

TABLE 1. Patients With GLDC or AMT Mutations

Family number	Ethnicity	Age of onset	Consanguinity	CSF Gly (mM)	CSF/serum Gly ratio	Gene	Mutation ^a		Reference
							Mutation 1	Mutation 2	
Neonatal type									
P14	Caucasian	Day 1	No	296	0.25	GLDC	Exon 1 deletion	c.2714T>G	This study
P21	Caucasian	Day 1	Yes	71	0.24	AMT	c.230C>T	c.230C>T	This study
P26	Caucasian	Day 1	Yes	86	0.27	AMT	c.125A>G	c.125A>G	Kure et al. [1998a]
P29	Caucasian	Day 1	No	43	0.04	GLDC	c.793delC	ND	This study
P31	Caucasian	Day 1	No	196	0.06	AMT	c.471+2T>C	c.887G>A	This study
P32	Caucasian	Day 1	No	32	0.20	GLDC	c.1786C>T	c.1786C>T	This study
P36	Caucasian	Day 1	No	220	0.18	GLDC	Exon 1 deletion	Exon 1 deletion	This study
P39	Caucasian	Day 1	No	187	0.13	GLDC	c.1595C>G	c.1832T>G	This study
P48	Caucasian	Day 1	No	198	0.20	GLDC	c.2665+1G>C	ND	This study
P49	Caucasian	Day 1	No	213	0.17	GLDC	c.2203-2A>G	ND	This study
P59	Caucasian	Day 1	Yes	202	0.23	GLDC	c.1996C>T	c.1996C>T	This study
P5	Oriental	Day 1	No	240	0.18	GLDC	Exon 1 deletion	c.1996C>T	Ohya et al. [1991]
P6	Oriental	Day 1	No	160	0.09	GLDC	c.245T>G	Exon 1 deletion	Kure et al. [2004]
P19	Oriental	Day 1	No	264	0.30	GLDC	c.449A>C	c.1821_1831del	Kure et al. [2004]
P25	Oriental	Day 1	No	74	0.34	AMT	c.54delC	c.2368C>T	Kure et al. [1998b]
P74	Oriental	Day 1	No	117	0.12	GLDC	c.2311G>A	ND	This study
P86	Oriental	Day 1	No	177	0.20	GLDC	c.2213_2214delGT	ND	This study
P93	Oriental	Day 1	No	130	0.13	GLDC	c.2105C>T	ND	This study
P115	Oriental	Day 1	No	145	0.11	AMT	c.147delG	c.970_972delATG	This study
P124	Oriental	Day 1	No	300	0.11	GLDC	c.255+1G>A	c.806C>T	This study
P30	Caucasian	Day 2	No	121	0.19	AMT	c.60delG	c.471+2T>C	This study
P44	Caucasian	Day 2	No	98	0.11	GLDC	c.806C>T	c.255+1G>A	This study
P46	Caucasian	Day 2	No	155	0.13	GLDC	c.2293C>T	c.1705G>A	This study
P47	Caucasian	Day 2	No	78	0.17	GLDC	c.2519T>A	ND	This study
P61	Caucasian	Day 2	No	186	0.17	AMT	c.982_972GC>T	c.452_466del	This study
P75	Caucasian	Day 2	No	167	0.16	AMT	c.212A>C	c.217C>T	This study
P3	Oriental	Day 2	No	151	0.10	GLDC	c.2306C>T	c.2846C>T	This study
P4	Oriental	Day 2	No	387	0.28	GLDC	c.2258A>C	c.2839-1G>C	This study
P7	Oriental	Day 2	No	164	0.10	GLDC	c.2266_2268delTTC	ND	Kure et al. [1991]
P8	Oriental	Day 2	No	209	0.31	GLDC	c.2080G>C	ND	This study
P10	Oriental	Day 2	No	517	0.20	GLDC	c.887T>G	ND	This study
P77	Oriental	Day 2	No	148	0.12	GLDC	c.449A>C	c.1926+1G>A	This study
P91	Oriental	Day 2	No	132	0.08	AMT	c.61delC	c.535delC	This study
P69	Oriental	Day 3	No	220	0.12	GLDC	c.2311G>A	ND	This study
P70	Oriental	Day 3	No	68	0.19	GLDC	Exon 1 deletion	ND	This study
P120	Oriental	Day 3	No	324	0.19	GLDC	c.2574T>G	ND	This study
P23	Oriental	Day 4	No	83	0.14	GLDC	c.2182G>C	ND	This study
P104	Caucasian	Day 4	No	240	0.26	GLDC	c.1166C>T	c.1443insG	This study
P15	Black	Day 5	No	333	0.08	GLDC	Exon 1 deletion	c.2891insA	This study
P34	Caucasian	Day 6	No	174	0.08	AMT	c.139G>T	ND	This study
P76	Caucasian	Day 6	No	215	0.18	AMT	c.136G>A	c.230C>T	This study
P72	Black	Day 7	No	117	0.20	GLDC	c.2665+1G>C	c.176G>C	This study
Infantile type									
P50	Caucasian	3 months	No	200	0.25	GLDC	Exon 1 deletion	c.2311G>A	This study
P78	Caucasian	6 months	No	46	0.06	GLDC	c.2216G>A	c.2216G>A	Dinopoulos et al. [2005]
P12	Caucasian	12 months	No	41	0.04	GLDC	c.2216G>A	ND	Christodoulou et al. [1993]
P107	Caucasian	Unclear ^b	No	150	0.09	GLDC	c.1166C>T	c.1166C>T	Dinopoulos et al. [2005]
P108	Caucasian	Unclear ^b	No	55	0.05	GLDC	c.1166C>T	c.1166C>T	Dinopoulos et al. [2005]

^aDNA mutation numbering is based on cDNA sequence: +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. GLDC, NM_000170; AMT, NM_00481.

^bDevelopmental delay in infantile period. ND, not detected.

TABLE 2. *GLDC* Mutations*

Mutation	Location	Consequence of mutation	No. of families	Novel mutation	Evolutionary conservation				
					Human	Rat	Chicken	Pea	<i>E.coli</i>
Missense mutations									
c.176G>C	Exon 1	p.R59T	1	Yes	Arg	Arg	Arg	Ser	Ser
c.245T>G	Exon 1	p.L82W	1	No	Lue	Lue	Val	Val	Val
c.449A>C	Exon 3	p.N150T	2	No	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
c.806C>T	Exon 6	p.T269M	2	Yes	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
c.887T>G	Exon 7	p.L296R	1	Yes	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile
c.1166C>T	Exon 9	p.A389V	3	No	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
c.1595C>G	Exon 13	p.T532R	1	Yes	Thr	Thr	Thr	His	Thr
c.1705G>A	Exon 14	p.A569T	1	Yes	Ala	Ala	Ala	Met	Ile
c.1832T>G	Exon 15	p.V611G	1	Yes	Val	Val	Ile	Phe	Val
c.2080G>C	Exon 18	p.A694P	1	Yes	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys
c.2105C>T	Exon 18	p.S701F	1	Yes	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
c.2182G>C	Exon 18	p.G728R	1	Yes	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
c.2216G>A	Exon 19	p.R739H	2	No	Arg	Arg	Arg	Ser	Ser
c.2258A>C	Exon 19	p.H753P	1	Yes	His	His	His	His	His
c.2293C>T	Exon 19	p.P765S	1	Yes	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
c.2306C>T	Exon 19	p.P769L	1	Yes	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
c.2311G>A	Exon 19	p.G771R	3	Yes	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
c.2368C>T	Exon 20	p.R790W	1	No	Arg	Arg	-	-	-
c.2519T>A	Exon 21	p.M840K	1	Yes	Met	Met	Met	Met	Ile
c.2714T>G	Exon 23	p.V905G	1	Yes	Val	Val	Ile	Ile	Val
c.2846C>T	Exon 24	p.P949L	1	Yes	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Nonsense mutations									
c.1786C>T	Exon 15	p.R596X	1	Yes					
c.1996C>T	Exon 17	p.Q666X	1	Yes					
c.2574T>G	Exon 22	p.Y858X	1	Yes					
Deletions and insertions									
Exon 1 deletion	Exon 1	Deletion including exon 1	6	No	A recurrent mutation				
c.793delC	Exon 6	Deletion of first letter of 265Gln codon	1	Yes	FS after codon 264/TRM at codon 296				
c.1821_1831del	Exon 15	11-bp deletion started at third letter of 607Gly codon	1	No	FS after codon 607/TRM at codon 669				
c.1443insG	Exon 11	Insertion of G after third letter of 481Leu codon	1	Yes	FS at codon 482/TRM at codon 491				
c.2213_2214delGT	Exon 19	Deletion of GT in 738Cys codon	1	Yes	FS after codon 738/TRM at codon 745				
c.2266_2268delTTC	Exon 19	Deletion of TTC in 756Phe codon	1	No	No FS/TRM at codon 1019				
c.2891insA	Exon 24	Insertion of A after second letter of 964Tyr codon	1	Yes	No FS/TRM at codon 964				
Aberrant splicing									
c.255+1G>A	Intron 2	Disruption of splicing donor site, gt>at	1	Yes					
c.1926+1G>A	Intron 17	Disruption of splicing donor site, gt>at	1	Yes					
c.2203-2A>G	Intron 18	Disruption of splicing acceptor site, ag>gg	1	Yes					
c.2665+1G>C	Intron 22	Disruption of splicing donor site, gt>ct	2	Yes					
c.2839-1G>C	Intron 23	Disruption of splicing acceptor site, ag>cg	1	Yes					

*DNA mutation numbering is based on cDNA sequence: +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. *GLDC*: NM_000170. FS, frameshift; TRM, termination codon.

observed in CSF glycine levels between 42 mutation-positive and 14 mutation-negative individuals. *GLDC* mutations were detected in five (83%) of the six patients with infantile NKH. No mutations were found in *GLDC*, *AMT*, or *GCSH* in any of seven patients with late-onset NKH. NKH mutations were highly heterogeneous. Only nine of the 47 mutation-positive individuals were homo-

zygous for a single mutation (three individuals from consanguineous families (P21, P26, and P59), and five homozygotes of recurrent mutations (P36, P5, P78, P107, and P108)). Patient P32 was homozygous for a private mutation (p.R596X), even though there was no evidence that he was the product of a consanguineous marriage. No *GCSH* mutations were identified in this study.

