

札幌市における新型コロナウイルス検査対応について

菊地正幸 大西麻実 島崎梨絵 尾口裕介
細海伸仁 山口 亮

1. 緒 言

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を原因とする感染症であり、2019 年末に中国湖北省武漢市において発生が確認された。その後、世界中に感染が拡大し、2020 年 3 月には WHO がパンデミック (世界的大流行) に相当すると発表した。日本では 2020 年 1 月 16 日に武漢市に滞在歴のある 1 例目の患者が確認されて以降、感染者が増加し、2 月末には全国に先駆けて北海道が独自の緊急事態宣言を行い、4 月には政府が緊急事態宣言を発出することとなった。その後も様々な施策がとられてきたが、2021 年 6 月現在でも収束に至っていない。

本稿では当所における SARS-CoV-2 検査対応の概要について報告する。

2. 方 法

2-1 検査方法

(1) リアルタイムPCR法 (感染研法)

2020年1月下旬に国立感染症研究所 (以下、感染研) から分与された新型コロナウイルス (2019-nCoV) 検出用プライマープローブセット、新型コロナウイルス (2019-nCoV) 検出用リアルタイムPCR試薬及び陽性コントロールを用い、感染研から示された「2019-nCoV検査マニュアルVer. 2.1」に基づくTaqManプローブを用いたリアルタイムone-step RT-PCR法 (感染研法) による検査が可能となった。

感染研法では、必要な前処理を行った喀痰や咽頭拭い液等の検体から、スピнкаラムを用いたキットによりウイルス遺伝子を抽出した後にリアルタイム

one-step RT-PCR法により新型コロナウイルス遺伝子を検出した。

ウイルス遺伝子の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、スピンプロトコールにより、または自動核酸抽出装置QIAcube (QIAGEN) を使用して行った。

(2) リアルタイムPCR法 (市販キット)

感染研法以外に簡易抽出を用いたリアルタイムPCR試薬やPCR法以外の核酸増幅法を用いた試薬など多くの市販検査試薬が開発・販売され、検査時間の短縮や効率化が図れるようになった。検出感度や特性を評価検討した後、2020年7月より、国内メーカーが開発販売した簡易抽出を用いた試薬を使用することとした。

検査工程としては、感染研法におけるスピнкаラムによるウイルス遺伝子の抽出に代わり、検体を簡便な前処理操作した後、感染研法と同様のリアルタイムone-step RT-PCR法を実施するものである。反応条件等は添付文書に従い検査を実施した。

(3) 変異株スクリーニング検査

2021年1月にN501Y変異株のリアルタイムPCR検出系が感染研で開発され、検出マニュアル及び運用文書が送付された。これに記載されているプライマー及びプローブを購入し、陽性コントロールを感染研から分与された後、変異株スクリーニング検査が実施可能となった。

2-2 検体採取及び搬送

2020年2月の検査開始当初は、感染が疑われる患者の報告があり、要検査と保健所が判断した検体を、

時間を問わず保健所職員が当所に搬送した。その後、感染者の発生やそれに伴う接触者の検査、陰性確認の検査依頼が増加したため、午前と午後には衛生研究所職員を含む複数の職員が検査依頼のあった医療機関から回収して搬入した。

保健所において検体回収・搬送業務について民間運送業者と委託契約が完了した2020年6月以降は、運送業者が午前と午後には回収、搬入をすることとなった。

3. 結 果

3-1 札幌市の初期対策と経緯

札幌市の感染症対策主管部局である保健所は2020年1月16日に札幌市医師会、疑似症定点医療機関に対し疑い事例の報告依頼等を通知し、市民に対してホームページ等で情報提供、注意喚起するなど対応した。1月30日には当所における検査が可能となり、また、第1回感染症対策本部会議が開催され、感染症のまん延を防止するためより一層の対策を実施することとなった。2月7日には帰国者・接触者相談センターを、同月14日には一般電話相談窓口設置し、相談体制を拡充した。

3-2 市内感染確認までの初期対応

(1) 検査（図1、2）

感染研法による検査体制を構築した翌週の2020年2月4日に、1月28日に確認された北海道内で初めての新型コロナウイルス感染者（武漢市からの旅行者）の陰性確認の検査検体が搬入された。当時の感染者への対応としては、すべての感染者が入院し、症状の消失とPCR検査で2回連続陰性であることが退院の条件であったため、当該感染者の検体が2回連続陰性となる2月13日まで合計5回搬入された。その間に疑い患者2名について6検体が搬入されたが陰性であった。

市内で初めて感染者が確認されたのは、2月14日に搬入された疑い患者の咽頭ぬぐい液及び気管吸引痰（2検体）から新型コロナウイルス遺伝子が検出され

た事例であった。当時は、検体搬入は計画的にされるものではなく、各疑い事例について医療機関との調整後に都度搬入されており、検体搬入後ただちに検査を実施した。また、検体については喀痰と咽頭ぬぐい液など疑い患者1名に対して複数の検体が搬入されており、検体前処理や遺伝子抽出など煩雑かつ複雑な作業となるため、検査が夜間に及ぶことも多々あった。

(2) 検査体制

検査はウイルス担当者3名で夜間、休日でも対応し、検査結果については判明後速やかに保健所担当者あて速報として連絡した。

ウイルス検査用として使用していたリアルタイムPCR装置は2台（Applied Biosystems 7500Fast リアルタイムPCR システム及びApplied Biosystems 7900HT Fast リアルタイムPCR システム）あり、感染症や食中毒事例における検査に使用していた。新型コロナウイルス検査についても陽性コントロールを用いて検出感度等を確認した後、当該機器を使用して対応することとした。

3-3 市内感染確認以降の対応

(1) 検査（図1、2）

市内で初めて感染者が確認された2020年2月14日以降、疑い事例と併せて家族や職場の同僚などの接触者、感染者が入院している医療機関関係者の検体が継続的に搬入され、2月18日には2例目の陽性者（咽頭ぬぐい液及び喀痰で陽性）が確認された。その後、2月末までに246検体搬入され、32検体が陽性であった（陰性確認検査含む）。

3月以降も土日祝日を含め毎日検体が搬入された。3月は、47検体搬入された日が最高であり、月平均の陽性率は約23%であった。4月に入って一週間程度は3月と同様の傾向であったが、複数の医療機関等におけるクラスターの発生により4月9日には106検体搬入され、初めて一日100検体を超えた。これ以降5月中旬まで一日の搬入検体数が100検体

