

C. 研究結果

図3~8に Phe、Tyr、Val、Leu+Ile、Met の測定値について HPLC 法とタンデムマス法の相関を示す。Phe の回帰式は $y=1.100x+0.089$ 、相関係数 (R^2) は 0.994 (図3) であり、両測定法からの Phe 測定値分布範囲は PKU と HPA 患者が 0.7~18.1 mg/dl、他疾患の患者では 0.5~1.1 mg/dl であった。Tyr の回帰式は $y=1.180x-0.183$ 、相関係数 (R^2) は 0.989 (図4) で、Tyr II 型患者はタンデムマスで 4.5 mg/dl、HPLC では 3.8 mg/dl を示した。他疾患の患者での Tyr 測定値分布範囲は 0.5~2.2 mg/dl であった。Val の回帰式は $y=0.787x+0.233$ 、相関係数 (R^2) は 0.932 (図5) で、Val 測定値分布範囲は MSUD 患者が 1.8~2.8 mg/dl、他疾患の患者では 1.1~2.9 mg/dl であった。Leu+Ile の回帰式は $y=0.836x+0.154$ 、相関係数 (R^2) は 0.960 (図6)、Leu+Ile 測定値分布範囲は MSUD 患者が 2.0~3.7 mg/dl、他疾患の患者では 0.8~2.9 mg/dl であった。Met は、タンデムマス法で 6.23 mg/dl、HPLC 法では 7.9 mg/dl を示した HCU 患者を含むと、回帰式は $y=0.797x-0.004$ 、相関係数 (R^2) は 0.999 となった (図7)。しかしこの患者のみが飛び抜けて高値であることから、これを含まない群で相関を求めた結果、回帰式は $y=0.838x-0.014$ 、相関係数 (R^2) は 0.846 (図8) となり、この場合の Met 測定値分布範囲は 0.1~0.5 mg/dl であった。

D. 考察と結論

両測定法における Phe、Tyr、Val、Leu+Ile についての相関係数 (R^2) はそれぞれ、0.994、0.989、0.932、0.960、と非常に良い相関が得られた。Met については 0.846 と他の4種類のアミノ酸よりやや低い値であったが、測定値分布範囲が 0.1~0.5 mg/dl と他のアミノ酸と比較して低濃度でかつ狭小範囲であることを考慮すれば、かなり良い相関であると思われた。

今回の検討は、使用した母数が 25 検体と少数であるが、患者検体を使用したことで、各アミノ酸測定値において正常値~異常高値を含む母集団から相関を求める事を可能とし、かつ検討結果が非常に良い相関であった事は、タンデムマス法の信頼性を裏付けるために大きな意義を持つものと考えられる。

さらにタンデムマス法は、HPLC 法と比較して濾紙血からの試料調整が難しいとされているが、今回

の検討では定量性に優れた HPLC 法と非常に良い相関が得られた事から、分析時間が短く、かつ安定した測定系であり、信頼性の高い方法であると考えられた。

E. パイロットスタディーの結果

大阪地区におけるタンデムマス法による新生児マス・スクリーニング検査結果を表1に示す。大阪市では2001年から大阪市内の主要医療機関で出生し、親のインフォームドコンセントが得られた新生児の濾紙血検体を福井大学医学部に送付しており、3年間の検査実施数は合計 15,830 検体、再採血検査数は 14 検体であったが、患者はまだ発見されていない。

文献

- 1) 大竹治美、酒本和也、武井節子 他：一次スクリーニング法としての HPLC アミノ酸分析システムの検討。日本マス・スクリーニング学会誌 Vol.9, No.3 : 65 - 74, 1999.
- 2) 大竹治美、酒本和也、長谷 豊 他：HPLC 短時間法によるアミノ酸代謝異常症マス・スクリーニング5年間の成績。日本マス・スクリーニング学会誌 Vol.15, No.1 : 45 - 54, 2005.
- 3) 重松陽介、布瀬光子、畑 郁江、他：Electrospray Tandem Mass Spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マス・スクリーニング。日本マス・スクリーニング学会誌 Vol.8, No.1 : 13 - 20, 1998.
- 4) Shigematsu Y, Hata I, Kikawa Y, et al : Modifications in electrospray tandem mass spectrometry for a neonatal - screening pilot study in Japan. J. Chromatogr. B. 731 : 97 - 103, 1999.
- 5) 重松陽介、平野聡子、畑 郁江、他：タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常マス・スクリーニングスクリーニング地域拡大と患者検体分析による知見の蓄積一。日本マス・スクリーニング学会誌 Vol.11, No.1 : 57 - 67, 2001.

HPLC測定法及び分析条件

《 測定方法 》

HPLC	:	LC-10Avp (アミノスクリーン分析システム、島津製作所)
分離モード	:	固定相に逆相シリカゲルを用いた逆相分配ペアードイオン法
検出法	:	OPA-ポストカラム
蛍光検出波長	:	励起波長(Ex) 344nm、蛍光波長(Em) 455nm
定量法	:	内部標準1点検量線法(内部標準物質/ノルロイシン)
標準溶液濃度	:	L-Ile(0.03mg/dl)/L-allo-Ile(1.25 μ M)/アミノ酸(2.5 μ M)

《 分析条件 》

移動相流量	:	1.4~1.3ml/分
洗浄液流量	:	1.4~1.3ml/分
反応液流量、反応温度	:	0.3ml/分、37°C
試料注入量	:	5 μ l
オートサンプラー内温度	:	10°C
分析時間	:	約12分

図 1. HPLC 測定法及び分析条件

タンデムマス測定法及び分析条件

《 測定方法 》

タンデムマス分析計	:	TSQ7000(サーモクエスト)
HPLC	:	LC-10Avp(島津製作所)
イオン化法	:	ESI法
分析モード	:	アシルカルニチン/プリカーサーイオンスキャン アミノ酸/SRM(Selected Reaction Monitoring)
移動相	:	50%アセトニトリル
内部標準	:	重水素標識アシルカルニチン / 自家調整 重水素標識シトルリン / 自家調整 安定同位体標識アミノ酸 / CILあるいはCDN

《 分析条件 》

移動相流量	:	15 μ l/分
洗浄流量	:	0.5ml/分
シースガス圧	:	60psi
加熱キャピラリー温度	:	200°C
試料注入量	:	10 μ l
分析時間	:	1.3分