TABLE 3. AMT Mutations*

Mutation	Location	Sequence alternation	No. of families	Novel mutation	Evolutionary Conservation				
					Human	Rat	Chicken	Pea	<i>E.coli</i>
Missense mutations									
c.125A>G	Exon 2	p.H42R	1	No	His	His	His	His	His
c.136G>A	Exon 2	p.G47R	1	Yes	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala
c.139G>T	Exon 2	p.G47W	1	Yes	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala
c.212A>C	Exon 2	p.H71P	1	Yes	His	His	His	Asn	Ala
c.217C>T	Exon 2	p.R73C	1	Yes	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
c.230C>T	Exon 2	p.S77L	1	Yes	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly
c.826G>C	Exon 7	p.D276H	1	No	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu
c.887G>A	Exon 8	p.R296H	1	No	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys
Deletions and insertion									
c.54delC	Exon 1	Deletion of third letter of 18Phe codon	1	No	FS at codon 20/TRM at codon 95				
c.60delG	Exon 1	Deletion of third letter of 20Pro codon	1	Yes	FS at codon 21/TRM at codon 95				
c.61delC	Exon 1	Deletion of first letter of 21Ala codon	1	Yes	FS at codon 21/TRM at codon 95				
c.147delG	Exon 2	Deletion of third letter of 49Met codon	1	Yes	FS at codon 50/TRM at codon 95				
c.452_466del	Exon 4	Deletion start at second letter of 151Lys codon	1	Yes	No FS/TRM at codon 398				
c.535delC	Exon 5	Deletion of first letter of 179Leu codon	1	Yes	FS at codon 179/TRM at codon 180				
c.970_972delATG	Exon 8	Deletion of 320Met codon	1	Yes	No FS/TRM at codon 482				
c.982_972GC>T	Exon 8	GC in 328Ala codon was substituted byT	1	Yes	FS at codon 328/TRM at codon 337				
Aberrant splicing									
c.471+2T>C	Intron 4	Disruption of splicing donor site, gt>gc	2	Yes					

*DNA mutation numbering is based on cDNA sequence: +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. AMT: NM_00481. FS, frameshift; TRM, termination codon.

GLDC Mutations

Deletion of exon 1 was detected in six patients (four Caucasian, one oriental, and one black). In this study we identified 36 GLDC mutations, 28 of which were novel (Table 2). None of the identified mutations were detected in 100 control alleles. There were 21 missense mutations, three nonsense mutations, seven deletion/insertion mutations, and five splicing mutations (Table 3). For all of the 21 missense mutations the substituted amino acids are conserved in rats, and 13 of the 21 amino acids are conserved from humans to *E. coli*. Such a high degree of evolutionary conservation presumably reflects the functional importance of each of these amino acids. Seven mutations were found in multiple individuals with no apparent relationship. A missense mutation p.N150T was identified in oriental families, while p.T269M, p.A389V, p.R739H, and c.2665+1G>C were found in Caucasian families. Sequencing analysis of the GLDC gene revealed the presence of several polymorphisms, which were also found in control subjects (Table 4). Five of the polymorphisms were found in at least 10% of the control alleles tested. Three of them were found within exons (exon 1: c.249G>A; exon 4, c.501G>A; and exon 25, c.3070C>G (3' noncoding region)). Two of them were located in introns (intron 9, c.1262+36A>G; and intron 19, c.2203-6insA). The c.2203-6insA polymorphism was located at the intron 19/exon 20 boundary, and substitutes the ttaaaaaaaatcacg/GAAGAAA (A8 allele) to the ttaaaaaaaatcacg/GAA GAAA (A9 allele). Other polymorphisms that were less frequently observed were c.438G>A (p.T146T) in exon 3, c.1261+36A>G (intron 9), and c.1261+52G>A (intron 9).

Human Mutation DOI 10.1002/humu

AMT Mutations

A total of 17 mutations (including 13 novel mutations) were identified, including eight missense mutations, eight deletion/insertion mutations, and one splicing mutation. The evolutionary conservation of each mutated amino acid is shown in Table 3. All of these amino acids are conserved among humans, rats, and chickens, and six of eight amino acids are also conserved in peas, which suggests that they are functionally important. All of the deletion/insertion mutations generated a profoundly truncated AMT polypeptide. Two polymorphic sites were observed in two AMT exons: exon 2, c.327T>C; and exon 8, c.1083G>A.

Characterization of the GLDC Exon 1 Deletion

To define the boundaries of the exon 1 deletions, eight STSs were designed: seven STSs at the region 150 kb upstream of GLDC, and one STS in intron 2 of GLDC (Fig. 1; Supplementary Table S1). Two additional published STSs (D9S281 and RH92434) and GLDC exons 1–5 were also used for the deletion mapping. We amplified a total of 15 STSs using genomic DNA as the templates obtained from Patients P5 and P36, who were homozygous for the GLDC exon 1 deletion. In Patient P5, STSs 2–8 and exons 1–3 were not amplified, indicating that the 80–100 kb was homozygously deleted. In Patient P36, STSs 6–8, and exons 1–2 failed to be amplified, demonstrating a 35–45 kb homozygous deletion. Both deletions did not extend to a known gene 5' adjacent to GLDC: jumonji domain containing protein2C (*JMJD2C*). *Alu* repeats in this region were identified using the UCSD Genome Browser (Fig. 1).

TABLE 4. Haplotype Analysis of the *GLDC* Allele With the Exon 1 Deletion

Patients	Ethnicity	Allele	Polymorphic site			
			Exon 4 c.501G>A ^a	Intron 9 c.1262+36A>G	Intron 19 c.2203–6insA	Exon 25 (3' noncoding region) c.3070C>G
P5	Oriental	Allele 1	G	A	A8	C
		Allele 2	G	A	A8	C
P14	Caucasian	Allele 1	G	A	A8	C
P36	Caucasian	Allele 1	G	A	A8	C
		Allele 2	G	A	A9	C
P50	Caucasian	Allele 1	A	G	A9	C

^aDNA mutation numbering is based on cDNA sequence: +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. *GLDC*: NM_000170.

Haplotype Analysis of the *GLDC* Mutations

The identification of five polymorphisms within *GLDC* allowed us to determine the haplotypes of the mutant alleles with the exon 1 deletion. Haplotypes of the deletion allele were identified in four families (P5, P14, P36, and P50), but could not be determined in two families (P15 and P86; Table 4). Four mutant alleles shared the same haplotype (G, A, A8, C), with the genotypes of four polymorphic sites being written as follows: (c.501G>A, c.1232+36A>G, c.2203–6insA, c.3070C>G). Two additional haplotypes, (G, A, A9, C) and (A, G, A9, C) were also found, suggesting multiple origins of the exon 1 deletion.

Mutation Spectra of the *GLDC* and *AMT* Genes

The *GLDC* mutations detected in this study, as well as those from previous reports, are illustrated in Fig. 2A. The most striking feature of the mutation distribution is the clustering of the missense mutations in exon 19. Seven of the 32 missense mutations (22%) were identified in exon 19. The distribution of the *AMT* mutations is shown in Fig. 2B. No obvious clustering of the mutations was found in this gene.

DISCUSSION

We undertook an extensive screening for *GLDC*, *AMT*, and *GCSH* mutations in a cohort of patients with NKH, and the results reveal a comprehensive picture of the mutation spectrum of NKH to date. In this study, 36 *GLDC* mutations and 17 *AMT* mutations were detected, including 28 novel *GLDC* and 13 novel *AMT* mutations. In total, 75% of neonatal and 83% of infantile patients were positive for *GLDC* or *AMT* mutations. Mutations in NKH patients were highly heterogeneous. Patients were found to be compound heterozygotes in 38 of 47 mutation-positive cases (81%). This is in sharp contrast with findings in countries with a high incidence of NKH, such as Finland [von Wendt et al., 1979] and Israel [Korman and Gutman, 2002]. In those countries there are common mutations and many homozygotes for each common mutation. A *GLDC* missense mutation (p.564I) has been identified in Finland [Kure et al., 1992], and a *GLDC* missense mutation (p.M1 T) and *AMT* missense mutation (p.H42R) have been found in Israel [Boneh et al., 2005; Flusser et al., 2005].

In 16 of 36 families (44%) with *GLDC* mutations, we were able to identify a mutation in only one of two mutant alleles despite extensive mutational screening of *GLDC*, *AMT*, and *GCSH*. Mutations may present in promoter regions or introns of the *GLDC* gene, or large deletions or duplications may exist. Deletion of *GLDC* exon 1 was detected in eight of the 36 families (22%) with *GLDC* mutations. The deletion was found in Caucasian,

oriental, and black patients. Subsequent haplotype analysis suggested multiple origins of the deletion. There is a high-density repeat region of *Alu* motifs in the 5' upstream region and the introns of *GLDC*, which are reported to trigger a homologous recombination between two *Alu* motifs and cause a large deletion (e.g., the C1-inhibitor gene, *C1-INH* [Stoppa-Lyonnet et al., 1991]; lysyl hydroxylase gene, *PLOD1* [Pousi et al., 1994]; and a MutL mismatch repair gene, *hMLH1* [Mauillon et al., 1996]). We therefore speculate that the deletions of *GLDC* exon 1 are caused by homologous recombination between *Alu* repeats. Recently, Sellner et al. [2005] reported a deletion of *GLDC* exons 2–15 that was flanked by *Alu* motifs. *Alu*-mediated homologous deletion may occur not only in the 5' region of *GLDC*, but also in other regions of *GLDC*.

No mutations were detected in seven patients with late-onset NKH, despite intensive screening of the entire coding regions of *GLDC*, *AMT*, and *GCSH*, which suggests that gene(s) other than *GCS* genes may be responsible for late-onset NKH. Several reports have described hyperglycinemic patients with no evidence of neurological symptoms until 1 year of age [Bank and Morrow, 1972; Steiman et al., 1979; Lane et al., 1991, 1998; Wiltshire et al., 2000; Ellaway et al., 2001]. The diagnosis of NKH was not confirmed by mutational analysis in any of those patients. Patients with atypical GE tend to have a relatively modest elevation of serum and CSF glycine concentrations, which may be also caused by other genetic disorders or therapeutic agents [Korman and Gutman, 2002]. Vanishing white matter disease is a type of leukoencephalopathy with characteristic MRI findings that is commonly associated with mild elevation of CSF glycine concentration [van der Knaap et al., 1999]. This disorder might have been classified as a late-onset NKH if the responsible genes (*EIF2B5* and *EIF2B2*) had not been identified [Leegwater et al., 2001]. For a more accurate diagnosis and better understanding of late-onset NKH patients, genetic characterization is of paramount importance. There are several other proteins that are functionally related to the GCS reaction. Lipoylation of H-protein is catalyzed by lipoyltransferase. The gene encoding the enzyme would be a good candidate for NKH [Fujiwara et al., 1999]. Two types of glycine transporters, GlyT1 and GlyT2, have been identified [Zafra et al., 1997]. GlyT2 is located only in the brain stem and spinal cord, while GlyT1 is distributed in the brain, kidney, and liver, and the latter transporter may have a role in maintaining the glycine level in both CSF and plasma. Thus, the GlyT1 gene is another good candidate gene for NKH.

