

表1 各法における安定同位体ラベルスタンダード物質 (略表記した物質名称については表2を参照)

d; 重水素 (²H; deuterium)

| 測定法 | アミノ酸 | アシルカルニチン |
|--------|--|--|
| 誘導体化法 | ¹⁵ N, ²⁻¹³ C-Gly, d4-Ala, d8-Val, d3-Leu, d3-Met, ¹³ C6-Phe, ¹³ C6-Tyr, d5-OrnHCl, d5-Cit, ¹³ C5-ArgHCl, d3-Asp, d3-Glu | d9-C0, d3-C2, d3-C3, d3-C4, d9-C5, d3-C8, d9-C14, d3-C16 |
| 非誘導体化法 | ¹⁵ N, ²⁻¹³ C-Gly, d4-Ala, d8-Val, d3-Leu, d3-Met, d5-Phe, ¹³ C6-Tyr, d2-Orn2HCl, d2-Cit, ¹³ Cd4-ArgHCl | d9-C0, d3-C2, d3-C3, d4-C4, d9-C5, d6-C5DC, d3-C6, d3-C8, d3-C10, d3-C12, d3-C14, d3-C16, d3-C18 |

表2 一般検体を用いた各測定平均値及び標準偏差の比較 (n = 621), 単位 nmol/ml

| 略称 | 正式名称 | 誘導体化法 | | 非誘導体化法 | |
|-----------|---------------------------|-------|-------|--------|-------|
| | | 平均値 | 標準偏差 | 平均値 | 標準偏差 |
| Phe | phenylalanine | 50.0 | 9.5 | 61.4 | 13.2 |
| Leu + Ile | leucine + isoleucine | 242.7 | 50.8 | 159.5 | 42.0 |
| Met | methionine | 21.5 | 4.5 | 18.3 | 5.5 |
| Cit | citrulline | 13.8 | 4.9 | 15.5 | 7.0 |
| Arg | arginine | 13.3 | 6.4 | 20.3 | 10.1 |
| Gly | glycine | 374.2 | 140.0 | 361.4 | 132.4 |
| Ala | alanine | 440.0 | 149.3 | 281.6 | 84.8 |
| Val | valine | 92.6 | 23.9 | 119.9 | 28.9 |
| Tyr | tyrosine | 113.1 | 53.2 | 130.1 | 63.0 |
| Asp | aspartic acid | 49.1 | 26.5 | | |
| Glu | glutamic acid | 337.9 | 83.6 | | |
| Orn | ornithine | 115.0 | 55.2 | 108.4 | 42.9 |
| CO | free carnitine | 22.9 | 7.0 | 18.1 | 6.2 |
| C2 | acetyl carnitine | 26.6 | 7.6 | 20.7 | 6.8 |
| C3 | propionyl carnitine | 2.10 | 0.89 | 1.40 | 0.63 |
| C4 | butyryl carnitine | 0.234 | 0.068 | 0.209 | 0.091 |
| C5 | isovaleryl carnitine | 0.124 | 0.088 | 0.113 | 0.089 |
| C5:1 | tiglyl carnitine | 0.009 | 0.003 | 0.009 | 0.015 |
| C6 | hexanoyl carnitine | 0.040 | 0.012 | 0.047 | 0.035 |
| C5OH | 3-OH-isovaleryl carnitine | 0.126 | 0.034 | 0.134 | 0.054 |
| C8 | octanoyl carnitine | 0.070 | 0.028 | 0.056 | 0.041 |
| C10:1 | decanoyl carnitine | 0.103 | 0.068 | 0.074 | 0.045 |
| C10 | decanoyl carnitine | 0.149 | 0.068 | 0.081 | 0.052 |
| C5DC | glutaryl carnitine | 0.056 | 0.018 | 0.171 | 0.060 |
| C12 | dodecanoyl carnitine | 0.115 | 0.053 | 0.091 | 0.050 |
| C14:1 | myristoyl carnitine | 0.082 | 0.036 | 0.037 | 0.021 |
| C14 | myristoyl carnitine | 0.210 | 0.056 | 0.116 | 0.040 |
| C14OH | 3-OH-myristoyl carnitine | 0.020 | 0.006 | 0.007 | 0.007 |
| C16:1 | palmitoleyl carnitine | 0.122 | 0.051 | 0.132 | 0.062 |
| C16 | palmityl carnitine | 2.40 | 0.81 | 2.61 | 0.94 |
| C16OH | 3-OH-palmityl carnitine | 0.018 | 0.006 | 0.017 | 0.012 |
| C18 | steroyl carnitine | 0.932 | 0.279 | 0.647 | 0.212 |
| C18:1OH | 3-OH-oleyl carnitine | 0.016 | 0.005 | 0.021 | 0.011 |

表3 各測定法のアッセイ内変動係数(Coefficient of variation; CV) n=6 SD: 標準偏差 (standard deviation)

| 物質名 | 理論値 nmol/ml | 誘導体化法 | | | 非誘導体化法 | | |
|-----------------------------|----------------|-------|------|-------|--------|------|-------|
| | | 平均値 | SD | CV(%) | 平均値 | SD | CV(%) |
| Leucine (Leu) | 578 | 542.0 | 48.3 | 8.9 | 535.7 | 55.5 | 10.4 |
| | 1466 | 1505 | 62.6 | 4.2 | 1485 | 52.5 | 3.5 |
| Phenylalanine (Phe) | 283 | 227.3 | 16.1 | 7.1 | 243.2 | 24.4 | 10.0 |
| | 827 | 675.2 | 20.3 | 3.0 | 716.5 | 37.6 | 5.2 |
| Methionine (Met) | 120 | 86.2 | 7.2 | 8.3 | 79.8 | 11.3 | 14.2 |
| | 369 | 281.8 | 5.5 | 2.0 | 266.0 | 16.5 | 6.2 |
| Citrulline (Cit) | 189 | 121.4 | 11.9 | 9.8 | 142.9 | 13.6 | 9.5 |
| | 572 | 414.6 | 32.9 | 7.9 | 470.3 | 68.5 | 14.6 |
| Free Carnitine (C0) | 163 | 129.1 | 8.9 | 6.9 | 97.7 | 14.4 | 14.8 |
| | 395 | 313.0 | 6.8 | 2.2 | 236.3 | 22.1 | 9.4 |
| Acetyl Carnitine (C2) | 41.2 | 57.3 | 4.2 | 7.4 | 50.1 | 7.0 | 13.9 |
| | 89.2 | 131.9 | 5.7 | 4.3 | 107.7 | 9.3 | 8.6 |
| Propionyl Carnitine(C3) | 5.5 | 10.8 | 0.7 | 6.8 | 8.1 | 1.0 | 12.4 |
| | 14.3 | 28.3 | 1.6 | 5.5 | 19.5 | 1.9 | 9.6 |
| Glutaryl Carnitine(C5DC) | 0.5 | 0.34 | 0.04 | 10.8 | 0.52 | 0.13 | 24.8 |
| | 1.5 | 0.88 | 0.06 | 7.2 | 0.97 | 0.09 | 9.3 |
| Octanoyl Carnitine(C8) | 1.2 | 0.80 | 0.07 | 9.2 | 0.61 | 0.10 | 16.3 |
| | 3.1 | 2.22 | 0.13 | 5.7 | 1.55 | 0.16 | 10.3 |
| Decanoyl Carnitine(C10) | 0.6 | 0.97 | 0.09 | 8.8 | 0.59 | 0.16 | 27.3 |
| | 1.5 | 2.61 | 0.13 | 5.0 | 1.28 | 0.10 | 8.0 |
| Myristoyl Carnitine(C14) | 1.7 | 1.74 | 0.18 | 10.2 | 1.09 | 0.04 | 3.9 |
| | 4.8 | 4.35 | 0.37 | 8.5 | 3.53 | 0.20 | 5.8 |
| Steroyl Carnitine(C18) | 1.9 | 3.43 | 0.25 | 7.3 | 2.26 | 0.06 | 2.9 |
| | 4.5 | 6.23 | 0.55 | 8.9 | 5.35 | 0.10 | 2.0 |

表4 各測定法のアッセイ間変動係数(Coefficient of variation; CV) n=6 SD: 標準偏差 (standard deviation)

| 物質名 | 理論値 nmol/ml | 誘導体化法 | | | 非誘導体化法 | | |
|-----------------------------|----------------|-------|------|-------|--------|------|-------|
| | | 平均値 | SD | CV(%) | 平均値 | SD | CV(%) |
| Leucine (Leu) | 578 | 533.2 | 10.4 | 1.9 | 505.9 | 29.0 | 5.7 |
| | 1466 | 1470 | 106 | 7.2 | 1590 | 65.4 | 4.1 |
| Phenylalanine (Phe) | 283 | 226.4 | 7.7 | 3.4 | 246.4 | 8.6 | 3.5 |
| | 827 | 663.1 | 35.4 | 5.3 | 769.9 | 36.4 | 4.6 |
| Methionine (Met) | 120 | 85.0 | 2.3 | 2.7 | 61.3 | 7.1 | 11.6 |
| | 369 | 284.3 | 15.4 | 5.4 | 252.5 | 17.9 | 7.1 |
| Citrulline (Cit) | 189 | 123.6 | 5.5 | 4.4 | 169.7 | 14.3 | 8.4 |
| | 572 | 409.1 | 24.1 | 5.9 | 535.6 | 74.9 | 14.0 |
| Free Carnitine (C0) | 163 | 130.8 | 3.8 | 2.9 | 117.4 | 4.8 | 4.2 |
| | 395 | 325.8 | 22.3 | 6.9 | 306.6 | 17.3 | 5.6 |
| Acetyl Carnitine (C2) | 41.2 | 57.5 | 24.3 | 4.2 | 47.2 | 5.7 | 12.1 |
| | 89.2 | 130.1 | 76.9 | 5.9 | 129.6 | 9.3 | 7.2 |
| Propionyl Carnitine(C3) | 5.5 | 11.2 | 0.6 | 5.4 | 7.7 | 0.9 | 11.1 |
| | 14.3 | 28.1 | 2.3 | 8.1 | 21.8 | 1.9 | 8.8 |
| Glutaryl Carnitine(C5DC) | 0.5 | 0.33 | 0.03 | 10.1 | 0.96 | 0.14 | 14.8 |
| | 1.5 | 0.92 | 0.05 | 5.6 | 2.73 | 0.30 | 10.9 |
| Octanoyl Carnitine(C8) | 1.2 | 0.79 | 0.05 | 6.7 | 0.61 | 0.06 | 9.8 |
| | 3.1 | 2.15 | 0.11 | 5.3 | 1.79 | 0.24 | 13.5 |
| Decanoyl Carnitine(C10) | 0.6 | 0.94 | 0.05 | 5.4 | 0.57 | 0.11 | 19.4 |
| | 1.5 | 2.53 | 0.16 | 6.3 | 1.52 | 0.13 | 8.5 |
| Myristoyl Carnitine(C14) | 1.7 | 1.86 | 0.15 | 7.9 | 0.96 | 0.14 | 14.5 |
| | 4.8 | 4.10 | 0.29 | 7.0 | 3.32 | 0.33 | 10.4 |
| Steroyl Carnitine(C18) | 1.9 | 3.60 | 0.47 | 13.0 | 2.15 | 0.34 | 15.9 |
| | 4.5 | 5.57 | 0.51 | 9.2 | 3.69 | 0.53 | 14.3 |

