

エレクトロスプレー・タンデムマススペクトロメーターによる新生児マススクリーニングの基礎的検討－有機酸代謝異常症の診断を中心とした検討
(分担研究：マススクリーニング対象疾患一次スクリーニングから二次スクリーニングのあり方に関する研究)

重松陽介**、畑 郁江**、田中幸枝***、須藤正克*

要約：高感度質量分析システムであるエレクトロスプレー・タンデムマススペクトロメーター/コンピュータシステムによる有機酸およびアミノ酸代謝異常症のマススクリーニングの診断精度などを検討した。新生児ろ紙血を用いて、有機酸代謝異常症の診断にはアシルカルニチンを分析定量し、アミノ酸代謝異常症の診断にはアミノ酸を定量した。既に有機酸代謝異常症と診断された患者について保存されていた新生児期の血液ろ紙を収集し、これを対照新生児血液ろ紙の分析結果と比較した。プロピオン酸血症やイソ吉草酸血症などでは診断マーカーのアシルカルニチンの定量値は著しく高値であり、対照群と明確に区別された。一部の有機酸代謝異常症の診断マーカーアシルカルニチンの定量値は対照群でのばらつきがみられ、精度良いスクリーニングのためには、対照群の数を増やしカットオフ値の設定を更に検討する必要があると考えられた。アミノ酸についても良好な定量値が得られることから、患者血液ろ紙の測定などで診断の精度を確認していく予定である。

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】先天性有機酸代謝異常症などのマススクリーニングとして、ろ紙血のtandem mass spectrometry (MS/MS)が有力な分析法と考えられる。即ち、MS/MS分析では、precursor ion scanやneutral loss scanを用いることで特異性に優れた高感度分析が可能となる¹⁾²⁾。この方法を用いると、血中の中鎖アシルカルニチンの蓄積を検出することでmedium-chain acyl-CoA dehydrogenase欠損症の診断が可能であること、また、アミノ酸も精度良く測定出来てアミノ酸代謝異常症の診断が可能であることから、これらの疾患の発見を目的とした新生児マススクリーニングが検討された³⁾⁶⁾。当初MS/MS分析のために用いられたイオン化法 (FABイオン化) では、多検体処理の自動化が困難であったが、その後 electrospray (ESI)イオン化が実用化されることでオートサンブ

ラーでの多検体連続自動測定が可能となり、サウジアラビアなどでESI-MS/MS法による血液ろ紙を用いたマススクリーニングが開始されている⁷⁾。

今回、このESI-MS/MS法での分析条件やデータ処理法を検討すると共に、本邦において既に有機酸代謝異常症と診断された患者について保存されていた新生児期の血液ろ紙を収集し、これを対照新生児血液ろ紙の分析結果と比較することで、診断精度等についても検討を行った。

【方法】分析には血液ろ紙パンチアウト (径3.3 mm) 3個を用いた。これを洗浄後シリコン処理したCORNING社製 Cell Wells (24-well) に入れ、それぞれ内部標準とメタノールを加えて振盪しアシルカルニチンとアミノ酸を抽出した。塩酸ブタノールでブチル化し、65%アセトニトリル溶液に再溶解し、

福井医科大学*、小児科**、実験実習機器センター*** (Department of Pediatrics, Fukui Medical School)

オートサンプラー用バイアルに移し分析した。内部標準としては、アシルカルニチン測定用に、当施設で合成した炭素数2、3、4、8の重水素標識アシルカルニチンと重水素標識glutaryl carnitineを、アミノ酸測定用には重水素標識アミノ酸（グリシン、アラニン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン）（京都府立医大小児科提供）を使用した。二塩基性アミノ酸の測定では重水素標識メチオニンを内部標準として代用した。

