

- [16] T.H. Zytovicz, E.F. Fitzgerald, D. Marsden, C.A. Larson, V.E. Shih, D.M. Johnson, A.W. Strauss, A.M. Comeau, R.B. Eaton, G.F. Grady, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1945.
- [17] S. Nomachi, T. Nakajima, M. Sakurada, N. Ota, M. Fukushi, K. Yano, U.G. Jensen, *Annual Report of Sapporo City Institute of Public Health*, 34, 2007, 37.
- [18] Y. Honma, Y. Ishii, Y. Yamamoto-Yamaguchi, T. Sassa, K. Asahi, *Cancer Res.* 63 (2003) 3659.
- [19] G.K. Menon, D.L. Friedman, J.R. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* 44 (1960) 375.
- [20] J.G. Okun, S. Kolker, A. Schulze, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, M. Lindner, G.F. Hoffmann, R.J. Wanders, E. Mayatepek, *Biochim. Biophys. Acta* 1584 (2002) 91.

# 新生児突然死の予防：タンデムマスによる早期発見

島根大学医学部小児科

山口 清次

## Key words

新生児突然死  
SIDS  
脂肪酸代謝異常  
タンデムマス  
新生児マススクリーニング

### 1. はじめに

乳児突然死症候群 (SIDS) は生後 2～4 カ月にピークがいわれるが、新生児突然死に遭遇することもある。また SIDS 乳幼児症例でも新生児期の病歴をみると、一過性多呼吸、一過性低血糖などの病歴を持っていることが少なくない。このような症例では、新生児期に SIDS の前兆を示したと考えられる。

新生児マススクリーニングの新技術としてタンデムマス法が注目されているが、その対象疾患の中には、SIDS や急性脳症、ライ症候群様の発症形態をとる先天代謝異常が含まれている<sup>1)~3)</sup>。今後タンデムマスを応用すれば、乳幼児突然死の予防あるいは病態解明に役立つ可能性がある。そこで、先天代謝異常の面から新生児突然死の予防、あるいは遭遇した時の対応について述べたい。

### 2. 新生児突然死の要因

乳幼児突然死症候群 (SIDS) あるいは新生児突然死の原因として、表 1 のような仮説がある。すなわち 1) 生物学的因子、2) 生理学的要因、3) 生化学的因子 (一部の先天代謝異常)、4) 体質因子 (単一遺伝子のみならず

表 1 新生児突然死を起こす要因として考えられること

分類	例
1) 生物学的因子	未熟性 潜在的感染症、エンドトキシンなど
2) 電気生理学的因子	不整脈 (QT 延長症候群など) 脳幹自律神経機能異常
3) 生化学的因子	先天代謝異常 (脂肪酸代謝異常など)
4) 体質的素因	同胞、家族歴に SIDS など
5) 環境社会的因子	うつぶせ 母親の喫煙など

多因子遺伝)、および 5) 社会的環境因子 (うつぶせ寝、母親の喫煙) などである。

### 3. 乳幼児突然死 (SIDS) または

#### 新生児突然死を起こす代表的な先天代謝異常

SIDS 様症状で発症する先天代謝異常の代表的な疾患として、表 2 のように脂肪酸代謝異常、有機酸代謝異常、アミノ酸代謝異常、糖新生系異常症などがある<sup>4) 6)</sup>。このうち脂肪酸代謝異常、有機酸代謝異常は、微量の血液をタンデムマスで分析することによって、比較的簡単に診断でき、注目されている。

#### 1) 脂肪酸代謝異常症

ミトコンドリア脂肪酸  $\beta$  酸化系の代謝障害である。この代謝系に異常があると、長時間空腹状態が続いたり、感染症、下痢などで急激にエネルギー需要の高まった時、急激に代謝不全状態におちいり、急性脳症、突然死などの経過をとる。

#### 2) 有機酸代謝異常症

アミノ酸の中間代謝過程にはたらく酵素の異常によって、中間代謝体である有機酸が体内に上昇して、ケトアシドーシス、高アンモニア、低血糖などをきたす。

#### 3) アミノ酸代謝異常

尿素回路異常症、メーブルシロップ尿症などで急性発作が起こることがある。

#### 4) 糖新生系異常症：

食後一定時間後に食事由来の炭水化物からのエネルギーが枯渇すると、肝臓や筋肉に蓄えていたグリコーゲンや、乳酸、アミノ酸からブドウ糖を産生して血糖を維持する代謝経路が働く。この経路の代表的な代謝疾患として、糖原病、糖新生異常症がある。

#### 5) その他

内分泌疾患で急性の電解質異常や、低血糖をきたす高インスリン血症などがある。

表2 新生児突然死を起こす可能性のある先天代謝異常症

分類	代表的疾患
1) 脂肪酸代謝異常	1. 中鎖アシル-CoA脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 2. 極長鎖アシル-CoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 3. CPT欠損症* 4. トランスロカーゼ欠損症 5. グルタル酸血症2型 6. 全身性カルニチン欠乏症
2) 有機酸代謝異常	1. ヒドロキシメチルグルタル酸血症 (HMG血症) 2. メチルマロン酸血症 3. プロピオン酸血症
3) アミノ酸代謝異常	1. メープルシロップ尿症 2. 尿素回路異常症
4) 糖新生系異常症	1. 糖原病1型 2. フルクトース-1, 6-ジホスファターゼ欠損症**
5) その他	1. グリセロールキナーゼ欠損症 2. 副腎過形成症 3. 重症低血糖症

\* CPT = カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (1型, 2型を含む)

\*\* 代表的な糖新生系異常症

表3 有機酸・脂肪酸代謝異常等の診断アプローチのために必要な検査と検体

検体	特殊検査	備考
1) 尿 (0.5 ~ 10ml)	尿中有機酸 尿中アシルグリシン アミノ酸 カルニチン測定	GC/MS など
2) 血清 (0.5 ~ 1ml)	血中アシルカルニチン アミノ酸 血中遊離脂肪酸 カルニチン測定	タンデムマスなど
3) 血液ろ紙 (ガスリー-1スポット)	アシルカルニチン アミノ酸 遺伝子解析	タンデムマス
4) 培養細胞 (リンパ芽球, 皮膚繊維芽細胞)	酵素測定 代謝能評価 遺伝子解析	末梢血液 (ヘパリン血) 米粒大の皮膚片から培養可
5) 胆汁 (1ml)	アシルカルニチン	脂肪酸代謝異常の診断に有用なことがある
6) 臓器 (肝など)	酵素測定 遺伝子解析	ホルマリンにつけない -80℃保存が望ましい

