

的中度のように有病率による影響を受けない。今回、表1に示す3種類の検査方法を100万人が受診すると仮定した上で推計を実施した。感度及び特異度の合計が190%である検査1（1件当たり費用1000円）、感度及び特異度の合計が198%である検査2（1件当たり費用2000円）、感度及び特異度がともに100%の確認検査（1件当たり費用10万円）、を仮定し、1）初回検査に検査1、2段階目検査に検査2を用いる場合、2）初回検査及び2段階目検査の両方に検査2を用いる場合の大きく2通りを設定し、1）については検査1の感度と特異度を変化させて推計を実施した。（表1）

表1：各検査の費用と正確性に関する設定

	検査1	検査2	確認検査
単価	1000円	2000円	10万円
感度上限	99%	99%	100%
特異度上限	99%	99%	100%
感度特異度計	190%	198%	200%

なお、検査1におけるカットオフラインの変更による感度及び特異度の最大値は99%と設定した。感度または特異度を99%から99.9%に向上させるのは一方を犠牲にしたとしても有効数字の桁数が増えることによって追加費用が発生すると考えたためである。各検査の実施および治療に伴う副作用（およびそれに伴う費用）は存在しないと仮定

表2：スクリーニング検査の感度及び特異度の変化がもたらす影響

感度	特異度	検査陽性患者数	非患者検査陽性	検査陽性総数	見逃し患者数
91%	99%	910	9990	10900	90
92%	98%	920	19980	20900	80
93%	97%	930	29970	30900	70
94%	96%	940	39960	40900	60
95%	95%	950	49950	50900	50
96%	94%	960	59940	60900	40
97%	93%	970	69930	70900	30
98%	92%	980	79920	80900	20
99%	91%	990	89910	90900	10
99%	99%	990	9990	10980	10

注：受診者総数は100万人、有病率は0.1%を仮定した。

表3に有病率を0.1%と仮定した場合の第1段階検査の感度及び特異度と第2段階検査における検査結果の予測を示す。第2段階検査の感度と特異

した。発見（見逃し）患者数をスクリーニング検査全体の効果の指標とし、治療によって得られる便益については検討対象から除外した。さらに0.1%、0.02%、0.01%の3通りの有病率を仮定し、感度分析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究は仮想データによる推計によって実施されており、倫理面に関する問題は存在しない。

### C. 結果

表2に有病率を0.1%と仮定した場合の第1段階スクリーニング検査の感度及び特異度が見逃し患者数及び検査陽性者総数にもたらす影響を示す。感度が高くなるにつれて見逃し患者数は減少し、感度が99%であれば特異度によらず見逃し患者数は患者総数の1%である。カットオフラインの変更により感度を向上させた場合に特異度が減少する影響としては、患者ではない者が検査で陽性と判定される割合（偽陽性）が特異度の減少とともに増加していくことである。検査1の感度を99%とした場合には特異度は91%であり、感度及び特異度が99%の検査2と見逃し患者数は同数であっても偽陽性は9倍多く生じている。これに伴い、第1段階検査陽性者数も変化し、第2段階検査の受診が必要な者の人数は特異度が低下するにつれて増加している。

度はいずれも99%であり、この段階における見逃し患者数は第1段階検査の感度及び特異度によらず10人（端数切り捨て）と推計された。よって、

全体での見逃し患者数総計に影響を与えるのは第一段階検査の感度であることが示されている。同様に、この段階で患者でない者が検査陽性となる者の人数に影響を与えるのは第一段階検査の特異度であることが示されている。なお、第一段階検査

の感度が99%であれば、第2段階検査受診を必要とする者の人数に差があっても第一・第二段階の検査を通じて見逃される患者の総数は20人と等しくなることも推計された。

表3：第1段階検査の感度及び特異度と第2段階検査における検査結果の予測

第1段階検査の感度及び特異度		対象者数	内患者数	検査陽性患者数	検査陽性非患者数	見逃し患者数	見逃し患者数総計
91%	99%	10900	910	900	100	10	100
92%	98%	20900	920	910	200	10	90
93%	97%	30900	930	920	300	10	80
94%	96%	40900	940	930	400	10	70
95%	95%	50900	950	940	500	10	60
96%	94%	60900	960	950	600	10	50
97%	93%	70900	970	960	700	10	40
98%	92%	80900	980	970	800	10	30
99%	91%	90900	990	980	900	10	20
99%	99%	10980	990	980	100	10	20

注：受診者総数は100万人、有病率は0.1%を仮定した。

表4に有病率が0.1%と仮定した場合の第1段階検査の感度及び特異度と第2段階・確認検査全体の費用予測を示す。第一段階検査に必要な費用は第一段階検査の単価と受診者総数にのみ影響を受ける。第二段階検査及び確認検査は第1段階検査の感度及び特異度の影響を受け、第一段階検査の特異度が低くなるにつれて第二段階検査及び確認検査に必要な費用が増加していた。

感度及び特異度がともに99%である検査2（1件当たり費用2000円）を第一段階検査に用いた場合

の費用を感度及び特異度の合計が190%である検査1（1件当たり費用1000円）を用いた場合の費用と比較した結果、検査1の感度および特異度をそれぞれ91%と99%に設定したのみ以外の状況では、第2段階検査及び確認検査の費用は検査2を用いる方が低くなっていた。しかし、第一段階検査、第2段階検査及び確認検査の費用を全て合計した費用については検査1の感度および特異度によらず、検査2を第一段階検査に用いた場合の方が高くなっていた。

表4：第1段階検査の感度及び特異度と第2段階・確認検査全体の費用予測

第1段階検査感度・特異度		1検体毎の費用	第1段階費用	第2段階費用	確認検査費用	総費用
91%	99%	1000円	10億円	2180万円	1億円	11億2180万円
92%	98%	1000円	10億円	4180万円	1億1100万円	11億5280万円
93%	97%	1000円	10億円	6180万円	1億2200万円	11億8380万円
94%	96%	1000円	10億円	8180万円	1億3300万円	12億1480万円
95%	95%	1000円	10億円	1億180万円	1億4400万円	12億4580万円
96%	94%	1000円	10億円	1億2180万円	1億5500万円	12億7680万円
97%	93%	1000円	10億円	1億4180万円	1億6600万円	13億780万円
98%	92%	1000円	10億円	1億6180万円	1億7700万円	13億3880万円
99%	91%	1000円	10億円	1億8180万円	1億8800万円	13億6980万円
99%	99%	2000円	20億円	2196万円	1億800万円	21億2996万円

注：受診者総数は100万人、有病率は0.1%を仮定した。

表5に0.1%、0.02%、0.01%の3通りの有病率を仮定した場合の見逃し患者数及び検査全体の費用の予測を示す。なお、これまでの議論から患者の見逃しを最小化するために第1段階検査は感度99%特異度91%に設定している。第1段階検査に必要な費用は有病率ではなく、対象者数とこの段階で用いる検査の単価によって決定される。第1段階検査の感度と特異度が同一であれば、第2段階検査における費用の差はほとんど存在しないと考えられる程度であった。確認検査については、有病率が高くなるにつれて費用も高くなる傾向が認められた。第1段階検査に検査1（感度99%特異度91%）を用いた場合は有病率が0.01%から0.1%へ10倍高くなると確認検査の対象者数が約2倍と

なることを反映していた。有病率が低い場合は第1段階検査に検査1（感度99%特異度91%）ではなく検査2（感度99%特異度99%）を用いた場合に確認検査対象者数が減少することを反映していたが、有病率が高くなるにつれて確認検査対象者数の差が小さくなることを反映していた。具体的には、有病率が0.01%の設定では確認検査に関する費用の比が約5倍であったのに対し、有病率が0.02%の設定では約3.7倍、有病率が0.1%の設定では約1.7倍となっていた。今回の設定では、いずれの状況でもマス・スクリーニング検査全体に占める費用の内訳でもっとも割合が高かったのは第1段階検査における費用であった。