図 2. タンデムマス測定法及び分析条件

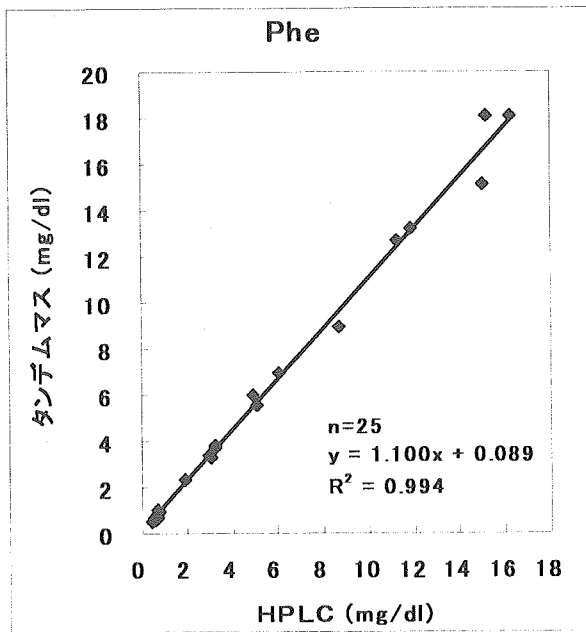


図 3. フェニルアラニンにおける HPLC 法とタンデムマス法の相関

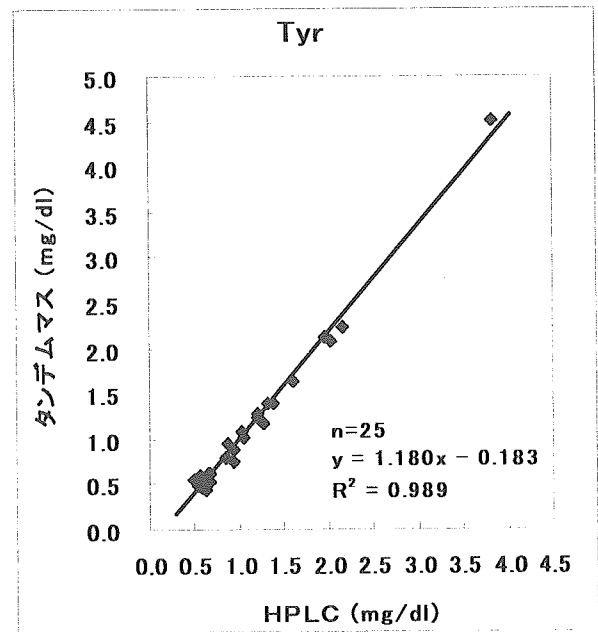


図 4. チロシンにおける HPLC 法とタンデムマス法の相関

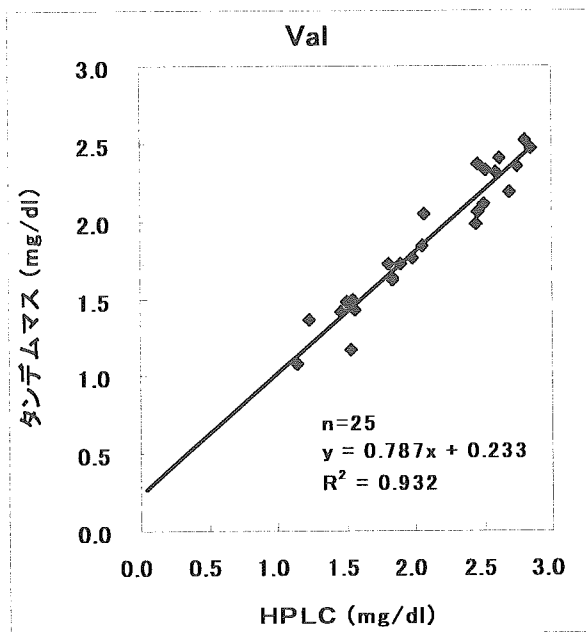


図 5. バリンにおける HPLC 法とタンデムマス法の相関

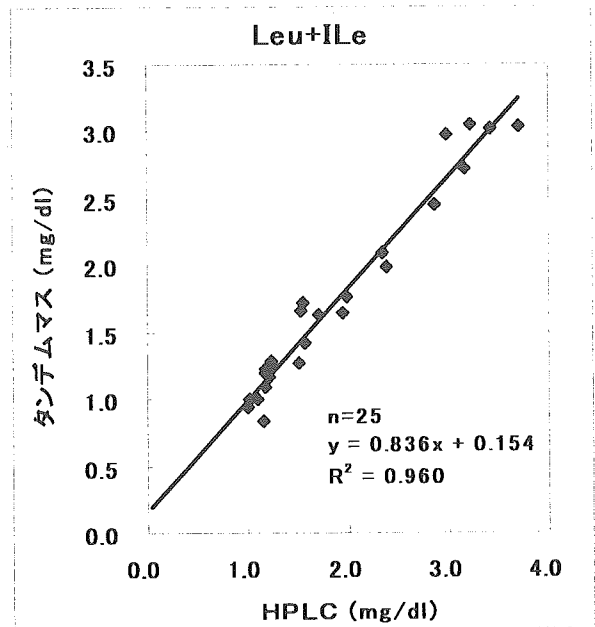


図 6. ロイシンとイソロイシンにおける HPLC 法とタンデムマス法の相関

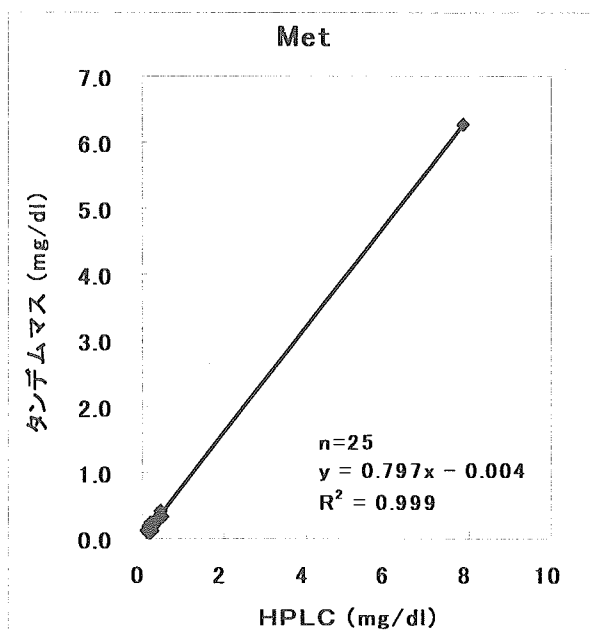


図7. メチオニンにおける HPLC 法とタンデムマス法の相関 (HCU 患者を含む)

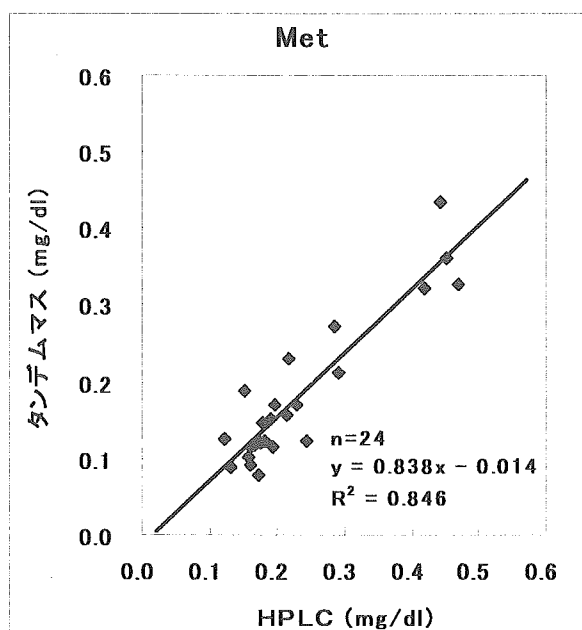


図8. メチオニンにおける HPLC 法とタンデムマス法の相関 (HCU 患者を含まず)

年度	受付数	再採血検査数	患者数
2001	3,042	2	0
2002	5,582	6	0
2003	7,206	6	0
計	15,830	14	0

表1. 大阪地区におけるタンデムマス法による新生児マス・スクリーニング検査結果

分担研究課題：タンデムマスによるマススクリーニングの効果に関する研究

タンデムマスによる非誘導体化アミノ酸測定

研究要旨

質量分析装置を用いたアミノ酸分析では、前処理として試料の誘導体化処理(ブチルエステル化など)を行うのが一般的であるが、処理が煩雑なために多量の検体を取り扱う新生児マススクリーニング検査への導入には障害となることが予想される。われわれは、誘導体化処理を省略し、乾燥血液濾紙サンプルを直接タンデムマスに導入する非誘導体化分析法の可能性を、標準試料の測定再現性および新生児スクリーニング検体測定値について、現行 HPLC 法と比較検討した。