質量分析計はThermoQuest社製TSQ7000で、APIは溶融シリカキャピラリカラムを用いたESI。オートサンプラーはLC-10Aシステム（島津）のSIL-10Aで、回路は溶融シリカキャピラリカラムを用いて直接ESIに接続した。移動相は65%アセトニトリル溶液で流速15 μ l/minとした。サンプル注入量は15 μ lで、約3.5分間隔で自動注入を行った。

MS/MS分析は、3種類の分析モードを順に切り替えて行った。即ち、product ion m/z 85を用いたprecursor ion scanning (scan range: 250-500/3sec)、 m/z 102 及び m/z 119のneutral loss scanning (scan range: 125-300/3sec)の分析モードで、それぞれ2秒スキャンである。CIDはアルゴンガス2.0mTorr、collision energyは-30eVである。分析は1サンプル毎にオートサンプラースタート信号に同期させて開始し、分析データの取り込みを2.5分間行い、サンプルピーク出現にあわせて15スキャンのスペクトルを積算した。

記録された分析データは手動で統計解析し診断判定を行った。アシルカルニチンについては、アセチルカルニチン値で補正した比で判定を行った。アミノ酸については、アミノ酸自動分析計と同時測定したサンプルを用いた補正や、血液サンプルを標品の基準溶液で希釈することにより血液ろ紙1サークルの血清量を算出する方法なども検討した。

【結果と考察】 Fig. 1に、precursor ion scanningによるろ紙血アシルカルニチン分析のマススペクトルを示した。Controlのマススペクトル中に示したように、正常対照では内部標準としての重水素標識アシルカルニチン以外には、アセチルカルニチン(C2)、パルミトイルカルニチン(C16)、オレイルカルニチン(C18:1)が主なイオンピークであった。それぞれの疾患において診断指標となるアシルカルニチンは、図中に示したように、グルタル酸尿症I型(GA-1)でglutaryl carnitine (diC5)、プロピオン酸血症(PA)でpropionyl carnitine (C3)というように単一である場合

