

スクリーニングの費用対効果も高まるであろう。

## 文献

- [1] 重松陽介, 畑 郁江. 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. 平成16年度厚生労働科学研究費補助金 (子どもの家庭総合研究事業) 総括・分担研究報告書. 83-86, 2005.
- [2] Koizumi A, 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. *Hum Mol Genet* 1999;8:2247-2254.
- [3] 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.
- [4] 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*. 823(1): 7-12, 2005.

## 研究発表

- 1) Shigematsu Y, Hata I, Tanaka 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*. 823(1): 7-12, 2005.
- 2) Tajima G, Sakura N, Yofune H, et al: Enzymatic diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-octenoyl-CoA production using high-performance liquid chromatography: a practical confirmatory test for tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *J Chromatogr B*. 823(2): 122-30, 2005.
- 3) Kaneoka H, Uesugi N, Moriguchi A, et al: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency due to a novel gene variant in a patient with rhabdomyolysis and ARF. *Am J Kidney Dis*. 45(3): 596-602, 2005.
- 4) Tajima G, Sakura N, Yofune H, et al: Establishment of a practical enzymatic assay method for determination of isovaleryl-CoA dehydrogenase activity

using high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta*. 353(1-2): 193-9, 2005.

- 5) 重松陽介, 畑郁江: タンデム質量分析新生児マススクリーニングのピットフォール. *日本マス・スクリーニング学会誌*. 15(1):13-18, 2005.
- 6) 重松陽介, 畑郁江, 田中幸枝: タンデム質量分析法による新生児マススクリーニング. *J Mass Spectrom Soc Jpn*. 53(3):133-136, 2005.
- 7) 重松陽介, 畑郁江, 田中幸枝: 質量分析と代謝異常症化学診断. *化学工業*. 56(8):7-12, 2005.
- 8) 重松陽介: 新生児スクリーニング対象疾患と最近の話題-脂肪酸酸化異常症. *周産期医学*. 35:1221-1224, 2005.

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

## 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

### 研究要旨

札幌市では 2005 年 4 月から希望者を対象にタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングを研究的に開始した。12 月までに先天性代謝異常症等検査を受けた 11,380 人のうち 11,259 人(98.9%)がタンデム検査を希望し、その結果、3 名を精査としたが患者は発見されなかった。精査と再採血を合わせた初回陽性は 44 例 (0.39%)であった。このうち陽性理由として最も多かったのが C10(decanoyl)カルニチン高値によるグルタール酸尿症Ⅱ型 (GAⅡ) 疑いで 28 例あった。また、開始 9 ヶ月分の消耗品費と試薬費から算出したランニングコストは 1 件あたり 150 円となった。

### 研究協力者

野町祥介, 阿部敦子, 坂上絵理奈, 花井潤師,  
本間かおり, 田上泰子, 太田紀之, 福士 勝,  
藤田晃三 (札幌市衛生研究所)  
長尾雅悦 (国立病院機構西札幌病院小児科)  
窪田 満 (北海道大学 小児科)

### A. 研究目的

札幌市の先天性代謝異常症等検査の受検者のうち、保護者が希望した新生児を対象に、研究的にタンデム質量分析計による検査を実施し、発見例の治療の効果、見逃し例の把握等と合わせて評価を行ない、適切な実施方法を案出する。

### B. 研究方法

2005 年 4 月から 2005 年 12 月までの間に、札幌市の要領「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」に従い、保護者から検査希望のインフォームド・コンセント(IC)を取得した新生児について、タンデム質量分析計(以下;タンデムマス)による多項目検査(以下;タンデム検査)を実施し<sup>1,2)</sup>、その間の実施率、再採血率、再採血理由、精査内容の把握、検査データの評価を行なった。検査データの統計処理には 2005 年 4 月から札幌市で運用しているデータ処理システムを用いた<sup>3,4)</sup>。またラン

ニングコストは、実施 9 か月間に消費した試薬費、消耗品費から算出した。加えて、期間内に発生した機器トラブルとその原因、対処方法をまとめた。

### C. 研究結果と考察

#### ① 検査実施率

2005 年 4 月から 2005 年 12 月までの間に、札幌市の先天性代謝異常症等検査を受検した新生児は 11,380 人で、このうち保護者の希望によりタンデム検査を実施したのは 11,259 人であった。実施率は 98.9%と他地域のパイロットスタディ<sup>5)</sup>と比較して高いものであった。

#### ② 検査成績

2005 年 12 月までに 11,259 人を対象に検査を実施し、3 人を精査としたが患者は発見されなかった。初回検査で陽性となったのは 44 人(直接精査 2 人、再採血 42 人)で陽性率は 0.39%であった。再採血された 42 人のうち 1 人を精査としたが、他は 2 回目以降の検査で正常となった。精査 3 例の内訳を表 1 に、初回再採血 42 例の内訳を表 2 に示す。このうち陽性理由として最も多かったのが C10(decanoyl)カルニチン高値によるグルタール酸尿症Ⅱ型 (GAⅡ) 疑いで 28 例あった。また、札幌市では出生時体重が 2,000g 以下の低出生体重児の場合、体重が 2,500g

に達した時か生後1か月の時点であらためて採血し、2回目の検査を初回と同様に行なうこととしている他、2005年4月からいずれかの項目で再採血となった児についても再検査時は全項目について検査を実施することとした。このために初回タンデム検査の結果が正常であっても2回目以降の検査で陽性となる例が5例〔再採血時 C5OH(3-OH isovaleryl)カルニチン高値4例、再採血時 C3/C2(propionyl カルニチン / acetyl カルニチン比)高値1例〕見出された(表3の例①～⑤)。そのうち2例は3回目の採血で正常となったが、引き続いて C5OH カルニチンの高値が認められた3例と、初回から引き続いて C5OH カルニチンが高値を示した1例(表3の例⑥)の計4例については、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症(MCD)の除外診断を行なった。すなわち、採血医療機関の協力を得て対象児から採取した尿を試料とし、3OH-isovalerate, 3Me-crotonylglycine の増加を認めないことをガスクロマトグラフィー質量分析器により確認することで正常とした。再採血検査により C5OH カルニチンの上昇が認められた5例は、1,000g以下の超低出生体重児(超未熟児)か 1,000～1,500gの極低出生体重児(極小未熟児)であり、出生時体重が1,500g以下の極低出生体重児や超低出生体重児に関しては、その栄養法との関連も含め、さらに検討が必要と思われる。

検査対象者のうち生後4～6日目に採血された初回検体(n=10,856)について、各指標物質と指標パラメーターの平均値、標準偏差等を表4にまとめた。また、表4にはあわせて2005年12月現在のカットオフ値と、各項目の陽性例数を示す。

なお、アミノ酸6項目の場合、カットオフ値を超えた検体については高速液体クロマトグラフィー法による二次検査を行ない、最終的な判定の根拠とした。

実施9か月の間にコンサルタント医の指導に基づいて2つの指標についてカットオフ値の変更を行なった。一つはグルタール酸尿症II型(GAII)の指標で、カットオフ値を C10 カルニチン 400pmol/ml から、C10 カルニチン 500pmol/ml かつ C8(octanoyl)カルニチン 300pmol/ml に変更した。これによって旧カットオフ値では陽性であった22例中17例は陰性となる。もう一つは高アルギニン血症の指標で、Arg(arginine) 50mmol/ml から、同 100mmol/ml に変更した。

