

Table 3  
Genetic aspects of Japanese patients with GA2

Patient	Mutant gene		cDNA position	Effect
<i>Neonatal onset form</i>				
1	<i>ETFB</i>	Exon 2	77delG	Truncated (frame shift)
		Exon 5	490C>T	Truncated (R174stop)
2	<i>ETFB</i>	Exon 1	55A>T	Truncated (K19stop)
		Exon 2	80delC	Truncated (frame shift)
3	<i>ETFA</i>	Intron 6	IVS6-1G>C	Truncated (frame shift)
		Intron 6	IVS6-1G>C	Truncated (frame shift)
<i>Late onset form</i>				
4	<i>ETFDH</i>	Exon 9	922T>G	F308V
		?	?	
5	<i>ETFDH</i>	Exon 10	1208C>T	A403V
		Exon 10	1208C>T	A403V
6	<i>ETFA</i>	Exon 4	283T>G	L95V
		Exon 4	283T>G	L95V
7	<i>ETFDH</i>	Exon 9	1084G>A	G362R
		Exon 12	1601C>T	P534L
8	<i>ETFDH</i>	Exon 9	1096C>T	L366F
		Exon 12	1675C>T	Truncated (R559stop)
9	<i>ETFDH</i>	Exon 9	1096C>T	L366F
		?	?	
10	<i>ETFDH</i>	Exon 5	524G>A	R175H
		Exon 13	1774T>C	C592R
11	<i>ETFDH</i>	Exon 11	1367C>T	P456L
		Exon 11	1367C>T	P456L
<i>Previously reported cases (Neonatal onset form)</i>				
12*	<i>ETFA</i>	Exon 1	7C>T	Truncated (R3stop)
		Exon 9	799G>A	G267R
<i>(Late onset form)</i>				
13*	<i>ETFB</i>	Exon 5	491G>A	R174Q
		Intron 5	IVS5+1G>C	G148-M200del
14*	<i>ETFB</i>	Exon 5	491G>A	R174Q
		Intron 5	IVS5+1G>C	G148-M200del
15*	<i>ETFA</i>	Exon 6	478delG	Truncated (frame shift)
		Exon 9	764G>T	G255V

\* Purevjav E. et al. [12].

\*\* Colombo I. et al. [11]; sibling case.

tively. A splice site mutation (IVS6-1G>C) and a missense mutation (L95V) were found in 2 alleles of the *ETFA* gene, respectively. Two single nucleotide deletions (77delG and 80delC) and 2 nonsense mutations (K19stop and R174stop) were identified in the *ETFB* gene.

Although the number of subjects limited, the frequency of *ETF* $\alpha$ , *ETF* $\beta$ , and *ETFDH* deficiency in Japanese patients is 27, 27, and 47%, respectively, in our studies. The previous study showed a similar trend, although patients from various ethnic groups were analyzed (11, 33, and 56%, respectively) [13]. All neonatal forms were either *ETF* $\alpha$  or *ETF* $\beta$  deficiency, but cases 6 and 15 with *ETF* $\alpha$  deficiency showed the late onset form. No cases of *ETFDH* deficiency showed the neonatal onset form in our study. Previous reports, however, identified patients with the neonatal onset form with *ETFDH* deficiency [13]. These findings suggest that the severity of the disease is unlikely associated with particular enzyme deficiency. Even if the late onset form appears to be predominant in GA2, the neonatal form may be

underestimated, since children with the neonatal onset form die early in the neonatal period before the diagnosis of GA2 is made.

In addition to the current study, our previous studies revealed 4 mutations in the *ETFA* gene and 2 mutations in the *ETFB* gene in 4 Japanese patients (Table 3) [11,12]. In the 15 cases studied, only 2 cases with *ETF* $\alpha$  deficiency and 2 with *ETFDH* deficiency had homozygous mutations, while the rest of them were compound heterozygotes. There were no common mutations except for L366F in the *ETFDH* gene that was shared by 2 unrelated patients. Other mutations were different in each case, except for the sibling cases (cases 13 and 14). In addition, mutations identified in our study were different from those reported in other countries except for P456L. These findings suggest that Japanese patients with GA2 show allelic heterogeneity without frequent mutations. Similarly, multiple mutations were identified in *ETFA*, *ETFB*, and *ETFDH* genes in non-Japanese populations (19, 7, and 29 mutations, respectively) [13,14], though T266M in the *ETFA*

gene was reported as the most frequent mutation associated with a severe phenotype [13].

All mutations described in this report are novel, except for P456L. P456L in the *ETFDH* gene of patient 11 who remained asymptomatic until his 40's was previously reported in a late onset patient [17]. The patient was a compound heterozygote with a nonsense mutation (W182stop) and P456L and remained asymptomatic until 27 years old [17]. These findings suggest that P456L is associated with a mild phenotype. Since our case was homozygous for this mutation, P456L most likely prevented the development of symptoms until 40 years of age, whereas its presence in combination with the W182stop mutation that can destroy the structure of the protein due to codon termination presumably accelerated the onset of the disease at 27 years [17]. However, immunoblot analysis failed to detect residual protein in our patient. The mutation may only affect the stability of the ETFDH protein with a short half-life without impairing its activity. Although a younger brother of case 11 is alleged to have died of an unknown disease at 30 years old, it was not clarified whether he was affected with the same mutation.

A homozygous IVS6-1G>C mutation in patient 3 produced 2 aberrant *ETF*A transcripts. One of the transcripts lacked the first 7 nucleotides of exon 7, which appears to be generated by alternative splicing using the AG at the 6th and 7th nucleotides of exon 7 as a splice acceptor site as a consequence of the loss of the normal splice acceptor site in intron 6 (IVS6-1G>C). This introduces a frame shift and alters the protein structure, explaining the severe phenotype. The second aberrant transcript containing the skipping of exon 6 and 7 was barely detectable by RT-PCR, suggesting that it represents an extremely minor transcript. Although the mechanism responsible for exon 6 and 7 skipping in the minor transcript is not clear, the sequence analysis of other intron/exon boundaries detected no additional mutations. While exon 6 and 7 skipping does not introduce a frame shift, it is likely that the protein structure and function will be lost as a result of the loss of 71 amino acids.

Two patients with the neonatal onset form (cases 1 and 2) were heterozygous for frame shift and codon termination mutations (77delG/R174stop and K19stop/80delC in the *ETFB* gene, respectively), both of which destroy the protein structure and/or function as a consequence of the frame shift or truncation of the *ETFB* mRNA and explain the severe neonatal onset phenotype. All patients with mutations on one of the ETF protein showed loss of both ETF $\alpha$  and ETF $\beta$  protein, presumably because degradation of one subunit may also be induced by the other subunit deficiency. Although cause of the lability of ETF protein is not clear, an ETF complex may not be formed in the mitochondrial matrix due to abnormality in the peptides of either ETF $\alpha$  or ETF $\beta$ , and the defect results in the lability of both subunits [4].

Although the polarity of the mutated amino acids was not affected by almost all missense mutations except for

G362R and C592R in *ETFDH* that alter the non-polar side chain to a basic side chain, all mutated amino acids are highly conserved among species from insect to humans. Furthermore, none of the mutations were found in 100 alleles from normal Japanese controls. These findings strongly suggest that they are specifically associated with the disease and are the most likely disease-producing mutations. Cases 5 and 6 with the late onset form were homozygous for A403V of *ETFDH* and L95V of *ETF*A, respectively, suggesting that these mutations may be associated with the late onset phenotype. Similarly, L366F in *ETFDH* that was shared by 2 unrelated patients with the late onset form appears to be associated with a mild phenotype since 1 of the patients (case 8) was a compound heterozygote with L366F and an R559stop nonsense mutation that likely destroyed the protein structure. These results suggest that some mutations may be associated with a specific phenotype, although it is necessary to accumulate additional cases with the same genotype to identify a definitive relationship.

It is not feasible to make a definitive diagnosis for GA2 by GC/MS or ESI-MS/MS, although the technique is very useful to confirm the disease. All patients reported here demonstrated reduced or barely detectable ETF or ETFDH protein, making the deficient enzyme predictable. While biochemical diagnosis using immunoblot analysis is useful to identify cases with unstable or reduced protein levels, it does not rule out the functional deficiency of enzymes if patients show comparable levels of protein with controls. Since the activity of ETF and ETFDH may not be determined on a routine basis due to technical difficulties, the easiest and most reliable means to determine specific enzyme deficiency is a genetic diagnosis. Furthermore, this it will facilitate a prenatal diagnosis for families with affected children.

In summary, our results demonstrate that the mutational spectrum is heterogeneous in Japanese patients with GA2, and their phenotypes were not associated with a specific enzyme deficiency. Although no common mutation was found, some mutations appeared to be associated with a specific phenotype. A genetic diagnosis may help to predict the potential outcome of patients and provide more accurate diagnostic information for patients and families with GA2.

#### Acknowledgments

We thank all of the attending physicians for providing clinical information on the patients, Dr. T. Hashimoto for providing anti-ETF antibody, and Ms. M. Furui for her technical assistance. This study was supported in part by a Grant from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture of Japan, the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