研究協力者

稲岡一考、中村しのぶ、宮城晶子、
畝川謙太郎、入江明美、竹島清美、
宮道徹、中山雅弘、和田芳直、
(大阪府立母子保健総合医療センター)
重松陽介
(福井大学医学部看護学科)

を使用する機会を得たので、新生児スクリーニング用乾燥血液濾紙中アミノ酸の非誘導体化分析の可能性について検討した。

A. 研究目的

質量分析法を用いた生体試料の分析は、「分析感度の高さ」と「得られる情報の豊富さ」などの優れた特性から、代謝異常疾患の精密診断に多様されるようになってきている。特に新しい MS/MS (以下タンデムマス) を用いたインフュージョン-ESI 分析法は、「検体の微量性」と「装置の検体処理能力の豊富さ」から新生児スクリーニング分野においても急速に普及しつつある。

一般的に、タンデムマスによるアミノ酸分析では、試料のイオン化効率を高めるための前処理として、高温強酸下でブチルアルコールとエステル化反応を生じさせ、誘導体化(ブチルエステル化)を行うが、

- ① 専用誘導体化試薬の価格。
- ② 自家製誘導体化試薬の品質管理。
- ③ 強酸ガスによる機器・設備の劣化。
- ④ 煩雑な操作と手技誤差の混入。
- ⑤ 反応温度・時間管理
- ⑥ 水分残存による反応の不均一化。

などのマイナス要因も予想され、多量の検体を処理する新生児スクリーニングに適した方法とは言い切れない。

今回、我々は高感度なイオン源を採用した新型タンデムマス分析装置(API3200 Applied Biosystems)

B. 研究方法

1) 対象物質

現在、わが国の新生児スクリーニングで測定対象としているアミノ酸3種

- ①Phe
- ②Met
- ③Leu(Leu + Ile)

2) 対象検体

- ・ 新生児スクリーニング検体
(大阪府立母子医療センター受理検体)
- ・ 先天代謝異常検査用標準血液濾紙
(富士レビオ)
- ・ 先天性代謝異常検査用管理検体
(公衆衛生協会精度管理センター)
- ・ アミノ酸標準液 H 型
(和光純薬)

3) 分析装置

(タンデムマス法)

①送液ポンプ・サンプラー：

Prominence (島津製作所)

②質量分析計：API3200

③イオン源：TurboV ion source

④分析ソフト：Analyst1.4.1

⑤解析ソフト：ChemoView1.3.1

(②～⑤Applied Biosystems)

(HPLC 法(対照法))

①アミノスクリーンシステム(島津製作所)

4) 使用試薬

内部標準液：

Labeled Amino Acid Standards Set-A

(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

※その他試薬は、LC/MS 分析・HPLC 分析グレードを使用した。

(試薬調整)

① 自施設調整誘導体化試薬

Acetyl Chloride : 1-Butanol = 1 : 9

② 自施設調製固定液

Methanol : Acetone : H₂O = 7 : 7 : 2

5) 検討方法

(測定再現性)

①標準乾燥濾紙および標準溶液を検体に、一般的な誘導体化タンデムマス法と新しい非誘導体化タンデムマス法の測定同時再現性について比較検討した。

②標準乾燥濾紙および標準溶液を検体に、現行 HPLC 法と新しい非誘導体化タンデムマス法の測定同時再現性について比較検討した。

(測定値の相関)

③実際の新生児スクリーニング検体を対象に、現行タンデムマス法と新しい非誘導体化タンデムマス法による測定結果を比較検討した。

C. 研究結果

一般的な誘導体化法を基準に、非誘導体化分析手順を作成した。

1) 分析手順の作成

(ブチルエステル誘導体化分析法)

①血液濾紙検体 (1/8 インチ、全血 3 μ l 相当を平底マイクロプレート^{*1}) に採取。

②内部標準物質を含んだメタノールを吐出型 Eppendorf Multipette4780^{*2} 連続分注マイクロピペットを用いて 100 μ l 添加。

③室温で一時間溶出。

(10 分間振盪、40 分間静置、10 分間振盪)

④抽出液のみ別プレートに採取し、血液濾紙を除去。

⑤N₂ ガス下、50 $^{\circ}$ C ドライバス (あるいは加熱プレート) を用いて乾固。

⑥誘導体化試薬 (10% HCl/n-Butanol) を添加。

⑦反応中の蒸発を防ぐため蓋を閉め 65 $^{\circ}$ C 15 分間インキュベート。

⑧N₂ ガス下、50 $^{\circ}$ C ドライバス (あるいは加熱プレート) 加熱を用いて乾固。

⑨移動相溶液 100 μ l に再溶解。

⑩インフュージョン ESI-MS/MS 分析。

⑪専用ソフトで濃度換算。

(ブチルエステル非誘導体化分析法)

①血液濾紙検体 (1/8 インチ、全血 3 μ l 相当を平底マイクロプレート^{*1}) に採取。

②メタノール/アセトン/水 (7:7:2) 溶液 10 μ l を加え Hemoglobin 固定。

③内部標準物質を含んだメタノールを吐出型 Eppendorf Multipette4780^{*2} 連続分注マイクロピペットを用いて 100 μ l 添加。

④室温で 1 時間溶出。

(10 分間振盪、40 分間静置、10 分間振盪)

⑤遠心分離 (3000rpm、10 分間程度)。

⑥抽出液のみ別プレートに採取し、血液濾紙の除去。

⑦インフュージョン ESI-MS/MS 分析。

⑧専用ソフトで濃度換算。

以上が今回変更を加えた分析手順である。ここで分析精度に大きく影響するのは、「内部標準の添加」および「誘導体化」の操作で、テクニカルエラーが発生する可能性の高さが予想される。そのため、粘性の低い有機溶媒溶液を主成分とする内部標準の分注操作 (術式※1、※2) では、平底マイクロプレートと吐出型連続分注ピペットを用いることで、溶液分注の精度を確保した。一方、非誘導体化法では、内部標準を加えた移動相溶液で血液濾紙からのアミノ酸溶出を行うため、溶血の発生に配慮する必要がある。これには、予めメタノール/アセトン溶液による Hemoglobin 固定処理を行うことで、利用する移動相の選択の幅を広げた。また、抽出液分取の前段階に遠心操作を加えることで、質量分析装置へ不溶性不純物の混入防止に努めた。

2) 分析結果

非誘導体化タンデムマス分析法の測定同時再現性を一般的な誘導体化タンデムマス分析法を対照に検討した。

0.02%ギ酸添加 50%アセトニトリル溶液を移動相としてアミノ酸標準液を測定した結果を(表 1)、同一条件でアミノ酸標準乾燥血液濾紙を測定した結果を(表 2)、0.02%ギ酸添加 90%メタノール溶液を移動相として標準乾燥血液濾紙を測定した結果を(表 3)に示す。誘導体化法、非誘導体化法共にアミノ酸標準液、アミノ酸標準乾燥血液濾紙の測定再現性はおおむね C.V. 3%前後 (最大でも C.V. 値 6%以下) であり、良

好な再現性が得られている。今回の検討では、非誘導体化法に感度不足は認められず、誘導体化法との測定再現性の比較でも、特に遜色無く測定できていた。また、検討に用いた移動相については、その組成にかかわらず良好な分析であった。

イオン強度情報は、内部標準物質による補正を行う前段階のデータであるため、この測定再現性は、装置内のイオン化の安定性を表す指標となる。アミノ酸標準液の希釈系列を血液濾紙濃度域に合わせ調整し、イオン強度の測定再現性から検討したところ、非誘導体化法においても安定したイオン化が行なわれていることが確認された(表 4)。

