

# 先天代謝異常症の 新生児スクリーニング

解説資料

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

# Contents

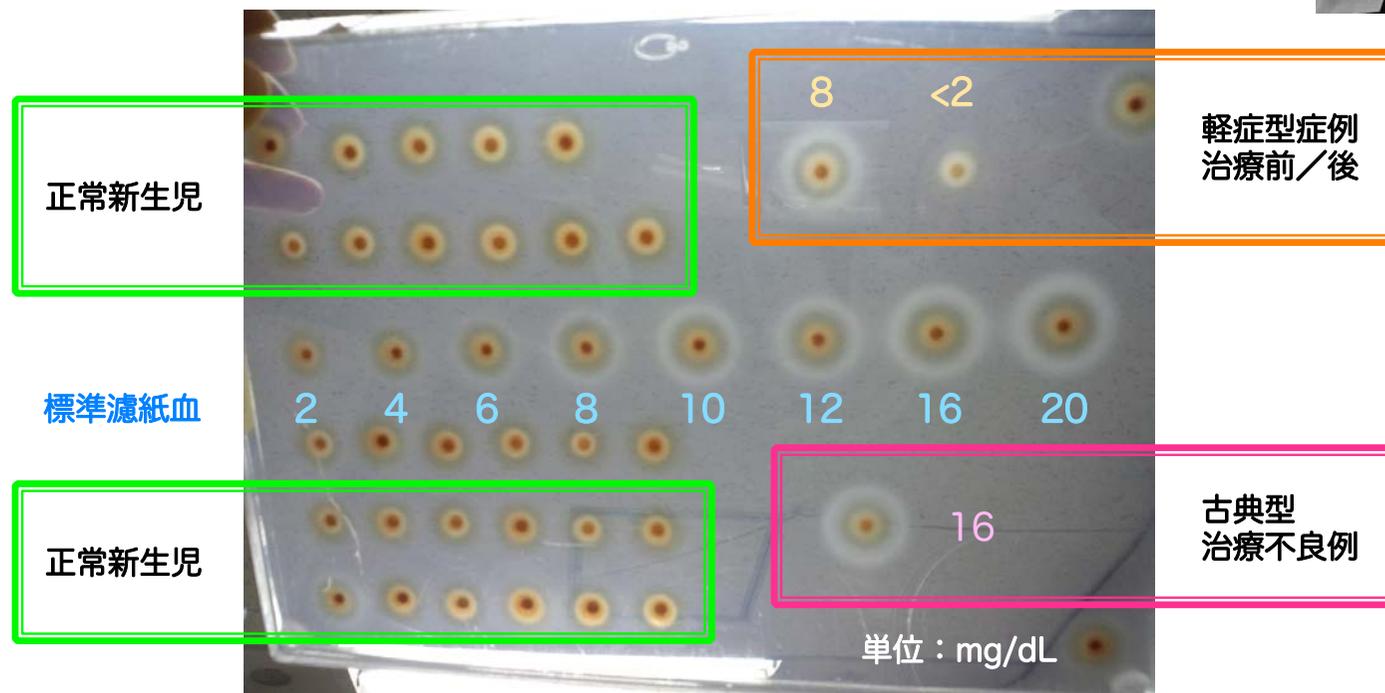
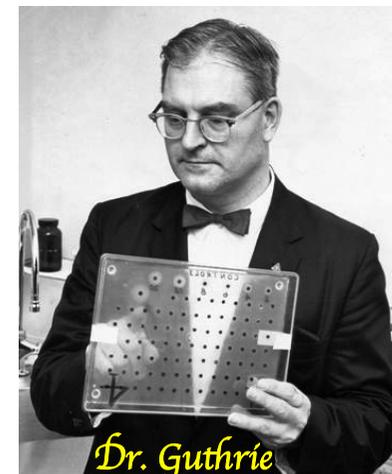
- 1) 先天性代謝異常症の新生児スクリーニング概論
- 2) 疾患各論：アミノ酸代謝異常症
- 3) 疾患各論：有機酸代謝異常症
- 4) 疾患各論：脂肪酸代謝異常症
- 5) 新生児スクリーニング検査の精度管理

# 先天代謝異常症の新生児スクリーニング小史

- |      |                        |   |
|------|------------------------|---|
| 1902 | Garrod (英)             | アルカプトン尿症に関する論文：<br>メンデル遺伝性を示す化学的個体差として説明                |
| 1908 | Garrod                 | 先天代謝異常の概念を提唱  |
| 1934 | Fölling (ノルウェー)        | 精神発達遅滞の原因としてフェニルケトン尿症を発見                                |
| 1941 | Beedle, Tatum (米)      | 一遺伝子一酵素説を提唱   |
| 1953 | Bickel (独)             | 低フェニルアラニン食の有効性を報告                                       |
| 1951 | Moore, Stein (米)       | 陽イオン交換カラムによるアミノ酸分析法を確立                                  |
| 1958 | Spackman, Moore, Stein | アミノ酸自動分析計を実用化   |
| 1961 | Guthrie (米)            | 新生児マススクリーニング検査法を実用化                                     |
| 1967 | Tanaka (日)             | イソ吉草酸血症を発見 (最初の有機酸代謝異常症)<br>以後 GC/MS 法による有機酸代謝異常症の解明が進展 |
| 1972 | Moore, Stein           | ノーベル化学賞を受賞  |
| 1977 | (日本)                   | 公費による新生児スクリーニング事業が始まる                                   |

# ガスリー法の原理

1. 枯草菌のフェニルアラニン依存性菌株を培地で培養
2. 乾燥濾紙血をパンチアウトしたディスクを培地上に静置
3. 濃度既知のフェニルアラニンを含むディスクを対照として静置



4. 濾紙血ディスク周囲の菌成長面積からの比例計算でフェニルアラニン含有濃度を判定

# カラムクロマトグラフィによる化学分析

未知の混合試料  
(血液・尿など)



分離系

= ガスクロマトグラフィ (GC)  
= 高速液体クロマトグラフィ (HPLC)



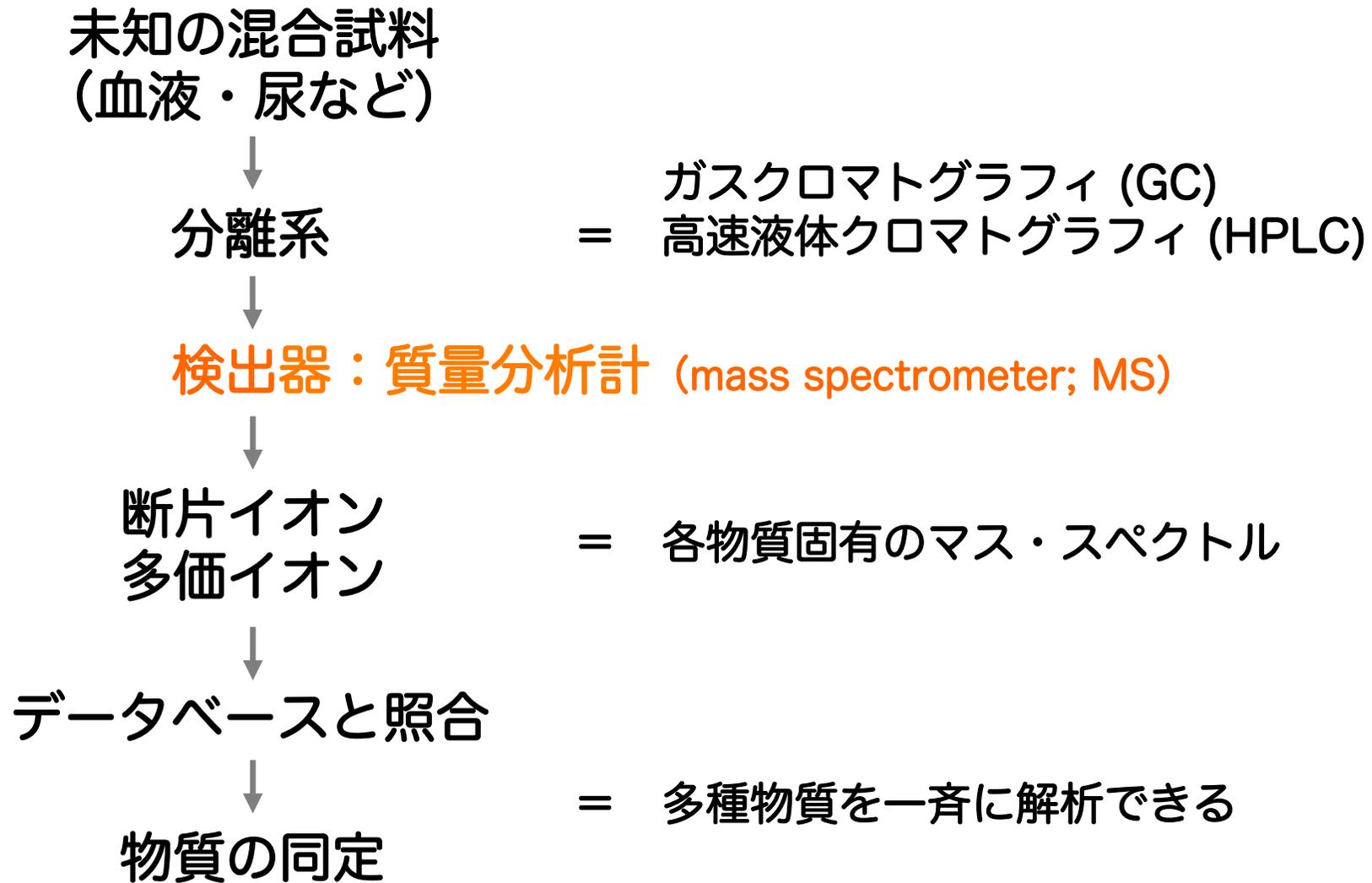
検出器

= 紫外吸光度計, 蛍光光度計, etc.

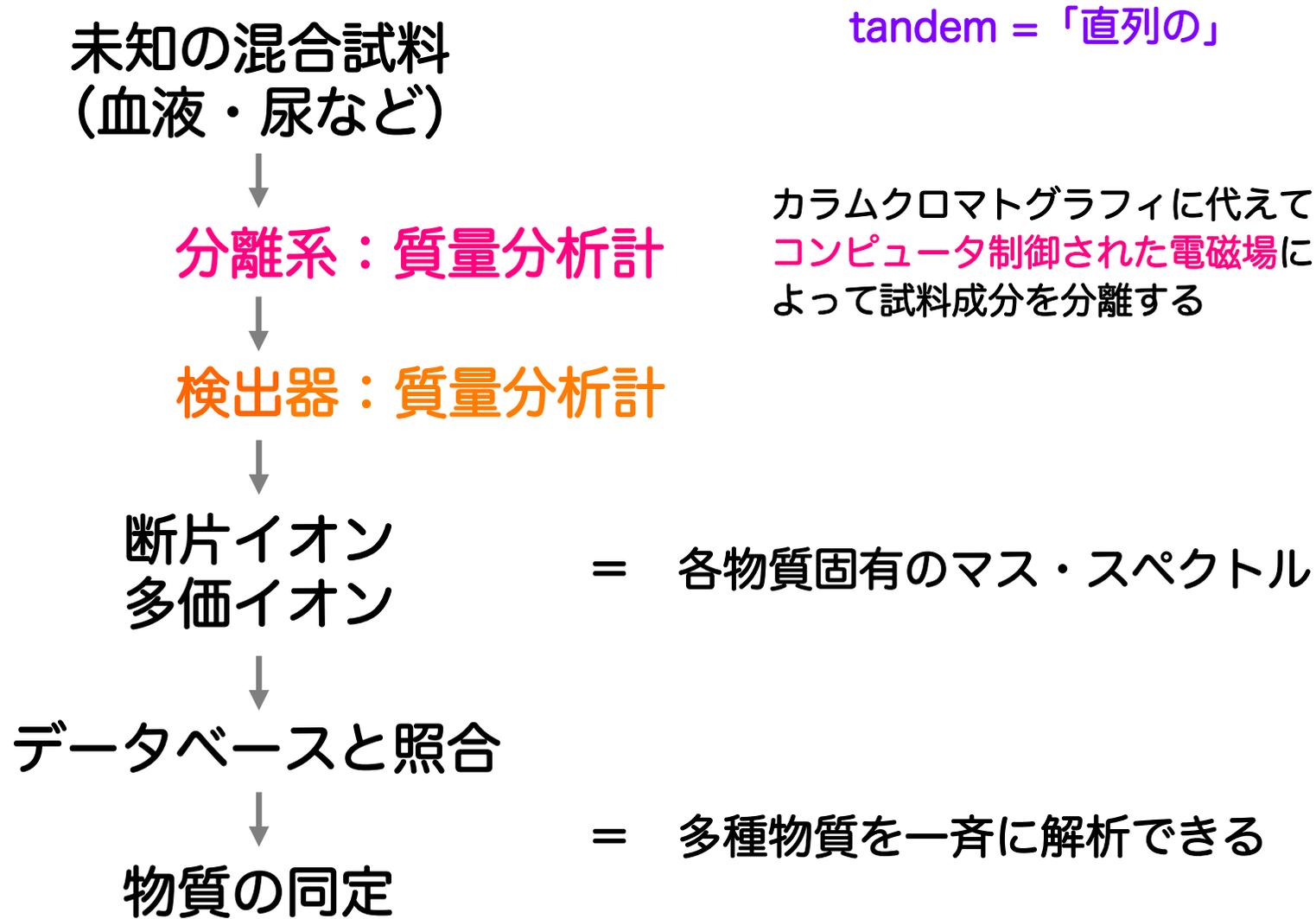


定性的同定は カラムからの溶出に  
要した時間 (=保持時間) に依拠

# カラムクロマトグラフィ+質量分析計による化学分析



# タンデムマス = 質量分析計 + 質量分析計による化学分析



# 日本国内のタンデムマス新生児スクリーニング

- 1997 福井県で試験研究を開始（重松）
- 1999 広島県で試験研究を開始
- 2000 徳島県で試験研究を開始
- 2005 厚生労働科学研究班（山口班）が発足

分析拠点：札幌・東京・福井・島根・熊本

- 2012 自治体事業への移行が始まる
- 2014 全自治体での実施体制が実現

# 新生児スクリーニングの対象疾患：検査方法

疾患	測定する指標	検査法
フェニルケトン尿症	フェニルアラニン	ガスリー
メープルシロップ尿症	ロイシン	↓ (酵素法 or HPLC)
ホモシスチン尿症 1 型	メチオニン	↓ タンデムマス
尿素サイクル異常症 シトルリン欠損症	シトルリン (アルギニノコハク酸, セリン)	タンデムマス
有機酸・脂肪酸代謝異常症	アシルカルニチン	タンデムマス
ガラクトース血症	ガラクトース	パイゲン → 酵素法
	酵素活性 (1 型)	ボイトラー
先天性甲状腺機能低下症	TSH	ELISA
先天性副腎皮質過形成症	17-OHP	ELISA

# 新生児スクリーニングの対象疾患：臨床像の分類

疾患	急性発症	緩徐進行性
フェニルケトン尿症		発達遅滞
メープルシロップ尿症	急性脳症	発達遅滞, 成長障害
ホモシスチン尿症1型		発達遅滞, てんかん
尿素サイクル異常症	急性脳症	発達遅滞, 成長障害
シトリン欠損症	急性脳症 (成人期)	肝障害, 成長障害
有機酸代謝異常症	急性脳症	発達遅滞, 成長障害
脂肪酸代謝異常症	低血糖症, 急性脳症, 心停止 横紋筋融解症	
ガラクトース血症		肝障害, 白内障
先天性甲状腺機能低下症		発達遅滞
先天性副腎皮質過形成症	急性副腎不全によるショック	

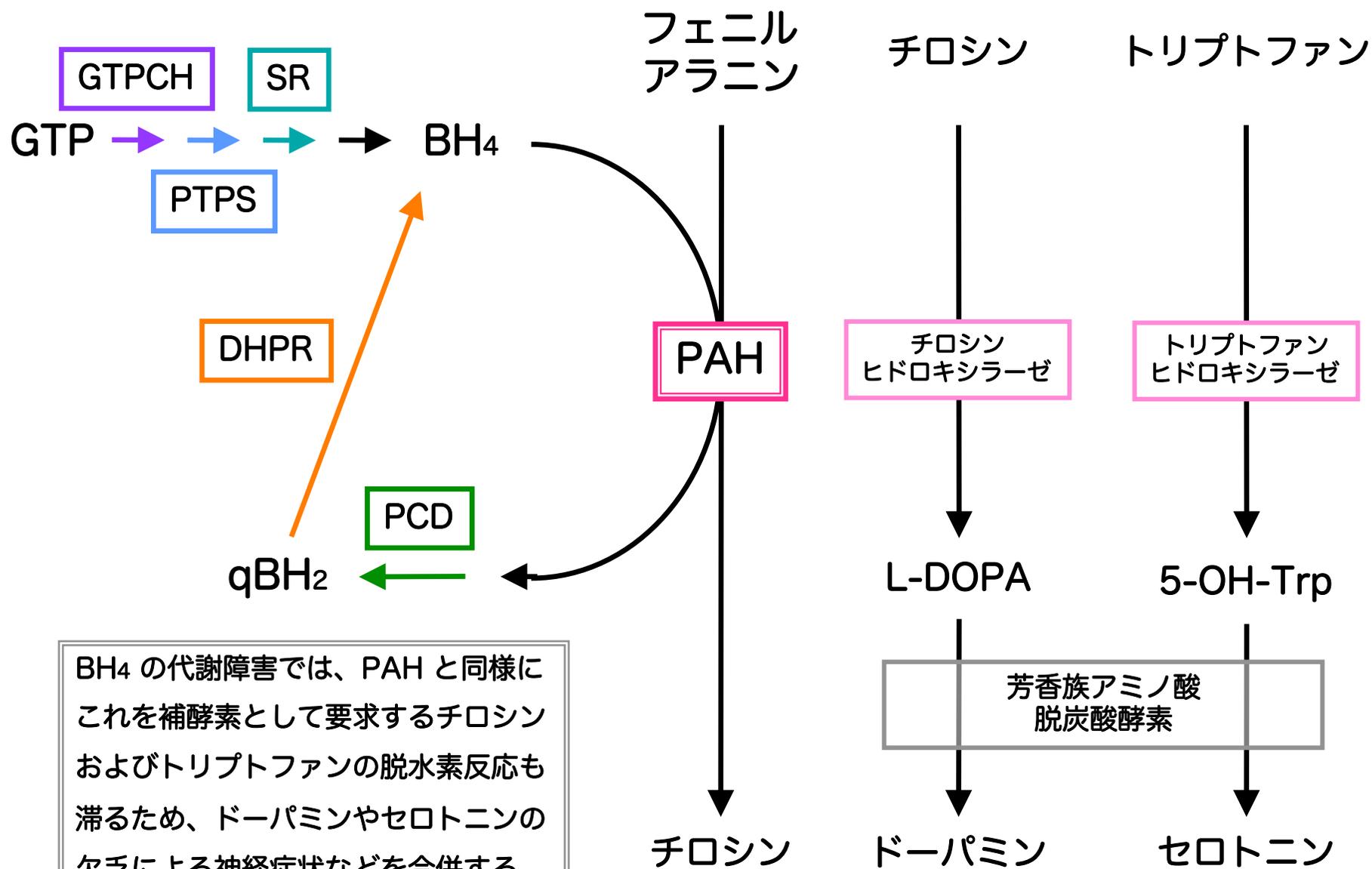
# アミノ酸代謝異常症

## 試験研究結果：アミノ酸代謝異常症（頻度 1/27,000）

	マススクリーニング対象疾患	指標項目	発見例数
試験研究参加地域 外で従来法の検査 で発見された症例 は含まれていない	高フェニルアラニン血症	Phe	37
	メープルシロップ尿症	BCAA	1
	ホモシスチン尿症1型	Met	3
	シトルリン血症1型	Cit	6
	アルギニノコハク酸尿症	Cit (ASA)	2
	シトリン欠損症	Cit, etc	23
	スクリーニング総数	(1997~2012)	1,949,987

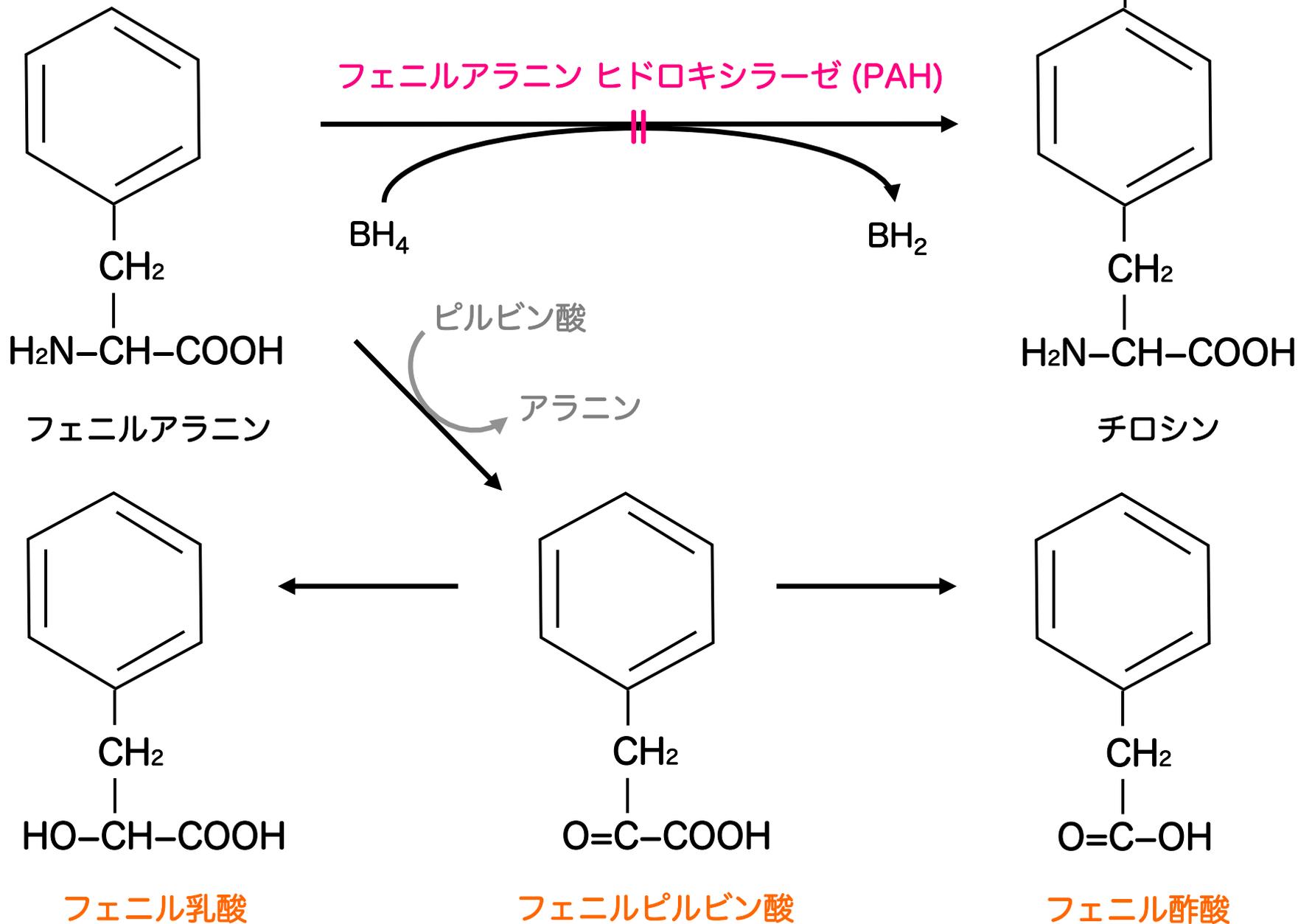
山口清次：タンデムマス導入による新生児マススクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究。  
平成24年度厚生科学研究報告書, 2013.

