

て、重松らが提示しているカットオフ値（以下、参考値）¹⁾をベースに、各施設が独自に設定したり、指標を変更していることが確認された(表2)。

(3) 全施設の平均値、陽性率等の比較

全施設のすべての指標について、平均、標準偏差、陽性数、陽性率をまとめた(表3)。

(4) 各施設の特徴

ヒストグラムや陽性率に関して、各施設にはそれぞれ固有の特徴があり、前処理法や内標などの違いによる共通の傾向は認められなかった(表4)。

(5) 誘導体化の有無による特徴

誘導体化と非誘導体化の前処理法の違いによる各指標の特徴を検討した結果、特徴の認められた指標について以下に記載した(表5)。

- ① Leu+Ile濃度：非誘導体化による場合、誘導体化より高値傾向を示すと言われているが、両群の平均値に目立った違いは認められなかった。
- ② C5-DC濃度：参考値のカットオフ値では、誘導体化法 $0.2\mu\text{M}$ 、非誘導体化法 $0.25\mu\text{M}$ となっているが、非誘導体化施設の平均値が誘導体化施設の約2倍、特に施設B、Gで陽性率が高値であった。
- ③ C14:1陽性率：前処理法を問わず、カットオフ値 $0.4\mu\text{M}$ が全国的に用いられているが、誘導体化法施設の陽性率は、非誘導体化法施設の5.48倍であった。
- ④ C3/C2比の99.9%タイル：比の指標は施設間差があまり生じないと考えられるが、99.9%タイルを比較すると、施設Jの99.9%タイルは施設Cの1.64倍であった。

(6) 各施設の陽性率、精査率の比較

各施設の疾患ごとの陽性率、精査率を集計した結果（検体数の少ない施設Cを比較から除く）、施設別の陽性率の平均は最低0.206%（施設A）から1.055%（施設D）であった(表6)。また、精査率は、最低0.022%（施設A）から最高0.116%（施設J）であった。疾患別には、カルニチントランスポーター異常症(0.143%)、イソ吉草酸血症(0.129%)の陽性率が高かった。また、精査率は、複合カルボキシラーゼ欠損症など

(0.013%)、プロピオン酸・メチルマロン酸血症、極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(VLCAD)(0.009%)などが高い傾向であった。

考 察

マス・スクリーニングにおいて設定するカットオフ値は、基礎検討段階において、正常群の測定データを集積した上で、統計学的手法により、例えばM+3SDや99%タイルなどと設定し、陽性率、感度、特異度などの検査精度を確認する必要がある^{8,9)}。特に、タンデムマス・スクリーニング開始する際には、前もって各指標のカットオフ値の適正さを十分検討することが重要である。

現在、タンデムマス・スクリーニングを実施している施設においては、重松らがタンデムマス・スクリーニングの発見患者の分析値をもとに設定した参考値に、各施設の条件で得られた測定値分布を踏まえて、これに修正を加えることでカットオフ値の適正性を確保してきた。

しかしながら、これまで、各施設ごとの指標の正常値の分布等を集約して、施設間差について検討したことがなく、今回共通のツールを用いて、初めてこれらの比較検討が可能となった。その結果、前処理における誘導体化の有無、測定機器の違い、用いている内標の違いなどから、多くの指標において異なった傾向が認められた。さらに、同じカットオフ値を用いても、検査の陽性率が異なる指標もあり、カットオフ値を標準化して、統一したカットオフ値を用いることが必ずしも適当ではない場合があることが確認された。

このことは、カットオフ値の適正性を確認せずにスクリーニングを行った場合には、偽陽性、偽陰性の双方を増大させる危険性があることを意味しており、その場合、不要な再採血や患者の見逃しなどによりタンデムマス・スクリーニングの信頼性を大きく損なう原因となりうる。

なお、各施設の陽性率における全施設の集計において、最も陽性率が高かったのはC5を指標としたイソ吉草酸血症疑いであったが、これは新生児に対しピボキシル系抗生剤を使用した

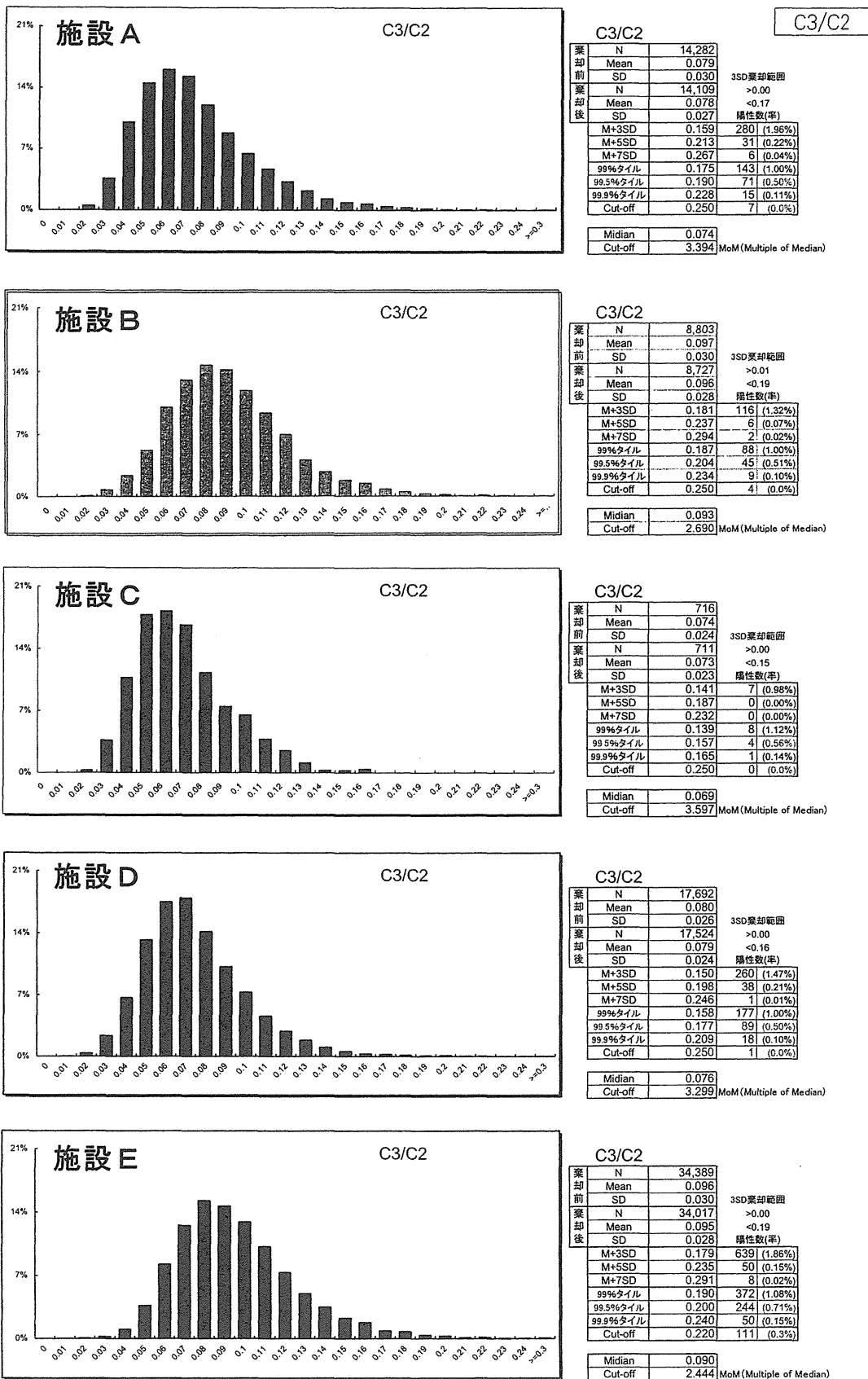


図1. 施設別ヒストグラム出力例 (1)

