

## Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*

Atsuo Kikuchi <sup>a,\*</sup>, Natsuko Arai-Ichinoi <sup>a</sup>, Osamu Sakamoto <sup>a</sup>, Yoichi Matsubara <sup>b</sup>, Takeyori Saheki <sup>c,1</sup>, Keiko Kobayashi <sup>d</sup>, Toshihiro Ohura <sup>e</sup>, Shigeo Kure <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan

<sup>b</sup> Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan

<sup>c</sup> Institute for Health Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Yamashiro-cho, Tokushima 770-8514, Japan

<sup>d</sup> Department of Molecular Metabolism and Biochemical Genetics, Kagoshima University, Kagoshima 890-8544, Japan

<sup>e</sup> Division of Pediatrics, Sendai City Hospital, 3-1 Shimizukoji, Wakabayashi-ku, Sendai, Miyagi 984-8501, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 November 2011

Received in revised form 29 December 2011

Accepted 30 December 2011

Available online 8 January 2012

#### Keywords:

Citrin deficiency

Genetic diagnosis

Rapid diagnosis

Expanded newborn screening

*SLC25A13*

### ABSTRACT

Citrin deficiency is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *SLC25A13* gene and has two disease outcomes: adult-onset type II citrullinemia and neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. The clinical appearance of these diseases is variable, ranging from almost no symptoms to coma, brain edema, and severe liver failure. Genetic testing for *SLC25A13* mutations is essential for the diagnosis of citrin deficiency because chemical diagnoses are prohibitively difficult. Eleven *SLC25A13* mutations account for 95% of the mutant alleles in Japanese patients with citrin deficiency. Therefore, a simple test for these mutations is desirable. We established a 1-hour, closed-tube assay for the 11 *SLC25A13* mutations using real-time PCR. Each mutation site was amplified by PCR followed by a melting-curve analysis with adjacent hybridization probes (HybProbe, Roche). The 11 prevalent mutations were detected in seven PCR reactions. Six reactions were used to detect a single mutation each, and one reaction was used to detect five mutations that are clustered in a 21-bp region in exon 17. To test the reliability, we used this method to genotype blind DNA samples from 50 patients with citrin deficiency. Our results were in complete agreement those obtained using previously established methods. Furthermore, the mutations could be detected without difficulty using dried blood samples collected on filter paper. Therefore, this assay could be used for newborn screening and for facilitating the genetic diagnosis of citrin deficiency, especially in East Asian populations.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Citrin deficiency is an autosomal recessive disorder that results from mutations in the *SLC25A13* gene [1] and causes two diseases: adult-onset type II citrullinemia (CTLN2; OMIM #603471) and neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD; OMIM#605814) [1–4]. The clinical appearance of these diseases is variable and ranges from almost no symptoms to coma, brain edema, and severe liver failure requiring transplantation [5–8]. In a study of patients with NICCD, only 40% of individuals were identified by newborn screenings to have abnormalities, such as hypergalactosemia, hypermethioninemia, and hyperphenylalaninemia [9]. Other

patients were referred to hospitals with suspected neonatal hepatitis or biliary atresia, due to jaundice or discolored stool [9]. Hypercitrullinemia was not observed in all patients [9]. Mutation analysis of *SLC25A13* is indispensable because of the difficulties associated with the chemical diagnosis of citrin deficiency. The *SLC25A13* mutation spectrum in citrin deficiency is heterogeneous, and more than 31 mutations of *SLC25A13* have been identified to date [1,10–18]. However, there are several predominant mutations in patients from East Asia. As shown in Table 1, 6 prevalent mutations account for 91% of the mutant alleles in the Japanese population [12,19]. Five additional mutations also occur within a 21-bp cluster in exon 17 (Table 1 and Fig. 1D). The six prevalent mutations, together with the five mutations in exon 17, account for 95% of the mutant alleles in Japan [12,19].

Several different methods, such as direct sequencing, PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), are currently used for the detection of mutations in *SLC25A13* [1,10–14,19]. However, these methods are too complex for clinical use. Direct sequencing is a standard but cumbersome method. The PCR-RFLP method is

**Abbreviations:** CTLN2, adult-onset type II citrullinemia; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HRM, high resolution melting; NICCD, neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency; Tm, melting temperature.

\* Corresponding author. Fax: +81 22 717 7290.

E-mail address: [akikuchi-thk@umin.ac.jp](mailto:akikuchi-thk@umin.ac.jp) (A. Kikuchi).

<sup>1</sup> Present address: Institute of Resource Development and Analysis, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan.

**Table 1**  
Seven primer/probe sets and 11 targeted mutations of *SLC25A13*.

Primer/probe set	Mutation	Location	Nucleotide change	Effects of mutations	Allele frequency* [19]	References	
A	Mutation [I]	:851del4	exon 9	c.851_854delGTAT	p.R284fs(286X)	33.2%	[1]
B	Mutation [III]	:g.IVS11+1G>A	intron 11	c.1019_1177del	p.340_392del	37.6%	[1]
C	Mutation [III]	:1638ins23	exon 16	c.1638_1660dup	p.A554fs(570X)	3.4%	[1]
D	Mutation [IV]	:S225X	exon 7	c.675C>A	p.S225X	5.3%	[1]
E	Mutation [V]	:g.IVS13+1G>A	intron 13	c.1231_1311del	p.411_437del	8.2%	[1]
F	Mutation [XIX]	:IVS16ins3kb	intron 16	c. aberrant RNA	p.A584fs(585X)	4.6%	[19]
G	Mutation [VI]	:1800ins1	exon 17	c.1799_1800insA	p.Y600X	1.3%	[10]
	Mutation [VII]	:R605X	exon 17	c.1813C>T	p.R605X	0.90%	[10]
	Mutation [VIII]	:E601X	exon 17	c.1801G>T	p.E601X	1.2%	[11]
	Mutation [IX]	:E601K	exon 17	c.1801G>A	p.E601K	0.30%	[11]
	Mutation [XXI]	:L598R	exon 17	c.1793T>G	p.L598R	0%	[15]
					Total 95.1%		

\* The frequency of each mutant allele among Japanese patients with citrin deficiency.

complicated and can lead to genotyping errors, due to incomplete digestion by the restriction enzymes. DHPLC is time-consuming and requires expensive equipment. Thus, there is a strong need for the development of a simple test for these mutations.

The goal of this study was to establish a rapid and simple test for the detection of the 11 most common *SLC25A13* mutations. We adopted the HybProbe format (Roche) for the detection of the mutations using real-time PCR followed by a melting-curve analysis with adjacent hybridization probes [20,21]. This assay can be completed in less than 1 h and has the advantage of being a closed-tube assay. The fundamental process for detecting point mutations using the HybProbe assay is presented in Fig. 1A. The 11 prevalent mutations contain not only point mutations but also include a 4-bp deletion and insertions of 1-bp, 23-bp and 3-kb genomic fragments (Table 1 and Fig. 1). Careful design of the PCR primers and HybProbes enabled us to test for these various *SLC25A13* mutations.

## 2. Methods

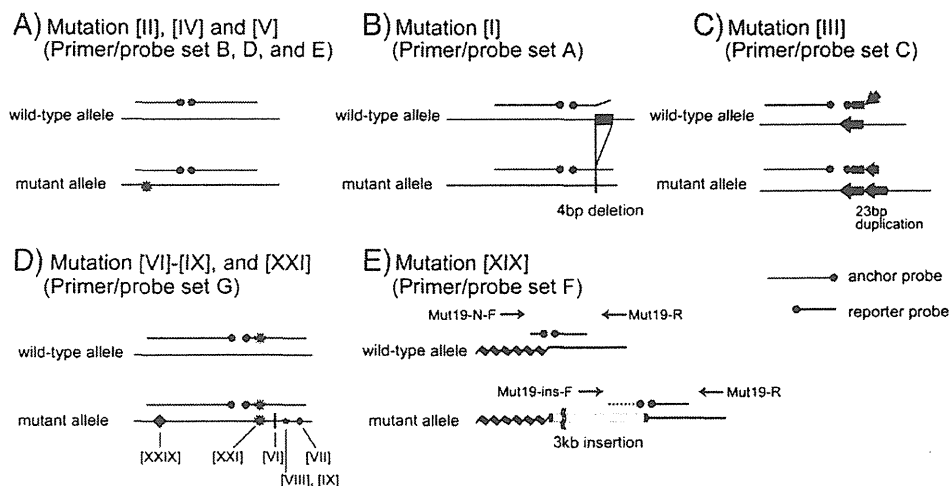
### 2.1. Subjects

CTLN2 and NICCD were diagnosed, as previously described [9,10,19,22–24]. Genomic DNA of the patients was obtained from peripheral blood leukocytes using the DNeasy blood kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Genomic DNA was purified from filter paper blood samples using the ReadyAmp Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Mutations in these DNA samples

were analyzed at Kagoshima University using a combination of PCR with or without restriction enzyme digestion or by direct sequencing, as previously described [1,10–14,19]. Another set of samples was obtained from 420 healthy volunteers (mainly from Miyagi prefecture in the northeastern region of Japan) at Tohoku University. Genomic DNA from leukocytes was extracted, as described above.

### 2.2. Detection of seven prevalent mutations in *SLC25A13* using the HybProbe assay

HybProbe probes comprise a pair of donor and acceptor oligonucleotide probes designed to hybridize adjacent to their target sites in an amplified DNA fragment [20,21]. The donor probes are labeled at their 3' end with fluorescein isothiocyanate (FITC), whereas the acceptor probes are labeled at their 5' end with LC Red640; these acceptor probes are phosphorylated at their 3' end to prevent extension by the DNA polymerase. When two probes hybridize to the amplicon, the fluorescent dyes are located within 5 bases of each other, which allows fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the excited FITC and the LC Red640; this process emits light that can be quantified by real-time PCR. Following PCR amplification, a melting-peak analysis is performed. The melting peak is produced by the reporter probe, which has a lower melting temperature ( $T_m$ ) than the other probe, called the anchor probe. As the reporter melts from the target, the fluorophores are separated, and the FRET ceases. The  $T_m$  of the reporter probe determines the reaction



**Fig. 1.** Principle of *SLC25A13* mutation detection by melting-curve analysis with the HybProbe assay. In primer/probe sets A–E, and G, PCR was performed with a pair of primers, whereas in primer/probe set F, two forward primers and one common reverse primer were used for the amplification of both wild-type and mutant alleles. Note that mutation [XXIX], located on the anchor probe of primer/probe set G, is a non-target mutation.

specificity (i.e., binding of the probe to a perfectly matched sequence rather than to regions with sequence mismatches).

Seven primer/probe sets were designed for this study. Fig. 1 shows a schematic diagram of the strategy for mutation detection using these primer/probe sets. Tables 1 and 2 list the primer/probe sets and corresponding sequences and primer concentrations that were used to target the 11 mutations. Primer/probe sets A, B, C, D, E, and F were designed to detect mutations [I], [II], [III], [IV], [V], and [XIX], respectively. Primer/probe set G was designed to detect the five mutations clustered on exon 17: mutations [VI], [VII], [VIII], [IX], and [XXI] (Fig. 1D). All primers and probes were synthesized based on the NCBI reference SLC25A13 gene sequence (GenBank accession no. **NM\_014251**) with the exception of mutation [XIX]:IVS16ins3kb, which was designed according to [19].

Real-time PCR and subsequent melting curve analyses were performed in a closed tube using a 20- $\mu$ L mixture on a LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). The PCR mixture contained 2.0  $\mu$ L of genomic DNA (10–50 ng), 0.5  $\mu$ M of forward primer, 0.5 or 0.1  $\mu$ M of reverse primer, 0.2  $\mu$ M of each sensor and anchor probe, and 10  $\mu$ L of Premix ExTaq™ (Perfect Real Time) reagent (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan).

