

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、外部精度管理の QC 試験結果と PT 結果を解析したところ、QC 試験測定報告値が全施設平均値±10%内でない施設が希でなく、多くの施設で3年間に10%範囲に収まらない不規則な測定値変動がみられた。溶液キャリブレーションを用いた3種の内部標準キット IS 量の評価をフローインジェクション MS/MS 法により全施設で実施したところ、同一キットを使用している施設でも IS 量が大きく変動し、使用機器の違いによる変動も見られた。MS/MS 分析条件は機器の仕様に基づき最適化されていると想定されるが、実際の設定は一定ではなく、また多数の検体処理を行い一定程度機器汚染がある状況での分析であったことが変動の要因と考えられた。濾紙血キャリブレーションを用いた標準化が必須と考えられた。

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長補佐)
福岡一孝 (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。本年度は、外部精度管理状況を評価すると共に、機器の分析条件設定及び IS キットに含まれる安定同位体標識物質の妥当性について検討した。

B. 研究方法

1. 機器間差の検証

検査施設の分析機器条件の実態を評価するために、精度管理事業構成員より提供された

native 体含有“溶液キャリブレーション”と、各施設

で使用されている内部標準キット液を混和し、混和液をフローインジェクション MS/MS 法で分析するよう全国の検査施設に依頼した。直前に機器メーカーによる点検整備を受けていることを研究参加条件とはしなかったが、native 体と内部標準 (IS) とで MS/MS 分析条件が異なっている施設からは条件設定値の提供を受けた。“溶液キャリブレーション”には現状のタンデムマススクリーニングでの全指標物質が含まれている一方、IS キットによっては C5-OH あるいは C10 のラベル体が含まれていなかった。IS 体量を評価するために、測定された native 体とラベル体 (IS) のイオン強度比を計算した上で、“溶液キャリブレーション”及び IS キットの添付文書に記載されている含有量を用いて native 体とラベル体とが等量となるように補正し、IS/native 体比とした。

2. 外部精度管理

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 試験での全検査施設の報告値をスクリーニング指標毎に分布をグラフ化した。QC 試験では“中濃度”濾紙血測定値を、PT 試験では、陽性者濃度の測定

値を分析に用いた。

C. 研究結果

1. 機器間差の検証

全国 34 検査施設のうち 33 施設と、福井大学病院・小児科代謝検査部門、成育医療研究センター・マスキング研究室が研究に参加した。使用されていた IS キットは、シーメンスが 18 施設、PerkinElmer が 9 施設、CIL が 6 施設、SEKISUI が 2 施設であった。

①IS/native 体比の分布

図 1 (A-C) に、SEKISUI キット使用を使用していた施設を除き、キット別に“IS/native 体比”を示した。

図 1A に示すように、いずれの IS キットにおいても IS/native 体比は 1 ± 0.2 の範囲を超えて広く分布した。特定の施設のみが特に大きくずれるわけではなかった。C5-OH と C5-DC は、溶液キャリブレータの含有量が相対的に少ないことを示唆する分布であった。

図 1B に示すように、重水素多標識された IS (d_8 -Val、 d_9 -C0、 d_9 -C5、 d_9 -C5-DC) では IS/native 体比の分布がより拡散する傾向が見られた。シーメンスキット d_5 -Phe は、 $^{13}C_6$ -Phe に比べ分布が拡散する傾向が見られた。

図 1C に示すように、5 施設で native 体と IS で異なった最適化 MRM 条件が使われていたが、このような最適化によっても IS/native 体比が 1 ± 0.2 の範囲を外れている施設が少なくなかった。

