

# 新生児マス・スクリーニングにおける質量分析の応用

Application of mass spectrometer to Newborn Screening

中島英規

Hideki Nakajima

独立行政法人国立成育医療研究センター 小児血液・腫瘍研究部

〒157-8535 世田谷区大蔵2-10-1

TEL 03-5494-7120 ex. 4591

E-mail: [nakajima-h@ncchd.go.jp](mailto:nakajima-h@ncchd.go.jp)

## Abstract

Newborn screening tests look for serious developmental, genetic, and metabolic disorders so that important action can be taken during the critical time before symptoms develop. Most of these illnesses are very rare, but are treatable if caught early. These screening tests are done using whole blood samples collected from the baby's heel to obtain a few spots on specially designed filter paper which are also called dried blood spots (DBS). Neonatal screening tests had been started more than 30 years ago by Guthrie test, enzyme assay, HPLC and ELISA, but new method using ESI-QqQ-MS had spread over most prefecture from March, 2012 under the guidance of the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. Present target diseases of newborn screening tests are amino acid, organic acid or fatty acid metabolic disorder, it is said that next target disease to newborn screening are lysosomal storage disorder and severe combined immunodeficiency (SCID) because therapeutics are already developed.

## はじめに

新生児マス・スクリーニングとは新生児に対して生後1週以内に行われるスクリーニング検査である。この検査は重篤で緊急性の高い遺伝病、代謝病を対象に行われる。例えば、新生児マス・スクリーニングによってフェニルケトン尿症が疑われる症例が見つかった場合、精密検査を経てその新生児は母乳・一般ミルクの摂取が直ちに中止され、フェニルアラニン除去ミルクが与えられることによって重篤な精神・神経障害を回避することができるようになっている。マス・スクリーニングの対象として重要な点は、「治療可能」なもの

のであり、費用対効果が充分見込めるものである点である。ここで1968年にWHOより提言された集団検診のためのWilson-Jungnerの古典的基準を記載するが、現在のマス・スクリーニングもこの考えに沿った形で行われている。

1. 放置すると重大な健康被害をもたらしうる
2. 自然歴の明らかな病気である
3. 効果的な治療法がある
4. 発症前に診断できる
5. 受け入れられる適切な検査法がある
6. 集団に対して受け入れられる社会的合意

7. 診断・治療の施設が利用可能である
8. 患者、陽性社のフォローアップ体制
9. 費用対効果バランスが適切である
10. 事業の意味、内容に関して受検者の同意

## 新生児マス・スクリーニング事業の実際と歴史

新生児マス・スクリーニング事業は、全ての新生児を対象とした「スクリーニング」検査であるため、多くの検体を分析する必要があり、精度よりはある程度スループット性が優先される試験である。そのため「おおまかな」スクリーニング検査で陽性となった場合には同じ検体を用いた「確認検査」や二次検査を経て酵素活性測定や遺伝子検査により確定診断が行われる。

新生児マス・スクリーニングでは、新生児のかかとに小さな傷をつけてろ紙にスポットとして「採血」した乾燥ろ紙血 (Dried Blood Spot: DBS) を検体に検査が行われる。我が国ではこの新生児マス・スクリーニングは、1977年より国主導で開始され、現在では自治体主導の事業として、基本的に「無料」で受けることができる。これまで新生児マス・スクリーニングの対象疾患は、フェニルケトン尿症（1977年～）、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症（1977年～）、クレチニ症（1979年～）、先天性副腎過形成（1988年～）、ガラクトース血症の6疾患であった。これらは変異株を用いたガスリー法や酵素法、ペイゲン法、HPLC、或いはELISAなどによってその検査が行われてきた。これら新生児マス・スクリーニングの対象疾患となっているものはほとんどが代謝酵素遺伝子の変異等により酵素活性が欠損して正常な代謝が起こらなくなることに起因する。従ってその代謝異常によ

り血液中に蓄積する物質をこれらの方によって検出することにより判定される。これら従来の試験法は基本的に1試験1対象疾患である点が次に述べる質量分析装置を用いた試験と大きく異なる点である。

## 新生児マス・スクリーニングと質量分析

我が国では、三連四重極型質量分析装置 (QqQ-MS, 以下タンデムマス) を用いた新生児マス・スクリーニングの研究が1997年から福井大学重松教授によって開始されたのに続き、2004年より厚生労働省科学研究班が組織されパイロット研究が行われた（班長：島根大学山口清次教授）。この研究成果から、タンデムマスの新生児マス・スクリーニングに対する有益性が示されたため、2012年3月に厚労省から全国自治体に対しタンデムマスによる新生児マス・スクリーニング促進についての通達が出され、全国自治体でタンデムマスによる新生児マス・スクリーニングの導入が始まった。現在行われているタンデムマスによる新生児マス・スクリーニングでは、スループット性を上げるため、乾燥ろ紙血抽出液をクロマトグラフィーにかけることなく、直接ESI-QqQ-MSに導入することにより分析されている。タンデムマスの導入により、新生児マス・スクリーニングの対象疾患は6から一気に23疾患（厚労省通知では16疾患）へと広がり、スクリーニングが有効に行われることで救われる命も増えることとなった。

