

Ⅱ. 分担研究報告書

2. 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

分担研究課題：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

分担研究者 重松陽介（福井大学医学部教授）

研究要旨

わが国におけるタンデム質量分析計による新生児代謝異常症マススクリーニングの有用性を実証するために、先行の福井大学だけでなく、島根大学や札幌市、東京都、熊本県の現行マススクリーニング実施機関においても当該パイロット研究を実施すべく、スクリーニング実施体制や発見患者への医療介入実施体制について検討した。即ち、現行のマススクリーニングと当該パイロット研究とを並行して実施するためのシステムが整備され、インフォームドコンセントの書式が整えられ、患者の追跡調査システムも準備された。標準濾紙血を用いて行われた分析機器の条件検討結果については、各検査機関の情報ネットワークを利用して、相互に検証が行われた。これらの検討を踏まえ、後発の検査機関でもスクリーニング研究事業が実施されることとなった。

先行してパイロット研究を実施してきた福井大学では、総計約25万新生児、直近の1年間で約44,700新生児の濾紙血を分析し、累計35名の対象疾患患児を発見し、早期治療を行った。新生児期発症の最重症3例では生命予後が不良であったが、その他の患児では、早期からの医療介入により概ね良好な発育発達が得られている。今後スクリーニング実施地域を全国に拡大することにより、対象疾患を有する児の全体像を更に明らかにでき、本スクリーニングの有用性を実証できると考えられた。

研究協力者

藤田晃三（札幌市衛生研究所）
鈴木 健（東京都予防医学協会）
木村正彦（島根大学医学部小児科）
田崎隆二（化学及血清療法研究所）

ることで、従来のフェニルケトン尿症（PKU）などのアミノ酸代謝異常症のスクリーニングも、高精度で実施できる[2]。欧米での研究では、フェニルケトン尿症（PKU）と中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症（MCADD）の頻度が高く、合わせると発見される対象疾患の約2/3を占めることが明らかにされている[3]。

研究目的

約30の先天性代謝異常症を対象とするタンデム質量分析法による新生児マススクリーニング（タンデムマス・スクリーニング）が世界的に注目され、多くの国や地域で導入されてきている。その背景として、欧米では乳幼児突然死症候群の約5%は先天代謝異常症との報告[1]があり、脂肪酸酸化異常症患者と知らず我が子の突然死を経験した親からマススクリーニングの強い要請がある。また、この新しい分析方法を用い

一方、わが国では、それらの先天性代謝異常症の個別の頻度は希と推定されるものの未だ明らかにされていない。また、希な疾患であるため、様々な医療介入が実施されてはいるものの、早期治療の効果は必ずしも疫学的に実証されていない。1997年より、研究者らは福井県をはじめとする一部地域でこの新しいマススクリーニングの試験研究事業を行ってきたが、これらを解明するに十分なデータは収集できていなかった。

この研究の当該年度の目的は、以上の状況を踏まえ、以下の5項目とした。

(1) タンデム質量分析新生児マススクリーニング事業を、新たに複数の検査機関において拡大実施した場合に派生する技術的問題点を検討する。

(2) 複数のスクリーニング検査機関において精度管理を行い、疑陽性頻度や見逃し例を検討する。

(3) スクリーニング陽性者に対する精密検査システムと発見患者に対する医療支援体制を検討する。

(4) スクリーニング事業の経費について検討し、従来の新生児マススクリーニング事業と比較検討する。

(5) 発見患者の分析により、わが国における対象疾患の頻度や、発見患者に対する新生児期からの早期治療の効果を検討する。

研究方法

福井大学、島根大学、札幌市衛生研究所、東京都予防医学協会、熊本化学及血清療法研究所に設置されているタンデム質量分析計 (MS/MS) を用いて研究が行われた。サンプル処理法やMS/MS分析方法は、既報のもの[4]を参考にして条件検討が行われ、情報交換システムを利用して分析法の標準化が検討された。その分析方法を用いて、各施設において収集した既診断患者の濾紙血などの検体や、米国CDC (Centers for Disease Control and Prevention) より供与された標準濾紙血を分析し、精度などに関してHPLC法などの既存の分析法との比較検討が行われた。

パイロット研究におけるインフォームド・コンセントの取得方法については、先行の福井大学も含め、各々の地域での条件に適合する適切な内容と形式になるよう検討を加えた。特に現行のマススクリーニングと並行してタンデムマス・スクリーニングを施行する検査機関では、両者のシステムを円滑に実施する上で問題点が検討された。発見された患者に対する医療介入システムについても、各地域で担当する医療機関が選定された。本研究が対象とする疾患は希少疾患であり、医療関係者の間においても認知度が低いため、講演会などの啓蒙活動が検討された。

先行する福井大学では、福井県・広島県・徳島県・大阪市などでタンデムマス・スクリーニングを既報通

り継続し、発見患者の確定診断名や治療成績などについて調査した。

要精密検査対象者に対する診断確定法として、GC/MSによる尿有機酸分析、酵素活性測定、DNA解析が、広島大学医学部小児科、京都大学医学部小児科、東北大学医学部、鹿児島大学分子病態生化学、千葉県こども病院、島根大学医学部小児科、金沢医科大学総合医学研究所、福井大学医学部小児科で行われた。

診断された患者は、各地域の大学病院の専門医の元で医学的管理を受けており、その治療効果の判定のための特殊検査は、福井大学医学部小児科で行われた。

研究結果

後発の4施設において自施設の機器を用いた分析方法の検討が完了し、医療機関から同意の得られた濾紙血が入手できる施設では実際に分析が開始され、患者も発見され始めた。

札幌市衛生研究所では、自施設のタンデム質量分析計による分析法の詳細な検討が行われ、その結果は、同じ機種を使用する東京都予防医学協会と化学及血清療法研究所での分析法の検討に利用された。また、濾紙血中アミノ酸定量値のHPLC法との比較検討が行われ、良好な相関が示された。

東京都予防医学協会でも濾紙血中アミノ酸定量値のHPLC法との比較検討などが行われ、同様により相関が示された。

CDC標準濾紙血を利用した精度管理が各施設で行われ、良好な分析精度が確認された。

島根大学では、対象疾患と既に診断されている患者の濾紙血の分析が行われ、メチルマロン酸血症やイソ吉草酸血症では偽陰性になる症例の存在する可能性から、軽症例でのスクリーニングの問題点が指摘された。

札幌市衛生研究所では、また、タンデムマス・スクリーニング試験研究を現行のマススクリーニングと並行して実施するため、対象疾患を確定した上でインフォームド・コンセントの書式を決定し、治療体制・追跡システムを整備した。更にシステムの改善点として、啓蒙用のパンフレットを別途作成し、検査申込書(同意書)を複写式として受付システムを二本立てにし、コンサルタント医師との連携を確立した。

化学及血清療法研究所では、治療体制・追跡システムの確立のため熊本大学小児科と提携し、熊本大学の「先端医療支援」としての承認を受けた。更に、産科医・小児科医に対する教育講演や、地方新聞への紹介記事の掲載などの啓蒙活動が実施された。

先行してパイロット研究を実施してきた福井大学では、総計約25万新生児（直近の1年間で約44,700）の濾紙血を分析し、累計35名の対象疾患患児（直近の1年間で9人）を発見した。直近の1年間で再採血あるいは直接精密検査が必要とされた新生児は44人であり、疑陽性率0.07%、的中率20%と計算された。

これらの患者に対して、対象疾患毎に適切と考えられる早期治療を行った。新生児期発症の最重症メチルマロン酸尿症2例とカルバミルリン酸合成酵素欠損症患児では生命予後が不良であった。神経学的予後では、新生児期発症のアルギニノコハク酸尿症患児は2歳時点でDQ56と遅れが見られ、最軽症型のプロピオン酸血症1患児は5歳時点で言語発達に遅れがみられている。それ以外の症例では良好な発育発達がみられている。特筆すべきは、グルタル酸尿症I型1患者は、早期治療により、乳児期早期の運動機能の遅れが次第に改善し、2歳時点で発達が正常化した[5]。

考察

本年度の研究により、タンデムマス・スクリーニング事業を、新たに複数の検査機関において拡大実施することが可能となった。今後も相互のネットワークを通じて精度管理や事業運用が可能となっている。

スクリーニング陽性者に対する精密検査システムと発見患者に対する医療支援体制については、現在の規模であれば、大学の研究室や附属病院の資源を活用して対応可能と考えられるが、今後更に患者数が増加した場合には、診断確定のための検査法を大学以外の検査機関に普及させていくことも検討すべきであろう。この場合は、検査費用の負担方法についても検討する必要がある。

スクリーニング事業の経費については、今後スクリーニング事業を検査機関で実際に運用していく中で確認していく必要がある。

先行する福井大学でのパイロット研究で既に約25万新生児のスクリーニング実績を挙げている。しかしながら、これでも対象疾患全てにおけるわが国での頻度や早期医療介入の効果を実証するには未だ充分ではないが、後発の検査機関でのスクリーニング事業が軌道に乗ることで、発見患者数も飛躍的に増え、タンデムマス・スクリーニング事業の有用性の実証という本研究の目的は達成できると考えられた。

結論

本年度の研究により、わが国でも2大学・3検査機関によるタンデムマス・スクリーニング研究事業実施体制が構築された。今後、この体制で受検者規模を拡大すれば、わが国においても本スクリーニング事業が対象疾患患者のQOL改善に寄与することを実証できるであろう。

