

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

## タンデムマスと培養線維芽細胞を用いた脂肪酸β酸化能の評価

### 研究要旨

タンデムマスによる新生児マススクリーニングの普及に伴い、有機酸、脂肪酸代謝異常症が疑われた症例に対する診断方法の確立が必要となる。脂肪酸代謝異常症のスクリーニングでは、血中アシルカルニチン分析が有用ではあるが、確定診断が困難な場合がある。そこで、診断されている脂肪酸代謝異常症患者の皮膚線維芽細胞を用い、タンデムマスによる脂肪酸β酸化能評価法を確立した。疾患の内訳は、中鎖アシル Co-A 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 1 例、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 2 例、三頭酵素 (TFP) 欠損症 2 例、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II (CPT II) 欠損症 2 例、そしてグルタル酸尿症 2 型 (GA2) 13 例で、それぞれの線維芽細胞に対し、パルミチン酸及びオクタン酸を添加した培地で培養し、96 時間後にタンデムマスで上清のアシルカルニチン分析を行った。結果は、それぞれの脂肪酸代謝異常症に特徴的なアシルカルニチンプロファイルを示し、診断確定に有用であった。GA2 については、新生児型 3 例と遅発型 10 例でプロファイルに違いがみられ、感度よく診断できるだけでなく、重症度も評価できる可能性が示された。本法がスクリーニング後の確定診断の方法として、有力な選択肢となることが期待される。

### 研究協力者

遠藤 充、小林 弘典、長谷川 有紀、  
山口 清次（島根大学小児科）

### A. 研究目的

タンデムマスによる新生児マススクリーニングの普及に伴い、有機酸、脂肪酸代謝異常症が疑われた症例に対する診断方法の確立が必要となる。このため、スクリーニングで発見される脂肪酸代謝異常症の診断を確立する事を目的として、皮膚線維芽細胞を用い、タンデムマスによる脂肪酸β酸化能の評価方法について検討した。

### B. 研究方法

中鎖アシル Co-A 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 1 例、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 2 例、三頭酵素 (TFP) 欠損症 2 例、カルニチンパルミト

イルトランスフェラーゼ II (CPT II) 欠損症 2 例、そしてグルタル酸尿症 2 型 (GA2) 13 例を用いた。Jurgen G. Okunらの方法を一部改変して行った。パルミチン酸及びオクタン酸を添加した培地で皮膚線維芽細胞を培養し、96時間後に上清を採取し、タンデムマスでアシルカルニチン分析を行った。

### C. 研究結果

#### C-1. 線維芽細胞β酸化能の特徴（図1、表1）

MCAD 欠損症ではパルミチン酸負荷とオクタン酸負荷の両方で、C4、C6、C8 といった中鎖アシルカルニチンの上昇が特徴的であった。VLCAD 欠損症では、パルミチン酸負荷時に C12、C14、C14:1 が上昇した。CPT II 欠損症ではパルミチン酸負荷時に C16、C16:1 が上昇し、TFP 欠損症では C16、C16:1、C16-OH の上昇がみられ、疾患に特徴的なプロファイルを示した。VLCAD 欠損症、CPT II 欠損症、そして TFP 欠損症では、オクタン酸負荷時に

特異的なアシルカルニチンの上昇はみられなかった。GA2 では、パルミチン酸負荷時に C4~C16 が広範にわたって増加し、オクタン酸負荷時に、C4, C6, C8 の上昇がみられた。

#### C-2. GA2 の表現型によるアシルカルニチンプロファイルのちがい

GA2 患者 13 症例を臨床型で分類すると、新生児型 3 例、遅発型 10 例であった。β酸化能の評価をこれらの型に分けて検討したところ、新生児型では、パルミチン酸負荷時に C12, C16 の上昇がみられ、オクタン酸負荷で C4, C8 が上昇した。遅発型では、パルミチン酸負荷時に C4, C6, C8, C10, C12, C16 が上昇し、オクタン酸負荷で C4, C8 が上昇した。

### D. 考察

#### D-1. 線維芽細胞 β酸化能の特徴

本法によって、簡便に脂肪酸 β酸化能を測定することができた。培養線維芽細胞とタンデムマスを用いた β酸化能評価の手法は以前にも報告されているが、本法では、安定同位体を用いない事と長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸を別々に負荷することが特徴である。2 種類の鎖長の脂肪酸を負荷することで、長鎖脂肪酸だけを負荷するよりも β酸化能を詳しく知ることができる。

従来のタンデムマスでは、長鎖アシルカルニチンが蓄積するような疾患、特に CPT2 欠損症や GA2 は化学診断が困難な場合がある。これらは本法で、パルミチン酸を負荷した場合にいずれも C16 を中心に上昇している。しかし、オクタン酸の負荷を加えると GA2 の症例は中鎖アシルカルニチンが上昇した。これは GA2 において、長鎖から中鎖まで広く β酸化能が障害されていることを示している。これによって疾患の鑑別が容易であった。

#### D-2. GA2 の臨床型によるアシルカルニチンプロファイルの違い

GA2 の臨床型は、1) 新生児型と 2) 遅発型に大

別される。1) 新生児型は、新生児期早期に重症の非ケトン性低血糖や代謝性アシドーシスをきたし、致死的経過をとる。2) 遅発型は、様々な程度に間欠発作を繰り返すのが特徴である。タンデムマスや GC/MS によってスクリーニングされるが、非特異的な結果しか得られないことも多く、診断が困難な疾患の一つである。

今回、GA2 患者 13 症例の検討を行った。内訳は新生児型 3 例、遅発型 10 例であった。新生児型では、パルミチン酸負荷時に C16 が上昇し、オクタン酸負荷時に C8 が上昇した。一方、遅発型はパルミチン酸負荷時には C16 以下のアシルカルニチンが上昇していた。新生児型で C16, C8 が上昇するのは、それだけ酵素活性が遅発型よりも低下しており、アシルカルニチンが蓄積することが考えられた。この方法によって、タンデムマスだけでは診断が困難な場合でも、GA2 を感度よく診断し、また、重症度の評価にも役立つ可能性がある。

### E. 結論

タンデムマスによる新生児マススクリーニングが普及することで、新生児期に診断困難な症例が増えることが予想される。本法は、*in vitro* で飢餓状態を作り、炭素鎖の異なる脂肪酸を加えて細胞の β酸化能を測定することができ、診断に有用であった。スクリーニング後の確定診断の方法として、本法が有力な選択肢となることが期待される。今後は、より簡便な検査とするために、リンパ球を用いて採血だけで済む方法を検討したい。

