

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 2007年度(3年目)実施成績

野町祥介 小田千恵 杉町安紀 穂積哲彦 花井潤師
福士 勝 矢野公一 長尾雅悦^{*1} 窪田 満^{*2}

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、2007年4月から2008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16,507件(前年度比387件増加)のうち16,303件(98.8%)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2例がプロピオン酸血症、1例がカルニチントランスポータ異常症であり、これらの患児を早期に見出すことができた。また、シトルリン高値により精査となった1例については、現在も精査医療機関においてフォローを行っている。

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¹⁾。本報では前報²⁾に引き続いて、2007年度(3年目)の検査実施成績を報告する。

2. 方 法

検査方法は既報³⁾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月以降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16,507件を

対象とし⁴⁾、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16,303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⁵⁾。

3. 結 果

3-1 タンデムマスによる検査希望率

2007年4月1日から2008年3月31日までの1年間の新生児代謝異常症等検査の受検者数は16,507件(前年度比387件の増加)で、そのうち16,303件がタンデム検査を希望した。検査希望率は前年度及び一昨年度をやや上回り、98.8%だった。また、検査済み検体の10年間保存と研究等への二次利用の承諾率は93.8%(15,458/16,507)で、前年度比で0.2%増であった。

3-2 陽性例

タンデム検査における初回陽性例は41例で、そのうち1例を直接精査、残りの40例を再採血とした。再

*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

採血40例のうち3例が最終的に精査となった。これらの40例の内訳を表1にまとめる。なお、3項目検査においては、5例を再採血（phenylalanine (Phe) 高値3例、methionine (Met) 高値1例、PheかつMet高値1例）としたが、いずれも再採血時の検査でカットオフ値を下回り、正常となった。

3-3 要精査例と発見例

タンデム検査における要精査例の4例（症例 ~ ）の内訳を表2にまとめる。このうち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、2例がプロピオン酸血症、1例がカルニチントランスポータ異常症であった。

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、以下のフォロー検査⁶⁾を行った。

メチルマロン酸血症もしくはプロピオン酸血症を疑った2例については、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、昨年度の発見例²⁾と同様に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。

カルニチントランスポータ異常症を疑った1例については精査医療機関の依頼に基づき、タンデム質量分析計を用いて、尿中のfree carnitine (COH) 及び総アシルカルニチンを測定することでカルニチンクリアランス試験を行った。すなわち、被験者の尿を試料として、これにメタノールを添加することでタンパクを除去したのち、遠心し、上澄みを用いて通常の紙血液を用いたタンデム検査と同様の手法によりプチル誘導体化ののちMultiple Reaction Monitoring (MRM) により測定した。その結果、Renal reabsorption rate for free carnitine (RRFC) は日齢37で45.9%、日齢51で65.1%（正常 $99 \pm 4\%$ ）だった。またRAFCC（総アシルカルニチン / COH 比）は日齢37で0.476、日齢51で0.343、（正常10-98.7）と極めて低く、腎尿細管よりCOHが大量に失われていることが示され⁷⁾、当該疾患の補助診断となった。

シトルリン血症を疑った1例については、現在も血中citrulline (Cit) の微高値傾向が続いているほか、精査後の経過観察中に肝機能異常（GOT 62 IU/l）、血中アンモニアの微高値を示し、今後もフォローを続ける必要がある。

3-5 確定診断

症例 ~ については、精査医療機関において遺伝子診断により確定診断が行われた。その遺伝子型は以下の通り。

- (1) 症例 PCCB遺伝子 Y435C / Y435C⁸⁾
- (2) 症例 PCCB遺伝子 Y435C / ?⁸⁾
- (3) 症例 OCTN2遺伝子 S467C / ?⁹⁾

症例 についてはhetero病変のみでの同定であったが、臨床像及び尿中methylcitrateとglycine (Gly) の増加などの検査所見から診断に至った。

症例 については、本稿執筆の時点では、すべての遺伝子解析を終了していないが、すでに一つのhetero変異が同定されたことに加えて、カルニチンクリアランス試験が異常値を示すという本疾患に特有の検査所見が得られたことから診断に至った。

