

分担研究課題名：新生児胆汁うっ滞性疾患スクリーニング体制の構築  
**新生児濾紙血を利用した先天性胆汁酸代謝異常症スクリーニング法の開発**

研究分担者：鈴木 光幸（順天堂大学医学部小児科・准教授）

窪田 満（国立成育医療研究センター総合診療部・統括部長）

研究要旨

先天性胆汁酸代謝異常症（BASD）は、胆汁酸生合成経路の先天的な酵素欠損によって引き起こされる疾患で、このうちHSD3B7欠損症、SRD5B1欠損症、CYP7B1欠損症は、早期に発見して一次胆汁酸療法を行えば肝硬変発症を回避できる可能性がある。同様に、Zellweger症候群（PBD1A）やNiemann-Pick病C1型（NPC1）は異常な胆汁酸代謝産物が蓄積する疾患であり、一次胆汁酸やミグルスタット治療が有効なことがある。これらの疾患は現状では臨床症状が出現してから生化学的検査や遺伝子検査で診断が行われている。本研究では、新生児マススクリーニング用に採取された濾紙血を用いて、これらの疾患がスクリーニングできるかを検討した。遺伝子検査で診断が確定している7例の濾紙血を回収し、LC/MSを用いて胆汁酸分析を行った。通常法（76分法：分離カラムあり）と短時間法（5分法：分離カラムなし）を比較した結果、総胆汁酸は通常法の方が高値であったが、各種胆汁酸の比率に差はなかった。この比率を利用すれば各疾患に特異的な異常胆汁酸の上昇を検出することで診断が可能であった。BASD、PBD1A、NPC1は新生児濾紙血を用いてスクリーニングが可能であり、特にBASDは早期発見および治療により予後が改善できる可能性がある。

A. 研究目的

先天性胆汁酸代謝異常症（BASD）は、胆汁酸生合成経路の遺伝性酵素欠損を原因とする代謝異常症である。BASDのうち、HSD3B7欠損症、SRD5B1欠損症、CYP7B1欠損症は早期に発見し一次胆汁酸療法（コール酸：CA、ケノデオキシコール酸：CDCA）を行えば肝硬変への進展を回避できる可能性がある。また、Zellweger症候群（PBD1A）、Niemann-Pick病C1型（NPC1）も同様に異常胆汁酸代謝産物が蓄積する疾患で、それぞれ一次胆汁酸、ミグルスタットの内服の有効性が報告されている。これらの疾患は早期診断により予後の改善が期待できるが、現状では臨床症状が出現してから胆汁酸分析を含む生化学診断を行い、遺伝子検査で確定診断がなされる。今回、新生児マススクリーニングの濾紙血を用いてこれらの疾患の診断ができるか検討した。

B. 研究方法

遺伝子検査で確定診断がなされている7症例 [HSD3B7欠損症（n=2）、CYP7B1欠損症（n=1）、SRD5B1欠損症（n=1）、NPC1（n=2）、PBD1A（n=1）]の濾紙血を入手し、LC/MSで血中胆汁酸分析を行った。同時に健常児1055人の濾紙血を用いて正常範囲を決定した。スクリーニングには1検体当たりの検査時間の短縮が必要であり、76分かかる通常法（分離カラム有）と5分法（分離カラム無）で分析値を比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は順天堂大学の施設審査委員会の承認を得た（承認番号19-184）。本研究への登録に先立ち、各対象者の両親からインフォームド・コンセントを得た。本研究は、1964年のヘルシンキ宣言およびその後の改正、または同等の倫理基準（2000年にエジンバラで改訂）に準拠して実施された。

### C. 研究結果

胆汁酸の総計は従来法（分離カラム有）の方が高かったが、各種胆汁酸の比率には差を認めなかった。各疾患では、G- $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol-3SとT- $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol-3S（HSD3B7欠損症）、T- $\Delta^5$ -3 $\beta$ -ol-3S（CYP7B1欠損症）、GCA- $\Delta^4$ -3-oneとTCA- $\Delta^4$ -3-one（SRD5B1欠損症）、C<sub>27</sub>-THCA（NPC1）、 $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol-3S（PBD1A）の特異的な異常胆汁酸の上昇を認めた。異常胆汁酸の占有率を比較すれば新生児マススクリーニングの濾紙血を用いて各疾患の診断は可能であった。

