

FAB-MS/MS法による有機酸代謝異常症の出生前診断と 新生児マススクリーニングの検討

(分担研究：マススクリーニングの新しい対象疾患と

その実施年齢およびスクリーニング法に関する研究)

重松陽介、 須藤正克

要約： FAB-MS/MS法を用いると、正常対照を含め羊水中のacylcarnitine及びacylglycine濃度が高感度で測定出来、イソ吉草酸血症の出生前診断が可能であった。この方法の感度であれば他の有機酸血症の出生前診断も行えると考えられた。この方法を用いた、カルニチン投与前のプロピオン酸血症患者より採血して作製した血液濾紙からのacylcarnitine分析の結果、propionylcarnitineが確かに検出され、新生児マススクリーニングが可能であることを確認した。イソ吉草酸血症や晩発型のプロピオン酸血症の治療経験から、これら有機酸代謝異常症の早期診断による新生児・乳児期の積極的な治療の必要性と長期予後の改善の可能性を指摘した。

見出し語： マススクリーニング、tandem mass spectrometry、acylcarnitine

緒言： 有機酸代謝異常症では、有機酸がカルニチンやグリシンと結合して存在することが多い。しかし、例えば患者が急性増悪時でなかったり、低カルニチン血症が存在する時には、それらの濃度は必ずしも高くないことがある。特にacylcarnitineはFAB-MS法で測定されることが一般的であったが、この方法はそれほど高感度でなく、診断の為にはカルニチン負荷時の尿の分析が必要とされた。このように、acylcarnitineやacylglycineは有機酸代謝異常症に比較的普遍的に認められ、

診断やスクリーニングにおける有用性が考えられるにもかかわらず、その測定法の感度の問題から、利用が限られていた。最近、これらの分析に高感度分析であるFAB-MS/MS法が有効であることが報告されているので、イソ吉草酸血症での出生前診断やプロピオン酸血症での血液濾紙を用いたマススクリーニングへの応用を検討した。

研究方法： イソ吉草酸血症の出生前診断の対象者は昨年度の報告に詳述してある。前回GC/MS分析に供した羊水を使用した。羊

水0.2~0.5mlに内部標準として0.5 μ gのhexanoylcarnitineと1.0 μ gのhexanoylglycineを加え、メタノールで除蛋白し、乾涸した後3N塩酸メタノールを50 μ l加え、70°Cで15分加熱しメチル化し、これをFAB-MS/MS分析した。

血液濾紙を分析したプロピオン酸血症患者3人は晩発型で、その病歴は、[症例1]乳児期より精神運動発達の軽度遅れがあった。小学校は普通学級であったが成績不良で体育も苦手であった。しばしば嘔吐発作で入院加療を受けることがあった。14歳、歩行障害出現時に本症と診断。兄が1歳3ヶ月時嘔吐脱水にて死亡している。[症例2]生後3ヶ月まで母乳栄養でその後調製乳。頸定4ヶ月、寝返り5ヶ月だが、10ヶ月時座位不能。10ヶ月時、発熱嘔吐半身痙攣を認め、本症と診断。特殊ミルクが飲めず、低蛋白食・カルニチン投与を行い、5歳でDQ60前後。[症例3]4ヶ月時、一旦見られていた笑い消失、頸定無し、筋緊張低下あり。7ヶ月時部分発作とケトアシドーシス発作を認め、本症と診断。症例2と3は、室温保存されていた新生児期採血の血液濾紙を検査機関から得た。症例1は治療開始前に採血し血液濾紙を2つ作製し、室温保存で1週間後分析した。血液濾紙は1circleを切り出し、Millingtonらの方法¹⁾に従い、細切した後メタノールで抽出し、乾涸後メチル化した。

FAB-MS/MS分析は、TSQ 700 triple stage-quadrupole mass spectrometer (Finnigan, MAT Instrument Inc.)を用いて行った。FABのマトリックスはglycerol/thioglycerolで、メチル化したサンプルと等量使用した。MS/MSはparent scan modeで行い、

acylcarnitineの分析は、m/z99のparent ionをモニターし、acylglycineの分析には、m/z90のparent ionをモニターした。

結果：羊水の分析(図1)では対照でも各acylcarnitineが十分な感度で定量出来た。isovalerylglycineは対照では感度以下であったが、患者での濃度であれば今回の症例だけでなく報告されている症例でも診断できる感度を有していた。acylcarnitineの場合、acytylcarnitineとの比の方が対照との差が大きかった(表1)。濾紙血の分析では、室温保存期間が1年以上と長かった症例2、3では、propionylcarnitineは検出されなかったものの、症例1では感度良く検出された(図2)

考案：acylcarnitineとacylglycineを指標とする有機酸代謝異常症の出生前診断は、汎用性があり、FAB-MS/MS法であれば簡便かつ精度が高いといえる。更に他の有機酸代謝異常症での経験を重ねる必要があると思われる。有機酸代謝異常症には比較的軽症の群があり、好運が重なればほぼ無症状で経過する場合もありうる一方、感染症時などに急性増悪し不幸の転帰をとることがあるのは今回のプロピオン酸血症例同胞やイソ吉草酸血症例同胞の例が示すとおりである。FAB-MS/MS法を用い血液濾紙からacylcarnitineを検出するマスキングは米国でパイロット的になされているが、今回呈示したようなプロピオン酸血症例が新生児期に診断されれば、その神経学的予後も大幅に改善されるものと思われる。今後、このようなマスキングの取り組みも考慮されるべきと考えられた。

文献

1) Millington DS, et al.: J Inher Metab Dis 13:321-324, 1990.