#### 4. SIDS 症例に占める先天代謝異常の頻度

脂肪酸代謝異常と SIDS の関連性が注目されつつあるが、SIDS の原因としてどの程度を占めるのであろうか。

Bole ら<sup>9)</sup> は、SIDS の剖検例についてその病歴を詳しく検索し、かつタンデムマス分析を後方視的に行った研究結果を報告している。その結果「狭義の SIDS」の定義に合致した症例 313 例中 14 例 (4.4%) に脂肪酸代謝異常が発見された。また感染に引き続いて突然死にいたった例では 45 例中 9 例 (20%) に代謝異常が見出された。検索した「SIDS」症例全体の 358 例中 23 例 (6.4%) に脂肪酸代謝異常症が発見された。他の先

天代謝異常の可能性も考慮すると、SIDS 症例の中に先天代謝異常の含まれる頻度は少なくとも 5 ~ 10% はあるものと思われる。

#### 5. 新生児突然死に遭遇したとき

##### 代謝異常診断へのアプローチ

新生児突然死または SIDS 症例に遭遇した時、いかにして先天代謝異常診断にアプローチすべきであろうか。表3に示すように、いくつかの特殊検査が必要となる。すなわち GC/MS による尿中有機酸分析、タンデムマスによる血中アシルカルニチン分析が最初のステップとして重要である。

図 1 先天代謝異常患者の発症時期、発症形態と新生児ガスリーろ紙のタンデムマスによる後方視的分析結果 (島根大学小児科)  
 略字：有機酸＝有機酸代謝異常；脂肪酸＝脂肪酸代謝異常症；アミノ酸＝アミノ酸代謝異常症；HMG血症＝ヒドロキシメチルグルタル酸血症；TFP＝ミトコンドリア三頭酵素；CPT＝カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ；VLCAD, MCAD＝極長鎖，中鎖アシル-CoA脱水素酵素；●＝突然死様発症；■＝感染を契機に突然死；○＝急性脳症；□＝感染を契機に急性脳症．新生児ろ紙＝発症後に新生児期に採取されていた使用後ガスリーろ紙を後方視的にタンデムマス検査した結果．◎＝新生児期の検体で診断できた；×＝保存されていた新生児ろ紙で明らかな異常を検出できなかった

(疾患)	発症時期					新生児血液ろ紙	
	7日	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	1才	2才 ↓	
有機酸	1) マルチプルカルボキシラーゼ	○					◎
	2) マルチプルカルボキシラーゼ			□			◎
	3) メチルマロン酸血症	●					◎
	4) メチルマロン酸血症		○				◎
	5) メチルマロン酸血症		○				◎
	6) プロピオン酸血症			□			◎
	7) プロピオン酸血症					□	◎
	8) β-ケトチオラーゼ欠損症				○		×
	9) HMG血症			□			◎
	10) グルタル酸血症 I 型				○		◎
脂肪酸	11) TFP 欠損症		●				◎
	12) TFP 欠損症				□		◎
	13) CPT2 欠損症				□		◎
	14) CPT2 欠損症					□	◎
	15) VLCAD欠損症			■			◎
	16) グルタル酸血症 II 型			●			×
	17) グルタル酸血症 II 型				□		◎
アミノ酸	18) MCAD 欠損症					■	◎
	19) シトルリン血症 I 型	○					◎
	20) シトルリン欠損症		○				×

採取すべき検体は、少量の尿、血清、血液ろ紙 (ガスリーろ紙) などである。不幸にして死亡して採尿できなくても膀胱穿刺などによって微量の尿でも採取保存すると役立つ。さらに可能ならば末梢リンパ球、皮膚繊維芽細胞のための皮膚生検検体 (米粒大) を清潔に採取しメディウムに入れてできるだけ早く専門検査機関に送付する。

6. タンデムマスを導入した

新生児マススクリーニングの動き

脂肪酸代謝異常では、ふだんは正常とかわらぬ生活をしながら、感冒などのストレスのかかった時急性発症し、突然死をきたすことがある。タンデムマスを導入すると、従来の対象疾患である3種類のアミノ酸代謝異常に加えて、有機酸・脂肪酸代謝異常がスクリーニングできるようになる。わが国でもパイロット研究が進み、2008年までに約81万人の新生児が検査を受け、計92名の代謝異常を発見している。現時点では日本人

で発見される頻度は8,000～1万人に1人と予想されている<sup>7)</sup>。

図1に、急性脳症などで発症した後に、島根大学小児科で生化学診断した患者の発症時期を示している。このうち、新生児期に採取されたガスリーろ紙の分析ができた症例をプロットした。新生児血液ろ紙を後方視的に分析して陽性が確認されたのは20例中17例であった。大部分の患者が新生児期に検査されていたら発症前に診断されていたことを示す。

7. まとめ

SIDSの背景因子として、先天代謝異常の関連性について述べた。その要点を表4にまとめた。タンデムマスによる新しい新生児マススクリーニング体制が確立すれば、一部であるにしてもSIDSなどの危険性をスクリーニングできる可能性がある。

本論文のデータは、厚生労働科学研究費補助金 (子ども家庭総合研究事業) (新興・再興感染症研究事業)、

表4 まとめ：新生児突然死に遭遇した時の注意点

1. 家族歴のチェック
2. 新生児突然死は別の診断名で片付けることが少なくない
3. 新生児一過性多呼吸, 低血糖, 哺乳低下に注意する
4. 母親の栄養の偏りはないか (菜食主義者など)
5. 突然死に遭遇したとき生化学的な方向からの検索も念頭におく
6. 肝機能障害 (特に LDH, CK など) に注意する
7. 突然死の誘因となる低血糖, アンモニアをチェックする
8. 新生児期は見かけ上正常でも, 検査値は不安定なこともある
9. タンデムマス, GC/MS による代謝異常検索も念頭におく
10. 尿, 血清などの検体保存 (-20°C) しておく
11. ホルマリン処理しない臓器の保存も念頭におく (-80°C)

および日本学術振興会科学研究費の補助によって行われた研究成果を一部引用した。

#### 文 献

- 1) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也, 大浦敏明, 大和田操, 青木菊磨, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介, 大浦敏博: タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療