文献

- [1] Marshal, E. Fast technology drives new world of newborn screening. *Science* 2001, 294, 2272-2274.
- [2] Chase, DH et al; Cunningham, G.C. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin. Chem.* 1998, 44, 2405-2409.
- [3] Schoen, EJ et al: Cost-benefit analysis of universal tandem mass spectrometry for newborn screening. *Pediatr.* 2002, 110, 781-786.
- [4] Shigematsu, Y et al: Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J. Chromatogr. B* 2002, 776, 39-48.
- [5] Shigematsu Y, et al: Stable-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric measurement of 3-hydroxyglutaric acid, glutaric acid and related metabolites in body fluids of patients with glutaric aciduria type 1 found in newborn screening. *J Chromatogr B.* (in press)

研究発表

1. 重松陽介：周産期の検体検査とその意味. 先天異常検査. 先天代謝異常. 有機酸代謝. 周産期医学. 34(5) : 736-738, 2004.
2. 重松陽介, 畑郁江, 田中幸枝：発症の予知と疾患の早期発見. タンデム質量分析計による新生児代謝異常マスキング. 小児科. 45(11)増刊号: 1923-1927, 2004.
3. 久保田美穂, 吉井千代子, 渡川美弥子, 柳川順子, 濱川以行, 但馬剛, 西村裕, 小野浩明, 佐倉伸夫, 重松陽介：タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング：広島県における5年間のまとめ. 日本マスキング学会雑誌. 14(3) : 41-44, 2004.
4. 青山友則, 矢澤 生, 杉江秀夫, 重松陽介, 佐倉伸夫, 中瀬浩史：横紋筋融解症を反復した骨格筋型極長鎖アシルCoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症の1例. 脳と神経. 56(1) : 64-68, 2004.
5. 寺岡通雄, 和田智顕, 小倉和郎, 安原伸吾, 喜多村哲朗, 村上暢子, 伊藤滋, 金澤正樹, 重松陽介：長期抗生剤投与により低カルニチン血症を来したと考えられた1例. 日児誌. 108(8) : 1059-1061, 2004.
6. Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y, Kobayashi K, Saheki T, Tagami Y, Takei H, Shigematsu Y, Hata I, Ozaki H, Tokuhara D, Nishimura Y, Yorifuji T, Igarashi N, Ohura T, Shimizu T, Inui K, Sakai N, Abukawa D, Miyakawa T, Matsumori M, Ban K, Kaneko H, Yamano T: Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency. *Pediatr Res.* 56(4) : 608-14, 2004.
7. Yorifuji T, Kawai M, Mamada M, Kurokawa K, Egawa H, Shigematsu Y, Kohno Y, Tanaka K, Nakahata T: Living-donor liver transplantation for propionic acidaemia. *J Inherit Metab Dis.* 27(2) : 205-10, 2004.
8. Shigematsu Y, Hata I, Tanaka Y, Tajima G, Sakura N, Naito E, Yorifuji T: Stable-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric measurement of 3-hydroxyglutaric acid, glutaric acid and related metabolites in body fluids of patients with glutaric aciduria type 1 found in newborn screening. *J Chromatogr B.* (in press)
9. 重松陽介：MS/MS新生児マスキング. 質量分析. (in press)

分担研究課題：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

タンデム質量分析新生児マススクリーニング・パイロットスタディの実績報告

研究要旨

1997年春より開始したパイロットスタディは、実施地域が拡大し、総計約254,300新生児、直近の1年間で約44,700新生児の濾紙血を分析した。この中で累計35名の対象疾患患児を発見し（対象疾患頻度は約1:7,300）、早期治療を行った。新生児期発症の重症型メチルマロン酸尿症患児2名とカルバミルリン酸合成酵素欠損症患児1名は治療にもかかわらず1年以内に死亡した。アルギニノコハク酸尿症患児1名と軽症プロピオン酸血症患児1名で中等度から軽度の発達遅延を認めているが、それ以外の患児では正常発達が得られている。特に高頻度で精神運動発達障害を発症するとされるグルタル酸尿症1型患児の1例では、乳児期早期に見られた運動発達の遅れが早期治療により著しく改善し、2歳時には正常化した。また、多くの脂肪酸酸化異常症患児では飢餓を避けることにより低血糖発作や突然死を免れている。

研究協力者

重松陽介（福井大学医学部看護学科）
畑 郁江（福井大学医学部小児科）

必ずしも疫学的に実証されていない。

欧米での研究では、フェニルケトン尿症（PKU）と中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症（MCADD）の頻度が高く、合わせると発見される対象疾患の約2/3を占めることが明らかになってきているが、わが国では、この研究開始当初には、PKUの頻度は欧米の1/5から1/10であり、MCADDは未だ1例も診断されていなかった。

研究目的

タンデム質量分析法による先天性代謝異常症を対象とした新生児マススクリーニング（タンデムマス新生児スクリーニング）のパイロット研究が欧米やサウジアラビアで始められたのと同時期の1997年に、研究者らは、わが国においても福井県などの一部の地域において同様の研究を開始した[1]。

この研究の目的は、このような状況を踏まえ、以下の5項目とした。

その背景として、乳幼児期以降に発症し診断された先天性代謝異常症患者の治療の困難性と予後の悪さがある一方、同胞検索や出生前診断で新生児期に診断される患者の予後が良好であるといった臨床医療の現場での経験がある。また、欧米では乳幼児突然死症候群の約5%は先天代謝異常症であり、脂肪酸酸化異常症患者と知らず我が子の突然死を経験した親からマススクリーニングに対する強い要請がある。一方、わが国でもインフルエンザ脳症患者の中に先天性代謝異常症と診断された例がある。

(1) タンデムマス新生児スクリーニング事業を一定規模の新生児集団を対象に実施すること

(2) スクリーニング検査システムの精度管理を行い、疑陽性頻度や見逃し例を検討すること

(3) スクリーニング陽性者に対する精密検査システムを検討すること

(4) 発見患者の分析により、わが国における対象疾患の頻度を明らかにすること

(5) 発見患者に対する新生児期からの早期治療の効果を検討すること

このパイロット研究では、約30の先天性代謝異常症を対象疾患とするが、それらの個々の疾患のわが国での頻度は極めて希と考えられているものの未だ確認されておらず、医療介入が行われ一定の効果が上がってはいるものの、希な疾患であるためその治療効果が

研究方法

福井大学医学部に設置されているタンデム質量分析装置TSQ7000に島津製作所製LC装置を接続し、既報[2]の方法でアミノ酸とアシルカルニチンを分析した。暫定的な対象疾患は、有機酸代謝異常症8疾患、脂

脂肪酸酸化異常症8疾患、アミノ酸代謝異常症8疾患の計24疾患（現行マススクリーニングの対象疾患であるPKUなど3疾患を含む）であり、各疾患毎のカットオフ値に基づいて再検査あるいは精密検査の必要性を判定した。

対象者は、福井県、広島県、徳島県、大阪市の医療機関、及びそれ以外の地域の4研究協力医療機関で出生した新生児であり、文書を用いた説明により親権者から同意が得られた児について、濾紙血を分析に供した。説明文には、対象疾患の特徴と予想される効果と危険性が記述され、スクリーニングシステムの有用性を検討する研究事業であること、個人情報保護されること、同意の有無にかかわらず通常の診療に不利な取り扱いを受けないことが明記されている。

現行のスクリーニング濾紙血をこの研究に使用する場合は、地域のスクリーニング検査機関で濾紙血が一部切り離され、福井大学に転送された。

分析結果の報告は、再採血や精密検査の依頼も含め、地域のスクリーニング検査機関を通じて、あるいは直接研究協力医療機関に対して行った。

分析した濾紙血は、約3ヶ月間冷凍庫に保存された後、研究用に必要なものを除き、焼却処分した。

要精密検査対象者に対する診断確定法として、GC/MSによる尿有機酸分析、酵素活性測定、DNA解析などが、広島大学医学部小児科、京都大学医学部小児科、東北大学医学部、鹿児島大学分子病態生化学、千葉県こども病院、島根大学医学部小児科、金沢医科大学総合医学研究所、福井大学医学部小児科で行われた。発見された患者は各地域の大学病院の専門医の元で医学的管理を受け、その治療効果の判定のための特殊検査（尿中・血中有機酸分析、血中アシルカルニチン分析、濾紙血アミノ酸分析）は、福井大学医学部小児科で行われた。

研究結果

直近の1年間で約44,700新生児の濾紙血を分析し、9人の対象疾患患児を発見した。この間に再採血あるいは直接精密検査が必要とされた新生児は44人であり、疑陽性率0.07%、的中率20%と計算された。1997年からの累計では、2004年12月までにスクリーニングした新生児は約254,300人、発見した患者は35人であり、対象疾患患者の頻度は1:7300新生児となった。

