

# 先天性副腎過形成症スクリーニング二次検査における 内標製品の有用性の検討

山岸卓弥 齋藤翔太 田上泰子 藤倉かおり 野町祥介  
濱谷和代 鈴木欣哉 藤峰慶徳\*1

## 要 旨

高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS法)による先天性副腎過形成症(CAH)スクリーニングのための安定同位体標識物質(内標)混合溶液の開発中製品が、当所で実施するCAHスクリーニングにおいて有用であるかを検討した。検査の目的物質溶液や実際のマススクリーニング血液濾紙を、現在当所で使用する自家調製内標を使用した場合と製品を使用した場合で相違なく測定できることを確認した。内標製品の使用により検査手法や精度管理の面で改善が見込まれることから、本製品を使用する利点があると考えられた。

## 1. 緒 言

新生児マススクリーニング対象疾患のひとつである先天性副腎過形成症(CAH)は、その検査のために酵素免疫測定法(ELISA法)による17-ヒドロキシprogステロン(17-OHP)の測定が全国的に行われている。しかし、この方法では交差反応により見かけの測定値が実際の血中17-OHP濃度より高くなる場合があることから、偽陽性例の頻度が高くなる問題がある<sup>1)</sup>。当所ではこの問題を解決するために、平成23年4月より、高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計による二次検査(LC-MS/MS法)を用い、17-OHPおよび4種類のステロイド代謝産物(コルチゾール(F)、21-デオキシコルチゾール(21-DOF)、11-デオキシコルチゾール(11-DOF)、4-アンドロステンジオン(4-AD))を測定している<sup>2)</sup>。LC-MS/MS法では交差反応による偽陽性の増加を回避できることに加え、血中の複数のステロイド代謝産物濃度を測定することでより精密なスクリーニングが期待できる<sup>3)</sup>。

LC-MS/MS法には、内部標準として測定目的物質の安定同位体標識物質(内標)が必要である。現在当所では5種類の純品から自家調製し使用しているが、検査の精度を維持するためには、5種類すべてを含み精度保証されたLC-MS/MS法CAHスクリーニング用内

標の調製済製品(内標製品)が安定的に供給されることが望ましい。そのような背景を踏まえ、国内の複数の企業が内標製品を開発中である。この度大塚製薬株式会社より、内標製品の試作品の無償提供による実用試験の依頼があった。そこで、LC-MS/MS法による濾紙血中ステロイド測定における本製品の有用性を検討することを目的として本研究を実施した。

## 2. 方 法

### 2-1 対象

#### (1) ステロイド標準品

測定の直線性を確認するため、当所が保有する濃度既知の5種ステロイド混合溶液を使用した。各物質の表示濃度4 $\mu$ g/mLの混合溶液原液を希釈し、0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 ng/mLの希釈系列を作成した。

#### (2) 新生児マススクリーニング検体

札幌市の母子保健事業「新生児マススクリーニング」において2016年度にCAHスクリーニング二次検査を受検した新生児濾紙血検体のうち、無作為に(ただし後述の2-3(1)のとおり倫理的配慮のうえ)抽出した117件とした。

\*1 大塚製薬株式会社

表 1 11-DOF の同位体標識と MS/MS 測定条件の違い

	自家調製内標	内標製品 (CAH-1000-OP)
同位体ラベル	21, 21-d2	2, 2, 4, 6, 6-d5
プリカーサーイオン [m/z]	349.2	352.2
プロダクトイオン [m/z]	97.0	99.5

## 2-2 測定方法

当所で実施している LC-MS/MS 法<sup>2),3)</sup>において自家調製内標を大塚製薬株式会社製内標製品「CAH-1000-OP」へ変更した方法により対象の検体を測定し、内標製品測定値とした。内標製品は 11-DOF の標識が自家調製内標と異なるため、MS/MS の測定条件を表 1 のとおり変更した。

## 2-3 倫理的配慮

### (1) 検体の研究利用了承の取得

札幌市では新生児マスキング申請書により「検査を終えた検体の他の研究等への利用」に関する了承の可否を保護者もしくは代諾者へ確認しており、本研究にかかる検体・データ利用はこの了承が得られたものについてのみ行った。