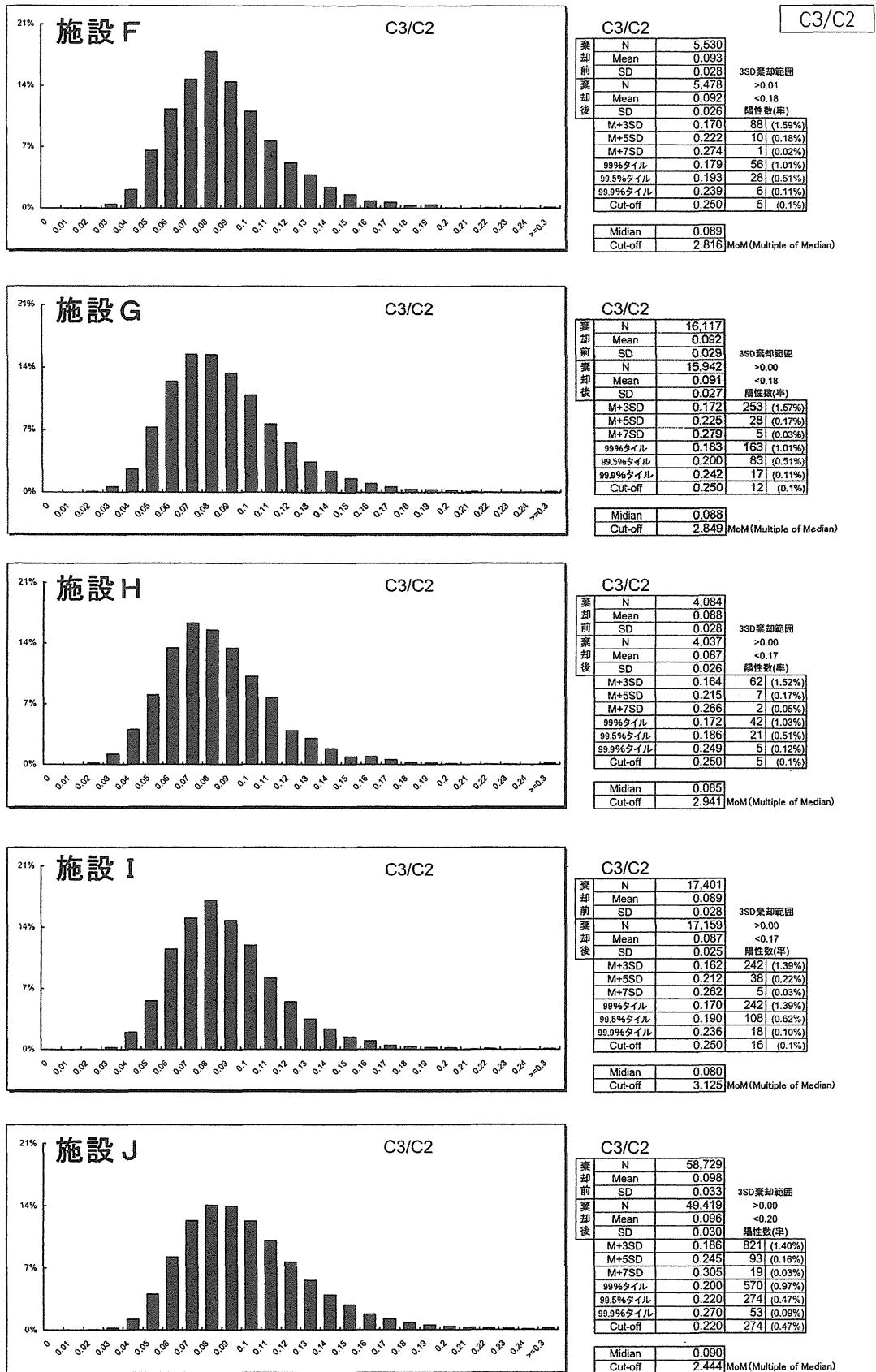


図1. 施設別ヒストグラム出力例 (2)

表2. 各施設のカットオフ値

疾患名	測定項目 ¹⁾	参考値(H施設)	A施設	B施設	C施設	D施設	E施設	F施設	G施設	I施設	J施設 ³⁾	
一次対象疾患	フェニルケトン尿症	Phe	180	120	180	121	120	121	150	100	180	130
	メープルシロップ尿症	Leu+Ile	350	350	350	350	350	305	350	350	350	350
		Val	250	250	250	250	250	250	280	250	250	360
	ホモシスチン尿症	Met	80	50	80	60	70	67	80	50	80	60
	シトルリン血症	Cit	100	100	100	100	100	65	60	100	50	85
	アルギニノコハク酸尿症	Cit	100	ASA>100	100	100	100	65	60	100	50	20
	プロピオン酸/メチルマロン酸血症	C3/C2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.22	0.25	0.25	0.25	0.22
		C3	3.6	- ²⁾	3.6	5	5	4.2	3.6	3.6	3.5	4.2
	イソ吉草酸血症	C5	1	1	1	1	1	0.7	1	1	1	1
	複合カルボキシラーゼ欠損症など	C5-OH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	グルタル酸尿症 I 型	C5-DC	0.25	0.25	0.25	0.3	0.25	0.15	0.25	0.25	0.25	0.25
	MCAD	C8	0.3	0.3	0.3	0.27	0.3	0.35	0.3	0.3	0.3	0.3
		C8/C10	1.4	<0.5	1	1.4	1	-	1.4	1.4	1	1.8
	VLCAD	C14:1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3
		C14:1/C2	0.013	-	0.013	0.013	0.013	-	0.013	0.013	0.013	0.02
LCHAD	C16-OH	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.2	0.1	0.1	0.05	0.08	
	C18:1OH	0.1	-	0.1	0.1	0.05	-	0.1	0.1	0.05	0.05	
CPT-1	C0/(C16+C18)	100	100	100	100	100	-	100	100	100	40	
二次対象疾患	シトルリン欠損症	Cit	38	40	36	40	40	65	-	38	50	85
		Cit/Ser	0.25	-	0.25	0.25	0.24	-	-	0.25	0.25	90
		Tyr	200	-	200	200	-	-	-	200	200	570
		Phe	120	-	120	120	-	121	-	120	120	130
		Met	80	-	80	80	-	67	-	80	80	80
	3-ケトチオラーゼ欠損症	C5:1	0.025	0.1	0.01	0.01	0.09	0.2	-	0.01	0.025	0.05
		C5-OH	0.6	-	1	1	1	1	-	1	0.6	1
	グルタル酸尿症 II 型	C8	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.35	-	0.3	0.3	0.3
		C10	0.4	0.5	0.4	0.5	0.5	0.35	-	0.4	0.4	0.4
		C12	0.4	-	0.4	0.4	-	-	-	0.4	0.4	0.4
		C10/C2	0.014	-	0.014	0.014	-	-	-	0.014	0.014	-
	CPT-2/TRANS	C16	3	8	3	6.5	3	7	-	3	3	3.5
		(C16+18:1)/C2	0.62	C18>3	0.62	0.62	0.5	-	-	0.62	0.62	0.6
	カルニチントランスポーター異常症	C0	<10	<9	<10	<9	<9	<8	-	<8	<10	<9

測定値の単位はμM。ただし、C3/C2などの比の場合は単位なし。

1)複数の測定項目がある場合はすべてがカットオフ値を超えた場合、陽性と判定。ただし、シトルリン欠損症はCit以外はどれかの項目がカットオフ値を超えた場合、陽性と判定。

2)指標として用いない場合

3)測定項目以外の指標を組み合わせて判定するとともに、生データをチェックして、明らかに疾患と思えないものは除外。

表3. 全施設のタンデムマス各指標の平均, 標準偏差, 陽性率一覽 (1)

(比以外の単位: μM)

施設名	Val					Leu+Ile				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	105.62	28.18	250	4	0.03%	179.45	40.48	350	9	0.06%
B	150.83	39	250	138	1.57%	168.70	44.09	300	68	0.77%
C	106.89	32.38	250	1	0.14%	154.27	32.73	300	0	0.00%
D	146.84	35.49	250	187	1.06%	180.55	42.47	350	36	0.20%
E	134.63	32.07	250	87	0.25%	179.00	36.18	305	76	0.22%
F	124.04	26.57	280	3	0.05%	154.13	27.44	350	1	0.02%
G	160.92	34.53	250	287	1.78%	150.84	36.57	350	18	0.11%
H	133.41	32.41	250	28	0.68%	173.89	43.44	350	13	0.32%
I	129.01	32.49	250	10	0.06%	183.62	47.41	350	15	0.09%
J	138.87	37.58	350	22	0.04%	156.76	40.65	360	43	0.07%

施設名	Met					Phe				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	18.73	4.44	50	1	0.01%	46.71	9.57	120	4	0.03%
B	20.76	5.52	80	1	0.01%	43.56	9.57	120	4	0.05%
C	23.19	9.08	60	2	0.28%	45.68	17.05	121	1	0.14%
D	21.79	5.28	70	2	0.01%	47.64	11.65	120	15	0.08%
E	25.08	6.06	67	3	0.01%	42.12	8.91	121	5	0.01%
F	24.28	5.05	80	0	0.00%	43.49	8.79	150	1	0.02%
G	19.81	5.32	50	6	0.04%	45.27	8.97	100	10	0.06%
H	18.33	4.72	80	0	0.00%	51.00	11.57	180	0	0.00%
I	23.94	5.93	80	1	0.01%	47.09	9.07	180	1	0.01%
J	17.53	6.51	60	11	0.02%	51.46	13.77	150	27	0.05%

施設名	Cit					C2				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	11.16	3.60	40	5	0.04%	29.24	10.00	50	535	3.76%
B	13.57	5.26	36	36	0.41%	20.71	6.28	50	17	0.19%
C	11.49	8.18	40	0	0.00%	25.83	7.66	50	8	1.12%
D	10.93	3.78	40	20	0.11%	20.81	6.19	50	30	0.17%
E	12.92	5.11	65	3	0.01%	25.78	8.12	50	448	1.30%
F	12.10	3.86	60	1	0.02%	19.18	5.46	50	3	0.05%
G	13.58	4.16	40	14	0.09%	18.14	5.72	40	14	0.09%
H	14.24	4.23	100	1	0.02%	16.18	5.13	30	68	1.66%
I	11.64	3.52	50	1	0.01%	24.31	6.59	50	73	0.42%
J	14.31	7.70	65	40	0.07%	13.87	5.10	45	18	0.03%

