

分担研究課題名：新生児マススクリーニングの全国標準化に関する研究
研究分担者：但馬 剛（国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室・室長）

タンデムマス・スクリーニング検査の標準化と精度管理

研究協力者：重松 陽介（福井大学医学部医学科・客員教授）

研究要旨：前年度に引き続き、外部精度管理、および検査施設の現地調査実施に関与した。QC 試験結果と PT 試験結果を比較したところ、測定値のバラツキが大きく精度に問題のある検査施設は PT 試験結果で抽出できる可能性が示唆された。native 体含有チェック液を用いた内部標準キット IS 体量の評価を 8 検査施設で試行したところ、IS 体量測定値は重水素標識数の多さではなく、それ以外の機器分析条件に影響されることことが示唆された。全ての検査施設で同様の検討を行うことで、検査施設の機器ごとの分析条件の特性を明らかにし、個別に修正を行い、また精度管理を行えば標準化が可能になることが示唆された。

研究協力者

花井潤師（北海道薬剤師会公衆衛生検査センター技術顧問）
石毛信之（東京都予防医学協会小児スクリーニング科科长補佐）
稲岡一孝（大阪母子医療センター医療技術部特任職員）

A. 研究目的

タンデムマス・スクリーニングを実施している検査施設が、必ずしも日本マススクリーニング学会の検査施設基準を満たしていない現状を踏まえ、見逃しを起こさない、またスクリーニング対象者に無用な不安を惹起しないような良好な精度を保証する体制が望まれる。この体制を実現するために、外部精度管理体制を整備し、検査システムの標準化に取り組む必要がある。

B. 研究方法

1. タンデムマス・スクリーニング普及協会が自治体から受託している精度管理事業に対して提言を行うため、QC 試験と PT 試験データの評価方法を検討した。QC 試験では、健常新生児の低濃度、カットオフ値濃度、患者での中濃度、患者での高濃度という 4 濃度の検査ろ濾紙血が使用され、日内変動と日間変動を評価す

るために 1 日 5 回で 5 日間測定が実施された。PT 試験では、対象疾患のスクリーニング指標が

QC 試験での中濃度程度であるろ紙血サンプルを使用して年間 3 回実施された。

2. 外部精度管理事業などで明らかになっている検査施設毎の測定データの乖離を最小化するために必要な要件を情報収集するために、機器メーカーや試薬メーカーの関係者を含めたワーキンググループを設置し、問題点の提起を行いながら情報収集を行った。

3. 内部精度管理用のチェック液を試薬メーカーから提供を受け、主な 8 スクリーニング検査施設において内部標準溶液のバラツキを調査した。

4. 偽陽性率を低減し、精密検査での的中率を向上させるための二次検査法を再検討した。

C. 研究結果

1. 外部精度管理

QC 試験では、測定値のバラツキは昨年度同様大きかった。中濃度での CV 値が 10% を越える検査施設はほとんどなかった。PT 試験での年間 3 回の測定値の CV 値は QC 試験以上に大きく、また QC 試験の CV 値とほとんど相関していなかった。（図 1）。

2. 標準化ワーキンググループ

①機器分析設定(1)：タンデムマス法MRM分析条件設定において、指標物質の native 体と内部標準標識体 (IS) との条件を同一にしていない検査施設があり、それぞれ最適化すると同じ条件にならないと指摘された。

②安定同位体標識数の問題：native 体と 7 個の重水素で標識された IS (D_7 体) を同じ MRM 条件で測定すると、 D_7 体の強度がより低くなる現象有り。重水素が測定のどこかの段階で水素に置換されている可能性が指摘された。

③機器分析設定(2)：MRM の dwell time (取り込み時間) を長くすると感度をあげられると考えられるが、イオンの取り込み方法が異なる機器では必ずしもそうはならないし、定量性が変化する可能性があり、標準化には利用出来ないと考えられた。

④イオンサプレッション現象の影響：一般的な量 ($100\mu\text{l}$) の IS 液でろ紙血を抽出した場合、抽出液中の雑イオン量が過大になり、イオンサプレッション現象のため指標物質の感度が低下する可能性があり、抽出液は希釈した方がよいと考えられるが、機器の感度も考慮する必要がある。

⑤機器間の測定値の変動についての考え方：機器が適正な値を出しているという状態を整えることが第一であり、その前に機器間差を安易に補正すべきではないという意見があった。現実のマススクリーニング事業では、カットオフ値の適正を評価したり、患者の重症度を評価したりするためには、全ての機器で適切な範囲 (ほぼ同一) の値となることが望まれるので、値をそろえる標準化も必要である。

3. 機器間差の検証の試行

標準化ワーキンググループでの情報収集結果を踏まえ、特に、多くの重水素で標識された IS の挙動を確認するために、札幌 IDL から内部精度管理用の native 体チェック液の提供を受け、同意を得られた有志の 8 検査施設において、それぞれの施設で使用している内部標準液で溶解した native 体チェック溶液を作成し、フローインジェクションで分析した。native 体と IS のイオン強度をそれぞれの存在量で補正し、それらの比を算出し

た (図 2)。この比は理論的には 1.0 となることが想定され、多くの指標で概ね 1 前後であったが、バリリン、遊離カルニチン、C5-OH アシルカルニチン、C5-DC アシルカルニチンで 1 からはずれる現象がみられた。C5 の IS は D_9 体であるが、ほぼ 1 前後に分布した。

