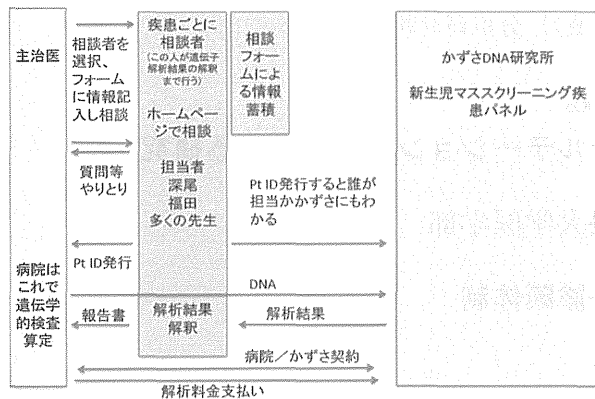


遺伝学的検査(新生児マススクリーニング陽性例)



D. 考察

遺伝子型を決めてフォローすることは今後遺伝型と臨床像の関係を明らかにして、今後のマススクリーニング診断患者の診療に役立てるためにも重要である。本研究班のコホートと遺伝子診断をリンクさせることが今後重要であると考えられる。

E. 結論

遺伝子パネルによるマススクリーニング対象疾患の遺伝子診断を構築中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, Fukao T: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* in press (査読有り)

2) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Sathienkijanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain Dev* in press. (査読有り)

3) ○Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet* 59:609-14, 2014 (査読有り)

4) Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, Yabe H, Kato S, Shimada T, Mason RW, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome. *Mol Genet Metab Rep.* 2014;1:184-196. (査読有り)

5) Shimada T, Kelly J, LaMarr WA, van Vlies N, Yasuda E, Mason RW, Mackenzie W, Kubaski F, Giugliani R, Chinen Y, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Novel heparan sulfate assay by using automated high-throughput mass spectrometry: Application to monitoring and screening for mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab.* 2014 Sep-Oct;113(1-2):92-99 (査読有り)

6) Kiema TR, Harijan RK, Strozzyk M, Fukao T, Alexson SE, Wierenga RK: The crystal structure of human mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase (T1): insight into the reaction mechanism of its thiolase and thioesterase activities. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 70:3212-25, 2014 (査読有り)

読有り)

2. 学会発表

- 1) Akiba K, Fukao T, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake T, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without intellectual disability. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014
- 2) Fukao T, Hori T, Sasai H, Ohtsuka H, Kimura T, Aoyama Y: Alu elements insertions into intron 9 affect exon 10 recognition with a suboptimal splice acceptor site in human ACAT1 gene. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, 2-5 September, Innsbruck, 2014
- 3) 赤川翔平、保坂泰介、石井紘介、寺口正之、村上貴孝、園府寺美、木野稔、深尾敏幸、青山友佳、重松陽介：ケトン性低血糖発作を契機に診断した HSD10 病の 4 歳男児。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014
- 4) 折居建治、森本将敬、笹井英雄、松井永子、村上圭、大竹明、深尾敏幸：新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 型異常症の姉弟例の検討。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014
- 5) 小林正久、深尾敏幸、重松陽介、長谷川有紀、村山圭、井田博幸：本邦初の乳児期発症の HSD10 病症例。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014
- 6) 青山友佳、山本俊至、坂口直美、石毛美夏、田中藤樹、市原朋子、大原克明、深尾敏幸：HMG-CoA リアーゼ (HMGCL) 遺伝子の MLPA 法確立と HMGCL 欠損症 1 症例における Uniparental disomy の同定。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014
- 7) 笹井英雄、北澤徹三、木村豪、川本典生、川本美奈子、深尾敏幸、下澤伸行、山本崇裕：経過中に大脳白質病変を呈したホモシスチン尿症の 1 例。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014
- 8) 伊藤哲哉、中島葉子、加藤沙耶香、深尾敏幸：ミトコンドリア HMG-CoA 合成酵素欠損症の急性期症状。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014
- 9) 深尾敏幸、堀友博、笹井英雄、大塚博樹、青山友佳：ACAT1 遺伝子のイントロン 9 への Alu 挿入はエクソン 10 の認識に影響を与える。第 56 回日本先天代謝異常学会。11 月 12-15 日、仙台、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告

2. マスククリーニング検査精度向上に関する研究

分担研究者 重松陽介（福井大学医学部教授）

分担研究課題

マスキング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介 (福井大学医学部 教授)

研究要旨

タンデムマス・スクリーニングが全国の自治体で事業化されて間もない状況であり、検査施設の検査精度はまだ充分ではない。日本マスキング学会技術部会が開発した「内部精度管理ツール」を用いて行われた調査では、カットオフ値の設定が適切でなく再採血率の高い検査施設もみられた。スクリーニングで発見された患者調査においては、患者情報が不十分であるため適切なカットオフ値の検討に利用出来ない事例もみられた。本研究で新たなスクリーニング指標が追加でき、再採血率を最小化し診断精度を高めるための二次検査法も開発できた。さらに倫理面に配慮した患者情報の収集に取り組み、検査施設から収集したデータと対応させてカットオフ値を再検討し、二次検査法の導入を進めていくことで、全国の検査施設においてスクリーニング精度を保証していくことが可能であると考えられた。

研究協力者

中島英規 (国立成育医療研究センター・研究員)
花井潤師 (札幌市衛生研究所・課長)
石毛信之 (東京都予防医学協会・主査)
福士 勝 (札幌 IDL・所長)
田崎隆二 (化学及血清療法研究所・検査係長)
畑 郁江 (福井大学医学部小児科・講師)

A. 研究目的

タンデム型質量分析を用いた拡大新生児マスキング (TMS スクリーニング) が全国の自治体事業として実施される一方で、新規参入検査施設の分析技術や対象疾患を理解した対応については、試験研究を担った先行検査施設や日本マスキング学会技術者部会 (学会技術者部会と略) からの支援が必要な状況である。特に検査精度の保証に関して、学会技術者部会や成育医療研究センター・マスキング研究室 (成育 MS 研) が中心となって取り組みが続けられている。研究分担者は、これらの組織の協力を得て、全国の検査施設の分析技術や精度管理に関す

る情報を収集する一方、それらの検査施設で有効利用出来るスクリーニング精度保証技術を開発することを目的とした。

B. 研究方法

研究協力者と以下の点について調査、及び分析法の開発を行った。調査にあたっては、可能な限り発見患者の個人情報収集をしないように配慮した。

1) 検査施設の分析方法と検査値、及びスクリーニング精度の調査

花井らの報告書「平成 25 年度タンデムマス検査実施状況調査報告についてー内部精度管理の充実に向けた取組みー」に詳述

2) 検査施設のスクリーニング実績とカットオフ値に関連づけた発見患者データの調査

石毛らの報告書「タンデムマス・スクリーニング発見患者調査について」に詳述

3) 新しいスクリーニング指標の開発 (重松担当)

これまでのスクリーニング指標では発見が困難であった患者のデータを基に、適切なスクリー

ニング指標を開発し、有用性をシミュレーションした。

4) LC-MS/MS 法による二次検査法の開発 (中島、重松担当)

偽陽性率の高い対象疾患を対象に、初回濾紙血を用いることにより対象疾患の化学診断情報が得られる二次検査法として、新開発の LC カラムを用いて分析条件を検討し、患者検体を用いて有用性を確認した。

C. 研究結果

1) 検査施設の分析方法と検査値、及びスクリーニング精度の調査

学会技術者部会が中心となって開発した「内部精度管理ツール」を用いて全国の 41 検査施設のうち 34 施設からデータを回収した。結果の詳細は該当報告書を参照されたい。重要な点としては、“いくつかの指標において、カットオフ値の設定が適正でない施設やばらつきの多い施設が複数存在”していたこと、“再採血率や総精査率が高い施設が散見”されたことであり、当該報告書では“適性”と記述されている平均的な再採血率も“家族の不安”を最小にするという点では不当に高率であった。