この間、パイロット研究当初にMCADD患児1名

表1 MS/MS新生児マススクリーニングで発見された患者とその臨床経過

<対象疾患>	<患者数>	<臨床経過>
<i>(脂肪酸酸化異常症)</i>		
MCAD 欠損症	3	低血糖を伴う急性発症が1例、3例とも正常発達
VLCAD 欠損症	2	2例とも急性発症なく正常発達
SCAD 欠損症	2	2例とも急性発症なく正常発達、無症状の同胞あり
CPT-I 欠損症	1	急性発症なく正常発達
CPT-II 欠損症	1	急性発症なく正常発達
グルタル酸尿症 II 型	2	急性発症なく正常発達
<i>(有機酸代謝異常症)</i>		
メチルマロン酸尿症	3	新生児期発症の重症2患児は1歳までに死亡、B12反応性1患児は急性発症なく正常発達
プロピオン酸血症	7	6例は急性発症なく正常発達、1例（最軽症型遺伝子変異）で言葉の遅れあり
グルタル酸尿症 I 型	3	急性発症なく正常発達
HCS欠損症	1	ビオチン反応型で急性発症なく正常発達
<i>(アミノ酸代謝異常症)</i>		
フェニルケトン尿症	4	全例正常発達、1例はBH4反応型
アルギニノコハク酸尿症	1	新生児期発症で2歳時にDQ56
CPS欠損症	1	新生児期に死亡
シトリン欠損症	4	乳児期に胆汁鬱滞性肝障害、全例正常発達

が技術的な錯誤により精密検査とされず乳児期に急性発症したが、以外に見逃しは無かった。この患児の診断以降、カットオフ値は欧米と比べても最も低いと考えられる値に下げられた。

表1に疾患別患児数とその治療及び臨床経過を示した。欧米とは異なり、最も患者が多かったのはプロピオン酸血症 (PA) であったが、それでも全体の1/5程度であり、PKUとMCADDの合計数と同じであった。このように、わが国では、PA、メチルマロン酸尿症 (MMA)、グルタル酸尿症I型 (GA1) といった有機酸代謝異常症の割合が欧米に比べると多い。また脂肪酸酸化異常症も比較的偏りなく発見されており、マススクリーニング以前に考えられていた頻度よりはるかに高かった。

発見後最長6年間の観察期間において、重症型のMMA 2患者は治療の甲斐無く1歳までに死亡し、また同様に重症型のカルバミルリン酸合成酵素 (CPS) 欠損症患児も新生児期に死亡しているものの、その他の患児の生命予後は良好であった。

神経学的な予後については、新生児期発症のアルギニノコハク酸尿症患児は、新生児期に血中アンモニア高値状態が持続したためか、その後の低蛋白食とアルギニン服用によっても2歳時点でDQ 56と遅れが見られている。最軽症型の遺伝子変異を持ち残存酵素活性が7.5%と比較的高いプロピオン酸血症1患児で、特に重篤な急性発症は経験しなかったにもかかわらず、5歳時点で言語発達の遅れがみられ、DQは80である。

GA1患者は、多くの例で生後6ヶ月から18ヶ月の間に大脳基底核病変を伴った急性発症が見られるが、このパイロット研究で発見された3例は、低蛋白食、カルニチン服用、飢餓時の積極的なブドウ糖輸液療法で治療され、全て急性発症を経験していない。特に、最長2年6ヶ月の観察期間がある1例では、乳児期早期の運動機能の遅れが次第に改善し、2歳時点で発達が正常化した[3]。

要精密検査対象者に対する診断確定法としてのGC/MSによる尿有機酸分析、酵素活性測定、DNA解析は、多くの典型例において、早期の治療法の選択をする上で有用であった。一方、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 欠損症などのカルニチンサイクル異常症や軽症型グルタル酸尿症II型 (GA2) では、診断が確定するまでに長い時間を要した。

考察

タンデムマス新生児スクリーニング・パイロット研究は7年目となり、直近の1年間でも順調に検査実績を積み重ねることが出来た。この研究の中で、実施地域が限られているのでわが国の一般的な患者頻度を反映していない可能性があるものの、欧米とは異なる患者スペクトルを明らかにすることが出来、また早期発見された患児への医療介入により、最重症型患児を除き、概ね良好な治療効果が得られることも明らかに出来た。

この限定的なパイロット研究では、発見された患者は各地域の大学病院の専門医の元で医学的管理を受けており、その治療効果の判定のための特殊検査は、福井大学医学部小児科が無料で請け負っている。更に、診断確定のための検査も無料で研究的に行われている。このような研究的な検査システムが、新生児マススクリーニングシステムにとって必ずしも適切であるとは限らないので、経済的な問題も含め、今後検討が必要であろう。

タンデムマス新生児スクリーニングの経済的な側面としては、これまでのパイロットスタディは大学で行われてきたので、人件費や設備投資を含めた検査費用が厳密には検討できていない。また、発見された患児への医療費や家族への負担を含めた費用対効果の検討もなされていない。今後このような点についても更に検討していく必要がある。

結論

タンデムマス新生児スクリーニング・パイロット研究により、早期からの医療介入によりQOLの改善が可能と考えられる代謝異常症が、これまで考えられていた以上に数多く発見され、良好な治療効果が得られている。今後、大規模なパイロットスタディを行う中で、費用対効果に関する疫学調査も含め、更にその有用性を検討すべきであると考えられた。

文献

- [1] Shigematsu Y, et al: Modifications in electrospray tandem mass spectrometry for a neonatal-screening pilot study in Japan. J Chromatogr B 731:97, 1999.
- [2] 重松陽介, 他: タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常マス・スクリーニング, スクリーニング地域拡大と患者検体測定による知見の蓄積. 日本マス・スクリーニング学会誌. 11:57, 2001.

[3] Shigematsu Y, et al: Stable-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric measurement of 3-hydroxyglutaric acid, glutaric acid and related metabolites in body fluids of patients with glutaric aciduria type 1 found in newborn screening. *J Chromatogr B*. (in press)

研究発表

1. 重松陽介：周産期の検体検査とその意味. 先天異常検査. 先天代謝異常. 有機酸代謝. 周産期医学. 34(5) : 736-738, 2004.
2. 重松陽介, 畑郁江, 田中幸枝：発症の予知と疾患の早期発見. タンデム質量分析計による新生児代謝異常マスキング. 小児科. 45(11)増刊号: 1923-1927, 2004.
3. 久保田美穂, 吉井千代子, 渡川美弥子, 柳川順子, 濱川以行, 但馬剛, 西村裕, 小野浩明, 佐倉伸夫, 重松陽介：タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング：広島県における5年間のまとめ. 日本マスキング学会雑誌. 14(3) : 41-44, 2004.
4. 青山友則, 矢澤 生, 杉江秀夫, 重松陽介, 佐倉伸夫, 中瀬浩史：横紋筋融解症を反復した骨格筋型極長鎖アシルCoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症の1例. 脳と神経. 56(1) : 64-68, 2004.
5. 寺岡通雄, 和田智頭, 小倉和郎, 安原伸吾, 喜多村哲朗, 村上暢子, 伊藤滋, 金澤正樹, 重松陽介：長期抗生剤投与により低カルニチン血症を来したと考えられた1例. 日児誌. 108(8) : 1059-1061, 2004.
6. Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y, Kobayashi K, Saheki T, Tagami Y, Takei H, Shigematsu Y, Hata I, Ozaki H, Tokuhara D, Nishimura Y, Yorifuji T, Igarashi N, Ohura T, Shimizu T, Inui K, Sakai N, Abukawa D, Miyakawa T, Matsumori M, Ban K, Kaneko H, Yamano T: Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency. *Pediatr Res*. 56(4):608-14, 2004.
7. Yorifuji T, Kawai M, Mamada M, Kurokawa K, Egawa H, Shigematsu Y, Kohno Y, Tanaka K, Nakahata T: Living-donor liver transplantation for propionic acidemia. *J Inherit Metab Dis*. 27(2):205-10, 2004.
8. Shigematsu Y, Hata I, Tanaka Y, Tajima G, Sakura N, Naito E, Yorifuji T: Stable-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric measurement of 3-hydroxyglutaric acid, glutaric acid and related metabolites in body fluids of patients with glutaric aciduria type 1 found in newborn screening. *J Chromatogr B*. (in press)
9. 重松陽介：MS/MS新生児マスキング. 質量分析. (in press)

分担研究課題：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

新生児濾紙血を用いたチロシン血症 1 型のマス・スクリーニングの試み

研究要旨：新生児濾紙血を用いたチロシン血症 1 型のマス・スクリーニングの方法について検討した。1 次検査として MS/MS 法による血中チロシン濃度測定、2 次検査として spectrophotometric microassay 法による血中サクシニルアセトン濃度測定を用いて実施可能と考えられたが、カットオフ値、気温の影響などについての検討が必要である。

研究協力者

畑 郁江（福井大学医学部小児科、助手）
重松陽介（福井大学医学部看護学科、教授）

A. 研究目的

チロシン血症 1 型(HT1)は、フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼの欠損により生後早期より重篤な肝細胞障害、腎尿管障害を来す疾患である。肝不全への進行、肝細胞癌の発生がみられた場合は、肝移植が唯一の治療法であった。しかし近年、2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione(NTBC)の投与が臓器障害の進行阻止、肝移植の回避に有効であることが報告され、新生児マス・スクリーニングによる早期診断、早期治療の重要性が指摘され、欧米においてはすでに実施されている。我々は、診断時すでに肝不全を呈し、NTBC 無効であった HT1 の 4 ヶ月女児例を経験した。この症例の新生児期の濾紙血中チロシン濃度が高値を示していたことから、新生児マス・スクリーニングの必要性を痛感した。医従って今回の研究では、HT1 のマス・スクリーニングを、新生児濾紙血を利用して実施する方法について検討する。