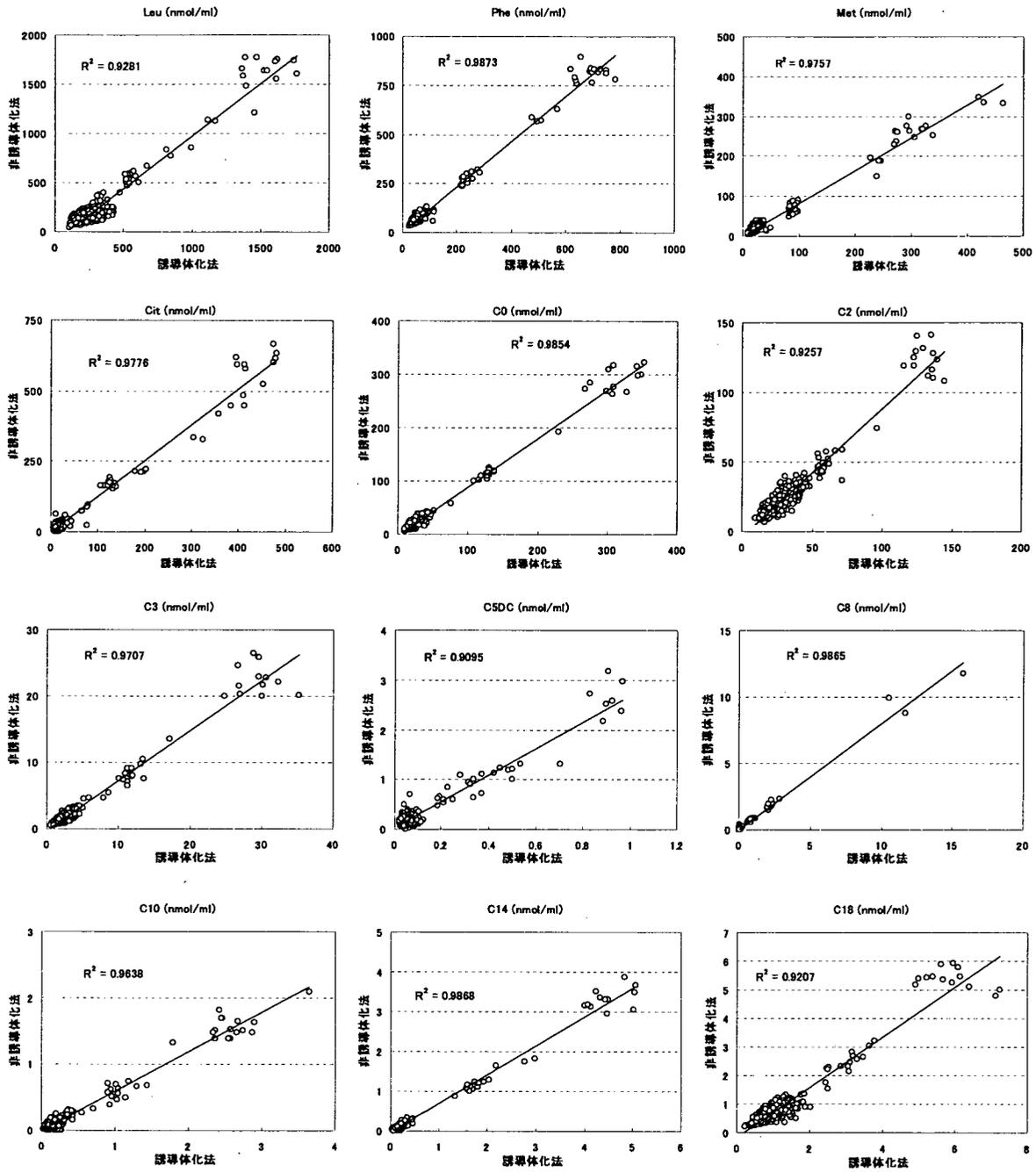


図 主な測定物質における誘導体化法と非誘導体化法の測定値の相関の様子

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の検討

東京地区におけるパイロットスタディの成績

－第 4 報－

研究要旨

我々の施設では、東京都の承認の下で平成 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、平成 19 年 12 月末までに 25,898 名の新生児をスクリーニングしたが現在までに患者は発見されていない。一方、ハイリスク症例では、171 例中 2 例の患児 (VB₁₂代謝障害による MMA 1、MCD 2) を発見した。今回は平成 19 年 4 月から 12 月までのスクリーニング成績をまとめるとともに、これまで使用してきた判定基準の見直しも行った。

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)

採血医療機関が、出生した新生児の保護者に研究の目的を説明し、保護者の同意が得られた場合には本研究の検査申込書に必要事項を記入してもらい、新生児ろ紙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へ送付する。協会では、この試験研究の検査申込書があるものに対してのみ、現行 6 疾患のスクリーニングに加えて、MS/MS による、尿素サイクル、有機酸、脂肪酸代謝異常症の検査を施行している。検査法は、市販の塩酸ブタノール試薬によるブチル誘導体化法で、内部標準物質には市販の MS/MS 用内部標準物質セット(CIL Set A + Set B)を使用した。MS/MS による分析は、アミノ酸、アシルカルニチンともに MRM モードで行った。使用した機器は MS/MS は Quattro micro API、その LC 部は Alliance2795 (ともに Waters 社)である。精度管理は、外部精度管理、内部精度管理のいずれも、米国 CDC の新生児スクリーニング精度管理プログラム(NSQAP)に登録し、分与されたろ紙血液を用いて行っている。

A. 研究目的

われわれ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、東京都の承認の下で本研究の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、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、平成 17 年 12 月から実施してきた。本年度の研究では、平成 19 年 4 月から 12 月末までに MS/MS による新生児スクリーニングを行った 11,195 例の成績を検討し、その有用性と問題点を明らかにするとともに、これまでに使用してきたカットオフ値の見直しも行い、スクリーニング精度の向上を図った。

B. 研究方法および対象

本年度は、平成 19 年 4 月から 12 月末までに都内で出生した新生児 74,693 人のうちの 11,195 名(15.0%)を本研究の対象とした。検査システムはこれまでと同様で、本研究について協力が得られた 16 の

(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

本研究について協力が得られた採血医療機関数

は、昨年度の14施設から16施設に増え平成19年4月から12月までのMS/MSで測定した新生児ろ紙血液の件数は11,195例であった。本研究の同意率は、昨年度実績より若干向上して95.4%となり、各医療機関ごとの検査同意率は、1施設を除いてほぼ100%だった。

測定した新生児ろ紙血液中のアミノ酸の平均値、range、およびカットオフ値を表1に示した。この表中で、アミノ酸が最大値を示したのは、Cit以外は同一症例で、再採血依頼時に死亡が確認された(死因は不明)。また、Cit高値例は、再採血検体では正常化していた。

MS/MSによる測定で、PKU、MSUD、HCUの診断マーカーであるPhe、Met、Leu+IleとVal値がカットオフ値を超えていた件数と、そのうち実際に再採血を依頼した件数を調査して比較した(表2)。われわれの施設では、これら3疾患の各疾患については、東京都内で出生し、ろ紙血液が送られてきたすべての新生児ろ紙血液のアミノ酸を分析しているHPLC法の測定結果に基づいて判定し、再採血を依頼している。PKUでは、MS/MSによるカットオフ値を超えた例と実際に再採血を依頼した症例はよく一致しており、MS/MSのPheのカットオフ値の設定は妥当であろうと思われた。また、HCUでは、現行のHPLC法のMet値よりもMS/MSのMet値がやや低めに測定されるため、現在カットオフ値も低め(50 μ mol/L)に設定しているが、検討の結果、カットオフ値を70~80 μ mol/L程度に設定することで、現行スクリーニングと同様な成績が得られると推測された。これらに対して、MSUDでは、Leu+Ile値にVal値を加味して判定した場合でも、HPLC法による判定に比較して偽陽性が多くなった。MS/MSでは、Leu+Ile値、Val値のカットオフ値を変更することで、再採血率を低下させることは出来るが、MSUDにおいては、Leu単独の値や、本疾患で見られるアロイソロイシンの有無をHPLCにて確認することが重要と考えられ、MS/MSでカットオフ値を超えた例については、HPLC法でも確認検査を行うことが重要と思われる。MSUDに対してHPLC法を併用するのであれば、PKUとHCUについてもHPLCで確認検査を行い、再採血依頼対象検体を絞ることで検査精度が向上すると考える。

