

簡易型ウレアーゼ処理法を用いた先天代謝異常症の診断支援の自動化と  
新生児マススクリーニング試験研究  
(分担研究：新しい対象疾患に関する研究)

久原とみ子、新家敏弘、井上義人、彭海、木下邦則、松本勇

**要約：**昨年度に引き続き、新たに開発した簡易型ウレアーゼ処理GC/MS分析法を用いた先天性代謝異常症の新生児マススクリーニングの試験研究<sup>1</sup>を行った。この方法は従来の有機酸代謝異常症のスクリーニングと異なり、有機酸<sup>2</sup>、アミノ酸<sup>3,4</sup>、脂肪酸<sup>5</sup>、糖、糖アルコール、核酸塩基類<sup>6,7</sup>を一斉分析できる画期的な手法<sup>8</sup>である。金沢医科大試験研究班では4,540例を分析し、メチルマロン酸尿症1例、シスチン尿症3例、ハートナップ病1例の計5例の異常を認めた。いずれも発症前診断であった。発見率は1/900人で、4試験機関<sup>9</sup>合計では11,871名中7例で1/1,700名の発見率であり、心身障害発症予防に有効な方法と考える。

**見出し語：**GC/MS、新生児マススクリーニング、ウレアーゼ処理法、濾紙尿分析

**研究目的**

尿中に大量に含まれる尿素をウレアーゼで分解し、エタノールによる除タンパク操作のみを行なう簡便な前処理によりGC/MS分析する手法を用いて、早期診断、早期治療による心身障害発症予防を目的とする新生児マススクリーニング試験研究を昨年度に引き続き行った。

**対象および方法**

石川県下9病院を含む計12病院の協力を得て、

平成7年4月より平成10年1月までに新生児尿4,540検体を分析した。採尿日はガスリーテスト採血日と合わせた。

アドバンテック社製U-5濾紙(3x7cm)に吸着させ、室温乾燥後送られてきた濾紙尿を1mlのイオン交換水で再溶出し、その溶出尿0.1mlを分析試料とした。

溶出尿0.1mlにウレアーゼ(Sigma, urease type C-3) 30Uを加え、37℃で10分間インキュベートして尿素を分解した。内部標準物質として重水素標識 D<sub>3</sub>

---

金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学研究部門生化学

ークレアチニン (100nmol)、D<sub>2</sub>-グリシン (40nmol)、D<sub>3</sub>-ロイシン (20nmol)、D<sub>3</sub>-メチオニン (20nmol)、D<sub>5</sub>-フェニルアラニン (20nmol)、D<sub>4</sub>-チロジン (20nmol)、D<sub>8</sub>-シスチン (40nmol)、D<sub>8</sub>-ホモシステイン (40nmol)、D<sub>4</sub>-リジン (40nmol) およびヘプタデカン酸 (50nmol) を加えた後、エタノールを加えて (90%飽和) 遠心除タンパクし、上清を減圧下濃縮乾燥し、窒素気流下で乾燥の後、BSTFAとTMCS (10:1) 100 $\mu$ lを加えて80 $^{\circ}$ Cで30分間加熱してトリメチルシリル化しその1 $\mu$ lをスプリット法 (1:10~1:40) にてGC/MS分析した。

GC/MSは卓上型四重極型質量分析計を用いた。分析用カラムには5% phenylmethylsilicone キャピラリーカラム (0.25mm $\times$ 30m $\times$ 0.25 $\mu$ m) を用いた。分析温度条件は60 $^{\circ}$ C (一部では125 $^{\circ}$ C) から325 $^{\circ}$ Cまで16 $^{\circ}$ C/minの昇温分析を行った。

#### 結果および考察

我々は20年前からGC/MS分析なしには診断が困難な先天代謝異常症のハイリスク児に対する全国的な診断支援を行ってきた。今回、尿の試料調製法を改良、簡略化し、6生月時に施行する神経芽細胞腫を除く21疾患の新生児マススクリーニング・パイロットスタディーを石川県下の4,540名の新生児を対象として行った。

スクリーニングの結果、1) メチルマロン酸尿症1例、2) ハートナップ病1例、3) シスチン尿症8例、4) 新生児一過性ガラクトース高排泄89名、5) 新生児一過性チロジン症15名で、異常を認めたのは合計114例、全体の2.5%であった。このうち、1) と2) については全て再現性を確認、3) については8例中3例に再現性を確認し