施設名	C3					C3/C2				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	2.20	0.86	5	142	1.00%	0.079	0.030	0.25	7	0.05%
B	1.96	0.76	3.6	263	2.99%	0.097	0.030	0.25	4	0.05%
C	1.84	0.65	5	0	0.00%	0.074	0.024	0.25	0	0.00%
D	1.62	0.64	5	23	0.13%	0.080	0.026	0.25	1	0.01%
E	2.42	0.99	4.2	1,615	4.70%	0.096	0.030	0.22	111	0.32%
F	1.74	0.62	3.6	69	1.25%	0.093	0.028	0.25	5	0.09%
G	1.62	0.61	3.6	157	0.97%	0.092	0.029	0.25	12	0.07%
H	1.39	0.52	3.6	19	0.46%	0.088	0.028	0.25	5	0.12%
I	2.11	0.78	3.5	922	5.30%	0.089	0.028	0.25	16	0.09%
J	1.30	0.52	4.2	51	0.09%	0.098	0.033	0.22	274	0.47%

施設名	C5					C5-DC				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	0.14	0.07	1	3	0.02%	0.04	0.02	0.20	1	0.01%
B	0.13	0.07	1	4	0.05%	0.10	0.04	0.25	24	0.27%
C	0.13	0.06	1	0	0.00%	0.09	0.03	0.30	1	0.14%
D	0.14	0.19	1	9	0.05%	0.05	0.02	0.25	2	0.01%
E	0.16	0.09	0.7	82	0.24%	0.03	0.01	0.15	10	0.03%
F	0.14	0.16	1	11	0.20%	0.03	0.01	0.25	0	0.00%
G	0.12	0.12	1	20	0.12%	0.10	0.03	0.25	46	0.29%
H	0.15	0.08	1	0	0.00%	0.10	0.03	0.25	3	0.07%
I	0.15	0.14	1	43	0.25%	0.05	0.02	0.25	1	0.01%
J	0.12	0.12	1	37	0.06%	0.09	0.03	0.20	162	0.28%

表3. 全施設のタンデムマス各指標の平均, 標準偏差, 陽性率一覽 (2)

(比以外の単位: μM)

施設名	C5-OH					C8				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	0.11	0.03	1	1	0.01%	0.06	0.03	0.3	5	0.04%
B	0.22	0.09	1	1	0.01%	0.10	0.03	0.3	5	0.06%
C	0.16	0.06	1	0	0.00%	0.09	0.03	0.27	2	0.28%
D	0.13	0.04	1	0	0.00%	0.08	0.03	0.3	14	0.08%
E	0.14	0.05	1	1	0.00%	0.07	0.03	0.35	8	0.02%
F	0.12	0.04	1	1	0.02%	0.07	0.03	0.3	6	0.11%
G	0.22	0.07	1	2	0.01%	0.12	0.03	0.3	9	0.06%
H	0.14	0.05	1	0	0.00%	0.05	0.02	0.3	2	0.05%
I	0.11	0.04	0.6	1	0.01%	0.08	0.04	0.3	48	0.28%
J	0.16	0.07	0.5	28	0.05%	0.06	0.03	0.3	33	0.06%

施設名	C10					C14:1				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	0.12	0.06	0.5	26	0.18%	0.08	0.04	0.4	4	0.03%
B	0.12	0.05	0.4	20	0.23%	0.05	0.04	0.4	2	0.02%
C	0.13	0.06	0.5	1	0.14%	0.09	0.04	0.4	1	0.14%
D	0.11	0.06	0.5	19	0.11%	0.10	0.06	0.4	32	0.18%
E	0.10	0.05	0.35	184	0.54%	0.11	0.05	0.4	22	0.06%
F	0.12	0.06	0.4	27	0.49%	0.11	0.04	0.4	10	0.18%
G	0.11	0.05	0.4	22	0.14%	0.08	0.03	0.4	4	0.02%
H	0.09	0.03	0.35	2	0.05%	0.08	0.03	0.4	0	0.00%
I	0.13	0.07	0.4	156	0.90%	0.10	0.04	0.4	33	0.19%
J	0.07	0.04	0.4	53	0.09%	0.06	0.03	0.3	74	0.13%

施設名	C16					C14:1/C2				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	2.54	0.86	8	0	0.00%	0.0030	0.0016	0.013	19	0.13%
B	2.40	0.87	8	1	0.01%	0.0025	0.0018	0.013	18	0.20%
C	2.54	0.86	6.5	0	0.00%	0.0034	0.0016	0.013	1	0.14%
D	2.45	0.85	6	22	0.12%	0.0052	0.0028	0.013	152	0.86%
E	2.47	0.87	7	8	0.02%	-	-	-	-	-
F	2.76	0.93	8	0	0.00%	0.0060	0.0021	0.013	45	0.81%
G	2.36	0.77	3	2,952	18.32%	0.0044	0.0017	0.013	43	0.27%
H	2.50	0.86	3.2	747	18.27%	0.0055	0.0020	0.013	24	0.59%
I	2.54	0.84	3	4,486	25.78%	0.0042	0.0017	0.013	48	0.28%
J	2.51	0.91	6	181	0.31%	0.0046	0.0022	0.02	65	0.11%

施設名	C0					C0/(C16+C18)				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	32.11	11.50	9	1	0.01%	10.35	4.81	100	0	0.00%
B	22.36	6.73	9	35	0.40%	7.84	3.18	100	0	0.00%
C	22.40	7.51	9	0	0.00%	7.33	2.91	100	0	0.00%
D	21.68	6.97	9	70	0.40%	7.53	3.24	100	0	0.00%
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	22.21	6.97	8	13	0.08%	8.03	4.13	100	0	0.00%
H	27.55	8.15	10	4	0.10%	8.98	4.10	100	0	0.00%
I	25.23	7.84	10	18	0.10%	8.38	3.37	100	0	0.00%
J	25.22	8.08	9	90	0.15%	8.66	4.18	40	89	0.15%

施設名	(C16+C18:1)/C2					C8/C10				
	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %	mean	SD	cutoff	陽性数 n	陽性率 %
A	0.162	0.045	0.62	0	0.00%	0.56	0.18	1.4	30	0.21%
B	0.118	0.039	0.62	2	0.02%	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	0.74	0.29	1.4	10	1.40%
D	0.180	0.045	0.5	5	0.03%	0.73	0.24	1	1,730	9.78%
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	0.60	0.14	1.4	2	0.04%
G	0.211	0.051	0.62	2	0.05%	-	-	-	-	-
H	0.250	0.065	0.63	3	0.07%	-	-	-	-	-
I	0.157	0.036	0.62	0	0.00%	-	-	-	-	-
J	0.299	0.084	0.65	125	0.21%	0.77	0.19	1.8	61	0.30%

表4. 各施設のタンデムマス指標の特徴

A施設	Valの低値と、C0, C2, C3の高値が特徴的(C2, C3はE施設も同じ傾向). C2はほかかに比べて、特にすそを引いている.
B施設	C5-DCの陽性率が高い。(参考値で推奨されている非誘導体化カットオフ「0.25」を用いている)
C施設	検体数が少ないため、ヒストグラムの形状がひずんでいるものがあった.
D施設	C3/C2の陽性率が低い(0.006%)
E施設	C3/C2の陽性率が高い(0.323%), C5の陽性率が高い.
F施設	SDが小さく、アミノ酸はほとんどカットオフ値を超えない傾向.
G施設	「Valの平均値 > Leu+Ileの平均値」は普通と逆の傾向(非誘導体化法ではLeu+Ileが高値になる)
	C5-DCの陽性率が高い。(参考値で推奨されている非誘導体化カットオフ「0.25」を用いている)
I施設	C5の陽性率が高い. C5-OHのヒストグラムがいびつ.
	平均, カットオフ値に差がないにもかかわらず, C8の陽性率が高い.
J施設	C3, C2は低値傾向. C3/C2は高値傾向で, 陽性率が高め.
	C14:1, C0/(C16+C18), C3/C2などで独自のカットオフ値を使用しており, 陽性率は高めの傾向.

H施設は参考値の施設であるため除く.

表5. 誘導体化の有無によるタンデムマス指標の特徴

①Leu+Ile濃度 (単位: μM)				②C5-DC濃度 (単位: μM)			
誘導体化	平均	非誘導体化	平均	誘導体化	平均	非誘導体化	平均
A施設	179.45	B施設	168.70	A施設	0.04	B施設	0.10
C施設	154.27	G施設	150.84	C施設	0.09	G施設	0.10
D施設	180.55	J施設	183.62	D施設	0.05	J施設	0.08
E施設	179.00	H施設	173.89	E施設	0.03	H施設	0.10
F施設	154.13			F施設	0.03		
I施設	183.63			I施設	0.05		
平均	171.84	平均	169.26	平均	0.05	平均	0.10

③C14:1陽性率				④C3/C2比の99.9%タイル			
誘導体化	陽性率	非誘導体化	陽性率	誘導体化	99.9%タイル	非誘導体化	99.9%タイル
A施設	0.03%	B施設	0.02%	A施設	0.228	B施設	0.234
C施設	0.14%	G施設	0.02%	C施設	0.165	G施設	0.242
D施設	0.18%	J施設	*	D施設	0.209	J施設	0.270
E施設	0.06%	H施設	0.00%	E施設	0.240	H施設	0.249
F施設	0.18%			F施設	0.239		
I施設	0.19%			I施設	0.236		
合計	0.11%	合計	0.02%	平均	0.220	平均	0.249