現在自治体で行われているタンデムマスによるマス・スクリーニングの対象疾患は（1）アミノ酸代謝異常症（2）尿素回路異常症（3）有機酸代謝異常症（4）脂肪酸代謝異常症の4つに分類される。測定対象となる化合物はア

ミノ酸類、アシルカルニチンである。有機酸・脂肪酸代謝異常症では、酵素活性欠損などにより蓄積された有機酸・脂肪酸がミトコンドリア中でアシル-CoAとなり、アシル-CoAからカルニチンへアシル基が転移されることによりアシルカルニチンが生成されて細胞外へと排出され、体液中に排出される。この過剰に生成されたアシルカルニチンを検出することによって疾患が判定される。

以下の表にタンデムマス導入に寄って発見可能な疾患をまとめた。

分析項目	分類	疾患名
アミノ酸類	アミノ酸代謝異常症	フェニルケトン尿症 メープルシロップ尿症 ホモシスチン尿症
	尿素回路異常症	シトルリン血症 アルギノコハク酸尿症
アシルカルニチン類	有機酸代謝異常症	メチルマロン酸血症 プロピオン酸血症 イソ吉相酸血症など
	脂肪酸代謝異常症	MCAD欠損症 VLCAD欠損症 三頭酵素欠損症など

### (1) アミノ酸代謝異常症

タンデムマスで見つかる主なアミノ酸代謝異常

疾患	欠損酵素	異常代謝産物	主な症状
フェニルケトン尿症	PAH	Phe, PP, PL	精神発達遅滞 色素低下
メープルシロップ尿症	BCK ADH	Leu, Ile, Val, 2K IV, 2K3 MV, 2K	嘔吐、けいれん、ショックなどの発作

		IC	
ホモシスチン尿症	CTS	Met, Homocyst	高身長、水晶体亜脱臼、血栓症、遅滞
高チロシン血症1型	FAA	Tyr, SA, T, SAA	肝不全、肝硬変、腎尿細管障害
高グリシン血症	GCS	Gly	けいれん、小頭症（治療法なし）

### (2) 尿素回路異常症

タンデムマスで見つかる主な尿素回路異常

疾患	欠損酵素	異常代謝産物	主な症状
シトルリン血症	ASS	Cit, ウラシル、オロット酸	高アンモニア血症
アルギニノコハク酸尿症	ASL	ASA, Cit, ウラシル、オロット酸	高アンモニア血症
アルギニン血症	ARG	Arg	高アンモニア血症
シトリン欠損症	AGC	Phe, Met, Gal	乳児肝炎様症状 高アンモニア血症
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC	ウラシル オロット酸	高アンモニア血症
カルバミルリン酸合成酵素1欠損症	CPS	—	高アンモニア血症

### (3) 有機酸代謝異常症

タンデムマスで見つかる主な有機酸代謝異常

疾患	欠損酵素	異常代謝産物	主な症状
メチルマロン酸血症	MCM	<u>C3</u> MAA, M C, 3HP, P G	他呼吸、意識障害、ケトアシドーシス、高アンモニア
プロピオン酸血症	PCC	<u>C3</u> MC, 3HP, PG	同上
イソ吉相酸血症	IVDH	<u>C5</u> IVG	他呼吸、意識障害、特異な体臭
グルタル酸血症1型	GCDH	<u>C5DC</u> GA, 3HG	脳性有機酸血症、錐体外路障害
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	HCS or BT	<u>C5OH</u> MC, MC G, 3HIV, LA	頑固な失神、頑固な下痢、高乳酸血症
先天性高乳酸血症	PDHC, PC	LA, Pyr	筋緊張低下、発達遅滞

素酵素欠損症			
極長鎖アシル-CoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症	VLCA D	<u>C14:1, C16</u>	急性脳症 筋肉痛 脱力 全身倦怠
三頭酵素(TFP)欠損症	TFP	<u>C16-OH, C16</u>	急性脳症 筋肉痛 脱力
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII(CPT2)欠損症	CPT2	<u>C16</u>	急性脳症 肝機能障害 筋力低下 筋肉痛
CPT1欠損症	CPT1	<u>C0 C0/[C16+ C18]比</u>	急性脳症 肝機能障害 筋力低下 筋肉痛
全身性カルニチン欠乏症	OCTN 2	血中 <u>C0</u> 低下 (尿中 <u>C0</u> 増加)	急性脳症 突然死