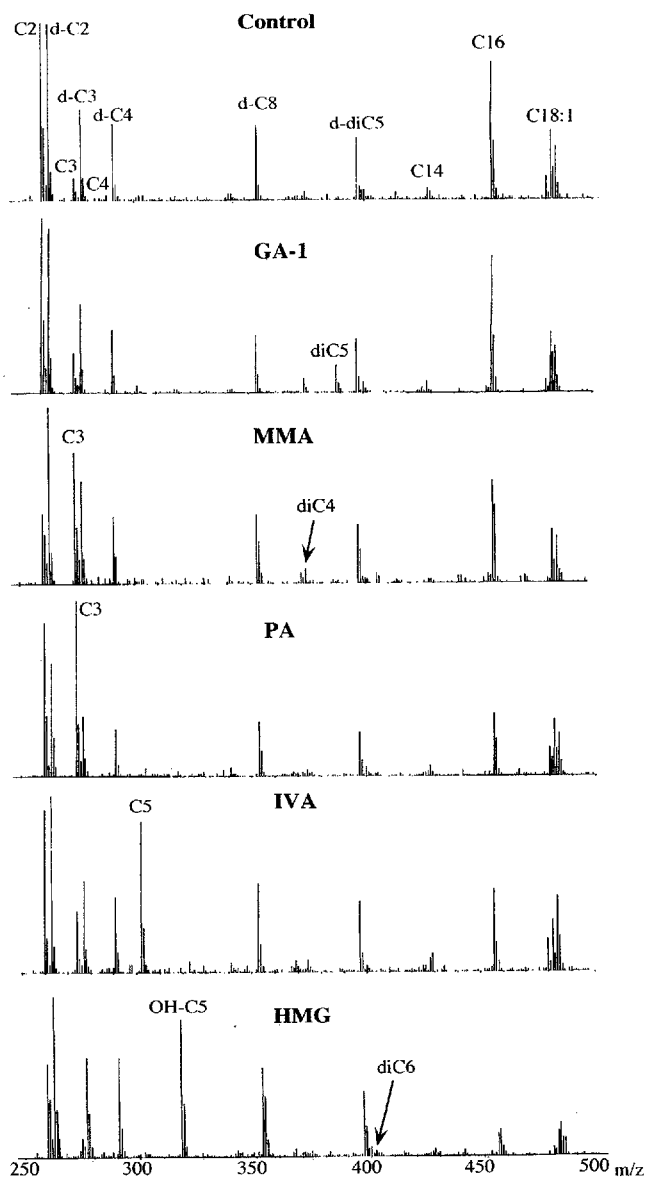


Fig. 1. Acylcarnitine profiles in blood spots measured by ESI-MS/MS using precursor-ion scanning of m/z 85. GA-1; glutaric aciduria type I, MMA; methylmalonic aciduria, PA; propionic acidemia, IVA; isovaleric acidemia, HMG; 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, C2; acetylcarnitine, d-C2; deuterium-labelled acetylcarnitine, C3; propionylcarnitine, diC4; methylmalonylcarnitine, diC5; glutaryl carnitine, C18:1; oleylcarnitine, C5; isovalerylcarnitine, OH-C5; 3-hydroxyisovalerylcarnitine, diC6; 3-methylglutaryl carnitine.

と、メチルマロン酸尿症(MMA)でpropionyl carnitineとmethylmalonylcarnitine (diC4)、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症では3-hydroxyisovalerylcarnitine (OH-C5)と3-methylglutaryl carnitine (diC6)といったように、複数になる場合とがある。

Fig. 2にpropionyl carnitine/acetylcarnitine比の度数

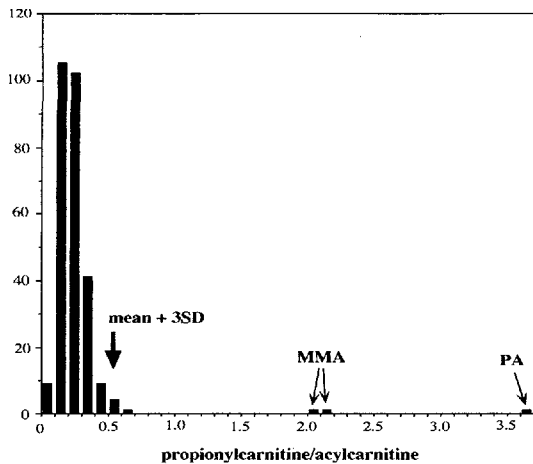


Fig. 2. Distribution of the ratios of propionylcarnitine to acetylcarnitine in blood spots of control newborns and patients with propionic acidemia or methylmalonic aciduria.

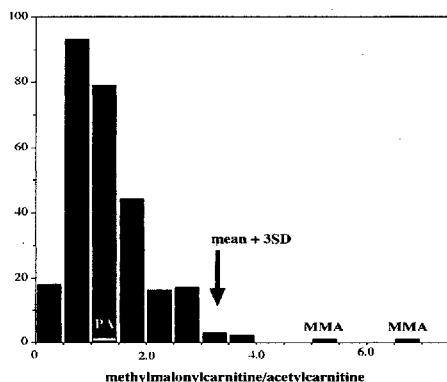


Fig. 3. Distribution of the ratios of C4-dioylcarnitine (methylmalonylcarnitine) to acetylcarnitine in blood spots of control newborns and patients with propionic acidemia or methylmalonic aciduria.

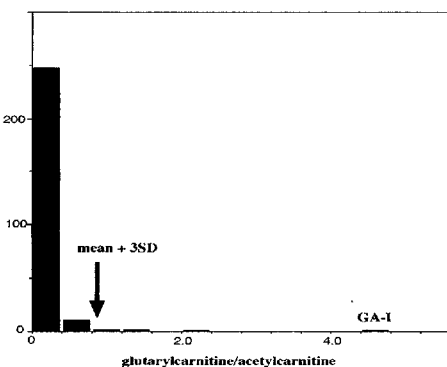


Fig. 4. Distribution of the ratios of C5-dioylcarnitine (glutarylcarnitine) to acetylcarnitine in blood spots of control newborns and a patient with glutaric aciduria type-1.

