

ESI-MS/MS法による新生児代謝異常マス・スクリーニング パイロットスタディ

(分担研究：新しい対象疾患に関する研究)

重松陽介**、眞弓光文**、須藤正克*

要約：平成9年4月より、ESI-MS/MS法による新生児代謝異常マス・スクリーニングパイロットスタディを、福井県下のマススクリーニング関係医療機関、及び他府県関連医療機関の協力を得て、同意書取得を前提に、開始した。対象疾患は、当初、アシルカルニチン分析により診断可能と考えられる有機酸・脂肪酸代謝異常症、及び8アミノ酸代謝異常症を設定した。その後、ESI-MS/MS法の分析モードの追加により、測定アミノ酸数を増やすことが可能であったので、高アンモニア血症を呈するアミノ酸代謝異常症の診断の可能性を検討している。また、対象疾患と診断された患者の新生児ろ紙血をさらに収集し分析した。これまで約1万検体をスクリーニングしたが、対象疾患を有する患者は見出しえていない。これら頻度が非常に低い対象疾患について、その診断の精度や有用性を確認するために、検体処理能力を向上すべく機器や測定法をさらに改良しているところである。

見出し語：有機酸、アミノ酸、マススクリーニング、タンデムマススペクトロメトリー

〔緒言〕タンデム型質量分析法（MS/MS分析）とは、イオン化されて導入された物質を質量分析計内部で断片化させ、その断片化の特徴を利用して特定の物質を特異的に高感度で分析する手法である1)-2)。近年実用化されたエレクトロスプレーイオン化法（ESI）との組み合わせにより、多検体自動分析が可能となり、ESI-MS/MSによる新生児ろ紙血の分析が代謝異常症マススクリーニングの有力な手段として注目されている。昨年度、我々は有機酸代謝異常症診断を中心にESI-MS/MS法の検討を行い、その有用性を確認し、本年度から福井県を中心にパイロ

ットスタディを開始した。このパイロットスタディの中で、更に分析法の改良を行い、特にアミノ酸分析において測定対象アミノ酸を増やすことが出来、また、多検体処理の点での改善も行った。これらの検討を踏まえ、約1万検体のスクリーニングの結果、並びに対象疾患の選択と診断精度の問題点について報告する。

〔対象と方法〕福井県においては、1997年6月より、福井県衛生研究所や産科医師をはじめ関係機関の協力を得て、書面による説明と同意を得られた新生児

福井医科大学*、小児科**、(Department of Pediatrics, Fukui Medical School)

について現行の血液濾紙を本パイロットスタディに使用している。また、他府県で協力を得られる医療機関においても、1997年4月頃より、同様に文書による説明と同意を得られた新生児について、別途血液濾紙を作成し、分析を行っている。

使用した内部標準は、重水素標識アシルカルニチンについては当施設で合成し、安定同位体標識アミノ酸は、Cambridge Isotope Laboratories あるいは CDN Isotopesから購入した。

血液ろ紙はパンチで径1/8インチに1個切り出し、96穴マルチウエルプレートに入れ、内部標準を含むメタノール溶液110 μ lを加え、攪拌抽出を行い、抽出液は窒素気流で乾涸後ブチル化し、50%アセトニトリル溶液80 μ lに再溶解し、オートインジェクタ用のサンプルバイアルに移し測定する。

質量分析計はサーモクエスト社製TSQ7000で、heated capillary、ESIおよびオートインジェクタの条件は昨年度の報告書通りであるが、移動相は50%アセトニトリル溶液（流速15 μ l/min）とした。サンプル注入量は20 μ lで、約4分間隔の自動注入である。

MS/MS分析は、Table 1 に示したように、現在12種類の分析モードを順に切り替えて行っている。

分析は1サンプル毎にオートインジェクタでのスタート信号に同期させて開始し、分析データは2.5分

間サンプル毎に1つのデータファイルとして記録される。記録されたデータは、自動処理プログラムにより、サンプルピーク出現にあわせて15スキャン分のスペクトルが積算され、各イオンの強度値として保存され、定量に利用される。この積算イオン強度値は、MS/MS制御用DEC社製ワークステーションにネットワーク接続されたApple社製コンピュータに移され、Microsoft Excel[®]のマクロプログラムで数値化され、診断判定が行なわれる。

