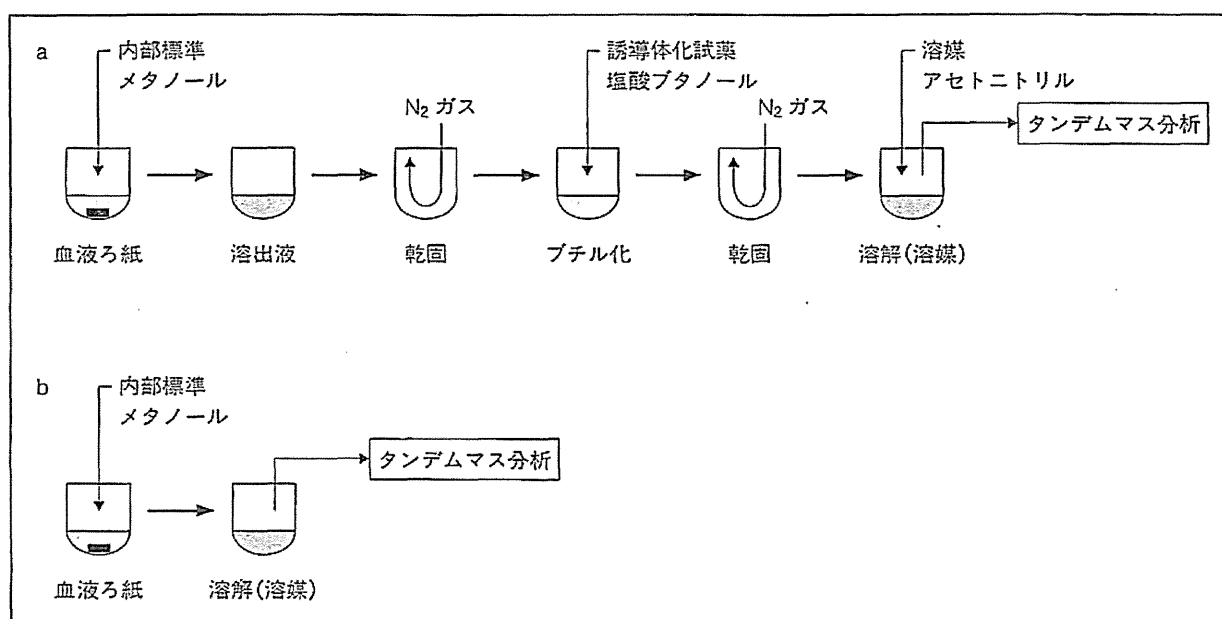


表3 タンデムマス分析における誘導体化と非誘導体化の比較

	誘導体化	非誘導体化
長所	1. イオン化効率がよく、感度のよい分析となる 2. 質量数が大きくなるため精度のよい分析となる	1. 抽出操作のみなので測定対象物質の分解が起こりにくい 2. 危険な試薬は使わないので特別な設備が要らない 3. 調製操作が単純であり大量検体処理に適している(人件費削減可能)
短所	1. 調製操作が複雑であり、前処理の時間と人手がかかる 2. 腐食性のある試薬を取り扱うためドラフトなどの設備が必要である 3. 誘導体化の過程で化合物の分解が起こることがある 4. 誘導体化反応が不十分なとき不適切な分析となることがある	1. より高性能の機器が必要である 2. 質量数が小さい物質では精度が不十分になることがある

(文献15)より作成



a
b

図2 検体前処理の流れ
a: 誘導体化法, b: 非誘導体化法.

7. スクリーニング後の確定診断

微量のサンプル(血液ろ紙検体)で検査した後、陽性者については確定診断する必要がある。スクリーニング段階で測定値がカットオフ値からかけ離れているときは、ただちに治療が必要となるが、それほどかけ離れてない場合は、再検査、精密検査によって確定診断する必要がある¹⁶⁾。

表4に示すように、アミノ酸に異常があり、アミノ酸代謝異常症(尿素回路異常を含む)が疑われるときには、アミノ酸自動分析計で精密に評価することによって診断できる。高フェニルアラニン血症の場合、悪性高フェニルアラニン血症と鑑別

するために血液プテリジン分析を行う。またテトラヒドロビオプテリン(BH₄)反応性高フェニルアラニン血症の病型を鑑別するためにBH₄負荷試験を行うことがある。

アシルカルニチンの異常から有機酸代謝異常症が疑われる場合は、GC/MS(gas chromatography/mass spectrometer)による尿中有機酸分析(note参照)によってほとんどの症例が生化学診断される¹⁷⁾。さらに血中カルニチンを測定して遊離カルニチン欠乏の程度を評価する。