分布を示したが、propionylcarnitineの著しい増加によりプロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症が精度良く診断出来た。Fig. 3にmethylmalonylcarnitine/acylcarnitine比の度数分布を示したが、この比はメ

チルマロン酸尿症で増加しているように見えるが、対照との差はあまり大きくなかった。また、Fig. 4のglutarylcarnitine/acetylcarnitine比でも、対照新生児のなかにやや高値を示すものがあった。こうした場合、カットオフ値をどこに設定するかで見逃し例の存在や要精検例の増加といった点が問題となる可能性がある。サウジアラビアでの経験では、要精検者数は診断患者数（アミノ酸代謝異常症も含む）の約3倍であったようである。今後の分析例の増加の中で検討すべき問題と考えられた。

Fig. 5にm/z 102のneutral loss scanningによるろ紙血アミノ酸分析のマススペクトルを示した。図示していないが、m/z 119のneutral loss scanningでは、アルギニンとシトルリンをモニターしている。図にはフェニルケトン尿症(PKU)患者の治療中（1歳6ヶ月時）のろ紙血の分析を示した。Fig. 6には、フェニルアラニンの血清濃度換算値の度数分布を示した。PKU患者の治療中のろ紙血分析による定量値も示してある。ここでは、ヘマトクリット値を55%とし、血液ろ紙パンチアウトの全血量について既報の換算値⁹⁾を用いて計算しており、この換算は今回検討した希釈法による値と良く一致した。しかしながら、同時にアミノ酸分析計で測定した血清濃度値と比較すると、対照での低濃度の領域では良い相関を示すものの、患者の高い値では別の換算が必要であった。ともかく、このアミノ酸定量値についても高精度の値を提供できることから、PKU患者の自己採血によるフェニルアラニン濃度管理にも利用したいと考えている。

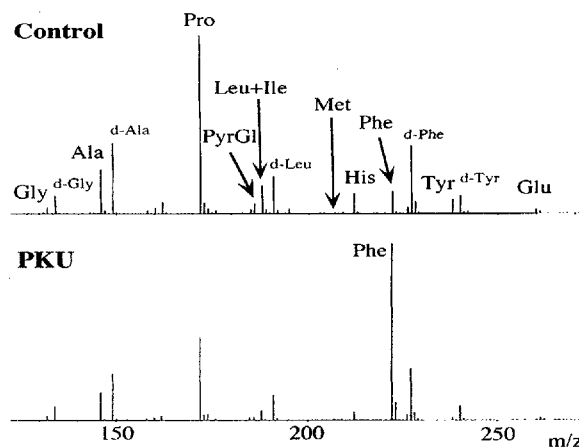


Fig. 5. Amino acid profiles in blood spots measured by ESI-MS/MS using neutral loss scanning of 102. PKU; phenylketonuria, d-Gly; deuterium-labelled glycine, PyrGlu; pyroglutamic acid, Phe; phenylalanine.

表にこの方法でのマススクリーニング対象疾患を示したが、今後パイロットスタディの中でその有用性を更に検討する必要があると思われる。さらに分析例を増やし症例の診断精度を検討していく予定である。

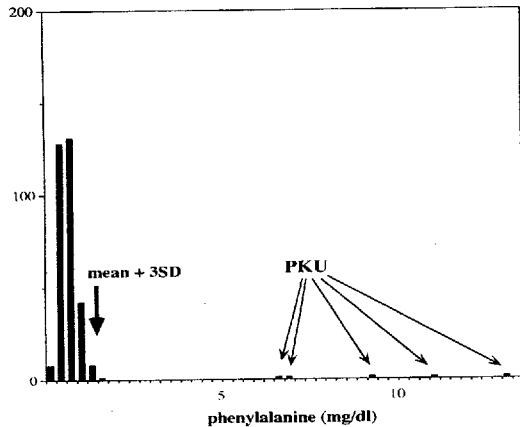


Fig. 8. Distribution of the serum levels of phenylalanine calculated with values in blood spots of control newborns and patients with phenylketonuria under diet therapy.

