

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

尿GC/MS分析による代謝異常症例の化学診断および追跡調査  
- 有機溶媒抽出法とウレアーゼ法の比較 -

研究要旨

ろ紙尿あるいは原尿 0.1(クレアチニン濃度が低いときは0.2)mlをウレアーゼ処理した後、GC/MS分析し、アミノ酸、アミノ酸由来の有機酸、糖、糖アルコール、核酸塩基を一斉分析する簡易ウレアーゼ法について、安定同位体希釈法を用いて定量精度の改善を図った<sup>1-3</sup>)。また人の手による前処理の良否のバラツキを避けるため前処理の自動化を試みかなり良好な成績を得た。新生児マススクリーニング試験研究では7,054検体を分析し、8例を発見、発見率は1/882名であった。代謝異常児は追跡調査している。久留米大学、島根医科大学、千葉こども病院を含めた4試験研究機関全体では22,078名を分析し、13例を発見、発見率は1/1,698名であった<sup>4</sup>)。ろ紙血のtandem MSを用いた米国でのスクリーニングの発見率は1/3,000名で、我が国での重松ら<sup>5</sup>)による2万人を対象としたスクリーニングの発見率は1/20,000名であるので、簡易ウレアーゼ法の発見率は極めて高く、心身障害発症予防に有効な方法と考えられる。

研究協力者

久原とみ子、大瀬守眞、Xia Zhen-wei、  
井上義人、新家敏弘、松本勇

(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)

同位体希釈法を用いて改善を図ってきたが、LeuやLysの定量に用いるD3-LeuやD4-Lysを、RTや化学構造の近いAla、Val、IleuあるいはOrnにも内標として共用することでCV値を大きく改善できた。

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とGC/MS分析の手法を用いて、ハイリスク児に対する診断支援のみならず、早期診断支援を目的として新生児スクリーニング試験研究を行い、本法の有効性について考察した。

また、武漢医学院より黄疸のためガラクトース血症を疑って、分析依頼されたる紙尿は、ガラクトース、ガラクトン酸、ガラクトールの増加がなく、Try、Met、Tryの異化中間体のp-hydroxyphenyl-lactate、p-hydroxyphenylpyruvateの著増を認めたので、チロシン症と判定した。さらにビタミンB12と葉酸の低値および巨赤芽球性貧血を呈したホモシスチン尿症の兄妹例について、本ウレアーゼ法では尿中Met、Hcys、orotate、methylmalonateについて一斉検索できることを確認した。

研究対象および方法

平成7年4月より平成11年1月28日までに新生児尿7,054検体を分析した。

採尿日はガスリー採血日とし、濾紙尿からの試料調製は昨年同様の方法<sup>1,7</sup>)で行った。

これまでに22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、7,054名の新生児を対象として行った。その結果、1)メチルマロン酸尿症2例、2)グリセロール尿症1例、3)ハートナップ病1例、4)シスチン尿症3例、5)-アミノアジピン酸尿症1例<sup>6</sup>)で、代謝異常は計8例で、8/7,054即ち1/882人の発見率であった。

研究結果および考察

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、定量精度がよいこと、定量および化学診断の自動化が必要である。

人の手による前処理の良否のバラツキを避けるためHP社のPrepStationを用いて前処理の自動化を試み、かなり良好な成績を得た。

定量精度については、特にアミノ酸について安定

Table 1.に示すようにメチルマロン酸やグリセロールなど指標物質の異常度、健常児+nSDにおけるn値は、血液と異なり尿であるため、対照との差は明瞭で、正規曲線に近似させた場合、ほとんど10SD以上であった。

久留米大学でシトルリン血症、神経芽細胞腫、

OTC欠損症を含む計5例、4試験機関全体では22,078名を対象とし、総計13例を発見したので、1/1,698名の発見率であった<sup>4)</sup>。

ろ紙血のtandem MSを用いた米国でのスクリーニングの発見率は1/3,000名と報告されている。また同じ手法で、我が国での重松らによる2万人を対象としたスクリーニングの発見率は1/20,000名である<sup>5)</sup>ので、我々の簡易ウレアーゼ法の発見率は極めて高く、心身障害発症予防に有効な方法と考えられる。

#### 文献

1. I. Matsumoto, T. Kuhara: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry - Rapid, practical, simultaneous urinary metabolites analysis -. Mass Spectrom. Review, Vol. 15, No. 1: 43-57 (1996)
2. 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)
3. 久原とみ子、新家敏弘、井上義人、大瀬守眞、吉田一郎、猪口孝洋、山口清次、木村正彦、高柳正樹、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. 23: 69-76 (1998)
4. Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Ohse M, Yoshida I, Inokuchi T, Yamaguchi, S, Kimura M, Takayanagi M, Matsumoto I: High-risk and Low-risk Screening for Inborn Errors of Metabolism by GC/MS Analysis of Urine in Japan. 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening(1999年6月)にて発表予定
5. 重松陽介：ESI-MS/MSによる新生児マススクリーニングの再検討。'98年度厚生科学研究-マススクリーニングの見逃し等を予防するシステムの確立に関する研究-研究会議。1999.2.13
6. H. Peng, T. Shinka, Y. Inoue, H. Mitsubuchi, J. Ishimatsu, M. Yoshino, T. Kuhara: Asymptomatic a-ketoadipic aciduria detected during a pilot study of neonatal urine screening. Acta Paediatr. in press
7. 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, p. 123 (1998)

Table 1. Pilot Study Report at Kanazawa Medical University ( ~'99.1.28 )

Disease/Abnormality	Cases	5SD< >10SD	10SD< >30SD	30SD<
Methylmalonic aciduria	2	-	2	-
Glyceroluria	1	-	1	-
Hartnup disease	1	-	-	1
Cystinuria	3	1	2	-
-Amino adipic/ -ketoadipic aciduria	1	-	1	-
Total: with defect	8	1	6	1
Total: screened	7,054			
Incidence	1/882			

(n SD): mean + nSD of methylmalonate, glycerol, valine, lysine and -amino adipate