

新生児マススクリーニング用濾紙血の保存性評価のための研究

山岸卓弥 藤倉かおり 阿部正太郎
野町祥介 細海伸仁 矢野公一

要 旨

新生児マススクリーニングの乾燥濾紙血検体において、内分泌疾患の指標となる物質が安定的に存在し続けているかを確認した。同一検体を経時的に2回測定した値を比較したが、劣化を示唆するような測定値の著明な減少傾向や経時的相関は認められなかった。一方、検体由来ではなく検査手法に起因して生じる統計学的現象により、再測定値に有意な差異が生じる可能性が示唆された。

1. 緒 言

新生児マススクリーニングは、新生児の血中の各種物質を定量することで特定の疾患を発見できる検査である。本市では、対象疾患のうち内分泌疾患(先天性甲状腺機能低下症および先天性副腎過形成症)の検査において、3種血中ホルモン物質(甲状腺刺激ホルモン(TSH)、遊離サイロキシン(FT4)、17ヒドロキシprogesteron(17OHP))の濃度を測定している¹⁾。

新生児マススクリーニングでは血液を簡便に取り扱うため、専用の濾紙に血液を染み込ませ乾燥させた検体(乾燥濾紙血)を検査対象としている。医療機関で作成された乾燥濾紙血は常温下で検査機関へ郵送されたのち、冷蔵保管され各種検査に供される。本市新生児マススクリーニングでは、全ての検査が終了するまでには1週間程度を要し、さらにその後検査目的外の研究利用の了承が無い検体は1年間、了承があった検体は10年間冷凍保存し、必要に応じ検査や研究に使用している。

このような運用は測定対象物質が乾燥濾紙血中で長期間安定であることが前提となっているが、上記ホルモン物質がどの程度乾燥濾紙血中に保持されているかを示した知見は少ない^{2)~4)}。このことを明らかにすることで、検査の精度管理状況を

より正確に把握することや検査の運用が適切であるかの検証へつながる可能性があった。

本市における内分泌疾患の検査では、初回検査で要再採血となった場合、再採血検体の測定時に、併せて初回測定検体についても再測定を行うことで、測定値の上昇・下降の程度を把握し、判定の参考としている。そこで、同一検体の初回検査(1回目測定)の測定値と再採血検体測定時(2回目測定)の測定値を比較することで、新生児マススクリーニング用乾燥濾紙血中のホルモン物質の保存性を評価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

札幌市内の母子保健事業「新生児マススクリーニング」において、2008~2017年度の10年間に内分泌疾患の再採血検査を受検した児のデータ。ただし、2-3および2-4(1)によりデータ利用が不能、不適であるものを除き、延べ(検体毎ではなく検査項目毎の総件数)1605件とした。

2-2 測定方法

TSH、FT4、17OHPのいずれも、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社販売のエンザプレートキット(表1)を用いた酵素免疫測定法

(ELISA 法)により測定した。

表 1 測定用キット

項目	名称	ELISA法の種別	正確性*
TSH	甲状腺刺激ホルモンキット エンザプレート Neo-TSH	サンドイッチ法	±18%
FT4	遊離サイロキシシンキット エンザプレート N-FT4	競合法	±35%
17OHP	17-ヒドロキシプロゲステロンキット エンザプレート Neo-17 α -OHP	競合法	±18%

製造: 株式会社 第一岸本臨床検査センター、販売: シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社

*製品添付の取扱説明書に記載の、既知濃度のコントロール濾紙血液を測定するとき、既知濃度の何%以内にあるかを示す。いずれも 2020 年 10 月時点で最新の取扱説明書(2012 年 7 月改定版)による。

2-3 集計方法

本市新生児・妊婦・乳児マススクリーニングシステムに保持されるデータベースより、2008～2017 年度に新生児マススクリーニングを受検し、2-4(1)の研究利用了承があり、内分泌疾患検査の 3 項目いずれかで要再採血判定となった児の受付情報および初回検体測定値をシステム機能の演算処理により抽出した。2-4(2)の方法により匿名化処理を行い、採血日、測定日、内分泌疾患検査の ELISA 法測定 3 項目の測定値、および備考欄以外の情報を削除した。備考欄には 2 回目測定についての記録が文字入力されており、ここから 2 回目測定日および測定値をデータ化した。記録の不備によりデータ化が不能なものが複数存在したが、データ解析に影響しない無作為な抽出条件であると判断し、研究対象から除外した。

