

分担研究課題名：アミノ酸代謝異常症に関する研究

ホモシスチン尿症の新生児スクリーニング新規指標の導入

分担研究者：田中 藤樹（国立病院機構北海道医療センター・小児遺伝代謝センター・小児科医長）

研究要旨 ホモシスチン尿症(HCU) 1型だけでなく、2型と3型も鑑別しながら高ホモシステイン(tHcy)血症を検出する新生児マススクリーニング(NBS)の方法として2段階スクリーニング法を検討した。1次検査にMetとフェニルアラニン(Phe)の比(Met/Phe比)とC3/Met比を、2次検査にLC-MS/MSによるtHcyの測定を検討した。Met低値域にも注目し0.1%tile値、およびMet/Pheの0.1%tile値を暫定的なカットオフ値とした。1次検査での推定カットオフ値超過は3病型とも0.1%未満となり、2次検査のtHcyはカットオフ値を超える検体はなかった。2次検査にtHcy測定を行う2段階スクリーニング法は、1次検査でMet、Met/Phe、C3/Metの複数指標を用い、同時に前2者では低値域のカットオフ値も加えることにより、各病型を効率的に発見し早期診断と治療につなげることができる。これらの方法はNBSだけでなく、乳児期以後のハイリスクスクリーニングへも応用し、これまで未診断の症例の診療に活用できる。

研究協力者氏名：長尾 雅悦  
所属機関名及び所属機関における職名：  
国立病院機構北海道医療センター・小児遺伝代謝センター・院長

A. 研究目的

ホモシスチン尿症(HCU)にはメチオニン(Met)代謝経路の先天性異常による総ホモシステイン(tHcy)濃度の上昇を共通の所見とする複数の疾患が含まれる<sup>1)</sup>。これまで含硫アミノ酸代謝異常としての古典型HCU(1型)と、ビタミンB12(2型)と葉酸(3型)の代謝異常はそれぞれ生化学的な側面から別個に扱われることが多かった。一方、1型の新生児マススクリーニング(NBS)は1977年から導入され、シスタチオニン合成酵素(CBS)欠損によるtHcy上昇のみ広く知られることになった<sup>2)</sup>。HCUは2021年に上記の3病型を一括して指定難病<sup>3)</sup>となり生涯に渡る治療と療養の支援が可能となったが、早期発見と治療の導入が最も遅後に影響する。Met単独の指標に拠らない

HCU全体を対象としたNBSの方法論の確立が必要である。

B. 研究方法

1型だけでなく2型と3型も鑑別しながら高Hcy血症を検出するNBSの方法として2段階スクリーニング法を検討した。札幌市では2022年度より1次検査にMetとフェニルアラニン(Phe)の比(Met/Phe比)とC3/Met比を、2次検査にLC-MS/MSによるtHcyの測定を開始した。またMet低値域では0.1%tile値、およびMet/Pheの0.1%tile値を暫定的なカットオフ値とした。

(倫理面への配慮) NBS対象疾患とその関連疾患の遺伝学的調査研究は、国立病院機構北海道医療センターの倫理委員会の承認を受けている(平成25年2月25日、受付番号25-2-1)。

C. 研究結果

札幌市ではこれまでの成績を基に既存指標に新規カットオフ値、ならびに新指標を追加し、ホモシスチン全病型をスクリーニングするアルゴリズムを2022年度から運用

開始した。その要点は、HCU 1型では1次検査は新規カットオフ値 ( $\text{Met} > 40 \mu\text{M}$ ) および新指標  $\text{Met}/\text{Phe} > 0.75$ 、2次検査でtHcyを測定することである。HCU 2型・3型にも新生児マススクリーニング指標を導入し、同時にスクリーニングできると効率的である。両病型ともMet低値が指標となるが、低値域での精度の改善によるカットオフ設定が課題となる。ここでもMet /Pheの併用を検討した。2型はコバラミン代謝異常であるが、タンデムマスでC3が上昇するプロピオン酸血症 (PA)、メチルマロン酸血症のスクリーニングに絡めC3/Metを追加すると精度が高く鑑別できた。これに2次検査でLC-MS/MSにてtHcy、できればMMAも測定できれば、感度、特異度、陽性的中率が向上する。

