

1 保健科学課  
 (1) 微生物係

調査研究名	研究の概要
<p>カルバペネム耐性腸内細菌科細菌、バンコマイシン耐性腸球菌、薬剤耐性アシネトバクターの薬剤耐性試験検査について</p> <p>研究担当者：石黒真琴            尾島拓也            大門世理奈</p> <p>研究期間：平成 30 年度～</p>	<p><b>【目的】</b>            カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) をはじめとする <math>\beta</math>-ラクタム系薬剤に耐性を示す多剤耐性菌が増えており、世界的な問題となっている。平成 29 年 3 月 28 日に出された厚生労働省の通知は保健所へ CRE 感染症、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) 感染症、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 感染症、薬剤耐性アシネトバクター (MDRA) 感染症の発生届があった場合、係る感染症病原体薬剤耐性遺伝子等の検査を地方衛生研究所が実施するよう求めるものとなっている。当所でも、平成 30 年 11 月より薬剤耐性菌の検査を開始した。</p> <p>札幌市保健所に届出のあった CRE、VRE、MDRA の菌株について薬剤耐性遺伝子等の検査を実施し、札幌市の薬剤耐性菌流行状況について把握するとともに、医療機関へ情報提供する。</p> <p><b>【方法】</b>            当所に搬入のあった菌株についてディスク拡散法、PCR 法、mCIM 法を用いて薬剤耐性菌検査を実施した。</p> <p><b>【結果及び考察】</b>            1. VRE、MDRA については菌株搬入がなかったため検査を実施しなかった。            2. CRE について、2020 年度搬入分 48 株について検査を実施した。            48 株のうち、いずれかのカルバペネマーゼ遺伝子陽性株は 7 株であった。カルバペネマーゼ遺伝子陽性株の遺伝子型の内訳は、IMP 型が 4 株、NDM 型が 3 株となった。NDM 型は当所での薬剤耐性菌検査開始後、初の検出となった。IMP 型は国内での報告が多く (国内型)、NDM 型は海外での報告が多い (海外型) とされるが、近年、全国的に海外型カルバペネマーゼ遺伝子である NDM 型や KPC 型の増加が指摘されている。特に海外渡航歴のない症例からの NDM 型検出が報告されており、当所での検出事例も、すべて海外渡航歴は無い事例であった。本事例は 3 例とも同時期に同地域からの届出であり、2021 年 6 月時点で新たな NDM 型の検出は無いが、今後も注視していく必要がある。</p>

(2) 母子スクリーニング検査係

調査研究名	研究の概要
<p>LC-MS/MS による有機酸の分析法の基礎検討</p> <p>研究担当者：手塚美智子 吉永美和 石川貴雄</p> <p>研究期間：平成 30 年度～令和 2 年度</p>	<p><b>【目的】</b> 先天性代謝異常症の一次検査（タンデムマス検査）では、主に有機酸代謝異常症において、1 つのアシルカルニチンが複数の疾患の指標となるケースがある。各疾患において特異的に検出される有機酸も疾患の指標となり得るが、先天性代謝異常検査における有機酸の分析系はまだ確立されていない。より早期に疑い疾患を特定できるよう、新生児マススクリーニングのろ紙血検体を用いた有機酸の分析法の構築について検討する。</p> <p><b>【方法】</b> 高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 LC-MS/MS-8050（島津製作所製）及び分離カラムを用いて、12 種類の有機酸（ピルビン酸 (Pyr)、乳酸 (Lac)、3-ヒドロキシプロピオン酸 (3-OH-PA)、3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-OH-IVA)、2-メチル-3 ヒドロキシ酪酸 (2-Me-3-OH-BA)、コハク酸 (SA)、メチルマロン酸 (MMA)、グルタル酸 (GA)、3-メチルグルタル酸 (3-Me-GA)、3-ヒドロキシグルタル酸 (3-OH-GA)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸 (3-OH-3-Me-GA)、メチルクエン酸 (MCA) ) の分析法を検討する。</p> <p><b>【結果及び考察】</b> 洗浄赤血球及び異なる 4 濃度の有機酸標準液を混合し、無添加を含む 5 濃度の有機酸添加ろ紙血液を作製し分析を行ったところ、良好な直線性が得られた。さらに、有機酸添加ろ紙血液を検量線とした外部標準法を用い、新生児マススクリーニング検体及び診断済み患者検体を分析したところ、正常群・偽陽性群・患者群についての濃度分布が確認できた。MMA はメチルマロン酸血症に特異的に検出されており、メチルマロン酸血症とプロピオン酸血症においては疑い疾患の迅速な絞り込みが可能になると思われる結果が得られた。なお、3-OH-PA はろ紙血液の抽出試料ではピーク形状不良となることが判明した。</p>