### ③ ランニングコスト

実施9か月分から算出した年間の試薬および消耗品の消費予想量、単価、年間費用を表5にまとめた。年間の検査実施件数を例年の数を参考に17,000件と仮定した場合、1件あたりのランニングコストはおおよそ150円と計算された。これを札幌市衛生研究所が従来アミノ酸代謝異常症3疾患の検査に用いてきたHPLC(高速液体クロマトグラフィー)法<sup>6)</sup>と比較すると、HPLC法では、分離液、反応液、洗浄液を全て市販のものを購入した場合おおよそ208円/件、全て自家調製した場合おおよそ53円/件であるため、タンデム検査の多項目という意義を合わせて考えるなど様々な検討が必要ではあるが、十分有用であると思われる。

### ④ 機器メンテナンス

札幌市衛生研究所にタンデムマスが設置されたのは2004年2月であり、匿名化検体によるプレスタディは2004年10月から開始された。2005年12月までの通算インジェクション数は3万回を超え、2005年4月以降は1稼働日あたりおおよそ100インジェクションが行なわれている。これは通常検体の検査のほか、外部精度管理検体、内部精度管理検体、コンサルタント医からの依頼検体なども含むほか、再検査、確認検査なども含んだ数である。マニュアル上では、液体クロマトグラフィー部分のシール、ニードル、チェックバルブを6か月もしくは2万インジェクション毎に1回の頻度で交換することを推奨しているが、札幌市衛生研究所では現在までチェックバルブを交換したのみである。半定期的なメンテナンスとしては質量分析計のイオンソース部分を4か月に1回程度クリーニングしているが、そのためには真空ポンプを停止する必要があるため、他の修理等の機会に合わせて実施しているのが実情である。

参考までに実施9か月の間に1日以上検査が実施できなかった機器トラブルの一覧を表6に示した。そのうち原因の判明まで最も日時を要したものはキャピラリーの詰まりによるもので、5日間の稼働停止期間を要した。事業化に際してはメンテナンス契約なども考慮する必要がある。

### D. 文献

1) 野町祥介, 阿部敦子, 花井潤師 他:平成16年

- 度厚生労働科学研究(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」報告書, 98-103, 2004
- 2) 野町祥介, 阿部敦子, 花井潤師 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, 札幌市衛生研究所年報, 32, 54-61, 2005
- 3) 本間かおり, 野町祥介, 花井潤師 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(2)事務処理プログラム, 札幌市衛生研究所年報, 32, 62-69, 2005
- 4) 花井潤師, 本間かおり, 野町祥介 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(3)データ処理システム, 札幌市衛生研究所年報, 32, 70-74, 2005
- 5) 久保田美穂, 吉井千代子, 渡川美弥子 他. タンデム型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・スクリーニング学会誌, 14:3, 41-44, 2004
- 6) 田上泰子, 野町祥介, 花井潤師 他. 高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸代謝異常症スクリーニング. 札幌市衛生研究所年報, 29, 31-37, 2002

表1 2005年4月～9月の間に精密検査となった3例の内訳

精査例	精査理由	疑い疾患名	診断結果・備考
① 直接精査 初回 5日目採血 出生時体重 2,742g	C12 (dodecanoyl) カルニチン; 0.57pmol/ml C14:1 (myristoleyl) カルニチン; 0.49pmol/ml	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症(VLCAD) グルタール酸尿症Ⅱ型(GAⅡ)	一過性の高値
② 直接精査 初回 5日目採血 出生時体重 3,806g	C5 (isovaleryl) カルニチン; 3.7nmol/ml	イン吉草酸血症(IVA)	抗生物質塩酸セフカペンピボキシルによる偽陽性
③ 2回目採血精査 初回 4日目採血 二回目 10日目採血 出生時体重 2,920g	C0 (Free) カルニチン; 初回 9.4nmol/ml 二回目 7.6nmol/ml	カルニチントランスポーター異常症	低栄養(初回採血時の体重増加率が-13%と著しく減少傾向)による一過性の可能性が高い

カットオフ値については表4を参照

表 2 2005 年 4 月～9 月 初回再採血判定例の内訳

再採血理由	例数	疑い疾患名	その後	備考
C10 高値	28	グルタル酸尿症Ⅱ型	2 回目以降の採血で全例が正常化	10 月以降, 再採血基準を C10 かつ C8 高値に変更
C3/C2 高値	3	メチルマロン酸血症 プロピオン酸血症	2 回目以降の採血で全例が正常化	
Arg 高値	4	高アルギニン血症	2 回目の採血で全例が正常化	10 月以降, カットオフ値を 50 nmol/ml から 100nmol/ml へ変更
Cit 高値	1	高シトルリン血症	2 回目の採血で正常化	
C5 高値	4	イソ吉草酸血症	2 回目の採血で全例が正常化	全例が抗生物質 (塩酸セフカペンピホキシル, セフトレピホキシル) 使用による偽陽性
C0/(C16+C18) 高値	1	カルニチンハルトイルトラン スフェラーゼ I 欠損症	2 回目以降の採血で正常化	
C0 低値	2	カルニチントランスポーター 異常症	2 回目採血で 1 例が精査, 他は正常化	

C0, free carnitine; C2, acetyl; C3, propionyl; C5, isovaleryl; C8, octanoyl; C10, decanoyl; C16, palmityl; C18, stearoyl; Arg, arginine; Cit, citrulline.

表 3 初回タンデム検査の結果が正常であっても 2 回目以降の検査でタンデム検査陽性となった 5 例, および初回から Arg の他に C5OH が高値であった 1 例の経過

例 (出生時体重)	採血 日齢	初回検査結果	採血 日齢	再採血検査結果	採血 日齢	3 回目採血検査結果	その後・備考
① (1,130g)	4	正常	51	C5OH 再採血	100	正常	
測定値	C5OH ; 0.25nmol/ml		C5OH ; 0.56nmol/ml		C5OH ; 0.48nmol/ml		
② (800g)	5	FT4 再採血 タンデム 正常	69	FT4 再採血 タンデム 正常	98	C5OH 再採血	尿検査で正常を確認 日齢 142 0.96nmol/ml 日齢 268 0.41nmol/ml
測定値	C5OH ; 0.18nmol/ml		C5OH ; 0.42nmol/ml		C5OH ; 0.57nmol/ml		
③ (626g)	28	CAH 再採血 タンデム 正常	147	C5OH 再採血			尿検査で正常を確認
測定値	C5OH ; 0.19nmol/ml		C5OH ; 0.67nmol/ml				
④ (910g)	14	FT4・CAH 再採血 タンデム 正常	50	C5OH 再採血			尿検査で正常を確認
測定値	C5OH ; 0.34nmol/ml		C5OH ; 0.84nmol/ml				
⑤ (1,996g)	6	正常	48	C3/C2 再採血	55	正常	
測定値	C3/C2 ; 0.053		C3/C2 ; 0.259		C3/C2 ; 0.226		
⑥ (630g)	107	Arg; C5OH 再採血	146	C5OH 再採血			尿検査で正常を確認
測定値	Arg ; 126nmol/ml C5OH ; 0.65nmol/ml		Arg ; 41nmol/ml C5OH ; 0.80nmol/ml				

C2, acetyl carnitine; C3, propionyl; C5OH, 3-OH isovaleryl; Arg, arginine. カットオフ値については表 4 を参照