2-4 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スクリーニング申込書により「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

本研究で使用したデータは、本市情報セキュリティポリシー重要性 1 に該当するテーブル状態のデータベースとして新生児・妊婦・乳児マススクリーニングシステムサーバに保持されている。デ

ータベースから使用する検体のデータを抽出した後、本研究に関与しない者が検体番号に換えてランダムな番号を付与して連結不可能匿名化するとともに 2-3 に示した以外の情報を削除した。番号の置換のための台帳は本研究に関与しない者が管理し、本研究においてはこの加工されたデータのみを用いて解析を行った。

(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、2018 年度第 1 回札幌市衛生研究所倫理審査委員会の承認を受けた(研究課題 18-003)。

2-5 評価手法

(1) 2 回測定値の比較

1 回目測定値と 2 回目測定値を関連二群とした t 検定により、2 回測定における有意差を確認した。t 検定には Microsoft Office Excel 2016 の分析ツール「一对の標本による平均の検定」を用いた。また、各項目について同一検体順にソートした測定値の散布図を作成し、1 回目測定値と 2 回目測定値を重ね合わせることで 2 回測定における差の傾向を可視化することを試みた。

(2) 経時変化

2 回測定における測定値の変動と経過日数の相関から、検体の劣化について評価することを試みた。測定値の変動割合(%)=100×(2 回目測定値-1 回目測定)/1 回目測定値と、1 回目測定から 2 回目測定までに経過した日数の散布図を作成し、経時的な傾向が見られるかを確認した。

3. 結 果

3-1 2回測定値の比較

対象3項目それぞれについて、横軸を検体番号、縦軸を測定値として1回目と2回目を重ね合わせた散布図を図1に示した。検体番号は1回目測定値の降順となるように付与した。同一検体の2回測定による変動は、プロットの縦軸方向のずれとして示されることとなる。FT4では1回目より2回目が高値傾向、TSHでは1回目より2回目が低値傾向となっていたことが示唆され、有意差も認められた($p < 0.05$)。一方17OHPでは有意差が認められなかった。

3-2 経時変化

対象3項目それぞれについて、横軸を2回測定の経過日数、縦軸を測定値の変動割合とした散布図を図2に示した。変動割合の平均値もあわせて示した。変動割合の平均値は、3-1で示唆された傾向と同じく、FT4ではプラス(1回目より2回目が高値)、TSHではマイナス(1回目より2回目が低値)であったが、経時的变化を示唆するような相関はいずれの項目でも認められなかった。

