

分担研究課題名：新生児マススクリーニング(NBS)の全国標準化に関する研究

研究分担者： 但馬 剛 (国立成育医療研究センター)

二次検査法の有用性と問題点の検討

石毛 信之 (公益財団法人東京都予防医学協会・科長補佐)

研究要旨：1977年にGuthrie法による先天性代謝異常症の新生児マススクリーニング(NBS)が開始されて間もなく、HPLC法等による二次検査法が開発されて偽陽性率の軽減、要精査例の的中率の向上に寄与してきた。タンデムマス・スクリーニング(TMS)が全国的に開始された現在も二次検査の実施は望まれているが普及には至っていない。そこで、東京都でこれまで検討してきたLC/MS/MS法を用いた二次検査法を例示し、その有用性と検査体制の普及に向けた課題について報告した。本法は上記の目的で有用であるが、検査体制の普及に至るまでには検査費用の負担や検査法導入時の支援について検討すべき課題があると考えられた。

研究協力者

稲岡一考：大阪府立病院機構 大阪母子医療センター・特任職員

重松陽介：福井大学医学部小児科・客員教授

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

花井潤師：北海道薬剤師会公衆衛生検査センター・技術顧問

九曜雅子：富山県衛生研究所・がん研究部長

田崎隆二：化学及血清療法研究所・検査総轄

コハク酸が定量できない。また、イソ吉草酸血症スクリーニングにおいては、薬剤性の偽陽性が多数報告されているがFIA法では偽陽性物質を分別することができない。これらの状況から、偽陽性率の軽減、検査精度・診断精度の向上を目的とした二次検査法の有用性が国内外から報告されている。そこで、NBS開始以降、これまで東京都予防医学協会(以下、本会)で実施してきた二次検査の変遷と、分離カラムを装着した液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC/MS/MS)法を用いて現在本会で試験運用中の二次検査法を例示し、その有用性と検査体制の普及に向けた課題について報告した。

A. 研究目的

2014年からタンデムマス質量分析計(タンデムマス)が先天代謝異常疾患の新生児マススクリーニングの一次検査法として全国で使用されている。しかしその分析法、すなわち分離カラムを装着しないフローインジェクション分析(FIA)法では幾何異性体(例：ロイシンに対するイソロイシン、アロイソロイシン)の分別定量はできず、また分析装置・検体前処理法の選択によっては一次対象疾患であるアルギニノコハク酸尿症の疾患特異的指標であるアルギニノ

B. 研究方法

東京都のNBSにおける先天代謝異常疾患マススクリーニングの二次検査は、アミノ酸・有機酸代謝異常症の一部の疾患疑い例が生じた場合に初回検査または再採血検査のろ紙血で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法またはLC/MS/MS法にて行ってきた。ガラクトース血症疑い例についても二次検査を実施している。二次検査結果の妥当性については、NBS要精査例ならびにNBS外の依頼検査(本会では有料で

実施) 検体の担当医師から開示された診断結果・臨床経過と併せて評価した。

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 研究結果

1) 二次検査法の変遷

Guthrie 法による先天性代謝異常症の NBS 開始当初からの二次検査法の変遷の概要を表 1 に示した。NBS の一次検査法の変遷にしたがって二次検査法も変化してきた。ガラクトース検査では、Paigen 法実施期間に二次検査法であった酵素法が試薬キット化され、現在では一次検査法として全国に普及した。アミノ酸代謝異常症 3 疾患(フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症)の検査では、Guthrie 法実施期間には HPLC 法が二次検査法であった。その後、TMS が実施されるまでの期間には HPLC 法が一次検査法として実施された。そしてアミノ酸・有機酸・脂肪酸代謝異常症 13 疾患以上が対象疾患として追加された TMS 導入(FIA 法にて実施)後には、本会を含めた一部検査施設においてアミノ酸高値例の二次検査法として HPLC 法が実施され、有機酸・脂肪酸代謝異常症の一部では LC/MS/MS 法による二次検査法が開発された。

