

- ionization time-of-flight mass spectrometry with sphingosylphosphorylcholine as an internal standard Practical application to cardiac valves from patient with Fabry disease. *J Chromatogr B* 832: 97-102, 2006
- 19) Coman D, Huang J, McTaggart S, Sakamoto O, Ohura T, McGill J, Burke J: Renal Transplantation in a 14 year old girl with Vitamin B12 Responsive cblA Type Methylmalonic Acidaemia. *Pediatr Nephrol* 21: 270-273, 2006
 - 20) Yang Y, Sun F, Song J, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Zhang Y, Jiang Y, Qin J, Wu X: Clinical and biochemical studies on Chinese patients with methylmalonic aciduria. *J Child Neurol* 21: 1020-1024, 2006
 - 21) Sakamoto O, Ohura T, Matsubara Y, Takayanagi M, Tsuchiya S: Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia. *J Hum Genet* 52: 48-55, 2007
 - 22) Tokuhara D, Iijima M, Tamamori A, Ohura T, Takaya J, Maisawa S, Kobayashi K, Saheki T, Yamano T and Okano Y: Novel diagnostic approach to citrin deficiency: Analysis of citrin protein in lymphocytes. *Mol Genet Metab* 90: 30-36, 2007
 - 23) Sato H, Harada S, Yokoya S, et al: Treatment for childhood-onset Graves' disease in Japan: Results of a nationwide questionnaire survey of pediatric endo-crinologists and thyroidologists. *Thyroid* 17: 67-72, 2007
 - 24) Kondo M, Fukao T, Shinoda S, Kawamoto N, Kaneko H, Kato Z, Matsui E, Teramoto T, Nakano T, Kondo N: Lymphocyte responses to chymotrypsin- or trypsin V-digested b-lactoglobulin in patients with cow's milk allergy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (in press)
 - 25) Narumi Y, Aoki Y, Tetsuya Niihori T, Giovanni Neri G, Cavé H, Verloes A, Nava C, Kavamura MI, Okamoto N, Kurosawa K, Hennekam RCM, Wilson LC, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Lapunzina P, Ohashi H, Makita Y, Kondo I, Tsuchiya S, Ito E, Sameshima K, Kato K, Kure S, Matsubara Y: Molecular and clinical characterization of Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: Overlapping clinical manifestations with Costello Syndrome. *Am J Med Genet* (in press)
 - 26) Yamada K, Fukao T, Zhang G, Sakurai S, Ruiter JPN, Wanders RJA, Kondo N: Single-base substitution at the last nucleotide of exon 6 (c.671G >A), resulting in the skipping of exon 6, and exons 6 and 7 in human Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene. *Mol Genet Metab* (in press)
 - 27) Sakurai S, Fukao T, Haapalainen AM, Zhang G, Yamada S, Lilliu F, Yano S, Robinson P, Gibson MK, Wanders RJA, Mitchell GA, Wierenga RK, Kondo N: Kinetic and Expression Analyses of Seven Novel Mutations in Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase (T2): Identification of a K_m Mutant and an Analysis of the Mutational Sites in the Structure. *Mol Genet Metab* (in press)
 - 28) Kato T, Kato Z, Kuratsubo I, Ota T, Orii T, Kondo N, Suzuki Y: Evaluation of ADL in patients with Hunter disease using FIM score. *Brain and Development* (in press)
 - 29) Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevusuren J, Yamaguchi S: ESI-MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders. *J Chromatogr B* (in press)
 - 30) Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, Abukawa D, Sakamoto O, Tsuchiya S, Saheki T: Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD). *J Inher Metab Dis* 2007 (in press)
 - 31) Sato H, Sasaki N, et al: Growth of patients with congenital hypothyroid-ism detected by neonatal screening in Japan. *Pediatrics International* (in press)
 - 32) Shigematsu Y, Hata I, Tanaka Y: Stable-isotope dilution measurement of isovalerylglycine by tandem mass spectrometry for newborn screening of isovaleric academia. *Clin Chem* (投稿中)
 - 33) Suzuki K, Ishige N, Ohashi T, et al: Measurement of urinary α -galactosidase A protein using enzyme-linked immunosorbent assay and globotriaosylceramide using tandem mass spectrometry: Evaluation for non-invasive detection of Fabry disease. *Clinical Chemistry* (投稿中)
 - 34) 重松陽介: タンデム質量分析計による新生児代謝異常症マスキング. *日本小児科学会雑誌* 110(7): 895-903, 2006

- 35) 田中あけみ, 澤田智, 藤岡弘季, 山野恒一: Hurler病の1症例における酵素補充療法の効果. 日本小児科学会雑誌 110: 945-950, 2006
- 36) 大浦敏博: シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) -臨床像の検討. 日本小児科学会雑誌 110(8): 1060-1065, 2006
- 37) 野町祥介, 花井潤師, 本間かおり, 田上泰子, 福士 勝, 藤田晃三, 長尾雅悦, 窪田満: 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのための体制整備. 日本マス・スクリーニング学会誌 16(1): 65-72, 2006
- 38) 本間かおり, 花井潤師, 野町祥介, 田上泰子, 福士 勝, 藤田晃三: 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのためのデータ処理システム (1) 事務処理システム. 日本マス・スクリーニング学会誌 16(1): 73-77, 2006
- 39) 花井潤師, 本間かおり, 野町祥介, 田上泰子, 福士 勝, 藤田晃三: 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのためのデータ処理システム (2) 検査データ処理と内部精度管理. 日本マス・スクリーニング学会誌 16(1): 79-84, 2006
- 40) 野町祥介, 花井潤師, 田上泰子, 福士 勝, 藤田晃三: アミノ酸代謝異常症一次検査としてのタンデム質量分析法. 日本マス・スクリーニング学会誌 16(1): 85-90, 2006
- 41) 岡田純一郎, 渡辺順子, 平井裕子, 神戸太郎, 廣瀬彰子, 藤野 浩, 前野泰樹, 芳野 信: 栄養療法で急性期治療を行ったメープルシロップ尿症の1例. 日本マススクリーニング学会雑誌 16(3): 63-67, 2006
- 42) 石毛信之, 鈴木 健, 大和田操ほか: タンデム質量分析計を用いた尿中グロボトリアオシルセラミド測定によるファブリー病のスクリーニング法の研究. 日本マス・スクリーニング学会誌 16(3): 69-79, 2006
- 43) 松本かおり, 猪口隆洋, 青木久美子, 田代恭子, 稲場美佐, 文森明代, 原 千尋, 吉田一郎: GC/MSによる新生児代謝異常症スクリーニングの意義. 日本マス・スクリーニング学会誌 16(3): 81-85, 2006
- 44) 文森明代, 猪口隆洋, 青木久美子, 田代恭子, 稲場美佐, 松本かおり, 原 千尋, 吉田一郎: 小児における尿中カテコラミン代謝産物. 日本小児臨床薬理学会雑誌 19: 23-26, 2006
- 45) 山口清次, 重松陽介: タンデムマスによる新生児スクリーニングの近未来. 日本先天代謝異常学会雑誌 22(1): 66-69, 2006
- 46) 重松陽介: 日本におけるタンデムマス・スクリーニングの対象疾患 -試験研究結果の検討. 日本先天代謝異常学会雑誌 22(1): 70-73, 2006
- 47) 福士勝: 行政, 検査機関, 採血医療機関, 精査・治療機関が連携したタンデムマス新生児マススクリーニングの試験研究実施体制の確立. 日本先天代謝異常学会誌 22: 74-76, 2006
- 48) 高浦奈津子, 田中あけみ, 吉田敏子, 竹下由紀子, 清水教一, 青木継稔, 玉井浩, 山野恒一: Sanfilippo症候群B型とWilson病を合併した1男児例. 脳と発達 38: 49-53, 2006
- 49) 久原とみ子: 診断と個別化医療のための非侵襲的ヒトメタボローム解析. 細胞工学 25: 1404-1409, 2006
- 50) 長谷川有紀, 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症 -発症形態と予後-. 小児科診療 69: 1661-1666, 2006
- 51) 田中藤樹, 奥山虎之: 酵素補充療法ムコ多糖症I型, VI型. 小児科診療 69: 1735-1739, 2006
- 52) 北川照男, 鈴木 健, 石毛信之ほか: マス・スクリーニングの最近の進歩. 小児科診療 69: 1595-1601, 2006
- 53) 但馬剛, 佐倉伸夫, 大浦敏博. 高速液体クロマトグラフィーを用いた迅速酵素診断法. 小児科診療 69(11): 1607-1613, 2006
- 54) 高柳正樹: 先天性尿素サイクル異常症(高アンモニア血症). 小児科診療 69(増刊): 527-530, 2006
- 55) 藤浪綾子, 高柳正樹: 救急外来で見のがしてはならない先天代謝異常症. 小児科診療 69: 1574-1578, 2006
- 56) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也ほか: タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報 42: 28-53, 2006
- 57) 大和田操, 他: 新生児マス・スクリーニング対象アミノ酸代謝異常症の食事療法と「日本人の食事摂取基準 (2005)」の関わりについて. 特殊ミルク情報 42: 54-64, 2006
- 58) 北川照男, 鈴木 健: 新生児マス・スクリーニング. 小児科臨床 59: 559-566, 2006
- 59) 重松陽介, 畑郁江: 健診・検査後の対応とその評価-新生児スクリーニング-有機酸代謝異常症. 小

