcitrateの増加のみをみとめたことから、メチル

マロン酸血症は否定的で、プロピオン酸血症のみを疑うに至った。

#### 3-5 確定診断

発見された4症例については、精査医療機関等において遺伝子診断により確定診断が行われた。遺伝子型を以下に示す。

- (1) 症例 PAH遺伝子 IVS4nt-1/R252W<sup>7)</sup>
- (2) 症例 ETFDH遺伝子 A360P/Y507D
- (3) 症例 PCCB遺伝子 I430L/Y435C<sup>8)</sup>
- (4) 症例 PCCB遺伝子 Y435C/Y435C<sup>8)</sup>

#### 3-6 発見例の予後

症例 (PKU) については、コンサルタント医の指導により特殊ミルクを中心とした血中Phe値のコントロールが行われている。

症例 (GA2) については、精査医療機関において、ただちにビタミンB2、重曹投与等の治療を開始したが、重篤な新生児型であったため、生後2か月で死亡した。

症例 および (PA) については、精査医療機関において、カルニチン投与と特殊ミルクにより治療が行われている。これまで軽度な血中アンモニアの上昇が認められたが、症状は軽微で、きわめて良好な経過を辿っている。

#### 3-7 発見例に基づくカットオフ値の評価

##### (1) グルタル酸尿症2型

今回の発見例と再採血例をoctanoyl carnitine(C8)値とdecanoyl carnitine (C10) 値の比較でプロットしたものを図1に示す。また、C10値を体重増加率によりプロットしたものを図2、同じくmyristoyl carnitine (C14:1) 値をプロットしたものを図3に示す。C8値C10値併用、もしくはC14:1値のカットオフの双方により本例を見出すことは可能であった。

##### (2) プロピオン酸血症・メチルマロン酸血症

今回の発見例の初回時、及び再採血時(日齢等は表3を参照)のpropionyl carnitine (C3) 値とpropionyl carnitine / acetyl carnitine (C3/C2) 比値の比較によりプロットしたものを図4に示す。

表 1 定量物質とその平均値及び標準偏差 (n = 15,389), 並びに見出された患者 4 例の検査データ  
(注: 対象は生後 4 日目から 6 日目に採血されたもの カットオフ値は指標物質としているもののみ表示)

