

## 調査研究の概要

### 1. 保健科学課 保健科学係

調査研究名	研究の概要
<p><b>タンデム質量分析計によるスクリーニング・システム構築に関する研究</b></p> <p>研究担当者： 野町祥介、雨瀧由佳、吉永美和</p> <p>研究期間： 平成 20 年度から 2 年間</p>	<p><b>【目的】</b> 現行のろ紙血液を用いる新生児代謝異常等検査に、タンデム質量分析計による検査法を導入することで、見出しうる代謝異常疾患を増やし、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て、新しい札幌市のスクリーニング・システムを構築する。</p> <p><b>【方法】</b> 2005 年 4 月から「タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの研究実施要領」に基づいて研究を開始した。2010 年度は、5 年間の研究成果を踏まえ、本検査の事業化を行った。変更点等を以下にまとめる。</p> <p>(1) 関連要綱・要領：名称を「先天代謝異常等検査実施要綱・要領」から「新生児マス・スクリーニング実施要綱・要領」に変更し、対象疾患を 6 疾患から 26 疾患に拡充した。これに伴い、「タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの研究実施要領」を廃止した。また、追跡調査実施要領、連絡会議実施要領もこのたびの事業化に合わせて改訂した。</p> <p>(2) リーフレット：母子健康手帳交付時の「新生児マス・スクリーニングのお知らせ」と題する広報用リーフレットを改訂した。</p> <p>(3) パンフレット・申込書：事業化に伴う内容変更を実施した。申込書は、保護者の自由意思に基づいて、追加対象 20 疾患の拒否が可能な様式とした。</p> <p>(4) ホームページ：事業化に伴い内容を更新した。</p> <p>(5) 保健センター向け冊子類：保健センター職員向けの「新生児マス・スクリーニング Q&amp;A」と「新生児マス・スクリーニングの手引き」の内容を更新し、配布した。</p> <p>(6) マス・スクリーニングニュース第 17 号の発行：従来発行している市内の医療機関向け広報媒体で、このたびの事業化に関して、周知と啓発を目的としたものを発行・配布した。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> 札幌市の新生児マス・スクリーニング対象疾患を 26 に拡充することができた。これによって全国でももっとも充実した検査の提供が可能となった。なお、当該検査の事業化は 2010 年 4 月にこれを行った大阪市に次いで国内で 2 番目。</p>
<p><b>血中多種アミノ酸及び尿中アシルカルニチン・アミノ酸分析法の検討</b></p> <p>研究担当者： 野町祥介</p> <p>研究期間： 平成 20 年度から 22 年度</p>	<p><b>【目的】</b> 代謝異常依頼検査でハイリスク児、もしくはスクリーニング精査例について、化学補助診断の一端として、精度の高い血中・尿中多項目アミノ酸及び尿中アシルカルニチンの分析を行うため、これらのタンデムマスを用いた簡易分析法を構築する。</p> <p><b>【結果及び考察】</b></p> <p>(1) 各アミノ酸の添加回収試験結果 4 濃度の Ctrl 尿検体を作製し、それぞれ n=6 で測定を行った。平均回収率は、Gly 49.1%、Ala 46.0%、Ser 46.7%、Val 42.9%、Thr 61.9%、Leu+Ile 77.4%、Lys 76.8%、Phe 56.7%、Tyr 79.0%、Asp 53.2%、Glu 62.7%、Orn 58.7%、Met 48.2%、Arg 48.5%、Cit 4.5%であった。</p> <p>(2) 直線性の検討 4 濃度の Ctrl 尿検体による測定値：理論値の直線性は良好だった。</p> <p>(3) AccqTag 法との相関 かつて AccqTag 法により測定後、凍結保存していた尿検体について、本</p>