# フェニルアラニンの代謝経路

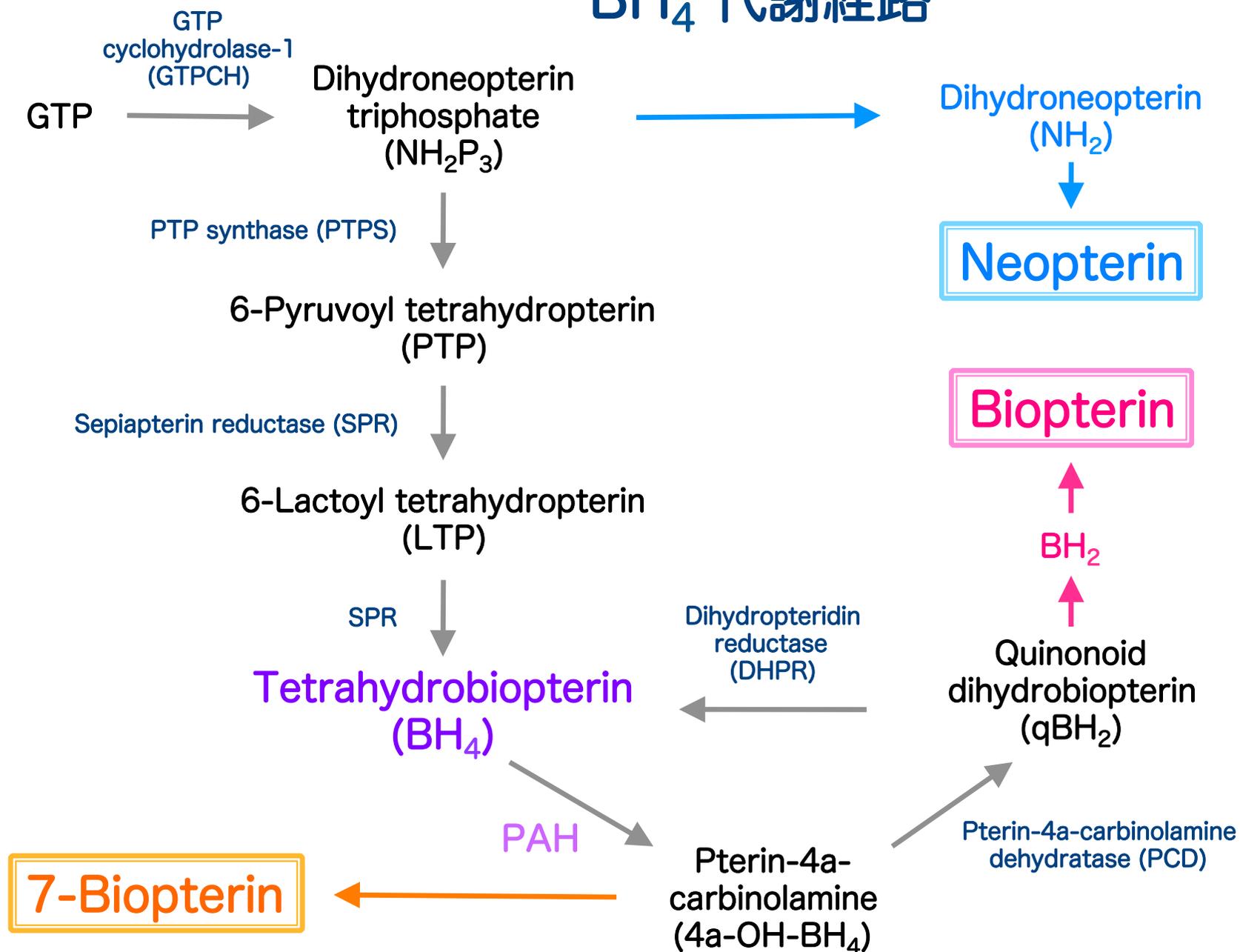


BH<sub>4</sub> の代謝障害では、PAH と同様にこれを補酵素として要求するチロシンおよびトリプトファンの脱水素反応も滞るため、ドーパミンやセロトニンの欠乏による神経症状などを合併する。

# フェニルケトン類の生成



# BH<sub>4</sub> 代謝経路



# フェニルアラニン高値の原因

濾紙血フェニルアラニン値  
mg/dL (μM)

## フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) 障害

フェニルケトン尿症 (古典型)	20 (1,200) ~
フェニルケトン尿症 (軽~中等症)	10~20 (600~1,200)
高フェニルアラニン血症 (要治療レベル)	4~10 (240~600)
高フェニルアラニン血症 (治療不要レベル)	2~ 4 (120~240)

## テトラヒドロビオプテリン (BH<sub>4</sub>) 欠乏症

GTPCH 欠損症  
PTPS 欠損症  
DHPR 欠損症  
PCD 欠損症

ごく軽度の上昇~著明高値  
まで広範囲にわたっており、  
異常値の程度を問わず直ちに  
プテリジン分析にて鑑別診断  
を進めなければならない。

## シトリン欠損症 (NICCD)

ガラクトース, シトルリン,  
メチオニン, チロシンなどの  
異常が様々な組み合わせで  
現れるのが特徴的。

# 高フェニルアラニン血症

フェニルアラニンは異化の第一段階で水酸化されてチロシンとなる。  
血中フェニルアラニン値の上昇は、以下の原因によって出現する。

- ・ フェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) の障害
  - ・ PAH の補酵素テトラヒドロビオプテリン (BH<sub>4</sub>) の合成・再生経路の障害
- 

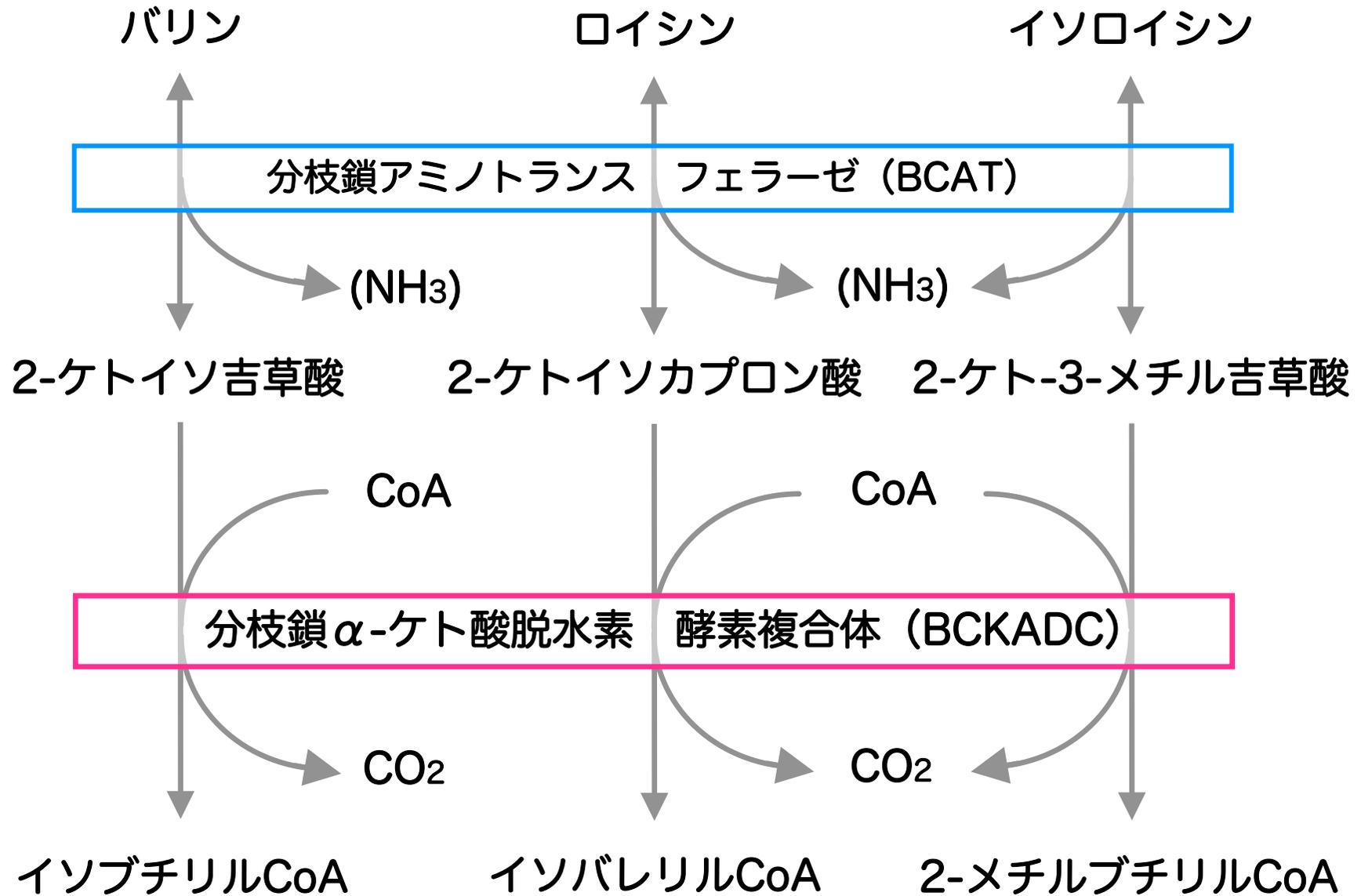
## ◎ PAH 障害による高フェニルアラニン血症 (フェニルケトン尿症 : PKU)

- ・ 頻度 : 欧米白人=約1万人に1人, 日本人=約7万人に1人
- ・ 医療によって予防できる精神発達遅滞の原因として重要!
- ・ 治療 : 食事療法=フェニルアラニン摂取制限

乳児期      フェニルアラニン除去ミルクによる授乳

離乳期～    食品中のフェニルアラニン含有量に基づいて摂取量を計算し、  
タンパク質の摂取不足分を除去ミルクで補うようにする。

# 分枝鎖アミノ酸異化の第1～第2段階



# 分枝鎖アミノ酸の代謝経路と酵素欠損症

1. 3種類の分枝鎖アミノ酸 (BCAA) は、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ (BCAT) によって分枝鎖 $\alpha$ -ケト酸 (BCKA) を生じる。

※BCAT の障害による高 BCAA 血症は現在まで知られていない。

---

2. 分枝鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素複合体 (BCKADC) によって分枝鎖アシルCoA となる。BCKADC 活性の障害によってメープルシロップ尿症が生じる。

診断： 血中 BCAA 増加, 尿中 BCKA 増加

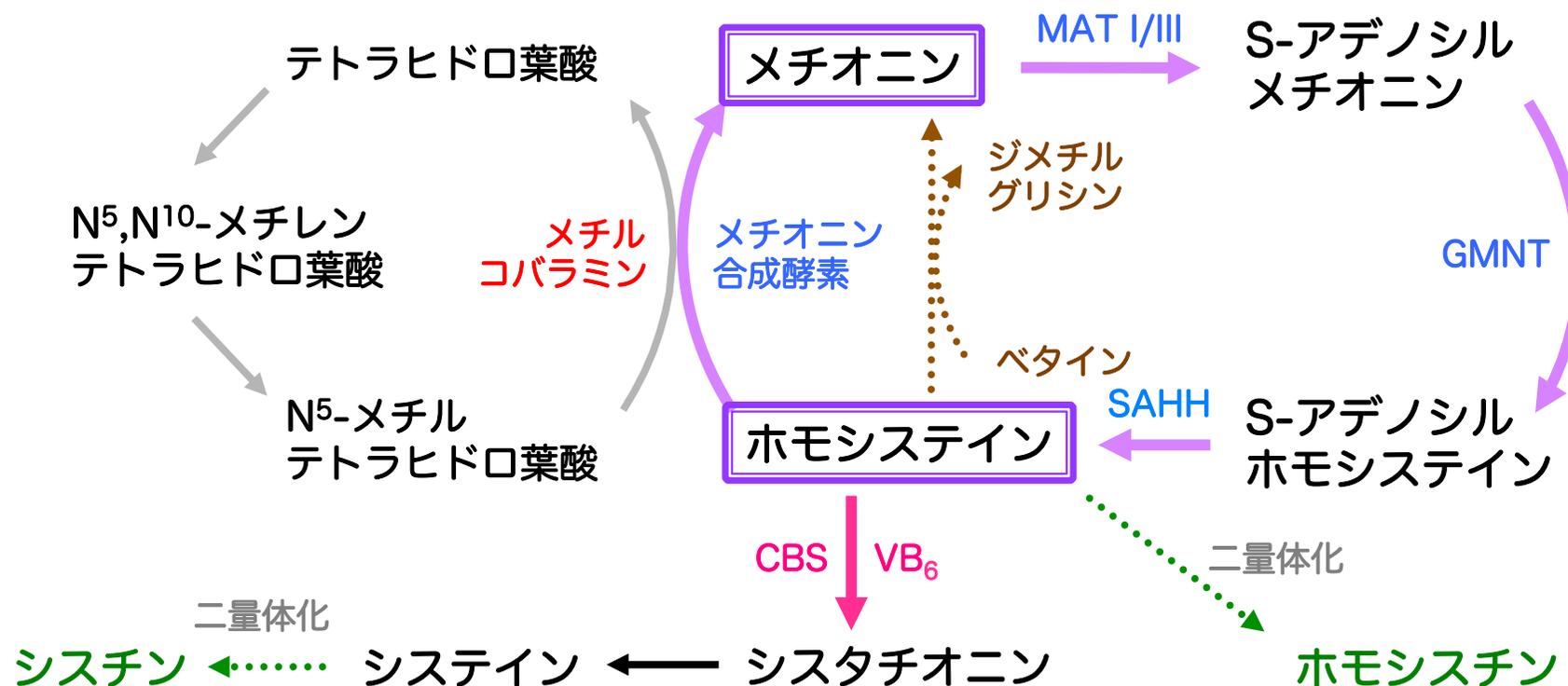
症状： (古典型) 新生児期発症の進行性脳症  
(遅発型) 反復性嘔吐症, 発達遅滞 など

---

3. BCKADC の反応は不可逆的であるため、分枝鎖アシルCoA以降の代謝酵素の障害では血中 BCAA 増加は伴わない。

この経路にはメチルマロン酸血症・プロピオン酸血症などの代表的な有機酸代謝異常症が多数知られ、その診断には尿中有機酸分析が必須。

# 「メチオニン回路」の代謝障害



疾患	メチオニン	総ホモシステイン
肝メチオニンアデノシル転移酵素 (MAT-I/III) 欠損症	↑↑~↑↑↑	正常 ~ 30μM
グリシン N-メチル転移酵素 (GNMT) 欠損症	↑↑~↑↑↑	正常
S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素 (SAHH) 欠損症	↑~↑↑	正常
シスタチオニン合成酵素 (CBS) 欠損症 (ホモシスチン尿症1型)	↑↑~↑↑↑	100μM~

# 高メチオニン血症を呈する先天代謝異常症

疾患

臨床症状

MAT-I/III 欠損症

常染色体優性型と劣性型が存在する：

AD 型

優性阻害効果（二量体形成阻害）を示す R264H 変異に起因  
メチオニンは軽度上昇に留まることが多い（ $\sim 400 \mu\text{M}$ ）  
無症状

AR 型

メチオニンは著明な高値を呈する（ $600 \sim 2,500 \mu\text{M}$ ）  
無症状例が多いが 発達遅滞・大脳白質病変の報告例あり

GNMT 欠損症

2001年以來3例の報告あり：  
肝腫大，AST・ALT 高値 などが認められているが  
軽度の症状に留まる

SAHH 欠損症

2004年以來6例の報告あり：  
胎児水腫，発達遅滞，ミオパチー，重度肝障害  
などを呈する予後不良疾患

CBS 欠損症  
(ホモシスチン尿症1型)

マルファン症候群様体型，水晶体亜脱臼，骨粗鬆症，  
血栓塞栓症，精神発達遅滞，てんかん

# 従来からの3疾患に関する課題：軽度高値例の多発

タンデムマス移行後、軽度高値例の多発傾向が強まっている

---

フェニルアラニン軽度高値：軽症高フェニルアラニン血症  
多くは治療不要レベルに留まる

→ 軽症例の高頻度変異によって治療の必要性を評価できる可能性  
(AMED 深尾班・大阪市立大学のデータによる)

---

分枝鎖アミノ酸軽度高値：メープルシロップ尿症偽陽性  
異化亢進時に筋肉から動員されるエネルギー源であるため  
哺乳不良などに伴う軽度高値による偽陽性が生じやすい

→ 初回濾紙血を用いる二次検査（アロイソロイシン測定）  
によって要精査率を低減することが可能

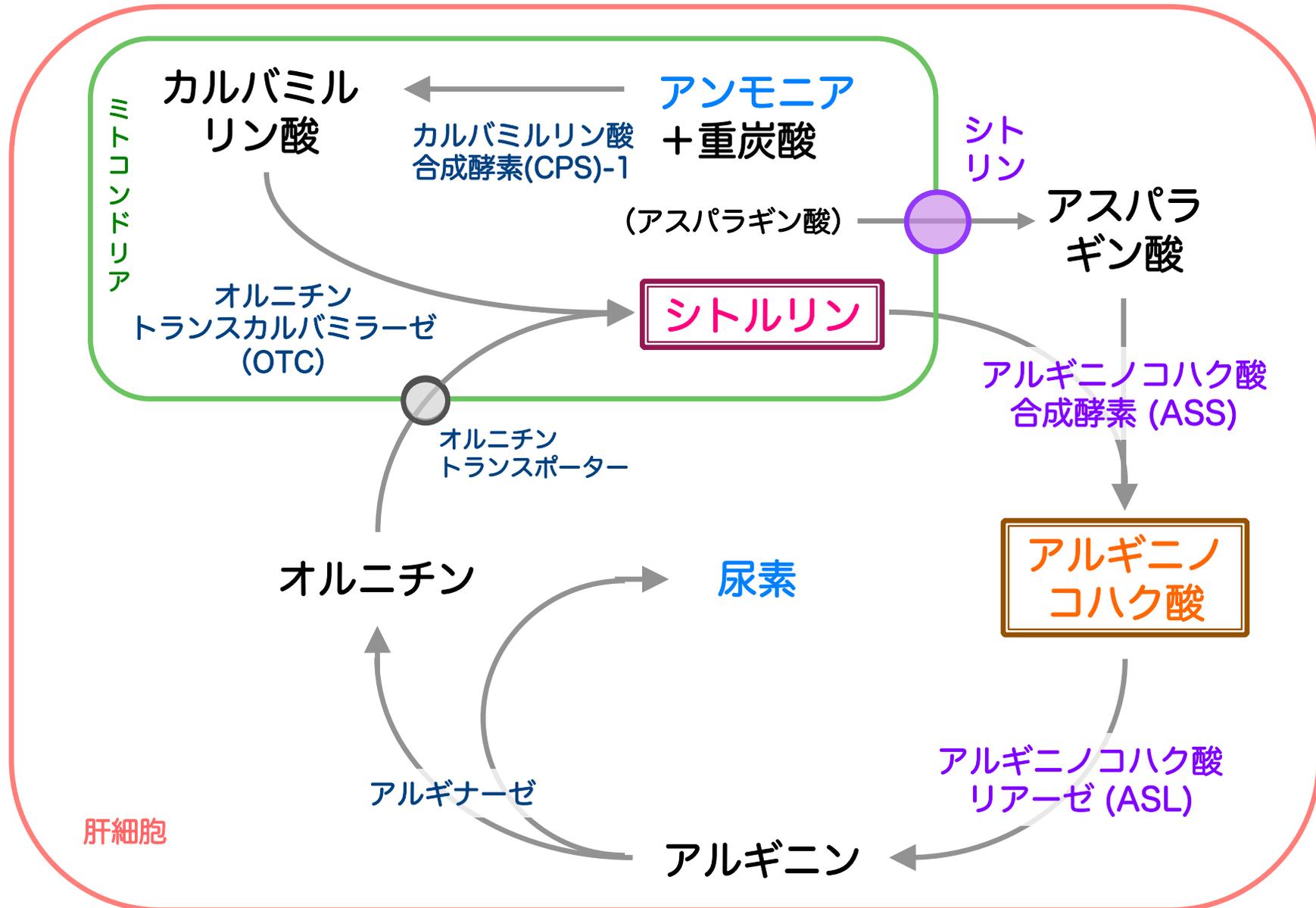
---

メチオニン軽度高値：肝メチオニンアデノシル転移酵素欠損症 保因者  
これは医療管理不要だが、ホモシスチン尿症1型患者も  
初回検査では同程度の軽度高値を呈しうる

→ 初回濾紙血を用いる二次検査（総ホモシステイン測定）  
によって要精査率を低減することが可能

---

# 濾紙血シトルリン高値で見つかる尿素回路異常症



# 尿素回路の代謝障害と生化学所見

指 標	疾 患	その他の生化学所見
シトルリン↓	カルバミルリン酸合成酵素 (CPS) -1 欠損症	<p>新生児期発症例の早期診断には有用だが、遅発型症例を新生児期に発見することには成功していない</p> <p>AMED 小林弘典班で検討中</p>
	N-アセチルグルタミン酸合成酵素 (NSGS) 欠損症	
	オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症	
シトルリン↑	アルギニノコハク酸合成酵素 (ASS) 欠損症 =シトルリン血症1型	
	シトリン欠損症 = 新生児肝内胆汁うっ滞 (NICCD) シトルリン血症2型 (成人型)	Cit/Ser, Phe, Met, Arg, Tyr, ガラクトース などが様々な組み合わせで増加
	アルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) 欠損症 =アルギニノコハク酸尿症	アルギニノコハク酸↑ 血) タンデムマス分析 尿) 有機酸分析