2) 検査施設のスクリーニング実績とカットオフ値に関連づけた発見患者データの調査

全国の 41 検査施設のうち 34 施設からデータを回収した。2012 年度と 2013 年度に 1,337,911 名の新生児を検査して 129 例の患者が発見されていた。ただ、確定診断の根拠については確実性が不足している施設もあった。患者や偽陽性例の初回濾紙血分析データを用いたカットオフ値の検討も行われたが、必ずしも適切なカットオフ値となっていない場合がみられた。

3) 新しいスクリーニング指標の開発

① 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

厚生労働省母子保健課長通知 (雇児母発 0331 第 1 号「先天性代謝異常の新しい検査法 (タンデ

ムマス法) について」) で 1 次対象疾患に含められなかった CPT-2 欠損症の乳幼児期突然死例が無視出来ない程度に学会などで報告されている。また、スクリーニング指標が適切でなかったため偽陰性となり後に急性脳症で急性発症した患者も経験した。これらのデータを収集し、偽陽性率を勘案した上で適切なスクリーニング指標として、(C16+C18:1) /C2 を開発し、福井大学の分析値を用いたカットオフ値も設定した。広島県でのスクリーニングでこの指標の精度が検証された³⁾。

②メチルマロン酸血症・プロピオン酸血症

ビタミン B12 反応型メチルマロン酸の見逃し例や B12 欠乏症例のデータを収集し、濾紙血中メチルマロン酸・3 ヒドロキシプロピオン酸濃度測定と組み合わせたスクリーニング指標とカットオフ値を開発した。軽症例を見逃さないためにはプロピオニルカルニチン (C3) のカットオフ値を出来るだけ低くし、また二次性カルニチン欠乏状態などによる C3 の低下をカバーするためにアセチルカルニチン (C2) との比 C3/C2 のカットオフ値も活用する必要があることが判明した。また、ホモシスチン尿症を伴う B12 反応型メチルマロン酸血症については、C3/メチオニン比が鋭敏な指標となることを示した⁵⁾。

4) LC-MS/MS 法による二次検査法の開発

分析方法と分析対象物の詳細については、研究協力者中島の報告書を参照されたい。患者検体を含む分析により、以下の対象疾患について LC-MS/MS 法による二次検査法を確立出来た。

①メチルマロン酸血症・プロピオン酸血症 (図 1)

分析サンプル調整条件の検討を行い、GC/MS 法と同等の高い精度で濾紙血サンプル分析が可能であることを確認した。

②グルタル酸血症 I 型 (GA-1) (図 2)

新生児期の 3-ヒドロキシグルタル酸とグルタル酸の濃度を同時に高感度で測定出来る分析条件を決定した。患者の化学診断が可能であった。

③メープルシロップ尿症 (図 3)

アロイソロイシンを精度よく定量出来た。患者の化学診断が可能であった。

④イソ吉草酸血症（図4）

抗生剤投与で増加するピバロイルカルニチンとイソバレリツカルニチンなどの異性体との分別定量が可能であった。

D. 考察

学会技術者部会が中心となって取り組んだ今回の調査により、全国の検査施設の検査体制には不十分な点が多々あることが判明した。これまで指摘されてきたとおり、使用されている分析機器や試薬、サンプル調製法が各施設で同一でないこともあり、施設毎に分析値がばらつくという現実がある。また、それぞれの施設の分析担当者が学会技術者部会主導の十分な研修とトレーニングを経て、本スクリーニング事業が開始されたわけではないという事情もある。

このような状況においては、権威ある精度保証機関が、調査情報を共有しつつ教育的な取り組みを行う必要があると考えられる。

この点で、学会技術者部会が開発した「内部精度管理ツール」は各検査施設での内部精度管理ツールとしても極めて有用である。今後とも全国全ての検査施設で使用され、また、精度管理センターとしての成育MS研での管理ツールとしても有効活用されるべきである。

また、各検査施設で採用されているスクリーニング指標とカットオフ値については、上記ツールでのデータを基礎とし、患者データの更なる収集を進め、適切で精度の高いものとする必要がある。また、患者の重症度によっても指標値の値が変化し、軽症型患者ではカットオフ値に近い値をとるのが一般的である。このため、患者の確定診断に関する情報が必要であるが、検査施設への情報収集だけではこのような情報を得るのは困難である。このように、倫理面での配慮を行いながら、患者情報を収集する研究体制にする必要性も明らかとなったので、次年度の研究に活かしたい。

今回の調査の回収率が必ずしも十分ではなかった一方、検査施設の担当者に積極的に検査の質

の向上へ取り組もうとする姿勢の感じられる調査でもあった。今回開発した新たなスクリーニング指標や二次検査法をこのような検査施設に導入してもらえる体制作りも必要であると考えられた。

E. 結論

TMSスクリーニングが全国の自治体で事業化されたばかりの状況では、いまだ検査体制や精度に不十分な点が多々ある。学会技術者部会やマススクリーニング研究室を中心とした調査及び支援活動を行うことによってスクリーニング精度を保証していくことが必要であり、本研究事業では倫理面に配慮して患者データを収集し患者データに基づいたスクリーニング指標やカットオフ値の開発を更に深化させていくことも重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 重松陽介：血清および尿のアシルカルニチン分析．小児内科．46(4)：506-509，2014.
- 2) Hayashi H, Tokuriki S, Okuno T, Shigematsu Y, Yasushi A, Matsuyama G, Sawada K, Ohshima Y：Biotin and carnitine deficiency due to hypoallergenic formula nutrition in infants with milk allergy. *Pediatr Int.* 56(2)：286-288, 2014.
- 3) 原圭一、但馬剛、小野浩明、津村弥来、岡田賢、佐倉伸夫、畑郁江、重松陽介：CPT II 欠損症の新生児スクリーニング．見逃し例経験後の指標変更の影響．日本マス・スクリーニング学会誌．24(3)：261-266，2014.
- 4) 林泰平、岩井和之、津田英夫、重松陽介：母親の慢性萎縮性胃炎が原因となったビタミンB12欠

乏症の乳児例. 日本小児科学会雑誌. (印刷中)

5) 重松陽介, 畑 郁江, 林 泰平, 小野浩明, 但馬 剛: 二次検査法と組み合わせて実施するメチルマロン酸血症・プロピオン酸血症のタンデムマス・スクリーニング指標の検討. 日本マス・スクリーニング学会誌. 24(1);49-56, 2014.

6) 畑 郁江, 重松陽介: 新生児期に特徴的なけいれん性疾患. 先天代謝異常症. 小児科. 55(8);1175-1182, 2014.

7) 重松陽介, 畑 郁江: ピンポイント小児医療 タンデムマス・スクリーニングの二次検査 血清および尿のアシルカルニチン分析. 小児内科. 46(4);506-509, 2014.

8) 小野浩明, 但馬 剛, 重松陽介, 畑 郁江, 原圭一, 佐倉伸夫, 吉井千代子, 森岡千代美, 阪本直美: 新生児タンデムマス・スクリーニングで陽性とならず、1歳時ノロウイルス感染を契機に発症したビタミンB12反応性メチルマロン酸血症の1例. 日本マス・スクリーニング学会誌. 24(1);43-47, 2014.

9) 西山将広, 田中 司, 藤田杏子, 丸山あずさ, 永瀬裕朗, 竹田洋樹, 上谷良行, 重松陽介: ピボキシル基含有抗菌薬3日間投与によるカルニチン欠乏が関与した急性脳症の1例. 日本小児科学会雑誌. 118(5);812-818, 2014.

2. 学会発表

1) 稲岡一考, 藤田 宏, 中村しのぶ, 竹島清美, 笠原敏喜, 竹内 真, 和田芳直, 小梶哲雄, 藤峰慶徳, 関根和人, 原田正平, 重松陽介: LC/MS/MSを用いた先天性副腎過形成症スクリーニングの確認検査. 第39回医用マススペクトル学会. 千葉市. 2014. 10.

