

「GC-MSによる尿中有機酸分析に関する提言と推奨」（2022年5月）

一般社団法人日本医用マススペクトル学会・化学診断委員会

[背景]

1 診療報酬改正における「尿中有機酸分析」検査の位置付

1-1 令和2年度診療報酬改正での特殊検査項目の変更は以下の通りです。

「8 先天性代謝異常症検査

- イ 尿中有機酸分析 1,141 点、
- ロ 血中極長鎖脂肪酸 1,141 点、
- ハ タンデムマス分析 1,141 点、
- ニ その他 1,141 点

注1 イ、ロ及びハについては、別に厚生労働大臣が定める施設基準に適合しているものとして地方厚生局長等に届け出た保険医療機関において行われる場合に、患者1人につき月1回に限り算定する。

注2 ニについては、別に厚生労働大臣が定める施設基準に適合しているものとして地方厚生局長等に届け出た保険医療機関において、当該保険医療機関内で検査を行った場合に、患者1人につき月1回に限り算定する。」

1-2 日本先天代謝異常学会社会保険委員会窪田満委員長の解説は以下の通りです。

「尿中有機酸分析、血中極長鎖脂肪酸、タンデムマス分析は、『小児科を標榜している小慢の指定医の常勤医が1名以上いる病院』で検体採取されれば、民間検査会社を含め、どこで検査をしても1,141点算定できるということになりました。

これは、闇雲に高額な検査が提出されるのを防ぐため、検査する側のハードルは下げましたが、検体採取側の病院のハードルを上げたということです。対象疾患がすべて小慢疾患であり、整合性はあると思います。」（日本先天代謝異常学会 HP 「おしらせ」 2020年03月17日）

2 化学診断委員会の取り組み

上記のように、「尿中有機酸分析」検査を実施する検査機関の要件については明記されなくなりました。

一方、ヨーロッパを中心に海外では、このような特殊臨床検査を実施する検査機関については、権威ある認証機関からの検査品質認証を受けることが求められています。先天代謝異常症の有機酸分析については、ヨーロッパでは ERNDIM (European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism)、北米では CAP (College of American Pathologists) が認証の役割を担っています。

我が国には上記のような権威ある認証機関はないため、尿中有機酸分析による化学診断を創設期より研究してきた日本医用マススペクトル学会としては、我が国でこのような特殊検査を実施する医療機関や登録衛生検査所に対して、海外の認証機関の認証事業に参加することを推奨し、会員に対して ERNDIM 認証の詳細を紹介することで参加を支援いたします。

[ERNDIM 尿中有機酸分析]

1. ERNDIM の尿分析精度管理スキーム (scheme) の選択

主に3コースがあります。

(1) 尿有機酸定性 Qualitative Organic Acids (urine) scheme : QLOU、年間6検体、2回報告

(2) 有機酸定量 Quantitative Organic Acids (urine) scheme : QTOU、年間8検体、8回報告

(3) 診断技能評価 Diagnostic Proficiency Testing (urine) scheme の有機酸項目 : DPT 年間6検体、2回報告

(注 : アメリカ病理学会 CAP のサーベイ「biochemical genetics survey」にも有機酸技能評価 Proficiency testing 項目があり、ERNDIM(3)の DPT と似ています。)

「尿有機酸定性スキーム」では、新規疾患を含め多様な有機酸代謝異常症の患者尿が配布されます。

ERNDIM 精度管理実施の専門家委員には、世界の第一線で活躍している先天代謝異常症の研究者が多く、ヨーロッパを中心とした世界の先天代謝異常症症例登録ネットワークがあるため、精度管理検体が多様です。また、分析技術だけでなく、病態の理解も重視されます。

新規疾患の検体がいち早く精度管理検体として使用される傾向があり、日本ではあまり見つかからない疾患や、あるいは最近の論文で報告された新疾患の患者尿も使用されるので、これらの疾患名、代謝物名に関する知識を事前に得ておく必要があります。

新疾患が報告されると、3年以内に管理検体に導入されることが多いです。

たとえば、2018年の精度管理検体として Mitochondrial short-chain enoyl-CoA hydratase deficiency (ECHS1D)患者の尿が配布され、尿中 2-methyl-2,3-dihydroxybutyric acid (23DH2MB)の増加が診断マーカーでした。

2020年には Combined malonic and methylmalonic aciduria (CMAMMA)の検体があり、malonic and methylmalonic acid の同時軽度増加が特徴でした。

2021年には Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency 検体があり、3-O-methyl-dopa(3-OMD)、Vanillic acid(VLA) , Acetylvani alanine の増加と Homovanillic acid(HVA), Vanillylmandelic acid (VMA) 低下が病態解析のポイントでした。また2021年 ERNDIM シンポジウムの発表では、新しく幅広い尿有機酸プロファイル解析による Transport and golgi organization protein 2 (TANGO2) deficiency、Aminoacylase 1 deficiency、3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coa synthase-2 deficiency、PEPCK deficiency の管理検体も登場しました。

これらの新規疾患患者尿の分析では、尿有機酸プロファイル解析により化学診断名の可能性を提示でき、「確定診断は遺伝子解析が必要である」と指摘することで精度管理評価は合格となります。したがって、有機酸定性スキームへの参加は難度が高いですが、日頃体験できない稀の疾患の診断を経験でき、また参加による診断データベースの拡大が可能です。