次に、試料の質量分析導入のタイミングに合わせて移動相の流速を変えるピークパーキング法により分析感度の改善を試みた結果を(表 5、表 6)に示す。

以上の基礎検討をもとに大阪府立母子保健総合医療センターで受理した実際の新生児スクリーニング 250 検体を非誘導体化タンデムマス法で測定し、現行 HPLC 法の分析結果と比較した。正常児からなるアミノ酸濃度の極めて低い集団においても相関係数 $r=0.894$ (Phe)、 $r=0.854$ (Met)、 $r=0.940$ (Leu+Ile) であり、新生児スクリーニングで特に重要となる 1 次カットオフ値付近では、 $r=0.990$ (Phe)、 $r=0.972$ (Met)、 $r=0.947$ (Leu+Ile) と極めて良好な再現性が得られ、現行アミノ酸分析を HPLC 法から非誘導体化タンデムマス法に変更することに問題は無いと思われた。

D. 考察

タンデムマスによる乾燥血液濾紙中アミノ酸分析は、非誘導体化法においても、顕著な感度低下を伴うことなく良好な再現性で定量可能であり、ブチルエステル化反応で懸念される問題を解消できる優れた方法と思われた。しかし、イオン化効率の低い一部のアミノ酸やアシルカルニチンで感度が不足する可能性や、検体中に存在する塩の濃度が、イオン化効率に影響を与える可能性も否定できない。今回の検討では、移動相の組成と分析精度に大きな違いが認められなかったが、対象物質の拡大にあたっては、引き続き検討の必要がある。われわれは、タンデムマス導入の第一段階として、現行スクリーニングが対象とするアミノ酸についてのみ、非誘導体化質量分析の基礎検討を行ったが、今後、対象物質を増やし、分析条件に変更を加えながら検討を続ける必要がある。

学会発表

1. 稲岡一考、竹島清美、中村しのぶ、入江明美、畝川謙太郎、宮城晶子、宮道徹、中山雅弘、和田芳直：大阪府における先天性代謝異常症スクリーニング検査-LC/MS 分析法導入の検討 - 第 30 回日本医用マススペクトル学会年会 大阪、2005 年
2. 稲岡一考、竹島清美、中村しのぶ、入江明美、畝川謙太郎、宮城晶子、宮道徹、中山雅弘、和田芳直：タンデムマスによる誘導体化を用いないアミノ酸分析 第 33 回日本マス・スクリーニング学会 久留米、2005 年

参考文献

1. 平成 16 年度厚生労働科学研究「わが国の 21 世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究」報告書(主任研究者：山口清次)、2005
2. Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, Tajima T, Yamaguchi S. Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. *J Chromatogr B*, 776 (2002) 39-48.
3. Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M. Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry : difficulties in practical discrimination. *J Chromatogr B*, 792 (2003) 63-72.
4. Nagy K, Takats Z, Pollreisz F, Szabo T, Vekey K. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17: 983-990

表1. アミノ酸標準液の測定同時再現性

アミノ酸名	誘導体化法				非誘導体化法			
	N	平均	S.D.	C.V.(%)	N	平均	S.D.	C.V.(%)
Ala	10	1.86	0.029	1.56	10	1.90	0.036	1.89
Arg	10	5.94	0.049	0.82	10	5.43	0.091	1.68
Asp	10	4.02	0.065	1.62	10	4.46	0.248	5.56
Leu	10	4.44	0.071	1.60	10	3.77	0.047	1.25
Met	10	3.92	0.084	2.14	10	4.13	0.081	1.96
Phe	10	3.40	0.051	1.50	10	4.12	0.101	2.45
Tyr	10	5.01	0.082	1.64	10	3.93	0.098	2.49
Val	10	5.28	0.261	4.94	10	2.21	0.026	1.18

分析法：MRM 移動相：50%アセトニトリル+0.02%ギ酸 流量：0.1ml/min

表2. アミノ酸標準乾燥血液濾紙の測定同時再現性

アミノ酸名	表示値	誘導体化法				非誘導体化法			
		N	平均	S.D.	C.V.(%)	N	平均	S.D.	C.V.(%)
Phe	4 mg/dl	5	6.48	0.128	1.94	5	4.25	0.140	3.29
	8 mg/dl	5	13.17	0.268	2.03	5	8.83	0.331	3.75
Met	4 mg/dl	5	4.22	0.096	2.28	5	4.44	0.198	4.47
	8 mg/dl	5	8.11	0.197	2.43	5	8.30	0.259	3.12
Leu	4 mg/dl	5	4.32	0.124	2.86	5	4.74	0.082	1.72
	8 mg/dl	5	8.52	0.165	1.94	5	9.54	0.299	3.13
Tyr	4 mg/dl	5	4.31	0.049	1.14	5	4.18	0.081	1.94
	8 mg/dl	5	8.97	0.106	1.18	5	9.52	0.393	4.13

分析法：MRM 移動相：50%アセトニトリル+0.02%ギ酸 流量：0.1ml/min

表 3. アミノ酸標準乾燥血液濾紙の測定同時再現性

アミノ酸名	表示値	誘導体化法				非誘導体化法			
		N	平均	S.D.	C.V.(%)	N	平均	S.D.	C.V.(%)
Phe	4 mg/dl	5	5.85	0.184	3.15	5	3.98	0.085	2.14
	8 mg/dl	5	11.85	0.402	3.39	5	8.09	0.369	4.56
Met	4 mg/dl	5	3.89	0.091	2.29	5	3.92	0.094	2.45
	8 mg/dl	5	7.22	0.343	4.75	5	6.93	0.221	3.18
Leu	4 mg/dl	5	4.04	0.160	3.96	5	4.19	0.122	2.91
	8 mg/dl	5	7.28	0.166	2.28	5	7.29	0.109	1.50
Tyr	4 mg/dl	5	4.89	0.256	5.24	5	3.93	0.101	2.58
	8 mg/dl	5	9.25	0.486	5.26	5	8.73	0.431	4.94

分析法 : MRM 移動相 : 90%メタノール+0.02%ギ酸 流量 : 0.1ml/min

表 4. イオン強度で見た測定同時再現性 (アミノ酸標準血液濾紙)

アミノ酸	Q1 Mass (amu)	Q2 Mass (amu)	希釈倍数	N	Intensity (CPS)		
					平均	標準偏差	C.V.(%)
Phe	168	120	1.00000	5	653690	22408.0	3.428
			0.50000		545974	12500.9	2.290
			0.25000		415278	11032.9	2.657
			0.12500		322882	2528.5	0.783
			0.06250		216712	14362.6	6.628
			0.03125		148388	8729.7	5.883
			0.01563		96198	4840.6	5.032
			0.00782		61536	3176.9	5.163
Met	150	104	1.00000	5	138420	6080.0	4.392
			0.50000		117796	3886.2	3.299
			0.25000		91616	1724.2	1.882
			0.12500		73768	600.1	0.814
			0.06250		50078	3105.6	6.202
			0.03125		35344	1745.9	4.940
			0.01563		23604	1153.4	4.886
			0.00782		15828	660.9	4.176
Leu	132	86	1.00000	5	1643300	52058.4	3.168
			0.50000		1444360	36872.6	2.553
			0.25000		1187760	16431.1	1.383
			0.12500		940434	11673.6	1.241
			0.06250		677382	27834.1	4.109
			0.03125		482036	21682.1	4.498
			0.01563		316800	17184.2	5.424
			0.00782		207918	8894.7	4.278
Tyr	182	165	1.00000	5	48106	1625.7	3.379
			0.50000		39975	1181.3	2.955
			0.25000		30383	610.0	2.010
			0.12500		23425	1029.8	4.386
			0.06250		15800	928.3	5.875
			0.03125		10828	583.7	5.390
			0.01563		7111	373.8	5.257
			0.00782		4566	215.6	4.722