### (2) 匿名化の取扱い及びその方法

本研究における測定では、新生児マスキングにおいて氏名等の個人情報とは切り取られ検体番号のみが付けられ連結可能匿名化された濾紙血検体を使用した。本研究における測定結果とスクリーニング測定結果を結合したうえで検体番号を削除し、連結不可能匿名化した上でデータ解析を行った。また、測定結果の結合と検体番号の削除およびそのための台帳の管理は本研究に関与しない者が行った。

### (3) 倫理的配慮にかかる審査および承認

本研究内容について、札幌市衛生研究所倫理審査委員会の承認を受けた。

## 3. 結果

### 3-1 ステロイド標準品の測定

#### (1) 希釈系列測定値の直線性

ステロイド標準品希釈系列を内標製品を用いて測定した結果を図 1 に示した。各濃度について 3 回反復測定した。ただし 0.5 ng/mL および 5 ng/mL は 6 回反復測定した。両法の測定値の間にほぼ完全な正の相関が確認されたが、F については表示値よりも低値傾向であった。

#### (2) 定量下限値および検出限界値の算出

S/N 比=10 となる濃度を定量下限、S/N 比=3.3 となる濃度を検出限界として、標準品を 0.5 ng/mL および 5 ng/mL に希釈した溶液を内標製品を用いて 6 回反復測定して得られた S/N 比の平均値から定量下限値および検出限界値を算出した(表 2、単位は ng/mL blood)。

表 2 定量下限値と検出限界値

	現行	a	b
定量下限値			
17-OHP	0.30	0.55	0.49
11-DOF	1.0	0.083	0.28
21-DOF	1.9	0.51	0.31
4-AD	0.30	0.070	0.16
F	2.2	0.68	0.54
検出限界値			
17-OHP	0.10	0.18	0.16
11-DOF	0.30	0.027	0.094
21-DOF	0.60	0.17	0.10
4-AD	0.10	0.022	0.052
F	0.70	0.22	0.18