表 4 4～6 日に採血された初回検体 (n=10,856) の測定結果

略称	正式名称	平均値 ± 標準偏差 (SD)	カットオフ値 (SD 比)	(一次) 陽性数	主な対象疾患
Phe	phenylalanine	50.4 ± 9.5 nmol/ml	100 (+5.3SD)	5	フェニルケトン尿症*7
Leu + Ile	leucine + isoleucine	200.8 ± 42.8 nmol/ml	300 (+2.3SD)	217	メープルシロップ尿症*7
Met	methionine	21.3 ± 4.8 nmol/ml	50 (+6.0SD)	5	ホモシスチン尿症*7
Cit	citrulline	10.8 ± 3.6 nmol/ml	40 (+8.2SD)	4	高シトルリン血症
Arg	arginine	11.5 ± 6.7 nmol/ml	100 (+13.5SD)	0 *3	高アルギニン血症
ASA	argininosuccinic acid	86.6 ± 35.1 *2	500 (+11.4SD)	0	アルギニノコハク酸尿症
COH	free carnitine	27.4 ± 8.0 nmol/ml	10 (-2.2SD)	2	カルニチントランスポータ異常症
C5:1	tiglyl carnitine	10.9 ± 4.1 pmol/ml	100 (+21.6SD)	0	βケトチオラーゼ欠損症
C5	isovaleryl carnitine	123 ± 89 pmol/ml	1000 (+9.9SD)	4	イソ吉草酸血症
C5OH	3-OH-isovaleryl carnitine	103 ± 30 pmol/ml	500 (+8.2SD)	0	複合カルボキシラーゼ欠損症
C8	octanoyl carnitine	61.2 ± 30.9 pmol/ml	300 (+7.7SD)	8 *4	中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症
C10	decanoyl carnitine	121 ± 69 pmol/ml	500 (+5.5SD)	27	グルタル酸尿症 II 型
C5DC	glutaryl carnitine	36.4 ± 15.2 pmol/ml	200 (+10.7SD)	1 *5	グルタル酸尿症 I 型
C14:1	myristoyl carnitine	97.1 ± 43.5 pmol/ml	400 (+7.0SD)	2 *6	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症
C16	palmitoyl carnitine	2.44 ± 0.89 pmol/ml	8.0 (+6.3SD)	0	長鎖 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素欠損症
C18	steroyl carnitine	0.78 ± 0.24 pmol/ml	3.0 (+9.1SD)	0	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II 欠損症
C0 / (C16+C18) *1		9.31 ± 3.89	100 (+23.3SD)	0	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-I 欠損症
C3 / C2	propionyl carnitine / acetyl carnitine	0.085 ± 0.027	0.25 (+6.2SD)	2	プロピオン酸血症 メチルマロン酸血症

\*1 C0 は COH の値

\*2 シグナル強度 (ピーク高) の値

\*3 Arg のカットオフを 100nmol/ml としたときの陽性数 (9 月までのカットオフ値は 50nmol/ml)

\*4 C10 で陽性となった 27 例に含まれる

\*5 C14:1 で陽性となった 2 例に含まれる

\*6 1 例はかつ C5DC 高値, 1 例はかつ C10 高値

\*7 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三項目は, 通常の先天性代謝異常症等検査の一次検査として実施

表 5 実施 9 か月分から算出した年間ランニングコスト

試薬・消耗品	単 価	使用量 / 年	合 計
ラベルアミノ酸セット A	41,000 円	12 本	492,000 円
ラベルカルニチンセット B	41,000 円	12 本	492,000 円
塩酸ブタノール	750 円	1,300 本	975,000 円
アセトニトリル 3ℓ	7,020 円	24 本	168,480 円
メタノール 3ℓ	3,000 円	12 本	36,000 円
蟻酸 500mℓ	1,900 円	1 本	1,900 円
アルゴンガス 1.5m <sup>3</sup>	3,200 円	1 本	3,200 円
N <sub>2</sub> ガス 7m <sup>3</sup>	5,000 円	15 本	75,000 円
平底プレート	124 円	430 枚	53,320 円
丸底プレート	144 円	860 枚	123,840 円
プレートシール	65 円	860 枚	55,900 円
その他部品, オイルなど			76,400 円
合 計			2,553,040 円

年間 17,000 件 ~ 150 円 / 件

表 6 実施 9 か月間における機器トラブルの事例

現 象	原 因	解決法	復帰所用 日数
制御システムから分析器へのアクセス不可	ハードディスクの故障	ハードディスクを交換しソフトを再インストール	3 日
マス*1 の真空度の低下	ロータリーポンプ内電気系統の接触不良	ポンプの中を確認し, 配線系をチェック	1 日
Mass Lynx*2 が分析時, 不定期にサンプルリストを中止	ソフトの不具合	LAN ケーブルを変更し, ソフトを再インストール	2 日
イオンソースの温度が上昇しない (通常 140℃ のところが 50℃)	ヒーターの故障	ヒーターの交換	1 日
分析時, LC*3 の流速を低下させると, ピークが消失する	マス*1 のキャピラリー入口付近の詰まり	キャピラリーの交換	5 日

\*1 タンデム質量分析計の質量分析計部分

\*2 分析・解析のためのソフトウェア

\*3 タンデム質量分析計の液体クロマトグラフィー部分

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

## 島根で開始したタンデムマスによるパイロットスタディー：2005年度の成績

### 研究要旨

我々は2005年4月からタンデムマスによる新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディーを開始し、2006年1月末現在、14,115 検体を分析した。当施設の研究に参加している6県であり、そのうち宮城県と島根県では県下の全ての参加施設のうち希望施設が参加し、それ以外は特定の施設において希望者のみの検査を行っている。これまでに計 3 症例すなわち、軽症プロピオン酸血症、軽症メチルマロン酸血症、3-メチルクロニル CoA カルボキシラーゼ欠損症をそれぞれ一例発見した。再採血率は 0.64%であった。これらの主な理由としては、①C3 もしくは C3/C2 比高値 ②チロシン高値 ③遊離カルニチン低値 ④中鎖アシルカルニチン軽度高値 などであった。①については特にメチルマロン酸血症は軽症型を検出できないことがあることは知られている。今回は軽症型を発見するために意識的に欧米で使用されている基準値より低いカットオフ値を用いたが、結果的には再採血率を上げることになった。軽症型のマス・スクリーニングでの発見率を上げる必要があるか否かを含めて、再度検討する必要がある。②については一過性高チロシン血症のために再採血となる場合が多かった。チロシン血症 1 型は日本では極めて頻度が少ないため対象疾患とすべきかどうか検討が必要である。③についてはC0のみでなく、複数のアシルカルニチンの合計を評価することにより、再採血率を下げる事が可能である。

タンデムマスによる分析を行う際には多疾患について低コストで一度に大量処理できる利点がある。反面、メチルマロン酸血症のように頻度が高い疾患であっても、発見が困難であるものもあり、その特性も十分理解するべきである。

### 研究協力者

小林弘典、長谷川有紀、遠藤充、山口清次  
(島根大学小児科)  
重松陽介 (福井大学看護学科・小児科)

パイロットスタディーへの参加を呼びかけて希望のあった施設で出生し、希望のあった児についてタンデムマスによるアミノ酸分析とアシルカルニチン分析を行った。分析検体は現行スクリーニングで使用済みとなった検体を各スクリーニング施設の協力を得て島根大学小児科に転送した。

### A 研究目的

島根でタンデムマスによるパイロットスタディーを開始し、我が国における疾患頻度を前方視的に調査し、マス・スクリーニングにおける問題点について検討する。

### B 研究方法

2005年4月からパイロットスタディーを開始し、愛媛県、岡山県、山口県、兵庫県については県内の特定の施設で出生した児について希望者のみ、宮城県、島根県では県下の全産科施設にパ

### C 研究結果と考察

#### (1) 分析検体について

2005年1月末時点での総分析数は14,115検体であった。再採血率は0.64%であった。

#### (2) 発見された異常について

これまでに3症例、すなわち軽症プロピオン酸血症、軽症メチルマロン酸血症、3-メチルクロニル CoA カルボキシラーゼ欠損症をそれぞれ



れ一例発見した。軽症プロピオン酸血症については無治療のまま経過観察が可能となっており、軽症メチルマロン酸血症についてはその後の経過でメチルマロン酸の排泄が消失している。3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症については本邦では稀であるが、確定診断されたときには2次性カルニチン欠乏症と高アンモニア血症などの異常が認められた。現在は治療により良好な経過をとっている。