表5：有病率による見逃し患者数及び検査全体の費用の予測

有病率及び感度・特異度		見逃し患者数	第1段階費用	第2段階費用	確認検査費用	総費用
0.01%		(総患者数は100万人中100人)				
99%	91%	2人	10億円	1億8018万円	9980万円	12億7998万円
99%	99%	2人	20億円	2019万円	1980万円	20億3999万円
0.02%		(総患者数は100万人中200人)				
99%	91%	4人	10億円	1億8036万円	1億960万円	12億8996万円
99%	99%	4人	20億円	2039万円	2960万円	20億4999万円
0.1% (再掲)		(総患者数は100万人中1000人)				
99%	91%	20人	10億円	1億8180万円	1億8800万円	13億6980万円
99%	99%	20人	20億円	2196万円	1億800万円	21億2996万円

#### D. 考察

今回の推計では、これまでの研究で実際に得られた有病率など、現実に近い状況を仮定した上でマス・スクリーニングを実施した場合の費用について、一定の患者数を見逃さずに発見可能という効果を得るための費用を最小化する上での考え方を示した。マス・スクリーニング検査は、有病率が低く対象者の大多数は正常、新生児のほぼ全数を対象者とすること、などの日常臨床とは異なる状況下で実施されるため、診断の正確性が高い検査であっても侵襲性や費用の高い検査は通常用いられない。このため、複数の検査を組み合わせた多段階の検査体制を構築するのが一般的である。

多段階スクリーニング検査全体で患者の見逃しにもっとも影響を与えるのは第1段階検査の感度であることが推計された。特に見逃しによる生

命予後への影響が大きい疾患のスクリーニング検査については特異度を犠牲にしても感度を最大化することが望ましい。実際にはタンデムマス法によるスクリーニング検査では複数の異なる疾患を同時に検査可能であり、それぞれの疾患について感度や特異度を算出可能な情報を集積していくことで、それぞれの疾患について適切なカットオフラインの設定が可能になる。

スクリーニング検査の単価1～2000円、確認検査の単価10万円という今回の設定に基づいて推計を実施した結果、多段階スクリーニング検査全体の費用に最も影響を与えるのは第1段階検査における費用であった。第2段階検査における単価をスクリーニング検査の単価に近い2000円と設定しているため、第2段階検査の単価が今回の推計結果に与える影響を過小評価している可能性は否定

できない。また、確認検査の単価10万円という設定は推計を容易にするためのものである。実際には複数の疾患を対象としており、それぞれに応じた費用が必要であることを無視しているという問題が存在している。しかし、他の検査の50～100倍の費用を有する検査をスクリーニング検査として用いることは不合理としても問題はない。

検査に必要な費用については単純に単価のみを設定した。よって、検体の採取から結果の通知まで様々な作業を一括して計上したと仮定している。つまり検体が尿であるか血液であるかなどによる作業量の違いは考慮されていない。また、検査機器導入に必要な固定費と試薬に代表される変動費については、検査体制の整備状況に影響を受ける。今後、マス・スクリーニングの費用対効果を検討する上では、こうした費用について積算を行った上で、検査の単価を計上する必要がある。また、検証の対象とはしなかったが、疾病の自然史や治療効果と予後、検査実施による対象者への侵襲または副反応などについても効果または費用として計上することも重要である。さらに、スクリーニング検査を2段階実施した後に確認検査を実施するという条件で今回は推計を実施したが、3段階以上のスクリーニング検査を実施した後に確認検査を実施する体制も考慮に値する。

## E. まとめ

今回の推計は、多段階スクリーニング検査によって対象疾患を有する者を発見するための費用を推計する上での基礎的な考え方を示した。国家レベルでマス・スクリーニングを実施する上では、対象者数や有病率、検査の特性などについて十分な検討を行うことが必須である。これにより、多段階スクリーニング全体における精度を一定に保った上で、必要な費用を軽減可能な方法を検証可能である。また、スクリーニング検査のカットオフラインの設定についても、このような検証を実施することは有用である。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

共に特記事項なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

いずれも特記事項なし

## 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

分担研究者 重松陽介（福井大学医学部教授）

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、福井大学、島根大学、および札幌市、東京都、熊本県の現行マススクリーニング実施機関で、平成16年度の準備期間を経て、平成17年度からパイロット研究が開始され、平成18年度には分析新生児数も年間約100,000と大幅に増加した。その結果、本年度には新規発見疾患であるイソ吉草酸血症と3メチルクロトニルグリシン尿症を含む9例の患者が発見された。パイロット研究地域の拡大に伴う疾患スペクトルの多様性が示唆されるとともに、各疾患の重症度の多様性の点でも注目に値する結果であった。一方、本スクリーニングの費用対効果を実証する上で疑陽性率と偽陰性率の低減が重要であり、精度の高い2次検査を追加することで疑陽性率を殆ど無くする方法がイソ吉草酸血症や高チロシン血症のスクリーニングに関して試みられた。また、精度管理を向上させるため、メープルシロップ尿症、グルタル酸尿症Ⅱ型、カルニチントランスポータ異常症のスクリーニングに関するカットオフ値の評価に関する検討も行われた。複数の機関で本スクリーニング・パイロットスタディの規模が更に拡大される情勢にあり、このような成果を踏まえ、対象疾患を有する患児の生命予後とQOLの改善のために研究を更に進めて行く必要があると考えられた。

研究協力者

藤田晃三（札幌市衛生研究所）  
北川照男（東京都予防医学協会）  
小林弘典（島根大学医学部小児科）  
田崎隆二（化学及血清療法研究所）  
岡野善行（大阪市立大学発達小児医学）  
和田芳直（大阪府立母子保健総合医療センター）

ること、わが国における対象疾患患者頻度を明らかにすること、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であり、引き続き2大学（福井大学・島根大学）・3検査機関（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）によるパイロット研究実施体制で、これらの課題への取り組みが行われた。また、大阪府立母子保健総合医療センターでは、次年度からのパイロット研究開始に向け、非誘導体化試料分析法がさらに検討された。

A. 研究目的

世界的に注目されてい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）は、乳幼児突然死症候群に関連した先天代謝異常症を新たに対象とするが、人種差のため欧米での知見が必ずしも当てはまらないわが国でのこれらの疾患の頻度や予後などはいまだ明らかになっていない。このため、このパイロット研究事業の主たる検討課題は、精度管理を実施しつつ疑陽性頻度や見逃し例を検討す

B. 研究方法

引き続き、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。福井大学では、高感度MS/MS機器を用いて非誘導体化試料を分析し、その他の施設では引き続き誘導体化試料を分析した。カットオフ値につい

ては、福井大学の設定値を参考にしながら、各々の施設で集積した分析データを基に適宜改変して設定した。また、引き続き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も分析し、精度などが検討された。グルタル酸尿症 I 型のスクリーニングに使用する重水素標識グルタルカルニチンは、名古屋市立大学大学院薬学研究科・前田康博博士から合成物が提供された。

### C. 研究結果

平成18年12月までの直近1年間で、福井大学で約47,000新生児、その他の分析機関で約53,000新生児、計約100,000新生児のスクリーニングが行われた。この中で、イソ吉草酸血症1例、3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症1例、3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症の母の子1例、極長鎖アシルCoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症1例、CPT-I欠損症1例、グルタル酸尿症II型1例、フェニルケトン尿症1例、シトリン欠損症2例が発見された。