2) 中島英規, 石毛信之, 穴澤 昭, 奥山虎之, 藤本純一郎, 重松陽介, 山口清次, 原田正平. タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの現状と課題 タンデムマススクリーニングにおける second tier test の開発. 第39回医用マススペクトル学会. 千葉市. 2014. 10.

3) 重松陽介, 畑郁江: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの現状と課題 タンデムマス・スクリーニングの診断精度の向上. 第39回医用マススペクトル学会. 千葉市. 2014. 10.

4) 重松陽介: 小児の疾患とカルニチン. 第51回日本小児アレルギー学会. 四日市市. 2014. 11.

5) 田代恭子, 石井宏美, 木下幸恵, 鈴谷由吏, 柳内千尋, 井上かおり, 稲場美佐, 青木久美子, 但馬 剛, 依藤 亨, 重松陽介, 猪口 隆洋, 松石豊次郎, 渡邊順子. 当施設で診断した軽症型プロピオン酸血症7症例の検討. 第41回日本マス・スクリーニング学会. 広島市. 2014. 8.

6) 畑 郁江, 西島節子, 石上 毅, 但馬 剛, 重松陽介: タンデムマス・スクリーニングで発見されたイソ吉草酸血症女児の臨床経過. 第41回日本マス・スクリーニング学会. 広島市. 2014. 8.

7) 中島英規, 前田堂子, 鈴木恵美子, 渡辺倫子, 小須賀基通, 奥山虎之, 重松陽介, 原田正平: 二次検査応用に向けた LC-MS による疾患マーカー分子分離分析系確立. 第41回日本マス・スクリーニング学会. 広島市. 2014. 8.

8) 重松陽介, 畑 郁江: アシルカルニチンプロフィールを参照した脂肪酸酸化異常症スクリーニング陽性判定の重要性. 第41回日本マス・スクリーニング学会. 広島市. 2014. 8.

9) 但馬 剛, 津村弥来, 香川礼子, 岡田 賢, 原圭一, 松本裕子, 栢田紗季, 森岡千代美, 吉井千代子, 佐倉伸夫, 畑 郁江, 重松 陽介: タンデムマス新生児スクリーニング in 広島 自治体事業化後の現状. 第41回日本マス・スクリーニング学会. 広島市. 2014. 8.

10) 藤澤大輔, 中村公俊, 三淵浩, 大浦敏博, 重松陽介, 依藤亨, 笠原群生, 堀川玲子, 遠藤文夫: 日本における有機酸血症の臨床的特徴と管理の現状. 第117回日本小児科学会学術集会. 名古屋市. 2014. 4.

11) 重松陽介: タンデムマス・スクリーニング全国導入の現状と早期診断・治療への期待. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台市. 2014. 11.

12) 石毛信之、渡辺和宏、長谷川智美、世良保美、石毛美夏、大和田操、北川照男：東京都のタンデムマス・スクリーニングにおけるイソ吉草酸家偽陽性例について. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台市. 2014. 11.

13) 中島英規、原田正平、石毛信之、穴澤昭、小須賀基通、藤本純一郎、山口清次、重松陽介、奥山虎之：新生児マススクリーニングにおけるLC-MSによる二次検査法開発. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台市. 2014. 11.

14) 原圭一、但馬剛、小野浩明、岡田賢、佐倉伸夫、畑郁江、重松陽介：日本人初と考えられるメチルマロン酸血症 cb1D 型の 1 歳男児. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 仙台市. 2014. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

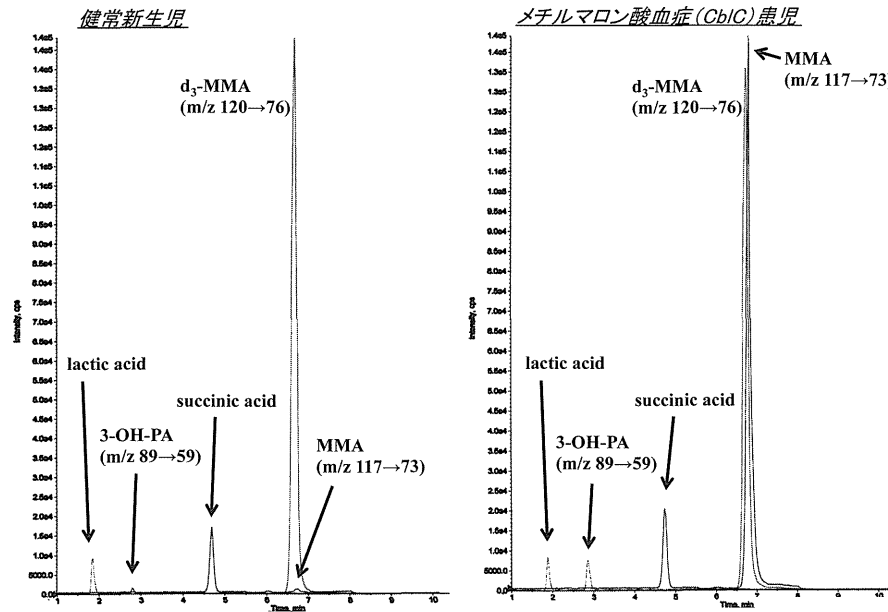


図1 LC-MS/MS (MRM)による濾紙血メチルマロン酸(MMA)と3-ヒドロキシプロピオン酸(3-OH-PA)の測定

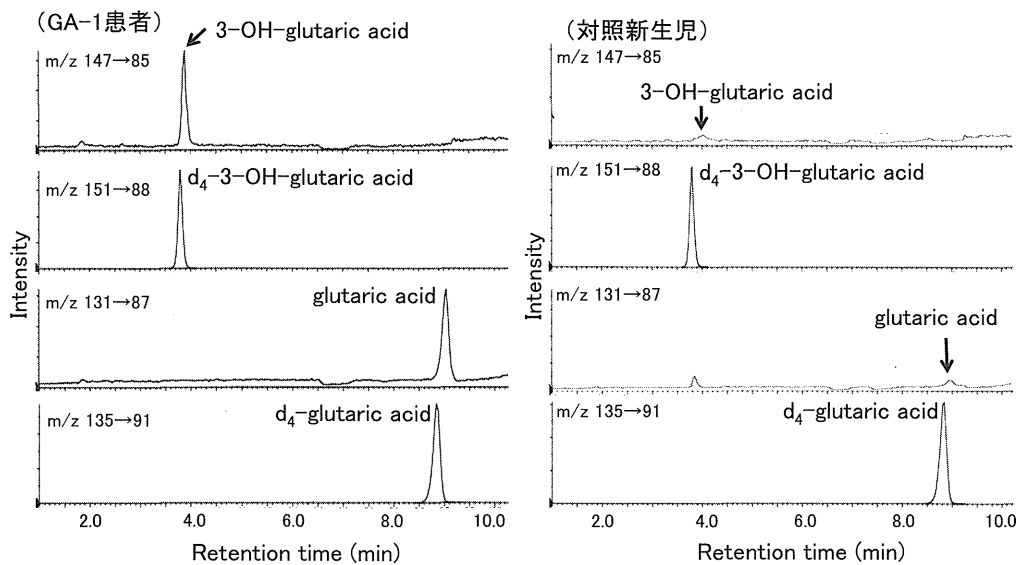


図2 GA-1患者のLC-MS/MS (MRM分析)による化学診断(濾紙血)