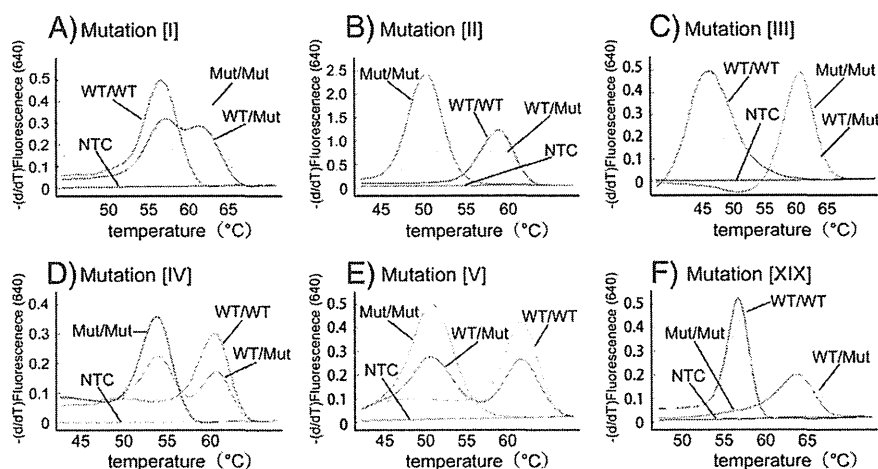
The thermal profile conditions were identical for all seven assays and consisted of an initial denaturation step (30 s at 95 °C), followed by 45 amplification cycles with the following conditions: denaturation for 5 s at 95 °C and annealing and extension for 20 s at 60 °C. The transition rate between all steps was 20 °C/s. After amplification, the samples were held at 37 °C for 1 min, followed by the melting curve acquisition at a ramp rate of 0.15 °C/s extending to 80 °C with continuous fluorescence acquisition.

**Table 2**  
Primers, probes and target amplicon sequences, target mutation sites, and primer concentrations.

Primer/probe set	Name	Sequences of PCR products, primer locations, probe sequences, and mutation sites (5' to 3')	Concentration ( $\mu$ mol/L)
A		GGCTACTGAAATATGAGAAatgaaaaaggatgttttaaatttataatgtaaattgtaataaattgggtatattgttctgtgtttttccctacagac <u>gtagctcttagcagacattgaacggattgctcctctggaagagggaactctgccCTTAACTTGGCTGAGG</u> (181 bp)	
	Mut1-F	GGCTACTGAAATATGAGAA	0.5
	Mut1-R	CCTCAGCCAAGTTAAAG	0.5
	Mut1-UP Mut1-DW	ATGTA AATTGTAATAAATTTGGTATATTTGTTGCTTGTGTT-FITC LC Red640-GTTTTTCCCTACAGACGACC-P	
B		GAATGCAGAACCAACGAtcaactggctcttttgggagaactcatgtataaaacagctttagctgttttaagaaggtctacgctatgaagcttctt <u>tggaactgtatagaggtagtgcacatgctcaatacctgttaggtgaaataacactcaaaaggttggttctcatcttagtgcctGACATGAATTAGCAAGACTG</u> (205 bp)	
	Mut2-F	GAATGCAGAACCAACGA	0.5
	Mut2-R	CAGTCTTGCTAATTCATGTC	0.1
	Mut2-UP Mut2-DW	ACCTAACAGGTATTGAGCATGTG-FITC LC Red640-CACTAACCTCTATACAGTCCA-P	
C		GCAGTTCAAAGCACAGTTATTTttatagtgagaatgtgaccagctgagatgggtgtgtctcctctcaggtatgctgacagctcttttagt <u>accctgctgatgtatcaagacagagattacaggtg</u> <u>gctgcccggg(gagattacaggtggctcccggg)ctggccaaccaCTTACAGCGGAGTGATAGAC</u> (175 bp)	
	Mut3-F	GCAGTTCAAAGCACAGTTATT	0.5
	Mut3-R	GTCTATCACTCCGCTGTAAG	0.5
	Mut3-UP Mut3-DW	ACCCCTGCTGATGTTATCAAGACGAGATTACAGGT-FITC LC Red640-GCTGCCCGGGAGATTA-P	
D		TCAATTTATTGAGGCTGCTggaggtaccacatccalcaagtagttctctattttaatggattaattcgtctccttaacaac <u>atggaactcattagaagaatctatagcactc</u> <u>tgctggcaccaggaagatgtgaagtGACTAAGGTTGAGTGAGAA</u> (164 bp)	
	Mut4-F	TCAATTTATTGAGGCTGC	0.5
	Mut4-R	TTCTCACTCACCTTAGTC	0.5
	Mut4-UP Mut4-DW	AATGGATTTAATTCGCTCCTTAACA-FITC LC Red640-ATGGAACCTATTAGAAAGATCTATAGCACTC-P	
E		TGCACAAAGATGGTTTCgctccacttgcagcagaattcttctgaggctgcgtaagctctttgaaagctctcttctgaaagactgtttcac <u>atatatactactaccatgtcaacaggttggaactaaggtctctgtTAACCACAGATCTCGCA</u> (162 bp)	
	Mut5-F	TGCACAAAGATGGTTTCG	0.5
	Mut5-R	TGCAGGATCTGTGGTTA	0.5
	Mut5-UP Mut5-DW	GTGAAACAAGCTTTTCAATGAAGAGACTTC-FITC LC Red640-AAGGTACTTACGCACGCTC-P	
F	normal allele	GGAGCTGGTGGTATGGAAtaattgtgttcttaactcttttggtatcaggtaaaattttaaaatatctaattatctgtgatttctc <u>catttttaagctcgtgtatttgcactcaccagtttgg</u> <u>gtaactttgctgacttacgaattgctacagcagatggttctacattgatttggaggagtgaagtatcactgtaaatctgctgtaaat</u> GGCTGCTGCTAATGCTC (244 bp)	
	insertion allele	CCATCTCTCTCCCTTggcagccccccccgatttctcatttttaagctcgtgtatttgcactcaccagtttgg <u>gtaactttgctgacttacgaattgctacagcagatggttctacattgatttggaggagtgaagtatcactgtaaatctgctgtaaat</u> ggaggagtgaagtatcactgtaaatctgctgtaaatGGCTGCTGCTAATGCTC (196 bp)	
	Mut19-N-F	GGAGCTGGTGGTATGGA	0.5
	Mut19-ins-F	CCATCTCTCTCCCTT	0.5
	Mut19-R	GAGCATTAGCAGCAGCC	0.5
	Mut19-UP	ACCAAAGTGGGTGAGGATCGAAATACAGGCTTTAAAAAATG-FITC	
	Mut19-N-DW Mut19-ins-DW	LC Red640-AGAAATCACAGATATAATTAGATAATT-P LC Red640-AGAAATCGGGGGCGGGG-P	
G		TCTTAACTAACTCTTTGGTATCAGGTaaattttaaaatctaatatatactgtatttccatttttaagctc <u>tgatttgcactcaccagtttgggtgtaacttgcctgactta(a)cgaaatgctacagca</u> <u>tggttctacattgatttggaggagtgaagtatcactgtaaatctgctgtaaatGGCTGCTGCTAATGCTC</u> (217 bp)	
	Mut6-9, 21-F	TCTTAACTAACTCTTTGGTATCAGGT	0.5
	Mut6-9, 21-R	GAGCATTAGCAGCAGCC	0.5
	Mut6-9, 21-UP Mut6-9, 21-DW	TGTATTTTCGATCTCACCCAGTTTGGTGAACCTT-FITC LC Red640-GCGGACTTACGAATTGCTACAGCGA-P	

Upper case and underlined letters indicate the locations of primers and probes, respectively. Inserted DNA is shown in parenthesis. Nucleotides in boldface were used for mutation detection.

F: forward, R: reverse, UP: upstream, DW: downstream, N: normal allele, ins: insertion allele, FITC: fluorescein isothiocyanate, P: phosphate.



**Fig. 2.** Typical melting curves used in the detection of mutations [I–V] and [XIX]. Each assay using primer/probe sets A–F is displayed in a separate graph (A–F). WT: wild-type allele, Mut: mutant allele, NTC: no DNA template control.

### 2.3. Validation of the mutation detection system

After establishing the protocol for detecting the 11 prevalent mutations, 50 DNA samples from patients' blood were sent from Kagoshima University to Tohoku University for the validation of this system in a single-blind manner. Similarly, 26 DNA samples purified from paper-filter blood samples were analyzed in the same manner as the blood DNA samples.

### 2.4. Estimation of the carrier frequency

For the estimation of the heterozygous carrier frequency, 420 genomic DNA samples from healthy volunteers were screened using the HybProbe analysis for the 11 prevalent mutations. All detected mutations were confirmed by direct sequencing.

### 2.5. Ethics

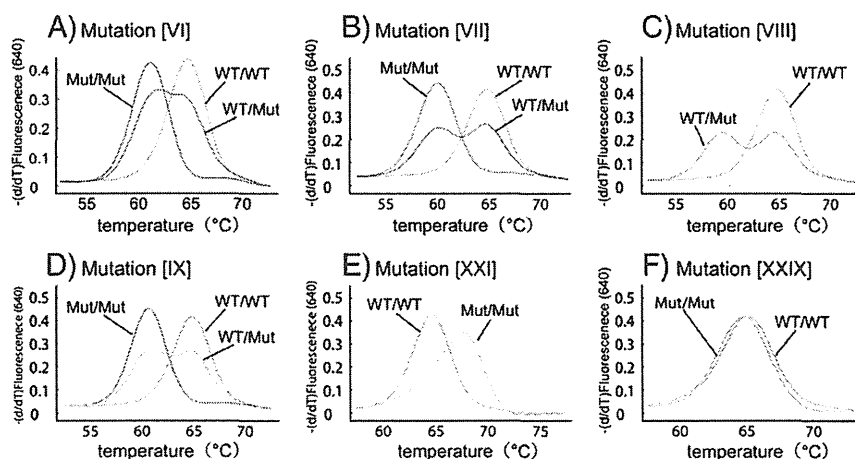
This study was approved by the Ethical Committees of Tohoku University School of Medicine and Kagoshima University. Written informed consent was obtained from all participants or their guardians.

## 3. Results

### 3.1. Development of the mutation detection system

In primer/probe sets B, D, and E, the reporter probes were designed to be complementary to the wild-type allele (Fig. 1A). To allow for an improved detection of the mutations, primer/probe sets A and C were designed to be complementary to the mutant allele (Figs. 1B, C). In the primer/probe set F, two forward PCR primers, which were specific to the wild-type and the mutant alleles, were used with a common reverse primer for the co-amplification of the wild-type and 3-kb insertion alleles (Fig. 1E). Two reporter probes, which had a common anchor probe, were used for the detection of the wild-type and mutant alleles. Because the two reporter probes had different melting temperatures, we were able to identify the allele that was amplified. Fig. 2 shows representative results of the melting curve analyses using the primer/probe sets A–F, in which all of the mutant alleles generated distinct peaks corresponding to the wild-type alleles.

In the primer/probe set G, we used a reporter probe that was complementary to the mutant [XXI] allele (Fig. 1D). All five mutations in exon 17 were successfully differentiated from the wild-type allele (Figs. 3A–E). The [XXIX] mutation is an additional mutation in exon



**Fig. 3.** Typical melting curves used in the detection of mutations [VI–XI], [XXI], and [XXIX] on exon 17. Genotyping was performed using primer/probe set G. Each melting curve for a target mutation is displayed in a separate graph (A–F). Note that mutation [XXIX] (F) is a non-target mutation on the anchor probe. WT: wild-type allele, Mut: mutant allele.