A mutation in at least one of two alleles was identified in 47 of 62 patients with neonatal or infantile type NKH, 36 of whom (77%) had *GLDC* mutations. The dominance of the *GLDC* mutations over *AMT* mutations is in agreement with previous

enzymatic studies [Tada and Hayasaka, 1987; Toone et al., 2000]. No GCSH mutations were identified in any of the three clinical subtypes of NKH, suggesting that GCSH mutations are extremely rare in NKH. We recently identified a heterozygous splicing mutation in GCSH in a Japanese family with a peculiar type of NKH—transient type NKH [Kure et al., 2002]. Transient NKH is indistinguishable from neonatal NKH in terms of the onset of disease, but serum and CSF glycine are normalized within 2–8 weeks [Luder et al., 1989; Schiffmann et al., 1989]. A girl with atypical NKH was reported to have low enzymatic activity of the H-protein [Hiraga et al., 1981]. Unlike other patients with NKH, this patient showed progressive deterioration and extensive spongy degeneration of white matter with marked gliosis on postmortem examination [Trauner et al., 1981]. It may be that GCSH mutations will be found in patients with atypical NKH rather than the more readily recognized clinical form of NKH.

Seven of 32 GLDC missense mutations were clustered in exon 19 (Fig. 2). Glycine decarboxylase consists of 1,020 amino acids, and exon 19 encodes 37 of 1,020 amino acids (3.6%), that is, 22% of the GLDC missense mutations were clustered in only 3.6% of the protein-coding region. Two octapeptides encoded in exon 19—His749 to Phe756 (HLNLHKTF) and Pro759 to Gly766 (PHGGGGPG)—are perfectly conserved in humans, chickens, peas, and *E. coli*. Crystal structure analysis revealed that His749, Asn751, His753, Lys754, and His760 (underlined) formed an active-site pocket of the GLDC enzyme [Nakai et al., 2005], and the cofactor of GLDC, pyridoxal phosphate, was covalently bound to Lys754 [Fujiwara et al., 1987]. Amino acid changes in this conserved region frequently abolish GLDC enzyme activity, which may be a possible explanation for the high incidence of GLDC missense mutations in this region.

Patients P107 and P108 were homozygous for the p.A389V mutation, while patient P104 was a compound heterozygote of the p.A389V mutation and a null mutation, c.1443insG (Table 1). The p.A389V mutation had approximately 8% residual activity in the COS7 expression analysis [Dinopoulos et al., 2005]. Patients P107 and P108 did not present with comas or seizures in the neonatal period, but exhibited developmental delay and abnormal behaviors that developed with age. In contrast, Patient P104 had a typical presentation of the neonatal form of NKH, but subsequently the course of the disease was less severe. The presence of the pA389V mutant allele, which allows some residual enzyme activity, may explain this milder phenotype of classic NKH. The clinical course of P104 resembled those of P6 and P19, who were expected to have 5–8% residual activity by the in vitro expression analysis [Kure et al., 2004]. These results suggest that only a few-percent difference in GCS residual activity dramatically alters the clinical picture, such as age of onset and prognosis. A previous enzymatic study of patients with neonatal and infantile NKH supports this suggestion [Hayasaka et al., 1987]. GCS activities ranged from 0 to 0.7 nmoles of CO₂ formed/mg protein/hr in the neonatal type, while it ranged from 0.7 to 1.4 in the infantile type (for which the control range was 3.9–5.2). However, an exception was observed. Both P69 and P50 were compound heterozygotes of GLDC exon 1 deletion and p.G771R. Patient P69 manifested typical symptoms on the second day of life, whereas Patient P50 did not develop symptoms until 3 months of age. Thus far, residual activity is a major determinant of the clinical course, but it is probably modified by environmental factors and/or genotypes of other than the GCS genes.

Elucidation of the responsible gene(s) for late-onset NKH, and screening for deletions in all GLDC exons are needed to establish

a more complete picture of the genetic background and develop the genotype–phenotype relationships in NKH.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the families who participated in this work. We thank Dr. Avihu Boneh (Royal Children's Hospital, Melbourne), Dr. Helena Haekansson (Lalmar Central Hospital, Sweden), Dr. Shiro Tono-Oka (Kagoshima City Hospital, Japan), Dr. Toshimitsu Takayanagi (National Hospital Organization Saga National Hospital, Japan), Dr. Mitsuru Kubota (Hokkaido University Hospital, Japan), and Dr. Masaki Takayanagi (Chiba Children's Hospital, Japan) for referring the NKH patients.

REFERENCES

- Bank WJ, Morrow G 3rd. 1972. A familial spinal cord disorder with hyperglycinemia. *Arch Neurol* 27:136–144.
- Boneh A, Korman SH, Sato K, Kanno J, Matsubara Y, Lerer I, Ben-Neriah Z, Kure S. 2005. A single nucleotide substitution that abolishes the initiator methionine codon of the GLDC gene is prevalent among patients with glycine encephalopathy in Jerusalem. *J Hum Genet* 50:230–234.
- Christodoulou J, Kure S, Hayasaka K, Clarke JT. 1993. Atypical nonketotic hyperglycinemia confirmed by assay of the glycine cleavage system in lymphoblasts. *J Pediatr* 123:100–102.
- Dinopoulos A, Kure S, Chuck G, Sato K, Gilbert DL, Matsubara Y, Degrauw T. 2005. Glycine decarboxylase mutations: a distinctive phenotype of nonketotic hyperglycinemia in adults. *Neurology* 64:1255–1257.
- Ellaway CJ, Mundy H, Lee PJ. 2001. Successful pregnancy outcome in atypical hyperglycinaemia. *J Inher Metab Dis* 24: 599–600.
- Flannery DB, Pellock J, Bousounis D, Hunt P, Nance C, Wolf B. 1983. Nonketotic hyperglycinemia in two retarded adults: a mild form of infantile nonketotic hyperglycinemia. *Neurology* 33: 1064–1066.
- Flusser H, Korman SH, Sato K, Matsubara Y, Galil A, Kure S. 2005. Mild glycine encephalopathy (NKH) in a large kindred due to a silent exonic GLDC splice mutation. *Neurology* 64: 1426–1430.
- Fujiwara K, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y. 1987. Amino acid sequence of the phosphopyridoxyl peptide from P-protein of the chicken liver glycine cleavage system. *Biochem Biophys Res Commun* 149:621–627.
- Fujiwara K, Suzuki M, Okumachi Y, Okamura-Ikeda K, Fujiwara T, Takahashi E, Motokawa Y. 1999. Molecular cloning, structural characterization and chromosomal localization of human lipoyltransferase gene. *Eur J Biochem* 260:761–767.
- Hamosh A, Johnston MV. 2001. Nonketotic hyperglycinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, vol 2. New York: McGraw-Hill. p 2065–2078.
- Hayasaka K, Tada K, Fueki N, Nakamura Y, Nyhan WL, Schmidt K, Packman S, Seashore MR, Haan E, Danks DM, Schutgens RBH. 1987. Nonketotic hyperglycinemia: analyses of glycine cleavage system in typical and atypical cases. *J Pediatr* 110:873–877.
- Hiraga K, Kochi H, Hayasaka K, Kikuchi G, Nyhan WL. 1981. Defective glycine cleavage system in nonketotic hyperglycinemia. Occurrence of a less active glycine decarboxylase and an abnormal aminomethyl carrier protein. *J Clin Invest* 68: 525–534.