*J施設は別のカットオフ値を使用

場合、ピバロイルカルニチンをC5として検出してしまうためであると考えられる⁷⁾。このことは、C5陽性例においては、医療機関から抗生剤使用の有無を確認することが必要であるというだけでなく、一般的な新生児への抗生剤投与の危険性について、医療機関へ周知することが併せて重要であること⁸⁾を示すものであることにも触れておく。

今後、新たにタンデムマス・スクリーニングを開始する施設にあっては、厚生省研究班などで提示されたカットオフ値を参考値とする際に、

統計学的手法により、自施設の各指標の正常値の分布、平均値、SD等の特徴を把握したうえで、適切なカットオフ値を設定する必要がある。さらに、各施設においては、一定期間ごとに、正常値の分布を確認し、再採血率や精査率を確認するなどの内部精度管理を実施し、カットオフ値の適正さを継続的に確認することが重要である。

謝辞

この研究は、厚生労働科学研究費補助金 成

表6. 各施設の陽性率, 精査率

疾患名	全体 検査件数: 189,605				A施設 検査件数: 13,598				B施設 検査件数: 8,624				C施設 検査件数: 715				D施設 検査件数: 17,539			
	陽性		精査		陽性		精査		陽性		精査		陽性		精査		陽性		精査	
	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率
フェニルケトン尿症	85	0.045%	8	0.004%	3	0.022%	2(1)*	0.015%					1	0.140%			15	0.086%		
メーブルシロップ尿症	61	0.032%	5	0.003%					11	0.128%	1	0.012%					18	0.103%		
ホモシステイン尿症	34	0.018%	7	0.004%	1	0.007%			1	0.012%	1	0.012%	2	0.280%			2	0.011%		
シトルリン血症	31	0.016%	10	0.005%					1	0.012%	1	0.012%								
アルギニコハク酸尿症	6	0.003%	0	0.000%																
プロピオン酸/メチルマロン酸血症	124	0.065%	18	0.009%	6	0.044%											1	0.006%	1	0.006%
イソ吉草酸血症	245	0.129%	8	0.004%	5	0.037%			2	0.023%							9	0.051%		
複合カルボキシラーゼ欠損症など	39	0.021%	24	0.013%					1	0.012%	1	0.012%								
グルタル酸尿症 I 型	88	0.046%	3	0.002%	1	0.007%			8	0.093%			1	0.140%			2	0.011%		
MCAD	27	0.014%	8	0.004%	2	0.015%	1(1)	0.007%	1	0.012%			2	0.280%	2(2)	0.279%	2	0.011%		
VLCAD	141	0.074%	17	0.009%	4	0.029%			3	0.035%	2	0.023%	1	0.140%	1(1)	0.140%	28	0.160%	1	0.006%
LCHAD	5	0.003%	1	0.001%													5	0.029%		
CPT-1	100	0.053%	1	0.001%																
シトリン欠損症	33	0.017%	6	0.003%	5	0.037%			3	0.035%	1	0.012%	1	0.140%			20	0.114%	1	0.006%
3-ケトチオラーゼ欠損症	2	0.001%	3	0.002%																
グルタル酸尿症 II 型	21	0.011%	4	0.002%					1	0.012%	1	0.012%					10	0.057%		
CPT-2/TRANS	32	0.017%	4	0.002%					1	0.012%	1	0.012%					3	0.017%		
カルニチントランスポーター異常症	271	0.143%	6	0.003%	1	0.007%			49	0.568%							70	0.399%	1	0.006%
合計	1,345	0.709%	133	0.070%	28	0.206%	3	0.022%	82	0.951%	9	0.104%	8	1.119%	3	0.420%	185	1.055%	4	0.023%

疾患名	E施設 検査件数: 34,389				F施設 検査件数: 22,115				G施設 検査件数: 16,117				I施設 検査件数: 17,779				J施設 検査件数: 58,729				
	陽性		精査		陽性		精査		陽性		精査		陽性		精査		陽性		精査		
	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	数	率	
フェニルケトン尿症	5	0.015%	4	0.012%	3	0.014%			10	0.062%	2	0.012%	1	0.006%			47	0.080%			
メーブルシロップ尿症	11	0.032%	3	0.009%	4	0.018%			16	0.099%	1	0.006%	1	0.006%							
ホモシステイン尿症	3	0.009%	3	0.009%	4	0.018%	1	0.005%	6	0.037%	2	0.012%	1	0.006%			14	0.024%			
シトルリン血症	3	0.009%			1	0.005%	1	0.005%			1(1)	0.006%	1	0.006%	2	0.011%	25	0.043%	5	0.009%	
アルギニコハク酸尿症	3	0.009%			2	0.009%							1	0.006%							
プロピオン酸/メチルマロン酸血症	55	0.160%	3	0.009%	20	0.090%	3	0.014%	8	0.050%	2	0.012%	9	0.051%	1	0.006%	25	0.043%	8	0.014%	
イソ吉草酸血症	74	0.215%	4	0.012%	53	0.240%	1	0.005%	20	0.124%			42	0.236%			40	0.068%	3	0.005%	
複合カルボキシラーゼ欠損症など	1	0.003%	1	0.003%	4	0.018%	2	0.009%	2	0.012%			1	0.006%	2	0.011%	30	0.051%	18	0.031%	
グルタル酸尿症 I 型	5	0.015%							48	0.298%			1	0.006%	1	0.006%	22	0.037%	2	0.003%	
MCAD	7	0.020%	1	0.003%	3	0.014%	1	0.005%	2	0.012%							8	0.014%	3	0.005%	
VLCAD	17	0.049%			37	0.167%	1	0.005%	3	0.019%			20	0.112%			28	0.048%	12	0.020%	
LCHAD																				1	0.002%
CPT-1					1	0.005%												99	0.169%	1	0.002%
シトリン欠損症	1	0.003%													2	0.011%	3	0.005%	2	0.003%	
3-ケトチオラーゼ欠損症									1	0.006%			1	0.006%					3	0.005%	
グルタル酸尿症 II 型													10	0.112%					3	0.005%	
CPT-2/TRANS																	28	0.048%	3	0.005%	
カルニチントランスポーター異常症	1	0.003%							13	0.081%			18	0.101%	1	0.006%	119	0.203%	4	0.007%	
合計	186	0.541%	19	0.055%	132	0.597%	8	0.036%	129	0.800%	8	0.050%	107	0.602%	9	0.051%	488	0.831%	68	0.116%	

*カッコ内の数字は精査数のうち直接精査の数
F施設については、検査件数を増やして再集計した。
H施設は参考値施設のため除く。

育疾患克服等次世代育成基盤研究事業「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」(研究代表者 山口清次)の助成を受けて実施した。調査にご協力いただいた検査施設等の関係者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 重松陽介, 畑 郁江, 稲岡一孝: タンデムマス・スクリーニングにおける非誘導体化分析. 日本マス・スクリーニング学会誌 21(3) 13-18(2011).
- 2) 重松陽介, 野町祥介, 北川照男, 他: 分担研究課題 タンデムマス診断精度向上・維持, 対象疾患設定に関する研究. 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. 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平成22年度総括・分担研究報告書 49-57(2011).
- 3) 花井潤師, 野町祥介, 高橋広夫, 他: タンデムマス・スクリーニングのカットオフ値設定-各指標の施設間差の検討-. 分担研究課題 タンデムマス診断精度向上・維持, 対象疾患設定に関する研究. 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. 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平成23年度総括・分担研究報告書 投稿中.

- 4) 児玉京子, 花井潤師, 沼田公介, 他: 神経芽細胞腫スクリーニング実施38施設の尿中VMA, HVA値の解析. -ヒストグラム作成ソフトの有用性-. 日本マス・スクリーニング学会誌12(1) 37-45(2002).
- 5) 原田正平: TSHのカットオフ値. 平成8年度先天性代謝異常章検査技術者研修会テキスト, 146-157, 1996.
- 6) 深尾 彰, 久道 茂: 各論1章公衆衛生学分野での応用 A. スクリーニング. 今日の疫学, 青山秀康編, 医学書院, 東京1996, p112-125.
- 7) 重松陽介: ESI-MS/MS新生児マススクリーニングの再検討. 効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業. 平成10年度研究報告書74-76(1999).
- 8) 雨瀧由佳, 野町祥介, 花井潤師, 他: タンデム検査で偽陽性を生じる抗生剤使用の問題点とその対応について. 日本マス・スクリーニング学会誌20(3), 213-216(2010).