# 尿素回路異常症

この群の疾患は、高アンモニア血症による中枢神経障害を主体とする症状を呈する。

高アンモニア血症→脳浮腫→脳圧亢進→中枢神経障害

これは、グルタミン酸+アンモニア→グルタミン の反応が進む結果、主にアストロサイトの細胞内浸透圧が上昇して、細胞が膨化するためと考えられている。

臨床症状：

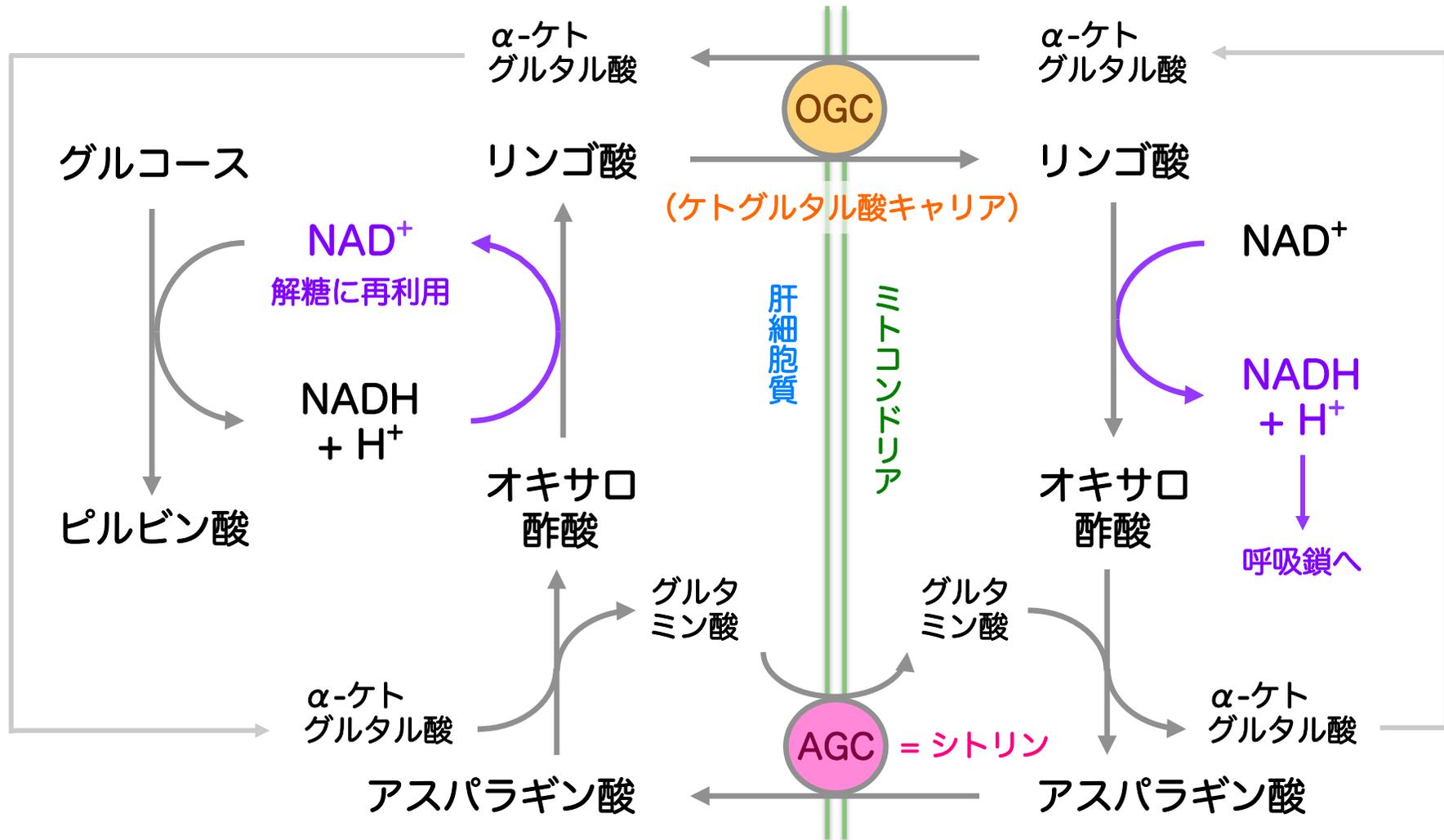
新生児期発症 = 哺乳不良，過呼吸，けいれん，傾眠，昏睡

乳児～小児期 = 嘔吐症，発育障害，発達遅滞，急性脳症

成人期 = 慢性の神経学的・精神医学的症状，急性脳症

# シトリンの役割：細胞質 NADH の再酸化

肝細胞質で生じた NADH はミトコンドリアへ直接入ることはできず、二種類の輸送タンパクアスパラギン酸-グルタミン酸キャリア (AGC=シトリン) & ケトグルタル酸キャリア (OGC) が化学反応のサイクルを形成することで、ミトコンドリア内に NADH を生成させている。

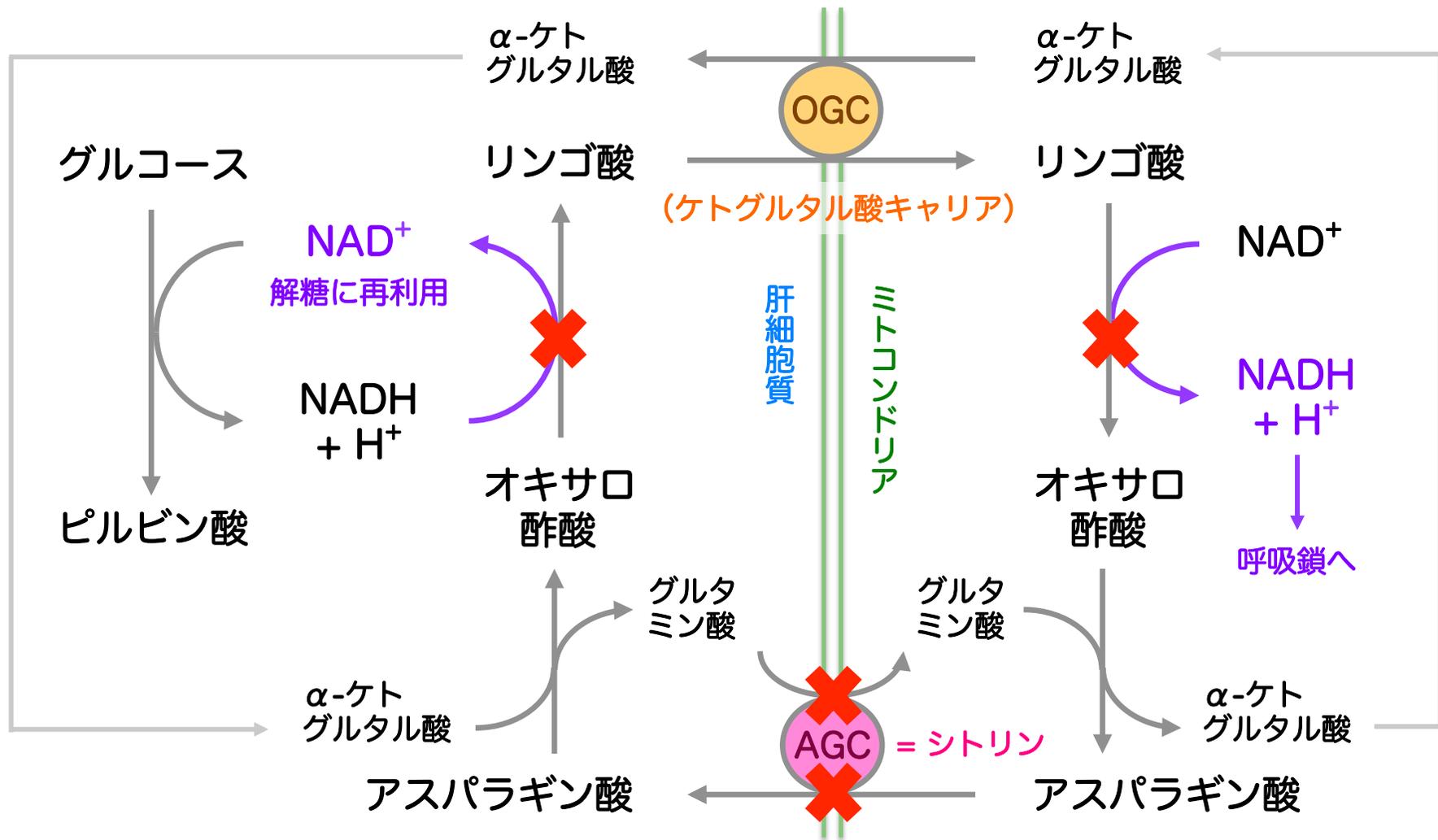


# シトリン欠損症 (推計頻度=約 1/20,000人) の自然歴

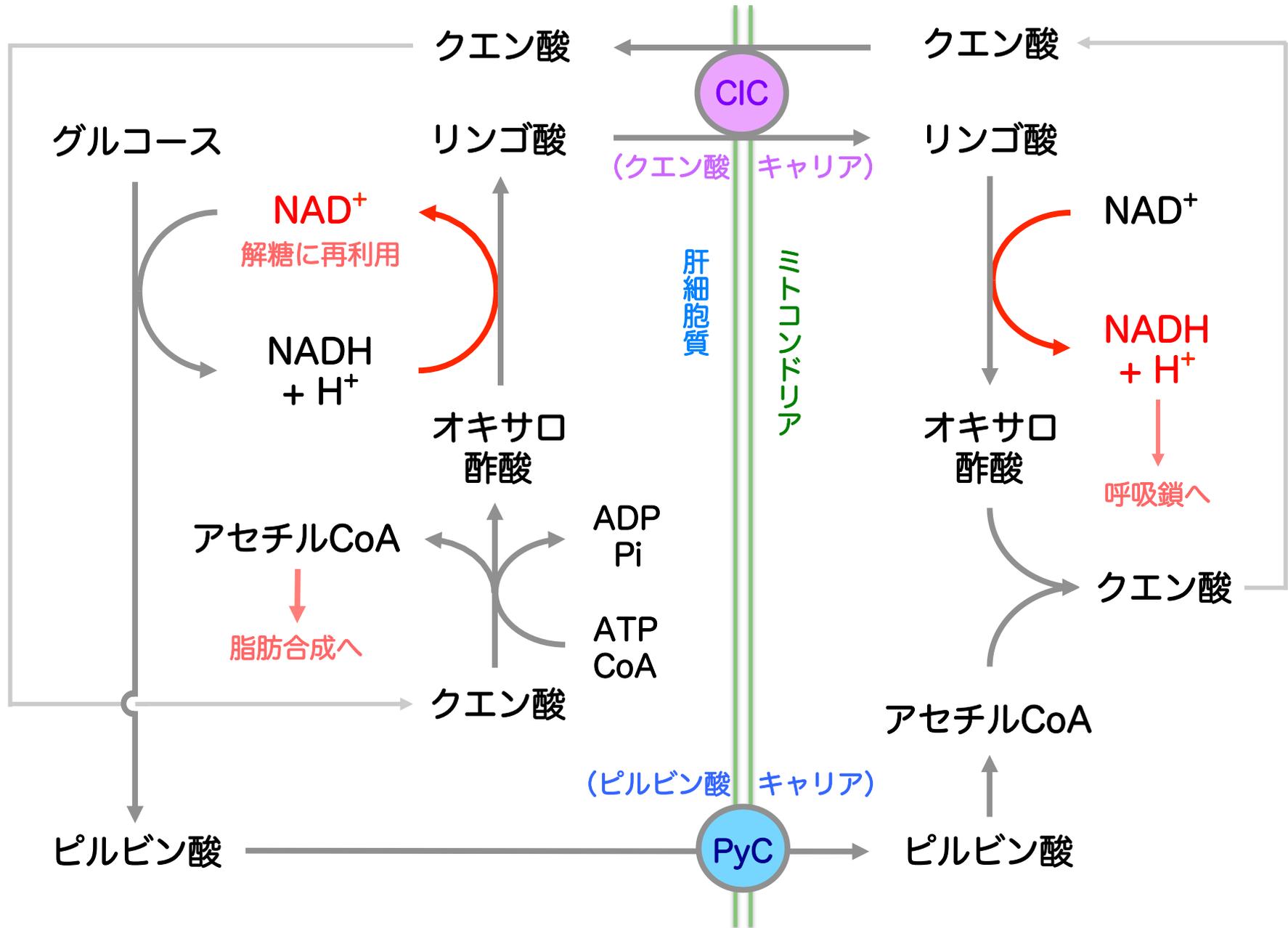
新生児期 0y	幼小児期 1y~10y	思春期~成人期 10y~80y
NICCD	適応・代償期	CTLN2
<p>体重増加不良</p> <p>遷延性黄疸 肝内胆汁うっ滞 脂肪肝 低タンパク血症 凝固能低下</p> <p>多種アミノ酸血症 Cit, Thr, Met, Phe, Tyr, etc.</p> <p>高ガラクトース血症</p> <p>低血糖症</p>	<p>特異な偏食傾向が出現</p> <p>↓</p> <p>タンパク (特に大豆) 脂質 糖質</p> <p>◎ ○ ×</p> <p>細胞質での Asp 欠乏を代償するため、特に豆類を多量に摂取するものと考えられている。</p> <p>糖質は細胞質内の NADH を増加させ、体調悪化をもたらす。</p> <p>代償期の低血糖症も少なくないことが明らかとなりつつある。</p>	<p>意識障害</p> <p>↓</p> <p>高アンモニア血症 高シトルリン血症</p> <p>* 高濃度グルコース輸液 + 浸透圧利尿剤 (グリセロール+果糖) の投与で致命的となる。</p> <p>脂肪肝, 肝癌, 膵炎</p>
		<p>中鎖脂肪酸オイルで肝移植を回避できる</p>

# シトリン欠損症の影響：細胞質 NADH 再酸化障害

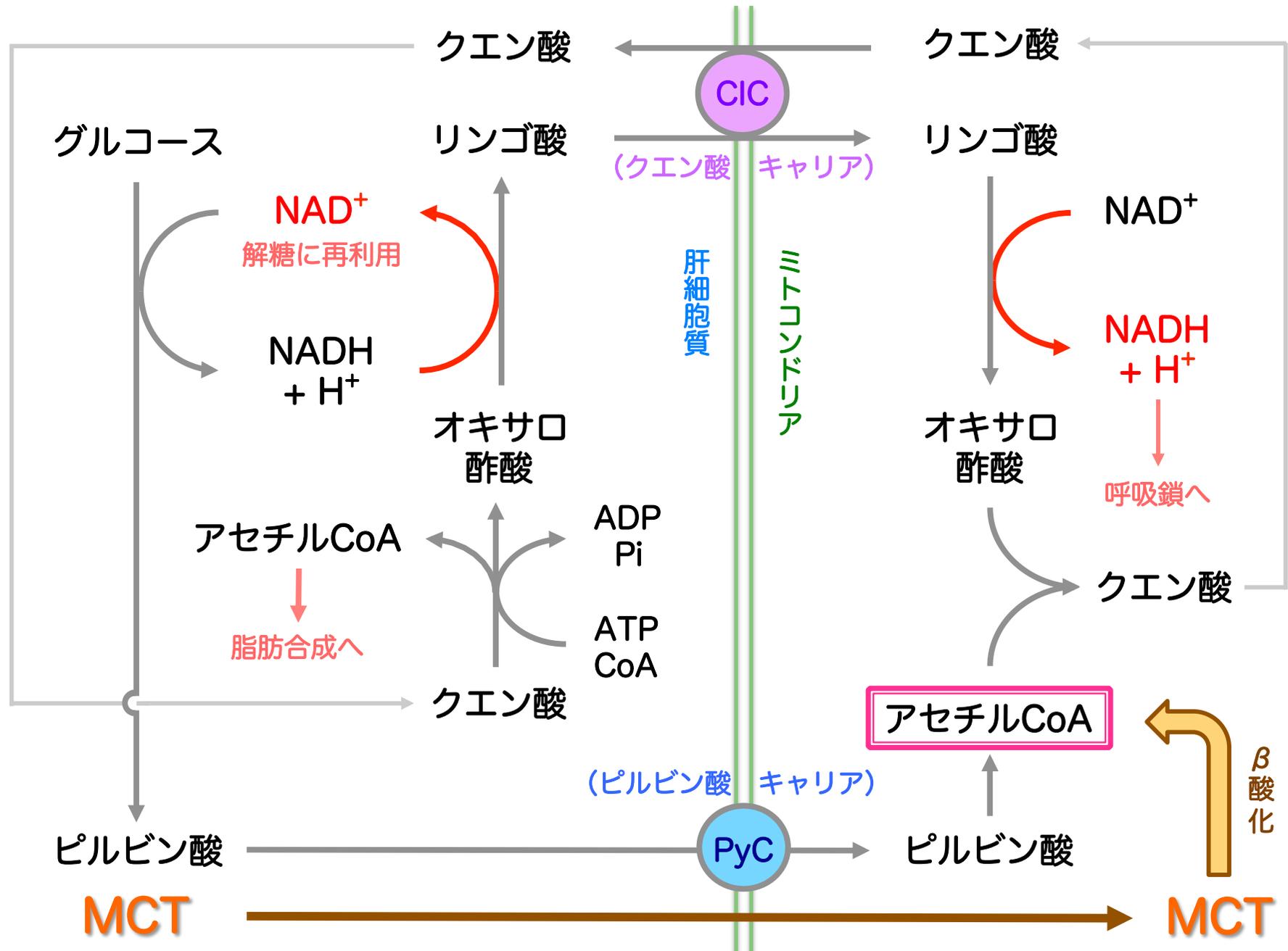
シトリン機能障害の結果、細胞質の  $\text{NAD}^+$  が欠乏して解糖系が停滞  
→ 過剰な糖質の負荷は代謝異常を悪化させ、各種の症状を惹起する



# リンゴ酸-クエン酸シャトル：シトリンを代償できる？



中鎖脂肪酸油 (MCT) は肝細胞ミトコンドリアに直接届いて多量のアセチルCoA を生成させる



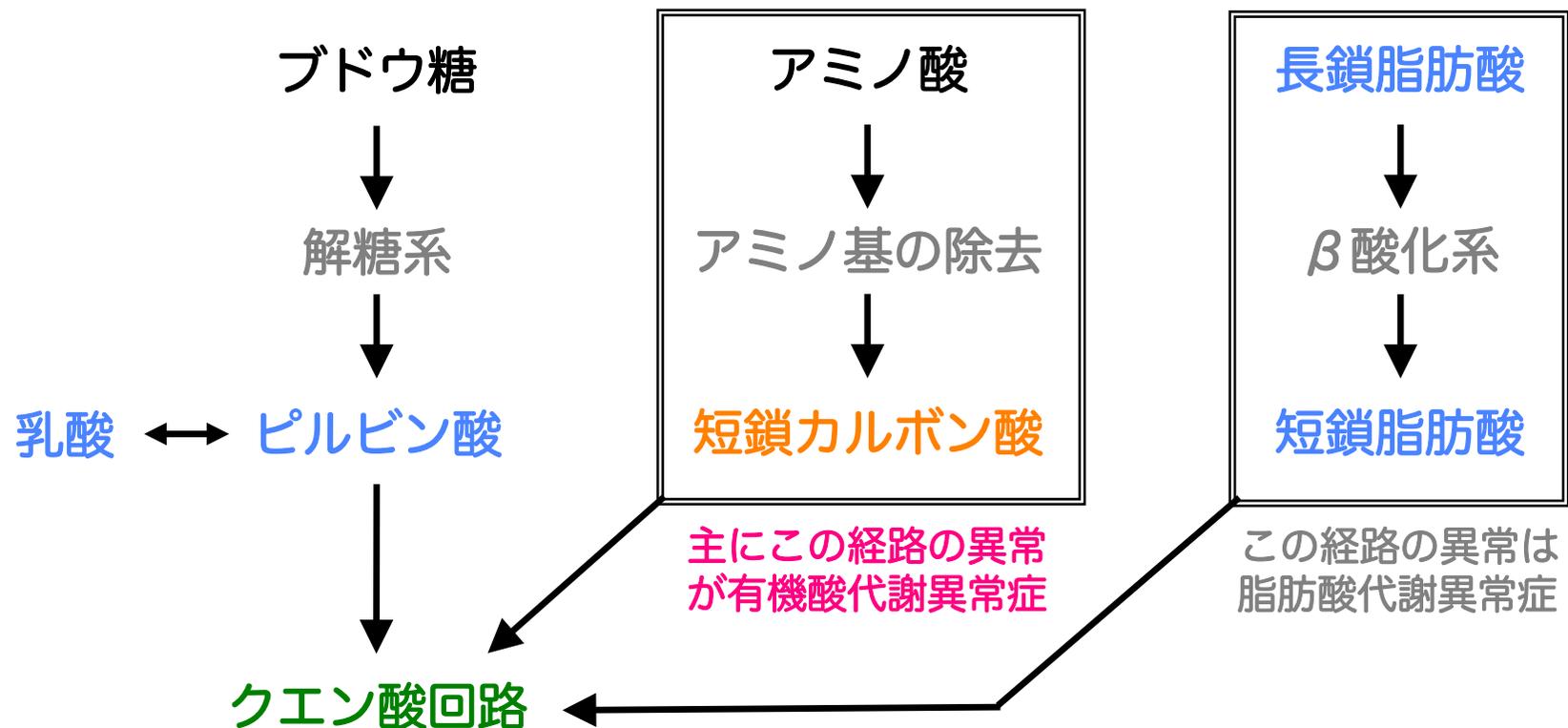
# 有機酸代謝異常症 (有機酸血症)

# 「有機酸」の代謝異常症とは

有機酸 = 炭化水素骨格の短いカルボン酸

ヒト生体内で代謝障害が疾患として問題となるものは、主としてアミノ酸の中間代謝で生じる。

※乳酸・ピルビン酸や脂肪酸などの代謝異常症は、臨床的な観点から有機酸代謝異常症とは区別して扱われる。



# 有機酸代謝異常症の症状

このグループの疾患は

有害な「酸」が蓄積することにより、血液・体液が酸性に傾いて臨床症状が出現する

という点でよく似た病像を示す。

症状： （古典型） 新生児期発症の進行性脳症

（遅発型） 反復性嘔吐症，発達遅滞 など

新生児期に発見・診断し、蓄積する有機酸の元になるアミノ酸の摂取を抑える食事療法を開始することによって、嘔吐・意識障害などの急性症状の出現を防ぎ、良好な成長・発達につなげていく。