- 児科臨床 59(4):635-641, 2006
- 60) 大和田操, 青木菊麿: 遺伝性高フェニルアラニン血症. 小児科臨床 59: 593-601, 2006
- 61) 山口清次, 小林弘典: 健診・検査後の対応とその評価: 先天性脂肪酸代謝異常症. 小児科臨床 59: 643-651, 2006
- 62) 北川照男, 鈴木 健: 新生児マス・スクリーニング. 産婦人科治療 92: 972-976, 2006
- 63) 原田正平: 新生児マススクリーニングの現状と21世紀における課題. 小児保健研究 65(3): 391-397, 2006
- 64) 大和田操, 青木菊麿: 先天性代謝異常症の新生児スクリーニング, 30年のかかわり. 東京都予防医学協会年報 35: 157-161, 2006
- 65) 山口清次: SIDS様症状で発症する先天代謝異常と診断へのアプローチ. 日本SIDS学会雑 6(1): 15-24, 2006
- 66) 山口清次: 乳幼児突然死症候群 (SIDS) と先天代謝異常症. 母子保健情報 (特集) 乳幼児突然死症候群 (SIDS) ーその歴史と現状ー 53: 39-45, 2006
- 67) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代. 小児保健研 65(6): 725-732, 2006
- 68) 高柳正樹: カルニチン代謝異常症. 小児内科 38(増刊): 167-168, 2006
- 69) 野町祥介, 阿部敦子, 太田 優, 坂上絵理奈, 臼井知美 他: タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの試験研究 2005年度実施成績. 札幌市衛生研究所年報 33: 42-49, 2006
- 70) 田上泰子, 花井潤師, 野町祥介, 阿部敦子, 成田慶 他: ハイリスク・スクリーニングにおいてGC/MSとタンデム質量分析計の有用性を示した2診断例. 札幌市衛生研究所年報 33: 29-37, 2006
- 71) 深尾敏幸: 有機酸代謝異常症. 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎編: 今日の小児治療指針 第14版, 医学書院, 東京, 168-169, 2006
- 72) 山口清次: ミトコンドリア β 酸化異常症. 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎編: 今日の小児治療指針 第14版, 医学書院, 東京, 169, 2006
- 73) 高柳正樹: ビタミン代謝異常 (葉酸, ビオチン, ビタミンB12). 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎編: 今日の小児治療指針 第14版, 医学書院, 東京, 177, 2006
- 74) 大浦敏博: Wilson病. 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎編: 今日の小児治療指針 第14版, 医学書院, 東京, 174-175, 2006
- 75) 重松陽介: 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. プロテオーム・メタボローム・マススペクトロメトリー, 細胞工学別冊, 秀潤社, 東京, 2007 (印刷中)
- 76) 坂口 (梶田) 知子, 田中あけみ, 山野恒一: ジメチルメチレンブルー呈色反応による尿のムコ多糖症スクリーニング法: 見逃し症例に基づく反省と方法の再検討. 日本マススクリーニング学会誌 (印刷中)
- 77) 小林弘典, 遠藤充, 長谷川有紀, 他: 発症した先天代謝異常症患者13例の新生児ろ紙血を用いたタンデムマス分析による後方視的検討. 日本小児科学会雑誌 (投稿中)

2. 学会

平成16（2004年）年度

- 1) Yamaguchi S: Clinical onset and prognosis of Japanese Children with mitochondrial b-oxidation disorders: Significance of newborn mass screening. 5th Annual meeting of Korean Society for Inborn Metabolic Disease, Seoul, May 2004
- 2) Tajima G, Sakura N, Shigematsu Y: 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, August 31-September 4, 2004
- 3) Tashiro K, Yoshida I, Inokuchi T, Aoki K, Inaba M, Fumimori A, Matsumoto K, Hara C, Tanaka M: GC/MS method still has a space for neonatal metabolic screening. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Amsterdam, August 31, 2004
- 4) Inaba M, Yoshida I, Inokuchi T, Aoki K, Tashiro K, Fumimori A, Matsumoto K, Hara C, Tanaka M: Orotic acid and uracil are not good diagnostic markers in neonatal screening for inherited metabolic disease. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Amsterdam, August 31, 2004
- 5) Fukuhara Y, Okuyama T, et al.: Long-term behavioral improvement after intra-cerebral transplantation of neural stem cells into the mice with mucopolysaccharidosis VII. 10th annual meeting of the gene therapy, Tokyo, August 5, 2004
- 6) Yamaguchi S: Natural history and prognosis of children with organic and fatty acid disorders. 5th Asia Panpacific Regional Meeting of International Society for Neonatal Screening. Shanghai, September 2004
- 7) Yamaguchi S, Kimura M, Hasegawa Y, Shigematsu Y: Diagnostic support from GC/MS in MS/MS screening for organic and fatty acid disorders. 5th Asia Panpacific Regional Meeting of International Society for Neonatal Screening. Shanghai, September 2004
- 8) Hasegawa Y, Iga M, Kimura M, Shigematsu Y, Yamaguchi S: Prenatal detection of organic acidemias: measurement of organic acids and acylcarnitines in amniotic fluid, using GC/MS and ESI/MS/MS. 5th Asia Panpacific Regional Meeting of International Society for Neonatal Screening. Shanghai, September 2004
- 9) Harada S: The quality assurance system of neonatal screening in Japan. 5th Pacific Regional Meeting of International Society for Neonatal Screening. Shanghai, Sept. 14-17, 2004
- 10) Matsubara Y, et al: A novel DNA diagnostic method for point-of-care genetic testing: competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization with enzyme-linked immunosorbent assay. 54th annual meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, October 27, 2004
- 11) 松原洋一: ベッドサイド遺伝子診断のための簡便な遺伝子多型・変異検出法の開発. 第107回日本小児科学会学術集会ワークショップ, 岡山, 2004年4月9日
- 12) 但馬 剛, 佐倉伸夫, 夜船展子, 西村 裕, 小野浩明, 畑 郁江, 重松陽介, 木村正彦, 山口清次: タンデム質量分析と HPLC 酵素診断による新生児マス・スクリーニング: 広島県での経験. 第107回日本小児科学会学術集会. 岡山, 2004年4月
- 13) 長谷川有紀, 堀 大介, 木村正彦, 安達昌功, 立花克彦, 黒田泰弘, 重松陽介, 山口清次: インフルエンザ脳症の発症と有機酸血症との関連: GC/MS による有機酸分析結果の検討. 第107回日本小児科学会学術集会. 岡山, 2004年4月
- 14) 鳥海善貴, 村田幸治, 竹谷 健, 渡辺 浩, 内山温, 大家隆晴, 木下芳一, 梶原正宏, 山口清次: 13C呼気テストによるインスリン-高アンモニア血症症候群患児の糖代謝能の検討. 第107回日本小児科学会学術集会. 岡山, 2004年4月
- 15) 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
- 16) 小林弘典, 長谷川有紀, 木村正彦, 四本由郁, 山口清次: ESI-MS/MS によるメチルマロン酸血症診断の検討: GC/MS による尿中有機酸分析所見との比較. 第29回日本医用マススペクトル学会年会. 出雲, 2004年9月
- 17) 藤脇建久: DE MALDI TOF/MS を応用したスフィンゴリピドーシス患者の脂質分析. 第29回日