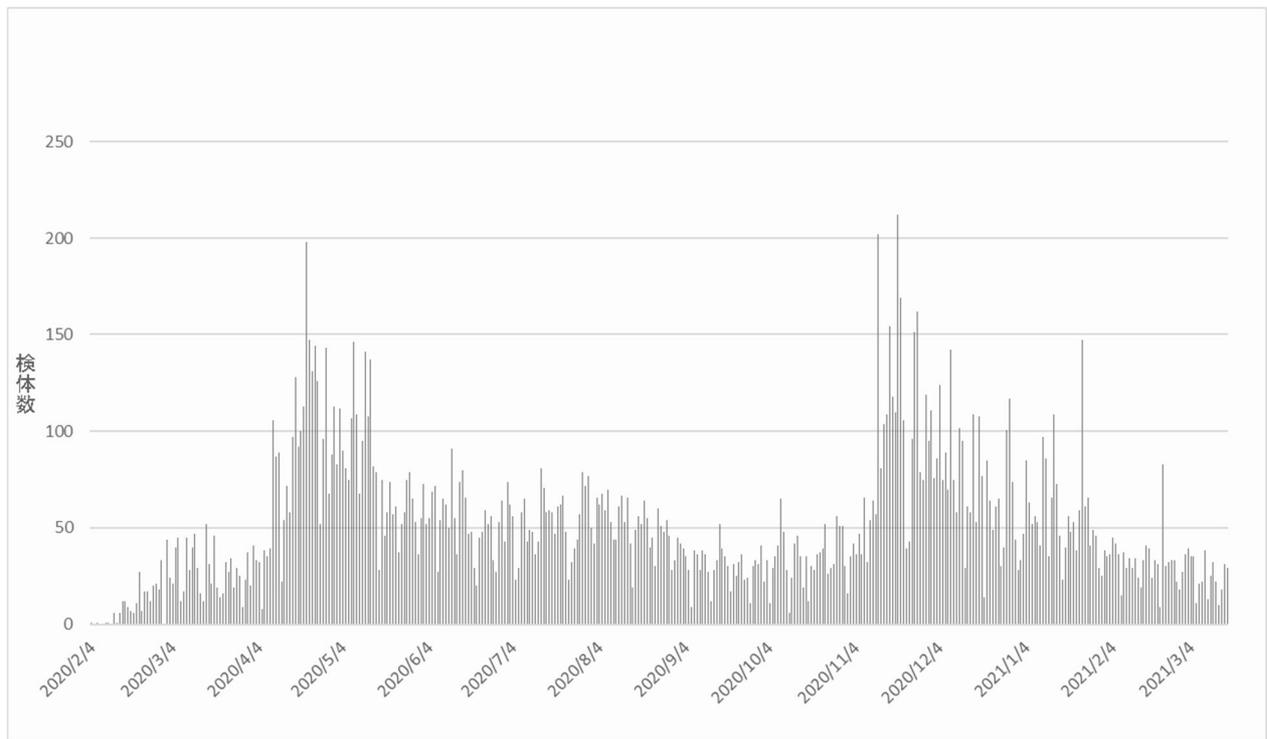


図1 新型コロナウイルス検査検体数（2020/2/4～2021/3/17）

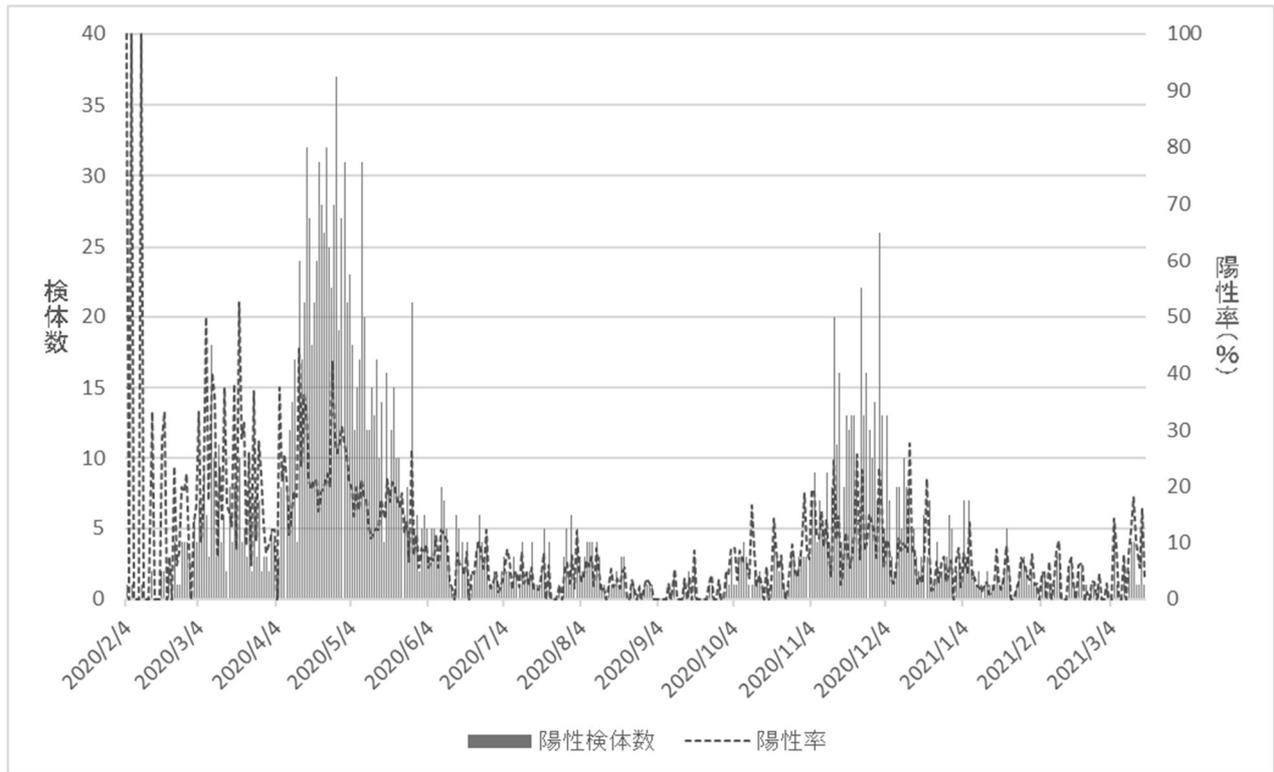


図2 新型コロナウイルス陽性検体数及び陽性率（2020/2/4～2021/3/17）

程度（最大 198 検体、4 月 21 日）、陽性検体数についても 37 検体（4 月 28 日）を最高に 2 桁台で推移した。

6 月以降には民間検査機関への委託等が進められたこともあり、8 月末まで一日平均 50 検体程度の搬入数であり、陽性検体数は一日平均 2.5 検体であった。

9、10 月の検査数は一日平均 32 検体であり、陽性検体数は一日平均 1.2 検体と散発的であった。11 月初旬までは同様の傾向であったが、中旬に入ると医療機関、介護施設及び保育園等で感染者が発生し、クラスター（疑い）事例として接触者等の検査数が急増した。11 月 12 日に 202 検体が搬入されて以降、100 検体以上が搬入されることが多くなり 2021 年 3 月にかけて漸減した。搬入検体数が最大となったのは、11 月 19 日の 212 検体であった。

(2) 検査体制

検査に従事するウイルス担当者 3 名に加え、微生物係細菌班 3 名が検体のデータの整理等の事務処理の応援に入った。検査結果の報告に関しては、一覧表を作成し、少なくとも担当者及び係長職の確認後に保健所関係者（部署）あて報告することとした。そのため、土日祝日の結果を報告する際には担当者に加え係長職の確認が必要となり、所内係長職に応援を依頼して土日祝日に勤務するシフト体制を組むこととした。

2019 年度には当初から自動核酸抽出装置を更新する計画があり、当該機器が 2020 年 3 月に納品されて 2 台体制となった。また、2020 年 2 月に、都道府県、保健所設置市における感染症の検査体制を充実させるためにリアルタイム PCR 装置が国庫補助金の補助対象に加えられ、これを活用して 3 月にリアルタイム PCR 装置を 1 台増設し 3 台体制とした。

3-4 変異株スクリーニング（図 3）

(1) N501Y 変異株検査対応

2021 年 3 月より、当所において新型コロナウイルス陽性となった検体と保健所から依頼のあった市内

民間検査機関等において陽性となった検体について N501Y 変異株スクリーニング検査を開始した。その後、ゲノム解析により N501Y 変異株（B. 1. 1. 7 系統、アルファ株）によるクラスターが発生したことが判明したため、3 月 16 日から市内陽性検体について実施可能なものについてはすべて N501Y 変異株スクリーニング検査を実施することとなった。診断検査は市内民間検査機関等が実施し、陽性検体について運送委託業者が当所に搬入し、当所は搬入された陽性検体について N501Y 変異株スクリーニング検査を実施する体制を整えて対応した。5 月 7 日の国からの通知により、感染拡大地域であって N501Y 変異株の陽性割合が高い自治体については、感染拡大防止策に対応を重点化できるよう、当初求めていた陽性検体の 40%程度の検査実施を必須としない運用が可能となった。札幌市内では急速な感染拡大が進み、N501Y 変異株の陽性割合も高いことが確認されており、また診断検査の需要も高まっていることから、当所における集中的な N501Y 変異株スクリーニング検査体制から診断検査を優先して実施する体制となった。

(2) 検査結果

2021 年 3 月 1 日から 5 月 8 日までの検査件数は図 3 に示す。民間検査機関等の陽性検体が搬入されることとなった 3 月 17 日以降、N501Y 変異の陽性率は 30%を超えており、その後漸増して N501Y 変異株が 90%を占めるようになり、N501Y 変異株にほぼ置き換わったことが判明した。

2021 年 6 月末までに、2648 検体について N501Y 変異株スクリーニング検査を実施し、N501Y 変異陽性は 1784 検体、ウイルス量が少なく検出限界以下となった検体は 204 検体であった。

4. 考 察

4-1 事前準備体制

2020 年 1 月中旬に新型コロナウイルスの全ゲノム配列が公開され、下旬には感染研が PCR 法に基づ

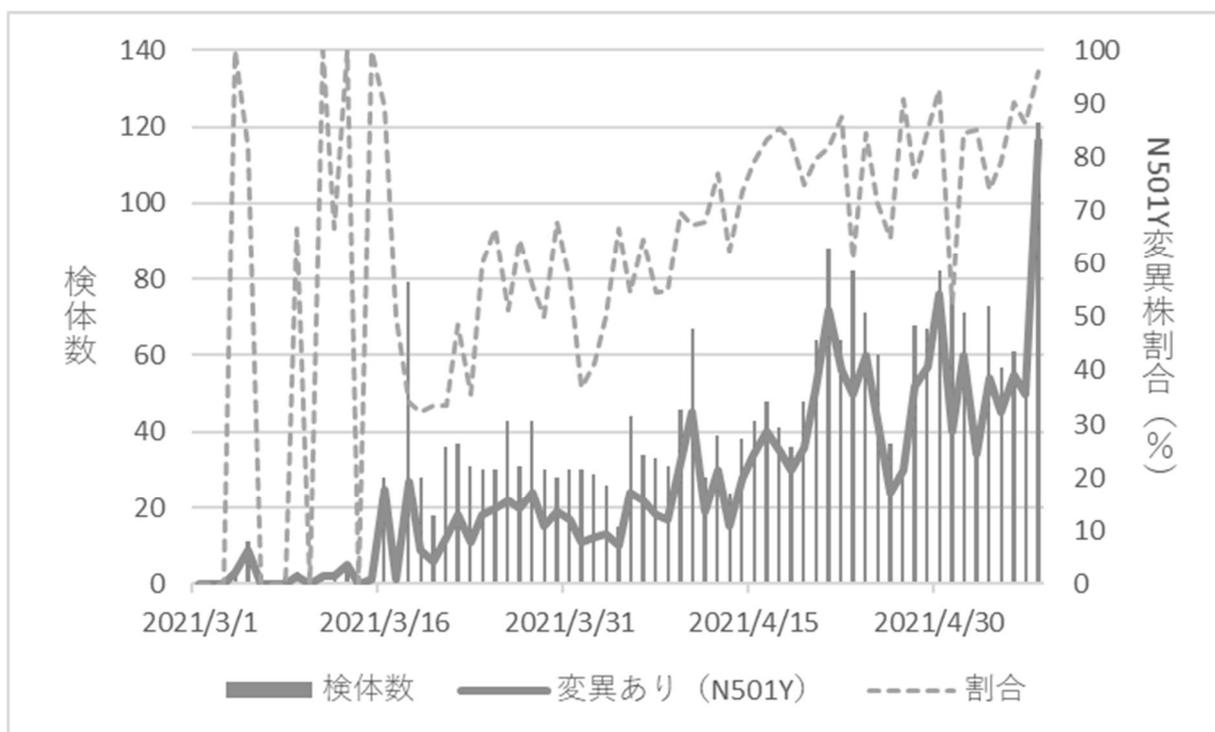


図3 N501Y変異株スクリーニング検査

く検査法を開発し、地方衛生研究所あて検査マニュアル及び必要試薬が配付された。当所を含む地方衛生研究所では日常的に様々な病原体についてPCR法による検査を実施しており検査機器とともに必要な知識や手技等が備わっていること、また、平常時から地方衛生研究所と感染研の連携が取れていることから迅速に検査対応が可能となった。新型コロナウイルスについても試薬等の到着後速やかに条件等の検討、確認を行い、検査の受け入れ態勢を整備することができた。

4-2 検査体制と課題

発生当初から検体搬入後速やかに検査を行い、結果について報告することになっており、24時間休日もなく対応する状況であった。2020年2～3月頃は、疑い患者の増加に加え、感染者が発生すると搬送先の医療従事者や接触者の検査や陰性確認のための検査が依頼されることになり検体数が急増した。同時期には検体の種類が被験者一人につき複数（喀痰と咽頭拭い液など）持ち込まれ、前処理工程が異なる

ため複雑な作業となった。さらに、感染研ではスピカラムによる遺伝子抽出の工程があり、検体数が増えるほど単純な増分以上の作業量となるため担当者の負担が大きくなった。また、いつ検査依頼があるかも不明であり精神的な疲労も蓄積されていた。

現在でも課題として残るのは、採取容器やラベリングが統一されておらず採取医療機関により異なり、さらにラック等で順に並べるなどの整理がされておらず無秩序に搬入されるため、採取容器の破損や検体の漏れなどの確認作業や、検査依頼のあったリストの名前と採取容器に記載された名前との照合などの確認作業が多大な負荷となっていることである。検査の効率化を図るためにも、検体持ち込みまでの手順、採取容器の統一化や検体リスト作成ルール等を取り決めて実施することが有用であると思われる。

次に、それまでの想定や経験を超越する数の検体が毎日搬入されたため、検査試薬やチップ等の消耗品の消費が激しく、緊急に調達するなどの対策をとつ

たが、全国的、世界的にも検査数が増加するにつれ、特に海外メーカーの物品が入手困難となった。よって、必要な量の見積もりは困難ではあるが、それらの消耗品をどの程度備蓄しておくべきか、他のメーカーや製品への切り替えが可能かなどを検討しておく必要がある。

当初ウイルス検査用として使用していたリアルタイム PCR 装置は 2 台 (Applied Biosystems 7500Fast リアルタイム PCR システムおよび Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システム) あり、緊急に対応すべき時期に検体が五月雨式に搬入されると、1 回 (検体) の検査に 1 台使用することになり迅速に対応できなくなる可能性があった。リアルタイム PCR 装置を使用するその他の検査項目の依頼があった場合にも、装置が占有されている時間は対応不可となる。今回は、同時並行検査やバックアップ用に、また、検査処理能力の強化のために、事務方や財政担当部局等の協力により国庫補助金を活用して 2020 年 3 月に 1 台を迅速に増設することができた。機器の整備は危機管理の一環として計画的に行うべきではあるが、緊急時には機器の購入等による検査体制の整備・強化の必要性についての判断力がその後の検査能力に影響することを理解しておかねばならない。

