

分担研究課題名：新生児マススクリーニング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研究所マススクリーニング研究室・室長）

## 二次検査法の有用性と問題点の検討(第二報)

研究協力者：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

昨年度の本研究班で報告した二次検査法の検査成績の続報を報告した。複数の検査項目を組み合わせることによって、新生児マススクリーニング（NBS）の濾紙血で病態の鑑別が可能となり、早期に適切な診断・治療の支援目的においても有用性であることが確認された。また、NBS以外の有症状例であっても、二次検査法による早期の鑑別診断支援の意義が認められた。しかしながら、現在、代謝異常疾患の二次検査を実施している施設は限られているため、各検査施設で導入しやすい環境を提供可能な方法を引き続き検討したい。

### 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

謝異常疾患のスクリーニングにおける二次検査はNBSの初回濾紙血検査のアミノ酸測定値が高値の際に既報のLC/MS/MS法にて確認検査として実施した。そのほかは、有機酸代謝異常症の一部の疾患を疑って要精査とした例の精査受診時の濾紙血を用いて実施した。また、NBS外の依頼検査の検体についても、担当医師からの検査依頼時に同等の検査を実施した。検査結果は、NBS要精査例ならびに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。

### A. 研究目的

現在全国で実施されているタンデム質量分析計（タンデムマス）によるNBS（タンデムマス法）は分離カラムを装着しないフローインジェクション分析法であるため、同一の質量/電荷比を有する幾何異性体や偽陽性物質を分別することができない。本二次検査法では、高速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NBSの濾紙血を使用し、偽陽性例の削減と病態の鑑別を目的として行われる。本年度は昨年度報告以降に運用した検討した実績を報告し、実用性・有効性を評価することを研究目的とした。

### B. 研究方法

東京都予防医学協会（以下、本会）の先天代

（倫理面への配慮）

該当なし

### C. 研究結果

#### 1) 濾紙血総ホモシステインの分析

2017年度に検体の前処理法と分析条件を検討した濾紙血総ホモシステイン（tHcy）分析法を用いて、過去に診断されたホモシチン尿症ならびにメチルマロン酸血症患者ならびにNBS要精査（Met 高値 1 例、C3・C3/C2 比高値 3 例）の濾紙血を分析した。同時に採取された尿ではホモシチン分析（高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法を用いたアミノ酸分析装置）と尿中有機酸分析も併用した。C3・C3/C2 比高値例では濾紙血メチルマロン酸（MMA）の分析デー

タも同時に評価した。これらの結果を表 1、2 に示した。表 1 に示したように、ホモシスチン尿症患児では、高 Met 血症とは異なり、濾紙血 tHcy が著明に増加し、尿ホモシスチン分析の結果とも一致したので両者の鑑別が可能と考えられた。次に表 2 に示したように、濾紙血 MMA と tHcy を同時に分析することで、C3 高値を来す病態、特に古典型メチルマロン酸血症とビタミン B12 欠乏症・欠損症の鑑別支援が可能であることが確認された。

## 2) 高アンモニア血症例の迅速検査について

本会の濾紙血アミノ酸分析の二次検査法では標準物質と内部標準物質を添加すれば同一分析条件でオロト酸およびウラシルの分析が可能である。現在、公費 NBS 時に新生児濾紙血でオロト酸を測定し、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTCD) スクリーニングの前向き試験研究を実施している自治体があるが、東京都では現在のところ実施していない。そのため、本会では公費 NBS の二次検査法として本法を用いる機会は現在のところはない。しかし、NBS 外の代謝疾患を疑う有症状例のなかには著明な高アンモニア血症例を来し、尿素サイクル異常症が疑われる症例も存在する。本会で経験した新生児期に著明な高アンモニア血症で搬送された症例の検査結果を表 3 に示した。濾紙血、尿、血清のオロト酸およびウラシルを測定し、即日担当医師に結果を報告した。その結果は翌日以降に判明した尿中有機酸分析の結果と一致した。