次に、ろ紙血液中アシルカルニチン値の平均値、range、およびカットオフ値を表3、4に示した。各疾患のマーカーであるアシルカルニチンが異常高値を示した症例について、その最終判定に至るまでの経過を表5に示した。表5において、症例1は、C3はカットオフ値の1.5倍ほどの値を示したが、C3/C2比ならびにC3/C16比が低値であったため、再採血を依頼せずに正常と判定した。症例2は、C5がカットオフ値の2倍以上あったが抗生剤使用中と記載されていたため再採血とし、再検にカットオフ値未満の値を示したため正常と判定した。また、症例3では、C5OHの異常高値とともに他項目の低カルニチン状態も呈していたので、主治医に尿中有機酸分析の施行を勧めたが、主治医の判断で再採血となった。そして、再採血ろ紙血液検体を分析すると、初検時よりも値が低下していたものの、依然としてC5OH高値が持続していたので、尿中有機酸分析の施行を再度勧めた。その結果、千葉県こども病院の高柳正樹先生に尿中有機酸分析を行っていただき、異常な有機酸の排泄は認められないとのことだった。さらに、症例5は、MCAD疑いで再採血を依頼したが、再採血検体でC5OHが異常高値を示したため、もう一度採血を依頼した。その結果、同項目がさらに急上昇していた(低カルニチンは認められなかった)ため、医師へ至急に連絡し、尿中有機酸分析の施行を勧めた。

表6に平成19年度12月までのMS/MSによるスクリーニング成績を示した。初回採血検体を用いて行う確認検査検体185例のうち、実際に尿素サイクル、有機酸、脂肪酸代謝異常症を疑われて再採血を依頼した症例数は、それぞれ5例、25例、56例で、心疾患による大循環障害によると思われる症例1例を含めて複数のアシルカルニチンが異常上昇していた症例が3例(計89例)あり、今年度は現在のところ発見された患者はまだない。

次に、表7に再採血を依頼した症例の内訳を示したが、この中で、再採血依頼数が10例以上ある疾患(MMA・PA、GA II、MCAD)を中心に、各疾患の診断マーカーの現在の判定基準を見直した結果を表8に示した。これまで使用してきたカットオフ値は、本研究開始当初に福井大学の重松教授のご指導と、東京に先行して試験研究を開始していた札幌市衛生

研究所の基準を参考にして定めた。その設定値は出来る限り見逃しを減らす目的でやや低目の値であり、項目によってはこれを若干修正しながら、これまで運用してきた。しかしながら、現行の基準で再採血を依頼した症例のほとんど全てが、2回目に採血したろ紙血液を用いた検査で正常となっているため、偽陽性が多い疾患を中心に、判定基準の見直しが必要となった。とくに、MMA・PA、GA II、MCADにおいては、カットオフ値を変更せずに判定法(複数のマーカーを組み合わせる)を変更することで、3疾患あわせて42例の偽陽性を減少させることが可能であったが、これらの疾患を含めて、先日、重松教授からいただいた最新の判定基準をもとに、あらためて判定すると、実に61例の偽陽性を除くことができ、新基準を用いた際の再採血依頼数は40例(0.38%)となった。しかし、IVAでは、既報[1]のように抗生剤の影響によって偽陽性が生じることが明らかであり、実際に今年度に再採血を依頼した7例のうち4例が抗生剤を使用している(薬剤名不明)ことがわかっており、現在のカットオフ値を低目に変更することは、現状では難しいと思われた。また、CRNTでは、現行のカットオフ値が低目であるために再採血依頼数がわずか1例しかなかった。このカットオフ値を上げることによって、再採血対象者が大幅に増えることが予測される。

一方、新生児のスクリーニングの他にハイリスクの児でMS/MSによる検査を依頼された例では、平成19年度の12月までに171例の検査を行い、その中からVB12代謝障害によるホモシスチン尿症をともなったMMAを1例、MCDを2例(ビオチンダーゼ欠損症1例、二次性ビオチン欠乏症1例)を発見した。また、東京以外の地区で出生した児で、出生8ヶ月後にMMA(ムターゼ欠損)と診断がついた症例の初検のろ紙血液を分析したところ、C3/C2比のみ高値(0.46)で陽性となった。したがって本症例は、MS/MSによる新生児スクリーニングを行っていれば、より早期に診断・治療を開始できたものと思われる。

E. 結論

2007年4月から12月までに11,195件の新生児をスクリーニングしたが、これまでに患者は発見されていない。ハイリスク症例では、MMA 1例とMCD 2例

を発見した。現行のアミノ酸代謝異常症3疾患では、偽陽性を減少させるためにはMS/MSでカットオフ値を超えたものについてHPLC法で確認した後に再採血を依頼することが重要と考える。一方、尿素サイクル、有機酸、脂肪酸代謝異常症では、MMA・PA、GA II、MCADのように、これまでの判定基準では偽陽性が多く存在する疾患もあることがわかったので、重松教授のご指導の下で判定基準を見直し、偽陽性を減少させることが出来る新基準を定めた。今後さらに検査例数を増やしてスクリーニング精度向上のため検討を重ねたい。

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

飯野病院

大森赤十字病院

葛飾赤十字産院

杏林大学病院

順天堂医院

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

東邦大学医療センター大森病院

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

16施設に深謝いたします。

(五十音順)

F. 引用文献

[1] 北川照男、石毛信之 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—東京都におけるパイロット研究 第3報—厚生労働科学研究費補助金(こども家庭総合研究事業)平成18年度総括・分担研究報告書,92-98,2007.

G. 研究発表

原著・論文

1. OToya Ohashi, Mio Sakuma, Teruo Kitagawa, et al: Influence of antibody formation on reduction of globotriaosyl-ceramide(GL-3) in urine from Fabry patients during agalsidase beta therapy. Mol Genet Metab 92: 271-273, 2007
2. 北川照男: Fanconi 型腎性くる病を伴う肝腎型高チロジン血症をめぐって. 小児内科, 39: 1421-1429, 2007.
3. 北川照男: 糖尿病と私 —学童糖尿病検診の経験から—「肥満と糖尿病」, 6:533-536, 2007
4. 鈴木健, 笹島薫, 大和田操, 他: 尿によるウィルソン病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, 17(1):21-26, 2007.
6. 石毛信之, 原淳, 穴澤昭, 鈴木健, 大和田操, 北川照男: MS/MS を用いた複数のマススクリーニングシステムへの対応. 第 32 回日本医用マススペクトル学会 p35, 2007
7. K. Suzuki, N. Ishige, A. Anazawa, et al: Diagnosis of α -L-iduronidase deficiency and lysosomal acid α -glucosidase deficiency using dried blood spots on filter paper based on the methods by Nestor Chamoles. International Symposium of Lysosomal Storage Disease p30, 2007
8. T. Kitagawa, K. Suzuki, N. Ishige, et al: Utility of combining methods measure urinary α -galactosidase A protein and globotriaosylceramide as a non-invasive high risk screening tool for Fabry disease hemizygote and heterozygote. International Symposium of Lysosomal Storage Disease p37, 2007

学会発表

1. 北川照男: 欧米で検討されている新しい対象疾患. 第 110 回日本小児科学会学術集会 111(2):292, 2007.
2. 新宅治夫, 大和田操, 山野恒一, 他: テトラヒドロピオプテリン反応性軽症フェニルケトン尿症の診断と日本における頻度
3. 新宅治夫, 大浦敏博, 小山田美香, 他: テトラヒドロピオプテリン反応性軽症フェニルケトン尿症の長期治療. 第 110 回日本小児科学会学術集会 111(2):291, 2007.
4. 石毛信之, 鈴木健, 大和田操, 他: 尿 α ガラクトシダーゼ A タンパクとグロトリアオシルセラミド測定によるファブリー病ハイリスク・スクリーニングに関する研究. 第 34 回日本マス・スクリーニング学会 17(2):60, 2007.
5. 鈴木健, 石毛信之, 大和田操, 他: 新生児濾紙血を用いた 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside 法によるグリコーゲン蓄積症 II 型 (ポンペ病) スクリーニング法の検討. 第 34 回日本マス・スクリーニング学会 17(2):60, 2007.

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)
(H19年度 4月~12月, n=11,195)

| 対象疾患名 | 測定項目 | 測定平均 | | range | | cut off |
|-------------|-------------|-------|------|-------|--------|-----------|
| | | mean | SD | min | max | |
| メーブルシロップ尿症 | Val | 122.6 | 30.2 | 23.3 | 472.7 | 200 |
| | Leu+Ile | 203.2 | 47.2 | 54.4 | 786.6 | 300 |
| ホモシスチン尿症 | Met | 25.4 | 6.5 | 5.3 | 332.9 | 50 |
| フェニルケトン尿症 | Phe | 48.9 | 15.8 | 15.9 | 1246.8 | 120 |
| アルギニン血症 | Arg | 11.5 | 5.5 | 1.6 | 222.3 | 70 |
| シトルリン血症 | Cit | 12.0 | 4.3 | 2.8 | 171.0 | 40 |
| アルギニノコハク酸尿症 | ASA (ピーク高さ) | 769 | 283 | 177 | 19400 | mean × 10 |

表2 血中アミノ酸値が MS/MS で cut off 値を超えていた件数と HPLC 法によって再採血を依頼した件数の比較

| 対象疾患 | MS/MSでカットオフ値を超えた数 | HPLCで測定して再採血依頼した数* | 直接精査* |
|------------|-------------------|--------------------|-------|
| アミノ酸** PKU | 13 | 9 | 1 |
| MSUD | 29 | 2 | 2 |
| HCU | 14 | 3 | 1 |

*: MS/MS のカットオフ値を超え、かつ、HPLC のカットオフ値を超えて再採血または精査を依頼した症例数。

** : これらの3疾患は実際には HPLC による検査結果で再採血を依頼しているので、MS/MS の再採血依頼数に含まれていない。

表3 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)

| 対象疾患名 | 測定項目 | 測定平均 | | range | | cut off |
|---------------|--------|------|------|-------|------|---------|
| | | mean | SD | min | max | |
| PA, MMA | C3 | 1683 | 681 | 63 | 7500 | 5,000 |
| | C3/C2 | 0.07 | 0.02 | 0.02 | 0.27 | 0.20 |
| | C3/C16 | 0.77 | 0.35 | 0.07 | 5.31 | 5.00 |
| IVA | C5 | 148 | 82.4 | 23 | 2289 | 1,000 |
| 3-KT | C5:1 | 12.7 | 5.4 | 1.0 | 80.0 | 90 |
| GA I | C5DC | 50 | 18 | 9 | 223 | 200 |
| MCD, HC, 3MCC | C5OH | 130 | 41 | 45 | 1265 | 460 |