# 主な有機酸代謝異常症の国内症例数

タンデムマス導入前 (1985~2000年)

メチルマロン酸血症	65
プロピオン酸血症	30
ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症	10
イソ吉草酸血症	4
グルタル酸血症1型	3
3-メチルグルタコン酸尿症	3
グリセロールキナーゼ欠損症	3

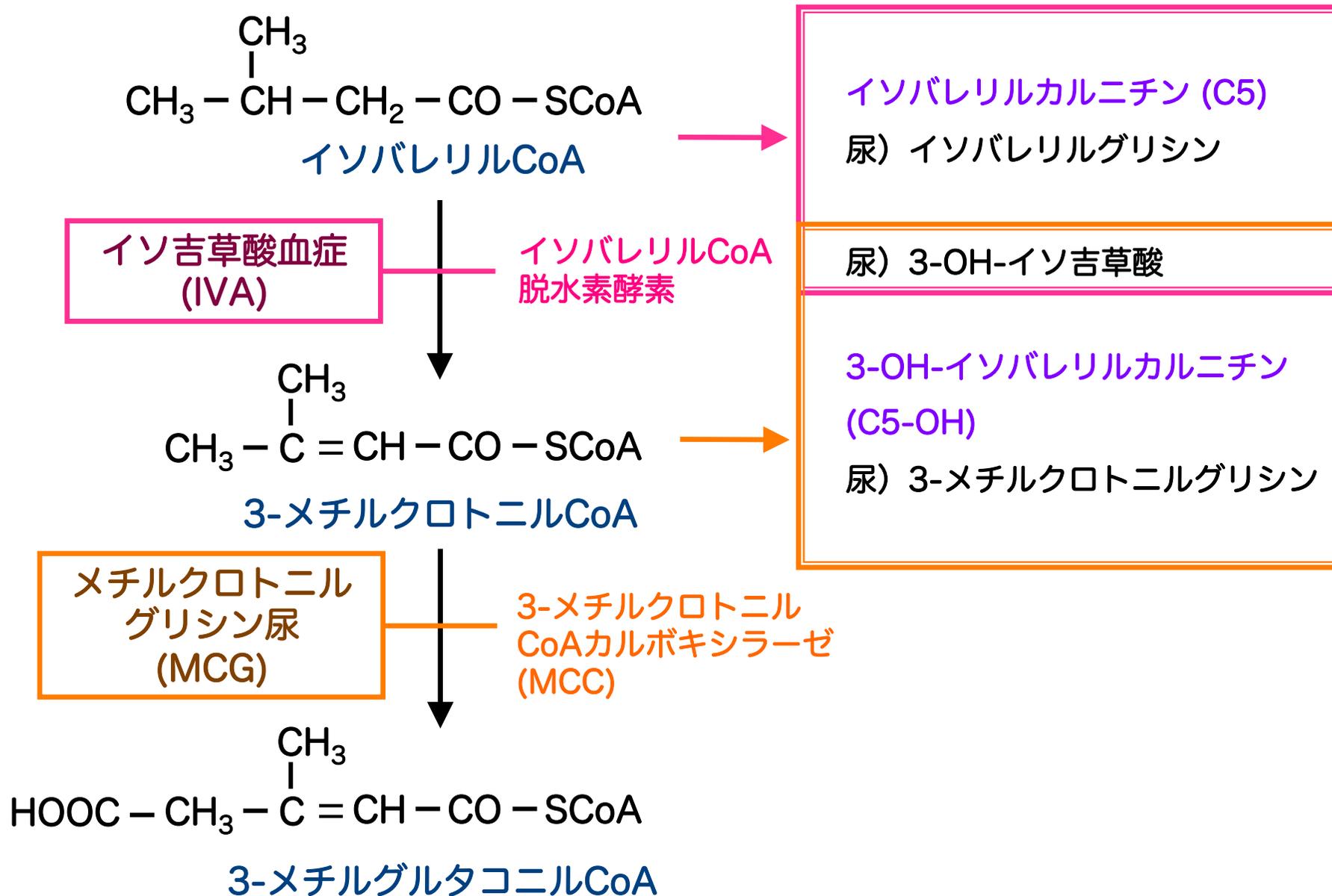
高柳正樹 他：有機酸代謝異常症の全国調査。平成11年度厚生科学研究報告書, 2000.

## 試験研究結果：有機酸代謝異常症（頻度 1/22,000）

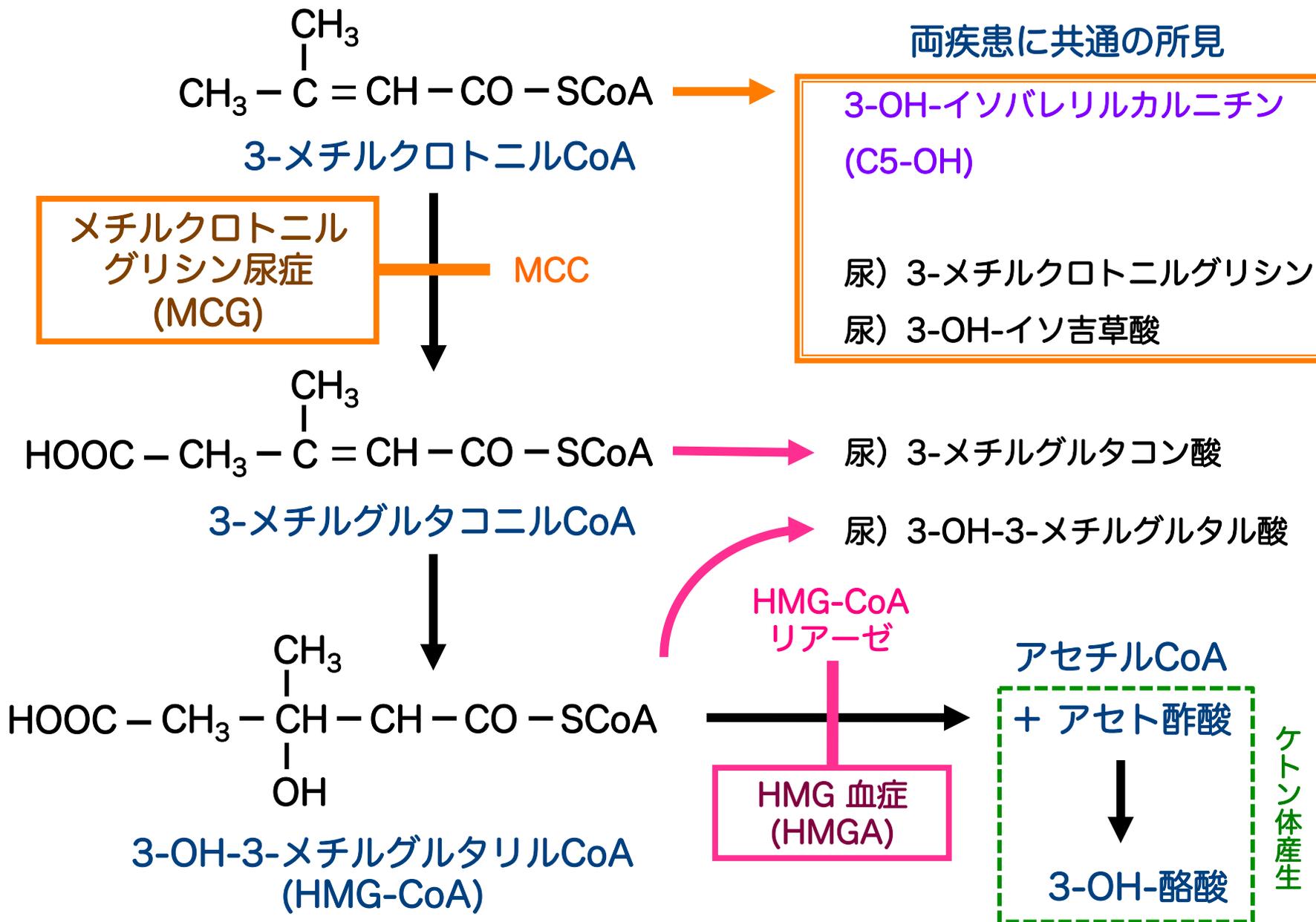
マススクリーニング対象疾患	指標項目	発見例数
プロピオン酸血症 (PA)	C3, C3/C2	43
メチルマロン酸血症 (MMA)	C3, C3/C2	18
メチルクロトニルグリシン尿症 (MCG)	C5-OH	13
グルタル酸血症1型 (GA1)	C5-DC	7
イソ吉草酸血症 (IVA)	C5	3
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 (MCD)	C5-OH, C3	3
3-OH-3-メチルグルタル酸血症 (HMGA)	C5-OH	0
スクリーニング総数	(1997~2012)	1,949,987

山口清次：タンデムマス導入による新生児マススクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究。  
平成24年度厚生科学研究報告書, 2013.

# ロイシン代謝経路の有機酸血症（1）

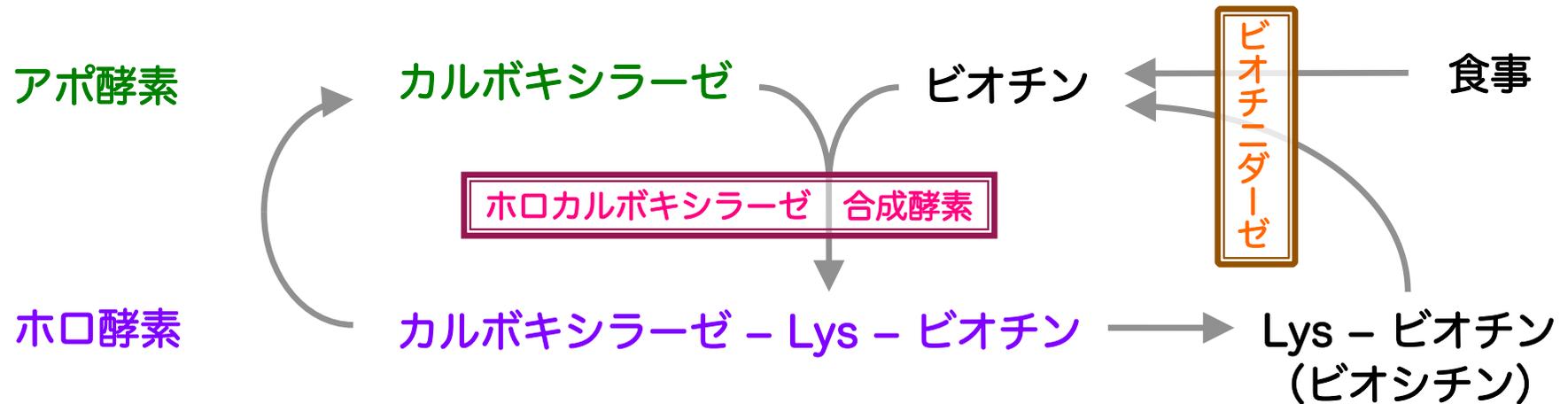


# ロイシン代謝経路の有機酸血症（2）





# マルチプル カルボキシラーゼ 欠損症 (MCD)

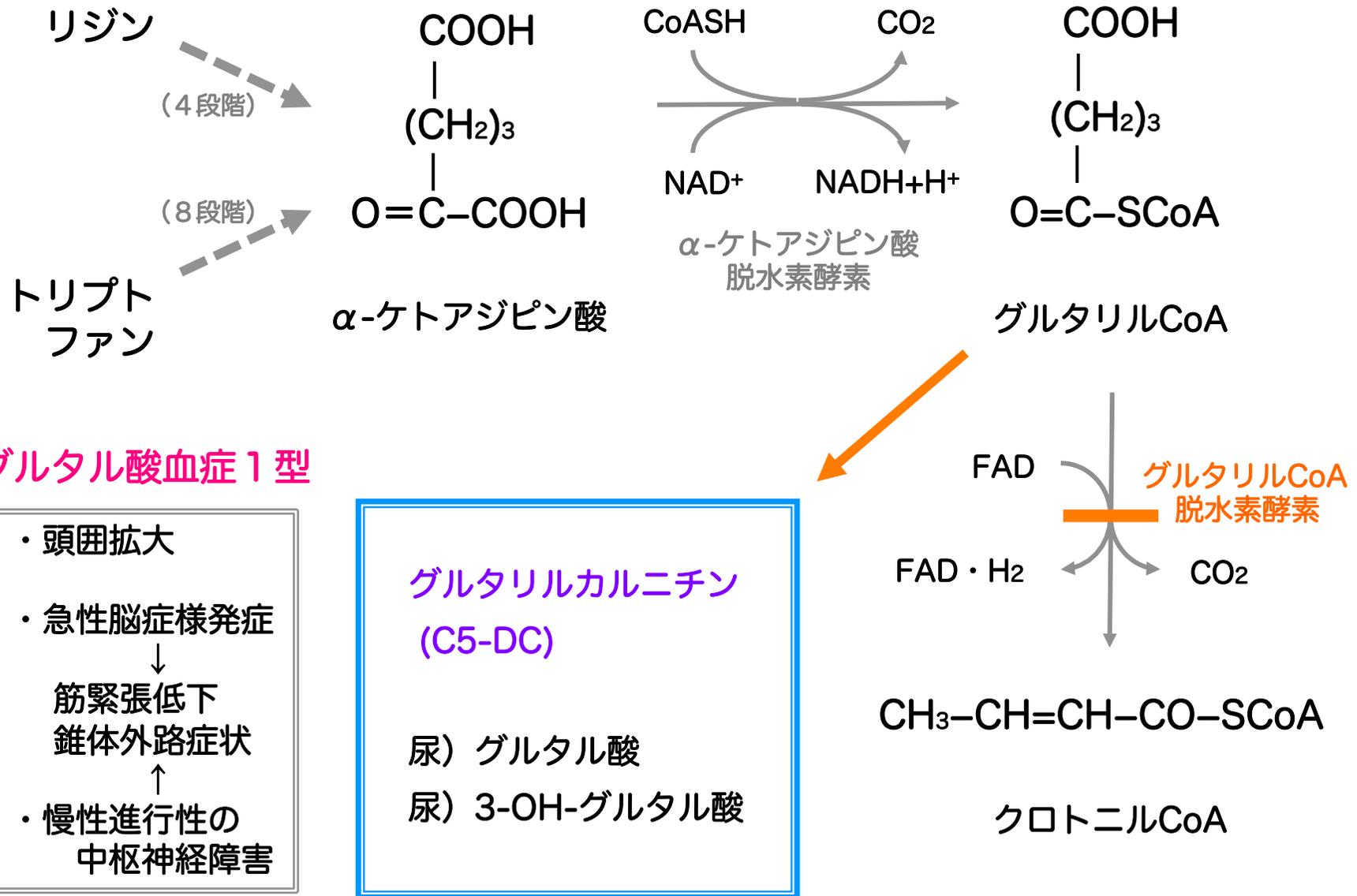


生体内の4種類のカルボキシラーゼ（アポ酵素）を活性型（ホロ酵素）とするための「ビオチン化」に必要な、下記2種類の酵素いずれかの障害に起因する疾患：

- ・ **ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS)** = アポ酵素とビオチンの結合を触媒
- ・ **ビオチニダーゼ** = ホロカルボキシラーゼからビオチンを再生  
食品からビオチンを供給

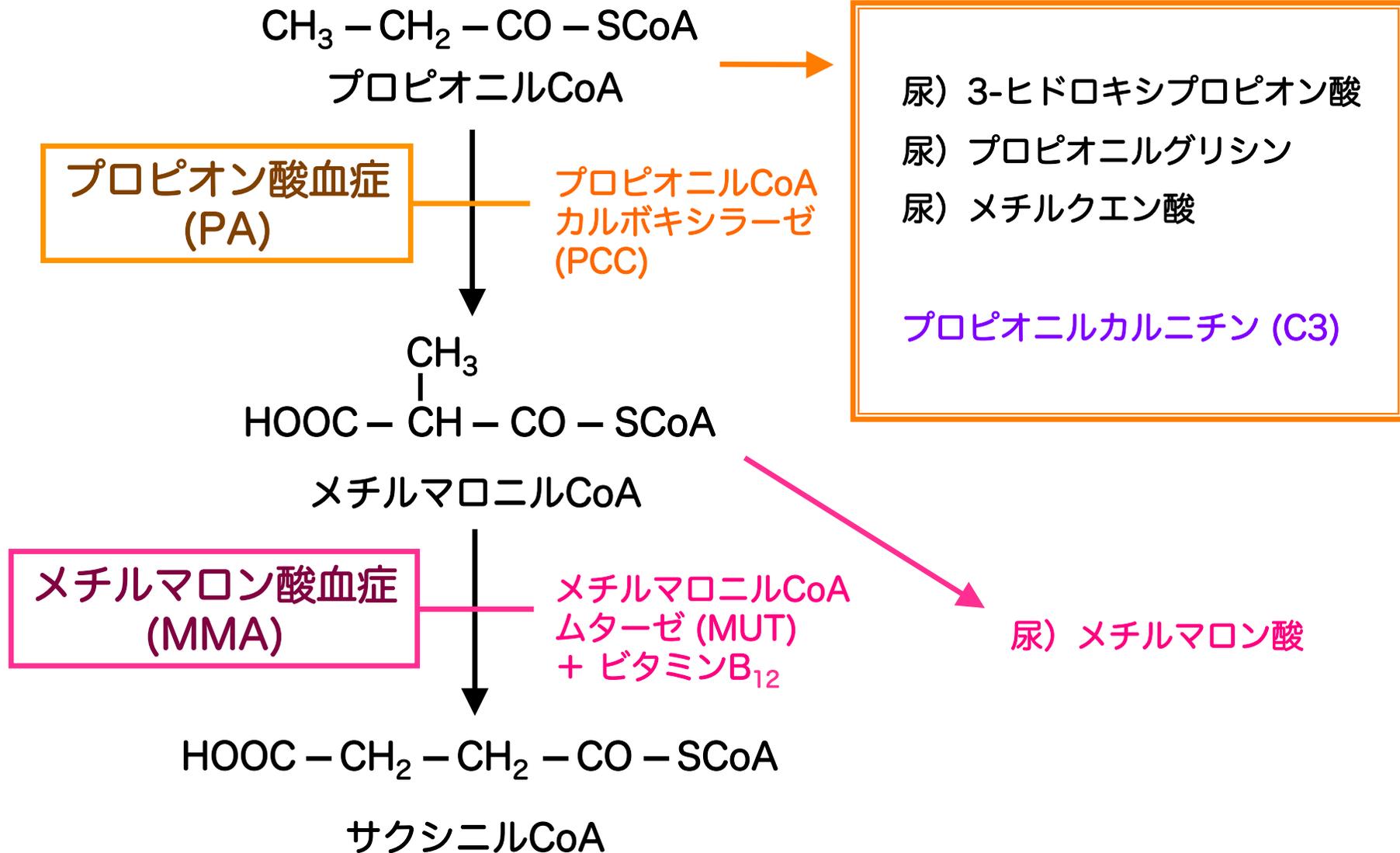
	タンデムマス指標	異常有機酸など
3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ	C5-OH	メチルクロトニルグリシン尿症と共通
プロピオニルCoAカルボキシラーゼ	C3	プロピオン酸血症と共通
ピルビン酸カルボキシラーゼ	—	乳酸・ピルビン酸
アセチルCoAカルボキシラーゼ	—	(脂肪酸合成の減弱)

# リジン・トリプトファン代謝経路の有機酸血症

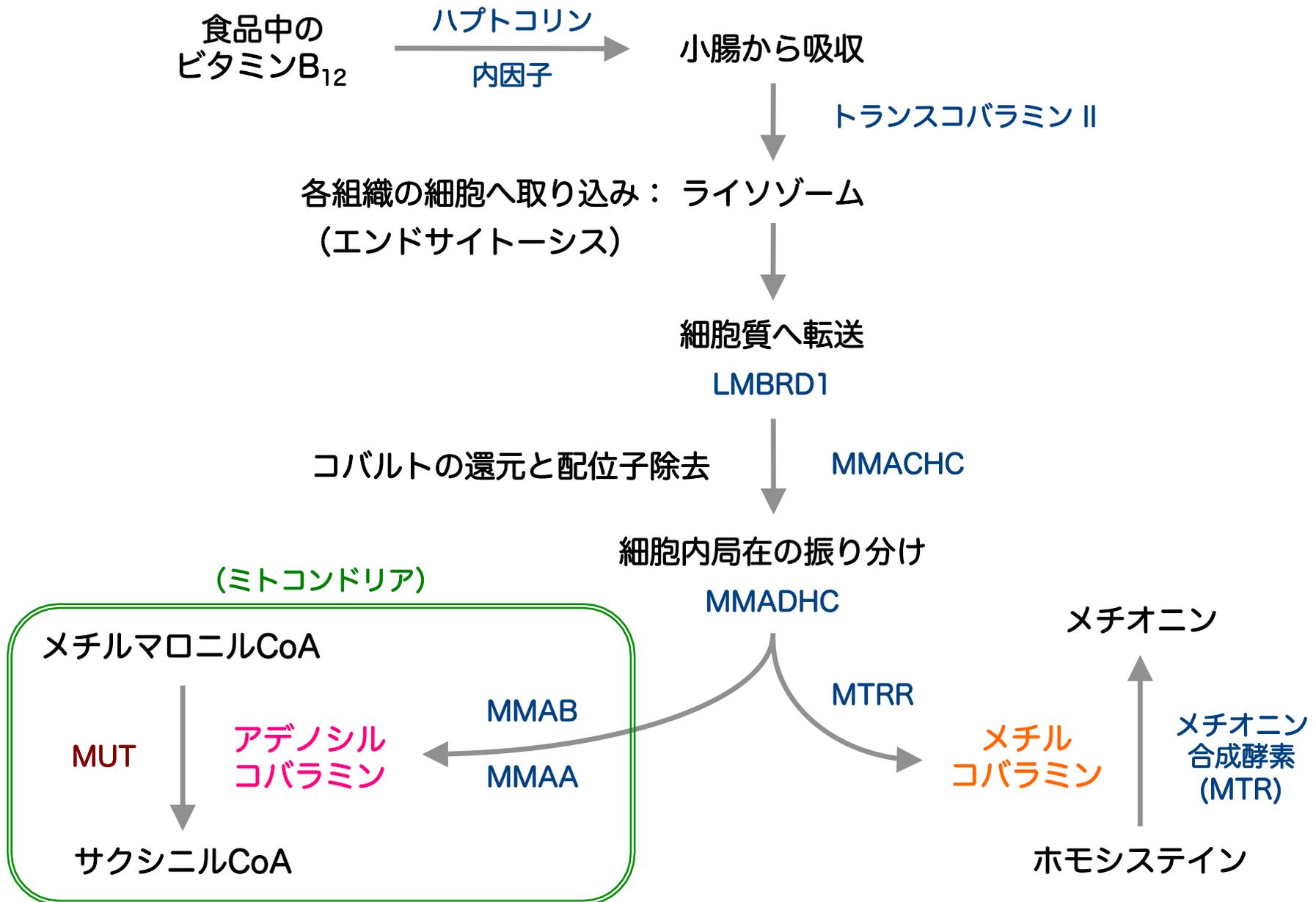


# 代表的な疾患：メチルマロン酸血症・プロピオン酸血症

両疾患に共通の所見



# メチルマロン酸とホモシステインの関係



# MMA・PA：スクリーニング検査の課題

現行のスクリーニング検査では

- ・典型的に発症する重症例には間に合わない（早期診断には有用）
- ・メチルマロン酸血症 → 遅発型症例の見逃しを防ぐ対策が必要
- ・プロピオン酸血症 → 病的意義が不明瞭な「最軽症型」症例が多発  
※ PCCB 遺伝子 Y435C 変異 ホモ接合体