3-6 発見例の予後

症例 および （プロピオン酸血症）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。

症例 （カルニチントランスポータ異常症）については、精査受診時には1日に数回嘔吐があり痙攣が認められたほか、血中アンモニアも224 $\mu\text{g/dl}$ と高値を示したが、精査医療機関において、カルニチンの投与(400mg/day)と蛋白摂取制限(1g/kg/day)による治療を開始したところ、嘔吐、痙攣が消失し、現在まで良好な経過を辿っている。

表 1 2007 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		最終的に要精査 となった例数
Cit	シトルリン血症	4		1
COH	カルニチントランスポータ異常症	2		1
C5	イソ吉草酸血症	13	(うち 12 例は抗生剤による偽陽性)	
C5DC	グルタル酸尿症 1 型	3	(3 例ともかつ C10・C8 高値)	
C10 かつ C8	グルタル酸尿症 2 型	15	(うち 3 例はかつ C5DC 高値, 1 例はかつ C14:1 高値)	
C14:1	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症	5	(うち 1 例はかつ C10・C8 高値)	
C16	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 欠損症	1		
C3/C2	プロピオン酸血症 メチルマロン酸血症	1		1
要再採血数 合計		40 ^{*1}		3

*1 複数項目で陽性となったものの重複を含まない数

Cit; citrulline COH; free carnitine C2; acetyl carnitine C3; propionyl carnitine C5; isovaleryl carnitine C5DC; glutaryl carnitine C8; octanoyl carnitine C10; decanoyl carnitine C14:1; myristoyl carnitine C16; palmitoleyl carnitine

表 2 2007 年度のタンデム検査の要精査例内訳

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
(女児)	3,090g	プロピオン酸血症 メチルマロン酸血症	C3/C2 ; 0.44 (4 days ; 2,870g)	< 直接精査 >	プロピオン酸血症
(女児)	2,548g	プロピオン酸血症 メチルマロン酸血症	C3/C2 ; 0.31 (5 days ; 2,520g)	C3/C2 ; 0.39 (22 days ; 3,250g)	プロピオン酸血症
(女児)	2,240g	カルニチントランス ポータ異常症	COH ; 6.6nmol/ml (5 days ; 2,026g)	COH ; 6.7nmol/ml (21 days ; 約 2,500g)	カルニチントランス ポータ異常症
(男児)	3,600g	シトルリン血症	Cit ; 46.8nmol/ml (4 days ; 3,538g)	Cit ; 101.6nmol/ml (12 days ; 3,754g)	(現在フォロー中)

表3 2008年4月現在の札幌市におけるタンデム検査の対象疾患とその指標及び再採血、精査基準の概略

主な対象疾患	再採血基準	直接精査基準	備考
シトルリン血症 型	Cit 40nmol/ml	Cit 100nmol/ml かつ Arg低値	再採血において、なおCitがカットオフ近傍であっても、Arg低値がなければ正常とする
シトルリン血症 型			
アルギニン血症	Arg 100nmol/ml		再採血で状況が変わらなければ精査
アルギニニコハク酸尿症	ASA 100nmol/ml		患者ではCitも微高値と考えられる
メチルマロン酸血症 プロピオン酸血症	C3/C2 0.25	C3/C2 0.35	C3が高値であっても、C3/C2 < 0.25で正常とする
グルタル酸尿症 型	C5DC 250pmol/ml	C5DC 400pmol/ml	再採血で状況が変わらなければ精査
グルタル酸尿症 型	C8 300pmol/ml かつ C10 500pmol/ml	C8 300pmol/ml かつ C10 1000pmol/ml かつ C4～C16が全般に高値	体重減少の顕著な新生児の場合、飢餓から偽陽性となり易い傾向がある
イソ吉草酸血症	C5 1nmol/ml	C5 2nmol/ml かつ 抗生剤の未使用を確認	
複合カルボキシラーゼ欠損症 3メチルクロトニルグリシン尿症	C5OH 1nmol/ml	C5OH 2nmol/ml	再採血で状況が変わらなければ精査
ケチオラーゼ欠損症	C5:1 100pmol/ml		同上
中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症	C8 300pmol/ml	C8 500pmol/ml かつ C4、C6、C10:1高値	同上
極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症	C14:1 400pmol/ml		同上
カルニチントランスポータ異常症	COH < 9nmol/ml		同上
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 欠損症	C0/(C16+C18) 100		同上
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 欠損症	C16 8nmol/ml あるいは		同上
カルニチントランスロカーゼ欠損症	C18 3nmol/ml		カルニチントランスロカーゼ欠損症の場合、かつCOH低値