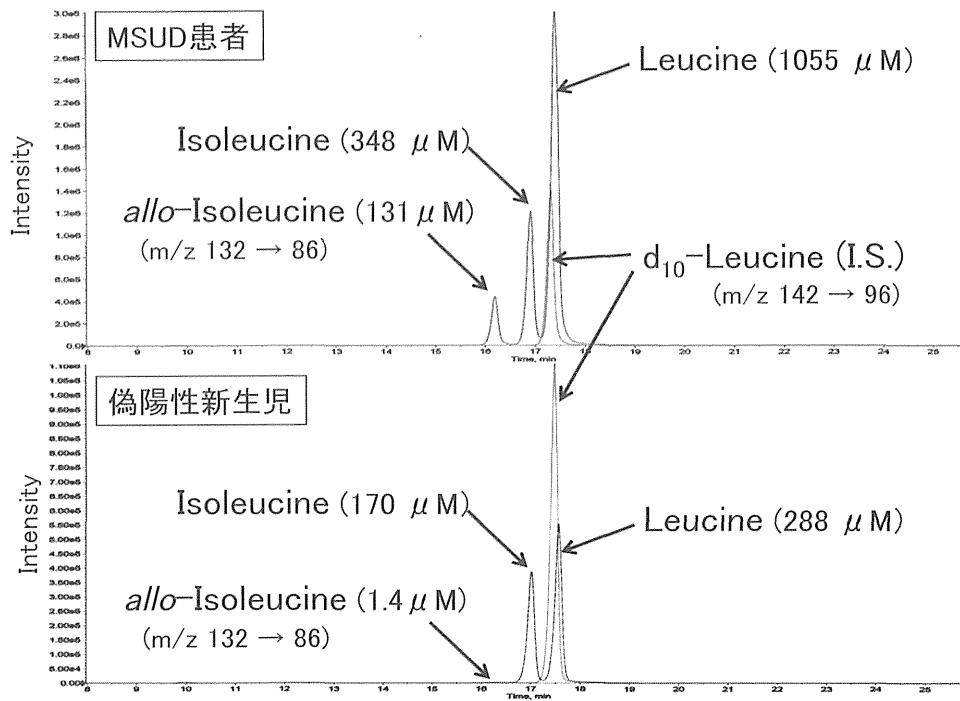


図3: MSUD患者のLC-MS/MS (MRM分析)による化学診断(濾紙血)

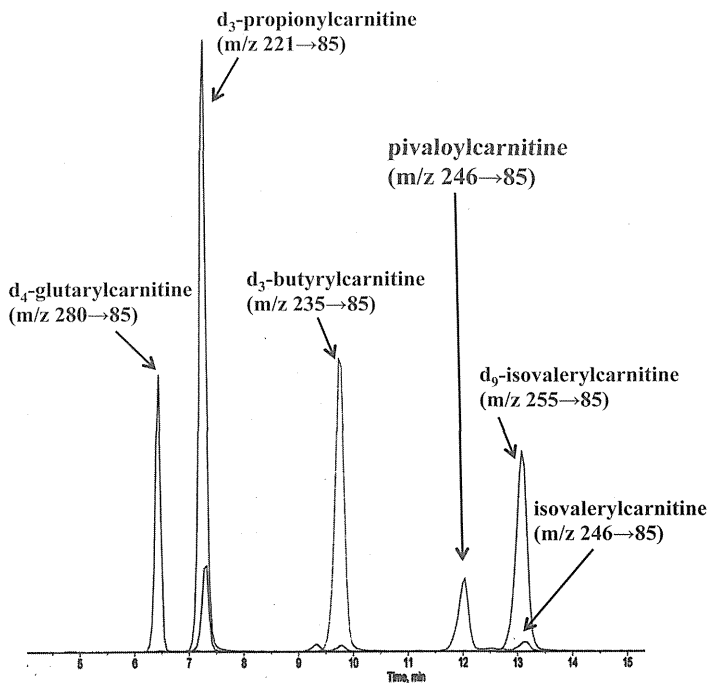


図4: LC-MS/MS (MRM分析) による抗生剤投与新生児濾紙血アシルカルニチン測定

分担研究課題

マススクリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部 教授）

LC-MS による二次検査法開発

研究要旨

本邦では近年、新生児マススクリーニングにおいて質量分析装置の導入が進んだ。このスクリーニングで陽性となった場合、再採血や採尿を行った後、遺伝子検査を行ったり、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）を使った分析などが行われたりしているが、このような検査は全ての施設で行うことは困難であり、診断の迅速化を妨げる原因となっている。このことから精度の高い二次検査法の開発が望まれている。本研究では、全国で用いられている質量分析装置でも導入可能な二次検査法として、本邦で新開発され市販化に成功したマルチモードクロマトグラフィーを用いて、代謝疾患マーカーを分離・定量分析する系の開発を行った。この系では一般の検査施設での一次検査では判別が難しいアミノ酸類やアシルカルニチン類の異性体判別が可能であったことに加え、従来のクロマトグラフィーでは分離困難だった有機酸やそのグリシン抱合体の分析も可能であった。この方法は一般検査施設で導入されている質量分析装置に「カラム」を接続するのみで行うことが可能であることから、診断の迅速化につながるのではないかと期待される。

研究協力者

中島英規（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・研究員）

A. 研究目的

本邦において新生児マススクリーニング（NBS）検査施設で使用されている質量分析装置は、カラムによる分離を行うことが可能な高速液体クロマトグラフィー（HPLC: LC）と三連四重極型質量分析装置（QqQ-MS）が組み合わされた LC-MS が用いられている。しかしながら検査施設では多数の全新生児検体を測定する必要性から、スループット性を上げるためカラム分離を行わず、フローインジェクションという方法で一次検査が行われている。本研究は、診断の迅速化を目指すために

二次検査法としてこれまで GC/MS を用いた分析や、誘導体化しなければ高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分離分析が困難だったアミノ酸、有機酸などの代謝疾患マーカー分子をマルチモードクロマトグラフィーを用いて LC-MS による分離分析系を国内では初めて開発・市販化に成功した。

B. 研究方法

一般に HPLC カラムの充填剤にはシリカゲルやポリマーを担体として表面修飾を行ったものが使用される。最も汎用されるのはシリカゲル表面のシリル基をオクタデシルシリル基（ODS）として修飾された逆相クロマトグラフィーである。このクロマトグラフィーは非常に優秀で、食品、環

境分野ばかりか薬物分析等にも使用される。

現在質量分析装置による NBS では、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常、有機酸代謝異常、脂肪酸代謝異常などが対象疾患であるが、これらの疾患マーカーはその代謝に関わる分子である。逆相クロマトグラフィーはその性質上、脂溶性の高い分子に対しては非常に有効であるが、質量分析装置によるマススクリーニングの対象疾患マーカーは水溶性のものが多く、一般に逆相クロマトグラフィーでは分離分析が困難であり、そのため煩雑な誘導体化方やガスクロマトグラフィーを用いた分析が行われてきた。本研究では Imtakt 社より市販化に成功したマルチモードクロマトグラフィーのカラムを用いた。このカラムはカラム充填剤担体表面を ODS による修飾を行うと同時に、陽イオン交換基、陰イオン交換基で「等価」に修飾したものが充填されている (図 1)。

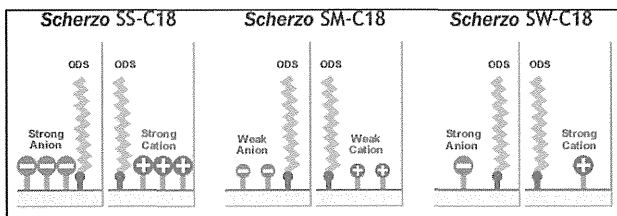


図 1 マルチモード担体表面構造

これまで海外メーカーからは陽イオン交換基あるいは陰イオン交換基いずれかで修飾されたものは市販化されていたが、「等価」に修飾することが非常に困難であり、Imtakt 社によって初めて市販化が成功した。この担体では、逆相クロマトグラフィーの性質と同時にイオン交換クロマトグラフィーの性質を持つことから、逆相クロマトグラフィーでは分離が困難だった様々な代謝疾患マーカーが分離分析することが可能となった。本研究における分離カラムは Imtakt 社製マルチモードカラム Scherzo SS-C18 (3.0 X 150 mm) を用い、グラディエント分離を行った。移動相には A pump: 0.5%ギ酸、B pump: (0.5 M ギ酸アンモニウム/0.5 M アンモニア=9:1)/メタノール=1:9 を用いた。つまり移動相 B へ移行するに従い、有機溶媒濃度を上げて ODS と相互作用する分