## 3) 2018 年度の NBS 要精査例における実績

東京都における 2018 年度の代謝疾患 NBS 要精査は 27 例あった。その中でアミノ酸・有機酸代謝異常症を疑った 13 例のうち、8 例で精密検査受診時の濾紙血で LC/MS/MS 法による二次検査を行った結果を表 4 にまとめた。ビタミン B12 欠乏症 (表 4 の No.1=表 2 の症例 3) ならびにメチルマロン酸血症 (表 4 の No.2) では、同時に検査依頼があった尿中有機酸分析に先立って化学診断に結びつく結果が得られた。Cit 高値例 (同 8) では、Cit と同時に濾紙血 ASA、Ser、Thr も測定することで、アルギニノコハク酸尿症の否定、シトリン欠損症の早期からの疑い (ASA 感度以下、Thr/Ser 比、Cit/Ser 比上昇) が指摘された。その後本例は、東北大に依頼したシトリン欠損症の高頻度変異解析によって本症である

ことが確定した。C5-OH 高値 2 例 (同 6、7) ならびに Met 高値例 3 例 (同 3-5) の濾紙血では、各々の測定対象物質である 3-メチルクロトニルグリシン (3MCG) ならびに tHcy は検出されなかった。C5-OH 高値例では 2 例とも本人の尿中有機酸分析においても 3MCG の排泄増加を認めなかったが、そのうち 1 例は MCCC2 の複合ヘテロ変異が認められたため 3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症 (MCCD) と診断された。他方は、母親のアシルカルニチン分析、尿中有機酸分析でも異常が認められず、経過観察中である。一方、Met 高値 3 例のうち 2 例では尿ホモシスチン分析も行ったが暫定カットオフ値未満であり、Met 高値遷延は認めるもののホモシスチン尿症は否定的な結果であった。後日、担当医師からコマーシャルラボに別途外注検査を依頼した血中 tHcy も基準範囲内であったと情報提供があり、本会の検査結果と一致することが確認された。

また、タンデムマス法で初回濾紙血で Leu+Ile and/or Val 高値で確認検査の対象となった 25 例については、全例 LC/MS/MS 法で確認検査を施行したが allo-Ile が検出された例は 1 例も存在しなかった。この確認検査によって Leu 単独高値が確認された 2 例は要再採血としたが、再採血検査の結果、Leu は正常化していたので異常なしと判定された。

## 4) 2018 年度の NBS 外の依頼検査における実績

本会では NBS 開始当初から要精査例の受診時や診断された代謝疾患罹患者の経過観察の検査、ならびに代謝疾患を疑った NBS 外の未診断例の依頼検査を無料受託していたが、2017 年度から有償化した。その依頼検体のうち、濾紙血アミノ酸分析は 2017 年度までは HPLC 法で行っていた (シトルリン血症ならびにアルギニノコハク酸尿症例はタンデムマス法にて検査した) が、2018 年度からは濾紙血アミノ酸分析は全例 LC/MS/MS 法に変更した。2018 年度はのべ 2,097 件の依頼検体を受託し、279 件のアミノ酸分析を本法で行った。また、血中アミノ酸分析 (血漿、血清) の依頼例では、通常は HPLC 法 (アミノ酸分析装置) を使用しているが分析時間が 120 分/件と時間を要し、実際に定量値を算出するまでにはほぼ一日要するため、緊急対応が必要な場合には LC/MS/MS 法 (分析時間 13 分/件) で分析可能な範囲のアミノ酸データを報告した。

#### D. 考察

先天性代謝異常症のNBSにおけるLC/MS/MS法を用いた二次検査の有用性は既報の通りであるが、今回は2018年度に実施した本検査の実績について報告した。濾紙血MMAとtHcyの同時分析では、古典型メチルマロン酸血症とビタミンB12欠乏症の鑑別で有用である。いずれの病態であっても基本的には濾紙血、尿ともにMMAが検出されるが、その濃度レベルは10倍程度異なる(古典型メチルマロン酸血症>>ビタミンB12欠乏症)ことが多い。この結果は、尿中有機酸分析におけるMMA排泄レベルの多少とも一致した。これにtHcyが加わった場合、濾紙血の検査で両者の病態の鑑別のために迅速でより有用な情報を提供することが可能であり、既報と同様に診断的価値があると考えられた。