B. 研究方法

1. 新生児濾紙血中チロシン濃度の検討

現行の新生児マス・スクリーニングを受けた症例のうち、当科で行っている MS/MS 法による先

天代謝異常症スクリーニングに対する同意を得られたものを対象とした。MS/MS 法により、濾紙血中チロシン濃度を測定した。

2. spectrophotometric microassay 法による濾紙血中サクシニルアセトン (SA) 濃度の測定

Schulze らの報告した spectrophotometric microassay 法を改変して用いた。96 穴マイクロプレート上で乾燥濾紙血から血液を抽出し、反応基質である δ -アミノレブリン酸 (δ -ALA) を加えて 4 時間反応させた。反応停止後遠心し、その上清のみを別のマイクロプレートに移し、発色液 (modified Ehrlich reagent) を加えると、 δ -ALA から産生されるポルフォビリノーゲンがピンク色に発色するため、550 nm にて吸光度を測定した。SA は δ -ALA dehydratase 活性阻害作用を持つため、既知の濃度の SA を含む濾紙血をスタンダードとして用いることで、サンプルの血中 SA を算出した (図 1)。

3. HT1 患者の濾紙血中 SA 濃度

当科で経験した HT1 症例の経過中に採取保存した濾紙血について、血中 SA 濃度を測定した。

4. 保存温度による測定値への影響の検討

同一の濾紙血検体を 37°C、室温、4°C で 1~14 日間保存し、測定値の変化を検討した。

5. 倫理面への配慮

検体の使用にあたっては、文書による説明を行い、文書による同意を取得した。

C. 研究結果

1. 新生児濾紙血中チロシン濃度

新生児濾紙血 6144 検体のチロシン濃度は、 102 ± 36 nmol/ml であった。そのうち、200 nmol/ml 以上が 113 検体 (1.8%)、300 nmol/ml 以上が 20 検体 (0.33%) であった。

2. HT1 患者の濾紙血中 SA 濃度

当科の HT1 症例における濾紙血中 SA 濃度は、診断時に著しい高値を示していたが、NTBC 治療開始後低下した (図 2)。これは、尿中 SA 濃度の変化と一致していた。また、患児の生後 5 日目の濾紙血中 SA 濃度も高値であった。

3. 保存温度による測定値への影響 (図 3)

4°C 保存では、測定値への影響はほとんどなかった。室温では、1 週間で前値の約 80%、2 週間で約 70% 程度に低下した。更に、37°C では、1 日で約 70% に低下し、以後も急速な低下を示した。

D. 考察

新生児期には生理的に一過性高チロシン血症を示すものが多いといわれているが、今回の検討でも正常新生児の濾紙血中チロシン濃度は、比較的高値のものが多く存在した。しかし、HT1 患者でも血中チロシン濃度のそれほど高くない例 (200 nmol/ml 前後) が報告されているため、血中チロシン濃度のみで HT1 のスクリーニングを行うことは困難である。従って、MS/MS 法において血中チロシン濃度が比較的高値を示した検体について、2 次検査を加える方法を検討した。

2 次検査の方法としては、血中 SA 濃度測定が確実と考えられ、濾紙血を MS/MS 法で測定する方法も報告されているが、測定の簡便性を考慮して、spectrophotometric microassay 法を用いた。我々が用いた方法により、比較的簡便かつ正確に測定することが可能であった。

当科の HT1 症例の濾紙血 SA 濃度は、尿中 SA 濃度と一致した変動を示し、また、新生児期の検体ですでに高値であった。従って、同じような急性の経過をとる症例については、この方法でスクリーニングできる可能性が考えられる。しかし、

症例の経過や栄養法などによって偽陰性となることも否定できず、今後検討を行うべきである。

spectrophotometric microassay 法の問題点として、高温下での δ -ALA dehydratase 活性低下による偽陽性の発生が指摘されていたが、今回の検討においても、37°C での保存により急速な吸光度低下がみられた。夏季の検体では、炎天下での郵送により、偽陽性数が増加する危険性があり、注意が必要である。

E. 結論

HT1 の新生児マス・スクリーニングとして、新生児濾紙血を用いた MS/MS 法によるチロシン濃度測定と spectrophotometric microassay 法による SA 濃度測定は、実施可能な方法と考えられた。今後、実際に測定を行い、1 次・2 次検査それぞれのカットオフ値を調整していくとともに、季節による陽性数の変動、偽陰性例の有無などについて検討を加えていく予定である。

参考文献

1. Holme E, Lindstedt S: Neonatal screen for hereditary tyrosinemia type I. *Lancet* 340: 850, 1992.
2. Holme E, Lindstedt S: Tyrosinemia type I and NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). *J Inher Metab Dis* 21: 507-517, 1998.
3. Schulze A, Frommhold D, Hoffmann GF, Mayatepek E: Spectrophotometric microassay for δ -aminolevulinic acid dehydratase in dried-blood spots as confirmation for hereditary tyrosinemia type I. *Clin Chem* 47: 1424-1429, 2001.

図1 スタンダードカーブ
(spectrophotometric microassay)

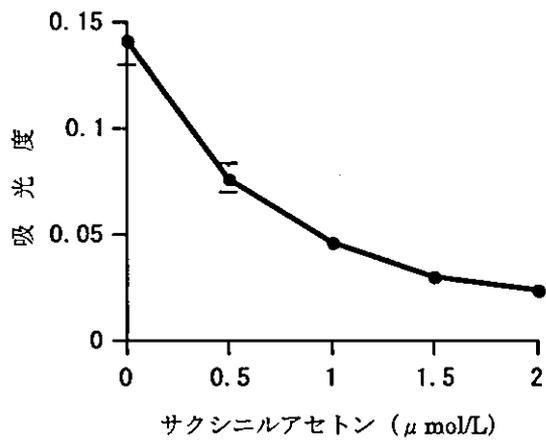
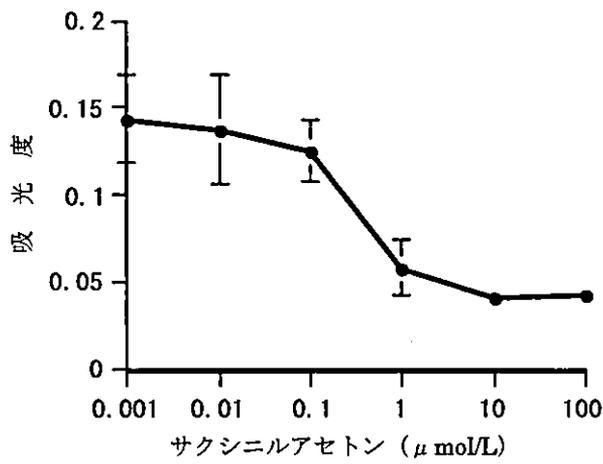


図2 当科の HT1 症例のサクシニルアセトン値

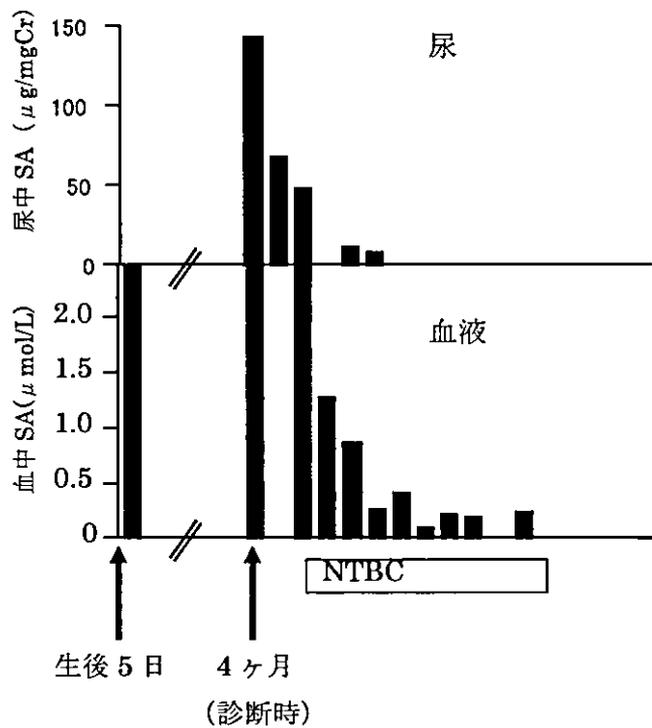
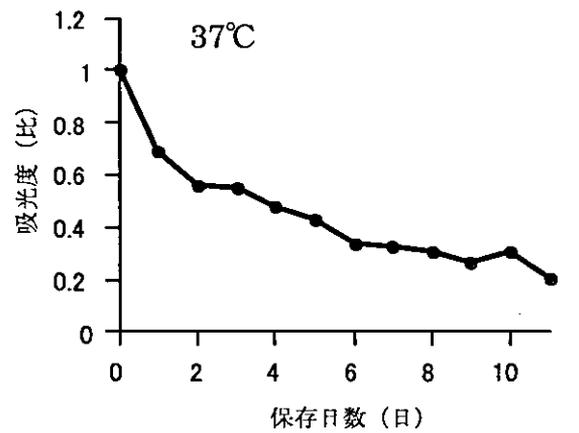
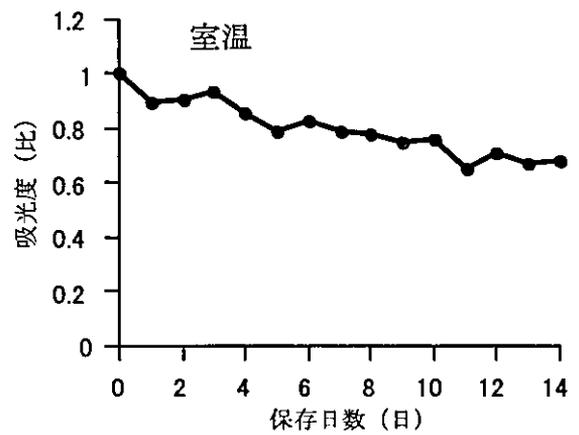
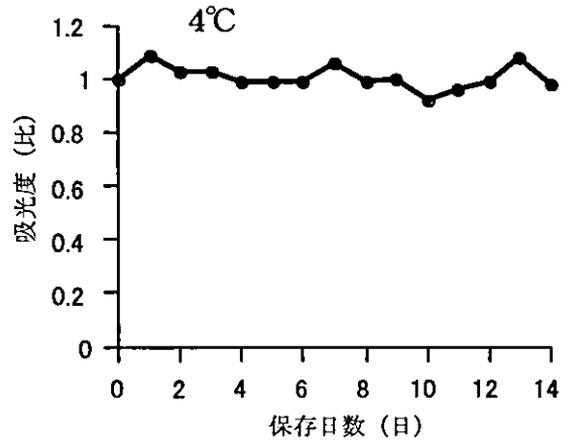


