

分担研究課題

外部精度管理体制の確立に関する研究

研究分担者 原田正平（独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所マスキング研究室長）

質量分析装置によるマスキングの精度管理のための
精度試験用検体（QC 検体）作製及び測定後のデータ処理について

研究要旨

本邦における質量分析装置によるマスキング(タンデムマス・スクリーニング:TMS)の精度管理に使用する精度試験用検体(Quality Control:QC 検体)作製のため、日本赤十字社より提供された濃厚赤血球、凍結血漿中のアミノ酸、アシルカルニチン量を低減する技術を構築した。処理後の赤血球および血漿に、測定対象のアミノ酸、アシルカルニチンを添加して、Base(無添加)、Low、Mid、Highの4濃度の乾燥ろ紙血を作成し、QC検体とした。全国の指定検査機関に対して、平成26年12月に練習用のQC検体、27年1月に本番用のQC検体を配布し測定を依頼した。

QC検体配布に先行して、多数の測定項目に伴う入力項目の省力化を図るため、どのメーカーの質量分析装置データ解析ソフトウェアにも共通して用意されている、csv形式ファイル出力機能を用いたデータエクスポートの仕組みを構築した。この仕組みを利用し、アシルカルニチン及びその内部標準物質を含む測定項目の、三連四重極型質量分析装置による測定強度と濃度計算値提出を依頼したところ、27年1月20日時点で、全国38検査機関のうち36機関から指定の様式で回答が得られた。今後、本番用QC検体の測定値の評価のため、分布、平均値との差や日内・日間変動といった併行精度・室内精度等を評価プログラムにより分析し、各施設に対して情報提供する予定である。また来年度は、国立成育医療研究センター情報管理部と共同で、Web baseのID・パスワードで管理された、セキュリティの高いデータ受領・精度管理情報提供サーバーの構築を進める予定である。

研究協力者

中島英規(国立成育医療研究センター研究所マスキング研究室・研究員)

渡辺倫子(同上)

鈴木恵美子(同上)

A. 研究目的

これまで本邦における新生児マスキングの外部精度管理では、患者検体に相当する異

常値検体の見逃しが無いかに主眼点が置かれてきた。近年、質量分析装置によるマスキング(TMS)が開始され、従来の外部精度管理の方式に加えて、精度試験用検体(Quality Control:QC 検体)を用いた、検査機関間の項目(測定対象化合物)ごとの測定値の分布、一機関における併行精度・室内精度等の評価が求められる。これまでは、米国疾病予防管理センター(Centers for Disease Control and Prevention: CDC)による外部精度管理システム

が、米国以外の検査機関により費用負担なく利用されてきた。日本国内の複数の検査機関も利用してきた経緯があるが、日本の検査機関全てが利用するとした場合、米国の連邦政府予算で行われているシステムであることに問題が生じる。

さらに、英語のインターフェースが難しいことに加え、情報提供が CDC から一方的に行われるため、検査機関の希望する情報が得られない、個々の検査機関の問題点が指導されない等の難点がある。更に TMS では測定対象化合物が多いことから、CDC への回答用紙の入力箇所が数百カ所に上り、入力に 1 日以上もかかってしまう事例があるなど、限られた人員で日常業務を行っている日本の検査機関担当者にとっては、継続的な参加が困難なシステムといえる。

そこで本研究では、日本独自の精度試験用検体 (Quality Control : QC 検体) の作製を行うと同時に、QC 検体測定後のデータ処理の迅速化、簡素化を図るため、日本で用いられている質量分析装置メーカーの、データ解析ソフトウェアに共通するファイル出力機能を用いた、csv 形式のデータ提出によるデータ入力の手間の低減と、将来的な Web 上のデータ授受システムへの対応の可否を検討した。

B . 研究方法

1) 血漿・血球処理法

QC 検体作成に用いる血液には、各測定対象化合物が様々な濃度で含まれているため、血漿については、チャコールカラム等による処理によって、各種の低分子化合物含量を低減させた。血球については、生理食塩水あるいはリン酸緩衝液含有生理食塩水で洗浄操作を繰り返し行い、アミノ酸、アシルカルニチン含有量を低減させた。