札幌市衛生研究所での研究事業では、引き続き、現行のスクリーニング受検者の99%がタンデムマス・スクリーニングを受検しており、グルタル酸尿症II型1例とフェニルケトン尿症1例が発見された。再採血率は昨年度と同様0.35%と比較的高かったが、疑い疾患としてはグルタル酸尿症II型が0.13%と多く、更にカルニチントランスポータ異常症(0.06%)、イソ吉草酸血症(0.05%)が比較的多かった。トランスポータ異常症疑いの1例は経過を見ている状況であった。本施設では、二次検査あるいは追跡検査としてGC/MSとHPLC法による尿有機酸分析とアミノ酸分析などを採用している。

東京都予防医学協会では、濾紙血アミノ酸及びアシルカルニチンのカットオフ値の確認を行い、低出生体重児や早産児で脂肪酸酸化異常症の疑陽性となる率が高いことから、この点での対策が必要であることを報告した。また、研究事業の開始が遅れたものの、シトリン欠損症1例が発見された。

化学及血清療法研究所では、前年度は研究事業参加医療機関が熊本市内の大規模病院のみであったが、本

年度から熊本全県下の産科医療機関に拡大し、更に宮崎県や福岡県にも拡大しつつある。3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症1例を発見し、シトリン欠損症やグルタル酸尿症疑い例を追跡調査中である。パイロット研究事業への同意も95~99%と高かった。

島根大学では、島根県・宮城県を中心に複数県の医療機関からの受検者に対して研究事業が実施され、CPT-1欠損症、VLCAD欠損症、イソ吉草酸血症が発見された。再採血率は0.36%であった。

福井大学での研究事業では、満期産新生児のC50Hアシルカルニチン持続高値から母の3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症が診断された。イソ吉草酸血症疑陽性となる濾紙血C5アシルカルニチン高値例(0.59%)について、二次検査として濾紙血中イソバレルリグリシン定量を試行した。イソバレルリグリシン濃度は、島根大学で発見されたイソ吉草酸血症患者新生児期濾紙血では0.6nmol/mlであり、その他の本疾患患者では1.1~80.0 nmol/mlであった。カットオフ値を0.5nmol/mlに設定したところ、これまでのところ本症患者は発見されていない。また、高チロシン血症I型のスクリーニングとして、濾紙血中チロシン濃度が200nmol/mlを越える例(1.79%)について、サクシニルアセトン(hydrazone)を定量[1]したが、カットオフ値5nmol/mlを越える例はなかった。本症自験例での新生児期濾紙血の後方視的分析では、チロシン高値とサクシニルアセトンの上昇が確認できた。

大阪府立母子保健総合医療センターでは、次年度からの研究事業開始に向けて、非誘導体化試料MS/MS分析での試料調整法の改良が行われ、良好なアシルカルニチン・アミノ酸測定精度が確認された。

### D. 考察

本年度のタンデムマス・スクリーニング研究事業では、5施設での年間分析新生児数が約10万となり、これまでの累積数も約42万を越えた。発見された疾患は特定のものに偏ることなく、多様であった。福井大学での先行研究では、プロピオン酸血症を中心とした有機酸代謝異常症が比較的多かったが、研究事業地域が拡大して更に疾患の種類が多様になってきている

といえる。この事業が更に全国規模に拡大されれば、また異なった疾患分布が見られる可能性が考えられる。

今回、発症後診断調査からは極めて頻度の低い疾患と考えられるイソ吉草酸血症が岡山県から発見された。本邦での本症診断第1例は岡山県の症例であったので興味深い。またこの患者は、濾紙血イソバレリルカルニチン濃度などから軽症例と判断されるが、欧米での本症マスキング発見例の多くが軽症例であると報告[2]されており、この点も興味深い。

本研究事業での3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症発見例が、昨年発見例と合わせて2例となった。更に、無症状の本症母親から生まれた新生児が本症スクリーニングで陽性となり、母親の診断に至った。この“母性”3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症はドイツでも多く報告されている。本症の重症度は多様であることが知られており、マスキングで発見された場合の医学管理については、その必要性も含め議論のあるところであるので、酵素活性測定や遺伝子解析などによる重症度の的確な評価を行った上で、慎重な追跡調査が重要と考えられる。

脂肪酸酸化異常症については、島根大学で2例の患者が発見された。この一年、希であると考えられてきたMCAD欠損症患者が複数例、急性発症の際にタンデム質量分析法によるアシルカルニチン分析を受けることで化学診断されている。しかしながら、未だに脂肪酸酸化異常症が突然死や急性脳症の基礎疾患であり、またその化学診断にはタンデム質量分析法によるアシルカルニチン分析が必要であるという認識が普及しているとは言えない。MCAD欠損症患者の1例は、診断が遅れ、急性発症時に死亡している。タンデムマス・スクリーニングの普及により、その対象疾患への認識と理解がすすめば、このような不幸な事件は防げるものと考えられる。

高チロシン血症I型は、希ではあるものの、肝不全症状を呈して診断されてからでは内科的治療が困難であるので、MS/MSスクリーニング対象疾患として扱われるべきと考えられる。サクシニルアセトン定量二次検査法は簡便で精度が高い方法であるので多くの検査機関で採用がすすむことが期待される。

福井大学の本年度の研究事業で、新生児期急性発症のOTC欠損症患者が2例、シトルリン低値・グルタミン高値でスクリーニングされ、尿オロト酸分析で化学診断された。1例は新生児期早期に死亡し、1例は重度障害を残し生存しているが、原因不明の死亡とせず、早期診断を可能にするという点で本スクリーニングシステムの意義は大きいと考えられた。

本研究事業参加機関の再採血率は必ずしも低いとは言えない。再採血率の上昇は費用対効果の面でも不利な要素となる。分析方法の改良や、指標値の複合化などにより再採血率を下げられる可能性があるため、更に検討が必要であろう。

## E. 結論

本年度の研究で、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における受検新生児は年間100,000（全国出生の約9%）となり、新たな疾患が次々に診断されており、また今後スクリーニング規模が拡大される情勢にある。対象疾患の重症度に多様性があるため、その医学管理について検討すべき課題はあるものの、非スクリーニング地域で発症後に診断された患者が不幸な転帰をとっている現状を可及的速やかに改善する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

(各研究協力者報告書を参照されたい)



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・スクリーニング」における疑陽性例低減のための技術改良と効果

研究要旨

タンデムマス・スクリーニングの費用対効果を高めるためには、疑陽性率を最小化し、再採血・精密検査やそれに伴う精神面での家族負担を減らす必要がある。わが国では抗生剤投与によるイソ吉草酸血症疑陽性、及び高チロシン血症疑陽性が多いので、これらについて初回濾紙血で二次検査を行う方法を開発し、平成18年5月から11月末まで27,905例にこの方法を実施したところ、イソ吉草酸血症、高チロシン血症の二次検査実施率は0.59%、1.79%であった。結果は全て陰性で精密検査も不要であり、この期間の再採血依頼率は0.10%となり、極めて精度の高いシステムとすることが出来た。イソ吉草酸血症二次検査は新規の方法であり学術的意義も高く、簡便で安価な検査であるため経済的負担軽減のメリットがある。このように極めて低い再採血率は本スクリーニングに参加する家族への負担を軽減し費用対効果を高めることに大いに寄与すると考えられた。

研究協力者

重松陽介 (福井大学医学部看護学科健康科学)  
畑 郁江 (福井大学医学部小児科)

A. 研究目的

「タンデムマス・スクリーニング」パイロットスタディでの検討課題の概要は、精度管理を実施しつつ疑陽性頻度や見逃し例を検討すること、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、わが国における対象疾患患者頻度を明らかにすること、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である。