図3 保存温度による測定値の変化



分担研究課題：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

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

研究要旨

札幌市において、2005年4月からタンデムマス法による新生児スクリーニングのパイロットスタディを開始するにあたり、分析条件、前処理法の検討と現行のHPLC法との比較を行った。ヒツジ血液と生理食塩水に溶かしたアミノ酸等の標準液を混合し調製した乾燥ろ紙血液により添加回収試験を行ったところ、回収率はアミノ酸では40～80%、アシルカルニチンでは60～80%で、抽出溶媒の水分含量を上げるとアミノ酸の回収率が多少改善された。正常検体の現行法との比較の結果、分布が両法で多少異なっていたが、カットオフ値等に修正を加えれば、マススクリーニングに十分使用可能であると考えられる。

研究協力者

阿部敦子、野町祥介、花井潤師、田上泰子

水嶋好清、福士勝、藤田晃三

（札幌市衛生研究所）

重松陽介（福井大学看護学科）

研究目的

タンデムマスを用いた新生児スクリーニングの分析方法を確立する。

研究方法

測定機器はQuatromicroAPI (Waters)、送液装置として2795 (Waters)を用いた。試薬では、安定同位体標準物質はSetA, SetB (Cambridge Isotope Lab, Inc.)、10%塩酸ブタノール試薬はガスクロマトグラフィー誘導体化用（半井）、アセトニトリル及びメタノールは液クロ用（和光純薬、関東化学）を用いた。添加回収試験には、アミノ酸、アシルカルニチンの特級品（和光純薬、Sigma）とヒツジ保存血液（和光純薬）を用いた。

1. 測定条件の検討

プリカーサーイオンの質量電荷比 (m/z)、コーン電圧、プロダクトイオンの m/z 、コリジョン電圧は、アミノ酸等をブチル化した後、10nmol/mL程度

の濃度となるように80%アセトニトリルで溶かし、マスキャンとプロダクトキャンにより最適な条件を設定した。

2. ブチル化条件の検討

複数の正常検体の乾燥ろ紙血液ディスクを同位体内部標準溶液で抽出した後混合した溶液を用い、異なる条件でブチル化して、その同位体内部標準物質の感度を比較した。

3. 抽出液の水分含量の検討と添加回収試験

アミノ酸はバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、アルギニン、シトルリン及びオルニチン、アシルカルニチンはC0, C2, C8, C14, 及びC16の標準物質を生理食塩水に溶かし、濃度既知の混合溶液を調製した。これをヒツジ血液に添加して混合し、ろ紙にスポットして室温で放置し、乾燥ろ紙血液を調製した。別に、安定同位体の内部標準を含むメタノール溶液を水分含量だけを変えて3種類調製し、先に作成した乾燥ろ紙血を抽出後、1, 2で設定した条件でブチル化、測定を行い、回収率を比較した。

4. 正常検体995件を現行のHPLC法¹⁾とタンデムマス法（同位体内部標準を含む抽出液の水分

含量は0.06%とした)の両方で測定し、その分布と相関を検討した。

結果及び考察

1. 測定条件は、表1の通りとした。

2. プチル化条件は、アシルカルニチンでは、60℃5分で十分な感度を得られたが、アミノ酸の反応が遅いことを考慮し、60℃15分とした。塩酸ブタノールの量は60μLとした。

3. 添加回収試験の結果を表2に示した。アミノ酸では、抽出液の水分含量が少ないと回収率が低かった。アシルカルニチンのC14, C16では、高濃度を添加した場合、回収率が100%を超えるものもあり、真の濃度より高い値が出ていると予想された。C0ではすべての条件で回収率が100%を超えていた。これは、他のアシルカルニチンが乾燥

ろ紙血液の調製中、又は前処理の過程で分解しているためと考えられた。

4. 正常検体のHPLC法との相関及び分布

図1～図10にタンデムマス法とHPLCによる測定値の相関と分布を示した。相関係数は0.55(メチオニン)～0.94(チロシン)で、HPLC法とタンデムマス法では分布に若干の差が見られた。

結論

カットオフ値等について若干の修正を加える必要があるが、本法はスクリーニングに使用可能であると考えられる。

参考文献

- 1) 田上泰子ら 札幌市衛研年報 29,31-37 (2002)

表1 MRMのメソッド

物質名	ブリーク m/z	ブリーク外 m/z	コーン電圧	コリジョン電圧
グリシン	131.1	73.0	20	10
グリシン 15N, 13C2	134.1	78.1	20	10
アラニン	146.1	44.0	20	15
アラニン d4	150.1	47.9	20	15
バリン	174.3	55.0	20	30
バリン d8	182.2	62.0	20	30
ロイシン+イソロイシン+ヒドロキシプロリン	188.3	86.1	20	15
オルニチン	189.3	70.0	20	25
オルニチン d2	191.2	72.0	20	25
ロイシン d3	191.2	89.1	20	15
メチオニン	206.3	104.0	20	15
メチオニン d3	209.2	107.2	20	15
フェニルアラニン	222.3	120.1	20	15
フェニルアラニン d5	227.2	125.2	20	15
アルギニン	231.2	70.0	30	25
シトルリン	232.3	70.0	20	20
シトルリン d2	234.2	72.1	20	20
アルギニン d4, 13C1	236.2	75.0	30	25
チロシン	238.3	136.2	20	15
チロシン 13C5	244.2	152.2	20	15
アスパラギン酸ジプチル	246.2	144.2	20	15
アスパラギン酸ジプチル d3	249.3	147.3	20	15
グルタミン酸ジプチル	260.3	158.1	20	15
グルタミン酸ジプチル d3	263.3	161.2	20	15
セリン	162.3	60.0	20	15
プロリン	172.3	70.0	20	15
スレオニン	176.2	74.0	20	15
リジン	203.3	84.2	20	20

ヒスチジン	212.3	110.1	20	20
アルギニノコハク酸ジブチル	403.3	144.2	25	30
アルギニノコハク酸トリブチル	459.4	144.2	25	30
C0H	218.0	85.0	25	30
C0H d9	227.0	85.0	25	30
C2	260.0	85.0	25	30
C2 d3	263.0	85.0	25	30
C3	274.0	85.0	25	30
C3 d3	277.0	85.0	25	30
C4	288.0	85.0	25	30
C4 d3	291.0	85.0	25	30
C5	302.0	85.0	25	30
C5 d9	311.0	85.0	25	30
C8	344.0	85.0	25	30
C8 d3	347.0	85.0	25	30
C14	428.2	85.0	25	30
C14 d9	437.2	85.0	25	30
C16	456.3	85.0	25	30
C16 d3	459.3	85.0	25	30

表2 抽出液の水分含量と添加回収試験の結果

	添加濃度 nmol/mL Blood	回収率平均値±標準偏差(単位:%)		
		0.06%含水 n=13	0.2%含水 n=6	1%含水 n=6
フェニルアラニン(1)	120	64.8±7.3	76.2±11.5	73.4±13.4
チロシン(1)	200	63.3±6.8	83.5±9.9	71.1±11.5
ロイシン+イソロイシン+ ハイ ドロキシプロリン(1)	450 ⁽³⁾	44.7±6.3	53.6±8.4	48.3±9.3
メチオニン(1)	120	58.8±6.7	68.3±10.1	64.1±10.8
バリン(1)	250	52.5±7.0	59.0±11.6	59.7±11.5
アルギニン(1)	150	43.7±7.1	50.8±6.9	49.2±9.1
オルニチン(1)	50	43.0±14.2	59.0±16.7	47.3±17.8
シトルリン(1)	50	59.3±10.7	70.0±14.6	59.9±17.2
C0(1)	1.0	183.8±19.3	145.3±29.6	163.2±48.3
C2(1)	1.0	68.9±17.0	87.8±23.9	70.3±27.2
C8(1)	0.3	69.6±9.0	79.2±16.6	76.9±13.9
C14(1)	3.0	65.2±6.6	66.0±5.8	72.6±9.1
C14(2)	12.0	107.5±11.9	106.8±9.9	106.2±4.9
C16(1)	3.0	66.4±5.7	56.0±3.9	67.9±8.2
C16(2)	12.0	109.4±11.2	95.0±7.7	103.7±5.8