	<p>法で測定した。</p> <p>良好な相関を示したもの：Gly、Ala、Phe、Tyr、Lys、Ser、Thr  相関が良好とは言えなかったもの：Asp、Leu+Ile、Glu、Val、Arg</p>
<p><b>代謝異常症依頼検査システムの構築</b></p> <p>研究担当者： 野町祥介、吉永美和</p> <p>研究期間： 平成 21 年度から当分の間</p>	<p><b>【目的】</b> 有用性の高い各種先天性代謝異常症の化学的補助診断システムを確立する。</p> <p><b>【方法】</b> 医療機関の依頼に基き、新生児マス・スクリーニング精査例及び臨床症状等から代謝異常疾患が疑われる例について、タンデム質量分析計による血中アミノ酸・アシルカルニチン分析、GC/MS による尿中有機酸分析を中心とした特殊検査により、診断補助・患者フォローに貢献できるデータを提供する。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> 代謝異常依頼検査では例年通り毎月 50～80 件程度の依頼があり、2010 年度の主な国内補助診断症例とその代表的検査指標について示す。</p> <p>(1) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ欠損症：尿中 Pyruvate 高値、血中乳酸・ピルビン酸高値</p> <p>(2) オキシプロリン尿症：尿中オキシプロリン高値</p> <p>(3) プロピオン酸血症：血中プロピオン酸高値、アセチルカルニチン/アセチルカルニチン比高値、尿中メチルケトン酸高値；タンデム見逃し例</p> <p>(4) MELAS (2 例)：PCR-RFLP 法による mtDNA 病因変異確認</p> <p>(5) SCOT 欠損症：尿中ケトン体高値 (特に butyric)</p> <p>なお、(5) の症例については、保護者の同意に基づいて北海道薬剤師会検査センターが保管する新生児マス・スクリーニング検査済検体による追加検査を実施したが、異常所見は認めなかった。</p> <p>また、本年度から、倫理審査委員会の助言に基づき、保護者から当該検査、及び追跡調査、検体の保管と二次利用に関する同意文書を書面により取得することとした。これによって、当該依頼検査の説明機会の確保と、検体の他の研究への利用に関する環境が整備された。</p>
<p><b>スクリーニング対象疾患における酵素診断法の構築に関する研究</b></p> <p>研究担当者： 雨瀧由佳、野町祥介</p> <p>研究期間： 平成 22 年度</p>	<p><b>【目的】</b> 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児スクリーニングで対象疾患が疑われた児を円滑に確定診断に導き、かつ「酵素診断法を複数の検査機関が保有する」という全国的な診断支援体制の一環を担うため、早期確定診断の重要性が高い中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (MCADD)、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (VLCADD) についての酵素診断法のプロトコールの検討を行い、診断のための測定系が施設として維持できる適切な方法であるかどうか等を含めて検討する。</p> <p><b>【方法】</b> MCADD と VLCADD の酵素診断法を広島大学の但馬先生のプロトコールを応用し、検討する。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> 本研究のために必要な全血からの白血球抽出法について、血液分離キット Lympholyte (CEDARLANE) を試したところ、ある程度良好であった。また、白血球数計算は、希釈ペレットをノイバウエル計算版により目視カウントすることで可能であった。</p>
<p><b>1 歳 6 か月児を対象とした神経芽細胞腫スクリーニング事業の有用性の検討</b></p> <p>研究担当者： 吉永美和、太田優、</p>	<p><b>【目的】</b> 札幌市の神経芽細胞腫スクリーニング事業は、6MS で発見される予後良好例の過剰診断・治療を低減し、2 歳から 4 歳で発症する予後不良例を効果的に発見することを目的として、平成 18 年度から 1 歳 6 か月児を対象として実施している。本研究では、市内の神経芽細胞腫患者症例の確実な捕捉により、この目的が達成されているかどうか検証するとともに、18MS</p>