## References

- [1] F.E. Frerman, S.L. Goodman, Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4517–4520.
- [2] Y. Ikeda, S.M. Kesse, K. Tanaka, Biosynthesis of electron transfer flavoprotein in a cell-free system and in cultured human fibroblasts. Defect in the alpha subunit synthesis is a primary lesion in glutaric aciduria type II, *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 997–1002.
- [3] J.P. Loehr, S.I. Goodman, F.E. Frerman, Glutaric acidemia type II: heterogeneity of clinical and biochemical phenotypes. *Pediatr. Res.* 27 (1990) 311–315.
- [4] S. Yamaguchi, T. Orii, Y. Suzuki, K. Maeda, M. Oshima, T. Hashimoto, Newly identified forms of electron transfer flavoprotein deficiency in two patients with glutaric aciduria type II, *Pediatr. Res.* 29 (1991) 60–63.
- [5] Y. Tamaoki, M. Kimura, Y. Hasegawa, M. Iga, M. Inoue, S. Yamaguchi, A survey of Japanese patients with mitochondrial fatty acid beta-oxidation and related disorders as detected from 1985 to 2000, *Brain Dev.* 24 (2002) 675–680.
- [6] F.J. Ruzicka, H. Beinert, A new iron–sulfur flavoprotein of the respiratory chain. A component of the fatty acid beta oxidation pathway, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8440–8445.
- [7] D.L. Roberts, F.E. Frerman, J.J. Kim, Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 14355–14360.
- [8] G. Finocchiaro, M. Ito, Y. Ikeda, K. Tanaka, Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the alpha-subunit of human electron transfer flavoprotein, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 15773–15780.
- [9] G. Finocchiaro, I. Colombo, B. Garavaglia, C. Gellera, G. Valdameri, N. Garbuglio, S. Didonato, cDNA cloning and mitochondrial import of the beta-subunit of the human electron-transfer flavoprotein, *Eur. J. Biochem.* 213 (1993) 1003–1008.
- [10] S.I. Goodman, K.M. Axtell, L.A. Bindoff, S.E. Beard, R.E. Gill, F.E. Frerman, Molecular cloning and expression of a cDNA encoding human electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, *Eur. J. Biochem.* 219 (1994) 277–286.
- [11] I. Colombo, G. Finocchiaro, B. Garavaglia, N. Garbuglio, S. Yamaguchi, F.E. Frerman, B. Berra, S. DiDonato, Mutations and polymorphisms of the gene encoding the beta-subunit of the electron transfer flavoprotein in three patients with glutaric acidemia type II, *Hum. Mol. Genet.* 3 (1994) 429–435.
- [12] E. Purejav, M. Kimura, Y. Takusa, T. Ohura, M. Tsuchiya, N. Hara, T. Fukao, S. Yamaguchi, Molecular study of electron transfer flavoprotein alpha-subunit deficiency in two Japanese children with different phenotypes of glutaric acidemia type II, *Eur. J. Clin. Invest.* 32 (2002) 707–712.
- [13] R.K. Olsen, B.S. Andresen, E. Christensen, P. Bross, F. Skovby, N. Gregersen, Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 12–23.
- [14] M. Schiff, R. Froissart, R.K. Olsen, C. Acquaviva, C. Vianey-Saban, Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects, *Mol. Genet. Metab.* 88 (2006) 153–158.
- [15] S. Yamaguchi, T. Orii, N. Sakura, S. Miyazawa, T. Hashimoto, Defect in biosynthesis of mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase in cultured fibroblasts from a boy with 3-ketothiolase deficiency, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 813–817.
- [16] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [17] S.I. Goodman, R.J. Binard, M.R. Wootner, F.E. Frerman, Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) gene, *Mol. Genet. Metab.* 77 (2002) 86–90.

## 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた 日本人中鎖アシルCoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症3例の 脂肪酸β酸化能の検討

虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 中村 勇, 山口清次

島根大学小児科

### 【要 旨】

我々は脂肪酸代謝異常症スクリーニングの補助診断として、線維芽細胞とタンデム質量分析法 (MS/MS) を用い脂肪酸β酸化能を評価する *in vitro* probe assay法を導入してきた。今回、線維芽細胞の代わりに末梢血リンパ球を用いたβ酸化能評価方法を検討した。対象は遺伝子検査で診断が確定された中鎖アシルCoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症の3例。末梢血よりリンパ球を分離し、パルミチン酸を添加した培地で120時間培養後、MS/MSを用いて培養液中のアシルカルニチンを分析した。MCAD欠損症3症例では、C8-アシルカルニチンが0.96, 0.49, 0.58 nmol/mlとコントロール (0.19±0.07 nmol/ml) に比較して高値であった。アシルカルニチン間の比でみると、C8/C10比が対照と比べ差が最も大きかった ( $p < 0.01$ )。リンパ球を用いた *in vitro* probe assayによって上記指標を用いればMCAD欠損症の診断が可能であることを確認した。

### 【キーワード】

タンデム質量分析, アシルカルニチン, リンパ球, 脂肪酸代謝異常症, MCAD欠損症

### 1. はじめに

新生児マススクリーニングはガスリー法を中心とした従来の方法からタンデム質量分析法 (MS/MS) に変わろうとしている。この方法により対象となる代謝異常症は、現行の6疾患から有機酸代謝異常症, アミノ酸代謝異常症, 脂肪酸代謝異常症 (fatty acid oxidation disorders: FAODs) を含む20疾患以上に増えるとされている<sup>1)</sup>。このうちFAODsは脂肪酸β酸化の障害により細胞中のエネルギーの枯渇を引き起こす。

低血糖発作で発症することが多く、突然死や重度の障害を残す危険も指摘されている<sup>2,3)</sup>。

中鎖アシルCoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症は、ミトコンドリア脂肪酸β酸化のうち主に炭素数 (C) 10から4のアシルCoAを代謝するMCADの異常によっておこる。欧米では1~2万に1人と最も頻度の高い先天性代謝異常症の一つであり、かつ突然死様の発症をすることの有名である<sup>2,4)</sup>。日本でのパイロットスタディによると約10万出生に1人の頻度と考えられている<sup>5)</sup>。MCAD欠損症は、適切な生活指導、食事指導で良好な予後が期待でき、早期に発見することは健康な発育を維持するために重要である<sup>6)</sup>。

タンデムマス・スクリーニングによって、発見された患者の確定診断を迅速かつ正確に要求されるべきケースも増えることが予想される<sup>7)</sup>。我々はこれまで脂肪酸酸化異常症の酵素診断を

### <連絡先>

虫本 雄一

〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部小児科

Tel: 0853-20-2219 Fax: 0853-20-2215

E-mail: mushiu1@med.shimane-u.ac.jp

するために患者の培養皮膚線維芽細胞を用いたβ酸化能をMS/MSによって評価する方法を検討してきた<sup>8-9)</sup>。今回、皮膚線維芽細胞の代わりに、より簡便で侵襲が少ない末梢血リンパ球を用いて脂肪酸β酸化能を評価する方法を検討した。

## 2. 対象

MS/MSによるアシルカルニチン分析で異常を示し、遺伝子解析によりMCAD欠損症と確定診断<sup>10)</sup>した3例を対象とした。その変異は症例1が449-452delCTGA/820A>C、症例2が134A>G/449-452delCTGA、症例3が157C>T/275C>Tであった。

対象の診断時の年齢と症状、タンデム質量分析の結果を表1に示す。性別は男児1名と女児2名、年齢は生後3週～2歳0ヶ月の時期に検査を行った。

症例1と2は、新生児マススクリーニングで発見された無症状の症例であり、症例3は1歳7ヶ月時に発熱を伴う感冒に罹患し、発熱2日目の朝に低血糖(20mg/dl以下)を伴う意識障害で発症した症例であった。3例はともに、家族歴、周産期歴、既往歴に特記すべきことを認めなかった。症例1, 2は現在まで無症状で経過している。症例3も治療後は症状の改善を認め、後遺症なく経過している。対照は健康人8

人である。

## 3. 方法

### 3-1 リンパ球分離

EDTA入り採血管に静脈血5mlを採取し、1,500 rpmで10分間遠心した。血漿を除去し、血球層の2倍量のDulbecco's phosphate buffered saline (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を加え均一に混ぜた。混合液をリンパ球分離液(ナカライテスク, 京都, 日本)の上に注意深く流し込み、400×gで30分間遠心し、リンパ球浮遊液を分離採取した。

### 3-2 パルミチン酸負荷

既報の方法<sup>11)</sup>を一部改変して行った。①遠心後のリンパ球分離液をPBSで2回洗浄した。②培養液としてSMEM (invitrogen)に0.4% bovine serum albumin (Sigma, St Louis, Mo, USA), 100u/ml penicillin (ナカライテスク), 0.1mg/ml streptomycin (ナカライテスク), 2mM L-glutamine (ナカライテスク), 0.4mM L-carnitine (Sigma)と25U/ml IL2 (Sigma), 0.2mM パルミチン酸 (ナカライテスク)を最終的にそれぞれの濃度になるように加えたものを用いた。③リンパ球3×10<sup>6</sup>個に1mlのSMEMを添加して、インキュベーター(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)で120時間培養した。

表1 MCAD欠損症3症例のプロフィール

症例 (性)	診断時							検査時	
	年齢	症状	ろ紙血アシルカルニチン分析結果(nmol/ml)					年齢	
			C0 (10-60)	C6 (<0.25)	C8 (<0.35)	C10 (<0.4)	C8/C2 (<0.02)		C8/C10 (<3)
1 (男)	生後5日	無症状 (新生児マス スクリーニング)	37.8	<u>0.43</u>	<u>1.33</u>	<u>0.52</u>	<u>0.049</u>	<u>2.56</u>	生後3週
2 (女)	生後4日	無症状 (新生児マス スクリーニング)	21.57	<u>1.27</u>	<u>12.05</u>	<u>0.67</u>	<u>0.27</u>	<u>17.86</u>	1ヶ月
3 (女)	1歳7ヶ月	低血糖, 意識障害	<u>8.29</u>	<u>0.45</u>	<u>3.05</u>	<u>0.41</u>	<u>0.15</u>	<u>7.41</u>	2歳0ヶ月

### 3-3 MS/MSによるアシルカルニチン分析

MS/MSを用いて培養液中のアシルカルニチン分析を行った。分析は標準化された方法を用いた<sup>8,11-12)</sup>。すなわち培養後の上清10 $\mu$ lに200 $\mu$ lの内部標準液 (NSK-B, Cambridge Isotope Laboratories, Andover USA) を加え、4,000 rpmで10分間遠心した。遠心後の上清150 $\mu$ lをフィルター (セルロースアセテート 0.45 $\mu$ m, 東洋濾紙株式会社, 東京, 日本) に通し、96穴プレート (グライナー・ジャパン, 東京, 日本) に移した。45 $^{\circ}$ Cで乾固し、塩酸ブタノール 50 $\mu$ l (HPLC, Wako, 大阪, 日本) を添加し、65 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。再度窒素ガスにより乾固し、75%アセトニトリル100 $\mu$ l (HPLC, Wako) を添加し混和して分析した。タンデム質量分析計はAPI 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), サンプル注入にはSIL-HTc autosampler (Shimadzu, 京都, 日本) を用いた。1回あたりのサンプル注入量は25 $\mu$ lとし

た。ChemoView<sup>TM</sup> software (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada) を用いて、アシルカルニチンを定量した。

### 3-4 結果解析

有意差はt検定によって行った。統計ソフトはJMP version 5.01aを使用した。

## 4. 結果

MCAD欠損症3例とコントロールのアシルカルニチンプロファイルを図1に示す。MCAD欠損症ではC8-アシルカルニチン (C8) が0.96, 0.49, 0.58 nmol/mlとコントロール (0.19 $\pm$ 0.07 nmol/ml) に比べ高値であった。C8/C10比 4.58, 6.08, 3.49 nmol/ml (コントロール 0.98 $\pm$ 0.13 nmol/ml), C8/C6比 4.58, 6.08, 3.49 nmol/ml (コントロール 1.01 $\pm$ 0.18 nmol/ml), C8/C4比 7.69, 6.18, 4.30 nmol/ml (コントロール 1.05 $\pm$ 0.45 nmol/ml) も高値を示した。コントロール