新生児スクリーニングで発見されたプロピオン酸血症例について  
Y435C 変異と臨床像との関連性を検討する必要あり



適切な診療指針を提示するための**全国調査**を実施：  
= **AMED 委託研究**（代表：岐阜大学小児科・深尾敏幸教授）  
「新生児タンデムマススクリーニング対象疾患の  
診療ガイドライン改訂、診療の質を高めるための研究」

# 調査方法と回答状況

地域	一次調査票			二次調査票	
	送付先 医療機関	回答返送 あり	所在判明 症例数	送付先 医療機関	回答返送 あり
北海道	2	2	5	2	2
東北	6	4	8	2	2
関東	27	24	25	13	9
中部	23	18	12	5	4
関西	40	35	15	7	4
中四国	35	27	10	4	4
九州	22	20	12	6	4
計	155	130	87	39	39
回答率	83.9%			100%	

## 二次調査で回答のあった87症例の性別と年齢分布

男女比	年齢	0y	1y	2y	3y	~6y	~12y	~18y
41 : 46	例数	18	20	15	9	9	10	6

臨床症状		心臓・中枢神経	実施	異常あり
なし	83	UCG	26	0
発達遅滞	1	ECG	28	0
けいれん	1	MRI	14	1*
「あり」 (不詳)	2			

\* 基底核 T2 高信号性変化 (一過性)

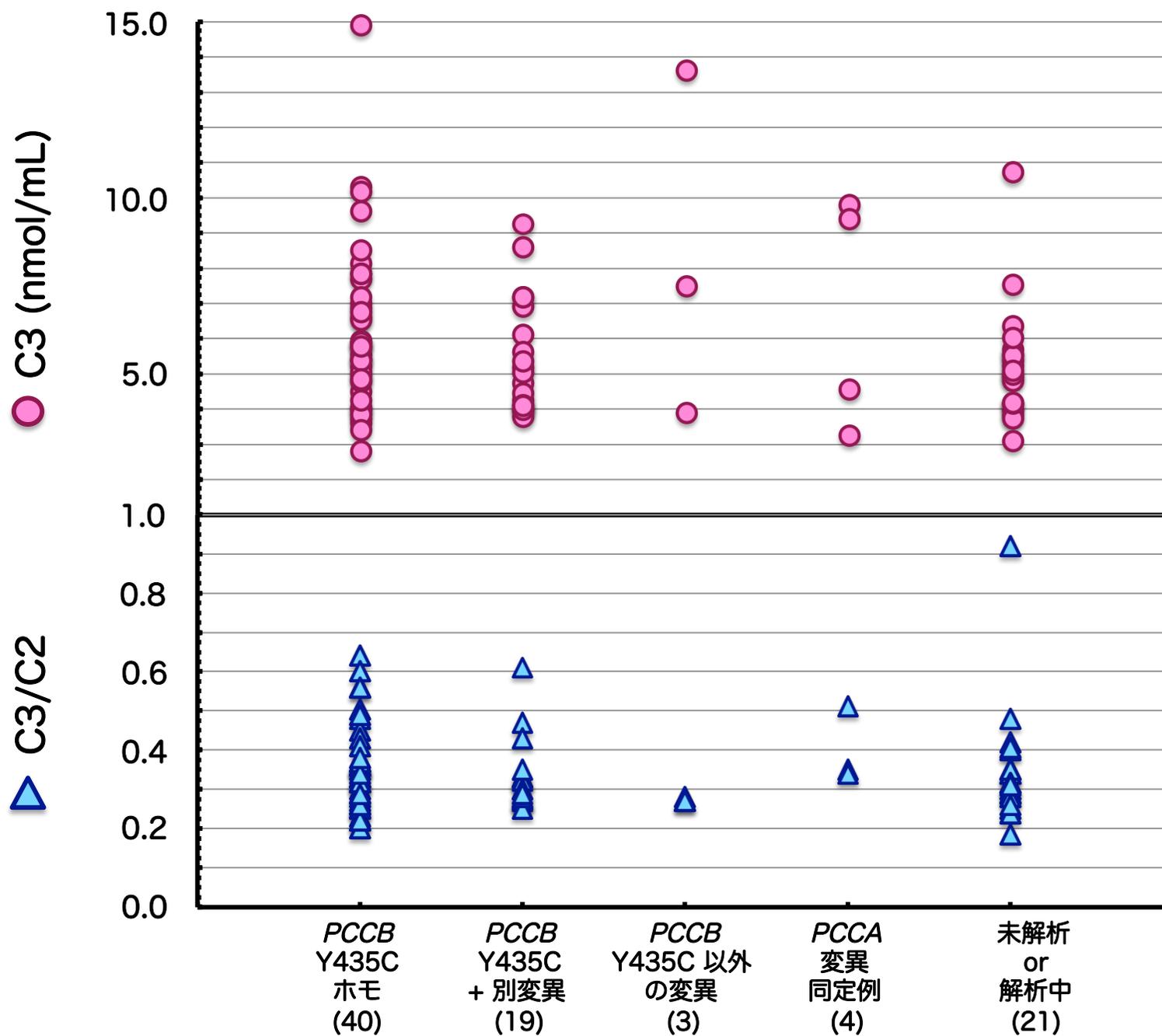
## 検査値異常 (主治医判断)

TKB ↑ (軽度)	7
AST・ALT ↑ (軽度)	2
NH <sub>3</sub> ↑ (軽度)	1
乳酸 ↑ (軽度)	2
貧血 (軽度)	3

## 治療内容

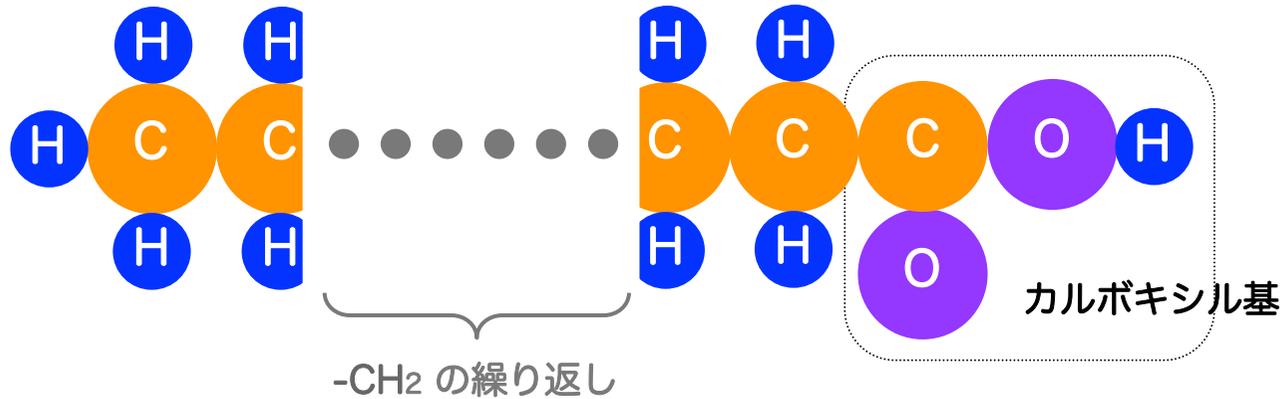
L-カルニチン	67 (うち中止済み 9)
ビオチン	7 (中止済み 1)
タンパク制限	21 (うち中止済み 13)
治療歴なし	17

# 遺伝子型とマススクリーニング指標値の関係



# 脂肪酸代謝異常症

# 脂肪酸の基本構造と種類



長鎖脂肪酸： 炭素数 12 ~ 18 程度  
(C12 ~ C18)

動植物性脂肪は長鎖脂肪酸が主体：  
パーム油，バター，ラード，獣脂，  
サラダ油，オリーブ油，マーガリン など。

中鎖脂肪酸： 炭素数 6 ~ 10 程度  
(C6 ~ C10)

自然食品ではヤシ油・パーム油などに多い。  
母乳・牛乳にも比較的多く含まれている。

最近のヘルシー志向のサラダ油製品には、  
中鎖脂肪酸が強化されているものもある。

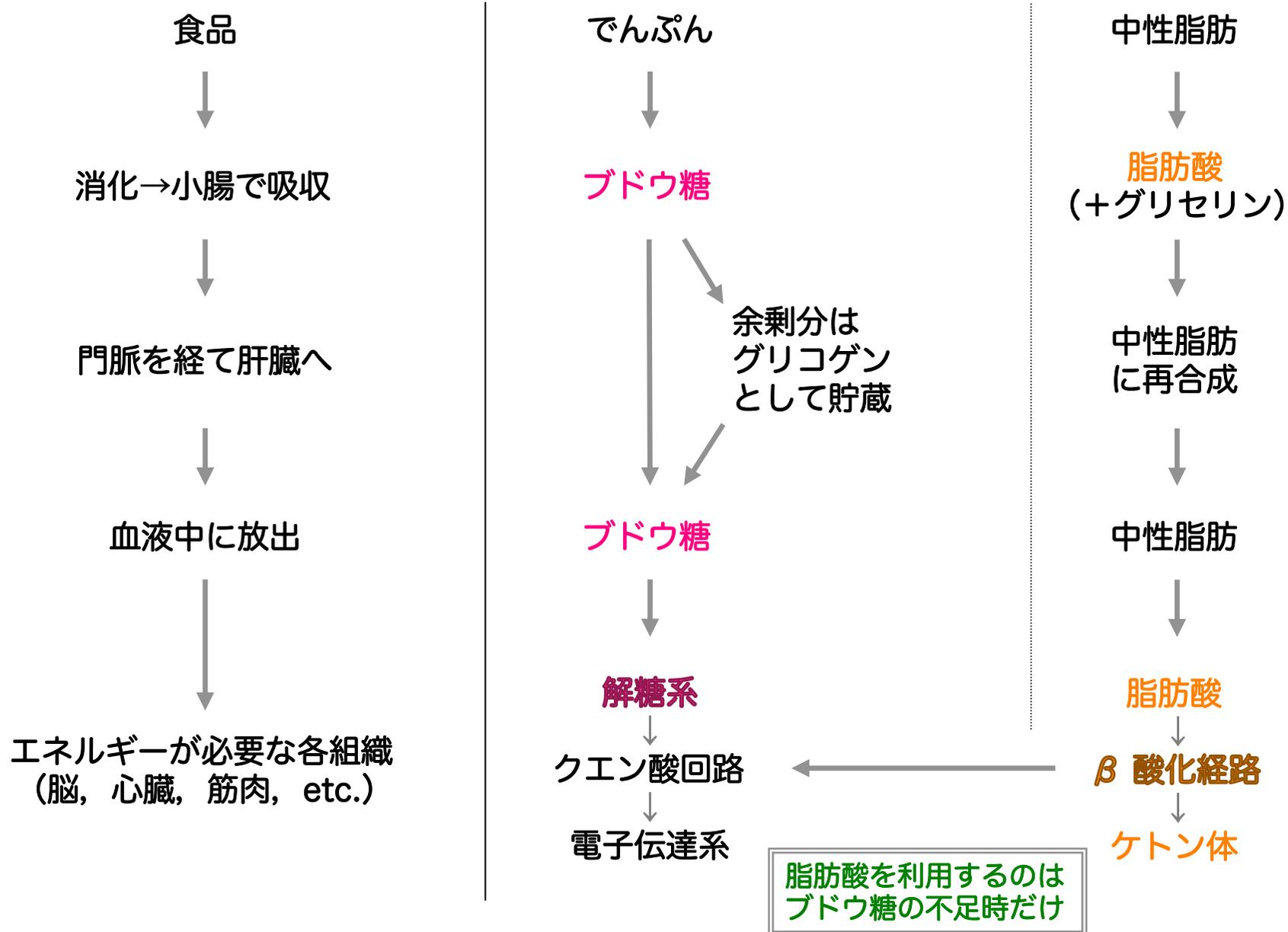
短鎖脂肪酸： 炭素数 4 (C4)

= 酪酸 → バター・チーズなどに多い。

炭素数 2 (C2)

= 酢酸 → 食酢に多量に含まれる。

# ヒトのエネルギー源：ブドウ糖と脂肪酸



# 脂肪酸代謝異常症の臨床像

グルコース供給不足時にエネルギー産生不全を来すため、空腹の遷延～飢餓や感染症などによる異化亢進状態において、

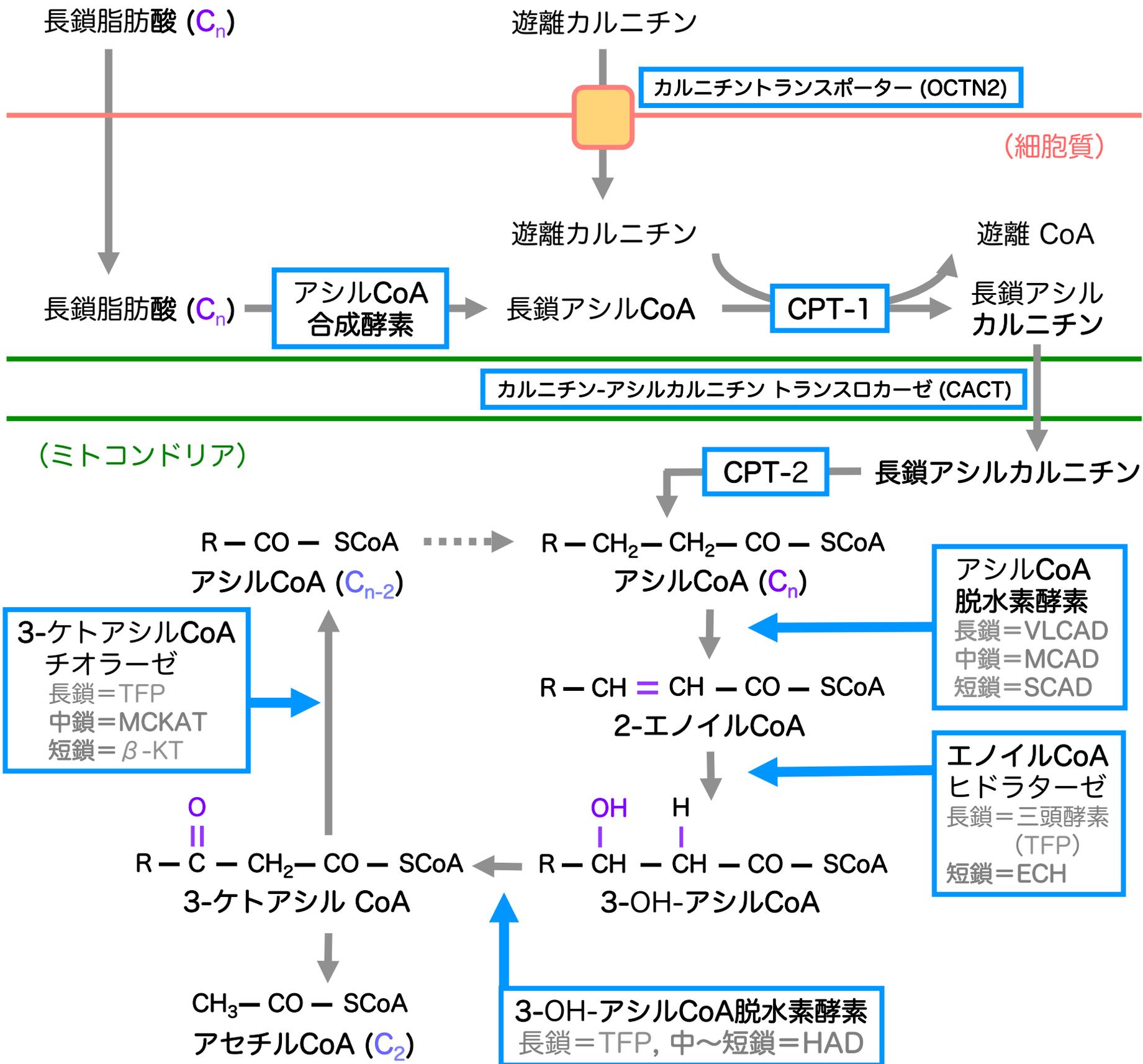
- ・ 低血糖症
- ・ 急性脳症／Reye 様症候群
- ・ 突然死（SID/ALTE）