表5. 非誘導体化法によるアミノ酸標準液測定同時再現性

分析法:MRM 移動相:75%アセトニトリル+0.05%ギ酸 流速:0.085~0.500ml/min

質量分析計条件

Curtain Gas :10.0

Temperature : 300°C

Ion Source Gas1 : 40.0

Collision Gas : 3

Ion Spray Voltage :5000.0V

Ion Source Gas2 : 60.0

	N	平均	S.D.	C.V.(%)	最大値	最小値	幅	幅(%)
Phe	10	1.531	0.035	2.286	1.579	1.484	0.095	6.201
Met	10	1.453	0.025	1.748	1.498	1.400	0.098	6.730
Leu+Ile	10	2.662	0.032	1.195	2.711	2.616	0.094	3.515
Tyr	10	1.364	0.024	1.785	1.407	1.333	0.075	5.471
Val	10	0.886	0.011	1.209	0.901	0.872	0.029	3.268

表6. 非誘導体化法によるアミノ酸標準血液濾紙測定同時再現性

分析法:MRM 移動相:75%アセトニトリル+0.05%ギ酸 流速:0.085~0.500ml/min

質量分析計条件

Curtain Gas :10.0

Temperature : 300°C

Ion Source Gas1 : 40.0

Collision Gas : 3

Ion Spray Voltage :5000.0V

Ion Source Gas2 : 60.0

		N	平均	S.D.	C.V.(%)	最大値	最小値	幅	幅(%)
Phe	4mg/dl	10	3.775	0.2209	5.852	4.117	3.485	0.632	16.741
	8 mg/dl	10	7.715	0.2334	3.025	8.133	7.418	0.715	9.272
Met	4 mg/dl	10	4.433	0.2024	4.567	4.630	4.040	0.591	13.324
	8 mg/dl	10	8.158	0.3297	4.041	8.633	7.707	0.926	11.351
Leu+Ile	4 mg/dl	10	4.199	0.0611	1.454	4.295	4.103	0.192	4.578
	8 mg/dl	10	7.929	0.3543	4.468	8.352	7.369	0.983	12.404
	5.5 mg/dl	4	5.072	0.0551	1.087	5.152	5.031	0.121	2.380
Tyr	2.8 mg/dl	4	3.529	0.1470	4.165	3.708	3.366	0.342	9.678
Val	7.2 mg/dl	4	7.769	0.2686	3.457	8.149	7.516	0.633	8.150

図1. 非誘導体化タンデムマス法と HPLC 法の相関

新生児スクリーニング初回検査検体測定値の比較

初検検体	Phe (mg/dl)	Met (mg/dl)	Leu+ Ile (mg/dl)
HPLC法	0.816±0.180	0.398±0.084	2.015±0.501
MS/MS(MRM)法	0.750±0.144	0.411±0.085	2.150±0.488
相関係数(r)	0.894	0.854	0.940

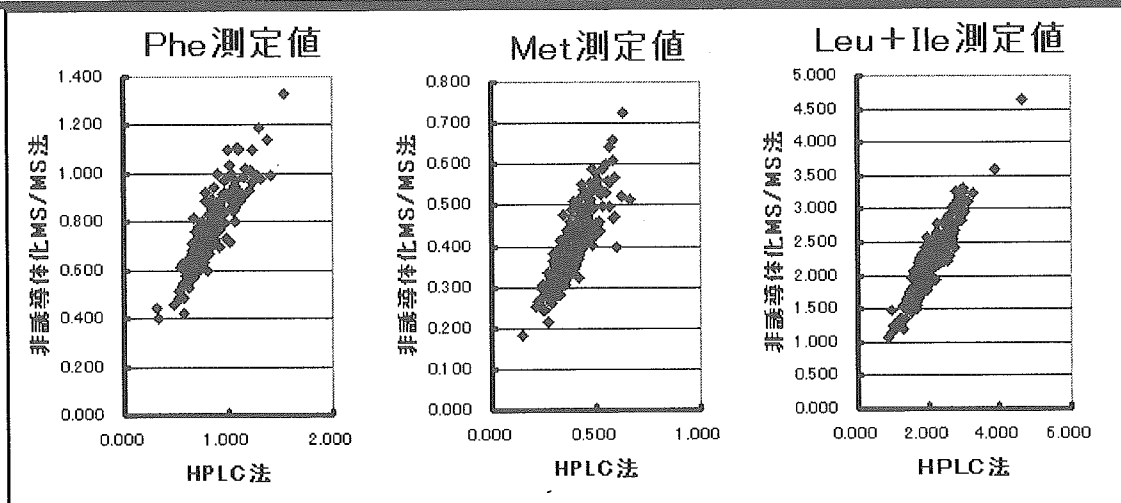
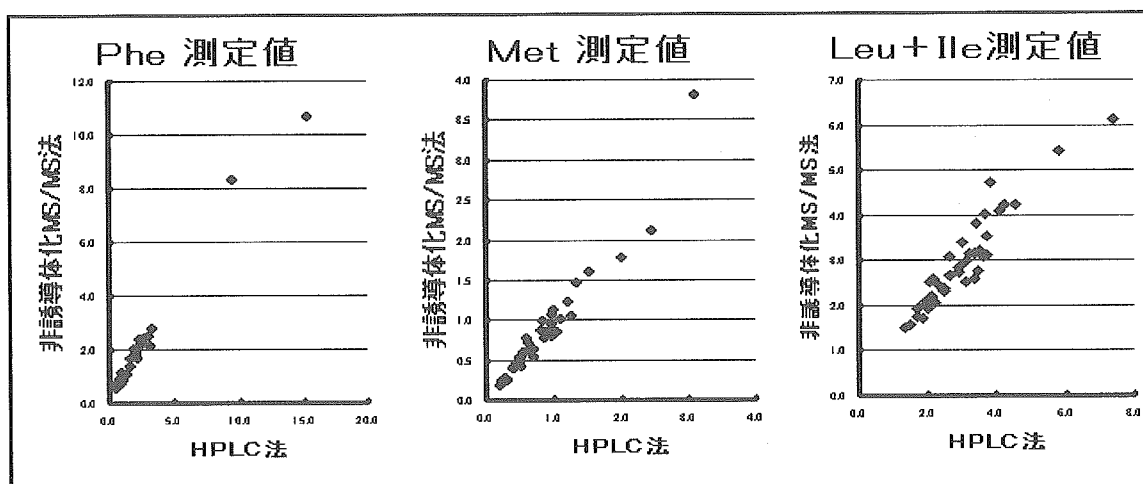


図2. 非誘導体化タンデムマス法と HPLC 法の相関

新生児スクリーニング再採血対象検体の測定値比較

初検検体	Phe (mg/dl)	Met (mg/dl)	Leu+ Ile (mg/dl)
相関係数(r)	0.990	0.972	0.947



Ⅱ. 分担研究報告書

3. 現行マスキングの問題解決に関する研究

分担研究者 原田正平（国立成育医療センター研究所室長）

分担研究課題

現行マスキリーニングの問題解決に関する研究

分担研究者 原田正平 (国立成育医療センター研究所室長)

