

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

ESI-MS/MS新生児マススクリーニングの再検討

研究要旨

タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常症マススクリーニングについて、前処理法や分析法の改良により、6万検体/年/台以上の処理能力が可能となった。これまで1年10ヶ月のパイロットスタディで約23,000検体を処理し、1例のプロピオン酸血症患者を発見し、低蛋白食とカルニチン投与により良好な治療効果を得ている。さらにスクリーニング対象を拡大し、このマススクリーニングの有用性を実証していく予定である。なお、後方視的な検討により、スクリーニング対象疾患の多くは診断可能であることが確かめられているが、今回合成した安定同位体標識シトルリンを用いるシトルリン微量定量法での尿素サイクル異常症のスクリーニングについては、未だ症例での測定経験が無いので更に検討を行う予定である。

このスクリーニング法は、新生児血液濾紙を使用し、現行マススクリーニングの対象疾患のアミノ酸代謝異常症もスクリーニング出来るので、正規の新生児マススクリーニング事業として早期に採用されるべき方法と考えられる。

研究協力者

重松陽介

(福井医科大学小児科)

研究目的

現在新生児マススクリーニングに用いられている方法では、各々の疾患について診断指標物質をそれぞれ血液濾紙小片1個を用いて別個の検査法で測定している。このような方法では、上記以外の疾患をスクリーニング対象に追加しようとする場合、診断指標物質測定のための手間と費用が増える上、対象疾患の個々の頻度が極めて希であるので、スクリーニングの効率も低下する。これに対して、1回の測定で多数の疾患を診断できる方法を用いれば、上述の問題点は解決できる。このような測定が可能な方法の1つとして、エレクトロスプレー・タンデム型質量分析法(ESI-MS/MS)が挙げられる。この研究の目的は、ESI-MS/MS法を採用した場合の問題点と有用性について、スクリーニング対象疾患と検体処理能力の点から検討し、現行のスクリーニング事業に追加採用できるかどうかを明らかにすることである。

研究方法

(1) 分析対象

ESI-MS/MS法では、新生児ろ紙血を分析検体として使用する。平成9年度より開始したパイロットスタディでは、福井県内の現行新生児マススクリーニングで採取されたるろ紙血、及び福井県以外の協力医療機関で出生した新生児より採血されたるろ紙血を、同意を取得して、分析している。平成10年度も引

き続き同じ形式でパイロットスタディを行った。また、後方視的に、患者のろ紙血も収集し分析した。対象疾患は表1の通りである。

(2) 分析方法

前処理：ESI-MS/MS法では、ろ紙血中のアシルカルニチンとアミノ酸を測定する。それらを血液濾紙から抽出し誘導体化する前処理法の原則は、ESI-MS/MS法を試みている諸外国の検査機関においても変わらないが、今回、処理の迅速化を目的としてマイクロプレートを用いた方法を検討した。血液ろ紙の打ち抜きは、打ち抜き範囲を確認する必要があるため、手作業で行った。血液ろ紙打ち抜き片各1個を96穴マイクロプレートに入れ、内部標準を含むメタノールで抽出し、抽出液は別の96穴マイクロプレートに移す。これを特製のマイクロプレート用ノズルを備えたドライサーモバスにより窒素気流下で乾涸し、誘導体化試薬を加え、密閉蓋でシールし加熱誘導体化する。誘導体化試薬は同様に窒素気流で乾涸し、分析用50%アセトニトリル溶液に再溶解する。

MS/MS分析：検体は、96穴マイクロプレート対応のオートインジェクタで連続注入し分析した。1検体のMS/MS分析時間は1.3分、サンプル注入間隔は2.3分である。MS/MS分析は表2に示した条件で行った。分析感度向上を目的に、CIDの衝突エネルギー条件の最適化を行った。アミノ酸分析において、シトルリンの微量分析のために重水素標識シトルリンを合成し、専用のスキャンモードを設定した。分析データの処理、及び診断判定は既報の通りの方法で行った。

研究結果

(1)検体処理能力

今回、マイクロプレートを使用した前処理法を採用した。96穴マイクロプレート1枚分の検体の処理時間は約1.5時間であるが、待ち時間に併行して複数枚のプレートの処理が行えるので、大量のろ紙検体の処理でも、処理時間はあまり増えず、手間もかからなかった。

MS/MS分析時間は96穴マイクロプレート1枚あたり約4時間である。午前中に検体前処理を行い、測定を開始し自動運転による分析を行うと、1日8時間の勤務条件で1人の担当者によりプレート3枚の分析が可能であった。