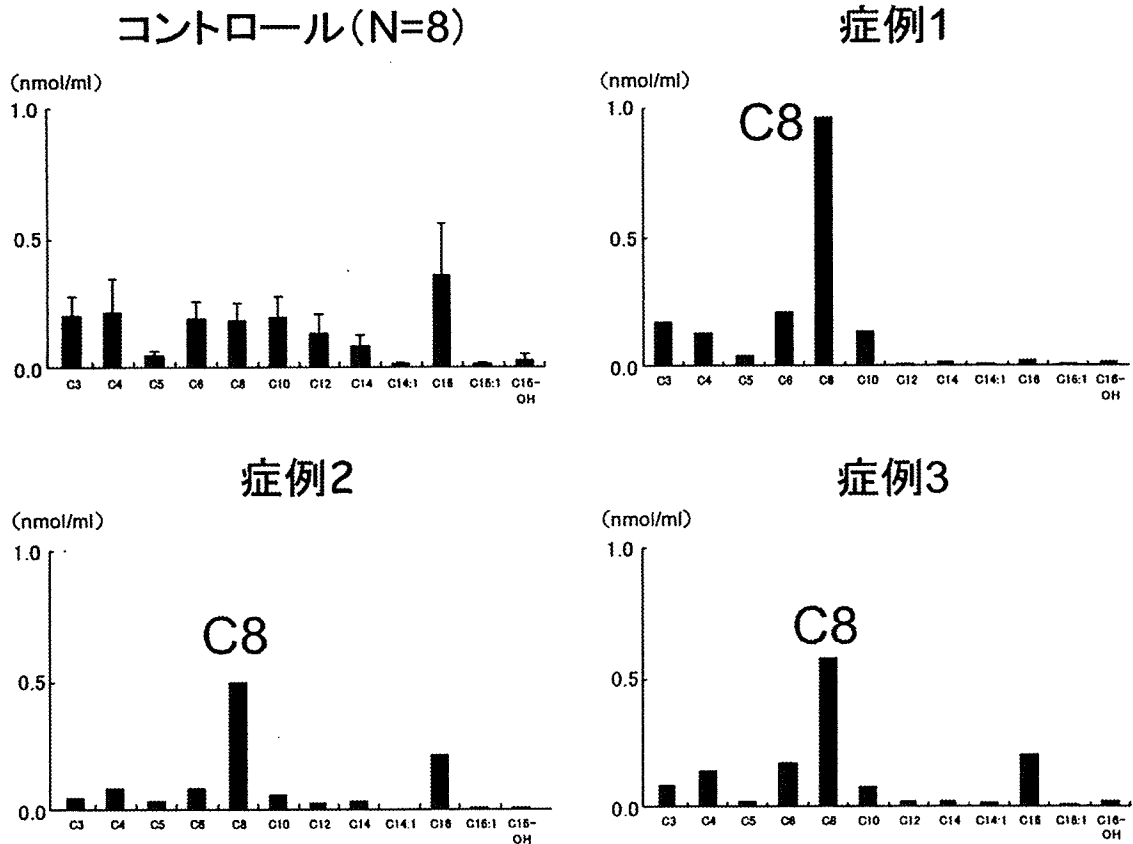


図1 タンデム質量分析によるアシルカルニチンプロファイル  
リンパ球にパルミチン酸を添加し、120時間培養後の培養液をタンデム質量分析計で分析した。

との有意差は、C8/C10比が $p=0.0068$ 、C8/C4比が $p=0.0330$ 、C8/C6比が $p=0.0377$ であった(図2)。C8/C14比 99.78, 14.06, 35.62 nmol/ml (コントロール  $2.48 \pm 1.23$  nmol/ml) と、C8/C2比 0.044, 0.103, 0.58 nmol/ml (コントロール  $0.01 \pm 0.003$  nmol/ml) ではコントロールと比較して高値を示したが有意差を認めなかった。

### 5. 考 察

今回の研究において、末梢血リンパ球とMS/MSを用いる *in vitro* probe assay によってMCAD欠損症の診断が可能であることを確認した。リンパ球を使用する方法は検体として約5 mlの採血のみでよく、皮膚生検が必要なくなり非侵襲的で、線維芽細胞では1ヶ月近くかかっていた培養時間も短縮される。又、安定期には正常にみえる症例においても、*in vitro*で飢餓状態をつくることによってより正確な代謝能評価が可能である。

血中アシルカルニチン分析や尿中有機酸分析でFAODsが疑われた場合、遺伝子解析などの確定診断を行う必要がある。遺伝子検査はある程度専門的技術が必要であり、コストと時間が

かかることが問題である。MCAD欠損症においてはFAODsの代謝能評価が可能であることを示した。本方法で補助診断を行うことにより、より疑わしい症例の確定診断を迅速に行うことが可能となる。

今回検討したMCAD欠損症症例では、長鎖脂肪酸であるパルミチン酸(C16)を添加した場合にコントロールと比較してC8の上昇を認め診断が可能であった。さらにC8/C10、C8/C6、C8/C4などのアシルカルニチン比をみることで、より診断精度を高めることができた。今回の検討では、MCAD欠損症症例とコントロールの値で最も差を認めたのはC8/C10比であった( $p=0.0068$ )。

遺伝子解析において、症例1と2にみられる449-452delCTGA変異は日本人に多く(45%以上)、酵素活性をほとんど持たない<sup>10,19)</sup>。一方症例2の134 A>G変異<sup>19)</sup>、症例3の157 C>T<sup>19)</sup>変異は、ある程度残存活性をもつと推測されている。今回の3症例において酵素活性測定は行っていないが、少なくとも今回の検討ではパラメーター間ではばらつきがみられ、明らかな臨床的重症度との相関は認められなかった。今後は保因

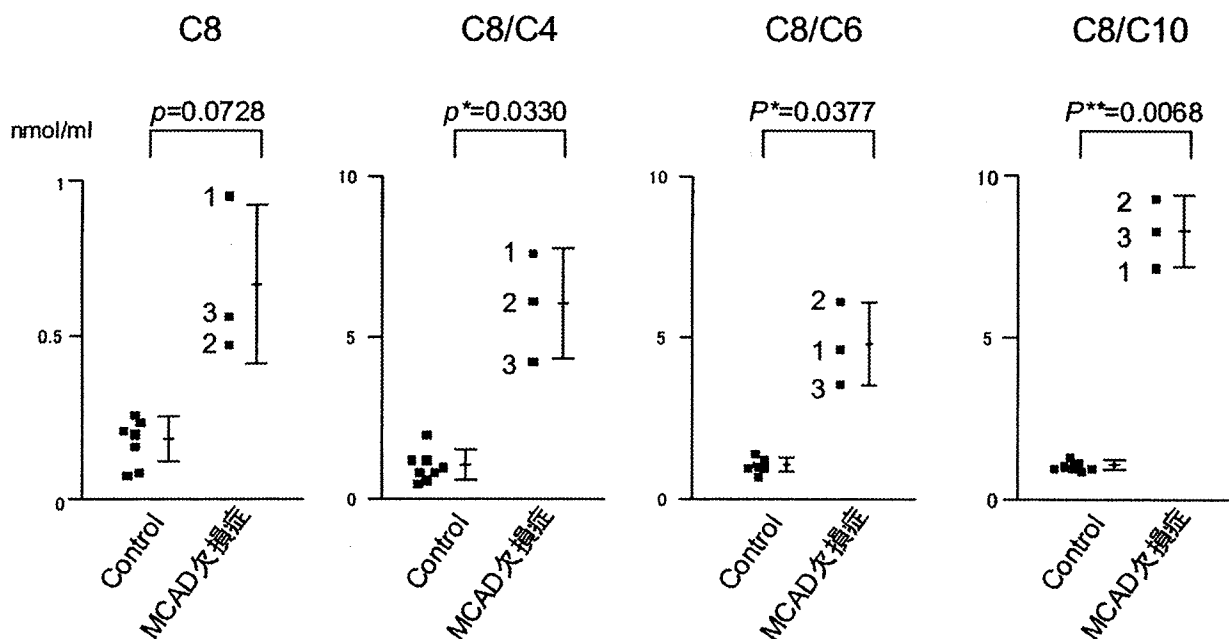


図2 中鎖アシルCoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症とControlにおけるアシルカルニチンの比較  
 図内の数字は症例番号を示す  
 $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$

者も対象として、酵素活性との比較について検討を行っていく必要がある。

我々はこれまでの線維芽細胞を使用した検討から、長鎖脂肪酸を添加し $\beta$ 酸化の状態をMS/MSによって分析する方法が、脂肪酸代謝がどのレベルで障害されているかを評価できることを確認している。同様の理由により本方法でも、MCAD欠損症だけでなく他のFAODsの診断も可能である可能性が高い。これまでのところリンパ球を使用した方法で、FAODsである極長鎖アシルCoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症、長鎖3-ヒドロキシアシルCoA脱水素酵素(LCHAD)欠損症、短鎖アシルCoA脱水素酵素(SCAD)欠損症の診断が可能であるとする報告がある<sup>11)</sup>。線維芽細胞での検討ではグルタル酸血症2型、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-1(CPT1)欠損症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-2(CPT2)欠損症の診断も可能であった<sup>8-9)</sup>。

今後の課題として、本方法では線維芽細胞を用いた場合と比較して再現性を確認できない点があげられる。EBウイルストランスフォームリンパ球様細胞の使用も検討しているが、cell line化した細胞での脂肪酸酸化能が通常の細胞と同じかどうかについての検討が必要であり、培養に時間がかかることも課題としてあげられる。

## 謝 辞

貴重な検体を提供して下さった医療機関の先生方、和田美夏先生(駿河台日本大学病院小児科)、小林真之先生(大阪府済生会中津病院小児科)、および患者の皆様に深謝致します。本研究は厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)を受けて行なった。