精度の高い PCR 検査を実施するためには、適切な施設や設備、機器とともに高い技術や知識を習得した検査員が必要である。当所では日常的に病原体を取り扱い、PCR 検査のような遺伝子検査を実施している他部署がなく、また過去に所属していた経験者もほとんどいないため、即戦力あるいは検査担当者の負担、業務の停滞を招かない程度の研修で検査に従事できる職員がいない。そのため、データ処理や連絡調整などの応援に限られ、処理能力を向上するため検査を分担する、あるいは長期的に持続可能とするために交代可能な人員体制を整備することができなかった。遺伝子関連検査に関する経験と知識を有し、適切に患者検体や遺伝子の取り扱い、精度の

高い検査を実施できる人材の増員や育成の必要性がこれまで以上に明らかになった。

また、検査を実施するには専用の検査室が必要であり、検査可能な検体数の向上や検査時間の短縮などのためには、現状の検査室のみでは不可能である。リアルタイム PCR 装置や遠心機などの機器類のほか、安全キャビネットが必要であるが、現状の体制下では条件を満たす検査室がないため物理的な限界がある。

5. 結 語

今回の新型コロナウイルス検査対応においては、様々な検査試薬や全自動 PCR 装置などの開発が進み、病院検査室や民間検査機関での検査が実施可能となった。2021 年 6 月現在では民間検査機関における検査が大多数を占めている。今後新しい感染症が発生した際には、国内未発生時から発生初期についてはキット化された試薬が市販されて、直ちに民間検査機関等が検査対応可能となるかは不透明である。これまでの経験上、同時期には感染研が検査法を開発し、各地方衛生研究所で対応することになると思われる。元来、地方衛生研究所では、希少な感染症の診断、あるいは食中毒、感染症法で規定された感染症の微生物診断などを行政検査として実施している。また、遺伝子解析などの詳細な検査についても地方衛生研究所は平常時から実施していることが多く、保健所における疫学調査の情報を補完し、感染症対策に寄与している。このように新たな感染症への検査や詳細な性状解析の対応能力は高いが、パンデミッククラスの発生になった場合に全て検査するだけの体制は整備されていない。

以上のことから、衛生研究所としては新しい感染症への迅速な検査対応、発生初期からの緊急検査対応、遺伝子解析等の高度な検査等への対応が求められると考えられ、さらなる技術や知識の向上を目指す必要がある。大量の検体を処理する体制については、民間検査機関等との連携を含め、想定される場

面（新種の病原体、発生初期、パンデミック時等）における対応としてどの程度の検査処理能力が必要であるのかを総合的に検討しておく必要がある。その結果により、衛生研究所として整備すべき検査体制が明らかとなると思われる。

今回の新型コロナウイルス感染症への対応が、今後新たに発生するであろう様々な健康危機に活かされていくことを望む。

新生児マススクリーニング代謝異常症検査結果 (2020年度)

石川貴雄 吉永美和 和田光祐 野町祥介 細海伸仁
山口 亮 長尾雅悦*1 田中藤樹*1 小杉山清隆*2

1. 緒 言

札幌市では、2005年4月から、新生児マススクリーニング事業の効果を高めることを目的とし、タンデム質量分析計による検査を導入した新生児マススクリーニング（以下「タンデムマス・スクリーニング」という。）を研究事業として開始した¹⁾。2010年8月からは、従来から検査を行っていたガラクトース血症と合わせて代謝異常症検査の対象疾患を24疾患とし、札幌市の母子保健事業として現在まで継続して実施している。

今回は、2020年4月から2021年3月までの1年間における、代謝異常症検査結果について報告する。

なお、本稿において、アミノ酸はIUPACの定めた3文字表記あるいは1文字表記を用いる。

2. 方法及び対象

検査方法は既報²⁻⁴⁾に従った。対象は、市内の医療機関で出生した生後4~6日目の新生児のうち、保護者が新生児マススクリーニング申込書により検査を申し込んだ児とした。また、保護者から別途「新生児マススクリーニング検査対象疾患除外申請書」の提出があった場合には、従来からの対象疾患であるアミノ酸代謝異常症3疾患のみの検査を受けることも可能とした⁵⁾。

また、CPT2欠損症の指標について2018年4月から2020年1月の測定値分布より当該指標の再評価を行い、2020年度よりカットオフ値を表1のとおり変更した。

表1 CPT2欠損症指標カットオフ値

指標	カットオフ値	
	(変更前)	(変更後)
(C16+C18:1)/C2	0.4	0.38
C14/C3	0.48	0.41

3. 結 果

3-1 受検者数

2020年4月から2021年3月までの1年間における新生児マススクリーニングの検査数は13,910件で、そのすべてがタンデムマス・スクリーニングを受検した。また、検査済み検体の研究等への二次利用とそれに伴う検体の10年保存について承諾があったのは、13,438件(96.6%)であった。

3-2 検査結果

2020年度における代謝異常症検査結果を表1にまとめた。

アミノ酸代謝異常症における要再採血数は9例で、要精密検査数は3例であった。要精密検査例のうち、2例はフェニルケトン尿症疑いによるものであり、1例はアルギニノコハク酸尿症疑いであった。なお、後者については初回検査の結果、即精密検査とした。

有機酸代謝異常症における要再採血数は14例で、要精密検査数は1例であった。要再採血例のうち、9例はイソ吉草酸血症疑いによるものであり、うち4例に母のピボキシル基含有抗生剤使用があった。要精密検査例はプロピオン酸血症またはメチルマ

*1 国立病院機構北海道医療センター小児科 *2 北海道大学病院小児科

ロン酸血症疑いによるものであった。

脂肪酸代謝異常症における要再採血数は 12 例で、うち 7 例がフリーカルニチン値低値によるカルニチントランスポータ欠損症疑いによるものであった。

ガラクトース血症検査の要再採血数は 8 例であった。要精密検査数は 2 例であり、うち 1 例を初回検査の結果をもって即精密検査とした。

3-3 要精密検査例の詳細とその後

要精密検査例 6 例について、表 2 にまとめた。

症例①は、Phe 値が継続してカットオフ値を超えていたため、フェニルケトン尿症疑いとして精密検査判定とした例である。なお、本件については測定値がカットオフ値近傍であったため、1 か月健診の際 3 回目採血を実施した。その後、精密検査時（日齢 42）の札幌市マスキング関連疾患依頼検査（以下「依頼検査」という。）による Phe 値も僅かにカットオフ値超過が認められた。本例についてはフェニルアラニン水酸化酵素遺伝子に R53H ヘテロ変異が確認されており、現在軽症型フェニルケトン尿症疑いとしてフォローされている。

症例②も Phe 値が継続してカットオフ値を超え、フェニルケトン尿症疑いとして精密検査とした例である。当該例についても Phe 値の推移から 1 か月健診時に 3 回目採血を実施した。本例は精密検査時（日齢 45）の依頼検査では Phe 値がカットオフ値を下回っていた。本例についてはプテリジン分析、ジヒドロプテリジン還元酵素（DHPR）活性測定結果が正常であり、軽症高フェニルアラニン血症と診断された。

症例③は、初回検査時に ASA 値がカットオフ値を超過した。ASA 値がカットオフ値を超過した例は当所において初の事例（3-4 及び 4-2 で詳述）であったため、コンサルタント医と相談の上、初回検査結果をもって即精密検査とした。精密検査時（日齢 12）の依頼検査においても ASA 値は高値であった。その後アルギニノコハク酸リアーゼ遺伝子に V178M 及び Y375C の変異が確認され、遺伝学的にアルギニノ

コハク酸尿症と診断された。なお、児の発達は正常であり、現在のところ極軽症型と考えられている。

症例④については初回、2 回目採血の検査において C3 アシルカルニチン値及び C3/C2 比がカットオフ値を超過し、精密検査とした。精密検査受診時（日齢 15）の依頼検査においても同指標高値は継続していた。なお、ろ紙血検体のホモシステイン測定ではホモシステインは高値検出されなかった。尿中有機酸分析では 3-ヒドロキシプロピオン酸、メチルクエン酸が高値検出されたのに比して、メチルマロン酸は高値検出されなかった。このことからプロピオン酸血症が疑われた。後の遺伝子検査によってプロピオニル CoA カルボキシラーゼβサブユニット（PCCB）遺伝子に Y435C 及び A468P の複合ヘテロ変異が確認され、プロピオン酸血症と診断された。

症例⑤は初回検査にてガラクトース-1-リン酸（Gal-1-P）の値が高値を示した。二次検査として実施した UDP-ガラクトース 4' エピメラーゼ（EP）活性測定において活性が確認されなかったため、即精密検査とした。精密検査時（日齢 13）の依頼検査においても Gal-1-P 高値は継続していた。児に臨床症状は認められず、末梢型のガラクトース血症Ⅲ型と診断された。

症例⑥は双胎第 2 子として出生した児で、初回検査検体は採血時体重 1,619 g の低出生体重児の検体として送付されていた。初回検査においてカットオフ値超過は認められなかったが、その後低体重出生児の採血指針⁶⁾による再採血検体（日齢 40）の検査においてガラクトースが高値を示した。日齢が進んでいたこともあり、コンサルタント医へ相談の上、精密検査とした。精密検査時（日齢 47）の依頼検査においても Gal 値は高値となっていた。また、同時に行ったタンデムマス検査において Met 値（35.7 μM）、Arg 値（60.2 μM）、Cit 値（27.2 μM）等が高値傾向にあった。これによりシトリン欠損症等も疑われ、遺伝子検査が施行されたが、関連遺伝子（SLC25A13、ASS、ASL）は正常であった。現在門脈体循環シャント疑いとしてフォロー中である。

3-4 当所で初となった ASA のカットオフ値超過事例 (表 2 症例③)

症例③の初回検体は出生体重 3,218 g、日齢 5、採血時体重 3,030 g、哺乳状況良好の検体として受け付けた。タンデムマス検査を実施したところ、ASA 値がカットオフ値を超過していた。測定不良等の可能性を排除するため、検体複数個所からサンプリングして再測定を行ったが、いずれも再現性良く高値を示した。また、旧測定法である誘導体化法による測定も実施し、高値であることを確認した。

当所新生児マススクリーニングにおける ASA 測定値のヒストグラム(集計期間は非誘導体化法導入後である 2017 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、n=59,480、機器不調時のデータ 166 件は除く)を図 1 に示した。ASA のカットオフ値 $0.5 \mu\text{M}$ を超過した事例は症例③のみであった。

症例③のアルギニノコハク酸尿症関連指標の測定結果を表 3 に示した。また、新生児平均値等及び参考値として当所にてフォローしているアルギニノコハク酸尿症患者の最新測定値 (23 歳時点採血ろ紙) も併せて示した。症例③については ASA 値が新生児平均値の 10 倍程度の高値を示しているものの、Cit 値の上昇、Arg 値の低下というアルギニノコハク酸尿症の特徴は顕著には認められなかった。また、症例③の ASA 値は参考としたフォロー患者測定値の 1/10 程度の値であった。