- 指針. 特殊ミルク情報 2006 (11月); 42: 28-53
- 2) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代. 小児保健研究 2006; 65 (6): 725-732
  - 3) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, Tajima T, Yamaguchi S: Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. J Chromat B, 2002; 776: 39-48
  - 4) 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 学会誌 2006; 6 (1): 15-24
  - 5) 山口清次: 乳児突然死症候群 (SIDS) の原因検索: 先天代謝異常スクリーニングの重要性. 法医病理 2007; 1325-32
  - 6) Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK, Yoon H, Madsen JA, ReyesMugica M, Rinaldo P: Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life, J Pediatr 1998; 132 (6): 924-33
  - 7) 山口清次: 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. 厚生労働科学研究費補助金 (子ども家庭総合研究事業) 平成 20 年度総括・分担研究報告書 (研究代表者 山口清次), p5-p16, 2009

## 非誘導体化試料調製によるタンデムマス・スクリーニング

重松陽介<sup>1,2)</sup>, 畑 郁江<sup>2)</sup>

1) 福井大学医学部看護学科, 2) 福井大学医学部小児科

## 【要 旨】

タンデムマス・スクリーニングでは、分析機器感度の向上、内部標準物質キットの整備などにより、ブチルエステル誘導体化を必要としない試料調整法（非誘導体化法）が採用されるようになってきた。この非誘導体化法を使用した分析について、試料調整上の注意点、タンデム質量分析法での条件設定などの問題点や工夫について解説した。誘導体化試薬を使用しないことでの安全性や方法の簡便さが利点であるものの、定量精度や分析の特異性については解決すべき問題も存在することを指摘した。

## 【キーワード】

タンデム質量分析, アシルカルニチン, アミノ酸, 新生児マススクリーニング, 非誘導体化

## 結 言

タンデム質量分析法 (MS/MS) は、イオン化した (させた) 物質の質量や解離様式を測定する技術である。MS/MSによる代謝異常症新生児マススクリーニング (タンデムマス・スクリーニング) では、濾紙血中のカルニチン・アシルカルニチンとアミノ酸を分析する。

カルニチン・アシルカルニチンは溶液中で既にイオンとして存在しており、アミノ酸はMS/MS機器の試料導入部のエレクトロスプレー・イオン化 (ESI) 装置でイオンとなる。ESIで質量分析計内に導入されたアミノ酸は主として水素イオンが付加した陽イオン、即ち疑似分子イオン ( $[M+H]^+$ ) として観測される一方、カルニチン・アシルカルニチンは分子イオン ( $M^+$ )

が観測される。

ところで、これらの物質に存在するカルボキシル基は溶液中で陰イオンとなる性質がある。特に、アシルカルニチンの中でも、アシル基に更にカルボキシル基を有するジオイルカルニチン (グルタリルカルニチンなど) では、観測される陽イオン強度がより低下する。しかしカルボキシル基をエステル化して陰イオン化しないようにしておくと、これらの物質はより強度の高い陽イオンとして感度良く分析できる。このため、分析感度が不足するMS/MS機器での分析では、試料のブチルエステル化が必須であった。この方法の欠点は、分析対象物質のエステル化率にバラツキがあったり、エステル化の段階で物質の構造が一部壊れたりすることのため、分析精度が低下すること、エステル化には腐食性の強い試薬が必要で、かつ手間がかかることなどである。

既に述べたように、カルニチン・アシルカルニチンもアミノ酸も、カルボキシル基をエステル化しなくても、MS/MS分析では陽イオンとして観測され、感度さえ問題なければ誘導体化しなくても分析でき、また上記の問題点はなく

## &lt;連絡先&gt;

重松 陽介

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23

福井大学医学部看護学科・小児科

Tel:0776-61-3111 Fax:0776-61-8563

E-mail:yosuke@u-fukui.ac.jp

なる<sup>3)</sup>。一方、誘導体化しない試料では、夾雑物が増えることによる問題や、測定対象物質の分子量が小さいので特異性が低下する欠点もある。

このような観点を踏まえ、本稿では筆者らの施設での経験を元に分析法を紹介し、操作法がマニュアル化されているPerkin Elmer社キットについては参考情報のみ述べる。また、筆者らの施設の機器はアプライドバイオシステムズ社製API4000であるので、他社製の機器での分析においては多少改変の必要な部分があることをお断りしておく。

### 試料前処理法

#### (1) 内部標準

高精度分析のためには、定量する物質それぞれに対して安定同位体標識体の内部標準があることが望ましい。MS/MS分析では、衝突解離室における衝突エネルギーを厳密に一定に保つことが難しいので、物理的挙動が同じでない物質を内部標準として用いるとイオン強度の変化を補正しがたいことになる。安定同位体標識体が入手困難(註1)な場合は、分子量も考慮して物理的挙動が似通った物質の内部標準を準用し、

表1. 非誘導体化試料のMS/MS分析条件 (福井大学)

#### 1) MRM分析設定

(アミノ酸)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell time (msec)
Alanine	90	44	50
<sup>2</sup> H <sub>4</sub> -Alanine	94	48	50
Serine	106	60	50
<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Serine	109	63	50
Valine	118	72	50
<sup>2</sup> H <sub>8</sub> -Valine	126	80	50
Leucine	132	86	50
<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Leucine	135	89	50
Methionine	150	104	50
<sup>2</sup> H <sub>4</sub> -Methionine	153	107	50
Phenylalanine	166	120	50
<sup>2</sup> H <sub>5</sub> -Phenylalanine	171	125	50
Arginine	175	70	50
<sup>2</sup> H <sub>4</sub> , <sup>13</sup> C-Arginine	180	75	50
Citrulline	176	159	50
<sup>2</sup> H <sub>2</sub> -Citrulline	178	161	50
Tyrosine	182	136	50
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Tyrosine	188	142	50
C5:1-AC	244	85	50
<sup>2</sup> H <sub>9</sub> -C5-AC	255	85	50
Glutaryl carnitine	276	85	50
<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Glutaryl carnitine	279	85	50
C6DC-AC	290	85	50
C16OH-AC	416	85	50
<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -C16-AC	403	85	50
C18:1OH-AC	442	85	50

#### 2) Precursor-ion scan分析設定

	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Scan time (sec)
Acylcarnitines (AC)	150-450	85	4

バラツキが少なくなるようにする。このような場合、非誘導体化法と誘導体化法では測定対象物質と内部標準に準用した物質のイオン化効率の比が異なるため、非誘導体化法と誘導体化法での定量値を単純に比較することは無意味である。

特に、他のアシルカルニチンと異なりイオン化効率が低いグルタリルカルニチンの非誘導体化分析には安定同位体標識体が必須である。

## (2) 抽出

アミノ酸や遊離カルニチン、短・中鎖アシルカルニチンの抽出用には水分量の多いメタノール溶液が適しているようである。ただし、長鎖アシルカルニチンは水分量の多いメタノール溶液には溶解しにくいので注意すべきである。我々の施設では水分含有量は2%である。