## 文 献

- 1) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児スクリーニングの新時代. 小児保健研究 65: 725-732, 2006
- 2) Charles R.Roe, Jiahuan Ding: Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>th</sup> ed, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, McGraw-Hill Inc, New York, 2001, p2297-2326
- 3) 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学会雑誌 6: 15-24, 2006
- 4) 山口清次: ミトコンドリア脂肪酸酸化の障害. ネルソン小児科学第17版, 五十嵐隆, 大澤真木子, 河野陽一, 森川昭廣, 山城雄一郎, エルゼビア・ジャパン, 東京, 2005
- 5) 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スクリーニング. 日本小児科学会雑誌 110: 895-903, 2006
- 6) B. Wilcken, M. Haas, P. Joy, et al: Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. The Lancet 369: 37-42, 2007
- 7) 但馬 剛, 佐倉伸夫: タンデムマス新生児スクリーニング: 確定診断とフォローアップにおける問題点. 日本マス・スクリーニング学会誌 18(1): 17-22, 2008
- 8) J. G. Okun, S. Kolker, A. Schulze, et al: A method for quantitative acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using unlabelled palmitic acid: diagnosis of fatty acid oxidation disorders and differentiation between biochemical phenotypes of MCAD deficiency. Biochim.Biophys. Acta 1584: 91-98, 2002
- 9) 遠藤 充, 小林弘典, P ジャミヤン, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸代謝異常症スクリーニングの診断支援方法 培養線維芽細胞とタンデムマスを用いた $\beta$ 酸化能評価. 日本マス・スクリーニング学会誌 17(2): 68, 2007
- 10) Jamiyan Purevsuren, Hironori Kobayashi, Yuki Hasegawa, et al: A Novel Molecular Aspect of Japanese Patients with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MCADD): 449-452delCTGA is a Common



- Mutation in Japanese Patients with MCADD. Molecular genetics and metabolism (投稿中)
- 11) A. Schulze-Bergkamen, J. G. Okun, U. Spiekerkotter, et al: Quantitative acylcarnitine profiling in peripheral blood mononuclear cells using *in vitro* loading with palmitic and 2-oxoadipic acids: biochemical confirmation of fatty acid oxidation and organic acid disorders. *Pediatr Res* 58: 873-880, 2005
- 12) A. Schulze, M. Lindner, D. Kohlmuller, K. Olgemoller, E. Mayatepek, G.F. Hoffmann: Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics* 111: 1399-1406, 2003
- 13) Go Tajima, Nobuo Sakura, Hiroko Yofune, 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. *Journal of Chromatography B* 823: 122-130, 2005
- 14) M.J. Nichols, C.A. Saavedra-Matiz, K.A. Pass, and M. Caggana: Novel mutations causing medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: under-representation of the common c.985 A>G mutation in the New York state population. *Am. J. Med. Genet. A*, 146A: 610-619, 2008

受付日：平成20年11月11日

受理日：平成20年12月1日

Evaluation of fatty acid oxidation by an *in vitro* probe acylcarnitine profiling assay using peripheral lymphocytes and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS) in 3 Japanese cases of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency

Yuichi Mushimoto, Hironori Kobayashi, Yuki Hasegawa, Isamu Nakamura, Seiji Yamaguchi

Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine

## タンデム質量分析計による新生児スクリーニングの 検査施設基準に関する検討

福士 勝

札幌市衛生研究所

### 【要 旨】

タンデム質量分析計による新生児スクリーニングを実施する検査施設に要求される要件を検討した。その結果、検査施設では年間検査数として3万から5万件程度確保できること、十分に教育を受けた検査担当者を専任とすること、先天性代謝異常専門医をコンサルタントとして委嘱し必要な指導助言が受けられること、新生児スクリーニング連絡協議会等の設置により関係者の連携が確保されていること等が保証されることにより適切なスクリーニングが実施できることが明らかになった。

### 【キーワード】

新生児スクリーニング、タンデムマス、検査施設基準

### 【はじめに】

タンデム質量分析計（タンデムマス）による新生児スクリーニング（タンデムマススクリーニング）は、従来から実施されているアミノ酸代謝異常症3疾患に加えて、20疾患以上の脂肪酸代謝異常症や有機酸代謝異常症などを一回の検査で行うことができる効率的な方法である。タンデムマススクリーニングは1990年代に米国で導入され、その有効性が認められて、その後世界各国でも広く実施されるようになった。わが国でも重松らが1997年から特定の医療機関を対象として、そのパイロットスタディを開始しており<sup>1)</sup>、2005年から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のあり方に関する研究」（主任研究者山口清次島根大学教授）においてパイロットスタディが始まり<sup>2)</sup>、現在も厚生労働科学研究（子ども家庭総合研究事業）「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」（研究代表者山口清次島根大学教授）において継続実施されており、その平成19年度研究報告書<sup>3)</sup>によると、すでに60万人以上の新生児でパイロットスタディが行われ、脂肪酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、アミノ酸代謝異常症を合わせて68例が発見されている。タンデムマススクリーニング全体での頻度は8,880人に1人と高く、スクリーニングによる早期発見例の予後は発症後診断された症例と比較して極めて良好とされており、現行の新生児スクリーニングへのタンデムマスによるスクリーニングの早期導入が期待されている。しかしながら、新生児スクリーニングの実施主体である都道府県・政令指定都市などの行政側の昨今の財政事情を考慮すると、新たに導入するタンデムマススクリーニングのコストを最小限とすることが課題

### <連絡先>

福士 勝

〒003-8505 札幌市白石区菊水9条1丁目  
札幌市衛生研究所 保健科学課

Tel:011-841-2341 Fax:011-841-7073

E-mail: masaru.fukushi@city.sapporo.jp

となっている。さらに、タンデムマススクリーニングでは対象となる疾患は20以上と多いが、発見される個々の疾患は頻度が少ないことから、先天性代謝異常を専門とする経験豊かな医師による指導を受けて、スクリーニング検査から診断、治療が迅速かつ的確に実施される必要があり、採血機関、行政などの関係機関との連携が不可欠となる。

そこで、現行の新生児スクリーニング体制を再検討してより効率的な実施体制を構築するため、適切な精度保証システムの構築とこれに要するコストの観点からタンデムマススクリーニング導入時のスクリーニング検査施設が満たすべき基準について検討したので報告する。

#### 【検査施設基準の基本的な考え方】

昭和52年の厚生省児童家庭局長通知（都道府県知事・政令指定都市市長宛）「先天性代謝異常検査の実施について」の別紙として添付された「先天性代謝異常症の早期発見方法の確立について」（先天性代謝異常スクリーニング研究班報告 代表 森山 豊<sup>1)</sup>）に記載された検査機関が満たすべき要件を基本として、その後追加された先天性甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成症のスクリーニングへの適切な対応、タンデムマススクリーニングを導入した場合にさらに必要となる要件を検討して検査施設基準として作成した<sup>2),3)</sup>。

その内容は、タンデムマススクリーニングの実施に必要な検査レベル（機器と設備）と精度保証体制、検査コストから見た適正な検査施設規模、一定水準以上の検査技術レベルもつ検査担当者の確保、コンサルタント医師の確保、地域連絡協議会の設置による関係機関との連携体制の確保等、適切なスクリーニングシステム維持に要する項目とした。

#### 【精度保証体制】

タンデムマススクリーニングにおいても従来の新生児スクリーニングと同様に正確な検査結果を提供するためには、検査前、検査、検査後における精度保証体制が確立されていなければ

ならない。また、内部監査システムの整備と組織における責任体制の明確化により検査結果に疑義が生じた場合にも的確に対応できるようにしておく必要もある。

検査前の精度保証としては採血時期採血方法、採血用濾紙、採血量、採血後の濾紙血液の管理、検体の郵送頻度などが適切かどうかを確認すること、検査の精度管理としては適切な検体受付、検体前処理、使用機器の保守管理、使用する試薬の品質管理、適切な内部精度管理の実施、妥当な検査結果の判定が行われていることの確認、検査後の精度管理としては、適切な検査成績報告と短期・長期フォローアップ等が確実に実施できていることが重要である。

#### 【検査対象疾患と検査の実施体制】

タンデムマススクリーニングを実施する検査施設では、現在実施しているガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成症の3疾患の検査に加えて、現行のアミノ酸代謝異常症のフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症の3疾患とともに高チロジン血症、シトルリン血症、アルギニノコハク酸尿症の合計6疾患をタンデムマスによりスクリーニングするとともに、メチルマロン酸血症などの8疾患の有機酸代謝異常症、中鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症などの8疾患の脂肪酸代謝異常症のスクリーニングが毎日実施可能でなければならない。

現行スクリーニングでも検査の一部を他機関に委託する検査体制をとっている自治体があるが、検査の遅延、検体の取り違い等が起きやすく、事務的エラーの原因ともなる。また、検査の一部委託は検体の再郵送にかかるコスト、受付・成績発行事務の重複等により検査コストの増加を招くことから、タンデムマススクリーニングを母子保健行政の施策の一環として実施していく場合、精度及びコストの観点から検査機関は従来の新生児スクリーニングも同時に実施できる施設であることが望ましいと考えられる。

タンデムマススクリーニングで発見される疾患の2次検査及び精密検査のための特殊検査と

して、ガスクロマトグラフ質量分析計やアミノ酸分析計などを整備して血中・尿中のアミノ酸や有機酸の定量が可能な体制を確保し、不要な検査の繰り返しを避け、かつ精査時の緊急検査にも対応できるようにしておかなければならない。さらに、将来的には欠損酵素の確認や遺伝子検査などによる診断支援ができる施設も必要となるであろう。

#### 【検査担当者の資格要件】

タンデムマスによる新生児スクリーニングでは、これまでのスクリーニングが細菌学的検査、生化学的検査及び免疫化学的検査による1検査1項目測定であったものが機器分析的な検査となり、1回の検査で30項目以上のアミノ酸やアシルカルニチン等の測定が可能となる。タンデムマスのデータ処理は自動化され対象となるアミノ酸、アシルカルニチンの測定値は自動的に出力されるが、測定結果の良否の判定には検査担当者による個別のデータのチェックが要求される。従って、タンデムマスの検査担当者は機器の原理、特性等をよく理解し、検査開始前に機器の操作方法、日常・定期点検等の保守点検手順等について十分な教育訓練を受けておくこと、さらに検査開始後も定期的な研修等の受講によりその技術レベルの維持・向上を図らなければならない。また、検査担当者は機器分析ばかりでなく、新生児スクリーニングの概念や先天性代謝異常症に関する知識や最新情報を修得していることも要求されることから、日本マス・スクリーニング学会の認定技術者制度で認定され、新生児スクリーニングに関する一定の知識と技術を持っていなければならない。また、これらの業務を確実に遂行するためには検査担当者は専任とすべきである。

具体的には年間検査数3万検体あたり検査担当者2名以上、受付・成績発行などの事務従事職員1名が専任として確保されていなければならない。また、年間3万検体以上の検査を行う施設では相応の検査担当者、事務職員を増員しなければならない。

#### 【コンサルタント医師の委嘱】

タンデムマススクリーニングの導入により、これまでのアミノ酸代謝異常3疾患に加えて有機酸代謝異常症や脂肪酸代謝異常症等の稀少疾患が20以上も追加されることになるため、日常検査の判定、特に再採血や精密検査となる判定の際には、高度で専門的な知識と経験を有する代謝異常専門医による適切な助言・指導が必要となる。

