

分担研究課題

マススクリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部小児科・客員教授）

東京都における LC-MS/MS 法を用いた二次検査法の検討（第二報）

石毛信之（東京都予防医学協会・主査）

研究要旨

メチルマロン酸（MMA）ならびに3-メチルクロトニルグリシン（3MCG）は、それぞれメチルマロン酸血症ならびに3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症（MCCD）患者の尿で排泄が増加する有機酸のひとつである。これらを液体クロマトグラフ-タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて新生児マススクリーニング（NBS）のろ紙血で定量する二次検査法について検討した。ろ紙血MMAは、メチルマロニルCoAムターゼ欠損症のみならずビタミンB12（VB12）欠乏症においても陽性となり、これらの症例の治療経過も反映して測定値が増減することが確認された。一方、ろ紙血3MCGは、C5-OH著明高値による即精査例では著明高値となり、C5-OH高値となる有機酸代謝異常症の鑑別に有用であった。また、未診断のMCCD母親による児のC5-OH高値例ではろ紙血3MCGの上昇は認められなかった。さらに、C5-OH値の上昇程度が低いMCCD罹患者、本症保因者、未診断のC5-OH軽度高値遷延例は、初回ろ紙血3MCG値のみでは判別が困難であった。

研究協力者

氏名（所属・職名）

花井潤師：札幌市衛生研究所・主査

福士 勝：札幌イムノダイアグノスティック
ラボラトリー・所長

田崎隆二：化学及血清療法研究所・検査総轄

れた例、ならびに有機酸代謝異常症を疑う症状を呈した例のろ紙血を対象（表1）とし、分離カラムに Scherzo SS-C18 (Imtakt)を用いた LC-MS/MS 法(既報)¹⁾にて MMA あるいは 3MCG を定量した。その結果について、担当医師から開示された臨床経過と併せて評価した。

A．研究目的

LC-MS/MS 法を応用し、新生児マススクリーニング（NBS）のろ紙血メチルマロン酸（MMA）ならびに 3-メチルクロトニルグリシン（3MCG）を定量し、二次検査法としての有用性について検討することを目的とした。

B．研究方法

2008-2016 年度の東京都における新生児マススクリーニングでメチルマロン酸血症/プロピオン酸血症、あるいは 3-メチルクロトニルグリシン尿症(MCCD)等を疑って要再採血・要精査と診断さ

C．研究結果

本法を用いて分析した LC-MS/MS クロマトグラムを図 1、定量データを表 2-4 に示した。

1) MMA 定量について

2015 年 4 月から 2016 年 12 月までに C3 & C3/C2 高値でメチルマロン酸血症/プロピオン酸血症疑いで要再採血となった 12 例のうち 4 例が精査となった。これらのろ紙血 MMA を後方視的に定量した。MMA が検出されたのは要精査例のうちの 2 例のみで、そのうちの 1 例では暫定カットオフ値を越えた（表 2、図 2）。これら 2 例は後の各種検査によって栄養性のビタミン B12（VB12）欠乏症と

判明し、VB12 補充によって MMA ならびに各種生化学検査は速やかに正常化した。一方、メチルマロン酸血症の既診断例ならびに有機酸代謝異常症を疑う依頼検査例で C3&C3/C2 高値であった有症状例では、ろ紙血 MMA 値は治療経過中の C3 ならびに血中アンモニアの増減とほぼ一致していた(表 3、図 3)。

2) 3MCG 定量について

2008 年から 2016 年 12 月までに C5-OH 異常高値で即精査となった MCCD 罹患者 3 例のろ紙血 3MCG は健常新生児の 100 倍程度の著明高値を呈した。また、C5-OH がカットオフ値(1.00nmol/mL)近傍で MCCD 罹患者と診断された 1 例の初回ろ紙血 3MCG はその暫定カットオフ値(0.10nmol/mL)程度の値であり、再採血時以降もほぼ同レベルの値で推移していた。一方、母親が未診断の MCCD の児と診断された例では、3MCG は健常者レベルであり、その母親では著明高値が認められた(表 4、図 4)。MCCD 罹患者はいずれも無症状で経過しているが、そのうちの 2 例のろ紙血 3MCG ならびにろ紙血・血清 C5-OH の経時変化を図 5 に示した。3MCG はろ紙血 C5-OH 上昇に伴って次第に上昇傾向にあった。

D. 考察

MMA 定量はメチルマロニル CoA 欠損症のみでなく、VB12 欠乏症の診断にも有用であった。3MCG 定量は C5-OH 著明高値による即精査例については C5-OH 高値となる疾患の鑑別に有用で、未診断の MCCD 母親による児の C5-OH 高値例ではろ紙血 3MCG の上昇は認められなかった。一方、C5-OH 値の上昇程度が低い MCCD 罹患者、保因者、未診断の C5-OH 軽度高値遷延例は、初回ろ紙血 3MCG 値

のみでは判別が困難であった。

E. 結論

これらの検査法は新生児スクリーニングの二次検査法として有用であることに加えて、患者の治療経過観察にも効果的と考えられた。両法ともにさらに分析項目を追加して症例を蓄積し、NBS の偽陽性率を低減させて検査に関連する費用や時間ならびに受検者家族の心的負担を軽減、ならびに罹患者においては早期診断の一助となるように検討を重ねたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 石毛信之、花井潤師、福士 勝、他：東京都における LC-MS/MS 法を用いたイソ吉草酸血症の二次検査法の検討。平成 27 年度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(健やか次世代育成総合研究事業))「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 75-78, 2016.

