

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 教授）

False negative を防ぐために：広島での経験と取り組み

研究協力者 但馬剛（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 講師）

研究要旨

広島県地域では、タンデムマス法によるマススクリーニングの試験研究段階で、メチルマロン酸血症とCPT-2欠損症の偽陰性発症患者を各1例経験したことから、迅速な確定/除外診断法の整備と積極的な陽性判定・精査に取り組んでいる。CPT-2欠損症では迅速な酵素活性測定法を確立し、現行の指標による確実かつ効率的な患者発見体制を実現した。メチルマロン酸血症では、陰性判定後に重篤な症状を発症したビタミンB12欠乏の症例が新たに診断され、初回陽性例には二次検査として濾紙血メチルマロン酸測定を実施すべきであると考えられた。

A．研究目的

対象疾患のうち、哺乳不足 異化亢進による偽陽性の多発や、濾紙血による再検での偽陰性化が問題となっている脂肪酸代謝異常3疾患（MCAD 欠損症、VLCAD 欠損症、CPT-2 欠損症）と、現行の指標では捕捉が不確実と思われるビタミン B12 反応性メチルマロン酸血症について、基準値の調整や積極的な陽性判定・精査を試みた。

B．研究方法

広島市医師会臨床検査センターと連携して基準値を調整しながらスクリーニング検査を実施。MCAD、VLCAD、CPT-2 各欠損症は初回陽性後即精査とし、酵素活性測定と遺伝子解析を行った。これら3疾患については、県外依頼症例の診断も実施した。

C．研究結果

1) 広島県地域のスクリーニング結果

2012 年 2 月から 2015 年 12 月までの新生児 73,010 人中 83 例（0.12%；アミノ酸 14、有機酸 16、脂肪酸 53）を精査。表 1 の通り診断した。

2) スクリーニング陰性の後に急性発症した症例

広島県で出生後、5 か月～成長発達停滞、9 か月～溶血性貧血による黄疸あり、尿中メチルマロン酸・血漿ホモシステインの著増を県外施設で指摘された男児例。胃全摘歴のある母親から完全母乳栄養で哺育されており、ビタミン B12 欠乏が原因と判明した。補充療法にて代謝異常所見は速やかに正常化した。大脳萎縮像を伴う発達遅延が残っている。

3) MCAD 欠損症の診断実績

タンデムマス法によるマススクリーニング（以下、TMS スクリーニング）の自治体事業化以降、無症状での発見症例が急増し、発症後診断例は頭打ちになっている（図 1）。マススクリーニング陽性 47 例のうち 8 例（17%）が偽陽性（正常個体）3 例（6%）が保因者と判定された。比較的少数の高頻度変異が認められ、上位 5 者で 58%を占めた（表 3）。

4) VLCAD 欠損症の診断実績

本疾患も自治体事業化以降、無症状での発見症例が急増しているが、マススクリーニング陽性 61

例中 14 例 (23%) が偽陽性 (正常個体)、15 例 (25%) が保因者と判定された。追加指標として「 $C14:1 > C14 \& C12 \& C10$ 」を用いると、罹患と判定された全例 (データ不足例を除く) が満たしていたのに対し、保因者は 7 例、偽陽性は 1 例のみで、スクリーニング精度の向上に有用であった (表 4)。

5) CPT-2 欠損症の診断実績

2008 年にスクリーニング陰性例の急性発症を経験し、現行の指標「 $(C16+C18:1)/C2 > 0.62$ かつ $C16 > 3.0$ 」に変更したところ、偽陽性例が多発するようになった。これを受けて新たに実用化した酵素活性測定法を県内外の症例に応用し、迅速な確定/除外診断における有用性が確認された (表 5)。

D. 考察

TMS スクリーニングの導入以降、各対象疾患について軽症例の発見頻度増加が新たな問題となっているが、偽陰性例の急性発症は、より喫緊の課題として克服する必要がある。