脂肪酸代謝異常症が疑われるときには、血液ろ紙のみならず血清でアシルカルニチン分析をす

表4 確定診断のために必要な検査

検査項目 の異常	疑われる 疾患	確定診断の方法			
		アミノ酸分析	有機酸分析 (GC/MS)	遺伝学的 検査	その他
アミノ酸	アミノ酸 代謝異常症	◎	○	△	BH ₄ 負荷試験 プテリジン分析
アシルカ ルニチン	有機酸 代謝異常症	△	◎	○	タンデムマス精査*
	脂肪酸 代謝異常症	△	○	○~◎	タンデムマス精査*

◎：確定診断に必須である，○：確定診断の参考になる，△：時々必要なことがあるが原則として不要，*：誘導体化による精査，血液ろ紙のみならず血清，尿の分析，あるいは遊離カルニチン測定などを含む。

脂肪酸代謝異常症は，タンデムマス結果が典型的で臨床検査所見もそれを支持する所見があれば確定診断可能。遺伝学的検査とは，酵素，遺伝子検査をさす。

る。全身性カルニチン欠乏症の場合は，尿中カルニチン分析も行ってカルニチンクリアランスを測定することによって診断される。脂肪酸代謝異常症のうち，一部は尿中有機酸分析で異常がみられるので診断がより確かなものになる。長鎖脂肪酸代謝異常では非ケトン性ジカルボン酸尿がみられる。短鎖脂肪酸代謝異常ではエチルマロン酸，メチルコハク酸の増加がみられる。中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase ; MCAD) 欠損症では，ヘキサノイルグリシン，スベリルグリシンが検出される。またグルタル酸血症 2 型では，特徴的な有機酸プロフィールがみられるのでこの段階で生化学的に確定診断される。

しかし，GC/MS，タンデムマス検査で確定診断に至らないときは，末梢リンパ球や皮膚線維芽細胞を用いて酵素活性で直接確定診断する場合もある¹⁸⁾。また培養細胞とタンデムマス法を用いる

in vitro probe acylcarnitine assay (note 参照) によって酵素活性を評価する方法もある^{19,20)}。さらに，血液や培養細胞で遺伝子検査によって確定することも少なくない。

いずれにせよ病気であるかないかは一生の問題であるので確定診断は不可欠である。確定診断のためには特殊な検査が必要になるので，全国数か所の専門施設に相談できるネットワークが構築されつつある^{21,22)}。

8. タンデムマス法導入のいくつかの課題

タンデムマス法が導入されると，マススクリーニングの質的向上が期待できる。さらにその対象疾患には乳幼児突然死 (sudden infant death syndrome ; SIDS) や原因不明の急性脳症のような発症形態をとる疾患が少なくない。タンデムマス法は小児の障害予防に貢献するのみならず，小児の難病の病態解明にも貢献する可能性がある。一方，いくつかの課題もある^{23,24)}。

尿中有機酸分析

有機酸は弱酸性であり体内に増加した有機酸は体液の恒常性を維持するために，直ちに尿中に排出される。有機酸とその代謝産物は血中よりもはるかに尿中に多いので，尿中有機酸を溶媒抽出，誘導体化などの処理をして GC/MS (gas chromatography/mass spectrometer) で測定する。代謝プロフィールから有機酸代謝異常症の生化学診断が可能である¹⁷⁾。

in vitro probe acylcarnitine assay

培養細胞とタンデムマス法を組み合わせた脂肪酸代謝異常の酵素診断法である。培養液はブドウ糖フリー，脂肪酸フリーでカルニチンが過剰量含まれている。この培養液にパルミチン酸 (あるいはオクタン酸など) を負荷後 72~96 時間培養して，培養液中のアシルカルニチンを測定する。β酸化に異常があるとその障害部位に対応したアシルカルニチンが増加することで障害部位を特定する¹⁹⁾。