従って、スクリーニング検査施設は、従来から委嘱している先天性代謝異常疾患及び小児内分泌疾患のコンサルタント医師に加えて、タンデムマススクリーニング対象疾患についても適切な指導助言ができる専門医をコンサルタントとして委嘱しておかなければならない。

#### 【スクリーニング関連部門との連携】

新生児スクリーニングは単に検査ばかりでなく、スクリーニングの意義を保護者によく理解してもらうための教育、適切な濾紙血液検体の採取、検査結果を正確に報告し、必要に応じて再採血や精密検査等の対応を迅速に実施できる体制が不可欠である。また、短期・長期のフォローアップによる確実な精密検査の受診、予後調査、見逃し例の調査等ができる体制も必須である。

従って、検査施設においては、新生児マススクリーニングに関連する全ての部門、採血を担当する医師会産婦人科会及び小児科医会、精査・診断・治療機関である大学、小児病院等の専門医療機関、保護者への広報・教育及び事後措置等を行う自治体の母子保健担当部局（保健所、保健センターなど）との密接な連携のもとでスクリーニングを実施していかなければならない。このためには、関係機関・関係者により構成されるスクリーニング連絡協議会のような協議機関を設置し、スクリーニングシステムの問題点を検討し、その対策を講じて常に継続的な改善ができるようにしておかなければならない。

さらに、短期・長期のフォローアップによるスクリーニング陽性者の精密検査受診状況、確定診断結果、治療状況、予後及び見逃し例の調

査等を実践に実施するためには、関係機関・関係者の協力は不可欠であり、上記のスクリーニング連絡協議会の設置は必須である。

【適切な年間検査検体数】

タンデムマス1台の検体処理能力を1日220検体（確認検査検体、再採血検査検体、精度管理検体等を除く初回採血検体数として）で年間実稼動日数230日とすると初回採血検体数として約5万検体となる。そこで機器の整備と保守、試薬・器具などの購入、検査技術者の人件費、その他間接経費などから1検体当りの検査費用を年間検査件数1万人から5万人まで変えて検査コストを算出した。表1は機器整備でタンデムマスのみ整備した場合であり、その算出基礎は、タンデムマス1台3,500万円、7年間で減価償却として年間費用は500万円、年間保守契約は200万円とすると、検査機器関連で年間700万円となった。検査試薬及び検査器具は1件当たり150円、検査技術者1人の年間人件費は専任で800万円として5万件まで処理できるものとした。検体受付・成績発行業務に係る人件費は現行スクリーニングシステムの業務量で可能であるため算入しなかった。その他の費用としては、研修費を年間30万円、人件費にはコンサルタント医師への報酬、スクリーニング連絡協議会開催費用として年間120万円を追加し、合計950万円とした。さらに、電気水道光熱費、

表1 現行新生児スクリーニング実施検査施設でタンデムマススクリーニングを実施した場合の年間検査件数別の1検体当たりの検査コスト（タンデムマスのみ導入時、単位：円）

費目	年間検査数				
	1万人	2万人	3万人	5万人	
直接経費	検査機器+保守監理	700	350	235	140
	試薬+検査器具	150	150	150	150
	人件費+報酬等	950	475	320	190
小計	1,800	975	705	480	
間接経費	630	341	247	168	
総計	2,430	1,316	952	648	

施設管理費、人事管理費等の間接経費は直接経費の30%として算出した。

一方、確認検査及び精密検査時の補助検査としてGCMS、アミノ酸分析用HPLCを整備した場合の検査数別の検査単価を表2に示した。機器の整備費が2,100万円、7年間の減価償却として年間費用は300万円、年間保守契約は100万円とすると、検査機器関連で年間400万円の増加となり、これを年間検査数で除したものを機器整備にかかる1検体あたりの単価として加えた。検査試薬・器具代として確認検査及び精密検査対象者を全スクリーニング数の0.5%とし、1件当たりの検査試薬等の単価を1,200円とした場合、1人あたりでは6円の増加となった。また、GCMS、HPLC検査導入時の、GCMS、HPLCの維持管理に0.3人を必要とし、300検体まで対応可能とすると、年間人件費は5万人以下のスクリーニング施設で240万円となり、1万人では240円、5万人では48円の増加となった。

年間検査検体数が5万件で1検体の検査コストはタンデムマスのみ整備で648円なり、確認検査及び精密検査時使用のGCMS、HPLCの整備まで含めると829円となった。一方3万人では1.5倍、2万人では2倍、1万人では4倍の増加となり、タンデムマスの検体処理能力を最大限に活用し、その費用投資効果を最大にするには5万人以上の検査の実施が有効であった。

表2 現行新生児スクリーニング実施検査施設でタンデムマススクリーニングを実施した場合の年間検査件数別の1検体当たりの検査コスト（タンデムマスに加えて確認検査用GCMS、HPLCを導入した場合、単位：円）

費目	年間検査数				
	1万人	2万人	3万人	5万人	
直接経費	検査機器+保守監理	1,110	550	367	220
	試薬+検査器具	156	156	156	156
	人件費+報酬等	1,190	595	400	238
小計	2,446	1,301	923	614	
間接経費	856	455	323	215	
総計	3,302	1,756	1,246	829	

しかしながら、わが国で現行のスクリーニング検査を行っている52施設中、年間5万件以上の検査を行っているのは7施設、3万件以上としても11施設20%程度であり、60%以上は年間検査数が2万件以下であることから、効率的なタンデムマススクリーニングの実施には現行スクリーニング検査施設の統合が課題となる。

また、昭和52年の先天性代謝異常症検査開始される際に、当時の厚生省心身障害研究班の勧告「先天性代謝異常症の早期発見方法に確立について」においても検査施設の規模は年間3万検体以上を最小単位とすべきであるとしており、現行スクリーニングの効率化のためにも一つのスクリーニング検査施設が適正な検体数を検査できるようにしていく必要がある。

#### 【まとめ】

タンデムマスによる新生児スクリーニングの検査施設では、年間検査数として3万から5万件程度確保できること、十分に教育を受けた検査担当者を専任とすること、先天性代謝異常専門医をコンサルタントとして委嘱することにより必要な指導助言が受けられること、新生児スクリーニング連絡協議会等の設置により関係者の連携がとれること等が保証されていなければならない。

#### 謝 辞

本研究は、平成16年度～18年度厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「わが国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」、平成19年度厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」を受けて行った。

#### 文 献

- 1) 重松陽介, 平野聡子, 畑 郁江, 他: タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常マ

ス・スクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌11: 57-67, 2001

- 2) 山口清次: 厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「わが国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」平成16年度～18年度報告書, 2007
- 3) 山口清次: 新生児マススクリーニング検査施設基準の検討, 厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」平成19年度総括・分担報告書, 2008
- 4) 森山 豊: 先天性代謝異常症の早期発見方法の確立について. 日本医事新報, 2888号 110-113, 1977
- 5) 福士 勝, 藤田晃三, 梅橋豊蔵, 山口清次: 新生児マススクリーニング検査施設基準の検討. 厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「わが国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」平成17年度総括・分担研究報告書, 2006, 87-91
- 6) 福士 勝, 藤田晃三, 梅橋豊蔵, 山口清次: 新生児マススクリーニング検査施設基準の検討. 厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「わが国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」平成18年度総括・分担研究報告書, 67-70, 2007
- 7) 福士 勝, 梅橋豊蔵, 山口清次: 検査施設のあり方に関する研究. 厚生労働省科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」平成19年度総括・分担報告書, 44-46, 2008

受付日: 平成20年10月6日



## Brief Communication

## A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD): c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD

Jamiyan Purevsuren<sup>a</sup>, Hironori Kobayashi<sup>a</sup>, Yuki Hasegawa<sup>a</sup>, Yuichi Mushimoto<sup>a</sup>, Hong Li<sup>a</sup>, Seiji Fukuda<sup>a</sup>, Yosuke Shigematsu<sup>b</sup>, Toshiyuki Fukao<sup>c,d</sup>, Seiji Yamaguchi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, Shimane University, Faculty of Medicine, 89-1 Enya, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

<sup>b</sup> Division of Health Sciences, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan

<sup>c</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Gifu 501-1194, Japan

<sup>d</sup> Medical Information Sciences Division, United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University, Gifu, Gifu 501-1194, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 September 2008

Received in revised form 24 October 2008

Accepted 24 October 2008

Available online 6 December 2008

## Keywords:

Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase

MCAD deficiency

Acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain

(ACADM)

Common mutation

Mass screening

## ABSTRACT

We studied 11 Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) and found a common mutation, c.449-452delCTGA, which accounted for 45% of the mutations. Seven of 10 independent patients carried at least one copy of this mutation. Phenotypes of homozygous patients with the c.449-452delCTGA mutation varied from asymptomatic to life-threatening metabolic decompensation in Japanese patients with MCADD, similar to the phenotypic variations in Caucasians. This study suggests the genotypic difference between those of Caucasians and Japanese regarding MCADD.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) (MIM #201450) is an autosomal recessive inherited metabolic disorder of mitochondrial fatty acid oxidation. Clinical symptoms are hypoketotic hypoglycemia, lethargy, seizure, coma, and sudden infant death syndrome (SIDS)-like illness triggered by catabolic stress such as infection and prolonged fasting. Up to 20% of these patients die during their first metabolic decompensation [1]. MCADD is the most common fatty acid oxidation disorder among Caucasians, especially those of Northern European descent. The disease frequency has been estimated to range between 1:4900 and 1:25,000 based on newborn screening programs worldwide [2–5]. The common missense c.985A > G mutation reportedly occurs in 80–90% of Caucasian patients with MCADD [6–11], whereas this disease has rarely been reported in Asian countries. However, after acylcarnitine analysis became available in Japan, MCADD has been identified more frequently. The disease frequency was estimated to be approximately 1:51,000 in Japan based on a newborn screening pilot study [12]. Herein, we report the genetic aspects of 11 Japanese patients with MCADD.

\* Corresponding author. Fax: +81 853 20 2215.

E-mail address: [seijiyam@med.shimane-u.ac.jp](mailto:seijiyam@med.shimane-u.ac.jp) (S. Yamaguchi).

## Subjects and methods

## Subjects

Eleven Japanese patients with MCADD from 10 unrelated families, including four previously-reported patients, were studied (Table 1). No families showed consanguineous marriage. Patients' diagnoses were made by urinary organic acid and/or blood acylcarnitine analyses. Six of them were symptomatic patients. One was asymptomatic sibling case, and four of them were diagnosed in a newborn screening pilot study. The diagnoses of Cases 1–7 were confirmed by an enzyme assay and *in vitro* assay of  $\beta$ -oxidation. In this study, we performed mutation analysis in Cases 1–7 and 10. Informed consent to perform DNA analysis was obtained from the parents of the patients. This study was approved by the Ethical Committee of the Shimane University Faculty of Medicine.

