

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10465

研究課題名(和文) 乳幼児突然死症候群に潜在する先天性代謝異常症の探索と遺伝カウンセリング体制の構築

研究課題名(英文) Search for congenital metabolic disorders potentially associated with sudden infant death syndrome and establishment of a genetic counseling system.

研究代表者

島田 祐美 (SHIMADA, Yumi)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：50548146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：先天代謝異常症に対するタンデムマス分析を導入した新生児マススクリーニングは多くの先進国で実施されている公衆衛生事業である。先天代謝異常症では新生児マススクリーニング陽性時の迅速かつ効果的な介入が特に重要である。一方、新生児マススクリーニング実施後の保存濾紙血中のアシルカルニチンとアミノ酸の長期的な安定性に関する生化学的な情報は少なく、保存濾紙血を用いた後方視的な解析は限られてきた。今回我々は新生児マススクリーニング後に冷蔵保存されていた濾紙血中のアミノ酸、遊離・アシルカルニチンの安定性の特徴について検討し、冷蔵保存検体でも後方視的に先天代謝異常症を同定することが可能な項目があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンデムマス法は、乳幼児突然死症候群の中の先天代謝異常症を同定し死因の解明に繋がる場合がある。タンデムマス法による新生児マススクリーニング導入前に乳幼児突然死症候群で死亡した症例の保存濾紙血から、後方視的に未診断の先天代謝異常症を同定することができれば、発見された先天代謝異常症の死亡症例を通してその遺族の中の潜在的なニーズを把握し、家族に対して遺伝カウンセリングを行うことで正確な情報を提供することが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Newborn screening of IEM using tandem mass spectrometry has become a public health strategy in many developed countries. Prompt and effective intervention in screening-positive patients is particularly important in cases of IEM. Retrospective analyses using stored dried blood specimens have been limited, mainly due to a lack of biochemical information on the long-term stability of acylcarnitines and amino acids in stored specimens. We studied the characteristic profiles of the stability of amino acid, free carnitine, and acylcarnitines in dried blood specimens stored in a refrigerator after newborn screening. These data suggested that a part of metabolic parameters from refrigerator-stored dried blood specimens were applicable for the detection of inborn errors of metabolism.

研究分野：小児科

キーワード：新生児マススクリーニング タンデムマス法 乳幼児突然死症候群 先天代謝異常症 乾燥濾紙血

### 1. 研究開始当初の背景

乳幼児突然死症候群(以下 SIDS)は日本での発症頻度はおおよそ出生 6,000 ~ 7,000 人に 1 人と推定され、いまだに年間 100 名余りが死亡している。生後 2 か月から 6 か月に多く、稀には 1 歳以上で発症することがある。一方先天代謝異常症の中でも特に脂肪酸代謝異常症には普段は正常と変わらない生活をしていながら、飢餓や感染などの異化が亢進するときに突然死で発症する場合がある。1990 年代に開発されたタンデムマス法を用いた新生児マススクリーニングが導入され有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症が新たに対象疾患に加わった。2014 年 4 月には大分県でもタンデムマス法が導入され、発症前に早期発見することで突然死の予防がある程度可能となったが、一方でタンデムマス法導入前の小児の中には未診断の脂肪酸代謝異常症が潜在しており SIDS の高いリスクである。またほとんどの先天代謝異常症は常染色体劣性遺伝形式であるため、突然死後に特定の脂肪酸代謝異常症などが診断された場合、患者家族の中に未発症者や保因者が含まれるため、最新で正確な情報を極めて慎重に提供する遺伝カウンセリング体制の構築が不可欠である。

### 2. 研究の目的

タンデムマス法は、SIDS 中の先天代謝異常症を同定し死因の解明に繋がる場合がある。本研究では、タンデムマス法による新生児マススクリーニング導入前に SIDS で死亡した症例の保存濾紙血に着目し、未診断の先天代謝異常症の実態を調査する。さらに発見された先天代謝異常症の死亡症例を通してその遺族の中の潜在的なニーズを把握し独自の遺伝カウンセリング体制を構築することを目的とする。

