

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）

東京都における LC-MS/MS 法を用いたイソ吉草酸血症の二次検査法の検討

研究協力者 石毛信之（東京都予防医学協会・主査）

研究要旨

タンデムマス質量分析計による新生児スクリーニングの対象疾患の一つのイソ吉草酸血症 (IVA) では、新生児期に使用した薬剤の影響で多くの偽陽性が生じることが知られている。本会では、IVA の偽陽性低減を目的として液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS 法) を用い、その有効性の評価を試みた。その結果、本年度 4 月から 9 月までに IVA 疑いで要再採血または要精査となった 40 例のうち 36 例 (90%) を初回検査で偽陽性として除外することが可能であり、実際の再採血または精査の結果（正常）と全例一致した。本法は、不要な再採血ならびに精査を減少させ、再度の検査に関連する費用や時間ならびに受検者家族の心的負担を軽減することが可能である。

研究協力者

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）

いた LC-MS/MS 法（表 1）でイソバレリルカルニチン (IVC)、PI 含有薬剤使用によって生じるピパロイルカルニチン (PC)、そして IVA 患者で検出されるイソバレリルグリシン (IVG) を定量した。

C．研究結果

IVA 患者の紙血を本法を用いて分析した LC-MS/MS クロマトグラムを図 1、定量データを表 2 に示した。本症患者では PC は検出されず、IVC ならびに IVG の著明な高値が認められた。正常対照では PC、IVG はいずれも検出されなかった。

2012 年 4 月から 2015 年 3 月までに IVA 疑いで要精査となった 14 例では、全例で IVC はカットオフ値 (C5 アシルカルニチン 1.0nmol/mL) 未満であったが PC の著しい高値を認め、IVG は検出されなかった。これは本会にて尿中有機酸分析を行った全例 (14 例中 13 例) の精査結果 (3HIVA、IVG ともに排泄増加を認めず) と一致し (表 3)、尿中有機酸分析を行っていない 1 例 (No.8) も精査受診時の紙血は C5 < 1.0nmol/mL と正常であった。したがって、14 例全例が初回の紙血を用いた

A．研究目的

LC-MS/MS 法の導入で、ピボキシル基 (PI) 含有薬剤使用を原因としたイソ吉草酸血症 (IVA) の偽陽性例の検出が可能であることは知られており、すでに我々も報告している。今回、本法を東京都における新生児マススクリーニングに試験的に運用してその有効性を評価することを目的とした。

B．研究方法

2012 年 4 月から 2015 年 3 月までに IVA 疑いで要精査となった 14 例、IVA 患者 2 例 (有症状例)、そして 2015 年 4 月以降の IVA 疑いの再採血ならびに精査例 40 例を対象とした。これらの紙血を、分離カラムに Scherzo SS-C18 (Imtakt) を用

LC-MS/MS 法によって薬剤性の偽陽性と判定可能と考えられた。

2015年4月から9月までのIVA疑いの再採血ならびに精査例の初回ろ紙血の9割(40例中36例)ではPCが検出され(90%)、薬剤性の偽陽性と判定可能であった。なお、これら40例は再採血または精査時にろ紙血C5値または尿中有機酸分析によって全例正常と判定され、二次検査による判定結果と一致した(表4)。

D. 考察

わが国のタンデムマス・スクリーニングの疾患別の偽陽性率ならびに精査率、そして要精査例のスクリーニング時の測定値は、本研究班と日本マススクリーニング学会技術部会が連携して調査されている¹⁻²⁾。これらの調査によると、2014年度の調査(2013年度の成績)ではイソ吉草酸血症の再採血率はそれぞれ0.10%、0.003%と他疾患と比較して高いが、再採血後の精査率は低かった(0.001%)。一方、患者は1例しか発見されなかったため、PPVは2.86%と2013年度に本スクリーニングで発見された先天代謝疾患の中では最も低かった。本疾患の偽陽性発生の主な原因には、国内外で多く報告されているPI含有薬剤(PI含有抗菌薬ならびにシベレスタットナトリウム)の新生児または母体への使用が推測される³⁾。PI含有抗菌薬の使用制限は、検査受託自治体内の産科医療機関へ依頼するなど各地域ごとに取り組みられているが、全国的には現在もIVA偽陽性例が著しく多いことが本調査から示されている。

今回検討したLC-MS/MS法を実際に二次検査法として試験的に導入することによって、東京都ではC5高値例の90%が薬剤に起因する偽陽性例として除外可能であった。二次検査法によって偽陽性例を除外することにより、再採血または精査に付随する費用削減ならびに医療機関を再度受診する受検者家族の心的・経済的負担を軽減することが可能と考えられた。一方、本法によってIVAが強く疑われた場合には、早期の医療介入が可能となるので、患者予後の向上にも寄与し、検査精

度の向上に貢献すると思われた。

E. 結論

イソ吉草酸血症疑い再採血ならびに要精査例のうち、PI含有薬剤の影響による偽陽性例は本法によって容易に検出可能であり、本法を正式に導入することで不要な再採血を防止することが可能と考えられ、日常検査への導入が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 花井潤師, 福士 勝, 石毛信之, 他: 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 - . 平成26年度厚生労働科学研究費補助金(育成疾患克服等次世代育成基盤研究事業(健やか次世代育成総合研究事業))「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 71-75, 2015.

2) 石毛信之, 花井潤師, 福士 勝, 他: タンデムマス・スクリーニング発見患者調査について. 平成26年度厚生労働科学研究費補助金(育成疾患克服等次世代育成基盤研究事業(健やか次世代育成総合研究事業))「マススクリーニング検査精度向上に関する研究」分担研究報告書, 76-79, 2015.