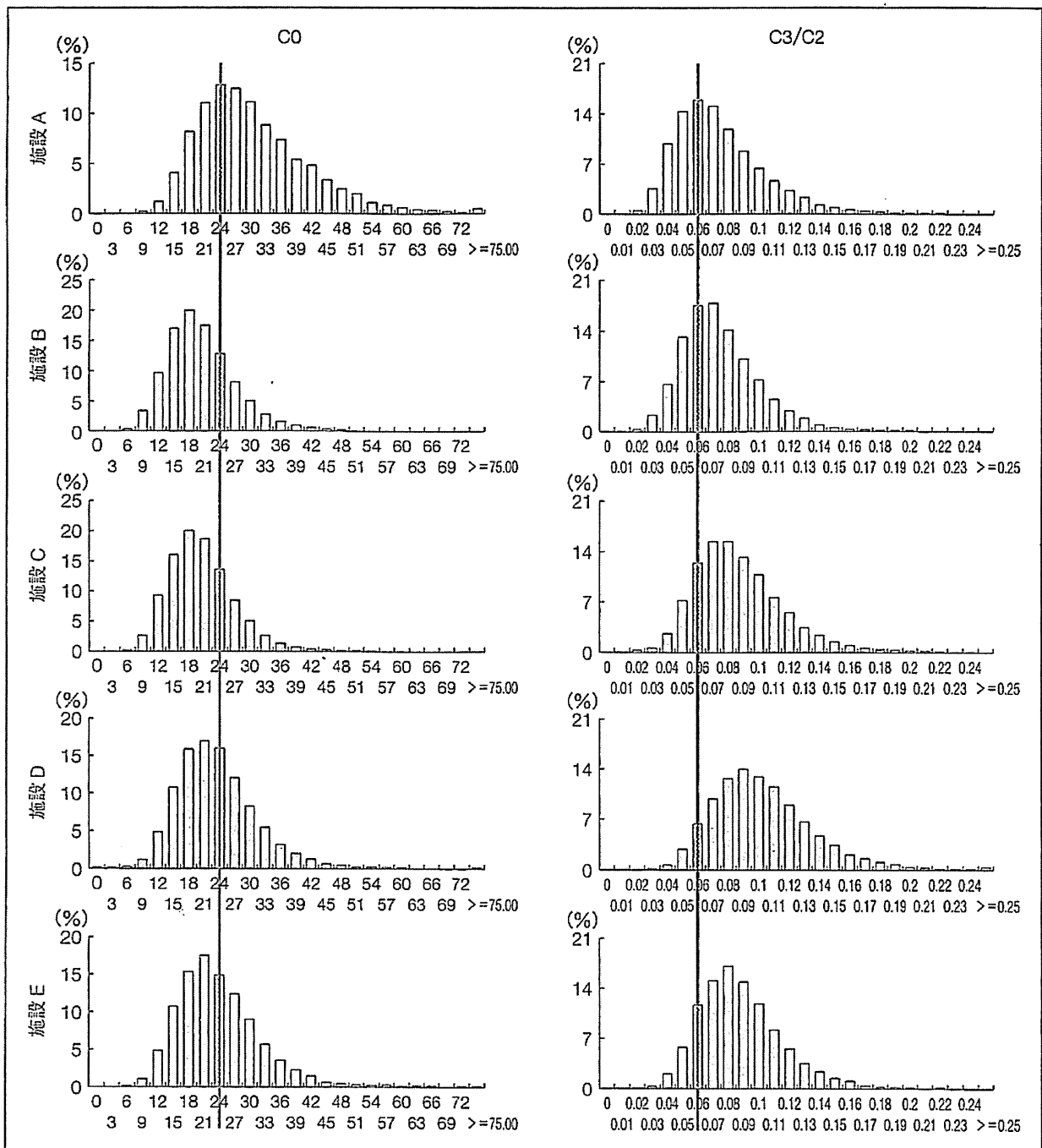


図3 施設間の測定値の差

C0：遊離カルニチン，C3：プロピオニルカルニチン，C2：アセチルカルニチン。

同じ検体を測定したにもかかわらずヒストグラムのピークが施設間でずれていることがわかる。

(山口清次：タンデムマス Q&A 2012—厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業) 冊子，2012 より転載)

対象疾患が稀少疾患であり小児科医にとってもなじみがなく、いったん陽性者を目の前にすると戸惑うことも予想される。全国のネットワークを充実させること、疾患の診断と治療に関連した刊行物などで継続的な啓発が必要である。

精度管理も問題となる。新規に検査を始める施設では測定値が安定するまで一定期間が必要になり、また施設ごとに“偽陽性”率が高くなった

り、“見逃し例”が出る可能性もある。全国統一の固定したカットオフ値はまだできていないので、現段階では各施設で継続的に内部精度管理や外部精度管理を受けながら、季節ごとにカットオフ値を見直す必要がある。図3に施設ごとの測定値の違いを調査した結果の一部を示している^{21,22)}。