前処理後の血漿、血球を用いて Base (無添加) の QC 検体用血液を作製し、それにアミノ酸・アシルカルニチンを高濃度で調製したマスター溶液を添加し、ヘマトクリット値が最終的に 55% となるよう調製した上で、採血用ろ紙へ滴下して各

種濃度の QC 検体とした。

添加するアミノ酸・アシルカルニチンマスター溶液の濃度を変えることで、乾燥ろ紙血中のアミノ酸・アシルカルニチン濃度が、最終的に Low、Mid、High の 3 段階となるよう調製した。

2) データ授受及びデータ処理

(1) データ授受の実証実験

全国の検査機関に対しては、実際の QC 外部精度管理試験を確実に実行するため、本番の外部精度管理に向けて次の 3 段階でファイル出力等の試行を求めた。

質量分析装置データ処理プログラムによる測定データファイルの出力法習得

練習用検体受領とその測定及び出力データの返送

Quality Control [外部精度管理試験実施]

(2) データ処理の効率化

データ処理サーバーの構築を株式会社スタージェンに依頼し、ハードウェアは国立成育医療研究センター情報管理部の管理下の、オペレータールームに設置した。

データ処理システムとして、併行精度、室内精度等の評価を目的とし、散布図および表、 $X-R$ 管理図、 Z -スコア等の表示が可能なプログラムを開発し、それが動作するサーバーの構築を行う。

(倫理面への配慮)

本研究においては、患者の個人情報などを取り扱わないため、特段の倫理的配慮は必要としない。

また、本研究で用いた血液材料は、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募において承認を受け、日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターから譲渡 (来年度からは購入) されたものであり、倫理面で問題ないと判断された。

C . 研究結果

1) 血漿・血球処理法

テスト段階で数十 ml 程度の血漿・濃厚赤血球の処理では、理想的な測定値を示す QC 用乾燥ろ紙血を作成することができた。

しかし、多数検体作製のために、リットルオーダーまでスケールアップしたところ、溶血が起こる等のトラブルが生じた。

2) データ授受及びデータ処理

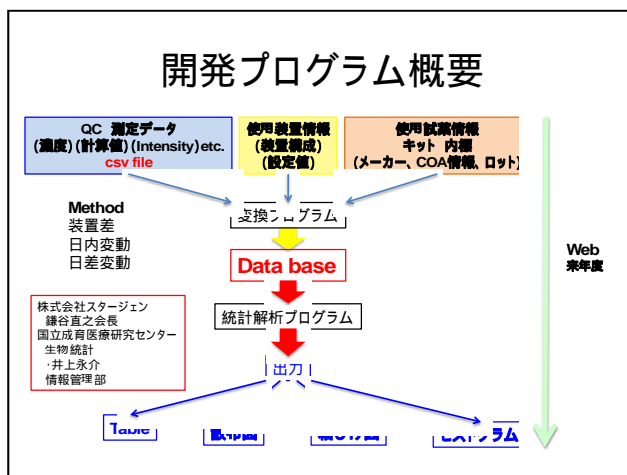
(1) データ授受の実証実験

平成 26 年 11 月 27 日に「MS 装置データ処理プログラムによる測定データファイルの出力法習得」を検査機関に依頼し(12月10日締め切り)、「練習用検体受領とその測定及び出力データの返送」については、12月8日に練習用検体を送付、12月26日締め切りとした。

平成 27 年 1 月 20 日時点で、出力データの返送は、全 38 機関中 36 機関が正しい形でのファイルで行うことが可能となった。残りの 2 機関については、質量分析装置およびソフトウェアメーカー側共同でサポート中である。

(2) データ処理の効率化

データ処理サーバー内の動作を図に示した。サーバー内では、検査機関より収集したデータが「変換プログラム」によってデータベースに蓄積され、次いで「統計解析プログラム」によって、散布図および表、 $X-R$ 管理図、 Z -スコア、ヒストグラム等の理解しやすい形式に「出力」される(図)。