1) メチルマロン酸血症

アポ酵素障害例が新生児期に重篤な症状で発症している一方、現行のマススクリーニング方法では、ビタミン B12 投与で発症を予防できる症例が十分に見つかっていないと推測される。2012 年にはコバラミン合成障害によるメチルマロン酸血症の偽陰性発症例も経験しており、両者の比較を表 2 に示した。いずれも初回濾紙血中のメチルマロン酸測定を行なっていれば捕捉可能な症例であったことから、 $C3 \cdot C3/C2$ 陽性例には上記二次検査の実施が望まれる。

2) MCAD 欠損症、LCAD 欠損症

TMS スクリーニングの試験研究初期段階から、広島大学では両疾患の酵素・遺伝子診断に取り組んできた。いずれも残存活性は定量限界域から正常レベルまで連続的に分布しており、軽症罹患者や保因者も発見されており、偽陰性のリスクは低

いと考えられる。

VLCAD 欠損症については、現行の指標が異化亢進による偽陽性を生じやすく、その低減には追加指標「 $C14:1 > C14 \& C12 \& C10$ 」が有用である。

3) CPT-2 欠損症

本研究班で行った昨年度の調査では、マススクリーニングで発見可能であった死亡例が 4 例確認された。偽陰性例の発症を機に現行の指標を設定してからは偽陽性が急増しており、真の罹患者を発見する確実性は極めて高いと考えられる。MCAD・VLCAD と同様の酵素活性測定法の確立によって、迅速な確定/除外診断も実現したことから、本疾患は現在の「二次対象疾患」という位置付けを見直して「一次対象疾患」とし、全国一律に患者の発見・発症予防に注力すべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 但馬剛, 他: タンデムマス新生児スクリーニング in 広島: 自治体事業化後の現状. 日本マススクリーニング学会誌 25 (1): 57-66, 2015.
- 2) Hara K, Tajima G, et al.: Significance of *ACADM* mutations identified from newborn screening of MCAD deficiency in Japan. *Mol Genet Metab* 2016, in press.

2. 学会発表

- 1) 但馬剛, 他: MCAD 欠損症の酵素・遺伝子診断: 14 年間の知見. 第 42 回 日本マススクリーニング学会, 東京都, 2015 年 8 月 21-22 日.
- 2) 香川礼子, 但馬剛, 他: MCAD 欠損症の酵素・遺伝子診断: 14 年間の知見. 第 57 回 日本先天代謝異常学会, 大阪市, 2015 年 11 月 12-14 日.
- 3) 原圭一, 香川礼子, 但馬剛, 他: VLCAD 欠損症確定検査より得られた知見: 新たなスクリーニング指標の有用性と新規好発変異. 第 57 回 日本先天代謝異常学会, 大阪市, 2015 年 11 月 12-14 日.
- 4) 但馬剛, 他: CPT-2 欠損症の新生児マススクリーニング: 一次対象疾患化へ向けた課題. 第 57 回 日本先

天代謝異常学会, 大阪市, 2015年11月12-14日.

表 1. 広島県地域のタンデムマス法によるマススクリーニング結果 (2013年2月~2015年12月)

指標項目	陽性	対象疾患・鑑別疾患	偽陽性	
フェニルアラニン	4	フェニルケトン尿症 軽症高フェニルアラニン血症	0 4	
分枝鎖アミノ酸	3	メープルシロップ尿症	0	3
メチオニン	3	ホモシスチン尿症 1 型 メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ欠損症 保因者 未確定：軽度高値が持続	0 1 2	
シトルリン	4	シトルリン血症 1 型 保因者 シトルリン欠損症 肝外門脈閉塞症 未確定：軽度高値が持続	1 0 1 2	
C3	5	軽症プロピオン酸血症 メチルマロン酸血症	2 0	3
C5	1	イソ吉草酸血症	1	
C5-OH	9	メチルクロトニルグリシン尿症 メチルクロトニルグリシン尿症母体からの出生 未確定：濾紙血のみ軽度高値が持続	1 1 7	
C5-DC	1	グルタル酸血症 1 型	0	1
C8	4	MCAD 欠損症	2	2
C10 (C8~C16)	3	グルタル酸血症 2 型	0	3
C14:1	23	VLCAD 欠損症 保因者 VLCAD 欠損症 保因者の疑い	2 6	15
C16, C18:1	10	CPT-2 欠損症 保因者 未確定：リンパ球脂肪酸代謝能 軽度低下 (保因者の疑い)	1 3	6
C0 高値	0	CPT-1 欠損症	0	
C0 低値	13	カルニチントランスポーター異常症 軽症例または保因者	2	11