2) 本会における 2017 年度の二次検査法の検討

本会における 2017 年度の検討について表 2 に示した。以下にその検討ならびに試験運用の成績の概要を述べる。

2-a. アミノ酸分析

東京都では 2012 年度にタンデムマス法を導入以降、2017 年度に至るまで、一次検査でシトルリン以外のアミノ酸高値例については HPLC 法で対応してきた。しかしながら分析装置の老朽化のためその代替が必要なことと、分析項目の拡大を目的として HPLC 法に替わる LC/MS/MS 法によるアミノ酸二次検査法の検討を行った。HPLC 法ならびに LC/MS/MS 法の分離カラム、測定対象物質の比較を表 3 に示した。LC/MS/MS 法では、シトルリン高値例の確認検査に加えて、本会のタンデムマスの FIA 法では分析不能であった、非誘導体化法によるアルギニノコハク酸定量が可能になり(図 1)、ホモシスチン(尿)、オロト酸などについても定量が可能となった。

2-b. C3 高値例への対応

C3 高値例ではプロピオン酸血症ならびにメチルマロン酸血症が疑われる。そのうちメチルマロン酸血症ではメチルマロニル CoA ムターゼ欠損症と VB12 代謝障害または VB12 欠乏症による病態が存在する。これらについては既報のメチルマロン酸分析に加えて、血中総ホモシステイン(tHcy)の分析が必須とされる。tHcy についても検体前処理法を検討し、アミノ酸分析と同一の分析条件で分析が可能となった(図 2)。MMA と tHcy の同時分析についても検討を進めたい。

2-c. C5 異性体分離、アシルグリシン分析

本法は 2-a/b とは異なり、既報の ScherzoSS-C18 カラム(Imtakt 社)を使用した分析である。

C5 高値例については、C5 異性体の分離検出ならびにイソバレリルグリシン(IVG)の検出を行うことで、ピバリン酸含有薬剤(セフカペンピボキシル等の抗菌薬ならびにシベレスタットナトリウム)による薬剤性の偽陽性例を除外することが可能である。本法開発以降 2017 年度までの検討では、C5 高値例の 90.8%が要再採血、要精査例から除外されることが判明した(表 4)。一方、3メチルクロトニルグリシン(3MCG)は、3メチルクロトニルグリシン尿症例にて著明に上昇することが判明している(表 5)ので、低出生体重 2 回目など、特に未熟児において出生後 1 ヶ月程度の期間を置いて採血された例のろ紙血 C5-OH 高値遷延例(初回 C5-OH 正常例)の判定時に有用と考えられた。

D. 考察

先天性代謝異常症 NBS において LC/MS/MS 法は、偽陽性例削減や鑑別診断を目的とした二次検査法として有用であることは国内外の報告で明らかで、今回例示した二次検査法の一部は学会等で報告されており、その有用性は評価されている。LC/MS/MS 法は、TMS に使用しているタンデムマスに分離カラムならびに装置構成によってはカラムオープンを追加することで分析可能となるため、一般の検査施設でも施しうる検査法である。しかし、その導入にあたっては初期投資を含めたコストが問題となると思われる。無用な要再採血、要精査の削減による医療費削減分から負担できる可能性も考えられる

が、本法導入時の費用対効果の評価について次年度以降の検討課題としたい。そして機器・試薬メーカーによる支援を得ることで本法の導入が容易になる可能性も考えられたので、これについても検討を進めたい。

E. 結論

LC/MS/MS法による代謝異常疾患の二次検査法の開発までの経緯と、現状（本会で開発中の検査法の提示）、二次検査体制の整備に向けた課題について報告した。いずれの分析法も、TMSが全国で導入された現在において有用な分析法であるが、導入するまでの課題もあり、今後の継続的な検討を要すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) LC/MS/MS法によるイソ吉草酸血症の2次検査法の有用性—ろ紙血 C5 アシルカルニチン異性体とイソバレリルグリシン同時分析法—: 石毛信之, 渡辺和宏, 長谷川智美, 小西 薫, 間下充子, 世良保美, 村山 圭, 菅原秀典, 堀川玲子, 石毛美夏, 大和田 操: 日本マススクリーニング学会誌. 投稿中.
- 2) ボイトラー法における簡便な蛍光強度測定法の検討: 間下充子, 長谷川智美, 石毛信之, 世良保美, 望月孝一, 大和田操: 日本マススクリーニング学会誌. 27(1): 83-89, 2017.
- 3) タンデムマス検査データ Web 解析システムの有用性について: 花井潤師, 福士 勝, 石毛信之, 田崎隆二, 重松陽介, 山口清次: 日本マススクリーニング学会誌. 27(1), 35-42, 2017.
- 4) C5-DC 値上昇が腎機能障害による偽陽性と考えられた 2 例: 伊東藍, 中尾寛, 石黒精, 石毛信之, 窪田満: 日本マススクリーニング学会誌. 27(3): 263-268, 2017.
- 5) Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R,

Okada S, Sakura N, Maruyama S, Noguchi A, Awaya T, Ishige M, Ishige N, Musha I, Ajihara S, Ohtake A, Naito E, Hamada Y, Kono T, Asada T, Sasai H, Fukao T, Fujiki R, Ohara O, Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takayanagi M, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M: Newborn screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency using (C16+C18:1) /C2: Evaluation of additional indices for adequate sensitivity and lower false-positivity. *Mol Genet Metab.* 122(3): 67-75, 2017.