- 本医用マススペクトル学会年会 学会奨励賞受賞講演. 出雲, 2004年9月
- 18) 長谷川有紀, 小林弘典, 伊賀三佐子, 木村正彦, 重松陽介, 山口清次: 羊水中にメチルクエン酸とプロピオニルカルニチンの上昇を認めたアルギニノコハク酸尿症の2例. 第29回日本医用マススペクトル学会年会. 出雲, 2004年9月
 - 19) 川名修一, 中川勝博, 長谷川有紀, 木村正彦, 山口清次: 負化学イオン化 (NCI)-GC/MS による脂肪酸の高感度分析と血液ろ紙サンプルへの適用. 第29回日本医用マススペクトル学会年会. 出雲, 2004年9月
 - 20) 山口清次. 質量分析と小児科学. 第29回日本医用マススペクトル学会年会 シンポジウム. 出雲, 2004年9月
 - 21) 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
 - 22) 井上義人, 新家敏弘, 大瀬守眞, 久原とみ子: 高蔞酸尿症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回日本医用マススペクトル学会年会, 出雲, 2004年9月
 - 23) 小林弘典, 長谷川有紀, 木村正彦, 四本由郁, 山口清次: ESI-MS/MS によるメチルマロン血症スクリーニングでの検討: 軽症型メタルマロン酸血症診断における限界. 第32回日本マス・スクリーニング学会. 仙台, 2004年10月
 - 24) 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. 仙台, 2004年10月
 - 25) 花井潤師, 野町祥介, 田上泰子, 水嶋好清, 福士勝, 藤田晃三, 山口昭弘, 窪田 満, Nestor A. Chamoles: 新生児濾紙血中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. 第32回日本マススクリーニング学会. 仙台, 2004年10月
 - 26) 坂本修, 大浦敏博, 飯沼一字他: 若年発症性脳梗塞を契機に21歳で発見されたホモシスチン尿症の1例. 第32回日本マススクリーニング学会. 仙台, 2004年10月8日
 - 27) 原田正平: 軽症クレチン症. 第32回日本マススクリーニング学会. 仙台, 2004年10月
 - 28) 新堀哲也, 松原洋一ほか: ヌーナン症候群と小児白血病の遺伝子解析と変異蛋白の生化学的解析. 日本人類遺伝学会第49回大会. 東京, 2004年10月13日
 - 29) 呉繁夫, 松原洋一ほか: テトラヒドロビオプテリン反応性フェニルアラニン水酸化酵素欠損症: 正常マウスのBH4反応性に基づく発症機序の仮説. 日本人類遺伝学会第49回大会. 東京, 2004年10月13日
 - 30) 鈴木洋一, 松原洋一ほか: 喘息発症における receiver-operating characteristic curve を用いた遺伝子検査の有用性. 日本人類遺伝学会第49回大会. 東京, 2004年10月13日
 - 31) 山口清次: 有機酸代謝異常症・ β 酸化異常症の診断, 治療の進歩. 第47回日本先天代謝異常学会 学会賞受賞講演. 宇都宮, 2004年11月
 - 32) 長谷川有紀, 小林弘典, 木村正彦, 重松陽介, IC. Verma, 山口清次: 出生前診断でメチルマロン酸血症またはプロピオン酸血症を疑わせる所見を示し, 出生後アルギニノコハク酸尿症と診断された2症例. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月
 - 33) 但馬 剛, 佐倉伸夫, 西村 裕, 小野浩明, 小林正夫, 長谷川有紀, 木村正彦, 山口清次, 畑 郁江, 重松陽介: 高速液体クロマトグラフィを用いた中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症酵素診断法の精度向上について. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月
 - 34) 木村正彦, 長谷川有紀, 山口清次: 安定同位体希釈法を用いた GC/MS によるろ紙血中極長鎖脂肪酸の検討. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月
 - 35) 久米晃啓, 松原洋一ほか: アデノ随伴性ウイルス8型ベクターを用いたフェニルケトン尿症遺伝子治療の前臨床研究. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月12日
 - 36) 坂本修, 松原洋一ほか: 日本人ビタミンB12反応性メチルマロン酸血症の遺伝子解析. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月12日
 - 37) 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. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月11-13日
 - 38) 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. 第47回

日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月12日

- 39) 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
- 40) 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, 飯沼一宇: 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
- 41) 芳野 信, 徳永泰幸, 渡辺順子, 吉田一郎, 畑郁江, 重松陽介, 木村正彦, 山口清次: グルタル酸尿症II型におけるアシルカルニチンの腎でのhandling. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月12日
- 42) 文森明代, 吉田一郎, 猪口隆洋, 市川光太郎, 廣瀬伸一, 小林圭子, 佐伯武頼, 芳野 信, 田中正敏: シトリン欠損症 (NICCD) における尿中2-ヒドロキシイソ吉草酸の意義. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月11-13日
- 43) 木村正彦, 長谷川有紀, 山口清次: 安定同位体希釈法を用いたGC/MSによるろ紙血中極長鎖脂肪酸の検討. 第47回日本先天代謝異常学会. 宇都宮, 2004年11月
- 44) 四本由郁, 内田由里, 長谷川有紀, 山口清次: 新生児・乳児期に発症したグルタル酸血症2型の臨床的検討. 第49回日本未熟児新生児学会学術集会. 横浜, 2004年12月
- 45) 片山幸樹, 中島正幸, 渡辺順子, 芳野 信: ボイトラ試験異常が契機となって発見されたグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 欠損症の男児例. 第432回日本小児科学会福岡地方会例会. 2004年12月11日
- 46) 深尾敏幸: ケトン体の臨床的意義ーケトン体代謝を中心にー. 第33回大垣小児科医会. 大垣, 2005年2月26日
- 47) 山口清次: SIDS様の症状で発症する先天代謝異常: 有機酸・脂肪酸代謝異常の重要性. 第11回日本SIDS学会. 盛岡, 2005年3月

平成17 (2005) 年度

- 1) Fukao T, Haapalainen A, Sakurai S, Zhang G-X, Wierenga RK, Kondo N: Molecular and structural

analysis of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase. 6th International congress on fatty acid oxidation, Egmond aan Zee, June 2005

- 2) Fukao T, Hasegawa Y, Ohashi Y, Nishino I, Shigematsu Y, Kondo N, Yamaguchi S. Clinical and molecular aspects of VLCAD deficiency in Japan. 6th International congress on fatty acid oxidation, Egmond aan Zee, June 2005
- 3) Yamaguchi S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Uchida Y, Yotsumoto Y, Takayanagi A, Kimura M, Tajima G, Sakura N, Fukao T, Takayanagi M, Shigematsu Y: Survey of mitochondrial fatty acid oxidation disorders (FAODS) in Japanese. 6th International congress on fatty acid oxidation, Egmond aan Zee, June 2005
- 4) Kuhara T, Ohse M, Inoue Y, Shinka T, Tetsuo M: Urine metabolome analysis for chemical diagnosis of metabolic diseases, newborn screening, and tailor-made medicine. The First International Conference of the Metabolomics Society. Tsuruoka, June 2005
- 5) Yamaguchi S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Kimura M, Fukao T, Shigematsu Y: Clinical and Molecular Aspects of VLCAD Deficiency and Glutaric acidemia Type II in Japanese, 42st Annual symposium of SSIEM, Paris, France, September 2005
- 6) Fumimori A, Yoshida I, Inokuchi T, Aoki K, Tashiro K, Inaba M, Matsumoto K, Hirose S, Yoshino M, Kobayashi K, Saheki T, Tanaka M: 2-Hydroxyisovaleric aciduria in patients with citrin deficiency. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 42nd Annual symposium, Paris, September 6-9, 2005
- 7) Fukao T, Sakurai S, Yamada K, Zhang G-X, Kondo N: Recent Advances in the study for inborn errors of ketone body metabolism. 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research, Tokyo, November 2005
- 8) 山田桂太郎, 深尾敏幸, 張改秀, 桜井里美, 近藤

