

平成16年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

HPLCによる有機酸脂肪酸代謝異常症の酵素診断系の確立

研究要旨

タンデム型質量分析計による有機酸脂肪酸代謝異常症のマススクリーニングを実施中である。しかし、タンデム型質量分析計によるアシルカルニチン分析はスクリーニングには絶大な力を発揮するが、確定診断はできない欠点をもつ。それを補うために、臨床応用可能なHPLCによる酵素診断系の確立を目指し、現在9種の酵素診断系を確立した。この結果、タンデム型質量分析計によるスクリーニングで、発見される疾患の3分の2程度が診断可能となった。さらに、4種の酵素を追加確立し、グルタール酸尿症2型以外は確定診断可能としたい。

研究協力者

佐倉伸夫（重症心身障害児施設 鈴が峰 病院
院長）

A. 研究目的

乳児突然死（SID）の予防には疫学的根拠から、うつぶせ寝の回避、禁煙、母乳保育の推進などが試みられている。代謝異常の面からは、脂肪酸代謝異常症とSIDとの関連が証明され、欧米ではタンデム型質量分析計による脂肪酸代謝異常症のスクリーニングにより、SIDの防止が可能とされ、本スクリーニングが欧米各国で広く採用されている。

本邦では、過去にタンデム型質量分析計でのスクリーニングの体系的報告はなく、SIDの防止に有効か否か、さらには脂肪酸代謝異常症患者が存在するの否かさえも明らかではなかった。数年前から、福井大学で、タンデム型質量分析計でのスクリーニングが開始されたが、なかなか実績が上がらなかった。しかし、1999年より広島県、徳島県が協力し、スクリーニング数が劇的に増加し、また、広島県が確定診断系の確立に寄与したこともあって、1万人弱に一人の頻度で、発症前に患者が発見されるようになった。その結果、本

邦でもタンデム型質量分析計でのスクリーニングが有用であることを証明しつつある。

本研究では、スクリーニングに関係した確定診断法として、HPLCを用いた脂肪酸有機酸代謝異常症の酵素診断法を確立し、発見されるほとんすべての疾患を診断できる体制を構築することを目的とした。

B. 研究方法

スクリーニングは迅速を旨とするので、培養に時間を要する線維芽細胞ではなく、末梢リンパ球そのものを酵素源とした。ヘパリン血採血から、リンパ球分離液を用いる細胞分離まで、約1時間で可能である。また、後の酵素活性測定条件の検討から、細胞数は最大 2×10^6 個必要で、採血量は5ないし6mlで、新生児でも十分対応できる量である。

酵素活性測定は基質として主としてアシルCoAを用い、その他に活性発現に必要なNAD, FAD, ATP, PMS, ferriciniumなどを添加した。反応温度は

37℃、反応時間は10～30分を基本とし、最短5分、最長60分であった。反応停止は、過塩素酸を使用し、極長鎖脂肪酸脱水素酵素活性測定のみにはアセトニトリルを用いた。過塩素酸では反応産物に変性するためである。

反応停止後は、除蛋白し、上清をHPLCで分析し、紫外線吸光度計（波長260nm）で反応産物を定量し、反応産物量から、酵素活性を算出した。HPLCはODSカラムを用いる逆相クロマトグラフィで、反応産物を分離定性定量した。移動相はリン酸緩衝液（0.1M, pH2.5～4）を基本とし、メタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒で泳動時間を調節した。（表1, 2, 3, 4）

C. 研究結果

このHPLC法で、酵素活性測定可能となったのは有機酸代謝異常症のメチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、イソ吉草酸血症、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症、3-メチルクロトニルグリシン尿症、楓糖尿症の6種、脂肪酸代謝異常症の中鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症、極長鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症、グルタル酸尿症1型の3種、計9種である。

D. 考察

本診断法は、スクリーニングで発見された患者をその日のうちに診断できる迅速確実な方法で、測定に用いる基質などの試薬類もすべて市販品で容易に入手可能で、一検体あたりの費用も5000円強とCP比も高い。HPLCもUV検出器を備えた一般のもので可能である。また、採血量も少なく、患者負担も少ない。これらの特徴から、タンデム型質量分析計でのマススクリーニングが全国的に実施された際に、中核センターに具備し、確定診断に備えるに、最も簡便な方法と考える。

現在9種の疾患の診断が可能で、タンデム型質量分析計によるスクリーニングで発見される疾患の3分の2強が診断可能である。さらに、現在検討中のものに、ホロカルボキシラーゼ欠損症、短鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症、3-ケトチオラー

ゼ欠損症の3種がある。これらが確立されれば、グルタル酸尿症2型を除いて頻度の高い疾患はほぼ全例が診断可能となる。比較的頻度の高いグルタル酸尿症2型に関しては酵素欠損ではなく、電子伝達蛋白の欠損であるために、酵素診断は不可能で、他の方法を考える必要がある。

E. 結論

タンデム型質量分析計によるスクリーニングとHPLCによる本診断法を組み合わせれば、迅速確実なスクリーニング体制が構築できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Andi Dwi Bahagia Febriani, Akiko Sakamoto, Hiroaki Ono, Nobuo Sakura, Kazuhiro Ueda, Chiyoko Yoshii, Miho Kubota, and Junko Yanagawa. Determination of totalhomocysteine in dried blood spots using high performance liquid chromatography for homocystinuria newborn screening. *Ped Internat*, 46:5-9, 2004
- 2) Y Nishimura, G Tajima, A Dwi Bahagia, A Sakamoto, H Ono, N Sakura, K Naito, M Hamakawa, C Yoshii, M Kubota, K Kobayashi, T Saeki. Differential diagnosis of neonatal mildhypergalactosemia detected by mass screening: Clinical significance of portal vein imaging. *J Inher Metab Dis*, 27:11-18, 2004
- 3) G Tajima, H Yofune, A D Bahagia Febriani, Y Nishimura, H Ono, and N Sakura. A simple and rapid enzymatic assay for the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex using high performance liquid chromatography. *J Inher Metab Dis*, 27:633-639, 2004

4) 久保田美穂、吉井千代子、渡川美弥子、柳川
順子、浜川以行、但馬剛、西村裕、小野浩明、
佐倉伸夫、重松陽介
タンデム型質量分析計による新生児マス・ス
クリーニング:広島県における5年間のまとめ
日本マス・スクリーニング学会誌
24:41-44, 2004

Medium-chain acyl-CoA
dehydrogenase deficiency found through
tandem mass spectrometry newborn
screening in Japan.
Society for the Study of Inborn Errors
of Metabolism (SSIEM)
41st Annual Symposium, Amsterdam,
2004/8/31-9/4

