

マススクリーニングシステムの精度管理に関する研究

平成4年度研究概要

分担研究者：成瀬 浩

研究協力者：入江 實、菊地由生子

澤田 淳、辻 章夫

松浦信夫、宮井 潔

I. 研究目的

今回の課題で、もっとも重要なものは、現在全国的に実施されているマススクリーニングで、全国的な精度管理が確立されていない、先天性副腎過形成症（以下CAHと略）スクリーニングと、神経芽細胞腫スクリーニングの、精度管理の研究であり、研究目標としては、この両者のスクリーニング精度管理法の確立が最重点目的である。

それと共に、マススクリーニングの精度管理全般についても、現状を分析し、改良すべき点、あるいは問題点についての研究を行うことも一つの研究テーマとして取り上げた。

研究協力者は、次項に述べる如くであるが、目的設定、あるいは、研究方向の設定の過程の中で、多数のスクリーニング担当者、あるいは、マススクリーニングの研究者の方から、貴重な意見や、情報を頂いて来たのである。

II. 研究課題と組織

課題と主な研究協力者は次の如くである。

1. 現行の精度管理の問題とその効用の分析

入江 實、松浦 信夫、宮井 潔

2. CAHスクリーニングの精度管理の確立のための研究

菊地由生子、辻 章夫

3. 神経芽細胞腫スクリーニングの精度管理の確立のための研究

澤田 淳

ただ、協力者の大半は、2つの課題に関与して研究を行っている。この研究班としては、日本マススクリーニング学会時に、簡単な打ち合わせ会を行った他、次の如き会合を行った。

1. 平成4年12月7日、東京地区の会議（成瀬、辻、入江）、12月12、13日関西地区の会議（成瀬、宮井、澤田）、12月14日札幌市の会議（成瀬、菊地、松浦）を行い、詳細を討議した。

2. 特に新しく精度管理を確立するための研究を行う必要のある3)と4)の課題については、以下の如き検討会を行った。

(1) 副腎過形成症スクリーニング

イ) このスクリーニング技術を研究している人々を招待し、精度管理方法の内容を検討する会を2回行った。それに基づき、平成5年1月9日昭和大学において、当面の精度管理の方針と、基準物質作製の方針について討議を行った。

(2) 神経芽細胞腫スクリーニング

イ) 平成4年12月4日に、最も問題の多いとされている、S社製HPLCについての技術的検討を行った。

ロ) 平成5年1月23日に、各種のHPLC法を使用している技術者の主な人々に参加してもらい、全国的な基準物質の作製の可能性、精度管理の確立の可能性、その方法などについて討議を行った。

Ⅲ. 研究報告

1. 現行の精度管理の問題点とその効用の分析

そもそも、現行の精度管理が発足したのは、わが国で先天性代謝異常マススクリーニングの全国実施の準備段階で、多数の者から必要性が主張され、当時のマススクリーニング関係の研究班々長の森山豊より厚生省に要望が出されたものである。

その理由としては、①マススクリーニングに於いては、通常の医療場面での検査と違って、臨床医が、医学的症状からの検査値についてのフィードバックが、全く出来ないこと。つまり、検査値が患者発見に絶対的な意味を持つこと。②しかも、その検査は、通常の病院の検査室に比べ、設備も人員も貧弱な所で、ごく少数の人が多数の検体を処理しなければならないのである。毎日殆ど正常の検体を、少数の人がmanualで処理することは、大変な業務である。③更に、ごくわずかの血液（一般にわずか3 μ l）からの定量であり、試薬感度ぎりぎりの所で、軽い異常も見い出さなければならない。つまり、可能なかぎり、低いカットオフ値を設定することが要求されている。

この様な状況で、発見もれを防ぐために、精度管理システムを確立し、正確度テストや重要な試薬類の品質管理、さらに、これらの精度管理を通し、個々のセンターの技術者の問題点を把握し、援助を行うシステムを作ることを国に要望し、現行のシステムが確立したのである。

現在行われている精度管理の結果については、入江ら、成瀬らにより分析されている。現在でも、まだアミノ酸や、TSHの軽度上昇サンプルが見逃されている。また、この所、記録などのエラーが少なくないことも目立っている。技術者の交代などの状況に関係している面と、

省力化で、負荷が過重になっている面が指摘しうる。事務的な作業も含め、自動化の推進の必要性も考えられる。

次に、クレチン症マススクリーニングの現状については、先に、クレチン症スクリーニング全国研修の折の資料によれば、現在の各施設のカットオフ値は、 $10 \mu\text{U}/\text{ml}$ という低いレベルに迄進歩して来ている。