Cit; citrulline Arg; arginine ASA; argininosuccinic acid COH; free carnitine C2; acetyl carnitine C3; propionyl carnitine C4; butyryl carnitine C5; isovaleryl carnitine C5:1; tiglyl carnitine C5DC; glutaryl carnitine C5OH ; 3-OH-isovaleryl carnitine C6; hexanoyl carnitine C8; octanoyl carnitine C10; decanoyl carnitine C10:1; decenoyl carnitine C14:1; myristoyl carnitine C16; palmitoleyl carnitine C18; steroyl carnitine

3-7 試験研究3年間の実績に基づく、再採血、精査等の判断指標

調査研究「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」をすすめるにあたって、私たちは厚生労働省科学研究費補助金：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」において提案されている「新しい新生児マススクリーニング対象疾患の手引き」で示された指標物質とカットオフを参考としてきた。今回、これに3年間に及ぶ当該研究の実施成績を加味し、2008年4月現在の当所における項目別の再採血、精査の判断基準について表3にまとめた。

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、新生児代謝異常症等検査受検総数の98.8%にあたる16,303例がタンデム検査を希望し、一昨年度、前年度に続いて高い検査希望率となった。3年間のタンデム検査実施総例数は47,356例となり、この間の3項目検査を含めた発見患者数は、古典的フェニルケトン尿症1例、プロピオン酸血症4例、グルタル酸尿症 型1例、カルニチントランスポータ異常症1例の計7例で、3年間の総発見頻度は、およそ6,800人に1人程度となった。このうち2007年度は、タンデム検査において3例の患者を発見し、いずれの症例においても早期治療開始に貢献することができた。

2007年度のタンデム検査における再採血数は昨年度より13例減少し、40例(再採血率0.25%)であった。再採血理由の内訳で、グルタル酸尿症 型疑に次いで多かったイソ吉草酸血症の疑いがあった13例のうち12例は、投与された抗生剤の影響によるもので、中には出産前の母体への投与が検査値に影響した例も含まれていた。再採血率はカットオフ値の変更等により、本研究開始当初と比較すると減少しており、本研究がスクリーニングとして適切なものになってきていると言える。

4-2 2007年度発見例について

プロピオン酸血症の2例のうち1例は初回検査でC3/C2比(propionyl carnitine / acetyl carnitine比)が0.44と直接精査基準の0.35を上回り、ただちに精査とした。もう1例は再採血においてもC3/C2の高値傾向が継続したため精査とした。いずれの例も精査時の検査において、2006年度に発見された2例と同様に尿中methylcitrateの増加を確認したことが有力な化学診断の指標となり、その後精査医療機関で遺伝子診断され(うち1例はヘテロ変異のみ同定)、C3/C2高値例における尿中有機酸分析の有用性が確認された。

カルニチントランスポータ異常症例は、再採血検査時に検体に記載された採血時体重から体重増加不良が推測され、栄養状況の影響も考えられたが、採血医療機関への問い合わせにより、記載された採血時体重のデータに不正確な点があったことが確認できた。このため急遽要精査とし、疾患の発見に至った。本例の診断にあたっては、精査医療機関の指示に基づいて行った尿中の総アシルカルニチン及びCOHの測定によるカルニチンクリアランス試験の検査所見がきわめて有用な補助診断の指標となった。これまで当所では、尿中アシルカルニチンの基礎データの収集などは行ってこなかったが、今後は、本例のような場合、補助診断の精度を高めるため、尿中アシルカルニチンの基礎データの蓄積が必要だと考えられた。