(1) カットオフ値付近 (2) カットオフ値の4倍付近

(3) ロイシン (300nmol/mL) とイソロイシン (150nmol/mL) を添加しロイシンの同位体標準物質で定量したもの

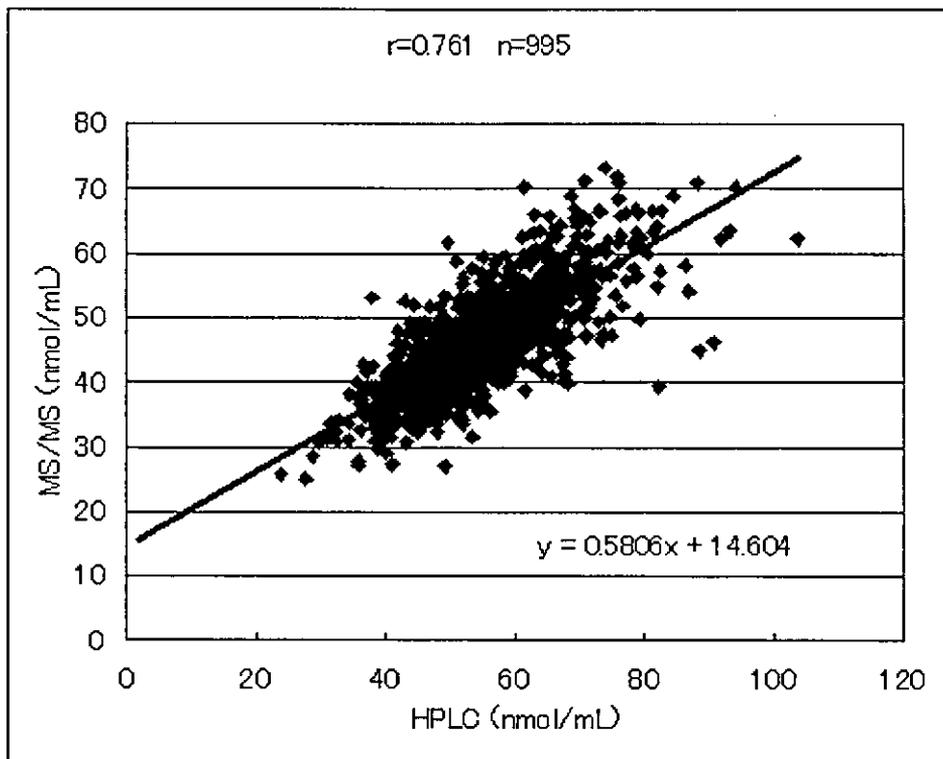


図1. フェニルアラニン値タンデムマス法とHPLC法測定による相関

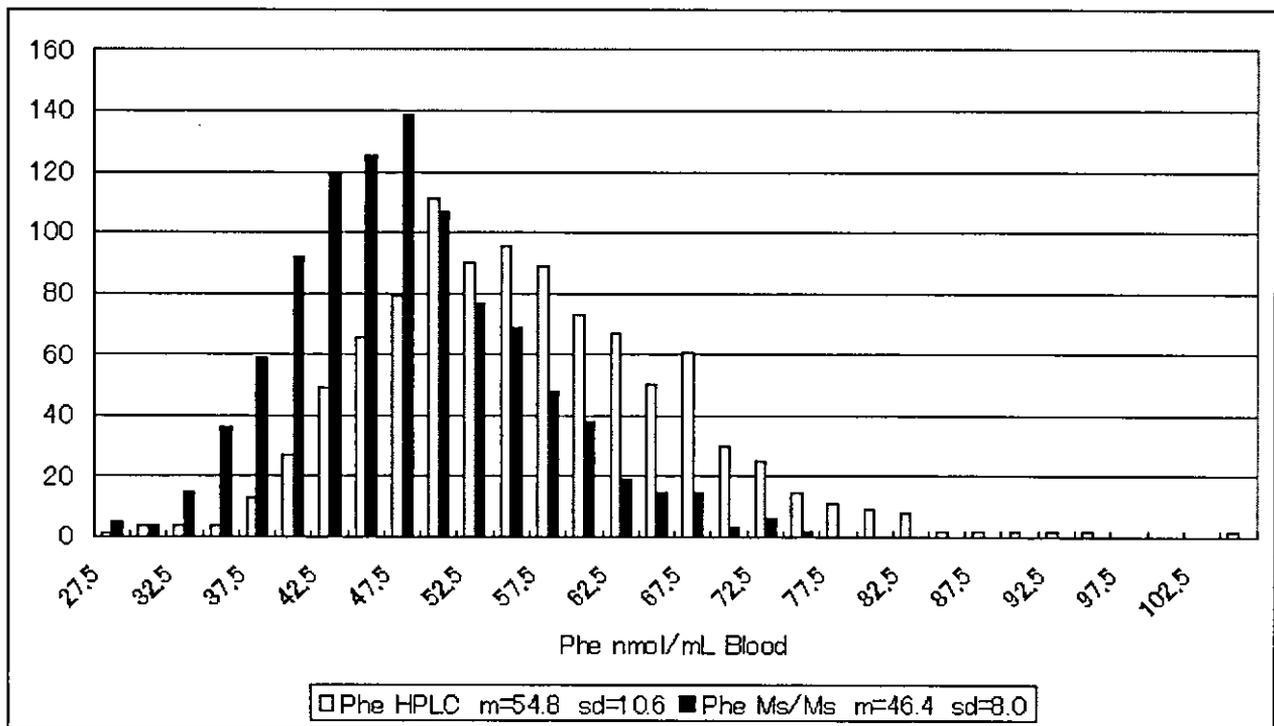


図2. タンデムマス法とHPLC法測定によるフェニルアラニン値の分布 (n=995)