研究要旨

1977 (昭和 52) 年の新生児マスキリーニング (MS) の全国実施以来、旧厚生省、厚生労働省の研究班は、その研究成果を還元するため種々の提言を行い、1990 (平成 2) 年以降は、MS の問題点を抽出し、改善方法を繰り返し提言してきた。その主眼点は 1) 精度管理・精度保証体制の確立、2) 長期追跡などの情報管理体制の確立、3) 残存濾紙血の保存・再利用などの倫理的諸問題であり、これらの問題点を継続的に監視し改善するには、専任の組織体、すなわち”Center for Mass-screening”の設立が求められる。本年度の研究では、外部精度管理が行われなくなった場合の便益損失が推計され、日本全国では最低でも、年間約 8 千万円から 1 億円の損失と計算された。生命保険の加入率は前年度調査より向上したが、問題は残っていた。長期追跡調査では先天性甲状腺機能低下症とメープルシロップ尿症の予後が良好なことが示された。しかし、MS の基本となる初回濾紙採血の採血漏れや投函忘れが半数以上の検査機関で経験されるなど、専任組織体による継続的監視の必要性が改めて示唆された。新しい外部精度管理方法であるブラインドサンプルの試験的導入を開始したことから、次年度に成果が期待される。

研究協力者

掛江 直子 (国立成育医療センター研究所
成育保健政策科学研究室長)

新宅 治夫 (大阪市立大学大学院医学研究科
発達小児医学 助教授)

大和田 操 (女子栄養大学 教授)

佐々木 望 (埼玉医科大学小児科 教授)

梅橋 豊藏 (熊本保健科学大学 教授)

鈴木恵美子 ((財) 日本公衆衛生協会スクリー
ニング精度管理センター 主任)

A. 研究目的

平成 17 年度は平成 16 年度に検討を始めた諸問題のうち、生命保険加入拒否、長期的 QOL 調査、ブラインドサンプルによる新しい外部精度管理の調査結果の報告に加え、新たに緊急の課題となった、採血漏れを来すよう

な状況の調査を行い、それぞれ具体的な解決策の提示を目的として研究を行った。同時に、過去 30 年あまりの旧厚生省、厚生労働省の研究報告書における提言の実効性を高めるための方法についても検討した。

B. 研究方法

1) 現行マスキリーニングの問題点の継続的な監視と改善のためのシステムについて

わが国における新生児マスキリーニング (MS) の仕組みについて、その法的根拠などを資料を基に検討を行った。

国立保健医療科学院のホームページにある「厚生労働省の研究成果」から 1975 (昭和 50) 年度以降の MS 事業関連の研究報告書を全てダウンロードし、その内容を解析した。

2) 外部精度管理が行われなくなった場合の

新生児マススクリーニングでの「見逃し」数の試算とその社会的費用について

日本公衆衛生協会スクリーニング精度管理センターの記録から、1977（昭和 52）年 11 月からの先天性代謝異常症（当初 5 疾患、1994 年度からは 4 疾患）、1985（昭和 60）年度からの先天性甲状腺機能低下症（CH）、1995（平成 7）年度からの副腎過形成症（CAH）、それぞれを対象とした外部精度検体の、スクリーニング検査機関での「見逃し数」、1991（平成 3）年度からの「記入の誤り数」について解析した。

見逃しの社会的費用は、外部精度管理が行われないと仮定して、わが国の MS で発見できなくなる CH 症例数を推定し、その発生による損失を、平成 5 年度厚生省心身障害研究での、1 患者発見あたりの純便益 1,613 万円という推計値を参考として計算した。

3) フェニルケトン尿症（PKU）をもつ子どもの保険加入状況調査（平成 17 年度調査）

PKU 親の会の協力を得て、平成 16 年度に引き続き、簡易保険観入状況についてアンケート調査を行った。そのうち学資保険、養老保険への加入状況のその後の動向を把握し、問題点を再検討した。

4) 新生児マススクリーニングで発見されたメープルシロップ尿症（MSUD）の長期追跡

母子愛育会総合母子保健センターでの特殊ミルク事業の一環として行ってきた、MS 追跡調査対象例の中で、MSUD 19 例について、治療を担当している小児科医に対し、治療状況のアンケート調査を行い、その結果を分析した。

5) マススクリーニングで発見された先天性甲状腺機能低下症患者の長期的 QOL 調査

2005（平成 17）年 3 月に選定した全国 1613 施設に対し第一次調査を実施し、113 施設（中学生 232 名、高校生 197 名、高等学校卒業以上 234 名を管理）から回答が得られ、それら

施設に対し第二次調査を順次施行した。

最終的に回答を得られたのは 132 名で、内訳は中学生 46 名、高校生 41 名、高等学校卒業以上 45 名であった。

6) 採血漏れをきたすような状況の調査結果について

全国の MS 検査機関を対象にアンケートを実施し 49 検査施設中 47 検査施設から回答を得た。実態調査は過去 5 年の期間中という前提をおき、回答が「あった」の場合においては、その件数についても報告を依頼した。未熟児については過去 5 年間の集計が困難な場合は平成 16 年度分のみで可とした。

7) わが国のスクリーニング外部精度管理システムへのブラインドサンプルを導入の検討

まず、外部精度管理検体と解らぬような、「ブラインドサンプル」を作製し、仮の母親名・児の生年月日等を記入した血液濾紙を、産科・採血機関より検査施設に送付する。ついで、検査施設が、検査を終了し、産科・採血機関に結果報告を行った時に、産科・採血機関からそれが「ブラインドサンプル」と告げられる。このような手順で、試験的に 3 県について行い、うち 1 県では完全なブラインドの形で行った。

C. 研究結果

1) 現行マススクリーニングの問題点の継続的な監視と改善のためのシステムについて

わが国の MS は、1977（昭和 52）年 7 月 12 日に旧厚生省児童家庭局長から各都道府県知事・指定都市市長宛の「先天性代謝異常検査等の実施について」が通知されることで、全国的に公的に始められたが、母子保健法がその背景として考えられた。

旧厚生省、厚生労働省の MS に関する研究班は、その研究成果を還元するため種々の提言を行い、1990（平成 2）年以降は、MS の問題点を抽出し、改善方法を繰り返し提言してきた。その主眼点は 1) 精度管理・制度保

証体制の確立、2) 長期追跡などの情報管理体制の確立、3) 残存濾紙血の保存・再利用などの倫理的諸問題であった。

2) 外部精度管理が行われなくなった場合の新生児マススクリーニングでの「見逃し」数の試算とその社会的費用について

1977年から2006年1月までの外部精度管理検体の見逃し数は、精度管理が本格的に始まった1978年度が最も多く、年間164検体であった。1981年度以降は減少し、ここ10年間は年間10検体以下(総検体数が約6,000検体)、見逃し率は0.2%以下となっている。

一方で、検査機関で測定結果などを所定の用紙に記入して外部精度管理機関に返送するにあたり、「記入の誤り」が見られており、1991年度以降では、送付検体数に対する誤記入率は0.22%であった。

外部精度管理が行われない場合のCHの未発見数を、米国・仏国の報告と同様と仮定し、スクリーニング総数約14万人に対し1人程度の発生率とすると、年間出生数約100万人に対しCHだけで約5～6人の超過未発見例の発生が推定される。1患者発見あたり1,613万円の純便益が失われるとして、日本全国では年間約8千万円から1億円の損失と計算された。

3) フェニルケトン尿症(PKU)をもつ子どもの保険加入状況調査(平成17年度調査)