4-3 再採血、及び要精密検査基準について

本研究は2005年度の開始当初から、厚生労働省の科学研究費補助金・子ども家庭総合事業研究に所属しながら、当該研究班で定めたカットオフ値等をまとめた手引きに従い進めてきた。今回、私たちはこれに加えて3年間の札幌市の実施内容を踏まえた上で、現段階で適切と考えられる再採血及び精査基準をまとめたものが表3である。

シトルリン血症は、古典型とよばれる 型の場合、シトルリンの高値とともにarginine (Arg) の低値が有用な指標と考えられる。そのため、Citの微高値かが継続する場合であっても、Argの正常値により、除外することができる¹⁰⁾。成人発症型とよばれる 型の場合、必ずしも新生児期にCitが高値とはならないため、すべての病型を見出すことはで

きないが、新生児期の肝機能障害により血中Phe、Met、galactoseなどが特徴的に高値を示す場合があることが知られており、スクリーニング時の検査データを総合的に判断することが重要である^{11,12)}。

アルギニコハク酸尿症は、患者においてはアルギニコハク酸が顕著に増加し、またCitがやや高値、Argがやや低値を示すと考えられるが、スクリーニングの指標としてはアルギニコハク酸だけで十分であると考えられる¹³⁾。

メチルマロン酸血症及びプロピオン酸血症においては前報でまとめたようにC3/C2比を指標とすることで、精度の高いスクリーニングが可能であると考えられる²⁾。

グルタル酸尿症 型は、新生児期の一過性の飢餓から偽陽性が多くなるが、当所の発見例などの場合、主要な指標であるoctanoyl carnitine (C8)、decanoyl carnitine(C10)に加えて、dodecanoyl carnitine (C12)、myristoyl carnitine (C14:1) などの中長鎖域のアシルカルニチンも高値を示していたため、これの測定値も疾患の疑いの強さの指標として有用であると考えられる²⁾。しかし一方で私たちは代謝異常症依頼検査で寛解期には異常な検査所見を認めない当該疾患例も経験していることから、新生児期の検査所見では異常が認められず、発見が困難な例も存在することが考えられる。

中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症は、C8を指標としているが、グルタル酸尿症 型や新生児期の飢餓、あるいは未熟児ミルクなどを使用した場合の高値との判別のため、hexanoyl carnitine (C6) やC8/C10比、C8/C2比等の様々な指標が提案されている¹⁴⁾。しかし一般に欧米に比べて国内での当該疾患の発症頻度は低く^{15,16)}、私たちの検討も十分とはいえない。C8高値例の場合、精査医療機関と連携しながら使用しているミルクの種類、哺乳量などの情報に加え、血糖値、クレアチンキナーゼ値、肝機能関連指標、血中アンモニア濃度などの臨床指標を注意深く観察する必要がある。

複合カルボキシラーゼ欠損症等の指標である3-OH-isovaleryl carnitine (C5OH) は、日齢とともに増加する傾向がある¹⁷⁾ため、低出生体重時などを対象に再採血した場合、新生児に比して高値を示す場合が普通であるので、

今後は日齢依存性のカットオフ値を考慮する余地があると思われる。また、その他にも新生児期のアシルカルニチン類には、その血中濃度が日齢により変動するものが多くある¹⁷⁻¹⁹⁾ため、新生児期のスクリーニングでは、そのような傾向をあらかじめ踏まえておくことも重要であると考えられる。

また、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 欠損症ではPalmitoyl carnitine (C16)、Stearoyl carnitine (C18)とともにOleyl carnitine (C18:1) が指標となるとの報告²¹⁾があり、札幌市でも2007年10月以降、C18:1を測定対象に追加しており、参考指標に加えている。

4-4 今後の方針について

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は3年間で6名の患者の早期発見に貢献し、のちの治療とあいまって子どもの健全な発達に大きく寄与することで、その有用性が認められつつある。一方でタンデム質量分析計による新生児スクリーニング検査については、2007年度から3年間の予定で厚生労働科学研究「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マス・スクリーニング体制の確立に関する研究」班(主任研究者: 島根大学山口清次教授)が組織され、2009年度には全国的な実施等についても報告することが予定されている²¹⁾。札幌市では国の動向も考慮しつつ、本研究を2009年度まで継続し、その後の事業化への礎としたい。