17 that is not listed in Table 1. The [XXIX] mutation is located in the anchor-probe binding site and not on the reporter-probe binding site (Fig. 1D). To examine the effect of mutations on the anchor probe, we genotyped a patient with a heterozygous [XXIX] mutation using primer/probe set G (Fig. 3F). We found no change in the melting curves between the wild-type allele and the [XXIX] allele, thereby suggesting that point mutations within the anchor probe sequence have little effect on the melting curve analysis.

### 3.2. Validation

The genotypes determined at Tohoku University using the proposed method and those determined at Kagoshima University using a previously published method were identical for the 11 common mutations (Table S1 in supplementary material). We performed a similar test using DNA samples purified from filter-paper blood samples to determine if this method could be used for newborn screening. The genotypes determined in both laboratories were identical for all 26 DNA samples (Table S2 in supplementary material).

### 3.3. Frequency of eleven prevalent mutations

We found four heterozygous carriers of mutation [I], three of mutation [II], and two of mutation [V]. In addition, primer/probe set G detected one heterozygous mutation, which was confirmed as mutation [VIII] by direct sequencing. Altogether, 10 mutations were detected in 420 Japanese healthy controls.

## 4. Discussion

We developed a simple and rapid genetic test using real-time PCR combined with the HybProbe system for the 11 prevalent mutations in *SLC25A13*: mutations [I], [II], [III], [IV], [V], [VI], [VII], [VIII], [IX], [XIX], and [XXI]. This genetic test is a closed-tube assay in which no post-PCR handling of the samples is required. In addition, the genotyping is completed within 1 h. This test can utilize DNA samples purified from both peripheral blood and filter-paper blood. The reliability of the test was confirmed by genotyping 76 blind DNA samples from patients with citrin deficiency, including 50 peripheral blood and 26 filter-paper blood DNA samples. Because screening for the 11 targeted mutations would identify 95% of mutant alleles in the Japanese population [19], both, one, and no mutant alleles are expected to be identified in 90.4%, 9.3%, and less than 0.3% of patients, respectively. This genetic test would be useful not only in Japan but also other East Asian countries, including China, Korea, Taiwan and Vietnam, in which the same mutations are prevalent. Our test is expected to detect 76–87% of the mutant alleles in the Chinese population [12,19,25], 95–100% in the Korean population [12,19,26], 60–68% in the Taiwanese population [27,28], and 100% in the Vietnamese population [12,19]. If we were to prepare a primer/probe set for mutation [X]:g.IVS6+5G>A [12], which is prevalent in Taiwan, the estimated sensitivity would exceed 90% in the Taiwanese population [27,28].

Recently, the high resolution melting (HRM) method was reported to be suitable for the screening of mutations in the diagnosis of citrin deficiency [28]. HRM analysis is a closed-tube assay that screens for any base changes in the amplicons. The presence of SNPs anywhere on the amplicons can affect the melting curve, thereby suggesting that HRM is not suitable for screening for known mutations, but rather, is best suited to screening for unknown mutations. When we detected one heterozygous prevalent mutation, we performed HRM screening for all 17 exons of *SLC25A13*. After HRM screening, only the HRM-positive exons were subjected to direct sequencing analysis. Several mutant alleles were identified using this approach.

The frequency of homozygotes, including compound heterozygotes, presenting *SLC25A13* mutations in the population at Kagoshima (a prefecture in the southern part of Japan) has been calculated to be 1/17,000 based on the carrier rate (1/65) [19]. The prevalence of NICCD has been also reported to be 1/17,000–34,000 [29]. In this study, the carrier rate in Miyagi (a prefecture in northern Japan) was 1/42 (95% confidential interval, 1/108–1/26), thereby yielding an estimated frequency of patients with citrin deficiency of 1/7,100. Our result, together with the previous report [19], suggests that a substantial fraction of the homozygotes or compound heterozygotes of *SLC25A13* mutations was asymptomatic during the neonatal period.

The early and definitive diagnosis of citrin deficiency may be beneficial for patients with citrin deficiency by encouraging specific dietary habits and avoiding iatrogenic worsening of brain edema by glycerol infusion when patients develop encephalopathy [30,31]. Because the screening of blood citrulline levels by tandem mass analysis at birth does not detect all patients with citrin deficiency, the development of a genetic test would be welcomed. In this study, we demonstrated that genomic DNA extracted from filter paper blood samples was correctly genotyped, thereby indicating the feasibility of newborn screening using this genetic test. If 100,000 babies in the northern part of Japan were screened by this method, we would detect 14 homozygotes or compound heterozygotes with *SLC25A13* mutations and 2400 heterozygous carriers. In 2400 heterozygous carriers, we would expect to observe only 1 to 2 compound heterozygotes with one target and one non-target mutation. The estimated frequency of babies with two non-target mutations is 0.04/100,000. Our genetic method would therefore allow us to screen newborn babies efficiently. If we performed this genetic test in a high-throughput real-time PCR system, such as a 384- or 1,536-well format, the cost per sample could be lowered.

In conclusion, we have established a rapid and simple detection system using the HybProbe assay for the 11 prevalent mutations in *SLC25A13*. This system could be used to screen newborns for citrin deficiency and may facilitate the genetic diagnosis of citrin deficiency, especially in East Asian populations.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ymgme.2011.12.024.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the contribution of Dr. Keiko Kobayashi, who passed away on December 21th, 2010. Dr. Kobayashi discovered that the *SLC25A13* gene is responsible for citrin deficiency and devoted much of her life to elucidating the mechanism of citrin deficiency. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology and the Ministry of Health, Labor, and Public Welfare.

## References

- [1] K. Kobayashi, D.S. Sinasac, M. Iijima, A.P. Boright, L. Begum, J.R. Lee, T. Yasuda, S. Ikeda, R. Hirano, H. Terazono, M.A. Crackower, I. Kondo, L.C. Tsui, S.W. Scherer, T. Saheki, The gene mutated in adult-onset type II citrullinemia encodes a putative mitochondrial carrier protein, *Nat. Genet.* 22 (1999) 159–163.
- [2] T. Ohura, K. Kobayashi, Y. Tazawa, I. Nishi, D. Abukawa, O. Sakamoto, K. Iinuma, T. Saheki, Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia, *Hum. Genet.* 108 (2001) 87–90.
- [3] Y. Tazawa, K. Kobayashi, T. Ohura, D. Abukawa, F. Nishinomiya, Y. Hosoda, M. Yamashita, I. Nagata, Y. Kono, T. Yasuda, N. Yamaguchi, T. Saheki, Infantile cholestatic jaundice associated with adult-onset type II citrullinemia, *J. Pediatr.* 138 (2001) 735–740.
- [4] T. Tomomasa, K. Kobayashi, H. Kaneko, H. Shimura, T. Fukusato, M. Tabata, Y. Inoue, S. Ohwada, M. Kasahara, Y. Morishita, M. Kimura, T. Saheki, A. Morikawa, Possible clinical and histologic manifestations of adult-onset type II citrullinemia in early infancy, *J. Pediatr.* 138 (2001) 741–743.
- [5] T. Shigeta, M. Kasahara, T. Kimura, A. Fukuda, K. Sasaki, K. Arai, A. Nakagawa, S. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Soneda, H. Kitagawa, Liver transplantation for an

- infant with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency using heterozygote living donor, *Pediatr. Transplant.* 14 (2009) E86–88.
- [6] M. Kasahara, S. Ohwada, T. Takeichi, H. Kaneko, T. Tomomasa, A. Morikawa, K. Yonemura, K. Asonuma, K. Tanaka, K. Kobayashi, T. Saheki, I. Takeyoshi, Y. Morishita, Living-related liver transplantation for type II citrullinemia using a graft from heterozygote donor, *Transplantation* 71 (2001) 157–159.
- [7] Y. Takashima, M. Koide, H. Fukunaga, M. Iwai, M. Miura, R. Yoneda, T. Fukuda, K. Kobayashi, T. Saheki, Recovery from marked altered consciousness in a patient with adult-onset type II citrullinemia diagnosed by DNA analysis and treated with a living related partial liver transplantation, *Intern. Med.* 41 (2002) 555–560.
- [8] A. Tamamori, Y. Okano, H. Ozaki, A. Fujimoto, M. Kajiwaru, K. Fukuda, K. Kobayashi, T. Saheki, Y. Tagami, T. Yamano, Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: severe hepatic dysfunction in an infant requiring liver transplantation, *Eur. J. Pediatr.* 161 (2002) 609–613.
- [9] T. Ohura, K. Kobayashi, Y. Tazawa, D. Abukawa, O. Sakamoto, S. Tsuchiya, T. Saheki, Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD), *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 139–144.
- [10] T. Yasuda, N. Yamaguchi, K. Kobayashi, I. Nishi, H. Horinouchi, M.A. Jalil, M.X. Li, M. Ushikai, M. Iijima, I. Kondo, T. Saheki, Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia, *Hum. Genet.* 107 (2000) 537–545.
- [11] N. Yamaguchi, K. Kobayashi, T. Yasuda, I. Nishi, M. Iijima, M. Nakagawa, M. Osame, I. Kondo, T. Saheki, Screening of SLC25A13 mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis methods for nine mutations, *Hum. Mutat.* 19 (2002) 122–130.
- [12] Y.B. Lu, K. Kobayashi, M. Ushikai, A. Tabata, M. Iijima, M.X. Li, L. Lei, K. Kawabe, S. Taura, Y. Yang, T.-T. Liu, S.-H. Chiang, K.-J. Hsiao, Y.-L. Lau, L.-C. Tsui, D.H. Lee, T. Saheki, Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the SLC25A13 gene of Japanese patients with citrin deficiency, *J. Hum. Genet.* 50 (2005) 338–346.
- [13] E. Ben-Shalom, K. Kobayashi, A. Shaag, T. Yasuda, H.-Z. Gao, T. Saheki, C. Bachmann, O. Elpeleg, Infantile citrullinemia caused by citrin deficiency with increased dibasic amino acids, *Mol. Genet. Metab.* 77 (2002) 202–208.
- [14] J. Takaya, K. Kobayashi, A. Ohashi, M. Ushikai, A. Tabata, S. Fujimoto, F. Yamato, T. Saheki, Y. Kobayashi, Variant clinical courses of 2 patients with neonatal intrahepatic cholestasis who have a novel mutation of SLC25A13, *Metab. Clin. Exp.* 54 (2005) 1615–1619.
- [15] A. Luder, A. Tabata, M. Iijima, K. Kobayashi, H. Mandel, Citrullinaemia type 2 outside East Asia: Israeli experience, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 59.
- [16] T. Hutchin, M. Preece, K. Kobayashi, T. Saheki, R. Brown, D. Kelly, P. McKiernan, A. Green, U. Baumann, Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) in a European patient, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 112.
- [17] J.-S. Sheng, M. Ushikai, M. Iijima, S. Packman, K. Weisiger, M. Martin, M. McCracken, T. Saheki, K. Kobayashi, Identification of a novel mutation in a Taiwanese patient with citrin deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 163.
- [18] J.M. Ko, G.-H. Kim, J.-H. Kim, J.Y. Kim, J.-H. Choi, M. Ushikai, T. Saheki, K. Kobayashi, H.-W. Yoo, Six cases of citrin deficiency in Korea, *Int. J. Mol. Med.* 20 (2007) 809–815.
- [19] A. Tabata, J.-S. Sheng, M. Ushikai, Y.-Z. Song, H.-Z. Gao, Y.-B. Lu, F. Okumura, M. Iijima, K. Mutoh, S. Kishida, T. Saheki, K. Kobayashi, Identification of 13 novel mutations including a retrotransposal insertion in SLC25A13 gene and frequency of 30 mutations found in patients with citrin deficiency, *J. Hum. Genet.* 53 (2008) 534–545.
- [20] P.S. Bernard, R.S. Ajioka, J.P. Kushner, C.T. Wittwer, Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1055–1061.
- [21] C.N. Gundry, P.S. Bernard, M.G. Herrmann, G.H. Reed, C.T. Wittwer, Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes, *Genet. Test.* 3 (1999) 365–370.
- [22] T. Saheki, K. Kobayashi, I. Inoue, Hereditary disorders of the urea cycle in man: biochemical and molecular approaches, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 108 (1987) 21–68.
- [23] K. Kobayashi, M. Horiuchi, T. Saheki, Pancreatic secretory trypsin inhibitor as a diagnostic marker for adult-onset type II citrullinemia, *Hepatology* 25 (1997) 1160–1165.
- [24] Y. Tazawa, K. Kobayashi, D. Abukawa, I. Nagata, S. Maisawa, R. Sumazaki, T. Iizuka, Y. Hosoda, M. Okamoto, J. Murakami, S. Kaji, A. Tabata, Y.B. Lu, O. Sakamoto, A. Matsui, S. Kanzaki, G. Takada, T. Saheki, K. Iinuma, T. Ohura, Clinical heterogeneity of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: case reports from 16 patients, *Mol. Genet. Metab.* 83 (2004) 213–219.
- [25] H.Y. Fu, S.R. Zhang, X.H. Wang, T. Saheki, K. Kobayashi, J.S. Wang, The mutation spectrum of the SLC25A13 gene in Chinese infants with intrahepatic cholestasis and aminoacidemia, *J. Gastroenterol.* 46 (2011) 510–518.
- [26] K. Kobayashi, Y.B. Lu, M.X. Li, I. Nishi, K.-J. Hsiao, K. Choeh, Y. Yang, W.-L. Hwu, J.K.V. Reichardt, F. Palmieri, Y. Okano, T. Saheki, Screening of nine SLC25A13 mutations: their frequency in patients with citrin deficiency and high carrier rates in Asian populations, *Mol. Genet. Metab.* 80 (2003) 356–359.
- [27] T. Saheki, K. Kobayashi, M. Iijima, M. Horiuchi, L. Begum, M.A. Jalil, M.X. Li, Y.B. Lu, M. Ushikai, A. Tabata, M. Moriyama, K.-J. Hsiao, Y. Yang, Adult-onset type II citrullinemia and idiopathic neonatal hepatitis caused by citrin deficiency: involvement of the aspartate glutamate carrier for urea synthesis and maintenance of the urea cycle, *Mol. Genet. Metab.* 81 (Suppl 1) (2004) S20–S26.
- [28] J.T. Lin, K.J. Hsiao, C.Y. Chen, C.C. Wu, S.J. Lin, Y.Y. Chou, S.C. Shiesh, High resolution melting analysis for the detection of SLC25A13 gene mutations in Taiwan, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 460–465.
- [29] Y. Shigematsu, S. Hirano, I. Hata, Y. Tanaka, M. Sudo, N. Sakura, T. Tajima, S. Yamaguchi, Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 776 (2002) 39–48.
- [30] M. Yazaki, Y.-i. Takei, K. Kobayashi, T. Saheki, S.-I. Ikeda, Risk of worsened encephalopathy after intravenous glycerol therapy in patients with adult-onset type II citrullinemia (CTLN2), *Intern. Med.* 44 (2005) 188–195.
- [31] H. Takahashi, T. Kagawa, K. Kobayashi, H. Hirabayashi, M. Yui, L. Begum, T. Mine, S. Takagi, T. Saheki, Y. Shinohara, A case of adult-onset type II citrullinemia—deterioration of clinical course after infusion of hyperosmotic and high sugar solutions, *Med. Sci. Monit.* 12 (2006) CS13–CS15.