### F. 学会発表

1) 遠藤充、小林弘典、長谷川有紀、山口清次：第 31 回日本医用マスペクトル学会、2006 年 9 月、名古屋

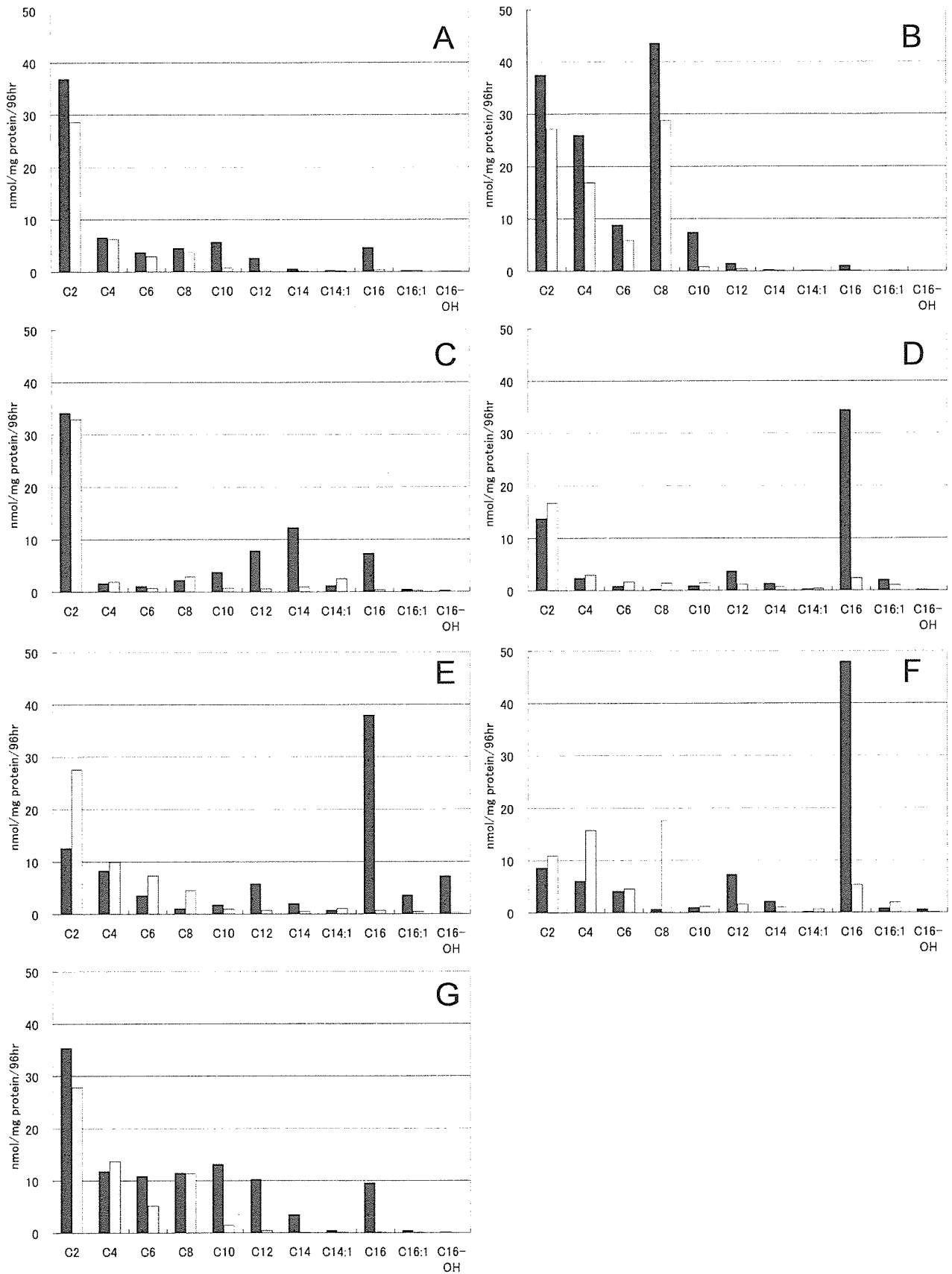


図1. 線維芽細胞のアシルカルニチンプロファイル

■ パルミチン酸負荷、□ オクタン酸負荷、A; control、B; MCAD 欠損症、C; VLCAD 欠損症、D; CPT II 欠損症、E; TFP 欠損症、F; GA2 (新生児型)、G; GA2 (遅発型)

表 1. パルミチン酸とオクタン酸を負荷した場合の $\beta$ 酸化中間代謝物

	代謝指標	
	オクタン酸負荷	パルミチン酸負荷
MCAD欠損症	C4, C6, C8	C4, C6, C8
VLCAD欠損症	—	C12, C14, 14:1
CPT2欠損症	—	C16, C16:1
TFP欠損症	—	C16, C16:1, C16-OH
GA2 (Neonatal)	C4, C8	C12, C16
(Late-onset)	C4, C8	C4~C12, C16

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

遺伝子診断 ゲノム解析によるピットフォール：T2 欠損症の解析から

研究要旨

新生児マススクリーニングで先天代謝異常症が疑われた場合、確定診断としての遺伝子診断が必要となる。この場合ゲノムレベルでの各エクソン配列の増幅により遺伝子変異を同定するのが一般的である。われわれがこれまで行ってきたミトコンドリアアセトアセチル-CoA チオラーゼ (T2) 欠損症の解析から、そのようなアプローチにて変異が同定困難であったり、変異の特徴を誤って解釈する変異について検討した。その結果、遺伝子の再構築（大きな欠失、挿入、重複）は変異なしと考えられる可能性があり、またエクソン内のミスセンス（もしくはサイレント）変異が実はスプライシング異常をきたす変異であるなどのケースが見つかっている。このためゲノムからの遺伝子変異解析は簡便ではあるが、変異が同定されない場合や病態まで考える場合 cDNA 解析が相補的に重要である。

研究協力者

深尾 敏幸（岐阜大学助教授）

A. 研究目的

新生児マススクリーニングで先天代謝異常症が疑われた場合、確定診断としての遺伝子診断が必要となる。この場合ゲノムレベルでの各エクソン配列の増幅により遺伝子変異を同定するのが一般的である。

われわれはこれまで 60 症例のミトコンドリアアセトアセチル-CoA チオラーゼ (T2) 欠損症解析を行ってきたが、1 アリールの異常が同定できないものが 3 症例、両アリールの異常が同定できないのが 1 症例、両アリールが大きな遺伝子欠失、挿入であると考えられたのが 3 症例で、その切断点まで最終的に同定できたのが 2 症例であった。ゲノムでの各エクソンを増幅し配列を決定するというアプローチにて変異が同定困難であったり、変異の特徴を誤って解釈する変異について検討した

B. 研究方法

患者細胞よりゲノム DNA を抽出してゲノムレベルで、各エクソン（両端のスプライス部位を含む）を増幅、ダイレクトシーケンスを行った。一部では Total RNA を抽出して RT-PCR を行い、増幅断片は原

則 T ベクターにサブクローニングして塩基配列を決定した。また症例によって Long Range PCR などを行った。

（倫理面への配慮）本研究は岐阜大学大学院医学系研究科の医学研究等倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

以下の症例はすべて酵素診断で T2 活性がなく、イムノブロットでも T2 蛋白が検出されなかった例である。

症例 GK41: ゲノム解析の結果、エクソン 2、3、4 が増幅されず、他のエクソン配列は正常であった。大きな遺伝子の欠失が示唆されたが、cDNA 解析の結果エクソン 2-5 スキップが認められた。そこで Long range PCR を用いてゲノム解析を進めたところイントロン 1 とイントロン 4 の Alu 配列にて non-equal homologous recombination が生じて 6.4Kb の欠失をきたしていることがわかった。

症例 GK48: ゲノム解析の結果、各エクソンとその両端のスプライス部位を増幅してダイレクトシーケンスを行ったが変異は認められなかった。そこで cDNA 解析を行ったところ、エクソン 8、9 がタンデムに重複していることが明らかになった。ゲノムに

てさらに解析を進めたところ、イントロン7とイントロン9のAlu配列にて non equal homologous recombination が生じて、このようなエクソン8、9のタンデムな重複が生じていることが明らかになった。

**症例 GK06, GK44, GK51:** これら3症例はゲノム解析の結果、それぞれ A380T, A210V, E254K をヘテロで持つことは確認できたが、それぞれもう1つのアリアルの変異が同定できず、cDNA 解析の結果ではこれら同定された変異をもつ cDNA のみが増幅され、一方のアリアルが発現していないことは明らかになった。発現していないアリアルが大きな欠失によるものなのかどうかについては今後の検討が必要である。

**症例 GK03:** ゲノム解析の結果、各エクソン、エクソンイントロン境界は正常であり、さらに 5' flanking 領域を解析しても明らかな変異は同定できなかった。cDNA 解析では正常な配列の cDNA が増幅されており、ただ発現量は低下していた。現在変異は不明である。