一方で新生児マススクリーニング実施後に保存されている濾紙血中のアシルカルニチンとアミノ酸の長期的な安定性についての生化学的な情報は少なく、保存濾紙血を用いた後方視的な解析は限られてきた。そこで我々は新生児マススクリーニング後に冷蔵保存されていた濾紙血中のアミノ酸、遊離・アシルカルニチンの安定性の特徴について検討し、後方視的に先天代謝異常症を同定することが可能か検討する。

### 3. 研究の方法

【対象】2018 年 7 月に大分県内で出生した健常新生児の乾燥濾紙血 198 検体と、2014 年 7 月に出生した健常新生児の 90 検体。

【研究方法】新生児マススクリーニング初回検査後に冷蔵保存していた乾燥濾紙血を経時的にタンデムマス分析を行い各項目の特徴を明らかにする。3 年間的前方視的検討: 2018 年 7 月に初回検査を実施した 198 例を 5 の冷蔵室に保存した状態で 1 か月後、3 か月後、6 か月後、1 年、2 年、3 年後に再度タンデムマス分析を行い、初回時の測定値と比較する。4 年間の後方視的検討: 前方視的検討を開始した時点から 4 年前の 2014 年 7 月に初回検査を実施し、その後冷蔵保存されていた 90 検体を、再度タンデムマス分析し初回時と比較する。

【評価方法】各項目に散布図を作成し、近似式と相関係数を求める。 $R^2$  が 0.5 以上の場合、相関が保持されていると判断し、さらに増加傾向か変化しないか、減少傾向なのか、各項目で特性を確認する。

### 4. 研究成果

#### (1)【結果】

##### 3 年間的前方視的検討:

アミノ酸ではアラニン、アルギニン、フェニルアラニン、プロリン、チロシンの 5 項目で相関性を保持していた。アラニン、アルギニン、フェニルアラニンは減少傾向であり、プロリン、チロシンはほぼ変化していなかった。

遊離・アシルカルニチンでは C0、C3、C5、C10、C14、C16、C18、C18:1、C0/(C16+C18)比、C14/C3 比の 11 項目が相関性を保持していた。C0 C3/C2 比 C0/(C16+C18) 比、C14/C3 比は経時的に増加し、逆に C3 は減少していた。C5、C10、C14、C16、C18、C18:1 は大きな変化はなかった。

##### 4 年間の後方視的検討:

4 年間の後方視的検討では、4 年後のアラニンの測定値が著しく低い検体が 12 検体あった。それらはほかの項目においても低値を示しており、保存状態が悪かったと考えられ、アラニンが 100nmol/ml 以下だった 12 検体をすべての解析から除外して、近似式・相関係数を各項目で算出した。

アミノ酸ではアラニン、アルギニン、ロイシン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、チロシン、バリンの 8 項目で相関性が保持されていた。遊離・アシルカルニチンでは C0、C5OH、C10、C12、C14、C14:1、C16、C18、C18:1、C0/(C16+18) は相関性を保持していた。

#### (2)【考察】

本研究における問題点について考察する。まずは乾燥濾紙血の保存状態の問題がある。今回 4 年

前の検体において、カビなどによる濾紙血そのものの汚染による影響が疑われた。今回は再分析の測定値がアラニンで 100nmol/ml 以下の検体を除外したが、アラニンが保存乾燥濾紙血自体が評価可能な検体かどうかのスクリーニング指標として妥当かどうかは今後さらなる検証が必要と考える。2 点目に乾燥濾紙血中の中鎖・長鎖脂肪酸の測定値が小さく、その変化がとらえにくい点が挙げられる。3 点目に今回の研究では実際の患者の検体を用いた検討はできておらず、実際の患者の測定値がどのように変化をするか検討することが、今後より正確な評価につながる。最後に今回は単一の解析施設による分析であるが、温度や湿度の影響を考慮すると、様々な季節に、より多くの解析施設での検討が必要と考える。