これらより当所で経験のない事例であったため、コンサルタント医に相談の上、初回検査結果を以て要精密検査判定とした。

日齢 12 の精密検査時には、全身状態は良好とのことであった。精密検査時のタンデムマス検査では表 3 のとおり初回検査同様 ASA 値が高値であった。また、尿中オロト酸測定の結果 (表 4)、オロト酸は高値検出されなかった。同様に尿中有機酸分析においてもオロト酸、ウラシルの排泄増多は認められなかった。

4. 考 察

4-1 検査結果全般

2020 年度の代謝異常症検査における要再採血数は 43 例 (要再採血率 0.31%) であり、要精密検査数は 6 例 (要精密検査率 0.04%) であった。

要再採血率、要精密検査率共に大きな変動は無かった。

再採血事例では C5 高値による再採血例が 9 例と前年度 4 例 (うち 2 例に母の抗生剤使用あり) に比して高くなった。いずれの例も測定値はカットオフ値近傍 ($1.0 \mu\text{M}$ ～ $1.3 \mu\text{M}$) であり、検体情報では児への抗生剤使用が「無」として送付されていた。確認のため採血医療機関へ問合わせしたところ、4 例で出産に伴い母にピボキシル基含有抗生剤を適用していたことが判明し、母から児への影響が考えられた。いずれも再採血結果で正常判定となっており、今後とも当該指標と抗生剤の関係については注視していきたい。

4-2 当所で初となった ASA のカットオフ値超過事例 (表 2 症例③)

アルギニノコハク酸尿症は尿素回路異常症の一つであり、アルギニノコハク酸をアルギニンとフマル酸に分解するアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) の障害を原因とする。患者では ASL の活性低下により尿中に ASA が大量に排出され、血中では ASA、Cit が上昇し、Arg が低下する。また、尿中のオロト酸、ウラシルの排泄増加が認められる場合もある。臨床症状は主に尿素回路の異常による高アンモニア血症によって生じ、重症型から無症候性のものまで幅があるとされる⁷⁾。

新生児マススクリーニングではアルギニノコハク酸尿症の疑い判別の指標として、中等度 (50 ～ $300 \mu\text{M}$) に増加する Cit 値を用いることが多い⁸⁾。当所でも Cit を測定しているが、アルギニノコハク酸尿症の疑い判別には ASA 値を用いている。

症例③は ASA 値が上昇しているものの、Cit 値の著明な上昇等が認められず、ASA 値の上昇度合いも新生児平均の 10 倍程度、参考としたフォロー患者測定値の 1/10 程度であり、判断に苦慮した例であ

った。

タンデムマス検査に採用している内部標準物質のセットに ASA は含まれておらず、定量には Arg の内部標準物質の値を代用している。現在当所の検査系では Arg の感度及び S/N 比は良好であるが、ASA は感度及び S/N 比が高くなく、定量に用いる両者のシグナル値に開きがある。特に ASA はバックグラウンドノイズの影響を受けやすく、参考としたフォロー患者検体のように、典型的な患者検体は高値検出できるものの、血中濃度の低い通常の新生児検体についてはシグナル検出が困難な測定項目である。症例③の測定結果については、現行法の非誘導体化法でのシグナルがコンタミネーションやバックグラウンドノイズの影響等でないことを推定するため、カルボキシル基をブチル基修飾する誘導体化法も用いて測定した。観測するフラグメントイオンが異なる両方法にて高値を得たことから、バックグラウンドノイズやコンタミネーションによる別物質の誤検出の可能性は低いと考え、陽性検体と判断した。

本例は Cit 値からはアルギニノコハク酸尿症疑いと判定できなかつたと考えられる。これにより ASA 測定は同疾患の疑い判別に有用であると考えられた。ただし、新生児検体で得られる ASA シグナル値が低いため、今後感度増加の検討や、ノイズ増減の原因の検証等を行い、測定系の安定化を図り、同様のケースの発生に備えたい。

5. 結 語

2020 年度の代謝異常症検査の結果、軽症高フェニルアラニン血症 1 例、アルギニノコハク酸尿症 1 例、プロピオン酸血症 1 例、ガラクトース血症Ⅲ型 1 例を見出した。いずれも精密検査受診を経てフォローされており、早期治療に繋げることができた。

今後も適正なカットオフ値の検討や測定系の改良、コンサルタント医との緊密な連携体制の維持など十分に配慮を行いながら事業を実施していきたい。

6. 文 献

- 1) 野町祥介, 本間かおり, 花井潤師 他: 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのための体制整備, 日本マス・スクリーニング学会誌, **16**(1), 65-72, 2006
- 2) 重松陽介, 畑郁江, 稲岡一考: 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**, 213-218, 2011
- 3) Yamaguchi A, Fukushi M, Mizushima Y et al: Microassay system for newborn screening for phenylketonuria, maple syrup urine disease, homocystinuria, histidinemia and galactosemia with use of a fluorometric microplate reader. *Screening*, **1**, 49-62, 1992
- 4) Beutler E, Baluda M, Donnell GE. A new method for the detection of galactosemia and its carrier state. *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 695-705, 1964
- 5) 太田優, 吉永美和, 手塚美智子 他: タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングについて-2012年度の結果と申込書の様式変更-, 札幌市衛生研究所年報, **40**, 57-62, 2013
- 6) 日本小児内分泌学会, 日本マス・スクリーニング学会, 日本未熟児新生児学会: 新生児マス・スクリーニングにおける低出生体重児の採血時期に関する指針, 日本マス・スクリーニング学会誌, **16**, 6-7, 2006
- 7) 日本先天代謝異常学会編: 新生児マススクリーニング対象疾患等診療ガイドライン 2019 (改訂第 2 版), 67-92, 株式会社診断と治療社, 2019
- 8) 山口清次編: よくわかる新生児マススクリーニングガイドブック (初版), 38-41, 株式会社診断と治療社, 2019

表1 2020年度新生児マススクリーニング代謝異常症検査結果

	指標	カットオフ値	疑い疾患名	要再採血数*1	要精密検査数 (うち初回要精密検査数)
アミノ酸 代謝異常症	Phe	≧120 μM	フェニルケトン尿症	6	2
	Leu	≧350 μM	メープルシロップ尿症	1	0
	ASA	≧0.5 μM	アルギニノコハク酸尿症	0	1(1)
	Cit/AA	≧0.025	シトルリン血症1型 シトルリン欠損症	2	0
	小計			9	3(1)
有機酸 代謝異常症	C3 かつ C3/C2	≧0.4 μM ≧0.25	メチルマロン酸血症 プロピオン酸血症	3	1
	C5	≧1 μM	イソ吉草酸血症	9*2	0
	C5-DC	≧0.35 μM	グルタル酸尿症1型	2	0
	小計			14	1
脂肪酸 代謝異常症	C0	≧8 μM	カルニチントランスポータ 欠損症	7	0
	C8 かつ C10	≧0.3 μM ≧0.5 μM	グルタル酸尿症2型	4*3	0
	C14:1 かつ C14:1/C2	≧0.4 μM ≧0.013	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症	2*3	0
	小計			12*4	0
糖 代謝異常症	Gal Gal-1-P TR EP	≧6.0 mg/dL ≧18.0 mg/dL 活性無し 活性無し	ガラクトース血症	8	2(1)
合計				43	6(2)

*1 同一指標で2回以上要再採血判定となった場合は1と計上する *2 うち4例母のピボキシル基含有抗生剤使用あり

*3 うち1例はC8、C10高値かつC14:1、C14:1/C2高値 *4 複数指標で要再採血判定となった場合1と計上する

Cit; citrulline AA; Gly, Ala, Val, Leu, Phe, Tyr, Asp, Glu, ASA, Orn, Met, Arg, Citの合計 ASA; argininosuccinic acid
C0; freecarnitine C2; acetylcarnitine C3; propionylcarnitine C5; isovalerylcarnitine C5-OH; 3-hydroxyisovalerylcarnitine C5-
DC; glutaryl carnitine C8; octanoylcarnitine C10; decanoylcarnitine C14; tetradecanoylcarnitine C14:1; tetradecenoylcarnitine
C16; palmitoylcarnitine C18:1; octadecanoylcarnitine Gal; galactose Gal-1-P; galactose-1-phosphate TR; galactose-1-
phosphate-uridylyltransferase EP; uridine di-phosphate-galactose-4-epimerase

表 2 2020 年度要精密検査例の詳細

症例	出生時 体重	疑い疾患名	初回検査値 (採血日齢；体重)	再検査値 (採血日齢；体重)	診断結果 (精密検査時依頼検査測定値,受診日齢)
①	2,595g	フェニルケトン尿症	Phe ; 127.1 μM (4d ; 2,475 g)	2 回目採血 Phe ; 121.0 μM (10d ; 2,614 g)	軽症型フェニルケトン 尿症疑い (Phe ; 125.7 μM, 42d)
				3 回目採血 Phe ; 132.0 μM (31d ; 3,554 g)	
②	2,732g	フェニルケトン尿症	Phe ; 135.5 μM (5d ; 2,616 g)	2 回目採血 Phe ; 143.3 μM (10d ; 2,888 g)	軽症高フェニルアラニ ン血症 (Phe ; 112.9 μM, 45d)
				3 回目採血 Phe ; 127.7 μM (38d ; 4,194 g)	
③	3,218g	アルギニノコハク酸 尿症	ASA ; 0.74μM (5d ; 3,030 g)	—	アルギニノコハク酸尿症 (ASA ; 0.74 μM, 12d)
④	3,254g	メチルマロン酸血症 プロピオン酸血症	C3 ; 5.9 μM C3/C2 ; 0.39 (4d ; 2,984 g)	C3 ; 7.1 μM C3/C2 ; 0.70 (10d ; 3,120 g)	プロピオン酸血症 (C3 ; 6.7 μM C3/C2 ; 0.77, 15d)
⑤	3,340g	ガラクトース血症	Gal ; 1.4 mg/dL Gal-1-P ; 36.1 mg/dL TR 活性あり EP 活性なし (5d ; 3,254 g)	—	ガラクトース血症Ⅲ型 (Gal ; 1.6 mg/dL Gal-1-P ; 39.0 mg/dL TR 活性あり EP 活性なし, 13d)
⑥	1,619g	ガラクトース血症	Gal ; 4.4 mg/dL Gal-1-P ; 11.1 mg/dL (8d ; 1,558 g) ※正常判定	Gal ; 16.5 mg/dL Gal-1-P ; 3.7 mg/dL TR,EP 活性あり (40d ; 2,540 g)	門脈体循環シャント疑い (Gal ; 16.1 mg/dL Gal-1-P ; 4.1 mg/dL TR, EP 活性あり, 47d)