これらの検討課題の中で、昨年度は“非誘導体化法”の検討を行い、分析精度が向上し疑陽性・偽陰性率を低減できるだけでなく、試料調整費用の低減と分析時間の短縮の点でもメリットがあることを報告した[1]。本年度は、この試料調整法を採用したパイロットスタディを実施すると共に、この調整法を採用してもなお高い疑陽性率となるイソ吉草酸血症と高チロシン血症I型のスクリーニングについて、二次検査法を検討・開発し、更にスクリーニング精度向上を目指した。

わが国では、感染症リスクのある新生児に対して経口抗生剤の投与が希でなく行われているが、中でもピバリン酸エステル型の抗生剤は生体に投与されると体内でpivaloylcarnitineが生成される。Pivaloylcarn-

itineは、イソ吉草酸血症スクリーニング指標である isoavaeryl carnitine の異性体であり、「タンデムマス・スクリーニング」でのアシルカルニチン分析では共にC5アシルカルニチンとして定量されるためイソ吉草酸血症疑陽性となる。今回開発した二次検査法は、本症で同時に増加しているグリシン抱合体の濾紙血中濃度を定量し、本症か抗生剤投与による疑陽性かを確認する方法である。

高チロシン血症I型の二次検査法としては、既に報告されている濾紙血中hydrazone体サクシニルアセトンを定量する方法[2]であり、濾紙血中チロシン濃度200nmol/ml以上の新生児に対して用いることで、その精度について検討した。

B. 研究方法

実施地域は前年度と同様、福井県、広島県、徳島県、大阪市、その他の協力医療機関である。

分析機器は、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API4000であり、島津製作所製LC装置を接続して分析した。1次スクリーニングとしては、濾紙血検体の非誘導体化サンプルを分析した。

分析検体は、平成18年5月から11月末までに受検した27,905新生児の濾紙血である。

(1) 濾紙血グリシン抱合体分析

1次スクリーニングでC5アシルカルニチン濃度がカットオフ値(0.5nmol/ml)を越えた例について、1/8

インチ径濾紙血片を平底96穴マルチプレートに入れ、重水素標識isovaleryglycine (内部標準) を含む95%メタノールを加え、振盪器で20分間振盪した。メタノール溶液は別のU底96穴マルチプレートに移して乾涸しブチルエステル誘導体とした。試薬を乾涸後、80%アセトニトリル水溶液 (0.05%ギ酸含有) を加え、flow injection-MS/MS分析した。Isovaleryglycineブチルエステルの定量のためのMRM分析は、pivaloylglycineブチルエステルでは殆ど観測されないm/z 132のプロダクトイオンと[M+H]<sup>+</sup>イオンの組み合わせで行った。MS/MS分析条件は専用のソフト“Analyst”を用いて最適化した。

健常対照者の血液に既知量のisovaleryglycineを添加した濾紙血を用いて検量線を作成し定量した。

重水素標識isovaleryglycineなどの関連グリシン抱合体は既報の方法を用いて合成した。

## (2) 濾紙血中hydrazone体サクシニルアセトンの定量

1次スクリーニングでチロシン濃度がカットオフ値 (200nmol/ml) を越えた例について、1/8インチ径濾紙血片を平底96穴マルチプレートに入れ、これに5,7-dioxooctanoic acid (15nmol/ml) (内部標準) とhydrazine hydrate (0.1%) 及びギ酸 (0.1%) を含む80%アセトニトリル溶液を100 $\mu$ l加え、37°Cで45分間振盪した。抽出液はV底96穴マルチプレートに移し遠沈し、上清をU底96穴マルチプレートに移してflow injection-MS/MS分析した。MS/MS分析は、hydrazone体サクシニルアセトンも5,7-dioxooctanoic acidも、[M+H]<sup>+</sup>イオンとその脱水イオンの組み合わせでMRM分析した。

サクシニルアセトンの定量は、健常対照者の血液に既知量のサクシニルアセトンを添加した濾紙血を用いて検量線を作成して行った。

## D. 研究結果

### (1) 濾紙血グリシン抱合体分析

isovaleryglycine 定量用の検量線は isovaleryglycine濃度0.1~50 nmol/mlの範囲で良好な直線性が得られた。pivaloylglycine濃度を20nmol/mlに調整して作成した濾紙血の分析では、isovaleryglycine濃度0.32 nmol/mlと定量された。この方法での濾紙血中のisovaleryglycine濃度は、健常新生児で0.16  $\pm$  0.03 nmol/ml、抗生剤使用新生児で0.19  $\pm$  0.07 nmol/ml、これに対しイソ吉草酸患者では0.6 ~ 80.0 nmol/mlと、明らかに高い定量値を示した。

平成18年5月から11月末までにスクリーニングした27,905例の内、C5アシルカルニチン濃度が0.5nmol/ml以上のため二次検査を行ったのは165例 (0.59%) であったが、この中で isovaleryglycine 濃度が 0.5 nmol/ml以上であった例はなかった。

### (2) 濾紙血中hydrazone体サクシニルアセトンの定量

サクシニルアセトン定量用の検量線はサクシニルアセトン濃度 1~100 nmol/mlの範囲で良好な直線性が得られた。既報によれば、高チロシン血症 I 型患者での濾紙血サクシニルアセトン濃度は 5.0 nmol/ml以上であるとされているので、カットオフ値を5.0nmol/mlに設定した。

当科で最近経験した本症例での後方視的分析では、新生児期濾紙血濃度が 57.2 nmol/mlであったが、生後5ヶ月の診断時の濾紙血では 8.1 nmol/mlと低下しており、NTBC治療開始後は 2.6 nmol/mlと更に低下していた。この患者は、母親をドナーとする生体部分肝移植を生後6ヶ月で受けており、その後の濾紙血サクシニルアセトン濃度もカットオフ値以下で推移した。

平成18年5月から11月末までにスクリーニングした27,905例の内、チロシン濃度が 200 nmol/ml以上のため二次検査を行ったのは499例 (1.79%) であったが、この中でサクシニルアセトン濃度が 5.0 nmol/ml以上であった例はなかった。

## E. 考察

わが国では、感染症リスクのある新生児に対して経口ピバリン酸エステル型抗生剤投与が希でなく行われており、これがイソ吉草酸血症の疑陽性となり、スクリーニングシステムに負荷をかけている。イソ吉草酸血症のスクリーニング指標であるC5アシルカルニチンがカットオフ値を越える例については、参加医療機関に抗生剤使用の有無を確認し、服用していなければ再採血を依頼するという手順で対応している検査機関が殆どである。この場合、抗生剤の確認の際の錯誤やイソ吉草酸血症患者に抗生剤が投与されていた場合には、見逃しとなる危険がある。今回開発した方法で isovaleryglycineの増加を確認すれば、このような問題は解決できる。

ただし、この方法では、もう1つのC5アシルグリシン異性体である 2-methylbutyrylglycine と isovaleryglycineとを区別して定量することは出来ない。このため、2-methylbutyrylglycineが増加すると考えられる疾患 (short/branched-chain acyl-CoA dehydr-

ogenase deficiency)でも陽性となるので、その鑑別診断には尿有機酸分析が必要である。しかしながら、少なくとも、比較的頻度の高いpivalateエステル型抗生剤服用による疑陽性を無くすことには有用な検査である。

この検査法は、比較的高感度の機器を必要とする点も注意が必要である。特に、欧米ではタンデムマス・スクリーニングで軽症型イソ吉草酸血症患者が多く発見されている。このような患者の濾紙血C5アシルカルニチンは最低値で 0.8 nmol/mlと報告[3]されており、isovalerylglycine 濃度もカットオフ値に近い値であることが想定される。本年度、島根大学の研究事業で発見された本症患者の新生児濾紙血中C5アシルカルニチン濃度は 1.36 nmol/mlで、本法でのisovalerylglycine値は 0.6 nmol/mlであったことから、カットオフ値を更に下げる必要があるかもしれない。ただし、最軽症型の本症患者は臨床症状を呈しないとも考えられ、スクリーニング対象として適当かどうか議論が必要である。