#### 1) 2022年度の1次および2次検査結果 (表1)

2022年度のMet/Phe比 (カットオフ値: 0.75) のヒストグラムはmean: 0.45 (0.43)、SD: 0.12 (0.12)、99%tile: 0.76 (0.75) と以前と大きな変化はなかった (括弧内は17~21年度)。同様にC3/Met (同0.32) はmean: 0.10 (0.09)、SD: 0.044 (0.038)、99.9%tile: 0.36 (0.32) であった。Met低値域では0.1%tile: 7.4 (7.0)、またMet/Pheの0.1%tile: 0.16 (0.15) となり、両者による評価の有用性が課題である。1次検査のカットオフ超えが40検体と当初の予想 (年間25~26人程度) より僅かに多く、中でもC3/Metが21件で超過率0.17%と高かった。2次検査のtHcyは、mean:  $3.43 \mu\text{mol/L}$ 、SD: 0.9、range: 1.81~7.06 (対照新生児200検体) となり、暫定カットオフ値を $9.0 \mu\text{mol/L} (+6\text{SD})$ としている。NBSに適用可能なtHcy測定法はLC-MS/MSとHPLCの2つ方法があるが、いずれも低濃度域 (正常域) では定量性の精度が低い。一方、各病型の患者検体を用いると、両者の相関性と精度が高いことが確認できた。LC-MS/MSではHPLC測定値の約160%を示すので、暫定カットオフ値は実際の高値の検体群を抽出するのに妥当である。2次検査で陽性となった症例はなく、ホモシスチン尿症は3病型とも陽性例はなかった。

以前よりMetが低値を示す検体が夏に多い傾向があった。そこで、検体受付日ごとの初回検体平均値をプロットし、季節変動性について検討したところ (期間: 2022年4月1日~2022年12月28日) Metは夏季 (8月、9月) に平均値が下降していた。C3/Metは当該期間について、平均値が反対に上昇していた。またMetが低値となる検体は低体重あるいは哺乳不良のものが多かった。

#### 2) tHcyとMetの相関

Met値とtHcy値の相関を散布図で検証したところ、R2値が低く相関性は低かった。すなわちHCU以外の非特異的な原因によるMetの高値が2次検査の偽陽性に結びつく可能性は低い。また、Metの著明な高値を認めた症例では、ホモシスチン尿症病態と関連しない限りtHcyのカットオフ値を超えることはなかった。2022年度にMet高値 ( $52.4, 69.7 \mu\text{M}$ ) で精査となった2例は、Met単独高値で遺伝子検査でもメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (MAT) 欠損症の診断となった。tHcyは正常域にあったが、Met/Phe (0.8, 1.29)、Met/tHcy (15.7, 22.4) といずれも高値を示した。

#### D. 考察

我が国のHCU 1型の症例をNBS受検群と非受検群に分けてその成人期での予後を比較検討した研究では、身体的な合併症だけでなく社会的な活動や知的水準において、前者に良好な結果を認めている。しかしNBSをすり抜けたビタミンB6反応性の症例を検出し難い問題点がある。Met単独指標は感度が低く、HCU1型のスクリーニング法は早急な改善が必要である。新たな指標としてMet/Pheを追加し、その上昇を検出することが有用と推測される。さらに2次検査項目としてtHcyを使用するならば、1次検査のMetのカットオフ値を下げて特異度を上昇させることが可能である。またMet/tHcyも同時に測定できるのでMAT欠損症の鑑別にも応用できる。Met/Pheを標準的な指標とするためのエビデンス蓄積が必要であり、本研究班が中心となって多施設共同研究を計画している。

HCU2型、3型では、1st tier: Met ↓

(Met/Phe↓) or C3/Met↑、2nd tier:  
tHcy↑およびMMA↑とすることで、両病型を同時にスクリーニングするアルゴリズムの運用ができる。このように複数疾患を対象とするアルゴリズムは、現行のタンデムマスと親和性がよく導入しやすい。そしてtHcyやMMAのような2次検査との組み合わせにより、偽陽性を減少させ陽性的中率 (PPV) を一定以上に維持できる。無症候で軽症例の発見につながると期待され、治療による長期的予後改善のエビデンスを示すことで社会からも受け入れられると考える。

## E. 結論

Met/PheとtHcyを用いる2段階検査法によるスクリーニング法は、Metのみを指標としたHCU1型のスクリーニングでの見逃し例を防ぐ効果が期待される。1次検査でMet, Met/Phe, C3/Metの複数指標を用い、加えて前2者に低値域のカットオフ値を追加して、HCUの全病型を効率的に発見するアルゴリズムが可能となる。