平成2年度の猪股・中島らの報告で、12例の偽陰性（発見もれ）が発生したとのことである。平成元年迄に1141万名の新生児がスクリーニングを受け、2131名のクレチン症患者が発見されたわけで、この反面12名（全患者の0.56%）見逃しがされたのである。この数字を諸外国の推定見逃し数約5%あるいはそれ以上と云われる頻度に比較すると、かなり低いことがわかる。クレチン症スクリーニングシステムとして諸外国の中で、最も進歩していると思われるフランスで、この偽陰性が2.1%で、TSHカットオフ値が $20 \mu\text{U}/\text{ml}$ 程度である。

ただ、わが国の現状を、より詳しく分析した松浦らの報告によると、第1回目の測定で、明らかに患者を疑わせる様な高い値を示しているのに、すぐ専門医に送らず、第2回目あるいはそれ以上採血を続ける施設が2ヶ所あり、この様な所では、発見された患者の発生頻度が2万名に1名と、平均よりもかなり低い値を示している。（ただ、これらの2ヶ所の新生児数は2万名で、1名しか発見されていないというので、現実には、発生患者数がもう少し多くなる迄待たないと、正確なところは解らないが。）

一般には、第1回採血で著しい高値を示したものは、すぐ専門医に送り、あと中等度～軽度のTSH上昇群を、第2回あるいはそれ以上の採血を依頼して検査を続けるのだが、この際の方針は必ずしも全国的に統一されていない。少しでもTSHが高い場合に、専門家に送るか否かを決める場合の、基準値についても、全国的に一致した方針が必要でないかと指摘している。前述の如く、第2回採血を依頼するか否かの判断のためのカットオフ値は、大体 $10 \mu\text{U}/\text{ml}$ になっているのだが、2回目採血検体が正常か否かを判断する時のカットオフ値は、必ずしも決まっていない。クレチン症患者の一部は、生後2週前後で、TSH値が多少低下し、その後再び高くなる者もあるので、再採血の血液の正常が異常かの判断の基準について、より詳細な検討を行い、出来れば、全国的な基準を決めるべきであろう。

松浦らによれば、一部の施設で、何回か採血を繰り返し、かなり低い基準値を用いて、専門家に送る様なシステムを樹立している20施設の発見頻度は、 $1/3721$ であり、そうでない所は多少高い傾向があるとの事であり、この点注意すべき点であろう。ただ何回か再採血を繰り返すことの可否もあり、再採血検体では、第1回よりより低いカットオフ値を用いて、早く専門医へ送るべきケースを、選び出せないか否かを追究することが必要かもしれない。

尚現行の精度管理の中では、スクリーニングに用いる試薬の品質管理の仕事も重要である。成瀬らの分析では、クレチン症のスクリーニング用の試薬がかなりよくなっているが、まだロット差が歴然としている様である。この程度のロット差は、外国の製品に比べても決して劣

ってはいないのだが、上述の如く厳しいカットオフ値を必要とする場合には、見逃すことの出来ない問題であり、今後も引続き管理を続けることが必要であろう。

宮井らは、厳密にスクリーニング技術の精度を上げようとするなら、採血濾紙の扱い方に、より注意をしなければならないという問題を報告している。一つは、濾紙に血液を採取した折の乾燥させる場合の温度、湿度、時間の影響について、詳細に分析した。湿度の高い所で時間をかけて乾かすことで、血液分析はかなり不均一になることがわかった。これは、今後より正確なマススクリーニングを行う事を目標にする場合大切な問題であり、精度管理から見て大切なポイントである。この情報は、採血する現場にフィードバックする必要がある。また宮井らは、カットオフ値の考え方についても、新しい見解を示している。今年度は、フリーT4測定によるスクリーニングの場合のカットオフ値についての考え方を示しているが、これと同様な考え方で、TSH測定のスクリーニングのカットオフ値を論ずることが可能であると考えられる。次年度は、TSH値の問題について検討されることを期待している。

成瀬らは、酵素法による新しいPKUスクリーニングの開発に伴い、フェニールアラニン基準血液濾紙についての、より厳密な品質管理法を検討しつつある。今後PKUスクリーニングで 2mg/dl 内外迄カットオフが下げられた場合、基準物質についても、今迄とは異なる、より厳しい品質管理が必要となる。その為の方法の開発の報告であり、これは比較的どの施設でも実行しやすい方法である。