G. 学会発表

Go Tajima, Nobuo Sakura, Yosuke
Shigematsu

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 アシル CoA 脱水素酵素の測定条件

酵素	イソヴァレリルCoA脱水素酵素 (IVDH)	グルタリルCoA脱水素酵素 (GDH)
反応系		
緩衝液	40mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	40mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)
基質	1mM Isovaleryl-CoA	3mM Glutaryl-CoA
補因子	2mM PMS(phenazine methosulfate)	2mM PMS
	0.1mM FAD	0.1mM FAD
細胞数	1 × 10 ⁶	1 × 10 ⁶
反応時間	30 min	30 min
反応温度	37°C	37°C
反応停止	0.3N HClO ₄	0.3N HClO ₄
HPLC		
カラム	ODS-II	
移動相	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4.0) Acetonitrile 13%	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 2.5) Methanol 15.5%
流速	1.5 ml/min	1.5 ml/min

表2 アシルCoAカルボキシラーゼの測定条件

酵素	プロピオニルCoAカルボキシラーゼ (PCC)	3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ (3MCC)
反応系		
緩衝液	40mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	40mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)
基質	0.5mM Propionyl-CoA	0.5mM 3-Methylcrotonyl-CoA
補因子	3mM ATP	3mM ATP
	5mM MgCl ₂	5mM MgCl ₂
	30mM NaHCO ₃	30mM NaHCO ₃
細胞数	1 × 10 ⁶	0.1 × 10 ⁶
反応時間	20 min	5 min
反応温度	37°C	37°C
反応停止	0.3N HClO ₄	0.3N HClO ₄
HPLC		
カラム	ODS-II	ODS-II
移動相	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 2.5) Methanol 17%	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 2.5) Methanol 27%
流速	1.5 ml/min	1.5 ml/min

表3 有機酸代謝酵素の測定条件

酵素	メチルマロニルCoAムターゼ (MMCM)	HMG-CoAリアーゼ (HMGL)	分枝鎖ケト酸脱水素酵素 (BCKADH)
反応系			
緩衝液	50mM Tris-sulfate (pH 7.5)	50mM Tris-HCl (pH 8.2)	30mM Tris-HCl + 0.12mM EDTA (pH 7.5)
基質	3mM Methylmalonyl-CoA	2mM HMG-CoA	7.5mM 2-ketoisocaproic acid
補因子	0.25mM Adenosylcobalamin 0.25mM NaCN	5mM Dithiothreitol 20mM MgCl ₂	7.5mM CoA trilithium salt 1mM TPP 4mM NAD 35mM MgCl ₂
細胞数	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶ Frozen & thawed in 50mM Tris-HCl + 0.2mM EDTA (pH 7.5)
反応時間	Pre-incubation with VB12 for 10min Incubation with MM-CoA for 20min	5 min	60min
反応温度	37°C	37°C	37°C
反応停止	0.3N HClO ₄	0.3N HClO ₄	0.3N HClO ₄
HPLC			
カラム	ODS-II	ODS-II	ODS-II
移動相	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 2.5) Methanol 12%	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 2.5) Methanol 13%	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4.0) acetonitrile 15%
流速	1.5 ml/min	1.5 ml/min	1.5 ml/min

表4 β 酸化酵素の測定条件

酵素	極長鎖脂肪酸脱水素酵素 (VLCAD)	中鎖脂肪酸脱水素酵素 (MCAD)
反応系		
緩衝液	40mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	40mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)
基質	2mM palmitoyl-CoA	2mM octanoyl-CoA
補因子	2mM PMS 0.1mM FAD	0.5mM ferrocenium
細胞数	1×10^6 sonicated in 0.4% taurodeoxycholate	1×10^6
反応時間	10 min	10 min
反応温度	37°C	37°C
反応停止	acetonitrile	0.3N HClO ₄
HPLC		
カラム	ODS-II	ODS-II
移動相	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4.0) Acetonitrile 49%	100mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4.0) Acetonitrile 28%
流速	1.5 ml/min	1.5 ml/min

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：新しい新生児マス・スクリーニング体制に関する研究

β -ケトチオラーゼ欠損症の酵素、蛋白、遺伝子診断に関する研究

研究要旨

β -ケトチオラーゼ（T2）欠損症は生後数カ月から 2 才で重篤なケトアシドーシス発作をきたす有機酸代謝異常症である。発作間欠期はまったく無症状であり、発作をきたす前に新生児マススクリーニングにてタンデムマス、有機酸分析にてスクリーニングが可能な疾患と考えられ、その後の酵素診断、蛋白遺伝子診断などの確定診断を行うことが必要である。これまで行ってきた 5 2 例の酵素、蛋白、遺伝子診断について、マススクリーニングにて“疑い”例が出た場合にどのような方法が適切であるのかという観点から再検討を行った。その結果 T2 欠損症においては、酵素活性を行うのが望ましいが細胞培養の時間がかかることを考えると、イムノブロットおよび遺伝子解析で行ったほうが迅速で有用であると考えられた。

研究協力者

深尾 敏幸（岐阜大学大学院医学研究科小児病態学 助教授）

A, B 研究目的と方法

β -ケトチオラーゼ欠損症は生後数カ月から 2 才で重篤なケトアシドーシス発作をきたす有機酸代謝異常症である。発作間欠期はまったく無症状であり、発作をきたす前に新生児マススクリーニングにてタンデムマス、有機酸分析にてスクリーニングが可能な疾患と考えられ、その後の酵素診断、蛋白遺伝子診断などの確定診断を行うことが必要である。我々はこれまで 5 2 例の β -ケトチオラーゼ欠損症を解析してきた。その経験から酵素、蛋白、遺伝子診断について再検討をおこなった。

C, D 研究結果と考察

[酵素診断]

酵素診断は 3 種類が報告されているが、我々はカリウム依存性アセトアセチル-CoA チオラーゼ活性を測定してきた。線維芽細胞、リンパ芽球を用いた場合、本法では残存活性の評価は難しく、感度がいい測定法ではないが、患者診断には有用であった。末梢血単核球を用いた場合、赤血球の混入が影響し診断が難しい場合が多く、酵素診断のためには線維芽細胞、リンパ芽球の培養が必要で、時間がかかる難点がある。

[蛋白診断]

T2 欠損症 5 2 例のイムノブロット解析では 5 1 例で T2 蛋白は著しい減少もしくは検出されなかった。わずか 1 例では正常コントロールと同程度の T2 蛋白が検出された。以上から T2 欠損症においては蛋白診断も有用であると考えられた。

[遺伝子診断]

遺伝子解析にて約半数はスプライシング異常やフレームシフトおよびナンセンス変異であり、ミスセンス変異が約半数を占めた。これまでは研究目的のた

めすべてのミスセンス変異は発現実験により確認したが、A5P以外はすべて病因となる遺伝子変異であった。以上からゲノム遺伝子のPCR,ダイレクトシークエンスによる遺伝子診断は迅速で確実な方法であると考えられた。

E 結論

マススクリーニングで疑い例が出ることを想定してT2欠損症の診断について再検討を行った。免疫ブロット解析による蛋白診断,ゲノム遺伝子解析による遺伝子診断は,活性測定より迅速でT2欠損症では有用である。