### (参考論文)

- 1) Gerrard A, Dawson C: Homocystinuria diagnosis and management: it is not all classical. *J Clin Pathol* 75: 744-750, 2022.
- 2) Aoki K: Newborn screening in Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 80, 2003.
- 3) ホモシスチン尿症 (指定難病337) 概要・診断基準等 (厚生労働省作成). <https://www.nanbyou.or.jp/entry/22378>.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 長尾雅悦、田中藤樹. シスチン尿症 日本先天代謝異常学会編 新生児マススクリーニング対象疾患等診療ガイドライン 2019 Part2 2019年版未収載疾患編 東京 診断と治療社 2023 p8-20
- 2) 長尾雅悦、田中藤樹. ホモシスチン尿症スクリーニングの新たな展開 日本マススクリーニング学会誌 2023 33:31-40
- 3) 田中藤樹 長尾雅悦、小杉山清隆 新た

に追加された「ライソゾーム病+原発性免疫不全+脊髄性筋萎縮症」新生児マススクリーニング 札幌市医師会医学会誌 2023

- 4) Jun Kido, Johannes Häberle, Toju Tanaka, Masayoshi Nagao, Yoichi Wada, Chikahiko Numakura, Ryosuke Bo, Hiromi Nyuzuki, Sumito Dateki, Shinsuke Maruyama, Kei Murayama, Shinichiro Yoshida, Kimitoshi Nakamura. Improved sensitivity and specificity for citrin deficiency using selected amino acids and acylcarnitines in the newborn screening. *J Inherit Metab Dis*. DOI: 10.1002/jimd.12673. 2023

### 2. 学会発表

- 1) 田中藤樹 北海道の新生児マススクリーニングの現状 北海道ライソゾーム病セミナー2023 2023.2.4 札幌 (Hybrid)
- 2) 田中藤樹 新たな追加マススクリーニング 北海道での取り組み 北海道代謝性疾患 Webinar 2023.2.17 札幌 (WEB)
- 3) 田中藤樹 新たに北海道で開始したPID・LSD・SMA 新生児マススクリーニング 北海道新生児スクリーニング懇話会 2023.4.25 札幌 (WEB)
- 4) 田中藤樹 新たな追加新生児マススクリーニング 北海道での取り組み 岡山 Webinar 2023.6.30 岡山 (WEB)
- 5) 田中藤樹 ライソゾーム病の新生児マススクリーニング 第3回 東北・北海道ライソゾーム病ネットワークセミナー 2023.9.15 札幌 (Hybrid)
- 6) 田中藤樹 北海道における追加新生児マススクリーニングでのファブリー病の発見 Fabry disease Web seminar 2023.10.23 札幌 (WEB)
- 7) 田中藤樹 北海道での拡大新生児マススクリーニングの取り組み拡大新生児マススクリーニングライブ配信講演会~Expert Collaboration~2023.11.30. 札幌 (WEB)
- 8) 長尾雅悦、田中藤樹、小杉山清隆 新たに追加された「ライソゾーム病+原発性免疫不全+脊髄性筋萎縮症」新生児マススクリーニング 2023.2.19 第48回札幌市医師会医学会 札幌
- 9) 田中藤樹 LSD/PID/SMA-NBS 北海道新生児

追加スクリーニングの現況報告 2023. 6. 10  
 第 17 回北海道先天代謝異常症研究会 札幌  
 10) 長尾雅悦、田中藤樹、小杉山清隆、石川貴雄、齋藤大雅、和田光祐、吉永美和、野町祥介、三上篤、伊藤智、三浦真之、花井潤師  
 ホモシスチン尿症の新生児マススクリーニングの新たな展開 2023. 8. 25-26.  
 第 50 回日本マススクリーニング学会学術集会 新潟  
 11) 長尾雅悦、田中藤樹、小杉山清隆、石川貴雄、齋藤大雅、和田光祐、吉永美和、野町祥介、三浦真之、花井潤師  
 新生児マススクリーニング関連疾患検査としてのハイリスク・スクリーニングの成果. 2023. 10. 5-7.

第 64 回日本先天代謝異常学会学術集会 大阪  
 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- G. 知的財産権の出願・登録状況  
 (予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

表 1. 1 次および 2 次検査結果 (2022 年度札幌市新生児マススクリーニング)

A. 1 次検査

カットオフ値	I 型		II 型	II・III 型
	Met>50	Met>40 and Met/Phe>0.75	C3/Met>0.32	Met<7
期間内検体数	12,659	6054	12,659	12,659
1 次カットオフ値 超過検体数	5	7	21	10
1 次カットオフ値 超過率 (%)	0.04	0.12	0.17	0.098
立案時推定の 1 次カットオフ値超過率 (%)		0.06	0.094	0.091

B. 2 次検査

カットオフ値	tHcy>9
期間内検体数	40
2 次カットオフ値 超過検体数	0
2 次カットオフ値 超過率 (%)	-

HCU 疑い再採血判定 5 例  
 再採血率 0.039%