- Hong YS, Kerr DS, Craigen WJ, Tan J, Pan Y, Lusk M, Patel MS. 1996. Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Hum Mol Genet* 5:1925–1930.
- Hoover-Fong JE, Shah S, Van Hove JL, Applegarth D, Toone J, Hamosh A. 2004. Natural history of nonketotic hyperglycinemia in 65 patients. *Neurology* 63:1847–1853.
- Isobe M, Koyata H, Sakakibara T, Momoi-Isobe K, Hiraga K. 1994. Assignment of the true and processed genes for human glycine decarboxylase to 9p23-24 and 4q12. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1483–1487.
- Kikuchi G. 1973. The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem* 1:169–187.
- Korman SH, Gutman A. 2002. Pitfalls in the diagnosis of glycine encephalopathy (non-ketotic hyperglycinemia). *Dev Med Child Neurol* 44:712–720.
- Korman SH, Boneh A, Ichinohe A, Kojima K, Sato K, Ergaz Z, Gomori JM, Gutman A, Kure S. 2004. Persistent NKH with transient or absent symptoms and a homozygous GLDC mutation. *Ann Neurol* 56:139–143.
- Kume A, Koyata H, Sakakibara T, Ishiguro Y, Kure S, Hiraga K. 1991. The glycine cleavage system. Molecular cloning of the chicken and human glycine decarboxylase cDNAs and some characteristics involved in the deduced protein structures. *J Biol Chem* 266:3323–3329.
- Kure S, Narisawa K, Tada K. 1991. Structural and expression analyses of normal and mutant mRNA encoding glycine decarboxylase: three-base deletion in mRNA causes nonketotic hyperglycinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 174:1176–1182.
- Kure S, Takayanagi M, Narisawa K, Tada K, Leisti J. 1992. Identification of a common mutation in Finnish patients with nonketotic hyperglycinemia. *J Clin Invest* 90:160–164.
- Kure S, Mandel H, Rolland MO, Sakata Y, Shinka T, Drugan A, Boneh A, Tada K, Matsubara Y, Narisawa K. 1998a. A missense mutation (His42Arg) in the T-protein gene from a large Israeli-Arab kindred with nonketotic hyperglycinemia. *Hum Genet* 102:430–434.
- Kure S, Shinka T, Sakata Y, Osamu N, Takayanagi M, Tada K, Matsubara Y, Narisawa K. 1998b. A one-base deletion (183delC) and a missense mutation (D276H) in the T-protein gene from a Japanese family with nonketotic hyperglycinemia. *J Hum Genet* 43:135–137.
- Kure S, Kojima K, Kudo T, Kanno K, Aoki Y, Suzuki Y, Shinka T, Sakata Y, Narisawa K, Matsubara Y. 2001. Chromosomal localization, structure, single-nucleotide polymorphisms, and expression of the human H-protein gene of the glycine cleavage system (GCSH), a candidate gene for nonketotic hyperglycinemia. *J Hum Genet* 46:378–384.
- Kure S, Kojima K, Ichinohe A, Maeda T, Kalmancey R, Fekete G, Berg SZ, Filiano J, Aoki Y, Suzuki Y, Izumi T, Matsubara Y. 2002. Heterozygous GLDC and GCSH gene mutations in transient neonatal hyperglycinemia. *Ann Neurol* 52:643–646.
- Kure S, Ichinohe A, Kojima K, Sato K, Kizaki Z, Inoue F, Yamanaka C, Matsubara Y. 2004. Mild variant of nonketotic hyperglycinemia with typical neonatal presentations: mutational and in vitro expression analyses in two patients. *J Pediatr* 144:827–829.
- Lane RJ, Dick JR, de Bellerocche J. 1991. Glycine and neurodegenerative disease. *Lancet* 337:732–733.
- Lane RJ, Virgo L, Lantos PL, de Bellerocche J. 1998. A case of multiple system atrophy with hyperglycinaemia due to a selective deficiency of glycine transporter mRNA. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:353–358.
- Leegwater PA, Vermeulen G, Konst AA, Naidu S, Mulders J, Visser A, Kersbergen P, Mobach D, Fonds D, van Berkel CG, Lemmers RJ, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS. 2001. Subunits of the translation initiation factor eIF2B are mutant in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat Genet* 29:383–388.
- Luder AS, Davidson A, Goodman SI, Greene CL. 1989. Transient nonketotic hyperglycinemia in neonates. *J Pediatr* 114:1013–1015.
- Mauillon JL, Michel P, Limacher JM, Latouche JB, Dechelotte P, Charbonnier F, Martin C, Moreau V, Metayer J, Paillot B, Frebourg T. 1996. Identification of novel germline hMLH1 mutations including a 22 kb Alu-mediated deletion in patients with familial colorectal cancer. *Cancer Res* 56:5728–5733.
- Nakai T, Nakagawa N, Maoka N, Masui R, Kuramitsu S, Kamiya N. 2005. Structure of P-protein of the glycine cleavage system: implications for nonketotic hyperglycinemia. *EMBO J* 24:1523–1536.
- Nanao K, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y, Danks DM, Baumgartner ER, Takada G, Hayasaka K. 1994a. Identification of the mutations in the T-protein gene causing typical and atypical nonketotic hyperglycinemia. *Hum Genet* 93:655–658.
- Nanao K, Takada G, Takahashi E, Seki N, Komatsu Y, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y, Hayasaka K. 1994b. Structure and chromosomal localization of the aminomethyltransferase gene (AMT). *Genomics* 19:27–30.
- Ohya Y, Ochi N, Mizutani N, Hayakawa C, Watanabe K. 1991. Nonketotic hyperglycinemia: treatment with NMDA antagonist and consideration of neuropathogenesis. *Pediatr Neurol* 7:65–68.
- Okamura-Ikeda K, Ohmura Y, Fujiwara K, Motokawa Y. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *Eur J Biochem* 216:539–548.
- Pousi B, Hautala T, Heikkinen J, Pajunen L, Kivirikko KI, Myllyla R. 1994. Alu-Alu recombination results in a duplication of seven exons in the lysyl hydroxylase gene in a patient with the type VI variant of Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hum Genet* 55:899–906.
- Sakata Y, Owada Y, Sato K, Kojima K, Hisanaga K, Shinka T, Suzuki Y, Aoki Y, Satoh J, Kondo H, Matsubara Y, Kure S. 2001. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 94:119–130.
- Schiffmann R, Kaye EM, Willis JK 3rd, Africk D, Ampola M. 1989. Transient neonatal hyperglycinemia. *Ann Neurol* 25:201–203.
- Sellner L, Edkins E, Greed L, Lewis B. 2005. Detection of mutations in the glycine decarboxylase gene in patients with nonketotic hyperglycinaemia. *Mol Genet Metab* 84:167–171.
- Singer HS, Valle D, Hayasaka K, Tada K. 1989. Nonketotic hyperglycinemia: studies in an atypical variant. *Neurology* 39:286–288.
- Steiman GS, Yudkoff M, Berman PH, Blazer-Yost B, Segal S. 1979. Late-onset nonketotic hyperglycinemia and spinocerebellar degeneration. *J Pediatr* 94:907–911.
- Stoppa-Lyonnet D, Duponchel C, Meo T, Laurent J, Carter PE, Arala-Chaves M, Cohen JH, Dewald G, Goetz J, Hauptmann G, Laguerre G, Lesavre P, Lopez-Trascasa M, Misiano G, Moraine C, Sobel A, Spöth PJ, Tosi M. 1991. Recombinational biases in the rearranged C1-inhibitor genes of hereditary angioedema patients. *Am J Hum Genet* 49:1055–1062.

- Suzuki Y, Ueda H, Toribe Y. 2001. [Proton MR spectroscopy of nonketotic hyperglycinemia]. *No To Hattatsu* 33:422–425.
- Tada K, Narisawa K, Yoshida T, Yokoyama K, Nakagawa H, Tanno K, Mochizuki K, Arakawa T, Yoshida T, Kikuchi G. 1969. Hyperglycinemia: a defect in glycine cleavage reaction. *Tohoku J Exp Med* 98:289–296.
- Tada K, Hayasaka K. 1987. Non-ketotic hyperglycinaemia: clinical and biochemical aspects. *Eur J Pediatr* 146:221–227.
- Takayanagi M, Kure S, Sakata Y, Kurihara Y, Ohya Y, Kajita M, Tada K, Matsubara Y, Narisawa K. 2000. Human glycine decarboxylase gene (GLDC) and its highly conserved processed pseudogene (psiGLDC): their structure and expression, and the identification of a large deletion in a family with nonketotic hyperglycinemia. *Hum Genet* 106:298–305.
- Toone JR, Applegarth DA, Coulter-Mackie MB, James ER. 2000. Biochemical and molecular investigations of patients with nonketotic hyperglycinemia. *Mol Genet Metab* 70:116–121.
- Toone JR, Applegarth DA, Coulter-Mackie MB, James ER. 2001. Recurrent mutations in P- and T-proteins of the glycine cleavage complex and a novel T-protein mutation (N145I): a strategy for the molecular investigation of patients with nonketotic hyperglycinemia (NKH). *Mol Genet Metab* 72:322–325.
- Toone JR, Applegarth DA, Kure S, Coulter-Mackie MB, Sazegar P, Kojima K, Ichinohe A. 2002. Novel mutations in the P-protein (glycine decarboxylase) gene in patients with glycine encephalopathy (non-ketotic hyperglycinemia). *Mol Genet Metab* 76:243–249.
- Toone JR, Applegarth DA, Levy HL, Coulter-Mackie MB, Lee G. 2003. Molecular genetic and potential biochemical characteristics of patients with T-protein deficiency as a cause of glycine encephalopathy (NKH). *Mol Genet Metab* 79:272–280.
- Trauner DA, Page T, Greco C, Sweetman L, Kulovich S, Nyhan WL. 1981. Progressive neurodegenerative disorder in a patient with nonketotic hyperglycinemia. *J Pediatr* 98:272–275.
- Turner SR, Ireland R, Rawsthorne S. 1992. Cloning and characterization of the P subunit of glycine decarboxylase from pea (*Pisum sativum*). *J Biol Chem* 267:5355–5360.
- van der Knaap MS, Wevers RA, Kure S, Gabreels FJ, Verhoeven NM, van Raaij-Selten B, Jaeken J. 1999. Increased cerebrospinal fluid glycine: a biochemical marker for a leukoencephalopathy with vanishing white matter. *J Child Neurol* 14:728–731.
- von Wendt L, Hirvasniemi A, Simila S. 1979. Nonketotic hyperglycinemia. A genetic study of 13 Finnish families. *Clin Genet* 15:411–417.
- Wiltshire EJ, Poplawski NK, Harrison JR, Fletcher JM. 2000. Treatment of late-onset nonketotic hyperglycinaemia: effectiveness of imipramine and benzoate. *J Inher Metab Dis* 23:15–21.
- Zafra F, Aragon C, Gimenez C. 1997. Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol Neurobiol* 14:117–142.

札幌市におけるタンデム質量分析計によるマス・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

本間かおり，花井潤師，野町祥介，田上泰子，福士 勝，藤田晃三

札幌市衛生研究所

要 旨

札幌市において2005年4月から、タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始するにあたり、検査の希望の有無を登録するなど、これまでのスクリーニングとは異なった受付処理に対応し、かつ、従来の事務処理システムと連動して運用できるシステムを開発した。

キーワード

新生児スクリーニング、事務処理システム、タンデム質量分析計、受付処理、成績処理

緒 言

札幌市の新生児スクリーニングでは従来から、対象6疾患（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、ガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症および先天性副腎過形成症；以下、6疾患）の検査に対応した当所独自開発の事務処理システム（以下、ルーチンシステム）により、検体の受付登録・検査データの取込・結果判定・成績書発行等を行ってきた。しかし2005年4月から、タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング（以下、タンデムMS）をパイロットスタディとして開始するにあたり、希望者のみを検査対象とし、希望しない児には検査そのものを行わない

など、これまでのスクリーニングとは異なった事務処理が必要になった^{1,2)}。

そこで、ルーチンシステムと連動し、かつ新しい事務処理に対応できるタンデムMS用の事務処理システムを新たに開発するとともに、ルーチンシステムについても一部の機能を修正し、今回のパイロットスタディにおいて両システムを並行して運用することで、新しい事務処理にも対応が可能になったので報告する。

方 法

タンデムMSの事務処理システム（以下、新規システム）は、ルーチンシステムとの連動性を考慮して設計することとし、必要な機能としては、受付登録処理、検査データ取込処理、成績処理、精査処理、検索処理とした。システムはMicrosoft Accessをベースとして開発することとして、外注により作成した。

結 果

1. 受付登録

今回タンデムMSを開始するにあたって新たに作成した検査申込書（以下、申込書）に

<連絡先>

本間 かおり

〒003-8505 札幌市白石区菊水9条1丁目

札幌市衛生研究所

Tel: 011-841-7672 Fax: 011-841-7073

E-mail: kaori.honma@city.sapporo.jp

は、保護者の署名、住所・電話番号のほか、タンデムMS検査希望の有無及び検査終了後の検体目的外利用の了承の有無が記載され、採血にあたる産科医療機関は血液ろ紙検体と申込書を必ずセットで当所へ送付することにした^{1,2)}。母氏名、児生年月日など血液ろ紙検体に記入される属性情報は、これまでどおりルーチンシステムに登録するが、申込書への記載内容については、新規システムの受付登録機能にて管理することが必要になったため、検体と申込書に同じ番号を振り、この番号をキーにして両システムへの入力内容を相互に参照できるものとした。新規システムへの入力内容は、検体番号・採血回数・受付日・申込書の有無・タンデムMS検査希望の有無・検体目的外利用の了承の有無とし(表1)、これらを表形式で入力できる画面を設計した(図1)。再採血検体では申込書は同封されないが、検査希望の有無と検体目的外利用の了承については、初回検体情報を参照して自動で登録できるようにした。