G 研究発表

論文発表

- 1) Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA: Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acid 70:243-251 (2004)
- 2) Fukao T, Chen P, Ren J, Kaneko H, Zhang GX, Kondo M, Yamamoto K, Furuichi Y, Takeda S, Kondo N, Lavin MF: Disruption of the BLM gene in ATM-null DT40 cells does not exacerbate either phenotype *Oncogene* 23:1498-1506, 2004
- 3) Asano T, Kaneko H, Terada T, Kasahara Y, Fukao T, Kasahara K, Kondo N: Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 136:284-290, 2004
- 4) Nagao-Watanabe M, Fukao T, Matsui E, Kaneko H, Inoue R, Kawamoto N, Kasahara K, Nagai M, Ichiki Y, Kitajima Y, Kondo N: Identification of somatic and germ-line mosaicism for a keratin 5 mutation in epidermolysis bullosa simplex in a family of which the proband was previously regarded as a sporadic case. *Clin Genet* 66:236-238, 2004
- 5) Zhang G-X, Fukao T, Rolland M-O, Zobot M-T, Renom G, Touma E, Kondo M, Matsuo N, Kondo N: The mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency: T2-deficient patients with mild mutation(s) were previously misinterpreted as normal by the coupled assay with tiglyl-CoA. *Pediatr Res* 56:60-64, 2004
- 6) Kaneko H, Isogai K, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yachie A, Seki H, Koizumi S, Arai M, Utunomiya J, Miki Y, Kondo N: Relatively common mutations of the Bloom syndrome gene in the Japanese population. *Int J Mol Med* 14:439-442, 2004.
- 7) Longo N, Fukao T, Singh R, Pasquali M, Barrios

RG, Kondo N, Gibson KM. Succinyl-CoA:3-keto acid transferase (SCOT) deficiency in a new patient homozygous for an R217X mutation. *J Inher Metab Dis* 27:691-692, 2004

8) Fukao T, Shintaku H, Kusubae R, Zhang X-Q, Nakamura K, Kondo M, Kondo N. Patients homozygous for the T435N mutation of succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) do not show permanent ketosis. *Pediatr Res* 56:858-863, 2004

学会発表

深尾敏幸, 櫻井里美, 張改秀, 近藤直実: 南アフリカのSCOT欠損症兄弟例の蛋白遺伝子解析. 日本先天代謝異常学会総会(第47回)(2004年11月11-13日, 宇都宮)

櫻井里美, 深尾敏幸, 張改秀, 近藤直実: ミトコンドリア・アセトアセチル-CoAチオラーゼ欠損症10例に認められた遺伝子変異の特徴. 日本先天代謝異常学会総会(第47回)(2004年11月11-13日, 宇都宮)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

日本人極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症の臨床的・遺伝的特徴

研究要旨

最近、日本でも脂肪酸代謝異常症患者の報告が増加している。中鎖アシル CoA 脱水素酵素（MCAD）欠損症は欧米で頻度が高い疾患であるが、日本では VLCAD 欠損症と診断される患者が増加している。我々は VLCAD 欠損症について生化学的分析および遺伝子解析を行ってきた。これまでに VLCAD 欠損症と診断された患者のほとんどは中間型と骨格筋型であり、重症型の多い欧米とは対照的である。酵素活性では臨床的重症度との関連が認められないが、イムノプロットによるタンパク発現は重症度との相関が認められた。遺伝子解析では骨格筋型の症例で exon9～14 に変異が集中しており、これは日本人症例の特徴であるかもしれない。本疾患は早期発見による発症予防効果が高い疾患と考えられ、タンデムマススクリーニングの対象疾患に適切といえる。

研究協力者

長谷川有紀、小林弘典、木村正彦、山口清次
（島根大学小児科）
重松陽介（福井大学看護学科・小児科）
深尾敏幸（岐阜大学小児病態学）
大橋裕子、西野一三（国立精神神経センター）

3) 酵素活性測定

皮膚線維芽細胞もしくは筋組織を用いて、既報¹⁾の Ferricinium 法によって測定した。

4) イムノプロット

皮膚線維芽細胞もしくは筋組織を用いて、アルカリフォスファターゼ発色法で行った。

5) 遺伝子解析

既報の方法²⁾によって RT-PCR、サブクローニングを行い、その後にシーケンスを行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析に当たり各患者および両親に説明を行い、解析への同意を得た。

A. 研究目的

タンデムマスの普及により我が国で発見される脂肪酸代謝異常症患者数が増加し、中でも VLCAD 欠損症は増加している。臨床的・遺伝的特徴を解析することは、早期発見による発症予防効果と比較する上で重要であるので、日本人患者の臨床的、生化学的検討を行った。

B. 研究方法

1) 臨床病型の解析

発症年齢と初発症状、検査データの特徴を各施設の報告から検討した。

2) 血中アシルカルニチン分析

ガスリーろ紙を用いてタンデムマスによる解析を行った。

C. 研究結果

1) 臨床病型（図 1）

マススクリーニングによる未発症例 1 例を含む 23 例について解析を行った。重症型は認められず、中間型が 3 例、骨格筋型が 19 例であった。中間型は急性脳症様または低血糖症状を示したが、骨格筋型はいずれも低血糖はなく、

筋肉痛や反復するミオグロビン尿を契機に発見された。骨格筋型の発症年齢は9か月～30歳代と幅広かったが、幼児期発症例が欧米の報告に比べ多い傾向がみられた。

2) 血中アシルカルニチン分析 (図1)

未発症例を含む全例でC14:1アシルカルニチンの増加が認められ、早期診断に非常に有用であった。

3) 酵素活性測定 (図2)

パルミトイルCoA脱水素酵素活性の絶対値およびオクタノイルCoA脱水素酵素活性との比(C16/C8)は、コントロール群と比較して明らかに低下していた。しかし、中間型と骨格筋型との間には活性に有意差はなく、活性値と臨床的重症度とは相関しないと考えられた。

4) イムノプロット

中間型の3例ではいずれもVLCADタンパクの発現がほとんど認められなかった。骨格筋型では発現をほとんど認めないものからコントロールと同程度まで、様々なパターンが認められた。これを臨床症状と比較すると、骨格筋型の中でも重症度の高い症例ではタンパク発現は低いなど、臨床的重症度との相関がみられた。(データは示していない)

5) 遺伝子解析 (図3)

22例で遺伝子解析が終了した。骨格筋型は特に exon9～14 に遺伝子変異が集中しており、K264Eが44 allele 中11 allele に、K382Qが7 allele にみられるなど、共通変異もいくつか認められた。これはVLCAD欠損症では高頻度変異はないといわれてきたが、日本人患者では一定の頻度を持つ遺伝子変異のある可能性が示唆された。