2. 学会発表

1) Second tier test for isovaleric acidemia using LC-MS/MS in Tokyo, Japan. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2016, Rome, Italy, 2016/9/6-9.

2) LC-MS/MS 法によるろ紙血メチルマロン酸定量の有用性の検討。第 58 回日本先天代謝異常学会総会, 東京都新宿区, 2016/10/27-29.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 検討対象

- メチルマロン酸血症/プロピオン酸血症が疑われて要再採血となった8例ならびに要精査となった3例(再採血例1-12)
- メチルマロン酸血症の既診断例5例(症例1-5)
- 有機酸代謝異常症を示唆する症状を来した依頼検体のうち、C3 & C3/C2の著明高値を認めた2例(症例6, 7)
- MCCDと診断された3例(症例8-10)
- MCCD保因者と診断された1例(症例11)
- C5-OH高値の児の精査の結果、母親がMCCDと診断された2例(症例12,13)
- C5-OH高値が遷延して診断が得られていない1例(症例14)

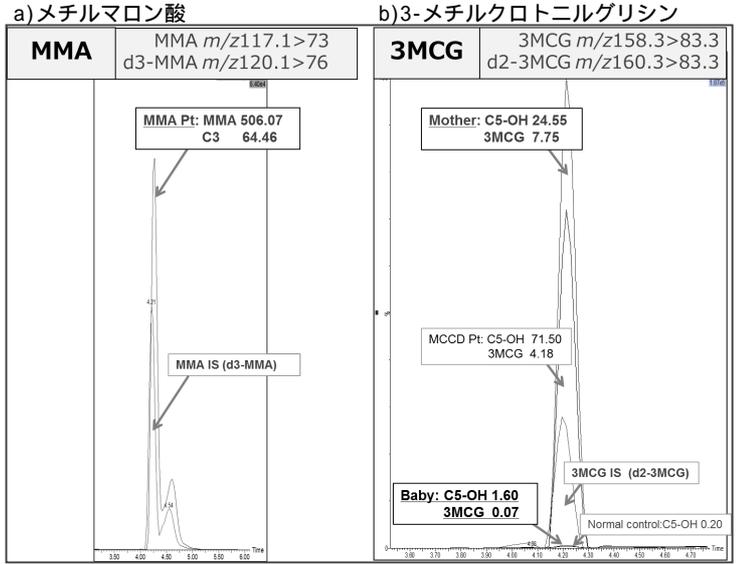


図 1 LC-MS/MS クロマトグラム

表 2 C3 & C3/C2 の高値で要再採血となった例の分析結果

再採血例	初回採血				再採血			最終判定
	C3	C3/C2	C3/Met	MMA	C3	C3/C2	C3/Met	
Controls (n=10)	2.70	0.14	0.08	N/D-0.53	—	—	—	正常
1	3.91	0.26	0.16	N/D	0.76	0.11	0.03	正常
2	4.12	0.27	0.16	N/D	1.66	0.19	0.04	
3	6.10	0.30	0.23	N/D	1.33	0.17	0.04	
4	4.18	0.26	0.20	N/D	1.79	0.19	0.09	
5	3.81	0.25	0.18	N/D	2.57	0.18	0.10	
6	4.63	0.28	0.19	N/D	2.66	0.21	0.12	
7	4.37	0.28	0.12	N/D	2.29	0.15	0.07	
8	4.66	0.26	0.20	N/D	2.23	0.21	0.08	
9	3.82	0.27	0.19	4.41	4.12	0.26	0.14	陽性
10	5.08	0.32	0.29	N/D	6.46	0.25	0.33	
11	3.74	0.26	0.34	1.75	4.72	0.34	0.18	
12	5.44	0.25	0.23	N/D	6.03	0.93	0.22	

表 3 メチルマロン酸血症患者の分析結果

症例 (診断年齢/日齢)	C3 (nmol/mL)	C3/C2	MMA (nmol/mL)	Urine MMA
1 (9years)	121.0	1.39	343.3	
2 (13years)	64.46	0.97	506.1	
3 (1years)	26.3	1.14	92.7	
4 (4years)	14.6	0.53	45.8	(↑↑↑)
5 (1years)	51.3	0.84	38.6	
6 (day 11)	49.95	4.24	506.2	
7 (day 8)	16.85	1.44	891.6	

