

高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸代謝異常症マス・スクリーニング

- 2. データ処理と内部精度管理システム -

花井潤師 田上泰子 野町祥介 日浦典子 水嶋好清 尾崎恒一 藤田晃三

要 旨

札幌市において、新生児のアミノ酸代謝異常スクリーニングに、HPLCを用いたアミノ酸分析システムを導入した。アミノ酸分析マクロプログラムや内部精度管理データベースを用いたデータ処理システムにより、コントロール濾紙血や検体の測定値の変化とともに、機器のトラブルを的確に判断することが可能となり、より高精度なアミノ酸代謝異常スクリーニングの実施が可能となった。

1. 緒 言

札幌市においては、平成13年9月から島津製作所製アミノ酸分析システムを導入し、高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)を用いたアミノ酸代謝異常症スクリーニングを開始した¹⁾。本スクリーニングでは、これまで、微量ケイ光定量法(以下MFL法)による測定結果を札幌市衛生研究所スクリーニングシステム(以下、成績システム)にデータベース化し、成績発行・管理等を行ってきたが、HPLC検査法の導入に伴い、新たなデータ処理システムが必要となった。

さらに、最近、日本マス・スクリーニング学会が作成した新生児スクリーニングデータ処理システムにより、酵素免疫測定法やMFL法に関してはデータ処理と内部精度管理について整備されているが²⁾、HPLCを用いたアミノ酸代謝異常スクリーニングに関しては、これまで、内部精度管理システムについて報告されていない。

今回、アミノ酸分析システムを導入するにあたり、HPLC測定結果のデータ処理および内部精度管理に関して、新生児スクリーニングに適したデータ処理システムの構築を行ったので報告する。

2. 方法

HPLCシステムは、LC-VPアミノ酸分析システム(島津製作所製)で、カラム・試薬等はアミノスクリーン標準試薬キットとして、キット化されている。HPLC制御およびクロマトグラム処理システムとして、Class-VP(ver6.10)が装備されている。また、Excel 2000で作成されたアミノ酸分析マクロプログラムが用意されており、スケジュール作成、集計結果、内部精度管理指標、CSVテキストファイルなどが自動的に作成される。なお、当所のデータ処理および内部精度管理のため、一部、マクロを改良した。さらに、内部精度管理は上記CSVファイルを利用し、Access97でデータベース化した(図1)。

3. 結 果

3-1 アミノ酸分析マクロプログラム

アミノスクリーン専用ソフトであるアミノ酸分析マクロプログラム(2002-LC1.xls)では、「スケジュール作成」、「集計」、「CSV作成」の3つのマクロプログラムが用意されている。すなわち、「スケジュール作成」では、検体番号を設定して、Class-VP用のスケジュールファイルを書き出す。また、「集計」では、分析終了後、Class-VPで作成されたエクスポートファイルを参照してデータを取り込み、5種類の集計シート(PKU-analysis, Conc- μ M, Conc-mg, Peak Time, Peak Area)と4種類の