表 4 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)

| 対象疾患名 | 測定項目 | 測定平均 | | range | | cut off |
|----------------|----------------|--------|-------|-------|---------|---------|
| | | mean | SD | min | max | |
| CRNT | C0 | 27,848 | 9,119 | 6,172 | 117,000 | < 7,000 |
| MCAD | C8 | 67 | 29 | 7 | 860 | 270 |
| | C8/C10 | 0.56 | 0.17 | 0.09 | 4.42 | 1.50 |
| GA II | C10 | 124 | 60 | 10 | 1,009 | 500 |
| VLCAD | C14:1 | 107 | 46 | 12 | 543 | 400 |
| CPT- I | C0/(C16+C18) | 9.59 | 4.69 | 2.75 | 71.80 | 100 |
| | C0/(C16+C18:1) | 8.00 | 3.47 | 2.66 | 46.36 | 100 |
| CPT- II, TRANS | C16 | 2,352 | 827 | 182 | 7,920 | 6,500 |
| | C18 | 839 | 264 | 88 | 2,247 | 2,500 |
| | C18:1 | 1,464 | 388 | 179 | 3,400 | 3,000 |
| | (C16+C18)/C2 | 0.14 | 0.04 | 0.02 | 0.66 | 0.62 |
| TFP/LCHAD | C16OH | 18.3 | 6.1 | 1.3 | 80.8 | 50 |
| | C18:1OH | 17.3 | 4.9 | 0.2 | 63.0 | 50 |

表 5 異常高値を示した症例の最終判定までの経過

| 症例No. | 出生体重 (g) | 対象疾患 | 測定項目 | cut off値 | 初検 | | 再採血 | | 再々採血 | | 最終判定 | 備考 |
|-------|----------|-------|----------------------|---------------------|---------------------|------------|---------------------|----------------|------|----------------|------|---------|
| | | | | | 測定値 | 判定 | 測定値 | 判定 | 測定値 | 判定 | | |
| 1 | 3,678 | MMA | C3 C3/C2 | 5,000 0.20 | 7,500 0.15 | 正常 | | | | | 正常 | |
| 2 | 2,884 | IVA | C5 | 1,000 | 2,289 | 再採血 | 340 | 正常 | | | | 抗生剤使用 |
| 3 | 549 | MCD | C5OH | 460 | 1,265 | 精査 →再採血 | 789 | 精査 →尿中有機酸分析 | | | 正常 | 有機酸排泄正常 |
| 4 | 460 | 非特異上昇 | C5 C5DC C8 | 1,000 200 270 | 1,298 223 860 | 再採血 | (未回収) | | | | | |
| 5 | 518 | MCAD | C8 C8/C10 C5OH | 270 1.50 460 | 373 4.42 346 | 再採血 | 82 1.90 1,020 | MCD疑いで再々採血 | | 精査 →尿中有機酸分析 | | |
| 6 | 2,638 | GA II | C8 C10 | 270 500 | 543 1,009 | 再採血 | 67 131 | 正常 | | | 正常 | |

表6 平成19年度のパイロットスクリーニングの成績 (平成19年4月~12月)

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| ● 検査数 | 11,195 |
| ● 確認検査数 | 185/11,195 (1.7%) |
| アミノ酸代謝異常症 (PKU,MSUD,HCU) | 31/185 (16.8) |
| 尿素サイクル異常症 (Cit高値) | 10/185 (5.4) |
| 有機酸代謝異常症 | 49/185 (26.5) |
| 脂肪酸代謝異常症 | 91/185 (49.2) |
| 汎アシルカルニチン上昇 | 4/185 (2.2) |
| ● 再採血依頼 (有機酸・脂肪酸代謝、尿素サイクル異常症) | 89/11,195 (0.79) |
| ● 再々採血依頼 (再採血依頼から) | 9/11,195 (0.08) |
| ● フォロー症例数 (再々採血依頼から) | 6/11,195 (0.05) |
| ● 患者 | 0 |

表7 尿素サイクル、有機酸・脂肪酸代謝異常症で再採血依頼した89件の内訳

| 対象疾患 | | 再 (%) | 備考 |
|-------------|-----------|---------------|--------------------|
| 尿素サイクル | Cit | 5 (5.6) | |
| 有機酸 | MCD | 6 (6.7) | |
| | IVA/抗生剤 | 7 (7.9) | 抗生剤使用例 4 |
| | MMA, PA | 12 (13.5) | |
| 脂肪酸 | CRNT | 1 (1.1) | |
| | GA II | 22 (24.7) | |
| | MCAD | 21 (23.6) | MCTミルクの使用を確認できた例 1 |
| | VLCAD | 3 (3.4) | |
| | CTP-II | 2 (2.2) | |
| | TFP/LCHAD | 7 (7.9) | |
| 汎アシルカルニチン上昇 | 3 (3.4) | 心疾患による大循環障害 1 | |
| 計 | | 89 | |

表 8 尿素サイクル、有機酸・脂肪酸代謝異常症の再検討後の判定基準とその新基準を超える件数

| 対象疾患 | 判定基準 | | 新基準を超える件数 | |
|----------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|----|
| | 現行 | 検討後 | | |
| 尿素サイクル | シトルリン血症 | Cit > 40 (μmol/L) | Cit > 100 | 1 |
| 有機酸 | MCD | C5OH > 460 (nmol/L) | C5OH > 1,000 | 1 |
| | IVA/抗生剤 | C5 > 1,000 | 変更なし | 7 |
| | MMA, PA | C3/C2 > 0.20 | C3/C2 > 0.25 かつ C3 > 3,500 | 2 |
| 脂肪酸 | CRNT | C0 < 7,000 (nmol/L) | C0 < 9,000 | 13 |
| | GA II | C10 > 500 | C10 > 400 かつ C8 > 300 | 6 |
| | MCAD | C8/C10 > 1.5 | C8/C10 > 0.10 かつ C8 > 300 | 3 |
| | VLCAD | C14:1 > 400 | 変更なし | 3 |
| | CTP-II | C16 > 6,500 または C18 > 2,500 | C18:1 > 3,000 かつ C16 > 6,500 | 1 |
| | TFP/LCHAD | C16OH > 50 または C18:1OH > 50 | C16OH > 50 かつ C18:1OH > 50 | 0 |
| 汎アシルカルニチン上昇 | | | 3 | |
| 計 (新基準による再採血率) | | | 40 (0.38) | |

表 9 平成 19 年度 4 月から 12 月のハイリスク症例の検査成績

| | | | |
|------------------------------|-----------------------------|--------|-------|
| ● 検査数 | 171 | | |
| ● 患者 | 3 | | |
| | MSMSIにおける診断マーカーと測定値(nmol/L) | | |
| VB12代謝障害によるホモシスチン尿症をともなったMMA | 1 | C3 | 7,826 |
| | | C3/C2 | 1.18 |
| | | C3/C16 | 16.75 |
| ビオチンダーゼ欠損症 | 1 | C5OH | 2,952 |
| 二次性ビオチン欠乏症 | 1 | 低カルニチン | |
| | | C5OH | 3,631 |
| | | 低カルニチン | |

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の検討

非誘導体化タンデムマス分析における専用キットと自家調製試薬の検討

研究要旨

大阪府では、平成 19 年 4 月より先天性代謝異常症スクリーニングの検査機器を、従来使用していた高速液体クロマトグラフィ（HPLC）に代えてタンデムマス（LC/MS/MS）を導入し、希望者には有機酸・脂肪酸代謝異常症のパイロットスタディを開始した。新生児スクリーニングのように多量検体を迅速に正確に処理することが望まれる分析では、特に操作が簡便で安定した手法が望ましく、われわれは前処理に誘導体化を行わない方法（以下非誘導体化法と表記）を検討し、これを採用してきた。このたび、マススクリーニング用非誘導体化試薬（専用キットと表記）がキット化され、入手可能となったので、同じ非誘導体化自家調整試薬と比較検討を行った。

研究協力者

稲岡一考、竹島清美、中村しのぶ、
宮城晶子、入江明美、宮道 徹、
山田 穰、中山 雅弘、和田 芳直

（地方独立行政法人

大阪府立母子保健総合医療センター）

重松 陽介

（福井大学医学部 看護学科・小児科）

ンデムマスのように、最適条件を得るために設定するパラメータが多く、検査施設間の検査法の標準化が困難に思われる分析法では、品質保証の範疇としての標準術式が示される効果も大きい。

本研究の目的は、わが国に導入が始まったばかりのタンデムマスを用いた新生児スクリーニングの分析試薬の選択肢として、「専用キット」と「自家調製試薬」の比較検討を行うものである。

A. 研究目的

わが国では、日本公衆衛生協会新生児スクリーニング研究開発センターを中心とした精度管理システムが世界に先駆けて効果を上げており、「日本マススクリーニング学会」や「本研究班」においても検査の精度保障に関する様々な新しい取り組みが報告されている。しかし、新しいスクリーニング項目の導入時期には、開発当時の研究的要素が強く残るため「試薬の品質保証」システムの確立が遅れる傾向にある。そのため、品質管理された専用試薬が、この時期に試薬メーカーからキット化され入手可能となったことは、検査データの品質保障において意味がある。また、タ

B. 研究方法

使用した分析装置は、試料導入部に Prominence HPLC(島津製作所)を結合した API-3200 LC/MS/MS (Applied Biosystems)で、検討法（専用キット）・対象法（自家調整試薬）ともに前処理にブチルエステル化を行わない非誘導体化法による分析を行った。自家調整試薬を用いたこの分析法の評価については、すでに「厚生労働科学研究（平成 17・18 年度）」、「日本マススクリーニング学会（第 30 回・第 32 回）」、「日本医用マススペクトル学会（第 33 回・第 34 回）」において報告を行っている。