略称	正式名称	平均値±標準偏差 単位	カットオフ値 (SD 比)	発見例			
				PKU 表 3	GA2 表 3	PA 表 3	PA 表 3
Phe	phenylalanine	49.0 ± 9.2 nmol/ml	120 (+7.7SD)	1454	37.2	43.9	50.5
Leu + Ile	leucine + isoleucine	220 ± 57 nmol/ml	300 (+1.4SD)	169	299	224	350
Met	methionine	21.9 ± 4.6 nmol/ml	50 (+5.9SD)	16.3	23.3	17.2	30.9
Cit	citrulline	12.0 ± 3.9 nmol/ml	40 (+7.2SD)	15.4	17.0	9.9	14.7
Arg	arginine	13.5 ± 7.7 nmol/ml	100 (+11.2SD)	14.5	17.9	10.3	18.1
Gly	glycine	362 ± 114 nmol/ml		212	401	301	258
Ala	alanine	426 ± 179 nmol/ml		116	559	389	597
Val	valine	114 ± 36 nmol/ml		32.2	57.1	68.8	112
Tyr	tyrosine	107 ± 44 nmol/ml		67.5	118	95.7	134
Asp	aspartic acid	45.4 ± 20.2 nmol/ml		22.2	28.5	38.0	43.9
Glu	glutamic acid	318 ± 75 nmol/ml		143	197	271	249
Orn	ornithine	112 ± 55 nmol/ml		53.2	66.2	77.0	97.0
COH	free carnitine	24.0 ± 7.3 nmol/ml	10 (-2.0SD)	27.7	19.3	27.4	30.2
C2	acetyl carnitine	23.6 ± 7.3 nmol/ml		10.9	9.8	22.7	30.5
C3	propionyl carnitine	1.88 ± 0.69 nmol/ml		0.47	0.72	6.92	8.94
C4	butyryl carnitine	220 ± 79 pmol/ml		165	2198	262	266
C5	isovaleryl carnitine	118 ± 80 pmol/ml	1000 (+11.0SD)	103	667	118	161
C5:1	tiglyl carnitine	10.1 ± 4.3 pmol/ml	100 (+20.7SD)	7.3	3.7	6.1	15.4
C6	hexanoyl carnitine	44.3 ± 21.9 nmol/ml		62.9	713	48.1	41.8
C5OH	3-OH-isovaleryl carnitine	112 ± 35 pmol/ml	1000 (+25SD)	145	71.0	137	155
C8	octanoyl carnitine	65.3 ± 30.1 pmol/ml	300 (+7.8SD)	49.9	616	57.8	76.9
C10:1	decanoyl carnitine	96.1 ± 32.9 pmol/ml		105	136	85.5	123
C10	decanoyl carnitine	133 ± 73 pmol/ml	500 (+5.1SD)	85.3	927	95.8	126
C5DC	glutaryl carnitine	47.9 ± 20.6 pmol/ml	250 (+9.8SD)	44.2	265	34.0	59.6
C12	dodecanoyl carnitine	111 ± 51 pmol/ml		66.1	987	74.7	83.9
C14:1	myristoyl carnitine	79.4 ± 37.6 pmol/ml	400 (+7.1SD)	36.3	989	68.0	56.6
C14	myristoyl carnitine	202 ± 60 pmol/ml		138	2341	296	297
C14OH	3-OH-myristoyl carnitine	16.3 ± 6.2 pmol/ml		11.8	27.8	14.4	27.1
C16:1	palmitoleyl carnitine	123 ± 54 pmol/ml		39.3	1167	127	107
C16	palmityl carnitine	2.36 ± 0.80 nmol/ml	8.0 (+6.6SD)	0.76	10.1	3.1	2.6
C16OH	3-OH-palmityl carnitine	16.4 ± 6.6 pmol/ml		8.7	38.7	17.2	20.7
C18	steroyl carnitine	820 ± 259 pmol/ml	3000 (+8.4SD)	694	2762	1295	907
C18:1OH	3-OH-oleyl carnitine	14.8 ± 6.5 pmol/ml		7.5	33.3	20.0	21.1
COH / (C16+C18)		8.20 ± 5.40	100 (+17.0SD)	1.50	19.0	6.17	8.72
C3 / C2	propionyl carnitine / acetyl carnitine	0.081 ± 0.073	0.25 (+2.3SD)	0.04	0.07	0.30	0.29

PKU ; フェニルケトン尿症, GA2 ; グルタル酸尿症 2 型, PA ; プロピオン酸血症

表 2 2006 年度タンデム検査における要再採血例内訳

指標	疑い疾患名	初回採血 要再採血 例数		二回目採血 要再採血 例数 <sup>*1</sup>
Cit	ソルリ血症	8		1
COH	加ニチトランス <sup>o</sup> -タ異常症	15		1
C5	イ吉草酸血症	11	(9 例は抗生剤の使用による偽陽性)	1
C5DC	ケルル酸尿症 1 型	3	(1 例はかつ C10・C8 高値)	
C10 かつ C8	ケルル酸尿症 2 型	9	(1 例はかつ C5DC 高値, 1 例はかつ C14:1 高値)	1
C14:1	極長鎖 <sup>o</sup> ル CoA 脱水 素酵素欠損症	3	(1 例はかつ C10・C8 高値)	
C3/C2	プロ <sup>o</sup> ピ <sup>o</sup> 酸血症 メチル <sup>o</sup> 酸血症	6	(2 例がその後要精査)	
要再採血数 合計		53 <sup>*2</sup>		4