## Methods

Genomic DNA was extracted from the patients' fibroblasts and blood filter papers using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and from peripheral blood lymphocytes using the DNA Quick II kit (Dainippon Pharmaceuticals, Osaka, Japan). We designed 12 sets of primers for the amplification of

**Table 1**  
Clinical and molecular features of Japanese patients with MCADD.

Cases	Age at onset	Age at diagnosis	Clinical symptoms	Allele 1	Allele 2
Case 1	1 y 3 m	1 y 3 m	Unconsciousness, apnea, vomiting	Deletion of exons 11 and 12 <u>449-452delCTGA</u>	Deletion of exons 11 and 12 <u>449-452delCTGA</u>
Case 2	1 y 4 m	2 y 2 m	Respiratory tract infection, enterocolitis, hypoglycemia, (neonatal transient hypoglycemia)	<u>449-452delCTGA</u>	<u>449-452delCTGA</u>
Case 3 <sup>*</sup>	1 y 4 m	1 y 4 m	Gastroenteritis, seizures, hypoglycemia, ketonuria, (neonatal transient hypoglycemia)	<u>449-452delCTGA</u>	<u>449-452delCTGA</u>
Case 4	1 y 7 m	1 y 7 m	Unconsciousness, fever, hypoglycemia, acidosis, hyperammonemia	<u>c.275C&gt;T (P67L)<sup>a</sup></u> <u>449-452delCTGA</u>	<u>c.157C&gt;T (R28C)</u> <u>c.134 A&gt;G (Q20R)</u>
Case 5	-	5 d	Neonatal mass screening (asymptomatic)	<u>449-452delCTGA</u>	<u>c.820A&gt;G (M249V)<sup>a</sup></u>
Case 6	-	5 d	Neonatal mass screening (asymptomatic)	<u>449-452delCTGA</u>	<u>449-452delCTGA</u>
Case 7 <sup>*</sup>	-	5 y 5 m	Sibling of case 2 (asymptomatic)	<u>449-452delCTGA</u>	<u>449-452delCTGA</u>
Case 8 <sup>b</sup>	7 m	3 y	Respiratory tract infection, lethargy, fever, vomiting, fatigue, hypoglycemia	<u>449-452delCTGA</u>	<u>c.1189T&gt;A (Y397N)</u>
Case 9 <sup>a</sup>	8 m	8 m	Cardiopulmonary arrest, liver dysfunction, hyperammonemia	<u>449-452delCTGA</u>	<u>c.157C&gt;T (R28C)</u>
Case 10 <sup>2</sup>	-	5 d	Neonatal mass screening (asymptomatic)	<u>c.1085G&gt;A (G337E)<sup>a</sup></u>	<u>c.843A&gt;T (R256S)</u>
Case 11 <sup>2</sup>	-	5 d	Neonatal mass screening (asymptomatic)	<u>449-452delCTGA</u>	Unknown

<sup>1</sup>Yokoi et al. (2007) and <sup>2</sup>Tajima et al. (2005) reported, respectively.

<sup>\*</sup> Siblings: Age: y, year; m, month; d, day; -, asymptomatic patients detected by neonatal screening. Common mutations are underlined. Mutations in bold were identified in this study.

<sup>a</sup> Novel mutations.

each exon including 5' and 3' splice sites of the acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain (ACADM) gene (Supplementary data 1). Exons were amplified for 35 cycles using the polymerase chain reaction (PCR) as follows: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s with the AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the iCycler (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). All PCR-amplified fragments of ACADM were then directly sequenced using ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kits and an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

## Results

In this study, we performed mutation analysis in Cases 1–7 and 10. Their clinical presentation and mutations are summarized in Table 1, together with information about three cases (Cases 8, 9, and 11) whose mutations were reported previously [13,14]. Three novel missense mutations, c.275C>T (P67L), c.820A>G (M249V) and c.1085G>A (G337E), three reported missense mutations, c.134A>G (Q20R) [15], c.157C>T (R28C) [16], and c.843A>T (R256S) [17], and two null mutations, c.449-452delCTGA [13–14] and a large deletion including exons 11 and 12 [17], were identified in this study (Table 1). Among them, c.449-452delCTGA was identified in 11 alleles including that of siblings (Cases 3 and 7). Therefore, frequency of c.449-452delCTGA was calculated as 45% of mutant alleles (nine out of 20 independent alleles) in the Japanese patients with MCADD since mutant alleles of siblings were derived from same origin. This mutation introduces a frameshift and premature termination at codon 128 (P128X), indicating that this common mutation is a null mutation. The novel mutations, c.275C>T (P67L), c.820A>G (M249V) and c.1085G>A (G337E), were not detected in 120 chromosomes from unaffected Japanese individuals, suggesting that they are not polymorphisms. In Case 1, no genomic fragments for exons 11 and 12 were amplified, indicating a large gene deletion including exons 11 and 12, as previously-reported [17].

## Discussion

It remained unknown why there were no Japanese patients with MCADD until Tajima et al. reported three cases in 2005 [14]. After acylcarnitine analysis became available in Japan in

2002, the detection of MCADD has been increasing, and several acute encephalopathic patients with hypoglycemia and hyperammonemia were identified as having MCADD. We have noted 11 patients with MCADD from 10 families in the Japanese population thus far.

Our study clearly showed that there is a common mutation, c.449-452delCTGA, in Japanese patients with MCADD. c.449-452delCTGA was identified in 45% of mutant alleles in Japanese patients with MCADD. In the Caucasian population, a well-known common c.985A>G missense mutation represents 80–90% of mutant alleles [6–11]. The c.985A>G missense mutation was not detected in any Japanese patient in this study and in a survey of c.985A>G mutation in patients with SIDS as well as a healthy Japanese population [18–19]. The prevalence of heterozygous carriers of c.985A>G missense mutations in Caucasians of northwestern Europe is reported to be 1/68–1/101 in newborns [20]. Although the frequency of c.449-452delCTGA mutation in Japanese patients with MCADD is less than that of the c.985A>G mutation in Caucasian patients, it is of interest to determine the prevalence of heterozygous carriers of c.449-452delCTGA in a Japanese population. Recently, two Korean patients with MCADD were also identified as heterozygotes for this mutation [15,17]. These findings suggest that the c.449-452delCTGA mutation may be common not only in Japanese but also in other Mongoloid populations. Namely, it is likely that this study shows the genotypic difference between those of Caucasian and Mongoloid ethnicity in MCADD.

As discussed above, c.449-452delCTGA is a null mutation. In this study, the age at onset varied among the patients with the same genotype of 449-452delCTGA. Two patients (Cases 2 and 3) with homozygous c.449-452delCTGA mutation showed neonatal transient hypoglycemia and developed life-threatening metabolic decompensation upon respiratory tract infection and enterocolitis within 2 years. However, Case 7 (sibling of Case 3) was asymptomatic until 5.5 years old, even though he had the same homozygous mutation. Patients generally become symptomatic upon infection, starvation, or in the presence of other stresses when catabolism becomes active. Depending on the time and degree of exposure to the stress, some patients develop MCADD attack earlier than others. These phenotypic variations among Japanese patients with homozygous null mutations are similar in MCADD patients in a Caucasian population [1,7,9].

In summary, this study indicates that c.449-452delCTGA represents a common mutation in Japanese patients with MCADD, in



contrast to the common c.985A > G mutation found in Caucasians, and adds three novel missense mutations, c.275C > T (P67L), c.820A > G (M249V) and c.1085 G > A (G337E), to the ACADM gene catalogue. The mutational spectrum of MCADD is still unknown across all ethnicities; however, there are different common mutations in Caucasians and Japanese.

#### Acknowledgments

We thank a number of referring physicians who suspected metabolic disorders, spent their precious time to send us patients' samples, and provided clinical information, making this work possible, and Ms.M. Furu for technical assistance. This study was partly supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (Research on Children and Families), and the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) of Japan.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jymgme.2008.10.012.