**症例 GK55:** ゲノム解析ではエクソン11が増幅されず、cDNA 解析を行ったところエクソン11スキップした cDNA のみが増幅された。現在エクソン11を含む欠失についてゲノムでのエクソン10からエクソン12にかけて Long range PCR を行っているが、正常者では増幅されるのに GK55 では増幅されず、長い挿入の可能性が示唆される。

**症例 GK43:** ゲノム解析の結果エクソン11に c. 1124A>G の1塩基置換が認められ、N375S 変異とした。しかし cDNA 解析を行ったところ、この変異は同定されず、この領域を含む c. 1120~1163 の欠失が認められた。c. 1124 の A>G 置換により、5塩基上流の cryptic splice site が活性化されて、ミスセンス変異としてでなく、スプライシング異常をきたす変異であることが明らかとなった。

#### D. 考察

以上のような症例が認められたが、特に症例48では通常のゲノムレベルの各エクソンのダイレクトシーケンスでは遺伝子異常はないと判断されてしまい、もし活性測定などの診断法を併用しなければ診断を誤る結果となる。しかし cDNA 増幅により異常

が明らかとなった。最近いくつかの疾患において Alu 配列を介した遺伝子再構築、欠失などが患者の分子病態として明らかになってきており、Multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法などを併用することが、これらの欠失などの同定に必要である。cDNA レベルの解析により、欠失のホモ接合体においてはかなりの情報が得られ、病態を明らかにすることは比較的容易であるが、点変異との複合ヘテロ接合体では非常に困難である。また GK43に代表される、ゲノム解析での点変異（あるときはアミノ酸を換えないサイレント変異と考えられるものを含む）が病態の上ではスプライシング異常をきたす変異である場合があり、cDNA 解析を行う重要性が示唆される。

#### E. 結論

遺伝子解析が容易な手段となって、診断を遺伝子レベルで行う場合が各種疾患で増えてきているが、ピットフォールも存在することを念頭に置いて解析することが重要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Funato M, Shimozawa N, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y, Imamura Y, Matsumoto T, Tsukamoto T, Kojidani T, Osumi T, Fukao T, Kondo N. Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal beta-oxidation enzyme deficiencies. *Brain Dev.* 28(5):287-292, 2006
2. Kawamoto N, Kaneko H, Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T, Kasahara K, Iwasa S, Kondo N: Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 17:125-133, 2006.
3. Kondo M, Fukao T, Shinoda S, Kawamoto N, Kaneko H, Kato Z, Matsui E, Teramoto T, Nakano T, Kondo N: Lymphocyte responses to chymotrypsin- or trypsin V-digested b-lactoglobulin in patients with cow's milk allergy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* in press

4. Fukao T, Sakurai S, Rolland M-O, Zobot M-T, Schulze A, Yamada K, Kondo N: A 6-bp deletion at the splice donor site of the first intron resulted in aberrant splicing using a cryptic splice site within exon 1 in a patient with succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. *Mol Genet Metab* 89:280-282, 2006

5. Zhang G, Fukao T, Sakurai S, Yamada K, Michael Gibson K, Kondo N: Identification of Alu-mediated, large deletion-spanning exons 2-4 in a patient with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *Mol Genet Metab*. 89:222-226, 2006

6. Teramoto T, Fukao T, Tomita Y, Terauchi Y, Hosoi K, Matsui E, Aoki M, Kondo N, Mikawa H: Pharmacokinetics of Beclomethasone Dipropionate in an hydrofluoroalkane-134a propellant system in Japanese children with bronchial asthma. *Allergology International* 55:317-320, 2006.

7. Sukegawa-Hayasaka K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T, Kuwata K, Orii T, Kondo N: Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *J Inherit Metab Dis*. 29 :755-761, 2006

○8. Yamada K, Fukao T, Zhang G, Sakurai S, Ruitter JPN, Wanders RJA, Kondo N: Single-base substitution at the last nucleotide of exon 6 (c. 671G >A), resulting in the skipping of exon 6, and exons 6 and 7 in human Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene. *Mol Genet Metab* in press

○9. Sakurai S, Fukao T, Haapalainen AM, Zhang G Yamada S, Lilliu F, Yano S, Robinson P, Gibson MK, Wanders RJA, Mitchell GA, Wierenga RK, Kondo N: Kinetic and Expression Analyses of Seven Novel Mutations in Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase (T2): Identification of a  $K_m$  Mutant and an Analysis of the Mutational Sites in the Structure. *Mol Genet Metab* in press

## 2. 学会発表

1) Fukao T, Sakurai S, Zhang GX, Haapalainen AM,

Wierenga RK, Kondo N.

Mutation update of human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 10<sup>th</sup> International congress of inborn errors of metabolism. September 12-16, 2006, Chiba, Japan

2) Fukao T, Sakurai S, Zhang GX, Yamada K, Kursula P, Mitchell GA, Kondo N. Mutation update of succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase deficiency. The 10<sup>th</sup> International congress of inborn errors of metabolism. September 12-16, 2006, Chiba, Japan

3) Yotsumoto Y, Hasegawa H, Kobayashi H, Hirose H, Fukao T, Yamaguchi S. Clinical and molecular study of 13 Japanese children with glutaric academia type 2. The 10<sup>th</sup> International congress of inborn errors of metabolism. September 12-16, 2006, Chiba, Japan

4) Sakurai S, Fukao T, Zhang GX, Yamada K, Haapalainen AM, Wierenga RK, Lilliu F, Kondo N. Characterization of E252del mutant protein identified in a patient with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 10<sup>th</sup> International congress of inborn errors of metabolism. September 12-16, 2006, Chiba, Japan

5) Yamada K, Fukao T, Zhang G, Sakurai S, Ruitter JPN, Wanders RJA, Kondo N: Single-base substitution at the last nucleotide of exon 6 (c. 671G >A), resulting in the skipping of exon 6, and exons 6 and 7 in human SCOT gene. The 10<sup>th</sup> International congress of inborn errors of metabolism. September 12-16, 2006, Chiba, Japan

6) Hasegawa Y, Kobayashi H, Ohashi Y, Nishino I, Shigematsu Y, Fukao T, Yamaguchi S. Study of clinical phenotype in Japanese patients with very-long chain acyl-CoA dehydrogenase. The 10<sup>th</sup> International congress of inborn errors of metabolism. September 12-16, 2006, Chiba, Japan

7) 深尾敏幸, 近藤直実, 新宅治夫, 澤田好伴, 坂崎弘美, 平山謙. サクシニル-CoA: 3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ欠損症の本邦初症例の発見. 第109回に本小児科学会学術集会. 平成18年4月21日-23日, 金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

## 新しい新生児マススクリーニングシステムにおける質量分析法の有用性

### 研究要旨

久留米大学 GC/MS 医学応用研究施設では、ガスクロマト質量分析 (GC/MS) 法およびタンデム質量分析 (MS/MS) 法を用いた新生児スクリーニング試験研究を施行している。特にリスク児に対しては GC/MS 法と MS/MS 法をセットにしたスクリーニングを実施している。試験研究を通して、わが国の先天性代謝異常症の中ではメチルマロン酸血症の頻度が最も高いこと。メチルマロン酸血症は GC/MS 法でのみ診断可能であり、頻度上からも、単独でも開始すべき疾患であることが示唆された。またリスク児尿の GC/MS 分析で、3-メチルクロトニルグリシンおよび 3-ヒドロキシイソ吉草酸の大量排泄が認められ、3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) 欠損症と化学診断した症例を経験した。5 生日目に採取されたガスリーろ紙血の MS/MS 分析において、C5-OH カルニチンの異常高値が確認され、発症前の新生児期において十分発見できる可能性が示唆された。これらの結果は、新生児スクリーニングにおける質量分析法の有用性と早期開始の必要性を強く示唆した。同時に両質量分析法を積極的に利用したわが国独自のスクリーニング体制を構築することが急務であると考えられた。