判定は、アシルカルニチンについては、それぞれの診断特異的アシルカルニチンの内部標準を利用した定量値と、それを更にアセチルカルニチン値で除した比を用い、暫定的に平均値+3SDをカットオフ値として行っている。アミノ酸については、パンチアウトの血液濾紙1個に含まれる血液を3 μ lとし内部標準を用いて定量し、それぞれのアミノ酸について、文献値などを参考にして暫定的なカットオフ値を設定し、判定している。

[結果と考察]

昨年度に引き続き患者の新生児ろ紙血を分析した。

アシルカルニチン分析では、Fig1に示したように、multiple carboxylase欠損症のうち、ピオチン反

Table 1 Multi-mode scanning in ESI-MS/MS for neonatal mass screening

Order	Scan mode	Range (m/z)	Time (s)	Target substances
1	precursor ion scan (product ion: m/z 85)	250-500	2.0	Acylcarnitines
2	precursor ion scan (product ion: m/z 41)	129-136	0.2	Gly
3	neutral loss scan (neutral loss: m/z 102)	129-270	1.0	Gly, Ala, Val, Leu+Ile, Phe, Tyr
4	neutral loss scan (neutral loss: m/z 119)	186-213	0.2	Orn+Asn, Gln+Lys
5	neutral loss scan (neutral loss: m/z 136)	203	0.4	Lys
6	neutral loss scan (neutral loss: m/z 145)	201-214	0.1	Met
7	neutral loss scan (neutral loss: m/z 161)	231	0.1	Arg
8	neutral loss scan (neutral loss: m/z 163)	233	0.1	¹³ C ₆ -Arg(I.S.)
9	neutral loss scan (neutral loss: m/z 162)	232	0.1	Citr
10	neutral loss scan (neutral loss: m/z 115)	189	0.2	Asn
11	neutral loss scan (neutral loss: m/z 73)	198-213	0.4	Gln
12	product ion scan (precursor ion: m/z 459)	139-177	0.2	ASA

応答は正常範囲内であり、軽症と考えられる症例では、診断特異的な3-hydroxyisovaleryl carnitineが増加して診断可能であったが、軽症のbiotinidase欠損症ではこのアシルカルニチンは増加しておらず、診断できなかった（ただし、この症例の尿中有機酸は分析していない）。また、濾紙尿GC/MSスキャンによる遊離カルニチンの定量は、マロン酸尿症（良性メチルマロ酸尿症）でも濾紙尿propionylcarnitineはカットオフ値以上には増加しておらず、診断は出来なかった。

なお、診断にはアセチルカルニチンによる補正值と未補正值を併用した。propionylcarnitineの判定には補正值の方が優れている印象であるが、その他のアシルカルニチンについても、更に多くの患者濾紙尿で確認する必要がある。また、MCD患者の血清アシルカルニチン値の偏りが強調される傾向があるため、スクリーニングには有利とも考えられる。

CPT1欠損症では遊離カルニチンが増加するので、その診断のためには遊離カルニチンを測定する必要があるが、現在の前処理法ではその定量は困難と考えられ、今後の検討課題とした。

アミノ酸分析では、Fig. 2に示す(119のneutral loss scanning)によるシトルリン血症患者の濾紙尿のシトルリンの定量は、¹³C標識アルギニンを内部標準として、より高感度な分析モードを組み合わせることで、一部の高アンモニア血症など、シトルリンが減少する可能性があるような病態では有用であろうと考えている。ただし、アルギニンとシトルリンは構造が類似しているとはいえ、標識シトルリンを内部標準とした場合に比べ精度が劣ると考えられるので、¹³C標識シトルリンの合成も考慮している。

現在までに約十萬検体をスクリーニングしたが、患者は見出し得ていない。チロシン高値 (300nmol/

ml以上) の検体が数%の割合で存在したが、その最終診断については検討していない。グリシン高値の検体も1%弱存在したが、アシルカルニチン異常により有機酸代謝異常症が疑われる場合のみ再検査とした。対象疾患の頻度は極めて低いので、今後は更に処理検体数を増やす方向で機器や前処理法の改良を検討していく予定