Cut off value: C3 3.6 nmol/mL, C3/C2 0.25, C3/Met 0.25
MMA 3.0 nmol/mL

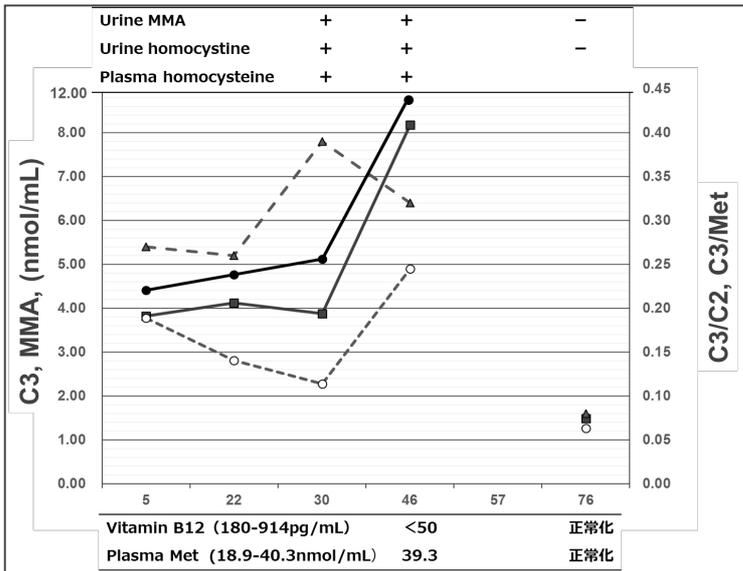


図 2 Vitamin B12 欠乏症例の検査データの時系列 (再採血例 9)

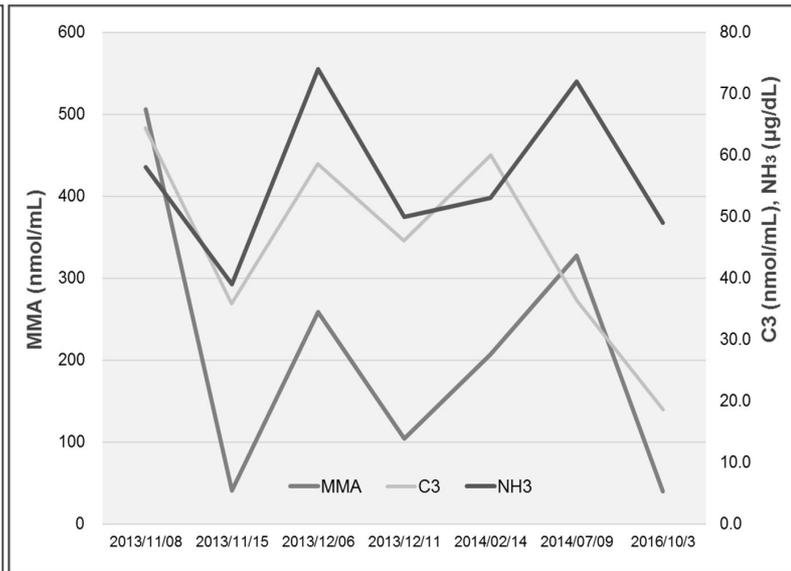


図 3 メチルマロン酸血症患者の検査データの時系列(症例 2)

表 4 対象症例の初回ろ紙血 3MCG の分析結果

症例	C5-OH (nmol/mL)	C0 (nmol/mL)	3MCG (nmol/mL)
Controls (n=18)	0.22	24.5	N/D-0.07
8 罹患者	10.38	6.36	3.13
9 罹患者	8.77	16.77	4.59
10 罹患者	1.05	16.40	0.09
11 保因者	1.09	23.48	0.28
12 児: 正常	10.34	4.70	0.07
母: 罹患者	24.63	3.97	10.38
13 児: 正常	5.62	8.28	0.05
母: 罹患者	24.55	5.98	7.75
14 C5-OH高値遷延例	1.05	13.00	0.05

Cut off value: C5-OH 1.00 nmol/mL, C0 < 8.00 nmol/mL
3MCG 0.10 nmol/mL (mean+4SD)

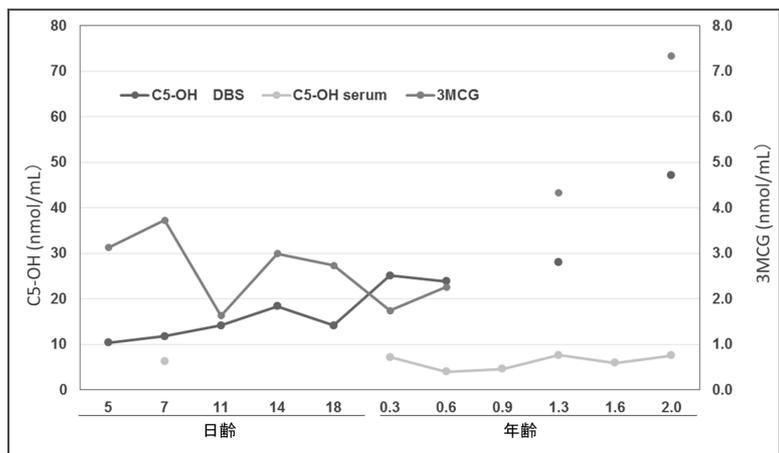


図 4 MCCD 患者の検査データの時系列 (症例 8)