

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による新生児代謝異常マススクリーニング  
- パイロットスタディ地域の拡大と患者検体の分析による知見の蓄積 -

研究要旨

有機酸代謝異常症と現行スクリーニング対象疾患以外のアミノ酸代謝異常症に対象疾患を拡大したESI-MS/MS新生児代謝異常マススクリーニングの有用性を検討するために、パイロットスタディ地域を昨年度までの福井県を中心とした体制から、本年度後半には広島県、徳島県にも拡大し、月間スクリーニング件数が約3,000検体と増加し、累積検査件数は44,653検体に達した。スクリーニングにより見いだされた患者は未だプロピオン酸血症1例のみであるが、この患者は早期治療により急性発症は経験することなくほぼ順調に経過している。シトルリンの持続的低値によりオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症とカルバミルリン酸合成酵素欠損症のスクリーニングを試みており、要再検率は約0.1%である。少数のこれら患者濾紙血でのシトルリン低値は確認できた。新生児期発症のシトルリン血症では、シトルリンの異常高値により容易にスクリーニング出来た。脂肪酸酸化異常症患者の新生児期濾紙血のアシルカルニチン分析を行ってみたところ、急性発症時の典型的な異常とは異なることがあり、身長に対応する必要があると考えられた。

研究協力者

重松陽介 (福井医科大学医学部看護学科)

研究目的

タンデム型質量分析計（ESI-MS/MS）による新生児濾紙血スクリーニングでは、現行のフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症以外に尿素サイクル異常症や有機酸代謝異常症もスクリーニングすることができる。これまで、本スクリーニングの技術的な検討を福井県を中心とした小規模なパイロットスタディで行ってきた。しかし、本スクリーニングの対象疾患の頻度は希であるため、早期発見・早期治療というマススクリーニングの有用性を確かめるには大規模なスクリーニングが必要である。今回、スクリーニング実施地域を更に拡大し、スクリーニングシステムがうまく機能するかどうかを検討した。また、対象疾患と診断された患者の新生児期血液濾紙を収集し、スクリーニングが確実に行えるかどうかにも更に検討した。

研究方法

(1)対象

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濾紙血、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濾紙血を、同意を取って分析して来た。平成11年度は、これらに加え、4月より広島県、また11月から徳島県においても、同

意が得られたも濾紙血の分析を行った。

スクリーニングを迅速に行う目的で、スクリーニング検査機関に郵送された血液濾紙を本スクリーニング用に一部切り離して登録番号をつけ、福井県と徳島県は週1回、広島県は週2回、ESI-MS/MS分析機関である福井医大小児科に郵送した。

引き続き、後方視的に患者の濾紙血も収集し分析した。

(2)分析方法

前処理：昨年度より採用した96穴マルチプレートを用いた前処理を行った。その手順は概略以下の通りである。血液濾紙は、打ち抜き範囲を目視し、手作業で打ち抜きを行った。血液濾紙打ち抜き片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した。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した。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した。シトルリン微量定量のために、新たに重水素標識シトルリンd3-citrullineを合成し、内部標準として使用した。

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1.4分、サンプル注入間隔は2.3分とした。分析イオンを選択することにより、特定のアミノ酸のみを定量した。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)検体処理能力と分析検体数

96穴マイクロプレートを使用した前処理法を行うことで、1人で3-4プレートを約2-3時間で処理できた。この検体は、ESI-MS/MS自動分析(プレート1枚あたり約3時間)により1日で測定できた。年間検体処理能力は計算上約10万検体であるが、現時点では血液濾紙検体の収集数は月約3,000検体であり、これを、前処理1名と機器の維持整備・データ処理1名の2人体制で実施した。平成11年1月から12月までに22,476検体を分析し、平成9年4月のパイロットスタディ開始以来の分析検体数は44,653検体となった。