水分量の多いメタノール溶液で濾紙血から抽出する場合は、ヘモグロビン固定(註2)を行っておくと溶血による回路やフィルターの汚染を軽減できる。

濾紙血片(3mm径)1個を96穴平底マイクロプレート・ウエルに入れ、内部標準含有メタノール液を加え、蓋をして30分間振盪抽出操作を行い、抽出液はマイクロプレート(遠沈用にはV底)に移す。

## (3) 粒子状物質の除去

試料による分析回路の閉塞を防止するため、我々の施設では、プレート遠沈機を用いて5,000 rpmで粒子状物質の除去を行っている。遠沈後は上清をU底マイクロプレートに移す。

オートインジェクタからESIへの回路にフィルター(註3)を使用すると遠沈操作は不要である。ただし、フィルターの種類によっては、アシルカルニチンの鎖長の違いによってイオン強度変化が強くなる出ることがあるので、分析サイクル毎のイオン強度を確認しておく必要がある。また、フィルターの劣化と交換頻度にも充分留意すべきである。

回路の閉塞を防止するもう一つの工夫は、試料注入量を少なくすることである。我々の注入量は5 $\mu$ lである。MS/MS分析中のLC流速を50-80 $\mu$ l/分程度に遅くすれば、イオン強度低下を

最小限にすることができ、また十分な分析時間(30秒程度)も確保できる。

## (4) 濾紙血以外の生体試料の分析

濾紙血以外の生体試料(血清、髄液、尿など)についても、微量かつ精度良く計量できる量(5 $\mu$ l)を用いて、非誘導体化法で分析できる。濾紙血分析と同じ内部標準含有メタノール溶液を同じ割合で試料に加え、遠沈上清を分析に供すると、濾紙血と同じ分析系で測定出来る。除蛋白が必要な試料の場合、メタノール濃度は80%以上にするとよい。

## MS/MS分析

### (1) ESIと移動相

ESIでは通常熱を利用した脱溶媒が行われているので、スプレーされる移動相の水分量は少ないほどイオン化効率は良い。生体成分を含む試料の分析の移動相としては、回路などへの吸着を少なく出来るアセトニトリルが汎用されるが、非誘導体化試料はメタノール液であるので、メタノールを含む移動相を使うと溶解度の変化による粒子形成を防止できる可能性がある。我々は、アセトニトリル・メタノール・水(5:5:2)の移動相を使用している。

更に、アミノ酸の分析では、ギ酸や酢酸を移動相にごく少量添加しておくことでESIでのイオン化効率が10倍近く向上する。我々は上記移動相に0.05%の濃度でギ酸を添加している。

### (2) MS/MS分析

表1にCILキットを用いた場合のMS/MS分析条件を示した。

アミノ酸はMRM分析(註4)を行う。シトルリンのMRM分析では、最も強度の高いproduct ionはm/z 70であるが、質量数が1しか違わないアルギニンも同じproduct ionを生成する<sup>3)</sup>ので、2番目に強度に強いproduct ionであるm/z 159との組み合わせ("m/z 176 $\rightarrow$ 159"と表記する)としている。アルギニンが著しく増加しなければシトルリン濃度への影響は少ないので、m/z 176 $\rightarrow$ 70のMRM分析としている報告<sup>4)</sup>もある。

カルニチン・アシルカルニチンの分析では、C5:1などの低濃度のアシルカルニチンや、イ



オン強度の低いC5DCなどのジオイルカルニチンについてはMRM分析を行うが、それ以外のアシルカルニチンについては、プレカーサーイオン・スキャン (precursor-ion scan) 分析での定量も可能である。プレカーサーイオン・スキャンを実施しておく、イオン化の質の確認や、スクリーニング指標の追加を後方視的に行えるなどの利便性がある。ただし、網羅的分析になるので、対象疾患を限定する場合は行わない。

衝突解離エネルギー (collision energy) などの条件設定については、それぞれの機器の操作法に従い、内部標準物質を使って定量物質毎に最適化する必要がある。内部標準物質が得られないアシルカルニチンについては、定量に利用する内部標準物質での測定条件を準用する。

(3) 分析時間の短縮

1試料の分析時間が短ければ試料処理能力が向上する。この分析時間は主に、オートサンプラー始動後試料吸引・注入までの時間、試料注入から試料ピーク出現までの時間、1分析サイクル時間、分析サイクル数、分析終了処理時間

によって決まる。

分析直前のオートサンプラーのニードル洗浄を省略すると注入までの時間を短縮できる。

試料注入直後の移動相の流速を早めるとサンプルピーク出現までの時間を大幅に短縮できる。我々の流速のタイムプログラムを表2に示した。図1に示したように、第2分析サイクルで既に試料ピークが出現している。分析サイクル毎に大きなイオン強度の変動がなければ、5サイクルで分析を終了できる。我々の分析のデータ記録時間は約35秒である。

表2. MS/MS分析におけるLC条件

- (1) 液相：0.05%ギ酸含有アセトニトリル・メタノール・水 (5:5:2)
- (2) 試料注入量：5 $\mu$ l
- (3) 液相流速のタイムプログラム