検体は、直径 3 mm のディスクにパンチした乾燥

血液濾紙（全血量 2.68 μ l 換算）である。既知検体としては、CDC(Center for Disease Control and Prevention)および専用キット添付管理検体、未知検体としては、保護者の同意の得られた新生児スクリーニング用検体を使用した。

自家調整試薬と専用キットの前処理法を図 1a、図 1b に示す。われわれの質量分析メソッドは、疾患のモニターのために NL 分析(neutral loss scan)、PS 分析(precursor ion scan)、定量のために MRM 分析(Multiple reaction Monitoring)と 3 種類の分析を行ない、スキャン回数に制限が生じるため、ピークパーキング技法を用いて有効にイオン導入を行っている。一方、専用キット指定の標準メソッドでは、定量のための MRM モードのみで分析を行い、スキャン回数を稼ぐことで、移動相流速を一定にした単純な分析メソッドが利用可能となっている。

（倫理面への配慮）

タンデムマスを用いた新生児スクリーニングおよび新しいスクリーニングのパイロットスタディは、大阪府立母子保健総合医療センター倫理委員会、大阪府先天性代謝異常等検査運営協議会の承認を得て実施されている。また、新生児検体については、今回の検討のために新たに採血を行ったものではなく、保護者の同意の得られたスクリーニング検体を用いており、かつ個人を特定することが可能な情報は一切利用していない。

C. 研究結果

非誘導体化法は、一般的に行われているブチルエステル誘導体化法に比べて操作の少ないことが、ひとつの特徴であるが、検討に用いた専用キットでは、より一層操作が簡略化されており、固定、遠心、上清分取にかかわる前処理時間を、おおよそ 90 分程度短縮することができる。

アミノ酸・アシルカルニチンに関する質量分析計の設定パラメーター一覧を（表 1・表 2）に示す。親イオン「Q1」、フラグメントイオン「Q3」の設定質量は、基本的にアミノ酸で「 $m/z=46.1$ 」のニュートラルロス、アシルカルニチンで「 $m/z=85.1$ 」

のプリカサーイオンを指標とするが、類似イオンペアを持つ物質が存在する場合には、あえてイオン強度を犠牲にして特徴的な他のプロダクトイオンの組み合わせを用いる。このような特殊な物質のうち、「Arg」、「Cit」、「Orn」、「Free Carnitine(C0)」については、両メソッドで異なった「Q3」イオン設定になっており、ふさわしいイオンペア選択に検討の余地がある。

調製後の内部標準物質の濃度レベルの違いは、最終的に各ウェルへの分注量（自家調整試薬：100 μ l、専用キット：190 μ l）で相補されるので、両試薬ともほぼ同じレベルの濃度となる。

CDC の管理検体を用いた同時再現性の確認では、自家調製試薬、専用試薬ともに C.V.=9%以内 ($n=10$) の良好な再現性が得られている（表 3、表 4）。なお、表中にある「Factor 値」は、「測定値/表示値」を意味し、アミノ酸の一部の分析でこの値は 1.0 以上、すなわち表示値より大きい濃度換算値が得られおり、何らかの問題の存在が示唆された。アシルカルニチンの分析では、「Factor」は、全体にほぼ 1.0 を示しており、濃度換算値と理論値の間に乖離は認められなかった。

一方、キット添付の内部精度管理検体を用いた同じ検討（表 5、表 6、表 7、表 8）では、アミノ酸・アシルカルニチンともに理論値と濃度換算値から計算される「Factor」値は、おおよそ 1.0 であり、再現性についても良好に分析されていた。

プレート間再現性についても検討を行なったが、その再現性も良好な結果（表 9）が得られており、両試薬ともに大きな問題はない。

次に、実際の新生児スクリーニング検体を利用して、自家調製試薬と専用試薬間の測定値の相関関係を確認した。図 2 には、多くの分析項目のうち「Phe」の処理結果を示し、その他の項目については、相関係数を一覧表（表 10）にまとめた。低濃度域に分布する正常検体においても両試薬間に良好な相関係数 0.8~0.9 が得られている。

D. 考察

専用キット・自家調整試薬ともに一部のアミノ

酸において、CDC 管理検体の濃度換算値が、表示値より高値であったが、「Leu」に関しては、同じ質量を持つ「Ile」の影響を考慮する必要がある。事実、CDC の管理検体は「Ile」を含み、専用キット添付管理検体はこれを含まないため、検討結果に差が生じたと考えられる。誘導体化法ではブチルエステル化されにくい「Ile」の影響は小さい。しかし、その誘導体化率は不安定で、誘導体化法の同時再現性に影響を与えている。

次に、専用キットの評価結果をまとめた。

【長所】

- ① 自家調製試薬同等の良好な再現性が得られた。
- ② 簡便な非誘導体化法の試薬でありながら、より一層操作が簡略化され、省力化および処理時間の短縮に効果が望める。
- ③ より多種類の内部標準物質が用意されているので、測定値の安定化が期待できる。
- ④ 試薬の品質が保障されているため、精度管理面で優位性がある。
- ⑤ 精度保障の対象となる標準法が示されるため、施設間の検査法統一化に効果が期待できる。

【短所】

- ⑥ 検査法に創意工夫を講じにくい。
- ⑦ 検査項目追加などの変更に迅速に対応できない可能性がある。
- ⑧ 試薬コストの増加が懸念される。

E. 結論

タンデムマスを用いた新生児スクリーニングは、まだ導入段階にあり、対象疾患の増減や新しい分析技術の開発が予想される。このような変化に迅速に対応でき、わが国のスクリーニングコストに合致できれば、新生児スクリーニングの検査薬の有効な選択肢になりえると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 参考文献

1. 平成 16 年度厚生労働科学研究「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（主任研究者：山口清次）、2005

2. 平成 17 年度厚生労働科学研究「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（主任研究者：山口清次）、2006

3. 平成 18 年度厚生労働科学研究「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（主任研究者：山口清次）、2007

4. Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, Tajima T, Yamaguchi S. Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J Chromatogr B*, 776 (2002) 39-48.

5. Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M. Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry : difficulties in practical discrimination . *J Chromatogr B*, 792 (2003) 63-72.

6. Nagy K, Takats Z, Pollreisz F, Szabo T, Vekey K. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17: 983-990

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

- 【自家調製試薬】
- ①検体パンチ(平底プレート)
 - ②ヘモグロビン固定 60分
メソール:アセトン:H₂O=7:7:2
 - ③抽出(100倍希釈内部標準液 100μl)
室温 30分 振盪
 - ④遠心 2500rpm 10min
 - ⑤上清を別プレート(V底)に分取
 - ⑥タンデムマス分析
インジェクション量 10μl
MeCN:MeOH:H₂O+酸
流速可変 0.60~0.05ml/min
PS, NL, MRM分析
分析時間 1.5min(14scan)

図1a. 自家調製試薬術式

- 【専用キット】
- ①検体パンチ(専用マイクロプレート)
 - ②抽出(200倍希釈内部標準液 190μl)
37℃ 30分 振盪
 - ③タンデムマス分析
インジェクション量 30μl
MeCN:H₂O+酸
流速一定 0.10ml/min
MRM分析
分析時間 1.5min (22scan)

図1b. 専用キット術式

表1. 分析条件 I (Amino Acids)

| | 自家調製試薬 | | | | 専用試薬 | | | |
|-----|-----------|-----------|----------------|---------|-----------|-----------|----------------|---------|
| | Q1 m/z | Q3 m/z | 分注量/well μl | μmol/ml | Q1 m/z | Q3 m/z | 分注量/well μl | μmol/ml |
| Ala | 90.1 | 44 | 4.94 | 100 | 90 | 44 | 2.44 | 190 |
| Phe | 166.2 | 120.1 | 4.83 | 100 | 166.2 | 120.1 | 2.45 | 190 |
| Leu | 132.2 | 86.1 | 4.93 | 100 | 132.2 | 86.1 | 2.46 | 190 |
| Val | 118.1 | 72.1 | 5.18 | 100 | 118.1 | 72.1 | 2.43 | 190 |
| Arg | 175.2 | 70.1 | 6.20 | 100 | 175.2 | 70.1 | 2.54 | 190 |
| Ca | 176.2 | 159.1 | 4.95 | 100 | 176.2 | 113.1 | 2.82 | 190 |
| Tyr | 182.2 | 136.1 | 4.99 | 100 | 182.2 | 136.1 | 2.51 | 190 |
| Orn | 133.2 | 70.1 | 4.87 | 100 | 133.2 | 70.1 | 2.56 | 190 |
| Met | 150.2 | 104.1 | 4.71 | 100 | 150.2 | 104.1 | 2.44 | 190 |
| Gly | (76) | (30) | 24.89 | 100 | 76 | 30 | 12.29 | 190 |

表2. 分析条件 II. (Acylcarnines)

| 物質 | 自家調製試薬 | | | | 専用キット | | | |
|-----|-----------|-----------|----------------|---------|-----------|-----------|----------------|---------|
| | Q1 m/z | Q3 m/z | 分注量/well μl | μmol/ml | Q1 m/z | Q2 m/z | 分注量/well μl | μmol/ml |
| C0 | 162.2 | 85 | 1.687 | 100 | 162.2 | 103.1 | 0.586 | 190 |
| C2 | 204.3 | 85 | 0.405 | 100 | 204.3 | 85 | 0.109 | 190 |
| C3 | 218.3 | 85 | 0.081 | 100 | 218.3 | 85 | 0.066 | 190 |
| C4 | 232.3 | 85 | 0.080 | 100 | 232.3 | 85 | 0.043 | 190 |
| C5 | 246.3 | 85 | 0.080 | 100 | | | | |
| C6 | | | | | 260.3 | 85 | 0.032 | 190 |
| C8 | 288.3 | 85 | 0.079 | 100 | 288.3 | 85 | 0.040 | 190 |
| C10 | | | | | 316.3 | 85 | 0.038 | 190 |
| C12 | | | | | 344.4 | 85 | 0.076 | 190 |
| C14 | 372.4 | 85 | 0.079 | 100 | 372.4 | 85 | 0.048 | 190 |
| C16 | 400.4 | 85 | 0.166 | 100 | 400.4 | 85 | 0.075 | 190 |
| C18 | | | | | 428.4 | 85 | 0.068 | 190 |