2. CAHスクリーニングの精度管理の確立のための研究

CAHスクリーニングが正式に採用されて、既に5年経過した。このスクリーニングについては、発足時に既に、EIA試薬が市販されていたが、4社が、別々の製品を作り、17ヒドロキシprogステロン(17OHP)基準濾紙血液も、17OHP抗体も、5種のものが存在している。このため、同一新生児血液でも、キットが違うと、測定値も変わるという現象があり、全国的に、一様の17OHPカットオフ値を決定することも出来ないでいる。この為、スクリーニング関係者からは、精度管理の早期開始を求める声が強く、日本マススクリーニング学会でも、精度管理実施の要望が出されていた。

まず、日本マススクリーニング学会の精度管理委員会松田委員長、諏訪、松本、福士委員らより、種々の情報及び学会技師部会などの要望を聞いた。菊地らは、まず現状において全国の各スクリーニングセンターで、どの様な内部精度管理を行っているか、またカットオフ値はどの様になっているかを調査した。更に、外部精度管理検体を送り、その測定結果の分析を行った。試薬の差により、カットオフ値は当然大きく変動している。しかも、同じ試薬でも、再採血率はかなり変動している。殊に17OHP測定の場合、正確に測定するためには、エチルエーテルによる抽出で、交叉反応を示す他の物質を除かなければならないが、この抽出法を併用しない所では、再採血率が高く、抽出法の併用をすすめる必要があることがわかった。外部標準検体を用いての検査では、成人血に17OHPを加えたものを送ったが、これでは今もっと

も多く使われている2種の異なる試薬で、あまり目立った差は出なかった。実際の新生児血では、この2種の試薬による測定値は大きく異なっている。新生児血中には、170HP抗体と交叉反応のある物質がかなり含まれているためである。従って外部精度管理検体としては、今迄のスクリーニングの場合のように、成人血に170HPを加えただけでは駄目であることが確認された。

菊地らの調査、あるいは学会よりの要望でも、出来るだけ早く、今迄のスクリーニングの様な、外部精度管理検体（今迄の精度管理では、外部標準検体という呼称を使用している）を用いた正確度テストを実施してほしいとのことであった。ただ、上述の如く、成人血液に170HPを加えただけでは不適当である。この問題の検討の為に会合では、新生児血液を用いる必要も強調されたが、種々の理由からこの案は否定された。また、この会合の中で、いくつかの精度管理の新しい形式も検討された。しかし最終的には、今迄の様に、10枚の精度管理検体中に、カットオフ値近辺の、軽度異常なものに加え、それが正しくピックアップされるか否かを問うという形式が妥当だという結論に達した。

成瀬らは、それでは、どの様な、物質を加えればよいのかについて、種々検討し、最終的には成人血に、現在の170HP抗体と交叉する特殊ステロイドを加えればよいと考えた。そこで、今迄の多くの施設での分析データに基づいて、数種の特殊ステロイドについて、現在マーケットで使用されて170HP抗体との交叉反応性を分析した。新生児に多い4種のステロイドを購入あるいは合成し、4種の170HP抗体との交叉の程度を測定した。

その結果、17- α -ヒドロキシプレグネノロン-3硫酸（170H Δ 5P-Sと略）が新生児血、殊に未熟児血中に多く、各種の抗体とも交叉することがわかった。それ故、成人血のヘマトクリットを調整した後に、170HPと170H Δ 5P-Sを適量加えればよいことがわかった。

上述の如く、このスクリーニングのカットオフ値は、使用する試薬により、かなり異なることがわかった。ただ、外部標準検体は、カットオフ値より、少し高いか、同じ位の170HP濃度のものを、送る必要がある。カットオフ値が試薬毎に変わるので、具体的にかなり面倒なこととなる。しかしこのカットオフ値の差も、交叉物質によるのであり、170H Δ 5P-Sを加えることにより、直接法（抽出しないで170HPを測定する方法）によるカットオフ値のバラツキに、対応出来ることがわかった。

そこで、どの程度の170H Δ 5P-Sを加えればよいかを検討するため、全国のスクリーニングセンターに試作品を送り、測定値を報告してもらい試みを繰り返し、妥当な濃度を定めることが出来た。こうして適当な外部標準物質をつくることに成功し、9ヶ所に試作サンプルを送った。この9ヶ所は、使う試薬は異なっているが、全ての所で、カットオフ値を越えることがわかった。この程度のもを送り、これらを正しく異常と判定しえない様な所には、カットオフ値を下げる様に指導すればよいと考えられる。こうして、外部精度管理標準検体を用いて、正確度のテストをする準備は完成したのである。