# 新しい新生児マススクリーニング： タンデムマス法について\*

山口清次<sup>1)</sup>

**KEYWORDS** タンデムマス法, 新生児マススクリーニング, 有機酸代謝異常症, 脂肪酸代謝異常症, 拡大スクリーニング

(臨床検査 56:770-776, 2012)

## 1. はじめに

新生児マススクリーニングとは、知らずに放置するとやがて重大な健康被害の起こるような代謝疾患を、発症前に発見して障害を予防する事業である。わが国では1977年から全国的に開始され、これまでに約4,300万人の新生児が検査を受け、1万人以上の小児が障害から免れたと考えられている<sup>1,2)</sup>。

新しいスクリーニング検査技術として、最近“タンデムマス法”が開発され普及しつつある<sup>3,4)</sup>。タンデムマス法では、1回の検査で多数の疾患をスクリーニングできるため、小児の障害予防事業を拡大できる技術として普及しつつあるので、現状を紹介したい。

## 2. これまでの新生児マススクリーニング

わが国ではこれまで、表1に示すような6疾患が対象となっている。方法は、Guthrie法、酵素法、Beutler法、ELISA法(enzyme-linked immunosorbent assay)などが用いられている<sup>2)</sup>。このうち先天性甲状腺機能低下症は、頻度が約3,000人に1人と最も高く、治療薬(レボチロキシンナトリウム水和物)は安価で、早期に治療を開始すれば予後も良く、費用便益の最も良い対象疾患である。副腎過形成症も約1.7万人に1人で

ある。

一方、アミノ酸代謝異常症3疾患では、フェニルケトン尿症の発見頻度は7万人に1人であるが、他の2疾患は数十万人に1人と、極めて稀である。ガラクトース血症は3~4万人に1人発見されるが、大部分は門脈形成異常や原因不明の一過性の症例が占め、先天的酵素欠損によるガラクトース血症1型の頻度は80万人に1人である。極端に稀な疾患は、マススクリーニング対象疾患として疑問視されることもある。

## 3. タンデムマス法導入による拡大スクリーニング

タンデムマスは、質量分析計を直列に2台並べた構造の分析機器で、超高感度分析できる機器である。使用する検体はこれまでと同じ血液ろ紙の約3mmのパンチでよく、1回の分析で20種類以上の疾患を一斉スクリーニングができる。ランニングコストはこれまでとあまり変わらない。分析項目はアミノ酸とアシルカルニチンで、現在対象となっているアミノ酸代謝異常症3疾患の他に、有機酸・脂肪酸代謝異常症なども発見できるようになる<sup>5,6)</sup>。

アミノ酸測定値に関しては、Guthrie法よりも精度がすぐれており、偽陽性、偽陰性も少ない。1回の分析は2分程度であり、1台のタンデムマスで、年間5万検体以上が処理できる。対象疾患が拡大すれば、それだけ発見される患者が増え、障害から救われる小児の数も増える。これを“拡大スクリーニング(expanded screening)”という<sup>7)</sup>。

\* : Expanded Newborn Mass Screenig for Inherited Metabolic Disease using Tandem Mass Spectrometry

1) YAMAGUCHI Seiji 島根大学医学部小児科・教授

表1 これまでのマススクリーニングの対象疾患と発見頻度

疾患	頻度	費用 便益	検査法
1) フェニルケトン尿症 2) メープルシロップ尿症 3) ホモシスチン尿症	1:7万 1:50万 1:80万	○ △ △	Guthrie 法 (または, 酵素法, HPLC 法)
4) ガラクトース血症(全体) (1型) (2型)	1:3万* (1:80万) (1:60万)	△	Peigen 法 (または, 酵素法, Beutler 法)
5) 先天性甲状腺機能低下症 6) 先天性副腎過形成	1:3,000 1:1.7万	◎ ○	ELISA 法

\*: ガラクトース高値の多くは酵素欠損でなく, 門脈奇形やシトリン欠損症などの2次性のもので, 真の先天性ガラクトース血症は極めて稀である. 6疾患全体での発見頻度は約1,600人に1人である.

HPLC: high-performance liquid chromatography, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

表2 タンデムマス法で発見できる代謝異常症の概略と診断マーカー

	タンデムマスの対象疾患	主な臨床症状	診断マーカー	頻度**
アミノ酸代謝異常症	● 1) フェニルケトン尿症*	けいれん, 発達遅滞	Phe	1:6万
	● 2) メープルシロップ尿症*	多呼吸, アシドーシス	Leu+Ileu, Val	1:156万
	● 3) ホモシスチン尿症*	遅れ, 発育異常	Met	1:78万
	● 4) シトルリン血症(1型)	興奮, 多呼吸, 昏睡	Cit	1:26万
	● 5) アルギニノコハク酸血症	興奮, 多呼吸, 昏睡	Cit, Cit/Arg, ASA	1:40万
	- 6) シトリン欠損症	一過性乳児肝炎類似症状	Cit, Cit/Ser, Phe, Met	1:8万
有機酸代謝異常症	● 1) メチルマロン酸血症	アシドーシス, 遅れ	C3, C3/C2	1:12万
	● 2) プロピオン酸血症	アシドーシス, 遅れ	C3, C3/C2	1:5万
	● 3) イソ吉草酸血症	アシドーシス, 体臭	C5	1:52万
	● 4) メチルクロトニルグリシン尿症	筋緊張低下, ライ症候群	C5-OH	1:16万
	● 5) ヒドロキシメチルグルタル酸血症	重症低血糖, 発達遅滞	C5-OH	-
	● 6) 複合カルボキシラーゼ欠損症	湿疹, 乳酸アシドーシス	C5-OH	1:52万
	● 7) グルタル酸血症1型	アテトーゼ, 遅れ	C5-DC	1:18万
	- 8) βケトチオラーゼ欠損症	重症ケトアシドーシス発作	C5-OH, C5:1	-
脂肪酸代謝異常症	● 1) MCAD 欠損症	ライ症候群, SIDS	C8	1:10万
	● 2) VLCAD 欠損症	低血糖, 筋肉, 心障害	C14:1	1:16万
	● 3) 三頭酵素欠損症	ライ症候群, SIDS	C16-OH, C18-OH	-
	● 4) CPT1 欠損症	ライ症候群, 肝障害	C0/(C16+C18)	1:31万
	- 5) CPT2 欠損症	ライ症候群, 筋肉症状	(16+C18:1)/C2, C16	1:26万
	- 6) TRANS 欠損症	ライ症候群, SIDS	(16+C18:1)/C2, C16	-
	- 7) 全身性カルニチン欠乏症	ライ症候群, SIDS	C0(低下)	1:26万
	- 8) グルタル酸血症2型	ライ症候群, 低血糖	C8, C10, C12 など	1:31万

●=1次対象疾患(16疾患), \*: 現行マススクリーニングの対象疾患, 新~乳: 新生児から乳児期, \*\*: 2011年までのタンデムマス試験研究のデータ.

SIDS: sudden infant death syndrome(乳幼児突然死症候群), MCAD: medium-chain acyl-CoA dehydrogenase(中鎖アシル-CoA 脱水素酵素), VLCAD: very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase(極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素), CPT: carnitine palmitoyltransferase(カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ), SCHAD: short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase(短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素).

タンデムマス法で発見される疾患と診断マーカーを表2にリストしている. 理論的には20数種類の疾患が発見できるが, 現時点で, 見逃しが極めて少なく, 発見すれば治療効果が期待できる16疾患を“1次対象疾患”としている. 一方, 現

時点では, 見逃し例が相当数ありうる疾患や, 治療効果が十分に確認されていない疾患は“2次対象疾患”として, 引き続き検討するとしている<sup>8,9)</sup>.