などの形で急性発症することが多い。

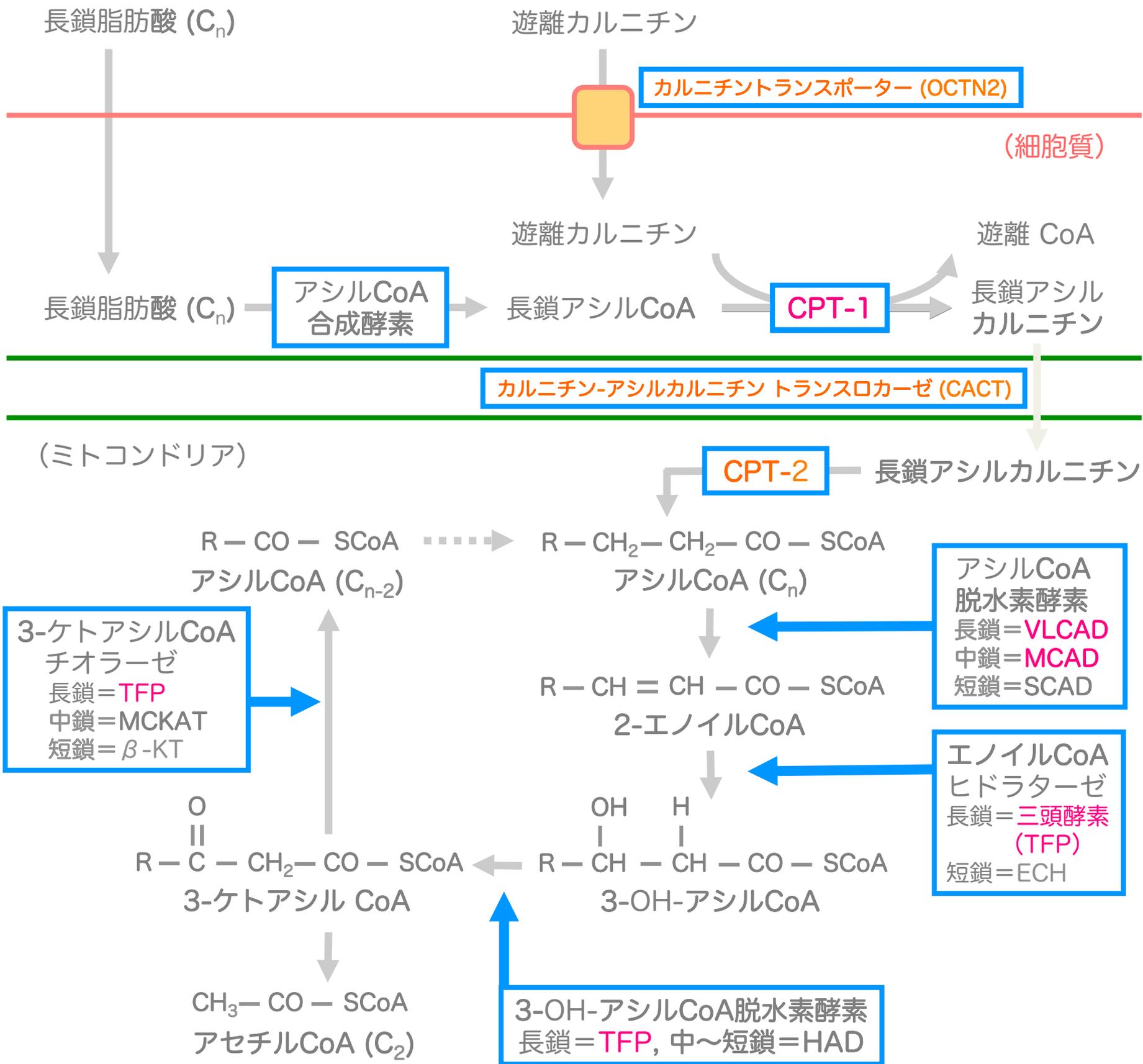
発作間欠期は無症状で、一般的に成長・発達障害は伴わない。

※長鎖脂肪酸代謝障害では、間欠的な骨格筋症状が見られたり、重症型では心筋障害のために致死的となる場合もある。

# 脂肪酸β酸化経路と新生児スクリーニング対象疾患

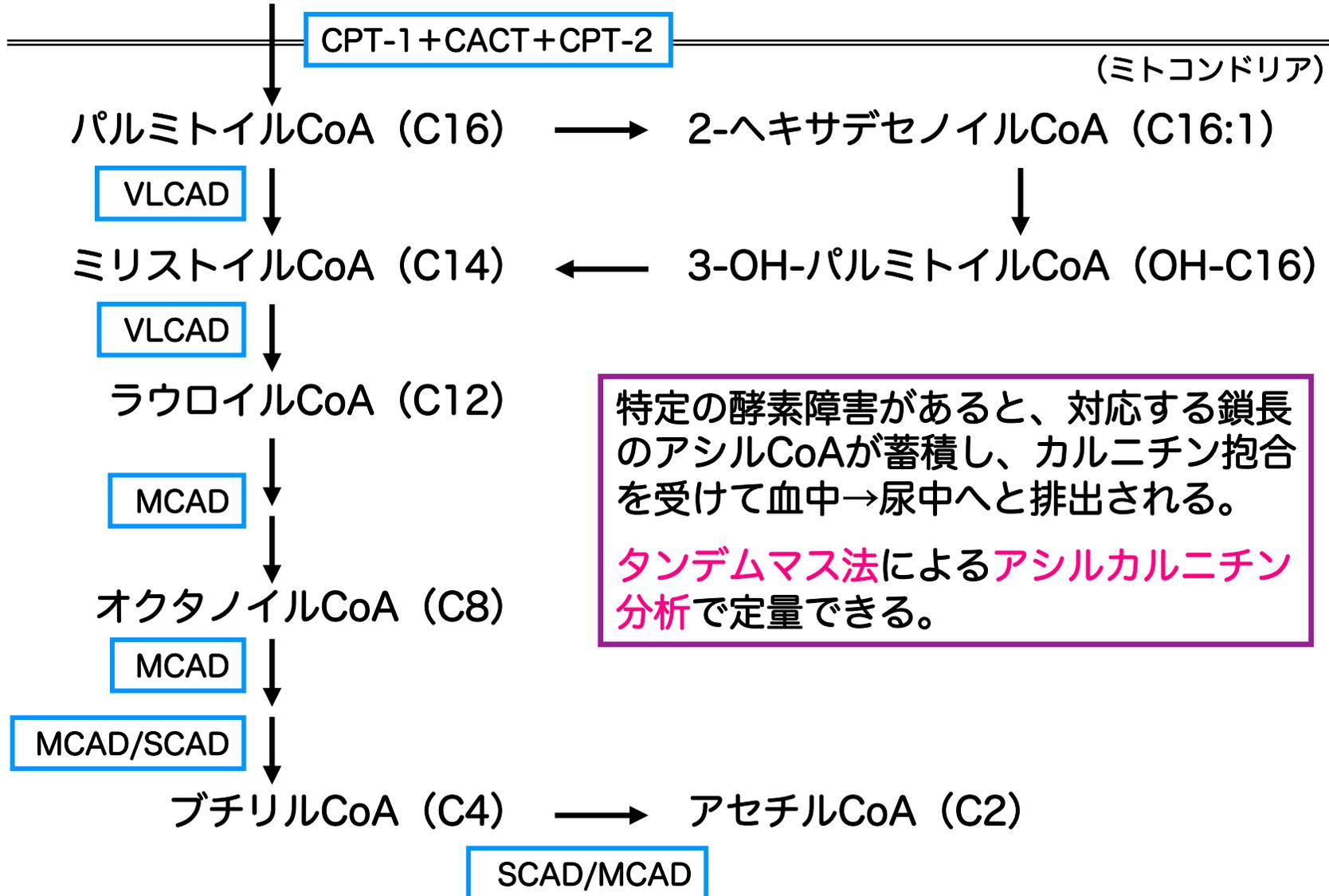


# 脂肪酸β酸化経路と新生児スクリーニング対象疾患



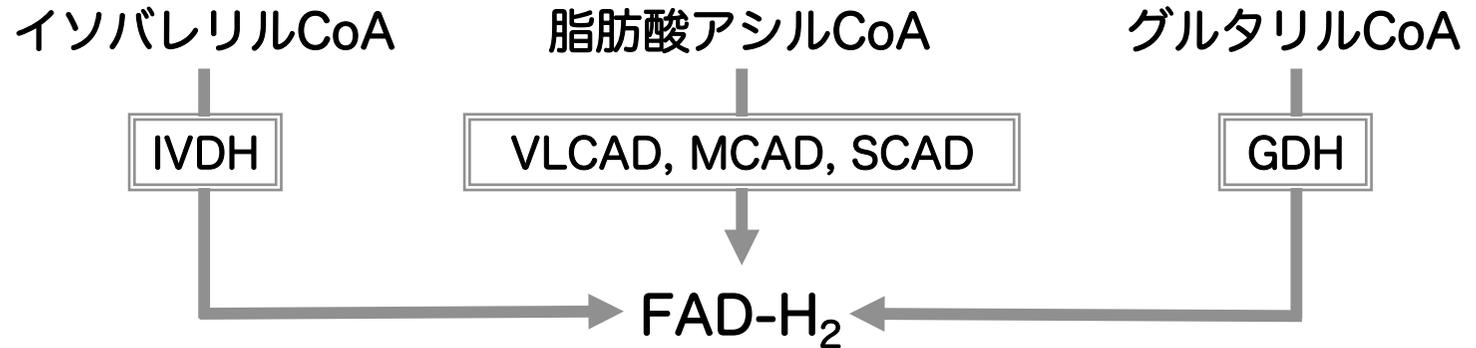
# 脂肪酸代謝異常症のスクリーニング検査

パルミチン酸 (C16) = 食物中の主な脂肪酸



# グルタル酸血症2型 (GA2)

(マルチプル アシルCoA 脱水素酵素欠損症 ; MADD)



複数のアシルCoA脱水素酵素に必要な電子受容体 electron transfer flavoprotein (ETF) あるいは還元された ETF を再酸化する ETF 脱水素酵素 (ETFDH) の異常に起因する疾患。

関連諸酵素に対応した有機酸・脂肪酸が蓄積して様々な鎖長のアシルカルニチンが増加する。

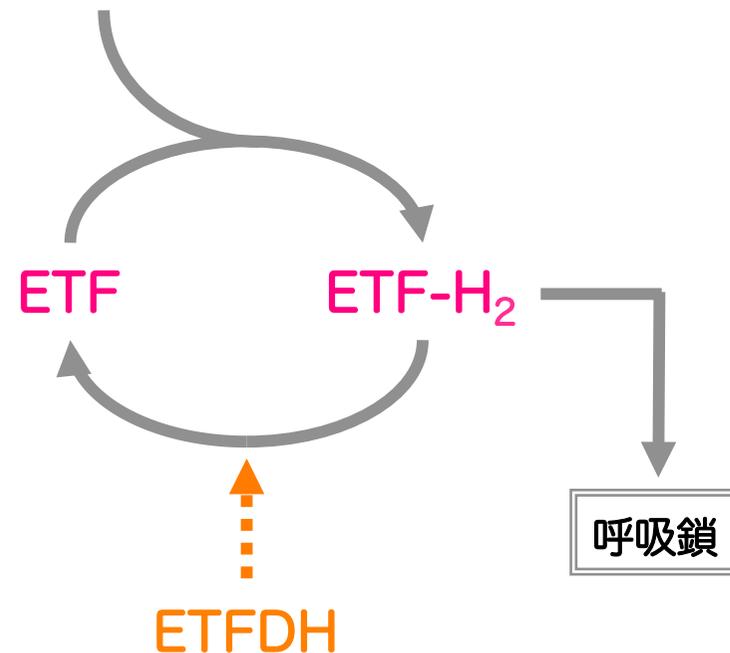
脂肪酸アシルCoA → C4, 6, 8, 10, 12, 14, 16

イソバレリルCoA → C5

グルタリルCoA → C5-DC

タンデムマス新生児スクリーニングでの中心的な指標は C8, C10 (C8<C10)

※MCAD 欠損症では C8>C10 となる。



# 主な脂肪酸代謝異常症の国内症例数

タンデムマス導入前 (1985~2000年)

疾患名	症例数
CPT-2 欠損症	16
.....	.....
グルタル酸血症2型	14
.....	.....
VLCAD 欠損症	7
.....	.....
CPT-1 欠損症	5
.....	.....
カルニチントランスポーター異常症	5
.....	.....
$\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症	5
.....	.....
MCAD 欠損症	0

(山口清次：ミトコンドリア $\beta$ 酸化異常症の生化学的評価・診断および  
病因解析に関する研究. 平成10-12年度科学研究報告書 より改編)

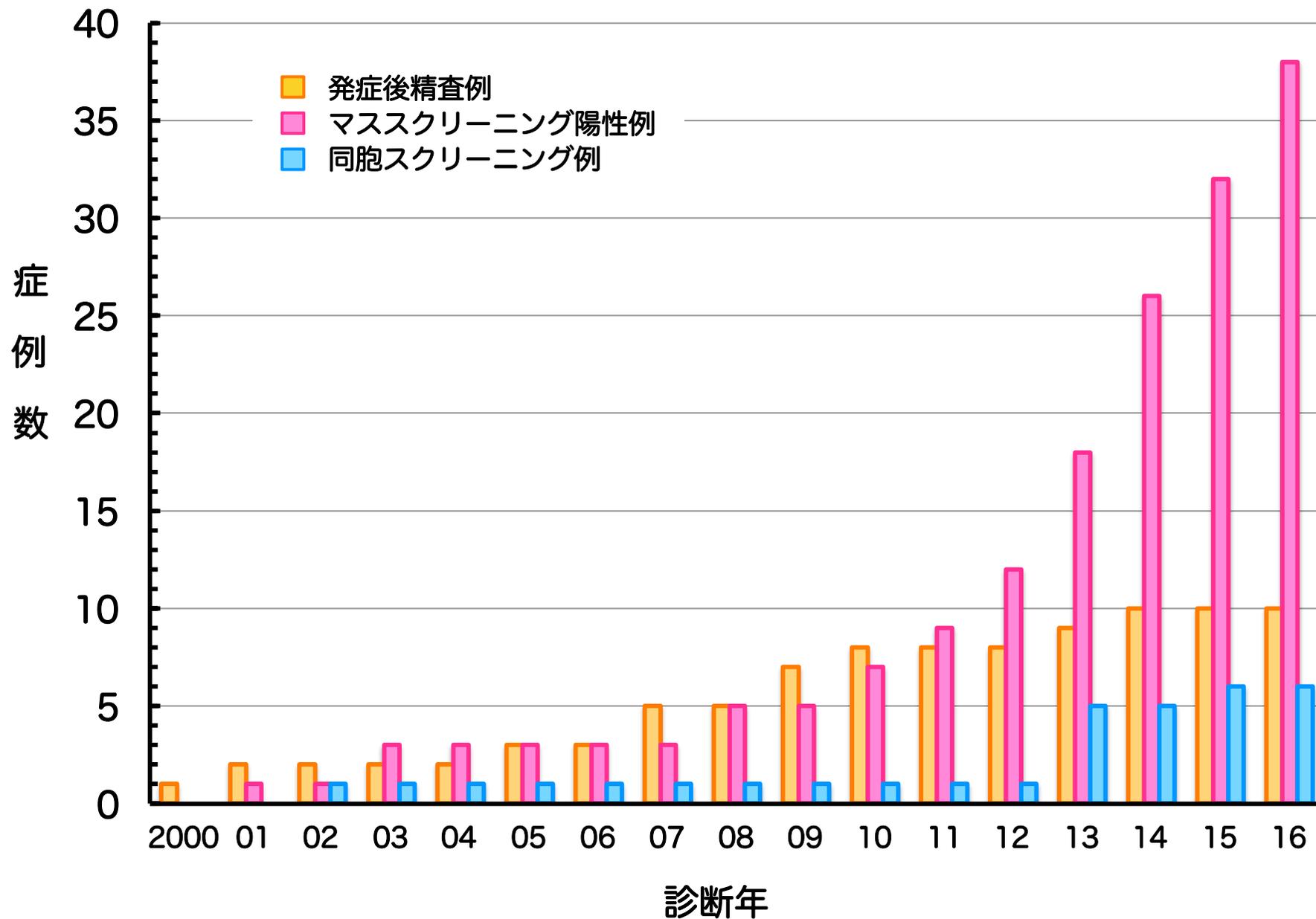
## 試験研究結果：アミノ酸代謝異常症（頻度 1/34,000）

マススクリーニング対象疾患	患者数	発見頻度
MCAD 欠損症	18	1/11万
VLCAD 欠損症	12	1/16万
カルニチントランスポーター異常症	7	1/28万
CPT-2 欠損症	7	1/28万
グルタル酸血症2型	6	1/32万
CPT-1 欠損症	5	1/39万
TFP 欠損症	2	1/97万
スクリーニング総数	1,949,987人	

山口清次：タンデムマス導入による新生児マススクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究。  
平成24年度厚生科学研究報告書, 2013.

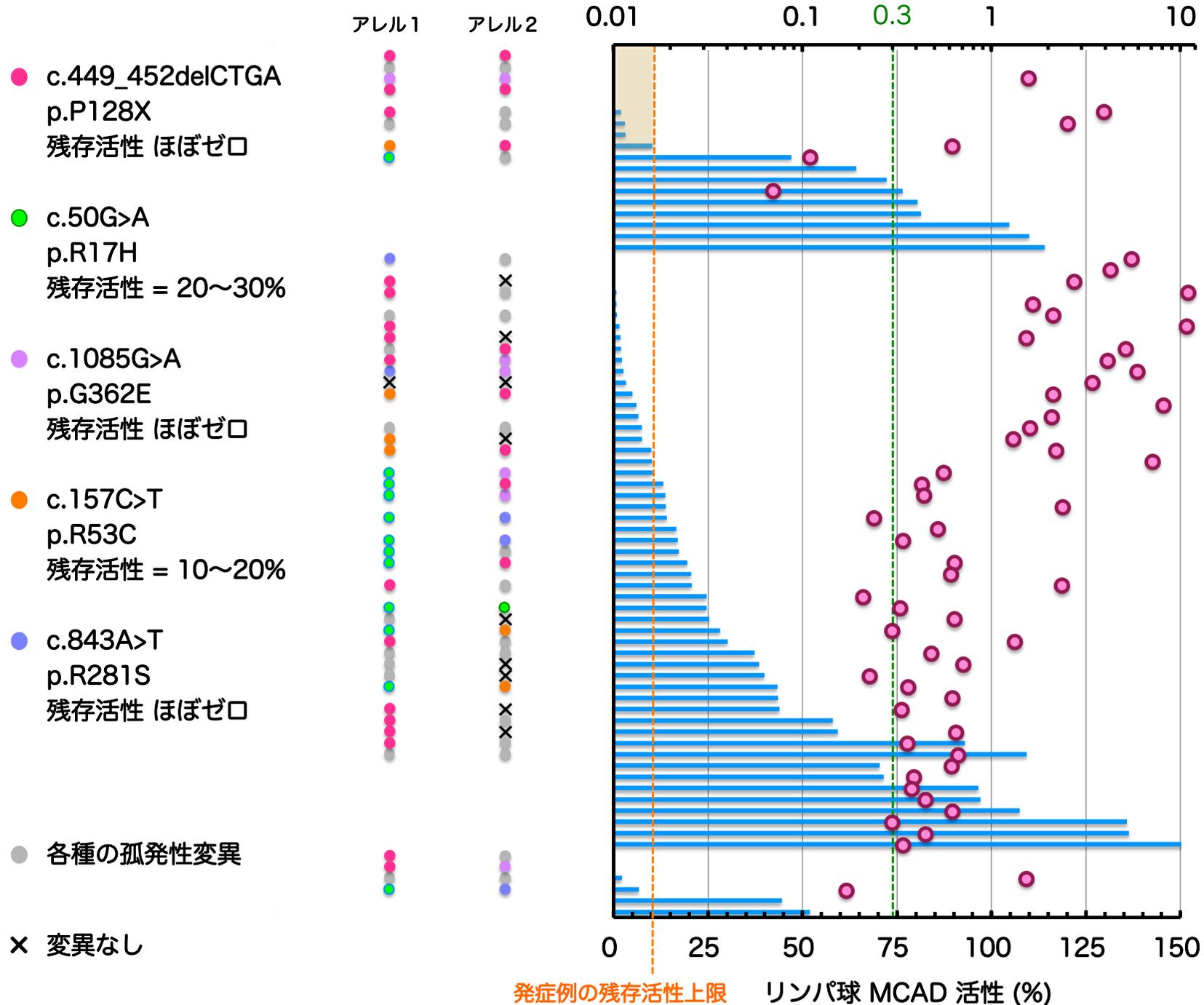
# 中鎖アシルCoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症

# MCAD 欠損症：酵素活性測定による累積診断症例数



# MCAD 活性と遺伝子変異

● 新生児初回濾紙血 C8 ( $\mu\text{M}$ )



# 日本人症例に比較的頻度の高い遺伝子変異

酵素活性低下～保因者相当 **39家系 43個体** の遺伝子解析結果より

塩基	アミノ酸	アレル数	個体数	家系数	(うち発症数)
c.449_452delCTGA	p.P128X	25	22	19	(4)
c.50G>A	p.R17H	11	10	9	(0)
c.1085G>A	p.G362E	8	7	6	(1)
c.157C>T	p.R53C	7	7	7	(1)
c.843A>T	p.R281S	4	4	3	(0)

上位5者で **55/86 アレル (64%)** を占める

# 極長鎖アシルCoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症

## VLCAD 欠損症：酵素診断症例数の年次推移

診断年	骨格筋型	中間型	新生児型	NBS 陽性
2002	3	1		
2003	1			1
2004		1		
2005	1			1
2006				
2007				
2008	1			
2009			1	
2010	1			2
2011	1	1		1
2012		1		1
2013	1			5
2014				6
2015				13
2016	1			11
計	10	4	1	41

# VLCAD 欠損症スクリーニングの問題：偽陽性の多発

ケトン性低血糖症の精査で C14:1 軽度上昇を指摘されるケースが非常に多い



酵素活性を測定すると、正常～保因者レベル（一部は遺伝子解析で保因者と確定）  
＝異化亢進時の脂肪動員状態では C14:1 の非特異的な上昇が起こりやすい



新生児スクリーニングでも、哺乳不足・体重増加不良の状態では採血された結果、  
同様の非特異的な C14:1 上昇を来したと考えられる偽陽性例が少なくない

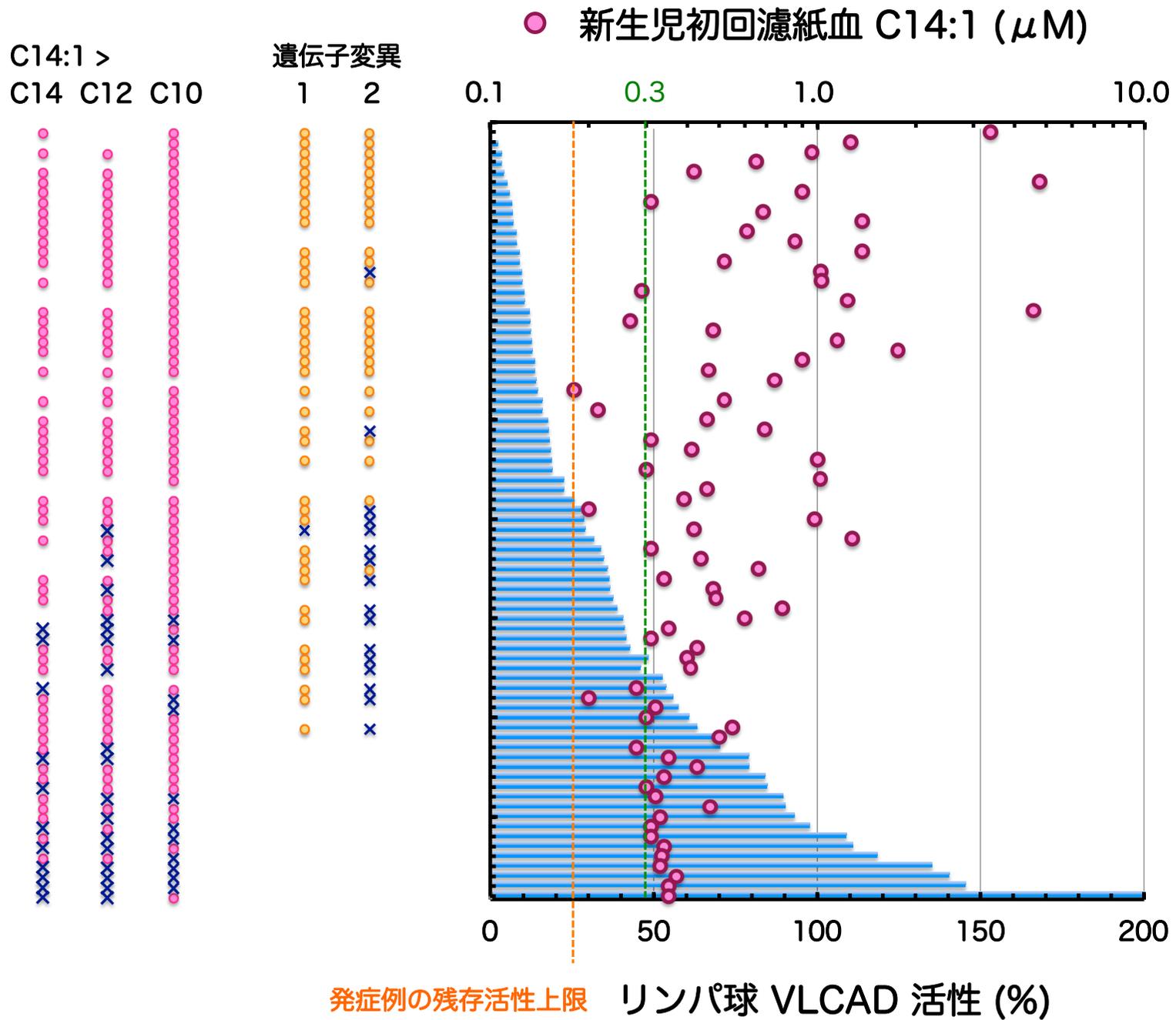


「C14:1 > C14 & C12 & C10」という条件の追加によって偽陽性率の低減が可能」  
(重松：日スクリーニング会誌 25, 2015)