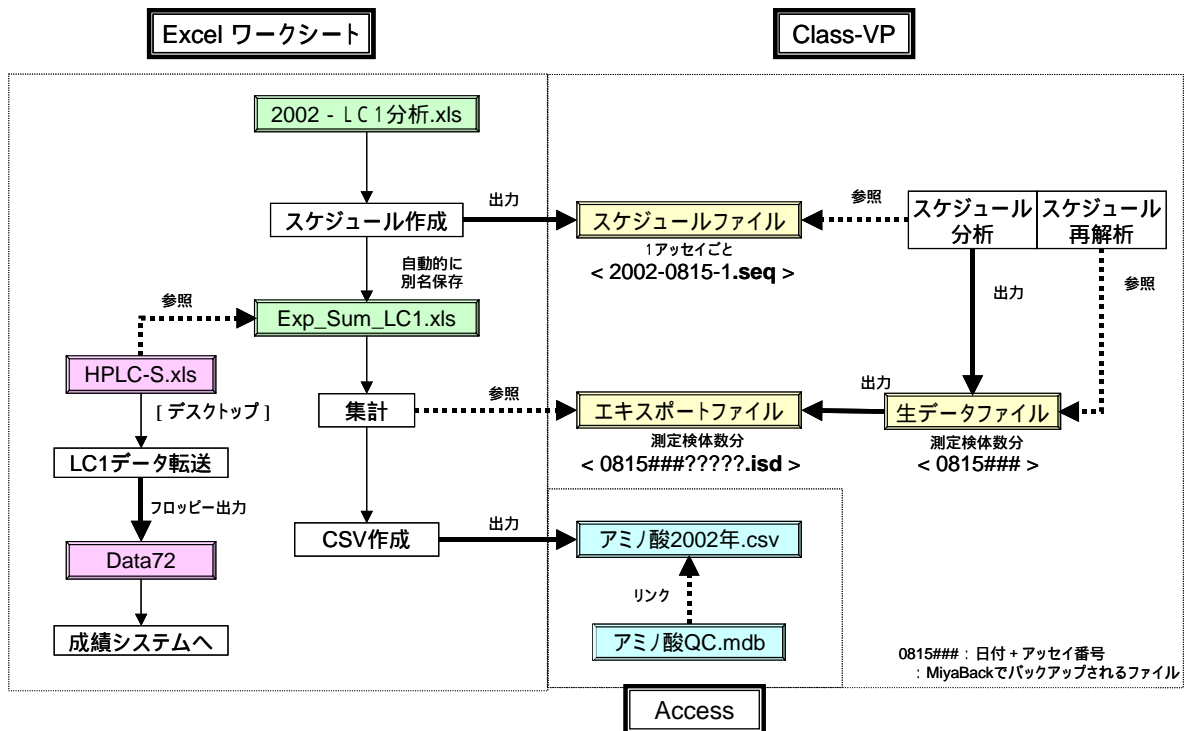


図 1. データ処理の流れとファイルの関連性

グラフ (PKU-LDA MAP, Conc-Graph, Peak Time-Graph, NLE-Graph)を自動的に作成する。このうち, Peak Time-GraphとNLE-GraphはHPLCの精度をモニタするため, 測定物質の保持時間の推移と, 内標として用いるnorleucine (NLE)のピークエリアをプロットしたものである。さらに, 「CSV作成」では, 「Conc-mg」シートのデータを元に, 標準液, コントロール, 検体の測定結果および, 初回検体の平均, 標準偏差が, CSVテキストファイル(アミノ酸2002.CSV)として出力され, データベースとして管理される。

さらに, 「Conc-mg」シートを参照して, 検査結果をテキストファイル(Data72)として出力し, 「成績システム」に転送するための Excel 97 のワークシート (HPLC-S.xls)を作成した。

3-2 内部精度管理データベース

データベースは, 上記CSVファイルをリンクテーブルとして, 内部精度管理メニュー (図2) から以下の6種類の機能を構築した。からのフォームは, 月別, 測定器別に表示する。

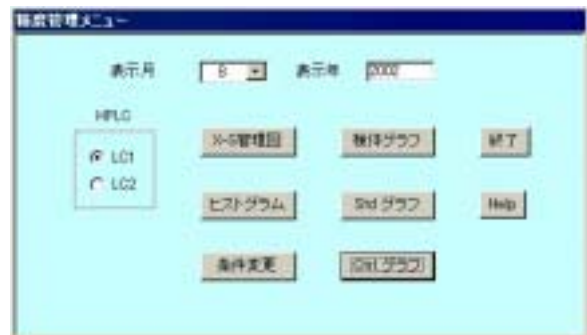


図 2. 内部精度管理メニュー

Xbar-S管理図: 測定項目であるフェニルアラニン (以下, Phe), ロイシン(Leu), メチオニン(Met)それぞれについて, 2種類のコントロールに対応した Xbar-S管理図を測定日ごとに表示, 印刷する (図3)。

検体グラフ: 初回検体について, Phe, Leu, Metの平均値を測定日ごとに表示する (図4)。

Standardグラフ: 標準液について, Phe, Leu, Met, および内部標準物質のNorleucineのピーク面積値を測定日ごとに表示する (図5)。

Controlグラフ:2種類のコントロール濾紙血について, Phe, Leu, Metの測定値を測定日ごとに表示する(図6)。

条件変更:HPLCのメンテナンスについて,日付ごと,装置別に条件変更箇所を記録する。条件は,カラム交換,カラム反転,試薬交換(試薬As,試薬Rs),抽

出液,標準液,コントロール濾紙血,内部標準物質溶液とした(図7)。

ヒストグラム:Excel97のワークシートにより,初回検査結果について,検体番号を指定し,Phe,Leu,Metおよびチロシンのヒストグラム作成し,基礎統計量を表示する(図8)。