表 ESI-MS/MSによる新生児マススクリーニング対象疾患

(1)アシルカルニチン分析により診断

- メチルマロン酸尿症
- プロピオン酸血症
- イソ吉草酸血症
- グルタル酸尿症 I型& II型
- HMG-CoA lyase 欠損症
- 複合型カルボキシラーゼ欠損症
- 複数のAcyl-CoA dehydrogenase 欠損症

(2)アミノ酸の分析により診断

- フェニルケトン尿症
- メープルシロップ尿症
- ホモシスチン尿症
- 高チロシン血症
- 非ケトン性高グリシン血症
- シトルリン血症
- 高アルギニン血症
- 先天性高乳酸血症

文献

- 1) Millington DS, Norwood DL, Kodo N, Roe CR, Inoue F. *Anal Biochem*, 180; 331-339, 1989
- 2) Hill RE. *Clin Chim Acta*, 194; 1-18, 1990
- 3) Van-Hove JL, Zhang W, Kahler SG, et al. *Am J Hum Genet*, 52; 958-66, 1993
- 4) Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. *Clin Chem*, 39; 66-71, 1993
- 5) Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Roe CR, Naylar EW. *Clin Chem*, 41; 62-68, 1995
- 6) Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Adam BW, Levy HL. *Clin Chem*, 42; 349-355, 1996
- 7) Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. *Pediatr Res*, 38; 324-331, 1995

ABSTRACT

Neonatal screening by analysis of acylcarnitines and amino acids in blood spots using electrospray tandem mass spectrometry

Shigematsu Y¹⁾, Hata I¹⁾, Tanaka Y²⁾, Sudo M³⁾

Department of Pediatrics¹⁾, Central Research Laboratories²⁾, Fukui Medical School³⁾

Acylcarnitines and amino acids in blood spots from newborns were measured by automated electrospray tandem mass spectrometry with multiple scanning functions. In the present study, three circles (3.3 mm diameter) from each blood spot were used for the analysis of extraction with methanol and derivatization with HCl in butanol, and the automated sample introduction was done at a rate of one sample every 3.5 min with excellent sample peak separation and sensitive detection of ion peaks in each function of tandem mass spectrometry. The diagnosis of several organic acidemias was clearly established using the ratios of acylcarnitines, specific to the respective acidemia, to acetylcarnitine in stored neonatal blood spots of the patients, although relatively large standard deviations were observed in diacylcarnitine measurements in control newborns and the cut-off levels for selection of abnormal samples should be investigated in large-scale samples.



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:高感度質量分析システムであるエレクトロスプレー・タンデムマススペクトロメーター/コンピュータシステムによる有機酸およびアミノ酸代謝異常症のマススクリーニングの診断精度などを検討した。新生児ろ紙血を用いて、有機酸代謝異常症の診断にはアシルカルニチンを分析定量し、アミノ酸代謝異常症の診断にはアミノ酸を定量した。既に有機酸代謝異常症と診断された患者について保存されていた新生児期の血液ろ紙を収集し、これを対照新生児血液ろ紙の分析結果と比較した。プロピオン酸血症やイソ吉草酸血症などでは診断マーカーのアシルカルニチンの定量値は著しく高値であり、対照群と明確に区別された。一部の有機酸代謝異常症の診断マーカーアシルカルニチンの定量値は対照群でのばらつきがみられ、精度良いスクリーニングのためには、対照群の数を増やしカットオフ値の設定を更に検討する必要があると考えられた。アミノ酸についても良好な定量値が得られることから、悪音血液ろ紙の測定などで診断の精度を確認していく予定である。