表1. 羊水中の isovalerylcarnitine(IVC)、acetylcarnitine(AcC)及び isovalerylglycine(IVG)

	IVC($\mu\text{g/ml}$)	AcC($\mu\text{g/ml}$)	IVC/AcC	IVG($\mu\text{g/ml}$)
Isovaleric acidemia fetus(32wk)	0.68	0.41	1.66	5.2
Control(n=1)(33wk)	0.079	0.84	0.094	<0.045
Control(n=9)(16-18wk)	0.086 ± 0.022	1.18 ± 0.44	0.072 ± 0.018	<0.041

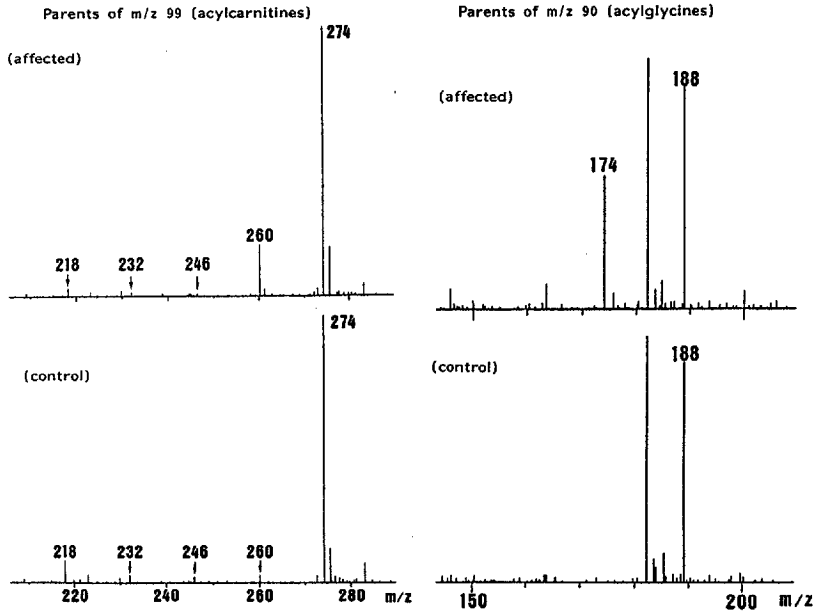


図1. 羊水中acylcarnitineとacylglycineのFAB-MS/MSスペクトル. m/z 274~218は、各々炭素数6~2のacyl基を持つacylcarnitine methylesterの $[M+H]^+$ イオン、 m/z 188、174は、各々hexanoylglycineと isovalerylglycine methylesterの $[M+H]^+$ イオンである。

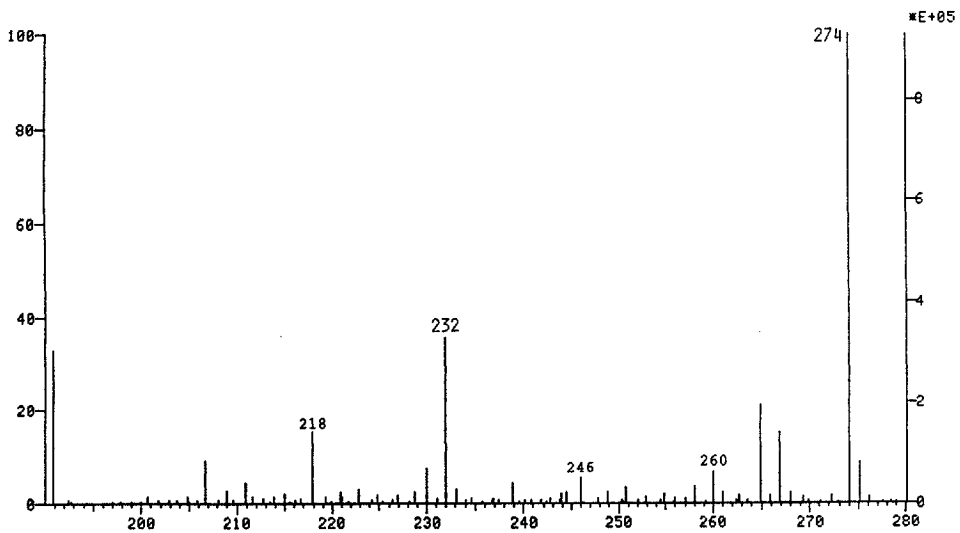


図2. 症例1の血液濾紙から抽出したacylcarnitineのFAB-MS/MSスペクトル. m/z は図1参照.



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:FAB-MS/MS法を用いると、正常対照を含め羊水中の acylcarnitine 及び acylglycine 濃度が高感度で測定出来、イソ吉草酸血症の出生前診断が可能であった。この方法の感度であれば他の有機酸血症の出生前診断も行えらるゝと考えられた。この方法を用いた、カルニチン投与前のプロピオン酸血症患者より採血して作製した血液濾紙からの acylcarnitine 分析の結果、pro-pionylcarnitine が確かに検出され、新生児マススクリーニングが可能であることを確認した。イソ吉草酸血症や晩発型のプロピオン酸血症の治療経験から、これら有機酸代謝異常症の早期診断による新生児・乳児期の積極的な治療の必要性と長期予後の改善の可能性を指摘した。