有効回答数は173通、有効回答率は52%であった。調査結果は前回と概ね同じ傾向であったが、現在保険に加入している家族は117家族(68%)あり、前回と比べ8ポイント多かった。平成15年の改正以前には加入を拒否された3家族については、当該保険への加入を再度試み、病名を告知して加入できていた。

4) 新生児マススクリーニングで発見されたメープルシロップ尿症(MSUD)の長期追跡

19例の経過を追跡調査し、6例に発達遅滞を認め、その内の6例が古典型であったが、

古典型でも4例には発達遅滞を認めなかった。

また、経過中の急性増悪は年齢と共に軽減するが、年長例でも治療乳摂取を継続している例が大部分で、食事療法の重要性が各例に浸透しているものと思われた。早期発見された本症の予後が改善傾向にあることが本調査で明らかにされた。

5) マススクリーニングで発見された先天性甲状腺機能低下症患者の長期的QOL調査

「現在の管理・服薬状況、就業・保険加入状況、学歴・結婚等に関する調査」の対象は45名で、成人患者の体格はほぼ正常で服薬状況は比較的良好であった。結婚・就業・学歴・健康保険の加入等についても特に一定の傾向は認めなかった。

現在でも小児科関連の担当科で管理している患者が7割以上を占めていた。

治療費に負担を感じている患者が、「少し負担」を含めると6割以上を占め、病名を告知して生命保険に申し込んだ場合半数の例で加入を断られていた。

「生活の満足度に関する調査」の対象は中学生42名、高校生32名、高等学校卒業以上37名で、どの年齢においても健常人と比較してQOLの低下は認められなかった。

6) 採血漏れをきたすような状況の調査結果について

検査の実施日が児の日齢22以降を採血漏れ・検査漏れと定義し、解析を行った。

未熟児については82.5%の検査施設が経験しており、一部には未熟児の2回採血ガイドラインの不徹底が明らかであった。

医療機関における採血忘れや投函忘れを検査施設の過半数となる57.5%および55.0%が経験していた。

検体紛失は検査施設の45.0%が経験しているが、その原因は搬送過程によるものから原因不明のものまで様々である。

検体搬送法は、一部の直接集荷の検査施設を除き殆どが郵送であるが、検体紛失を経験

した 18 施設のうち 13 施設は郵送によるトラブルで、その平均件数は 5 年間で 3.7 件であった。

再採血が不実施となっている大半は NICU 例と思われるが、77.5%の検査施設が経験していた。件数が 1 件から 312 件と大きいのは、自治体や医療機関における精査体制の違いが影響しているのではないかと考えられた。

7) わが国のスクリーニング外部精度管理システムへのブラインドサンプルを導入の検討
本年度の研究で、ブラインドと解らぬ検体が作製しうることを確認した。

①当センターが異常のブラインドを送付、
②検査施設の顧問医が異常と正常のブラインドを送付、③埼玉・千葉・神奈川県で、特定医師に依頼し、当センター作製ブラインドに医師が仮の母親名を付し、その県の検査施設に郵送し、その返事を見て検査結果を把握するという段階である。

D. 考察

前回、平成 16 年度の研究で現行 MS の問題点として浮かび上がったのは、一般財源化後も、スクリーニングの質改善を保證するシステムが、多くの地域で確立していないことであった。その際、地域のマネジメントサイクルが確立していること、従来、活動してきた関連学会、厚生労働省研究班だけではなく、中央監視機関(例えば、国立成育医療センター)が、Check-Action の部分に関与し、さらには MS の実施主体である各都道府県・政令都市の認識を変えること、地域においてもマネジメントサイクルを形成し、「スクリーニング全体の精度保証体制」を構築すべきことを提言した。

本年度の研究で、過去 30 年を超える旧厚生省、厚生労働省の MS に関する研究班の活動を再検証したところ、その主眼点となってきた、1) 精度管理・制度保証体制の確立、2) 長期追跡などの情報管理体制の確立、3) 残存濾紙血の保存・再利用などの倫理的諸問題など問題点

を継続的に監視し改善するには、専任の組織体、すなわち”Center for Mass-screening”の設立が求められると結論された。

同時に、現在危機的状況にある精度管理事業の崩壊による日本全体での損失を推計したところ、年間約 8 千万円から 1 億円の損失発生と推計された。このことは、精度管理事業費を国が全額負担したとしても、それを超える便益があることを意味し、MS 事業全体の精度保証を国として行うためにも、精度管理事業に国の直接的関与が望ましいことを示唆するものと考えられた。

この二つの研究から、”Center for Mass-screening”には、精度管理事業を統括する機能を持たせることが合理的であることが示された。

現在わが国では「耐震偽装問題」に端を発し、「規制緩和」や「行財政改革」を行いつつも、子どもとその家族が安全に安心して暮らせる社会を、いかに構築するかが大きな問題となっている。

こうした「安全・安心」のためには、事後の検証システム、つまり日本全国どこに住んでいても、標準的な制度による恩恵を受けられることを保証するシステムが、確立運営されることが求められている。

このことは、MS 事業では、地域におけるマネジメントサイクルを形成し、「スクリーニング全体の精度保証体制」を構築することであり、それを中央監視する機関、すなわち”Center for Mass-screening”の設立である。

本年度の具体的な研究成果としては、MS で発見された先天性代謝異常症の長期追跡調査により、CH の長期予後が著しく改善され、MS UD の重症型では予想以上に予後改善がなされていることが明らかとなった。

しかし、CH 患者の長期的 QOL 調査では、成人後の管理体制及び医療補助について検討すべきことも明らかとなり、CH を含んだキャリアオーバー例への医療施策のあり方について、

引き続き調査研究が必要である。

生命保険加入といった社会的差別については、PKU患者会調査とCH患者の長期的QOL調査は同様の結果であり、加入拡大実施の監視を行うとともに、今後一層、民間の保険会社にも患者の病状と健康状態の理解を広める事が重要と考えられた。

新しい外部精度管理の手法としてのブラインドサンプル導入は、限定した地方自治体でのパイロット研究が開始され、次年度での成果が期待される段階である。こうした新規研究も精度管理事業の一環であり、高度の研究的機能を持ち、かつ成育医療と密接に関連している高度専門医療センター（例：国立成育医療センター）が、精度管理事業も統括した”Center for Mass-screening”としての役割を果たすべき事が望ましい。

E. 結論

過去30年を超える旧厚生省、厚生労働省のMSに関する研究班の活動を再検証したところ、その主眼点となってきたものは、1) 精度管理・制度保証体制の確立、2) 長期追跡などの情報管理体制の確立、3) 残存濾紙血の保存・再利用などの倫理的諸問題であった。これらの問題点を継続的に監視し改善するには、専任の組織体、すなわち”Center for Mass-screening”の設立が求められると結論された。

同時に、現在危機的状況にある精度管理事業の崩壊した場合の、日本全体での損失を推計したところ、年間約8千万円から1億円の損失発生と計算され、”Center for Mass-screening”には、精度管理事業を統括する機能を持たせることが合理的であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原田正平：周産期のヨード含有消毒剤使用が胎児・新生児の甲状腺機能に及ぼす影響