②QC 試験濾紙血測定値と IS/native 体比の関連性の検討

図 2 に QC 試験濾紙血 C0 中濃度測定値と IS/native 体比の相関を示した。全体としては両者に相関は認められなかったが、更に native 体/IS 比による C0 濃度の補正値を個々に矢印で移動を示した。全体では濃度の平均値は 59uM から補正後 49uM に低下し、実線に沿った“強度補正可領域”に分布する施設の濃度は補正後平均値を中心とした狭い濃度範囲に収束した。施設①～⑤では、ほとんどのスクリーニング指標で同様の挙動を示したが、多くの施設の多くの指標では、必ずしも同様の挙動は認められなかった。

2. 外部精度管理

図 3 に、QC 試験のアミノ酸の分析値(中濃度)の一部を示した。全施設の平均値 $\pm 10\%$ の範囲を外れる施設が少なからずみられた。図 4 に、QC 試験のバリウム値の 3 年間の変化を示した。概ね平均値 $\pm 10\%$ の範囲で一定の値となる施設だけでなく、中空矢印で示したように平均値 $\pm 10\%$ の範囲に入る改善傾向を示したり、中塗り矢印で示したように平均値 $\pm 10\%$ の範囲を外れたままだったり、それら以外にも改善悪化を繰り返したりする施設もみられた。

図 5 に、QC 試験と 3 回目の PT についてバリウム濃度の相関を示した。相関係数 0.75 と一定の相関関係は見られたものの、回帰直線から大きく外れている施設も少なからずみられた。

D. 考察

機器間差の検証について、今回、直近の機器の点検整備を参加要件としなかったため、機器の整備状況が測定値のバラツキに関係していた可能性は否定できない。PT や QC 試験での測定値のバラツキは汚染による機器性能の低下が関係していると思われるので、分析検体数に応じて年 1, 2 回定期的に点検整備を受けるべきであろう。

液体キャリブレータを使用した標準化が可能か検討したが、一部の施設の機器を除き、困難であることが判明した。その要因として、MRM 測定条件の最適化が必ずしも容易でないこと、IS が d_8 -Val とか d_9 -C0 であり、重水素あるいは ^{13}C の 3 標識体という安定同位体希釈試験に求められる IS の要件を満たしていないことなどが考えられた。

このように、フローインジェクション MS/MS 法を用いると、液体キャリブレータを使用した場合でも標準化は困難である。国際的には traceability¹⁾に基づいた精度管理が要請されており、マトリックス干渉(matrix effect)を排除出来る LC-MS/MS 法での値付けが推奨されている。Traceable な液体キャリブレータを使用した IS キットの精度管理を LC-MS/MS 法で行い、更に濾紙血キャリブレータを作成し LC-MS/MS 法で濃度を検定²⁾して、全ての検査施設で利用可能にする必要があると考えられた。

(引用文献)

1. Koumantakis G: Traceability of measurement results. Clin Biochem Rev 29(suppl), S61-S66, 2008.
2. Miller IV JH, Poston AP, Karnes HT: A quantitative method for acylcarnitines and amino acids using high resolution chromatography and tandem mass spectrometry in newborn screening dried blood spot analysis. J Chromatogr B, 903: 142-149, 2012.

E. 結論

標準化の推進には、機器メーカーによる機器点検整備と、濾紙血キャリブレーションが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shigematsu Y, Yuasa M, Hata I, Nakajima H, Tajima G, Ishige N, Fukao T, Maeda Y: 2-Methylacetoacetylcarnitine in blood of bete-ketothiolase deficiency and HSD10 disease. Med Mass Spectr. 3(1):43-47, 2019.

