

拡大新生児マススクリーニングのLC-MS/MSによる 2次スクリーニング法の確立 ～クラッベ病における乾燥ろ紙血中サイコシン濃度測定～

大阪ラボラトリー 重山 拓摩・斎藤 葵・岡嶋 孝太郎

拡大新生児マススクリーニング（拡大 NBS : Newborn Screening）は、従来の新生児マススクリーニング（NBS）では対象外であった希少疾患を早期発見・早期治療につなげる取り組みである。ライソゾーム病（LSD : Lysosomal Storage Disease）の拡大 NBS では酵素活性を指標とした 1 次スクリーニングが実施されているが、偽陽性の発生や病型判別が困難であることが課題となっている。当社は LSD の一つであるクラッベ病（Krabbe Disease）のバイオマーカー、サイコシンに着目し、乾燥ろ紙血中サイコシンを LC-MS/MS で定量することで病型の層別化が可能な 2 次スクリーニング法を確立し、拡大 NBS での運用を開始した。本稿では、サイコシン濃度測定法の概要と有用性について紹介する。

1 はじめに

生後数日の新生児のかかとから少量の採血を行い、複数の先天性代謝異常症等の疾患を検査する NBS は、日本では 1977 年の開始以来、これらの疾患の早期発見・早期治療を可能にする公衆衛生事業の 1 つとなっている。現在、約 20 疾患に対してすべての新生児を対象として公費で行われている。

現行の NBS に加えて、近年の酵素補充療法や遺伝子治療等の治療法開発や検査技術の進展に伴い、新たに早期発見・早期治療が可能となった疾患を対象とした拡大 NBS が、各自治体や検査機関の協力のもと急速に普及しつつある。拡大 NBS は公費事業としての NBS とはなっておらず、自費による任意検査として実施されている。そのうち、LSD は酵素活性測定による 1 次スクリーニングが多く地域で実施されているが、酵素活性のみを指標とした 1 次スクリーニングでは偽陽性が一定数生じることや、病型の判別が困難であることが課題となっており、より精度の高い 2 次スクリーニングの導入が望まれている。

当社では、大阪市此花区のラボラトリーに衛生検査所を開設し^{※1}、LSD10 疾患^{※2}を対象とした 1 次スクリーニングとそのうちの 1 疾患であるクラッベ病の 2 次スクリーニング法を開発し、2025 年 11 月より受託業務を開始した。

LSD の中でも特に乳児型クラッベ病は、超早期の治療介入が予後改善に必要であり、拡大 NBS に対する医学的なニーズは

極めて高い。本稿では、迅速な診断が求められるクラッベ病に着目し、バイオマーカーであるサイコシンの定量を目的とした LC-MS/MS を用いた迅速かつ高精度な 2 次スクリーニング法について紹介する。

2 クラッベ病のスクリーニングの現状

クラッベ病は、ライソゾーム酵素である galactocerebrosidase（GALC）の欠損または活性低下に起因する常染色体潜性遺伝疾患である。GALC の活性低下に伴い、基質である galactocerebroside、およびその脱アシル化体である galactosylsphingosine（サイコシン）が体内に蓄積し、中枢・末梢神経の脱髄を引き起こす希少疾患である。

発症時期、重症度により乳児型、後期乳児型、若年型および成人型の 4 つの病型に分類され、なかでも乳児型は発症頻度が全体の約 40 % を占め、未治療の場合、2 ～ 3 歳で寝たきりになる重篤な経過を辿る。有効性のある唯一の治療法は乳児期早期（生後 30 ～ 45 日）の造血幹細胞移植と報告されている¹⁾。そのため、乳児型クラッベ病を早期にスクリーニングにより発見することは医学的な意義が高い。