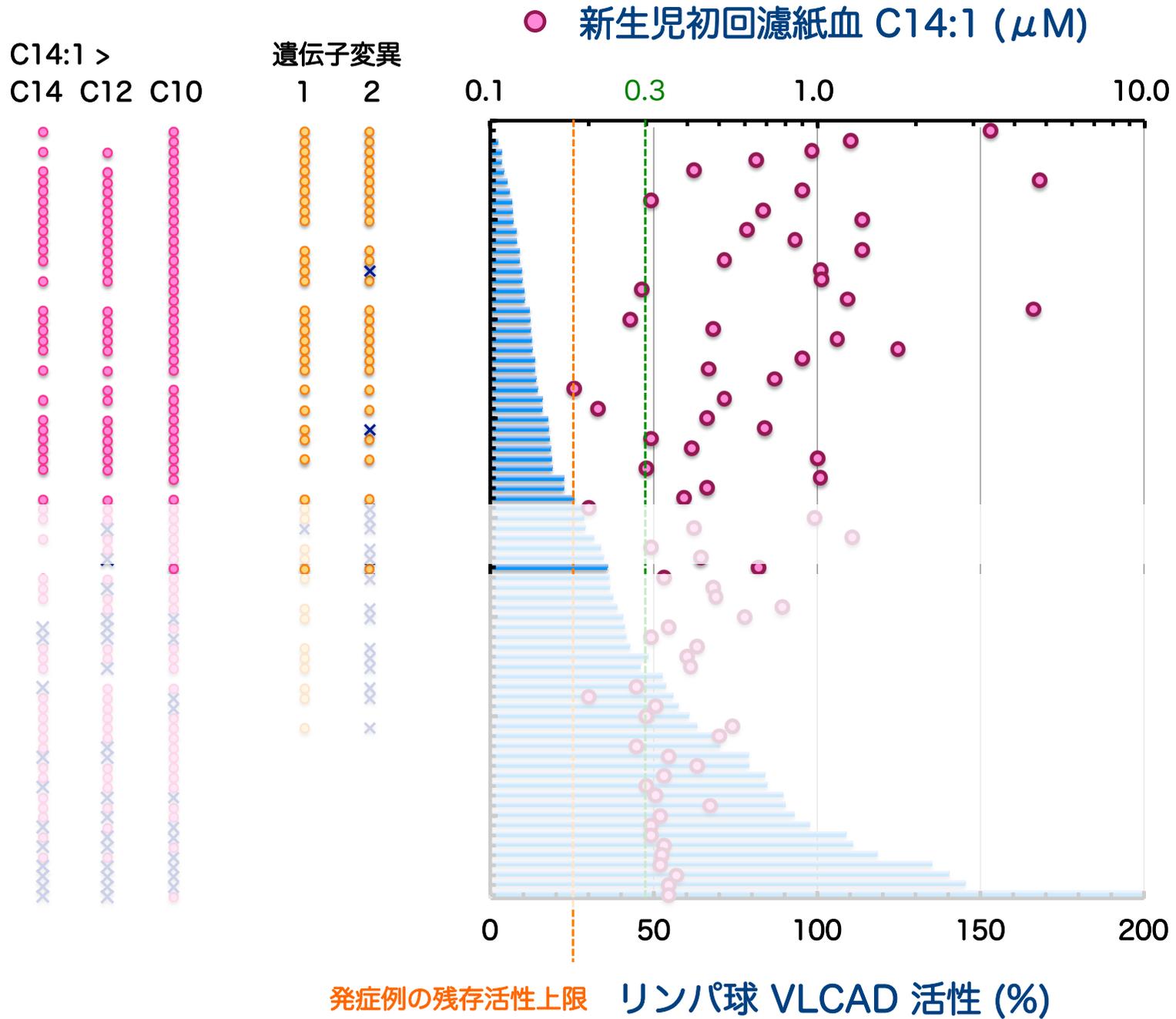


新生児スクリーニング陽性例の精査結果別に上記条件を満たす症例の比率を検討

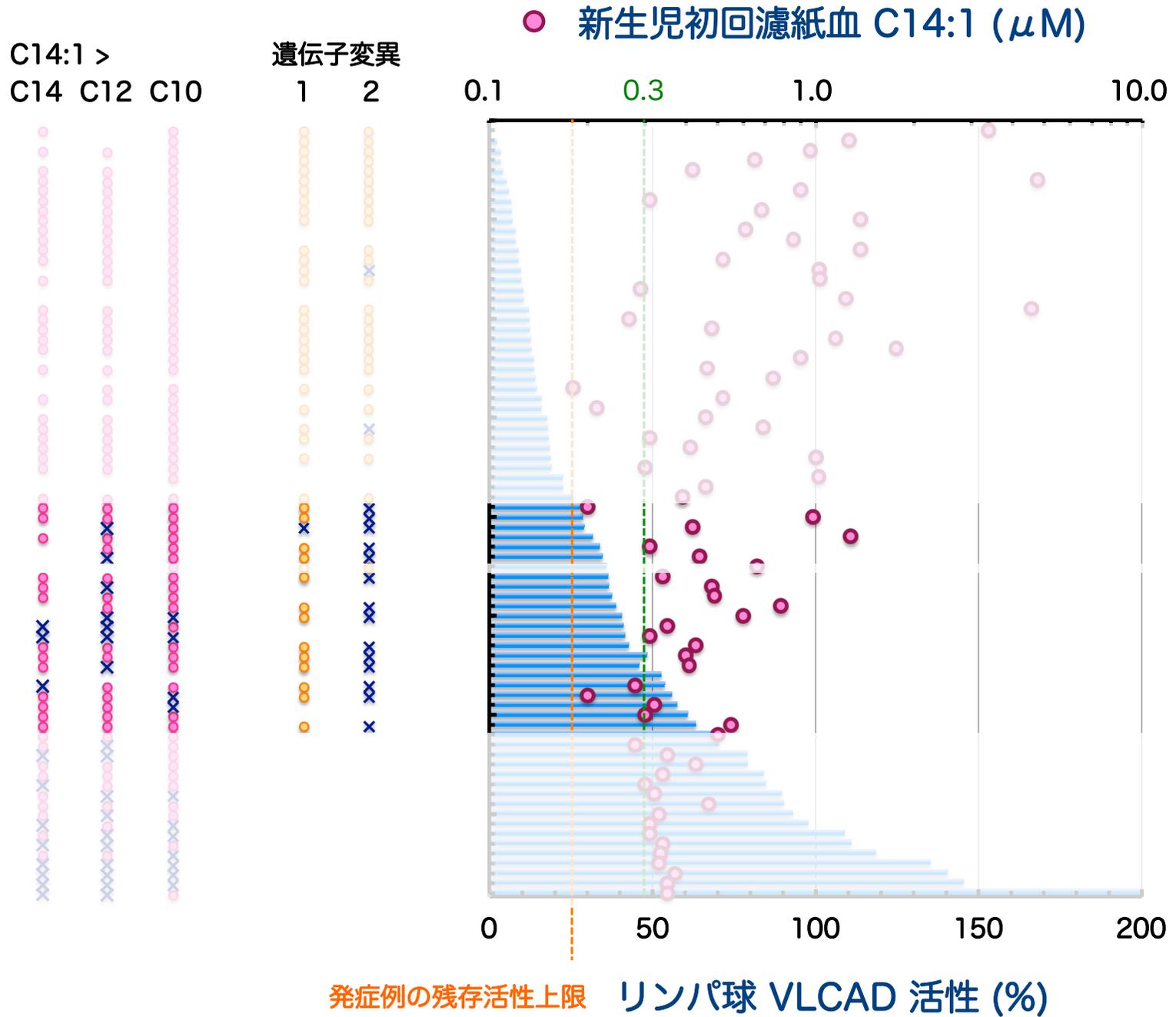
# 追加指標 C14:1 > C14 & C12 & C10 の有用性



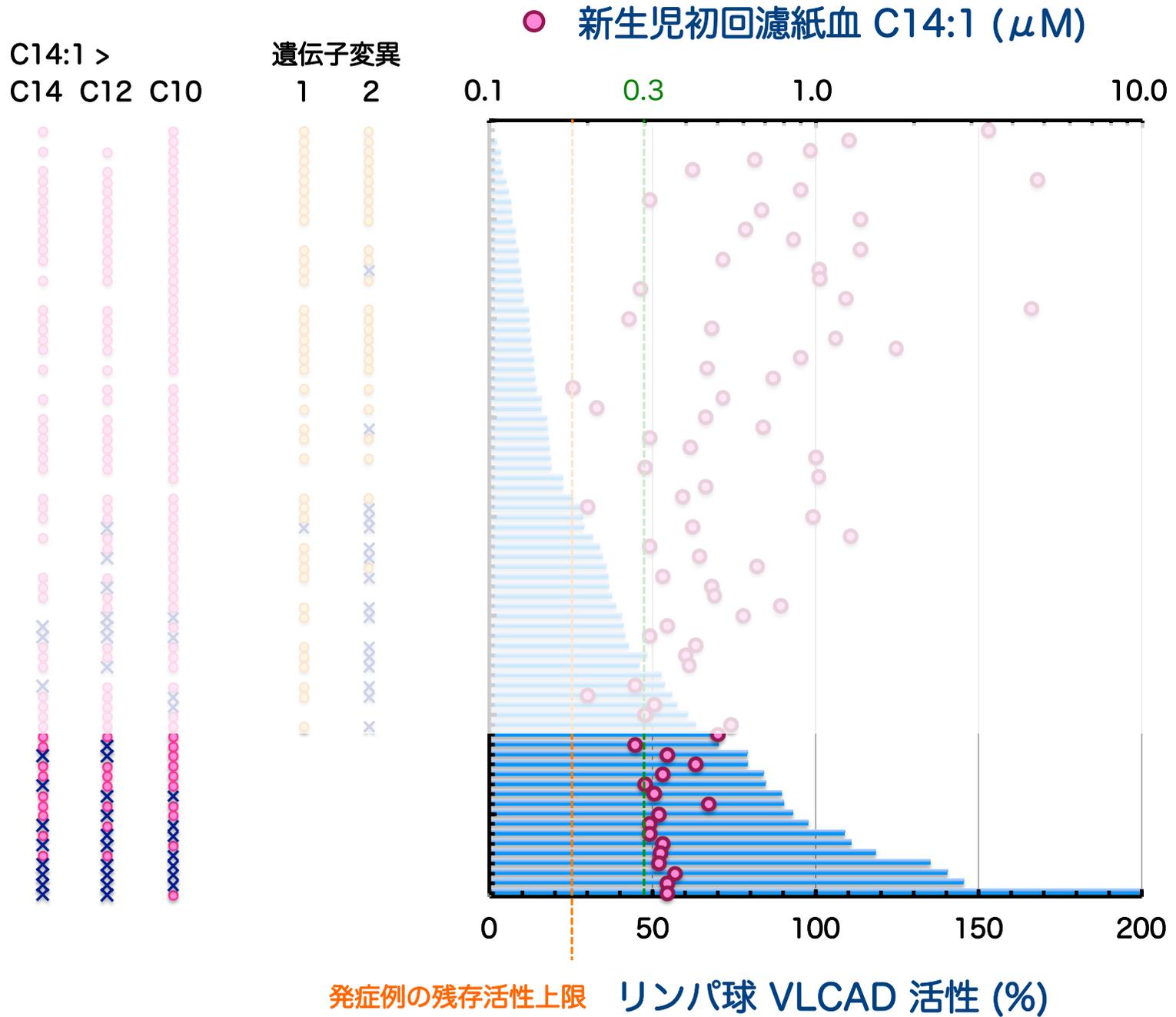
# 罹患者群 (39例；うちデータ不備13例) 3項目合致 = 26/26例



# 保因者群 (22例；うちデータ不備4例) 3項目合致=9/18例



# 偽陽性群 (17例; データ不備例なし) 3項目合致=4/17例



カルニチン パルミトイル  
トランスフェラーゼ-2  
(CPT-2) 欠損症

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(健やか次世代育成総合研究事業)) 分担研究報告書

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 教授）

2 次対象疾患 CPT2 欠損症の突然死、見逃し症例の収集

### 研究要旨

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II（CPT-2）欠損症の突然死例 3 例、スクリーニング見逃し例 1 例、スクリーニングすり抜け例 1 例を収集したので報告する。スクリーニング見逃し例を経験したことより、CPT-2 欠損症のスクリーニング指標の検討が行われた。すり抜け例を経験したことより、再検時にはろ紙とともに血清のアシルカルニチンプロファイル分析を行う事が必要と考えられた。CPT-2 欠損症スクリーニング未施行地域での突然死の発生は、CPT2 欠損症の新生児マススクリーニングの有用性を強く示すものである。

### 研究協力者

高柳正樹（千葉県こども病院・副院長）

表 1. タンデムマス検査対象疾患で乳児期に急性発症した症例の収集

	新生児マススクリーニング	発症経過	転帰	最終診断	施設
1	TFP 欠損症の疑い	(日齢 15) 正常	(生後 8 カ月) 突然死	CPT2 欠損症	中四国地方
2	異常なし	(生後 7 カ月) 発熱後急性脳症	重症心身障害 児	CPT2 欠損症	中四国地方
3	開始前	(生後 9 カ月) 発熱、胃腸症状、 意識障害	翌日突然死	CPT2 欠損症	関東地方
4	異常なし (CPT2 対象外)	(生後 8 カ月) 発熱、ぐったり、 意識障害	突然死	CPT2 欠損症	関東地方
5	開始前	(1 歳 1 カ月) 発熱、感冒症状、 意識障害	突然死	CPT2 欠損症	関西地方

自治体によって対応が異なる現状：一次対象疾患への格上げを厚労省へ要請中

# 新生児濾紙血データ

CPT2 遺伝子に複合ヘテロ変異を同定して診断確定 → なぜスクリーニング発見できなかった？

指標	C16	C18:1	(C16+C18:1)/C2
カットオフ	6.3 $\mu$ M	3.6 $\mu$ M	
本症例	3.45	1.68	0.75

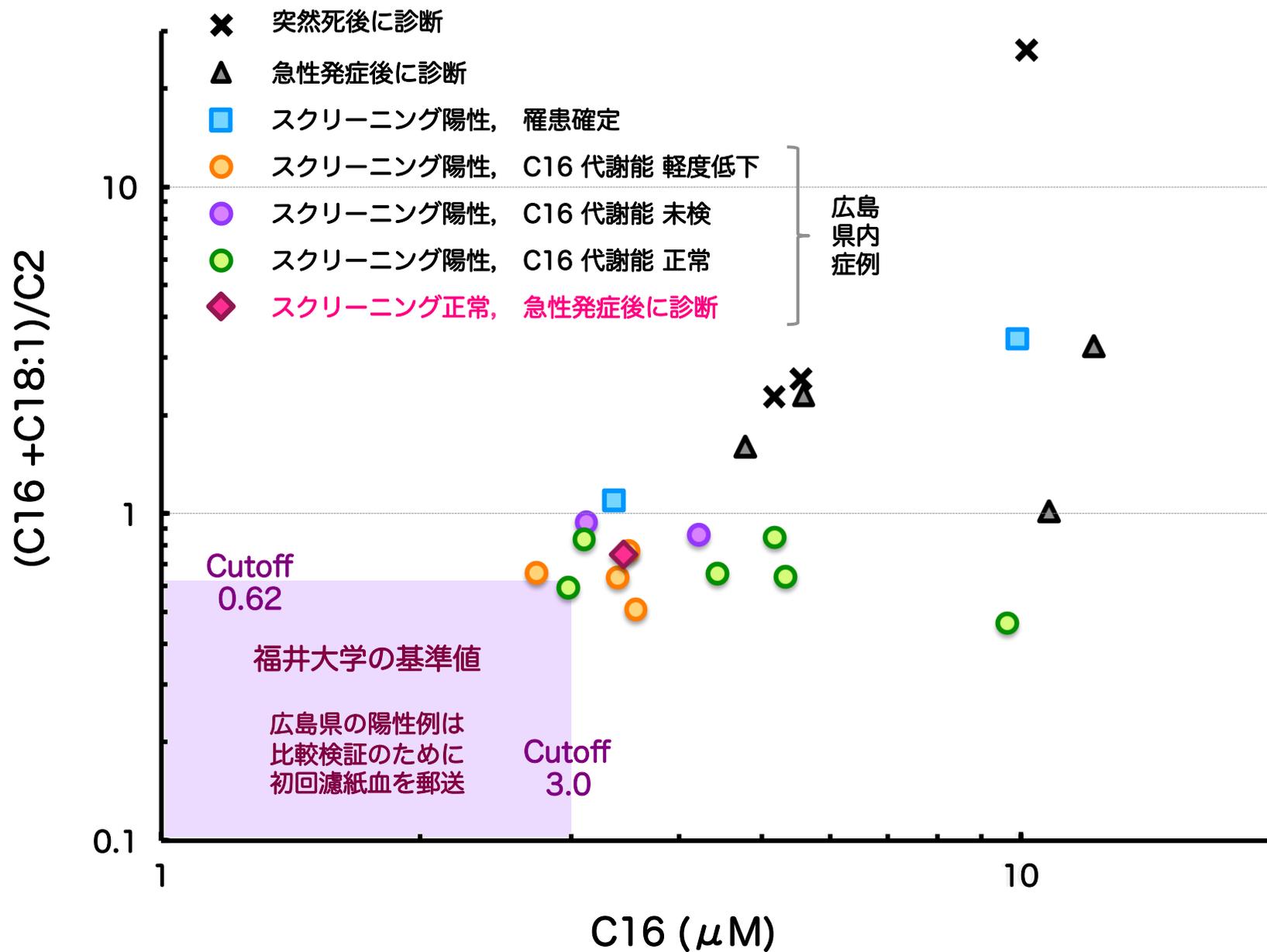
前ページ第2例が診断される以前のスクリーニング指標

この症例を見逃さないための指標として新たに

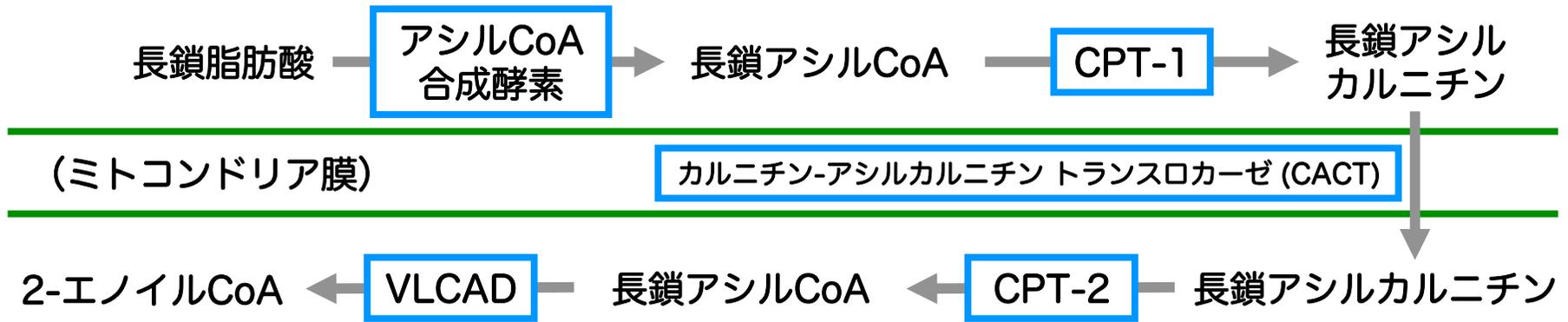
$(C16+C18:1)/C2 \geq 0.62$  &  $C16 \geq 3.0$  を採用