- 直実: SCOT遺伝子におけるc.671G>A変異は複数の異常mRNAを産生する. 第108回日本小児科学会学術集会. 東京, 2005年4月22-24日
- 9) 桜井里美, 深尾敏幸, 張改秀, 山田桂太郎, 近藤直実: β -ケトチオラーゼ(T2)における252Edel変異蛋白の温度不安定性. 第108回日本小児科学会学術集会. 東京, 2005年4月22-24日
- 10) 小林弘典, 木村正彦, 長谷川有紀, 四本由郁, 山口清次: タンデムマスによる先天代謝異常診断精度の検討: 尿中有機酸分析所見との比較. 第108回日本小児科学会学術集会. 東京, 2005年4月
- 11) 四本由郁, 長谷川有紀, 内田由里, 小林弘典, 木村正彦, 山口清次: グルタル酸血症2型日本人患者の臨床像と病因の検討. 第108回日本小児科学会学術集会. 東京, 2005年4月
- 12) 深尾敏幸: ケトン体代謝とその異常症の臨床と分子病態. 第11回山形小児内分泌・代謝研究会. 山形, 2005年6月3日
- 13) 新堀哲也, 松原洋一ほか: ヌーナン症候群の酵素活性測定による診断法の開発. 日本人類遺伝学会第50回大会. 倉敷, 2005年9月20日
- 14) 福永啓文, 木脇弘二, 請園なぎさ, 中村公俊, 三淵 浩, 遠藤文夫, 川瀬昭彦, 近藤裕一, 田崎隆二, 藤田春雄, 重松陽介, 但馬剛, 佐倉伸夫: 新生児タンデムマススクリーニングで発見した重症メチルマロン酸血症. 第50回日本人類遺伝学会. 倉敷, 2005年9月19-22日
- 15) 久原とみ子: ガスクロマトグラフィー質量分析法を用いたヒトメタボローム解析法の確立. 第30回日本医用マススペクトル学会年会. 豊中, 2005年9月
- 16) 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸・有機酸代謝異常症のタンデムマスによる代謝解析. 第30回日本医用マススペクトル学会年会. 豊中, 2005年9月
- 17) 稲岡一考, 竹島清美, 中村しのぶ, 入江明美, 畝川謙太郎, 宮城晶子, 宮道徹, 中山雅弘, 和田芳直: 大阪府における先天性代謝異常症スクリーニング検査-LC/MS分析法導入の検討. 第30回日本医用マススペクトル学会年会. 豊中, 2005年9月
- 18) 阿部敦子, 福士勝, 重松陽介: MS/MS新生児スクリーニングの技術的側面, 第30回日本医用マススペクトル学会年会. 豊中, 2005年9月8-9日
- 19) 大瀬守眞, 井上義人, 新家敏弘, 猪口隆洋, 吉田一郎, 哲翁正博, 久原とみ子: 簡易urease GC/MS法を用いる新生児マススクリーニング試験研究とハイリスクスクリーニング. 第33回日本マス・スクリーニング学会(第28回技術部会). 久留米, 2005年10月
- 20) 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 最近開始したタンデムマスによる新生児マス・スクリーニング試験研究の問題点. 第33回日本マス・スクリーニング学会. 久留米, 2005年10月
- 21) 田崎隆二, 武田聖子, 藤田春雄, 梅橋豊蔵, 木脇弘二, 中村公俊, 請園なぎさ, 三淵 浩, 遠藤文夫, 重松陽介: タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングパイロットスタディの状況報告~熊本県の場合~. 第33回日本マス・スクリーニング学会(第28回技術部会). 久留米, 2005年10月7-8日
- 22) 稲岡一考, 竹島清美, 中村しのぶ, 入江明美, 畝川謙太郎, 宮城晶子, 宮道徹, 中山雅弘, 和田芳直: タンデムマスによる誘導體化を用いないアミノ酸分析. 第33回日本マス・スクリーニング学会. 久留米, 2005年10月
- 23) 鈴木恵美子, 渡辺倫子, 成瀬浩, 平原史樹, 山上祐次, 望月孝一, 原田正平: わが国のスクリーニング外部精度管理システムへのブラインドサンプル導入の検討. 第33回日本マス・スクリーニング学会. 久留米, 2005年10月
- 24) 福士勝, 本間かおり, 吉永美和, 大田紀之, 藤田晃三, 藤枝憲二, 田島敏広, 母坪智行: 新生児内分泌疾患のスクリーニング問題点とその考え方. 第33回日本マス・スクリーニング学会, 久留米, 2005年10月7-8日
- 25) 桜井里美, 深尾敏幸, 張改秀, 山田桂太郎, 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: 252-256アミノ残基に認

められた遺伝子変異の解析. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日

- 26) 張改秀, 深尾敏幸, 桜井里美, 山田桂太郎, 小澤亮, 近藤直実: Exon 2,3,4を含めて長いT2遺伝子の欠失がみられたT2欠損症の1例. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 27) 深尾敏幸, 桜井里美, 張改秀, 山田桂太郎, 松尾直樹, 近藤直実: 非ケトン性低血糖発作をきたす児に対するミトコンドリアHMG-CoA合成酵素遺伝子解析の試み. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 28) 山田桂太郎, 深尾敏幸, 張改秀, 桜井里美, 近藤直実: SCOT遺伝子のエクソン6最後の塩基c.617G>A変異はエクソン6スキップ, エクソン6と7のスキップをきたす. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 29) 大浦敏博, 梁川陽子, 小林圭子, 坂本修, 佐伯武頼: NICCD患児の栄養素摂取量調査. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 30) 呉 繁夫, 松原洋一ほか: 13Cグリシン呼気試験による高グリシン血症の新しい診断法の開発. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 31) 四本由郁, 小林弘典, 長谷川有紀, 木村正彦, 山口清次: グルタル酸血症2型患者17例の臨床像と病因の検討. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 32) 木脇弘二, 請園なぎさ, 中村公俊, 三淵 浩, 遠藤文夫, 田崎隆二, 藤田春雄, 重松陽介: 熊本におけるタンデムマスによる新生児マススクリーニング~パイロットスタディの状況報告~. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 33) 福士勝: 行政などと連携したタンデムマススクリーニングの実施体制の検討. 第48回日本先天代謝異常学会. 熊本, 2005年11月16-18日
- 34) 四本由郁, 長谷川有紀, 小林弘典, 内田由里, 山口清次: タンデムマスによる新生児代謝異常スクリーニングの検討. 第50回日本未熟児新生児学会学術集会. 名古屋, 2005年12月

平成18(2006年)年度

- 1) Nakamura K, Endo F: Newborn screening trial for lysosomal disease using dried blood spots in Japan. 9th international symposium on MPS and related disease. Venice, June 28-July 2, 2006
- 2) Okuyama T: Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells. "Workshop on the blood brain barrier" 9th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases. Venice, Italy, June 29-July 2, 2006
- 3) OKuyama T: Assessment Long-term outcomes in MPS I and MPSII. The 9th Annual Asia Lysosomal Storage Disorders (LSD) Meeting. Makuhari, Sept 10-12, 2006
- 4) Yotsumoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Hirose S, Fukao T, Yamaguchi S: Clinical and molecular study of 13 Japanese children with glutaric aciduria type 2. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
- 5) Fukao T, Sakurai S, Zhang GX, Haapalainen AM, Wierenga RK, Kondo N. Mutation update of human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
- 6) Fukao T, Sakurai S, Zhang GX, Yamada K, Kursula P, Mitchell GA, Kondo N: Mutation update of succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA transferase deficiency. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
- 7) Sakurai S, Fukao T, Zhang GX, Yamada K, Haapalainen AM, Wierenga RK, Lilliu F, Kondo N: Characterization of E252del mutant protein identified in a patient with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
- 8) Yamada K, Fukao T, Zhang G, Sakurai S, Ruitter JPN, Wanders RJA, Kondo N: Single-base substitution at the last nucleotide of exon 6 (c.671G >A), resulting in the skipping of exon 6, and exons 6 and

- 7 in human SCOT gene. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
- 9) Hasegawa Y, Kobayashi H, Ohashi Y, Nishino I, Shigematsu Y, Fukao T, Yamaguchi S: Study of clinical phenotype in Japanese patients with very-long chain acyl-CoA dehydrogenase. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 10) Watanabe Y, Yano S, Tashiro K, Aoki K, Inokuchi T, Matsuishi T, Yoshino M: Long-term clinical observations of three patients with infantile carnitine-palmitoyltransferase II deficiency. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 11) Kuhara T: Metabolome-based chemical diagnosis of IEM. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 12) Okuyama T: Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells. Workshop Stem Cell Biology. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 13) Kitagawa T, Suzuki K, et al.: Measurement of urinary alpha-galactosidase A protein using enzyme-linked immunosorbent assay and globotriaosylceramide using tandem mass spectrometry: evaluation for non-invasive detection of Fabry disease. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 14) Ohashi T, Ishige N, et al.: Measurement of globotriaosylceramide in urine for long term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 15) Shintaku H, Ohwada M, et al.: Tetrahydrobiopterin (BH4) responsive hyperphenylalaninemia without BH4 deficiency in Japan over the past 10 years. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 16) Shintaku H, Ohura T, et al. Long-term treatment of Tetrahydrobiopterin (BH4)-responsive mild PKU in Japan. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 17) Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Yamaguchi S: Evaluation of urinary acylcarnitines for differential diagnosis of cases showing blood carnitine deficit in the tandem MS screening. The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 18) Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, Abukawa D, Sakamoto O, Tsuchiya S, Saheki T: Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD). The 10th International congress of inborn errors of metabolism, Chiba, September 12-16, 2006
 - 19) Hasegawa Y, Kobayashi H, Endo M, Purevsuren J, Yang YL, Verma IC, Nguyen TL, Yamaguchi S: Experience of High-risk Screening for Inborn metabolic disease by GC/MS and Tandem MS Using Dried Urine and/or Blood Filter Papers Transported from Asian Countries. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 20) Purevsuren P, Hasegawa Y, Kobayashi H, Endo M, Yamaguchi S: Metabolic screening of children with influenza-associated encephalopathy by organic acid analysis using GC/MS. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 21) Endo M, Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamaguchi S: Retrospective tandem MS analysis of newborn blood spots from patients with organic and fatty acid disorders who became symptomatic and diagnosed in infancy or childhood. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 22) Tajima G, Sakura N, Nishimura Y, Ono H, Nakatsune C, Tgawa M, Yangawa J, Kubota M, Yoshii C, Hamakawa M, Hasegawa Y, Hata I, Naito E, Yamaguchi S, Shigematsu Y: Enzymatic diagnosis of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-hexadecenoyl-CoA production using HPLC: A practical confirmatory test for MS/MS-based screening in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji,

