

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 客員教授）

研究要旨

日本マスキング学会（学会）技術部会によるタンデムマス・スクリーニング実施状況調査では、事業化当初に比べ再採血率が減少し、想定通りの数の対象患者が発見されていたものの、カットオフ値の設定や再採血率の点での改善を要すると考えられる検査施設も見られた。外部精度管理システムの検討が進み、学会の定めた検査施設基準に基づく精度管理を実施出来る体制が整った。運用を更に深化させ意義ある精度保証体制となるように検討がすすんでいる。これまでに経験した見逃し例を含めた対象疾患患者のスクリーニング指標データを収集した上で、見逃しが生じないようなスクリーニング指標およびカットオフ値の改善に取り組み、LC-MS/MS法を用いた二次検査法を更に改良した。今後、二次検査法の導入に向けた取り組みが重要であることを指摘した。

研究協力者

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・准教授）

A．研究目的

タンデム型質量分析計を用いた先天性代謝異常症等検査（タンデムマス・スクリーニング）が自治体事業として全国実施されているが、自治体より委託された検査施設（指定検査施設）での分析技術や対象疾患病態理解に基づいた対応は未だ改善が必要な状況である。これに対して、日本マスキング学会（以下、「学会」と成育医療研究センター・マスキング研究室（以下、「マス研」）が精度管理や実務研修などの事業を行っており、精度管理については 2015 年 3 月に新生児スクリーニング精度管理合同委員会（以下「NBS 合同委員会」）が設置され、協議が行われている。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、新たなスクリーニ

ング精度保証技術（second-tier test：初回濾紙血を用いた“二次検査法”）を開発してきた。前年度までの研究成果を踏まえ、引き続き以下の課題を検討した。

学会技術者部会を通じて、指定検査施設の分析データを収集し、スクリーニング指標とカットオフ値が機能しているかを確認する。

指定検査施設での分析精度を向上させるため、施設基準で規定された精度を評価できる外部精度管理法論を学会技術者部会やマス研と NBS 合同委員会の場で検討する。

指定検査施設での再採血検査率のデータなどを踏まえ、偽陽性率を低減させるためのスクリーニング指標やカットオフ値を再検討する。新規指標とそのカットオフ値を適用した場合に生じる再採血率増加に対応するため更に二次検査法を開発し、患者検体を用いてその有用性を検証する。

B．研究方法

(1-1)検査施設の検査実施状況調査（研究協力者・花井の報告書「タンデムマス検査実施状況調査報告（平成 27 年度検査結果）」に詳述）

(1-2)検査施設の正常新生児検査値分布と発見

患者データに基づくカットオフ値の検証（研究協力者・花井の報告書「タンデムマス検査データ Web 解析システムの有用性について」に詳述）

(2)学会検査施設基準適合レベルを検証できる外部精度管理法の開発（研究協力者・福士の報告書「新生児スクリーニングの検査精度向上に寄与する外部精度管理の検討」に詳述）

(3)脂肪酸酸化異常症のスクリーニング指標の見直し

分担研究者が関与している検査施設での偽陽性率の分析データを中心とし、成育医療研究センターの但馬剛分担研究者の酵素活性測定データも加えて、指標の妥当性を検討した。

(4)二次検査法の有用性の検討

花井研究協力者を中心とした学会技術者部会が収集した再採血率や精密検査率から二次検査の必要度を判定した。福井大学小児科でのタンデムマス・スクリーニングおよびハイリスクスクリーニングにおけるアシルカルニチン分析法および LC-MS/MS 二次検査法は既報の通りである。東京都予防医学協会での LC-MS/MS 二次検査については研究協力者・石毛の報告書「東京都における LC-MS/MS 法を用いた二次検査法の検討(第二報)」に詳述されている。

C. 研究結果

(1-1)検査施設の検査実施状況調査（研究協力者・花井の報告書に詳述）

(1-2)検査施設の正常新生児検査値分布と発見患者データに基づくカットオフ値の検証（研究協力者・花井の報告書に詳述）

(2)学会検査施設基準適合レベルを検証できる外部精度管理法の開発（研究協力者・福士の報告書に詳述）

昨年度の NBS 合同委員会における外部精度管理検討課題は、各検査施設からの分析生データを収集する目的を明確にし、簡潔で適切な方法を確立する。各検査施設の分析精度を確認できる検査用濾紙血を作成し、分析値の統計学的評価法を模索することであった。