### (3)【今後の展望】

日本ではタンデムマス分析導入前の 2014 年 4 月以前の冷蔵保存検体を再度タンデムマス分析することで、SIDS の症例に先天代謝異常症が見つかる可能性がある。一方でタンデムマス分析が導入されていない発展途上国においては、新生児スクリーニング後に乾燥濾紙血を冷蔵保存しておけば、日本に郵送しタンデムマス分析を行うことで後方視的に先天代謝異常症を診断できる可能性がある。診断がつけば日本と同様に SIDS の原因究明に役立てたり、治療介入につながる可能性がある。そして日本においても発展途上国においても、希少なメンデル遺伝病である先天代謝異常症を正確に診断することにより、遺伝カウンセリングを通して家族内の突然死のリスクや、次子の発症リスクなどに関する情報を提供することが可能になる。

### (4)【結語】

適切に冷蔵保存された乾燥濾紙血を用いたタンデムマス分析により、後方視的に一部の先天代謝異常症が診断可能であることが明らかになった。今後は海外で冷蔵保存された乾燥濾紙血のタンデムマス解析の臨床応用に向けて、国際共同研究・支援体制の整備が重要と考える。乾燥濾紙血を用いた新生児スクリーニングの適応疾患拡大に伴い、我が国の保存濾紙血の臨床使用に関するガイドラインの策定が望まれる。

### <引用文献>

1. Burton BK. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics* 1998; 102: E69.
2. Therrell BL Jr, Padilla CD. Newborn screening in the developing countries. *Curr. Opin. Pediatr.* 2018; 30: 734-9.
3. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin. Perinatol.* 2015;39(3): 171-87.
4. Yunus ZM, Rahman SA, Choy YS, Keng WT, Ngu LH. Pilot study of newborn screening of inborn error of metabolism using tandem mass spectrometry in Malaysia: Outcome and challenges. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2016; 29(9): 1031-9.
5. Fabie NAV, Pappas KB, Feldman GL. The current state of newborn screening in the United States. *Pediatr. Clin. North Am.* 2019; 66: 369-86.
6. Alfadhel M, Al Othaim A, Al Saif S et al. Expanded Newborn Screening Program in Saudi Arabia: Incidence of screened disorders. *J. Paediatr. Child Health* 2017; 53: 585-91.
7. Golbahar J, Al-Jishi EA, Altayab DD, Carreon E, Bakhiet M, Alkhayyat H. Selective newborn screening of inborn errors of amino acids, organic acids and fatty acids metabolism in the Kingdom of Bahrain. *Mol. Genet. Metab.* 2013; 110: 98-101.
8. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 2304-12.
9. Shibata N, Hasegawa Y, Yamada K et al. Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries: Selective screening vs. expanded newborn screening. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2018; 16: 5-10.
10. Yamaguchi S. Newborn screening in Japan: Restructuring for the new era. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2008; 37(12 Suppl):13-5.
11. Takahashi T, Yamada K, Kobayashi H et al. Metabolic disease in 10 patients with sudden unexpected death in infancy or acute life-threatening events. *Pediatr. Int.* 2015;57: 348-53.
12. Olpin SE. The metabolic investigation of sudden infant death. *Ann. Clin. Biochem.* 2004; 41: 282-93.
13. Fingerhut R, Ensenaer R, Roschinger W, Arnecke R, Olgemoller B, Roscher AA. Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: Implications