D. 考察と結論

タンデムマスが普及し、脂肪酸代謝異常症の概念が広まるにつれて、高CK血症や横紋筋融解症を反復する患者の中からも、VLCAD欠損症のようなβ酸化異常症の発見が増加している。今回の検討でも原因不明のミオパチーとされていた成人症例から多くのVLCAD欠損症が発見された。なかでも骨格筋型の日本人症例では共通変異を持つ率が高く、これまでの欧米の報告と異なっていることは興味深い。

このような脂肪酸代謝異常症の診断にはタンデムマスは不可欠であり、今回の症例でもすべてにC14:1アシルカルニチンの増加を検出できた。VLCAD欠損症は一般に正常な発育発達を示す。新生児マススクリーニングが実現すれば、新生児期発症例の発見と早期治療が可能となり、その社会的貢献度は高いと考える。

文献

- 1) Lehman TC, Hale DE, Bhala A, Thorpe C: An acyl-coenzyme A dehydrogenase assay utilizing the ferricenium ion. *Anal Biochem* 186: 280-284, 1990.
- 2) Watanabe H, Orii KE, Fukao T, Song XQ, Aoyama T, Ijlst L, Ruiten J, Wanders RJ, Kondo N: Molecular basis of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three Israeli patients: identification of a complex mutant allele with P65L and K247Q mutations, the former being an exonic mutation causing exon 3 skipping. *Hum Mutat* 15: 430-438, 2000.

臨床型	症例	発症年齢	家族歴	症状			C14:1アシル カルニチン
				急性脳症様	低血糖	筋肉痛/ミオグロビン尿	
中間型	1	1y	+	+	+	-	+
	2	1y	-	+	+	-	+
	3	4y	-	-	+	-	+
骨格筋型	4	8m	-	-	-	+	+
	5	1y	-	-	-	+	+
	6	2y	-	-	-	+	+
	7	3y	-	-	-	+	+
	8	8y	+	-	-	+	+
	9	8y	-	-	-	+	+
	10	10y	-	-	-	+	+
	11	10y	-	-	-	+	+
	12	13y	-	-	-	+	+
	13	13y	-	-	-	+	+
	14	13y	-	-	-	+	+
	15	13y	-	-	-	+	+
	16	14y	-	-	-	+	+
	17	14y	+	-	-	+	+
	18	16y	+	-	-	+	+
	19	16y	+	-	-	+	+
	20	19y	-	-	-	+	+
	21	20y	+	-	-	+	+
	22	30y	-	-	-	+	+
未発症	23	5d	-	-	-	-	+

図 1. VLCAD 欠損症患者の臨床像

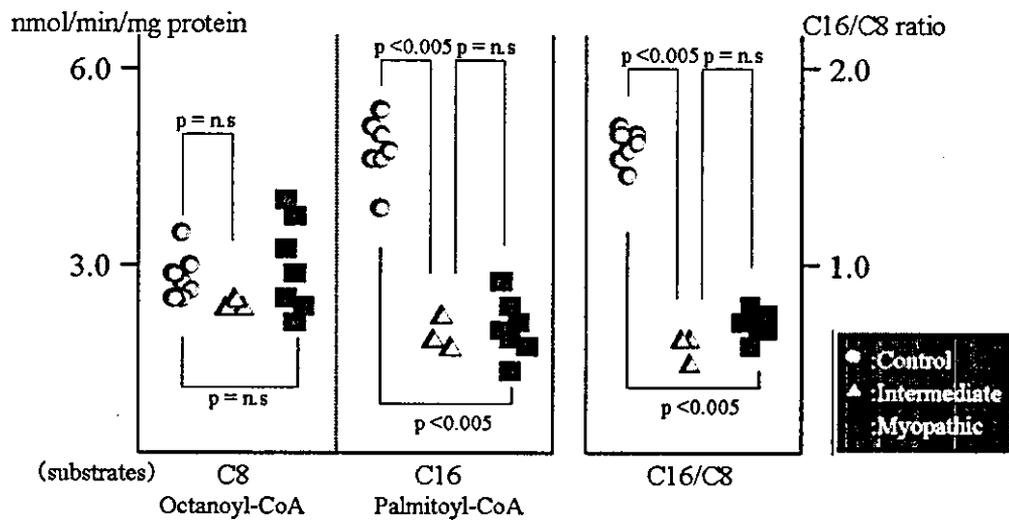


図 2. VLCAD 欠損症患者アシル CoA 脱水素酵素活性

遺伝子変異の頻度 (44 allele)	
K264E (Exon 9)	: 11
997 ins T (Exon 10)	: 4
K382Q (Exon 11)	: 7
A416T (Exon 12)	: 4
R450H (Exon 14)	: 5

図 3. 日本人 VLCAD 欠損症患者の遺伝子変異

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

尿のメタボローム解析による新生児マススクリーニング試験研究

研究要旨

金沢医科大研究班ではメタボロームの概念を先取りした、ろ紙尿 ウレアーゼ GC/MS 法を用い、新生児マススクリーニング試験研究を継続し、これまで 12 の対象疾患で計 17 例を発見し、その検出率は 1 例/1,100 児であった（久留米大との合同では 7.3 万児を対象に 20 の対象疾患で計 56 例を発見した）。この検出率はろ紙血タンデムマス法の 6.6 倍高値であり、日本人の遺伝特性にも非常に合った手法と考えられる。一方、ハイリスクスクリーニングでは 4,000 名を対象に 39 の対象疾患で 1 例/40 名の、このうち新生児では 1 例/12 名の割合で、該当患者を発見した。本スクリーニング法は多くが確定化学診断となるのみでなく、発見率も高く、その有用性はきわめて高い。尿メタボローム解析では日本人に約 2 万人に 1 人の発生率のメチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症を見逃し無く検出できるうえ、前 2 者では二次検査や負荷試験の必要もない。これらの 3 疾患の治療効果の高精度モニタリングにも利用できる。

研究協力者

久原とみ子

（金沢医科大学総合医学研究所）

共同研究者

大瀬守真 （同上）

井上義人 （同上）

新家敏弘 （同上）

哲翁正博 （博愛会哲翁病院）

研究目的

メタボロームの概念を先取りした、ろ紙尿 ウレアーゼ GC/MS 法を用い、新生児マススクリーニング試験研究（以下、ローリスクスクリーニングと略）とハイリスクスクリーニングを行い、日本人に多い疾患とその発生率、本法の検出率、化学診断の精度を明らかにする。また、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症同様、いずれも日本人に最も多いプロピオン酸血症、メチルマロン酸血症の高精度のスクリーニング、ろ紙血のタンデム MS (TMS 法) の二次スクリーニングとして用いる場合のスクリーニングの流れ、化学診断後の治療効果のモニタリングについて検討する。

研究方法

ろ紙尿を用いる 22 項目の新生児スクリーニング試験研究は原則として、両親のインフォームドコンセントを得、郵送されてきたろ紙尿を検体として用いた。長崎、熊本、金沢、神戸の 6 医療機関の協力を得た。分析は簡易ウレアーゼ法・安定同位体希釈法・GC/MS 法¹⁾で行った。