a: 0.5 ng/mL 標準溶液の測定値から算出

b: 5 ng/mL 標準溶液の測定値から算出

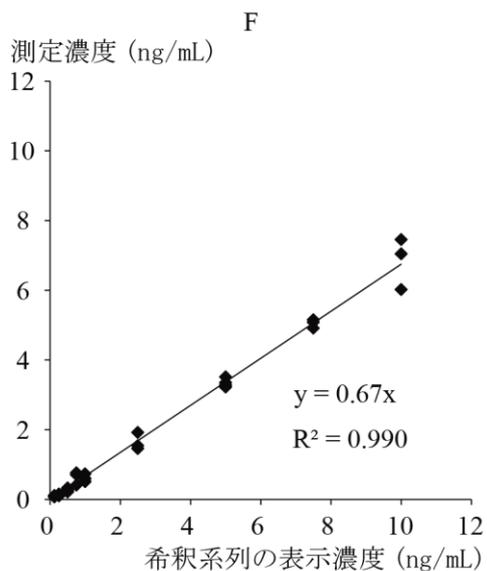
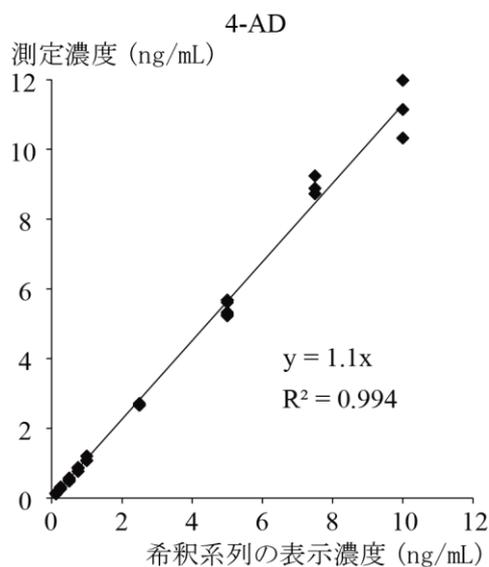
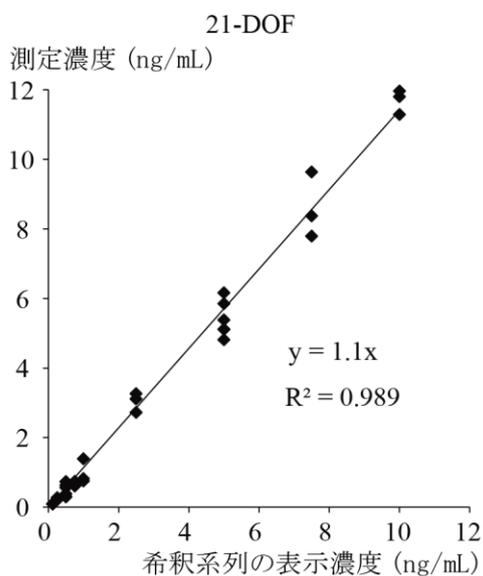
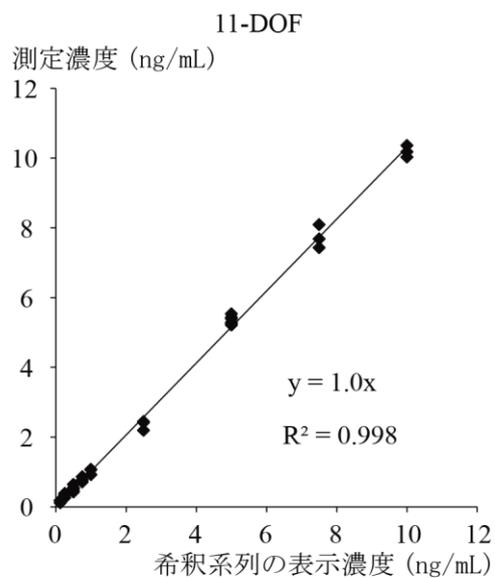
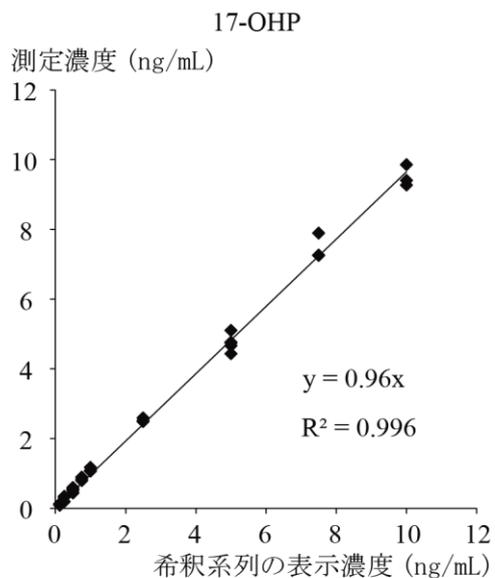