- for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Anal.Chem.* 2009; 81: 3571-5.
- 14.Prentice P, Turner C, Wong MC, Dalton RN. Stability of metabolites in dried blood spots stored at different temperatures over a 2-year period. *Bioanalysis* 2013; 5(12): 1507-14.
- 15.Strnadova KA, Holub M, Muhl A et al. Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin. Chem.* 2007; 53: 717-22.
- 16.Adam BW, Hall EM, Sternberg M et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin. Biochem.* 2011;44(17-18): 1445-50.
- 17.Golbahar J, Altayab DD, Carreon E. Short-term stability of amino acids and acylcarnitines in the dried blood spots used to screen newborns for metabolic disorders. *J. Med. Screen.*2014; 21: 5-9.
- 18.van Rijt WJ, Schielen P, Ozer Y et al. Instability of acylcarnitines in stored dried blood spots: The impact on retrospective analysis of biomarkers for inborn errors of metabolism. *Int. J. Neonatal. Screen.* 2020; 6: 83.
- 19.Douglas CM, van El CG, Faulkner A, Cornel MC. Governing biological material at the intersection of care and research: The use of dried blood spots for biobanking. *Croat. Med. J.* 2012; 53: 390-7.
- 20.Olney RS, Moore CA, Ojodu JA, Lindegren ML, Hannon WH. Storage and use of residual dried blood spots from state newborn screening programs. *J. Pediatr.* 2006; 148: 618-22.
- 21.Nordfalk F, Ekstrom CT. Newborn dried blood spot samples in Denmark: The hidden figures of secondary use and research participation. *Eur. J. Hum. Genet.* 2019; 27: 203-10.
- 22.Almannai M, Alfadhel M, El-Hattab AW. Carnitine inborn errors of metabolism. *Molecules* 2019; 24: 3251.
- 23.Magoulas PL, El-Hattab AW. Systemic primary carnitine deficiency: An overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2012; 7: 68.
- 24.Virman A, Pinto L, Bauermann O et al. The carnitine palmitoyl transferase (CPT) system and possible relevance for neuropsychiatric and neurological conditions. *Mol. Neurobiol.* 2015; 52: 826-36.
- 25.Longo N, di San A, Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2006; 142C: 77-85.
- 26.Blau N. Genetics of phenylketonuria: Then and now. *Hum.Mutat.* 2016; 37: 508-15.
- c 2021 The Authors. *Pediatrics International* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Japan Pediatric Society. Stability of stored dried blood spots 7 of 10
- 27.Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.s* 2010; 376(9750): 1417-
- 28.Kaku N, Ihara K, Hirata Y et al. Diagnostic potential of stored dried blood spots for inborn errors of metabolism: A metabolic autopsy of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Clin. Pathol.* 2018; 71: 885-9.
- 29.Shigematsu Y, Hirano S, Hata I et al. Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 776: 39-48.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada Yumi, Kawano Nanae, Goto Miho, Watanabe Hiromi, Ihara Kenji	4. 巻 64
2. 論文標題 Stability of amino acids, free and acyl carnitine in stored dried blood spots	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.15072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島田祐美 川野奈々江 後藤美穂 渡邊裕美 井原健二
2. 発表標題 Stability of amino acids, free and acyl-carnitine in stored dried blood spots
3. 学会等名 第63回先天代謝異常学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumi Shimada, Nanae Kawano, Miho Goto, Hiromi Watanabe, Kenji Ihara
2. 発表標題 Stability of amino acids, free and acyl-carnitine in stored dried blood spots
3. 学会等名 11th International Meeting of Pediatric Endocrinology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田祐美 川野奈々江 井原健二
2. 発表標題 新生児マススクリーニング検査実施後に長期冷蔵保存されている乾燥濾紙血のアミノ酸、遊離・アシルカルニチンの安定性の検討
3. 学会等名 第113回日本小児科学会大分地方会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	久我 修二  (KUGA Syuji)  (20773815)	大分大学・医学部・客員研究員   (17501)	
研究 分担者	井原 健二  (IHARA Kenji)  (80294932)	大分大学・医学部・教授   (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------