表3. 同時再現性 I (Amino Acids) CDC622 n=10

| 物質名 | Val | Leu | Met | Phe | Ca | Tyr |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 表示値 | 186.4 | 431.8 | 100.0 | 259.0 | 62.5 | 186.8 |
| Factor | 1.70 | 1.24 | 1.15 | 1.11 | 2.03 | 1.37 |
| Average | 318.6 | 538.6 | 115.3 | 288.1 | 127.7 | 258.0 |
| S.D. | 27.06 | 48.30 | 7.85 | 25.88 | 8.96 | 17.34 |
| C.V. | 8.49 | 8.97 | 6.80 | 8.98 | 7.02 | 6.72 |
| MAX | 356.2 | 602.0 | 129.2 | 324.6 | 145.4 | 285.4 |
| Min | 283.0 | 478.3 | 105.9 | 250.7 | 115.6 | 235.6 |
| Range | 73.2 | 123.8 | 23.3 | 74.0 | 29.8 | 49.8 |
| Factor | 2.02 | 1.32 | 0.85 | 1.09 | 2.03 | 1.17 |
| Average | 379.2 | 573.6 | 85.6 | 283.2 | 127.4 | 219.3 |
| S.D. | 10.87 | 22.20 | 3.44 | 9.32 | 6.55 | 8.65 |
| C.V. | 2.87 | 3.87 | 4.02 | 3.29 | 5.14 | 3.94 |
| MAX | 390.4 | 606.4 | 90.2 | 295.0 | 136.7 | 233.0 |
| Min | 361.1 | 536.1 | 80.1 | 270.9 | 117.9 | 208.5 |
| Range | 29.3 | 70.2 | 10.0 | 24.1 | 18.8 | 24.5 |

表4. 同時再現性 II (Acylcarnitines) CDC662 n=10

| 物質名 | C0 | C2 | C3 | C4 | C5 | C8 | C6 | C10 | C14 | C16 | C18 |
|---------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| 表示値 | 145.8 | 42.3 | 4.70 | 1.18 | 0.58 | 0.48 | 0.59 | 0.41 | 0.82 | 4.30 | 1.80 |
| Factor | 1.07 | 1.19 | 1.05 | 1.08 | 1.14 | 1.08 | 1.13 | 1.02 | 1.24 | 1.22 | 1.04 |
| Average | 156.2 | 50.4 | 4.9 | 1.28 | 0.88 | 0.52 | 0.87 | 0.42 | 0.77 | 5.25 | 1.87 |
| S.D. | 11.82 | 3.52 | 0.35 | 0.10 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.03 | 0.08 | 0.42 | 0.17 |
| C.V. | 7.63 | 8.98 | 7.15 | 7.55 | 5.92 | 7.76 | 7.32 | 7.70 | 7.33 | 7.96 | 9.23 |
| Max | 176.2 | 55.9 | 5.8 | 1.38 | 0.71 | 0.58 | 0.76 | 0.47 | 0.88 | 6.06 | 2.14 |
| Min | 140.4 | 45.0 | 4.5 | 1.13 | 0.59 | 0.48 | 0.58 | 0.37 | 0.69 | 4.54 | 1.57 |
| Range | 35.8 | 10.9 | 1.0 | 0.28 | 0.12 | 0.10 | 0.18 | 0.10 | 0.19 | 1.54 | 0.57 |
| Factor | 0.88 | 1.33 | 1.04 | 1.06 | 0.95 | 1.08 | 0.97 | 0.96 | 0.83 | 1.18 | 0.96 |
| Average | 98.3 | 56.0 | 4.9 | 1.25 | 0.55 | 0.51 | 0.57 | 0.39 | 0.39 | 5.08 | 1.72 |
| S.D. | 5.31 | 2.54 | 0.21 | 0.08 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.03 | 0.27 | 0.10 |
| C.V. | 5.40 | 4.52 | 4.36 | 6.51 | 9.01 | 9.34 | 8.55 | 11.24 | 8.82 | 5.24 | 5.84 |
| Max | 100.3 | 60.5 | 5.4 | 1.37 | 0.83 | 0.81 | 0.83 | 0.48 | 0.44 | 5.80 | 1.89 |
| Min | 91.8 | 53.3 | 4.7 | 1.09 | 0.49 | 0.48 | 0.51 | 0.33 | 0.35 | 4.73 | 1.59 |
| Range | 14.8 | 7.2 | 0.7 | 0.29 | 0.14 | 0.18 | 0.12 | 0.13 | 0.09 | 0.87 | 0.30 |

表5. 同時再現性 III (Amino Acids) P社Low n=10

| 物質名 | Ala | Val | Leu | Met | Phe | Ca | Tyr |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 表示値 μmol/ml | 571.0 | 337.0 | 541.0 | 89.0 | 293.0 | 228.0 | 455.0 |
| Factor | 0.93 | 1.23 | 1.00 | 1.25 | 0.72 | 1.00 | 0.94 |
| Average | 532.5 | 415.2 | 543.4 | 111.3 | 210.4 | 228.4 | 429.2 |
| S.D. | 32.79 | 26.01 | 42.53 | 6.71 | 14.98 | 6.06 | 20.12 |
| C.V. | 6.16 | 6.26 | 7.83 | 6.03 | 7.12 | 3.53 | 4.69 |
| Max | 584.2 | 469.6 | 610.8 | 123.0 | 239.8 | 241.3 | 468.8 |
| Min | 485.9 | 383.4 | 488.9 | 99.3 | 190.3 | 218.6 | 404.6 |
| Range | 88.4 | 86.2 | 121.8 | 23.7 | 49.5 | 22.7 | 64.2 |
| Factor | 1.02 | 1.57 | 1.16 | 0.96 | 0.74 | 1.05 | 0.83 |
| Average | 580.9 | 530.6 | 627.4 | 85.6 | 216.3 | 240.5 | 379.4 |
| S.D. | 38.27 | 31.88 | 41.65 | 3.95 | 13.07 | 18.05 | 23.89 |
| C.V. | 6.59 | 6.01 | 6.64 | 4.61 | 6.04 | 7.50 | 6.24 |
| Max | 634.7 | 588.3 | 708.9 | 93.0 | 241.2 | 276.9 | 411.6 |
| Min | 538.4 | 490.2 | 581.2 | 80.3 | 201.1 | 221.2 | 345.9 |
| Range | 96.3 | 98.2 | 127.8 | 12.7 | 40.1 | 55.7 | 65.6 |

表6. 同時再現性IV (Acylcarnitines) P社Low n=10

| 物質名 | C0 | C2 | C3 | C4 | C6 | C8 | C10 | C12 | C14 | C16 | C18 |
|------------------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|-------|------|
| 標準値 μ mol/ml | 148.2 | 81.0 | 12.9 | 3.82 | 0.82 | 0.84 | 0.48 | 1.98 | 1.38 | 13.86 | 2.02 |
| Factor | 1.18 | 0.99 | 1.01 | 1.23 | 1.38 | 1.35 | 1.44 | 1.18 | 1.82 | 1.13 | 1.17 |
| Average | 188.4 | 96.7 | 12.1 | 3.72 | 1.07 | 0.73 | 0.88 | 2.30 | 2.65 | 16.23 | 2.37 |
| S.D. | 10.82 | 2.80 | 0.76 | 0.23 | 0.13 | 0.07 | 0.07 | 0.23 | 0.36 | 1.13 | 0.14 |
| C.V. | 6.37 | 3.12 | 6.30 | 6.20 | 12.32 | 9.89 | 11.84 | 8.53 | 9.18 | 7.28 | 5.98 |
| Max | 188.0 | 84.8 | 13.1 | 3.97 | 1.20 | 0.83 | 0.75 | 2.78 | 2.98 | 17.28 | 2.66 |
| Min | 152.2 | 66.3 | 11.1 | 3.25 | 0.91 | 0.62 | 0.96 | 2.01 | 2.35 | 13.76 | 2.20 |
| Range | 33.8 | 8.6 | 2.1 | 0.72 | 0.29 | 0.22 | 0.19 | 0.74 | 0.64 | 3.66 | 0.46 |
| Factor | 0.74 | 1.10 | 1.83 | 1.12 | 1.19 | 1.14 | 1.22 | 1.08 | 0.87 | 1.07 | 1.10 |
| Average | 102.8 | 86.1 | 12.3 | 3.38 | 0.98 | 0.81 | 0.88 | 2.10 | 1.33 | 14.62 | 2.22 |
| S.D. | 3.88 | 2.88 | 0.89 | 0.13 | 0.08 | 0.06 | 0.05 | 0.07 | 0.08 | 0.86 | 0.13 |
| C.V. | 3.52 | 3.31 | 7.25 | 3.82 | 7.88 | 8.47 | 8.64 | 3.18 | 2.74 | 3.88 | 6.88 |
| Max | 108.1 | 83.1 | 12.4 | 3.81 | 1.08 | 0.68 | 0.63 | 2.23 | 1.47 | 18.28 | 2.39 |
| Min | 88.6 | 83.2 | 10.9 | 3.28 | 0.88 | 0.84 | 0.47 | 1.88 | 1.25 | 13.89 | 1.99 |
| Range | 9.5 | 0.9 | 2.8 | 0.33 | 0.22 | 0.18 | 0.16 | 0.25 | 0.22 | 1.87 | 0.41 |