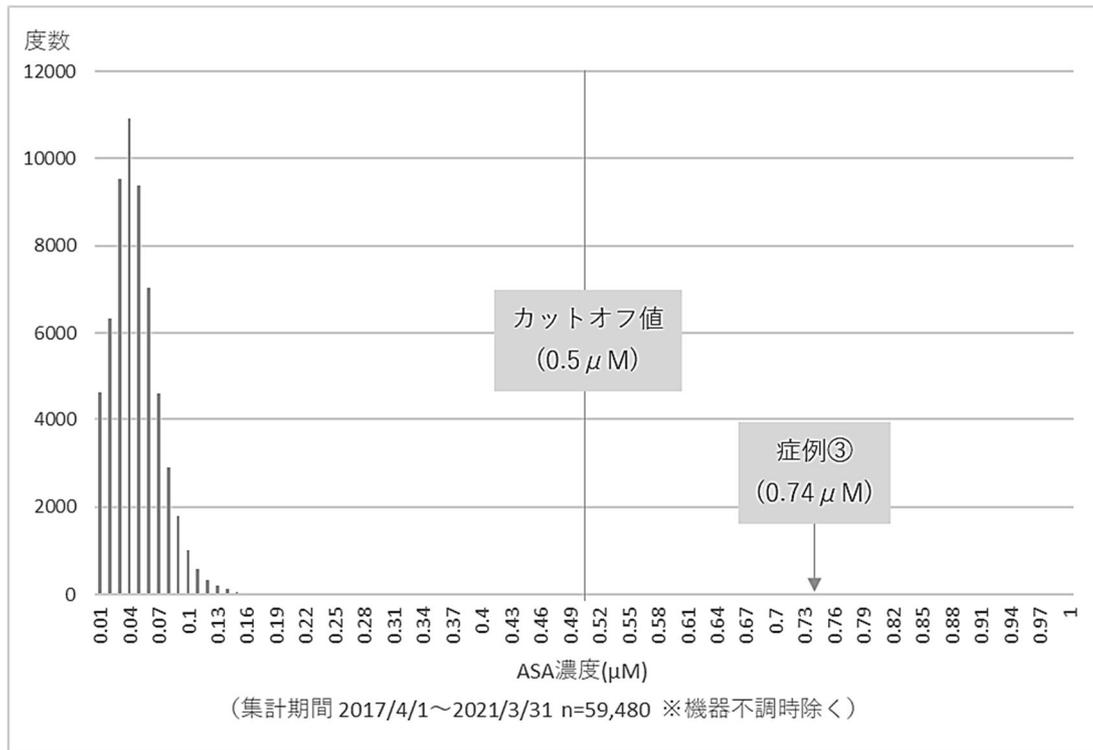


図1 新生児初回検体 ASA 値ヒストグラム

表3 症例③及び新生児平均値等のタンデムマス測定値比較

指標	ASA (μM)	Cit (μM)	Arg (μM)
症例③測定値 (初回検査時, 5d)	0.74	18.9	6.3
症例③測定値 (精密検査時, 12d)	0.74	29.6	7.2
新生児平均値(mean) 及び標準偏差値(SD)	Mean : 0.04 SD : 0.02	Mean : 11.2 SD : 3.2	Mean : 10.4 SD : 5.3
アルギニノコハク酸尿 症フォロー患者測定値 (参考値:23y)	10.20	129.5	9.8

表4 症例③尿中オロト酸測定値

	症例③ (精密検査時, 12d)	Normal control (n=34,1m-11y)
尿中オロト酸測定値 (μg/mmol Cre)	8.7	Mean: 25.2 SD: 14.3

新生児マススクリーニング内分泌疾患検査結果(2019年度)

藤倉かおり 山岸卓弥 阿部正太郎 野町祥介
 細海伸仁 山口 亮 鎌崎穂高*1 中村明枝*2

1. 緒 言

札幌市では、1977年4月にフェニルケトン尿症検査を開始して以来¹⁾、順次対象疾患を拡大しながら新生児マススクリーニングを実施してきた²⁻⁴⁾。内分泌疾患の検査は、先天性甲状腺機能低下症(CH)を1978年6月に^{5,6)}、先天性副腎過形成症(CAH)を1982年5月に⁷⁾開始し、現在まで継続して実施している。

今回は、2019年度の1年間に実施した新生児マススクリーニング内分泌疾患検査について報告する。

2. 方 法

CH検査は甲状腺刺激ホルモン(TSH)および遊離サイロキシン(FT4)を、CAH検査は17-ヒドロキシプロゲステロン(17-OHP)および関連4種ステロイ

ド(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)、コルチゾール(F))を測定している。

CH検査はエンザプレートNeo-TSH 甲状腺刺激ホルモンキットおよびエンザプレートN-FT4 遊離サイロキシンキット(いずれもシーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社製)を用いた酵素免疫測定法(ELISA法)により実施している。

CAH検査はエンザプレートNeo-17 α -OHP 17-ヒドロキシプロゲステロンキット(同社製)を用いてELISA直接法により一次検査を行い、高値の検体について、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)により5種ステロイドを測定する二次検査を実施している^{8,9)}。

各検査の基準値は表1のとおり。

表1 対象疾患と検査方法

対象疾患	検査法		測定項目	判定基準
先天性甲状腺機能低下症	ELISA		TSH FT4	TSH \geq 10 μ U/ml blood または FT4 \geq 4.0 または FT4<0.9 ng/dl serum ただし一部出生体重・在胎週数等を考慮して判定する
先天性副腎過形成症	一次検査	ELISA	17-OHP	\geq 5.5 ng/ml blood
	二次検査	LC-MS/MS	17-OHP 4-AD F 11-DOF 21-DOF	(A) 要精密検査基準 下記のいずれかを満たす ・21-DOF \geq 2 ng/ml blood ・17-OHP \geq 50 ng/ml blood ・在胎週数37週以上かつ17-OHP \geq 20 ng/ml blood (B) 要再採血基準 ・17-OHP \geq 2.5 ng/ml blood かつ 11-DOF/17-OHP 比<0.2 かつ Ratio I \geq 0.1 (Ratio I = (17-OHP+4-AD) \div F)

*1 札幌医科大学附属病院小児科 *2 北海道大学病院小児科

3. 結 果

3-1 検査成績

スクリーニング開始から2019年度まで通算の検査成績を表2に、2019年度1年間の検査成績を表3に示した。2019年度はCH検査で23例、CAH検査で2例が要精密検査となった。

CH検査で要精密検査となった23例の詳細を表4に示した。CAH検査で要精密検査となった2例は、いずれも塩喪失型のCAHと診断された。

3-2 追跡調査

2019年度に申請された小児慢性特定疾病(内分泌疾患)の対象2疾患の申請状況を表5に示した。新規申請者のうち札幌市で新生児マススクリーニングを受検した者を*印で示し、その詳細を表6に示した。CHの新規申請者3名のうち1名は本市スクリーニングを受検したが正常判定の児だった。

表2 検査開始から2019年度までの通算検査成績

対象疾患	開始年月	初回検査数	精密検査数	診断の確定した患者数と内訳
先天性甲状腺機能低下症	1978年6月	741,488	932	先天性甲状腺機能低下症 : 298 中枢性甲状腺機能低下症 : 25 その他(新生児バセドウ病等) : 27
先天性副腎過形成症	1982年5月	658,303	155	21 水酸化酵素欠損症 塩喪失型 : 24 単純男性化型 : 5 非古典型 : 2 POR異常症 : 1

表3 2019年度の検査成績

対象疾患	初回検査数	初回要再検査数(率(%))	精密検査数	精密検査内訳
先天性甲状腺機能低下症	14,864	79 (0.531)	23	表4参照
先天性副腎過形成症	14,864	10 (0.067)	2	塩喪失型2名

表4 2019年度先天性甲状腺機能低下症検査の精密検査例

精密検査理由	精密検査数	診断
TSH 高値 かつ FT4 低値	8	原発性甲状腺機能低下症 : 4 一過性甲状腺機能低下症 : 4 ※
TSH 高値	13	原発性甲状腺機能低下症 : 7 潜在性甲状腺機能低下症 (サブクリニカルCH) : 2 一過性甲状腺機能低下症 : 1 乳児一過性高TSH血症 : 2 その他 : 1
FT4 低値	1	潜在性甲状腺機能低下症 (サブクリニカルCH) : 1
FT4 高値	1	甲状腺ホルモン不応症 : 1

※4名中3名は三つ子の同胞

表5 新生児マススクリーニング対象疾患の小児慢性特定疾病申請状況

疾患名	分類	札幌市での新生児マススクリーニング受検の有無			計
		受検有		札幌市で受検していない	
		要精密検査判定	正常判定		
先天性甲状腺機能低下症	新規	2*	1*	1	88
	転入	0	0	0	
	継続・再開	31	27	26	
先天性副腎過形成症	新規	0	0	0	9
	転入	0	0	0	
	継続・再開	7	0	2	

表6 新規申請者のうち札幌市でスクリーニングを受検した3症例の詳細(表5の*)

スクリーニング受検年度	在胎週数 出生体重	スクリーニング結果				経過
		日齢	TSH※	FT4※	判定	
2010	38w 3,382g	5	2.2	1.89	正常	エコーで甲状腺低形成 6歳時から甲状腺ホルモン剤内服
2012 ①	38w 2,924g	4	14.2	1.86	要再採血	軽度の合成障害疑い
		13	19.7	1.37	要精密検査	
2012 ②	38w 3,016g	5	17.9	2.61	要再採血	ホルモン合成障害
		14	17.7	1.53	要精密検査	

※ TSH : μU/mL blood, FT4 : ng/dl serum

4. 考 察

4-1 CH 検査について

CH 検査において、2019年の再採血率は0.53%、同精密検査率は0.15%であり、2018年度(0.65%、0.17%)に比べて特に変化は無かった。

CH 検査要精密検査例23名のうち、11名が精密検査を経て原発性甲状腺機能低下症と診断され治療が開始された。3名は潜在性甲状腺機能低下症と診断され、このうち2名は治療開始となったが、1名は無治療で経過観察となった。CHの病型診断は神経細胞の発達が完了する3歳以降に行うことが推奨されている¹⁰⁾ため、これらの児における最終的な確定患者数は本稿で述べた結果から変動する可能性がある。

2019年度に申請された小児慢性特定疾病(内分泌疾患)において、CHの新規申請者のうち3名が本市スクリーニングを受検しており(表6)、このうち2名は2012年度のスクリーニングでTSH高値によ

り要精密検査となっていた。残りの1名は2010年度のスクリーニングで正常判定となっており、新生児マススクリーニングでは発見が困難なTSH遅発上昇例¹⁰⁾だったものと思われる。

4-2 CAH 検査について

本市のCAH検査では、2011年度より二次検査にLC-MS/MS法によるステロイド測定を用いることで再採血率を低減し効率的な検査の実施に寄与している^{8,9)}。最近5年間(2015-2019年度)の年度毎再採血率は0.03~0.11%の間で推移しており、2019年度に大きな変動は無かった。要再採血となった10例はいずれも2回目採血検体において正常化が確認された。

2019年度に要精密検査判定となった2例のうち1例は、胎児期のエコーにより出生前からCAH疑いとしてコンサルタント医によるフォローを受けており、日齢0に採血されたろ紙血のCAH検査で要精密検査判定となった。もう1例は出生直後よ