また、申込書が検体に同封されていなかった場合については、採血医療機関に電話で問い合わせを行い、医療機関側から保護者に対

登録内容	コード	内容説明
申込書の有無	1: あり	申込書が入っている
	2: 仮	申込書は入っていないが病院で検査の希望が確認でき、申込書を送付してもらっている状態
	3: 中止	仮申込書で検査を実施したが、最終的に確認がとれないため、検査を中止し、検査データを消去した
タンデムMS検査の希望	1: あり	同意書にタンデム検査の希望ありのチェックがあり、タンデム検査を実施する
	2: なし	同意書にタンデム検査の希望なしのチェックがあり、タンデム検査を実施しない
	3: 不明	同意書にタンデム検査の希望のチェックがどちらにもなく、タンデム検査を実施しない
検体の目的外利用の承諾	1: 撤回	タンデム検査の希望があり、検査を実施したが、その後、撤回の申請があり、検査データを消去した(番号自体は存在)
	1: あり	同意書に検体の利用の承諾のチェックがあり、目的外利用が可能である
	2: なし	同意書に検体の利用は承諾できないのチェックがあり、目的外利用できない
	3: 不明	同意書に検体の利用チェックがどちらにもなく、目的外利用できない
4: 撤回	同意書に検体の利用の承諾のチェックがあり、目的外利用が可能であったが、その後、撤回の申請があり、目的外利用できなくなった(1年以上保存している検体であれば検体を破棄する)	

表1 受付登録内容

して検査説明があったことを確認することとした。その場合、当所で仮の申込書を作成し、新規システムへは申込書の有無を「仮」、タンデムMS検査の希望を「不明」、検体の目的外利用の了承を「不明」として登録して、6疾患の検査のみを行なうこととした。

なお、申込書が届いていない場合には検査結果の取扱い等の管理に注意を要するため、申込書の有無が「仮」になっている受検者を抽出した「申込書未着リスト」を新規システムにおいて作成して管理することとした。

2. 検査データ取込処理

受付した検体は、タンデムMS検査の希望の有無により分類したうえで、希望ありの群に対してはタンデム質量分析計において、従来からフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症の指標として測定している3項目(Phe, Met, Leu; 以下、アミノ酸3項目)を含めたアミノ酸13指標及びアシルカルニチン関連24指標について測定し、希望なしの群ではアミノ酸3項目についてのみ測定することとした(図2)。

また、測定結果の転送は、タンデム質量分析計のデータ処理ソフト Neolynx から取り出されたテキスト生データを、Microsoft Excel のデータ処理用ワークシートへ取り込み、マクロ機能を利用して、あらかじめ設定したカットオフ値に基づいて自動で判定させた³⁾。さらに、アミノ酸13指標及びアシルカルニチン関連24指標の測定値と同時に、

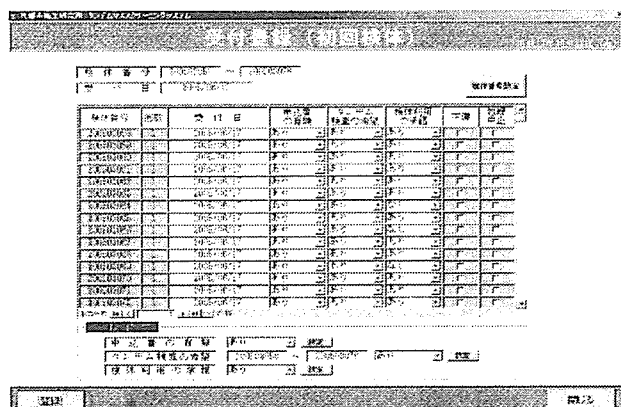


図1 受付登録画面

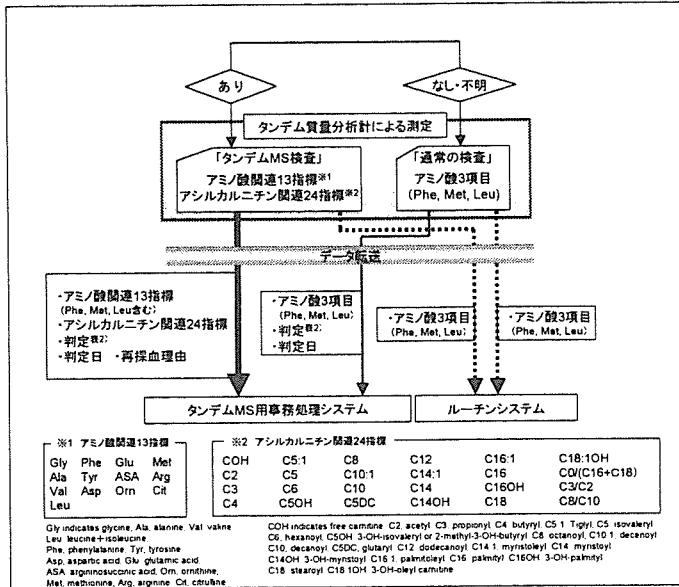


図2 タンデムMS検査における取込データ

判定、判定日及び再採血理由を、テキストファイルとして新規システムに転送するようにした³⁾。

タンデムMS検査の判定は、6疾患以外の疾患を「その他の代謝異常症」として取扱うこととし、一方、アミノ酸3項目の測定値については、これまでどおりルーチンシステムへ転送して判定処理を行うようにした。

なお、ルーチンシステムにおいては、検体1件につき、検査データを1つしか持たない(検査番号/採血回数)の組み合わせ1件につき、1つの検査データ)が、新規システムにおいては、検査番号/採血回数に加え、検査回数もキーとして保持するようにしたため、検体そのものの測定履歴を管理することが可能

判定コード	判定	説明
00	正常	タンデム質量分析計による検査で全て正常
10	再採血	タンデム質量分析計による検査でいずれかの項目が異常値を示し、再採血を要する
20	精査	タンデム質量分析計による検査でいずれかの項目が異常値を示し、精密検査を要する
30	保留	タンデム質量分析計による検査結果が保留
31	GAA再検	アミノ酸3項目 (Phe, Met, Leu) の異常により島津HPLCでの確認検査を要する
32	LAA再検	尿素系アミノ酸の異常により Waters HPLCでの確認検査を要する
33	タンデム再検	その他の検査異常によりタンデム質量分析計での再検査を要する
34	前処理再検	抽出、前処理の問題による再測定を要する
35	分析再検	タンデム質量分析計での分析上の問題により再測定を要する
50	不備	検体量不足など、検体の不備により再採血を要する
99	**	「タンデムMS検査希望なし」でアミノ酸3項目 (Phe, Met, Leu) のみ検査済み

表2 新規システムにおける判定の種類

になった。判定の種類は表2に示すとおりとした。

3. 成績処理

新生児スクリーニングの検査結果は従来、すべての受検者に対して、6疾患の結果判定の入った結果票を医療機関別に郵送してきた。タンデムMSの開始に伴い、従来の結果票に新たに「その他の代謝異常症」という欄を設けた(図3)。さらに、結果票の出力を行うルーチンシステムの成績処理機能に一部修正を加え、その他の代謝異常症の判定を新規システムを参照として6疾患の結果判定と併せて印字できるようにした。

また、新規システムにおいては、タンデム

図3 先天性代謝異常スクリーニング結果票

MS 検査を希望した受検者の成績書発行決裁書を自動で作成できるようにした。

このほか、再採血・精査に関する帳票として、再採血・精査台帳・異常判定検体一覧表・再検査検体結果一覧票を、いずれもルーチンシステムと同様の出力条件で作成できるようにした。

4. 精密検査処理

タンデムMSの検査結果から要精密検査となった場合には、対象となる児の保護者氏名・住所・電話番号を申込書から新規システムに入力し、ルーチンシステムに倣い、精密検査手続きに必要な帳票（精密検査の決裁様式、コンサルタント医師・採血医療機関・保健センターへの FAX 様式）が出力できるようにとした。精密検査理由としては、表3に示す疾患の中から疑われる疾患を最大5つまで登録できるようにした。

なお、このシステムにおいて管理する情報は、札幌市情報セキュリティポリシーにおいて重要性1に分類される個人情報であるため、当該ポリシーが規定する対策を徹底する

アルギニノコハク酸尿症（アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症）
イソ吉草酸血症
カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ欠損症
カルニチントランスポート異常症
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-I (CPT-I)欠損症
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II (CPT-II)欠損症
グルタル酸尿症 I 型
グルタル酸尿症 II 型
高アルギニン血症（アルギナーゼ欠損症）
高チロシン血症 I 型
極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)欠損症
シトルリン欠損症
シトルリン血症 I 型（アルギニノコハク酸合成酵素欠損症）
長鎖 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素(LCHAD)欠損症/三頭酵素(TFP)欠損症
中鎖アシル CoA 脱水素酵素(MCAD)欠損症
3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸尿症
複合カルボキシラーゼ欠損症
プロヒオン酸血症
3-メチルクロトニルグリシン尿症
メチルマロン酸尿症
その他のアミノ酸代謝異常疾患の疑い
その他の有機酸代謝異常疾患の疑い
その他の脂肪酸代謝異常疾患の疑い

表3 新規システムで登録可能な疾患名

こととした。

5. 検索処理

登録した検体について検体番号範囲等による検索が可能な、2通りの検索処理画面を設けた。

1つは、検体番号範囲をキーとして検索可能な表形式（1行に1件分が表示され、縦横にスクロール移動が可能な表）の画面であり、この検索結果画面には、重複してデータ転送した場合等により余計に保存されたデータを、測定値を確認しながら削除できる機能も有する。

もう1つはカード形式（1画面で1件分の情報を全て表示し、移動ボタンにより次の検体の情報が表示可能）の画面で、検体番号範囲のほか、受付日範囲・申込書の有無・タンデムMS検査の希望の有無・検体目的外利用の承諾の有無・判定をキーとして検索が可能である。さらに、ここで抽出した検索結果は、カンマ区切りのテキスト形式（CSV）で出力できるようにしたため、検索結果を表計算ソフト等に簡単に取り込むことができる。

考 察

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を、従来の新生児マス・スクリーニング体制に組み入れることに伴い、新たに整備すべき様々な問題が出現した。その1つとして、受検に関するインフォームド・コンセントを徹底するための体制整備は大きな変更点であり、新たに保護者向けにスクリーニング検査についてのパンフレットと申込書を作成した^{1,2)}。この申込書は、検査機関である衛生研究所が回収し、受検についての保護者の意思を確認するとともに、検体の目的外利用承の有無についても確認できるようにした。

このため、申込書の記載内容について個々に登録が可能なシステムが必要となった。また、従来の新生児マス・スクリーニングで運用しているルーチンシステムでは、検体の属性情報の登録、検査データの取込、検査結果判定、成績