9. おわりに

微量検体で多数検体のスクリーニングが可能になり、また小児の急性脳症や、筋肉症状などを起こす先天代謝異常を簡単に診断できるタンデムマス法について述べた。タンデムマス法は新生児マススクリーニングへの導入のみならず、小児の原因不明の難病解明にも貢献するものと思われる。

本論文は厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)を受けて行った研究成果の一部である。

文 献

- 1) 成瀬浩, 山口清次: 新生児スクリーニングの30年. 臨床精神医学 33: 1453-1460, 2004
- 2) 山口清次: 新生児マススクリーニング Update—現在, 未来. 小児内科 41(増刊): 16-21, 2009
- 3) 重松陽介, 布瀬光子, 畑郁江, 他: Electrospray Tandem Mass Spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 8: 13-20, 1998
- 4) McCabe LL, McCabe ER: Expanded newborn screening: implications for genomic medicine. Annu Rev Med 59: 163-175, 2008
- 5) 特殊ミルク共同安全開発委員会編: タンデムマス導入にともなう新しいスクリーニング対象疾患の治療指針, 恩賜財団母子愛育会, 2007
- 6) Dhondt JL: Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. J Inher Metab Dis 30: 418-422, 2007
- 7) Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, et al: Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics 111: 1399-1406, 2003
- 8) 山口清次: 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—3年間のまとめ—平成16~18年度総合研究報告書—厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業, 2007
- 9) 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—平成19~21年度総合研究報告書—厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業, 2010
- 10) 山口清次: 有機酸・脂脂肪酸代謝異常研究の進歩. 日本先天代謝異常学会雑誌 21: 26-36, 2005
- 11) Rashed MS, Bucknall MP, Little D, et al: Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. Clin Chem 43: 1129-1141, 1997
- 12) De Jesús VR, Chace DH, Lim TH, et al: Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 411: 684-689, 2010
- 13) 重松陽介, 畑郁江: タンデム質量分析新生児マススクリーニングのピットフォール. 日本マス・スクリーニング学会誌 15: 13-18, 2005
- 14) 重松陽介, 畑郁江: 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. 日本マス・スクリーニング学会誌 19: 11-17, 2009
- 15) 重松陽介, 畑郁江, 福岡一考: タンデムマス・スクリーニングにおける非誘導体化分析. 日本マス・スクリーニング学会誌 21: 213-218, 2011
- 16) 北川照男, 松田一郎, 大和田操, 他: タンデムマス・スクリーニングで異常が発見された時の対応. 特殊ミルク情報 47: 40-48, 2011
- 17) 山口清次編: 有機酸代謝異常ガイドブック—GC/MSデータの読みかた・活かしかた, 診断と治療社, 2011
- 18) Tajima G, Sakura N, Yofune H, et al: Enzymatic diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-octenoyl-CoA production using high-performance liquid chromatography: a practical confirmatory test for tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 823: 122-130, 2005
- 19) Okun JG, Kölker S, Schulze A, 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
- 20) Sim KG, Carpenter K, Hammond J, et al: Quantitative fibroblast acylcarnitine profiles in mitochondrial fatty acid β -oxidation defects: phenotype/metabolite correlations. Mol. Genet. Metab 76: 327-334, 2002
- 21) 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(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)平成23年度報告書, 2012
- 22) 山口清次: タンデムマス Q&A 2012—厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)冊子, 2012
- 23) 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
- 24) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. 日本先天代謝異常学会雑誌 27: 36-41, 2011

新生児マススクリーニングの新たな展開 タンデムマス法の導入

山口清次

はじめに

新生児マススクリーニング(以下、新生児 MS)は、知らずに放置すると障害の起こる先天性疾患を発症前に見つけて、障害を予防(または軽減)する事業である。

1950 年代にフェニルケトン尿症の治療ミルクが開発され、1960 年代にガスリーテストが発明されて以来、新生児 MS によって障害を予防するという考え方が急速に広まった^{1,2)}。

最近、タンデムマス法という新しい検査法を導入して対象疾患を拡大する動き(拡大スクリーニング)が、世界的に普及しつつある^{3,4)}。わが国でも 2011 年に「タンデムマス法の導入の推進」について厚生労働省課長通達が出され、現在全国自治体に広がりつつある。そこで、わが国のタンデムマス法導入による新生児 MS の新しい展開と今後の課題について述べたい。

わが国のこれまでの新生児 MS

わが国では 1977 年から新生児 MS が全国的に開始され、2010 年までに 4,300 万人以上が新生児 MS を受け、この間 1 万人以上の小児が障害から救われたと言われている。これまで 6 疾患を対象に新生児 MS が行われてきた。その結果を表 1 に示しているが、日本人における各対象疾患の頻度、予後、費用便益も明らかになってきた。