表7. 同時再現性V (Amino Acids) P社High n=10

| 物質名 | Ala | Val | Leu | Met | Phe | Ct | Tyr |
|------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|
| 標準値 μ mol/ml | 1183.0 | 808.0 | 1522.0 | 302.0 | 878.0 | 773.0 | 1480.0 |
| Factor | 0.96 | 1.25 | 1.05 | 1.26 | 0.72 | 1.03 | 0.92 |
| Average | 1141.2 | 1010.2 | 1802.8 | 379.5 | 630.3 | 793.0 | 1348.4 |
| S.D. | 58.94 | 40.04 | 70.65 | 14.53 | 28.38 | 22.39 | 41.11 |
| C.V. | 5.16 | 3.98 | 4.41 | 3.83 | 4.50 | 2.82 | 3.05 |
| Max | 1219.3 | 1067.1 | 1716.1 | 402.0 | 622.6 | 824.1 | 1408.6 |
| Min | 1043.4 | 942.4 | 1484.6 | 353.4 | 582.6 | 761.0 | 1279.4 |
| Range | 175.9 | 124.7 | 231.5 | 48.6 | 80.0 | 63.2 | 129.2 |
| Factor | 1.06 | 1.61 | 1.24 | 0.99 | 0.75 | 1.06 | 0.80 |
| Average | 1267.5 | 1298.4 | 1892.3 | 298.5 | 662.3 | 820.3 | 1166.9 |
| S.D. | 60.42 | 50.46 | 78.76 | 10.25 | 26.76 | 39.12 | 27.70 |
| C.V. | 4.77 | 3.89 | 4.16 | 3.43 | 4.04 | 4.77 | 2.37 |
| Max | 1370.4 | 1377.5 | 2023.3 | 313.3 | 712.8 | 867.2 | 1211.1 |
| Min | 1189.9 | 1242.4 | 1780.3 | 283.2 | 630.3 | 770.7 | 1120.8 |
| Range | 170.5 | 135.1 | 243.0 | 30.1 | 82.4 | 88.5 | 90.3 |

表8. 同時再現性VI (Acylcarnitines) P社High n=10

| 物質名 | C0 | C2 | C3 | C4 | C6 | C8 | C10 | C12 | C14 | C16 | C18 |
|------------------|-------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|
| 標準値 μ mol/ml | 269.1 | 120.5 | 32.0 | 8.45 | 2.46 | 1.86 | 1.36 | 5.75 | 3.85 | 36.47 | 4.98 |
| Factor | 1.11 | 0.99 | 1.02 | 1.21 | 1.37 | 1.38 | 1.47 | 1.15 | 2.02 | 1.11 | 1.03 |
| Average | 410.2 | 118.7 | 32.8 | 10.22 | 3.38 | 2.29 | 2.00 | 6.82 | 7.77 | 40.57 | 5.11 |
| S.D. | 20.77 | 5.19 | 2.07 | 0.58 | 0.28 | 0.15 | 0.09 | 0.35 | 0.48 | 2.88 | 0.37 |
| C.V. | 5.06 | 4.37 | 6.31 | 5.65 | 8.45 | 6.38 | 4.83 | 5.25 | 8.14 | 7.06 | 7.30 |
| Max | 428.7 | 125.9 | 38.7 | 11.04 | 2.75 | 2.55 | 2.13 | 7.08 | 8.52 | 45.5 | 5.65 |
| Min | 375.8 | 112.0 | 29.8 | 9.44 | 2.89 | 2.08 | 1.89 | 6.07 | 6.89 | 35.18 | 4.55 |
| Range | 53.0 | 14.0 | 8.8 | 1.80 | 0.86 | 0.48 | 0.25 | 0.99 | 1.53 | 10.32 | 1.10 |
| Factor | 0.74 | 1.13 | 1.10 | 1.20 | 1.22 | 1.08 | 1.27 | 1.08 | 2.88 | 1.10 | 1.02 |
| Average | 286.1 | 135.8 | 25.2 | 10.15 | 3.25 | 2.02 | 1.73 | 6.19 | 3.71 | 40.13 | 5.04 |
| S.D. | 13.89 | 8.44 | 2.11 | 0.67 | 0.28 | 0.09 | 0.13 | 0.46 | 0.23 | 1.82 | 0.23 |
| C.V. | 5.14 | 6.21 | 5.99 | 6.59 | 7.96 | 4.34 | 7.25 | 7.42 | 6.28 | 4.53 | 4.58 |
| Max | 290.1 | 150.8 | 37.4 | 10.92 | 3.53 | 2.18 | 1.91 | 8.88 | 4.18 | 43.02 | 5.39 |
| Min | 249.0 | 124.5 | 31.8 | 9.00 | 2.80 | 1.89 | 1.55 | 5.88 | 3.44 | 37.89 | 4.70 |
| Range | 41.1 | 28.2 | 5.6 | 1.92 | 0.73 | 0.29 | 0.36 | 1.18 | 0.72 | 5.33 | 0.69 |

表9. プレート間再現性 (Amino Acids) n=6

| | | Ala | Val | Leu | Met | Phe | Ct | Tyr | |
|--------|------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|
| 自家調製試薬 | CDC | Average | 384.8 | 192.1 | 188.8 | 29.9 | 81.9 | 35.5 | 71.7 |
| | g21 | C.V. | 7.0 | 5.3 | 7.7 | 5.0 | 6.0 | 8.7 | 7.1 |
| | CDC | Average | 419.4 | 290.8 | 480.8 | 107.2 | 284.4 | 120.9 | 243.1 |
| | g22 | C.V. | 3.6 | 3.5 | 4.2 | 2.7 | 3.3 | 3.7 | 3.3 |
| | PE | Average | 558.3 | 472.3 | 548.4 | 100.1 | 210.7 | 237.6 | 390.4 |
| | Low | C.V. | 8.2 | 7.3 | 5.6 | 5.8 | 10.5 | 7.7 | 34.7 |
| 専用試薬 | PE | Average | 1133.0 | 1008.3 | 1802.8 | 384.5 | 828.3 | 801.5 | 1282.4 |
| | High | C.V. | 5.9 | 5.1 | 6.2 | 5.1 | 4.8 | 2.2 | 4.4 |
| | CDC | Average | 448.3 | 280.0 | 270.4 | 21.8 | 88.4 | 41.9 | 80.4 |
| | g21 | C.V. | 6.9 | 5.3 | 7.8 | 7.9 | 8.8 | 12.7 | 4.9 |
| | CDC | Average | 480.2 | 364.0 | 810.0 | 81.0 | 254.4 | 129.5 | 191.9 |
| | g22 | C.V. | 3.3 | 3.7 | 2.4 | 3.8 | 5.0 | 5.0 | 3.4 |
| 専用試薬 | PE | Average | 618.1 | 531.1 | 712.0 | 88.8 | 214.4 | 255.4 | 374.1 |
| | Low | C.V. | 5.2 | 6.6 | 6.5 | 3.7 | 5.8 | 7.2 | 5.4 |
| | PE | Average | 1281.1 | 1380.7 | 2140.4 | 303.7 | 695.4 | 888.2 | 1210.8 |
| | High | C.V. | 6.9 | 6.0 | 6.5 | 8.2 | 9.3 | 6.0 | 3.2 |

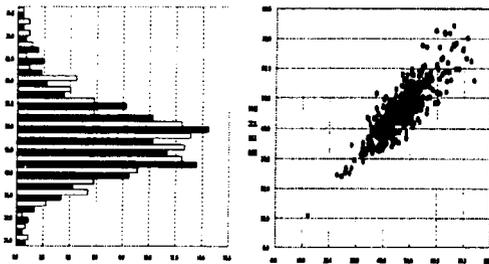


図2. 試薬間測定値の比較 (Phe 新生児検体 n=440)

表10. 試薬間測定値の相関 (新生児検体 N=440)

| | Amino Acids | | | | Acylcarnitines | | | | |
|-----|-------------|----------------|-------|-----------|----------------|----------------|-------|-----------|--------|
| | r | r ² | Slope | Intercept | r | r ² | Slope | Intercept | |
| Ala | 0.915 | 0.836 | 0.804 | 34.85 | C0 | 0.934 | 0.873 | 1.554 | 1.235 |
| Val | 0.896 | 0.803 | 0.719 | 9.05 | C2 | 0.918 | 0.842 | 0.823 | 1.516 |
| Leu | 0.821 | 0.649 | 0.703 | 14.41 | C3 | 0.829 | 0.683 | 0.821 | 0.122 |
| Met | 0.847 | 0.717 | 1.084 | 4.74 | C4 | 0.851 | 0.723 | 0.909 | 0.029 |
| Phe | 0.858 | 0.737 | 0.832 | 8.72 | C5 | 0.992 | 0.983 | 1.330 | -0.030 |
| Arg | 0.808 | 0.625 | 0.675 | 4.23 | C6 | 0.732 | 0.535 | 0.650 | -0.001 |
| Cr | 0.772 | 0.595 | 0.733 | 4.99 | C8 | 0.861 | 0.741 | 0.940 | 0.024 |
| Tyr | 0.973 | 0.948 | 1.188 | 2.98 | C10 | 0.874 | 0.764 | 0.950 | -0.043 |
| Orn | 0.830 | 0.688 | 0.646 | 33.31 | C12 | 0.933 | 0.871 | 1.043 | -0.014 |
| | | | | | C14 | 0.900 | 0.810 | 2.010 | -0.032 |
| | | | | | C16 | 0.942 | 0.888 | 1.002 | 0.100 |
| | | | | | C18 | 0.904 | 0.818 | 1.107 | 0.027 |

分担研究課題：タンデムマスによるスクリーニングの検討

島根大学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 2007 年の成績

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ている。2007 年 1 月 1 日から 12 月 31 日までに、25,007 検体を分析した。再採血率は 0.46%であった。精査となった 10 例のうち 5 例を先天代謝異常症と診断した。その内訳は、古典型メチルマロン酸血症(MMA) 1 例、軽症 MMA 3 例、軽症プロピオン酸血症(PPA) 1 例であった。古典型 MMA ではスクリーニング前の発症例であったが、他の 4 例は診断時無症状であった。軽症 MMA の多くは無治療で経過観察されており、今後は自然歴を明らかにして軽症例のマス・スクリーニングの必要性などについても再検討を行う必要がある。また、これまでのスクリーニングで発症された MCC 欠損症、CPT-1 欠損症、VLCAD 欠損症、IVA の患者も治療により無症状で経過している。