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、太田 優、坂上絵理奈 他：タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの試験研究 2006年(2年目)度実施成績、札幌市衛生研究所報，34，29-36，2007。
- 3) 野町祥介、仲島知美、櫻田美樹 他：タンデム質量分析計による非誘導体化アミノ酸・アシルカルニチンの一斉分析 - 現行ブチル誘導体化法との比較 - ，札幌市衛生研究所報，34，37-47，2007。

- 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) Matsuda I, Ohtani Y. Renal handling of carnitine in children with carnitine deficiency and hyperammonemia associated with valproate therapy, *J. Pediatr.* 109, 131-134, 1986:
- 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) Koizumi A, Nozaki J, Ohura T et al. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency, *Human Molecular Genetics*, 8, 2247-2254, 1999.
- 10) Endo F, Matsubara T, Yanagita K, Matsuda I. Clinical Manifestations of Inborn Errors of the Urea Cycle and Related Metabolic Disorders during Childhood, *Journal of Nutrition*, 134, 1605S-1609S, 2004.
- 11) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M et al. The gene mutated in adult-onset type citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nature Genet* 22, 159-163, 1999.
- 12) Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y et al. Neonatal presentation of adult-onset type citrullinemia. *Hum Genet* 108, 87-90, 2001.
- 13) Rashed MS, Rahbeeni Z, Ozand PT. Screening blood spots for argininosuccinase deficiency by electrospray tandem mass spectrometry, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 30(Suppl 2):170-3, 1999.
- 14) Ho S, Lukacs Z, Hoffmann GF, Lindner M, Wetter T. Feature construction can improve diagnostic criteria for high-dimensional metabolic data in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Clinical Chemistry* 53, 1330-1337, 2007.
- 15) Grosse SD, Khoury MJ, Greene CL et al. The epidemiology of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update, *Clinical Chemistry* 8, 205-212, 2006.
- 16) 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, 平成16~18年度厚生労働科学研究費補助金(子ども総合研究事業)総合研究報告書, 18-22, 2006.
- 17) Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K et al. Age-Related Variations in Acylcarnitine and Free Carnitine Concentrations Measured by Tandem Mass Spectrometry, *Clinical Chemistry* 51, 745-752, 2005.
- 18) Takiyama N, Matsumoto A. Age- and Sex-Related Differences of Serum Carnitine in a Japanese Population, *Journal of the American College of Nutrition*, 17, 71-74, 1998.
- 19) Constantin-Teodosiu D, Young S, Wellock F et al. Gender and age differences in plasma carnitine, muscle strength and exercise tolerance in haemodialysis patients, *Nephrol Dial Transplant*, 17, 1808-1813, 2002.
- 20) Albers S, Marsden D, Quackenbush E et al. Detection of Neonatal Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency by Expanded Newborn Screening With Tandem Mass Spectrometry, *Pediatrics* 107, e103-e107, 2001.
- 21) 重松陽介： タンデムマスによるマススクリーニ

Results of the Pilot Study of Newborn Screening using Tandem Mass Spectrometry in 2007

Shosuke Nomachi, Chie Oda, Aki Sugimachi, Tetsuhiko Hodzumi, Junji Hanai,
Masaru Fukushi, Koichi Yano, Masayoshi Nagao^{*1}, Mitsuru Kubota^{*2}

We have been carrying out the pilot study for newborn screening using tandem mass spectrometry in Sapporo city since April 2005. From April 2007 to March 2008, 16,303(98.8%) babies took the pilot screening tests based on the informed consents got from their guardians.

In 40 cases, we requested 2nd samples, and in 4 cases, we requested clinically evaluation by the consultant doctors.

We detected two patients with propionic academia and one patient with carnitine transporter deficiency. We have been following one case due to persistent hyper citrullinemia. The diagnosed three patients have been able to avoid for serious symptoms by the early treatments. Our pilot study is clarifying the effectiveness of the newborn mass screening using Tandem mass spectrometry.