- September 16-19, 2006
- 23) Tajima G, Sakura N, Nishimura Y, Ono H, Nakatsune C, Tgawa M, Yangawa Y, Kubota M, Yoshii C, Hamakawa M, Hasegawa Y, Hata I, Naito E, Yamaguchi S, Shigematsu Y: An HPLC-based enzymatic diagnosis system for MS/MS newborn screening of organic acid and fatty acid disorders conducted in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 24) Takayanagi M, Nagasaka H, Murayama K, Ogawa A, Kanazawa M, Ogawa E, Yamamoto S, Ohtake A: Clinical survey of patients with carnitine cycle disorders in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 25) Yoshino M, Watanabe Y, Okada M, Fujino H, Maeno Y, Inokuchi T, Yoshida I, Shigematsu Y, Takemoto K: Hypocarnitinemia in patients with propionic acidemia precipitated by long-term and repeated courses with pivalate-generating antibiotics. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 26) Kuhara T, Inoue Y, Ohse M, Shinka T, Inokuchi T, Aoki K, Tashiro K, Inaba M, Fumimori A, Tetsuo M: A pilot study of newborn screening and chemical diagnosis by GC/MS analysis of urine. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 27) Oguma T, Tomatsu S, Murayama N, Okazaki O, Sudo K: A new neonatal screening method for mucopolysaccharidoses using tandem mass spectrometry. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 28) Fukushi M: Changes in the informed consent procedure in Sapporo City's newborn screening program over the last 30 years. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 29) Ohkusa Y, Sugawara T: An Examination of Cost-Effectiveness Analysis of MS/MS New Born Screening in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 30) Aoki K, Ohwada M, et al.: Long term follow-up study of patients with Phenylketonuria detected by the newborn screening program in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 31) Shintaku H, Owada M, et al.: Diagnosis of tetrahydrobiopterin (BH4) responsive mild PKU in Japan over the past 10 years. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 32) Suzuki K, Owada M, et al.: Screening method for Wilson disease by measurement of urinary ceruloplasmin. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 33) Urakami T, Nagao N, et al.: Clinical characteristics at diagnosis in slow onset form of type 1 diabetes as detected by urine glucose screening at school. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 34) Nomachi S, Abe A, Hanai J, Honma K, Tagami Y, Yoshinaga M, Ota N, Fukushi M, Fujita K: Newborn Screening Program in Sapporo City -A pilot study on MS/MS screening and the storage and use of blood spot samples-. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 35) Owada M, Abe M, Suzuki K, Nakabayashi H: Treatment and outcome of 48 cases with hyperphenylalaninemia—The role of phenylalanine restriction diet. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 36) Suzuki K, Owada M: Determination of tetrahydrobiopterin in body fluids: A diagnostic tool for BH4 deficiency. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 37) Suzuki E, Watanabe N, Harada S, Naruse H: Examination of adopting the blind sample into External Quality Control Survey. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
 - 38) Watanabe N, Suzuki E, Kawashima T, Naruse H: Quality control system of neonatal screening in

- Japan and the result. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
- 39) Watanabe N, Suzuki E, Ikegami M, Omi S, Nitta K, Maeda M, Naruse H: Quality control of the materials and reagents for neonatal screening in Japan. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
- 40) Suzuki E, Watanabe N, Harada S, Tsuji A, Naruse H: Establishment of the national quality control committee for neonatal screening. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
- 41) Harada S: Attitude of Japanese peoples for using newborn babies blood spots as Biobank. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
- 42) Harada S, Inomata H: Summary of neonatal screening for congenital hypo-thyroidism in Japan, with special reference to subclinical hypothyroidism and its treatment. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
- 43) Nomachi S, Abe A, Hanai J, Honma K, Tagami Y, Yoshinaga M, Ota N, Fukushima M, Fujita K: Newborn screening program in Sapporo city – A pilot study on MS/MS screening and the storage and use of blood spot samples. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 16-19, 2006
- 44) Watanabe N, Suzuki E, Ikegami M, Omi S, Nitta K, Maeda M, Naruse H : Quality Control of the materials and reagents for Neonatal Screening in JAPAN. Quality Assurance and Quality Control Satellite Meeting of 6th ISNS. Nara, September 20, 2006
- 45) Suzuki E, Watanabe N, Kawashima T, Ichikawa N, Tsuji A, Harada S, Naruse H: Quality Control System of Neonatal Screening in Japan and the Result. Quality Assurance and Quality Control Satellite Meeting of 6th ISNS. Nara, Nara, September 20, 2006
- 46) Harada S: Follow-up system and assessment for newborn screening programs in Japan. Quality Assurance and Quality Control Satellite Meeting of 6th ISNS. Nara, September 20, 2006
- 47) Shosuke Nomachi, Atsuko Abe, Junji Hanai, Kaori Honma, Yasuko Tagami, Miwa Yoshinaga, Noriyuki Ota, Masaru Fukushima, Kozo Fujita: Newborn screening program in Sapporo city – A pilot study on MS/MS screening and the storage and use of blood spot samples The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, September 20, 2006
- 48) Sato H, Harada S, Sasaki N, et al: Treatment for childhood-onset Graves' disease in Japan: Results of a nationwide questionnaire survey of pediatric endo-crinologists and thyroidologists. 8th Congress Asia-Oceania Thyroid Association, Manila, February 5, 2007
- 49) 深尾敏幸, 近藤直実, 新宅治夫, 澤田好伴, 坂崎弘美, 平山謙. サクシニル-CoA: 3-ケト酸CoAトランスフェラーゼ欠損症の本邦初症例の発見. 第109回日本小児科学会学術集会. 金沢, 2006年4月21-23日
- 50) 久原とみ子, 大瀬守眞, 井上義人, 新家敏弘, 岡野善行, 滝澤登, 本郷和久, 宮脇利男, 森信若葉, 玉井浩: 経中心静脈栄養下の高フェニルアラニン血症のメタボローム解析. 第109回日本小児科学会学術集会. 金沢, 2006年4月21-23日
- 51) 井上義人, 大瀬守眞, 新家敏弘, 久原とみ子: 先天性代謝異常症の出生前診断について. 第109回日本小児科学会学術集会. 金沢市, 2006年4月21-23日
- 52) 小林弘典, 長谷川有紀, 遠藤充, 山口清次: 乳児期以降に診断された先天代謝異常症患者の新生児期におけるタンデムマス分析による検討. 第109回日本小児科学会学術集会. 金沢, 2006年4月21-23日
- 53) 横山隆人, 小池敬義, 石堂雄毅, 金 奉吉, 水落建輝, 河野 剛, 長井孝二郎, 大部敬三, 西野 裕, 渡辺順子, 芳野 信, 松石豊次郎, 猪口隆洋: Reye様症候群を呈した3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症の1例. 第440回日本小児科学会福岡地方会. 福岡, 2006年6月3日
- 54) 遠藤充, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 第31回日本医用マススペクトル学会. 名古屋, 2006年9月28日
- 55) 小林弘典, 長谷川有紀ほか: 尿中アシルカルニ

チン分析による脂肪酸・有機酸代謝異常症の代謝解析の試み. 第31回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2006年9月28日

- 56) 久原とみ子: 個別化医療と非侵襲メタボローム解析. 第31回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋市, 2006年9月
- 57) 小熊敏弘, 戸松俊治, 岡崎治, 須藤賢一: LC/MS/MSによるムコ多糖症マススクリーニング法の開発. 第31回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 平成18年9月29日
- 58) 佐藤浩一, 佐々木望, 中村伸枝, 掛江直子, 原田正平: マススクリーニングで発見された先天性甲状腺機能低下症患者の長期的QOL調査. 第40回日本小児内分泌学会. 浜松, 2006年9月28日
- 59) 野町祥介, 阿部敦子, 坂上絵理奈, 花井潤師, 本間かおり, 田上泰子, 太田紀之, 福士勝, 藤田晃三, 遠藤一行, 窪田満, 長尾雅悦, 館睦子: 札幌市におけるタンデムマスによる新生児マス・スクリーニングのシステム構築. 第33日本マス・スクリーニング学会. 熊本, 2006年10月7日
- 60) 西野 裕, 渡辺順子, 芳野 信, 松石豊次郎, 田代恭子, 青木久美子, 猪口隆洋, 横山隆人, 河野剛, 長井孝二郎, 大部敬三: 抗生物質長期投与中に低カルニチン血症, 低血糖, 痙攣重積をきたした一症例. 第442回日本小児科学会福岡地方会. 福岡, 2006年12月16日
- 61) 野町祥介, 太田 優, 阿部敦子, 坂上絵理奈, 白井知美, 太田紀之, 福士 勝, 藤田晃三: タンデム質量分析計を用いた新しいスクリーニング試験研究(札幌市の場合). 第58回北海道公衆衛生学会. 旭川市, 2006
- 62) 新宅治夫, 他: 新生児マススクリーニング対象疾患児の保険契約の動向について(仮題). 第110回日本小児科学会. 京都, 2007(予定)

