



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1607号
学位記番号	第1142号
氏名	中野 優
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	Development of tandem mass spectrometry-based creatinine measurement using dried blood spot for newborn mass screening. (タンデムマスを用いた新生児クレアチニンスクリーニング法の確立) Pediatric Research 2017;82(2):237-243. doi: 10.1038/pr.2017.56.
論文審査担当者	主査： 安井 孝周 副査： 大手 信之, 齋藤 伸治

論 文 内 容 の 要 旨

【背景】

先天性腎尿路異常 (Congenital anomalies of kidney and urinary tract : CAKUT) の重症度は非常に多彩であり、重症例では腎不全に至る。本邦では CKD ステージ 3~5 (腎機能が正常の半分以下) の児が 10 万人あたり 2.98 人とされている。近年 CAKUT に対して厳密な血圧管理を行うことで、腎不全までの時期を延ばした報告などもあり、CAKUT 患者の早期発見は重要視されている。

本邦では CAKUT 早期発見のために、1961 年から 3 歳児検尿を行っているが、CAKUT の児の場合は、現行のテープ法での検出が大変難しいことが分かってきた。

本邦では平成 26 年度から国内すべての地域で新生児タンデムマス・スクリーニングが行われている。本手法は、測定物に関する試薬を追加するだけで、新たな項目の測定を簡便に導入することができる点で、非常に注目されている。

私たちは、このろ紙血を用いた腎機能スクリーニングが可能となれば、CAKUT を新生児マススクリーニングの対象疾患とできるのではないかと考えた。

【目的】

新生児マススクリーニングの手法であるタンデムマス法を用いて、乾燥濾紙血からクレアチニン測定法を確立し、新生児腎不全症例を発見できる手法を確立する。

【方法】

【測定方法】

我々はまず現行の新生児マススクリーニングと同様の手法でのろ紙血 Cr 測定法を確立した。直径 1/8 インチのろ紙血に 10 μ L の固定液 (メタノール:アセトン:水, 7:7:2) を加え 37 度で 30 分乾固した。その後 d3-Cr (Cambridge Isotope Laboratories) をメタノールで 0.01 mg/dL に調整した内部標準液 100 μ L を添加し 30 分振盪した。このうち 10 μ L を用いて LC/MS/MS で測定を行った。LC/MS-8040 (島津製作所) を使用し、検出は MRM モードで行った。解析ソフトウェアは Lab solution を使用した。

【対象】

先行実験として、あいち小児保健医療総合センター腎臓科を受診した小児ボランティア患者 93 例での測定を行った。血清 Cr の中央値は 0.39 mg/dL (IQR:0.31, 0.51) であった。

その後、実際に新生児で 190 例での測定を行った。満期産で日齢 4-6 の児を対象とした。母体は何らかの内服治療を受けているもの、新生児が医療的ケアを受けているもの、担当医が今回の Cr 測定に影響を与えるような病態を疑うものを除外した。採血は通常のマスクリーニング採血

時に行った。在胎週数、出生体重、アプガースコア、採血時日齢を記録した。本研究は名古屋市立大学倫理委員会の承認を受けて行った(承認番号 201317)。

【結果】

我々は以下のような条件でDBS Crの測定法を確立した。測定はMRMでm/zはCrが114.10 / 44.10、同位体 d3-Cr が 117.05 / 47.10 であった。

測定手法が確立した後、実際に小児症例での測定を行った。小児患者 93 例で血清 Cr 値とろ紙血 Cr 値は強い相関を認め(R=0.863)、回帰式はろ紙血 Cr (mg/dL)=05693×血清 Cr (mg/dL)であった。

その後、実際に新生児 190 症例での測定を行った。新生児ろ紙血 Cr 中央値は 0.222 mg/dL (IQR:0.189, 0.269)であった。性別、在胎週数、出生体重、アプガースコアについても比較したが、有意な差はなかった。

【考察】

我々の知る限り、本研究は腎疾患スクリーニングとして新生児濾紙血を用いた初めての研究であった。

我々の予備実験では濾紙血 Cr は血清 Cr の約半分であった。全血では血球成分の分だけ血清が少なくなり、Cr は血清値に比して小さい値となる。本実験での回帰式 DBS Cr (mg/dL)=05693×血清 Cr (mg/dL)は理論上も妥当であり、かなり強い相関を認めた(R=0.863)。

新生児 190 例の測定では DBS Cr 中央値は 0.222 mg/dL (IQR:0.189, 0.269)であった。Boerらは日齢4の血清 Cr 平均値は 0.44 mg/dL であると報告している。私たちのろ紙血 Cr 中央値は 0.44 mg/dL の約半分にあたる。このことから私たちの回帰式は十分な精度があることが示唆された。