4. 二次検査法の再検討

初回濾紙血を用いた LC-MS/MS・二次検査法の LC カラムを再検討し、メチルマロン酸血症・ホモシスチン尿症のみならず、グルタル酸血症 1 型、アルギニノコハク酸尿症、高チロシン血症 1 型に対しても対応できることを確認した。

D. 考察

PT 試験では年 3 回での 1 回測定値であり、“CV 値”を算出することに統計学的に疑義はあるが、QC 試験での CV 値と比較すると、個別値を参照してみても PT 試験でのばらつきは大きく、多くの検査施設で QC 試験での良好な CV 値を反映できなかった。QC 試験は年 1 回であり、チャンピオンデータを出すような特別の対応がなされている可能性があり、精度評価には必ずしも適切でないのかもしれない。精度管理の評価には PT 試験での“CV 値”を重視し、CV 値の大きな施設について個別に機器分析条件を調査し改善作業に取り組む必要がある。

QC 試験で見られる指標値のバラツキに関して、native 体チェック液を用いた検討で、IS が d_9 標識体であることの影響はほとんどないことが判明した。それ以外の機器分析条件に影響される可能性が考えられ、QC 試験での測定値と今回の native 体チェック液を用いた検討での値との関連性を調査し、個別に問題点を解明したい。その上で更に、全ての検査施設で native 体チェック液を用いた分析調査を行い標準化作業に取り組むたい。

E. 結論

標準化の推進には、外部精度管理のデータの有機的な解析と、内部精度管理用チェック液を用いた検査施設の機器分析状況の調査に基づき、検査施設の機器分析の現状を個別・具体的に把握し、問題点を改善することから始める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 重松 陽介, 湯浅光織, 畑郁江, 磯崎由宇

子, 杉原啓一: LC-MS/MS 方による初回濾紙血を用いた二次検査法の改良と開発. 日本マス・スクリーニング学会誌 . 28(3); 295-303, 2018.

2. Yuasa M, Hata I, Sugihara K, Isozaki Y, Ohshima Y, Hara K, Tajima G, Shigematsu Y: Evaluation of Metabolic Defects in Fatty Acid Oxidation Using Peripheral Blood Mononuclear Cells Loaded with Deuterium-Labeled Fatty Acids. Dis Markers. 2984747, 2019.

2. 学会発表

1. 重松 陽介, 湯浅 光織, 畑 郁江, 磯崎由宇子, 杉原 啓一: LC-MS/MS 法による初回濾紙血を用いた二次検査法の改良と開発. 第 45 回日本マス・スクリーニング学会学術集会. さいたま市 8.17-18. 日本マス・スクリーニング学会誌 28 巻 2 号 Page232
2. 湯浅光織, 畑郁江, 杉原啓一, 磯崎由宇子, 重松陽介, 大嶋勇成, 香川礼子, 岡田賢, 原圭一, 但馬剛: 酵素活性が正常であった MCAD 欠損症患者における末梢単核球を用いた β 酸化能の検討. 第 60 回日本先天代謝異常学会. 岐阜市 11.8-10, 2018. 日本先天代謝異常学会雑誌. 34;188, 2018.
3. 重松陽介: タンデムマススクリーニングの精度管理と標準化. 日本マススクリーニング学会技術部会・第 37 回研修会. 富山市 3.2, 2019.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

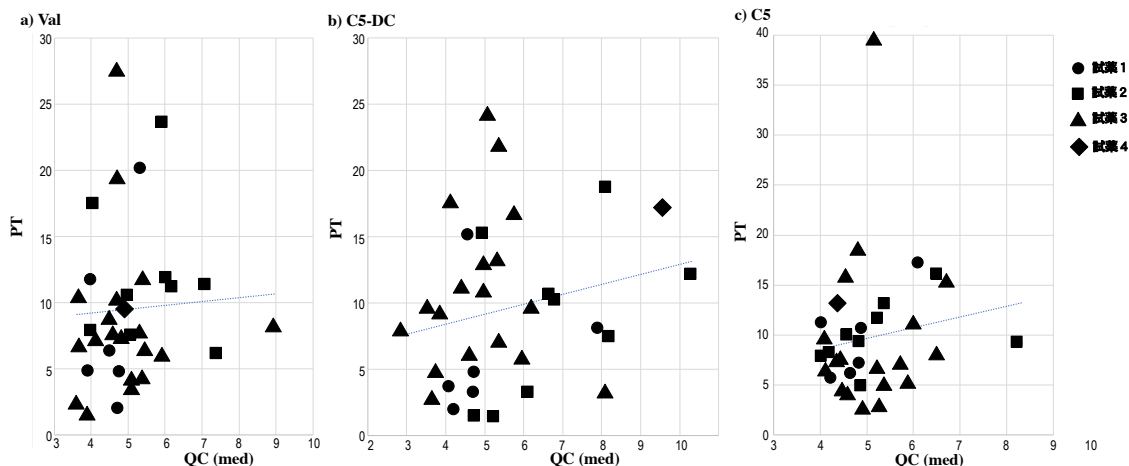
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図 1 PT 試験と QC 試験の CV 値 (%) 比較



(註) $CV(\%)=100 \times (SD/mean)$ 、Val : バリン、C5-DC : グルタリルカルニチン、C5 : C5 アシルカルニチン、QC (med) : QC 試験・中濃度測定値での CV 値、試薬 1 ~ 4 : IS キットメーカー別で示した。

図 2 native 体チェック液を用いた検査施設使用キット IS 量測定による機器間差の検討 : Y 軸は $[IS \text{ イオン強度} / IS \text{ 量}] / [native \text{ 体イオン強度} / native \text{ 体量}]$ で、1.0 が想定値