### (3) 再採血率について

今回の研究では、再採血率は0.64%であった。これらの原因として主なものは、①C3 もしくは C3/C2 比高値 ②チロシン高値 ③遊離カルニチン低値 ④中鎖アシルニチン軽度高値、であった。①については、軽症型を発見するために意識的に欧米で使用されている基準値より低い値 ( $C3/C2 < 0.24$ ) を用いたが、結果的には再採血率を大きく上げることになった。パラメーターを C3/C16 比などを入れるなどすることで再採血率を下げる事が可能であるが、マス・スクリーニングで軽症型疾患の発見率を上げる必要があるか否かを含めて、再度検討する必要がある。②については一過性高チロシン血症のために再採血となる場合が多かった。チロシン血症1型は日本では極めて頻度が少ないと考えられるため、対象疾患とすべきかどうか検討が必要である。③については C0 のみでなく、複数のアシルカルニチンの合計を評価することにより、再採血率を下げる事が可能であると考えられた。④における再採血率を下げることは困難であるが、再採血で全て正常判定となっている。しかし、グルタル酸尿症2型では栄養が安定すると異常を検出できないことが知られており、これらの中に隠れている可能性も否定できない。

### (4) パイロットスタディーを開始後に遭遇した問題点と課題

保護者を含めた社会の関心は非常に高い印象を受けた。また同時に、多くの保護者が現行マ

ス・スクリーニングについても適切な情報を提供されていないこともあり、適切な情報提供が強く望まれていると感じた。そのため、我々は途中から啓発のための、現行法およびタンデムマス法によるマス・スクリーニングについてのパンフレットを作成し、受検者の保護者に配布した。また、医療機関、行政については施設間、関係者の間でもマス・スクリーニングへの関心に大きな差があり、それが一般市民の認知度に差を生じさせる一因となっていると思われた。今後は、タンデムマス法だけではなく、スクリーニングの意義および問題点についても正しい情報を伝え、啓発していく必要がある。

## D 結論

- 1) タンデムマスによる分析を行う際には多疾患について低コストで一度に大量処理できる利点がある。反面、メチルマロン酸血症のように頻度が高い疾患であっても、発見が困難であるものもあり、その特性も十分理解すべきである。また、チロシン血症のように日本では非常に稀な患者を発見するために再採血率の高い疾患もあり、我が国に適した対象疾患を検討する必要がある。
- 2) 保護者を含む社会からのタンデムマスにおけるマス・スクリーニングへの関心は強く、一般市民への情報提供と啓発に努めるべきである。また、医療機関・行政においても正しい知識と理解が求められる。

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

## タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング法の検討

### — 第 2 報 —

#### 研究要旨

我々の施設では平成 17 年 12 月からタンデム質量分析計(MS/MS)を使用した新生児スクリーニングの試験研究を開始し、東京都の承認の下で研究への協力を得られた採血医療機関からの新生児ろ紙血液検体 1,019 例を MS/MS で測定した。Cutoff 値を超えているため、再採血を依頼したのは 8 例で、このうち現在までに 6 例が回収され、いずれも正常であった。また、アミノ酸の HPLC 法と MS/MS 法との相関は良好であった。提供を受けた有機酸・脂肪酸代謝異常症 19 例の患者検体の測定結果は、VB<sub>12</sub> 反応性メチルマロン酸血症の軽症型 1 例を除いてすべて診断可能であったが、今後さらに検査例数を増やして cutoff 値付近の測定結果などについて検討を重ねたいと考える。

#### 研究協力者

石毛信之(東京都予防医学協会主査)  
鈴木 健(東京都予防医学協会部長)  
北川照男(東京都予防医学協会理事長)  
大和田操(女子栄養大学大学院教授)  
重松陽介(福井大学看護学科教授)  
山口清次(島根大学小児科教授)

MS/MS 法に対応する標準化された精度管理用ろ紙血液検体がないために、米国 CDC の新生児スクリーニング精度保証プログラム(NSQAP)へ登録し、分与されたろ紙血液を使用した。

東京都における本試験研究のシステムは図1に示したとおりで、研究協力施設で出産した保護者からアシカルニチンの測定をすることの了解を得たものに対してのみ、現行の先天性代謝異常等スクリーニングに加えて MS/MS による試験的検査を実施している。

#### A. 研究目的

東京地区では、平成 17 年 12 月から、東京都の承認のもとで本パイロットスタディーを開始した。今回は、その検査システムと現在までの成績をのべ、現状と今後の課題を明らかにすることを目的とした。

#### (倫理面への配慮)

血液の採取においては、その用途、研究目的を事前に文書にて十分に説明し、承諾書(検査申込書)に署名を得たのちに行った。

#### B. 研究方法および対象

MS/MS に用いたろ紙血液の前処理法(塩酸ブタノールを用いたブチル処理)および HPLC 法の分析条件は既報のとおり行った。また、MS/MS 測定時のスキャンモードはアミノ酸、アシカルニチンともに MRM であった。

本研究に用いた検体は、東京都の承認の下で、協力の得られた採血医療機関から送付された新生児ろ紙血液検体 1,019 例と、提供を受けた有機酸・脂肪酸代謝異常症患者検体 19 例であった。また、精度管理検体には、札幌市衛生研究所で作製した内部精度管理用ろ紙血液を用いた。さらに、国内では

#### C. 研究結果

本試験研究の当施設における各測定項目の cutoff 値と新生児ろ紙血液検体 1,019 例の測定平均値を表1に示した。Cutoff 値の設定には、重松教授の指針[1][2]ならびに札幌市衛生研究所の cutoff 値と一般検体の測定平均値[3]を参考にした。当施設の測定値は札幌市と比較して低値傾向を示す項目もあったため、cutoff 値を札幌市よりやや低目に設定した。

2005 年 12 月から現在までの本試験研究の成績を表 2 に示した。上記の cutoff 値を超えたものは 43

件(4.2%)あり、同一検体で再度測定した。その結果、再採血を依頼したのは8件(0.8%)で、その内訳は、有機酸代謝異常症3例(メチルマロン酸血症(MMA)またはプロピオン酸血症1例、イソ吉草酸血症2例)、脂肪酸代謝異常症5例(全例グルタル酸尿症Ⅱ型)で、尿素サイクル異常症を疑った再採血依頼はなかった。また、初回検査から直接精査になった例もなかった。これら8例の再採血依頼のうち、現在までに6例の検体を回収し、いずれも正常であった。この中でイソ吉草酸血症疑いの2例は、ともにろ紙検体に抗生剤使用中との記載があり、採血医療機関に問い合わせたところ、いずれも第三世代セフェム剤のメイアクトを使用していることがわかった。しかしこれらは再採血時には抗生剤を使用しておらず、異常高値を示していたC5-アシルカルニチン(2,217nmol/Lと2,892nmol/L)および低値を示していた遊離カルニチンは正常化した。

つぎにアミノ酸のVal、Leu+Ile、Met、PheおよびTyrのMS/MS法とHPLC法による測定値の相関は、それぞれ重相関係数 $r^2=0.827, 0.703, 0.857, 0.786$ および $0.929$ であり、Leu+Ileでわずかにばらつきが見られるものの良好であった。