り陰核肥大、色素沈着があり CAH 疑いで日齢 3 に
コンサルタント医のいる医療機関へ入院搬送され
ていた。日齢 3 のろ紙血の CAH 検査で要精密検査
判定となった。いずれも、塩喪失型として治療継
続中である。

5. 文 献

- 1) 熊谷泰光, 前田博之, 林英夫 他: 札幌市にお
ける新生児の先天性代謝異常マススクリー
ニングについて, 札幌市衛生研究所年報, **5**,
55-57, 1978
- 2) 山田慶子, 浅野みね子, 佐藤敏雄 他: 札幌市
における昭和 53 年度先天性代謝異常マススク
リーニング成績について, 札幌市衛生研究所
年報, **6**, 92-94, 1979
- 3) 野町祥介, 本間かおり, 花井潤師 他: 札幌市
におけるタンデム質量分析計による新生児マ
ス・スクリーニングのための体制整備, 日本
マス・スクリーニング学会誌, **16(1)**, 65-
72, 2006
- 4) 野町祥介, 吉永美和, 雨瀧由佳 他: タンデム
質量分析計による新生児マス・スクリーニン
グの事業化, 札幌市衛生研究年報, **38**, 31-
36, 2011
- 5) 福士勝, 荒井修, 岸信夫 他: 固相法 TSH RIA
によるクレチン症マス・スクリーニングの検
討札幌市衛生研究所年報, **6**, 63-69, 1979
- 6) 福士勝, 荒井修, 水嶋好清 他: 札幌市におけ
るクレチン症マス・スクリーニングについて,
札幌市衛生研究所年報, **10**, 61-64, 1984
- 7) 水嶋好清, 福士勝, 荒井修 他: プレート固相
EIA 法による乾燥濾紙血液中の 17-OHP および
Cortisol の測定, 札幌市衛生研究所年報, **12**,
43-50, 1986
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 日本小児内分泌学会マス・スクリーニング委員
会, 日本マス・スクリーニング学会: 先天性
甲状腺機能低下症マス・スクリーニングガイ
ドライン(2014 年改訂版) [http://jspe.
umin.jp/medical/files/CH_gui.pdf](http://jspe.umin.jp/medical/files/CH_gui.pdf) 2021
年 6 月 23 日閲覧

2020 年度「食品添加物一日摂取量調査」 パラオキシ安息香酸エステル類測定結果

村越早織 小金澤望 滝川香織
島山久史 扇谷陽子 石田 睦 山口 亮

1. 緒 言

「マーケットバスケット方式による食品添加物一日摂取量調査」は、日本人が日常の食生活を通して摂取する食品添加物の量を推定するため、厚生労働省が中心となり、1982 年度から継続的に行われている。2020 年度は国立医薬品食品衛生研究所の他、全国 8 機関で調査を行った。

当所は調査開始時から本事業に参加し、各種の食品添加物を分析してきた。2020 年度は、平成 22 年度受託事業「食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書」(独立行政法人 国立健康・栄養研究所) の結果に基づいて作成した加工食品群年齢階級別の食品喫食量リストの成人 (20 歳以上) の食品喫食量に基づく保存料及び着色料の一日摂取量調査を行った。当所は、パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸プロピル (以下「パラオキシ安息香酸エステル類」という) の分析を担当したので、その結果を報告する。

2. 方 法

2-1 調査期間

試料の購入：2020 年 10 月

試料の発送：2020 年 11 月

試料の分析：2020 年 10 月～2020 年 12 月

2-2 試料の調製

参加機関及び分担項目を表 1 に示した。マーケ

ットバスケット方式により、全国 6 機関 (札幌市、仙台市、香川県、長崎市、沖縄県、国立医薬品食品衛生研究所) で食品喫食量リストに基づき 286 品目の食品を購入し、食品群別 (表 2) に個々の食品の喫食量に応じて混和し、試料を調製した (以下、「混合群試料」という)。2～7 群は等量の水を加えて混和した。

また、当該添加物表示がある食品は、個別に含有量を測定するため、別途必要量を購入し、担当する機関に送付した (以下、「表示群試料」という)。

表 1 参加機関及び分析項目

参加機関	分析項目
札幌市衛生研究所	パラオキシ安息香酸エステル類
仙台市衛生研究所	プロピオン酸
千葉県衛生研究所	タール色素
国立医薬品食品衛生研究所*1	ノルビキシン、ビキシン
東京都健康安全研究センター*1	β-アポ-8'-カロテノール及びカンタキサンチン
広島県立総合技術研究所保健環境センター*2	β-アポ-8'-カロテノール及びカンタキサンチン
香川県環境保健研究センター	二酸化硫黄
長崎市保健環境試験所	安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸
沖縄県衛生環境研究所*2	ノルビキシン、ビキシン

*1 表示群試料のみ分析

*2 混合群試料のみ分析

表2 成人の食品群別分類、食品数、品目数及び喫食量

群番号	食品数	品目数	喫食量 (g)
第1群 調味料、嗜好飲料	41	63	706.4
第2群 穀類	27	40	120.3
第3群 いも類、豆類、種実類	28	36	127.0
第4群 魚介類、肉類、卵類	17	29	43.4
第5群 油脂類、乳類	23	37	61.9
第6群 砂糖類、菓子類	27	55	29.9
第7群 果実類、野菜類、海藻類	26	26	24.2
合計	189	286	1113.1

2-3 試薬

パラオキシ安息香酸イソブチル及びパラオキシ安息香酸イソプロピルは和光純薬(株)製、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸プロピルは関東化学(株)製鹿特級を用いた。標準原液は各標準品を60vol%メタノールに200µg/mLとなるように溶解して調製した。混合標準液は、各標準原液をそれぞれ10µg/mLとなるように混合し、60vol%メタノールで希釈した。

メタノールは富士フィルム和光純薬(株)製LC/MS用、その他の試薬は富士フィルム和光純薬(株)製特級を用いた。

2-4 分析方法と測定条件

パラオキシ安息香酸エステル類の分析における試験法は、第2版 食品中の食品添加物分析法¹⁾に準じ、1、2、7群については水蒸気蒸留法、3、4、5、6群については高タンパク食品及び高脂肪食品に適用する溶媒抽出法を用いて、各試料3回併行で測定を実施した。水蒸気蒸留法の操作フロー図を図1に、溶媒抽出法の操作フロー図を図2に、

装置及び分析条件を表3に示した。

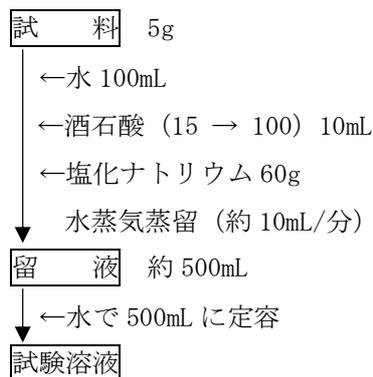


図1 パラオキシ安息香酸エステル類の分析法 (水蒸気蒸留法)

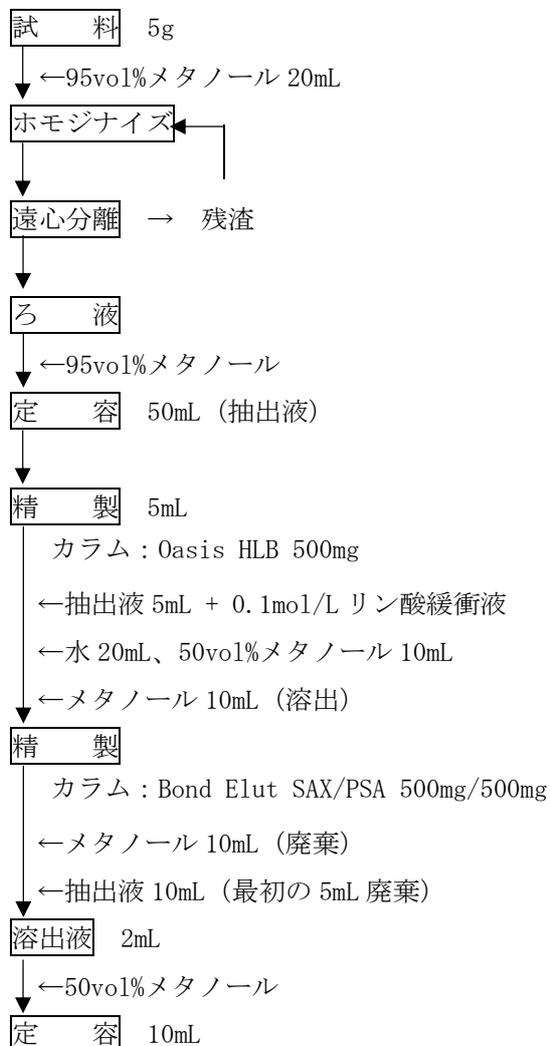


図2 パラオキシ安息香酸エステル類の分析法 (溶媒抽出法)

2-5 添加回収試験及び検出限界、定量限界

各群の混合群試料の1つに対し、1群は50 $\mu\text{g/g}$ 、2~7群は100 $\mu\text{g/g}$ となるように混合標準液を添加し、3併行で添加回収試験を行った。なお、本法における検出限界は、日本産業規格 JIS K 0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則に従い、S/N比10程度の濃度の標準溶液を6回繰り返し測定し、測定値の標準偏差に4.03を掛け、濃度に換算した値とした。定量限界は、検出限界の5倍とした。

表3 装置及び分析条件

HPLC 条件	
装置	Waters 社製 Acquity Arc
カラム	Tskgel ODS-80TSQA 4.6 \times 150mm, 5 μm
移動相	メタノール・水・0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) (12:7:1)
流速	1.0mL/min
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
注入量	20 μL
PDA 検出器条件	
装置	2998 PDA Detector
測定波長	190nm-400nm
検出波長	260nm

表4 パラオキシ安息香酸エチルの食品群別の添加回収率、検出限界及び定量限界

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
	調味嗜好飲料	穀類	いも類 豆類 種実類	魚介類 肉類 卵類	油脂類 乳類	砂糖類 菓子類	果実類 野菜類 海藻類
検出下限 ($\mu\text{g/g}$)	0.423	0.845	0.845	0.845	0.845	0.845	0.845
定量下限 ($\mu\text{g/g}$)	2.11	4.23	4.23	4.23	4.23	4.23	4.23
回収率 (%)	72.7	70.2	90.8	91.3	86.7	86.7	84.8

3. 結果

3-1 添加回収試験及び検出限界、定量限界

パラオキシ安息香酸エステル類の混合標準液 (1 $\mu\text{g/mL}$) を測定したクロマトグラムを図3に、添加回収試験の測定結果及び検出限界、定量限界をそれぞれ表4~表8に示す。