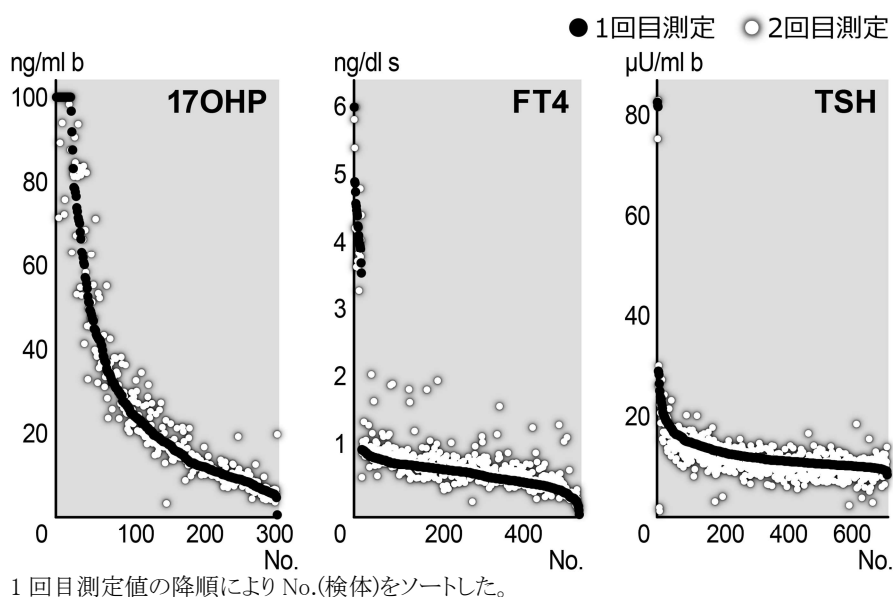


図1 1回目測定値と2回目測定値の比較

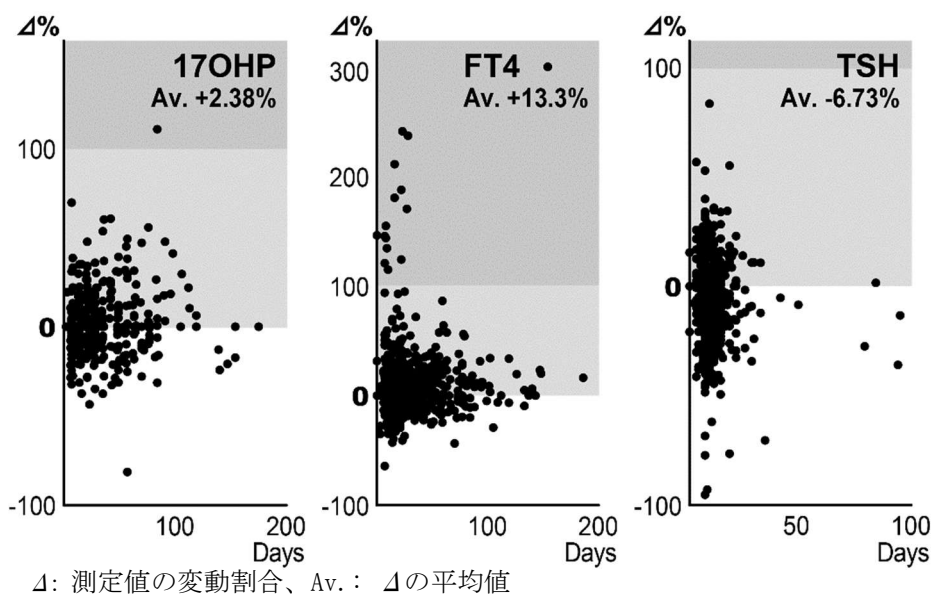


図2 測定値の経時変化

4. 考 察

本研究は濾紙血中で対象の物質がどの程度安定であるかを検討することが端となっていた。保存により検体が劣化するほど検体中に含まれる物質は分解していき、したがって日数が経つにつれ測定値の正確性が低下するものと考えられる。本研究において 170HP と FT4 は最大 200 日程度、TSH では 100 日程度の期間を空けた再測定について検討したが、測定値の変動割合と経過日数に相関は認められず、少なくともこの程度の期間、当該対象物質は検査に影響するほどは劣化せずに濾紙血中に安定して存在していると思われた。

一方、当初予想した「検体の劣化」では説明できない傾向も示された。検体の劣化により差異が生じるとすれば、検体中で対象物質は分解していき、1 回目測定値より 2 回目測定値が低下傾向になると考えられる。しかし FT4 では予想に反し、2 回目測定値がむしろ高くなる傾向が示唆された。経時的な変化が認められなかったことから、2 回目測定において差異が生じる可能性として、検体の保存による劣化以外の要因があるものと思われた。