表 2. ビタミン B12 投与で発症を防ぎ得た偽陰性例

診断年次	2012 年		2015 年	
臨床経過	生後経過良好 12 か月時 ノロウイルス胃腸炎に際して 重度アシドーシス + 高アンモニア血症 血液浄化療法を含む集中治療にて回復 後遺症なし 以後経過良好		胃切除母体より出生 完全母乳栄養 5 か月～ 成長発達停滞 9 か月時 溶血性貧血による黄疸が出現 ビタミン B12 補充にて軽快 大脳萎縮像を伴う発達遅延を遺残	
急性期 生化学 検査所見	血清 C3 14.5 μM 尿中メチルマロン酸 著増 血漿総ホモシステイン 5 μM 血清ビタミン B12 597pg/mL		血清 C3 6.7 μM 尿中メチルマロン酸 著増 血漿総ホモシステイン 131 μM 血清ビタミン B12 測定限界未満	
マスキリー ニング所見	C3 (cutoff 3.6 μM)	C3/C2 (cutoff 0.25)	C3 (cutoff 3.6 μM)	C3/C2 (cutoff 0.22)
初回濾紙血	4.79	0.23	4.84	0.22
再検濾紙血	(再検対象とせず)		3.01	0.22
初回濾紙血 二次検査所見 (後方視的)	メチルマロン酸 (cutoff 1.0 μM)		メチルマロン酸 (cutoff 1.0 μM)	総ホモシステイン (cutoff 5.0 μM)
	11.0		6.7	5.5

表 3. 遺伝子解析実施 39 家系に認められた頻度上位 5 変異

塩基	アミノ酸	アレル	家系	正常酵素に対する比活性
449-452deICTGA	P128X	22	19	ほぼ喪失
50G>A	R17H	7	7	20~30%
153C>T	R53C	7	7	10~20%
1085G>A	G362E	6	5	ほぼ喪失
843A>T	R281S	3	3	ほぼ喪失
合計		45/78 アレル		

表 4. VLCAD 欠損症に対する追加指標「C14:1>C14 & C12 & C10」の充足率

	例数	(データ不足)	全項目	2項目	1項目	0項目
罹患者	32	(7)	25/25	0/25	0/25	0/25
保因者	15	(1)	7/14	5/14	1/14	1/14
偽陽性	14	(0)	1/14	4/14	6/14	3/14

表 5. CPT-2 欠損症：遺伝子型確定症例のマススクリーニング(NBS)所見と残存活性

症 例	(C16+C18:1)/C2 (cutoff 0.62)	C16 (cutoff 3.0 μM)	CPT2 遺伝子 解析結果	CPT-2 活性(%)
NBS 偽陰性 7 か月時発症	0.75	3.45	c. 481C>T (p.R161W) c. 1148C>A (p.F383Y)	12.4
新生児期発症 = 初回採血時発症済み	19.87	29.9	c. 451C>T (p.R151W) ホモ接合体	6.1
NBS 陽性 罹患者(1)	3.01	10.6	c. 1121G>A (p.W374X) c. 1148C>A (p.F383Y)	7.2
NBS 陽性 罹患者(2)	3.27	4.98	c. 1148C>A (p.F383Y) ホモ接合体	11.1
NBS 疑陽性 保因者 (初回 C0 低値で精査)	0.51	3.58	c. 1525A>G (p.T509A) ヘテロ接合体 (de novo)	29.1
新生児期発症患者の父			c. 451C>T (p.R151W)	62.0
新生児期発症患者の母			c. 451C>T (p.R151W)	57.8