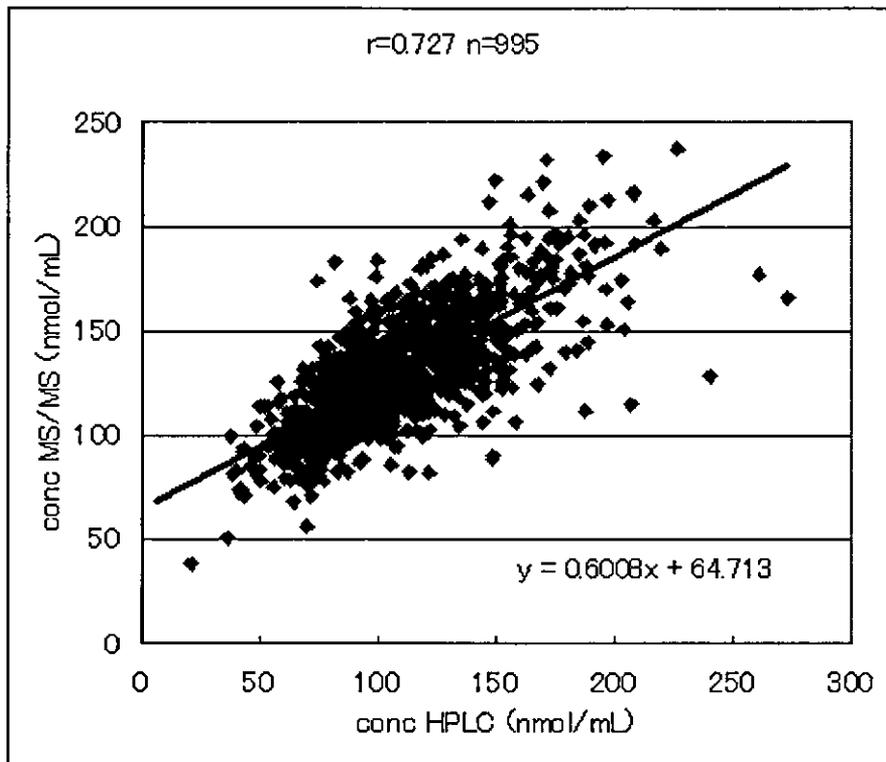


図3. パリン値のタンデムマス法とHPLC法測定による相関

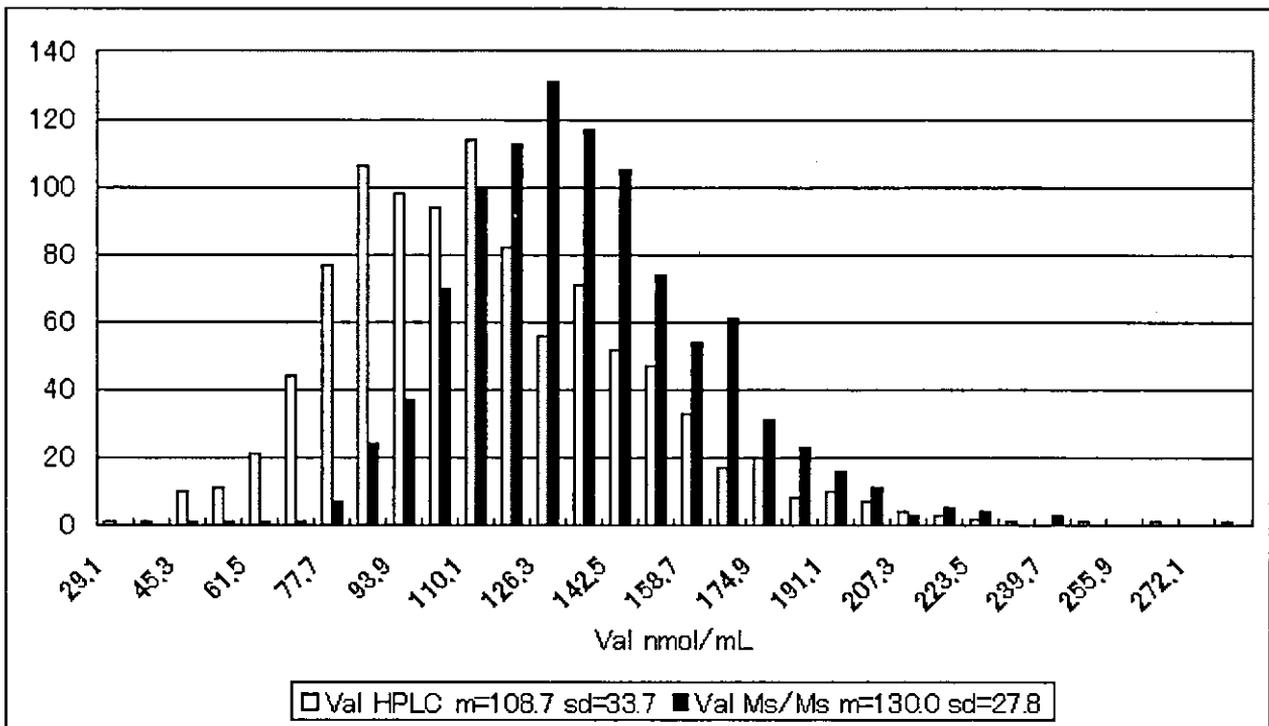


図4. タンデムマス法とHPLC法測定によるパリンの分布 (n=995)