LC-MS/MS を用いたステロイド  
測定項目の追加についての検  
討

研究担当者：阿部正太郎  
藤倉かおり  
山岸卓弥

研究期間：令和元年度～令和 3  
年度

【目的】

先天性副腎過形成症（CAH）は、コルチゾールの分泌不全を起こす常染色体劣性遺伝疾患群の総称であり、障害されている酵素の種類によって数種類の病型に分けられる。

当係における新生児 CAH スクリーニングは、最も頻度の高い 21-水酸化酵素欠損症（21-OHD）をターゲットに、一次検査では ELISA 法で 17-OHP を、二次検査では LC-MS/MS を用いて 17-OHP を含む 5 種のステロイドを測定し、ろ紙血中濃度及び濃度比を基準値と比較する運用としている。

この方法で 21-OHD 以外の CAH を発見することは困難であるが、下表のステロイドを同時に測定できれば、外性器異常等の症状がある児に対し、診断補助として大変有用である。

そこで、ろ紙血中の下表ステロイドの LC-MS/MS での分析系の構築について検討したい。

名前	疑われる疾患
デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)	3β-HSD 欠損症 POR 欠損症
テストステロン(T)	11β-水酸化酵素欠損症 17α-水酸化酵素欠損症
progesterone(Prog)	17α-水酸化酵素欠損症
pregnenolone(Preg)	3β-HSD 欠損症
11-deoxycorticosterone (DOC)	17α-水酸化酵素欠損症 11β-水酸化酵素欠損症
17-hydroxypregnenolone (17-OHPreg)	3β-HSD 欠損症
corticosterone(B)	17α-水酸化酵素欠損症

【方法】

高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 LC-MS/MS (Waters 社) を用い、現在ルーチンで測定している 5 種のステロイドに、7 種のステロイドを追加し同時に測定する方法について検討する。

1. 標準液を調製し、検討対象物質の検出条件（質量数設定、電圧等）を検討する。
2. 分離条件（グラジエント条件等）を検討する。
3. 検討対象物質の添加されたろ紙血液を用いて、2. のメソッドで分析を行い、感度等について確認する。
4. 倫理審査委員会の承認を得た後、新生児マススクリーニングの検査済み検体を測定し、正常群における対象物質濃度について調査する。

【結果及び考察】

検出条件及び分離条件等を検討した結果、現在ルーチンで測定している 5 種を含む 12 種のうち、10 種について良好なクロマトグラムを得た。17-ヒドロキシプレグネノロン及びプレグネノロンについては、定量可能な感度での検出に至らなかった。

良好なクロマトグラムを得た 10 種のステロイド化合物混合溶液（各約 100 ng/mL）を段階的に希釈した溶液について測定を行ったところ、特に低濃度帯において直線性が得られなかった。その後の調査において、一般的にステロイド化合物はガラス表面に対し不安定である旨の報告を確認したため、プラスチック製器具のみを使用し試料調製・測定を行ったところ、ピーク面積及び直線性が大幅に改善した。

今後は、試料調製及び検討した条件での測定を行う。検出できなかった 2 種についても条件検討から再度実施する。

その後、ろ紙血スタンダードを作成し、実検体における測定を行う予定である。