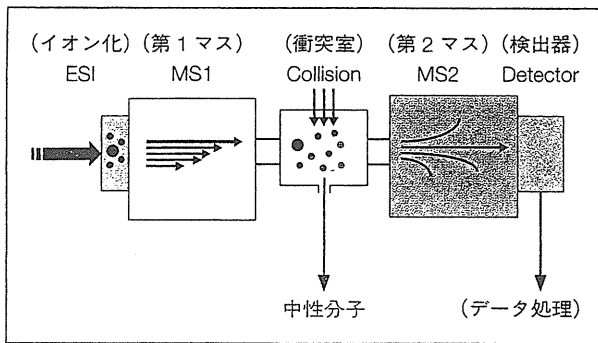


図1 タンデムマス法の原理

ESI: エレクトロスプレーイオン化, MS1: 第1マス室(プレカーサーイオン測定), 衝突室でアルゴンガスの粒子によって断片化, MS2: 第2マス室(プロダクトイオン測定). アシルカルニチンはMS1でのプレカーサーイオンをスキャンすることによって測定される. アミノ酸は, プレカーサーイオンとプロダクトイオンの質量数が一定の差を持っているときに, そのプレカーサーイオンが測定される.

#### 4. 新しい対象疾患と診断マーカー

表2に示すように, 新しく加わる対象疾患として, アミノ酸代謝異常症に含まれる尿素回路異常症の他, 有機酸・脂肪酸代謝異常症がある. 尿素回路異常症はアミノ酸から生じるアンモニアの処理ができないために高アンモニア血症を起こす. 有機酸代謝異常症は, アミノ酸の中間代謝過程の酵素障害によって有機酸が体内に蓄積する. 脂肪酸代謝異常症は,  $\beta$ 酸化系に障害があるため, ブドウ糖からのエネルギー供給が低下したとき, エネルギー産生不全におちいる.

これらの臨床症状は, 生後数日からみられる哺乳低下, 多呼吸, 意識障害, あるいは感染などを契機に急性発症する急性脳症, 突然死などである. 一部の疾患では, 生後数か月頃から徐々に発達障害が進行するものもある<sup>10)</sup>.

診断マーカーは, アミノ酸代謝異常症と尿素回路異常症ではアミノ酸, 有機酸・脂肪酸代謝異常症ではアシルカルニチンである.

アミノ酸自動分析計に比べると, タンデムマス法で測定できるアミノ酸は限られているので, スクリーニング対象疾患も限られる. またアシルカルニチン分析では, アシル基を反映する質量数だけの情報となるので, 異性体の鑑別はできない.

#### 5. タンデムマス法の概略

タンデムマスは2つの質量分析計が直列に並んだ構造を持つ. 図1に示すように, エレクトロス

プレーイオン化法(electrospray ionization; ESI)でイオン化された試料が第1質量分析室(第1マス)で質量分析される. この時測定された粒子をプレカーサーイオン(親イオン)という. 続いて衝突室でアルゴンガスの粒子に衝突して, 粒子は一定の法則で断片化される. これをプロダクトイオン(断片)といい, 第2マスで質量分析される<sup>11~13)</sup>.

アシルカルニチンは  $m/z$  85 の断片をもつことを利用して, 第2マスに  $m/z$  85 の断片が入ると, 第1マスでの親イオンを測定する. これを“ペアレントイオンスキャン法”という.

一方, アミノ酸の場合, 衝突室で断片化されたとき中性分子が発生し第2マスには到達できず, ここで失われる. この中性分子は一定の法則に従って生成され, アミノ酸ごとに特定の質量数である. 例えば, Val, Leu, Met, Phe など多くのアミノ酸では質量数 46 (非誘導体化法の場合) の中性分子が失われる. このことを利用して第1マスで測定した粒子の質量数と第2マスで測定した質量数の差が一定の数(多くは 46) のとき, 第1マスで測定した質量数の粒子のイオン強度を測定してアミノ酸が測定される. これを“ニュートラルロススキャン法”という.

親イオンをすべてスキャンする方法(スキャン法)とあらかじめ目的とする物質の親イオンの質量数を設定してより高感度に分析する方法(multiple reaction monitoring; MRM)とがある. MRM法では不要なイオンは測定しないため測定感度は良い. 一方スキャン法ではアシルカルニチン全体のプロフィールをみることができる.

#### 6. 検体の前処理

検体前処理として, “誘導体化法”と“非誘導体化法”とがある<sup>14,15)</sup>. その比較を表3に示した. 図2に示すように, 非誘導体化法は極めて簡便であり, マスクリーニングのような多数検体をスクリーニングするには適している. 人件費も節約できる. 一方, 血液ろ紙の抽出液をそのまま分析するため, 誘導体化法に比べ感度の高い機種が要求され, より高額な機器を必要とするため, いまだに誘導体化法を採用している施設は多い. しかし最近安価で高感度の機器が開発されたため, 今後は“非誘導体化法”が主流になるであろう.

表3 タンデムマス分析における誘導体化と非誘導体化の比較

	誘導体化	非誘導体化
長所	1. イオン化効率がよく、感度のよい分析となる 2. 質量数が大きくなるため精度のよい分析となる	1. 抽出操作のみなので測定対象物質の分解が起こりにくい 2. 危険な試薬は使わないので特別な設備が要らない 3. 調製操作が単純であり大量検体処理に適している(人件費削減可能)
短所	1. 調製操作が複雑であり、前処理の時間と人手がかかる 2. 腐食性のある試薬を取り扱うためドラフトなどの設備が必要である 3. 誘導体化の過程で化合物の分解が起こることがある 4. 誘導体化反応が不十分なとき不適切な分析となることがある	1. より高性能の機器が必要である 2. 質量数が小さい物質では精度が不十分になることがある

(文献15)より作成)

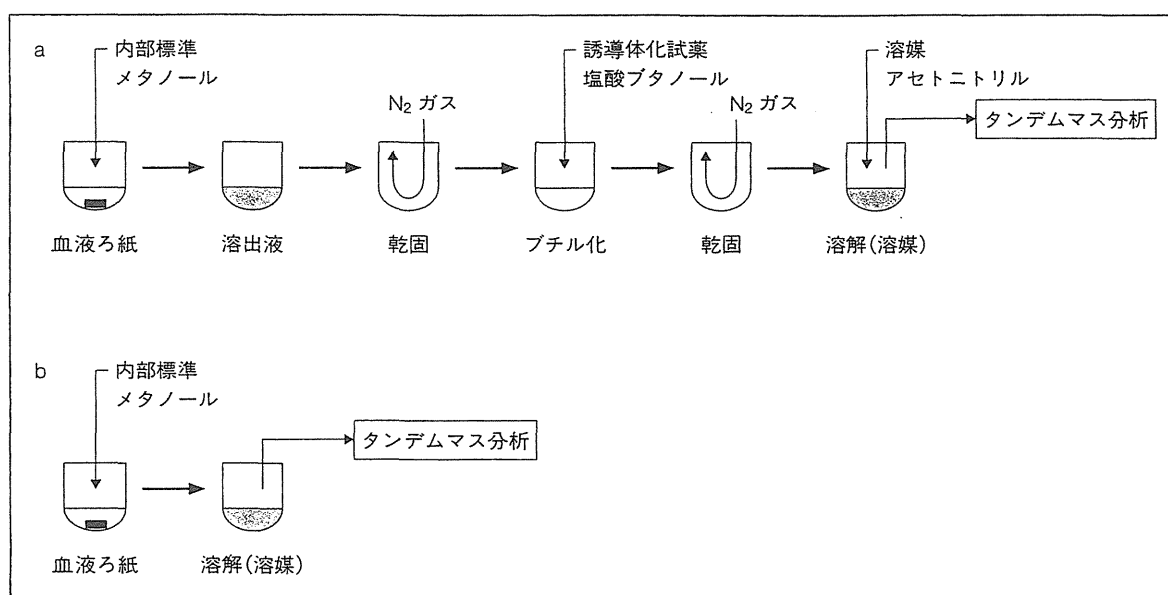


図2 検体前処理の流れ

a: 誘導体化法, b: 非誘導体化法.

### 7. スクリーニング後の確定診断

微量のサンプル(血液ろ紙検体)で検査した後、陽性者については確定診断する必要がある。スクリーニング段階で測定値がカットオフ値からかけ離れているときは、ただちに治療が必要となるが、それほどかけ離れてない場合は、再検査、精密検査によって確定診断する必要がある<sup>16)</sup>。

表4に示すように、アミノ酸に異常があり、アミノ酸代謝異常症(尿素回路異常を含む)が疑われるときには、アミノ酸自動分析計で精密に評価することによって診断できる。高フェニルアラニン血症の場合、悪性高フェニルアラニン血症と鑑別

するために血液プテリジン分析を行う。またテトラヒドロビオプテリン(BH<sub>4</sub>)反応性高フェニルアラニン血症の病型を鑑別するためにBH<sub>4</sub>負荷試験を行うことがある。

アシルカルニチンの異常から有機酸代謝異常症が疑われる場合は、GC/MS(gas chromatography/mass spectrometer)による尿中有機酸分析(note参照)によってほとんどの症例が生化学診断される<sup>17)</sup>。さらに血中カルニチンを測定して遊離カルニチン欠乏の程度を評価する。

脂肪酸代謝異常症が疑われるときには、血液ろ紙のみならず血清でアシルカルニチン分析をす

表4 確定診断のために必要な検査

検査項目の異常	疑われる疾患	確定診断の方法			
		アミノ酸分析	有機酸分析(GC/MS)	遺伝学的検査	その他
アミノ酸	アミノ酸代謝異常症	◎	○	△	BH <sub>4</sub> 負荷試験 プテリジン分析
アシルカルニチン	有機酸代謝異常症	△	◎	○	タンデムマス精査*
	脂肪酸代謝異常症	△	○	○~◎	タンデムマス精査*

◎：確定診断に必須である，○：確定診断の参考になる，△：時々必要なことがあるが原則として不要，\*：誘導体化による精査，血液ろ紙のみならず血清，尿の分析，あるいは遊離カルニチン測定などを含む。

脂肪酸代謝異常症は，タンデムマス結果が典型的で臨床検査所見もそれを支持する所見があれば確定診断可能。遺伝学的検査とは，酵素，遺伝子検査をさす。

る。全身性カルニチン欠乏症の場合は，尿中カルニチン分析も行ってカルニチンクリアランスを測定することによって診断される。脂肪酸代謝異常症のうち，一部は尿中有機酸分析で異常がみられるので診断がより確かなものになる。長鎖脂肪酸代謝異常では非ケトン性ジカルボン酸尿がみられる。短鎖脂肪酸代謝異常ではエチルマロン酸，メチルコハク酸の増加がみられる。中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase；MCAD) 欠損症では，ヘキサノイルグリシン，スベリルグリシンが検出される。またグルタル酸血症2型では，特徴的な有機酸プロフィールがみられるのでこの段階で生化学的に確定診断される。

しかし，GC/MS，タンデムマス検査で確定診断に至らないときは，末梢リンパ球や皮膚線維芽細胞を用いて酵素活性で直接確定診断する場合もある<sup>18)</sup>。また培養細胞とタンデムマス法を用いる

*in vitro* probe acylcarnitine assay (note 参照) によって酵素活性を評価する方法もある<sup>19,20)</sup>。さらに，血液や培養細胞で遺伝子検査によって確定することも少なくない。

いずれにせよ病気であるかないかは一生の問題であるので確定診断は不可欠である。確定診断のためには特殊な検査が必要になるので，全国数か所の専門施設に相談できるネットワークが構築されつつある<sup>21,22)</sup>。

#### 8. タンデムマス法導入のいくつかの課題

タンデムマス法が導入されると，マススクリーニングの質的向上が期待できる。さらにその対象疾患には乳幼児突然死 (sudden infant death syndrome；SIDS) や原因不明の急性脳症のような発症形態をとる疾患が少なくない。タンデムマス法は小児の障害予防に貢献するのみならず，小児の難病の病態解明にも貢献する可能性がある。一方，いくつかの課題もある<sup>23,24)</sup>。