また、濾紙血オロト酸およびウラシルについては、OTCDとCPS-1欠損症・NAGS欠損症の鑑別と、尿中有機酸分析の結果に先立つ迅速な化学診断支援に有が可能であった。今後、公費NBSの初回検査でオロト酸も測定する体制が一般化されたならば、有力な二次検査法となることが期待される。

さらに、allo-Ileを含めたLeu異性体の分離定量の有用性については昨年度の報告の通りであるが、タンデムマス法においてLeu+Ile高値例はメープルシロップ尿症以外にも、飢餓等による異化亢進時や分析装置の整備状況、環境要因によって出現しやすいことは周知のことである。そのため、各検査室の状況(要再採血率、要精査率、PPV等)によってはtHcyやMMA定量等よりもLeu異性体の分離定量法導入の優先順位が高いと思われた。しかしながら、LC/MS/MS法によるアミノ酸・有機酸等の分析は少数の施設で行われているのみであり、分析装置メーカーの支援によって本法の導入が実現した検査施設もある。また、公費NBSとは別にライソゾーム病の検査法のひとつとしてLC/MS/MS法を選択した施設もあり、いずれも今後の成績の報告が待たれる。一方、副腎過形成症の二次検査法としてのLC/MS/MS法は少しずつ広まりつつある。その背景には、検査試薬キットメーカーによる支援があった。この点を考慮して、各検査施設でもLC/MS/MS法によるアミノ酸・有機酸等の分析法を導入しやすい環境を提供可能な方

法を引き続き検討したい。

なお、これらのLC/MS/MS法はNBS外の依頼検査にも応用が可能であるため、代謝疾患を疑う有症状例の診断・鑑別支援のための有用性も極めて高いと考えられた。

#### E. 結論

LC/MS/MS法による代謝異常疾患の二次検査法の本会での運用について報告した。今後も本法を有効に活用するとともに普及にむけた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) 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: LC/MS/MS法によるイソ吉草酸血症の2次検査法の有用性—濾紙血 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—. 日本マスキリーニング学会誌. 28(3): 37-46, 2018.

2) Nakazaki K, Ogawa E, Ishige M, Ishige N, Fuchigami T, Takahashi S: Hypocarnitinemia observed in an infant treated with short term administration of antibiotic containing pivalic Acid. *Tohoku J. Exp. Med.* 244: 279-282, 2018

3) 渡辺和宏, 長谷川智美, 石毛信之, 間下充子, 鈴木 健, 大和田 操: フェニルケトン尿症スクリーニング—40年間の成績と今後の課題—. 日本マスキリーニング学会誌. 28(1): 93-99, 2018.

##### 2. 学会発表

1) 石毛信之, 渡辺和宏, 長谷川智美, 小西 薫, 世良保美, 石毛美夏: LC/MS/MS法による新生児マスキリーニングの二次検査法の有用性. 第60回日本先天代謝異常学会総会, 岐阜市, 2018. 2018/11/8~10.

2) Hiroyuki Iijima, Nobuyuki Ishige, Mitsuru Kubota: Liquid chromatography tandem-mass spectrometry as follow-up assessment for methylmalonic acidemia. 第60回日本先天代謝異常学会総会, 岐阜市, 2018. 2018/11/8~10.

3) 永松扶紗, 大竹 明, 石毛信之, 小林弘典, 深尾敏幸, 長谷川行洋: 新生児マスキリーニン

グで発見された乳児発症型グルタル酸血症Ⅱ型の1例. 第60回日本先天代謝異常学会総会, 岐阜市, 2018. 2018/11/8~10.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

表1 ホモシスチン尿症患者・高メチオニン血症の鑑別

症例	ろ紙血 (μM)		尿	
	Met	tHcy	ホモシスチン (μmol/mmol Cr)	
			LC-MS/MS	AAA*
	80.00	7.00	1.00	
ホモシスチン尿症患者	592.5	96.41	<b>78.74</b>	64.05
高メチオニン血症要精査例 精査受診時(生後3週間後)	169.5	4.61	0.71	N.D
一ヶ月後	199.0	6.51		