従来、クラッベ病のスクリーニングでは、乾燥ろ紙血中の GALC 酵素活性を指標としていたが、活性値だけでは発症の有無や病型の予測が困難であった。これに対し、クラッベ病に起因する蓄積物（バイオマーカー）であるサイコシンは、病態の重症度と密接に相関することが報告されている²⁾。米国ニューヨーク州では 2006 年からクラッベ病スクリーニングが開始されており、2014 年から 1 次スクリーニングで酵素活性

※1：衛生検査所名称：(株)住化分析センターメディカルラボ、大阪市衛生検査所登録 第83号

※2：ファブリー病、ゴーシェ病、クラッベ病、ムコ多糖症Ⅰ型、Ⅱ型、ⅣA型、Ⅳ型、Ⅶ型、ポンペ病、酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症

測定、2次スクリーニングとしてサイコシン濃度測定が実施されている³⁾。2次スクリーニングの導入により、乳児型のクラッペ病の早期スクリーニングおよび偽陽性率が改善され、2024年2月に乳児型クラッペ病は米国推奨統一スクリーニングパネル（RUSP：Recommended Uniform Screening Panel）に組み入れられた⁴⁾。サイコシンを用いた病型層別化の基準（カットオフ）としては10 nM以上を乳児型、2～10 nMを遅発型、2 nM未満を健常児または保因者とすることが提案されている⁵⁾。このようなカットオフに基づき2次スクリーニングを1次スクリーニングに続いて速やかに実施することで、特に緊急性の高い乳児型を迅速にスクリーニングできる。そのため、最適なタイミングでの治療介入を実現するうえで、サイコシン濃度測定による迅速な2次スクリーニングは極めて重要な役割を担っている。

日本では、大阪市が2024年4月から拡大NBSの対象疾患にクラッペ病を全国に先駆けて追加し、酵素活性測定を実施しているものの、開始時には2次スクリーニングまでは実施されていなかった⁶⁾。今回、当社は日本で初めて拡大NBSにおけるクラッペ病の2次スクリーニングとしてLC-MS/MSを用いた乾燥ろ紙血中のサイコシン濃度測定法を確立した。加えて、1次スクリーニングで酵素活性の低下が見つかった新生児に対し、同じ検体を用いて迅速にスクリーニングが実施できる体制を構築し、2025年5月より、大阪市の拡大NBSにおけるクラッペ病の陽性例に対して、サイコシン濃度測定をパイロット的に開始した。

3 LC-MS/MSを用いたサイコシン濃度測定法の確立

サイコシン濃度をLC-MS/MSで測定する際に、ゴーシェ病のバイオマーカーである glucosylsphingosine (Lyso-Gb1) の混在が技術的な障壁となる。サイコシンと Lyso-Gb1 は、糖部分がガラクトースかグルコースかが異なる質量数が同一の異性体である。このため、MS/MSのプリカーサーイオン、プロダクトイオンのいずれも m/z が一致し、MSのみで両者を分離して検出することが困難である。そこで、HPLC カラムや移動相の選択に加え、分離条件の最適化検討を重ね、HPLC で両者を分離し、サイコシンを特異的に検出する条件を確立した（図1）。

分析試料はNBSで標準的に使用されている乾燥ろ紙血から1パンチ（直径3.2 mm、血液量約3 μ L 相当）を用いた。抽出条件については、複数の溶媒組成を検討することで、血液由来の

