

(15) VMAマス・スクリーニングの精度管理

— DIP法について —

新 川 隆 康

(神奈川県衛生研究所)

研 究 目 的

神経芽細胞腫(N.B)のマス・スクリーニングにおける1次検査の判定には、VMAの呈色反応の色調とその濃淡の識別が基本とされ、検査担当者に充分な解析の能力が要求される。

そこで、日常のスクリーニング検査における技術の向上と精度の維持を計かるために、前年度に引き続き精度管理の方法論について検討を加え、スクリーニングシステム確立の一助とした。

研 究 方 法

1. DIP法

ア. 試料の調製と送付

VMA濃度、40, 20, 10, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準液およびSPOT法の試料と同じ由来の試料(尿)の20 mlをビーカーに採り、30枚の沓紙(東洋沓紙, №63, 2×5 cm)をまとめてビーカーに入れ、充分に尿をなじませた後1枚ずつ乾燥し、2枚ずつビニール袋に入れ各検査施設に郵送した。

イ. 回答の方法

SPOT法と同じ回答方法を用いた。

2. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による試料中VMA, HVAの測定

ア. 試料の前処理

尿1.0 mlをスクリーキャップ付褐色試験管に採り、1 NHCl 0.7 mlを加え、100℃ 5分間加熱処理をした。冷後、NaCl 0.8 gを加え、充分に溶解した後、酢酸エチル4 mlを加え、15分間振とうしてVMAとHVAを抽出した。静置後、上清を褐色共栓試験管に移して、再び酢酸エチル4 mlを加え、抽出を繰り返した。酢酸エチルを合わせて水浴上(50℃)で減圧乾固し、抽出物に0.1 NHCl 1.0 mlを加え再溶解し、メンブランフィルターで夾雑物を除去してHPLCの試料とした。

イ. HPLCの溶出条件

測定試薬はシグマ社のVMAとHVAの標準品および、和光純薬の特級リン酸、リン酸1カリウム、アセトニトリルを用いた。機器は島津製作所のLC4Aをポンプ本体とする蛍光測定用のシステムを、カラムはデュポン社のゾルボックス・ODS(4.6×150 mm)を用いた。

溶出液には、PH 3.8, 0.005 M リン酸バッファー 100 ml に対し、アセトニトリル 4 ml に混合液を用いた。流速は毎分 0.9 ml とし、カラムの温度は 65℃ とした。また、HVA の保持時間を短くするためアセトニトリルを 8% 添加するリニアグラジェント溶出を行った。

ウ. VWA, HVA の検出と定量法

分離した VMA と HVA の検出には、282 nm を励起光とする自然蛍光法を用い、316 nm の蛍光の強さにより濃度を求めた。

濃度の算定は、それぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準液を基にした絶対検量線法により、分離されたピークの高さより求めた。

3. クレアチニンの測定

測定には、和光純薬のクレアチニン測定用キットと、日立製 191 E 型 分光光度計を用いた。方法は尿 0.1 ml および、10 mg/dl と 30 mg/dl の標準液 0.1 ml をそれぞれマイクロピペットで試験管に分取し、2.0 ml の精製水で希釈した後、ピクリン酸溶液と NaOH 溶液を 1.0 ml ずつ加えて、25℃, 20 分間反応させた。

測定の波長は 520 nm, 層長は 10 mm とした。

研 究 結 果

第 2 回に参加の 7 施設の精度管理の成績および、試料中の VMA, HVA, クレアチニンの値を表 1 に、第 3 回に参加の 17 施設の成績と、試料中のそれぞれの値を表 2 に示した。表 3 は第 3 回の成績に添えられたコメントの内、No. 5 の試料についてのまとめである。

考 按

今回の成績より、SPOT 法と DIP 法との間に患者の尿に対する判定の差は、認められなかった。正常尿に対しては SPOT 法の偽陽性の回答が、2, 3 回合わせて 164 回答中 16 回答で、9.9%, DIP 法が同じく 144 回答中 19 回答で 13.2% となりやや高かった。これは DIP 法の呈色反応が高クレアチニン尿に対し、SPOT 法よりやや強い色調を示した為と思われた。