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)

大浦敏博 (東北大学小児科)

重松陽介 (福井大学看護学科・小児科)

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

島根大学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するとともに、発見される患者の生育歴についても調査し、我が国にマス・スクリーニングにおけるタンデムマス分析の役割について検討する。

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、宮城県、島根県では県下の全産科施設に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において出生した児のうち保護者の同意を得た場合に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

C. 研究結果と考察

(1) 分析結果について

2007 年 1 月から 12 月 31 日までの総分析数は 25,007 検体であった。前年度の分析数とあわせると累計 61,389 検体を分析した。2007 年における再採血率は 0.46%であった。再採血の理由として多かったのは、C0 低値(0.080%)、C3 高値(0.072%)、C5 高値(0.068%)であった。これらの症例は出生体重が低い症例、集中治療を受けている症例が相対的に多く、今後は出生体重（出生週数）や使用薬剤による影響などに関する情報をさらに蓄積する必要がある。

(2) 発見された異常について

これまでに発見された先天代謝異常症は 6 症例、すなわち軽症プロピオン酸血症(PPA)、一過性メチルマロン酸血症(MMA)、3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症(MCC)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ

-1 (CPT-1 欠損症)、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD) 欠損症、イソ吉草酸血症(IVA)が各 1 例であり、いずれも良好な経過をとっている。軽症 MMA, 軽症 PA については無治療で経過観察中である。

2007 年に発見されたのは 5 例であり、その内訳は、古典型 MMA が 1 例、軽症 MMA が 3 例、軽症 PPA が 1 例であった。古典型の 1 例は分析時にはすでに発症していたが、タンデムマスにより迅速な治療が可能となり、治療に役立った。また、軽症 MMA の 3 例は現時点ではいずれも無治療で経過観察が可能であり、今後はこれらの症例の自然歴を明らかにする努力を行う一方で、このような軽症例をスクリーニング対象とするか否かを検討していく必要があると思われた。

D. 結論

- 1) 2007 年は 25,007 検体を分析し、これまでの分析数とあわせると累計 61,389 検体を分析した。
- 2) これまでに 11 例のスクリーニング対象の患者が発見されており 1 例は発症後の診断例、6 例は無治療で経過、残りの 4 例は治療を行い発達・発育ともに良好な経過をとっており、タンデムマスによるマス・スクリーニングの有用性が示唆される。

E 研究発表

論文発表

1. Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevusuren J, Yamaguchi S: ESI-MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders. *J Chromatogr B*, 855 80-87. 2007
2. Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Prevsuren J, Yamaguchi S: A retrospective ESI-MS/MS analysis of newborn blood spots from 18 symptomatic patients with organic acid and fatty acid oxidation disorders diagnosed either

in infancy or in childhood. *J Inher Metab Dis* 30; 606. 2007

3. Uematsu M, Sakamoto O, Sugawara N, Kumagai N, Morimoto T, Yamaguchi S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Ihara K, Yoshino M, Watanabe Y, Inokuchi T, Yokoyama T, Kiwaki K, Nakamura K, Endo F, Tsuchiya S, Ohura T. Novel mutations in five Japanese patients with 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Hum Genet.* 52(12):1040-3. 2007
4. 小林弘典、遠藤充、長谷川有紀、山口清次：先天代謝異常症 13 例における新生児期ろ紙血を用いたタンデムマス分析による後方視的検討。小児科学会雑誌。111(9): 1155-1159. 2007

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の検討

質量分析法を用いた代謝異常スクリーニング診断
ーリスク児を中心にー

研究要旨

久留米大学 GC/MS 医学応用研究施設では、2007 年 12 月までに約 930 例のリスク児を質量分析 (MS/MS および GC/MS) 法を用いて、代謝異常症のスクリーニング化学診断を行った。診断された代謝疾患は、メチルマロン酸血症 3 例、メープルシロップ尿症 2 例、シトリン欠損症 2 例、3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ (MCC) 欠損症 1 例、イソ吉草酸血症 1 例、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) II 欠損症疑い 1 例の計 10 例であった。これらの中で、メチルマロン酸血症の 1 例は、3 生月に体重増加不良と意識障害で発症、発見されたが、5 生日での濾紙血を後方視的にタンデムマス (MS/MS) にて分析したところ、C3 (プロピオニルカルニチン) および C3/C2 (アセチルカルニチン) 比の高値が確認され、発症前での早期発見の可能性を強く示唆する症例であった。今回の我々の経験により、MS/MS による新生児代謝異常症スクリーニングは非常に有用であり、わが国において出来るだけ早期に導入すべきマス・スクリーニング法であると考えられた。

研究協力者

松下優美^{1),2)}、猪口隆洋¹⁾、青木久美子¹⁾、田代恭子¹⁾、稲場美佐¹⁾、井上かおり¹⁾、原千尋¹⁾、松石豊次郎^{1),2)}

- 1) 久留米大学医学部 GC/MS 医学応用研究施設
- 2) 久留米大学医学部小児科

A. 研究目的

当施設では、MS/MS 法、GC/MS 法の両質量分析法を積極的に用いた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。試験研究の過程で、今回リスク児を中心とした濾紙血の MS/MS 分析により、わが国での新生児マス・スクリーニングにおけるタンデムマス法のスクリーニング精度ならびにその有用性について検討した。

B. 研究方法および対象

久留米大学病院および他の医療機関を受診し、先天代謝異常症が疑われたハイリスク児約 930 例を対象に、濾紙血の MS/MS 分析と尿の GC/MS 分析とのセット質量分析により、スクリーニング化学診断を行った。また新生児期に採取された保存濾紙血を後方視的に MS/MS

にて分析することで、新生児期とりわけ発症前での早期発見の可能性を検討した。質量分析装置は、それぞれ Waters Quattro Premier LC/MS/MS 及び Agilent 5973, 5975B GC/MS を使用した。

なお、今回の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。

C. 研究結果および考察

スクリーニング分析数はリスク児約 930 例。その中で診断された代謝疾患は、メチルマロン酸血症 3 例、メープルシロップ尿症 2 例、シトリン欠損症 2 例、MCC 欠損症 1 例、イソ吉草酸血症 1 例、CPT II 欠損症疑い 1 例の計 10 例であった。この中で、新生児期に早期発見が可能であったと考えられる症例について報告する。

症例 1) メチルマロン酸血症：1 生月より反復性嘔吐、体重増加不良を指摘されていたが、たびたび輸液にて経過観察されていた。3 生月時、体重増加不良、傾眠傾向を認め当科紹介受

診となった。MS/MS 分析にて、C3 (=40.98nmol/ml) および C3/C2 比 (=0.78) にカットオフ値を超える高値を認めた。同時に行った尿の GC/MS 分析により、メチルマロン酸とメチルクエン酸の大量排泄が認められたため、メチルマロン酸血症と化学診断した。また、保護者の同意を得て、5 生日での保存ガスリー濾紙血を分析した結果、同様に C3 (=12.91nmol/ml) および C3/C2 比 (=0.49) に高値が認められた。新生児期にタンデムマスによるスクリーニングが行われていれば、専門機関での早期治療介入が可能な症例であると考えられた。

症例 2) メープルシロップ尿症：姉が同疾患と診断されており、同胞の出生に伴い出生直後より濾紙血および尿を経時的に分析した。1 生日の MS/MS 分析では、バリン (=346.0 nmol/ml) と [ロイシン+イソロイシン] (=525.5 nmol/ml) の高値を認めた。そのため 2 生日目より特殊フォーミュラの投与を開始し、蛋白制限を行った。その間中枢神経症状は認めず、臨床経過は良好であった。なお、5 生日尿の GC/MS 分析では、4-OH-フェニル乳酸と 2-OH-イソ吉草酸の有意の増加が認められた。メープルシロップ尿症の同胞例における MS/MS 分析は、5 生日以前においても診断に有効であることが示唆された。

症例 3) MCC 欠損症：1 才 3 ヶ月まで発育発達は正常であった。突然の意識障害と痙攣重積で発症、近医の救急病院へ搬送された。発症時、高アンモニア血症、低血糖、CK 上昇があり、MS/MS 分析を施行した。C5-ヒドロキシカルニチン (=17.55nmol/ml) の著明な上昇および、遊離カルニチン (=5.85nmol/ml) の低下を認めた。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高値排泄を認めたため、MCC 欠損症と化学診断した。保護者の同意の下、東北大学での遺伝子解析の結果、MCCB 遺伝子エクソン 6 とエクソン 9 にミスセンス変異を認めた。また、本症例の 5 生日における保存濾紙血を、後方視的に MS/MS 分析したところ、C5-ヒドロキシカルニチン (=7.44nmol/ml) の増加が確認された。このことは症例 1) と同様、MS/MS による新生児スクリーニングを施行していれば

本疾患を疑い、現在の重症な後遺症を残す状態を回避できた可能性は否定できない。

ハイリスク児中心とは言え、今回の試験研究の過程で発見・診断された症例のうち、上記の 3 症例は、タンデムマスによる新生児スクリーニングの有効性ならびに早期導入の必要性を示唆するものである。

D. 結論

質量分析法による新生児代謝異常スクリーニング試験研究の過程で、リスク児を中心に行った検討ではあるが、多くの先天代謝異常症が発見・診断された。また各症例の臨床経過より、質量分析法の新生児スクリーニングにおける診断精度の有効性ならびに有用性が確認された。従って、タンデムマスによる新生児マス・スクリーニング早期開始の重要性が強く示唆された。

G. 研究発表

- 1) Tashiro K, Inokuchi T, Aoki K, Inaba M, Matsumoto K, Hara C, Ohbu K, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T : One case of 3-methylcrotonylglycinuria found in neonatal metabolic screening using mass spectrometry. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. 2007.9.4. (Hamburg, Germany)
- 2) Aoki K, Inokuchi T, Tashiro K, Inaba M, Matsumoto K, Hara C, Matsuishi T : A pilot study for neonatal metabolic screening by GC/MS – An 11-year study in Northern Kyusyu, Japan. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. 2007.9.4. (Hamburg, Germany)