### 研究協力者

猪口隆洋, 田代恭子, 青木久美子, 稲場美佐,  
松本かおり, 原 千尋, 松下優美, 松石豊次郎  
(久留米大学医学部 GC/MS 医学応用研究施設)

芳野 信, 渡辺順子

(久留米大学医学部 小児科)

大部敬三

(聖マリア病院 小児内科)

によりサンプル調整し<sup>1)</sup>、Agilent 5973, 5975B GC/MS を用いて尿中の代謝産物を一斉分析した。また、MS/MS 法は重松らの方法に準じ、Waters Quattro Premier LC/MS/MS を用いて濾紙血中のアミノ酸、アシルカルニチンを分析した<sup>2),3)</sup>。なお、GC/MS および MS/MS による新生児スクリーニング試験研究は、久留米大学医学部倫理委員会で承認され、各医療機関で文書を用いた説明により保護者から得られたインフォームドコンセントに基づくものである。

### A. 研究目的

当施設では、GC/MS 法、MS/MS 法の両質量分析法を積極的に用いて新生児代謝異常スクリーニングの試験研究を実施している。試験研究を通して、わが国での新生児マススクリーニングにおける質量分析法の有用性の実証と対象疾患も含めたわが国独自のスクリーニングシステム構築のための知見を得ることを目的に検討した。

### B. 研究方法

GC/MS 法は、北部九州（福岡県、佐賀県、大分県）の各研究協力医療機関で出生した新生児の尿を、簡易ウレアーゼ法・安定同位体希釈法

### C. 研究結果

当施設では、1996 年 1 月から 2006 年 12 月までに、約 69,000 名の新生児尿をスクリーニングし、メチルマロン酸血症 10 例をはじめプロピオン酸血症 2 例、OTC 欠損症 1 例、シトルリン血症 I 型 1 例、グリセロール尿症 7 例、ジヒドロピリミジン分解酵素欠損症 4 例、ジヒドロピリミジン脱水素酵素欠損症 1 例、β-ウレイドプロピオナーゼ欠損症 8 例、シトリン欠損症 1 例、メープルシロップ尿症 1 例、ハートナップ病 2 例、2-ケトアジピン酸尿症 14 例、5-オキソプロリン尿症 1 例、エチルマロン酸尿症 1 例、D-グリセリン酸尿症 1 例お



よび神経芽細胞腫 2 例の 16 疾患、計 57 例を  
発見した。GC/MS 法による 10 年間の疾患全体  
としての発見率は、1 例 /1,200 人であった。  
このなかでメチルマロン酸血症の発見頻度は、  
1 例/6,900 人であった。またリスク児を対象  
とした GC/MS 法と MS/MS 法のセット質量分析  
の過程で、MCC 欠損症患児を発見した。尿の  
GC/MS 分析にて、3-ヒドロキシイソ吉草酸と 3-  
メチルクロトニルグリシンの大量排泄が確認  
され、MCC 欠損症と化学診断した。ろ紙血の  
MS/MS 測定では、C5-ヒドロキシカルニチン (3-  
ヒドロキシイソバレリルカルニチン) の異常高  
値を認めた。また、保護者の同意を得て、5 生  
日目のガスリーろ紙血を分析した結果、C5-ヒ  
ドロキシカルニチンの高値が認められた。

#### D. 考察

現在わが国では、現行法に代わるこれからの  
新しい新生児マススクリーニングの手段とし  
て質量分析法が考慮され、その導入のための試  
験研究が行われている。この質量分析法には尿  
を分析する GC/MS 法と血液ろ紙を用いる MS/MS  
法がある。当施設は 1996 年から GC/MS 法を用  
いて、2004 年からは MS/MS 法による代謝異常ス  
クリーニングの試験研究を施行している。10 年  
間の GC/MS 法による試験研究において、疾患全  
体の発見率が非常に高い (1/1,200) こと。特  
にメチルマロン酸血症の発見頻度 (1/6,900)  
は、わが国の先天性代謝異常症の中では最も高  
く、しかもスクリーニングの恩恵を最も受ける  
病型であるビタミン B<sub>12</sub> 反応性や軽症型メチ  
ルマロン酸血症は、GC/MS 法でのみ診断可能で  
あることなどが判明している。これらの結果は、  
代謝異常スクリーニングにおける GC/MS 法の  
感度ならびに診断精度の高さを実証している。  
また、われわれの施設では特に代謝異常症の疑  
われるリスク児の場合、尿の GC/MS 分析とろ紙  
血の MS/MS 分析とをセットにした分析を積極的  
に実施しているが、今回、このセット質量分析  
の過程で、MCC 欠損症患児を経験した。症例は、  
1 歳 3 ヶ月時に意識障害、けいれん重積にて発  
症、ライ症候群類似の経過をたどり代謝異常症  
が疑われた女児である。尿の GC/MS 分析にて、  
3-ヒドロキシイソ吉草酸と 3-メチルクロトニ  
ルグリシンの大量排泄が確認され、MCC 欠損症

と化学診断した。同時に提出されたる紙血の  
MS/MS 測定では、C5-ヒドロキシカルニチンの上  
昇を認め、GC/MS による化学診断を支持する結  
果が得られた。特記すべきは、保存の 5 生日ガ  
スリーろ紙血の分析においても、C5-ヒドロキ  
シカルニチンの高値がはっきり認められたこ  
とである。残念ながらこの患児は当施設施行の  
GC/MS 新生児スクリーニングを受けておらず新  
生児期 (5 生日) での確認はできないが、新生  
児期の尿においても 3-ヒドロキシイソ吉草酸  
と 3-メチルクロトニルグリシンの排泄を確認  
できることが十分予測される。今回の症例は、  
MCC 欠損症は質量分析法を用いることにより発  
症前の新生児期において早期発見できること  
を強く示唆する。MCC 欠損症は、わが国での報  
告例は少なく非常に稀な疾患とされているが、  
欧米では比較的頻度が高い疾患とされている<sup>4)</sup>。  
今後、質量分析法によるスクリーニングが実施  
されるようになると、わが国における MCC 欠損  
症の頻度を含めた実態が明らかになることが  
考えられる。

欧米はじめ諸外国では、フェニルケトン尿症  
と中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症が人種的に  
高頻度にあることなどの理由により、MS/MS 法  
はスクリーニングの手段としていち早く導入  
され、現在、世界の新生児スクリーニングの主  
流となっている。わが国においても現行のマ  
スクリーニングシステムがそのまま適用でき  
ること、サンプル処理能力に優れている点など  
現行法に代わるマススクリーニング法として  
は最適の質量分析法であると考えられる。しか  
し、先天性代謝異常症のような遺伝性疾患は人  
種差が大きいと、当然国ごとに重要となる対  
象疾患も異なる。新しいスクリーニングの対象  
となる疾患は、わが国において頻度が高く、治  
療効果の期待できる疾患を優先して選定する  
ことが重要である。従って、わが国で最も頻  
度が高いメチルマロン酸血症は、GC/MS 法でのみ  
診断可能な代謝疾患でもあり、単独でも  
GC/MS 法によるスクリーニングを開始すべきで  
あると考えられる<sup>5)</sup>。

これまでの試験研究の実績と経験により、こ  
れからの新しい新生児マススクリーニングに  
おける質量分析法の有用性が実証され、質量分  
析法によるマススクリーニング早期開始の必

要性が強く示唆された。同時に、対象疾患も含め両質量分析法を相補的かつ積極的に利用したわが国独自の新しい新生児スクリーニングシステムを構築することが急務であると考えられた。

## E. 結論

わが国の新しい新生児マススクリーニング法として質量分析法は非常に有用であり、対象疾患の選定も含め質量分析法を最大限に生かしたわが国独自のスクリーニングシステムを構築する必要性が強く示唆された。わが国で頻度上重要なメチルマロン酸血症は、単独でもGC/MS法によるスクリーニングを開始すべきである。現在のところ、GC/MS法、MS/MS法両者を同時に利用したスクリーニングシステムの構築は不可能かもしれないが、少なくともGC/MS法も施行可能な体制を整備した施設が、これからのスクリーニングを担当すべきであるとする。

## 文献

- 1) Matsumoto I and Kuhara T: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry-rapid, practical, and simultaneous urinary metabolites analysis. *Mass Spectrom Rev* 15: 43-57, 1996.
- 2) 重松陽介, 平野聡子 他: タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常マス・スクリーニング一スクリーニング地域拡大と患者検体分析による知見の蓄積一. *日本マス・スクリーニング学会誌*. 11: 57-67, 2001.
- 3) 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: 13-18, 2005.
- 4) H. G. M. Oude Luttikhuis, G. Touati et al: Severe hypoglycaemia in isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency; a rare, severe clinical presentation. *J Inher*

*Metab Dis*. 28: 1136-1138, 2005.