時間(分)	流速(ml/分)
0	1.7
0.03	1.7
0.06	0.08
0.49	1.7

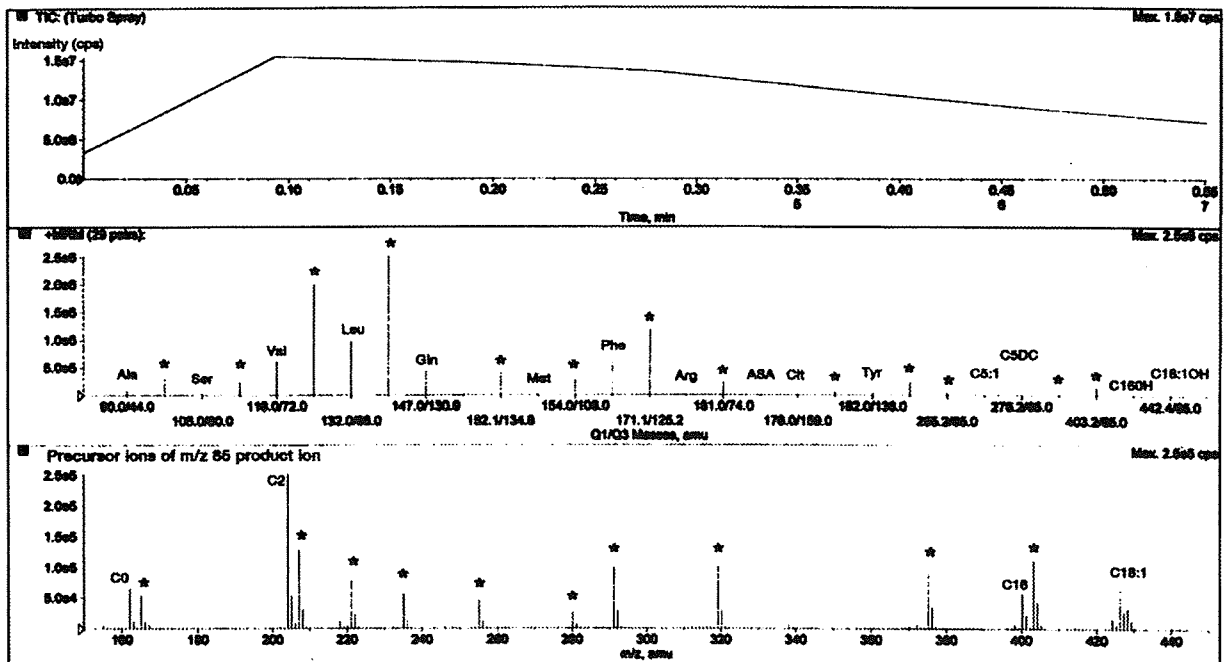


図1. 濾紙血の非誘導体化MS/MS分析におけるTotal ion chromatogram (上段), MRMイオン強度表示 (中段), およびPrecursor ion scan mass spectrum (下段) : データ記録時間は約0.55分 (7サイクル), 1サンプルの分析時間は約1分である。マススペクトルの\*印は安定同位体標識内部標準物質であることを示す。

## 分析結果評価

## (1) 内部標準物質に関連した定量値の評価

既に内部標準の項目で述べたように、MS/MS分析による測定対象物質の濃度の定量値は、分析に供する濾紙血片の血液量が3μlであるという前提に基づき、添加する安定同位体標識物質の濃度とイオン強度比で算出している。例えば、重ね塗りなどで含有血液量が増加している場合は過大な定量値になる。

ロイシンの定量値は、同じ擬似分子イオンを生じるイソロイシン、ヒドロキシプロリンが加算された値である。誘導体化法では、それぞれで誘導体化される割合が異なっているため、ロイシン値として算出された定量値への寄与についてはこの誘導体化率を考慮する必要があるが、非誘導体化法ではその必要はない。イソロイシンとヒドロキシプロリンのイオン化効率もロイシンのそれと同じではなく、また必ずしも一定していない。このため、安定同位体標識ロイシンの擬似分子イオン強度を用いて算出されるロイシン濃度の測定誤差は少ないものの、イソロイシンやヒドロキシプロリンの寄与値の測定誤差は大きくなり、結果としてロイシン値の測定誤差は大きくなると考えられる。

同様に、アシルカルニチンの定量値についても、安定同位体標識体を内部標準物質としないヒドロキシアシルカルニチンの定量値の測定誤差はある程度大きくなる。C5OHについては、新しいCILキットでは安定同位体標識体が含まれている。

## (2) 同じ擬似分子イオンを生じるアシルカルニチンの評価

非誘導体化分析では、ヒドロキシアシルカルニチン (C4OHなど) とジオイルカルニチン (C5DCなど) とが同じ擬似分子イオンを生成するので、注意が必要であり、表3に重要な指標物質を太字で示した。誘導体化法でも同様の現象は観察されていたが、ジオイルカルニチンはジオイル基がブチルエステル化されて分子量が更に大きくなるので、あまり問題にならなかった。

通常、これらの混合物はC4OH、C5OH、C5DCとして定量値を表示するので、C3DCが増加するマロン酸尿症でのSCHAD欠損症偽陽性、C6OHが増加するSCHAD欠損症でのグルタル酸尿症1型偽陽性について留意すべきである。どちらにしても尿有機酸分析での確認が可能である。メチルマロン酸尿症でのC4DC上昇の寄与によってC5OHがカットオフ値を越えることはないようであるが、この場合はC3上昇に注目していれば充分であろう。

## (3) 質量数が小さい物質の評価

誘導体化を行わないと、分析対象物質の質量数が小さい場合、夾雑物の干渉を受けて分析精度が低下することがある。特に分子量が小さいアミノ酸で異常値が観測された場合、必ず同じ検体で再分析を行い確認する必要がある。

遊離カルニチンの分析については、誘導体化した場合に生じる見かけ上の定量値の上昇はなくなるものの、おそらくは質量数が小さくなったことによる影響のためか、測定誤差は小さく

表3. 擬似分子イオンが重複するアシルカルニチン

非誘導体化法				誘導体化法			
	(m/z)		(m/z)		(m/z)		(m/z)
C3OH	234			C3OH	290		
<b>C4OH</b>	248	<b>C3DC</b>	248	<b>C4OH</b>	304		
<b>C5OH</b>	262	<b>C4DC</b>	262	<b>C5OH</b>	318		
<b>C6OH</b>	276	<b>C5DC</b>	276	<b>C6OH</b>	332		
C7OH	290	<b>C6DC</b>	290	C7OH	346		
C8OH	304	C7DC	304	C8OH	360	<b>C3DC</b>	360
C9OH	318	C8DC	318	C9OH	374	<b>C4DC</b>	374
C10OH	332	C9DC	332	C10OH	388	<b>C5DC</b>	388
C11OH	346	C10DC	346	C11OH	402	<b>C6DC</b>	402

なっており、再採血率の低減に貢献している訳ではない。更に精度向上の工夫が必要であると考えている。

## まとめ

キット化された非誘導体化法が存在し、その分析精度も保証されているものの、わが国でのタンデムマス・スクリーニングに採用するには経済性の点で困難な面があり、自家調製内部標準品を使用した精度管理を行うのが現実的である。今回詳述した我々の非誘導体化法に更に検討を加え、精度の高い方法として普及させる必要がある。また、非誘導体化法は簡便でかつ大量検体処理に向いており、そこで生じる余力を二次検査や尿有機酸分析などの診断補助検査に振り向け、早期診断と早期治療に貢献できるスクリーニング体制を作ることも重要と考えられた。

## 謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究補助金(子どもの家庭総合研究事業)の補助によって行われた。また技術情報の一部は大阪府立母子保健総合医療センター稲岡一考氏のご厚意によるものであり深謝する。

## 文献

- 1) 重松陽介, 畑 郁江, 眞弓光文, 田中幸枝, 小林圭子, 佐伯武頼. タンデム質量分析法によるシトリン欠損症の新生児マススクリーニング: 新生児期濾紙血アミノ酸ではスクリーニング困難な患者の存在. 日本マス・スクリーニング学会誌. 17(1): 43-48, 2007.
- 2) 重松陽介. 広がりはじめたタンデムマス・スクリーニングの現況. 日本マス・スクリーニング学会誌. 17(3): 19-24, 2007.
- 3) Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morla A, Bouchu D. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of

biological interest in positive and negative ionisation mode. Rapid Commun Mass Spectrom 17(12): 1297-1311, 2003.