回収率は70.2~96.1%と良好であった。

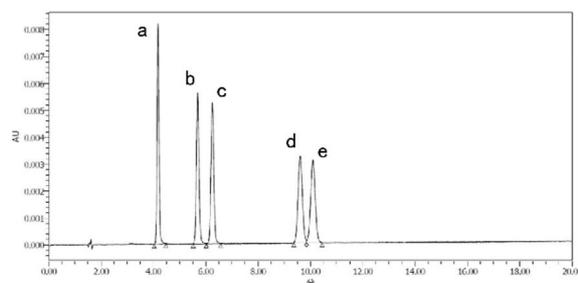


図3 混合標準液(1 $\mu\text{g/mL}$)におけるクロマトグラム

a:パラオキシ安息香酸エチル、b:パラオキシ安息香酸イソプロピル、c:パラオキシ安息香酸プロピル、d:パラオキシ安息香酸イソブチル、e:パラオキシ安息香酸ブチル

3-2 測定結果

本調査ではパラオキシ安息香酸エステル類の表示がある食品がなく、表示群試料に該当する食品がなかったため、混合群試料のみを分析した。その結果、いずれの混合群試料においても、パラオキシ安息香酸エステル類は定量限界未満であった。

表5 パラオキシ安息香酸イソプロピルの食品群別の添加回収率、検出限界及び定量限界

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
	調味嗜好 飲料	穀類	いも類 豆類 種実類	魚介類 肉類 卵類	油脂類 乳類	砂糖類 菓子類	果実類 野菜類 海藻類
検出下限 (µg/g)	0.593	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19
定量下限 (µg/g)	2.97	5.93	5.93	5.93	5.93	5.93	5.93
回収率(%)	96.1	94.5	91.9	91.4	87.1	86.2	96.0

表6 パラオキシ安息香酸プロピルの食品群別の添加回収率、検出限界及び定量限界

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
	調味嗜好 飲料	穀類	いも類 豆類 種実類	魚介類 肉類 卵類	油脂類 乳類	砂糖類 菓子類	果実類 野菜類 海藻類
検出下限 (µg/g)	0.510	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
定量下限 (µg/g)	2.55	5.10	5.10	5.10	5.10	5.10	5.10
回収率(%)	91.3	86.3	91.3	92.1	87.1	86.4	93.9

表7 パラオキシ安息香酸イソブチルの食品群別の添加回収率、検出限界及び定量限界

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
	調味嗜好 飲料	穀類	いも類 豆類 種実類	魚介類 肉類 卵類	油脂類 乳類	砂糖類 菓子類	果実類 野菜類 海藻類
検出下限 (µg/g)	0.471	0.942	0.942	0.942	0.942	0.942	0.942
定量下限 (µg/g)	2.36	4.71	4.71	4.71	4.71	4.71	4.71
回収率(%)	89.6	87.3	89.5	92.0	83.6	85.7	91.1

表8 パラオキシ安息香酸ブチルの食品群別の添加回収率、検出限界及び定量限界

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
	調味嗜好 飲料	穀類	いも類 豆類 種実類	魚介類 肉類 卵類	油脂類 乳類	砂糖類 菓子類	果実類 野菜類 海藻類
検出下限 (µg/g)	0.556	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11
定量下限 (µg/g)	2.78	5.56	5.56	5.56	5.56	5.56	5.56
回収率(%)	90.0	83.4	91.1	92.2	85.2	86.1	91.5

4. 結 語

混合群試料の測定結果より成人（20 歳以上）1 人当たりの各パラオキシ安息香酸エステル類の一日摂取量を算出したところ、0 mg/人/日であった。

このことから、保存料として、しょう油、酢、清涼飲料水等に使用が認められているパラオキシ安息香酸エステル類は、日本人の食生活において、ほとんど摂取されていないと考えられる。

5. 文 献

- 1) 「食品中の食品添加物分析法」の改正について(令和元年 6 月 28 日付け 薬生食基発 0628 第 1 号、薬生食監発 0628 第 1 号 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知により改正)

環境水試料中のエストラジオール類分析方法の検討について

(中間報告)

折原智明^{※1} 木原敏博 箕岡健輔 山口弘行^{※2} 石田 睦 山口 亮

1. 緒 言

17β-エストラジオール(E2)、17α-エチニルエストラジオール(EE2)、エストロン(E1)及びエストリオール(E3)の4物質(図1)は医薬品としても利用されているため、これら4物質の環境水(河川水及び海水)試料中濃度を、過去の調査より低濃度である検出下限値、0.00001 µg/Lで定量するための分析方法を検討した。これは令和元年度、環境省化学物質環境実態調査における分析法開発として札幌市が受託したものである。検出下限値は分析法の要求感度として、環境省がメダカでのLOEC(最低影響濃度)から設定したものである。本報告では、令和元年度及び2年度に行った分析法開発のうち、LC-MS/MSでの機器測定高感度化の検討について報告する。

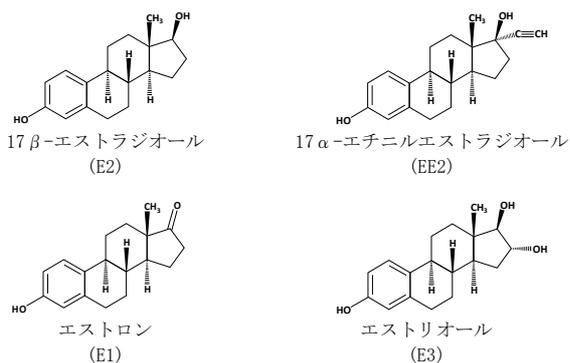


図1 対象物質の構造

2. 方 法

環境水調査を行うにあたり、複数地点の試料を採水する場合、1地点あたりの試料量は多くても2~3Lと想定される。試料量を2Lとし、固相抽出

による抽出液(試験液)量を0.5~1.0 mLとすると、濃縮倍率は2000~4000倍となる。2000倍濃縮試験液において試料換算濃度0.00001 µg/Lを検出するために、試験液の測定で0.02 µg/Lを検出可能(SN比>10)とすることを検討の目標とした。

2-1 試薬

分析対象物質としては、東京化成工業製のE2、EE2、E1及びE3を使用した。サロゲート用のラベル化体としては、Cerilliant(SIGMA-ALDRICH)製のE2-¹³C₃溶液(10 µg/mL)及びE1-¹³C₃溶液(10 µg/mL)、Tront Research Chemicals製のEE2-*d*₄及びE3-*d*₃を用いた。

試薬は関東化学製のアセトニトリル(LC/MS用)、メタノール(LC/MS用)、アセトン(残留農薬試験用5000)及びアンモニア水(Ultrapur)、富士フィルム和光純薬製の*N,N*-ジメチルホルムアミド(高速液体クロマトグラフ用)、メタノール-*d*₄(NMR用)及びフッ化アンモニウム(NH₄F, 和光特級)を使用した。

精製水はMilli-Q Advantage Q-POD Elementで製造したものをを使用した。

2-2 標準液の調製

標準原液は、E2、EE2及びE3はメタノールで溶解し、E1は*N,N*-ジメチルホルムアミドで溶解し100 mg/Lに調製した。

標準液は標準原液を各々アセトニトリルで希釈し1000 µg/Lに調製した。

サロゲート標準原液はEE2-*d*₄及びE3-*d*₃をメタノール-*d*₄で溶解し100 mg/Lに調製した。

サロゲート標準液はE2-¹³C₃溶液、EE2-*d*₄標準原

※1 現 下水道河川局豊平川水処理センター ※2 現 退職

液、E1-¹³C₃ 溶液及び E3-d₃ 標準原液を各々アセトニトリルで希釈し 1000 µg/L に調製した。

検量線用標準液は各標準液をメタノール/精製水(4:6, v/v)にて希釈して調製した。

2-3 移動相組成の検討

イオン化モードはNegativeであり、移動相の添加剤をアンモニア(NH₃)とした。移動相Aを10 mM NH₄ 精製水、移動相Bを①10 mM NH₄ アセトニトリル、②10 mM NH₄ アセトニトリル/メタノール(1:1, v/v)、③10 mM NH₄ メタノールとして①~③におけるE2とEE2のピーク応答値(面積値、高さ)等の比較を行った。

2-4 移動相添加剤の検討

移動相添加剤としてアンモニア及びフッ化アンモニウムの添加濃度の検討を行った。

2-5 試験液溶媒組成の検討

LC-MS/MS 測定時のグラジェント条件は同一で、試験液注入量を 50 µL としたとき、試験液の溶媒組成を①50%メタノール(メタノール/精製水(50:50, v/v))としたもの、②40%メタノール(同(40:60, v/v))としたもの、③40%アセトニトリル(アセトニトリル/精製水(40:60, v/v))としたもの、④30%アセトニトリル(同(30:70, v/v))としたもの、⑤20%アセトニトリル(同(20:80, v/v))としたものによるピーク形状への影響について調べた。

2-6 ESI と APCI イオン化法の検討

対象4物質はESI-Negative及びAPCI-Negativeの両イオン化法で測定可能であるが、夾雑物による影響について調べた。

検討は試料水として夾雑物の多いと考えられる下水処理水 2 L を用い、各サロゲート物質を添加後、Oasis HLB Plus によって固相抽出した。Oasis HLB Plus を乾燥後、メタノールまたはアセトンで溶出し溶媒乾固後、40%メタノール 1.0 mL で溶解した試験液についてサロゲート回収率を調べた。フローチャートを図2に示す。

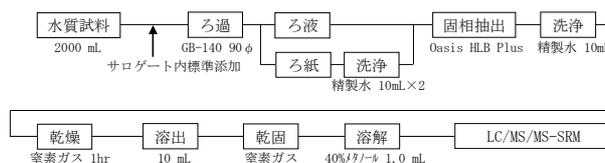


図2 フローチャート

3. 結果と考察

3-1 移動相組成の検討結果

移動相 B の組成を①、②、③として測定したクロマトグラムを図3~5に示す。またこの時の溶出時間、ピーク応答値の結果を表1に示す。なおこの検討は移動相③の場合、ESI ではカラムの耐圧(60MPa)を超えたため APCI にて実施した。

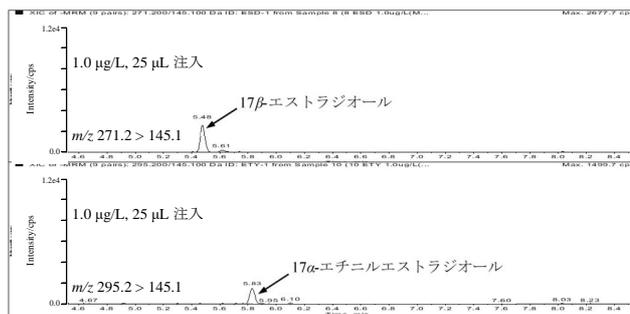


図3 移動相B① アセトニトリル

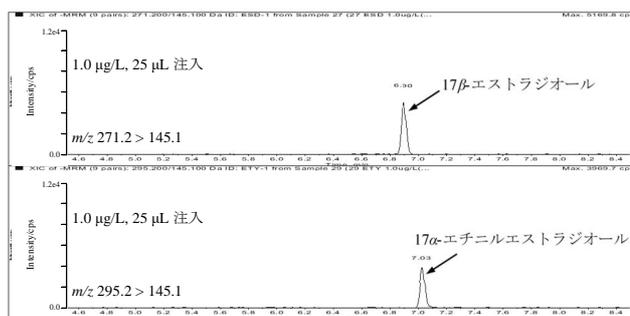


図4 移動相B② アセトニトリル/メタノール(1:1)