表 1 これまでのマススクリーニングの対象疾患と発見頻度(文献⁵⁾より)

疾患	頻度	検査法	費用便益
1) フェニルケトン尿症	1:7 万	ガスリー法、	○
2) メープルシロップ尿症	1:50 万	HPLC 法、	△
3) ホモシスチン尿症	1:80 万	酵素法など	△
4) ガラクトース血症(全体)	1:3 万*	ハイゲン法、	△
(1 型)	(1:80 万)	ポイトラー法、	
(2 型)	(1:60 万)	酵素法など	
5) 先天性甲状腺機能低下症	1:3,000	ELISA 法など	◎
6) 先天性副腎過形成	1:2 万		○

*ガラクトース高値症例の大部分は酵素欠損による真の先天性ガラクトース血症でなく、門脈奇形やシトリン欠損症等の 2 次性のものである。

費用便益：◎=極めて良好，○=良好，△=あまり良くない

タンデムマス法とは

タンデムマス(タンデム型質量分析装置)は、質量分析計を直列に 2 台並べた構造の分析機器である。これまで使用してきた血液ろ紙を検体として^{5,6)}、安価なランニングコストで、きわめて高感度に、短時間の分析で(約 2 分)、代謝産物を一斉分析し、1 回の分析で多くの疾患をスクリーニングできるため、ガスリーテストにとってかわりつつある。

対象疾患は図に示すように、現行のアミノ酸血症 3 疾患を含むアミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、および脂肪酸代謝異常症など 20 種類以

やまぐち せいじ：島根大学医学部小児科教授 連絡先：☎ 693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

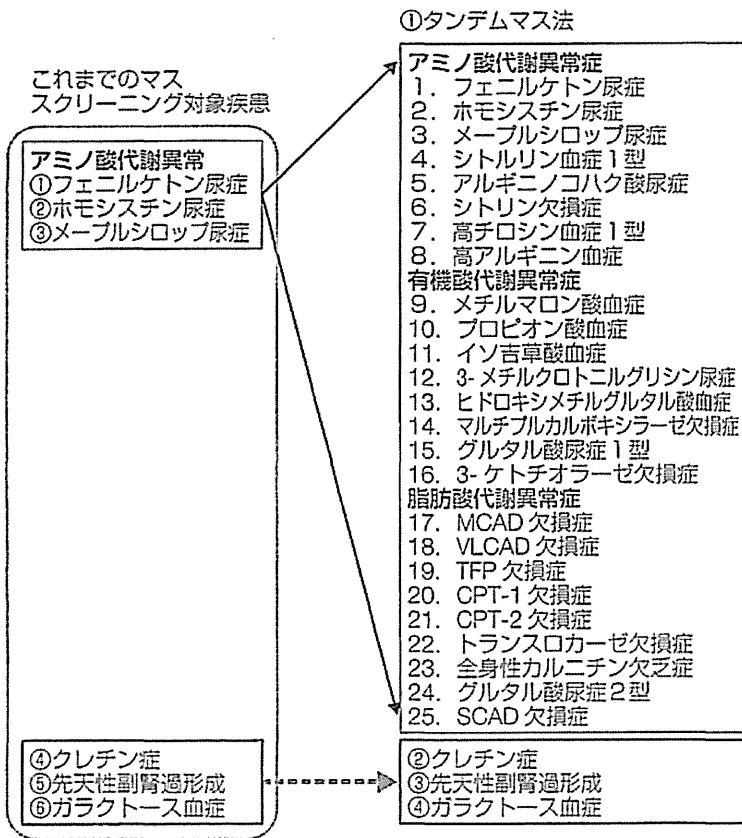


図 タンデムマス導入による拡大スクリーニング

上に広がる。

マススクリーニング対象疾患の設定

タンデムマス法を導入すると、1回の検査で多数の疾患が検査できるが、単に多くの疾患を見つければよいものではない。結果として小児の障害予防、福祉向上に役立つものでなければならない。

公的に行われる健診事業の対象疾患の要件として、表2に示すような Wilson & Jungner (1968) がある⁷⁾。厚労省研究班では、以上の基準に照らして、16疾患を「1次対象疾患」として提言している(表3)。現時点では引き続き検討の必要なものを「2次対象疾患」としている。