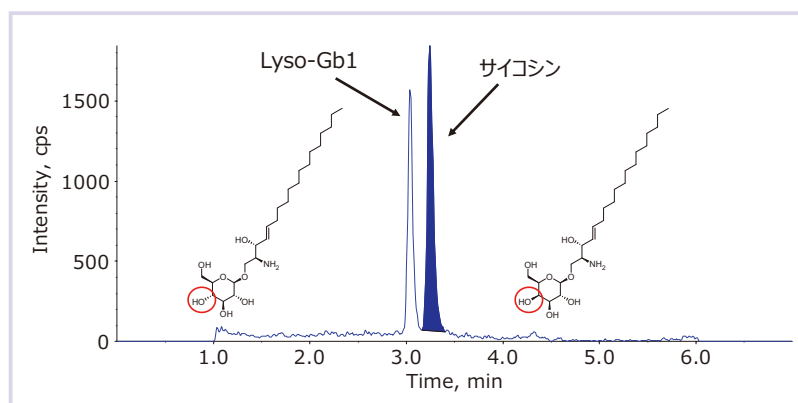


図1 サイコシンと Lyso-Gb1 のクロマトグラム

夾雑物を十分に除去しつつ、サイコシンを安定的に回収できる前処理法を構築した。

病型層別化が可能な2次スクリーニングとして社会実装するためには高度な分析精度が求められる。本分析法の性能を検証するためのバリデーション試験として、選択性、特異性、直線性、定量範囲、日内および日間再現性、並びに検体郵送中の安定性を評価した。バリデーション試験の結果、本分析法はサイコシンおよび内標準物質の検出位置に妨害ピークは見られず、良好な選択性、特異性を示した。また、1.00～100 nMの範囲で良好な直線性（相関係数 0.9900 以上）を示した。定量下限である 1.00 nM は、クラッペ病を識別する基準となるサイコシン濃度（2.00 nM 以上）を十分に定量可能であり、クラッペ病陽性者を検出するために必要な感度を有している。3 濃度（低・中・高濃度）各 $n = 3$ の品質管理試料を用いた評価では、日内および日間再現性（3 日間）ともに真度 $100 \pm 15 \%$ 以内、精度 15% 以下を達成し、良好な定量性を有することを確認した。拡大 NBS の検体（乾燥ろ紙血）は室温で郵送されるため、特に夏季の高温多湿下における安定性が課題となる。21～43 $^{\circ}$ C の環境下で 5 日間の安定性試験を実施したところ、サイコシン濃度に有意な変動は認められなかったことから、季節に影響されることなく信頼できる結果が得られると判断した（図2）。さらに、キャリアオーバー（高濃度試料測定後の残留物が次の試料の測定に影響する現象）の評価として高濃度試料測定後にブランク試料を連続注入したところ、サイコシンおよび内標準物質ともにピークは検出限界未満であり、前試料の残留による影響は認められなかった。前処理後試料についても 4 $^{\circ}$ C 保存 24 時間後に再測定を行い、初回測定と比較して真度および精度ともに事前に設定した許容範囲内であることを確認した。これらの結果より、本分析法はハイスループットな検体処理が求められる拡大 NBS に適用可能であると考えられる。