受付日:平成24年3月30日

受理日:平成24年4月20日

Cutoff values in neonatal screening by tandem mass spectrometry

-Comparison of cutoff values among screening centers-

Junji Hanai¹⁾, Shosuke Nomachi¹⁾, Hiroo Takahashi¹⁾, Yu Mitsuhashi¹⁾, Junko Sasaki²⁾, Mitsuhsa Isobe³⁾, Nobuyuki Ishige⁴⁾, Akira Anazawa⁴⁾, Kyoko Yasukata⁵⁾, Yoko Kinoshita⁶⁾, Yuji Yamakami⁶⁾, Kazuya Sakemoto⁷⁾, Ryuji Tasaki⁸⁾, Hironori Kobayashi⁹⁾, Seiji Yamaguchi⁹⁾, Yosuke Shigematsu¹⁰⁾

- 1) Sapporo City Institute of Public Health
- 2) Iwate Health Service Association
- 3) Saitama City Institute of Health Science and Research
- 4) Tokyo Health Service Association

- 5) Chiba Foundation for Health Promotion and Disease Prevention
- 6) Kanagawa Health Service Association
- 7) Osaka City Environment and Public Health Association
- 8) The Chemo Sero-Therapeutic Research Institute
- 9) Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine
- 10) Department of Health Science, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

乾燥ろ紙血中アシルカルニチンの保存期間と保存温度による安定性の検討 —有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の検体を用いた検討—

石毛信之¹⁾, 藤川研人¹⁾, 穴澤 昭¹⁾, 石毛美夏²⁾, 大和田 操¹⁾, 北川照男¹⁾

1) 公益財団法人 東京都予防医学協会, 2) 駿河台日本大学病院 小児科

要 旨

乾燥ろ紙血検体を長期間保存すると、アシルカルニチンは加水分解されて測定値が低下し、同時に遊離カルニチン値が上昇することが知られている。我々は、駿河台日大病院で治療中の有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の乾燥ろ紙血を用い、保存期間と保存温度による遊離カルニチンならびにアシルカルニチンの安定性について検討した。その結果、保存期間が長く、保存温度が高温になるほど加水分解によるアシルカルニチン値の低下が顕著であり、炭素数が少ないアシルカルニチンほど保存条件の影響を受けやすいことが確認された。したがって、採血から長期間経過した、もしくは、適切でない保存条件下に置かれた乾燥ろ紙血検体では、タンデムマスの分析データに影響が生じるので、このような検体の測定値の評価には注意を要すると考えられた。

キーワード

タンデムマス, アシルカルニチン, 遊離カルニチン, 安定性, 保存温度, 保存期間

【緒 言】

近年、わが国でも新生児マス・スクリーニングにタンデム質量分析計（タンデムマス）が導入されつつあり、これまで対象疾患とされていた6疾患に加えて、有機酸ならびに脂肪酸代謝異常症の一部がスクリーニング対象疾患となり^{1,2)}、新生児期の乾燥ろ紙血中の遊離カルニチン (C0) ならびにアシルカルニチン (AC) の分析が広く行われるようになった。新生児期以降にも、AC分析で先天代謝異常症と診断される症例があるが³⁾、新生児期にタンデムマスによるマス・スクリーニングを受けていなければ、

新生児期の乾燥ろ紙血を後方視野的に分析することは臨床的に有用である³⁾。乾燥ろ紙血検体においては、採血から長期間経過したり、その保存条件が不適切であった場合には乾燥ろ紙血中のACが加水分解されてC0が増加することがこれまでに報告されている⁴⁻⁸⁾。そのため、保存期間の長い検体や、検体の乾燥状態や検査施設に到着するまでの温度・湿度等の環境が適切でない場合^{9,10)}には、ACの分解に起因する偽陰性またはCPT-1欠損症のスクリーニング指標であるC0/(16+C18)においては、C0上昇による偽陽性が危惧される。そこで今回、我々は、駿河台日本大学病院小児科の協力の下に、本会のタンデムマス・スクリーニングで発見され、同院で治療中の有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の乾燥ろ紙血を使用して保存期間と保存温度によるACの安定性について検討したので報告する。

<連絡先>

石毛 信之

〒162-8402 東京都新宿区市ヶ谷砂土原町1-2
(公財)東京都予防医学協会検査研究センター
母子保健検査部小児スクリーニング・分析検査科

Tel:03-3269-1172 Fax:03-3269-7137

E-mail: thsa-screening@mrj.biglobe.ne.jp

【対 象】

本会で2005年12月から2012年3月までに実

表1. 診断時のろ紙血液の検査データ

	プロピオン酸血症	VLCAD欠損症	MCAD欠損症		カルニチントランス ポーター異常症
			症例a	症例b	
タンデムマス 検査日齢/年齢	5日	5日	5日	5日	1歳8ヶ月
検査データ* (カットオフ値)	C3 18.3 (>5.0)**	C14:1 0.71 (>0.40)	C8 1.33 (>0.30)	5.53	C0 0.82 (<10.00)**
	C3/C2 1.15 (>0.25)	C14:1/C2 0.038 (>0.013)	C8/C10 2.54 (>1.0)**	9.40	全アシルカルニチン 極めて低値
遺伝子変異	(解析中)	ACADVL: 334T>C 1349G>A	ACADM: 449-452 del CTGA 820A>G	IVS3+2T>C 843A>T	SLC22A5: 1394T>C (不明)

*各濃度値の単位: nmol/mL **診断当時の本会におけるカットオフ値

施したタンデムマス・スクリーニングの試験研究期間¹¹⁾に発見された有機酸・脂肪酸代謝異常症患者のうち4例(プロピオン酸血症 (PA) 1, 中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症 (MCADD) 2, 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (VLCADD) 1), および本スクリーニングが実施されていない地域で出生したが, 1歳8ヶ月時に本会でカルニチントランスポーター異常症 (CTD) と診断された1例のあわせて5例の患者検体を用いた。ろ紙血は, 駿河台日本大学病院で安定期にある患者の保護者に説明し, 同意を得て定期検査の採血を行う際, 同時に採取した。CTDでは, 保護者の同意を得た上で新生児期の乾燥ろ紙血も入手した。これら5例の検査データを表1に示した。現在, いずれの症例も駿河台日本大学病院小児科において治療中で, 診断ならびに治療開始以降は metabolic crisis を来すことなく順調に経過している^{2, 12, 13)}。

【方法】

1. 使用機器と前処理法

詳細は既報¹⁴⁾の通りで, 使用したタンデムマスは Quattro Micro API (Waters社), 検体前処理法は市販の誘導体化試薬 (和光純薬) を用いたブチル誘導体化法である。内部標準物質には NSK-Set AおよびB (CIL/大塚製薬) を使用した。

2. 検討方法

駿河台日本大学病院小児科において5例の患児から血液ろ紙を各4枚作成し, 採血当日また

はその翌日に検体が本会に到着後, 4枚の検体を直ちにタンデムマスで分析し, これら4枚の測定値の平均値を以後の検討における初回測定値 (100%値) とした。次に, 各症例4枚の乾燥ろ紙血をチャック付ビニール袋に入れ, -30°C, 4°C, 室温 (25~28°C), 37°Cに1枚ずつ分けて保存した。保存開始後, 1週間, 2週間, その後5ヶ月目まで毎月1回タンデムマスでC0ならびにACを測定した。これらの測定結果をもとに, C0, 短鎖AC (C2, C3), 中鎖AC (C6, C8, C10), 長鎖AC (C16, C18, C14:1, C18:1) について, 保存温度と保存期間による測定値の推移を追跡した。さらに, チャック付ビニール袋に入れて-30°Cで保存しておいた各症例の新生児期の乾燥ろ紙血ならびにCTD例では診断時の乾燥ろ紙血も, 今回あらためて測定し, スクリーニング時の測定値と比較した。測定値の評価には, Strnadováらの長期保存後のAC変動に関する報告⁶⁾におけるC0, ACの変動割合を参照し, さらに本会におけるC0, AC分析の変動係数がおおよそ4~12%であることから, 保存後の測定値が初回測定値±25%を超えた場合には明らかな変動 (初回測定値よりも明らかな上昇, 低下) があったと考えた¹⁵⁾。

【結果】

C0ならびに各ACの保存条件による測定値の変動を表2~4に示した。表には, 各患者検体毎の初回測定値に対するC0, AC値の変動 (%) の平均値とその標準偏差 (SD) を示した。これ

表2. 遊離カルニチンならびに短鎖アシルカルニチン (C2, C3) の保存条件による測定値の変動

	保存期間	-30°C		4°C		室温		37°C	
		mean (%)	SD	mean (%)	SD	mean (%)	SD	mean (%)	SD
C0	1週間	107.9	7.1	99.5	3.4	112.6	8.7	114.9	0.5
	2週間	107.5	12.6	102.6	2.2	112.0	5.7	115.2	2.5
	1ヶ月	100.2	9.8	112.2	17.2	114.3	19.6	111.1	11.0
	2ヶ月	112.5	16.4	131.3	21.6	145.5	32.8	120.6	14.2
	3ヶ月	122.2	21.6	137.7	31.5	142.3	32.6	146.2	36.6
	4ヶ月	113.4	15.1	151.3	33.2	158.2	38.5	147.4	37.1
	5ヶ月	126.8	30.2	158.8	43.4	162.3	41.4	164.8	49.8
C2	1週間	96.6	1.3	84.2	9.9	74.9	3.6	73.2	5.6
	2週間	90.5	12.4	80.1	17.2	79.0	6.2	68.0	5.1
	1ヶ月	93.9	4.3	69.3	7.8	57.2	8.3	64.1	7.3
	2ヶ月	97.6	12.3	60.3	6.7	48.1	10.8	57.0	12.9
	3ヶ月	86.6	9.9	46.8	11.2	37.4	14.0	42.7	11.9
	4ヶ月	87.4	4.2	41.1	8.4	30.4	8.1	36.8	2.0
	5ヶ月	72.4	3.3	30.9	9.6	21.5	9.2	27.0	9.1
C3	1週間	99.4	4.4	97.4	11.6	85.3	4.6	87.4	12.1
	2週間	91.3	20.8	86.4	20.5	87.0	12.3	84.1	15.5
	1ヶ月	96.2	7.4	83.3	15.6	74.7	9.9	80.1	10.0
	2ヶ月	97.3	9.0	73.4	10.5	66.0	14.1	70.4	12.3
	3ヶ月	87.2	13.1	60.3	16.7	54.0	24.7	59.7	17.8
	4ヶ月	93.5	4.2	60.6	14.0	57.2	9.1	66.0	6.8
	5ヶ月	85.5	9.1	48.8	11.6	36.6	10.2	48.3	10.1