<p>花井潤師</p> <p>研究期間： 平成 21 年度から当分の間</p>	<p>導入後の札幌市の正確な罹患率、死亡率の把握及びスクリーニングを実施していない地域との比較検討を行い、スクリーニングの有効性を検証する。</p> <p><b>【方法】</b> 札幌市における 18MS のデータをまとめ、発見患児に関する治療状況などの情報を収集した。また、小児慢性特定疾患医療意見書を閲覧し、神経芽細胞腫に関する情報を収集した。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> 18MS 開始後 5 年目となり、これまでのスクリーニングの結果についてまとめた。 18MS の有効性を評価するために、小児慢性特定疾患医療意見書を調査した結果 2009 年度までの申請のうち 18MS で見逃した例は見つからなかった。また、共同研究者である西先生が収集しているデータにおいても 18MS 見逃し例は確認されなかった。</p> <table border="1" data-bbox="592 696 1377 857"> <thead> <tr> <th>期間</th> <th>受検者数</th> <th>精密検査数</th> <th>患者数</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2006 年 4 月-2010 年 3 月</td> <td>40,478</td> <td>21</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>2010 年 4 月-2010 年 12 月</td> <td>7,913</td> <td>3</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>全 体</td> <td>48,391</td> <td>24</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table> <p>18MS で発見された患者は 6MS、14MS と比べ、進行例の割合が多くなった。</p> <table border="1" data-bbox="587 965 1382 1043"> <thead> <tr> <th>患者 No.</th> <th>原発部位</th> <th>INSS 病期</th> <th>治療</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>13</td> <td>右副腎</td> <td>1</td> <td>全摘</td> </tr> </tbody> </table>	期間	受検者数	精密検査数	患者数	2006 年 4 月-2010 年 3 月	40,478	21	12	2010 年 4 月-2010 年 12 月	7,913	3	1	全 体	48,391	24	13	患者 No.	原発部位	INSS 病期	治療	13	右副腎	1	全摘
期間	受検者数	精密検査数	患者数																						
2006 年 4 月-2010 年 3 月	40,478	21	12																						
2010 年 4 月-2010 年 12 月	7,913	3	1																						
全 体	48,391	24	13																						
患者 No.	原発部位	INSS 病期	治療																						
13	右副腎	1	全摘																						
<p>クレチン症スクリーニングシステム精度評価のための研究</p> <p>研究担当者： 藤倉かおり、田上泰子</p> <p>研究期間： 平成 21 年度から 22 年度</p>	<p><b>【目的】</b> クレチン症の診断精度向上とより効果的なスクリーニングシステムの再構築</p> <p><b>【方法】</b> ①クレチン症スクリーニング陽性例の児とその母の尿中ヨードの測定 クレチン症スクリーニング陽性例において、医療機関で行う精密検査の一環として採取した母児の採血ろ紙と尿を当所に送付する。当所では、ろ紙血中の甲状腺刺激ホルモン（TSH）、遊離サイロキシン（FT4）、尿中のヨード濃度、クレアチニン濃度を測定し、母児の甲状腺検査データとヨード測定データ、スクリーニング検査データ、精密検査データ、診断データを照合することで疫学的な検証を行う。 ②クレチン症スクリーニング正常例の尿中ヨード測定 新生児での尿中ヨード範囲について知見を得る目的で、NTT 東日本札幌病院産婦人科にて出生した生後 4～6 日目の児とその母親約 50 組を対象として、尿中ヨード濃度を測定する。また、児の母親に対してはアンケート調査票に記入してもらい、母親のヨード摂取状況等についても調べる。尿とアンケート調査票は随時当所へ送付されるものし、当所において ICP 発光分光分析法によりヨード濃度を測定する。得られた測定データおよびスクリーニング検査時の甲状腺機能検査データから、尿中ヨード濃度レベルの分布を調べる。また、健常児における尿中ヨードと甲状腺機能の関連についても調べる。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> アンケート集計の結果、昆布などヨード含有飲食物の摂取頻度、ヨード含有サプリメントの服用頻度、ヨード含有消毒剤によるうがいの頻度による尿中ヨード値に目立った差は見られなかった。子宮卵管造影検査の造影剤によるヨード負荷のあった母とその児で尿中ヨードが高くなっているケースがあったが、分布としては造影検査受検の有無による差は見られな</p>																								