国内のハイリスク児の化学診断も同手法で行った。

研究結果と考察

1. 21 世紀の個別化医療に対応

ポストゲノムの 21 世紀、生命科学の中心となるメタボロームとプロテオームの両分野で、質量分析 (MS) 法は中心的な手法となる。金沢医科大ではメタボロームの概念を先取りした、ろ紙尿 ウレアーゼ GC/MS 法を用い、診断の指標物質の被検者における異常度を多くは $\text{mean} + n \text{SD}$ の n 値で表示し、130 種以上の疾患を化学診断している¹⁾。その殆どの疾患の診断精度が確定診断に近い（ごく一部はスクリーニング）。さらに対象疾患に該当しなかった場合でも、対象とする多種類の疾患の可能性を否定できたということであり、その情報を有する被験者はその生涯にわたり、個別化医療の恩恵を受けることができる。

2. スクリーニング成績

ローリスクスクリーニングでこれまで 12 疾患、17 例を発見し、その検出率は 1 例/1,100 児であった（久留米大との合同では 7.3 万児を対象に 20 疾患、56 例を発見した）。一方、ハイリスクスクリーニングでは 4,000 名を対象に 39 疾患、1 例/40 名の、このうち新生児では 1 例/12 名の割合で、該当患者が発見された。

なお金沢医大のローリスクスクリーニングで発見、化学診断されたハートナップ病の 1 例は本疾患の原因遺伝子の同定に役立った²⁾。

3. 日本人に多い3疾患の化学診断の流れ (一次、二次スクリーニング)

ローリスクとハイリスク新生児スクリーニング成績から、プロピオン酸血症やメチルマロン酸血症の発生率は2万人に1人(原因不明のメチルマロン酸血症も含めるとその2倍)であると推定された。

ろ紙血のタンデム MS(TMS)法でプロピオニルカルニチンが高値と判定されると、プロピオン酸血症①、メチルマロン酸血症②、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症③の可能性があり、その鑑別が必要となる。非常にまれにその他の疾患④、偽陽性で健常⑤の可能性もある。更に①~③のいずれかであるのに偽陰性となる可能性がある(①⁻, ②⁻, ③⁻)。見逃しの確率は①<<②≤③である。

ろ紙尿のウレアーゼ・GC/MS法では①~⑤を1回の検査で高感度に見逃しなく検出し、化学診断確定できる。従って一次検査のみならず、TMSの二次検査に用いても二次の被検者については多項目、高感度、高精度のろ紙尿ウレアーゼ・GC/MS法を一次検査として受けたに等しく、その意義は深い。しかしTMSで見つかった多くの長鎖脂肪酸代謝異常症の二次スクリーニングに尿の分析を行っても余り効果は期待できない。

二次検査に酵素法を用いる場合は対象疾患が予め特定されていることが必要であり、仮に特定に誤りがあれば、そうではなかったという結論が得られるに過ぎない。

OTC欠損症はカルバミルリン酸が増加する他の原発性高アンモニア血症同様に orotate の増加が指標となるのでその安定同位体希釈法を採用する本法では高感度、高精度にスクリーニングできる¹⁾。

日本人に多い OTC 欠損症はハイリスク新生児で1例/76名とプロピオン酸血症やメチルマロン酸血症と同等の頻度であった。この OTC 欠損症は本法では尿の有機溶媒抽出による有機酸分析法(UOA)より高感度で検出されるが、TMSでは検出は不可能である。

4. 化学診断後の治療効果のモニタリング

治療効果のモニタリングとしての有用性で言えば、当尿ウレアーゼ・GC/MS法では例えばプロピオン酸血症と化学診断で確定した場合、治療により低値下した指標物質メチルクエン酸の、あるいは orotate が増加する原発性高アンモニア血症と確定した場合、指標物質 orotate の定量もできる。プロピオニルカルニチンはモニタリングには使えないと考える。

5. 患者の立場に立つ視点

TMS法は長鎖脂肪酸代謝異常症のスクリーニングに適しており、尿GC/MS法ではそのスクリ

ーニングは不可能である。しかし、尿のメタボローム解析法による発見率が約1児/1,000新生児と、ろ紙血のTMS法の6.6倍高値ということは本法が日本人の遺伝特性に合った検体(尿)と検査手法(ウレアーゼ・GC/MS法)であることを意味する。コストに言及すれば発見率が6倍高ければ控え目にみても2倍のコストでもよいかも知れない。更に二次検査や負荷試験が殆ど不要となれば例えばここで5倍のコストでもよい、となれば2×5=10倍のコストでもよいと考えられる。仮にTMS法が2,000円なら、20,000円でも2,000円と同様の安価な検査料と考えることもできる。

情報が恒常な遺伝子の解析と異なり、代謝物の一斉分析は病態生化学、質量分析学、化学などの総合的知識や技術を要する。従って、テイラーメイド医療や患者の視点に立つ新しい概念にふさわしい新しいシステムの構築(専門家、検査機関、リスク管理、検体収集など)が望まれる。

結論

日本人の遺伝特性からみて尿メタボローム解析法はハイリスク児のみならずローリスク児にも活用されることの21世紀における意義は大きい。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinka T., Kuhara T.: Quantification of urinary 5-aminolevulinic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 806: 19-23, 2004.
- 2) Inoue Y., Kuhara T.: Rapid and sensitive screening for and chemical diagnosis of Canavan disease by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 806: 33-39, 2004.
- 3) Kuhara T.: Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism. *Mass Spectrom. Rev.* 2004 Sep 16, on-line.

2. 学会発表

- 1) 哲翁正博、久原とみ子: ガスクロマトー質量分析法を用いた多項目化学診断システムの先天性代謝異常症新生児スクリーニングへの応用(II報). 第56回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 東京, 2004年4月.
- 2) 新家敏弘、久原とみ子: ろ紙吸着尿GC/MS分析によるチロジン症I型の化学診断. 第29回日本医用マススペクトル学会年会, 出雲, 2004年9月.

- 3) 井上義人、新家敏弘、大瀬守眞、久原とみ子：
高尿酸血症 II 型の化学診断 — グリセリン
酸の光学異性体分離分析 —。第 29 回日本医
用マスペクトル学会年会，出雲，2004 年 9
月。
- 4) 久原とみ子：GC-MS を用いるヒトろ紙尿メタ
ボローム解析とハイリスクの新生児から成
人までの診断システム。第 47 回日本先天代
謝異常学会，宇都宮，2004 年 11 月。
- 5) 大浦敏博、小泉昭夫、クレタ ロバート、金
井好克、井上純子、松浦範夫、野崎潤一、久
原とみ子、坂本修、飯沼一字：Hartnup 病：
病因遺伝子の同定および日本人 3 家系の遺
伝子解析。第 47 回日本先天代謝異常学会，
宇都宮，2004 年 11 月。

文献

- 1) Kuhara T.: Gas chromatographic-mass
spectrometric urinary metabolome
analysis to study mutations of inborn
errors of metabolism. Mass Spectrom.
Rev. 2004 Sep 16, on-line.
- 2) Kleta R. et al.: Mutations in SLC6A19,
encoding BOAT1, cause Hartnup disorder.
Nat. Genet. 36: 999-1002, 2004.