タンデムマス法による疾患発見頻度

表3に、タンデムマス法で発見できる疾患と、これまでのパイロットスタディ(157万人対象)の結果を示している。発見頻度は、全体では約9千

表2 Wilson-Jungner の古典的基準とマススクリーニング対象疾患への適用 (WHO, 1968)

1. 放置すると重大な健康被害をもたらしうる
2. 自然歴の明らかな病気である
3. 効果的な治療法がある
4. 発症前に診断できる
5. 受け入れられる適切な検査法がある
6. 受け入れられる社会的合意が得られている
7. 診断・治療の施設が利用可能である
8. 患者、陽性者のフォローアップ体制ができています
9. 費用対効果バランスが適切である
10. 事業の意味、内容に関して受検者の同意が得られている

人に1人であり、1次対象疾患16疾患に限ると1.1万人に1人である。

これまでの対象疾患6疾患では、年間約400~500人の患者が発見されるが、タンデムマス法導入後には、これに約100名余り患者数が新たに発見されるようになると予想されている⁸⁾。

タンデムマス法の費用対効果

費用対効果は、表4に示すように、タンデムマス法導入は最低1.73倍から6.44倍の便益があると計算されている⁹⁾。比較のために、同じ経済学者の計算した予防接種の便益比を挙げている。水痘ワクチン4.0倍以上、ムンプスワクチン5.2倍、ヒブワクチン0.25~2.08倍、肺炎双球菌ワクチン1.08倍、HPVワクチン1.94~4.90倍と計算されている。この費用対効果計算には、患者数と事業にかかる費用が関係している。

検討されている新しい対象疾患

新しい対象疾患として検討中の疾患を以下に示す。

1. ウィルソン病

4~5万人に1人の頻度の疾患で、以前パイロット研究されたが、新生児期には見逃す可能性が高く、幼児期の方が効果的であると言われてい

表3 タンデムマス法による1次対象疾患と2次対象疾患(1997~2011年のパイロット研究より⁹⁾)

	疾患	発見頻度 [*]
1次対象疾患	アミノ酸代謝異常	
	1) フェニルケトン尿症**	1:6万
	2) メープルシロップ尿症**	1:156万
	3) ホモシスチン尿症**	1:78万
	尿素回路異常症	
	4) シトルリン血症(1型)	1:26万
	5) アルギニノコハク酸血症	1:40万
	有機酸代謝異常症	
	6) メチルマロン酸血症	1:12万
	7) プロピオン酸血症	1:5万
	8) イソ吉草酸血症	1:52万
	9) メチルクロトニルグリシン尿症	1:16万
	10) ヒドロキシメチルグルタル酸血症	—
	11) 複合カルボキシラーゼ欠損症	1:52万
	12) グルタル酸血症1型	1:18万
	β酸化異常症	
13) MCAD欠損症	1:10万	
14) VLCAD欠損症	1:16万	
15) 三頭酵素欠損症	—	
16) CPT1欠損症	1:31万	
2次対象疾患	19) シトリン欠損症	1:8万
	20) 3-ケトチオラーゼ欠損症	—
	21) CPT2欠損症	1:26万
	22) TRANS欠損症	—
	23) 全身性カルニチン欠乏症	1:26万
	24) グルタル酸血症2型	1:31万

1次対象疾患とは、見逃しがきわめて少ない、発見されたとき治療効果が優れていると判断されている疾患(しかし新生児期に急性経過をとる超重症型も含まれる)、2次対象疾患とは、現時点では見逃しが相当数あると思われる、また発見された後の診断治療が必ずしも容易でないため、引き続き検討の必要と判断された疾患である。

*発見頻度=1997~2011年までのパイロットスタディ計156万人検査の結果である(1997年より福井大学で開始、2004年より厚労省研究班で開始)。

**=現行マススクリーニングの対象疾患(アミノ酸代謝異常症3疾患)。

略字(疾患名):MCAD=中鎖アシル-CoA脱水素酵素; VLCAD=極長鎖アシル-CoA脱水素酵素; CPT=カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ; SCHAD=短鎖3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素。

1)~16)は1次対象疾患、19)~24)は2次対象疾患。

る¹⁰⁾。

2. 重症複合型免疫不全症(SCID)

本症では易感染性があり、また生ワクチンなどで重大な予防接種禍を起こすことがある。患者頻度は4~5万人に1人と言われ、TREC_sという因子を血液ろ紙を使ってPCR法で測定する¹¹⁾。