※初回測定値を100%とする。

表3. 中鎖アシルカルニチン (C6, C8, C10) の保存条件による測定値の変動

	保存期間	-30°C		4°C		室温		37°C	
		mean (%)	SD	mean (%)	SD	mean (%)	SD	mean (%)	SD
C6	1週間	111.1	5.0	102.7	16.0	92.9	0.9	99.3	18.5
	2週間	82.0	32.2	70.5	28.6	94.1	23.7	90.0	27.3
	1ヶ月	110.1	20.4	97.2	9.7	90.2	21.7	88.1	25.8
	2ヶ月	105.3	54.8	82.8	27.9	86.9	31.5	83.2	37.4
	3ヶ月	103.3	27.3	84.3	41.3	90.4	39.9	108.0	56.7
	4ヶ月	104.2	9.1	82.8	13.3	87.0	13.0	87.7	5.0
	5ヶ月	105.9	9.4	91.5	11.1	76.5	10.8	83.6	13.3
C8	1週間	104.8	13.9	93.0	2.3	99.2	7.9	103.9	11.9
	2週間	95.5	10.2	90.7	10.8	109.8	11.9	93.6	5.9
	1ヶ月	99.7	8.0	101.7	10.9	95.2	33.1	85.6	18.2
	2ヶ月	97.9	4.1	87.5	13.1	86.0	9.9	81.2	17.8
	3ヶ月	87.5	11.2	91.7	12.9	87.7	13.4	81.6	8.4
	4ヶ月	96.7	5.1	77.0	10.3	83.7	13.5	70.2	14.6
	5ヶ月	87.0	12.0	81.8	16.8	67.2	13.4	64.0	6.5
C10	1週間	98.2	15.9	89.8	1.7	91.6	8.9	109.9	11.9
	2週間	101.5	0.6	107.1	3.4	106.8	1.2	112.6	28.1
	1ヶ月	105.0	13.3	101.7	7.4	102.6	9.2	91.7	14.8
	2ヶ月	97.0	6.5	92.5	7.8	97.1	9.7	81.2	8.7
	3ヶ月	109.8	25.0	82.9	20.6	87.8	9.2	83.3	26.6
	4ヶ月	95.6	9.4	74.5	12.5	71.4	19.0	60.6	15.3
	5ヶ月	109.1	15.3	73.6	10.1	69.3	23.9	60.4	17.4

※初回測定値を100%とする。

表4. 長鎖アシルカルニチン (C16, C18, C14:1, C18:1) の保存条件による測定値の変動

	保存期間	-30°C		4°C		室温		37°C	
		mean (%)	SD	mean (%)	SD	mean (%)	SD	mean (%)	SD
C16	1週間	102.9	5.0	99.2	6.3	107.6	0.7	95.3	2.3
	2週間	99.2	10.0	92.2	21.2	96.6	9.8	96.7	4.2
	1ヶ月	95.2	5.5	95.5	10.5	94.4	7.0	88.7	11.0
	2ヶ月	96.9	8.9	92.2	10.9	98.2	12.8	79.6	2.9
	3ヶ月	97.9	7.3	91.4	7.0	86.0	11.8	77.8	13.6
	4ヶ月	96.7	2.0	91.1	10.1	95.5	13.9	70.5	7.9
	5ヶ月	96.3	8.0	90.7	8.8	84.7	5.5	75.2	6.2
C18	1週間	106.6	10.4	101.8	7.4	99.2	5.0	97.6	4.6
	2週間	103.8	0.7	101.0	0.8	102.9	4.0	96.7	11.3
	1ヶ月	95.2	12.7	90.4	17.6	99.1	11.0	86.9	11.4
	2ヶ月	102.7	6.0	88.1	9.0	92.1	13.3	78.8	7.9
	3ヶ月	100.0	12.0	95.4	9.9	87.1	9.0	91.0	11.3
	4ヶ月	95.3	6.5	92.1	11.4	92.5	11.4	66.8	8.4
	5ヶ月	101.7	15.0	97.7	13.2	84.3	6.0	73.6	6.0
C14:1	1週間	102.9	19.5	99.3	8.5	95.1	18.7	84.6	19.5
	2週間	73.4	11.3	71.5	26.4	52.8	0.5	70.0	25.8
	1ヶ月	103.3	24.3	102.1	28.6	105.0	20.5	78.4	14.3
	2ヶ月	109.3	43.0	99.9	42.5	89.4	19.8	68.1	17.3
	3ヶ月	103.0	39.3	77.2	20.2	77.4	33.8	81.7	13.9
	4ヶ月	93.5	42.6	98.0	27.5	97.2	18.5	72.4	13.2
	5ヶ月	103.6	32.0	83.7	18.4	74.4	10.8	76.7	10.8
C18:1	1週間	110.1	14.5	98.6	2.2	107.1	3.6	99.6	4.5
	2週間	94.0	20.3	87.3	16.7	85.2	20.8	83.7	14.9
	1ヶ月	95.9	12.5	100.6	9.2	92.9	9.7	81.6	16.7
	2ヶ月	103.0	10.3	93.7	10.8	98.8	15.4	75.3	10.6
	3ヶ月	92.7	12.0	91.3	8.0	91.7	4.3	80.6	9.5
	4ヶ月	103.0	7.8	94.9	12.2	97.4	15.2	69.3	7.4
	5ヶ月	101.6	14.9	96.1	11.7	86.3	8.1	72.1	7.8

※初回測定値を100%とする。

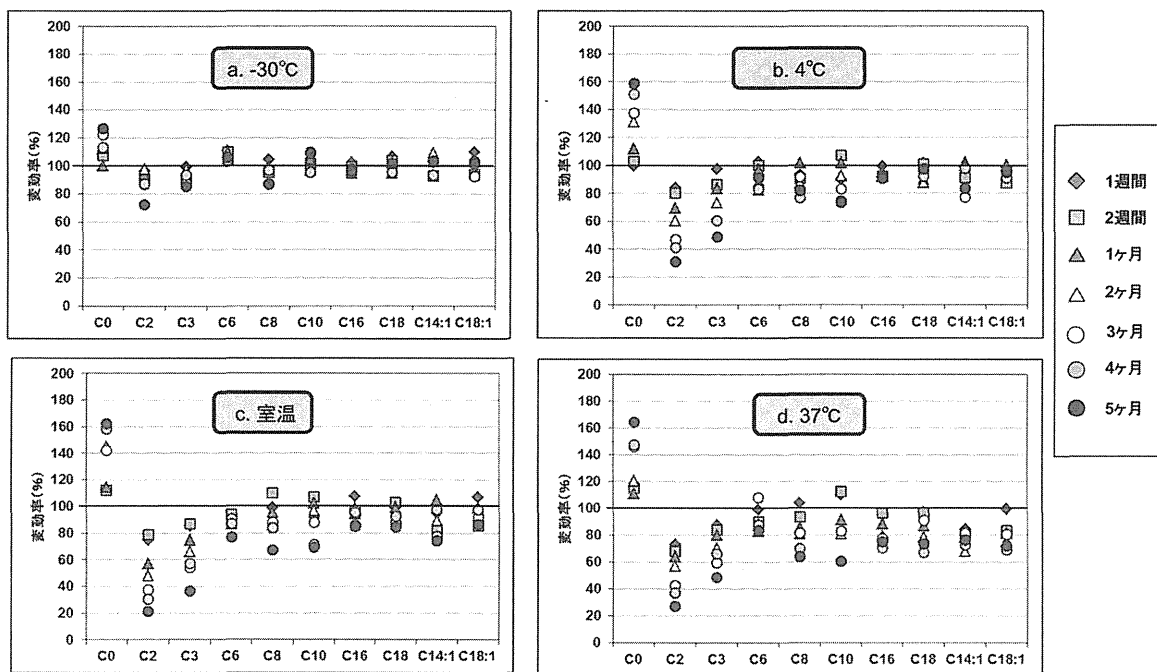


図1. 遊離カルニチンならびにアシルカルニチンの保存温度による安定性の検討

らの値を基に、保存条件による安定性の検討結果を述べる。

1. 保存温度による安定性の検討

図1に乾燥ろ紙血を保存する温度の違いによるACの安定性の比較を示した。-30°C保存(図1-a)では、多くのACが±20%程度の変動範囲内にあったが、他の保存温度では25%を超える変動を呈するC0, ACも多く見られ、保存温度が高温になるほどその傾向が顕著であった。-30°C~4°Cのいずれの保存温度においても、C0, C2, C3の変動幅は他のACよりも特に大きく、4°Cに保存した場合でも、C2, C3は5ヶ月後には初回測定値の半分以下の値となった。