- 4) Nagy K, Takáts Z, Pollreisz F, Szabó T, Vekey K. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. Rapid Commun Mass Spectrom 17(9): 983-90, 2003.

(註1) 安定同位体標識体が入手困難な物質は、ヒドロキシアルカルニチン、ジオイルカルニチン(グルタリルカルニチンなど)である。旧CILキットには安定同位体標識グルタリルカルニチンが入っていないが、新キットには入っている。Perkin Elmer社キットにはグルタリルカルニチンを含め多くの安定同位体標識体が入っている。

(註2) 我々の施設では、アセトニトリル・メタノール・水(7:7:2)を10 $\mu$ l加え30分37 $^{\circ}$ C放置する操作を行っている。

(註3) フィルターとしては、島津製作所のインラインフィルタPEEKとフリットの組み合わせや、SUMIPAX Filter PG-ODSなどがある。交換フィルター単価は前者が1,120円、後者が3,125円である。

(註4) MRM (multiple reaction monitoring) 分析: 第1質量分析部(Q1)で分析対象物質の擬似分子イオン(precursor ion)を選択して衝突解離室(Q2)に導入すると、複数の娘イオン(product ion)が生成する。これらの娘イオンは第2質量分析部(Q3)でスキャン分析することにより質量スペクトルとして観測される。分析対象物質の擬似分子イオンをQ1での質量数に、娘イオンをQ3での質量数に設定し、一定時間その娘イオンの強度を検出器で測定する方法がMRM分析である。イオン強度の大きい娘イオンを選択すると分析感度が高くなる。この擬似分子イオンと娘イオンの組み合わせは分析対象物質に特徴的なものとして選択できるので、特異性の高い分析となる。また観測時間を50ms程度と長く設定できるので高感度な分析となる。

受付日: 平成21年2月19日

Tandem mass spectrometric analysis of dried-blood spot extracts without derivatization for newborn screening

Yosuke Shigematsu<sup>1,2)</sup>, Ikue Hata<sup>2)</sup>

1) Department of Health Science, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

2) Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

## 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った 極長鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症の2例：血清分析の必要性

虫本雄一<sup>1)</sup>，小林弘典<sup>1)</sup>，長谷川有紀<sup>1)</sup>，坂本 修<sup>2)</sup>，大浦敏博<sup>3)</sup>，山口清次<sup>1)</sup>

1) 島根大学医学部小児科，2) 東北大学小児病態学，3) 仙台市立病院小児科

### 要 旨

血液ろ紙を用いた血中アシルカルニチン分析は、タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング（タンデムマス・スクリーニング）を含む脂肪酸代謝異常症の診断に使われている。我々はタンデムマス・スクリーニングで発見した極長鎖アシル-CoA脱水素酵素（VLCAD）欠損症症例の経過中に、血液ろ紙ではカットオフ値を下回った2例を経験した。症例1では初回の血液ろ紙でC14:1が0.92nmol/mlであったものが生後2ヶ月に0.31nmol/ml（カットオフ値 0.40）となり、症例2では5.21nmol/mlであったものが、徐々に低下し生後10ヶ月に0.27nmol/mlとなった。一方、いずれの症例も同時に検査した血清での分析ではカットオフ値を上回っていた。このことは血液ろ紙だけの検査ではVLCAD欠損症を見逃す場合があることを示唆する。血清には血液ろ紙に含まれる血球がなく、特に長鎖脂肪酸の測定に有用である。これまでの報告も含めて判断するとタンデムマス・スクリーニングにおいてVLCAD欠損症を含む長鎖脂肪酸代謝異常症が疑われる症例の再検査や、タンデムマス・スクリーニング以外でも診断が必要な場合には、見逃し例を減らすために血液ろ紙のみならず血清の検査を追加することが望ましい。

### キーワード

新生児マス・スクリーニング，アシルカルニチン分析，タンデム質量分析計，脂肪酸代謝異常症，極長鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損

### 1. はじめに

極長鎖アシル-CoA脱水素酵素（VLCAD）欠損症は、タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング（タンデムマス・スクリーニング）の対象疾患であり、本邦ではパイロットスタディの結果から約15万出生に1人の頻度と考えられている<sup>1)</sup>。発症形態として新生児期に肥

大型心筋症、低血糖で発症する重症型、乳児期に発症する低血糖型、主に幼児期以降に発症する筋型がある<sup>2,4)</sup>。

VLCAD欠損症のスクリーニング指標にはC14:1アシルカルニチン（C14:1）が用いられ<sup>3,5)</sup>、我々が行っているタンデムマス・スクリーニングでのカットオフ値は、血液ろ紙で0.40nmol/ml、血清で0.10nmol/mlとしている。現在進められているタンデムマス・スクリーニングでは血液ろ紙を用いて血中アシルカルニチンの分析を行っている。

VLCAD欠損症を含む長鎖脂肪酸代謝異常症において、血液ろ紙と血清のアシルカルニチン値を直接比較した報告は少ない<sup>6)</sup>。今回、タンデムマス・スクリーニングで発見されたVLCAD

### <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:0853-20-1125

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

欠損症症例の血液ろ紙、血清中C14:1値の経過を追跡したところ、血液ろ紙ではカットオフ値を下回った2症例を経験したので報告する。

## 2. 症例

### 症例1

在胎41週、3,566g、アプガースコア 9/9点、自然経膈分娩で出生した。その他、周産期歴、家族歴に異常なし。タンデムマス・スクリーニングでC14:1が0.92nmol/mlと高値を示し、確定診断のために行った遺伝子検査でVLCAD欠損症の原因となるACADVL遺伝子に複合ヘテロ接合性変異 (T260P, C607S) を認めた。生後3ヶ月よりMCTミルクを開始し、食事指導、sick dayの対応により1歳半現在まで無症状で経過している。経過中の血液ろ紙、血清におけるC14:1の値を図1(a)に示す。血液ろ紙でのC14:1は、生後1ヶ月で0.50nmol/mlまで低下し、生後2ヶ月に0.31nmol/mlとカットオフ値 (<0.40) を下回った。生後3ヶ月には0.75nmol/mlと再度高値を示したが、生後4ヶ月から11ヶ月まで0.27~0.35nmol/mlとカットオフを下回る値で推