#### References

- [1] A.K. Iafolla, R.J.J. Thompson, C.R. Roe, Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children, *J. Pediatr.* 124 (1994) 409–415.
- [2] S. Sander, N. Janzen, B. Janetzky, S. Schöll, U. Steuerwald, J. Schafer, J. Sander, Neonatal screening for medium chain acyl-CoA deficiency: high incidence in Lower Saxony (northern Germany), *Eur. J. Pediatr.* 160 (2001) 318–319.
- [3] E.M. Maier, B. Liebl, W. Roschinger, U. Nennstiel-Ratzel, R. Fingerhut, B. Olgemöller, U. Busch, N. Krone, R. Kries, A.A. Roscher, Population spectrum of ACADM genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Hum. Mutat.* 25 (2005) 443–452.
- [4] D.H. Chace, T.A. Kalas, E.W. Naylor, The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3 (2002) 17–45.
- [5] K. Carpenter, V. Wiley, K.G. Sim, D. Heath, B. Wilcken, Evaluation of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 275 000 babies, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 85 (2001) 105–109.
- [6] N. Gregersen, B.S. Andresen, P. Bross, V. Winter, N. Rudiger, S. Engst, E. Christensen, D. Kelly, A.W. Strauss, S. Kolvraa, Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: identification of a lys329 to glu mutation in the MCAD gene and expression of inactive mutant enzyme protein in *E. coli*, *Hum. Genet.* 86 (1991) 545–551.
- [7] I. Yokota, P.M. Coates, D.E. Hale, P. Rinaldo, K. Tanaka, Molecular survey of a prevalent mutation, 985A-to-G transition, and identification of five infrequent mutations in the medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in 55 patients with MCAD deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 49 (1991) 1280–1291.
- [8] B.S. Andresen, S.F. Dobrowolski, L. O'Reilly, J. Muenzer, S.E. McCandless, D.M. Frazier, S. Udvari, P. Bross, I. Knudsen, R. Banas, D.H. Chace, P. Engel, E.W. Naylor, N. Gregersen, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 1408–1418.
- [9] D.M. Frazier, D.S. Millington, S.E. McCandless, D.D. Koeberl, S.D. Weaver, S.H. Chaing, J. Muenzer, The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997–2005, *J. Inher. Metab. Dis.* 29 (2006) 76–85.
- [10] S.D. Grosse, M.J. Khoury, C.L. Greene, K.S. Crider, R.J. Pollitt, The epidemiology of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: an update, *Genet. Med.* 8 (2006) 205–212.
- [11] L. Waddell, V. Wiley, K. Carpenter, B. Bennetts, L. Angel, B.S. Andresen, B. Wilcken, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: genotype-biochemical phenotype correlations, *Mol. Genet. Metab.* 87 (2006) 32–39.
- [12] Y. Shigematsu, S. Hirano, I. Hata, Y. Tanaka, M. Sudo, N. Sakura, T. Tajima, S. Yamaguchi, Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 776 (2002) 39–48.
- [13] K. Yokoi, T. Ito, Y. Maeda, Y. Nakajima, A. Ueta, T. Nomura, N. Koyama, I. Kato, S. Suzuki, Y. Kurono, N. Sugiyama, H. Togari, Acylcarnitine profiles during carnitine loading and fasting tests in a Japanese patient with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Tohoku J. Exp. Med.* 213 (2007) 351–359.
- [14] G. Tajima, N. Sakura, H. Yofune, Y. Nishimura, H. Ono, Y. Hasegawa, I. Hata, M. Kimura, S. Yamaguchi, Y. Shigematsu, M. Kobayashi, 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 Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 823 (2005) 122–130.
- [15] M.J. Nichols, C.A. Saavedra-Matiz, K.A. Pass, M. Caggana, Novel mutations causing medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: under-representation of the common c.985 A > G mutation in the New York state population, *Am. J. Med. Genet. A* 146A (2008) 610–619.
- [16] K. Tanaka, N. Gregersen, A. Ribes, J. Kim, S. Kolvraa, V. Winter, H. Eiberg, G. Martinez, T. Deufel, B. Leifert, R. Santer, B. Francois, E. Pronicka, A. Laszlo, S. Kmoch, I. Kremensky, L. Kalaydjicva, I. Ozalp, M. Ito, A survey of the newborn populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for the G985 variant allele with haplotype analysis at the medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene locus: clinical and evolutionary consideration, *Pediatr. Res.* 41 (1997) 201–209.
- [17] R. Ensenauer, J.L. Winters, P.A. Parton, D.F. Kronn, J.W. Kim, D. Matern, P. Rinaldo, S.H. Hahn, Genotypic differences of MCAD deficiency in the Asian population: novel genotype and clinical symptoms preceding newborn screening notification, *Genet. Med.* 7 (2005) 339–343.
- [18] M. Nagao, D. Raymond, J. Kim, K. Tanaka, Improved PCR/NcoI method for the molecular diagnosis of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using dried blood samples: two-stage amplification using two different sets of primers improves accuracy and sensitivity, *Clin. Chim. Acta* 220 (1993) 165–174.
- [19] K. Tanaka, I. Yokota, P.M. Coates, A.W. Strauss, D.P. Kelly, Z. Zhang, N. Gregersen, B.S. Andresen, Y. Matsubara, D. Curtis, Mutations in the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene, *Hum. Mutat.* 1 (1992) 271–279.
- [20] N. Gregersen, V. Winter, D. Curtis, T. Deufel, M. Mack, J. Hendrickx, P.J. Willems, A. Ponzzone, T. Parrella, R. Ponzzone, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: the prevalent mutation G985 (K304E) is subject to a strong founder effect from northwestern Europe, *Hum. Hered.* 43 (1993) 342–350.



## Enzymatic evaluation of glutaric acidemia type 1 by an *in vitro* probe assay of acylcarnitine profiling using fibroblasts and electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS)<sup>☆</sup>

Yuichi Mushimoto\*, Yuki Hasegawa, Hironori Kobayashi, Hong Li, Jamiyan Purevsuren, Isamu Nakamura, Takeshi Taketani, Seiji Fukuda, Seiji Yamaguchi

Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine, 89-1 Enya, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 November 2008

Accepted 26 April 2009

Available online 3 May 2009

#### Keywords:

Glutaric acidemia type 1  
GA1  
Glutaryl carnitine  
C5DC  
Acylcarnitine  
Electrospray ionization/tandem mass spectrometry  
MS/MS  
Fibroblasts  
*In vitro* probe assay  
Lysine  
Amino adipate  
Glutaric acid

### ABSTRACT

Glutaric acidemia type 1 (GA1) is usually diagnosed with an accumulation of glutaric acid (GA) or 3-hydroxyglutaric acid by GC/MS. In some cases, however, excretion of GA is low. We investigated enzymatic evaluation of GA1 using fibroblasts and MS/MS. After loading substrates, lysine, 2-amino adipate (2AA), or GA, in fibroblasts, and incubating for 96 h, glutaryl carnitine (C5DC) levels in the media were measured. A significant increase of C5DC was observed in GA1 patients, irrespective of substrates added. 2AA showed the largest difference between patients and controls ( $p = 0.0004$ ). Results suggested enzymatic evaluation of GA1 is useful under appropriate culture conditions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glutaric acidemia type 1 (GA1) is a metabolic disorder of organic acids due to a defect of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH, EC 1.3.99.7), which acts in the intermediate metabolic steps of lysine, hydroxylysine, and tryptophan (Fig. 1) [1–3]. GA1 shows an autosomal recessive inheritance, and its frequency has been reported in one out of 100,000 people. The GCDH gene, the causative gene for GA1, has been mapped to chromosome 19q13.1. The active enzyme is a homotetramer consisting of 43.3-kDa subunits, localized in the mitochondrial matrix [4,5].

Many disorders of organic acid metabolism induce a rapid development of symptoms after early neonatal onset; however, GA1 shows the slow and gradual development of neuronal regression in most cases. If not diagnosed early and treated, disease onset starts

from infancy with extrapyramidal symptoms or neuronal regression, such as myotonia and dystonia [6–8]. In patients with GA1, a characteristic appearance of the brain can be seen [9]; namely, marked enlargement of the sylvian fissure, atrophy of the brain cortex, and enlargement of the cerebral ventricle.

Urinary organic acid analysis is useful for the diagnosis of GA1, with the characteristic findings of increases in glutaric acid (GA), 3-hydroxyglutaric acid (3-OH-GA), and glutaconic acid. Furthermore, blood acylcarnitine analysis using electrospray ionization/tandem mass spectrometry (MS/MS) shows an increase of glutaryl carnitine (C5DC). However, it has been reported that GA1 can be classified into two types based on excreted GA levels: a high GA excretion ( $GA > 100 \text{ mmol/mol creatinine}$ ), and a low one ( $GA < 100 \text{ mmol/mol creatinine}$ ) [1–2]. In some GA1 cases with low GA excretion, additional examinations are necessary, including measurement of the enzymatic activity or gene analysis.

Schulze-Bergkamen et al. reported enzymatic evaluation for GA1 on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using an *in vitro* probe assay and MS/MS, in which 2-oxoadipic acid was used as a substrate [13]. However, 2-oxoadipic acid is no longer available on a commercial basis, which led us to determine the alterna-

<sup>☆</sup> This paper was presented at the 33rd Meeting of the Japanese Society for Biomedical Mass Spectrometry, Tokyo, Japan, 25–26 September 2008.

\* Corresponding author. Tel.: +81 853 20 2219; fax: +81 853 20 2215.  
E-mail address: [mushiu1@med.shimane-u.ac.jp](mailto:mushiu1@med.shimane-u.ac.jp) (Y. Mushimoto).

tive substrate. Additionally, to date, little has been done to apply the enzymatic evaluation of using fibroblast and MS/MS to organic acidemia. In the present study, we investigated the efficacy of the *in vitro* probe assay using fibroblasts and MS/MS in enzymatic detection of GA1, with three different substrates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Human skin fibroblasts obtained from 10 Japanese patients diagnosed as having GA1 based on the characteristic metabolic profiles of urinary organic acids and genetic analysis were studied. Among the 10 patients, 6 were previously described in case reports [9–12]. The 7 control cell lines were also used.

### 2.2. Cell culture

Skin fibroblasts were cultured and maintained in a minimal essential medium (MEM), containing modified Eagle's essential medium (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% penicillin/streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and 2 mmol/l of L-glutamine (Nacalai Tesque) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere until confluency.

### 2.3. Substrate loading to cultured fibroblasts

As shown in Fig. 1, to determine an appropriate substrate to add to the culture medium, 3 compounds related to glutaryl-CoA metabolism were used: lysine (Lys; Sigma), L-2-aminoadipate (2AA; Wako, Osaka, Japan), and glutaric acid (GA; Wako). Confluent cells were harvested by trypsinization (0.25%-trypsin/1 mM-EDTA; Nacalai Tesque), then distributed onto 6-well-microplates (35 mm i.d.; Iwaki, Tokyo, Japan), and re-cultured. When they reached confluence, the cells were washed twice with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1 ml of MEM with containing each substrate plus L-carnitine

(0.4 mmol/l; Sigma) was added. After 96 h, the supernatant was collected, and acylcarnitine profiling by MS/MS was performed. The measured blood acylcarnitine levels were corrected by the protein concentration of the cells at the starting point. The protein concentration was calculated based on the previously described method by Lowry et al. [14]. The experiment was repeated at least 3 times for each sample.

### 2.4. Sample preparation for MS/MS analysis

Methanol, acetonitrile, and formic acid were purchased from Wako (Osaka, Japan). The contents of an acylcarnitine reference standard kit (NSK-B, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA): <sup>2</sup>[H]<sub>9</sub>-carnitine, <sup>2</sup>[H]<sub>3</sub>-acetylcarnitine, <sup>2</sup>[H]<sub>3</sub>-propionylcarnitine, <sup>2</sup>[H]<sub>3</sub>-butyrylcarnitine, <sup>2</sup>[H]<sub>9</sub>-isovalerylcarnitine, <sup>2</sup>[H]<sub>3</sub>-octanoylcarnitine, <sup>2</sup>[H]<sub>9</sub>-mirstoylcarnitine, and <sup>2</sup>[H]<sub>3</sub>-palmitoylcarnitine, were diluted in methanol and used as an internal standard.

The routine sample preparation method for MS/MS was used for acylcarnitine analysis [15–17]. Briefly, 10 µl of the supernatant was transferred to a 96-well microplate, and 200 µl of the methanol reference standard kit was added to each well. The aliquots were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and then 150 µl of supernatant was obtained. After drying the sample under a gentle stream of nitrogen, 50 µl of 3N *n*-butanol-HCl was added, and butylation was performed at 65°C for 15 min. After drying up, the sample was reconstituted in 100 µl of 80% acetonitrile:water (4:1, v/v, without formic acid).