2. 学会発表

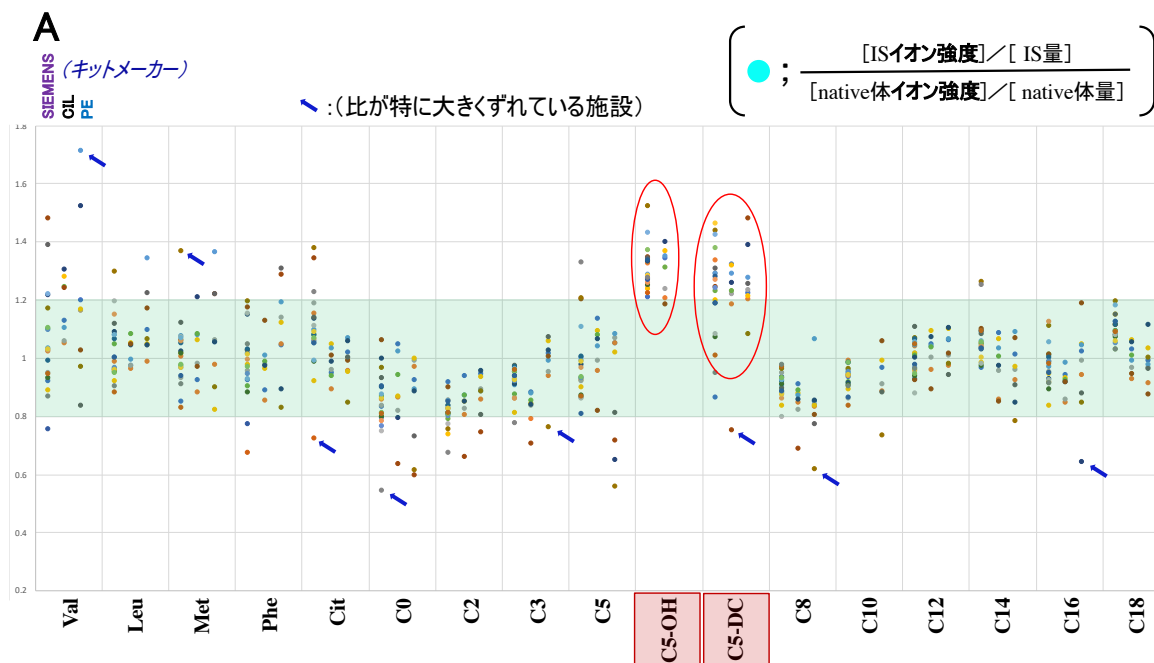
1. 重松陽介, 湯浅光織: 脂肪酸酸化異常症患者末梢単核細胞を用いた代謝トレーサー研究. 第44回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋市. 9.12-13, 2019. JSBMS Letters 44 (Supp), 80, 2019.
2. Shigematsu Y, Yuasa M, Sugihara K, Ikue Hata, Tajima G: A Simple Diagnostic test for carnitine-palmitoyl-transferase I deficiency using tandem mass spectrometer. 10th ISNS International Symposium 11th Asia Pacific Regional Meeting, 19-22 Sep, 2019. Hangzhou, China. Program book, p27, 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 スクリーニング指標の IS/native 体比(イオン強度)