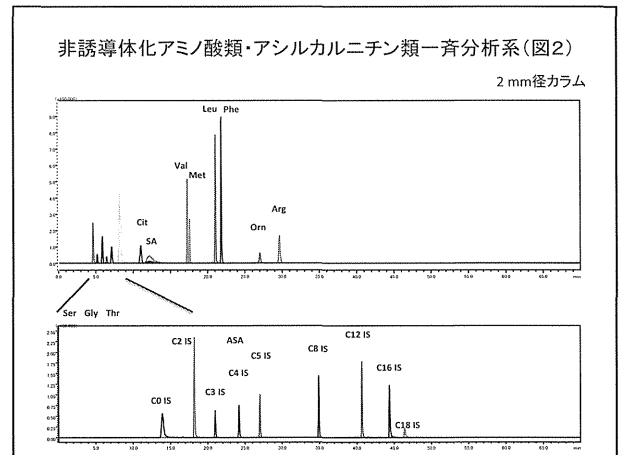
子を分離しつつ、イオン強度を上げてイオン交換基と相互作用する水溶性物質を分離するという方法である。測定対象分子によってグラディエント分析条件は変更した。流速は 0.4 mL/min、カラム温度は 37°C とした。検出には島津 LCMS-8030 を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では主に試薬として市販されている代謝疾患マーカー化合物を分析に用いたため、倫理面への配慮は特段必要ないと判断した。また市販されていない化合物については当研究室内で自己有機合成するか、株式会社ナード研究所から提供を受けた。実際の患者乾燥ろ紙血を用いた分析結果については、東京都予防医学協会石毛信之氏、福井大学医学部健康科学重松陽介教授より提供・実証いただいた。

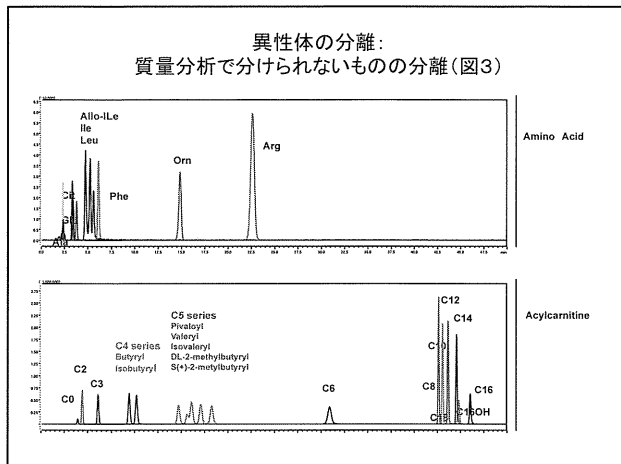
C. 研究結果

一般的な NBS において測定対象となるアミノ酸類・アシルカルニチン類は全て分離可能であった (図 2)。



またこの分離系では、メープルシロップ尿症のマーカー分子で一般の一次検査で行われるカラムを介さないフローインジェクションによる分析では判別が不可能な、アロイソロイシンの分離判別が可能であった。同様な例抗生剤投与時に高値となることで知られるイソバレリルカルニチンの異性体、特にピボシルカルニチンの分離判別

もが可能であった (図3)。



同様な例としてメチルマロン酸血症では、メチルマロン酸が血中で検出されるが、これは TCA サイクルの構成分子であるコハク酸と分子量が同一であるため質量分析装置のみでは判別不可能であるが、このクロマトグラフィーと併用することで分離分析が可能であった (data not shown)。この系では、これら分子ばかりでなく有機酸代謝異常症や脂肪酸代謝異常症でともに異常値を示すグリシン抱合体など他の疾患マーカーも分離分析及び判別定量が可能であった。例えば、プロピオン酸血症のマーカーである Propionylglycine、イソ吉草酸血症のマーカーである Isovalerylglycine、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症のマーカーである Hexanoylglycine、 β ケトチオラーゼ欠損症、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症のマーカーである Tiglylglycine、これと同一分子量のメチルクロトニルグリシン尿症、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症のマーカーである 3-Methylcrotonylglycine なども分離分析可能であったことから判別可能となったと考えられる。

D. 考察

これまでアミノ酸代謝異常症や尿素サイクル代謝異常症で異常値を示すアミノ酸の分析にはアミノ酸に特異な吸光吸収がないため、特異吸光や異性体分離を用意とするため、煩雑で測定値の

不確かさを増大させる要因になる誘導体化法による分析が行われてきた。

本研究によって、この測定値の不確かさ増大要因が極力少なくなる非誘導体化法で既に検査施設に導入されている質量分析装置を用いてアミノ酸の判別が可能となった。特にメープルシロップ尿症で判別が重要なアロイソロイシンに加え、ロイシン、イソロイシンの分離分析が可能になったことは非常に有益であると思われる。マルチモードクロマトグラフィーでは、逆相クロマトグラフィーによるカラム担体との相互作用要因の多様性がこのようなことを可能にしたと考えられる。

同様に検査施設で問題となっているピボキシル含有抗生剤投与時の C5 アシルカルニチン高値とイソ吉草酸血症の C5 アシルカルニチン高値について、その分別判定が可能となったことは再採血率低下に非常に有用と考えられる。

またこれまで有機酸、脂肪酸の分析には誘導体化して GC/MS 分析することが必須であったが、マルチモードクロマトグラフィーによって測定可能なものが増えてくるとと思われる。

また、今回条件決定した移動相、A pump: 0.5% ギ酸、B pump: (0.5 M ギ酸アンモニウム/0.5 M アンモニア=9:1)/メタノール=1:9 を用いれば HPLC の条件変更をするのみでカラム交換等行わずに様々な代謝疾患マーカーの分離・定量分析することが可能になるとと思われる。検査施設の負担を減らす意味でも有用と考えられる。加えて、初回乾燥ろ紙血検体を用いて分析できる点は有利な点であり発展の可能性が高い。

今後、実際の患者検体を用いた実証試験、判定値の決定等必要になって来るとと思われる。また実際に検査施設で二次検査が行われるなら、精度管理体制の構築も必要になって来ると考えられる。

E. 結論

今回開発した方法を用いれば、一次検査で陽性となった検体、つまりこれまでは新生児家族に依

頼して再採血あるいは採尿して遺伝子検査や GC/MS によって診断しなければならなかったような症例でも、初回採取した乾燥ろ紙血検体で LC を併用した LC-MS によって高精度な二次検査法が可能になると考えられる。初回乾燥ろ紙血検体で判定可能になるということは、再採血あるいは採尿時に新生児家族の同意、説明が不要になるので、家族の負担軽減にも役立つ。初回乾燥ろ紙血検体を同一施設内で分析できるので診断の迅速化にもつながることが期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 日本マス・スクリーニング学会 第41回日本マス・スクリーニング学会学術集会、広島県、広島大学広仁会館、平成26年8月22日、23日
- 2) 日本医用マススペクトル学会 第39回年会シ

ンポジウム、千葉県三井ガーデンホテル千葉、平成26年10月16日、17日

3) 日本先天代謝異常学会 第56回日本先天代謝異常学会総会 第12回アジア先天代謝異常症シンポジウム、宮城県、江陽グランドホテル、平成26年11月13日～15日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

株式会社積水メディカルより本成果の一部を応用した新生児マススクリーニングキット「アミノ酸・アシルカルニチン測定用内部標準液セット” NeoSMAAT™” 2015年2月より上市予定

分担研究課題

マスキング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部 教授）

平成 25 年度タンデムマス検査実施状況調査報告について
－内部精度管理の充実に向けた取組み－

研究要旨

日本マスキング学会技術部会が中心となって、タンデムマス（TMS）による新生児マスキング（TMSスクリーニング）の内部精度管理を充実するため、内部精度管理ツールを配布し、平成25年度の各施設の正常値分布およびTMS実施状況の調査を行った。その結果、内部精度管理ツールにより得られたTMSの指標ごと、施設ごとの正常値の分布とカットオフ値の比較や再採血率と精査率などのTMS実施状況の比較により、それぞれの特徴や問題点などが明らかとなり、各施設での適正なカットオフ値の設定に向けて、有用な情報提供が可能となった。今後も継続的に各施設の正常値分布調査を実施するためにはデータベースの構築と解析システムの整備が喫緊の課題である。