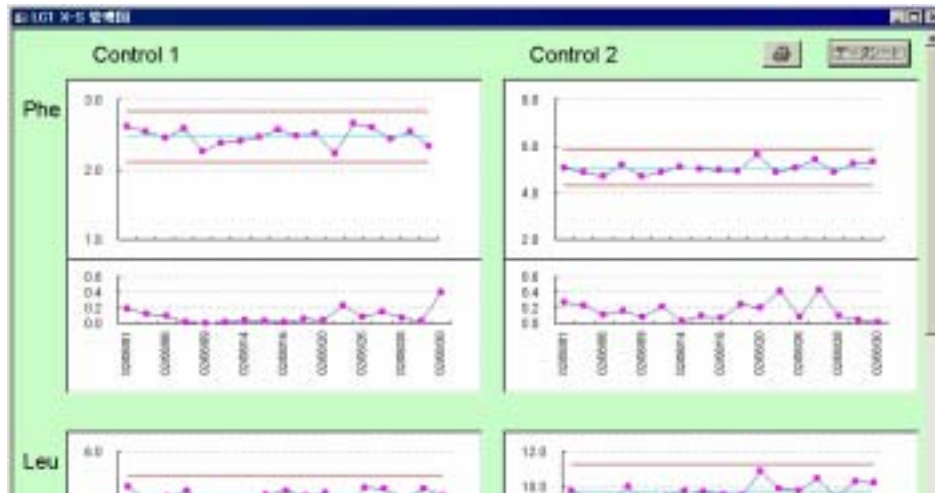


図 3. Xbar-S 管理図



図 4. 検体グラフ

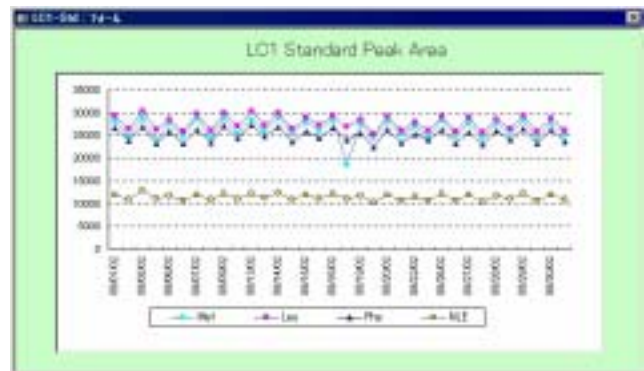


図 5. Standard グラフ



図 6. Control グラフ

条件変更

日付: 2002/07/08 条件: []

HPLC: [] Lot No.: []

訂正内容

DATE	HPLC	PARAM	LotNo.
2002/06/11	LC1	カラム交換	1022304
2002/06/03	LC1	抽出液	
2002/06/26	LC1	試薬As	25804
2002/06/13	LC1	試薬As	25454
2002/06/12	LC1	試薬As	27854
2002/06/12	LC1	試薬As	26454
2002/06/09	LC1	試薬As	27804
2002/06/08	LC1	カラム反転	2632301

変更履歴

DATE	内容	LC1	LotNo.
2002/06/11		カラム交換	
2002/06/03	抽出液		
2002/06/26	試薬As		
2002/06/13		試薬As	
2002/06/12		試薬As	
2002/06/12		試薬As	
2002/06/09		試薬As	
2002/06/08		カラム反転	

図 7.条件変更

図 8. ヒストグラム

施設名 **札幌市衛生研究所**

開始検体番号 **1** 集計

終了検体番号 **5000**

	カットオフ値	刻み幅	初期値	単位
Met	1.0	0.04	0.0	(mg/dl)
Tyr	15.0	0.40	0.0	(mg/dl)
Leu	3.0	0.15	0.0	(mg/dl)
Phe	2.0	0.10	0.0	(mg/dl)