一方、米国CDCから送付された検体を用いた精度管理成績のうち、年2回行われる精密度の管理(Quality Control Program)の結果を図2に示した。項目によっては低値傾向を示すものも見られたが、アミノ酸、アシルカルニチンともにより成績を示していた。また、年4回行われる正確度の管理(Proficiency Test)においても、見落としの原因となる偽陰性の結果はなかった。さらに、提供を受けた有機酸・脂肪酸代謝異常症患者検体の測定結果を表3に示した(検体が複数ある疾患については典型的なもののみ示した)。当施設のcutoff値をこれらの患者検体の測定値に適用すると、重松教授が個々の疾患ごとに示された指標物質、複数項目の濃度比の異常が確認され、VB<sub>12</sub>反応性MMAの軽症型1例を除いて各疾患とも診断可能であった。

#### D. 考察と結論

平成17年12月から東京地区においても本試験研

究が開始され、1,019件の新生児ろ紙血液検体をスクリーニングしたところ、再採血依頼検体は8件あったが、現在までに患者は発見されていない。これらの再採血依頼検体のうち2例は初回採血時に使用していた抗生剤の影響による偽陽性[4]と考えられたが、これを再採血を依頼せずに正常と判定することは難しい。今後、検査数が増えるとこれらと同様な例が増加することが予想され、抗生剤に起因する偽陽性対策が必要と思われた。

一方、アミノ酸のMS/MS法とHPLC法との相関はLeu+Ileで若干ばらつきが見られるものの良好であり、米国CDCの精度管理結果も妥当な成績であった。将来的には国内においても外部精度管理が実施できる体制が望まれる。

また、提供を受けた有機酸・脂肪酸代謝異常症患者検体の測定結果はVB<sub>12</sub>反応性MMAの軽症型1例を除いてすべて診断可能であったが、有機酸・脂肪酸代謝異常症では各疾患の個々の指標物質のみならず、濃度比や複数項目の増減を総合的に判断することが重要であり、特にcutoff値付近の測定結果に対しては慎重な対応が必要と思われた。今後さらに検査例数を増やして検討を重ねたいと考える。

謝辞: 今回の検討に際して、重症心身障害児施設鈴木ヶ峰 佐倉信夫病院長、広島大学小児科但馬剛先生、札幌市衛生研究所福士先生、化血研田崎先生にご協力・ご助言を頂きましたことを深謝致します。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

東京都におけるタンデム質量分析計によるマス・スクリーニングの準備状況について、第33回日本マス・スクリーニング学会(久留米市)。

#### 【文献】

[1]重松陽介:新しい新生児マススクリーニング対象疾患の手引き.本研究班作成冊子,2005.

[2]重松陽介,他: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 年度厚生労働科学研究(こ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」報告書.79-114,2006.

[3]野町祥介:タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングパイロットスタディーの状況報告~札幌の場合~,日本マス・スクリーニング学会誌, 15:87,2005.

[4]重松陽介,他:タンデム質量分析新生児マススクリーニングのピットフォール.日本マス・スクリーニング学会誌, 15:13-18,2005.

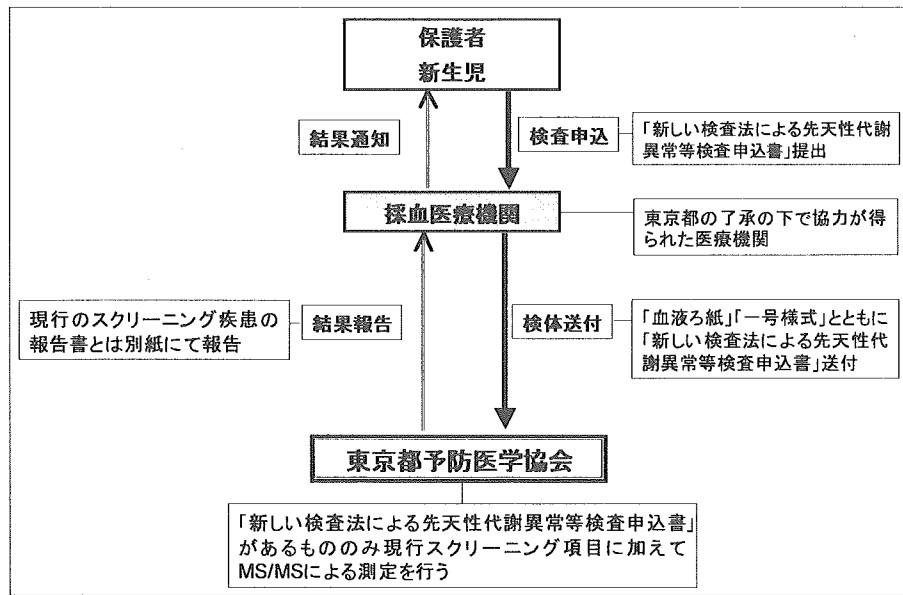


図 1 東京都におけるパイロットスタディーのシステム

表 1 各測定項目の cutoff 値と新生児ろ紙血液検体の測定平均値 (n=1,019)

	初回採血検体 (n = 1,019)		Cutoff	単位		初回採血検体 (n = 1,019)		Cutoff	単位
	mean	SD				mean	SD		
Val	96.0	23.1	190	μmol/L	C0	16.6	5.0	7.0	μmol/L
Leu+Ile	159.4	32.3	250	μmol/L	C2	30.0	9.0	50.0	μmol/L
Met	18.6	4.3	50	μmol/L	C3	1.97	0.80	5.00	μmol/L
Phe	46.8	8.9	120	μmol/L	C5	108.2	50.8	630	nmol/L
Arg	14.4	5.9	50	μmol/L	C5DC	33.3	13.4	160	nmol/L
Cit	9.7	3.1	40	μmol/L	C5OH	99.5	27.3	460	nmol/L
Tyr	78.5	34.6	800	μmol/L	C6	40.3	15.2	130	nmol/L
ASA (diBu+triBu)	578.2	172.9	2000	(ピーク強度)	C8	56.4	28.3	240	nmol/L
					C10	111.0	55.3	350	nmol/L
					C12	249.0	108.0	700	nmol/L
					C14	196.3	56.0	700	nmol/L
					C16	1.76	0.64	5.50	μmol/L
					C18	0.58	0.17	2.00	μmol/L
					C14:1	156.0	57.7	530	nmol/L
					C16OH	11.5	4.1	30	nmol/L
					C18:1OH	10.4	2.9	35	nmol/L
					C0/(C16+C18) (c/c)	7.7	3.4	80	
					C8/C10 (c/c)	0.52	0.10	1.30	
					C3/C2 (c/c)	0.07	0.02	0.20	
					C3/C16 (c/c)	1.22	0.56	5.00	

表2 本パイロットスタディーの成績(平成17年12月～平成18年2月)

●総受付検体数	19,298件
●MS/MS測定検体数	1,019件
●確認検査数	43件(4.2%)
●再検査依頼数	8件(0.8%)
有機酸・脂肪酸代謝異常症	
<i>異常項目</i>	<i>対象疾患</i>
C10上昇	GA-II
C5 著増(C0低下)	IVA→抗生剤(メイアクト)使用
C3 上昇、 C3/C2 軽度上昇	MMAまたはPA
尿素サイクル異常症	0件
●再採血検査からの精密検査依頼数	0件
●初回検査からの精密検査依頼数	0件

表3 有機酸・脂肪酸代謝異常症患者のアシルカルニチンの測定結果  
(□ は異常値を示した測定値を示す)