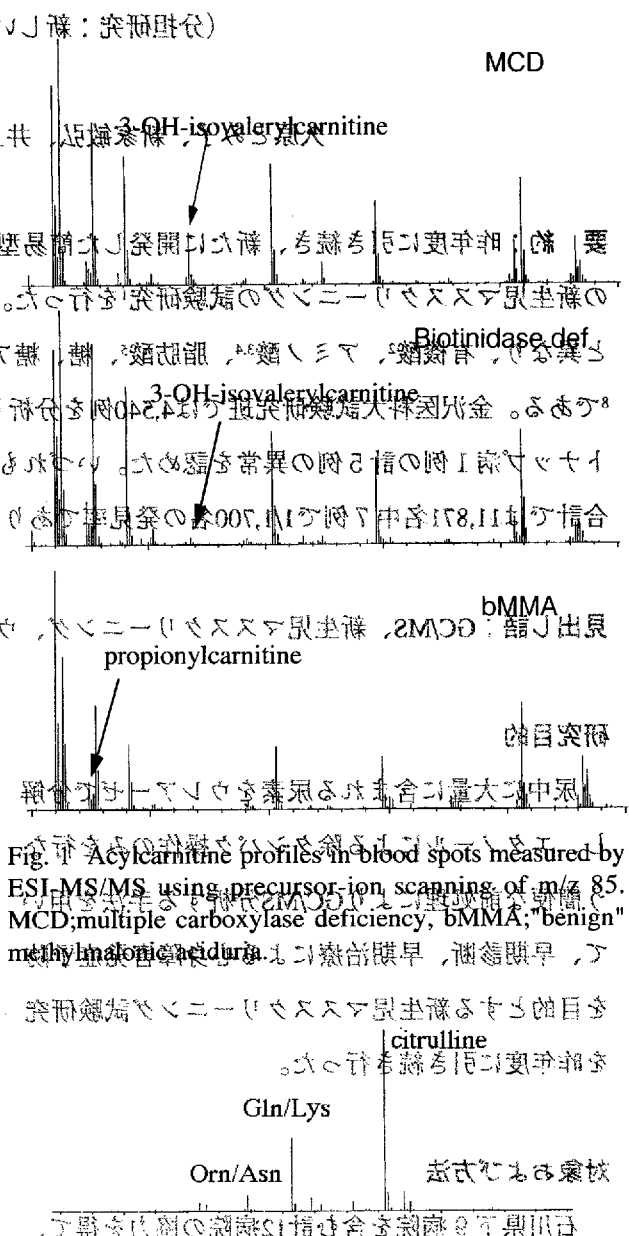


Fig. 1 Acylcarnitine profiles in blood spots measured by ESI-MS/MS using precursor-ion scanning of m/z 85. MCD; multiple carboxylase deficiency, bMMA; "benign" methylmalonic aciduria.

Fig. 2 Amino-acid profile in a blood spot of a newborn with citrullinemia, measured by ESI-MS/MS using neutral loss scanning of m/z 119.



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



要約:平成 9 年 4 月より、ESI-MS/MS 法による新生児代謝異常マス・スクリーニングパイロットスタディを、福井県下のマススクリーニング関係医療機関、及び他府県関連医療機関の協力を得て、同意書取得を前提に、開始した。対象疾患は、当初、アシルカルニチン分析により診断可能と考えられる有機酸・脂肪酸代謝異常症、及び 8 アミノ酸代謝異常症を設定した。その後、ESI-MS/MS 法の分析モードの追加により、測定アミノ酸数を増やすことが可能であったので、高アンモニア血症を呈するアミノ酸代謝異常症の診断の可能性を検討している。また、対象疾患と診断された患者の新生児ろ紙血をさらに収集し分析した。これまで約 1 万検体をスクリーニングしが、対象疾患を有する患者は見出しえていない。これら頻度が非常に低い対象疾患について、その診断の精度や有用性を確認するために、検体処理能力を向上すべく機器や測定法をさらに改良しているところである。