表2 メチルマロン酸排泄を認めるC3高値例における鑑別診断

症例 (日齢)	ろ紙血				尿		MMA	
	C3 (μM)	C3/C2	Met (μM)	C3/Met	MMA (μM)	tHcy (μM)		
1: 精査受診時 (30)	3.88	0.39	34.1	0.11	<b>5.12</b>	<b>17.21</b>	<b>6.6 (AAA)</b>	↑
	Vit B12内服2週間後 (71)	1.49	0.08	23.5	0.06	-	3.36	-
2: 精査受診時 (28)	4.50	0.41	34.90	0.13	<b>3.32</b>	<b>23.22</b>	<b>0.77 (AAA)</b>	↑
	Vit B12内服10日後 (56)	1.39	0.07	24.7	0.06	-	1.10	-
3: 精査受診時 (24)	2.97	0.31	39.2	0.08	<b>7.21</b>	<b>11.33</b>	<b>2.32 (LC-MS/MS)</b>	↑
Methylmalonyl-CoA mutase 欠損症	24.83	0.66	12.5	1.99	<b>44.48</b>	2.37	-	3↑
カットオフ値	3.60	0.25	80.0	0.25	<b>3.00</b>	<b>7.00</b>	<b>1.00 (LC-MS/MS)</b>	
Control DBS (n = 10)					C3/Met	MMA	tHcy	
mean±SD					0.051±0.008	N/D-0.53	3.42±0.66	

表3 オロト酸・ウラシルの分析結果による鑑別診断

症例	ろ紙血 (D) または 血清 (S) (μM)				尿				診断
	Cit	Arg	ORA	U	LC/MS/MS (μmol/mmol Cr)		GC/MS		
					ORA	U	ORA	U	
1: 男児	D 2.31	36.7	<b>53.7</b>	<b>97.5</b>	<b>406.9</b>	<b>43.0</b>	↑↑↑	↑↑↑	<b>OTCD</b>
	S 3.01	152.8	<b>102.1</b>	<b>114.3</b>					
2: 女児	なし				1.93	1.13	→	→	<b>CPS-1D</b>
Control (n = 4)	S 26.99	131	<b>N. D</b>	2.45 ±1.45	1.77 ±1.20	4.33 ±1.66	→	→	(尿素サイクル異常症非罹患患者)
OTCD, 女児	S 26.99	133.0	<b>N. D</b>	<b>25.41</b>	1.83	<b>21.27</b>	→	↑	(既診断例)

表4 2018年度のNBS要精査例の二次検査成績

No.	NBS要精査の異常項目	精査受診時*のろ紙血二次検査、尿検査	検査結果	診断等
1-2	C3・C3/C2	DBS: MMA, tHcy 尿: ホモシスチン分析 (Case1のみ)、有機酸分析	1: MMA > 7μmol/L tHcy > 10μmol/L 尿ホモシスチン > 2μmol/L 尿中有機酸分析: MMA軽度排泄	VB12欠乏症
			2: MMA > 50μmol/L tHcy (-) 尿中有機酸分析: MMA 著明に排泄上昇	メチルマロン酸血症
3-5**	Met	DBS: tHcy 尿: ホモシスチン分析	いずれも (-)	ホモシスチン尿症否定、経過観察
6-7	C5-OH	DBS: 3MCG 尿: 有機酸分析	3MCG (-) 尿中有機酸分析: 3MCGの明らかな排泄増加を認めず	6: MCCD (遺伝子解析にて診断) 7: 経過観察
8	Cit	DBS: ASA, Thr/Ser, Cit/Ser	ASA(-) Thr/Ser, Cit/Ser高値	シトリン欠損症 (ガラクトース正常)

\*:高Met血症1例はろ紙血のみの検査依頼であったため、本会では尿・血中アミノ酸分析を実施していない。

\*\* : 上記1例以外は全例、血中アミノ酸分析も行っている。