2. 学会発表

- 1) 石毛信之: 鑑別診断のための2次検査・特殊検査体制: 第44回日本マススクリーニング学会. 秋田市, 2016/8/26~27.
- 2) 花井潤師, 福士勝, 石毛信之, 田崎隆二, 重松陽介, 山口清次: Web 解析システムによる内部精度管理の構築. シンポジウム 2: タンデムマススクリーニングの現状と課題. 第44回日本マススクリーニング学会. 秋田市, 2016/8/26~27.
- 3) 渡辺和宏, 長谷川智美, 石毛信之, 小西 薫, 間下充子, 世良保美, 石毛美夏, 長谷川行洋, 大和田 操: 東京都における VLCAD 欠損症スクリーニングの現状と今後に向けた検討. 第59回日本先天代謝異常学会総会, 川越市, 2017.2017/10/12~14
- 4) 永松扶紗, 大竹 明, 石毛信之, 小林弘典, 深尾敏幸, 長谷川行洋: 遺伝子パネル解析で PCCA 遺伝子上に2つの変異がシス型に検出された全身性カルニチン欠乏症の1例. 第59回日本先天代謝異常学会総会, 川越市, 2017.2017/10/12~14

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

表1 NBS 一次検査法と二次検査法の変遷：東京都の場合

対象疾患	一次検査法		二次検査法			
			分析法	測定物質		
先天性代謝異常症	1 2 0 0 1 1 1	Guthrie法	高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法 (使用カラム: ODS)	アミノ酸: Phe, Leu, Ile, alb-Ile, Met, Tyr		
					1 2 0 1 1 1	HPLC法 (使用カラム: 陽イオン交換樹脂)
	2 0 1 2 1	タンデムマス法 (FIA法)				
					1 2 0 1 1 5	Beutler法 酵素法 (検査キット試薬)
	1 2 0 0 1	Beutler法 Pagen法				
					1 2 0 1 5	Beutler法 酵素法 (検査キット試薬)
2 0 1 6 1	酵素法 (検査キット試薬)	Beutler法	ウリジルトランスフェラーゼ活性			
				4-エピメラゼ法	4-エピメラゼ活性	

表2 東京都における2017年度の先天性代謝異常症NBSにおける二次検査法への取り組み

	分析の目的	分析	意義
アミノ酸分析	Leu+Ile高値例の再採血率軽減・診断精度向上	Leu異性体分離 allo-Ile分析	● Ileのみ高値例の除外 ● MSUD診断指標の検出
	Cit高値例の確認検査・鑑別検査	Cit分析 ASA分析	● Cit偽陽性例の除外 ● ASS欠損症/ASA欠損症の鑑別
C3高値例	疾患・病型鑑別	MMA分析	プロピオン酸血症/メチルマロン酸血症の鑑別
		tHcy分析	VB12反応性メチルマロン酸血症/VB12欠乏症の鑑別
C5高値例	薬剤性偽陽性例の軽減・診断精度向上	C5異性体分離 IVG分析	● PC陽性例の除外 ● IVA診断指標の検出
C5-OH高値例	疾患鑑別	3MCG分析	● MCCD鑑別 ● 未熟児日齢経過後採血例の鑑別

表3 アミノ酸分析における分析装置・分離カラム・分析対象物質の比較

	HPLC	LC/MS/MS
分析装置	日立7600形臨床用HPLC	島津 Nexera + LCMS-8050
分離カラム (固定相)	専用カラム (陽イオン交換樹脂)	SUPELCO Discovery HS F5-3 : 150 x 2.1mm, 3µm (F5 (ペンタフルオロフェニルプロピル))
測定物質	Phe, Leu, Ile, alb-Ile, Val, Met, Tyr	Phe, Leu, Ile, alb-Ile, Val, Met, Tyr, Cit, ASA, tHcy, homocystine, ORA, Ser, Thr, Asp, Gly, Gln, Arg, Orn, Ala
分析時間		17min