次に、健常新生児および病型が明らかとなっているクラッペ病

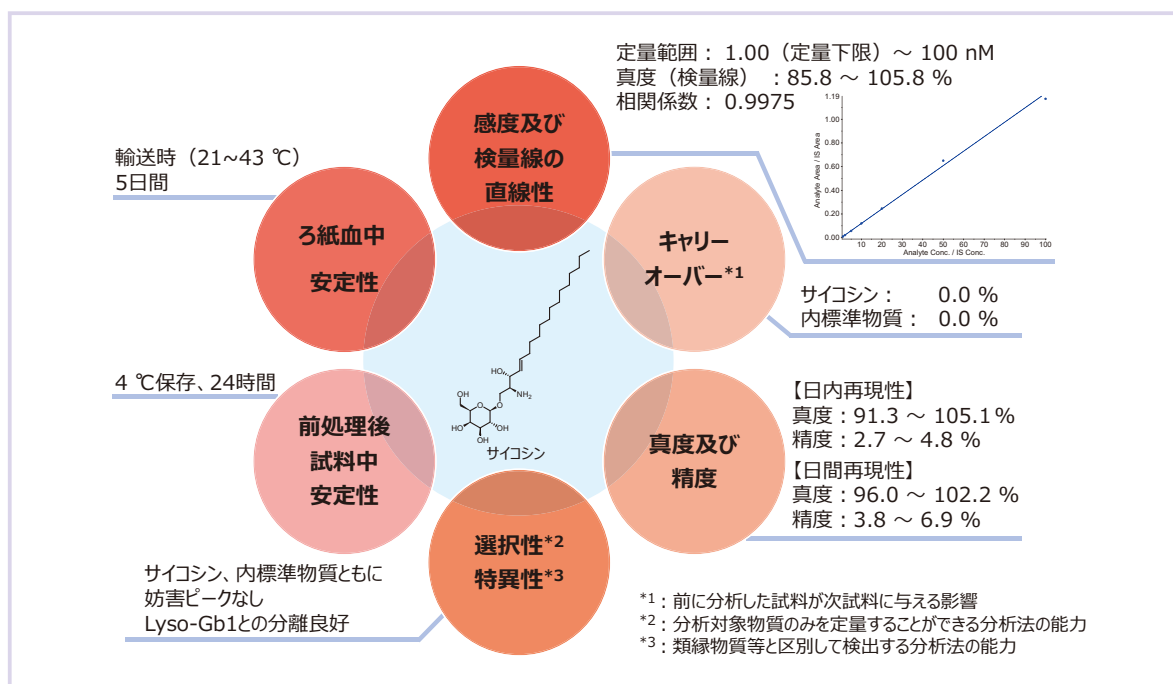


図2 2次スクリーニング試験方法のバリデーション結果

表1 健常新生児とクラッペ病患者の乾燥ろ紙血中サイコシン濃度

検体コード（病型）		サイコシン濃度（nM）
健常新生児		<1.00
クラッペ病患者	KR-001（成人型）	2.56
	KR-003（成人型）	3.01
	KR-004（後期乳児型）	22.2
	KR-005（乳児型）	21.3

患者の乾燥ろ紙血中サイコシン濃度を測定した結果、健常新生児は2.00 nM未満、クラッペ病患者では2.00 nM以上であった。また、クラッペ病患者のうち成人型は2.00～10.0 nM、乳児型は10.0 nM以上を示した。これらの結果はアメリカにおけるカットオフ値と一致しており、本スクリーニングにより病型の層別化が可能であることを確認した（表1）。

4 拡大NBSにおける2次スクリーニング

2025年5月より、医誠会国際総合病院が実施する臨床研究に測定機関として参画し、拡大NBS検体のクラッペ病2次スクリーニングを開始した。

1次スクリーニング（酵素活性測定）にて陽性と判定された50例に対し、2次スクリーニングとしてサイコシン濃度測定を実施した。50例中49例は、サイコシン濃度が2.00 nM未満（陰性圏内）であった。1例において、サイコシン濃度が52.0 nM

と極めて高値を示し、これは米国の乳児型カットオフ（10.0 nM以上）を大きく上回る値であった（表2）。通常、酵素活性のみの結果では精密検査に数週間を要するが多いが、2次スクリーニングとしてサイコシン濃度を測定し病型を予測することで、診断までのリードタイムが大幅に短縮されたと考える。

当社は、LSD 10疾患を対象とした1次スクリーニングと、クラッペ病の2次スクリーニングをワンストップで実施する体制を構築しており、1次スクリーニングにおいて陽性が疑われた場合、再採血を待つことなく、同じ乾燥ろ紙血を用いて2次スクリーニングへ移行できる。つまり、従来の外部委託や再検査に伴うタイムロス为数日から数週間単位で短縮したことで、より適切なタイミングでの治療介入に寄与することが期待される。また、2次スクリーニングで病型の層別化が可能になることで、緊急性の低い（または発症リスクの極めて低い）症例に対する過度な精密検査を回避できる。これは、ご家族の不安を解消することにもつながると考えられる。

5 おわりに

当社は1次スクリーニングとしてLSD10疾患の酵素活性測定に加え、そのうちの1疾患であるクラッペ病の2次スクリーニング法として、乾燥ろ紙血中のサイコシン濃度をLC-MS/MSにより測定する方法を確立した。同法はクラッペ病のバイオマーカーであるサイコシン濃度を1.00～100 nMの範囲で正確に精度よく定量可能であり、病型層別化が可能な2次スク