疾患名	MMA	VB12反応性 MMA	PA	MCD	GA-I	GA-II	CPT-I	MCAD	VLCAD	LCHAD
各疾患の指標項目	C3/C2、C3			C5OH	C5DC	C10, C8<C10 C4-C18	C0/(C16+ C18)	C8 C8/C10	C14:1	C16OH C18OH
COH	34.5	31.6	33.2	26.0	36.2	27.7	171.0	30.9	8.8	18.3
C2	25.8	18.9	42.3	25.4	40.4	12.7	31.0	19.3	7.7	11.8
C3	20.0	1.8	12.1	2.6	3.2	1.2	3.9	1.6	0.7	0.8
C5	107.7	86.0	54.1	152.6	87.5	213.5	67.9	114.7	38.0	56.9
C5DC	29.7	25.8	11.6	21.0	788.6	39.7	22.0	47.5	21.8	92.9
C5OH	452.6	300.9	162.1	3281.9	180.7	206.9	118.4	114.7	128.7	188.7
C6	63.1	42.1	43.2	41.7	76.9	257.0	35.9	1349.3	34.3	32.5
C8	81.6	57.1	27.9	58.5	120.7	580.6	43.8	14350.0	56.9	53.7
C10	145.9	99.1	45.3	86.1	228.4	862.6	76.4	1152.4	230.4	91.9
C12	184.7	115.6	151.0	114.2	167.2	207.4	37.4	130.1	183.1	135.8
C14	170.6	103.1	142.8	111.2	171.9	153.5	30.7	84.2	442.6	117.9
C16	0.47	0.62	0.97	0.69	0.99	0.57	0.13	0.52	0.55	0.49
C18	0.29	0.34	0.51	0.44	0.88	0.30	0.06	0.22	0.47	0.35
C14:1	171.1	167.6	136.0	151.9	257.9	127.4	41.8	150.8	1657.5	187.0
C16OH	6.91	10.17	10.83	7.34	10.20	4.35	2.20	6.11	6.53	88.83
C18:1OH	7.04	8.92	9.26	11.65	15.31	5.29	1.93	7.94	12.13	70.41
C0/(C16+C18) (c/c)	44.9	33.0	22.6	23.0	19.3	31.9	869.5	42.1	8.6	21.6
C8/C10 (c/c)	0.56	0.58	0.62	0.68	0.53	0.67	0.57	12.48	0.25	0.58
C3/C2 (c/c)	0.77	0.09	0.29	0.10	0.08	0.10	0.13	0.08	0.09	0.06
C3/C16 (c/c)	42.10	2.84	12.54	3.76	3.22	2.15	28.92	3.05	1.23	1.54

※ 表2、表3中の疾患名の略号:

MMA: メチルマロン酸血症、PA: プロピオン酸血症、MCD: 複合カルボキシラーゼ欠損症、GA-I: グルタル酸尿症I型、GA-II: グルタル酸尿症II型、CPT-I: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-I欠損症、MCAD: 中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症、VLCAD: 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症、LCHAD: 長鎖3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素欠損症

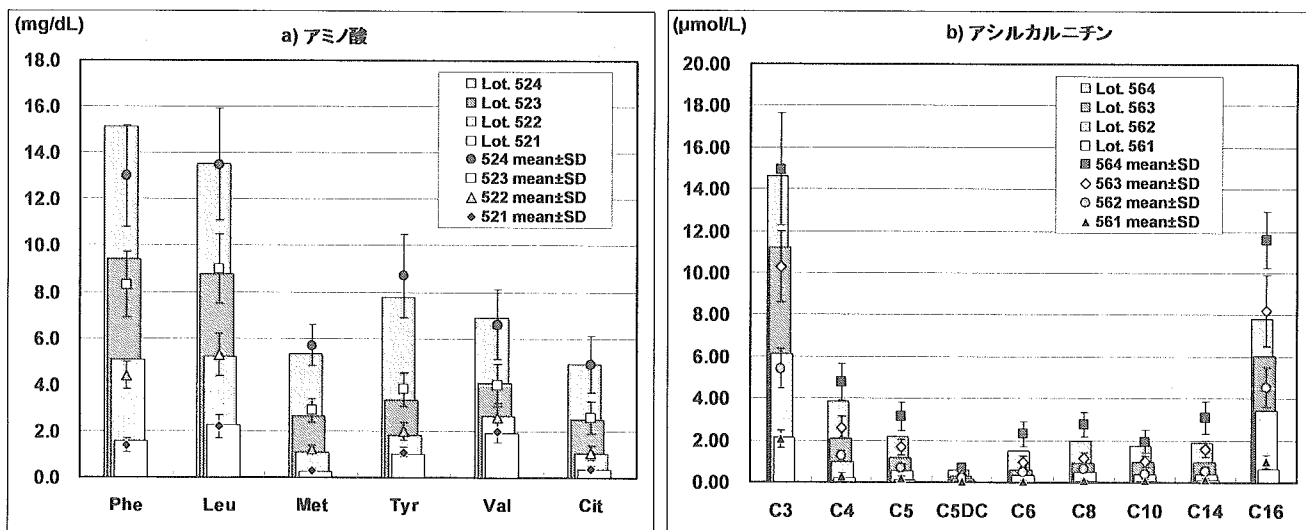


図2 米国 CDC Quality Control Program の成績  
 (「mean ± SD」は同一測定法を使用している全登録施設の実測値)

分担研究課題:タンデムマスによるスクリーニングの効果に関する研究

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

研究要旨

平成 17 年 3 月熊本市の一部施設にて保護者の同意が得られた新生児を対象にタンデムマス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した。精度管理について、日差再現性の検討では、アミノ酸の CV 3.1~6.5%, アシルカルニチンの CV 3.7~16.3% であり、実用上問題ないと考えられた。開始から平成 17 年 12 月末までに 2,039 名をスクリーニングした。検査の同意率は 99% であった。現在までスクリーニングから疾患は発見されていない。再採血率はアシルカルニチンが 0.29%, アミノ酸がチロシン(12 月末まで 3.62mg/dl のカットオフ値で再採血した)で 1.67% であった。スクリーニング以外に主に九州地域から濾紙血のタンデムマスによる解析依頼を受け入れている。この中で 1 例のメチルマロン酸血症(日齢 3 発症)を診断した。今後パイロットスタディを熊本県全域に拡大すべく準備中である。

研究協力者

氏名: 木脇弘二<sup>1)</sup>, 田崎隆二<sup>2)</sup>, 武田聖子<sup>2)</sup>, 藤田春雄<sup>2)</sup>, 三淵浩<sup>1)</sup>, 中村公俊<sup>1)</sup>, 請園なぎさ<sup>1)</sup>, 遠藤文夫<sup>1)</sup>, 梅橋豊蔵<sup>3)</sup>

所属: <sup>1)</sup>熊本大学大学院医学薬学研究部小児科学分野, <sup>2)</sup>財団法人化学及血清療法研究所, <sup>3)</sup>熊本保健科学大学

A. 研究目的

タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングを行うため、昨年度は分析装置の設定、検査技術の確立等の準備を実施した。今年度は、実際にパイロットスタディとしてタンデム質量分析計による新生児スクリーニングをスタートし、システムの検証や有効性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 測定に用いた装置並びに試薬、分析方法

昨年度本研究報告書で報告した装置、試薬、分析方法を用いた。測定の正確性、安定性を検証するため、アミノ酸、アシルカルニチンの同時再現性、日差再現性を今回も検討した。

2. スクリーニングのシステムについて

熊本大学先進医療倫理委員会の承認を得たパイロットスタディの説明書およびその内容をより平易にした説明書の 2 種類を用いて、産科医療機関のスタッフが保護者に説明し、同意書にて同意の得られた新生児を対象とした。同意の得られた濾紙サンプルには「タンデム同意」の朱印を押し、朱印のあるサンプルについてのみ、現行の方