図5 移動相B③ メタノール

表 1 移動相調製組成による測定感度の差 (APCI 測定時)

移動相組成			流速 (mL/min)	17β-エストラジオール			17α-エチニルエストラジオール		
アンモニア濃度 (mM)	アセトニトリル (%)	メタノール (%)		1.0 μg/L		25 μL 注入 高さ	1.0 μg/L		25 μL 注入 高さ
				溶出時間 (min)	面積		溶出時間 (min)	面積	
10	100	0	0.80	5.48	6173	2693	5.83	4183	1517
10	50	50	0.80	6.90	12338	5189	7.03	9895	3692
10	0	100	0.80	7.72	24419	10526	7.69	16520	6661

表 2 移動相添加剤濃度による測定応答値の比較 (ESI 測定時)

移動相添加剤 種類	濃度 (A,B 共) (mM)	17β-エストラジオール		17α-エチニルエストラジオール		エストロン		エストリオール	
		1.0 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL	0.20 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL
		面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ
NH ₄ F	0.10	425884	94977	335475	76861	335188	72681	236853	50020
	0.50	250281	58646	225403	53581	238864	56718	94797	21375
	5.0	83018	19757	58477	13759	76351	17429	79207	17789
NH ₄	5.0	448096	99532	228472	49863	377381	89967	414757	85220
	10	348005	78489	253409	60081	259031	58993	271641	58359
	20	260238	63797	184127	45499	189511	44939	155174	34864

表 3 移動相添加剤濃度による測定応答値の比較 (APCI 測定時)

移動相添加剤 種類	濃度 (A,B 共) (mM)	17β-エストラジオール		17α-エチニルエストラジオール		エストロン		エストリオール	
		1.0 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL	0.20 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL
		面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ
NH ₄ F	0.10	32716	11313	28408	9796	53939	19202	10551	3816
	0.50	27527	9244	22867	7748	58029	20195	17373	6143
	5.0	1420	445	1488	539	4724	1624	1879	621
NH ₄	5.0	52735	18585	43456	15230	79541	28726	39155	13851
	10	79898	26759	64751	21509	105379	34908	78659	25850
	20	72152	25327	60796	21628	92245	31993	64547	22166

メタノール濃度を0%から50%、100%と高くすることによりピーク応答値は、約2倍、4倍と増加したが、E2とEE2の溶出時間の差は縮まり、メタノール濃度100%では、ほぼ同じ溶出時間となり分離出来ない結果となった。グラジエントパターンを変えた検討も実施したが分離は向上しなかった。以上の結果から、ピーク応答値を増加させつつ

ピーク分離も確保するため、移動相Bの組成はアセトニトリル/メタノール(1:1, v/v)とする。

3-2 移動相添加剤の検討結果

ESI測定時の添加剤フッ化アンモニウム及びアンモニア各添加濃度における各対象物質のピーク応答値の結果を表2に示す。APCI測定時の結果を表3に示す。

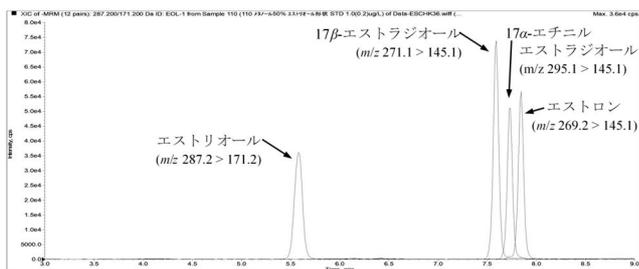


図 6 ①50%メタノール溶媒調製試験液

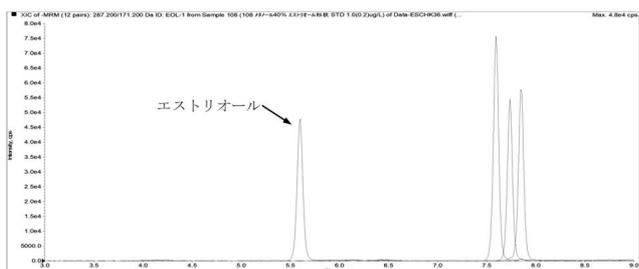


図 7 ②40%メタノール溶媒調製試験液

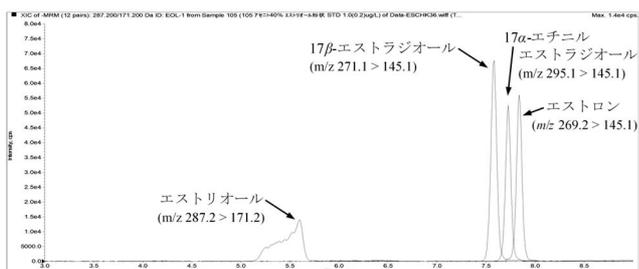


図 8 ③40%アセトニトリル溶媒調製試験液

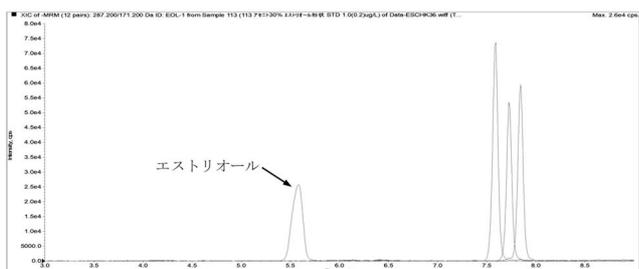


図 9 ④30%アセトニトリル溶媒調製試験液

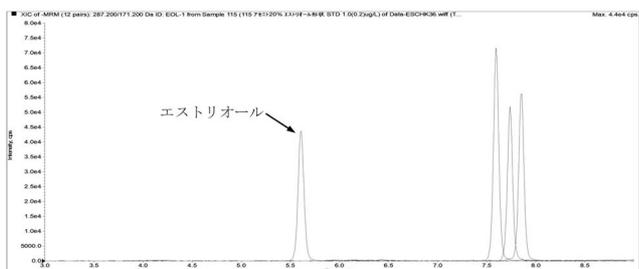


図 10 ⑤20%アセトニトリル溶媒調製試験液

ESI と APCI では添加剤による挙動が異なっており、ESI では 0.10 mM フッ化アンモニウム及び 5.0 mM アンモニアの場合が良好であり、APCI ではフッ化アンモニウムでのピーク応答値は小さく添加剤としては不適であり、10 mM アンモニアの場合が良好であったことから、各イオン化法において適当な添加剤種及び濃度は異なる結果となった。

ESI と APCI ではイオン化時の温度やチャージが液滴中か気化した状態かといった違いにより差が生じると考えられる。

3-3 試験液溶媒組成の検討結果

ESI 測定時における、試験液溶媒組成①～⑤で得られたクロマトグラムを図 6～10 に示す。溶出時間の早い E3 のピーク形状へ特に影響があり、試験液中の有機溶媒はメタノールの場合で 40%以下、アセトニトリルでは 20%以下としなければ SN 比の良いピークは得られない結果となった。APCI でも同様の結果であった。

以上の 3-1～3-3 の検討結果より ESI 及び APCI のどちらでも、標準液濃度 0.02 µg/L (E1 については 0.004 µg/L) での測定 (SN 比 > 10) が可能となった。また標準液濃度 0.02～1.0 µg/L、1.0～10 µg/L の範囲 (E1: 0.004～0.2, 0.2～2.0 µg/L) で良好な直線性を示す ($r^2 > 0.99$) 検量線も得られた。

3-4 ESI と APCI イオン化の検討結果

下水処理水を用いた 2000 倍濃縮では、メタノール溶出試験液は濃い緑色に着色していたが、アセトン溶出試験液は黄色の着色であったことから、メタノールの溶出能力が高く夾雑物も多く溶出していると考えられた。

ESI と APCI イオン化の比較試験を行うにあたり、メタノール溶出試験液とアセトン溶出試験液中の 4 種のサロゲート測定をそれぞれのイオン化法で行い、回収率を比較した結果を表 4 に示す。

いずれのサロゲートについても、APCI のアセトン溶出試験液が最も良い回収率が得られることが

表4 下水処理水 2000 倍濃縮試験液測定結果

イオン化法	サロゲート物質	回収率 (%)	
		メタノール溶出	アセトン溶出
ESI	17β-エストラジオール- ¹³ C ₃	15.3	18.3
	17α-エチニルエストラジオール- <i>d</i> ₇	13.7	17.1
	エストロン- ¹³ C ₃	28.7	38.9
	エストリオール- <i>d</i> ₃	18.9	26.0
APCI	17β-エストラジオール- ¹³ C ₃	54.6	72.2
	17α-エチニルエストラジオール- <i>d</i> ₇	79.0	103.3
	エストロン- ¹³ C ₃	62.4	87.6
	エストリオール- <i>d</i> ₃	53.9	90.3

判明した。

両イオン化測定では全く同じ試験液を測定しているため、回収率の差はイオン化方法の違いによるものであり、夾雑物による感度への影響が少ないのは APCI であった。

表4の結果から Oasis HLB Plus 固相カートリッジからの対象物質の溶出溶媒はアセトンを選択し、イオン化法については4種のサロゲート全ての回収率が70~120%の範囲に収まる APCI を採用することとした。

APCI イオン化法は気化後にイオン化させるため、ESI イオン化における液滴中でのチャージの奪い合いによるイオン化抑制が発生しにくいためと考えられる。

4. 結 語

本検討により、目的とした試験液中の対象4物質を0.02 μg/Lで検出可能となった。そのLC-MS/MS条件を表5に示す。

今回の検討結果は、環境水試料中のエストラジオール類の分析方法としてはLC-MS/MSの測定条件の設定までであり、実際に、環境水試料について検査するには、抽出方法、分解性スクリーニング試験、保存性試験等の検討が必要となる。

表5 LC-MS/MS条件

LC: 島津 Nexera X2	
カラム	: Poroshell HPH-C18 (150×4.6 mm 2.7 μm)
移動相	: A: 10mM NH ₄ /精製水 B: 10mM NH ₄ /AcCN/MeOH ※AcCN/MeOH(1:1, v/v)
	: 0→1 min(B 30%) 1→7 min(B 30→90%) 7→9 min(B 90%)
流量	: 0.8 mL/min (約37MPa)
注入量	: 50 μL
MS: Sciex QTRAP4500	
イオン化法	: APCI-Negative
カーテンガス	: 20 psi
コリジョンガス	: 12
ネブライザ電流	: -3.0 mA
スプレー位置	: X 8 mm, Y 7 mm
ガス温度	: 400°C
ネブライザガス	: 60.0 psi
出口電圧	: -10.0 V
N ₂ 発生装置	: PEAK製 AB-3G
CURTAIN	: 60 psi
SOURCE	: 110 psi
EXHAUST	: 60 psi
モニターイオン	
E2	: <i>m/z</i> 271.2→145.1(CE-55)
EE2	: <i>m/z</i> 295.1→145.1(CE-55)
E1	: <i>m/z</i> 269.2→145.1(CE-50)
E3	: <i>m/z</i> 287.2→171.1(CE-50)