正常対照群平均活性 (n = 17) 1381.1 ± 354.4 pmol/min/10⁶cells

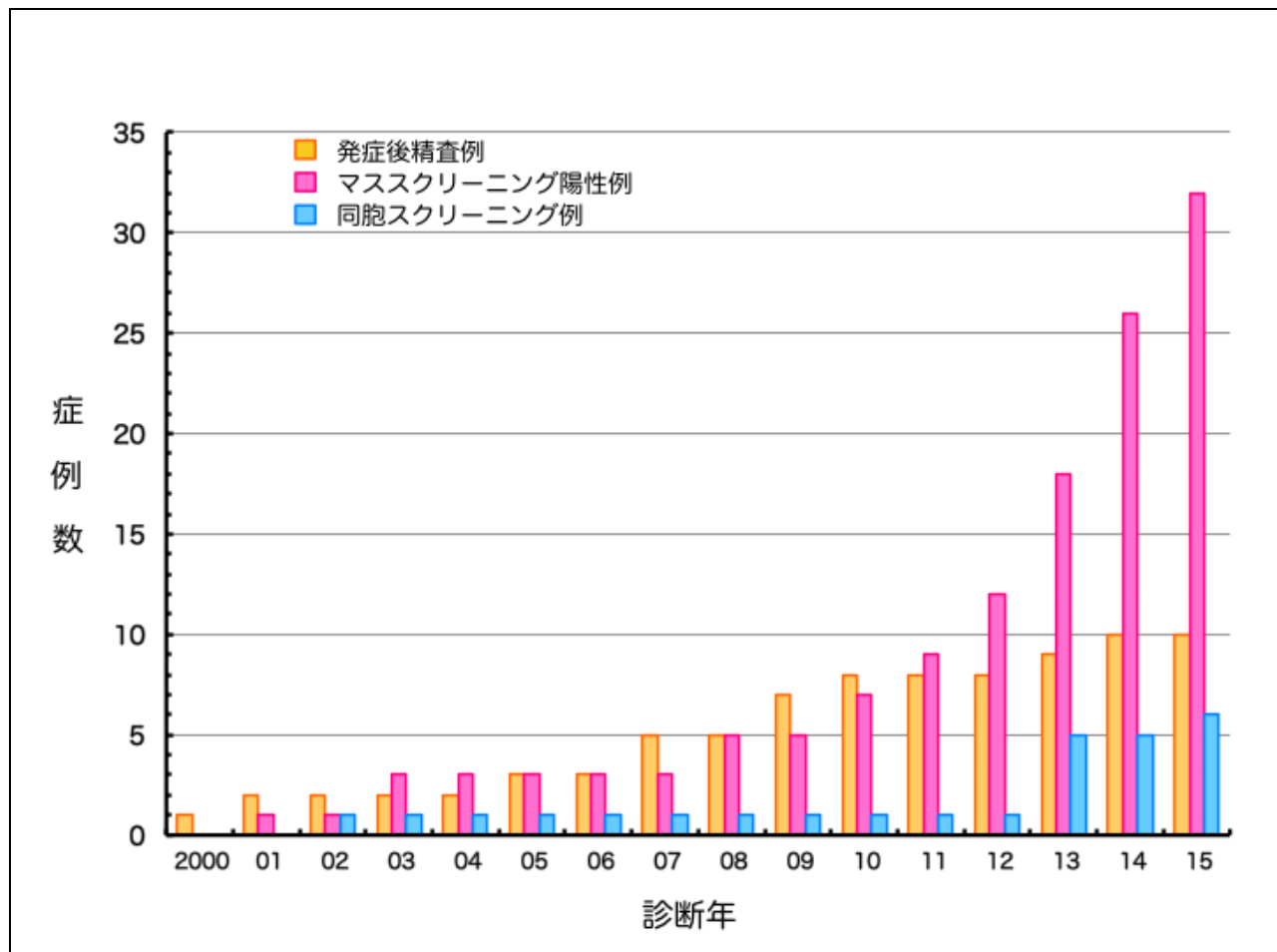