次に、現在スクリーニング施設で使われているELISAキットが、上述の如く4社5種あり、4社が異なったスタンダードを用いている。この点将来はより統一を図る必要があるが、当面、スタンダードについては、研究施設のどこかが、早くGolden Standardをつくり、これに各社のスタンダードをあわせる様にすべきだ、という見解で一致した。そして、このELISA方法の初めての研究者であり、ステロイド分析で高く評価される、昭和大薬学部辻に依頼することが最善という結論が出た。辻らは、現在世界中で市販されている、よい17OHP試薬を調べ、よいと思われるもの4~5種を購入し、元素分析、赤外、NMR、質量分析、HPLC、GC、毛細管電気泳動法でその純度を正しく把握し、国際的に決められた方法により、Golden Standardをつくる準備を開始した。

現実には、次年度に、一次標準血液濾紙も(Golden Standard)をつくることを目指している。

3. 神経芽細胞腫スクリーニングの精度管理の確立のための研究

神経芽細胞腫スクリーニングは、1988年より、HPLCを用いて、VMA・HVAを測定する様な指針が導入されている。そして、それに伴い、いくつかの注意と共に、「平均値+2.5標準偏差値以上」を異常高値とする方針が作られている。しかし、その後の研究で、HPLC法でも、一般検体の平均値が各地でばらばらであることもわかり、その他にも技術者より、多くの問題点が、学会時に報告されており、精度管理の確立の必要性が多くの人々から提唱されている。今年度は、澤田が中心となり、まず問題点の整理のための分析を中心として検討を行ってきた。

まず、このスクリーニングは、尿検体のクレアチニン(Cre)、VMA、HVAの定量が必要であるが、5種の尿サンプルを11施設で測定した結果、Creの定量には、あまり大きなバラツキはなかった。VMAがHPLC上での分離が悪く、高過ぎる値を示す所があり、11施設で最大16%の変動係数が示された。HVAは分離はよいが、やはり5種のサンプルでは、8.9~18.4%とかなり高い変動係数を示すこともわかった。

次には、24施設が同一の場所で、同一種のHPLCを用い、同一尿を分析してみた。この折にもVMAの変動係数は、極端な値を示した3施設を除いて、12.9~16.9%であった。この時の変動の原因分析で、細かい技術的な問題、カラムの変化や扱い方の乱暴さ、機器の扱いについての細かい点での不一致などが上げられ、また一般的な問題としては、不良検体についての取扱基準がきちんと決められていないことなども、データのバラツキの一つの原因としてあげられた。

この2回の経験に基づき、澤田らは会合を開いて討議した結果、早急に国内77ヶ所の施設で、統一した検体を測定することにより、精度管理を進める必要があることが確認された。そして、来年度に澤田が中心となり、同一検体を施設に送る試みが行われることとなった。また機器の日常メンテナンスについても、マニュアルをつくり、何箇所かで、このマニュアル

の是非を検討し、最終的には、全施設に基準となる案を示すようにする必要があることも確認された。また、基準物質についても、まず、一ヶ所が作製したものを、全施設で使うということが必要だという結論になっている。

尚このスクリーニングについては、全国的な精度管理の確立のために、採尿法を統一すること、あるいはHPLCを使用することに、困難を訴えている施設について、ELISAなど別の定量法を導入することの必要性についても検討されたが、今年度はまだ十分な検討が終了せず、次年度に持ち越されている。

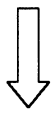
神経芽細胞腫スクリーニングについては、本格的な、全国的精度管理の確立の為には、まだいくつかの問題があることが、今年の澤田らの研究により、明らかになったと思われる。早くこれらの点を克服し、全国的精度管理の確立のための、統一した対策がとられることが望まれる。

〔謝辞〕

この課題の検討は、研究協力者の共同研究者のみでなく、全スクリーニング施設の技術スタッフ、日本マススクリーニング学会精度管理委員会、技術部会などの多くの組織、その構成員の協力によるものであり、ここに厚くお礼申し上げます。



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



1. 研究目的

今回の課題で、もっとも重要なものは、現在全国的に実施されているマススクリーニングで、全国的な精度管理が確立されていない、先天性副腎過形成症(以下 CAH と略)スクリーニングと、神経芽細胞腫スクリーニングの、精度管理の研究であり、研究目標としては、この両者のスクリーニング精度管理法の確立が最重点目的である。

それと共に、マススクリーニングの精度管理全般についても、現状を分析し、改良すべき点、あるいは問題点についての研究を行うことも一つの研究テーマとして取り上げた。

研究協力者は、次項に述べる如くであるが、目的設定、あるいは、研究方向の設定の過程の中で、多数のスクリーニング担当者、あるいは、マススクリーニングの研究者の方から、貴重な意見や、情報を頂いて来たのである。