- 5) 松本かおり, 猪口隆洋, 青木久美子, 田代恭子, 稲場美佐, 文森明代, 原 千尋, 吉田一郎: GC/MSによる新生児代謝異常症スクリーニングの意義. *日本マス・スクリーニング学会誌* 16: 81-85, 2006.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 松本かおり, 猪口隆洋, 青木久美子, 田代恭子, 稲場美佐, 文森明代, 原 千尋, 吉田一郎: GC/MSによる新生児代謝異常症スクリーニングの意義. *日本マス・スクリーニング学会誌* 16: 81-85, 2006.

- 2) 文森明代, 猪口隆洋, 青木久美子, 田代恭子, 稲場美佐, 松本かおり, 原 千尋, 吉田一郎: 小児における尿中カテコラミン代謝産物. *日本小児臨床薬理学会雑誌* 19: 23-26, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 横山 隆人, 小池 敬義, 石堂 雄毅, 金 奉吉, 水落 建輝, 河野 剛, 長井 孝二郎, 大部 敬三, 西野 裕, 渡辺 順子, 芳野 信, 松石 豊次郎, 猪口 隆洋: Reye様症候群を呈した3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症の1例. 第440回日本小児科学会福岡地方会. 2006. 6. 3. (福岡)
- 2) Watanabe Y, Yano S, Tashiro K, Aoki K, Inokuchi T, Matsuishi T, Yoshino M: Long-term clinical observations of three patients with infantile carnitine-palmitoyltransferase II deficiency. 10<sup>th</sup> International Congress of Inborn Errors of Metabolism. 2006. 9. 12. (Chiba, Japan)
- 3) Makoto Yoshino, Yoriko Watanabe, Mami Okada, Hiroshi Fujino, Yasuki Maeno, Takahiro Inokuchi, Ichiro Yoshida, Yosuke Shigematsu, Koji Takemoto: Hypocarnitinemia in patients with propionic acidemia precipitated by long-term and repeated courses with pivalate-generating antibiotics. The 6<sup>th</sup> Meeting of the

International Society for Neonatal Screening. 2006.9.16. (Tokushima, Japan)

4) Tomiko Kuhara, Yoshito Inoue, Morimasa Ohse, Toshihiro Shinka, Takahiro Inokuchi, Kumiko Aoki, Kyoko Tashiro, Misa Inaba, Akiyo Fumimori, Masahiro Tetsuo : A pilot study of newborn screening and chemical diagnosis by GC/MS analysis of urine. The 6<sup>th</sup> Meeting of the International Society for Neonatal Screening. 2006.9.16. (Tokushima, Japan)

5) 西野 裕, 渡辺 順子, 芳野 信, 松石 豊次郎, 田代 恭子, 青木 久美子, 猪口 隆洋, 横山 隆人, 河野 剛, 長井 孝二郎, 大部 敬三 : 抗生物質長期投与中に低カルニチン血症、低血糖、痙攣重積をきたした一症例. 第 442 回日本小児科学会福岡地方会. 2006.12.16. (福岡)

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

## 金沢医科大学のろ紙尿による新生児マススクリーニング試験研究 ー化学診断からモニタリングまでー

### 研究要旨

金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学部門生化学では本年度新生児尿 2,000 検体のマススクリーニングを行い、2 例を発見、発見率は 1/1,000 であった。前年度までにシスチン尿症としてスクリーニングしていた児が発症した。シスチン尿症は発症後は指標物質が有意に高いが、発症前では低く、カットオフ値設定が困難で、さらに発症には後天的因子の関与も大きいと考えられるため、対象疾患から除くことを検討している。極性が高く、尿の有機溶媒抽出法では定量性を欠くメチルクエン酸やオロト酸を尿ウレアーゼ処理法・安定同位体希釈法で定量することで発見し、現在モニタリングしている症例について、オロト酸尿症 2 例は両親のオロト酸値から、先天性オロト酸尿症のキャリアーである可能性が高いこと、また、プロピオン酸血症（Y435C ホモ）2 例ではメチルクエン酸と propionyl-CoA 前駆体アミノ酸をモニターしていて、治療効果があることを明らかにした。その他の 5 疾患についてもモニターしている。

### 研究協力者

久原とみ子

（金沢医科大学総合医学研究所 教授）

### 共同研究者

大瀬守眞

（同上 研究員）

井上義人

（同上 講師）

### A. 研究目的

次世代の新生児マススクリーニング法の開発。

### B. 研究方法

新生児尿（ろ紙尿）のウレアーゼ処理法・安定同位体希釈法による GC/MS を用いた一斉分析法。

（倫理面への配慮）

原則として被験者両親からインフォームドコンセントを得たものをサンプルとして使用。

### C. 研究結果

#### 1) 全体成績

金沢医科大学では、ろ紙尿による新生児マススクリーニング試験研究開始以来、2006 年 11 月末までに計 23,239 件を分析し、この 1 年間では 2,011 件を分析した。全体の疾患の発見率は約 1,000 人に 1 人であった。この 1 年間では高乳酸血症とシスタチオン尿症、各 1 例を発見した（表 1）。

#### 2) シスチン尿症の化学診断

今回、過去にシスチン尿症と化学診断した 3 例のうちの 1 例が 5 才時に発症したことを確認した（表 2 網掛け部）。しかし同時に、シスチン尿症の診断の難しさも再認識した。表 2 にシス

チン尿症に関する各異常度（対数変換処理後の  $\text{mean} + n \times \text{SD}$  における  $n$ 、total creatinine あたり）を示した。これまでシスチン尿症の指標であるシスチン、リジン、オルニチンの異常増加を認めた例は表 1 に示した 3 例を除くと、35 例あった。再検査でその後正常化を確認した例は 22 例あり、表 2 には異常高値と判定した時の異常度を示した。また、再検査でも異常増加が持続していた例（未発症）は 13 例あった。正常化した例も持続している例も各指標物質の値に有意差は認められなかった。一方、ハイリスクスクリーニング（発症例 5 例）では全て 3 才以上であったが、持続例とは有意差が認められた。

#### 3) 追跡中のオロト酸尿症例

現在追跡している軽度オロト酸尿症持続例 2 例と、その両親のオロト酸を既報に従い定量した<sup>1)</sup>。その結果を表 3 に示した（対数変換処理後の  $\text{mean} + n \times \text{SD}$  における  $n$ 、total creatinine あたり）。

#### 4) プロピオン酸血症における methylcitrate とアミノ酸のモニタリング

現在追跡中のプロピオン酸血症（Y435C ホモ）2 例は食餌療法とカルニチン投与を行っている。下図にそのうちの 1 例の methylcitrate (MC)<sup>2)</sup> と propionyl-CoA 前駆体のアミノ酸 (Val、Ile、Thr、Met) の異常度（対数変換処理後の  $\text{mean} + n \times \text{SD}$  における  $n$ 、creatinine あたり）を示した。対照に Gly、Phe、Ala を加えた。これらの化合物は一度の分析で計測できる<sup>3)</sup>。