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

論文

(謝辞に本研究補助金の記載のあったもののみを抜粋)

| | 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 | *は別刷の複写を掲載 |
|----|---------------------------------------|--|------------------|-------|---------|------|------------|
| 1 | Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, et al | Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosyl-ceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. | Mol Genet Metab. | 85 | 196-202 | 2005 | * |
| 2 | Tajima G, Sakura N, Yofune H, et al. | Enzymatic diagnosis of medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-octenoyl CoA production using high-performance liquid chromatography: A practical confirmatory test for tandem mass spectrometry newborn screening in Japan | J Chromatogr B | 823 | 122-130 | 2005 | * |
| 3 | 片山幸樹、渡辺順子、中島正幸 他 | ポイトラーテストでの蛍光欠如が契機となり診断されたグルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症の男児例 | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 15(1) | 41-44 | 2005 | |
| 4 | 青木久美子、吉田一郎、猪口隆洋 | タンデム質量分析法による新生児マススクリーニング対象疾患の検討 | 日本マススクリーニング学会誌 | 15(3) | 81-86 | 2005 | * |
| 5 | 原田正平 | 周産期のヨード含有消毒剤使用が胎児・新生児の甲状腺機能に及ぼす影響 | 周産期学シンポジウム | 23 | 87-91 | 2005 | |
| 6 | Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, et al | Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome | Nat Genet | 38 | 294-296 | 2006 | |
| 7 | Kamada F, Kure S, Kudo T, et al | A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the genotype-phenotype correlation. | J Hum Genet | 51 | 455-460 | 2006 | |
| 8 | Kure S, Kato K, Dinopoulos A, et al | Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia | Hum Mutat | 27 | 343-352 | 2006 | * |
| 9 | 野町祥介, 花井潤師, 本間かおり, 他 | 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのための体制整備 | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 16(1) | 65-72 | 2006 | |
| 10 | 本間かおり, 花井潤師, 野町祥介, 他 | 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのためのデータ処理システム(1)事務処理システム | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 16(1) | 73-77 | 2006 | * |

| | | | | | | | |
|----|---|---|-----------------|-------|----------|------|---|
| 11 | 花井潤師, 本間かおり, 野町祥介, 他 | 札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのためのデータ処理システム(2) 検査データ処理と内部精度管理 | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 16(1) | 79-84 | 2006 | * |
| 12 | 野町祥介, 花井潤師, 田上泰子, 他 | アミノ酸代謝異常症一次検査としてのタンデム質量分析法 | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 16(1) | 85-90 | 2006 | * |
| 13 | 松本 かおり, 猪口隆洋, 青木 久美子, 他 | GC/MS による新生児代謝異常症スクリーニングの意義. | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 16(3) | 81-85 | 2006 | * |
| 14 | 福士 勝 | 行政, 検査機関, 採血医療機関, 精査・治療機関が連携したタンデムマス新生児マススクリーニングの試験研究実施体制の確立 | 日本先天代謝異常学会誌 | 22 | 74-76 | 2006 | * |
| 15 | 北川照男, 松田一郎, 多田啓也, 大浦敏明, 大和田操, 青木菊麿 他 | タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針 | 特殊ミルク情報 | 42 | 28-53 | 2006 | * |
| 16 | Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, et al | Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: Overlapping clinical manifestations with costello syndrome | Am J Med Genet | | in press | 2007 | |
| 17 | Yamada K, Fukao T, Zhang G, et al | Single-base substitution at the last nucleotide of exon 6 (c.671G >A), resulting in the skipping of exon 6, and exons 6 and 7 in human Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene | Mol Genet Metab | | in press | 2007 | |
| 18 | Sakurai S, Fukao T, Haapalainen AM, et al | Kinetic and Expression Analyses of Seven Novel Mutations in Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase (T2): Identification of a Km Mutant and an Analysis of the Mutational Sites in the Structure | Mol Genet Metab | | in press | 2007 | |
| 19 | Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, et al | ESI-MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders | J Chromatogr B | | in press | 2007 | |



Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry

Teruo Kitagawa ^{a,*}, Nobuyuki Ishige ^a, Ken Suzuki ^a, Misao Owada ^b, Toya Ohashi ^c,
Masahisa Kobayashi ^c, Yoshikatsu Eto ^c, Akemi Tanaka ^d, Kevin Mills ^e,
Bryan Winchester ^e, Joan Keutzer ^f

^a Tokyo Health Service Association, Tokyo, Japan

^b Faculty of Child Nutrition, Kagawa Nutrition University, Graduate School, Saitama, Japan

^c Department of Pediatrics, Tokyo Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

^d Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

^e Biochemistry, Endocrinology and Metabolism Unit, Institute of Child Health at Great Ormond Street Hospital,
University College London, London, UK

^f Genzyme Corp., Cambridge, MA, USA

Received 10 November 2004; received in revised form 28 January 2005; accepted 28 January 2005

Available online 26 April 2005

Abstract

Fabry disease is an X-linked sphingolipidosis due to a deficiency of α -galactosidase A, which leads to the accumulation of globotriaosylceramide (GL-3) in several organs. When recombinant human α -galactosidase A is intravenously administered repeatedly before the patient develops permanent tissue damage, there is evidence that the accumulation of GL-3 is decreased in some organs and that the clinical symptoms are alleviated in some patients. However, Fabry disease is rare and many patients are not diagnosed until adulthood after irreversible tissue damage has occurred. Our group has developed a simple and non-invasive screening method for Fabry disease that measures total GL-3 in whole urine samples by tandem mass spectrometry. Using this method, we found that the concentration of GL-3 in whole urine sample from hemizygous patients, including pre-symptomatic young children with classic type Fabry disease, was significantly higher than that in controls. The mean concentration of GL-3 in urine from heterozygotes with symptoms was significantly higher than control concentrations, but GL-3 levels in the urine from 2 out of 8 heterozygotes of classic type Fabry disease were within control levels. An asymptomatic 14-year old hemizygote in the family of a cardiac variant did not have elevated urinary GL-3. Therefore, screening for the classic type and probably renal variant of Fabry disease is possible by measuring urinary GL-3, using our method. The early diagnosis of cardiac variant hemizygotes and some heterozygotes with all types of Fabry disease will not be possible using our method. We propose that this procedure can be used as a reliable, non-invasive, simple method for general and high-risk population screening for hemizygotic patients with the classic type and probably renal variant of Fabry disease.
© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Fabry disease; Classic type; Renal variant; Cardiac variant; Population screening; Urine screening; Non-invasive method; Globotriaosylceramide; GL-3 in whole urine; Tandem mass spectrometry

Introduction

Fabry disease is an X-linked sphingolipidosis caused by a deficiency of lysosomal α -galactosidase A (α -gal A; EC 3.2.1.22). This enzyme deficiency results in the

* Corresponding author. Fax: +81 3 3260 6900.

E-mail address: thsa-screening@mrj.biglobe.ne.jp (T. Kitagawa).

accumulation of globotriaosylceramide (GL-3, also known as ceramide trihexoside, CTH, and Gb₃) in several organs, including the heart, nervous system, and kidney. This metabolic defect causes a painful neuropathy, angiokeratomas, cardiac and renal failure, and cerebrovascular injury [1]. Our recent nation-wide survey of Fabry disease in Japan [2] revealed that renal failure was found in about 43% of patients over 30 years of age and cardiac insufficiency was seen in about 60% of patients over 40 years of age.

With the advent of technology for producing recombinant proteins, enzyme replacement therapy for Fabry disease has become available. When recombinant human α -galactosidase A is intravenously administered repeatedly before the patients develop permanent tissue damage, there is evidence that the accumulation of GL-3 is decreased in some organs and that the clinical symptoms are alleviated in some patients [3–9]. Fabry disease is a rare genetic disease with an estimated frequency of approximately 1 in 200,000 in Japan. For this reason, many patients are not diagnosed until adulthood when irreversible kidney or cardiac damage has occurred [6,10]. Pre-symptomatic detection of patients with Fabry disease has been hampered by the lack of effective methods for population screening. In 2002, Mills et al. [11] reported a method to quantitatively measure GL-3 in plasma by tandem mass spectrometry using C17-GL-3 or [D4] C16-GL-3 as an internal standard. Recently, our group developed a slight modification of the method to measure GL-3 in whole urine samples. We used urine samples instead of plasma because young children are usually afraid of having blood drawn [12]. We have used this method to measure the concentration of total GL-3 in urine and found that the GL-3 levels in urine from hemizygous patients with the classic type of Fabry disease were significantly higher than that in control urine samples. This procedure can be used as a reliable non-invasive method for general and high-risk population screening for the classic type and probably renal variant of Fabry disease [12].