については、検査施設での検査精度に問題が生じている場合に何が問題なのかを指摘できるデータの収集が目的であることを確認した。そのための Web データ収集システムにおいては、必要な項目のみのデータ収集とすることで作業負担を最小限とするよう改良された。

については、スクリーニング指標のカットオフ値レベルの濃度についての分析精度を重視すること、そのために必要な標品無添加で指標物質濃度が充分低い合成血を作成出来る機関に検査用濾紙血作成を委託することとした。検査用濾紙血の指標濃度レベルについては研究協力者の報告書を参照されたい。このような検査用濾紙血を作成出来たので、その分析により、低濃度レベルでの CV による精度評価、また検量線作成などによる施設間差の評価と標準化の可能性が検討できることになった。

(3)脂肪酸酸化異常症スクリーニング指標の見直し

表 1 に見直し内容を示した。詳細は重松らの論文³⁾を参照されたい。

VLCAD 欠損症と MCAD 欠損症については、既報^{S1)}に示したとおりの再採血率の高さを背景に見直されており、但馬らの検討⁴⁾などにより、その精度が確認されている。CPT1 欠損症と CPT2 欠損症については、重松らの既報^{S2,2)}に詳細が記述されている。

表 1. 改定が推奨されるスクリーニング指標とカットオフ値

対象疾患	スクリーニング指標と陽性判定法
VLCAD欠損症	C14:1 > 0.4 μM かつ C14:1 > C10 かつ C14:1 > 12 かつ C14:1 > C14
MCAD欠損症	C8 > 0.3 μM かつ C8/C10 > 1
CPT1欠損症	C0/(C16+C18) > 100 かつ C0 > 80 μM
CPT2欠損症	(C16+C18:1)/C2 > 0.62 かつ C16 > 3.0 μM

(4)二次検査法の有用性の検討

表2に、花井研究協力者報告書から全国の検査施設での状況を抜粋再掲した。再採血がほとんどないという検査施設もあったが、対象疾患スクリ

ーニングごとの再採血率としては比較的高い0.05%以上という施設が多く見られた。これ以外の指標では再採血率は比較的低かった。

表2. 検査施設毎の再採血率の調査結果

陽性となった指標	再採血率の分布 (%)	再採血率 > 0.1% (施設数)	再採血率 > 0.05% (施設数)
C3&C3/C2	0~0.61%	6	22
C5	0~0.26%	10	18
C5-DC	0~0.24%	3	16
Leu	0~0.23%	-	9

これらのスクリーニング指標での陽性例に対する二次検査法は既に昨年度報告したが、C3及びC3/C2の指標でのスクリーニングの妥当性を検証するため、表3に関連対象疾患患者での上記指標、及び新指標の分析値を示した。

メチルマロン酸血症の範疇に入れられるビタミンB12代謝異常および欠乏の患児では、C3とC3/C2の指標では必ずしもスクリーニングできていなかった。新指標としてC3/Met比及びMet低

値を採用するとスクリーニング可能であったが、この指標を採用するといわゆる“ホモシスチン尿症3型”もスクリーニング可能であった。これらの患児の初回新生児濾紙血での二次検査法として、図1に示したLC-MS/MS分析法を開発した。昨年度報告した方法では試料の誘導体化が必要であったが、この方法では質量分析法を改変し非誘導体化サンプル処理で簡便に測定できるようになった。

表3. メチルマロン酸血症およびホモシスチン尿症2型・3型のスクリーニング指標と患者データ

(新生児濾紙血分析)		C3	C3/C2	C3/Met	Met	メチルマロン酸	総ホモシステイン
		(μM)			(μM)	(μM)	(μM)
上限カットオフ値		3.5	0.25	0.25	80	1.0	5.0
下限カットオフ値					9.27		
cbIC	患者1	10.30	1.10	1.60	6.40	59.7	34.8
	患者2	15.01	1.10	0.46	32.50	44.4	17.0
cbID	患者1	4.79	0.23	0.21	23.00	11.0	(-)
ビタミンB12欠乏症	患者1	3.59	0.21	0.34	10.65	6.7	5.5
	患者2	2.14	0.45	0.35	6.12	5.5	11.8
	患者3	2.53	0.23	0.28	9.00	(-)	(-)
MTHFR欠損症	患者1	0.62	0.13	0.13	4.98	0.5	49.2
ホモシスチン尿症 3型(病型未確定)	患者2	0.45	0.05	0.07	6.63	0.8	10.6
	(患者3)	0.77	0.09	0.17	4.61	1.3	10.4
	(患者4)	0.53	0.09	0.08	6.7	0.7	28.7