表4 タンデムマス・スクリーニングと予防接種の費用対効果

	増分便益費用比 (BCR)	増分純便益 (NET)
タンデムマス	1.73~6.44	71~143億円
水痘ワクチン	4.0以上	522億円
ムンプスワクチン	5.2	379億円
ヒブワクチン	0.25~2.08	-322~477億円
肺炎双球菌7価ワクチン	1.08	51億円
HPVワクチン(子宮頸癌)	1.94~4.90	305~1,263億円

※タンデムマスの場合、設定する検査費用によって差がある。1検体あたり2,000円(6.44倍の便益)~8,000円(1.73倍の便益)である。大日らより引用²⁰⁾。

欧米では採用する国が増えつつある。

3. リソソーム病

ムコ多糖症やファブリー病などを対象に、血液ろ紙を使って酵素活性を見る方法である。酵素補充療法をより早期に開始することによって、QOL(quality of life)を高めることが期待されている。高額な治療費、治療効果の限界、発症時期の問題などが課題である¹²⁾。

4. 胆道閉鎖症の便カラーカード

1か月健診の時に便の色を見る方法であり、簡単で安価である。平成24(2012)年度から母子手帳に便カラーカードが採用されている。胆道閉鎖症の外科手術の予後がまだ確実でない点が課題である。

5. サイトメガロウィルス感染症

PCR法で検討されている。難聴の原因となる。発見後の治療効果が課題である¹³⁾。

新生児MSの今後の課題

新生児MS事業が開始されて35年が経過する。事業開始当初に発見された患者はすでに成人している。タンデムマス法の導入を機に、いくつかの課題が提起されている¹⁴⁾。主な項目を表5に示している。

1. 精度管理の充実

新生児MSは、新生児にとって生涯に1回きりの検査であり、基本的に見逃しは絶対に許されな

表5 新生児マススクリーニングの諸問題

- | | |
|------------------|-------------------------------|
| (1) 精度管理の充実 | 見逃し例, 偽陽性例の対策 |
| (2) 全国的診療支援体制の整備 | 稀少疾患の確定診断, 治療コンサルタント等のコーディネート |
| (3) 患者の長期追跡体制 | 患者登録とフォローアップ体制 |
| (4) 遺伝カウンセリング体制 | 重症型の存在, 長期予後に対する説明, 患者家族のサポート |
| (5) 患者のQOL向上 | 親の会との情報交換 |
| (6) 患者の成人後の支援 | 成人後の医療費支援, 特殊ミルク等の安定供給 |
| (7) 検査機関の効率的配置 | タンデムマス適正配置による事業の効率化 |
| (8) 中央コントロール組織 | 地域格差をなくすための中央組織の必要性 |

い。一方カットオフ値を下げて偽陽性が増えると、出産直後の家族にとっての精神的ストレスは小さくない。倫理的問題がある。

そして測定値は、同じ機種でも施設間で異なり、また時期によって微妙に異なることが少なくない。内部、外部の精度管理を継続的に続ける必要がある。そして第三者機関でチェックを受ける体制が必要である。

2. 全国的診療支援体制の整備

新生児MSで発見される疾患は、稀少疾患である。小児科専門医と言えども、スクリーニング陽性者を前にすると戸惑うかもしれない。しかし日本のどこで発見されても、適切な対応が取れる体制を作るためには、各自治体で、中核医師、中核医療機関を指定し、その医師が窓口となって、稀少疾患の専門機関のネットワークを利用する体制が現実的である。この他、ガイドライン、診療マニュアルなども充実する必要がある。

3. 患者の長期追跡体制

平成13(2001)年度より、新生児MS事業が自治体事業となって以後、個人情報扱いの制約のために、新生児MSで発見された患者の長期予後が把握しにくい状況となっている。新生児MS事業の評価、また稀少疾患に対する診療技術向上の

ためにも、長期的な患者追跡体制は不可欠である。

4. 遺伝カウンセリング体制

タンデムマス対象疾患の中には、新生児期に発症したために新生児MS結果が間に合わないケースもある。反対に、無症状で治療の必要性がないような症例も見つかることもある。また新生児MSによって、無症候性の保因者や、母親の病気が偶然見つかることもある。

家族の受けとめ方をよく理解しながら、正確な知識を伝え、必要以上のストレスから解放し、また適切な生活上の助言をして重篤な発作の予防に努める必要がある。

5. 患者のQOL向上

新生児MSの対象疾患は、稀少疾患のために、患者家族は相談できる人が少なく、孤独に陥りやすい。患者家族会と、行政、医療スタッフや研究者との交流の場を作ることによって、いろいろな情報を得ることは、患者家族のQOL向上の面からも効果的であると思われる。患者家族の生の声は、研究の方向性に反映させることもできる。