高チロシン血症 I 型は、肝不全症状を呈して診断されてからでは内科的治療が困難であり、自験例でも肝不全に対してNTBC治療は効果がなく、生体部分肝移植受けざるを得なかった。本症は、チロシン高値を指標にスクリーニングすると再採血率が1-2%と高率になるが、今回検討した方法で二次検査すれば、簡便に精度良く患者を診断できると考えられるので、多くの検査機関でMS/MSスクリーニング対象疾患として扱われることが期待される。

上記2疾患のスクリーニングにおける再採血率が殆どゼロになった場合でも、プロピオン酸血症/メチルマロン酸血症のスクリーニング(指標はC3/C2アシルカルニチン比)やグルタル酸尿症II型スクリーニング(指標はC8、C10アシルカルニチン値)では、まだ疑陽性率が充分低いとは言えない。再採血率を充分低くすることは、本スクリーニングに参加する家族への負担を軽減し、費用対効果を高めることに大いに寄与するので、カットオフ値の適正化や複数の指標値の組み合わせの採用などによる診断高率の改善の作業が今後も更に必要と考えられた。

## 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と新しい分析法の検討. 平成17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. 96-99, 2006.

[2] Allard P. et al.: Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. Clin. Chem. 37:1010-1015 (2004).

[3] R.Ensenauer, J. et al.: A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by new-born screening. Am. J. Hum. Genet. 75 (2004) 1136.

## F. 研究発表

1) 重松陽介: 日本におけるタンデムマス・スクリーニングの対象疾患-試験研究結果の検討. 日本先天代謝異常学会雑誌. 22(1):70-73, 2006.

2) 重松陽介: 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. 日本小児科学会雑誌. 110(7):895-903, 2006.

3) 重松陽介, 畑郁江: 健診・検査後の対応とその評価-新生児スクリーニング-有機酸代謝異常症. 小児科臨床. 59(4):635-641, 2006.

## 熊本県におけるタンデムマスによるパイロットスタディ状況（第 2 報）

### 研究要旨

平成 17 年 3 月から熊本市の一部施設を対象として、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（第 1 報）。その後、平成 18 年 8 月より熊本県の同意を得て、日本産婦人科医会熊本支部の理解と協力を受け、熊本県全県下の産科医療機関に対象を拡大した。また、宮崎県の一部施設についても同意が得られたので平成 18 年 10 月より、検査を開始した。この結果、検査数は大きく増加し、開始から平成 18 年 12 月までに 11,293 名をスクリーニングし、3-MCCD の患者 1 名を発見した。検査の同意率は累計で 97%、昨年末時点では 99%と高率であった。再採血率は 0.76%と少し高く、アシルカルニチンで 0.66%、Tyrosine と Citrulline で 0.1%であった。現在、更に他自治体の協力を得ながら対象地域の拡大が出来るよう、準備を進めている。

### 研究協力者

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

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

### A. 研究目的

2004 年 3 月にタンデム質量分析計の設置を完了し準備体制を整えたが、スタート時の一部施設のみを対象としたマス・スクリーニングを熊本県全域に広げ、また九州各地の協力を得ることで実施数を拡大して、タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの有効性の有無を確認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

平成 16 年度分担研究報告書に記載した装置、試薬、分析方法を用いた。

#### 2.スクリーニングシステムについて

基本的なシステムは平成 17 年度分担研究報告書の内容と同じであるが、平成 18 年 8 月より対象施設を熊本県全域に拡大した際に、日本産婦人科医会熊本支部より、検査結果は生後 1 ヶ月健診に間に合うようにすること、という要望が出た。このことから、公費負担 6 疾患で利用している検査結果報告書と同様な形式で新たな報告書を作成し検査終了後に、各産科医療機関宛に分かり易

い形で報告を行うように事務の体制を整えた。昨年報告したように、熊本においては同じ新生児濾紙血液を用いて、ファブリー病のスクリーニング検査（熊本大学先端医療支援研究費による）を実施している関係で、検査の優先順序を次のように設定した。すなわち、①公費負担 6 疾患、②タンデムマスによる測定、③ファブリー病スクリーニング検査。この内、①と②については同一施設（化血研）で実施している為、ほぼ 3～4 日で検査を済ませ、再測定のないことを確認してから熊大小児科へ検体を送付した。濾紙検体の移動は当研究所の従業員が毎日（平日）行った。

この様に、熊本におけるパイロットスタディは他地域と比べ少し異なる体制であるために、タンデムマスの検査結果とファブリー病の検査結果を、濾紙検体を受け付けた週の 2 週間後に、各産科医療機関に郵送するシステムとした。この為に、産科医療機関に報告書が届くのが、1 ヶ月健診の間近になることとなった。

その後、各産科医療機関からの要望等を受け、検査結果報告については次のように変更した。①公費負担 6 疾患とタンデムマスの検査結果を、公費分の専用報告書の中に専用枠を作り、入れ込んだ。②ファブリー病の検査結果については、単独で専用報告書に記載する形とした。このことで、初回検査、再採血の必要な場合の再採血依頼、再検査の実施、結果報告という行程の流れが一応スムーズにいくようになった。

検査データについての再採血等の判断は、特に必要性を認めた場合は従来どおり、熊大小児科に

相談し、判断を仰いだ。

要精密となった児については既報のとおり、全て熊大小児科を受診するようにした。

次に、宮崎県のパイロットスタディを、宮崎県の了解を得て、平成18年10月から開始した。

宮崎県の場合は、公費負担6疾患を財団法人宮崎県健康づくり協会で行っているため、同協会で濾紙検体を受付た同じ日に、1スポットのみ切り離し、その日の内に郵送するシステムとした。その結果、対象となる濾紙検体は翌日に熊本に到着し、受付た午後からタンデムマスでの測定が開始出来た。検査結果はE-mailを利用し、同協会に報告する形をとった。

### C. 研究結果

#### 1.スクリーニング成績

##### 1) 検査数と再採血率

平成18年12月末までに、累計で11,293件の検査を実施した。検査同意率は累計で96.7%、直近では99%と殆どの保護者が同意した。再採血数は86件で再採血率は0.76%となり、公費負担6疾患の再採血率と比較した場合、アミノ酸とガラクトース全てを合わせた再採血率とほぼ同率であった。再採血の内訳は以下のとおりである。

項目	Cut off point	件数	再検割合(%)
C0	<10	18	12
C10,C12	>0.4,>0.3	12	16
C12	>0.3	16	18
C5-OH	>1.0	1	2
Tyrosine	>8	11	16

単位：AC=nmol/ml, AA=mg/dl

項目	Cut off point	件数	再検割合(%)
C10	<0.4	6	7
C8/C10	1.5	4	5
C8,C10	>0.3,>0.4	3	3
C10,C6,C8,C12	>0.4,>0.3	2	2
C10,C8,C12	>0.4,>0.3	2	2
C8,C12,C10,C14:1	>0.3,>0.4	2	2
C14	>0.76	1	1
C8	>0.3	1	1
C5,C5/C2	>2.0,>0.06	1	1
C12,C14:1	>0.3,>0.3	2	2
C3/C2,or C3	0.25,>6.8	3	3
Citrulline	>0.88	1	1