【 LC-MS/MS analysis 】

LC column : lmtakt Scherzo SS-C18
mobile phase : [A] 0.5% Formic acid
[B] (0.5M NH₄-Formate & 0.5M NH₄OH)/MeOH (1:9)
MRM mode : negative ion mode for 4.3 min → positive ion mode
flow rate : 0.5ml/min
analysis time : 15 min

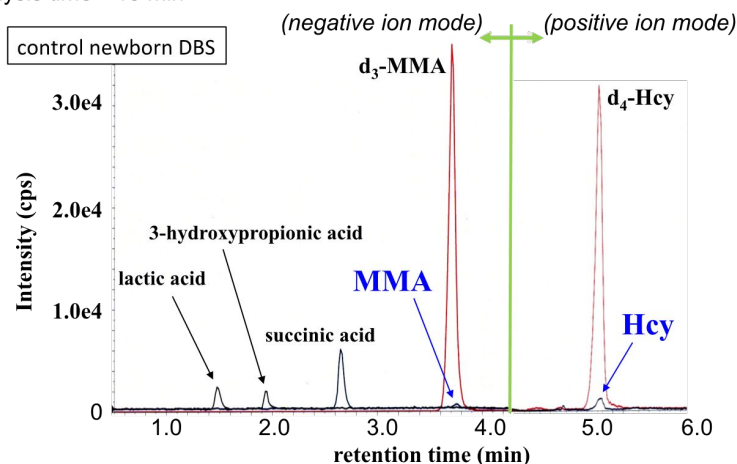


図1 LC-MS/MS法による濾紙血中メチルマロン酸・総ホモシステイン分析

ロイシン陽性によるメープルシロップ尿症スクリーニングでは、アロイソロイシンの二次検査分析（昨年度報告済み）により異化亢進状態での偽陽性を低減できた。

D. 考察

全国の検査実施状況調査では再採血率の低下、前年と同等の発見患者数が確認された。再採血率については、見逃しが起こらないようにカットオフ値が適切に設定されているという前提が重要である。しかし、今回の調査では、非患者新生児での測定値の施設間差を適切に反映してカットオフ値が設定できているとはいえない検査施設が存在していた。また、再採血がほとんど存在しないという検査施設も存在し、このような施設でのカットオフ値の設定が適切かどうか更に調査が必要と考えられた。ともあれ、このような問題点を明らかに出来るシステムは開発されたので、今後はそのデータ解析を踏まえた検査施設への精度保証体制を深めていく必要がある。

新生児スクリーニングでの偽陽性の発生や対象疾患患児の急性発症の点で、新生児の重篤な飢餓状態は見逃すことが出来ない問題である。母乳

栄養推進においては新生児の的確な状態把握を踏まえた栄養法を実施することが望まれる。脂肪酸酸化異常症スクリーニングにおいて、飢餓による異化亢進は偽陽性となることが多い。今回提唱した脂肪酸酸化異常症スクリーニングの新指標を用いると、異化亢進状態を容易に把握することが出来るが、検査施設で単に陽性でないとして放置するだけでよいのかは議論の余地がある。コンサルタント医師を含めたスクリーニング協議会での検討課題とされるべきである。

非患者新生児の家族に無用の不安を与えないためには偽陽性は少ないことが望ましい。偽陽性率を一定程度に下げると統計学的指標を用いてカットオフ値を上げると見逃しの原因になりかねない。見逃し例を含め、対象疾患と診断された患児の新生児濾紙血での指標値を元にして、スクリーニング指標とそのカットオフ値を更に開発すべきである。今回患者データを収集するシステムは出来上がったので、現行の指標のカットオフ値を評価していく必要がある。一方、見逃しが生じないように新たに開発された指標とそのカットオフ値の設定については、初回濾紙血の二次検査分析が前提になる。今回報告したメチルマロ

ン酸血症関連疾患のスクリーニングに関しては、新指標を採用すると偽陽性率が高くなるので、二次検査対応が必須である。二次検査の精度管理法や分析経費の問題を解決し、この二次検査実施体制を早急に整備する必要がある。

E. 結論

外部精度管理・内部精度管理のためのシステム整備が進んだ。更にその運用についても検討を深めていく必要がある。見逃しのないスクリーニングとするための新指標とカットオフ値の適用がすすむように、二次検査法の実施を具体化させる必要がある。