発行、データ検索が可能であるが、タンデム質量分析計による検査データ取込や結果判定を、ルーチンシステムに組み入れることは、確認検査や二次検査などの検査のながれが確立されていない段階では難しく、別のシステムで取扱うほうが良いと考えられた。そこで、これまでのスクリーニングとは異なった受付処理に対応し、かつ、ルーチンシステムと連動して運用できるタンデムMS用の新規システムを今回新たに開発した。2005年4月のパイロットスタディ開始以降、両システムを併用し、検体受付と成績発行等スクリーニングのルーチン業務を進めているが、特に大きな問題もなく順調に運用できている。

ルーチンシステムは、外注により当所独自に開発し、1999年に運用を開始したものであるが、その後このシステムは、札幌市以外のいくつかの新生児スクリーニング施設においても採用されている。従って、このルーチンシステムを使用し、タンデム質量分析計によるスクリーニングを実施しようとする施設においては、今回開発したタンデムシステムを応用する事は可能である。

2年間のパイロットスタディを経たのち、代謝異常スクリーニングは従来の1検査項目で1対象疾患をスクリーニングする体制から、多種類の検査項目の一斉分析により多種類の対象疾患をスクリーニングするという、全く新しいスクリーニング体制になると予想される。事務処理システムについてもそういった新しい体制に

対応させるため、今回のパイロットスタディでの経験を踏まえ、ルーチンシステムと新規システムを統合した形で、より使いやすいシステムの構築を目指し、さらに検討を進めたい。

本研究の一部は厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「わが国の21世紀における新生児マススクリーニングあり方に関する研究」(主任研究者:山口清次)の研究費助成で行った。

文 献

- 1) 野町祥介, 阿部敦子, 花井潤師, 他:平成16年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究」報告書, 98-103, 2004.
- 2) 野町祥介, 本間かおり, 花井潤師, 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環境整備, 日本マス・スクリーニング学会誌, 16:1, 65-72, 2006.
- 3) 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.

受付日:平成18年 1 月 30 日

受理日:平成18年 3 月 24 日

Data Processing System for Neonatal Screening Using Tandem Mass Spectrometry in Sapporo (1)A New Database System

Kaori Honma, Junji Hanai, Shosuke Nomachi, Yasuko Tagami, Masaru Fukushi, Kozo Fujita

Sapporo City Institute of Public Health

札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児 マス・スクリーニングのデータ処理システム (2) 検査データ処理と内部精度管理

花井潤師, 本間かおり, 野町祥介, 田上泰子, 福士 勝, 藤田晃三

要 旨

札幌市では平成17年4月から, タンデム質量分析計(以下タンデムマス)を用いる新たな代謝異常症マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始した。研究の開始にあたって, タンデムマスの測定データを取り込み, 自動的に判定処理を行い, 検査結果を出力するデータ処理システムを作成した。また, 判定結果は検査データとともに事務処理プログラムに転送し, 成績発行・精査の依頼処理などを行うこととした。さらに, これまでのアミノ酸代謝異常症検査などの内部精度管理を参考にして, タンデムマスを用いる代謝異常検査の内部精度管理データベースを構築した。

キーワード

タンデム質量分析計, 代謝異常スクリーニング, 内部精度管理

目 的

札幌市では, 平成17年4月から, 新生児代謝異常症スクリーニングに, タンデム質量分析計(以下タンデムマス)を導入し, 従来のアミノ酸代謝異常症3疾患に加えて, 20種類以上の代謝異常疾患を発見できる新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始した^{1,2)}。

このパイロットスタディを進めるにあたり, 行政的な体制整備³⁾, 現行のスクリーニング成績システムとの連動を目指した事務処理システムの整備⁴⁾, および, タンデムマスで得られた

検査データの処理と内部精度管理を行うデータ処理システムの整備を行った。ここでは, 検査データ処理と内部精度管理を行うデータ処理システムについて報告する。

方 法

タンデムマスは日本 Waters 製 Quattro microAPI を用い, 付属の Neolynx により測定データ等を出力した¹⁾。データ処理システムの構築には, Microsoft Excel 2000 および Access 2000 を用いた。

内部精度管理はコントロール検体として, アメリカ疾病管理センター(以下 CDC)の新生児スクリーニング精度保証プログラムで配布しているコントロールろ紙血(Quality Control Materials, 以下 CDC ろ紙血)およびヒト全血に標準溶液を添加して調製した異なる4濃度の自家製コントロールろ紙血(以下自家製ろ紙血)を用いた。毎回のアッセイでは, 自家製ろ紙血はアッセイの初めと終わりに2重測定し, CDC ろ紙血は1回のみ測定した。

<連絡先>

花井 潤師
〒003-8505 札幌市白石区菊水9条1丁目

TEL: 011-841-7672 FAX: 011-841-7073
E-mail: junji.hanai@city.sapporo.jp

管理項目は、自家製ろ紙血ではアミノ酸 5 項目 (Phe, Leu, Met, Arg, Cit) およびアシルカルニチン 5 項目 (C8, C14, C16, COH, C2) とした。また、CDC ろ紙血ではアミノ酸 5 項目 (Phe, Leu, Val, Met, Cit) およびアシルカルニチン 11 項目 (C3, C4, C5, C6, C5OH, C8, C10, C5DC, C12, C14, C16) とした。

結果

(1) 検査データの流れ (図 1)

新しい検査体制による代謝異常検査では、タンデムマスによる検査の希望の有無により、従来の 3 疾患の検査 (以下、ルーチン検査) とタンデムマスによる検査の 2 種類の異なったデータ処理が存在する⁴⁾。タンデムマスによる測定データは Neolynx により、ルーチン検査項目 (アミノ酸 3 項目) 用およびタンデム検査項目 (アミノ酸および関連

指標 20 項目, アシルカルニチンおよび関連指標 24 項目) 用の 2 種類のテキストファイルを出力した。このテキストファイルを参照して、Excel のマクロで作成したデータ処理用ワークシート (以下、タンデムワークシート) にデータを取り込み、あらかじめ設定したカットオフ値に基づいて、結果を自動判定した。さらに、判定の変更や再採血理由等を入力した後、事務処理システムに判定結果を含めた検査データを転送するため、ルーチン検査項目用およびタンデム検査項目用の 2 種類のテキストファイルを出力した。さらに、タンデム検査の内部精度管理データベース用に、標準液、コントロール、検体等すべての測定データの生データ、定量値が含まれるテキストファイルを出力した。

(2) タンデムワークシート

タンデムワークシートはメニュー画面から

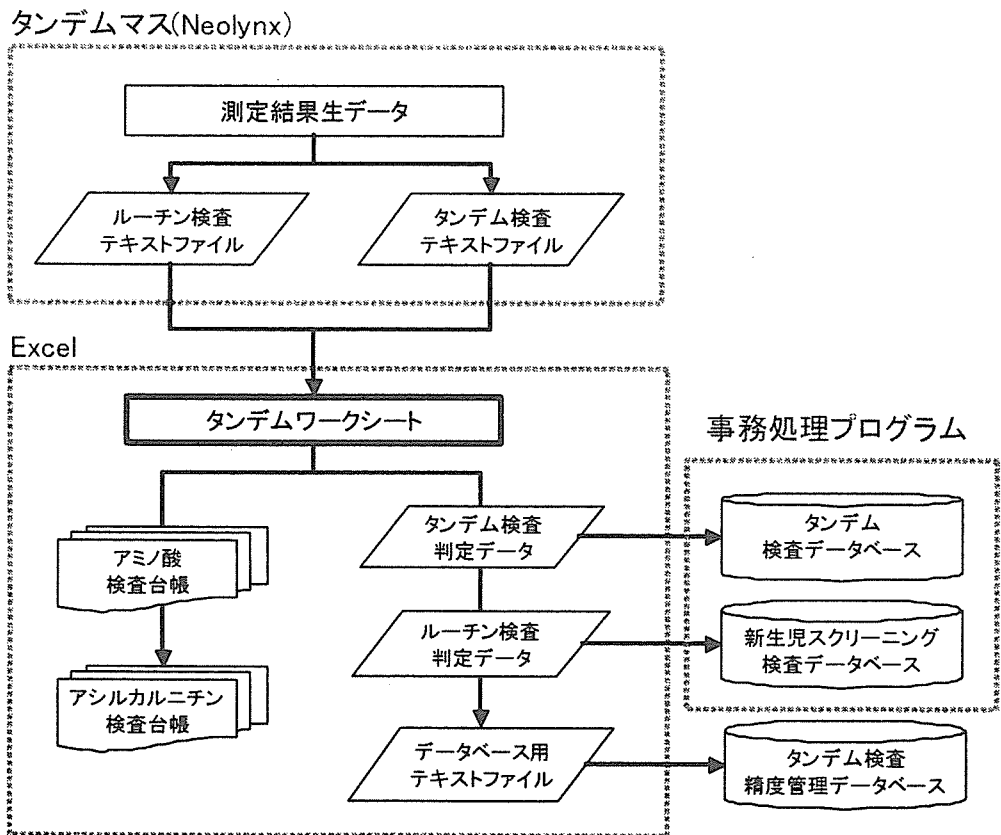


図 1. タンデム検査データの流れ

1	A	B	C	D	E	F	G	H	T
1	SmplNo	判定	理由	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	T
2	QC0			205.6	244.8	157.2	120.9	49.6	
3	QC1			251.8	344.6	185.6	182.1	74.8	
4	QC2			251.1	346.6	189.2	341.5	188.2	
5	QC3			243.0	308.7	174.7	571.1	230.2	
6	200501488			264.4	240.4	108.0	163.7	47.9	
7	200501489			255.2	169.9	94.2	150.1	42.1	
8	200501490			654.2	394.8	161.1	186.2	65.2	
9	200501491			221.3	227.4	126.0	187.4	41.3	
10	200501492			212.7	314.5	170.1	206.9	43.9	
11	200501493			299.7	279.7	158.3	233.8	49.3	
12	200501494			328.6	240.4	127.0	178.4	43.6	
13	200501495	*		367.2	343.7	174.6	226.9	161.5	
14	200501496			313.2	314.1	138.6	179.8	42.9	
15	200501497			381.5	386.0	160.2	210.8	44.3	
16	200501498			211.3	261.1	139.7	192.2	44.3	
17	200501499			346.0	366.5	156.4	198.7	55.4	
18	200501500			522.3	248.5	125.2	182.2	47.9	
19	200501501	*		344.6	223.1	149.4	175.8	50.7	
20	200501502	再採血		320.9	273.7	128.9	179.0	52.6	
21	200501503	検査保留		370.2	236.3	98.0	143.4	40.9	
22	200501504	GAA再検		248.5	247.6	125.7	187.1	47.9	
23	200501505	UAA再検		343.1	402.9	177.6	272.3	55.1	
24	200501506	タンデム再検		240.5	396.4	145.4	245.6	41.5	
25	200501507	前処理再検		287.6	433.8	169.7	258.4	68.4	
26	200501508	分析再検		354.8	309.2	143.1	216.7	70.4	