周産期学シンポジウム 23巻87～91、2005

原田正平：マスキングで発見される甲状腺機能障害の新しい診療手順 周産期医学 35巻9号1239～1243、2005

原田正平：甲状腺機能異常を疑ったときの検査の進め方 小児内科 37巻増刊号412～416、2005

原田正平：新生児内分泌疾患の頻度、周産期医学 35巻12号1587～1590、2005

2. 学会発表

鈴木恵美子、渡辺倫子、成瀬浩、平原史樹、山上祐次、望月孝一、原田正平

わが国のスクリーニング外部精度管理システムへのブラインドサンプル導入の検討. 第33回日本マス・スクリーニング学会、10月、2005年（久留米）

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究課題：現行マスキリーニングの問題解決に関する研究

現行マスキリーニングの問題点の継続的な監視と改善のためのシステムについて

研究要旨

1977（昭和 52）年の新生児マスキリーニング（MS）の全国実施以来、旧厚生省、厚生労働省の研究班は、その研究成果を還元するため種々の提言を行ってきた。とくに 1990（平成 2）年以降は、MS の問題点を抽出し、その改善方法を繰り返し提言してきた。その主眼点は 1）精度管理・制度保証体制の確立、2）スクリーニング陽性者の長期追跡などの情報管理体制の確立、3）残存濾紙血の保存・再利用や新しい MS 対象疾患の選定方法などの倫理的諸問題であったが、繰り返し提言された後の実効性が必ずしも確認されていなかった。これらの問題点を継続的に監視し改善することで「健全な次世代の育成」につなげるためには、専任の組織体、すなわち” Center for Mass-screening” の設立が求められる。

研究協力者

原田 正平（国立成育医療センター研究所）
加藤 忠明（国立成育医療センター研究所）
掛江 直子（国立成育医療センター研究所）

A. 研究目的

1977（昭和 52）年に新生児マスキリーニング（MS）が全国実施されるにあたり、当時の厚生省研究班が事前に調査研究を行い、全国各地においても標準的な MS が行われるよう濾紙採血手順、検体の送付システム、疾患毎の検査方法、その判定基準、精密検査方法などが提示された。

しかし、その後の研究班による実態調査により、実施主体ごとに MS の様々な要素が異なっていること、その結果、MS 成績に地域差が生じ、国民に不利益を与えている恐れのあることが明らかとなっている。

このような MS の問題点を抽出し、それを改善し、地域差解消、標準化を進めるためには、精度管理や情報管理といった継続的な監視と改善のためのシステムが必要であることが、繰り返し提言されてきた。

本研究では、これまで 30 年余りにわたる提言の実効性と、「継続的な監視と改善のためのシス

テム」自身を継続的に構築するための方法について検討した。

B. 研究方法

1. 日本における MS の法的根拠

わが国におけるスクリーニングの仕組みについて、とくにその法的根拠と考えられている点について文献的検討を行った。

2. 国立保健医療科学院のホームページにある「厚生労働省の研究成果」からは「厚生省心身障害研究報告書データベース（昭和 50～平成 9 年度）」（http://webabst.niph.go.jp/content/shinshin/ssh_index.html）と厚生労働科学研究データベース（平成 9～16 年度）（<http://mhlw-grants.niph.go.jp/>）を利用して過去の研究報告書を入手することが可能である。そこで 1975（昭和 50）年度以降の MS 事業関連の研究報告書を全てダウンロードし、その内容を解析した。

C. 結果

1. 日本における MS の法的根拠

わが国の MS は、1977（昭和 52）年 7 月 12 日に旧厚生省児童家庭局長から各都道府県知事・指定都市市長宛の「先天性代謝異常検査

等の実施について」が通知されることで、全国的に公的に始められた。

その通知には「昭和 52 年度から別紙要綱により新生児に対し血液によるマス・スクリーニング検査を実施することとし、従来から行われている小児慢性特定疾患治療研究事業による治療研究に係わる医療給付とあいまって、早期発見早期治療の徹底を期することとしたので、これが実施にあたっては遺漏なきを期せられたい」と明記されており（日本マススクリーニング学会誌 第 8 巻 Supplement 2:93, 1998）、小児慢性特定疾患治療研究事業（以下、小慢事業）と先天性代謝異常等検査事業（以下、MS 事業）は車の両輪として認識されていた。しかし、一方の小慢事業が 2005 年 4 月より児童福祉法第 21 条の 9 の 2 として法制化されたにもかかわらず、MS 事業については 2001（平成 13）年度の検査費の一般財源化に伴い、局長通知そのものが廃止され現在に至っている。

わが国の MS 事業の実施主体は、当初より都道府県及び指定都市とされており、実際上は、各自治体で定めている「先天性代謝異常健診実施要綱」に基づいて行われている。

例えば「東京都先天性代謝異常健診実施要綱」はその最初に「フェニルケトン尿症等の先天性代謝異常は、放置すると精神薄弱などの症状をきたすので、母子保健法第 5 条及び第 13 条に基づき新生児について血液によるマス・スクリーニング検査を行い、異常を早期に発見することにより、後の治療とあいまって障害の発生を防止することを目的とする。」と明記されている。

この精神をたどれば、日本国憲法第 25 条「すべて国民は、健康で文化的な最低限度の生活を営む権利を有する。2 国は、すべての生活部面について、社会福祉、社会保障及び公衆衛生の向上及び増進に努めなければならない。」に基づいており、母子保健法（国及び地方公共団体の責務）「第 5 条 国及び地方公共団体は、母性並びに乳児及び幼児の健康の保持

及び増進に努めなければならない。」、「第 13 条 前条の健康診査のほか、市町村は、必要に応じ、妊産婦又は乳児若しくは幼児に対して、健康診査を行い、又は健康診査を受けることを勧奨しなければならない。」はその具体像となっている。

2. 各実施主体におけるスクリーニングの仕組みと、それを維持するための旧厚生省、厚生労働省の研究班の調査研究

各実施主体におけるスクリーニングの仕組みは図 1 に示すように、都道府県・政令指定都市とスクリーニング検査機関が主な役割を果たしている。

1975 年以降の旧厚生省、厚生労働省の研究費による研究報告書の中で、この両者を調査対象として、スクリーニングの実態を検討した研究をまとめたのが図 2 である。

1996、1997 年度にはインフォームドコンセント、プライバシー保護、スクリーニングの法的義務づけ、残存濾紙の目的外使用といった問題について、図 3 に示した 2 つの報告書が書かれているが、その後は調査研究が一時中断し、2001～2003 年度に「検査済み乾燥濾紙血液の倫理面に配慮した管理・有効利用法の研究」が行われた。

D. 考察

現行マススクリーニングは公式には、各実施主体の策定した「先天性代謝異常検査等実施要綱」に基づいて行われている。

しかし、その現状に関する「監視」システムは脆弱であり、十数年にわたる厚生労働省の研究班等による繰り返しの提言は、必ずしも成果を上げていない。

問題点を整理すると「精度管理（精度保証）」「情報管理（追跡調査）」「倫理的問題など」となり、これらの問題点を継続的に監視し改善することで「健全な次世代の育成」につなげるためには、専任の組織体、すなわ

ち” Center for Mass-screening” の設立が求められる。

E. 結論

わが国のマススクリーニングの問題点を整理すると、「精度管理（精度保証）」「情報管理（追跡調査）」「倫理的問題など」となり、これらの問題点を継続的に監視し改善することで「健全な次世代の育成」につなげるためには、専任の組織体、すなわち” Center for Mass-screening” の設立が求められる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原田正平：周産期のヨード含有消毒剤使用が胎

児・新生児の甲状腺機能に及ぼす影響

周産期学シンポジウム 23 巻 87～91、2005

原田正平：マススクリーニングで発見される甲状腺機能障害の新しい診療手順 周産期医学 35 巻 9 号 1239～1243、2005

原田正平：甲状腺機能異常を疑ったときの検査の進め方 小児内科 37 巻増刊号 412～416、2005

原田正平：新生児内分泌疾患の頻度、周産期医学 35 巻 12 号 1587～1590、2005

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