たので、代謝異常は計5例で、5/4,540即ち1/900人の発見率であった。早産あるいはSFDの占める割合は5) で80%と高く、p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase活性の日令による急激な変化 (上昇) を改めて裏付けるものであった。4 試験機関全体では11,871名を対象とし、シトルリン血症、glycerol尿症を含む計7例を発見したので1/1,700名の発見率であった。

装置の特性や施設による差を排除した自動診断支援システムの確立には前処理の自動化、定量の自動化、化学診断の自動化の必要性があり、現在最終的な調整を行っている。

#### 文献

1. T. Kuhara, T. Shinka, Y. Inoue, M. Matsumoto, C. Zhang, C. Ning, T. Furumoto, I. Matsumoto: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry - Rapid, practical, simultaneous urinary metabolites analysis -. Proceeding of the 3rd International Society for Neonatal Screening in press (1996)
2. K. Ihara, R. Kuromaru, Y. Inoue, T. Kuhara, I. Matsumoto, M. Yoshino, J. Fukushige: An asymptomatic infant with isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency detected by newborn screening for maple syrup urine disease. Eur. J. Pediatr. 156: 713-715 (1997)
3. H. Miyajima, K.E. Orii, Y. Shindo, T. Hashimoto, T. Shinka, T. Kuhara, I. Matsumoto, H. Shimizu, E. Kaneko: Mitochondrial trifunctional protein deficiency associated with recurrent myoglobinuria

- in adolescence. *Neurology* 833-837 (1997)
4. C. Ning, T. Kuhara, I. Matsumoto: Simultaneous metabolic profile studies of three patients with fatal infantile mitochondrial myopathy-de Toni-Fanconi-Debre syndrome by GC/MS. *Clin. Chim. Acta* 247: 197-200 (1996)
  5. C. Ning, T. Kuhara, Y. Inoue, C. Zhang, M. Matsumoto, T. Shinka, T. Furumoto, K. Yokota, I. Matsumoto: Gas chromatographic-mass spectrometric metabolic profiling of patients with fatal infantile mitochondrial myopathy with de Toni-Fanconi-Debre syndrome. *Acta Paediatrica Japonica* 38: 661-666 (1996)
  6. 久原とみ子、新家敏弘、井上義人、彭海、松本雅裕、張春花、寧聡、古本正、松本勇：脂肪酸、アミノ酸、糖、核酸塩基代謝異常症例の化学診断。 *Proc. Jap. Soc. Biomed. Mass Spectrom.* Vol. 22: 119-124 (1997)
  7. K. Suzuki, S. Kobayashi, K. Kawamura, T. Kuhara, R. Tsugawa: Family Study of 2, 8-dihydroxyadenine stone formation: report of two cases of a compound heterozygote for adenine phosphoribosyltransferase deficiency (APRT\*J/APRT\*Q0). *Int. J. Urol.* 4: 304-306 (1997)
  8. I. Matsumoto, T. Kuhara: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry - Rapid, practical, simultaneous urinary metabolites analysis -. *MS Review*, Vol. 15, No. 1: 43-57 (1996)
  9. 久原とみ子、新家敏弘、吉田一郎、猪口孝洋、山口清次、高柳正樹、青木菊麿、福渡靖、松本勇：試験研究報告：GC/MSを用いる

化学診断法の新生児マススクリーニングへの  
 応用。 *Proc. Jap. Soc. Biomed. Mass Spectrom.*  
 Vol. 22: 63-66 (1997)



## 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:昨年度に引き続き、新たに開発した簡易型ウレアーゼ処理 GC/MS 分析法を用いた先天性代謝異常症の新生児マススクリーニングの試験研究 1 を行った。この方法は従来の有機酸代謝異常症のスクリーニングと異なり、有機酸 2、アミノ酸 3.4、脂肪酸 5、糖、糖アルコール、核酸塩基類 6.7 を一斉分析できる画期的な手法 8 である。金沢医科大試験研究班では 4,540 例を分析し、メチルマロン酸尿症 1 例、シスチン尿症 3 例、ハートナッブ病 1 例の計 5 例の異常を認めた。いずれも発症前診断であった。発見率は 1/900 人で、4 試験機関 9 合計では 11,871 名中 7 例で 1/1,700 名の発見率であり、心身障害発症予防に有効な方法と考える。