(2)ESI-MS/MS分析方法

現行スクリーニングの対象疾患であるアミノ酸代謝異常症のスクリーニング指標アミノ酸及びアルギニンの定量精度が良好であることは、既に報告してあるので省略する。

シトルリンの定量については、2-200nmol/mlの濃度範囲において良好な直線性が得られた。この方法による対照新生児のシトルリン濃度は、 16.7 ± 6.2 nmol/mlであった。現在、シトルリンの下限カットオフ値を7.0nmol/mlとしてスクリーニングを行っている。

アルギニノコハク酸尿症の診断にアルギニノコハク酸濃度をモニターしているが、重水素標識内部標準が得られないので、アルギニン測定の内標準を流用して半定量を行っている。対照新生児ではアルギニノコハク酸濃度は極めて低いので正常範囲が設定できないものの、患者血液濾紙の分析では感度よく定量出来ることが確認できた(図1)。

イソ吉草酸血症のスクリーニングに炭素数5のアシルカルニチン濃度を指標としているが、ピボキシル型抗生剤を服用すると同じ分子量であるピバロイ

ルカルニチンが生じて偽陽性となる。このようなケースが特定の医療機関を中心に増加しており、この方法でのスクリーニングに支障が生じている。

(3)疾患の発見頻度

これまで約23,000の新生児をスクリーニングし、1例のプロピオン酸血症を発見した。患者は診断時無症状で、特殊ミルクを使用した低蛋白食とL-カルニチン服用により、急性発症することなく順調に成長発達がみられている。

考察

今回採用した前処理法は、血液ろ紙の打ち抜き範囲を確認しなければならないため、完全自動処理法ではないが、以前の試験管法と比べ、手間と時間が大幅に軽減され、短時間で大量の検体処理が可能であることが確認できた。これまでのパイロットスタディでは年間約12,000新生児の分析を行ってきたが、この前処理法とMS/MS分析法を用いれば、その6倍程度の大量処理が可能であるので、今後分析数を増やし、更にESI-MS/MS新生児マススクリーニングの有用性を検討していきたい。

更に多くの患者がスクリーニングされて来た場合、それぞれの重症度にあわせた治療法の選択やその開始時期についても検討が必要になると考えられる。諸外国での成果も参考にしながら、スクリーニングの質を向上させていかなばならないと考えている。

結論

ESI-MS/MSによる新生児マススクリーニングは、現行のアミノ酸代謝異常症のスクリーニングにおいても測定精度向上という利点があり、更に多くの治療可能な代謝異常症のスクリーニングができるので、積極的に推進されるべきものであることを更に明らかにしていきたい。

表1 ESI-MS/MSによるスクリーニング対象疾患

<有機酸代謝異常症>	<アミノ酸代謝異常症>
メチルマロン酸尿症	フェニルケトン尿症
プロピオン酸血症	メ-プルシロップ尿症
イソ吉草酸血症	ホモシスチン尿症
グルタル酸尿症I型・II型	シトルリン血症
3ヒドロキシ3メチルグルタル酸尿症	アルギニノコハク酸尿症
マルチプルカルボキシラ-ゼ欠損症	アルギナ-ゼ欠損症
脂肪酸酸化異常症	カルバミルリン酸合成酵素欠損症
(アシルCoA脱水素酵素欠損症など)	オルニチントランスカルバミラ-ゼ欠損症

Table 2 Scan functions in ESI-MS/MS for neonatal screening

Order	Scan function	Collision energy (eV)	Scan Range (m/z)	Time (sec)	Target analytes
1	precursor ions of m/z 85	-30	250-500	2.0	acylcarnitines
2	product ions of m/z 459	-30	140-174	0.5	argininosuccinic acid
3	neutral loss of m/z 161	-26	231	0.1	arginine
4	neutral loss of m/z 163	-26	237	0.1	arginine-13C6
5	neutral loss of m/z 102	-18	140-242	1.0	amino acids*
6	neutral loss of m/z 56	-12	128-136	0.3	glycine
7	neutral loss of m/z 119	-18	185-197	0.3	ornithine
8	neutral loss of m/z 162	-26	228-240	0.3	citrulline

*alanine, valine, leucine, glutamine, phenylalanine, tyrosine

図1 アルギニコハク酸ブチルエステル疑似分子イオン(m/z 459)のプロダクトイオンスペクトル : [A] アルギニコハク酸尿症患者の紙血、[B] アルギニコハク酸標品。スクリーニングでは、構造式中に示したm/z172とm/z144の2つのプロダクトイオンの強度をモニターする。