## 5) その他の追跡例

現在、プロピオン酸血症、メチルマロン酸尿症、高乳酸血症、 $\beta$ -ウレイドプロピオナーゼ欠損症、オロト酸尿症、シスタチオニン尿症、5-オキソプロリン尿症、エチルマロン酸尿症について各々追跡調査を行っている。

## D. 考察

スクリーニングにおける発見率は 1/1,000 人で、マススクリーニングと異なり 1 生月未満のハイリスクスクリーニングの成績では 1/100 であった。

今回発症が確認されたシスチン尿症の 1 例は、発症前は正常化した例の異常度の範囲内であったが、発症後はシスチンの値が有意に増加しており、発症には後天的因子の関与も大きいと考えられる。このことから、現在は正常化例と持続例との鑑別が難しく、異常増加を認めた例については正常化を確認するまで追跡するという方法を取らざるを得ない状態である。従って、本疾患は対象疾患から除く事も検討している。

現在追跡しているオロト酸尿症 2 例について、ウラシルの増加がなく、父親にのみオロト酸の軽度増加を認めることなどから、ピリミジン生合成系におけるオロト酸尿症のキャリアーである可能性が高いと思われる。

追跡中のプロピオン酸血症 (Y435C ホモ) 2 例のうち、図に示した症例 1 については S-22 ミルク使用前、カルニチン投与・食事制限下で起きた発熱・アシドーシス発作時、および現在 (カルニチン投与下) のデータを示した。追跡中の 2 例とも、指標物質である MC は 3~4SD の高値を示していたが、propionyl-CoA 前駆体のアミノ酸は異常な増加も減少も示しておらず、このような化合物を指標に適切な管理に役立ててもらいたいと願っている。このように、本法はモニタリングにおいても、不可欠な情報が一度に得られる。なお、現在追跡中のメチルマロン酸尿症はいわゆる良性メチルマロン酸尿症と考えられる。methylmalonyl-CoA は free のメチルマロン酸になり易く、また、クリアランスが高く、尿に検出され易いため、本物質のみの増加であれば、カットオフポイントを上げるべきかと思われる。しかし、プロピオン酸血症では Y435C などの軽症例であっても治療介入が望ましいと判断され、良性プロピオン酸血症が存在するという根拠は未だ不在である。

## E. 結論

ろ紙尿による GC/MS を用いた先天性代謝異常症の化学診断法は約 1,000 人に 1 人の比較的高い発見率を持ち、鑑別できる疾患も少なくな

い。また、モニタリングにも不可欠であることから、他の方法と補完しながら、超高度少子化時代の子供達の健全な成育に貢献したい。本メタボローム解析法によるハイリスクスクリーニングでの発見率は約 100 倍高く、我が国の NICU 児などの発病者にこの新しい手法が迅速に適用されることが望まれる。

## 文献

- 1) Kuhara T, Ohse M, Ohdoi C, Ishida S, J. Chromatogr. B 746 (2000) 103.
- 2) Kuhara T, Ohse M, Inoue Y, Yorifuji T, Sakura N, Mitsubuchi H Endo F, Ishimatu J, J. Inherit. Metab. Dis. 25 (2002) 98.
- 3) Kuhara T, Mass Spectrom Rev. 24 (2005) 814.

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 久原とみ子、大瀬守眞、井上義人、新家敏弘、哲翁正博: 尿のメタボローム解析法による新生児マススクリーニング試験研究とテイラーメイド医療. 金沢医科大学雑誌 30: 543-550, 2005.
- 2) Kuhara T: Simultaneous diagnosis of inborn errors of purine & pyrimidine metabolism—Mass spectrometric metabolome analysis. Moriwaki Y (ed), Genetic Errors Associated with Purine and Pyrimidine Metabolism in Humans: Diagnosis and Treatment, Research Signpost, India, 2006, p173-196.
- 3) 久原とみ子: 診断と個別化医療のための非侵襲的ヒトメタボローム解析. 細胞工学 25: 1404-1409, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 久原とみ子、大瀬守眞、井上義人、新家敏弘、岡野善行、滝澤登、本郷和久、宮脇利男、森信若葉、玉井浩: 経中心静脈栄養下の高フェニルアラニン血症のメタボローム解析. 第 109 回日本小児科学会学術集会. 金沢市, 2006 年 4 月.
- 2) 井上義人、大瀬守眞、新家敏弘、久原とみ子: 先天性代謝異常症の出生前診断について. 第 109 回日本小児科学会学術集会. 金沢市, 2006 年 4 月.
- 3) Kuhara T: Metabolome-based chemical diagnosis of IEM. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Chiba,

September 2006.

- 4) Kuhara T, Inoue Y, Ohse M, Shinka T, Inokuchi T, Aoki K, Tashiro K, Inaba M, Fumimori A, Tetsuo M: A pilot study of newborn screening and chemical diagnosis by GC/MS analysis of urine. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 2006.
- 5) 久原とみ子: 個別化医療と非侵襲メタボローム解析. 第31回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋市, 2006年9月.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

表1 ろ紙尿 GC/MS 法を用いる新生児スクリーニング試験研究成績 (1995.2~2006.11)

No.	疾患名	例数
1	プロピオン酸血症	1
2	メチルマロン酸尿症	4
3	高乳酸血症 (内1例は PDH $\alpha$ )	2
4	チロシン血症	1
5	$\beta$ -ウレイドプロピオナーゼ欠損症	1
6	ハートナップ病	1
7	$\alpha$ -アミノアジピン酸/ $\alpha$ -ケトアジピン酸尿症	2
8	オロット酸尿症 (キャリアーと推定される)	2
9	先天性シスタチオニン尿症	2
10	ガラクトース尿症/チロシン尿症	1
11	シスチン尿症	3
12	神経芽細胞腫	1
13	5-オキソプロリン尿症	1
14	エチルマロン酸尿症	1
異常例数合計		23
受験児総数		23,239
発見率		1/1,010

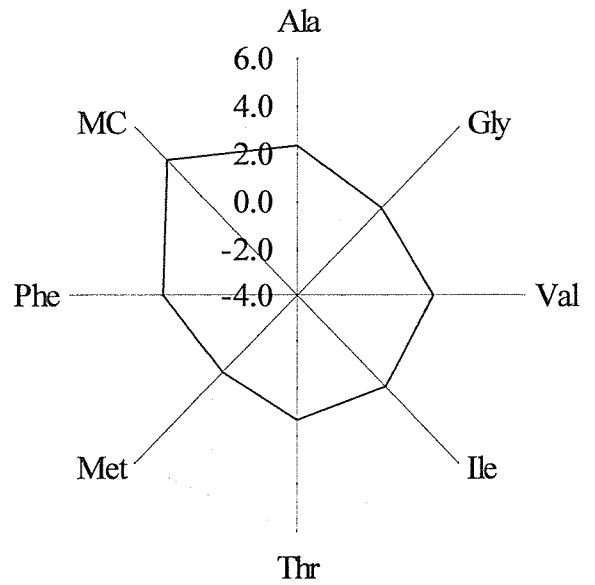
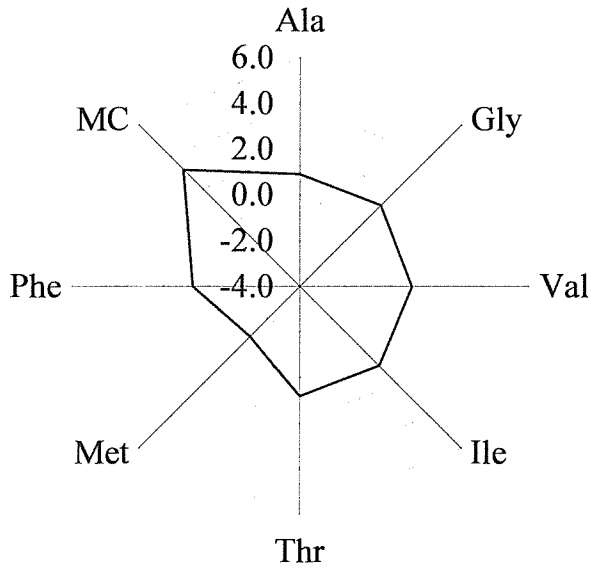
表2 シスチン尿症に関する各指標物質の異常度 (*n*)