研究協力者

花井潤師（札幌市衛生研究所・母子スクリーニング担当課長）

福士 勝（札幌イムノダイアグノスティックラボラトリー・所長）

石毛信之（東京都予防医学協会・主査）

田崎隆二（化学及血清療法研究所・検査総轄）

B. 研究方法

正常値分布の作成には、ヒストグラム作成シート¹⁾を改良し、1回の処理で、26項目の測定指標について、ヒストグラムとともに基礎統計量および集計一覧表を出力することが可能なEXCELのワークシート「一括ヒストグラム作成シート」を作成し、各検査施設に配布した。また、各検査施設から、平成25年度のTMSスクリーニング初回検査結果について、集計一覧表を作成後、技術部会で回収し、別途作成したEXCELワークシート「集計・解析シート」により解析を行った。さらに、平成25年度TMSスクリーニング実施状況として、初回検査件数、再採血数、精査数、発見患者数などの調査を行った。また、月別の測定値分布の確認のための「月別集計シート」を配布した(図1)。

A. 研究目的

タンデムマス・スクリーニング（TMSスクリーニング）では、検査する指標が多種類であるとともに、タンデムマス検査機器の影響により測定値が変動しやすいことから、各検査施設における内部精度管理が極めて重要である。日本マスキング学会技術部会では、各施設の内部精度管理の充実に向けて、内部精度管理ツールを配布するとともに、平成25年度の各施設の正常値分布およびTMSスクリーニングの実施状況の調査を行い、現状と課題について検討した。

C. 研究結果

1) 正常値分布調査

41 施設中 34 施設 (83%) から回答があった。

正常値分布調査では、各施設から、各指標の 1, 10, 50, 90, 99 パーセントイル(%)値を集計一覧表を用いて回収した。集計結果は、「集計・解析シート」を用いて、各指標の箱ひげ図として表した(図2)。また、タンデム機器、内標・キットなどの測定条件、カットオフ値、99%値により、ソートすることで、指標ごとの特徴を把握することが可能であった。

解析の結果、Leu+Ileu、C3、C3/C2、C5-DCにおいて、カットオフ値と99%値との関係から、カットオフ値の設定が適正ではない施設があることが確認された。また、C8/C10、C14:1/C2比において、ばらつきが大きい施設が確認された。

2) TMS 検査実施状況調査

(1) 一次疾患全体の集計結果

41 施設中 33 施設 (80%) から回答があった。

初回検査件数は、全施設合計で 872,085 件であった。一次疾患の全施設合計は、再採血数 3,386 件 (0.39%)、即精査数 155 件 (0.018%)、再採血後精査数 253 件 (0.029%)、総精査数 408 件 (0.047%) であった。また、発見患者数は 54 例で発見頻度 1:16,150 であった(図3)。また、二次疾患群での全施設合計は、再採血数 939 件 (0.13%)、即精査数 23 件 (0.003%)、再採血後精査数 49 件 (0.006%)、総精査数 72 件 (0.008%) であった。また、発見患者数は 14 例で発見頻度 1:62,292 であった(図4)。

各施設ごとの集計結果(図5)において、再採血率が0.6%を上回ったのは8施設であった。また、総精査率が0.1%を上回ったのは4施設であった。

(2) 一次疾患検査指標の施設別結果

C5:一部の施設で即精査率が高い。

C5-OH:再採血から精査になる割合が高い。

C14:1:総精査率が高い施設は、再採血せずに即精査としている施設である。

C0/(C16+C18):総精査率が高い施設で、カットオフ値が低い傾向がある。

D. 考察

「集計・解析シート」を用いて、各指標の正常値の分布について、箱ひげ図を用いて比較することにより、タンデムマス検査における以下の解析が可能となった。

- ① カットオフ値と99%値との関係の比較によるカットオフ値の適正さの確認
- ② 箱ひげ図の分布の幅の比較による測定値のばらつきの度合い(精密度)の確認
- ③ 中央値の比較により、測定値の正しさ(正確度)の確認

これらの解析により、いくつかの指標において、カットオフ値の設定が適正でない施設やばらつきの多い施設が複数存在することが確認された。現時点では、TMSスクリーニングを開始したばかりの施設も含まれており、検査の熟練度が増すことにより、施設間差も軽減されることが予想される。今回行った調査を、毎年継続的に行うことにより、検査精度の均質化を図ることが可能と思われる。さらに、今回配布した内部精度管理ツールを活用し、毎日、毎月、半年ごとなど定期的に自施設の検査データの分布を確認することが極めて重要であることが確認された。

TMS検査実施状況の調査結果では、一次疾患の全施設合計の再採血率は0.39%であり、厚労省研究班で作成したタンデムマスQ&A²⁾での、再採血率の目安0.1%から0.6%に収まっており、全体平均では、適正な精度でTMSが行われていることが示唆された。また、総精査率については0.047%となっており、各疾患のPPVから推定される適正な精査率0.05%の範囲³⁾となっていた。しかしながら、施設ごとの集計結果では再採血率や総精査率が高い施設が散見されており、各施設での正常値分布や内部精度管理の結果などから、カットオフ値の適正さを評価し、その原因を推定する必要性が確認された。

一次疾患検査指標の施設別の結果からは、タンデムマス検査やカットオフ値設定が原因と推定

された再採血率等の高値の他に、検査以外が原因と推定される再採血等の高値が確認された指標があった（ピボキシル基含有薬剤による C5 偽陽性、低体重児による C5-OH 高値の遷延など）。

E. 結論

TMS スクリーニングは、これまでのスクリーニングと比べ、各施設での内部精度管理が重要となる。各施設では、今回配布した内部精度管理ツールを利用して、定期的な検査データの確認を行うとともに、全国集計結果との比較を行うなど、自施設の現状を詳細に分析することにより、各施設におけるカットオフ値の適正さの確認が可能となった。今後も継続的に各施設の正常値分布調査を実施するためにはデータベースの構築と解析システムの整備が喫緊の課題である。

G. 研究発表

1. 学会発表

1) タンデムマス・スクリーニングにおける精度管理の現状と今後の課題ー内部精度管理の充実に向けた取組みー. 日本マススクリーニング学会, 広島県広島市, 2014/8/22-23.

引用文献

- 1) 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ー各指標の施設間差の検討ー, 日本マス・スクリーニング学会誌, 22(1), 49-60, 2012.
- 2) 山口清次: タンデムマスの検査精度は?. 新しい新生児マススクリーニング タンデムマス Q&A 2012. 厚生労働科学研究(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業), 出雲市, 2012, P14.
- 3) 花井潤師, 吉永美和, 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(2)ー患者データ, 再採血率, 精査率から考えるー, 日本マス・スクリーニング学会誌, 23(1), 61-67, 2013.