移した。一方、生後2ヶ月から血液ろ紙と同時に検査を行った血清では、C14:1が0.40~1.13nmol/mlといずれの時期でもカットオフ値 (<0.10) を超えていた。

### 症例2

在胎40週、3,296g、吸引分娩で仮死なく出生した。その他、周産期歴、家族歴に異常なし。新生児マス・スクリーニングでC14:1が5.21nmol/mlと高値を示した。遺伝子解析ではACADVL遺伝子に複合ヘテロ接合性変異 (997insT, A416T) を認めVLCAD欠損症と診断した。MCTミルクを生後1ヶ月から開始したが、摂取が不規則になり9ヶ月時に中止された。問診からは1歳半頃より、ぐったりする低血糖様発作が数回あったが、検査で確認された急性発症は感染罹患後の横紋筋融解症を伴った2回であった。1回目は2歳1ヶ月時の突発性発疹に罹患した際、筋肉痛はなかったが罹患1週間後の定期採血でCK 2,452IU/l, AST 106IU/l, ALT 211IU/lと上昇がみられた。2回目は2歳2ヶ月時のヘルパンギーナ罹患の際、発熱はなかったが、徐々に経口摂

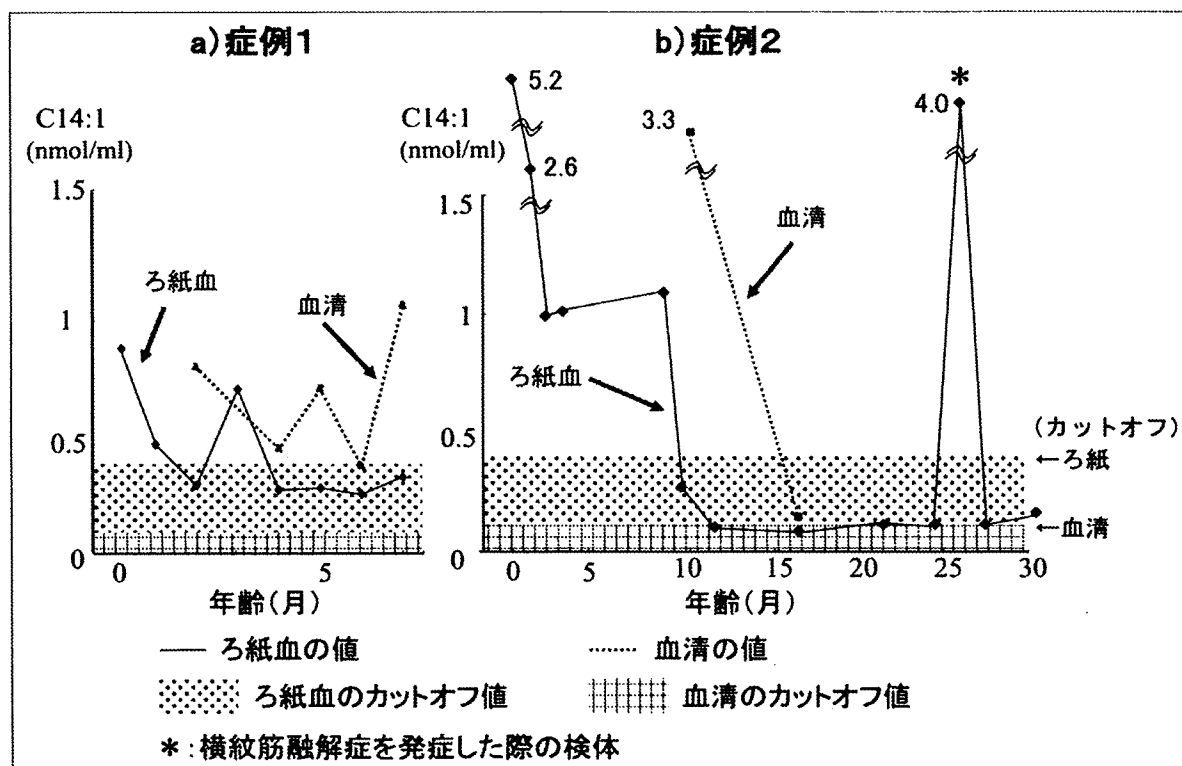


図1. 血液ろ紙と血清におけるC14:1値の推移

取が減少し発症3日目にぐったりしてきたため近医で点滴加療をうけた。その後の紹介受診時の採血でCKが10,000IU/l以上、AST 487IU/l、ALT 162IU/lと高値を示した。その際の血糖は88mg/dl、静脈血液ガス所見はpH 7.409、BE -3.2mmol/l、HCO<sup>3-</sup> 20.2mmol/l、PCO<sub>2</sub> 32.6mmHgであった。1歳までの発育発達は良好であったが、1歳半頃より言葉の遅れを指摘されている。2歳を過ぎてても発語がなく、言語発達遅滞として経過観察中である。

症例2の血液ろ紙C14:1値(図1, b)では、生後1ヶ月は2.6nmol/mlと高値、生後2ヶ月から9ヶ月の間も0.99~1.09nmol/mlとカットオフ値(<0.40)を上回った。しかし、その後は2歳1ヶ月の発作の際に4.01nmol/mlと一過性に上昇したものの、それ以外の生後10ヶ月から2歳7ヶ月までの定期検査では0.08~0.16nmol/mlとカットオフ値を超えなかった。一方、血清では、生後5ヶ月時にC14:1が3.33nmol/mlと高値、1歳5ヶ月時にも0.14nmol/mlと軽度ではあるがカットオフ値(<0.10)を上回った。

### 3. 考 察

今回の2症例では、C14:1値は出生後徐々に低下し、血液ろ紙がカットオフ値を下回った際も血清ではカットオフ値を上回っていた。このことは、出生後以降の血液ろ紙のみの検査ではVLCAD欠損症を見逃す可能性があることを示唆する。