各質量分析装置メーカーのソフトウェアより

出力されるファイルはおおよそ同様なレイアウトをとっているが、若干のデザインの相違がある。そのため、データベースへの測定データ取り込みをスムーズに行うため、質量分析装置メーカー各社デザインに対応した変換プログラムを作成した。

変換プログラムをスムーズに動作させるため、このファイル提出に先行して測定項目名略号の統一を各検査施設に依頼したが、施設側の様々な事情により変更・統一は困難であった。そのため、各施設から収集したデータを元に各施設が使用している測定項目略号をデータベースに蓄積させるためのプログラムを構築した。

本プログラムでは、検査施設より受領した csv file を直接読み込む形を目指しているが、各質量分析装置メーカーの csv 出力ファイル形式にデザインの違いが認められた。そこで、この違いに関しても、変換プログラムでうまくデータベースに取り込まれるようにした。

平成 27 年 1 月 20 日時点で、第 2 段階までに各検査施設より提出された csv file は取り込むことはできたが、練習用検体 1 日分の測定結果のみの受領であるため、このプログラムの最終動作確認は、本番として行われる QC 検体 10 日間連続測定結果の取り込みで検証する予定である。

現時点で、データベース上にダミーデータを置いた形で統計解析および出力プログラムをテストしたところ、CDC が提供している散布図や Table は出力できる状態までプログラムは完成した。今年度中には $X-R$ 管理図、 Z -スコア等の表示が可能になるので、検査施設、自治体へはこれらの情報を提供する予定である。

D. 考察

日本赤十字社より無償供与された血液を用いた QC 検体作製は、少量であれば定量性が担保されたが、大量を用いた場合、溶血などが生じた。来年度はより緩徐な条件で処理するなどして、効率よい QC 検体作製の検討を進める。

検査機関からは、質量分析装置データ処理プログラムによる測定データファイルの出力による各測定対象化合物（測定項目）の「濃度計算値（concentration: conc.）」と「シグナル強度（Intensity）」に加え、「装置構成情報」「使用している試薬或いはキットの情報」「質量分析装置の設定情報」などの情報も提供をうけた。

これら付随情報も入手することで、QC データがある施設で異常値を示したり、バラツキが大きかったりなどの問題点があった場合には、異常値の原因を絞ることも可能であると考えている。

E. 結論

平成 26 年度に開始された新しい精度管理体制の中で、QC 検体のデータ処理については、メールアドレスでデータ授受を行うための変換プログラムを含む、データベース用サーバーおよび統計解析サーバーはほぼ構築された。今後指定検査機関とより連携を深めて、解析結果の報告様式に加え、インターフェースがより容易で検査施設担当者を煩わすことのない、Web base のサーバー・プログラムの構築を来年度は行う。

なお、精度管理用検体の作成に使用する添加物質については、トレーサビリティの取れた Certificated Reference Material (CRM) が用意されている物質（アミノ酸等）については、それらを標準物質とする。CRM が用意されていない物質（アシルカルニチン）については、日本薬局方でも認知され、トレーサビリティが取れると保証されている qNMR によって、純度検定された標準物質を用いて値付けし、情報提供する系を構築する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 中島英規, 前田堂子, 鈴木恵美子, 渡辺倫子, 小須賀基径, 奥山虎之, 重松陽介, 原田正平: 二次検査応用に向けた LC-MS による疾患マーカー分子分離分析系確立. 第 41 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、広島、2014 年 8 月

2) 中島英規, 石毛信之, 穴澤昭, 奥山虎之, 藤本純一郎, 重松陽介, 山口清次, 原田正平: タンデムマススクリーニングにおける second tier test の開発. 日本医用マススペクトル学会 第 39 回年会シンポジウム、千葉、2014 年 10 月

3) 中島英規, 原田正平, 石毛信之, 穴澤昭, 小須賀基径, 藤本純一郎, 山口清次, 重松陽介, 奥山虎之: 新生児マススクリーニングにおける LC-MS による二次検査法開発. 第 56 回日本先天代謝異常学会総会 / 第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、宮城、2014 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

株式会社積水メディカルより本成果の一部を応用した新生児マススクリーニングキット “アミノ酸・アシルカルニチン測定用内部標準液セット NeoSMAAT™” 2015 年 2 月より上市予定