\*1 初回タンデム検査において正常であったが、低体重出生等の理由で再採血時に陽性を示したもの

\*2 複数項目で陽性となったものの重複を含まない数

表 3 2006 年度のタンデム検査、及びタンデムスによるアミノ酸代謝異常症 3 疾患の要精査例内訳

症例	出生時体重	検査分類 疑い疾患名	初回検査 指標検査値 (採血日齢；採血時体重)	再採血検査 指標検査値 (採血日齢；採血時体重)	精査結果 備考
	1,052g	フェニル <sup>o</sup> ト <sup>o</sup> 尿症	Phe; 1,454nmol/ml (17 days ; 967g)	< 直接精査 >	古典的フェニル <sup>o</sup> ト <sup>o</sup> 尿症
	2,184g	フェニル <sup>o</sup> ト <sup>o</sup> 尿症	Phe; 124.3nmol/ml (4 days ; 2,142g)	Phe; 181.1nmol/ml (15 days ; 2,730g)	良性持続性高 Phe 血症 (フォロー中)
	3,102g	ケルル酸尿症 2 型	C10 ; 1,058pmol/ml C8 ; 667pmol/ml (5 days ; 2,982g)	< 直接精査 >	ケルル酸尿症 2 型
	3,484g	加ニチトランス <sup>o</sup> -タ 異常症	COH ; 6.0nmol/ml (4 days ; 3,280g)	COH ; 6.8nmol/ml (11 days ; 3,680g)	一過性の低値
	2,516g	プロ <sup>o</sup> ピ <sup>o</sup> 酸血症 メチル <sup>o</sup> 酸血症	C3/C2 ; 0.30 (4 days ; 2,540g)	C3/C2 ; 0.51 (12 days ; 2,934g)	プロ <sup>o</sup> ピ <sup>o</sup> 酸血症
	2,775g	プロ <sup>o</sup> ピ <sup>o</sup> 酸血症 メチル <sup>o</sup> 酸血症	C3/C2 ; 0.29 (4 days ; 2,818g)	C3/C2 ; 0.50 (12 days ; 3,260g)	プロ <sup>o</sup> ピ <sup>o</sup> 酸血症

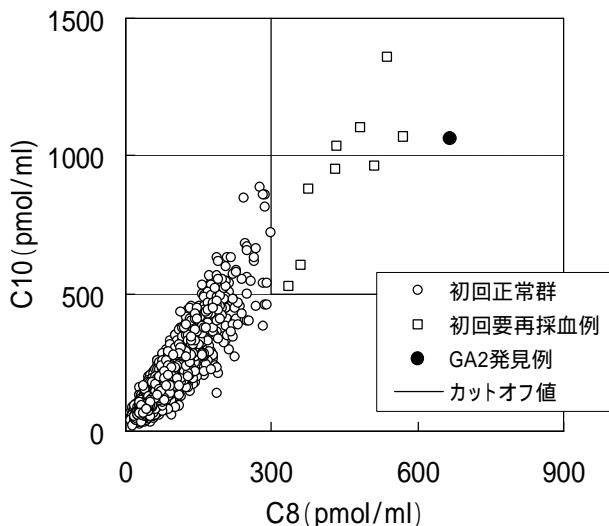


図1 GA2発見例及び再採血例におけるC8,C10値プロット

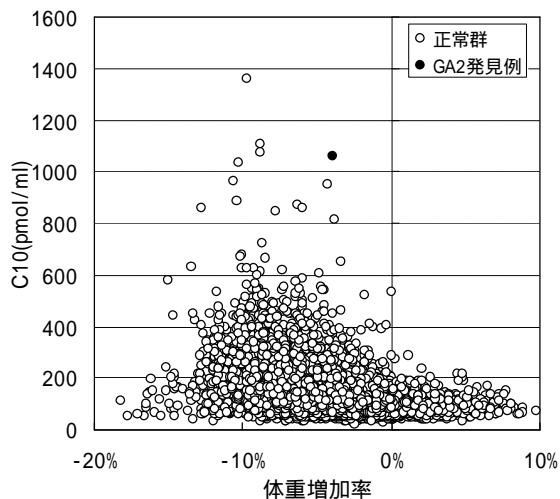


図2 C10値の対体重増加率プロット(採血日齢4~6日)