ろ紙尿新生児マスキリーニング試験研究の患児発見率，日本人に多い疾患の確定度とその予想
発生率

	疾患名	ろ紙尿ウレアーゼ法 GC/MS		ろ紙血 タンデムMS	ろ紙血 ガスリー等
		確定度	7.3 万人 ^a	25 万人 ^b	3,000 万人 ^c
1	プロピオン酸血症	AAA	2.4	3.5*	—
2	メチルマロン酸血症 (同血症)	AAA	0.6 (2.0)	8.3*	—
3	神経芽細胞腫	AAA	2.4	—	—
4	グリセロール尿症	AAA	1.8	—	—
5	ホモシスチン尿症・メチルマロン酸尿症	AAa	3.6	—	—
6	ガラクトース血症	AA	可	—	3.5
7	シトリン欠損症	A	可	6.2	—
8	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	AA	7.3	—	—
9	高フェニルアラニン血症	AAA	7.3 ^d	6.2*	7.7
10	メーブルシロップ尿症	AAA	7.3	可	50.3
11	ホモシスチン尿症	AAa	可	可	18.1
12	乳酸尿症	Aa	7.3	—	—
13	シトルリン血症	AA	7.3**	14.0**	—
14	アルギニノコハク酸尿症	AA	可	25.0	—
15	中鎖アシル-CoA DH 欠損症	Aa	可	8.3	—
疾患項目総数			20	14	4
異常例数			57	34	1,829
患児発見率			1/1,100~1,300	1/7,300	1/16,400

数値は予想発生率，これまでの検査数という限定付であるが，X 万新生児あたり 1 人見つかる時の X。

a 金沢医大と久留米大の成績 b 福井大 重松教授ホームページより c 特殊ミルク情報

d 島根大と 3 機関計で正しくは 7.7 万人に 1 例

AAA 殆ど 1 回の分析でスクリーニングでき化学診断も確定。 A, Aa は疾患の特性，尿検体であるなどの理由
で全てをスクリーニングはできないか，特定に他の分析を要する。

可は可能，— は検出せず，または検出不能。

*陽性なら GC/MS による尿メタボローム解析または有機酸分析が必須。

**相互にアミノ酸またはオロト酸の測定が必要。

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

新生児先天性代謝異常症スクリーニングにおけるGC/MSとMS/MSの相補性

研究要旨

新生児先天性代謝異常スクリーニングにおいてタンデム質量分析法(MS/MS)を用いることは世界の流れになっている。しかし、MS/MS でアプローチできない疾患が存在することも事実である。今回、ガスクロマトー質量分析法(GC/MS)によるスクリーニングと比較した結果、GC/MSとMS/MSの利点、欠点を明らかにして、単なる欧米の模倣ではなく、我が国の状況を踏まえた新生児スクリーニング体制を構築することが必要と考えられた。

研究協力者

吉田一郎、猪口隆洋、青木久美子、田代恭子、稲場美佐、文森明代、松本かおり、原 千尋、田中正敏（久留米大学医学部GC/MS医学応用研究施設、医学教育学）

チルマロン酸血症が約5000人に1名という高い頻度で発見されることが判明した。これは内分泌疾患を除くと、我が国の先天性代謝異常症の中では、最も頻度が高く、重要である。神経芽細胞腫の前例もあり、本来ならばメチルマロン酸血症単独のスクリーニングを開始してもよいと考えられる。一方、これらのメチルマロン酸血症患児の血液濾紙をMS/MSで測定すると血中プロピオニルカルニチン値は、大半がカットオフ値以下であることが判明し、MS/MSスクリーニングではメチルマロン酸血症患児の大半を見逃すことが想定される（事実、重松らのMS/MSによるスクリーニングではメチルマロン酸血症の頻度は8万人に1名であり、GC/MS法の16分の1という低頻度である）。

A. 研究目的

新生児先天性代謝異常スクリーニングにおけるGC/MSとMS/MSという2つの質量分析法について、GC/MSとMS/MSの相補性について、検討することを目的として本研究を実施した。

さらに、尿による新生児スクリーニングで発見されたハルトナップ病のように血液中では異常所見を示さず、このような場合には血液濾紙をもちいるMS/MS法ではスクリーニングできないことが確認され、MS/MS法では診断できない多くの疾患があることも明らかになった。一方、グルタル酸尿症2型のように診断マーカーの代謝産物がごく少量しか、尿中に排泄されない場合、GC/MS法で診断のレベルまで、言及することは困難と考えられた。先天性脂肪酸代謝異常症の多くも尿によるスクリーニングでは診断が不可能

B. 研究方法

尿を用いるGC/MS法での新生児先天性代謝異常スクリーニングで発見された患児を中心に、血液濾紙を使用して、後方視的にGC/MS法とMS/MS法との比較の観点から検討した。なおGC/MSおよびMS/MSによるスクリーニングは久留米大学医学部倫理委員会で承認され、インフォームドコンセントにもとづくものである。

C. 研究結果

私どもの尿による新生児スクリーニングでは、メ

であろう。また私どもの新生児尿スクリーニング開始当初、発症前に尿中オロト酸、ウラシルを診断マーカーとしてOTC欠損症を発見することが出来たため、GC/MS法でOTC欠損症が容易にスクリーニングできると期待された。しかし、その後の新生児尿によるスクリーニングの経験で、良性と考えられるオロト酸尿やウラシル尿が高頻度で発見され、診断特異性の点から、オロト酸やウラシルを診断マーカーとするGC/MS法でのOTC欠損症スクリーニングはよい方法とは考えられないと判断した。最近では、MS/MS法でもOTC欠損症のスクリーニングは不可能と考える意見が主流となっている。このようにGC/MS、MS/MSのどちらによってもスクリーニングが困難な疾患も存在する。

D. 考察

現在、世界の新生児スクリーニングにおいてはMS/MS法が主流となっている。例えば、米国カリフォルニア州でも2005年からは、MS/MS法により30種類以上の先天性代謝異常症のスクリーニングが開始されることになっている。一方、欧米諸国がMS/MS法を用いる主な理由のひとつは、フェニルケトン尿症と中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症が人種的に高頻度であることによる。我が国の現行のガスリー法によるマススクリーニングでは、スタート時に欧米の対象疾患をそのままストレートに、我が国のマススクリーニングの対象疾患とし、スクリーニング開始後も一部、見直しがあったものの、今なおホモシスチン尿症のような100万人に1人という疾患が対象疾患として残されている。先天性代謝異常症のような遺伝性疾患は人種差が大きく、それぞれの国で頻度に大きな差があり重要な疾患が異なるので欧米での対象疾患は我が国でのスクリーニングの対象モデルにはならない。我が国において頻度の高いメチルマロン酸血症のような疾患が対象疾患として優先されるべきと考える。一方、MS/MSの導入により、今までのGC/MS法では