そこで、FT4 と TSH では逆の傾向が見られたことに着目した。本研究では、項目ごとに定められた判定基準(表 2)により異常と判定された検体のみが対象となっている。つまり、FT4 では測定値が基準値よりも低い検体を、TSH では高い検体を、それぞれ抽出して再測定したこととなる。このように、ある基準値により集団から選出を行い再測定した場合、その値は初回測定値よりも元の集団の平均値に近くなりやすいという「平均への回帰」と呼ばれる現象が知られている⁶⁾。これは、例えば基準値以上の検体を選出した場合に「たまたま高い」検体は選出されるが「たまたま低い」検体は排除されるために起こるもので、検体由来ではなく測定方法に起因する誤差により生じる現象である。本研究において、検体の経時的劣化は認められず、なおかつ再測定値が FT4 では高値傾向、TSH では低値傾向であったことは、「平均への回帰」から予想される傾向と一致する。また、170HP では変動傾向

が認められなかったが、170HP は基準値が 3 項目中で最も集団の平均に近いこと、TSH と違い検量線が反比例となる競合法であること、FT4 よりも測定用キットの正確性が高いことといった理由により、他の 2 項目と比べ「平均への回帰」の変動幅が小さかった可能性がある。

表 2 判定基準

項目	判定基準	基準値の%ile相当値*2
TSH	≧10 μU/ml blood*1	99.6
FT4	<0.9 ng/dl serum*1	99.4
170HP	≧5.5 ng/ml blood	96.4

*1 出生体重、在胎週数等により一部異なる⁵⁾

*2 2017 年度本市新生児マススクリーニング初回検査による

5. 結 語

再測定の際に有意な差が生じるほどの「平均への回帰」が生じ得るとすれば、実際の検査における再測定値の取り扱いには注意が必要である。ある測定方法によるスクリーニングを検討する際、その方法により対象集団を測定した分布を得て、適切な水準の陽性率となるよう基準値を設定することになる⁷⁾⁸⁾。一様の測定により得られた分布を基に設定された基準値には当然「平均への回帰」は考慮されていない。一方、検査の運用として、基準値を超えた検体については複数回の再測定を行い、より真に近い測定値を得ようとする確認検査が実施されることがままある⁹⁾。しかし、この「複数の測定値を得る」ことはすなわち「平均への回帰」の起こる理由そのものである。したがって、確認検査の測定値に 1 回目検査の測定値と同じ基準値を適用すれば、陽性率が意図したよりも低下する可能性がある。検査全体の再現性を注意深く担保しなければ、測定の向上が逆効果となり得るということである。

6. 文 献

- 1) 野町祥介：札幌市におけるマスキリーニング事業の評価，札幌市衛生研究所年報，第 46 号 37-53，2019
- 2) 宮井潔，畑直成，水田仁士，他：乾燥ろ紙血液中 TSH，TBG，Free T4 の安定性，昭和 59 年度厚生省心身障害研究報告書，122-124，1985
- 3) Kay V. Waite, Glen F. Maberly, Creewell J. Eastman: Storage Conditions and Stability of Thyrotropin and Thyroid Hormones on Filter Paper, CLIN. CHEM., **33**/6, 853-855, 1987
- 4) Valeria S Lando, Marcelo C Batista, Izabel T Nakamura *et al.*: Effects of long-term storage of filter paper blood samples on neonatal thyroid stimulating hormone, thyroxin and 17-alpha-hydroxyprogesterone measurements, J Med Screen, **15**, 109-111, 2008
- 5) 山岸卓弥，藤倉かおり，田上泰子 他：検査機関における先天性甲状腺機能低下症スクリーニングの現状と問題点，日本マス・スクリーニング学会誌，第 25 卷(2 号)，25，2015
- 6) 横山徹爾，田中平三：疫学と統計学の基礎講座 平均への回帰，第 32 卷，日循協日誌 第 2 号，143-147，1997
- 7) 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，日本マスキリーニング学会誌，第 26 卷(1 号)，43-50，2016
- 8) 山本知美，三井規雅，堤泰子 他：先天性甲状腺機能低下症スクリーニングにおける濾紙血 TSH，Free T4 の同時測定の有用性について，日本マスキリーニング学会誌，第 29 卷(3 号)，27-34，2019
- 9) 東京都予防医学協会母子保健検査部：新生児の先天性代謝異常症のスクリーニング成績，東京都予防医学協会年報，第 49 号，130-137，2020