一般に最重症型以外のVLCAD欠損症を含む脂肪酸代謝異常症では、十分なエネルギー供給下では発症しない<sup>2,4)</sup>。新生児期では哺乳確立前の異化亢進の時期(生後2, 3日)が最も診断に適しており、生後3日目にVLCAD欠損症と診断された症例が、生後5日目にはC14:1がカットオフ値を下回っていた報告もある<sup>7)</sup>。脂肪酸代謝異常症では安定期に必ずしも検査値の異常を示さないことがあるが<sup>8,9)</sup>、今回の2症例のように、血液ろ紙でカットオフ値以下でも血清ではカットオフ値を超える場合が少なくないと思われる。その理由として、血液ろ紙では血球成分を分析してしまうことがあげられる。血球には長鎖脂肪酸が多いため、ろ紙血分析では正常でも長鎖脂肪酸の値が高めになりカットオフ値を高くせ

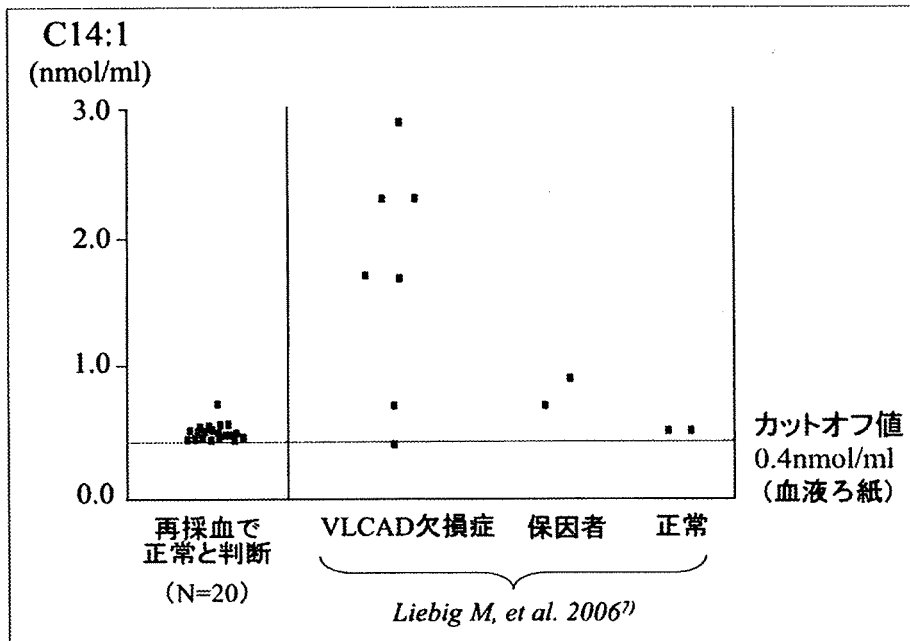


図2. VLCAD欠損症疑いの再採血でカットオフ値を下回った20症例の初回のC14:1測定値(島根大学小児科, 2005~2008年)

再採血では正常と判断された20症例の初回C14:1値は0.41~0.75nmol/ml(カットオフ, <0.4)であった。生後3日目の血液ろ紙でC14:1高値を示した11例の検討<sup>7)</sup>では、初回C14:1値0.4~1.0nmol/mlの中にはVLCAD欠損症の他、保因者や正常者が含まれていた。

ざるをえないためである<sup>4)</sup>。

タンデムマス・スクリーニングにおいて VLCAD 欠損症を含む長鎖脂肪酸代謝異常症が疑われた症例の再検査をする場合、血液ろ紙のみでなく血清の検査も行うことが望ましいと思われる。島根大学小児科でおこなった2005年から2008年のタンデムマス・スクリーニングの中で、初回検査のC14:1がカットオフ値を超えたが再検査でカットオフ値を下回った20例(図2)では、初回C14:1は0.41から0.75 nmol/mlであった。タンデムマス・スクリーニングでは、血液ろ紙のみの再検査を行っていた。C14:1の一過性軽度上昇は、正常でも感染や経口摂取不良などのストレス時にみられることがあるが<sup>7,8)</sup>、今回の2症例のような VLCAD 欠損症も否定できない。今後も全例に遺伝子解析を行うことは難しいが、血清検査を加えることで、見逃し例を減らすことができる可能性がある。

再採血に血清の検査を追加する場合には、初回採血と同様に産婦人科でも行うのかどうか課題である。血液ろ紙の場合とは異なり、血清の検体では採血後の遠心と冷凍での輸送が必要である。さらに、採血日齢を考慮したカットオフ値の設定についても検討する必要がある。

今回検討した2例は VLCAD 欠損症の中間型から筋型と考えられる症例であった。症例2のように血液ろ紙のC14:1がカットオフ値を下回った症例でも何らかのストレスを契機に発症する可能性は十分にある。発症予防、障害発生予防のためにも、長鎖脂肪酸代謝異常症のスクリーニングの再検査、あるいは経過追跡には、できるだけ血清アシルカルニチン分析を追加する必要がある。

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)、及び文部科学省科学研究費を受けて行なった。

## 文 献

- 1) 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

- 2) 深尾敏幸: アシル CoA 脱水素酵素欠損症. 小児内科41増刊号: 390-394, 2009
- 3) 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, 2297-2326, 2001
- 4) Charles P. Venditti, Charles A. Stanley: Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation. Nelson Textbook of Pediatrics, 17<sup>th</sup> ed, Richard EB, Robert MK, Hal BJ, Saunders, Philadelphia, 433-436, 2004
- 5) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也, 他: タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報 42: 28-53, 2006
- 6) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀 友博, 他: CPT2欠損症: 生後0日からの血液ろ紙, 血清のアシルカルニチンプロファイルの変化. 日本先天代謝異常学会 25: 146, 2009
- 7) Liebig M, Schymik I, Mueller M, et al: Neonatal Screening for Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Enzymatic and Molecular Evaluation of Neonates With Elevated C14:1-Carnitine Levels. Pediatrics 118, 1065-1069, 2006
- 8) Gempel K, Kiechi S, Hofmann S, et al: Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry. J Inherit. Metab Dis. 25, 17-27, 2002
- 9) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, et al: Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination. Journal of Chromatography B 792, 63-72, 2003

受付日: 平成21年10月30日

受理日: 平成21年11月20日



Two cases of VLCAD deficiency detected in neonatal mass screening, whose C14:1 values in blood spots became normal.

Yuichi Mushimoto<sup>1)</sup>, Hironori Kobayashi<sup>1)</sup>, Yuki Hasegawa<sup>1)</sup>, Osamu Sakamoto<sup>2)</sup>, Toshihiro Ohura<sup>3)</sup>,  
Seiji Yamaguchi<sup>1)</sup>

1) Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine

2) Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine

3) Department of Pediatrics, Sendai City Hospital