法によるスクリーニングに追加して、タンデム質量分析計による測定を行った。測定は財団法人化学及血清療法研究所(以下、化血研)にて実施し、結果が熊本大学小児科に送られ、カットオフ値を超える結果があった場合の再採血あるいは直ちに精密検査を行うかの判断を行った。産科医療機関への連絡は異常値の場合のみとした。保護者への連絡は、現行のスクリーニングと同じシステムを用い、産科医療機関から行った。費用は、対象者による負担はなし、とし、化血研が負担した。また、平成 16 年度熊本大学先端医療支援経費からも費用の一部を負担した。現行のスクリーニングシステムを利用した試験研究であるため、熊本県に説明、了承を受けた。新生児マススクリーニング以外で、担当医師から直接タンデムマスでの測定依頼のあったものは、全て測定を行い担当医と熊本大学小児科へ報告した。

C. 研究結果

1. 測定値の精度管理

- 1) アミノ酸及びアシルカルニチンの同時再現性  
アミノ酸は Phenylalanine (Phe), Isoleucine + Leucine (Ile +Leu), Citrulline (Cit) について患者濾紙血液を用い、前処理を含めた同時再現性の検討を行った。10 回の測定で CV は Phe 11.6%, Leu/Ile 2.6%, Cit 4.7% であった。アシルカルニチンは Acetylcarnitine (C2), Propionylcarnitine (C3), C3/C2 比を同様に検討した。CV は C2 が 4.0%, C3 が 4.5%, C3/C2 比が 5.8% であった。
- 2) アミノ酸及びアシルカルニチンの日差再現性  
米国 CDC 供与の精度管理用血液濾紙を用いア

ミノ酸 6 項目, アシルカルニチン 9 項目の 6 日間の日差再現性を確認した。CV は Valine (Val) 4.7%, Methionine (Met) 3.1%, Ile +Leu 4.8%, Tyrosine (Tyr) 3.1%, Phe 4.2%, Cit 6.5%, C2 が 3.7%, C3 が 6.0%, C4 が 5.7%, C5 が 9.1%, C6 が 14.9%, C8 が 4.8%, C10 が 10.6%, C14 が 16.3%, C16 が 11.9%であった。機器の故障等はパイロットスタディ開始後発生していない。準備期間中に 3 回のトラブルがあった (HPLC のデガッサーの異常→ユニット交換で対応, 質量分析計本体のパワーサプライ不良によるヒューズ切れ→ユニット交換で対応, 真空ポンプ停止→コンピューターソフトのバージョンアップで対応)。

## 2.パイロットスタディ

### 1) タンデム質量分析計による新生児スクリーニング

平成 17 年 3 月より, 同意が得られた児のみを対象としてパイロットスタディをスタート, 12 月末日までに 2,039 名をスクリーニングした。検査同意率は約 99%であった。再採血の対象となったのは合計 40 名 (再採血率 1.96%) で, このうち 34 名が Tyr (カットオフ 3.62mg/dl, 再採血率 1.67%)高値によるものであった。Tyr 以外では freecarnitine (C0) 2 名, C10 が 3 名, C8/C10 が 1 名であった。これらは最終的に全て疾患ではないと判断された。

### 2) 新生児スクリーニング以外の測定

新生児スクリーニング以外に主に九州地域から濾紙血のタンデムマスによる解析依頼を受け入れており, 平成 17 年 3 月より平成 18 年 1 月までに 44 件を測定した。この中で 1 例のメチルマロン酸尿症を診断した。この症例は日齢 1 に哺乳力低下がみられ, 日齢 4 に担当医からの依頼を受け緊急検査した。重症アシドーシス発症後で救命し得なかった (日齢 4 死亡) が, 化学診断, 酵素診断から確定診断ができ, 家族に対してより正確な遺伝カウンセリングが実施できた。

## D.考察

タンデム質量分析計による測定の精度管理については, 引き続き実用上問題のない範囲の CV であった。また, 昨年度報告したようにタンデム質量分析計によるアミノ酸の測定値は, HPLC による測定値と非常に良い相関を示しており, 今後アミノ酸の測定法を現行のものからタンデム質量分析計に移行することは可能であると考えられた。スクリーニングは, 今のところ一部産科医

療機関を対象としており検査数が少ないため, 今後自治体や産婦人科医会等の協力を得て拡大したい。タンデム質量分析計が 1 台のため, メンテナンスが必要な場合に検査の実施が遅れることがあった。この点は, 検査の費用をどこに求めるかということにつながる問題であり, 検討が必要である。マススクリーニング外で 1 例診断されたメチルマロン酸血症は日本で最も頻度の高い有機酸血症と考えられており, 新生児期発症の死亡例では確定診断に至らない症例も多いことが予想される。早期治療で救命可能な場合があることが知られており, 今後のスクリーニングを考えるとときに検討材料となると考えられる。

## E.結論

平成 17 年 3 月より熊本でタンデムマス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を開始し, 同 12 月までに 2,039 名をスクリーニングした。スクリーニングからは疾患は発見されていない。再採血率は 1.96%, Tyr を除いた再採血率は 0.29%であった。スクリーニング以外から 1 名のメチルマロン酸尿症を診断した。今後, 熊本県全域に対象を拡大する予定である。

## F. 研究発表

### 学会発表

福永啓文, 木脇弘二, 請園なぎさ, 中村公俊, 三 洩 浩, 遠藤文夫, 川瀬昭彦, 近藤裕一, 田崎隆二, 藤田春雄, 重松陽介, 但馬剛, 佐倉伸夫: 新生児タンデムマススクリーニングで発見した重症メチルマロン酸血症 第 50 回日本人類遺伝学会 2005. 9.19-22 (倉敷)

田崎隆二, 武田聖子, 藤田春雄, 梅橋豊蔵, 木脇弘二, 中村公俊, 請園なぎさ, 三 洩 浩, 遠藤文夫, 重松陽介: タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングパイロットスタディの状況報告～熊本県の場合～ 第 33 回日本マス・スクリーニング学会 第 28 回技術部会 2005. 10.7-8 (久留米)

木脇弘二, 請園なぎさ, 中村公俊, 三 洩 浩, 遠藤文夫, 田崎隆二, 藤田春雄, 重松陽介: 熊本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～パイロットスタディの状況報告～第 48 回日本先天代謝異常学会 2005. 11.16-18 (熊本)



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

## 濾紙血を用いたチロシン血症 1 型マススクリーニング法の検討

### 研究要旨

新生児濾紙血を用いたチロシン血症 1 型マススクリーニング法として、一次検査に血中チロシン濃度、二次検査に血中サクシニルアセトン濃度の測定を検討した。スクリーニング総数 28,891 検体のうち、一次検査陽性は 775 検体 (2.68%)、二次検査陽性は、3 検体 (0.01%) であった。二次検査陽性例に再検査を行ったが、いずれも正常で患者は発見されなかった。偽陽性となった原因としては、早期産児、低体重、貧血などの影響が考えられた。今後、スクリーニング数を増やして検討を行っていくとともに、MS/MS 法など他の血中 SA 濃度測定法、一次検査としての血中チロシン濃度測定の是非などについて検討を行う必要がある。

### 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重篤な肝細胞障害を来し、肝不全へと至る疾患である。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たことにより、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ている。しかし、新生児は生理的に血中チロシン濃度が高値を示すものが多く、一方で HT1 患者でも血中チロシン濃度が著しい高値を示さない症例があるため、血中チロシン濃度のみによるスクリーニングは困難である。そこで我々は、タンデムマスによる濾紙血中チロシン濃度測定に加えて、二次検査として濾紙血中 SA 濃度測定を行う方法について昨年度より検討を行っている。

### B. 研究方法

1. 一次検査：新生児濾紙血中チロシン濃度の測定  
当科で行っているタンデムマスによる先天性

代謝異常症スクリーニングに対して同意を得られたものを対象とした。タンデムマスにより、濾紙血中チロシン濃度を測定し、これを一次検査とした。血中チロシン濃度 200 nmol/ml 以上を一次検査陽性とした。