	<p>かった。健常新生児とその母における尿中ヨードの基準範囲はそれぞれ<math>&lt;17\mu\text{g}/\text{mgCre}</math>、<math>&lt;2.6\mu\text{g}/\text{mgCre}</math>と推定された。</p> <p>②の検討で得られた健常児とその母のヨードレベルを、①のスクリーニング陽性例と比較した結果、健常児における中央値1.2に対し、要精密検査児では5.2と高値を示し、ヨード負荷による一過性高TSHがかなりの割合で存在することが示唆された。一方、健常児の母と要精密検査児の母の比較では、両者の分布に目立った差はみられなかった。</p>
<p><b>先天性副腎過形成症スクリーニングの精度向上に関する研究</b></p> <p>研究担当者： 藤倉かおり、田上泰子</p> <p>研究期間： 平成22年度から23年度</p>	<p><b>【目的】</b> 先天性副腎過形成症（CAH）スクリーニングの偽陽性率を減少させ、より精度の高いスクリーニングシステムを構築することを目的とした二次検査法の検討を行う。</p> <p><b>【方法】</b> タンデム質量分析計 Waters Quattro Premier XE を用いて、新生児ろ紙血中の下記のス��ロイドについてタンデム質量分析計による測定条件の検討を行なう。  <ul style="list-style-type: none"> <li>・17-OHP</li> <li>・<math>\Delta</math>4-アンドロステンダイオン(4-AD)</li> <li>・コルチゾール(F)</li> <li>・11-デオキシコルチゾール(11-DOF)</li> <li>・21-デオキシコルチゾール(21-DOF)</li> </ul> </p> <p><b>【結果及び考察】</b></p> <p>1) 分析条件        エレクトロスプレーイオン化法 MRM ポジティブモード、キャピラリー電圧:3.0kV、脱溶媒ガス 1000L/hr、イオン源ヒーター:120°Cで検討した。保持時間 2.2分にF、2.4分に21-DOF、2.6分に11-DOF、2.8分に4-AD、3.0分に17-OHPのピークが観測され、1検体あたり平衡化も含め9分で測定可能であった。測定器の検出限界はそれぞれインジェクションあたり0.25、0.05、2.5、0.5、2.5 pgであり、200ng/mlまでの直線性は良好であることを確認した。</p> <p>2) ろ紙血からのサンプル調整方法の検討について        現行スクリーニングの確認検査で実施しているHPLC測定では、ろ紙血を水に溶出後にエーテル抽出していたが(従来法)、文献を参考に、より簡便な、ろ紙血から直接有機溶媒(80%アセトニトリル/水)で抽出する方法を検討した。この結果、両法の感度、直線性に大差はなかったことから、操作の簡便なアセトニトリル溶液で抽出する方法で今後の検討をすすめることとした。</p> <p>3) ろ紙からの回収率        活性炭でステロイド成分を除去した血清に5種の対象ステロイドを添加し、等量の血球を加えて作成した全血値5、20、100ng/mlの血液ろ紙により回収率を計算した。濃度5 ng/mlでの回収率は100%を超える場合が多かった。濃度20および100 ng/mlの回収率は79~225%であった。</p> <p>4) 17-OHPのHPLC法との相関        新生児ろ紙血液検体でHPLC法による17-OHP確認検査を行う検体について同時にタンデム質量分析計での17-OHP測定を行った。両法とも、ELISAキットに添付されている内部精度管理検体を標準検体として検量線を作成して定量した。良好な相関であった。</p> <p>5) 新生児における5種のろ紙血中ステロイドの分布        対象ステロイド5種を定量するために、CDC(アメリカ疾病予防センター)から送付されるキャリブレーション用血液ろ紙9点(0~150 ng/ml serum)を標準検体として使用した。ELISAで17-OHP<math>&gt;5.5</math>であった日齢4~6の新生児ろ紙血137件における5種のステロイドの平均値、中央値、最小値・最大値は表4のとおりであった。</p>

表4 ELISAで17-OHP>5.5であった新生児検体(日齢4-6)のステロイド分布

	n	平均	中央値	範囲(最小値~最大値)
F	137	83.4	42.6	0.0 ~ 594.7
21-DOF	137	0.0	0.0	0.0 ~ 0.7
11-DOF	137	1.5	1.1	0.0 ~ 13.3
4-AD	137	0.7	0.1	0.0 ~ 7.6
17-OHP	137	1.6	0.7	0.0 ~ 28.2

単位:ng/ml serum

分煙実施施設職員の受動喫煙状況の調査

研究担当者：  
花井潤師、吉永美和、  
太田優、

研究期間：  
平成22年度から23年度

【目的】

分煙を推進している本市の公共施設を対象として、健康増進法第25条に規定する受動喫煙防止対策の有効性について、就業する職員の受動喫煙状況を科学的に評価を行い、より効果的な分煙環境に改善していく。なお、今年度はすべて大気検査係で研究を実施した。