Materials and methods

Materials

Five to twenty milliliters of random fresh urine was obtained from 1140 normal volunteers (mean age 36.2 ± 9.6 years old, range 19–65, male/female ratio 75/25) who came to the clinic for a general health examination. Other random urine samples were collected from Fabry hemizygotes and heterozygote carriers prior to initiation of enzyme replacement therapy. GL-3 and creatinine levels were measured in all urine samples. All samples were collected with informed consent.

Patient characteristics

Eleven hemizygotic patients with classic type Fabry disease were divided into three groups A, B, and C. Patients in groups A and B showed one or more symptoms of classic type Fabry disease, with Ccr ≥ 30 mL/min and Ccr < 30 mL/min, respectively. The one asymptomatic hemizygote was classified as group C. This asymptomatic hemizygote (3 years old, case a) and his 5-year-old heterozygous sister (case b) had the L403S mutation which is associated with classic type Fabry disease.

Eight heterozygous carriers were divided into two groups, symptomatic (group D) and asymptomatic (group E). The number of patients, age distribution, and positive rate for urinary protein in each group are shown in Table 1.

Other urine samples were obtained from a pre-symptomatic 14-year-old hemizygote (case c) and his 37-year-old mother with proteinuria (case d) in a family with the cardiac variant. Mutation analysis revealed the M296I mutation in both cases confirming the diagnosis [13]. These two cases were classified as group F.

Diagnosis of Fabry disease hemizygotes and heterozygotes was made based on clinical manifestations, family history, and measurement of α -galactosidase A activity in plasma or leucocytes and urinary α -galactosidase A protein level by ELISA, and mutation analysis, if necessary.

Table 1
Characteristics of patient groups with Fabry disease

| Group | Group A | Group B | Group C | Group D | Group E | Group F |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------------|
| Clinical phenotype | Classic type Fabry disease | | | | | Cardiac variant (case c/case d) |
| Hemi or heterozygous | Hemizygous | | | Heterozygous | | Hemizygous/heterozygous |
| Clinical symptoms | Symptomatic | | Asymptomatic | Symptomatic | Asymptomatic | Asymptomatic/symptomatic |
| Creatinine clearance (Ccr) | Ccr ≥ 30.0 mL/min | Ccr < 30.0 mL/min | Normal | Normal | Normal | Normal |
| Number of patients | 7 | 3 | 1 | 6 | 2 | 1/1 |
| Proteinuria (positive rate) | 2/7 | 3/3 | 0/1 | 1/6 | 0/2 | 0/1 1/1 |
| Age (year) | | | | | | |
| Mean | 32 | 47 | 3 | 47 | 19 | 14 43 |
| Range | 19–42 | 32–62 | — | 5–65 | 10–29 | — — |

Measurement of GL-3 in whole urine sample

Measurement of GL-3 was carried out using a modification of the method reported by Mills et al. [11] using a triple quadrupole Quattro micro tandem mass spectrometer (MS/MS) (Micromass, Altrincham, UK).

Human erythrocyte GL-3 was obtained from Sigma (Tokyo, Japan) and the C17-GL-3 internal standard was obtained from Genzyme (Cambridge MA, USA). Both GL-3 were used as standards.

Direct method

Protein in urine samples was measured by a simple dipstick method and 2 µg of the C17-GL-3 internal standard was added to 2.0 mL of protein-negative urine. The urine was sonicated for 30 s. Twenty microliters of the urine sample was injected directly into the electrospray source of the MS/MS and GL-3 in the whole urine sample was measured.

Extraction method

If the urine was positive for protein, 50 µL of the urine sample was mixed with 1 mL of chloroform–methanol (2:1) containing 50 ng of C17-GL-3 and GL-3 was extracted by vortexing the mixture for 30 min. The extract was passed through a 1 mL column containing a 20 µm flit. Twenty microliters of the eluate was injected into the MS/MS.

Measurement of GL-3 in urine sediments and supernatant

To determine the difference between the GL-3 concentrations or the patterns of GL-3 isoforms in the whole urine, urine sediments and supernatant, GL-3 was measured in each urine fraction from three patients with classic type Fabry disease. Two milliliters of each protein-negative fresh urine sample containing 2.0 µg of C17-GL-3 was shaken by hand for 30 s and centrifuged at 12,000 rpm (15,000g) or 30,000 rpm (45,000g) or both for 30 min. Twenty microliters of the supernatant was directly injected into the MS/MS to measure GL-3. GL-3 was extracted from urinary sediments by vortexing them for 60 min with 2.0 mL of chloroform–methanol (2:1) containing 2.0 µg of C17-GL-3 internal standard. The extract was centrifuged to remove the sediment and 20 µL of the supernatant was injected into the MS/MS to measure GL-3.

Results

Reproducibility

The concentration of total GL-3 in a sample of whole urine from one hemizygote with classic type Fabry disease was measured 10 times using the direct method. The mean concentration was 2.30 ± 0.16 µg/mL (CV% 6.96). The concentration of total GL-3 in the whole urine sam-

ple from another hemizygote was measured five times using the lipid extraction method. The mean concentration was 26.40 ± 2.02 µg/mL (CV% 7.66). These results showed that the measurement of GL-3 by both procedures was highly reproducible.

The concentration of total GL-3 in whole urine samples from six hemizygotes, who had no proteinuria, was measured by the both the direct and extraction methods. The total GL-3 concentrations in each subject measured by the two different methods were similar as shown in Table 2.

Distribution of total GL-3 and individual GL-3 isoforms in whole urine, urine sediment and supernatant from Fabry patients

Urine samples from three patients with classic type Fabry disease were centrifuged at 15,000g, 45,000g or both for 30 min and the concentrations of total GL-3 were measured in the whole urine, the sediment and supernatant.

As shown in Table 3, the centrifugal force did not alter the distribution of GL-3 between the sediment and supernatant appreciably, with 18.9 and 19.6% being recovered in the supernatant after centrifugation at 15,000g and 45,000g for 30 min, respectively. The distribution of urinary GL-3 between the sediment and supernatant fractions was relatively constant for each patient and did not vary very much between patients.

The concentrations of total GL-3 in 6 whole urine samples measured by the direct method were between 8.7 and 30.2 µg/mL. The mean concentrations of GL-3 measured by adding the values from the sediment and supernatant fractions after centrifugation at 15,000g and 45,000g for 30 min were 14.9 and 13.0 µg/mL, respectively. The mean recoveries of total GL-3 in the sediment plus supernatant fractions after centrifugation at 15,000g and 45,000g for 30 min were 88.0 and 91.6% of GL-3 from the whole urine samples, respectively.

The distribution of the individual GL-3 isoforms in the whole urine, and in the sediment and supernatant fractions obtained after centrifugation at 45,000g for

Table 2
Comparison of total urinary GL-3 concentrations in Fabry hemizygotes measured by the direct and extraction methods

| Case no. | Age/sex | Direct method µg/mL | Extraction method µg/mL (%) |
|----------|---------|------------------------|--------------------------------|
| 1 | 37/M | 14.42 | 13.78 (95.6) |
| 2 | 32/M | 18.20 | 19.53 (107.3) |
| 3 | 33/M | 9.82 | 9.56 (97.4) |
| 4 | 30/M | 12.98 | 17.20 (132.6) |
| 5 | 32/M | 9.23 | 9.00 (97.5) |
| 6 | 37/M | 14.08 | 14.30 (101.5) |
| Mean | | 13.12 | 13.90 (105.9) |

Table 3

| Centrifugation | Case no. of Fabry patients | Sample No. | Age/sex | Total GL-3 in whole urine measured by direct method (A) $\mu\text{g/mL}$ | Recovery of total GL-3 in sediment supernatant B/A $\times 100$ (%) | GL-3 in urinary supernatant and sediment | | |
|--------------------|----------------------------|------------|---------|--|---|---|----------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | | Supernatant + sediment (B) $\mu\text{g/mL}$ | Supernatant $\mu\text{g/mL}$ (%) | Sediment $\mu\text{g/mL}$ (%) |
| 15,000g for 30 min | 1 | 1-a | 37/M | 14.42 | 79.5 | 11.47 | 1.91 (16.6) | 9.56 (83.4) |
| | | 1-b | | 8.65 | 89.6 | 7.75 | 1.50 (19.4) | 6.25 (80.6) |
| | 2 | 2-a | 32/M | 18.20 | 83.8 | 15.25 | 3.09 (20.3) | 12.15 (79.7) |
| | | 2-b | | 30.20 | 92.6 | 27.97 | 6.00 (21.5) | 21.97 (78.5) |
| | 3 | 3-a | 33/M | 13.01 | 91.5 | 11.90 | 1.96 (16.5) | 9.94 (83.5) |
| Mean | — | — | 16.90 | 88.0 | 14.87 | 2.80 (18.9) | 12.07 (81.1) | |
| 45,000g for 30 min | 1 | 1-a | 37/M | 14.42 | 94.1 | 13.56 | 2.44 (18.0) | 11.13 (82.0) |
| | | 2-a | 32/M | 18.20 | 91.2 | 16.59 | 3.62 (21.8) | 12.97 (78.2) |
| | 3 | 3-b | 33/M | 9.82 | 88.7 | 8.71 | 1.66 (19.1) | 7.05 (80.9) |
| | | Mean | — | — | 14.15 | 91.6 | 12.96 | 2.57 (19.6) |