因みに、このスキームでの結果報告方法は以下の通りで、指定期間中に Web 上にアップロードします。

<第1ステップ> 可能性のある診断名に関連した各成分の正常 or 増加 or 低下を判定し、選択します。(注 : クレアチニン補正した成分濃度値は必須ではありません。)

<第2ステップ> 定量結果に基づいて最も疑わしい病名や鑑別診断すべき疾患名を記入します。

<第3ステップ> 確定診断のために必要な確認検査方法を記入します。

<第4ステップ> 一般臨床医師に対して、示唆される代謝異常症について病態および治

療法に関する簡明なアドバイスを記入します。

<第5ステップ> 定性解析した TIC クロマトグラムチャートや成分データリスト（註：後者は省略可）をアップロードします。

「有機酸定量スキーム」は、日常の分析対象有機酸の定量精度を評価するものであり、2022年の分析対象有機酸は表1の26成分とクレアチニンです。これらが測定出来る検査機関がこのスキームに参加出来ます。「尿有機酸定性スキーム」ではこれら26成分よりも多くの有機酸の分析をする必要がありますので、この「有機酸定量スキーム」の26成分分析は「尿有機酸定性スキーム」参加の必要条件といえます。

表1 有機酸定量スキームの分析対象有機酸

1. 2-Methylcitric acid	10. 3-Methylglutaric acid	19. 3-OH-Glutaric acid
2. 4-OH-Butyric acid	11. Ethylmalonic acid	20. Hexanoylglycine
3. Methylmalonic acid	12. Pyro glutamic acid	21. Suberylglycine
4. 2-OH-Glutaric acid	13. 3-OH-3-Methylglutaric acid	22. 3-OH-Isovaleric acid
5. Adipic acid	14. Fumaric acid	23. Isovalerylglycine
6. Mevalonic acid	15. Sebacic acid	24. Tiglylglycine
7. 3-Methylglutaconic acid	16. 3-OH-Butyric acid	25. 3-OH-Propionic acid
8. Creatinine (mmol/L)*	17. Glutaric acid	26. Keto-glutaric acid
9. N-acetylaspartic acid	18. Suberic acid	27. Vanillactic acid

（註：*Creatinine (mmol/L)濃度は、ウレアーゼ法の場合はGC-MSで測定出来るが、有機溶媒抽出法の場合は別法で測定する）

「診断技能評価スキーム」では、診断対象疾患が広範囲であり、有機酸代謝異常症以外の試験検体も含まれます。有機酸分析だけの参加は、参加記録に残りますが、最終的に認証証明書は得られない点で注意が必要です。一方、アメリカのCAPでは、有機酸分析だけの参加でも認証が得られます。

2. GC-MS の分析条件

参加施設内有機酸ルーチン分析条件での参加となります。ルーチン検査法での有機酸分析結果の精度が評価されます。

これまでの参加施設では、サンプル処理法として有機酸のみ分析する有機溶媒抽出法、またはメタボローム解析に使用するウレアーゼ処理法（ウレアーゼ法）が行われています。

（註1：このスキーム自体は、有機溶媒抽出法が想定されており、主催ラボでは有機溶媒抽出法で検体管理を行っています。ウレアーゼ法での参加者は、有機酸以外にアミノ酸、糖質の測定値も加えて正確に病態判断できるメリットがあります）

（註2：誘導体化法については、基本TMS化のみで行われています。しかし、succinylacetone等のケト酸についてはオキシム化する必要があります）

GC-MS分析条件では、カラム、サンプル導入法、昇温条件の指定はなく、スキャンモードでの測定が主流です。

(註：一般的には、DB5 系カラムを使用し、注入部はスプリットモード、60℃から 320℃の昇温分析、分析時間は施設により様々で、16 分、18 分、22 分、30 分、60 分です。分析対象物の分離状況などに併せて複数の分析を行う施設もあります)

代謝物(有機酸)の同定は、GC-MS 装置のアプリケーションを用いて、通常、保持時間(RT)、定量イオン(Q-ion)、参照イオン(I-ion)に基づく自動判定でなされますが、自動で同定されないピークの可能性もふまえ、必ずマススペクトルも確認し、判定ミスを防ぐ必要があります。

3. ERNDIM 参加のメリット

有機酸定性スキームの参加は難度が高いですが、日頃体験できない稀な疾患の診断を経験することができ、データベースの拡大も可能です。

ERNDIM スキームの参加者は、ERNDIM が主催する教育セミナーや年一回のシンポジウムへの参加が可能です。研究者と技術者の養成、知識の拡張および世界トップレベルの専門家との交流もできるメリットがあります。

4. ERNDIM 参加の問題点

国外の精度管理ですので ERNDIM スキームの参加には下記の点で対応が必要です。

①Web での参加申し込みや報告、メールのやりとりはすべて英語になります。ただし、ビジネス英語ですので、Web の機械翻訳(Google 翻訳)でも十分対応できます。

②ERNDIM 組織運営システムの改修は比較的頻度が高く、システム対応にやや時間を要します。

(註：会員登録、結果報告法、結果評価法などでの改修が行われてきています)

③参加費は米ドルかユーロですが、年々少しずつ値上げされています。

④参加検査施設数が増えてきたため、新規参加施設が制限されています。また、昨年からは尿有機酸定性スキームでの検体数が、それまでの9検体から6検体と少なくなりました。今後は、日本やアジア諸国の検査施設を対象とした本学会主導の「ERNDIM」を立ち上げるべきかもしれません。

文責 化学診断委員会委員長 重松陽介 (協力 同副委員長 張春花、同委員 山口清次)