2. 二次検査：濾紙血中サクシニルアセトン (SA) 濃度の測定

一次検査陽性の検体のみについて、二次検査として濾紙血中 SA 濃度を測定した。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、 $\delta$ -アミノレブリン酸 ( $\delta$ -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、modified Ehrlich reagent を加え、550 nm にて吸光度を測定した。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た。血中 SA 濃度  $2 \mu\text{mol/l}$  以上を二次検査陽性とした。

3. 再検査

二次検査陽性例について、各検体を送付していただいている施設に連絡し、新たに採取した濾紙血または尿の送付を依頼した。再送付された検体について、濾紙血中または尿中 SA 濃度を測定した。

#### 4. 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. 一次・二次検査結果

研究期間内にスクリーニングを行った検体総数は、28,891 検体であった。そのうち、一次検査陽性は、775 検体 (2.68%) で、更に二次検査陽性は、3 検体 (0.01%) であった。

#### 2. 再検査結果

二次検査陽性であった3例について、いずれも再検査時には血中または尿中 SA 濃度は正常であった (表)。従って、今研究期間中には、HT1 症例は発見されなかった。偽陽性を呈した要因として考え得るものとしては、早期産児、低体重、貧血などが挙げられた (表)。

### D. 考察

本年度行った新生児濾紙血による HT1 マスクリーニングにおいて、一次検査では血中チロシン濃度高値を示した検体が多く認められ、これは昨年度の結果と同様であった。

二次検査陽性例はいずれも偽陽性であったが、そのうち2例が早期産・低体重児であった。その原因は明らかではないが、未熟性による  $\delta$ -ALA dehydratase 活性低下の可能性も疑われる。また、貧血の強い児では、濾紙血から抽出される赤血球が少ないために、みかけ上  $\delta$ -ALA dehydratase 活性が低値をとることに注意が必要である。1例では、偽陽性となった児自身の要因が明らかでなかった。 $\delta$ -ALA dehydratase 活性は、高温環境による影響を受けやすいという結果が昨年度の検討より得られており、検体保存・輸送条件が偽陽性の一因である可能性は考えられる。

今回の研究では、濾紙血中 SA 濃度測定法として spectrophotometric microassay 法を用いたが、SA による  $\delta$ -ALA dehydratase 活性抑制作用を利用した間接的測定法であるために、前述のような偽陽性の問題がみられた。濾紙血中 SA 濃度測

定法としては、最近 Allard らが MS/MS 法による測定について、比較的簡便で、温度など他の因子の影響を受けることも少ないと報告している。

今回、HT1 症例は発見されなかったが、これまでに推定されてきた HT1 の発症率を考慮すると、いまだスクリーニング数の不足が考えられる。また、新生児期に明らかな血中チロシン高値を呈さない HT1 症例が存在することから、一次検査として血中チロシン濃度を用いることで見逃し例が生じる可能性が考えられる。

### E. 結論

濾紙血を用いた HT1 のマスクリーニング法として、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、実施可能な方法であり、更にスクリーニング数を増やして検討を行う必要があると考える。今後、MS/MS 法などによる SA 濃度測定法の検討や、一次検査としてのチロシン濃度測定の必要性について、検討を加えることも必要と考えられる。

### 参考文献

1. Holme E, Lindstedt S: Tyrosinemia type I and NTBC (2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). *J Inher Metab Dis* 21: 507-517, 1998.
2. Schulze A, Frommhold D, Hoffmann GF, Mayatepek E: Spectrophotometric microassay for  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase in dried-blood spots as confirmation for hereditary tyrosinemia type I. *Clin Chem* 47: 1424-1429.
3. Allard P, Grenier A, Korson MS, Zytkevich TH: Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin Biochem* 37: 1010-1015, 2004.

表 二次検査陽性例

	陽性例 1	陽性例 2	陽性例 3
濾紙血中チロシン 濃度 (nmol/ml)	549.0	243.0	344.0
精検結果	血中・尿中 SA 正常	血中 SA 正常	血中 SA 正常
偽陽性の原因 (推定)	早期産児 低体重 (33w3d, 1116g) 貧血	? (検体保存状態、 温度など?)	早期産児 低体重 (23w, 618g)

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

## アミノ酸分析による HPLC 法とタンデムマス法の相関

### 研究要旨

新しい検査法を導入する場合、現行法との相関を検討することは重要な事項のひとつである。大阪市立大学小児科で治療中または経過観察中のフェニルケトン尿症、高フェニルアラニン血症、チロシン血症Ⅱ型、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症等の患者 21 症例の濾紙血 25 検体を使用して、大阪市環境保健協会的高速液体クロマトグラフィー法と福井大学医学部のタンデムマス法によるフェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン+イソロイシン、メチオニンの測定値について両者間の相関を求めた。その結果、両測定法における各アミノ酸の相関係数( $R^2$ )は、フェニルアラニン：0.994、チロシン：0.989、バリン：0.932、ロイシン+イソロイシン：0.960、メチオニン：0.846 であった。タンデムマス法は定量性に優れた高速液体クロマトグラフィー法と非常に良い相関が得られたことから、安定した測定系であり、信頼性の高い方法であると考えられた。

### 研究協力者

大竹治美、藤本昭榮、酒本和也、宮城富子  
(大阪市環境保健協会検査室)  
岡野善行、新宅治夫、山野恒一  
(大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学)  
長谷 豊 (大阪市北区保健福祉センター)  
重松陽介 (福井大学医学部看護学科)

(MSUD)は 2 症例 6 検体、ホモシスチン尿症 (HCU)は 1 症例 1 検体で合計 21 症例の濾紙血 25 検体を使用した。

### 2) 方法

新生児アミノ酸代謝異常症マス・スクリーニングの指標アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met) と診断に補足的な意義を持つアミノ酸であるチロシン (Tyr)、バリン (Val)、イソロイシン (Ile) の測定値について、大阪市環境保健協会 HPLC 法 (島津) と福井大学医学部のタンデムマス法 (TSQ7000) との相関を求めた。なお、タンデムマス法では同一分子量の Leu と Ile は分離できず Leu+Ile として検出されるため、HPLC 法で個々に分離された Leu と Ile の値を和して Leu+Ile の測定値とした。

### 3) HPLC 法の測定法と分析条件

試料調整は 1/8 インチ濾紙血 1 枚を使用し、詳細は既報<sup>1), 2)</sup> のとおりであるが、図 1 に測定法と分析条件を簡単に示す。

### 4) タンデムマス法の測定法と分析条件

試料調整は 1/8 インチ濾紙血 1 枚を使用し、チルエステル化をおこなっている。詳細は既報<sup>3), 4), 5)</sup> のとおりであるが、図 2 に測定法と分析条件を簡単に示す。

### A. 研究目的

大阪市では現在、アミノ酸代謝異常症のマス・スクリーニング検査法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を採用しているが、多種類の代謝異常症のマス・スクリーニングが同一分析系で可能であり、既に欧米各国で新生児マス・スクリーニング法として採用されているタンデムマス法の導入を検討中である。新しい検査法を導入する場合、現行法との相関を知ることは重要な検討事項のひとつであるため、アミノ酸測定値における HPLC 法とタンデムマス法について両者間の相関を求めた。

### B. 研究方法

#### 1) 使用検体

大阪市立大学小児科で治療中または経過観察中の患者症例について検討した。フェニルケトン尿症 (PKU) と高フェニルアラニン血症 (HPA) は 17 症例 17 検体、チロシン血症Ⅱ型 (TyrⅡ型) は 1 症例 1 検体、メープルシロップ尿症