アプローチできなかった先天性脂肪酸代謝異常症のような新しい疾患が、我が国で高頻度に発見される可能性があり、今後のパイロット研究における重要な課題と考えられる。

E. 結論

GC/MS法、MS/MS法のいずれも、得意とする疾患と、不得手な疾患がある。一方、先天性代謝異常症は人種差が大きく、欧米で重要な疾患が、必ずしも我が国で重要とはいえない。我が国で重要な疾患であるメチルマロン酸血症はMS/MSでは、見逃がされやすく、一方、GC/MS法では、正確にスクリーニングできることが明らかになったことからGC/MS法によるスクリーニングの全国的な実施が必要であろう。しかし、尿を用いるGC/MS法では先天性脂肪酸代謝異常症のスクリーニングは不可能であり、MS/MS法の普及により、我が国で先天性脂肪酸代謝異常症の実態が明らかにされることの意義は大きい。

G. 研究発表

1、論文発表

吉田一郎、尿素サイクル異常症スクリーニング、小児科、45、2020-2027、2004
矢野正二、吉田一郎、フェニルケトン尿症の治療成績、小児内科、36、1865-1872、2004

2、学会発表

青木久美子、吉田一郎、猪口隆洋、田代恭子、稲場美佐、文森明代、松本かおり、原千尋、田中正敏、タンデム質量分析法による新生児スクリーニング対象疾患の検討、第32回日本マススクリーニング学会、2004. 10. 8、仙台

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

LC/MS におけるムコ多糖症マススクリーニング法開発の可能性

研究要旨

ムコ多糖代謝異常症は、細胞外マトリックス成分であるムコ多糖(GAG)の分解酵素異常症であり、発症により GAG が生体内に蓄積する。現在まで LC/MS/MS を用いた GAG 分析研究により、定性面として硫酸基の数や結合位置の推測が可能であること。定量面として、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸の pmol レベルの高感度かつ迅速な定量が可能である。これらの知見を検証した結果、前処理法・分析条件の改善により LC/MS 法は臨床マススクリーニング法へ十分に適用可能であると考えられた。

研究協力者

小熊 敏弘（第一製薬・副主任研究員）
折居 忠夫（中部学院大学・教授、岐阜大学・名誉教授）

mm i.d. × 150 mm, 5 μm) (Waters)
ヘパラン硫酸 (HS) およびケラタン硫酸 (KS) :
CAPCELL PAK NH2 UG80 (2.0 mm i.d. × 10
mm, 5 μm) (資生堂)

A. 研究目的

ムコ多糖代謝異常症は、細胞外マトリックス成分であるムコ多糖(GAG)の分解酵素異常症であり、発症により GAG が生体内に蓄積する。このムコ多糖症の臨床マススクリーニング法に関しては、高感度かつ簡便な定量法は未だ確立されていない。一方、現在まで LC/MS を用いた GAG 分析研究 1-3) が展開されており、今回これらの結果を検討し、LC/MS によるムコ多糖症マススクリーニング法開発の可能性について検証した。

2. 実験

2.1. 定性分析

CS、HS および KS の二糖標準試料を移動相として 10 mM ギ酸アンモニウム/アセトニトリル (3:7, v/v) にて ESI イオン源に導入し、LC/MS および LC/MS/MS による分析を実施した。他の測定条件は次の通り。流速 0.2 mL/min、プローブ温度 425°C、注入量 20 μL、MS 検出 負イオンモード。

2.2. 定量法の検討

CS に関し、移動相として 2.5 mM テトラブチルアンモニウム ハイドロキシド (pH 3.5) /アセトニトリル (17:83, v/v)、流速 0.1 mL/min、ポストカラム添加としてアセトニトリル (0.15 mL/min)、注入量 5 μL にて LC/MS 分析を実施した。HS に関しては、移動相として 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 9.4) /アセトニトリル (9:1, v/v)、流速 0.2 mL/min、注入量 20 μL にて LC/MS/MS 分析を実施した。KS に関しては、移動相として 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 9.4)

B. 研究方法

1. 試験材料

1.1. 装置

三連四重極型質量分析計 API365 (Sciex)、高速液体クロマトグラフ Alliance 2690 System (Waters)

1.2. カラム

コンドロイチン硫酸 (CS) : Symmetry C18 (1.0

/アセトニトリル (3:2, v/v)、流速 0.2 mL/min、注入量 10 μ L にて LC/MS/MS 分析を実施した。いずれも他の測定条件は次の通り。プローブ温度 450°C、イオン化法 ターボイオンスプレー、MS 検出 負イオンモード。

C. 研究結果

1. 定性分析

LC/MS 分析により、硫酸基のない二糖は[M-H]⁻ および[2M-H]⁻を、一つの硫酸基を有する一硫酸化二糖体は[M-H]⁻を、二つの硫酸基を有する二硫酸化二糖体は[M-H]⁻および[M-SO₃-H]⁻を、さらに三つの硫酸基を有する三硫酸化二糖体については[M-H]⁻、[M-SO₃-H]⁻および[M-2SO₃-H]⁻を検出した。二硫酸および三硫酸化体に特徴的な MS パターンである、擬分子イオンから質量数 80 u および 160 u 低いフラグメントイオンを検出することで、糖鎖に含まれる硫酸基の数は容易に推定可能であった。

一方、LC/MS/MS 分析の結果、CS 由来の還元末端の 4 位または 6 位に硫酸基を持つ不飽和二糖である Δ Di-4S と Δ Di-6S はその MS/MS パターンに大きな差がみられた。HS 由来の Δ DiHS-NS は低エネルギー条件で、低分子のフラグメントイオンを主に検出することから、還元末端 2 位の N 硫酸基を持つ不飽和二糖は、還元末端 6 位に硫酸基を持つ二糖とは異なる MS/MS パターンを示す。また硫酸基のない二糖はいずれも低エネルギー条件で、低分子のフラグメントイオンが主に検出される。これらの MS/MS データは、二糖の結合様式(1-4 結合か 1-3 結合)と還元末端の硫酸基の位置を反映しており、MS/MS データから糖鎖に含まれる硫酸基の位置が推定可能であった。

2. 定量法の検討

硫酸基を持つ GAG である CS、HS および KS の構成二糖に関する各定量法として、LC/MS および LC/MS/MS による高感度定量法を検討した。CS 由来の不飽和二糖である Δ Di-4S および Δ Di-6S に関して、逆相 HPLC カラムを用いたイオンペア LC/MS による高感度定量法を確立した 1)。

