

分担研究課題

マスキング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介（福井大学医学部 教授）

qNMR による SI Traceable なマスキング測定対象化合物定量法

研究協力者 中島英規（国立成育医療研究センターマスキング研究室 研究員）

研究要旨

質量分析装置を用いたマスキングでは、たとえ同じ機種種の質量分析装置を使用して同じ検体を測定しても、同じ測定値が得られないことが知られており、これが施設間の測定値差を生んでいる。また一般に、試薬メーカーやキットメーカーが独自に定めた安定同位体標識内部標準物質の濃度に基づいた一点検量法によって濃度が決定されているため、各メーカーの試薬濃度定量法が異なればメーカー差が起こる原因になる。

本研究では定量NMR法 (qNMR)を応用し、このような不一致問題を解決する方法の一例として SI Traceable、つまり国際単位系 (Système international d'unités: 仏語)へ最終的に紐付け可能な、標準物質を用いた定量法を確立した。その結果、一部アミノ酸やアシルカルニチンは試薬メーカーが公表している純度値に達しておらず、一般に結果として報告されている測定値を補正する必要性が示唆された。

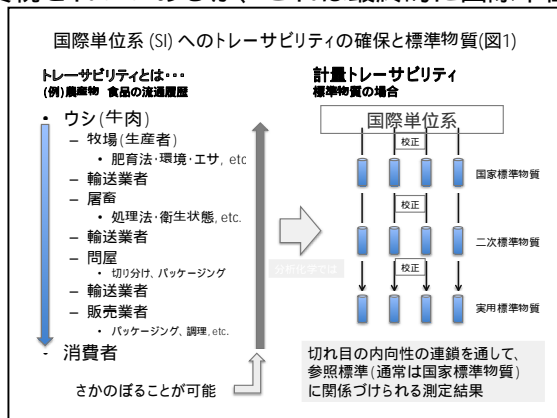
A. 研究目的

定量分析においては、測定対象化合物が標準物質に対してトレーサビリティ、つまり最終的に紐付けできることが求められている。臨床分析においても WHO, FDA など様々な機関から標準物質が供給されているが、純度や定量法の「定義」が異なるためしばしば標準物質間で定量値が一致しないことが知られている。一方で近年、SI Traceability が取れていることが定量分析で重要視されつつあるが、これは最終的に国際単位系

(Système international d'unités: 仏語)へ紐付け可能であることが定義されているため、世界中どの測定施設でも一致した測定値が得られる利点がある(図 1)。

質量分析装置を用いたマスキングでは、たとえ同じ機種種の質量分析装置を使用して同じ検体を測定したとしても、同じ測定値が得られないことが知られているが、これは m/z の相違によって得られるシグナル強度特性が各々の装置によって異なることに起因していることに加え、試薬メーカーやキットメーカーが独自に定めた安定同位体標識内部標準物質の濃度に基づいた一点検量法によって濃度が決定されていることにも起因している。

そこで本研究では最終的に標準物質を用いた各検査施設測定値の標準化を目指すため、定量 NMR 法 (qNMR) を利用して SI Traceability の取れたマスキング測定対象化合物の定量法を確立することを目的とした。



B. 研究方法

1. 試薬及びその秤量

qNMR による測定では、測定対象化合物と SI Traceability の保証された内部標準物質(本研究では DSS-d6 を使用)の秤量法と精度が非常に重要になる。本研究では、JCSS による検定を受けて1年以内の Sartorius 社製ウルトラマイクロ天秤 MSA2.7S を使用した。この電子天秤で 1 mg と 10 mg の分銅を 10 回測定し、最小計量値を 0.36 mg つまり測定不確かさ許容範囲を 0.1%以下に設定可能であることを確認した上で、5 mg 以上秤量して信頼性を担保した。SI Traceability の担保された国家標準物質としては和光純薬社製 DSS-d6 を使用した。マススクリーニングにおける測定対象化合物は非常に吸湿性が高いため、秤量は湿度 20%以下にコントロールしたグローブボックス内にて秤量中に重量が変化しないことを確認しながら行った。

2. qNMR 測定法

NMR 測定用溶媒としては和光純薬社製 Dimethyl Sulfoxide-d6(重 DMSO)を使用した。上記のように秤量した測定対象化合物と内部標準物質を風袋ごと硝子バイアルに入れ、JCSS 認定を受けたピペットを用いて正確に 1 mL の重 DMSO を添加して溶解した後、NMR 測定管に導入して測定を行った。

NMR 測定装置は慶應義塾大学理工学部の JEOL Resonance 社製 ECA-500(分解能 500 MHz)を使用し解析には Delta5 を使用した。核スピンのフリップ角は 90°となるようにパルス設定し、充分な緩和時間をとった。アシルカルニチンの定量に使用した分子内プロトンは、安定した強度が得られる、カルニチン残基中に含まれるトリメチル基の9つのプロトンを選択した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、患者の個人情報及び生物検体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。