2. 保存期間による安定性の検討

図2に保存期間によるACの安定性の検討結果を示した。1週間後(図2-a)では、C2が90%~80%弱まで低下し、C0の軽度上昇がみとめられたが、他のACは10%程度の変動範囲内に収まっていた。2週間後(図2-b)ではいずれの測定物質でも10~20%の変動がみられ、1ヶ月後(図2-c)にはC2は-30°C保存以外では70%以下まで低下し、C3もそれに次いで大きく低下していた。さらに5ヶ月後では、-30°C保存であってもC0, C2は30%近い変動が認められた。

3. 新生児期の乾燥ろ紙血中のC0ならびにACの-30°Cにおける長期保存後の変動

検討対象の各症例の初回測定値と-30°Cにおける長期保存後の測定結果を図3に示した。CTDの新生児期の乾燥ろ紙血は、出生地域でマス・スクリーニング後に1.6年間冷蔵保存されていたが、本会のタンデムマスで測定した後には-30°Cに保存(9ヶ月間)した。スクリーニング時のC0ならびにACの測定値と今回測定した値を比較すると、PA(3.4年間保存; 図3-a)のC2, C3値は低下傾向(各々-20.4%, -6.3%)が認められ、MCADD(症例a: 3年間保存, 症例b: 2.8年間保存; 図3-c)のC8値も10%前後低下していた。VLCADD(2.4年間保存; 図3-b)のC14:1には大きな変動はみとめられず、CTD(図3-d)におけるC0値は、新生児期の乾燥ろ紙血では9.5%上昇していたが、診断時の乾燥ろ紙血(2年間保存)では大きな変動はみとめられなかった。各症例の初回測定値と長期保存後の測定値には差がみられる例もあったが、いずれも指標となるC0またはACの異常は検出可能であった。

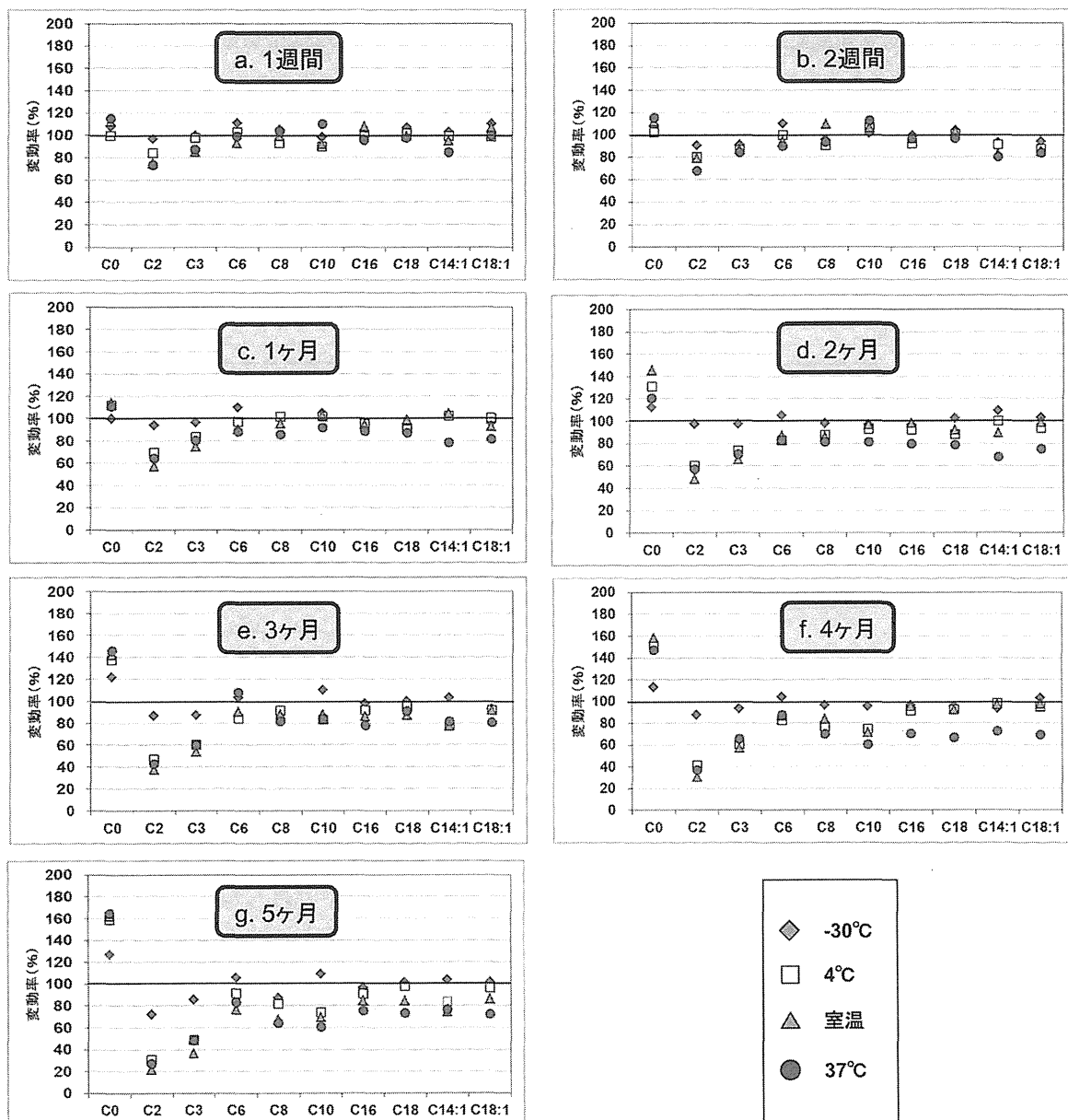


図2. 遊離カルニチンならびにアシルカルニチンの保存期間による安定性の検討

【考 察】

長期保存された乾燥ろ紙血中のACの安定性については、次のような報告がある。Strnadováら⁶⁾は660例の新生児期の乾燥ろ紙血検体を用いて常温・乾燥下における安定性を検討した。その結果、C0は最初の5年間で年7.6%ずつ上昇し、それ以降では年1.4%ずつ低下すること、そしてC2ならびにC3は、各々年18.5%ならびに27.4%ずつ低下することを報告した。また、Fingerhutら⁷⁾は、乾燥ろ紙血を-18°Cで保存した場合にはおよそ一年間は安定であると報告した。

その後、Fingerhutらは同一検体を常温保存してACの安定性を検討した結果、2週間以上経過するとACの測定値に影響が生じること、そして影響の程度は炭素数が少ないACほど大きく、保存環境の湿度が高い場合には著しく分解しやすいとしている。さらに、英国Newborn Screening Programme CentreによるMCADDの新生児マス・スクリーニングのガイドライン¹⁶⁾では、乾燥ろ紙血を密封し、常温よりも4°C、さらには-20°Cに保存することで中鎖AC (C6, C8, C10) の加水分解が抑制されることが示されている。一方、

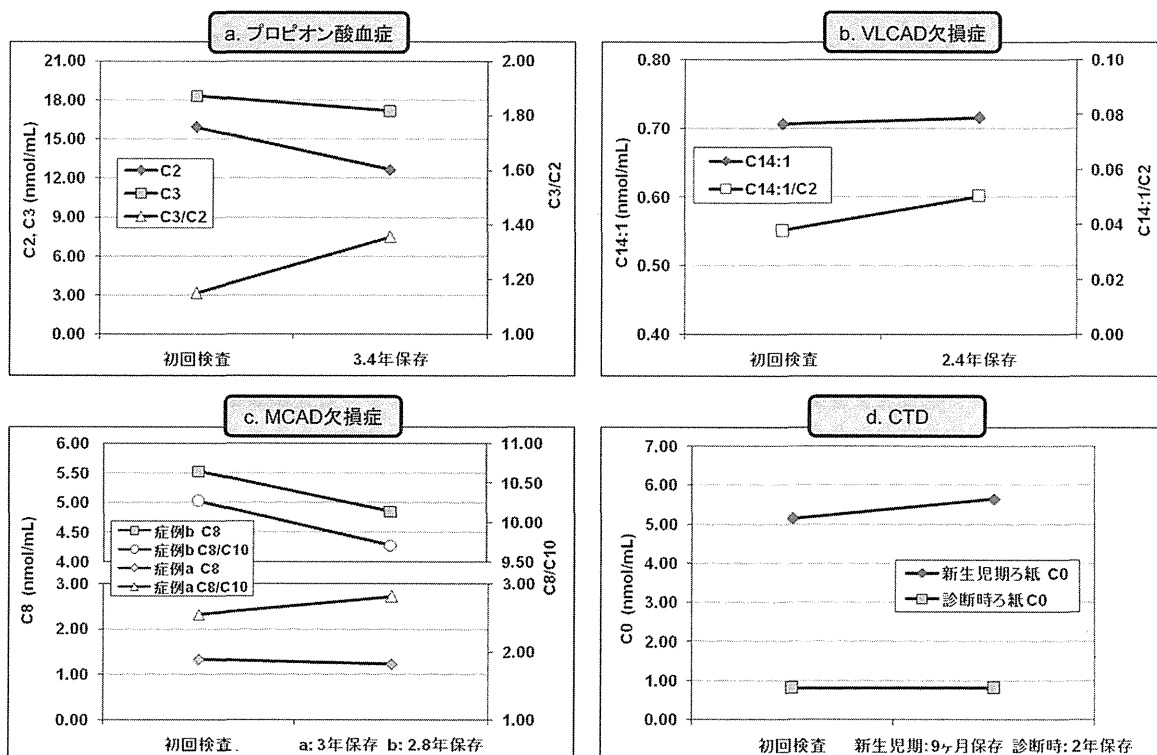


図3. 各症例の新生児期のろ紙血液における初回検査値と長期保存 (-30°C) 後の測定値の比較

米国疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention : CDC) では、3-ヒドロキシACのうちC4-OHならびにC16-OHを添加して作製した乾燥ろ紙血を用いた検討で、-20°C・湿度30%未満ならば少なくとも1年間は安定であり、日常的に使用する精度管理用乾燥ろ紙血は、湿度を抑えて4°Cに保存してもその使用期限は1ヶ月以内としている¹⁷⁾。また、米国臨床・検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI) によるタンデムマス・スクリーニングの精度保障に関するガイドライン¹⁸⁾では、精度管理用の乾燥ろ紙血検体の保存安定性について言及されており、市販されているものは指定された保存条件や使用期限を遵守し、自家製の管理検体では-20°C・湿度30%未満の環境で保存すべきとしている。