#### 2) 陽性報告数と確定患者数

再採血を実施した中から、4名を陽性と判断し精密検査を実施した。その結果、C5-OHが高値であった1例が、本研究班の主任研究者である山口教授により3-MCCD(3-メチルクロトニル Co-Aカルボキシラーゼ欠損症)患者と確定診断された。当該児については熊大小児科で治療管理中である。尚、当該児の両親と兄弟についても検索を行った結果、兄(I.O)のC5-OH値が16.76nmol/mlと高く、3-MCCDが疑われている。また、その他の3例についても現在フォロー中である。

#### 3) マス・スクリーニングにて見逃された例

本マス・スクリーニング実施中に、初回測定(生後4日目採血)時に異常がなく、その後、約1ヶ月後に測定を行った結果、Citrullineが5.89mg/dl(カットオフ値:0.88mg/dl)と上昇しており、最終的にシトリン欠損症と診断された例を経験した。

#### 2.事務処理上の問題

平成18年8月から本格的に熊本県全域に拡大したが、検査結果報告に関する事務処理システムの体制作りが遅れたため、下記のような問題点が発生している。今後、本格拡大を進める上で重要な事項と思われるので提示しておく。

##### 1) 問題点

産科医療機関では1ヶ月健診が最後の母子健診となることから、最終的な検査結果をこの時期までに保護者に渡す必要がある。この時期を逃すと、その後の連絡は郵送等の手段しかなく、新たな手間が発生する。本パイロットスタディを開始する前に産婦人科医会(熊本支部)から出された要望は、正に妥当なものといえる。

当研究所では、公費負担6疾患についてはシステム上の問題もなく、スムーズな対応を行っているが、パイロットスタディによる新たな事務作業については人手による事務処理を行っている関係で、かなりの工数を要している。更に、熊大小児科での研究テーマであるファブリー病スクリーニングも同じ濾紙検体であることから、同様な事務作業が必要となり、1ヶ月健診によりやく間に合うか否かのタイミングでの報告となっているのが実情である。

##### 2) 対策

パイロットスタディ期間中ではあるものの、公費負担で行っているマス・スクリーニングのシステムを利用しているものであり、現在以下のような

対応を取っているが、更にシステムを整備しておく必要がある。今後は以下に挙げる①のコンピューターシステムの整備を急ぐと共に、最終的には公費負担6疾患とタンデムマス、更に同時研究テーマでの報告書を完全に分ける形で体制を整えていく計画である。

- ①コンピューター処理システムの早期導入
  - ②公費負担6疾患とタンデムマス測定での同一報告書を利用した結果報告
  - ③同時研究テーマ用の専用報告書の作成
  - ④最終的には各項目別々の報告書での出力
- 今後、新たにタンデムマスでのスクリーニングを計画している自治体においては、結果報告についても十分な準備を整える必要があると考える。

#### D. 考察

本パイロットスタディは国内の限られた地域での実施で、予算的にも厳しい中状況であるが、熊本県においては熊本大学小児科の積極的な展開と地域小児科医会、産婦人科医会の同意と協力の元に、自治体の理解を得るという手法で県下全域に拡大することができた。現在も各地域への協力要請を行っており、九州地区で目標にしている年間5万件の検査は、近いうちに到達可能と思われる。昨年末までに実施したスクリーニングでは、再採血率が0.76%と高めとの指摘もあり、今後試験項目の追加やカットオフ値の検討などを進め、再採血率をより低く抑える努力が必要と思われた。年度中に発見できた3-MCCD患者は、特に症状も無く、その兄も同疾患が疑われるが臨床的には無症状とのことであり、今後の経過観察が重要と思われた。一年間のマススクリーニングでは検査そのものの問題よりも、その後が生じる事務的な業務が拡大し、その対応にかなりの時間が割かれている。コンピューターシステムの充実を図り、より短時間、短期間に産科医療機関への報告が終了できるシステムを構築する必要があるが見出された。

#### E. 結論

九州、熊本地区では平成17年3月から一部施設を対象にしたパイロットスタディを開始し、平成18年8月に熊本県下全域に拡大、その後10月には宮崎県の一部施設からの検体も加わり、昨年末までに11,293件の検査を実施した。その結果、再採血数86件（再採血率0.76%）、4名を陽性と、その中から1名が患者と確定診断（3-MCCD）

された。今後、九州内の他自治体を中心に実施地域を拡大して目標数を早期に達成したい。

#### F. 研究発表

- 1) Kimitoshi Nakamura and Fumio Endo Newborn screening trial for lysosomal disease using dried blood spots in Japan. 9<sup>th</sup> international symposium on MPS and related disease June 28-July 2, Venice

## タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング －東京都におけるパイロット研究 第 3 報－

### 研究要旨

平成 17 年 12 月からタンデム質量分析計による新生児スクリーニングの試験研究を開始したが、今回は平成 18 年 4 月から 11 月までに行った 8,410 例のスクリーニング成績をまとめた。方法は昨年と同様の方法であるが、Leu+Ile 値が cut off を超えていたものが 338 例あり、cut off 値について再検討の必要があった。アミノ酸の検査で再採血を依頼した 7 例中、Met、Cit が高値であった例は NICCD と診断されたが、その他は正常であった。有機酸・脂肪酸代謝異常症のスクリーニングでは、前者よりも後者の方が再検査を必要とするものが多く、特に低出生体重児や早期産児でアシルカルニチン値が異常となるものが多い傾向がみられ、診断において注意する必要があった。今後は対象数を多くして、その成績を検討する。

### 研究協力者

北川照男（東京都予防医学協会理事長）  
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参与）  
原 淳（東京都予防医学協会主任）  
穴澤 昭（東京都予防医学協会科長）  
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）

本年度は、平成 18 年 4 月から 11 月末までに都内で出生した新生児約 64,000 人のうちの 8,410 名（13.1%）の血液を MS/MS でスクリーニングする対象とした。すなわち、本研究について協力が得られた 14 の採血医療機関は、出生した新生児の保護者に研究の目的を説明し、新生児血液を MS/MS で検査することを承諾した保護者に、新しい検査法による先天性代謝異常検査申込書に必要な事項を記入してもらい、新生児血液および保護者が記入した現行の先天性代謝異常症等マス・スクリーニング申込書とともに東京都予防医学協会に送付する。協会は新しい検査について了解が得られている新生児血液についてのみ、現行の 6 疾患のスクリーニングに加えて MS/MS による検査を行う。協会は、現行の 6 疾患のスクリーニング結果報告書と別に、MS/MS による結果報告書を採血医療機関に送付し、医療機関はその成績を新生児の保護者に説明する（図 1）。

### A. 研究目的

東京都の承認の下で、(財)東京都予防医学協会は現行の先天性代謝異常症等の新生児マス・スクリーニングに加えて、タンデム質量分析計 (MS/MS) によるアミノ酸、有機酸・脂肪酸代謝異常症の試験的スクリーニングを、協力採血医療機関で出生し、保護者の了承が得られた新生児血液について、平成 17 年 12 月から実施してきた。本年度の研究は、平成 18 年 4 月から 11 月末までに MS/MS による新生児スクリーニングを行った 8,410 例の成績を検討し、その有用性と問題点を明らかにするのが目的である。

### 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は、まず内部標準物質 (CIL Set A + Set B) を含むメタノールで抽出し、次いで塩酸ブタノールでブチル化を行い、既報の条件で HPLC と MS/MS で分析した。MS/MS のスキャンモードはアミノ酸、アシルカルニチンともに MRM モードを使用した[1]。

使用した機器は MS/MS は Quattro micro API、LC は Alliance2795 (ともに Waters 社) である。

なお精度管理に用いる外部精度管理検体は、現在まだ国内で作られていないので、米国 CDC の新生児スクリーニング精度管理プログラム (NSQAP) へ登録し、分与されたろ紙血液を使用して精度管理を行い、これを内部精度管理用ろ紙血液としても使用した。

(倫理面への配慮)