性別、アプガースコア、在胎週数、出生体重については有意な差を認めなかった。Cr マスクリーニングにおいては、満期産の新生児であれば、1つの基準値で運用できることが証明できた。

最後にコストの問題である。我々の検討では、試薬コストに限れば 300 検体あたり 1 円のコストで測定が可能であった。

今回我々の確立した手法は既存の手法と同様の手法を取ることで容易に導入することができ、コストも非常に安価であった。新生児マスクリーニングに組み込むことで CAKUT 児の早期発見に役立つものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

【背景】小児腎不全は海外のデータでは年間死亡率 98.8 人/1000 人となる重篤な疾患である。その原因は先天性腎尿路異常（以下 CAKUT）が 60%をしめるとされている。日本では、CAKUT の発見の目的で 3 歳児検尿が行われてきたが、後述するようにスクリーニングとして不十分であることが報告された。一方で CAKUT の児では厳格な血圧管理を行うことで、腎不全の進行を抑制できるという報告もあり、早期発見は腎保護と合併症防止の目的で意義深い。私たちは既存の新生児マススクリーニングで用いられているタンデムマス法を用いて、新生児のろ紙血クレアチニンを測定し、小児腎不全児の発見につなげたいと考えた。

【対象と方法】対象はまず測定精度を確認するための先行実験として、あいち小児保健医療総合センター腎臓科患者 93 例を用いてろ紙血クレアチニンを測定した。その後ろ紙血クレアチニンの精度が十分であることを確認した後、新生児 190 例で実際の測定を行った。タンデムマス法は現行の新生児マススクリーニングで用いられる手法に準拠した。直径 1/8 インチの DBS に 10 μ L の固定液（メタノール:アセトン:水, 7:7:2）を加え 37 度で 30 分乾固した。その後 d3-Cr（Cambridge Isotope Laboratories）をメタノールで 0.01 mg/dL に調整した内部標準液 100 μ L を添加し 30 分振盪した。このうち 10 μ L を用いて LC/MS/MS で測定を行った。移動相はアセトニトリル:メタノール:水を 2:2:1 に調整し 0.05%ギ酸を加えた。LC/MS-8040（島津製作所）を使用し、検出は MRM モードで行った。解析ソフトウェアは Lab solution を使用した。

【結果】我々は以下のような条件で DBS Cr の測定法を確立した。測定は MRM で m/z は Cr が 114.10 / 44.10、同位体 d3-Cr が 117.05 / 47.10 であった。検量線は直線性を示した。測定手法が確立した後、実際に小児症例での測定を行った。小児患者 93 例で血清 Cr 値と DBS Cr 値は強い相関を認め (R=0.863)、回帰式は DBS Cr (mg/dL)=05693×血清 Cr (mg/dL)であった。その後、実際に新生児症例での測定を行った。新生児 DBS Cr 中央値は 0.222 mg/dL (IQR:0.189, 0.269)であった。性別では男児 0.215 mg/dL (IQR:0.186, 0.256)、女児 0.229 mg/dL (IQR:0.195, 0.278)であり、これらは有意差を認めなかった。在胎週数、出生体重、アプガースコアについても比較したが、DBS Cr 値に有意な差はなかった。本検討でのコストは 1 検体あたり 1.25 銭であった。すでに普及した手法を用いていること、画一的な基準値で運用できることから、新生児マススクリーニングに組み込むことで、小児腎不全患者の早期発見につなげることができると考える。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の安井からは CAKUT と CKD の違い、ほかのスクリーニング手法（エコーやシスタチン C の測定）との優位性、出生後の Cr 値の変化について等、8 項目の質問がなされた。また第一副査の大手教授からは、小児 CKD の死因や CKD 患者の治療法、統計学処理、新生児期のクレアチニン値に影響を与える要素について等、9 項目の質問がなされた。第二副査の齋藤教授からは専門領域に関連して、成人 CKD と小児 CKD の違い、移植などの長期的な治療戦略、既存の 3 歳児検尿のメリットについて等、4 項目の質問がなされた。いずれに対しても概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると共に専門領域の知識を有すると判断した。本研究は、新生児ろ紙を用いたクレアチニン測定により CAKUT のマススクリーニングの可能性を初めて示した論文であり、意義がある。以上をもって本論文の著者には、博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 安井 孝周 副査 副査 大手 信之、 齋藤 伸治