C. 研究結果

qNMR を用いた SI Traceable なマススクリーニ

ング測定対象化合物を定量・純度検定した結果を以下の表 2 にまとめた。

表 2. 測定対象化合物の定量・純度検定結果

化合物名	(%)	化合物名	(%)
C0	97.8	C10:1	97.4
C2	95.8	C12	96.9
C3	97.0	C14	96.0
C4	94.7	C14:1	95.8
C5	82.0	C16	94.8
C5:1	96.2	C16-OH	89.2
C5-DC	79.1	C18	96.0
C5-OH	92.2	C18:1	96.1
C6	96.8	C18:1-OH	91.9
C8	97.3	Cit	97.3
C8:1	98.5	Orn	98.5
C10	96.4	ASA	90.4

D. 考察

ほとんどの測定対象化合物は、試薬メーカー仕様書・成績証明書が提供する純度値を満たしていなかった。一般に試薬メーカーでは、HPLC や TLC によって純度を決定している場合が多いが、不純物等の存在がその検出法によって同定できない場合には、実際の濃度値は公表している純度より自ずと低くなる可能性がある。qNMR は、測定対象化合物の分子内プロトンのみによって定量されるため非常に信頼性が高く、近年薬局方など公定書に規定される定量法・純度決定法として広く採用されつつある。

本研究ではいくつかの化合物において 90%以下の純度を示していた。イソ吉草酸血症の判定に用いられるイソバレリルカルニチン (C5)の純度は 82.0%、グルタル酸血症の判定に利用されるグルタルルカルニチン (C5-DC)の純度は 80%に満たなかった。試薬メーカーやキットメーカーが供給している安定同位体標識内部標準物質も同様にメーカー自身が定める定量・純度検定法で決定されていることを考慮すると、本研究の結果と同様に純度が信じられている値より低いことが考えられる。このことは現在、検査施設で行われて

いる1点検量における定量値も正しく検定し直した内部標準物質を用いれば変わる可能性があることを示唆している。

E. 結論

本研究において、標準物質がどの機関からも用意されていないアミノ酸・アシルカルニチンの定量 NMR による SI Traceable な定量・検定系を確立した。NMR は「非破壊検査」であるため、qNMR 測定後の「定量値が決定した試料」をそのまま LC-MS などの検量線用標準物質として利用することができる。この SI Traceability の取れた試料を用いて検量線を描き、米国疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) から供給されている Quality control 乾燥ろ紙血中のマススクリーニング測定対象化合物を定量したところ、いくつかの化合物は CDC が公表している測定値と 20% 以上異なっていた。このことは将来的に現在行われている測定・濃度決定法やカットオフ値の見直しにつながる可能性がある。

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, 後藤温子, 品田京子, 志村明子, 相崎潤子, 小澤仁子, 渡辺倫子, 鈴木恵美子, 松原洋一, 原田正平: SI トレーサブルなマススクリーニング測定対象化合物検定法の確立. 第 42 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、東京、2015 年 8 月
- 2) 中島英規, 前田堂子, 後藤温子, 品田京子, 志村明子, 相崎潤子, 小澤仁子, 渡辺倫子, 鈴木恵美子, 松原洋一, 原田正平: 平成 26 年度 Quality control 外部精度管理結果について. 第 42 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、東京、2015

年 8 月

3) 中島英規, 前田堂子, 後藤温子, 品田京子, 志村明子, 相崎潤子, 小澤仁子, 渡辺倫子, 鈴木恵美子, 松原洋一, 原田正平: マスクリーニング外部精度管理 Web データ授受システムの構築. 第 42 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、東京、2015 年 8 月

4) 重松陽介, 畑郁江, 湯浅光織, 但馬剛, 渡邊順子, 石毛信之, 中島英規: 有機酸代謝異常症の LC-MS/MS 法による二次検査法の検討. 第 42 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、東京、2015 年 8 月

5) 渡辺倫子, 中島英規, 鈴木恵美子, 小澤仁子, 前田堂子, 品田京子, 志村明子, 後藤温子, 松原洋一, 原田正平: 平成 26 年度新生児マススクリーニング精度管理 (技能試験) の報告. 第 42 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、東京、2015 年 8 月

6) 鈴木恵美子, 渡辺倫子, 相崎潤子, 小澤仁子, 中島英規, 松原洋一, 原田正平: 新しい外部精度管理のためのブラインド検体導入とその問題点. 第 42 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、東京、2015 年 8 月

7) 中島英規, 鈴木恵美子, 渡辺倫子, 原田正平: 質量分析装置による新生児マススクリーニング外部精度管理結果. 第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会、大阪、2015 年 10 月

8) 中島英規, 渡辺倫子, 鈴木恵美子, 原田正平: 定量 NMR を応用した SI トレーサブルな新生児マススクリーニング測定対象化合物検定法の確立. 第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会、大阪、2015 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