この様に高張尿で低 VMA 濃度の検体では、VMA 以外の尿中成分の呈色反応が判定に際し強く影響するため、成績にバラツキが生ずる結果となった。

今後の課題としては、試料尿中の VMA の濃度をさらに低くして、 $10 \pm 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 程度をはっきり陽性と判定できる技術レベルの精度管理の方式を確立する必要がある。

表 1

第 2 回 精度管理成績表 (DIP法)

	標準試料				未知試料							
	A	B	C	D	1	2	3	4	5	6	7	8
神奈川県衛生研究所	1	4	2	3	—	+	—	—	+	—	—	—
聖マリアンナ医科大学	1	4	2	3	—	+	—	—	+	—	±	—
神奈川県予防医学協会	1	4	2	3	—	+	—	—	—	—	—	—
横須賀市衛生試験所	1	4	2	3	—	+	—	—	+	—	—	—
名古屋市衛生研究所	1	4	2	3	—	+	—	—	+	—	—	—
愛知県岡崎保健所	1	4	2	3	—	+	—	—	+	—	—	—
同 一宮保健所	1	4	2	3	—	+	—	—	+	—	—	—
試料中クレアチニン値 (mg/dl)					64.1	34.1	23.8	34.7	65.9	68.1	23.8	64.1
" VMA 値 ($\mu g/ml$)					2.6	13.1	2.1	1.4	2.3	1.9	2.1	2.7
" HVA 値 (")					4.9	16.9	6.0	2.9	4.8	3.2	5.5	4.5

表 2

第 3 回 精度管理成績表 (DIP法)

施設名	標準試料				未知試料							
	A	B	C	D	1	2	3	4	5	6	7	8
神奈川県衛生研究所	2	1	3	4	+	—	—	—	+	—	—	+
聖マリアンナ医科大学	2	1	3	4	+	—	—	—	+	—	—	+
神奈川県予防医学協会	2	1	3	4	+	—	—	—	—	—	—	+
横須賀市衛生試験所	2	1	3	4	+	—	—	—	—	—	—	+
名古屋市衛生研究所	2	1	3	4	+	+	—	—	+	—	—	+
群馬県小児医療センター	2	1	3	4	±	—	—	—	—	—	—	+
富山保健所	2	1	3	4	+	—	—	—	+	—	—	+
福井県衛生研究所	2	1	3	4	+	—	—	—	—	—	—	+
滋賀県保健衛生協会	2	1	3	4	±	—	—	—	—	—	—	+
大阪府寝屋川保健所	2	1	3	4	+	—	—	—	±	—	—	+
愛知県豊橋保健所	2	1	3	4	+	±	—	—	+	—	±	+
同 春日井保健所	2	1	3	4	+	—	—	—	±	—	—	+
同 半田保健所	2	1	3	4	+	±	—	—	+	—	—	+
広島県福山保健所	2	1	3	4	+	+	—	±	+	—	—	+
広島市衛生研究所	2	1	3	4	+	+	—	+	+	—	—	+
広島県衛生研究所	2	1	3	4	±	—	—	—	±	—	—	+
愛媛県衛生研究所	2	1	3	4	+	—	—	—	+	—	—	+
試料中クレアチニン値 (mg/dl)					33.3	57.7	14.1	11.1	38.8	24.5	73.7	25.3
" VMA 値 ($\mu g/ml$)					37.4	3.2	0.6	1.3	1.3	0.7	2.5	14.6
" HVA 値 (")					64.2	8.4	1.8	4.0	4.0	2.3	4.0	20.0

表 3

第 3 回 試料 No.5 に対するコメントのまとめ

判定成績	施設数	判定の主な理由
—	2	20 $\mu g/ml$ 以上を陽性
	1	TLC を併用している
	2	発色度が弱いため陰性
+	3	発色度は弱いが陽性
	1	10 $\mu g/ml$ 以上を陽性
	5	記入なし
±	1	10 $\mu g/ml$ 以上を陽性
	2	記入なし



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

神経芽細胞腫(N . B)のマス・スクリーニングにおける1次検査の判定には,VMAの呈色反応の色調とその濃淡の識別が基本とされ,検査担当者に十分な解析の能力が要求される。

そこで,日常のスクリーニング検査における技術の向上と精度の維持を計かるために,前年度に引き続き精度管理の方法論について検討を加え,スクリーニングシステム確立の一助とした。