図2. 判定処理画面

以下の処理を行うこととした。

- ① データ取り込み：Neolynx からの生データを取りこむ。
- ② 判定処理：あらかじめ設定したカットオフ値にもとづいて自動判定処理を行い、必要に応じて判定を変更し、さらに、再採血理由を入力する (図2)。
- ③ 検査台帳出力：アミノ酸とアシルカルニチンの検査結果台帳を印刷する。

④ データベース出力：内部精度管理データベース用のテキストファイルを出力する。

⑤ 転送データ出力：事務処理システムへの転送用テキストデータを出力する。

(3) タンデム検査内部精度管理データベース

タンデム検査における内部精度管理として、毎回のアッセイごとに測定した自家製ろ紙血および CDC ろ紙血の測定結果とともに、検体の測定結果等のデータを用いて、内部精度管理を行うデータベースを作成した。

管理グラフはアミノ酸とアシルカルニチンを別に表示することとし、アッセイ日ごとの時系列で表示した。

- ① 検体グラフ：初回検体について、各項目ごとの平均値をプロットする (図3)。
- ② 自家製ろ紙血コントロールグラフ：4濃度のコントロールろ紙血(QC1~QC4)について、画面上のタブを切り替えることにより、各項目の濃度値のプロットを表示する (図4)。
- ③ CDC ろ紙血コントロールグラフ：4濃度のコントロールろ紙血 (Base, Low, Intermediate, High) について、画面上

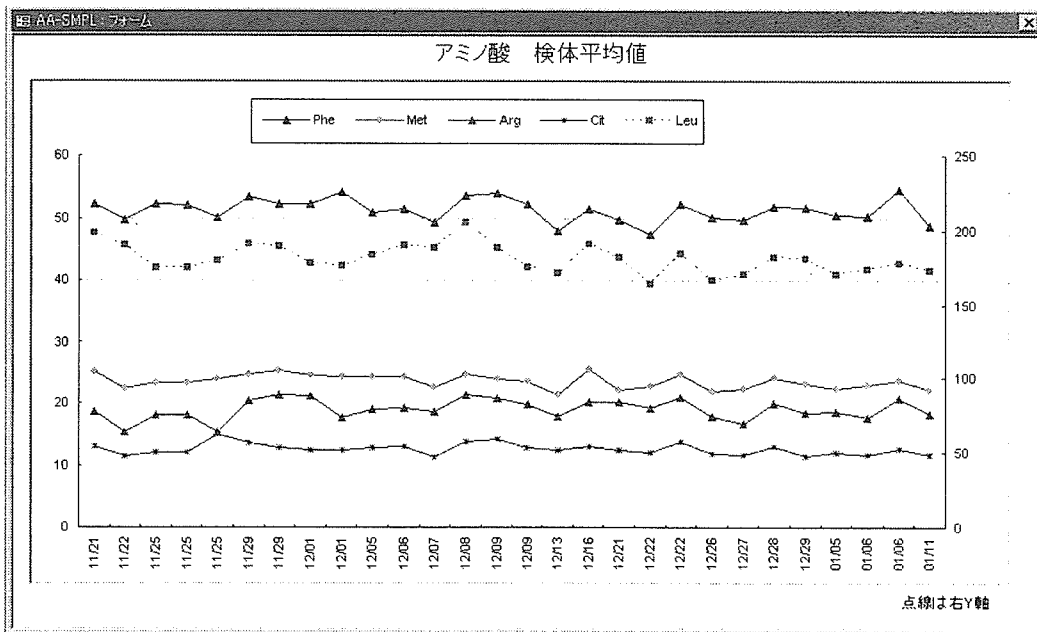


図3. 検体グラフ (アミノ酸)

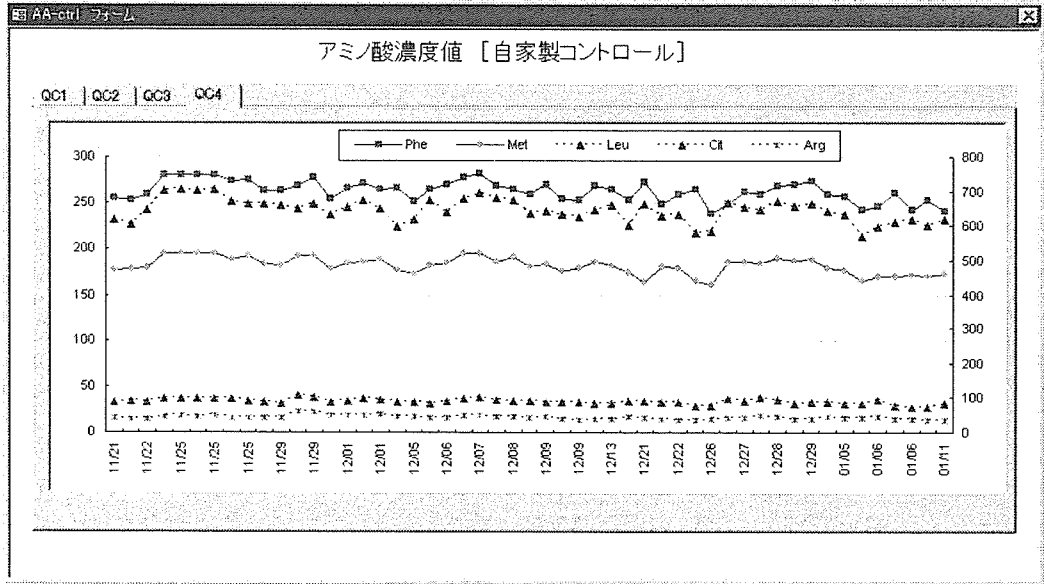


図4. 自家製コントロールグラフ (アミノ酸)

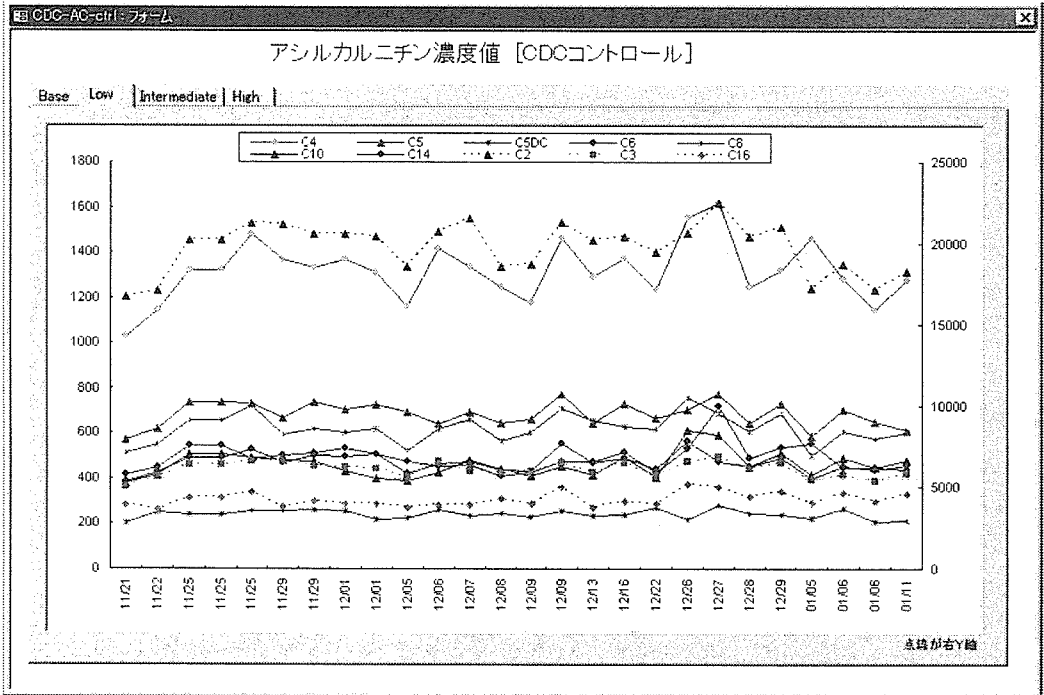


図5. CDC コントロールグラフ (アシルカルニチン)

のタブを切り替えることにより、各項目の濃度値のプロットを表示する(図5)。

- ④ 内標グラフ：すべてに添加している内部標準物質について、各アッセイごとの平均、標準偏差(SD)、変動係数をプロットする。

- ⑤ タンデム検査報告書：精密検査等で医療機関へ報告す

るレポートとして、アシルカルニチン、アミノ酸のすべての項目の濃度値と、アシルカルニチンについては各濃度とカットオフ値との棒グラフ、また、アミノ酸に

については健常新生児データで標準化した
各項目のSD値を棒グラフで表し、視覚

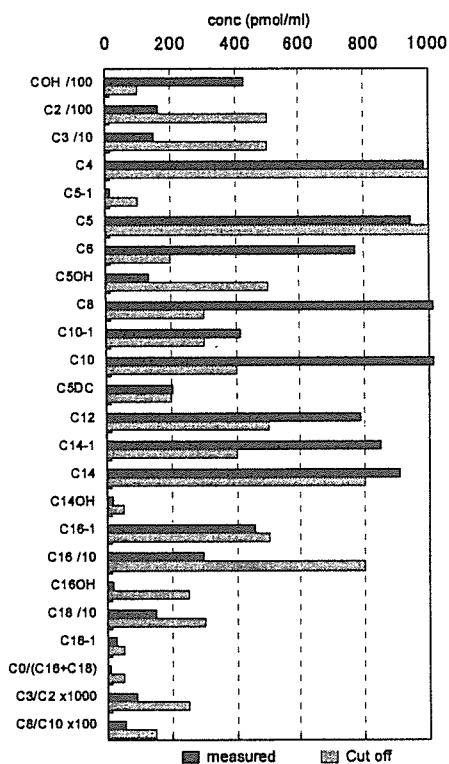
的に各項目の異常を判断できるようにし
た(図6)。

タンデムマス検査結果
Result report using Tandem MS

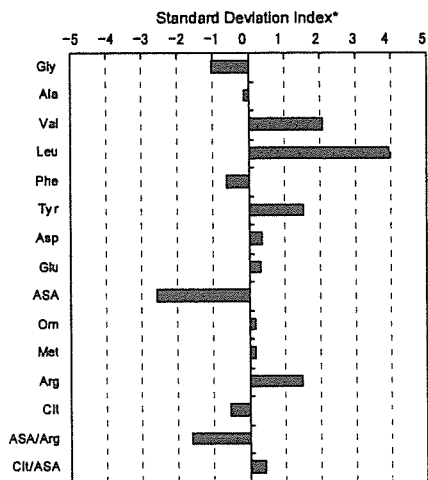
2005/07/08

Patient ID: _____ DBS ID: _____ Name: _____

Acylcarnitine (pmol/ml)	Healthy newborns (n=1040)			
	measured	cut off	mean	SD
COH	43080.0	10000.0	26451.0	7888.0
C2	16630.0	50000.0	18018.0	5097.0
C3	1495.9	5000.0	1535.8	560.2
C4	987.9	1000.0	195.7	58.6
C5:1	15.7	100.0	14.3	5.4
C5	945.2	1000.0	124.8	73.9
C6	771.0	200.0	41.5	13.6
C5OH	130.6	500.0	107.3	28.8
C8	1013.3	300.0	58.9	26.1
C10:1	413.9	300.0	75.9	24.2
C10	1902.9	400.0	109.3	60.1
C5DC	206.1	200.0	33.9	14.0
C12	787.4	500.0	145.3	61.2
C14:1	850.2	400.0	97.3	43.1
C14	909.6	800.0	209.3	58.3
C14OH	20.3	50.0	13.4	4.9
C16:1	458.6	500.0	124.7	58.1
C16	2987.0	8000.0	2333.6	849.5
C16OH	16.4	250.0	14.0	5.4
C18	1505.1	3000.0	713.0	214.7
C18:1	28.4	50.0	12.2	4.1
CO/(C16+C18)	9.59	50.00	9.70	5.00
C3/C2	0.09	0.25	0.09	0.03
C8/C10	0.53	1.50	0.56	0.11