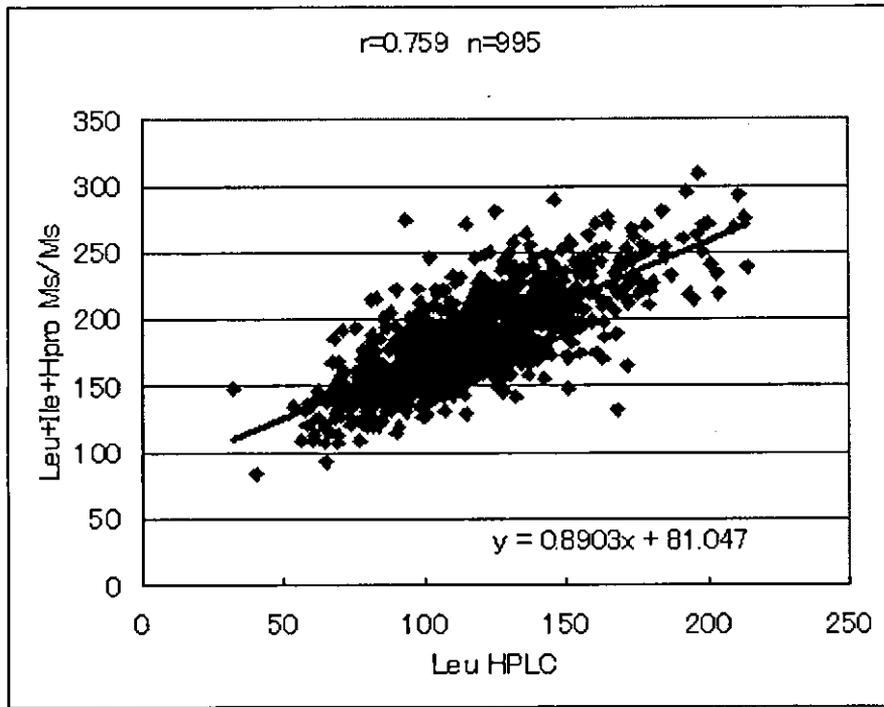


図5. ロイシン値タンデムマス法とHPLC法測定による相関

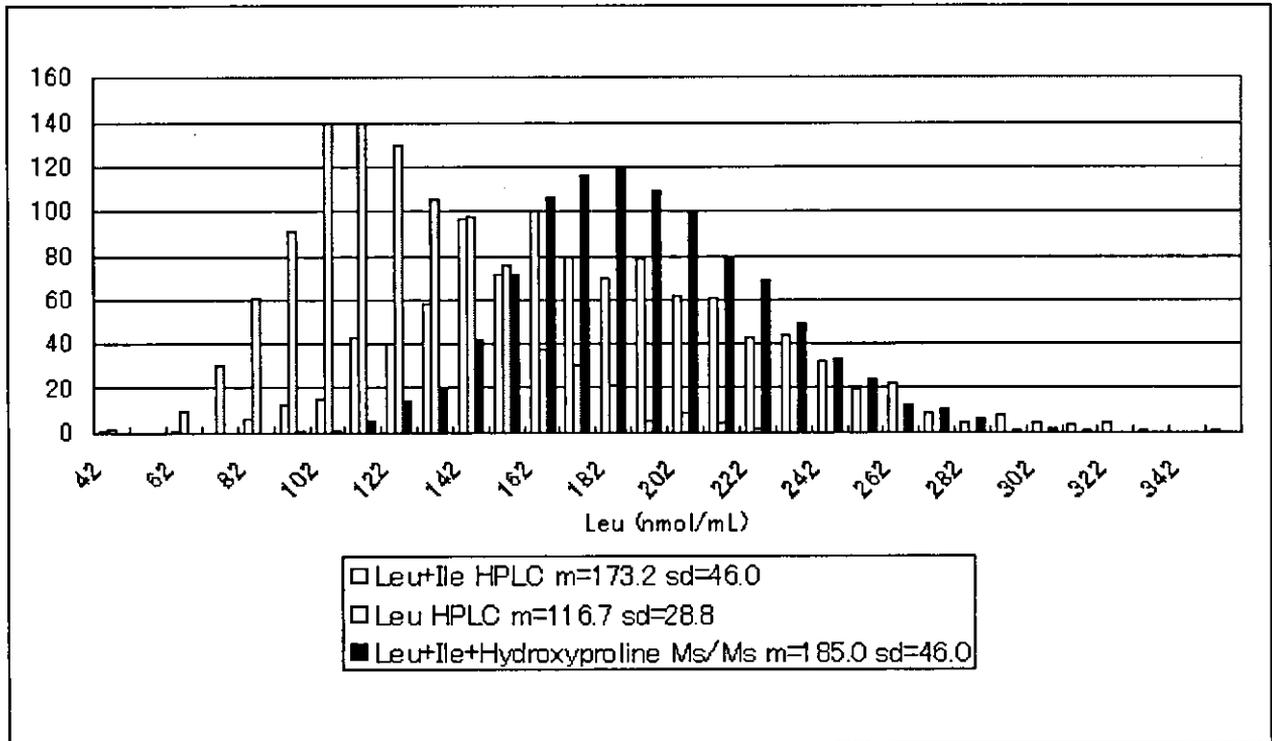


図6. タンデムマス法とHPLC法測定によるロイシン値の分布

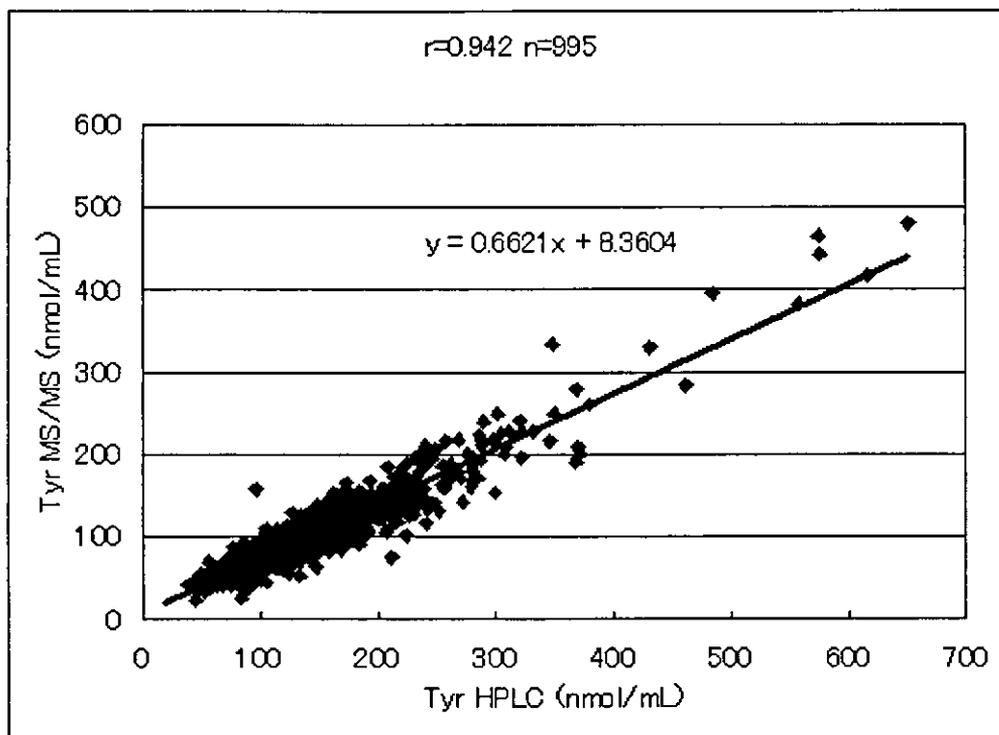


図7. チロシンのタンデムマス法とHPLC法の相関

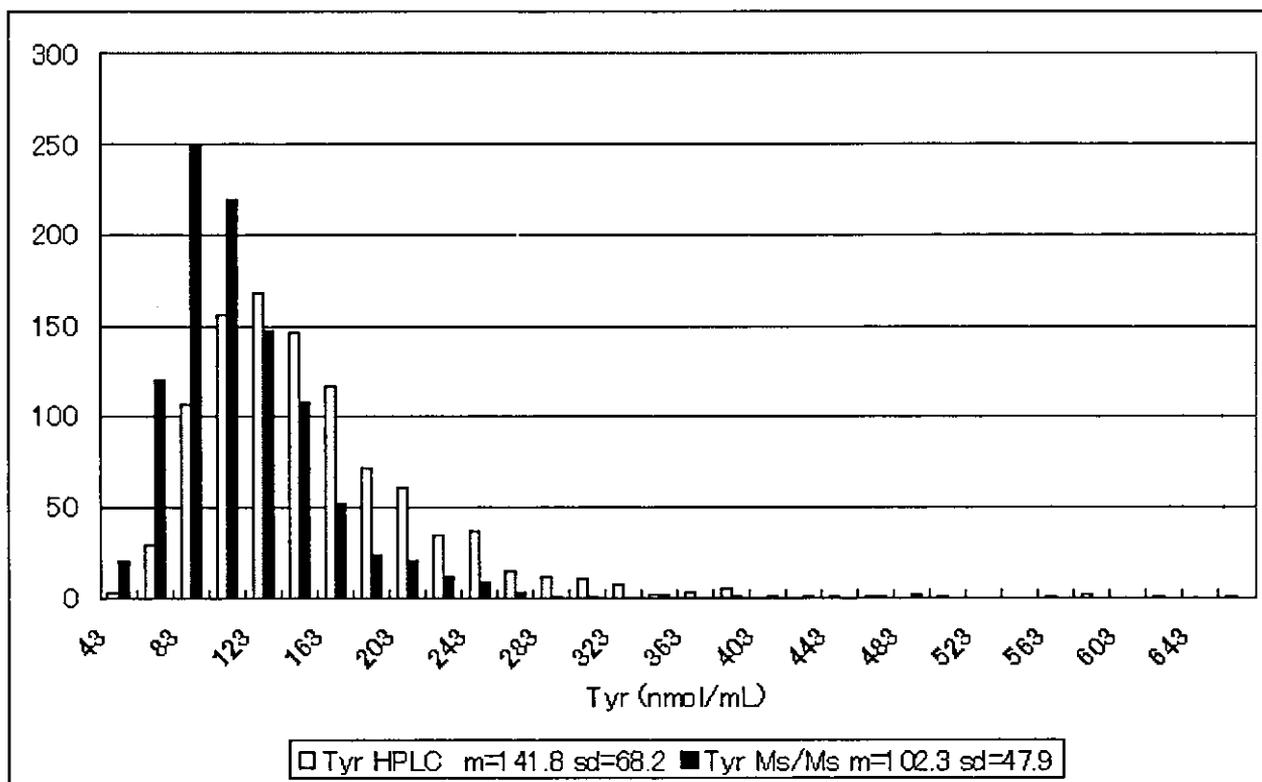


図8. チロシンの分布の比較

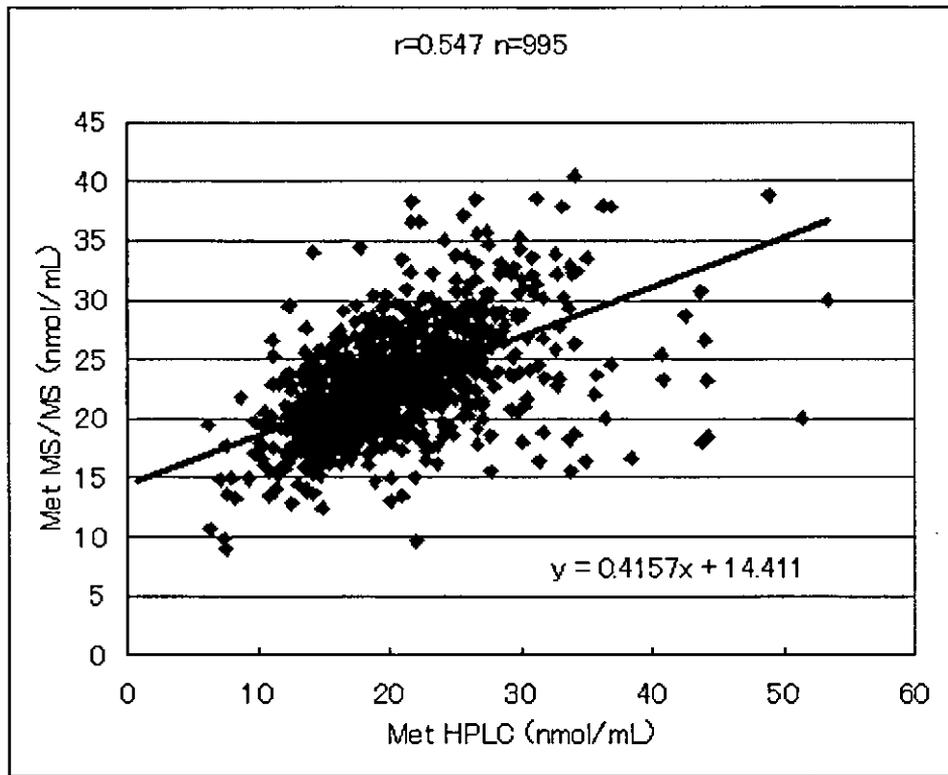


図9. メチオニンのタンデムマス法とHPLC法の相関

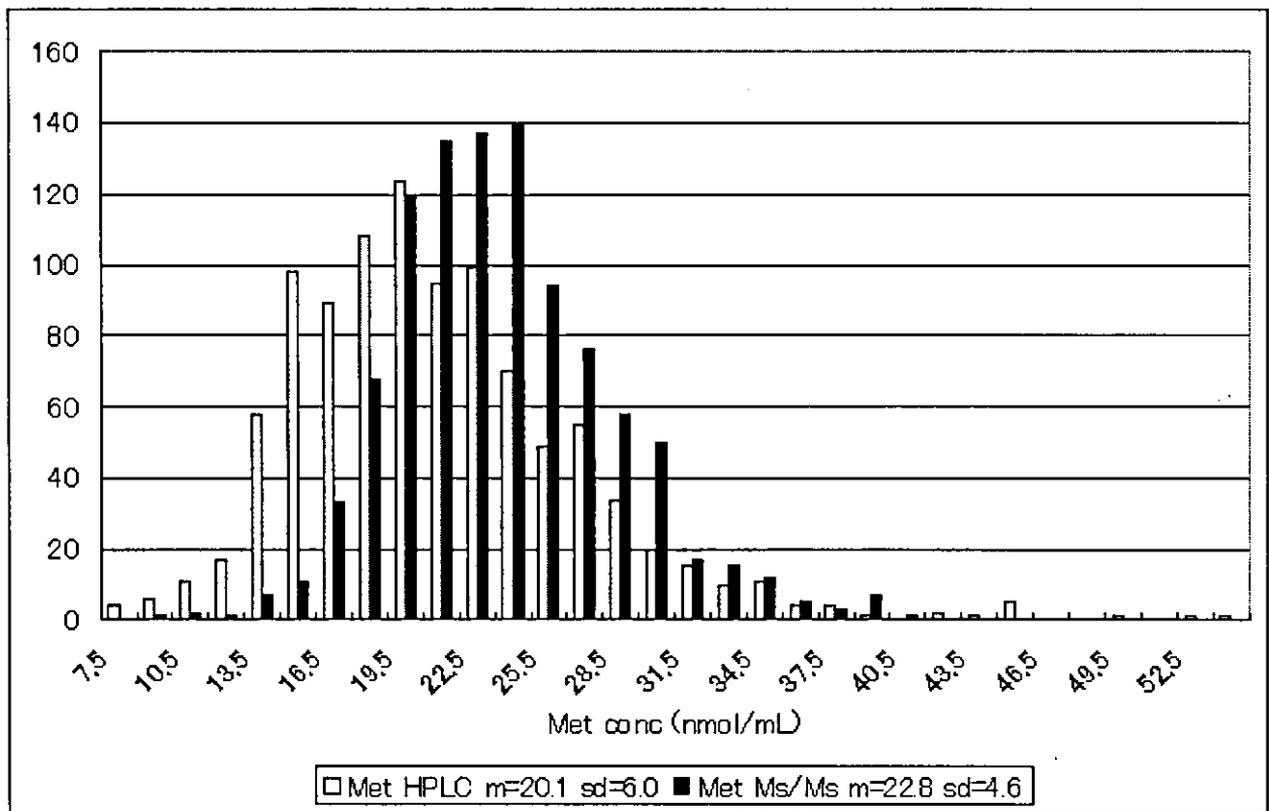


図10. メチオニンの分布の比較