Table 4

Distribution of individual GL-3 isoforms in the whole urine sample, sediment and supernatant from three hemizygotic patients with classic type Fabry disease

| Case No. | Urine fractions ^a | Distribution of individual GL-3 isoforms (%) | | | | |
|----------|------------------------------|--|-------|------|-------|------|
| | | C16 | C22:1 | C22 | C24:1 | C24 |
| 1 | Whole urine | 8.6 | 4.4 | 28.3 | 22.3 | 36.3 |
| | Supernatant | 11.4 | 6.7 | 27.1 | 25.1 | 29.7 |
| | Sediment | 5.7 | 2.9 | 32.5 | 18.8 | 40.1 |
| 2 | Whole urine | 10.5 | 4.3 | 27.8 | 23.3 | 34.2 |
| | Supernatant | 13.4 | 6.3 | 27.3 | 21.4 | 25.5 |
| | Sediment | 9.5 | 2.9 | 32.9 | 20.3 | 34.3 |
| 3 | Whole urine | 8.9 | 5.2 | 27.3 | 26.5 | 32.1 |
| | Supernatant | 15.3 | 6.3 | 26.2 | 26.8 | 25.4 |
| | Sediment | 8.6 | 4.0 | 27.4 | 26.2 | 33.8 |

^a Centrifugation at 45,000g for 30 min.

30 min was measured for the three patients with classic type Fabry disease (Table 4).

C24-GL-3 was the most abundant isoform of GL-3 in the whole urine and in the urinary sediment from all the patients in our study (Table 4). The proportions of the individual GL-3 isoform levels were similar in the supernatant but there was a higher proportion of the C-16 isoform.

Total GL-3 level in whole urine from normal controls, hemizygotes and heterozygotes with Fabry disease

The mean concentration of total GL-3 in control urine samples was as low as $0.17 \pm 0.13 \mu\text{g/mg Cr}$, range 0.08–0.42. The mean GL-3 concentration in the urine from symptomatic heterozygotes with classic type Fabry disease (group D) was significantly higher than that in control subjects, but GL-3 levels in the urine from 2 out of 8 heterozygotes were within the control range. The mean concentration of GL-3 in urine from hemizygotes

with normal kidney function (group A) was significantly higher than that in controls (Fig. 1). The mean concentration of total GL-3 in urine from hemizygotes with decreased kidney function (group B), was not significantly lower than in the patients with normal kidney function (group A).

One pre-symptomatic 3-year-old hemizygote (case a) in a family with classic type Fabry disease with the L403S mutation in the α -galactosidase A gene had an elevated total urinary GL-3 concentration. In contrast another pre-symptomatic 14-year-old hemizygote (case c) from a family, which has the M296I mutation that is associated with cardiac variant Fabry disease [13], had normal urinary GL-3. The electron microscopic examination of a renal biopsy specimen from case d, the mother of case c, who has microhematuria and proteinuria, revealed some lamellar inclusions in the lysosomes of epithelial cells of Bowman's capsule and renal tubulus [14]. However the concentration of GL-3 in her urine was within the normal range.

Early diagnosis will not be possible using our screening method for hemizygous patients with the cardiac variant genotype and some heterozygotes with the classic type of Fabry disease.

Discussion

In 1969, Philippart et al. [15] identified small amounts of trihexosyl ceramide and dihexosyl ceramide in normal urinary sediments and showed that their concentrations were greatly increased in urinary sediments from patients with Fabry disease. In 1970, Desnick et al. [16] reported a method for the quantitative determination of the neutral glycosphingolipids in urine sediments. The measurement of GL-3 in urine sediments has been widely used for the diagnosis [17–19] and biochemical

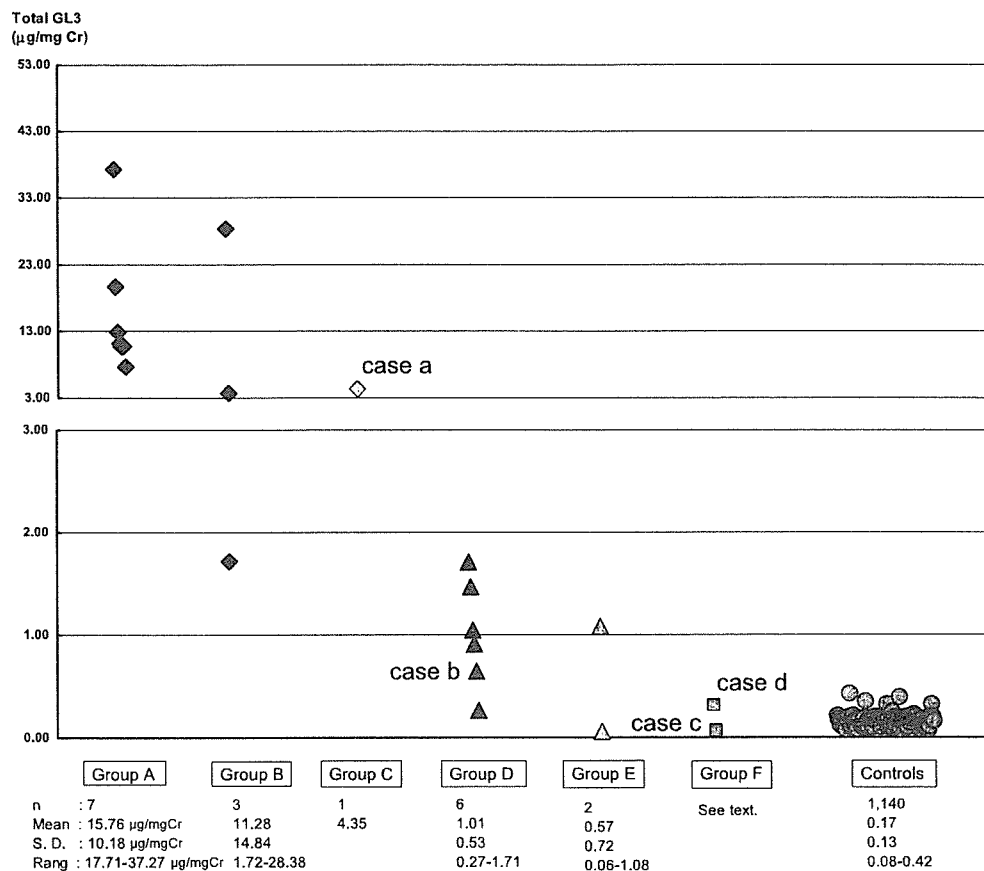


Fig. 1. Urinary total GL3 concentration in normal controls, hemizygous males, and heterozygous females of Fabry disease.

monitoring [3–6] during the treatment of Fabry disease with enzyme replacement therapy.

The above methods for the determination of GL-3 in urine are multiprocedural [15–19], requiring the collection of urinary sediments, lipid extraction, glycolipid isolation, and quantitation of the oligosaccharide moiety by gas–liquid chromatography or high-performance liquid chromatography.

These multiprocedural techniques used to measure urinary GL-3 are not suitable for screening for Fabry disease, because they are labor intensive [20] and only 10–20 assays a week can be performed by a committed technician.

In 2002, Mills et al. [11] reported a novel method to measure GL-3 in plasma quantitatively by MS/MS using the synthetic internal standards C17-GL-3 and [D4] C16-GL-3. The non-invasive nature of the collection of urine makes it the ideal sample for population screening in children because children are frequently afraid of having blood drawn to make plasma. Therefore, we developed a procedure to measure total GL-3 in whole urine samples [12] by using a slight modification of Mills's method [11]. In 2002, Boscaro et al. [21] reported a method to measure GL-3 in human plasma and whole urine samples. The internal standard and the prepara-

tion method for the urine sample were different from our procedure.

The concentration of GL-3 in whole urine samples can be measured by the direct injection of a small amount of urine with an appropriate amount of the C17-GL-3 internal standard into the electrospray source of MS/MS. If the urine contains a considerable amount of protein, urinary GL-3 should be extracted with chloroform–methanol (2:1) prior to injecting the sample into MS/MS.

From our preliminary study, we confirmed that GL-3 concentrations in whole urine samples from Fabry patients without proteinuria measured by both the direct and extraction methods were quite similar. The direct method should be suitable for general population screening and the extraction method may be good for the high risk population screening, such as screening for Fabry disease in subjects having symptoms of kidney disease.

It has been demonstrated that the sediments in urine contain the desquamated cellular elements from the kidney [16,22] and an increased amount of GL-3 in the urine sediment is a good indication of GL-3 accumulation in the cells of the kidney [23]. Few studies have been performed on the glycosphingolipids in urine