3) Kenji Yamada, Hironori Kobayashi, Ryosuke Bo, Tomoo Takahashi, Yuki Hasegawa, Makoto Nakamura, Nobuyuki Ishige, Seiji Yamaguchi: Elevation of pivaloylcarnitine by sivelestat sodium in two children. *Mol. Genet. Metab.*, 116, 192-194, 2015.

2. 学会発表

1) 東京都におけるLC-MS/MS法を用いたイソ吉草酸血症の二次検査法の検討. 日本先天代謝異常学会, 大阪府大阪市, 2015/11/12-14.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1. LC-MS/MS による C5 アシルカルニチン異性体分離ならびにイソバレリルグリシン定量法

MS/MS, LC	MS/MS:TQ Detector, LC: Alliance2795 (Waters)	LC条件		
分離カラム	Imtakt Scherzo SS-C18 両性イオン交換ODSカラム: 150 x 3mm、3µm	(min)	Solvent A(%)	Solvent B(%)
移動相		0.00	100	0
Solvent A	0.5% ギ酸水溶液	0.10	90	10
Solvent B	(500mM ギ酸アンモニウム / 500mM アンモニア水 = 9/1) / メタノール = 10/90	15.00	0	100
		15.10	100	0
		25.00	100	0

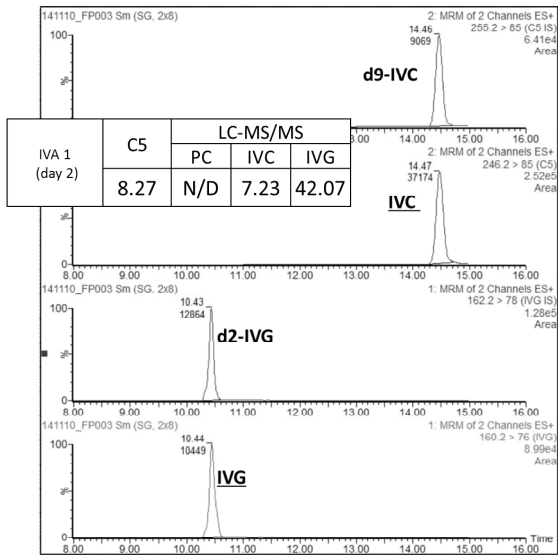


図 1. IVA 患者の LC-MS/MS クロマトグラム

表 2. IVA 臨床発症例とその同胞のろ紙血の分析結果

症例	FIA (nmol/mL)	LC-MS/MS (nmol/mL)			尿中有機酸分析結果
	C5	IVC	PC	IVG	
1 (day 2)	8.27	7.23	N/D	42.07	
2 (day10)	7.06	8.31	N/D	129.64	3HIVA (↑↑)
(3m)	0.89	1.32	N/D	0.55	IVG (↑↑)
(1y)	4.90	3.86	N/D	1.87	
症例2の同胞例 (day 6)	0.24	0.25	N/D	N/D	3HIVA (-) IVG (-)

FIA : フローインジェクション分析

3HIVA: 3-ヒドロキシイソ吉草酸 IVG: イソバレリルグリシン

PC: ピパロイルカルニチン IVC: イソバレリルカルニチン

表 3. 東京都における 2013-2014 年度の IVA 疑い精査 14 例の FIA、LC-MS/MS ならびに GC/MS 分析結果

精査例No	FIA (nmol/mL)	LC-MS/MS (nmol/mL)					尿中有機酸分析結果*	PI含有薬剤
	C5	IVC	PC	IVC+PC	IVG			
1	9.89	0.31	8.63	8.93	0.01		A	
2	6.68	0.15	5.84	5.99	0.02		S	
3	3.10	0.14	3.89	4.03	0.02		S	
4	2.95	0.18	3.63	3.81	N/D		S	
5	8.05	0.15	7.36	7.51	0.02		A	
6	4.23	0.12	4.41	4.52	0.01		S	
7	3.97	0.38	4.10	4.49	0.02	3HIVA (-)	S	
8	4.00	0.14	4.30	4.44	0.02	IVG (-)	A	
9	5.57	0.12	5.66	5.79	0.01		S	
10	4.00	0.13	4.48	4.61	0.01		S	
11	3.58	0.16	4.29	4.45	0.03		A	
12	2.04	0.11	1.98	2.09	0.03		A	
13	3.17	0.14	4.40	4.53	0.06		A	
14	6.87	0.52	5.03	5.54	N/D		A	
mean	4.86	0.20	4.86	5.05	0.02			
SD	2.24	0.12	1.63	1.66	0.01			

A: PI 含有抗菌薬
S: シベスタットナトリウム

*: 精査例 No8 は尿中有機酸分析実施せず、精査受診時のろ紙血で C5 の正常化が確認された。

表 4. IVA 疑いの再採血ならびに精査例の検査成績

初回検査におけるC5 上昇例数	40 (0.08%) (内訳: 要再採血数: 38 即精査数: 2) mean ± SD(range) : 1.79 ± 1.17 (1.01-7.08)
再採血検査または精 査受診時におけるC5 上昇例数	1/40 mean ± SD(range) : 0.45 ± 0.15 (0.17-1.37)
要精査例の尿中有機酸 分析結果 (n = 1, 精査時C5 1.37)	異常なし (3HIVA (-), IVG (-))
上記40例のLC-MS/MSによる二次検査結果	
ピバロイルカルニチン陽性例	36 (90.0%) (内訳: 要再採血数: 34 即精査数: 2)
イソバレリルグリシン上昇例 (IVG>0.50)	0