#### 尿中有機酸分析

有機酸は弱酸性であり体内に増加した有機酸は体液の恒常性を維持するために，直ちに尿中に排出される。有機酸とその代謝産物は血中よりもはるかに尿中に多いので，尿中有機酸を溶媒抽出，誘導体化などの処理をしてGC/MS (gas chromatography/mass spectrometer) で測定する。代謝プロフィールから有機酸代謝異常症の生化学診断が可能である<sup>17)</sup>。

#### *in vitro* probe acylcarnitine assay

培養細胞とタンデムマス法を組み合わせた脂肪酸代謝異常の酵素診断法である。培養液はブドウ糖フリー，脂肪酸フリーでカルニチンが過剰含まれている。この培養液にパルミチン酸 (あるいはオクタン酸など) を負荷後72~96時間培養して，培養液中のアシルカルニチンを測定する。β酸化に異常があるとその障害部位に対応したアシルカルニチンが増加することで障害部位を特定する<sup>19)</sup>。

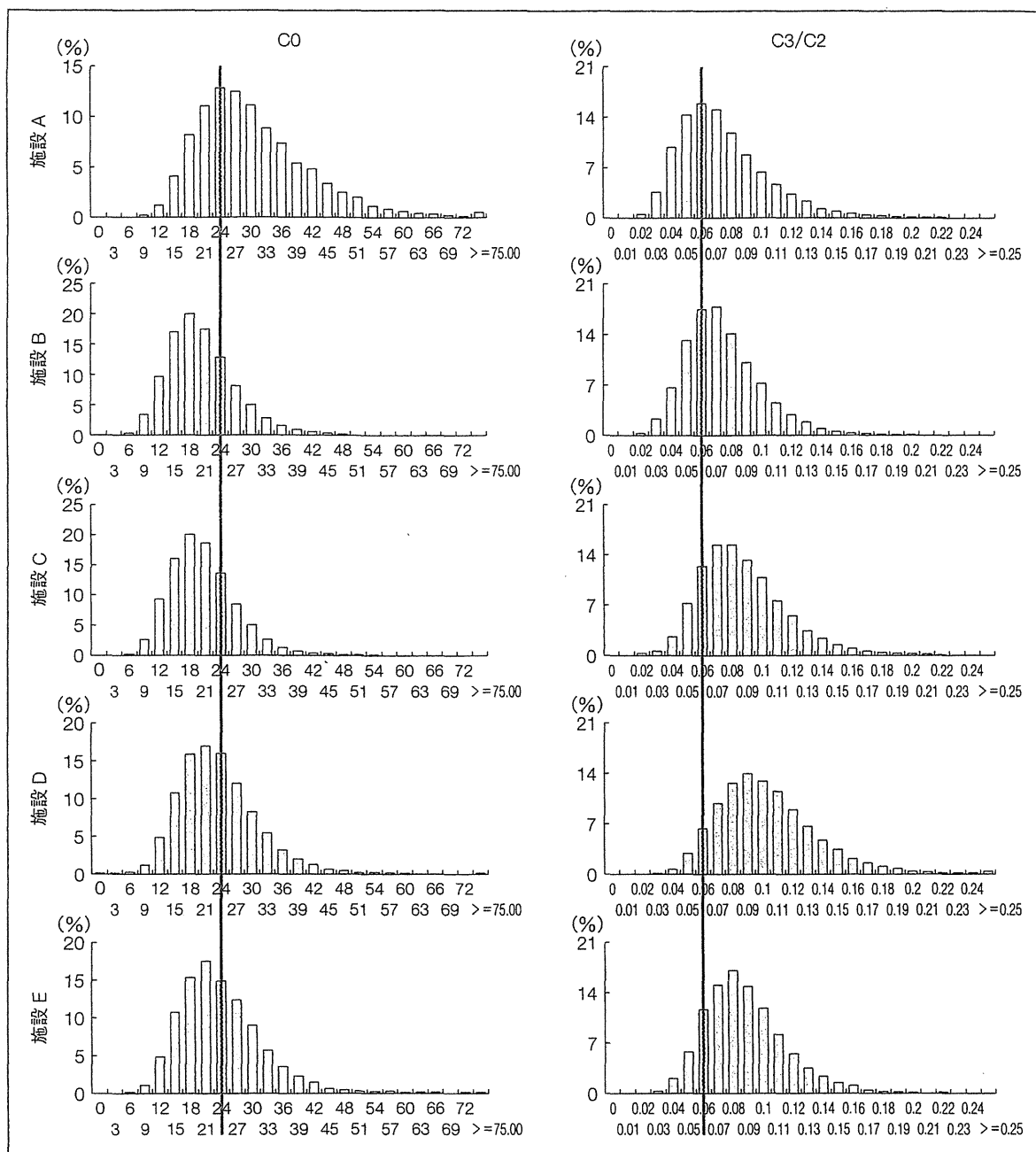


図3 施設間の測定値の差

C0：遊離カルニチン，C3：プロピオニルカルニチン，C2：アセチルカルニチン。

同じ検体を測定したにもかかわらずヒストグラムのピークが施設間でずれていることがわかる。

〔山口清次：タンデムマス Q&A 2012—厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)冊子，2012より転載〕

対象疾患が稀少疾患であり小児科医にとってなじみがなく、いったん陽性者を目の前にすると戸惑うことも予想される。全国のネットワークを充実させること、疾患の診断と治療に関連した刊行物などで継続的な啓発が必要である。

精度管理も問題となる。新規に検査を始める施設では測定値が安定するまで一定期間が必要になり、また施設ごとに“偽陽性”率が高くなった

り、“見逃し例”が出る可能性もある。全国統一の固定したカットオフ値はまだできていないので、現段階では各施設で継続的に内部精度管理や外部精度管理を受けながら、季節ごとにカットオフ値を見直す必要がある。図3に施設ごとの測定値の違いを調査した結果の一部を示している<sup>21,22)</sup>。

## 9. おわりに

微量検体で多数検体のスクリーニングが可能になり、また小児の急性脳症や、筋肉症状などを起こす先天代謝異常を簡単に診断できるタンデムマス法について述べた。タンデムマス法は新生児マススクリーニングへの導入のみならず、小児の原因不明の難病解明にも貢献するものと思われる。

本論文は厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)を受けて行った研究成果の一部である。

## 文 献

- 1) 成瀬浩, 山口清次: 新生児スクリーニングの30年. 臨床精神医学 33: 1453-1460, 2004
- 2) 山口清次: 新生児マススクリーニング Update—現在, 未来. 小児内科 41(増刊): 16-21, 2009
- 3) 重松陽介, 布瀬光子, 畑郁江, 他: Electrospray Tandem Mass Spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 8: 13-20, 1998
- 4) McCabe LL, McCabe ER: Expanded newborn screening: implications for genomic medicine. Annu Rev Med 59: 163-175, 2008
- 5) 特殊ミルク共同安全開発委員会編: タンデムマス導入にともなう新しいスクリーニング対象疾患の治療指針, 恩賜財団母子愛育会, 2007
- 6) Dhondt JL: Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. J Inher Metab Dis 30: 418-422, 2007
- 7) Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, et al: Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics 111: 1399-1406, 2003
- 8) 山口清次: 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—3年間のまとめ—平成16~18年度総合研究報告書—厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業, 2007
- 9) 山口清次: タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究—平成19~21年度総合研究報告書—厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業, 2010
- 10) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常研究の進歩. 日本先天代謝異常学会雑誌 21: 26-36, 2005
- 11) Rashed MS, Bucknall MP, Little D, et al: Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. Clin Chem 43: 1129-1141, 1997
- 12) De Jesús VR, Chace DH, Lim TH, et al: Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 411: 684-689, 2010
- 13) 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
- 14) 重松陽介, 畑郁江: 非誘導体試料調製によるタンデムマス・スクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 19: 11-17, 2009
- 15) 重松陽介, 畑郁江, 稲岡一考: タンデムマス・スクリーニングにおける非誘導体化分析. 日本マス・スクリーニング学会誌 21: 213-218, 2011
- 16) 北川照男, 松田一郎, 大和田操, 他: タンデムマス・スクリーニングで異常が発見された時の対応. 特殊ミルク情報 47: 40-48, 2011
- 17) 山口清次編: 有機酸代謝異常ガイドブック—GC/MSデータの読みかた・活かしかた, 診断と治療社, 2011
- 18) Tajima G, Sakura N, Yofune H, et al: Enzymatic diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-octenoyl-CoA production using high-performance liquid chromatography: a practical confirmatory test for tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 823: 122-130, 2005
- 19) Okun JG, Kölker S, Schulze A, et al: A method for quantitative acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using unlabelled palmitic acid: diagnosis of fatty acid oxidation disorders and differentiation between biochemical phenotypes of MCAD deficiency. Biochim Biophys Acta 1584: 91-98, 2002
- 20) Sim KG, Carpenter K, Hammond J, et al: Quantitative fibroblast acylcarnitine profiles in mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation defects: phenotype/metabolite correlations. Mol. Genet. Metab 76: 327-334, 2002
- 21) 山口清次: タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究—厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)平成23年度報告書, 2012
- 22) 山口清次: タンデムマス Q&A 2012—厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)冊子, 2012
- 23) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児スクリーニングの新時代. 小児保健研究 65: 725-732, 2006
- 24) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. 日本先天代謝異常学会雑誌 27: 36-41, 2011

# 新生児マススクリーニングの新たな展開 タンデムマス法の導入

山口清次

## はじめに

新生児マススクリーニング(以下、新生児 MS)は、知らずに放置すると障害の起こる先天性疾患を発症前に見つけて、障害を予防(または軽減)する事業である。

1950 年代にフェニルケトン尿症の治療ミルクが開発され、1960 年代にガスリーテストが発明されて以来、新生児 MS によって障害を予防するという考え方が急速に広まった<sup>1,2)</sup>。

最近、タンデムマス法という新しい検査法を導入して対象疾患を拡大する動き(拡大スクリーニング)が、世界的に普及しつつある<sup>3,4)</sup>。わが国でも 2011 年に「タンデムマス法の導入の推進」について厚生労働省課長通達が出され、現在全国自治体に広がりつつある。そこで、わが国のタンデムマス法導入による新生児 MS の新しい展開と今後の課題について述べたい。

## わが国のこれまでの新生児 MS

わが国では 1977 年から新生児 MS が全国的に開始され、2010 年までに 4,300 万人以上が新生児 MS を受け、この間 1 万人以上の小児が障害から救われたと言われている。これまで 6 疾患を対象に新生児 MS が行われてきた。その結果を表 1 に示しているが、日本人における各対象疾患の頻度、予後、費用便益も明らかになってきた。

表 1 これまでのマススクリーニングの対象疾患と発見頻度(文献<sup>1)</sup>より)

疾患	頻度	検査法	費用便益
1) フェニルケトン尿症	1:7 万	ガスリー法、	○
2) メープルシロップ尿症	1:50 万	HPLC 法、	△
3) ホモシスチン尿症	1:80 万	酵素法など	△
4) ガラクトース血症(全体) (1 型) (2 型)	1:3 万 (1:80 万) (1:60 万)	ペイゲン法、 ポイトラー法、 酵素法など	△
5) 先天性甲状腺機能低下症	1:3,000	ELISA 法など	◎
6) 先天性副腎過形成	1:2 万		○

\*ガラクトース高値症例の大部分は酵素欠損による真の先天性ガラクトース血症でなく、門脈奇形やシトリン欠損症等の 2 次性のものである。

費用便益：◎=極めて良好、○=良好、△=あまり良くない

## タンデムマス法とは

タンデムマス(タンデム型質量分析装置)は、質量分析計を直列に 2 台並べた構造の分析機器である。これまで使用してきた血液ろ紙を検体として<sup>5,6)</sup>、安価なランニングコストで、きわめて高感度に、短時間の分析で(約 2 分)、代謝産物を一斉分析し、1 回の分析で多くの疾患をスクリーニングできるため、ガスリーテストにとってかわりつつある。