東京都で本研究を行うにあたっては、前述のように東京都の指導を得て、倫理面について十分に配慮しつつ実施しており、検体や結果報告用紙等の保存等については個人情報の保護に十分配慮している。

### C. 研究結果および考察

MS/MS で測定した 8,410 例の新生児のろ紙血液中アミノ酸の平均値、range、および cut off 値は表 1 に示した。Range の最大値が cut off 値を超えていなかったのはアルギニンのみで、その他はすべて最大値が cut off 値を超えていた。なお、測定値の M+1SD 値が cut off 値を超えていたものはなかったが、ロイシン+イソロイシンの M+1SD 値とチロジンの M+2SD 値が cut off 値に近い値を示していたので、cut off 値を超える新生児について再採血を行い、再検査すると、再採血の症例がかなり多くなると危惧された。そこで、MS/MS による一次検査の Phe、Met、Leu+Ile、Tyr 値が cut off 値を超えていた症例数およびその%を調査したところ表 2 のようであった。次に、Leu+Ile 値が cut off 値を超えていた 338 例のろ紙血液について、HPLC で Leu を測定したところ、HPLC で測定した Leu の値が cut off 値を超えていたのは表 3 の症例 2 と 6 のみであり、MS/MS の Leu+Ile の cut off 値は再検討が必要と思われた。そこで、MS/MS の Leu+Ile の cut off を変化させた場合の cut off を超える症例数ならびにその比率は、表 4 のようであった。この値は、Leu と Ile の cut off を再検討する参考になると思われる。

MS/MS による一次スクリーニングで Phe、Leu+Ile、または Cit と Met 値が cut off を超えていた 7 症例について、HPLC でろ紙血液のアミノ酸を測定し、両者の値を比較した。その結果、Phe と Met については両者の値にそれほど大きな差はなかった(表 3 参照)。

なお、Tyr 値は代謝異常でなくても未熟児で高値を示すことが広く知られている上に、Tyr 値があまり高くない高チロジン血症 I 型の症例もあるといわれている [2]。したがって、東京では、血中 Tyr 値が cut off 値を超えたものについて再採血を依頼すると、その件数が多くなり、現行の新生児スクリーニングに支障を生ずる恐れがあるので、再採血依頼を行わないことにした。

血中 Met 値が高値を示した 1 例はシトルリンも高く、Arg 値もやや高い傾向を示しており、再採血を依頼したところ、その医療機関において遺伝子検査も含めた検査が行われ、NICCD と診断したとの報告を受けた。

次に、各種の有機酸代謝異常症の診断に用いるろ紙血液中アシルカルニチン値の新生児 8,410 例における平均値、range、および cut off 値は表 5 に示した。その range の最大値が cut off 値を超えていたのは、C3、C5、C5OH であるが、各アシルカルニチンの M+2SD 値が cut off 値を超えているものは認められなかった。これに対して、脂肪酸代謝異常症の診断に用いるろ紙血液中アシルカルニチン値の新生児 8,410 例での平均値は、表 6 に示したように、C16、C18、C0/(C16+C18) を除いたすべてのアシルカルニチンにおいて、range の最大値が cut off 値を超えていて、その他は正常範囲であった。そして、C0 も、range の最小値は cut off 値以下ではなかった。以上の成績から、有機酸代謝異常症の疑いで再確認検査や再検査を依頼するものよりも、脂肪酸代謝異常症が疑われて再確認や再検査を必要とする症例の方が多いと思われた。実際に有機酸、脂肪酸、尿素サイクル代謝異常症がそれぞれ疑われて再確認検査を実施した症例数は、28 例、77 例、15 例(計 120 例)であり、確認検査の結果から再採血を依頼して、さらに確認検査を必要とした症例数は、11



例、32例、1例(計44例)であった(表7)。

なお、再確認するために再採血を依頼した44例の内訳は表8のようである。C10が高く、GA IIが疑われたものが14例あり、最も頻度が多かったが、それらの出生時体重はほぼ正常範囲であった。次に、C0が低値を示し、CRNTが疑われた症例とC8/C10が高値を示し、MCADが疑われた症例がそれぞれ6例見られ、前者の出生時体重の平均値はほぼ正常範囲であったが、後者の出生時体重の平均値は $1,317 \pm 1,040\text{g}$ で低かった。また、C5OHが高値を示し、MCC、3MCCなどが疑われたものが4例みられたが、この症例の平均出生時体重も $1,443 \pm 1,262\text{g}$ で低いものが多く、C16OHとC18:1OHが高値でLCHAD欠損症が疑われた5例の平均出生時体重も $2,527 \pm 716\text{g}$ であり、その一部は低出生時体重であったので、これらの疾患が疑われた場合は、遺伝子の異常に基づく先天性代謝異常ばかりでなく、有機酸や脂肪酸の代謝機能が未熟なために、二次的な異常を生じた可能性を考慮に入れながら診断を進める必要があると思われた。また、C5の高値は、メイアクトなどの抗生剤の服用によっても生ずる[1]なので、その診断は慎重に行うべきと考える(表8参照)。以上の44症例について再採血を依頼し、送られてきた検体の中の血中シトルリンとMetが高値を示した1例は、前にも述べたように、採血医療機関が精密検査を行ってNICCDと診断された。その他の43例を再検査した結果、C5OHの高値が再確認された3症例とC5OHとC8/C10が高値を示した1例がみられ、再々採血を依頼した。その4症例は、極小未熟児、またはそれに近い低出生体重児であり、遺伝子の異常に基づく先天性有機酸・脂肪酸代謝異常症を考慮するとともに、代謝機能の未熟性による代謝異常も考える必要があると思っている(表9)。

症例1は、C5OHの値が初回に比較して再採血時、再々採血時の値が次第に低下して正常範囲となったので、正常であると診断したが、症例2と4は、血中C5OHの値が初回の検体に比較して継時的に増加しているので、経過を観察中である。現在のところ、尿のGC/MCによる有機酸分析で

は異常な有機酸の排泄は認めていない。

症例3はC5OHとC8/C10の上昇がみられた症例なので、再々採血を依頼してあるが、現在、まだ検体を受け取っていない。検体を受理して再分析してから結論を出したいと考えている。

## E. 結論

昨年度までにプロピオン酸血症、グルタル酸尿症I型およびMCAD欠損症などの有機酸・脂肪酸代謝異常症の患者10疾患20例についてMS/MSで検査を行って対象疾患の診断が可能であることを確認し、今年度は約8,500件の新生児をスクリーニングし、NICCD1例を発見した。Leu+Ileのスクリーニングではcut off値を再検討する必要があると思われた。また未熟児ではC5OH、C8/C10比が一過性に高値を呈するものが多いので、診断において注意が必要と思われた。

なお今後は、スクリーニング数を多くしてその成績を検討する予定である

謝辞：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。

本試験研究にご協力いただきました採血医療機関14施設に深謝いたします。

飯野病院

大森赤十字病院

葛飾赤十字産院

杏林大学病院

昭和大学附属病院

聖母病院

帝京大学医学部附属病院

東京慈恵会医科大学附属病院

東京女子医科大学病院

東京大学医学部附属病院

都立広尾病院

都立墨東病院

日本赤十字医療センター

日本大学医学部附属板橋病院

(五十音順)

## F. 引用文献

[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.

[2] 重松陽介: タンデム質量分による新生児代謝異常症マススクリーニング. 日本小児科学会雑誌, 110:895-903, 2006.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也ほか. タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報, 42:28-53, 2006.

2) 北川照男, 鈴木 健. 新生児マス・スクリーニング. 小児科臨床, 59:559-566, 2006.

3) 北川照男, 鈴木 健, 石毛信之ほか: マス・スクリーニングの最近の進歩. 小児科診療, 69:1595-1601, 2006.