	Met	Tyr	Leu	Phe
1	0.479	2.268	1.305	0.889
2	0.564	1.887	1.544	1.012
3	0.519	2.304	1.976	1.055
4	0.56	2.033	1.561	1.007
5	0.431	3.524	1.58	0.967
6	0.403	1.627	1.644	1.16
7	0.471	2.589	1.77	0.972
8	0.528	2.937	1.737	1.143
9	0.344	2.516	1.259	0.854
10	0.476	2.644	1.64	0.963
11	0.603	2.758	1.365	0.903
12	0.456	1.78	1.342	0.753
13	0.391	1.817	1.338	0.957
14	0.342	2.427	2.032	0.765
15	0.485	3.719	1.582	1.035
16	0.51	2.878	1.691	1.18
17	0.33	1.796	1.081	0.684
18	0.407	1.907	1.828	0.909
19	0.491	4.866	2.377	1.173
20	0.631	4.055	2.921	1.24
21	0.579	2.612	2.333	1.327
22	0.521	1.611	1.817	1.138
23	0.447	1.733	1.781	0.848
24	0.529	2.685	1.802	1.151
25	0.326	2.689	1.7	0.908
26	0.354	1.553	1.012	0.78
27	0.422	3.704	1.52	0.76
28	0.519	3.173	1.829	1.003

データ処理方法

[対象データ]
 『SUM_アミノ酸2002年.csv』に含まれる初回検体データ

[データ項目] (赤枠内で変更)
 項目名: Met, Tyr, Leu, Phe

[ヒストグラム設定デフォルト] (変更可能)
 刻み幅: Met: 0.04, Tyr: 0.40, Leu: 0.15, Phe: 0.10
 初期値: すべて0.0

[データ処理方法]
 開始と終了検体番号を入力してください。
 集計ボタンを押してください。
 『Graph』でデータを確認し、印刷処理をしてください。
 必要に応じて、初期値、刻み幅を変更することができます。
 必要に応じて、『名前を付けて保存』により別名で保存してください。

入力画面

結果画面

札幌市衛生研究所

	N	Mean	SD	初期値	刻み幅
計	4,861	3.84	3.32		
男	2,373	3.72	3.22		
女	2,488	3.97	3.42	+0.25	
計	4,861	3.52	3.11	+1.88	
男	2,373	3.42	3.02		
女	2,488	3.62	3.20		
M+3SD	1.81	81	2.14%		
M+2SD	1.32	31	0.64%		
M+1SD	1.82	71	1.46%		
M	1.84	61	1.24%		
M-1SD	1.89	76	1.56%		
M-2SD	1.31	31	0.64%		
M-3SD	1.31	31	0.64%		
Cutoff	1.00	31	0.64%		

	N	Mean	SD	初期値	刻み幅
計	4,861	3.32	3.12		
男	2,373	3.22	3.12		
女	2,488	3.42	3.12	+0.20	
計	4,861	3.11	2.91	+0.20	
男	2,373	3.11	2.91		
女	2,488	3.11	2.91		
M+3SD	0.54	76	1.56%		
M+2SD	0.84	76	1.56%		
M+1SD	0.76	71	1.46%		
M	0.76	51	1.04%		
M-1SD	0.51	26	0.54%		
M-2SD	0.51	26	0.54%		
M-3SD	0.51	26	0.54%		
Cutoff	1.00	31	0.64%		

	N	Mean	SD	初期値	刻み幅
計	4,861	1.84	1.47		
男	2,373	1.84	1.47		
女	2,488	1.84	1.47	+0.21	
計	4,861	1.54	1.21	+0.33	
男	2,373	1.54	1.21		
女	2,488	1.54	1.21		
M+3SD	0.89	81	1.64%		
M+2SD	1.01	31	0.64%		
M+1SD	1.42	31	0.64%		
M	1.42	51	1.04%		
M-1SD	1.01	26	0.54%		
M-2SD	0.89	26	0.54%		
M-3SD	0.89	26	0.54%		
Cutoff	1.00	31	0.64%		

	N	Mean	SD	初期値	刻み幅
計	4,861	7.12	6.62		
男	2,373	7.12	6.62		
女	2,488	7.12	6.62	+0.20	
計	4,861	7.40	6.87	+0.27	
男	2,373	7.40	6.87		
女	2,488	7.40	6.87		
M+3SD	5.13	81	1.64%		
M+2SD	6.02	81	1.64%		
M+1SD	6.81	76	1.56%		
M	6.81	76	1.56%		
M-1SD	5.92	51	1.04%		
M-2SD	5.03	26	0.54%		
M-3SD	4.14	26	0.54%		
Cutoff	15.00	31	0.64%		