Amino acid (nmol/ml)	Healthy newborns (n=1040)			
	measured	cut off	mean	SD
Gly	218.2	1000	312.3	89.6
Ala	262.0	800	273.4	74.1
Val	184.4	250	131.2	29.9
Leu	328.7	300	185.6	36.2
Phe	43.2	100	49	8.9
Tyr	170.2	800	103.2	42.9
Asp	40.3		34.9	13.8
Glu	288.9	800	270	52.8
ASA	32.0	500	133	39
Orn	87.0	350	81	30.9
Met	23.7	50	22.8	4.6
Arg	16.7	50	10	4.4
Cit	9.7	40	11.7	3.7
ASA/Arg	0.01	0.5	0.035	0.014
Cit/ASA	45.34	1000	38.5	14.1



*: each value is standardized by healthy newborns (n=1040)

Method: Tandem Mass Spectrometry

札幌市衛生研究所
Sapporo City Institute of Public Health

図6. タンデム検査結果報告書

考 察

タンデムマスを用いる新たな新生児代謝異常症マス・スクリーニングの研究開始にあたって、タンデムマスの測定データを取り込み、自動的に判定処理を行い、検査結果を出力するタンデム検査データ処理システムを作成した。ここで設定した判定結果は検査データとともに事務処理プログラムに転送し、成績発行・精査の依頼処理などを行っており、タンデムマスの測定結果を正確、迅速に成績処理に反映させることが可能になった。

さらに、これまでの HPLC を用いたアミノ酸代謝異常症検査での内部精度管理データベースを参考にして、タンデムマス検査の内部精度管理システムを構築した。タンデムマスは、多成分の測定と大量検体処理が可能な分析機器であるが、内部精度管理を行う上で、最適なコントロール検体、管理すべき測定項目、管理すべき指標、いずれもが試行錯誤の段階であり、今後、内部・外部精度管理ともに、最適な方法を模索していく必要がある。

今後、検査項目とそのカットオフ値等の検討結果を踏まえ、検査データ処理システムをより有用性の高いシステムに修正していく予定である。また、内部精度管理についても、他の指標の導入やシステム上での表現方法など、より現実に即した有用なシステムになるよう改善する予定である。

本研究の一部は厚生労働科学研究「わが国の21世紀における新生児マススクリーニングあり方に関する研究」（主任研究者：島根大学医学部小児科、山口清次教授）の研究費助成で行

った。

文 献

- 1) 阿部敦子, 野町祥介, 花井潤師, 他: タンデムマスによる新生児スクリーニングの基礎的検討, 平成16年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究」報告書, 90-97, 2005
- 2) 野町祥介, 阿部敦子, 花井潤師, 他: 札幌市におけるタンデムマスによる新生児スクリーニングシステムの構築, 平成16年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「わが国の21世紀における新生児マススクリーニングのあり方に関する研究」報告書, 98-103, 2005
- 3) 野町祥介, 本間かおり, 花井潤師, 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
- 4) 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

受付日:平成18年 1 月 30 日

受理日:平成18年 3 月 3 日

Data Processing System for Neonatal Screening Using Tandem Mass Spectrometry in Sapporo

(2) Data processing of results and internal quality control

Junji Hanai, Kaori Honma, Shosuke Nomachi, Yasuko Tagami, Masaru Fukushi, Kozo Fujita

アミノ酸代謝異常症一次検査法としてのタンデム質量分析計法

野町祥介¹⁾, 花井潤師¹⁾, 田上泰子¹⁾, 福士勝¹⁾, 藤田晃三¹⁾

1)札幌市衛生研究所

要旨

先天性アミノ酸代謝異常症検査は、指標物質である血中アミノ酸の測定により行なうが、札幌市ではタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始するにあたり、従来のアミノ酸代謝異常症一次検査法を、高速液体クロマトグラフィー法からタンデム質量分析計法に変更するための基礎的検討を行なった。その結果、両法による測定値の間には良好な相関があり、タンデム質量分析計によりアミノ酸代謝異常スクリーニングが可能であった。

キーワード

タンデムマス、新生児マス・スクリーニング、アミノ酸代謝異常症、カットオフ値

緒言

札幌市では2001年度からアミノ酸代謝異常症3疾患(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)の一次検査(以下;一次検査)を、高速液体クロマトグラフィー(以下;HPLC)により実施してきた¹⁾。しかし、2005年度からタンデム質量分析計(以下;タンデムマス)による多項目検査のパイロットスタディ²⁾を開始するにあたって、従来行なってきたこれらの一次検査も、HPLCとの併用期間を経て、タンデムマス法に変更することとした。

今回、アミノ酸代謝異常症3疾患の指標物質であるフェニルアラニン(Phe)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)について両法による測定値を比較し、一次検査法としてのタンデムマス法の有用性に関する基礎的検討を行ったので報告する。

方法

1) HPLC 測定

前処理は、直径1/8インチ濾紙血を有機溶媒(メタノール:アセトン:水、7:2:1)により固定したのち、内部標準物質であるノルロイシン(0.03 μ g/dl)を含む移動相溶液200 μ lで溶出し、これを試料とした。

標準溶液はアミノ酸混合標準液タイプH(和光純薬)を0.01N塩酸で25倍希釈した溶液(各アミノ酸濃度は100 μ mol/l)5.0mlに、ノルロイシン溶液(30mg/dl)100 μ lを加え、移動相で100mlに定容し、標準液とした。

測定はアミノスクリーン・キットの試薬を用い、島津高速液体クロマトグラフLC-VPによ

<連絡先>

野町 祥介

〒002-8011 札幌市白石区菊水9条1丁目

札幌市衛生研究所

Tel: 011-841-7672 Fax: 011-841-7073

E-mail: shosuke.nomachi@city.sapporo.jp

り内部標準法で行い、データ解析は専用ソフト島津 Class-VP と MS-Excel で作成したデータ処理用ワークシート³⁾により行なった。

2) タンデムマス法の測定

前処理は、直径 1/8 インチ濾紙血 1 枚を平底マイクロプレートに取り、安定同位体内部標準試薬 Labeled amino acid standards (set A) 1 vial を 5%含水メタノール 10ml で希釈したのち、さらにメタノールで 50 倍に希釈した抽出液 200 μl により 20 分振盪することで抽出した。その後、溶出液全量を丸底プレートに移し、窒素気流下 40°C で乾固し、10%塩酸ブタノール(東京化成)を 50 μl 加え、60°C 15 分でブチル化を行ない、次いで窒素気流下 40°C で乾固した後、移動相溶媒(アセトニトリル:水; 8:2)180 μl に溶解し、試料とした。

測定は Quattromicro AP(Waters)と送液装置 2795(Waters)を用い、データ解析はソフト Mass Lynx により行なった。解析に使用した

断片は、Leu(含むイソロイシン); プリカーサーイオン 188.3m/z-プロダクトイオン 86.1m/z, Met; プリカーサーイオン 206.3m/z-プロダクトイオン 104.0m/z, Phe; プリカーサーイオン 222.3m/z-プロダクトイオン 120.1m/z で、いずれも Cone 電圧 20V, Collision 電圧 15V とした⁴⁾。

3) 添加回収試験

まず、成人男性から採取した O 型血液をヘマトクリット 50%に調整したのち、アミノ酸濃度が既知である生理食塩水を添加してコントロール用の血液を調整した。次いでこれを用いてコントロールろ紙血を作成し、そのアミノ酸濃度をタンデムマス法と HPLC で測定することで、希釈系列から算出した添加量と回収量の比率から回収率を求めた。

Table.1 Comparison of the recovery rate between HPLC and Tandem mass in Phe, Leu, Ile, and Met

	Phe			Leu			Ile			Met		
theoretical value nmol/ml	182.8	287.6	493.2	447.1	759.0	1371	383.2	695.5	1308	75.0	127.5	230.5
recovery rate by HPLC	97.0%	106.7%	111.5%	100.4%	98.6%	108.4%	91.6%	106.0%	104.7%	65.7%	79.4%	88.9%
recovery rate by Tandem Mass	118.3%	114.6%	114.9%	90.7%	97.3%	105.3%	15.5%	15.7%	17.4%	98.4%	101.0%	117.6%

Table.2 The evaluation of the stability with Tandem mass method using home-made controls

(1) Variation of intra assay (nmol/ml) n=5

(2) Variation of inter assay (nmol/ml) n=5

	theoretical value	mean	SD	CV
Phe	60	70.9	1.8	2.6%
	120	127.7	7.0	5.5%
	240	251.6	11.4	4.5%
Leu	150	178.3	5.2	2.9%
	300	316.4	17.6	5.6%
	600	601.9	28.7	4.8%
Met	50	43.9	1.0	2.3%
	100	85.9	3.5	4.0%
	200	176.6	7.2	4.1%

	theoretical value	mean	SD	CV
Phe	60	62.3	4.4	7.1%
	120	126.8	1.6	1.3%
	240	230.9	10.0	4.3%
Leu	150	163.4	13.2	8.0%
	300	320.2	2.7	0.8%
	600	554.0	40.5	7.3%
Met	50	40.0	2.6	6.4%
	100	83.4	1.6	1.9%
	200	155.9	7.7	4.9%