今回我々は、本会のタンデムマス・スクリーニングで過去に発見され、現在治療中の患者の乾燥ろ紙血を用い、その保存温度と保存期間によるACの安定性を検討した。ACの加水分解は、保存期間が長く、保存温度が高温になるほど顕著であり、炭素数が少ないACほど影響を受け

やすいことが示された。これらの結果はこれまでの報告と一致した。特にC2, C3の分解が著しく、4°C保存においても2週間以上経過すると、C2, C3は低下しはじめており、-30°C保存においてもC2の低下は認められた。この時、C3よりもC2が分解する割合が大きいため、C3/C2比は経時的に上昇傾向が認められた。そして、ACが加水分解されるとC0が生じるため、-30°C~37°Cのいずれの保存温度においても保存期間が長くなるにつれてC0は上昇し、5ヶ月後には初回測定値のおよそ1.3~1.6倍になっていた。しかし、その中でも乾燥ろ紙血を-30°C保存にて保存した場合には、他の温度条件で保存した場合よりも多くのACの変動は軽度で、ACの分解を抑制する効果があると考えられた。

これらの結果から、長期間保存した検体や保存状況が適切でない検体では、C3を指標とするPAならびにメチルマロン酸血症が見逃される危険性があると考えられた。同時に、C3/C2比は経時的に上昇するため、これらの疾患の偽陽性が生じる可能性も示唆された。一方PA, MCADD, VLCADDでは二次性カルニチン欠乏

を来すことがあるが、ろ紙血検体の保存条件が適切でない場合では、C0の上昇によってこれがマスクされる可能性も考えられた。日常の検査の中で、C0値には異常なし～軽度上昇で、C2、C3値が著しく低値を呈している例を見た場合には、検体に記載された採血日等を再確認し、場合によっては採血医療機関に採血から検体発送までの経緯を問い合わせた上で、事情を説明し、不備検体として再採血を依頼する必要があると思われた。

-30°Cにて長期保存した患者の新生児期の乾燥ろ紙血を用いた検討では、C2、C3、C8値はわずかに低下していたが、1~3年間の保存期間であれば、異常の検出には問題なかった。CTD例では、結果1、2で示したほどにC0の上昇割合が著しくなかった理由は、新生児期の乾燥ろ紙血では本会で測定する以前の冷蔵保存中にある程度増加していたと推測されること、そして診断時の乾燥ろ紙血では、診断時点でC0をはじめとして、全ACが著しく低値であった(表1)故に、これらACが加水分解してもC0の総量に大きな差は無かったためと推測された。

以上の検討から、スクリーニングで使用した後の検体は、密閉して凍結保存することがもっとも理想的であるが、現実的には全検体を凍結保存することは難しいので、スクリーニング陽性検体、患者検体など、測定値の再評価などで後日使用する可能性が高い検体は、密閉可能な袋または容器に入れ、凍結にて保存するべきと考えられた。また、臨床発症例における新生児期の検索など、後方視野的研究の場合を除き、長く室温や冷蔵保存がなされた検体をタンデムマスで分析した場合には、疾患の見逃しが生じる可能性があるので測定値の評価には注意を要すると考えられた。

【結 語】

長期間の保存や、保存条件が適切でない乾燥ろ紙血検体では、タンデムマスの分析データに影響が生じるので、その測定値の評価には注意を要する。そして乾燥ろ紙血を長期保存する際には密閉可能な袋または容器に入れ凍結保存す

ることが望ましいことが示された。

【謝 辞】

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金の補助によって行われた。また、各症例の確定診断を得るにあたって、島根大学医学部小児科 山口清次先生、長谷川有紀先生、小林弘典先生、虫本雄一先生、福井大学医学部看護学科 重松陽介先生、千葉県こども病院代謝科 高柳正樹先生、村山 圭先生、広島大学医学部小児科 但馬 剛先生にご指導とご支援賜りましたことを深謝致します。

※本論文の要旨は2011年第38回日本マス・スクリーニング学会(福井)にて報告した。

【文 献】

- 1) 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。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)「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23年度総括・分担研究報告書：3-14, 2012.
- 2) 北川照男：タンデムマスによる新生児マススクリーニング—本会での準備と試験的実施の成果—。東京都予防医学協会年報 2012年版 41: 138-144, 2012.
- 3) 小林弘典, 遠藤 充, 長谷川有紀, 山口清次：先天代謝異常症13例における新生児期ろ紙血を用いたタンデムマス分析による後方視野的検討。日本小児科学会雑誌 111: 1155-1159, 2007.
- 4) Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Naylor EW: Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem 43: 2106-2113, 1997.
- 5) Santer R, Fingerhut R, Lassker U, et al.: Tandem mass spectrometric determination of

- malonylcarnitine: diagnosis and neonatal screening of malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *Clin Chem* 49: 660-662, 2003.
- 6) Strnadová KA, Holub M, Muhl A, et al.: Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chem* 53: 717-722, 2007.
- 7) Fingerhut R, Ensenauer 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* 81: 3571-3575, 2009.
- 8) Li W, Tse FL: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr* 24: 49-65, 2010.
- 9) 望月孝一, 堤 泰子, 岡田智香子, 他: 郵送濾紙血のGal値の季節変動. *日本マス・スクリーニング学会誌* 17: 57, 2007.
- 10) 原田正平, 鈴木恵美子, 小山舞子, 渡辺倫子, 加藤忠明, 松井 陽: 人為的に作成した不適切ろ紙採血検体の測定値への影響に関する検討. *日本マス・スクリーニング学会誌* 21: 161, 2011.
- 11) 北川照男, 石毛信之, 穴澤 昭, 鈴木 健, 大和田 操, 石毛美夏: 東京都における公費によるタンデムマス・新生児スクリーニング実施に向けての取り組みとパイロット・スクリーニングの成績のまとめ. 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)「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23年度研究報告書: 68-70, 2012.
- 12) 和田美夏, 碓井ひろみ, 横山(和泉)美奈, 他: タンデムマススクリーニングで発見された有機酸代謝異常症の一例. *日本先天代謝異常学会雑誌* 24: 86, 2008.
- 13) 石毛(和田)美夏, 碓井ひろみ, 石毛信之, 他: 当院における脂肪酸代謝異常症6例の臨床経過. *日本先天代謝異常学会雑誌* 26: 154, 2010.
- 14) 石毛信之, 藤川研人, 穴澤 昭, 石毛美夏, 大和田 操, 北川照男: VLCAD欠損症の診断に血清アシルカルニチン測定が有効であった一例. *日本マス・スクリーニング学会誌* 21: 55-62, 2011.
- 15) 山田健治, 虫本雄一, 高橋知夫, 他: 遊離カルニチンおよびアシルカルニチンの安定性の検討. *日本マス・スクリーニング学会誌* 22: 29-34, 2012.
- 16) UK Newborn Screening Programme Centre: A Laboratory Guide to Newborn Screening in the UK for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD), 2nd ed, Bartlett K, Besley G, Downing M, Goddard P, Green A, Kemp H, Oerton J, Pourfarzam M, Turner C edited, A UK National Screening Committee, London, 2010.
- 17) Lim T: Short and Long Term Stability of 3-Hydroxy acylcarnitines Enriched Dried Blood Spots Stored at Various Temperatures and Humidities. 2011 APHL Newborn Screening and Genetics Testing Symposium, San Diego, CA, 2011, http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2011/2011_APHL_NBS_Genetic_Testing_Symposium/2002-Lim.pdf.
- 18) CLSI: Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry; Approved Guideline. CLSI document I/LA32-A, Hoffman G, Cerda B, Chace D, Morris M, Morrissey M, Stanly E, Barshop B, George M, Halim A-B, Hannon W, Hooper P, Litsheim T, Pasquali M, Poston P, Whitley R edited, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2010.

受付日: 平成24年9月19日

受理日: 平成24年11月14日

Storage term and temperature affect the stability of acylcarnitines in dried blood spots: a study used patient samples with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders

Nobuyuki Ishige¹⁾, Kenjin Fujikawa¹⁾, Akira Anazawa¹⁾, Mika Ishige²⁾, Misao Owada¹⁾, Teruo Kitagawa¹⁾

1) Tokyo Health Service Association

2) Department of Pediatrics, Surugadai Nihon University Hospital