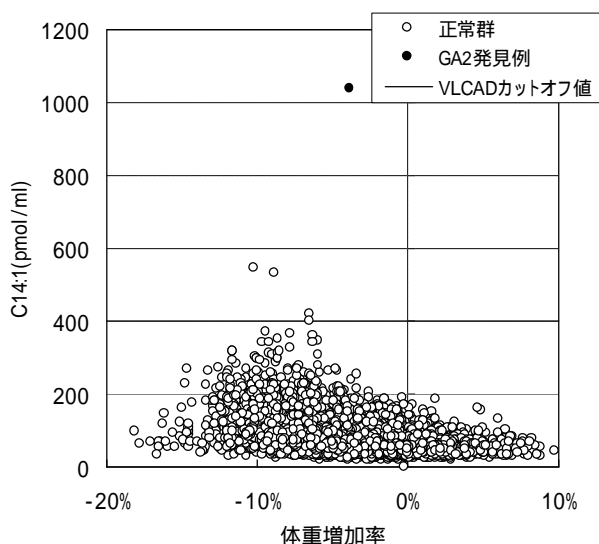


図3 C14:1値の対体重増加率プロット(採血日齢4~6日)

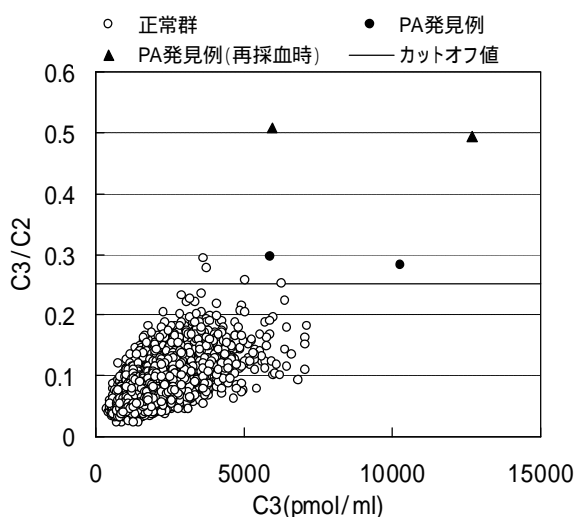


図4 PA発見例及び正常群におけるC3, C3/C2プロット

## 4 考察

### 4-1 検査結果について

タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングの試験研究においては、前年に引き続いて、新生児代謝異常症等検査受検総数の98.6%にあたる15,897例がタンデム検査を希望した。また、前年度に引き続いて、産科医療機関からの申込書の回収率は100%であったことと合わせて、2005年度から運用を開始した札幌市の新生児マス

クリーニングシステムは、順調に機能していると考えられる。

2006年度は、タンデム検査において3名の患者を発見し、早期治療開始に貢献することができた。これらの症例は、いずれも2004年度以前の新生児代謝異常症等検査においては見出すことができなかったものである。発見した3名のうち1名は死亡したが、他の2名は治療により、順調に症状を回避していることから、タンデム検査の有用性

は高く、意義が大きいと考えられる。

タンデム検査における再採血率は昨年度より0.02%減少し、0.36%(57/15,897)であった。減少したとはいえ、この再採血率は見出される疾患頻度に比して、概してやや高い傾向がある。しかし、このうちGA2を疑った9例中8例は、採血までの体重減少が平均(約3.9%)に比して顕著だった(8例の平均は約7.9%)もので、このことから出生直後の一過性の飢餓状態によって、脂肪酸酸化異常症の疾患群の関連指標が高値を示したものと予測された。体重増加率別にC10及びC14:1の各測定値をプロットした図2及び図3から、体重減少率の大きい児で偽陽性を示しやすい傾向が明らかである。また、イソ吉草酸血症を疑った11例のうち9例は、投与された抗生剤の影響によるものだった。