対象疾患は図に示すように、現行のアミノ酸血症 3 疾患を含むアミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、および脂肪酸代謝異常症など 20 種類以

やまぐち せいじ：島根大学医学部小児科教授 連絡先：☎ 693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

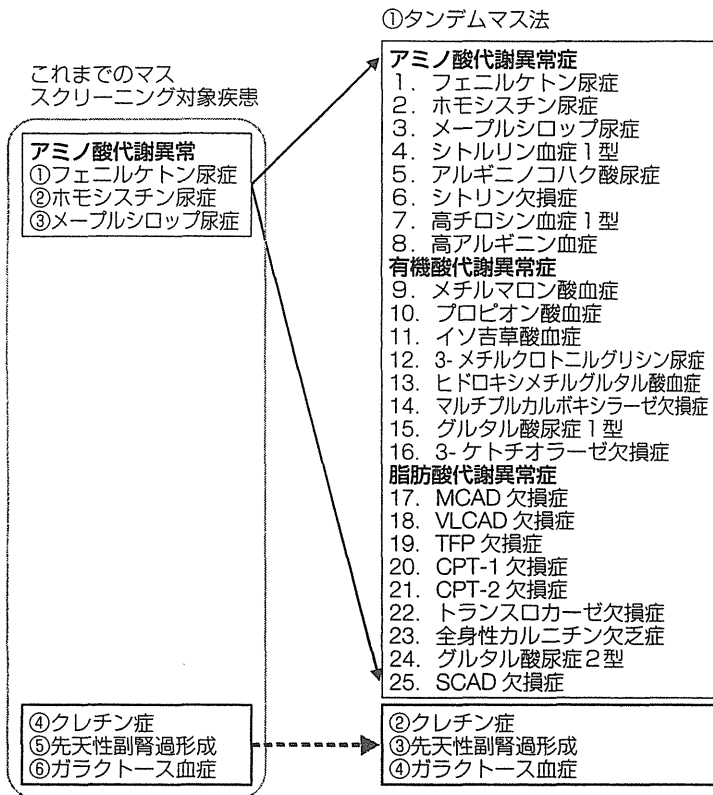


図 タンデムマス導入による拡大スクリーニング

上に広がる。

## マススクリーニング対象疾患の設定

タンデムマス法を導入すると、1回の検査で多数の疾患が検査できるが、単に多くの疾患を見つければよいものではない。結果として小児の障害予防、福祉向上に役立つものでなければならない。

公的に行われる健診事業の対象疾患の要件として、表2に示すような Wilson & Jungner(1968)がある<sup>7)</sup>。厚労省研究班では、以上の基準に照らして、16疾患を「1次対象疾患」として提言している(表3)。現時点では引き続き検討の必要なものを「2次対象疾患」としている。

## タンデムマス法による疾患発見頻度

表3に、タンデムマス法で発見できる疾患と、これまでのパイロットスタディ(157万人対象)の結果を示している。発見頻度は、全体では約9千

表2 Wilson-Jungnerの古典的基準とマススクリーニング対象疾患への適用(WHO, 1968)

1. 放置すると重大な健康被害をもたらしうる
2. 自然歴の明らかな病気である
3. 効果的な治療法がある
4. 発症前に診断できる
5. 受け入れられる適切な検査法がある
6. 受け入れられる社会的合意が得られている
7. 診断・治療の施設が利用可能である
8. 患者、陽性者のフォローアップ体制ができています
9. 費用対効果バランスが適切である
10. 事業の意味、内容に関して受検者の同意が得られている

人に1人であり、1次対象疾患16疾患に限ると1.1万人に1人である。

これまでの対象疾患6疾患では、年間約400~500人の患者が発見されるが、タンデムマス法導入後には、これに約100名余り患者数が新たに発見されるようになると予想されている<sup>8)</sup>。

## タンデムマス法の費用対効果

費用対効果は、表4に示すように、タンデムマス法導入は最低1.73倍から6.44倍の便益があると計算されている<sup>9)</sup>。比較のために、同じ経済学者の計算した予防接種の便益比を挙げている。水痘ワクチン4.0倍以上、ムンプスワクチン5.2倍、ヒブワクチン0.25~2.08倍、肺炎双球菌ワクチン1.08倍、HPVワクチン1.94~4.90倍と計算されている。この費用対効果計算には、患者数と事業にかかる費用が関係している。

## 検討されている新しい対象疾患

新しい対象疾患として検討中の疾患を以下に示す。

### 1. ウィルソン病

4~5万人に1人の頻度の疾患で、以前パイロット研究されたが、新生児期には見逃す可能性が高く、幼児期の方が効果的であると言われてい

表3 タンデムマス法による1次対象疾患と2次対象疾患(1997~2011年のパイロット研究より<sup>9)</sup>)

	疾患	発見頻度*
1次対象疾患	アミノ酸代謝異常	
	1) フェニルケトン尿症**	1:6万
	2) メープルシロップ尿症**	1:156万
	3) ホモシスチン尿症**	1:78万
	尿素回路異常症	
	4) シトルリン血症(1型)	1:26万
	5) アルギニノコハク酸血症	1:40万
	有機酸代謝異常症	
	6) メチルマロン酸血症	1:12万
	7) プロピオン酸血症	1:5万
	8) イソ吉草酸血症	1:52万
	9) メチルクロトニルグリシン尿症	1:16万
10) ヒドロキシメチルグルタル酸血症	—	
11) 複合カルボキシラーゼ欠損症	1:52万	
12) グルタル酸血症1型	1:18万	
2次対象疾患	β酸化異常症	
	13) MCAD欠損症	1:10万
	14) VLCAD欠損症	1:16万
	15) 三頭酵素欠損症	—
	16) CPT1欠損症	1:31万
	19) シトリン欠損症	1:8万
	20) 3-ケトチオラーゼ欠損症	—
	21) CPT2欠損症	1:26万
	22) TRANS欠損症	—
	23) 全身性カルニチン欠乏症	1:26万
	24) グルタル酸血症2型	1:31万

1次対象疾患とは、見逃しがきわめて少ない、発見されたとき治療効果が優れていると判断されている疾患(しかし新生児期に急性経過をとる超重症型も含まれる)。2次対象疾患とは、現時点では見逃しが相当数あると思われ、また発見された後の診断治療が必ずしも容易でないため、引き続き検討の必要と判断された疾患である。

\*発見頻度=1997~2011年までのパイロットスタディ計156万人検査の結果である(1997年より福井大学で開始、2004年より厚労省研究班で開始)。

\*\*=現行マススクリーニングの対象疾患(アミノ酸代謝異常症3疾患)。

略字(疾患名):MCAD=中鎖アシル-CoA脱水素酵素;VLCAD=極長鎖アシル-CoA脱水素酵素;CPT=カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ;SCHAD=短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素。

1)~16)は1次対象疾患、19)~24)は2次対象疾患。

る<sup>10)</sup>。

## 2. 重症複合型免疫不全症(SCID)

本症では易感染性があり、また生ワクチンなどで重大な予防接種禍を起こすことがある。患者頻度は4~5万人に1人と言われ、TREC<sub>s</sub>という因子を血液ろ紙を使ってPCR法で測定する<sup>11)</sup>。

表4 タンデムマス・スクリーニングと予防接種の費用対効果

	増分便益費用比 (BCR)	増分純便益 (NET)
タンデムマス	1.73~6.44	71~143億円
水痘ワクチン	4.0以上	522億円
ムンプスワクチン	5.2	379億円
ヒブワクチン	0.25~2.08	-322~477億円
肺炎双球菌7価ワクチン	1.08	51億円
HPVワクチン(子宮頸癌)	1.94~4.90	305~1,263億円

※タンデムマスの場合、設定する検査費用によって差がある。1検体あたり2,000円(6.44倍の便益)~8,000円(1.73倍の便益)である。大日らより引用<sup>20)</sup>。

欧米では採用する国が増えつつある。

### 3. リンソーム病

ムコ多糖症やファブリー病などを対象に、血液ろ紙を使って酵素活性を見る方法である。酵素補充療法をより早期に開始することによって、QOL(quality of life)を高めることが期待されている。高額な治療費、治療効果の限界、発症時期の問題などが課題である<sup>12)</sup>。

### 4. 胆道閉鎖症の便カラーカード

1か月健診の時に便の色を見る方法であり、簡単に安価である。平成24(2012)年度から母子手帳に便カラーカードが採用されている。胆道閉鎖症の外科手術の予後がまだ確実でない点が課題である。

### 5. サイトメガロウイルス感染症

PCR法で検討されている。難聴の原因となる。発見後の治療効果が課題である<sup>13)</sup>。

## 新生児MSの今後の課題

新生児MS事業が開始されて35年が経過する。事業開始当初に発見された患者はすでに成人している。タンデムマス法の導入を機に、いくつかの課題が提起されている<sup>14)</sup>。主な項目を表5に示している。

### 1. 精度管理の充実

新生児MSは、新生児にとって生涯に1回きりの検査であり、基本的に見逃しは絶対に許されな



表5 新生児マススクリーニングの諸問題

(1) 精度管理の充実	見逃し例, 偽陽性例の対策
(2) 全国的診療支援体制の整備	稀少疾患の確定診断, 治療コンサルタント等のコーディネート
(3) 患者の長期追跡体制	患者登録とフォローアップ体制
(4) 遺伝カウンセリング体制	重症型の存在, 長期予後に対する説明, 患者家族のサポート
(5) 患者のQOL向上	親の会との情報交換
(6) 患者の成人後の支援	成人後の医療費支援, 特殊ミルク等の安定供給
(7) 検査機関の効率的配置	タンデムマス適正配置による事業の効率化
(8) 中央コントロール組織	地域格差をなくすための中央組織の必要性

い。一方カットオフ値を下げて偽陽性が増えると、出産直後の家族にとっての精神的ストレスは小さくない。倫理的問題がある。

そして測定値は、同じ機種でも施設間で異なり、また時期によって微妙に異なることが少なくない。内部、外部の精度管理を継続的に続ける必要がある。そして第三者機関でチェックを受ける体制が必要である。

## 2. 全国的診療支援体制の整備

新生児MSで発見される疾患は、稀少疾患である。小児科専門医と言えども、スクリーニング陽性者を前にすると戸惑うかもしれない。しかし日本のどこで発見されても、適切な対応が取れる体制を作るためには、各自治体で、中核医師、中核医療機関を指定し、その医師が窓口となって、稀少疾患の専門機関のネットワークを利用する体制が現実的である。この他、ガイドライン、診療マニュアルなども充実する必要がある。

## 3. 患者の長期追跡体制

平成13(2001)年度より、新生児MS事業が自治体事業となって以後、個人情報扱いの制約のために、新生児MSで発見された患者の長期予後が把握しにくい状況となっている。新生児MS事業の評価、また稀少疾患に対する診療技術向上の

ためにも、長期的な患者追跡体制は不可欠である。

## 4. 遺伝カウンセリング体制

タンデムマス対象疾患の中には、新生児期に発症したために新生児MS結果が間に合わないケースもある。反対に、無症状で治療の必要性がないような症例も見つかることもある。また新生児MSによって、無症候性の保因者や、母親の病気が偶然見つかることもある。

家族の受けとめ方をよく理解しながら、正確な知識を伝え、必要以上のストレスから解放し、また適切な生活上の助言をして重篤な発作の予防に努める必要がある。

## 5. 患者のQOL向上

新生児MSの対象疾患は、稀少疾患のために、患者家族は相談できる人が少なく、孤独に陥りやすい。患者家族会と、行政、医療スタッフや研究者との交流の場を作ることによって、いろいろな情報を得ることは、患者家族のQOL向上の面からも効果的であると思われる。患者家族の生の声は、研究の方向性に反映させることもできる。