リーニングの基準を満たす感度を有した分析法である。この測定により、乳児型クラッペ病の早期治療介入に貢献できると考える。

当社は今後、近年治療薬が登場した異染性白質ジストロフィー（MLD）や副腎白質ジストロフィー（ALD）など、他のLSDやLSD以外の先天性代謝疾患に対しても1次スクリーニング法および2次スクリーニング法の開発を行い、スクリーニングの偽陽性の低減を図るだけでなく、病型予測、さらには治療モニタリングを可能とする拡大NBS体制の構築を目指す（表3）。特に、陽性疑い検体に対して初回紙血を用いた迅速な2次スクリーニングを実施できることは、迅速な診断の契機になり、またご家族の心理的負担軽減につながると考える。さらに、緊急性の低い症例や発症リスクの低い保因者候補を早期に識別できることは、不必要な精密検査や治療を回避し、限られた専門医療資源を高リスク症例に優先的に活用するうえでも重要である。

今後も、科学的根拠に基づいた高品質なスクリーニングサービスを通じて、希少疾患であっても見逃されることなく、ご家族が納得して治療選択を行える医療体制の構築に寄与していきたい。

表2 拡大NBSにおけるクラッペ病の2次スクリーニング

検体コード	サイコシン濃度 (nM)	検体コード	サイコシン濃度 (nM)
KR-006	<1.00	KR-014	<1.00
KR-007	<1.00	KR-015	<1.00
KR-008	1.04	KR-016	<1.00
KR-009	1.05	KR-017	<1.00
KR-010	初回検査	KR-018	<1.00
	再検査	KR-019	<1.00
KR-011	<1.00	KR-020	<1.00
KR-012	1.59	KR-021	<1.00
KR-013	<1.00	KR-022	<1.00

表3 今後予定しているLSDの2次スクリーニング測定対象

疾患名	測定対象
ファブリー病	Lyso-Gb3
ゴーシェ病	Lyso-Gb1
ボンベ病	Hex4
ムコ多糖症	デルマタン硫酸 ヘパラン硫酸 ケラタン硫酸 コンドロイチン硫酸
異染性白質ジストロフィー（MLD）	ARSA（アリルスルファターゼA）活性

6 謝辞

本研究は、医誠会国際総合病院における臨床研究（ライソゾーム病・ペルオキシソーム病 [LSD/PD] の良質かつ適切な医療体制の確立に関する研究 [研究責任者：酒井規夫医師]）に測定機関として参画し、実施した成果です。ここに深謝の意を表します。

文 献

- 1) Escolar ML, et al.: "Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease", *N Engl J Med.*, **352** (20), 2069 (2005).
- 2) Escolar ML, et al.: "Psychosine, a marker of Krabbe phenotype and treatment effect", *Mol Genet Metab.*, **121** (3), 271 (2017).
- 3) Orsini JJ, et al.: "Newborn screening for Krabbe disease in New York State: the first eight years' experience", *Genet Med.*, **18** (3), 239 (2016).
- 4) Health Resources & Services Administration: "Recommended Uniform Screening Panel", <<https://www.hrsa.gov/advisory-committees/heritable-disorders/rusp>>, (accessed 2026-04-28).
- 5) Thompson-Stone R, et al.: "Consensus recommendations for the classification and long-term follow up of infants who screen positive for Krabbe Disease", *Mol Genet Metab.*, **134** (1-2), 53 (2021).
- 6) 酒井規夫: 遺伝子医学, **15** (1), 78 (2025).



重山 拓摩
(しげやま たくま)
大阪ラボラトリー



斎藤 葵
(さいとう あおい)
大阪ラボラトリー



岡嶋 孝太郎
(おかじま こうたろう)
大阪ラボラトリー