### D. 考察

本研究では、濾紙血中の疾患特異的胆汁酸塩の高感度／選択的検出が、サンプル前処理なしで実証された。100検体の濾紙血をスクリーニングするために、サンプル前処理に3時間、LC/MSに1時間、データ解析に2時間を要し、合計約6時間で全プロセスを完了できた。従来、BASD診断における胆汁酸塩の分析には、異常胆汁酸塩がより効率的に尿中に排泄されることから、血液ではなく尿検体が利用されてきた。しかし、尿中のある種の胆汁酸塩は分解しやすいため、分析前の尿サンプルの保管と取り扱いには特別な注意が必要である。一方、血液が濾紙に固定されると、これらの胆汁酸塩は安定となり、効率よく定量的に胆汁酸塩が回収できた。本研究では3つの主要なBASD（HSD3B7欠損症、SRD5B1欠損症、CYP7B1欠損症）とNPC1、PBDA1欠損の5疾患を対象とした。全症例で欠損酵素のため一次胆汁酸が著しく減少し、特徴的な胆汁酸塩が上昇していた。HSD3B7欠損症は我が国で最も頻度の多いBASDで、SRD5B1欠損症やCYP7B1欠損症がそれに次ぐ。乳幼児期に急速に進行する胆汁うっ滞性肝障害を呈するため、後者2つの疾患の早期発見は特に重要である。今回のLC/MSでは、T- $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol-3S（HSD3B7-BA2, m/z 488→97）、T-3-oxo- $\Delta^4$  CA（SRD5B1-BA, m/z 510→97）およびT- $\Delta^5$ -3 $\beta$ -ol-3S（CYP7B1-BA, m/z 453→97）は、指定されたMRMによって容易に区別ができた。一般的に臨床応用のためには、患者やサンプルのばらつきによる偽陰性率を検索ことが重要である。しかし、今回の研究ではBASD、PBD1A、およびNPC1のサンプル数が非常に限られていたた

め、それぞれの疾患検出に対するシステムの感度を決定することはできなかった。我々は現在、11種類の胆汁酸塩を既存の新生児マススクリーニング検査に組み込む検査システムを開発中である。

### E. 結論

BASD、PBD1A、NPC1は新生児濾紙血を用いてスクリーニングが可能であり、特にBASDは早期発見および治療により予後が改善できる可能性がある。

### F. 研究発表

<論文発表>

- 1) Muto Y, Suzuki M, Takei H, Saito N, Sasaki T, Mori J, Sugimoto S, Imagawa K, Nambu R, Oguri S, Itonaga T, Ihara K, Hayashi H, Murayama K, Kakiyama G, Nittono H, Shimizu T. Dried blood spot-based newborn screening for bile acid synthesis disorders, Zellweger leukodystrophy, and Niemann-Pick type C1 by detection of bile acid metabolites. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2023;140: 107703
- 2) Hoshino E, Muto Y, Sakai K, Shimohata M, Urayama KY, Suzuki M. Age at Surgery and native liver survival in biliary atresia: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Pediatr*. 2023;182:2693-704.

<学会発表>

- 1) 森潤, 鈴木光幸, 武藤大和, 齋藤暢知, 杉本哲, 今川和生, 武井一, 入戸野博, 清水俊明. 乾燥濾紙血による先天性胆汁酸代謝異常症のスクリーニングの検討. 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）
- 2) Yamato Muto, Mitsuyoshi Suzuki, Hajime Takei, Nobutomo Saito, Kazuo Imagawa, Ryusuke Nambu, Hisamitsu Hayashi, Hiroshi Nittono, Toshiaki Shimizu. Dried blood spot-based newborn screening for bile acid synthesis disorders, Zellweger spectrum disorder, and Niemann-Pick type C1 by detection of bile acid metabolites. 2023. 10. 5-8 16<sup>th</sup>

Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (APPSPGHAN) (Korea)

- 3) 武藤大和, 鈴木光幸, 齋藤暢知, 今川和生, 南部隆亮, 糸永知代, 森潤, 林久允, 村山圭, 武井一, 入戸野博, 清水俊明. 乾燥濾紙血による先天性胆汁酸代謝異常症, Niemann-Pick病 C1型, Zellweger症候群の新生児マススクリーニングの検討. 2023. 10. 20-22 第50回日本小児栄養消化器肝臓学会(仙台)

- 4) 齊藤寛貴, 中野聡, 佐藤恵也, 福永英生, 鈴木光幸, 今川和生, 林久允, 武井一, 入戸野博, 清水俊明. 新生児ろ紙血検体を用いた先天性胆汁酸代謝異常症のスクリーニング: Zellweger症候群の自験例を踏まえて. 2023. 11. 25 第44回胆汁酸研究会(名古屋)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得: 該当なし
2. 実用新案登録: 該当なし
3. その他: 該当なし