4) 北川照男, 鈴木 健. 新生児マス・スクリーニング. 産婦人科治療, 92:972-976, 2006.

5) 石毛信之, 鈴木 健, 大和田操ほか: タンデム質量分析計を用いた尿中グロボトリアオシルセラミド測定によるファブリー病のスクリーニング法の研究. 日本マス・スクリーニング学会誌, 16:69-79, 2006

### 2. 学会発表

1) Kitagawa T, Suzuki K, et al. Measurement of urinary alpha-galactosidase A protein using enzyme-linked immunosorbent assay and globotriaosylceramide using tandem mass spectrometry: evaluation for non-invasive detection of Fabry disease. The 10th International Congress of Inborn Error of Metabolism, Chiba, Japan, 2006 (10<sup>th</sup> ICIEM 2006).

2) Ohashi T, Ishige N, et al. Measurement of globotriaosylceramide in urine for long term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. 10<sup>th</sup> ICIEM 2006.

3) Shintaku H, Ohwada M, et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) responsive hyperphenylalaninemia without BH4 deficiency in Japan over the past 10 years. 10<sup>th</sup> ICIEM 2006.

4) Shintaku H, Ohura T, et al. Long-term treatment of Tetrahydrobiopterin (BH4)-responsive mild PKU in Japan. 10<sup>th</sup> ICIEM 2006.

5) Aoki K, Ohwada M, et al. Long term follow-up study of patients with Phenylketonuria detected by the newborn screening program in Japan. The 6th Meeting of the International Society of Neonatal Screening, Tokushima, Japan, 2006 (6<sup>th</sup> ISNS 2006).

6) Shintaku H, Owada M, et al. Diagnosis of tetrahydrobiopterin (BH4) responsive mild PKU in Japan over the past 10 years. 6<sup>th</sup> ISNS 2006.

7) Suzuki K, Owada M. Determination of tetrahydrobiopterin in body fluids: A diagnostic tool for BH4 deficiency. 6<sup>th</sup> ISNS 2006.

8) Suzuki K, Owada M, et al. Screening method for Wilson disease by measurement of urinary ceruloplasmin. 6<sup>th</sup> ISNS 2006.

9) Urakami T, Nagao N, et al. Clinical characteristics at diagnosis in slow onset form of type 1 diabetes as detected by urine glucose screening at school. 6<sup>th</sup> ISNS 2006.

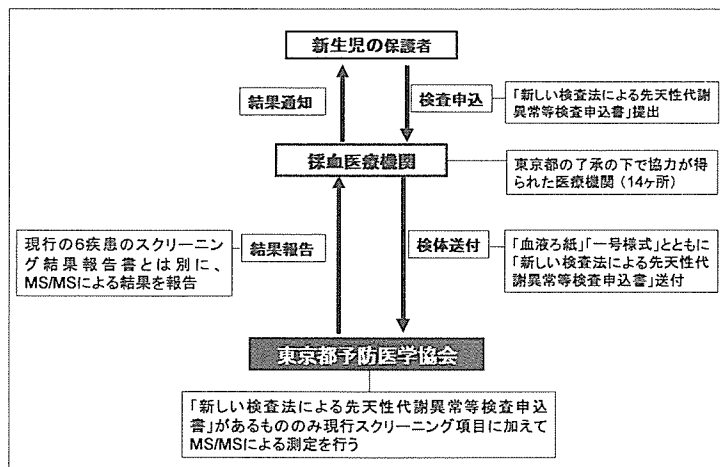


図1 東京都におけるパイロットスタディーの検査システム

表1 東京都におけるパイロットスクリーニングのアミノ酸の測定平均値と cut off 値 (μmol/L) (H18 年度 4 月～11 月, n = 8,410 )

測定項目	初回採血検体の平均値		range		cut off値	対象疾患
	mean	SD	min	max		
Val	112.0	25.2	27.4	309.7	200	MSUD
Leu+Ile	236.9	57.1	71.8	796.3	300	
Met	22.4	4.9	3.9	84.7	50	HCU
Phe	56.1	15.8	22.0	156.0	120	PKU
Arg	9.8	4.9	1.1	42.2	70	Arg
Cit	12.0	3.7	3.2	134.5	40	Cit I, II, ASA
Tyr	99.4	47.4	8.9	630.5	200	Tyr I

表2 血中アミノ酸値が MS/MS で cut off 値を超えていた件数

	Phe	Met	Leu+Ile	Tyr
cut off値(mg/dL)	2.0	0.7	3.9	3.6
cut off値(μmol/L)	120	50	300	200
cut off値をこえた件数	7	1	338	137
(%)	(0.08)	(0.01)	(4.02)	(1.63)

表3 初回検査で cut off を超えていた 7 症例の HPLC と MS/MS のアミノ酸値の比較 (mg/dL)

症例	測定	Phe	Leu+Ile	Met	初検判定	最終判定
1	HPLC	2.4			再採血	死亡
	MS/MS	2.0			再採血	
2	HPLC	2.5	3.5+1.1		再採血	正常
	MS/MS	2.4	3.4		Phe再採血	
3	HPLC	2.5			再採血	正常
	MS/MS		検査申込書なし			
4	HPLC	2.4			再採血	正常
	MS/MS	2.0			再採血	
5	HPLC		2.4+0.8		再採血	正常
	MS/MS		検査申込書なし			
6	HPLC		3.2+1.2		再採血	正常
	MS/MS		4.0		再採血	
7	HPLC			2.0	再採血	NICCD
	MS/MS			1.3	再採血	

表 4 血中ロイシン値と cut off を超えるものの件数

cut off値(mg/dL) cut off値(μmol/L)	Leu+Ile								
	3.9 300	→	4.6 350	→	4.9 375	→	5.1 390	→	5.2 400
cut off値をこえる件数 (%)	338 (4.02)	→	83 (0.99)	→	41 (0.49)	→	26 (0.31)	→	16 (0.19)

表 5 東京都におけるパイロットスクリーニングの有機酸代謝異常症関連のアシルカルニチンの測定平均値と cut off 値 [nmol/L (C3: μmol/L)]

測定項目	初回採血検体の平均値		range		cut off値	対象疾患
	mean	SD	min	max		
C3	1.6	0.6	0.1	9.6	5.00	MMA, PA
C5	118.3	64.2	27.4	2120.5	1000	IVA
C5DC	41.1	16.3	5.8	195.0	200	GA I
C5OH	110.5	30.5	39.5	1201.3	460	MCD、3-MCC等
C3/C2	0.072	0.023	0.01	0.21	0.20	} MMA, PA
C3/C16	0.80	0.34	0.12	4.12	5.00	

表 6 東京都におけるパイロットスクリーニングの脂肪酸代謝異常症関連のアシルカルニチンの測定平均値と cut off 値 [nmol/L (C0, C16, C18: μmol/L)]

測定項目	初回採血検体の平均値		range		cut off値	対象疾患
	mean	SD	min	max		
C0	24.5	7.6	8.6	80.6	< 7.0	CRNT
C8	57.8	25.7	11.6	559.2	270	MCAD
C10	116.8	56.8	23.7	1001.9	500	GA II
C16	2.2	0.8	0.2	6.1	6.50	CPT-II
C18	0.79	0.24	0.1	2.0	2.50	
C14:1	115.5	53.3	23.5	518.8	400	VLCAD
C16OH	15.8	5.7	0.8	58.7	50	} VLCHAD
C18:1OH	15.2	4.7	1.6	51.3	50	
C0/(C16+C18)	9.1	4.0	1.7	56.2	100	CPT-I
C8/C10	0.52	0.15	0.11	3.11	1.50	MCAD