図1 ステロイド標準品の希釈系列の測定結果

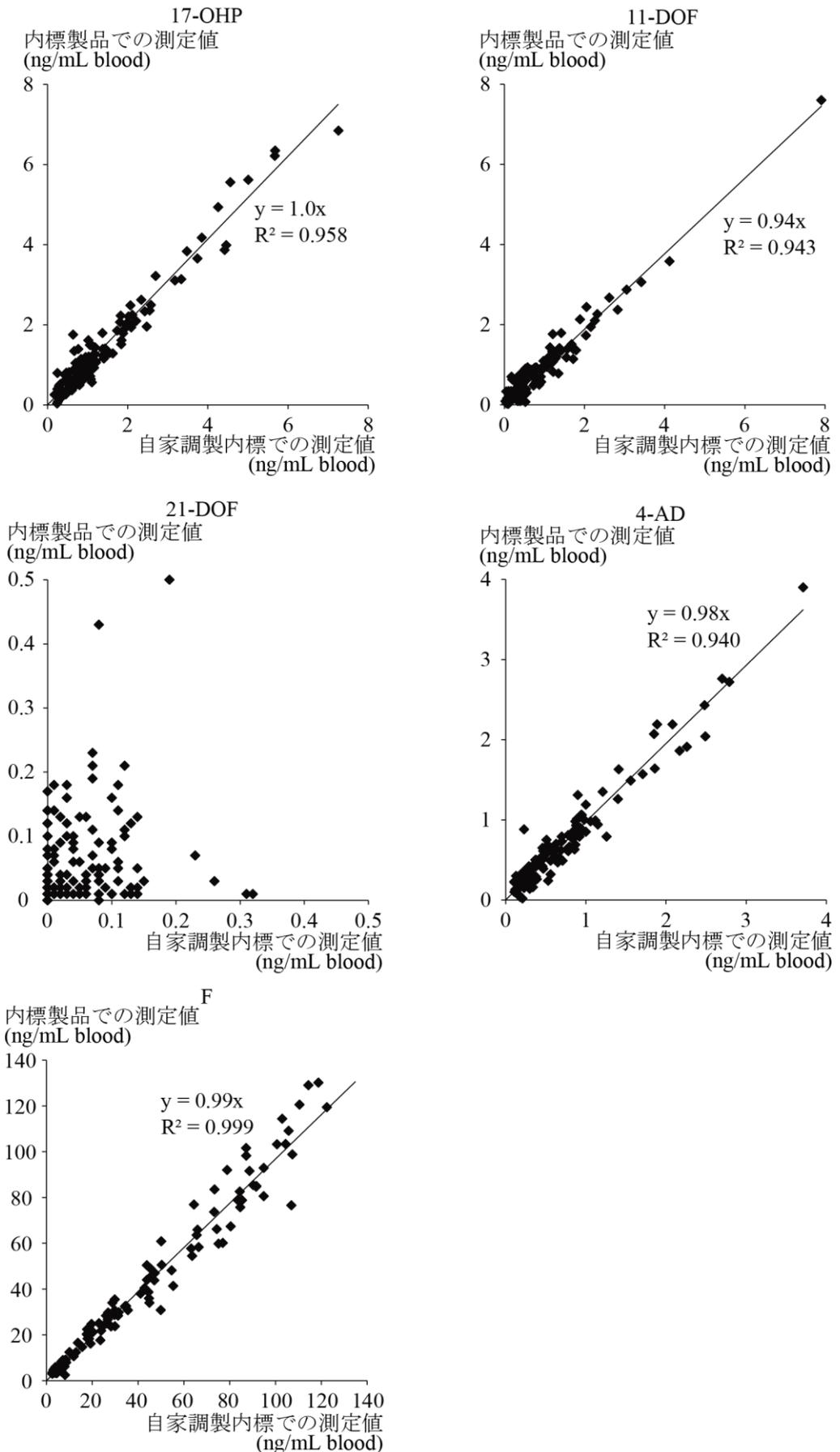


図2 スクリーニング検体の、自家調製内標と内標製品での測定値の比較

### 3-2 スクリーニング検体の測定

自家調製内標での測定値(スクリーニング時の測定値)と内標製品を用いた測定値の、各項目の二次元散布図を図2に示した。21-DOFは定量下限値を超える検体が対象に無かったため検証できなかったが、他4項目については直線性、相関ともに良好であった。

## 4. 考 察

標準品希釈系列による直線性の確認において、最もばらつきの大きかった21-DOFにおいても回帰直線の相関係数は $R^2=0.989$ であり、良好な結果が得られた。21-DOFは本法において定量下限値の大きな指標であり、その影響によりややばらつきが大きくなったものと思われる。回帰係数はF以外の4項目で1前後を示し表示値に近い測定値が得られた。Fについてはいずれの希釈濃度についても表示値の0.7倍程度の測定値しか得られなかったが、自家調製品で再測定したところ同程度の値が得られた(図3)ため、原液中のF濃度が表示よりも低かったと判断し、直線性について他の項目と同様の結果が得られたと考えた。

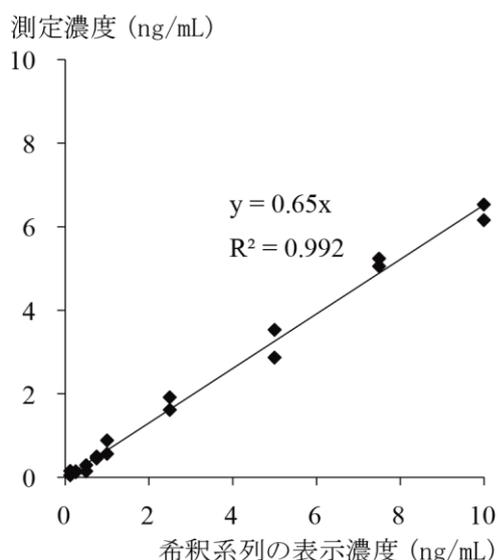


図3 自家調製内標での標準溶液希釈系列のF測定値

定量下限値は判定基準値(表3)より低い値が得られ、その範囲で検査可能であることが示された。また現行法開始時にブランク信号強度から算出した定量下限値と比べても遜色ない値であった(表2)。ただし本結果は血液成分の影響が除外されたものであり、血液濾紙を使用した場合には値が変動する可能性がある。