### 2.5. Acylcarnitine analysis by MS/MS

An API 3000 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in combination with a SIL-HTc autosampler (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used, with a sample volume of 10 µl. Quantitative analysis was conducted using ChemoView™ software (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada) by comparing the signal intensity of an analyte against the corresponding internal standard (Supplemental "Fig. 3"). The heated gas temperature was 250°C, and the ion spray voltage was 5500 eV. All acylcarnitines were measured by positive precursor ion scan of *m/z* 85 (scan range *m/z*: 200–500, C5DC *m/z*: 388.2) with declustering potential of 40 V, entrance potential of 10 V, and collision cell exit potential of 5 V.

### 2.6. Data analysis

The data were expressed as mean plus or minus standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test in JMP version 5.01a. <sup>2</sup>[H]<sub>3</sub>-octanoylcarnitine was used as an internal standard of glutarylcarnitine (C5DC). The quality assurance of MS/MS analysis was validated by measuring the standard samples including C5DC at the concentration of 0.06, 0.23, 0.39, and 0.72 nmol/ml. The calibration curves of the measurements (*n* = 10) indicated good linearity (*p* < 0.01, *r* = 0.99). Intra- and inter-assay variability was 9.9% and 17.3%, respectively (*n* = 6).

## 3. Results

### 3.1. Substrates and concentrations

The effects of different substrates, Lys, 2AA, and GA, on C5DC levels were compared using 5 cell lines from 5 GA1 patients. Each substrate was used at 0.5, 2.0, and 4.0 mM (Supplemental "Fig. 4"). When Lys or GA was added, the C5DC level was significantly higher than in medium alone (*p* < 0.01) at concentrations of 2.0 and 4.0 mM. When 2AA was added, C5DC level was significantly

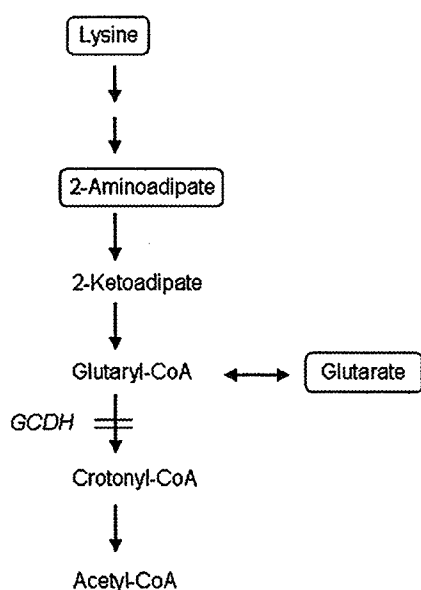
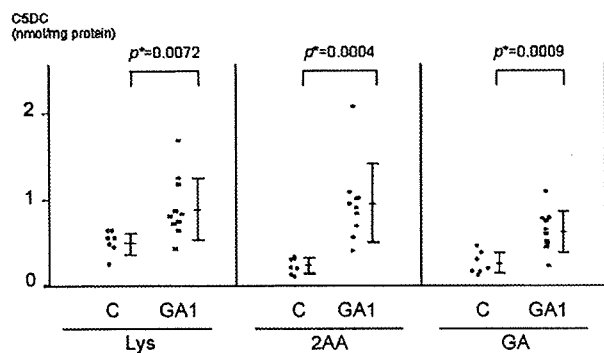


Fig. 1. Flow chart of added substrates and metabolic map of GA1. The substrates shown in the boxes were added in the present study. GCDH is an abbreviation of glutaryl-CoA dehydrogenase.



**Fig. 2.** Amount of C5DC in the medium of GA1 cells and control with different substrates.

As a substrate, 2.0 mM of Lys, 2AA, or GA was added. The amount of C5DC in the medium was compared between patients with GA1 cases and controls. \* $p < 0.01$ . Abbreviations: C, control; Lys, lysine; GA, glutaric acid; 2AA, 2-aminoadipate.

increased at a concentration of 2.0 mM ( $p < 0.01$ ). These substrates at 2 mM did not affect the cell viability as determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay [18]) (Supplemental "Fig. 5"). Based on these findings, the optimum concentration of substrates was considered to be 2.0 mM in the present study.

### 3.2. Amount of C5DC in culture medium in patients with GA1

The amount of C5DC was compared with control subjects and 10 patients with GA1 by adding substrates (Lys, 2AA, or GA at 2.0 mM) (Fig. 2 and Supplemental "Fig. 6"). In patients with GA1, a significant increase of C5DC was seen in each sample, with the level of significance regarding the difference. The addition of 2AA led to the greatest difference. When cultured without any substrates, no significant difference was seen between patients with GA1 and control subjects.

## 4. Discussion

Our study verified that enzymatic activity evaluation in patients with GA1 is practical by an *in vitro* probe assay of acylcarnitine profiling using human skin fibroblasts. Since 2-oxoadipic acid used by Schulze-Bergkamen et al. [13] is no longer commercially available, we determined whether the other molecules involved in GCDH represent alternative substrates. Lys and 2AA were used as substrates as they locate upstream of glutaryl-CoA synthesis pathway (Fig. 1). Since administration of GA would increase C5DC in cells with GCDH deficiency as a consequence of accumulation of glutaryl-CoA, to which GA is converted [19], GA was also used as another substrate. The results showed that all substrates increased the amount of C5DC in GA1 cells, compared with normal controls and GA1 cells cultured in medium alone. Our data indicate that 2AA can be used as an alternative substrate to evaluate the enzyme activity of GCDH.

If the concentration of a substrate is higher than 4 mM, the amount of C5DC in GA1 cells reduces in some cases. This tendency was striking when 2AA was added, which is likely due to growth suppression of the cells by the presence of an excessive substrate. However, these substrates at 2.0 mM did not affect the cell viability as determined by the MTT assay (Supplemental "Fig. 5"), making it highly unlikely that the substrate used in our study affected cell proliferation that could influence the amount of cellular protein and the C5DC level. Based on these results, the appropriate substrate concentration was considered to be 2.0 mM in the present study.

The difference of the C5DC between 10 patients with GA1 and 7 control subjects was most remarkable when 2AA was added as a substrate, showing no overlaps. Thus it was considered that 2AA was the most suitable substrate. When Lys or GA was added, there was an overlap in C5DC between GA1 patients and controls.

The *in vitro* probe assay has been reported to be useful for the enzymatic evaluation of  $\beta$ -oxidation disorders [20]. Based on our results, it was indicated that our method was useful for the diagnosis of patients with GA1. In future studies, analysis of C5DC using d6-glutaryl-carnitine as internal standard or quantifying the metabolite by a fast liquid chromatography (LC) step or the multiple reactions monitoring (MRM) would make the analysis more quantitative and improve the performance of the results. Although various metabolic disorders of organic acids can be diagnosed through urinary organic acid analysis by GC/MS, some cases require further diagnostic methods for enzymatic evaluation. Our data suggests that the *in vitro* probe assay will be useful for the diagnosis of other organic acidemias, though an appropriate substrate and experimental condition are required. Because PBMC do not allow us to repeat the experiments using the same sample, fibroblasts would provide more accurate and reliable information to determine an appropriate substrate.

## Acknowledgements

We are grateful to Yuka Ito, Toyomi Esumi, Midori Furui, Nana Tomita, and Shine Mushimoto for their technical assistance. This study was partly supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and from the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jchromb.2009.04.043.

## References

- [1] S.I. Goodman, F.E. Frerman, in: C. Scriver (Ed.), *Mol Met Basis Inher Dis*, 8th ed., McGraw-Hill Inc., New York, 2001, p. 2195.
- [2] S. Kolker, E. Christensen, J.V. Leonard, C.R. Greenberg, A.B. Burlina, A.P. Burlina, M. Dixon, M. Duran, S.I. Goodman, D.M. Koeller, E. Muller, E.R. Naughten, E. Neumaier-Probst, J.G. Okun, M. Kyllerman, R.A. Surtees, B. Wilcken, G.F. Hoffmann, P. Burgard, J. Inherit. Metab. Dis. 30 (2007) 5.
- [3] S.I. Goodman, S.P. Markey, P.G. Moe, B.S. Miles, C.C. Teng, *Biochem. Med.* 12 (1975) 12.
- [4] S.I. Goodman, D.E. Stein, S. Schlesinger, E. Christensen, M. Schwartz, C.R. Greenberg, O.N. Elpeleg, *Hum. Mutat.* 12 (1998) 141.
- [5] J. Zschocke, E. Quak, P. Guildberg, G.F. Hoffmann, *J. Med. Genet.* 37 (2000) 177.
- [6] G.F. Hoffmann, H.J. Bohles, A. Burlina, M. Duran, J. Herwig, W. Lehnert, J.V. Leonard, A. Muntau, F.K. Plecko-Starting, *A. Superti-Furga, J. Inherit. Metab. Dis.* 18 (1995) 173.
- [7] K.B. Bjugstad, S.I. Goodman, C.R. Freed, *J. Pediatr.* 137 (2000) 681.
- [8] S. Kolker, S.F. Garbade, C.R. Greenberg, J.V. Leonard, J.M. Saudubray, A. Ribes, H.S. Kalkanoglu, A.M. Lund, B. Merinero, M. Wajner, M. Troncoso, M. Williams, J.H. Walter, J. Campistol, M. Marti-Herrero, M. Caswill, A.B. Burlina, F. Lagler, E.M. Maier, B. Schwahn, A. Tokatli, A. Dursun, T. Coskun, R.A. Chalmers, D.M. Koeller, J. Zschocke, E. Christensen, P. Burgard, G.F. Hoffmann, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 840.
- [9] S. Yamaguchi, T. Orii, K. Yasuda, Y. Kohno, *Tohoku J. Exp. Med.* 151 (1987) 293.
- [10] H. Nagasawa, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, M. Kobayashi, Y. Wada, K. Shikura, S. Shimao, T. Okada, T. Orii, *Acta Paediatr. Jpn.* 34 (1992) 409.
- [11] H. Osaka, S. Kimura, A. Nezu, S. Yamazaki, K. Saitoh, S. Yamaguchi, *Brain Dev.* 15 (1993) 125.
- [12] H. Ikeda, T. Kimura, T. Ikegami, M. Kato, A. Matsunaga, S. Yokoyama, S. Yamaguchi, T. Ohura, K. Hayasaka, *Am. J. Med. Genet.* 80 (1998) 327.
- [13] A. Schulze-Bergkamen, J.G. Okun, U. Spiekerkötter, M. Lindner, D. Haas, D. Kohlmüller, E. Mayatepek, H. Schulze-Bergkamen, C.R. Greenberg, J. Zschocke, G.F. Hoffmann, S. Köllker, *Pediatr. Res.* 58 (2005) 873.
- [14] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [15] A. Schulze, M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, G.F. Hoffmann, *Pediatrics* 111 (2003) 1399.