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：質量分析法による新生児マススクリーニングの実相．J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 64(4);1-5,2016.
- 2) 重松陽介，湯浅光織，畑郁江：CPT2 欠損症の新生児スクリーニング新指標検討の経緯．特殊ミルク情報 52: 12-15, 2016.
- 3) 重松陽介：タンデムマス・スクリーニングのスクリーニング指標の改訂．日本マススクリーニング学会誌，27(1)（印刷中）2017.
- 4) Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M: Screening of MCAD deficiency in Japan: 16years' experience of enzymatic and genetic evaluation. Mol Genet Metab. 119:322-328, 2016.
- 5) Deswal S, Bijarnia-Mahay S, Manocha V, Hara K, Shigematsu Y, Saxena R, Verma IC: Primary carnitine deficiency - A rare treatable cause of cardiomyopathy and massive hepatomegaly. Indian J Pediatr. 2016 Sep 1. [Epub ahead of print]

- 6) Akagawa S, Fukao T, Akagawa Y, Sasai H, Kohdera U, Kino M, Shigematsu Y, Aoyama Y, Kaneko K: Japanese male siblings with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 Disease) without neurological regression. JIMD Rep. 2016 Jun 16. [Epub ahead of print]
- 7) Gupta D, Bijarnia-Mahay S, Kohli S, Saxena R, Puri RD, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Sakamoto O, Gupta N, Kabra M, Thakur S, Deb R, Verma IC: Seventeen Novel Mutations in PCCA and PCCB Genes in Indian Propionic Acidemia Patients, and Their Outcomes. Genet Test Mol Biomarkers. 20(7):373-82, 2016.
- 8) 野崎 章仁，楠 隆，重松 陽介，佐々木 彩恵子，熊田 知浩，柴田 実，林 安里，森 未央子，日衛嶋 郁子，井上 賢治，藤井 達哉：食事摂取量低下とピボキシル基含有抗菌薬 2 日間投与による二次性低カルニチン血症．日本小児科学会雑誌．120(9);1371-1374, 2016.

1-2. 参考論文

- S1) 重松陽介，畑 郁江：アシルカルニチンプロファイ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．日本マススクリーニング学会誌．2(1)；67-73，2015．
- S2) 重松陽介，畑郁江，伊藤順庸，新井田要，但馬剛，田崎隆二，新宅治夫，小林弘典，大浦敏博．カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-I 欠損症のスクリーニング指標の妥当性の検討．日本マススクリーニング学会誌．23(1);93-97.2013.

2. 学会発表

- 1) 湯浅光織、畑郁江、河北亜希子、他：重篤なケトアシドーシスの治療中に眼球運動障害を呈した -ケトチオラーゼ欠損症の 1 例．第 57 回日本先天代謝異常学会 大阪市，2015 年 11 月

- 2) 湯浅光織、畑郁江、林泰平、重松陽介、西村裕：新生児スクリーニングでのメチオニン値異常に着目した LC-MS/MS 二次検査法の有用性の検討．第 58 回日本先天代謝異常学会．東京，2016 年 10 月
 - 3) 香川礼子、但馬剛、原圭一、佐倉伸夫、小林正夫、田中藤樹、長尾雅悦、重松陽介：新生児スクリーニングでシトルリン著増を認め、無症状で経過中の 1 例．第 58 回日本先天代謝異常学会．東京，2016 年 10 月
 - 4) 磯崎由宇子、湯浅光織、畑郁江、重松陽介：4 歳未満で BH4 治療を開始した軽症フェニルケトン尿症 2 例の臨床経過．第 58 回日本先天代謝異常学会．東京，2016 年 10 月
 - 5) 原圭一、但馬剛、香川礼子、岡田賢、岡野里香、重松陽介、栢田紗季、森岡千代美、吉井千代子：カルニチントランスポーター異常症のマススクリーニング カルニチン補充を要したヘテロ保因者と考えられる 1 例．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
 - 6) 香川礼子、原圭一、但馬剛、重松陽介、栢田紗季、森岡千代美、吉井千代子：マススクリーニング初回陽性・再採血正常の後に発症したビタミン B12 欠乏症の乳児例．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
 - 7) 湯浅光織、畑郁江、米野聖子、重松陽介：メチオニン低値を指標としたホモシスチン尿を伴う疾患群のスクリーニングシステムの検討．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
 - 8) 但馬剛、津村弥来、香川礼子、岡田賢、原圭一、佐倉伸夫、畑郁江、重松陽介：タンデムマス・スクリーニング検査での疑問を解決しよう 脂肪酸代謝異常症陽性例への対応 見逃し例を出さないために．第 43 回日本マス・スクリーニング学会．札幌，2016 年 8 月
- H．知的財産権の出願・登録状況
なし。