		Cystine	Lysine	Ornithine
正常化例 <6M n=22	min	2.0	2.3	0.2
	max	4.5	4.2	4.4
	average	3.3	3.4	2.5
持続例 <6M n=13	min	2.0	2.7	1.0
	max	4.9	4.6	3.6
	average	3.5	3.5	2.3
発症例 (発症前)	5D	4.2	3.4	3.2
	1M	4.2	4.1	2.1
	5Y	6.5	4.1	1.3
発症例 * 3Y~67Y n=5	min	6.5	4.1	1.3
	max	11.5	6.3	5.2
	average	9.5	5.6	3.7

表3 オロット酸尿症として追跡中の2例の異常度 (*n*)

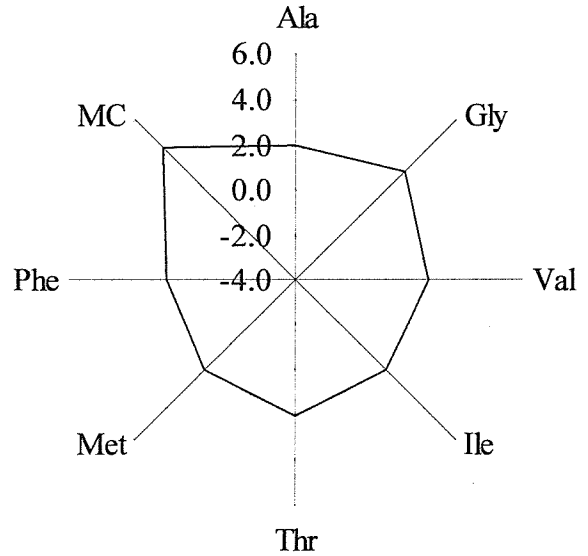
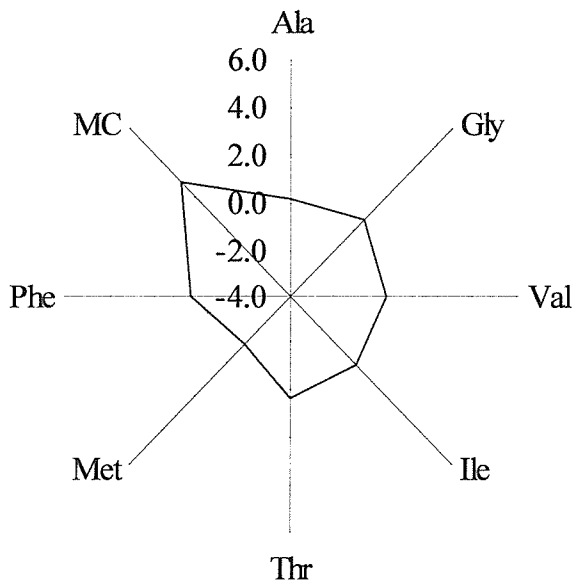
		患儿	父	母
Case1 男児	Uracil	0.7	1.2	-0.3
	Orotate	6.7	2.7	1.1
Case2 男児	Uracil	0.3	0.2	-0.4
	Orotate	4.8	3.3	0.1

S-22 ミルク使用前 (カルニチン投与前)  
2M24D



現在 (カルニチン投与下) 6Y9M

S-22 開始 (カルニチン投与前) 3M22D



発作時 (カルニチン投与下) 3Y2M

図 追跡中のプロピオン酸血症 (症例 1) における MC とアミノ酸の異常度の推移



分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

これまでに診断した CPT I 酵素欠損症の臨床的プロフィールについて

研究要旨

これまでわれわれが診断に関与した CPT I 欠損症症例は 9 例（8 家系）であり、2 例（2 家系）はスクリーニングで発見されたものである。

日本においても脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニングにて、CPSI 欠損症症例が発見されることが確実に証明された。

ハイリスクスクリーニングで発見された患者の中に、兄弟の死亡例を持つものが 3 家系あった。今後マススクリーニングで発見された CPT I 欠損症患者は不幸な転機を取ることはないと思われるので、社会に対して大きなインパクトがあるものと思われる。

研究協力者

高柳正樹（千葉県こども病院）

A. 研究目的

今進められている先天性脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニングプログラムにて、CPT I 欠損症はスクリーニング対象疾患として考えられている。

これまでハイリスクスクリーニングにてわれわれは 7 例（6 家系）の CPT I 欠損症の診断を行ってきた。またこれまでに先天性脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニングプログラムにて、2 例（2 家系）の CPT I 欠損症の診断を行った。

今回これら症例の臨床症状、酵素学的検討結果、遺伝子検索結果などを検討し、先天性脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニングプログラムの問題点などを検討した。

B. 研究方法

症例はハイリスクスクリーニング発見症例 6 例（6 家系）、家族内検索発見症例 1 例、マススクリーニング発見症例 2 例（2 家系）の合計 9 例である。

酵素活性測定法は Demaugre らの方法に準じて行った。遺伝子検索は Ogawa E ら（Expression analysis of two mutations in carnitine palmitoyltransferase IA deficiency. *J Hum Genet.* 2002;47(7):342-7.）の論文に記した方法により行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、患者が特定される形で発表されることはない。遺伝子検索については患者家族に了解をいただき行った。

C. 研究結果

臨床症状：性別男子 4 例、女子であった。血族結婚：8 家系中 2 家系にいとこ婚を認めた。兄弟に死亡例：8 家系中 3 家系に兄弟に死亡例を認めた。発症年齢：ハイリスクスクリーニング発見症例は 9 ヶ月 - 4 歳であった。臨床症状：ハイリスクスクリーニング発見症例の初発症状、診断は以下の通りであった。症例 1 ライ様症候群、症例 2 ライ様症候群、症例 3 ライ様症候群、症例 4 意識障害・痙攣・低血糖、症例 5 傾眠・意識障害・低血糖、症例 6 傾眠・呼吸障害・脱力・震顫。

血中カルニチン値：全症例フリーカルニチン値は  $80 \mu\text{mol/l}$  を超えている。症例により経過中に

正常値を示すこともあり、正しくは経過を追って数回血中フリーカルニチンを測定する必要がある。

酵素活性：ハイリスク症例は線維芽細胞で、マススクリーニング症例は末梢リンパ球を材料に測定した。

ハイリスク症例6例測定したが1例のみ正常対照の30%の活性を示したが、残りの5例の活性はほぼ0%であった。マススクリーニング症例は正常対照のそれぞれ20%、40%であった。

遺伝子検索：8家系中5家系に遺伝子変異の検索を行い、すべてのアレルに変異を検出した。日本人症例には、ホットスポットと思われる変異部位はないものと考えられた。

#### D. 考察

これまでわれわれが診断に関与した CPSI 欠損症症例は9例であり、2例はスクリーニングで発見されたものである。

日本においても脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニングにて、CPT I 欠損症症例が発見されることが確実に証明された。

マススクリーニングで発見される患者は軽症症例も多く発見されるものと思われる。今後酵素活性の測定方法の改良、検査結果の判断基準の検討、さらにはバックアップとしての遺伝子検索システムの整備が必須になるものと考えられる。