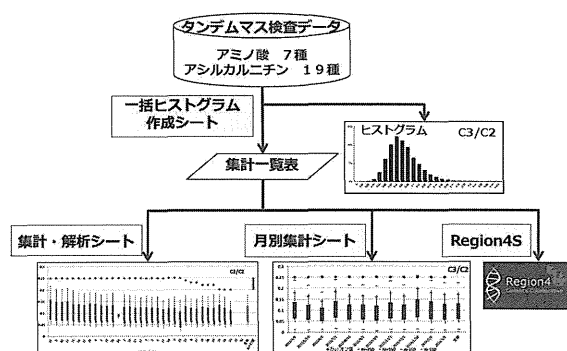


図1 タンデムマス検査用 内部精度管理ツールの関連性

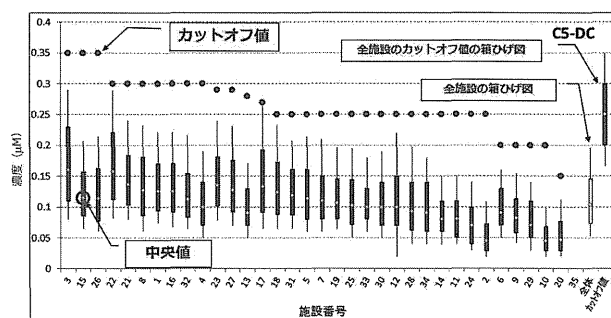
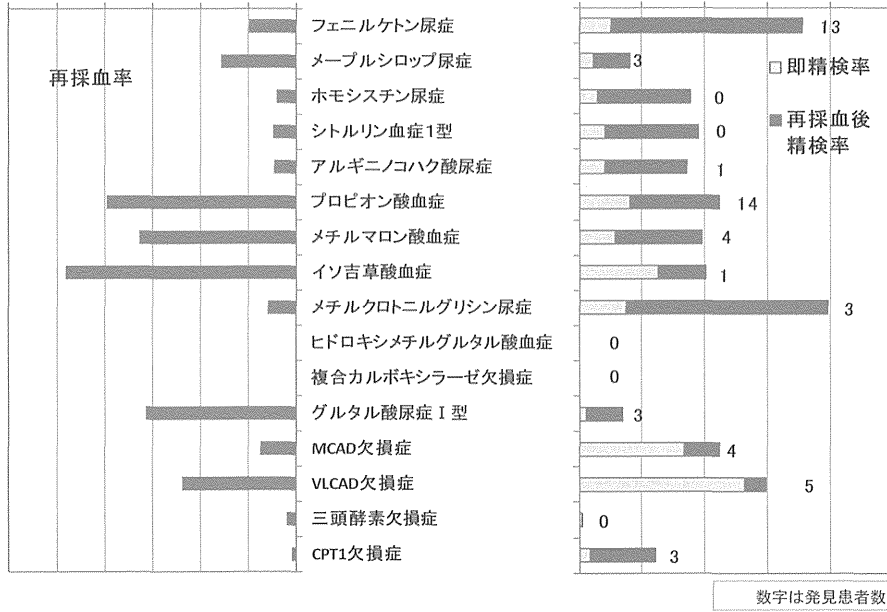


図2 正常値分布調査 集計チャート出力例 (C5-DC, カットオフ値ソート結果)

0.12% 0.10% 0.08% 0.06% 0.04% 0.02% 0.00%

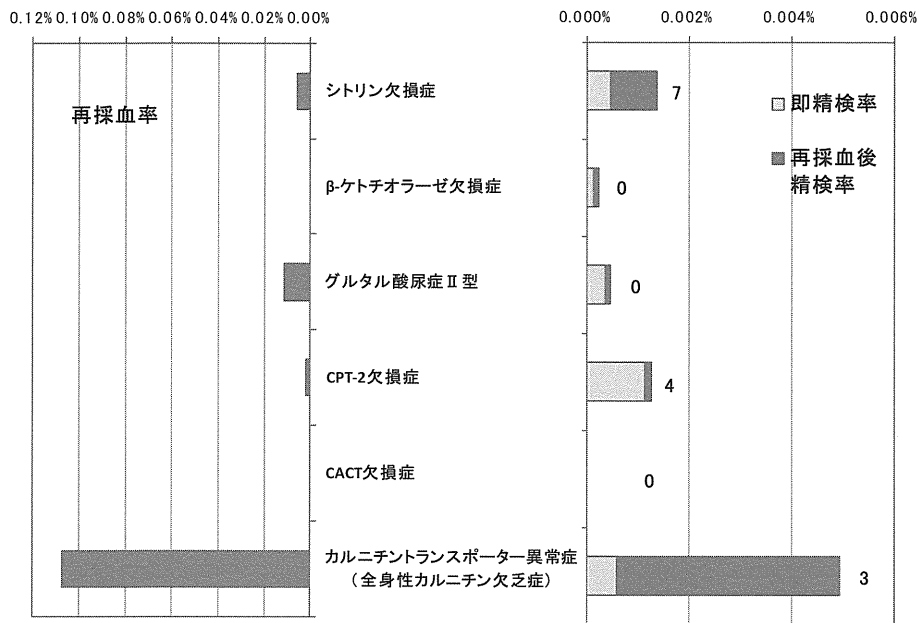
0.000% 0.002% 0.004% 0.006% 0.008% 0.010%



数字は発見患者数

項目	カットオフ値	初回検査		陽性数	再採血数	即精検数	再採血後精検数	総精検数	発見患者数	陽性率	再採血率	即精検率	再採血後精検率	総精査率	発見頻度	PPV
		初回検査	即精査													
フェニルケトン尿症	Phe	138.64	476.87	241	172	9	53	62	13	0.03%	0.020%	0.001%	0.006%	0.007%	1: 67,083	20.97%
メーブルシロップ尿症	Leu+Ile	345.61	532.87	1,785	274	4	10	14	3	0.20%	0.031%	0.000%	0.001%	0.002%	1: 290,695	21.43%
ホモシスチン尿症	Met	68.64	178.37	103	73	5	26	31	0	0.01%	0.008%	0.001%	0.003%	0.004%	-	-
シトルリン血症1型	Cit	77.30	260.91	148	87	7	26	33	0	0.02%	0.010%	0.001%	0.003%	0.004%	-	-
アルギニノコハク酸尿症	Cit	76.91	259.50	136	80	7	23	30	1	0.02%	0.009%	0.001%	0.003%	0.003%	1: 872,085	3.33%
プロピオン酸血症	C3	3.82	7.27	10,515	691	14	25	39	14	1.21%	0.079%	0.002%	0.003%	0.004%	1: 62,292	35.90%
メチルマロン酸血症	C3/C2	0.24	0.23	622	570	10	24	34	4	0.07%	0.065%	0.001%	0.003%	0.004%	1: 218,021	11.76%
イソ吉草酸血症	C5	1.00	4.27	880	841	22	13	35	1	0.10%	0.096%	0.003%	0.001%	0.004%	1: 872,085	2.86%
メチルクロトニルグリシン尿症		0.98	1.88	123	105	13	56	69	3	0.01%	0.012%	0.001%	0.006%	0.008%	1: 290,695	4.35%
ヒドロキシメチルグルタル酸血症	C5-OH	0.96	1.50	119	0	0	0	0	0	0.01%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	-	-
複合カルボキシラーゼ欠損症		0.96	2.00	118	0	0	0	0	0	0.01%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	-	-
グルタル酸尿症 I 型	C5-DC	0.27	0.13	1,172	547	2	10	12	3	0.13%	0.063%	0.000%	0.001%	0.001%	1: 290,695	25.00%
MCAD欠損症	C8	0.29	0.48	383	131	29	10	39	4	0.04%	0.015%	0.003%	0.001%	0.004%	1: 218,021	10.26%
VLCAD欠損症	C14:1	0.36	0.75	531	413	46	6	52	5	0.06%	0.047%	0.005%	0.001%	0.006%	1: 174,417	9.62%
三頭酵素欠損症	C16-OH	0.07	0.22	212	34	1	0	1	0	0.02%	0.004%	0.000%	-	0.000%	-	-
CPT1欠損症	C0/(C16+C18)	79.10	25.00	30	18	3	18	21	3	0.00%	0.002%	0.000%	0.002%	0.002%	1: 290,695	14.29%
全体	2013年度検体数	872,085		36,117	3,386	155	253	408	54	4.14%	0.39%	0.018%	0.029%	0.047%	1: 16,150	13.24%

図 3. タンデムマス検査 平成 25 年度 疾患別集計結果 (一次疾患)