図 1. MCAD 欠損症：広島大学での診断症例数の年次推移

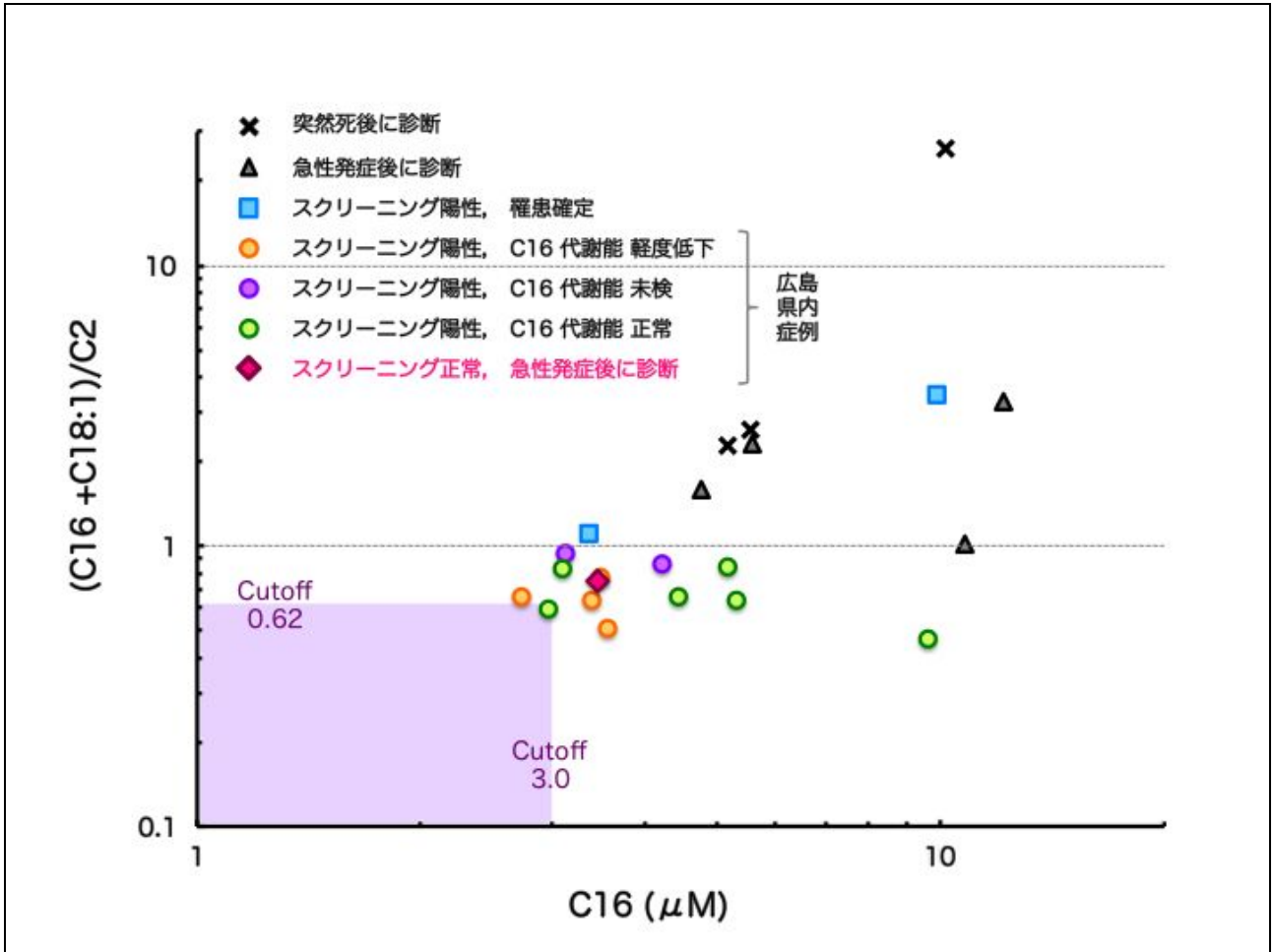


図 2. CPT-2 欠損症：初回濾紙血指標値の分布