このように、現状の検査法では、偽陽性の理由がある程度明らかなものも、再採血により正常を確認する必要があるため、タンデム検査において再採血率がやや高めであることは、やむをえない面もあると思われる。参考までに、同様の研究を行っている他施設の再採血率を比較すると、福井大学が0.1%<sup>9)</sup>(ただしこの値は抗生剤の影響によるものを除いたもの)、熊本県化学血清療法研究所が0.76%<sup>10)</sup>、島根大学が0.48%<sup>11)</sup>、東京都予防医学協会が0.52%<sup>12)</sup>となっており、これらと比較した場合、札幌の再採血率は一概に高いとは言えない。しかし、各施設とも再採血率の低下に取り組んでおり、今後の検討課題の一つである。

#### 4-2 カットオフ値について

本研究事業における検討項目の一つとして、適切なカットオフ値の設定に関する検討があるが、今回タンデム検査で発見された3症例の測定結果からカットオフ値について再度検討を行った。

グルタル酸尿症2型(GA2)では、研究開始当初はC10を単独の指標として用いた。しかし、再採血率が非常に高かったため、C10値とC8値を併用するカットオフ値に変更した<sup>13)</sup>。今回の発見例は、このC10値とC8値を併用するカットオフ値で見出すことができたことから、このカットオフ値は適切であると考えられた(図1)。また、当該患者の場合、複数の指標において測定値がカットオフ値を上回る傾向を示しており、今回の発見例でも、極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損

症(VLCAD)の指標であるC14:1において、むしろC8・C10と比しても、正常群から大きく乖離した測定値を示した(図3)。このことから、GA2患者の場合、指標としているC8・C10以外にも、複数の脂肪酸酸化異常症疾患関連の指標がカットオフ値を上回るという特徴<sup>14)</sup>があることが確認できた。

プロピオン酸血症は、タンデム検査においてメチルマロン酸血症と共通の指標を用いるが、その指標としてはC3値、もしくはC3/C2比が用いられる<sup>15)</sup>。今回発見した2例のうち1例はどちらの指標を用いても容易に見出すことができるが、残りの1例は、C3/C2比を用いた方が感度よく見出すことができるものだった(図4)。加えて再採血時に顕著な増加を示したのはC3/C2比の方であり、これらのことから、プロピオン酸血症の指標としてはC3/C2比を用いるべきであり、かつ0.25というカットオフ値も適切であると考えられた。

#### 4-3 フォロー検査体制について

代謝異常症を疑って精査となった全例において、札幌市が委嘱しているコンサルタント医の協力と要請に基づき「代謝異常症依頼検査」によりフォロー検査を実施した。今回の発見例では、特にプロピオン酸血症疑い例において、ガスクロマトグラフ質量分析法(GC/MS)による尿中有機酸の定性により、メチルマロン血症を否定し、プロピオン酸血症の診断を補助することができた。このように、タンデム質量分析計によるスクリーニングにおいて精査後のフォロー検査は、疾患の早期確定や、病型診断に寄与する重要なものとなることが示された<sup>6)</sup>。

#### 4-4 発見頻度について

先行する重松らのスタディでは、アミノ酸代謝異常症3疾患を含めたタンデムマスによる検査での疾患の発見頻度はおよそ1万人に1人と報告されている<sup>9)</sup>。これまで、私たちが実施した検査では、およそ3万1千人を検査し、PKU;1例、GA2;1例、PA;2例の計4例を見出すことができた。このことから発見頻度はおよそ8千人に1人と概算され、重松らの頻度とほぼ同等な結果が得られた。