本法は揮発性のイオンペア試薬を用いることにより、LC/MS 法では初めて Δ Di-4S および Δ Di-6S の分離定量に成功し、さらにアセトニトリルを HPLC 分離後にポストカラム添加することで、約 10 倍の高感度化を達成した。 Δ Di-4S および Δ Di-6S の定量限界は注入量として 0.43 pmol であった。

次に HS 由来の不飽和二糖である Δ DiHS-0S、 Δ DiHS-NS および Δ DiHS-6S に関して、LC/MS/MS による高感度定量法を確立した 2)。本法は各不飽和二糖のプレカーサーイオンがそれぞれ異なることから、分析時間が 3 分以内の迅速定量に成功、定量限界は注入量として Δ DiHS-0S で 3.1 pmol、 Δ DiHS-NS と Δ DiHS-6S は 0.3 pmol であった。

さらに KS 由来の二糖である Gal β 1-4GlcNAc(6S) および Gal(6S) β 1-4GlcNAc(6S) に関して、LC/MS/MS による高感度定量法を確立した 3)。本法は Gal(6S) β 1-4GlcNAc(6S) がイオン化の過程で容易に硫酸基の一つを脱離することを利用し [M-SO₃-H]⁻ イオンをプレカーサーイオンとして選択し、アミン結合型シリカのショートカラムを用いることで、両化合物を分析時間 5 分以内の迅速定量が可能であり、定量限界は注入量として Gal β 1-4GlcNAc(6S) で 0.17 pmol、Gal(6S) β 1-4GlcNAc(6S) は 0.10 pmol であった。

D. 考察

今まで、硫酸基を持つ化合物の LC/MS あるいは LC/MS/MS 分析は、一般的に逆相カラムを使用している。本研究により、硫酸基を有する化合物について揮発性のイオンペア試薬を用いたイオンペア LC/MS やアミン結合型シリカカラムをアルカリ条件で使用する負イオン検出 LC/MS/MS により pmol レベルまでの高感度分析が可能であることが明らかになった。

これらの知見に基づき、LC/MS/MS によるマスキング法開発の可能性について検証したい。まず MS/MS 検出では、今までの研究結果より負イオン検出によりマスキング法へ

の適用可能な高選択性が示されており、さらに HS および KS の同時定量の可能性も考えられる。一方、前処理法としてルーチン分析に適した簡便な操作方法の開発。HPLC 分離に関し、カラムへの保持を高め、生体由来成分のイオンサプレッション低減化などの課題が残る。これらを改善することで、LC/MS を用いたスクリーニング法の開発の可能性は十分にあると考える。

E. 結論

LC/MS/MS により各 GAG の高感度分析が可能である。前処理法および分析条件のさらなる改善により、LC/MS/MS を用いたムコ多糖症マスキング法の開発は十分に可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Oguma, H. Toyoda, T. Toida and T. Imanari: Analytical method of chondroitin/dermatan sulfates using high performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization mass spectrometry: application to analyses of the tumor tissue sections on glass slides. *Biomed. Chromatogr.* 15, 356-62 (2001).

2) T. Oguma, H. Toyoda, T. Toida and T. Imanari: Analytical method of heparan sulfates using high-performance liquid chromatography turbo-ionspray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 754, 153-9 (2001).

3) T. Oguma, H. Toyoda, T. Toida and T. Imanari: Analytical method for keratan sulfates by high-performance liquid chromatography/ turbo-ionspray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 290, 68-73 (2001).

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究課題：新しい新生児マススクリーニング体制に関する研究

新生児ろ紙血液中 α -L-iduronidase 活性測定によるムコ多糖症 I 型スクリーニングの可能性

研究要旨

ムコ多糖症 (MPS) I 型の欠損酵素である α -L-Iduronidase (以下 ID) について、ろ紙血中酵素活性測定法を開発し、新生児ろ紙血を用いたマス・スクリーニングの可能性を検討した。新生児スクリーニングろ紙血 3mm ディスク 1 枚を用いて、ろ紙血中 ID 活性を測定した結果、健常新生児 80 例の ID 活性は 4.83 ± 1.68 (mean \pm SD, nmol/ml blood /hr) であったが、MPS I 型患者 8 例では 1.11 ± 0.32 となり、患者群と健常群を良好に鑑別することが可能であった。本測定法は、基質の選択により、MPS I 型とともに、他の MPS スクリーニングの可能性は期待できるものの、病型に応じた測定系が必要であり、一次スクリーニング検査としての利用は難しいと考えられた。しかし、一次スクリーニング後の確認検査や精密検査において、ろ紙血を用いて酵素診断が可能な点で有用であると考えられた。

研究協力者

花井潤師, 田上泰子, 野町祥介, 水嶋好清,
福士 勝, 藤田晃三 (札幌市衛生研究所)
山口昭弘 (財) 日本食品分析センター)
窪田 満 (北海道大学病院小児科)
Nestor A. Chamoles (Laboratory of
Neurochemistry, Argentina)
折居忠夫 (中部学院大学)

研究目的

ムコ多糖症 (以下 MPS) は、リソゾーム酵素の異常により、ムコ多糖が体内に蓄積する疾患であるが、近年、骨髄移植、酵素補充療法、遺伝子治療などの治療法が現実になりつつある。これまで、尿中ムコ多糖測定によるスクリーニング方法が検討されてきたが、感度、特異性、検査時期などの問題から、有効なスクリーニングシステムが確立されていないのが現状である。

最近、Dr. Chamoles らにより、ろ紙血中ライソゾーム酵素活性測定法が報告された (以下、原報)¹⁾。今回、MPS I 型の欠損酵素である Iduronidase (以下 ID) について、ろ紙血中酵素活性測定法を開発し、新生児マス・スクリーニ

ングへの可能性を検討したので報告する。

研究方法

対象は、健常群として、新生児スクリーニングを受検したろ紙血で、患者群として、Dr. Chamoles から供与いただいた MPS I 型, II 型それぞれ 8 例, MPS I 型, II 型のキャリアそれぞれ 7 例, さらに、生後 7 カ月と 2 歳 2 カ月で MPS I 型と診断され、札幌市での新生児スクリーニングの受検が確認された患児 2 例であった。酵素活性測定用の基質は、4-methylumbelliferyl α -L-iduronide (以下 4-MU-ID, Glycosynth 社製) を用い、その他の試薬は特級品を使用した。

(倫理面への配慮)

新生児スクリーニングで使用したろ紙はあらかじめ二次利用の承諾を得たものを用い、患者検体については、あらかじめインフォームドコンセントを取得したものを用いた。

研究結果

(1) 測定方法：原報を元に、濾紙血中の血液成分による消光の影響を減少させる条件として、ろ紙血液 3mm ディスク 1 枚に、50 mmol/L ギ酸緩衝液 (pH2.8, 0.3 μ g D-saccharic acid-1,4-lactone を含む) 160 μ l を加え、2000 xg, 5 分間遠心し、抽出を行った。抽出液 20 μ l に、