短期間に2例の CPTI 欠損症症例が発見されたことより、これまで突然死として取り扱われていたり、ケトン血性低血糖症とされていた症例のなかに、本症症例が多く存在していたと思われる。

今後これらマススクリーニングで発見された患者は、不幸な転機を取ることはないと思われるので、社会に対して大きなインパクトがあるものと思われる。

#### E. 結論

日本においても脂肪酸代謝異常症の新生児マススクリーニングにて、CPT I 欠損症症例が発見されることが確実に証明された。今後診断法、さら

には治療法の改良、検討が必須であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kaneoka H, Uesugi N, Moriguchi A, Hirose S, Takayanagi M, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Yasuno T, Sasatomi Y, Saito T: 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

##### 2. 学会発表

1) Takayanagi M., Nagasaka H., Murayama K., Ogawa A., Kanazawa M., Ogawa E., Yamamoto S., Ohtake A: Clinical survey of patients with carnitine cycle disorders in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

## 宮城県におけるタンデムマス質量分析計による新生児マススクリーニング － 2 年間のまとめ－

### 研究要旨

平成 17 年度より宮城県内 48 の分娩施設の協力を得てタンデムマススクリーニング試験研究を実施した。平成 17 年度は 12,785 名が受検し、受検率は 65.2%であった。平成 18 年度（1 月 23 日現在）は 11,984 名が受検し、受検率は 73.0%と上昇した。再採血依頼はそれぞれ 0.62%（79 名）、0.28%（34 名）で、2 年目の方が減少した。精密検査が行われたのは 2 年間で 7 名であった。7 名のうち 2 名は正常と判明したが、残り 5 名は 3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症、軽症型プロピオン酸血症、一過性メチルマロン酸血症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ（CPT）1 欠損症、極長鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症と診断した。3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症患者は初診時既に高アンモニア血症、低カルニチン血症を呈していたが、ロイシン制限食、カルニチン投与で正常化した。タンデムマススクリーニングは有機酸、脂肪酸代謝異常症の早期発見、治療に有用であることが明らかになった。今後、精密検査、確定診断、治療のシステムを構築し、我が国でも全国レベルでタンデムマススクリーニングが実施される事が望まれる。

### 研究協力者

大浦敏博、坂本 修（東北大学小児病態学）  
島田美香、斉藤郁磨、名古屋裕子、一條敦子、針生敬子、山本俊夫、遠藤善宏、秋山和夫、白石廣行（宮城県公衆衛生協会）  
小林弘典、長谷川有紀、山口清次（島根大学小児科）

### A. 研究目的

タンデムマス質量分析計による新生児スクリーニングの有効性が欧米を中心に報告されている。今回わが国におけるタンデムマススクリーニングの有用性を検討する目的で、2005 年 4 月より宮城県でパイロットスタディを開始した。このパイロットスタディにより、精密検査システム、対象疾患の頻度、早期治療の効果などを検討することを目的とする。

### B. 研究方法

平成 16 年 7 月 26 日に開催された先天性代謝異常検査事業連絡会議において、使用済みろ紙血を用いたタンデムマススクリーニング試験研究の実施が承認された。平成 17 年 2 月、宮城県内の 73 分娩施設宛てに試験研究への協力依頼の文書を発送。4 月に承諾の得られた 48 施設へ保護者への説明文書、同意書を発送した。

（倫理面への配慮）

保護者への説明は分娩施設の医師により行われた。同意を取るに際しては、その目的、方法および異常が出たときの対応、予想される効果、危険性とそれに対する対処法、個人情報保護、検査費用、自由意志で撤回も可能でありそれによる不利益の無いことなどについて説明した。

書面で同意を得た検体は検査施設で分別され、従来の 6 項目のスクリーニング検査終了後、残りの

ろ紙血を週に1回島根大学小児科に発送し、タンデムマス質量分析計によるスクリーニングを行った。結果は島根大学より研究協力者の大浦にE-mailで連絡された。陽性検体が出た場合、大浦から直接分娩施設の担当者に連絡し、再採血、精検依頼を行った。

### C. 研究結果

平成17年度にタンデムマススクリーニングを受検した新生児の数は12,785名であった。同期間の初回受付数は19,605名であり、その受検率は65.2%であった。平成18年度(1月23日現在)に受検した新生児数は11,984名であった。初回受付数が16,420名であり、その受検率は73.0%と上昇した。一方、再採血率は平成17年度0.62%、平成18年度は0.28%と逆に減少した。精密検査が行われたのは合計7名であり、内1名は即精検となった。精密検査を行った7例のうち2名は正常であったが、残り5名は3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症、軽症型プロピオン酸血症、一過性メチルマロン酸血症、CPT1欠損症、VLCAD欠損症と診断した。前者3症例は昨年度の報告書に記載したので。今年度はCPT1欠損症、VLCAD欠損症症例の臨床経過について報告する。

#### 症例1：CPT1欠損症

家族歴に特記すべきこと無し、第1子。妊娠38週、2230g、帝王切開にて出生。母乳栄養。タンデムマススクリーニングにてC0 104と上昇、C16 0.03と低下しておりCPT1欠損疑いで精検依頼となった。日齢53で初診、発育は良好。生化学的検査所見ではpH 7.357、PCO<sub>2</sub> 42.1、HCO<sub>3</sub> 23.6、BE -2、アンモニア 76μg/dl、血糖 134mg/dlでその他生化学的データに異常は認められない。血中カルニチン分画では遊離カルニチン 105と著増、C16 0.09μmol/lと減少を認めた。尿中有機酸分析では明らかな異常は認めなかった。心臓超音波検査では心肥大等なく、機能上も正常であった。末梢血を用いた酵素活性測定では正常の11-26%程度に低下していた。これらの検査データより患児

はCPT1欠損症と診断した。MCT強化ミルクによる頻回食と、sick dayの対応を説明し、現在外来で経過観察中である。現在1歳であるが発育、発達は正常である。

#### 症例2：VLCAD欠損症

家族歴に特記すべき事なし、第1子。妊娠40週、3290g、吸引分娩にて出生。母乳栄養。タンデムマススクリーニングにてC14 3.69、C14:1 5.21と増加しておりVLCAD欠損症が疑われ、日齢24に来院した。再採血にてC14 0.76、C14:1 2.6と高値でありVLCAD欠損症が疑われた。生化学的諸検査ではCK 291IU/L、CK-MB 32と軽度上昇していた。尿有機酸分析ではジカルボン酸の軽度排泄が確認された。VLCAD遺伝子の解析を行ったところ、997insT/A416Tの変異が検出された。MCT強化ミルクによる頻回食と、sick dayの対応を説明し、現在外来で経過観察中である。現在7ヶ月であるが発育、発達は正常である。

### D. 考察

平成17年度より日本産婦人科医会宮城県支部の協力を得てタンデムマススクリーニングを実施する事が出来た。約22ヶ月間に24,796名が受検し受検率は平成17年度65.2%、平成18年度73.0%であった。再採血依頼はそれぞれ79名(0.62%)、34名(0.28%)で2年目はより減少した。これはカットオフ値の見直しや複数のanalyteを分析することで下げる事が可能であることを示している。

今回新たに発見されたCPT1欠損症とVLCAD欠損症は代表的脂肪酸代謝異常症であり、約20万人に一人の頻度で発見されている。両者とも新生児期から乳児期にかけて空腹時、感染症罹患時などに低ケトン性低血糖、代謝性アシドーシスによる意識障害や痙攣を引き起こし、脳障害を残したり死亡したりすることのある疾患である。また、VLCAD欠損症では心筋や骨格筋の障害を合併することもある。発症を防ぐためには頻回食、就眠時のコーンスターチ投与、MCT強化ミルクの使用、