Leu異性体分離定量

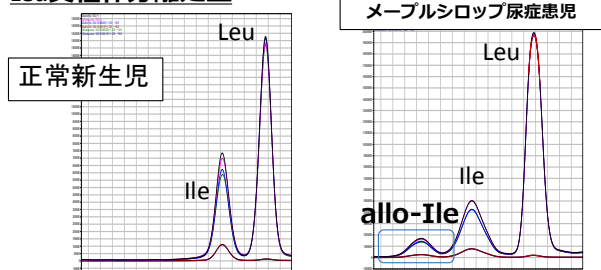


図1 Leu異性体分離とASAのLC/MS/MSクロマトグラム

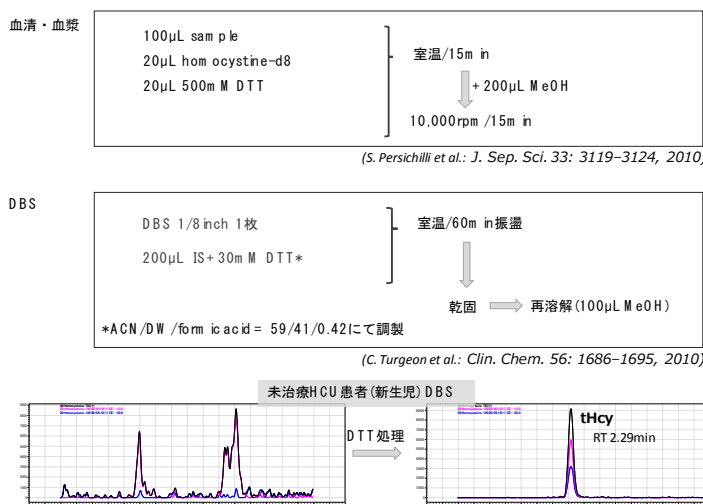


図2 tHcy分析時の検体前処理法の検討

表4 初回ろ紙血 C5 上昇例の分析結果

n = 267,357 (2015.4 - 2017.11)

Number of cases with elevated C5 at 1st screening test	174 cases (0.07%) (Repeat screening: 167, Medical examinations: 7)	
C5 levels of 174 samples: nmol/mL, FIA method (mean ± SD (range))	At 1st screening test	1.60 ± 1.01 (1.00-7.08)
	At repeat screening or medical examination	0.38 ± 0.21 (0.04-2.02)
Urine organic acid analysis at medical examination	3HIVA & IVG not detected	
Results of 2nd-tier test of 1st DBS sample with elevated C5	PC positive cases	158/174 (90.8%)
	IVG positive cases	0/174

表5 C5-OH 高値例の初回ろ紙血分析結果

症例		FIA法 (nmol/mL, FIA)		3MCG (nmol/mL, LC/MS/MS法)
		C5-OH	CO	
Controls (n=18)		0.22	24.5	N/D ~ 0.07
1	MCCD罹患者	10.38	6.36	3.13
2	MCCD罹患者	8.77	16.77	4.59
3	MCCD罹患者	1.05	16.40	0.09
4	MCCD保因者	1.09	23.48	0.28
5	児: 正常	10.34	4.70	0.07
	母: MCCD罹患者	24.63	3.97	10.38
6	児: 正常	5.62	8.28	0.05
	母: MCCD罹患者	24.55	5.98	7.75

《略号》Phe: フェニルアラニン、Leu: ロイシン、Ile: イソロイシン、allo-Ile: アロイソロイシン、Met: メチオニン、Tyr: チロジン、Val: バリン、Cit: シトルリン、ASA: アルギニノコハク酸、tHcy: 総ホモシステイン、ORA: オロット酸、Ser: セリン、Thr: スレオニン、Asp: アスパラギン酸、Gly: グリシン、Glu: グルタミン酸、Arg: アルギニン、Orn: オルニチン、Ala: アラニン、ASS: アルギニノコハク酸合成酵素、ASL: アルギニノコハク酸分解酵素、MMA: メチルマロン酸、DTT: ジチオスレイトール、3HIVA: 3-ヒドロキシイソ吉草酸、PC: ピパロイルカルニチン、HCU: ホモシスチン尿症、IVA: イソ吉草酸血症、MCCD: 3-メチルクロトニルグリシン尿症