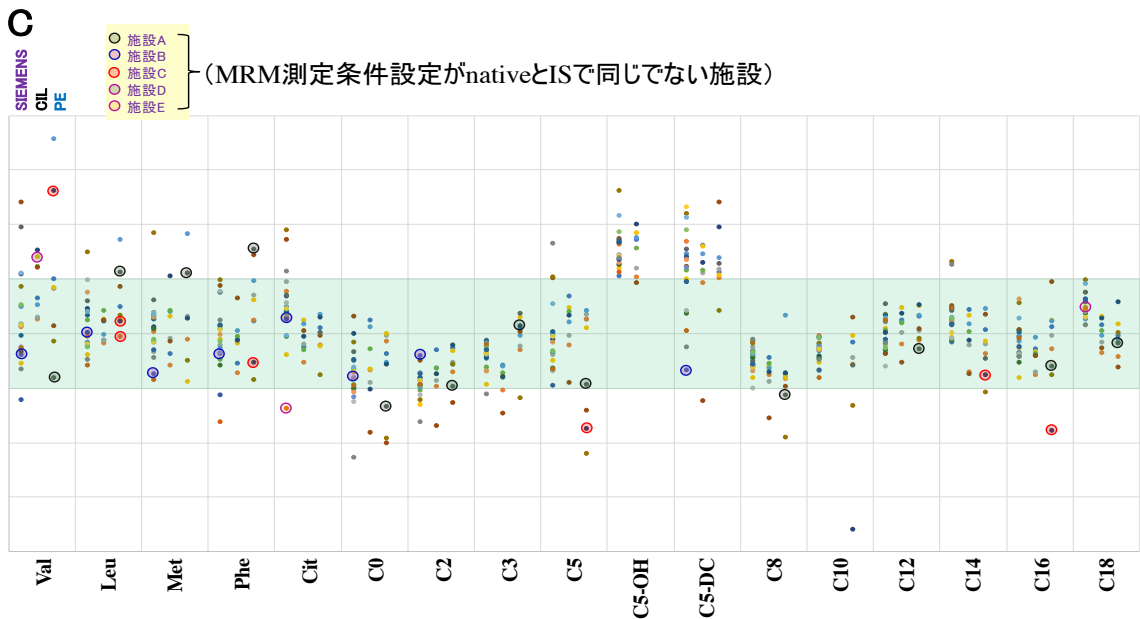
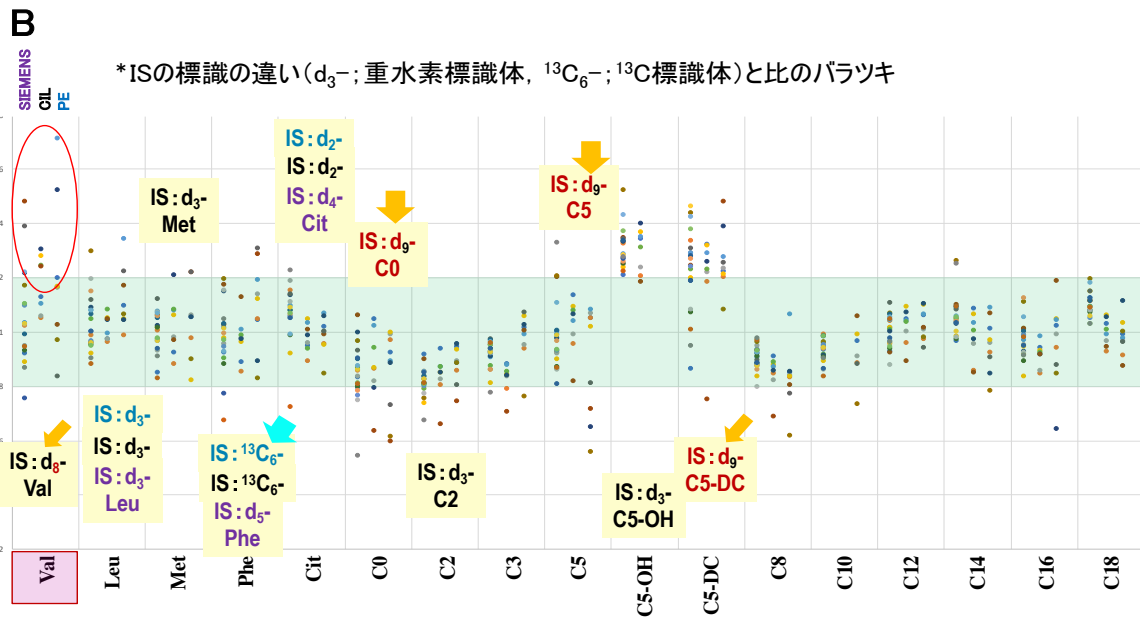