確定検査法： 培養リンパ球による脂肪酸代謝能測定 + 遺伝子解析

# CPT-2 欠損症：初回濾紙血指標値の分布

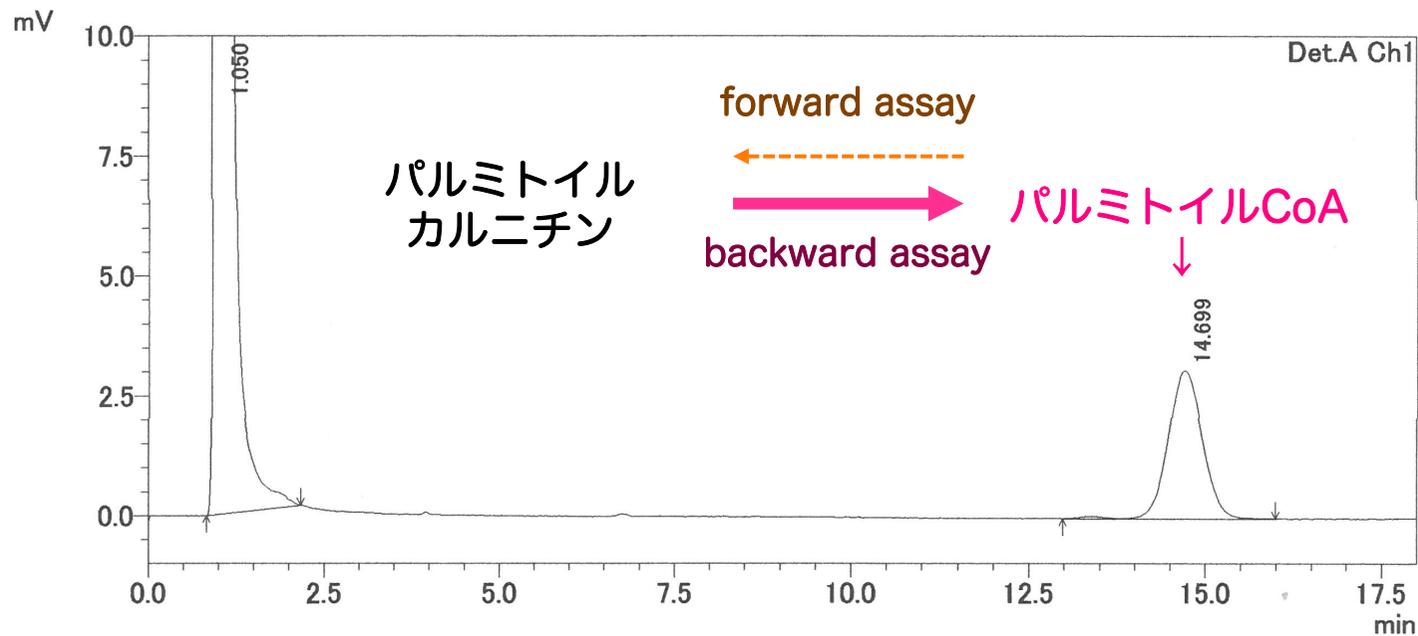


# CPT-2 活性の簡便な測定法が不可欠

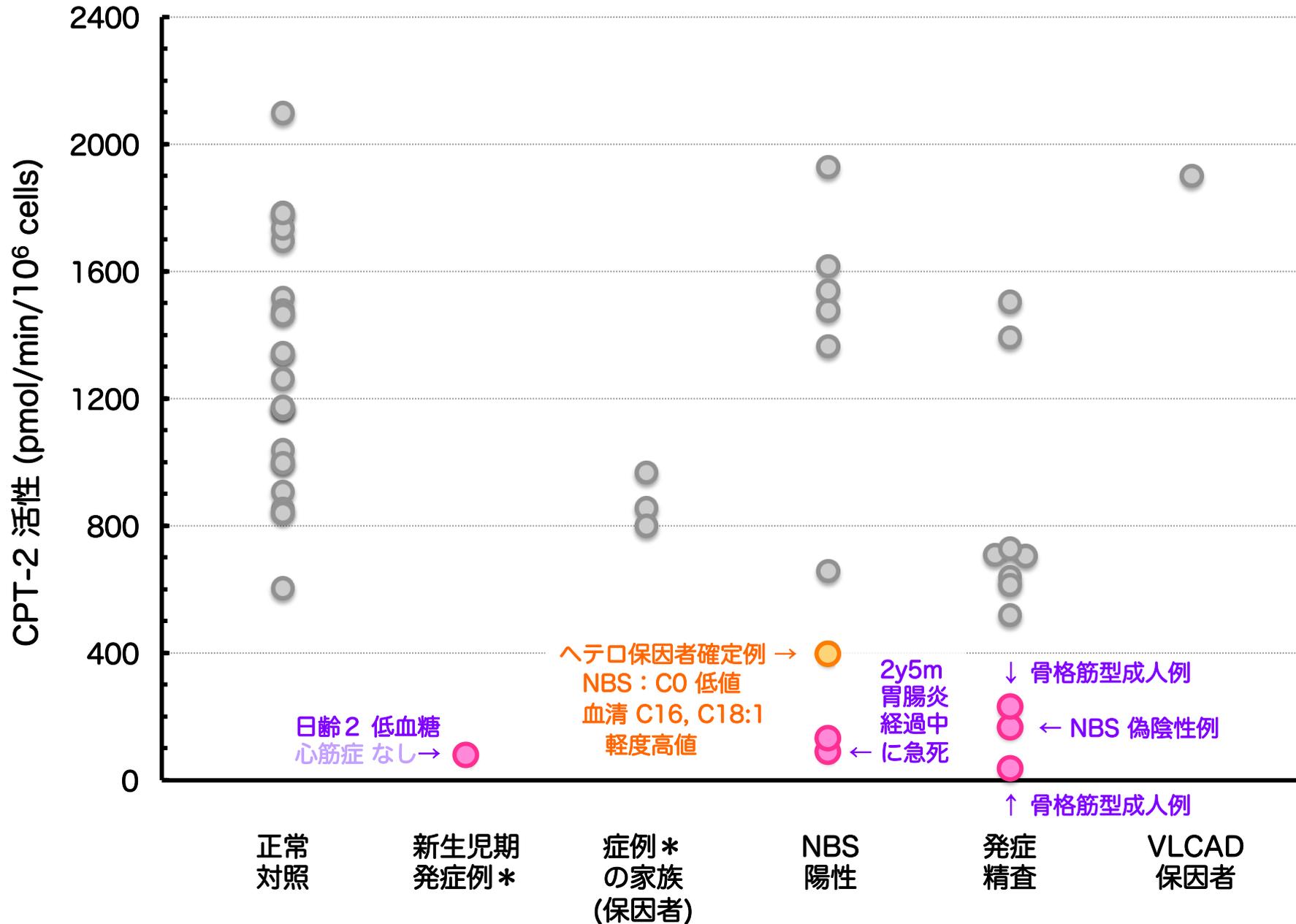


CPT-1, CPT-2 の反応は可逆性：

強力な界面活性剤でミトコンドリア膜構造を破壊 → CPT-1 だけを失活させる



# CPT-2 活性測定による診断結果



# タンデムマス対象疾患の小括

# タンデムマス導入によって浮上した注意点

---

## アミノ酸代謝異常

タンデムマス移行後、軽度高値例が多発する傾向：  
以下のような原因が実際に判明している

- ・ 軽症高フェニルアラニン血症
- ・ 肝 MAT 欠損症ヘテロ
- ・ シトルリン血症1型ヘテロ

---

## 有機酸代謝異常

VB<sub>12</sub> 投与で発症を防げたはずのメチルマロン酸血症  
2例を経験した

→ C3, C3/C2 陽性例は初回濾紙血 MMA 測定を

---

## 脂肪酸代謝異常

CPT-2, VLCAD, MCAD は濾紙血で再検せずに  
血清でアシルカルニチン分析を行うことが重要

VLCAD では C14:1 > C14 & C12 & C10 の追加  
によって偽陽性の減少が可能

血清指標値＋酵素活性＋遺伝子変異情報を蓄積して  
遺伝子型から重症度を推定できるデータベースの  
構築を進めたい

---

## 精査手順：アミノ酸・有機酸代謝異常症

指標項目	タンデムマス検体	診断的検査	
Phe	濾紙血	血漿アミノ酸分析	プテリジン分析
BCAA	濾紙血	血漿アミノ酸分析	尿中有機酸分析
Met	濾紙血	血漿アミノ酸分析	血漿総ホモシステイン
Cit	濾紙血	血漿アミノ酸分析	濾紙血アルギニノコハク酸
C3. C3/C2	血清	尿中有機酸分析	血清ビタミンB <sub>12</sub> 血漿総ホモシステイン
C5	血清	尿中有機酸分析	
C5-OH	血清 濾紙血	尿中有機酸分析	濾紙血高値，血清正常なら 母体の疾患が推定される
C5-DC	血清	尿中有機酸分析	

# 脂肪酸代謝異常症：濾紙血での再検査の適否

指標項目	濾紙血での再検査	考え方
C0 ↓	○	哺乳が進むことで C0 = 遊離カルニチン濃度が上昇していくのであれば、罹患は否定的となる
C0/(C16+C18) ↑	○	CPT-1 欠損症ではカルニチンの利用が常に停滞しており、哺乳が進むに連れて異常が明瞭となる
(C16+C18:1)/C2 ↑ & C16 ↑	△	哺乳が進むとβ酸化が抑制されて異常が軽減ないし消失する * 欧米では日齢2～3に検査を実施
C14:1 & C14:1/C2 ↑	△	↓
C16-OH ↑ & C18-OH ↑	△	見逃しを防ぐため、初回濾紙血での陽性例は直接精密検査対象として、血清アシルカルニチン分析を提出することが望ましい
C8 ↑ & C8/C10 ↑	△	

## 精査手順：脂肪酸代謝異常症

指標項目	タンデムマス検体	診断的検査
C0 ↓	血清	尿細管カルニチン再吸収率
C8, C8/C10	血清	酵素活性／脂肪酸代謝能
C14:1, C14:1/C2	血清	酵素活性／脂肪酸代謝能
C16-OH, C18-OH	血清	脂肪酸代謝能
(C16+C18:1)/C2, C16	血清	酵素活性／脂肪酸代謝能
C0/(C16+C18)	濾紙血	脂肪酸代謝能（酵素活性）

# 高ガラクトース血症

# ガラクトース血症マススクリーニングの問題点

病型	症 状	発見頻度
1 型	授乳開始後より嘔吐・下痢・黄疸などが出現。 進行性の重篤な肝障害, 白内障	1人/200万人
2 型	白内障 (成長・発達などには影響なし)	1人/100万人
3 型	赤血球・白血球中の酵素機能障害に限られ、 臨床的に問題とならない。	1人/ 10万人

欧米白人に多い1型は、日本人には極めて稀であることが明らかとなっている。

2型・3型を含めても、酵素機能障害によるガラクトース血症は非常に少ない。

しかし、**新生児マススクリーニングでのガラクトース陽性例は少なくない：**

→ 原因として**先天性門脈体循環シャント**がしばしば見出される。

# 1 型のスクリーニング検査：ボイトラー法

ガラクトース血症のスクリーニングは当初、1 型だけを対象として開始された。

ガラクトース-1-P

↓

グルコース-1-P

↓

グルコース-6-P

↓

6-P-グルコン酸

↓

リボース-5-P

(1) ガラクトース-1-P ウリジルトランスフェラーゼ

(2) ホスホグルコムターゼ

(3) グルコース-6-P 脱水素酵素

(4) 6-P-グルコン酸 脱水素酵素

NADP<sup>+</sup>

NADPH

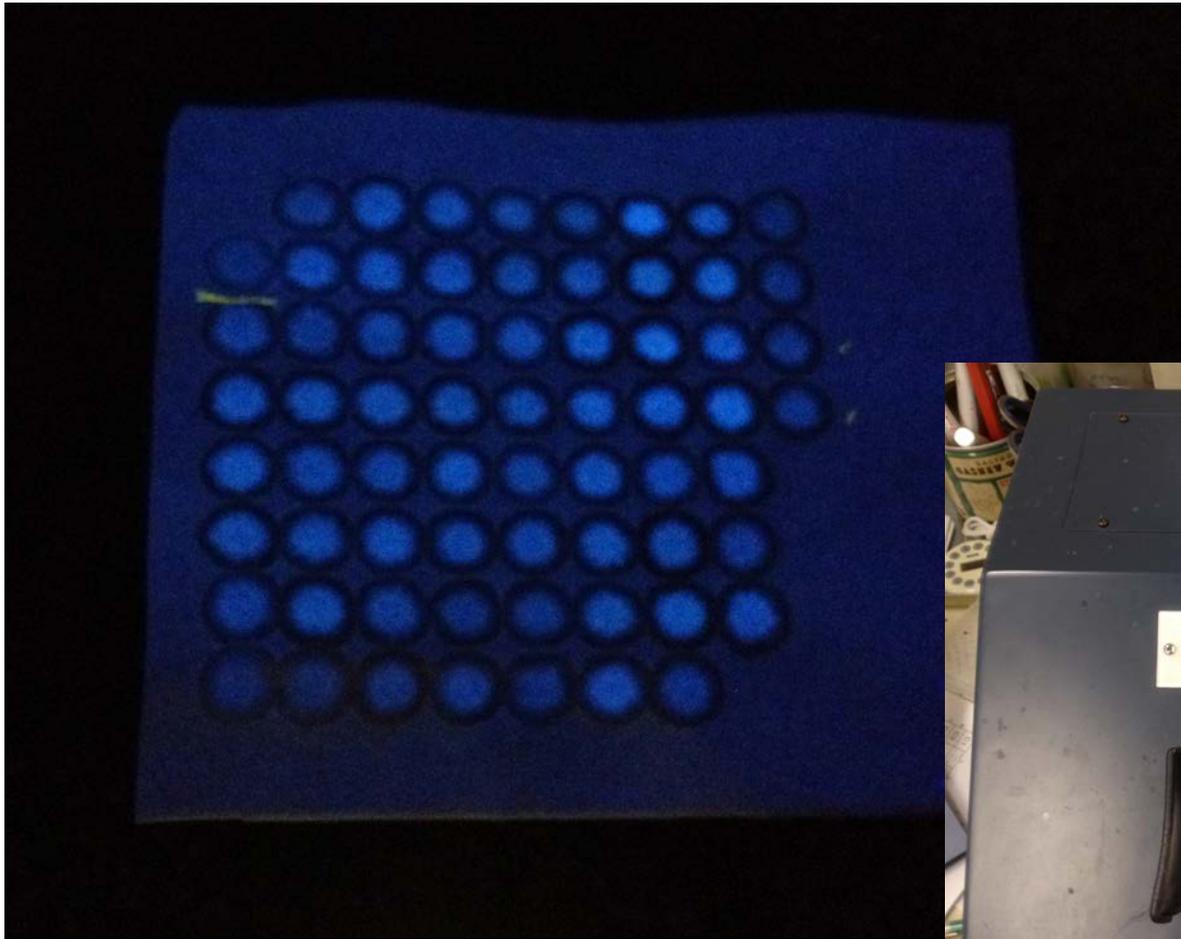
NADP<sup>+</sup>

NADPH

基質（ガラクトース-1-P, UDP-グルコース）と濾紙血を反応させる系に NADP<sup>+</sup> を加えると、濾紙血中に含まれる (1)~(4) の酵素が連続的に反応して、正常では NADPH が生成し UV 340nm 照射で蛍光を発する。

# ボイトラー法の蛍光

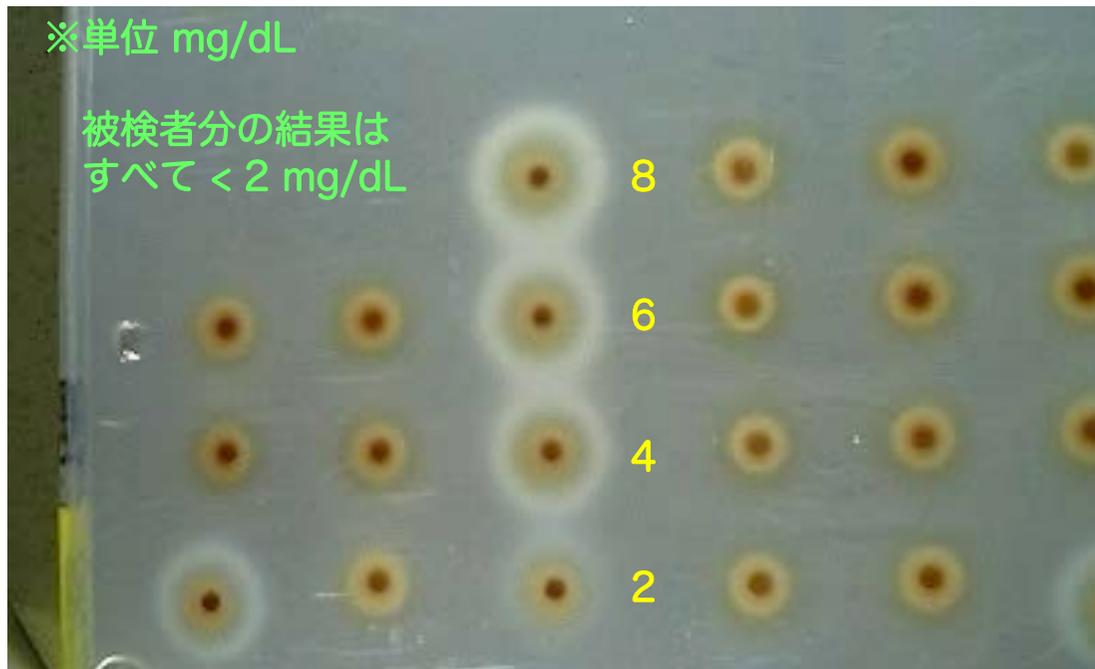
濾紙血の不十分な乾燥によって酵素が失活するため、手技の不良や梅雨の多湿などの影響で、蛍光微弱～消失による偽陽性が生じやすい。



# ガラクトース定量によるスクリーニング：ペイゲン法

ガラクトース濃度の測定が追加され、1型以外の陽性例が生じるようになった。

1. 大腸菌を溶菌させる作用があり、ガラクトースが存在すると溶菌が阻止される性質を有するファージを含む培地に、
2. 乾燥濾紙血をパンチアウトしたディスクを培地上に静置。
3. 様々な量のガラクトースを含むディスクを対照として静置。



\*ペイゲン法で得られるのは

- ・ガラクトース
- ・ガラクトース-1-リン酸
- ・UDP-ガラクトース

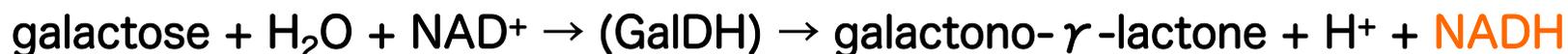
を合わせた値となっており、酵素法による測定値と直接比較するのは難しい。

2種類の測定法が長らく混在してきたが、2012年度中に全自治体で、ペイゲン法から酵素法への移行が完了した。

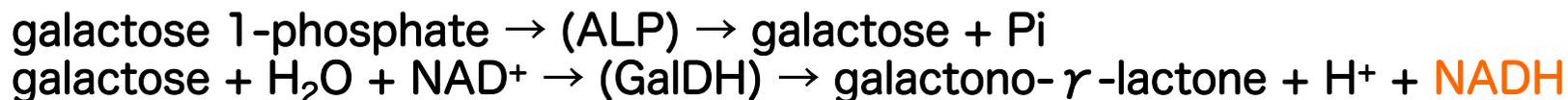
4. 濾紙血周囲の菌成長面積から **ガラクトース濃度\*** を判定。

# 「酵素法」によるガラクトース分画測定への導入

濾紙血 galactose 濃度 (Gal) : ガラクトース脱水素酵素 (GalDH; 試薬) を利用



濾紙血 total galactose 濃度 (T-Gal) : アルカリホスファターゼ (ALP; 試薬) を利用



NADH と反応して蛍光を発する試薬を触媒酵素とともに添加



以上の測定値を基に 濾紙血 galactose 1-phosphate (Gal-1-P) 濃度を算出

$$\text{Gal-1-P} = (\text{T-Gal} - \text{Gal}) \times 1.44$$

---

各分画のカットオフ値 (※自治体ごとに若干の差異あり)

Gal : 3~6 mg/dL , T-Gal : 7~10 mg/dL , Gal-1-P : 10~15mg/dL

# ガラクトース高値例の鑑別診断

---

ガラクトース血症1型： **ボイトラー異常** + **Gal-1-P 著明高値**

直ちに乳糖を除去して Gal-1-P < 5mg/dL に管理する。

---

ガラクトース血症2型： **Gal 著明高値** + **Gal-1-P 検出なし～極低値**

直ちに乳糖を除去して Gal < 5mg/dL に管理する。

---

ガラクトース血症3型： **ボイトラー正常** + **Gal-1-P 著明高値** + **Gal 正常～軽度高値**

治療不要の末梢型症例である可能性が高いが、精査時も Gal-1-P > 20mg/dL あるいは Gal > 10mg/dL が続く場合は、乳糖制限を行っておく。

---

シトリン欠損症 (NICCD), 新生児肝炎・胆汁うっ滞症 など： Gal > Gal-1-P の傾向

胆汁うっ滞を伴うガラクトース高値例は、乳糖除去が重要となる NICCD の可能性を考えながら対応する必要がある。

---

先天性門脈体循環シャント： 各分画値は様々（著明高値を呈する症例は少ない）

病的影響は不明瞭だが、精査時も Gal-1-P > 20mg/dL あるいは Gal > 10mg/dL が続く場合は、乳糖制限を行っておく。

---

# 持続性門脈体循環シャントの合併症

- ・高ガラクトース血症： ガラクトース自体の病的影響は少ないと考えられる
- ・高アンモニア血症（門脈体循環脳症） → 発達遅滞， 肝性脳症
- ・肺肝症候群： 明らかな心肺疾患のない肝疾患あるいは門脈圧亢進症で、肺内血管拡張から低酸素血症を呈する病態
- ・肺動脈圧上昇（門脈肺高血圧症） → 極めて予後不良
- ・肝腫瘍： 多くは良性だが 肝癌も生じうる。

門脈シャントによる重大な合併症を防ぎうる唯一の契機として、ガラクトース血症のマススクリーニングを生かすことが望まれる。

## <対処方針>

★ 静脈管閉鎖遅延， 肝内シャント， 肝血管腫 → 自然消失待ち（～2歳頃）

★ 肝外シャント（異常血管の存在， 門脈形成異常， など）

→ 自然消失の可能性は低い → シャント量が多ければ狭窄術～閉鎖術を考慮

# 精度管理

# 新生児マススクリーニング検査の精度管理

偽陽性をできるだけ出さず、かつ罹患者の見逃しを防ぐために、スクリーニング検査精度のコントロールが必要

## 内部精度管理

各検査施設が、日々の測定値の推移や分布を自らチェックして、変動係数 (CV) ・再採血率 ・要精査率などを一定水準以下に保つ

## 外部精度管理

自治体事業である新生児マススクリーニングは、公的な立場から検査精度を検証することが求められる

# 偽陽性をなるべく少なく

指標のカットオフを調整することで、陽性率・再採血率・要精査率は  
適当な水準にコントロールできる

実際には、再採血率・要精査率を適当な水準に収めることを目安として  
カットオフが設定されている

精査となった症例について、確定検査がどこまで詳しく実施されたか、  
明確な最終診断に至ったかどうか、などの情報を確認・集積するのは、  
現状では容易ではない

…が、速やかに除外診断がなされれば、重大な実害は生じにくい

# 見逃し（偽陰性）は防ぎたい

指標のカットオフを調整することで、陽性率・再採血率・要精査率は  
適当な水準にコントロールできる

実際には、再採血率・要精査率を適当な水準に収めることを目安として  
カットオフが設定されている

精査となった症例について、確定検査がどこまで詳しく実施されたか、  
明確な最終診断に至ったかどうか、などの情報を確認・集積するのは、  
現状では容易ではない

その上、偽陰性の有無は、重大な実害（発症）が生じるまでわからない

## 外部精度管理：評価方法の変更

従来： 旧対象 6 疾患について、カットオフやや上の濃度となるよう指標物質を添加した人工濾紙血検体を各検査施設へ送付し、検体受付～測定～結果判定～報告までの一連の作業について評価する“Proficiency Test (PT)”を月 1 回実施していた

現在： タンデムマス・スクリーニングの一次対象 16 疾患および従来法 3 疾患（先天性甲状腺機能低下症・副腎皮質過形成・ガラクトース血症）から様々な組み合わせの 9 疾患について、年 3 回 PT を実施

タンデムマス分析の正確性を評価するため、各指標物質を 4 段階の濃度で添加した人工濾紙血検体を、10日間連続で二重測定して変動係数などを調べる“Quality Control (QC)”を年 1 回実施

## QC：今後の目標

ガスリー・HPLC・ELISA など従来の検査法に比べると、タンデムマス分析は高度な専門知識・技術が要求されるが、個々の検査施設が十分に対応可能な人材を確保するのは、必ずしも容易ではないと考えられる

- 測定値（＝内部標準との比で算出）の分布だけではなく、検出した各指標物質の信号強度（絶対値）を合わせて評価することで、分析技術全体のクオリティをチェック
- 必要に応じて、経験豊富な専門家が施設を訪問して、改善のための具体的な助言・技術指導を行う
- ウェブシステムは、より使いやすいものへ改修を進める

## PT：今後の目標

PT の理想は「患者血検体」を用いた「ブラインド試験」では？

- 「患者血検体による外部精度管理試験」の倫理審査申請を準備中
- 人工検体でも、C3/C2, C8/C10, (C16+C18:1)/C2 など複数項目の比を用いた指標を含め、よりクォリティの高い試験用検体の確保に向けた取り組みが必要
- 当面は人工検体による従来方式の PT を継続しながら、**少しずつ患者血検体を混在させる**方向へ進めたい
- ウェブシステム導入：当面は QC システムの改修を優先
- **ブラインド試験の全国実施**へ、まずは**自治体への説明努力**から

ま と め

## 新生児スクリーニングによって 真に恩恵を受ける子供たちを救うために…

- 1) 初回濾紙血を用いる二次検査法を拡充し、継続的に提供する：  
= 偽陰性を防ぎつつ、偽陽性～保因者を初回濾紙血で除外
- 2) 酵素活性測定法を拡充し、継続的に提供する：  
= 精査となった新生児の診断を速やかに確定（除外）  
重症度を精確に評価 → 必要かつ十分な医療管理につなげる
- 3) 対象疾患の遺伝子変異データベースを構築し、情報を公開する：  
= 遺伝子型による重症度評価・医療管理方針の設定を可能にする
- 4) 有効な治療法が登場した疾患を、新規対象疾患として追加する
- 5) スクリーニング検査のクオリティを維持・向上するために、  
より有効な精度管理方法を追求する
- 6) 発見症例の追跡体制を確立し、新生児スクリーニング事業の  
有用性評価と、向上のためのフィードバックを可能にする