#### 4-5 今後の方針について

今回タンデム検査により見出した発見例3例のうち2例は後の治療とあいまって、患者のQOLの向上に活かせるものだった。このことからタンデム検査は十分に有用なス

クリーニングであると考えられる。今後は事業化も視野に入れ、検討を継続する。

## 5. 文献

- 1) 野町祥介、本間かおり、花井潤師 他：札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのための体制整備，日本マス・スクリーニング学会誌，16(1)，65-72，2006.
- 2) 野町祥介、阿部敦子、太田 優 他：タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの試験研究 2005年度実施成績，札幌市衛生研究所報，33，42-49，2006.
- 3) 阿部敦子、野町祥介、花井潤師 他：タンデムマスによる新生児スクリーニングの基礎的検討，厚生労働科学研究費補助金 子ども総合研究事業 わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究，90-97，2005
- 4) 野町祥介、阿部敦子、坂上絵理奈 他：タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのシステム構築 (1)体制整備，札幌市衛生研究所報，32，54-61，2005.
- 5) 本間かおり、花井潤師、野町祥介 他：札幌市におけるタンデム質量分析計によるマス・スクリーニングのためのデータ処理システム (1) 事務処理システム，日本マス・スクリーニング学会誌，16(1)，73-77，2006.
- 6) 田上泰子、花井潤師、野町祥介 他：ハイリスク・スクリーニングにおいてGC/MSとタンデム質量分析計の有用性を示した2診断例，札幌市衛生研究所報，33，29-37，2006.
- 7) Okano Y, Hase Y, DH. Lee et al. Frequency and distribution of phenylketonuric mutations in Orientals, Human Mutation, 216-220, 2005.
- 8) Yorifuji T, Kawai M, Muroi J et al. Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic academia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications, Human Genetics, 111, 161-165, 2002.
- 9) 重松陽介：タンデムマスによるマススクリーニングの効果に関する研究，厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究 平成16~18年度総合研究報告書，18-22，2007.
- 10) 田崎隆二、中村公俊、武田聖子 他：熊本県におけるタンデムマスによるパイロットスタディ状況 (第2報)，厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究 平成18年度研究報告書，89-91，2007.
- 11) 小林弘典、長谷川有紀、遠藤 充 他：島根大学におけるタンデムマスによる新生児マス・スクリーニング 2006年の成績，厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究 平成18年度研究報告書，105-107，2007.
- 12) 北川照男、石毛信之、鈴木 健 他：タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング - 東京都におけるパイロット研究 第3報 - ，厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究 平成18年度研究報告書，92-98，2007.
- 13) 野町祥介、阿部敦子、坂上絵理奈 他：札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング経過報告，厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究 平成17年度研究報告書，100-105，2006.
- 14) Shigematsu Y, Hata I, Nakai A et al. Prenatal diagnosis of organic acidemias based on amniotic fluid levels of acylcarnitines, Pediatric Research, 39, 680-684, 1996.
- 15) Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D et al. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization – tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications, Pediatrics, 111, 1399-1406, 2003

## Pilot Study of Newborn Screening using Tandem Mass Spectrometry in 2006

Shosuke Nomachi, Yu Ota, Erina Sakagami, Tomomi Usui, Noriyuki Ota,  
Masaru Fukushi, Kozo Fujita, Koichi Yano, Masayoshi Nagao<sup>\*1</sup> and Mitsuru Kubota<sup>\*2</sup>

We have been carrying out the pilot study of newborn screening using tandem mass spectrometry in the city of Sapporo since April 2005. From April 2006 to March 2007, 15,897(98.6%) out of 16,120 newborn babies took the pilot screening test with the informed consents of their guardians.

We requested blood samples again in 57 cases for the reexamination and 4 cases required further clinical evaluation by the consultant doctors. Clinical evaluation revealed two patients with propionic acidemia and one patient with glutaric acidemia type 2. Two cases of propionic acidemia have been able to avoid serious symptoms by the early treatment, even though a case of glutaric acidemia died shortly after birth.

We conclude that our newborn screening using tandem mass spectrometry is very useful.