41

3-2 バックアップ

HPLC生データやデータベース等は、パソコン等の不意のトラブルなどによるデータの消失を避けるため、定期的にバックアップを取る必要がある。今回、データ処理システムの構築にあたり、Windows NT上で動作可能で、ファイルの圧縮保存、世代管理の可能なフリーソフト「みやばっく - [簡単バックアップ]」を利用し、外部接続したMOドライブに定期的にバックアップを行うこととした。対象となるファイルは、Class-VP関連として、HPLC生データファイル、スケジュールファイル、データベース関連として、アミノ酸CSVファイル、データベース「アミノ酸QC.mdb」、並びに、集計ファイルである(図1中、マークのあるファイル)。

4. 考 察

新生児スクリーニングにおいては、「新生児マス・スクリーニング検査システムの手引き」の中で、「新生児スクリーニング検査実施機関における精度管理指針(案)」が示され、統計的精度管理の考え方や方法が提示されている。

これまで、アミノ酸代謝異常スクリーニングは、ガスリー法からMFL法を経て、HPLC法が導入されてきているが、HPLCを用いる分析においては、内部精度管理の指標は生化学的検査法と必ずしも同一に扱えない場合がある。特に、数種類の機器を組み合わせたHPLCにおいては、トラブルの種類が多岐にわたることから、それらに対応した新たな指標が必要であった。

今回導入したLC-VPアミノ酸分析システムにおいて、集計マクロプログラムに用意されているPeak Time-GraphとNLE-Graphは、HPLCのトラブルを的確に指摘することが可能である。すなわち、Peak Time-Graphでは温度制御、ポンプの液漏れなどが確認でき、NLE-Graphでは検出器の感度変化、カラムの劣化、蛍光試薬の劣化などが確認できる。

さらに、新たに作成したデータベースでは、Xbar-S管理図の他に、標準液やコントロールの測定値の変化を確認できるとともに、種々のメンテナンスを行った履歴を記録して、内部精度管理指標の変化の原因を推定する際の参考としている。

以上の内部精度管理はいずれも検査後の変化により、精度を確認することになるが、実際には、日々の機器の変化や状態をチェックすることが基本であり、クロマトグラムを検体ごとにチェックし、細かな変化を見逃さないような目を養う必要がある。その上で、上記、内部精度管理指標を確認することで、本来、HPLCが備えた精度の高い分析結果を得ることが可能になる。

5. 結 語

札幌市におけるアミノ酸代謝異常スクリーニングに、HPLCを用いたアミノ酸分析システムを導入した。HPLCを用いたスクリーニングにおける内部精度管理では、コントロール濾紙血や検体の測定値とともに、機器のトラブルを的確に判断できる指標が必須であり、今回構築した集計マクロプログラムや内部精度管理データベースを用いたデータ処理システムにより、高精度なアミノ酸代謝異常スクリーニングの実施が可能となった。

文 献

- 1) 田上泰子, 野町祥介, 花井潤師, 他: 高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸代謝異常スクリーニング - 1. 検査法の変更にとまなう基礎検討 -, 札幌市衛研年報, 29, **-**, 2002
- 2) 日本マス・スクリーニング学会編, 新生児マス・スクリーニング検査システムの手引き: 日本マス・スクリーニング学会誌, 8, Supplement 2, 1998.

Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism of Amino Acids using HPLC

2. Data Processing System and Internal Quality Control

Junji Hanai, Yasuko Tagami, Shosuke Nomachi, Noriko Hiura,
Yoshikiyo Mizushima, Tsuneichi Ozaki, and Kozo Fujita

In Sapporo City, high performance liquid chromatography (HPLC) system was introduced to measure amino acids in mass screening for inborn errors of metabolism. Data processing system (Shimadzu Co. Ltd.) consisted of a managing HPLC system, chromatographic data processing and summary worksheet. We established a new system for an internal quality control (QC) of amino acids measurement in connection with the summary worksheet. Our QC system includes X bar S control chart, histogram, Standard graph, Control graph, and maintenance checklist. Monitoring control data, standard data and so on, our data processing system made the screening more precise.