

効果的なマススクリーニングの施策に関する研究

GC/MSを用いるマススクリーニングの試験研究

— 尿代謝物一斉分析法 —

(分担研究：有機酸代謝異常症マススクリーニング)

久原とみ子、新家敏弘、井上義人、松本雅裕、寧聡、張春花、松本勇

要約：新たに開発したウレアーゼ処理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違って、有機酸、アミノ酸、糖、糖アルコールそして核酸塩基類を一斉に分析できる画期的な分析法である。尿の前処理に要する時間は1検体1時間で、バッチ法では30検体で3時間、GC/MS分析に要する時間は15分である。従って、本法は確定診断のためのハイリスクスクリーニングのみならず新生児マススクリーニングにも十分に対応できる分析法である。

試験研究では2,953例を分析し、86例の異常を認めた。内訳はメチルマロン酸尿症1例、シスチン尿症6例、一過性チロジン症11例、一過性ガラクトース高排泄58例であった。このうちメチルマロン酸尿症は発端者で発症前に発見された我が国で最初の症例である。一過性ガラクトース高排泄児はガラクトチオールやガラクトン酸の増加を伴わなかったため、真性のガラクトース血症との鑑別は容易であった。

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、口紙尿分析

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た後、エタノールによる除タンパク操作のみを加えた0.1mlの尿の代謝物を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に応用するための試験研究を行った。

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

対象および方法

金沢地区8病院の協力を得て、平成7年4月より平成9年1月までに新生児尿2,953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口紙(3x7cm)に吸着させ、室温乾燥後送られてきた口紙吸着尿を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。

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D3-クレアチニン(100nmol)、D2-グリシン(40nmol)、D3-ロイシン(20nmol)、D3-メチオニン(20nmol)、D5-フェニルアラニン(20nmol)、D4-チロジン(20nmol)、D8-シスチン(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の混和液(10:1) 100 μ lを加えて80℃で30分間加熱してトリメチルシリル化しその1 μ lをスプリット法(1:10~1:40)にてGC/MS分析した。

GC/MSは卓上タイプの四重極型質量分析計を用いた。分析用カラムには5% phenylmethyl silicone キャピラリーカラム(0.25mm \times 30m \times 0.25 μ m)を用いた。分析温度条件は60℃又は125℃から325℃まで16℃/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診断支援サービスを行ってきた。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2,953名の新生児を対象として行った。

先天性有機酸代謝異常症の診断には尿中有機酸分析が必須で、GC/MS分析は有機酸の分析に最も適した分析法であった。従来、尿のGC/MS分析はその前処理が煩雑なこと、1検体当りの分析時間が長いことからマススクリーニングには不向きとされ、主に代謝異常症確認のための所謂ハイリスク児のスクリーニングあるいは確定診断に用いられてきた。しかし近年の分析機器やコンピューターの進歩により分離が格段によくなり分析時間も短縮された。一方、前処理法はこれまで多数検体処理に適した方法がなく、GC/MS分析はハイリスクスクリーニングに限られていた。今回、我々の研究グループが開発したウレアーゼ処理とエタノール除タンパク法を組み合わせた前処理法は操作が非常に簡便で多数の試料の処理にも十分対応できる分析法である。この分析系の確立は、GC/MS分析をこれまでのハイリスクスクリーニングに留まらず、現在ガスリー法などで行われている新生児マススクリーニングなどの所謂ローリスクスクリーニングにも応用可能となり、そのパイロットスタディーを開始した。

検索対象疾患として現行の新生児マススクリーニングの対象疾患5疾患を含めた22疾患を選定し、平成7年4月より金沢地区8病院の協力を得て平成9年1月末までに2,953検体を処理した。各検索対象疾患には複数の疾患指標物質を選定し、正常値+3SDを越える排泄量をもって異常と判定し化学診断を行った。

2,953名のうち異常判定した検体は86例であっ

た。以下の 1) 1例のメチルマロン酸尿症 (わが国では兄弟例を除く最初の発症前診断例)、2) 6例のシスチン尿症、3) 11例の一過性高チロシン血症、4) 68例の一過性ガラクトース高排泄児、このうち、早産児、低出生体重児は1、2)にはなく、3)では82%と高率で、4)で26%であった。ガラクトース高排泄例はガラクトース血症で検出されるガラクトールおよびガラクトン酸の排泄増加を伴っていないところから新生児時期一過性ガラクトース高排泄と考えた。以上、2,953検体を分析した限り、4例の代謝異常症を発見し、現在追跡調査中である。発見率は4/2,953と単純に計算すると約1,000人あたり1.3人とかなり高頻度であった。

本分析法は現在22の疾患を検査対象としているが、何ら分析系を変えることなくその指標物質を登録することにより対象疾患を逐次増加できる。現在、分析終了より判定までに要する時間は1~2分程度であり、今後、前処理の自動化も含めた全自動の診断システムの完成を目指している。

文献

1. 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)
2. 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)
3. 久原とみ子、新家敏弘、井上義人、松本雅裕、寧 聡、張 春花、古本正、松本勇：マスキリーニングへの尿中代謝物一斉分析法の応用、*日本医用マススペクトル学会講演集第21巻*, 73-81 (1996)
4. 寧 聡、久原とみ子、佐倉伸夫、岡野善行、井幕充彦、松本勇、GC/MSによる高ガラクトース血症の化学診断、*日本医用マススペクトル学会講演集第21巻*, 155-158 (1996)
5. I. Matsumoto, T. Kuhara: A New Chemical Diagnostic Method for Inborn Errors of Metabolism by Mass Spectrometry - Rapid, Practical, Simultaneous Urinary Metabolites Analysis -, *MS Reviews*, Vol. 15, No.1, 43-57 (1996)
6. 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, 1996, 10, Boston, U.S.A, in press (1996)



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:新たに開発したウレアーゼ処理 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違って、有機酸、アミノ酸、糖、糖アルコールそして核酸塩基類を一斉に分析できる画期的な分析法である。尿の前処理に要する時間は1検体1時間で、バッチ法では30検体で3時間、GC/MS分析に要する時間は15分である。従って、本法は確定診断のためのハイリスクスクリーニングのみならず新生児マススクリーニングにも十分に対応できる分析法である。

試験研究では2,953例を分析し、86例の異常を認めた。内訳はメチルマロン酸尿症1例、シスチン尿症6例、一過性チロジン症11例、一過性ガラクトース高排泄58例であった。このうちメチルマロン酸尿症は発端者で発症前に発見された我が国で最初の症例である。一過性ガラクトース高排泄児はガラクトチールやガラクトン酸の増加を伴わなかったため、真性のガラクトース血症との鑑別は容易であった。