【方法】

- 調査期間：H22.11.5～11.29
- 対象施設：本市庁舎3施設10喫煙室
- 測定項目：喫煙本数、喫煙時間帯、浮遊粉じん、一酸化炭素、気流（風向・風速）、ニコチン等

【結果及び考察】

厚生労働省の「職場における受動喫煙防止対策ガイドライン」に示された室内空気環境の基準と照らし合わせると、

- ①全ての喫煙室に隣接する事務室等の非喫煙場所に、受動喫煙の影響は見られなかった。
- ②全ての喫煙室において浮遊粉じん濃度の”0.15mg/m<sup>3</sup>以下”を超える時間帯があった。
- ③喫煙本数及び喫煙時間と浮遊粉じん濃度にはほぼ良好な相関が認められた。
- ④喫煙本数及び喫煙時間とニコチン濃度にはあまり良い相関は認められなかった。
- ⑤喫煙室の排気処理能力については、不足している喫煙室があった。
- ⑥最大喫煙許容人数について浮遊粉じん濃度を基準として算出したところ、時間平均喫煙者数に対しては全ての喫煙室がクリアできたものの、時間最大喫煙者数に対しては全ての喫煙室がクリアできなかった。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）（主任研究者：稲葉洋平 国立保健医療科学院）の研究費の補助を受けて実施した。

胆道閉鎖症スクリーニングの有用性の検討

研究担当者：  
花井潤師、林 康一、吉永美和

研究期間：  
平成22年度から当分の間

【目的】

札幌市の胆道閉鎖症スクリーニングは、2001年度（平成13年度）から、生後1か月の乳児を対象に、便色調カードを用いて保護者が便の色調を判定することで実施している。

本研究では、追跡調査の結果を元に、札幌市における本症の発生頻度、患者の治療成績、予後など調査し、スクリーニングの有効性を検証する。

【方法】

スクリーニングの有効性を疫学的に検討するため、以下の基礎データを収集する。

- 1) 便色調番号の回答数を集計し、精査例の特徴を調べる。
- 2) 追跡調査結果を元に、札幌市で発見された患児の予後、肝移植、合併症などを調査する。
- 3) 平成17年度以降の追跡調査結果を元に、胆道閉鎖症患児のスクリーニング履歴、手術日時、肝移植術施行者数などの調査する。

	<p><b>【結果及び考察】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 便色調番号の異常を示す3を含む回答のあった49例では、単色の回答数が15例(31%)でその他は複数色の回答であった。</li> <li>2) 札幌市で発見された患児8例のうち、4例は6か月から1歳7ヶ月で肝移植を施行した。また、8例中3例が何らかの合併症を有していた。</li> <li>3) 平成17年度以降の追跡調査で確認された患児は41例であった。スクリーニングを受検した患児は合計12例で、判定が陽性と陰性だったものがそれぞれ6例ずつであった。また、肝移植術施行者数もそれぞれ3名ずつであった。</li> </ol>
<p><b>重症複合型免疫不全症の新生児スクリーニング法の検討</b></p> <p>研究担当者： 野町祥介、吉永美和</p> <p>研究期間： 平成21年度から当分の間</p>	<p><b>【目的】</b></p> <p>重症複合型免疫不全症は、易感染性を呈し、早期診断、早期治療を行わなければ致命的になる疾患である。しかし、診断がつけば、抗菌剤の投与、ガンマグロブリンの定期補充などにより感染症の予防が可能であり、さらに幹細胞移植により根治的な治療も期待できる。そこで、乾燥濾紙血液による重症複合型免疫不全症の簡便迅速で多検体処理が可能な測定法を確立して新生児スクリーニングへの応用を検討する。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>リアルタイム定量PCR法により、スクリーニングの指標であるTCR-rearrangement excision circles(TRECS)の高感度検出法により行う。 (DNA抽出) Generation Capture Card Kit (Quiagen)を使用。 (qPCR) Fast SYBRG 使用。プライマーは J Mol Med 2001;79:631 で示されている sjTREC primer を使用。</p> <p><b>【結果及び考察】</b></p> <p>1punchでpatientとNB(Normal newborn)の良好な分離を示した。2punchsでは逆に感度の不足を示すサンプルがあり、抽出過程の洗浄が不十分となる可能性が考えられた。</p>