## 6. 患者の成人後の支援

新生児MS対象疾患は、原則として小児慢性特定疾患事業の対象となっており、患者家族の医療費自己負担分は補助される。しかし現在の制度では、20歳を過ぎると自己負担が発生し、場合によっては月々数万円の負担となる。このために成人後に治療をやめ、徐々に症状が出るケースが問題になりつつある。これでは新生児MSの効果を台無しにする可能性がある。

また食事療法に必要な特殊ミルクも、現時点では原則20歳までが対象である。特殊ミルクは通常のミルクに比べて高価であるが(数倍から10倍のコストがかかる)、これまでは、乳業メーカーのボランティアに頼る面が大きかった。特殊ミルクの安定的供給体制を考える時期に来ている。

## 7. 検査機関の効率的配置

タンデムマス機器の価格は現時点では約3千万円で、初期投資額は大きい。またその後の保守点検費用として年間約200万円が必要である。タン

デュムマス 1 台で年間 5 万検体以上を分析する能力がある。したがって 1 台の機器でできるだけ多数の検体を分析する方が効率的であり、精度管理の面からも有利である。

研究班は、タンデムマス導入にあたって、近隣の自治体と調整して、1 台のタンデムマスで少なくとも年間 3 万以上の検体を分析することを提言している。

## 8. 中央コントロール組織

地方分権の流れの中で、わが国の新生児 MS は、平成 13(2001)年度より国から自治体事業に移行した。以後、新生児 MS 事業は自治体の裁量に任されている。その結果、新生児 MS にかかる予算、事業評価、質の維持、患者の追跡方法などは、自治体によって温度差が生まれている。何らかの中央組織を置いて、自治体と連携を取りながら、技術者研修、精度管理、患者登録、長期追跡、経費節減、社会啓発活動などを継続的に行うことが望ましい。

## おわりに

あらゆる病気は基本的に「治療よりも予防」が大切である。特にこれから長い人生を歩む小児では、重要なテーマである。新生児 MS はその代表的な事業の 1 つであろう。しかし対象疾患に満たすべき要件があるように、ただ隠れている病気を見つけて家族に伝えれば済む問題ではない。事業推進には倫理的、社会的、法的判断の求められる面がある<sup>15)</sup>。これらを念頭に置いて、新生児 MS 拡大による小児の福祉向上を進める必要がある。

本研究は厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)を受けて行ったものである。

## 文 献

- 1) 成瀬浩, 山口清次: 新生児スクリーニングの 30 年. 臨床精神医学 **33**: 1453-1460, 2004
- 2) Dhondt JL: Neonatal screening; from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. J Inherit Metab Dis **30**: 418-422, 2007
- 3) McCabe LL, McCabe ER: Expanded newborn screening; implications for genomic medicine. Annual Review of Medicine **59**: 163-175, 2008
- 4) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代. 小児保健研究 **65**: 725-732, 2006
- 5) 重松陽介, 他: Electrospray tandem mass spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 **18**: 13-20, 1998
- 6) Shigematsu Y, et al.: Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. J Chromat B **776**: 39-48, 2002
- 7) Wilson JMG, Jungner G: Principles and practice of screening for disease. p 163, World Health Organization, Geneva, 1968
- 8) 山口清次: タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)平成 23 年度報告書, 2012
- 9) 大日康史, 菅原民枝: MS/MS マススクリーニングの費用対効果の予防接種との比較および国際比較. 厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」平成 22 年度報告書, pp 123-125, 2011
- 10) 青木継稔, 他: 将来マス・スクリーニングに取りあげられる可能性の高い疾患について. 小児科診療 **63**: 1385-1390, 2000
- 11) 中川紀子, 他: TRECs 定量を用いた重症複合型免疫不全症に対する新生児マススクリーニング法の開発. 日本マス・スクリーニング学会誌 **19**: 249-253, 2009
- 12) 田中あけみ: ムコ多糖症のマス・スクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 **18**: 224-228, 2008
- 13) 古谷野伸, 他: 先天性サイトメガロウイルス感染マススクリーニングについて. 日本マス・スクリーニング学会誌 **21**: 9-14, 2011
- 14) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. 日本先天代謝異常学会雑誌 **27**(1): 36-41, 2011
- 15) 松田一郎: 新生児スクリーニングに関する倫理的、法的、社会的問題の歴史的背景. 日本マス・スクリーニング学会誌 **19**: 189-215, 2009

## タンデムマス・スクリーニングのカットオフ値 —各指標の施設間差の検討—

花井潤師<sup>1)</sup>、野町祥介<sup>1)</sup>、高橋広夫<sup>1)</sup>、三觜 雄<sup>1)</sup>、佐々木純子<sup>2)</sup>、磯部充久<sup>3)</sup>、石毛信之<sup>4)</sup>、穴澤 昭<sup>4)</sup>、安片恭子<sup>5)</sup>、木下洋子<sup>6)</sup>、山上祐次<sup>6)</sup>、酒本和也<sup>7)</sup>、田崎隆二<sup>8)</sup>、小林弘典<sup>9)</sup>、山口清次<sup>9)</sup>、重松陽介<sup>10)</sup>

- 1) 札幌市衛生研究所, 2) 公益財団法人岩手県予防医学協会, 3) さいたま市健康科学研究センター
- 4) 公益財団法人東京都予防医学協会, 5) 公益財団法人ちば県民保健予防財団
- 6) 公益財団法人神奈川県予防医学協会, 7) 大阪市環境保健協会
- 8) 一般財団法人化学及血清療法研究所, 9) 島根大学小児科
- 10) 福井大学医学部看護学科健康科学

### 【要 旨】

タンデムマス・スクリーニングにおいて、カットオフ値の標準化の可能性を統計学的手法により検討するため、検査データから直接ヒストグラムや基礎統計量を計算することができるワークシートを作成し、事業もしくは研究的にタンデムマス・スクリーニングを開始している国内10施設の各指標の正常値の分布、陽性率等を比較した。

その結果、前処理条件、測定機器、内標の違いなどにより、正常値の分布、陽性率は必ずしも同一の傾向を示さない場合があることが確認された。そのため、カットオフ値の設定に当たっては、前処理法や測定条件に応じて、各指標ごとの正常値分布や陽性率を確認し、適正なカットオフ値を設定するとともに、一定期間ごとに、正常値分布を確認するなどの内部精度管理を実施すべきであると考える。

### 【キーワード】

タンデムマス・スクリーニング, カットオフ値, 正常値, ヒストグラム

### 緒 言

タンデム質量分析計を用いる新生児マス・スクリーニング（以下、タンデムマス・スクリーニング）においては、各対象疾患をそれぞれ一つの検査指標で判定する従来の検査とは異なり、一回の検査で得られる複数の指標により、多種

類の疾患について同時に判定を行う必要がある。現在、厚生労働研究班などを中心に、検査法やカットオフ値の標準化の検討を行っている<sup>1,2)</sup>。しかし、カットオフ値の標準化を行う場合、測定機器の種類や前処理方法、使用する内部標準物質（以下、内標）の違いなどによる測定値の分布に、大きな違いがないことが前提となる。

今回、厚生労働科学研究班「タンデムマス導入による新生児マス・スクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究」の分担研究「タンデムマス診断精度向上・維持、対象疾患設定に関する研究」（研究分担者 重松陽介）の一環として、タンデムマス・スクリーニングを開始している10施設について、共通の統計処理によ

### <連絡先>

花井 潤師

〒003-8505 札幌市白石区菊水9条1丁目

札幌市衛生研究所保健科学課

Tel:011-841-7672 Fax:011-841-7073

E-mail: junji.hanai@city.sapporo.jp

る正常値のヒストグラムを作成し、前処理法や測定機器による各指標の分布の違いや各疾患ごとの陽性率などを確認した<sup>9)</sup>。その結果、カットオフ値の標準化の可能性と問題点、今後、タンデムマス・スクリーニングを導入にあたって、考慮すべき重要な知見が得られたので報告する。

方法

(1) 調査内容

各指標について、ヒストグラム、基礎統計量、カットオフ値、陽性率、精査率を調査した。

(2) 対象施設と対象データ

対象施設は、すでにタンデムマス・スクリーニングを開始している10施設(施設A~施設J)で、対象データは初回採血検体による検査結果から患者検体のものを除いた測定値とした。各施設のタンデムマスの測定条件と対象検体数を表1に記載した。

(3) 対象とした指標

アミノ酸：Val, Leu+Ile, Met, Phe, Cit

アシルカルニチン：C0, C2, C3, C5, C5-DC, C5-OH, C8, C10, C14:1, C16

アシルカルニチン比：C3/C2, C14:1/C2, C0/(C16+C18), (C16+18:1)/C2, C8/C10

(4) ヒストグラム作成ワークシート

ヒストグラム作成ワークシートは、神経芽細胞腫スクリーニングのカットオフ値を検討する際に作成<sup>9)</sup>したものをタンデムマス・スクリーニング用に改良し、各施設に配布した。

ワークシートは、生データを貼り付けること

により、直接ヒストグラムや基礎統計量を計算し、表示することが可能なもので、かつカットオフ値や度数分布の刻み幅を変更できるよう汎用性を持たせた。また、1回のデータ処理で4種類の指標について処理可能なものを用いた。

結果シートにはヒストグラムに加え、パラメトリックな統計量として平均(以下M)と標準偏差(以下SD)を計算し、M±3SDを超える測定値を1回棄却した残りのデータのM, SDから、M+3SD, M+5SD, M+7SDを計算した。さらに、ノンパラメトリックな統計量として、99パーセンタイル(以下,%タイル), 99.5%タイル, 99.9%タイルを算出した。また、それぞれの値に対する陽性数及び陽性率を表示した。その他に中央値とともに、カットオフ値について、中央値の何倍かを示す指標MOM(Multiple of Median)を表示した。

結果

(1) 正常値の分布

ヒストグラム作成ワークシートの集計結果は、各指標ごとに各施設のヒストグラムを一覧表で示すことにより、平均値や中央値などの施設間の絶対値が比較可能であり、さらに、ヒストグラムの形状を比較することにより、施設間の測定値のばらつき具合が目視的に比較可能であった。図1にC3/C2比の集計結果を例示した。

(2) カットオフ値

タンデムマス・スクリーニングのカットオフ値については、厚生労働研究班の検討結果とし

表1. 各施設のタンデムマス測定条件

施設名	前処理法	タンデムマス機種名	内部標準物質	対象検体数
A	誘導体化法	Quattro micro API (Waters Corporation,USA)	CILのSetA, SetB	14,223
B	非誘導体化法	TQ detector (Waters Corporation,USA)	CILのSetA OP, SetB OP	8,804
C	誘導体化法	Premier XE (Waters Corporation,USA)	CILのSetA OP, SetB OP	715
D	誘導体化法	Quattro micro API (Waters Corporation,USA)	CILのSetA, SetB	17,692
E	誘導体化法	API 3200 (AB Sciex)	CILのSetA, SetB	34,389
F	誘導体化法	API 3200 (AB Sciex)	CILのSetA, SetB	5,530
G	非誘導体化法	TQ detector (Waters Corporation,USA)	CILのSetA OP, SetB OP	16,117
H	非誘導体化法	API4000 (AB Sciex)	自家製	4,089
I	誘導体化法	TQ detector (Waters Corporation,USA)	CILのSetA, SetB	17,401
J	非誘導体化法	TQ detector (Waters Corporation,USA)	NeoBase MSMS kit (Perkin Elmer)	58,729