### (2)対象疾患と分析実績

尿素サイクル異常症のなかで、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症とカルバミルリン酸合成酵素欠損症については、シトルリンの持続低値でスクリーニングを試みている。前年度は内部標準としてd6-citrullineをシトルリンの定量を行い、標品の分析では2-200nmol/mlの濃度範囲において良好な直線性が得られたものの、サンプルの分析では再現性に問題がある場合があった。これは内部標準の重水素標識数と標識位置がMS/MS分析上不適切であるためと考えられたので、これを解決する目的でd3-citrullineを合成した。平成11年11月からこの内部標準を使用し、シトルリンの下限カットオフ値を7.9nmol/mlとし、再検査により持続性に低値を示す症例を要精検とした。再検査率は約0.1%であった。患者検体の測定では、生後2週目発症オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者の新生児期濾紙血シトルリン濃度は3.2nmol/mlであり、1歳時に急性発症したカルバミルリン酸合成酵素欠損症患者の新生児期濾紙血シトルリン濃度は5.3nmol/mlであった。

2例の新生児期発症シトルリン血症患者の新生児期濾紙血シトルリン濃度は共に1,000nmol/ml以上の著しい高値であった。

乳児期発症メチルマロン酸尿症2例の新生児期濾紙血propionylcarnitine濃度はカットオフ値より明らかに高値で、スクリーニング可能であった。

乳児期発症グルタル酸尿症II型患者の新生児期濾紙血アシルカルニチンプロフィールは、報告されている急性発症時のパターンと必ずしも同一ではなかったが、スクリーニングは可能であった。

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症I欠損症患者の濾紙血アシルカルニチン分析で、長鎖アシルカルニチンの著減が判明したが、新生児

期濾紙血での分析は未だ検討できていない。

### (3)スクリーニングで見いだされた患者

これまで本スクリーニングで発見した患者はプロピオン酸血症1例のみである。患者は1歳10ヶ月の時点で、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、小柄ながらもほぼ順調に成長発達がみられている。

## 考察

マルチプレートを使用した前処理法を行い、MS/MS分析時間の短縮を計ることで、月間約3,000検体以上の処理を人員名で実施できる体制になった。スクリーニング地域が拡大し検体数が増加したことで、新たな疾患のスクリーニングにつながるものと期待している。スクリーニングの迅速性の観点からは、このパイロットスタディでは濾紙検体の送付体制に不十分な点があり、センター機関による集中分析体制でスクリーニングを実施する場合には改善すべきと考えられた。

持続的なシトルリン低値による尿素サイクル異常症スクリーニングでは、未だ患者は見いだされていない。カットオフ値の妥当性や、精検方法について今後検討する予定である。

今回の脂肪酸酸化異常症患者の新生児期濾紙血での検討で、発症前のアシルカルニチンのプロフィールが、報告されているような急性発症時のパターンと異なる場合のあることが明らかとなった。スクリーニング後の精査に向けて慎重に対応する必要があると考えられた。

スクリーニングされて来た患者の対応については、それぞれの重症度にあわせた治療法の選択やその時期についても検討が必要になると考えられる。スクリーニングで発見した患者での経験を踏まえ、更に検討していく必要がある。

## 結論

EESI-MS/MSによる新生児マススクリーニングは、大規模検体処理が可能であり、その特性を生かして検討を行っているが、新たな対象疾患についてもスクリーニング後の診断手順などの課題についても検討を進めていく予定である。

## 文献

- 1) 重松陽介, 布瀬光子, 畑 郁江, 眞弓光文, 須藤正克, 田中幸枝. Electrospray Tandem Mass Spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 8:13-20,1998.
- 2) Shigematsu, Y., Hata, I., Kikawa, Y., Mayumi,

M., Tanaka, Y., Sudo, M., Kado, N. :  
Modifications in electrospray tandem mass  
spectrometry for a neonatal-screening pilot

study in Japan. J Chromatr B Biomed Sci App  
731:97-103, 1999.