### (4) 脂肪酸代謝異常症

タンデムマスで見つかる主な脂肪酸代謝異常

疾患	欠損酵素	異常代謝産物	主な症状
中鎖アシルCoA脱水	MCAD	<u>C8, C10,</u> <u>C6</u>	突然死 ライ症候群

### ライソゾーム病

ライソゾーム病 (lysosomal storage disease) は、細胞内にある小器官の一つであるライソゾーム (lysosome) に関連した酵素が欠損しているために、分解されるべき物質が老廃物として体内に蓄積してしまう先天代謝異常疾

患の総称である。現在、ライソゾーム病は自治体主導で行われている新生児マス・スクリーニング対象疾患ではないが、近年有効な治療法がいくつか開発されたため、欧米ではマス・スクリーニングの対象疾患にされているものも有り、成育医療センターでも希望者に対してスクリーニング検査を行っている。

ライソゾームは、細胞の中で糖質や糖脂質の分解を行っている。これには約60種類の加水分解酵素が関与しているが、酵素の欠損・異常によって、ライソゾームの分解機能が発揮されなくなり、本来分解されるべき物質が蓄積する疾患がライソゾーム病である。欠損している酵素により病名や症状が異なり、現在約30種類の病気がある。2001年に「ライソゾーム病」という病名で特定疾患に難病指定されたため、治療には国からの援助の対象となっている。根治には遺伝子治療が必要であるが、現在の所酵素補充療法、臓器移植、骨髄移植が行われている。しかし脳や神経の症状には酵素補充療法と骨髄移植はほとんど効果がないようであるが、成育医療センターでは髄液中の酵素補充療法による臨床試験が計画中である。

成育医療センターで行われているマス・スクリーニングは、ライソゾーム酵素により分解を受けると蛍光を発する4MU-Gを用いたものや酵素補充療法治療薬の販売元であるGenzyme社によって開発された酵素活性測定基質を用いたタンデムマスによるマス・スクリーニング系が確立されている。この酵素活性測定基質はGenzymeにより生産され、CDCから全世界に向けて無料で配布されている。現在のところポンペ病 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ欠損)、ファブリー病 ( $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損)、ゴーシュ病 (グルコセレブロシダーゼ欠損)、

クラッペ病 (ガラクトセレブロシダーゼ欠損)、ニーマンピック病 (スフィンゴミエリナーゼ欠損) に対する測定系を確立した。

## 免疫疾患

免疫疾患も近年有効な治療法が開発されたため、マス・スクリーニングの対象疾患となりつつある。T細胞欠損によって起こる重症複合免疫不全症 (Severe Combined Immunodeficiency: SCID) も骨髄移植や一部の疾患では酵素補充療法が開発されている。このSCIDのマス・スクリーニングは、米国ウィスコンシン州から開始されているが、T細胞の発生過程で起こるT細胞受容体の遺伝子再構成において生成されるT-cell receptor excision circles (T-RECs)を定量的PCRによって検出・定量することによって行われている。しかし定量的PCRの煩雑さ、コスト高から本邦ではなかなか開始される見通しが立っていない。

SCIDの中でもアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症は本邦において北海道大学で最初に遺伝子治療が行われた免疫疾患として有名であり、SCIDの中でも多くの割合を占める。成育医療センターではこの疾患に対してDARTイオン源を用いたスループット性の高いマス・スクリーニング系を島津製作所、AMRとともに開発した。ADAはアデノシンをイノシンに変換する反応を触媒する酵素である。イノシンは生体内に広く発現しているプリンヌクレオチドホスホリラーゼ (PNP) によって速やかにヒポキサンチンへと代謝される。乾燥ろ紙血を酵素源にアデノシン又はデオキシアデノシンを基質として一定時間反応させた後、酵素反応生成物をLC-ESI-QqQ-MSまたはDART-QqQ-MSで検出したところ、健常者と酵素補充療法を受けた患者の検体からは酵素

活性が検出されたが、酵素補充療法を受けていない患者からは酵素活性は全く検出されなかった。しかもDART-QqQ-MSでは1検体当たりの分析時間も12秒とスループット性も非常に優れていた。成育医療センターでは、CDCと共同でこの方法の普及に努める計画である。

タンデムマスを用いた新生児マス・スクリーニングは、厚労省通知によって急速に自治体に広まったが、全く質量分析装置に触れたことのない測定者によって操作されているため結果には問題があり、深刻なフォールスネガティブが多発しているのが実情である。私たちの施設ではこのような事態を一刻も早く解消するため、自治体によるタンデムマスを用いたマス・スクリーニングの技術指導や精度管理を行う予定である。

またCDCなど海外の機関と共にライソゾーム病や免疫疾患など次の時代のマス・スクリーニング系を開発していくと考えている。