数字は発見患者数

項目	カutoff値	初回検査	即精査	陽性数	再採血数	即精検数	再採血後精検数	総精検数	発見患者数	陽性率	再採血率	即精検率	再採血後精検率	総精査率	発見頻度	PPV
シトリン欠損症	Cit	65.36		178	51	4	8	12	7	0.02%	0.006%	0.000%	0.001%	0.001%	1:124,584	58.33%
β-ケトチオラーゼ欠損症	C5-OH	0.92		132	6	1	1	2	0	0.02%	-	-	-	-	-	-
グルタル酸尿症 II 型	C8	0.29		323	104	3	1	4	0	0.04%	0.012%	0.000%	0.000%	0.000%	-	-
CPT-2欠損症	(C16+C18:1)/C2	0.47	0.81	121	21	10	1	11	4	0.01%	0.002%	0.001%	0.000%	0.001%	1:218,021	36.36%
CACT欠損症	C16	3.11	6.67	85,883	0	0	0	0	0	9.85%	-	-	-	-	-	-
カルニチントランスポーター異常症 (全身性カルニチン欠乏症)	C0	7.72	3.33	2,569	939	5	38	43	3	0.29%	0.108%	0.001%	0.004%	0.005%	1:290,695	6.98%
全体	2013年度検体数	872,085		90,160	1,121	23	49	72	14	10.34%	0.13%	0.003%	0.006%	0.008%	1:62,292	19.44%

図 4. タンデムマス検査 平成 25 年度 疾患別集計結果 (二次疾患)

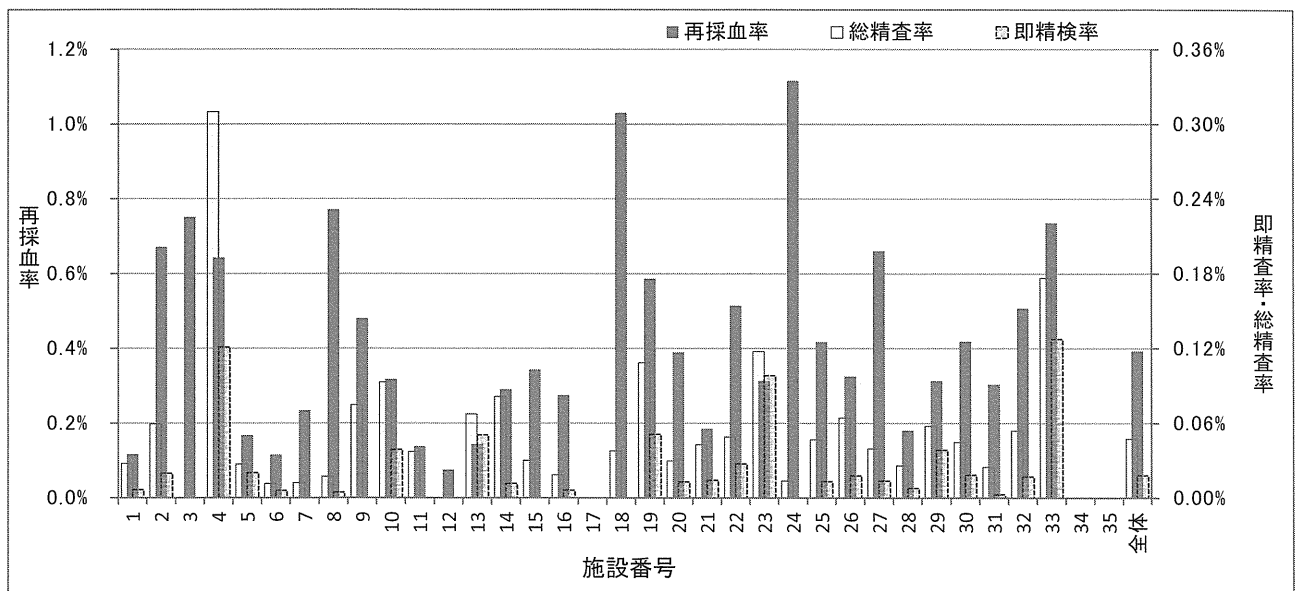


図 5. タンデムマス検査 平成 25 年度 施設別集計結果 (一次疾患)

分担研究課題

マススクリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部 教授）

タンデムマス・スクリーニング発見患者調査について

研究要旨

日本マススクリーニング学会技術部会と連携して、2012年度と2013年度のタンデムマス（TMS）スクリーニング精査例について、全国のTMSスクリーニング検査施設41施設と対象に精査例の調査を行った。その結果、34施設（82.9%）から回答があり、二年間で総検査数1,337,911名の新生児を検査して129例の患者が発見されたことが判明した。また、今回初めて、これらの患者ならびに偽陽性例の初回検査データが集約された。国内患者の初回検査データを欧米諸国のデータと比較すると、各疾患の指標の分布やカットオフ値は必ずしも一致しないことが明らかになった。したがって、本スクリーニングの判定基準の適正化による検査精度向上を試みるには、日本国内の患者および偽陽性例の検査データについて、継続的な集約体制とデータベースの構築、ならびにその解析手法の確立が必須であることが示された。

研究協力者

石毛信之（東京都予防医学協会・主査）
花井潤師（札幌市衛生研究所・課長）
福士 勝（札幌イムノダイアグノスティックラ
ボラトリー・所長）
田崎隆二（化学及血清療法研究所・検査総轄）

度、疑われた疾患名、精査結果、確定診断名、初回検査データの調査を行った。記入フォームはe-mailで送付し、分担研究者宛に返信することを依頼した。

C. 研究結果

A. 研究目的

わが国のタンデムマス・スクリーニング（TMS スクリーニング）の精度向上を目的として、日本マススクリーニング学会技術部会と連携し、全国のTMS検査機関を対象に2012と2013年度の発見患者調査を行った。

B. 研究方法

全国のスクリーニング検査施設41施設にデータの記入フォームを送付し、2012年度と2013年度における本法の全精査例について、精査依頼年

41施設中34施設（82.9%）から回答があり、二年間で総検査数1,337,911名の新生児を検査して129例の患者が発見された（発見頻度：1/10,400）ことが判明した（表1）。2012年度～2013年度に発見された疾患の発見頻度は、発見患者数が多かった疾患では以前に行われたパイロットスタディで得られた頻度とほぼ同様であった（表2）。

次に、発見患者の初回検査データと偽陽性例のデータを、日本マススクリーニング学会技術部会で2013年度に実施した正常値分布調査の集計チャートにプロットした（図1、添付資料）。患者と偽陽性例の初回検査データを比較すると、カットオフ値付近で同等の値を示す例が多い疾患もあ

った。プロピオン酸血症・メチルマロン酸血症では、指標が比較的高値であっても偽陽性と診断されている例も少なくなかった。低出生体重児の C5-OH 高値遷延例など検査精度以外の要因で指標が高値を呈する例が多い疾患ではカットオフ値のみで患者と偽陽性例を区別することは困難であった。

一方、今回集約したデータと欧米諸国の集約データベース (Region 4 Stork、<http://www.clir-r4s.org/>) における各疾患の指標の分布ならびに適正カットオフ値範囲 (Target Range) を比較すると、いずれの指標においても、国内の現状と必ずしも一致しないことが明らかとなった (図 2)。

D. 考察

わが国と欧米では人種的な差異に加えて、採血日齢の差もあるので、初回検査データには差が生じうると考えられる。TMS スクリーニングの判定基準の適正化による検査精度向上のためには、日本国内の患者・偽陽性例の検査データを詳細に解析する必要がある。

E. 結論

わが国のタンデムマス・スクリーニングの検査

精度向上のためには、日本国内の患者・偽陽性例の検査データを集約するデータベースならびに解析システムの構築と、継続的なデータ集約体制の構築が必須であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 新生児乾燥ろ紙血 C5 高値例の LC-MS/MS 法による 2 次検査法の検討. 日本マススクリーニング学会, 広島県広島市, 2014/8/22-23.

2) Newborn screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry on over 300,000 babies in Tokyo, Japan. Innsbruck, Tyrol, Austria, 2014/9/2-5.

3) 東京都のタンデムマス・スクリーニングにおけるイソ吉草酸血症偽陽性例について. 日本先天代謝異常学会, 宮城県仙台市, 2014/11/13-15.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。