表3 判定基準

要精密検査(以下のいずれかを満たす)
17-OHP $\geq 50$
在胎37週以上かつ17-OHP $\geq 20$
21-DOF $\geq 2.0$
要再採血(以下を全て満たす)
17-OHP $\geq 2.5$ 、11/17比 $\leq 0.2$ 、Ratio I $\geq 0.2$
11/17比 = 11-DOF / 17-OHP
Ratio I = (17-OHP + 4-AD) / F

17-OHP、11-DOF、4-AD、Fについては相関および再現性ともに良好であり、自家調製内標と内標製品による測定結果に明らかな差異は認められなかった。一方、21-DOFでは定量可能な濃度の対象検体が存在しなかったことから相関を確認することができなかった。しかし、コントロール検体として用いたCDC作成のステロイド添加血液濾紙の測定結果は良好であった(図4)。前述の希釈系列の測定検討結果も加味し、21-DOFについても定量下限値以上の範囲では問題無く測定できるものと思われた。

CAHスクリーニング二次検査は現在、全国的にはELISA抽出法を用いた17-OHP測定により実施されている。しかし、LC-MS/MSがタンデムマス・スクリーニング用途で普及したこともあり、CAHスクリーニングにおいても検査の精度や操作の簡便性といった面で利点のあるLC-MS/MS法が注目されている<sup>4)</sup>。内標製品が安定供給されることは、全国均一なスクリーニングの実施に寄与し、精度管理の観点から検査精度の向上につながるものである。また今回検討した製品は調製済溶液のアンブルであり、内標物質を入

手し調製する手間がかからないうえ、使用方法も簡便であった。したがって、本製品はLC-MS/MS法の利点を補強するものといえる。今後本製品が発売されLC-MS/MS法CAHスクリーニングの普及に役立つことを期待したい。

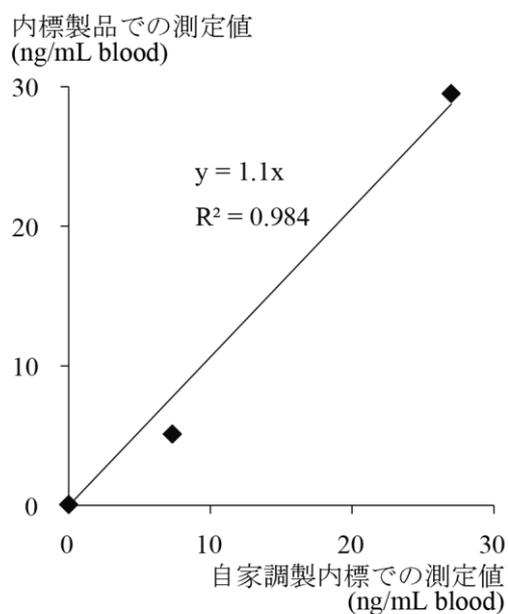


図4 CDCコントロール検体の、自家調製内標と内標製品での21-DOF測定値の比較 (表示値は0, 4.55, 22.7)

## 5. 文 献

- 1) 立花克彦, 山上祐次: 先天性副腎過形成症マスキングにおける低出生体重児の問題点 日本マス・スクリーニング学会誌 15(1), 18-22, 2005
- 2) 藤倉かおり, 山岸卓弥, 田上泰子, 他: 高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計による先天性副腎過形成症スクリーニング二次検査法の検討 日本マス・スクリーニング学会誌 23(1), 85-92, 2013
- 3) 山岸卓弥, 藤倉かおり, 田上泰子, 他: 高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた先天性副腎過形成症スクリーニングの判定基準の検討 日本マススクリーニング学会誌 26(1), 43-50, 2016
- 4) 磯部充久, 齋藤裕介, 岩崎希, 他: 高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計を用いた先天性副腎過形成症スクリーニング二次検査における陽性率の検討 日本マススクリーニング学会誌 25(1), 49-56, 2015