図2 C0での IS/native 体強度比と QC 試験測定値との相関、および補正濃度値の分布

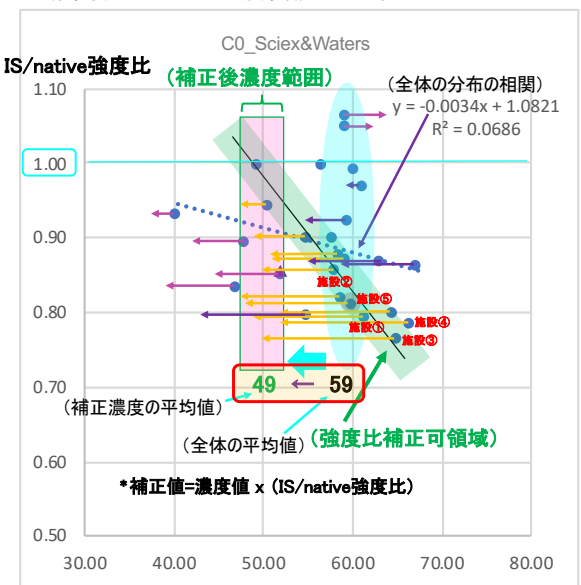


図5 QC 試験と PT での IS キット別 Valine 値の相関

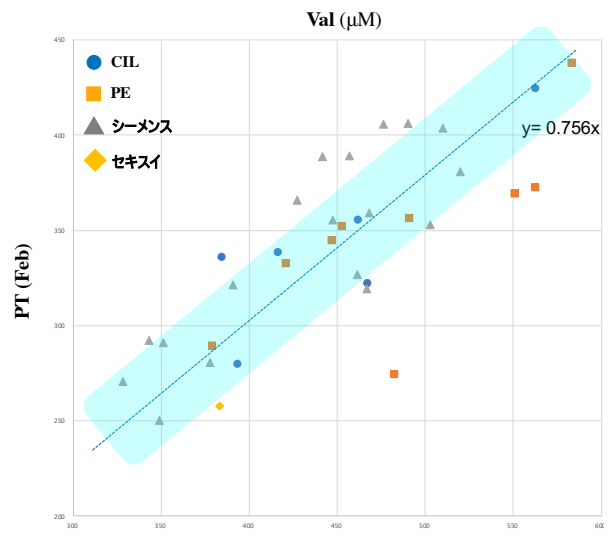


図3 QC 試験における検査施設毎のアミノ酸測定値(赤枠: 平均値±10%)

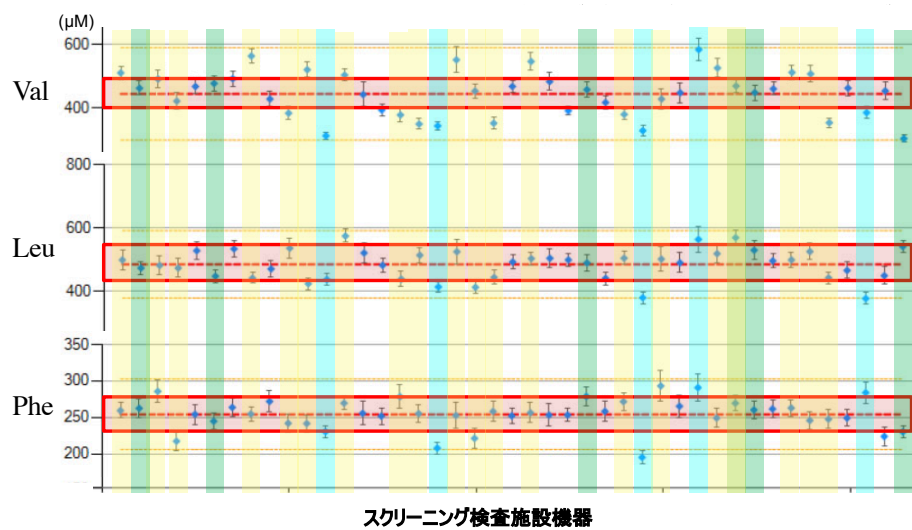


図4 QC 試験における Valine 測定値の検査施設毎の3年間の変動(赤枠: 平均値±10%)