6. 患者の成人後の支援

新生児MS対象疾患は、原則として小児慢性特定疾患事業の対象となっており、患者家族の医療費自己負担分は補助される。しかし現在の制度では、20歳を過ぎると自己負担が発生し、場合によっては月々数万円の負担となる。このために成人後に治療をやめ、徐々に症状が出るケースが問題になりつつある。これでは新生児MSの効果を台無しにする可能性がある。

また食事療法に必要な特殊ミルクも、現時点では原則20歳までが対象である。特殊ミルクは通常のミルクに比べて高価であるが(数倍から10倍のコストがかかる)、これまでは、乳業メーカーのボランティアに頼る面が大きかった。特殊ミルクの安定的供給体制を考える時期に来ている。

7. 検査機関の効率的配置

タンデムマス機器の価格は現時点では約3千万円で、初期投資額は大きい。またその後の保守点検費用として年間約200万円が必要である。タン

デュムマス 1 台で年間 5 万検体以上を分析する能力がある。したがって 1 台の機器ですでに多数の検体を分析する方が効率的であり、精度管理の面からも有利である。

研究班は、タンデムマス導入にあたって、近隣の自治体と調整して、1 台のタンデムマスで少なくとも年間 3 万以上の検体を分析することを提言している。

8. 中央コントロール組織

地方分権の流れの中で、わが国の新生児 MS は、平成 13(2001)年度より国から自治体事業に移行した。以後、新生児 MS 事業は自治体の裁量に任されている。その結果、新生児 MS にかかる予算、事業評価、質の維持、患者の追跡方法などは、自治体によって温度差が生まれている。何らかの中央組織を置いて、自治体と連携を取りながら、技術者研修、精度管理、患者登録、長期追跡、経費節減、社会啓発活動などを継続的に行うことが望ましい。

おわりに

あらゆる病気は基本的に「治療よりも予防」が大切である。特にこれから長い人生を歩む小児では、重要なテーマである。新生児 MS はその代表的な事業の 1 つであろう。しかし対象疾患に満たすべき要件があるように、ただ隠れている病気を見つけて家族に伝えれば済む問題ではない。事業推進には倫理的、社会的、法的判断の求められる面がある¹⁵⁾。これらを念頭に置いて、新生児 MS 拡大による小児の福祉向上を進める必要がある。

本研究は厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)を受けて行ったものである。

文 献

- 1) 成瀬浩, 山口清次: 新生児スクリーニングの 30 年, 臨床精神医学 33: 1453-1460, 2004
- 2) Dhondt JL: Neonatal screening; from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. J Inherit Metab Dis 30: 418-422, 2007
- 3) McCabe LL, McCabe ER: Expanded newborn screening; implications for genomic medicine. Annual Review of Medicine 59: 163-175, 2008
- 4) 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 65: 725-732, 2006
- 5) 重松陽介, 他: Electrospray tandem mass spectrometry による有機酸およびアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 18: 13-20, 1998
- 6) Shigematsu Y, et al.: Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan. J Chromat B 776: 39-48, 2002
- 7) Wilson JMG, Jungner G: Principles and practice of screening for disease. p 163, World Health Organization, Geneva, 1968
- 8) 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(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)平成 23 年度報告書, 2012
- 9) 大日康史, 菅原民枝: MS/MS マスクリーニングの費用対効果の予防接種との比較および国際比較. 厚生労働科学研究費補助金(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)「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 22 年度報告書, pp 123-125, 2011
- 10) 青木継稔, 他: 将来マス・スクリーニングに取りあげられる可能性の高い疾患について. 小児科診療 63: 1385-1390, 2000
- 11) 中川紀子, 他: TREC_s 定量を用いた重症複合型免疫不全症に対する新生児マススクリーニング法の開発. 日本マス・スクリーニング学会誌 19: 249-253, 2009
- 12) 田中あけみ: ムコ多糖症のマス・スクリーニング. 日本マス・スクリーニング学会誌 18: 224-228, 2008
- 13) 古谷野伸, 他: 先天性サイトメガロウイルス感染マススクリーニングについて. 日本マス・スクリーニング学会誌 21: 9-14, 2011
- 14) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. 日本先天代謝異常学会雑誌 27(1): 36-41, 2011
- 15) 松田一郎: 新生児スクリーニングに関する倫理的, 法的, 社会的問題の歴史的背景. 日本マス・スクリーニング学会誌 19: 189-215, 2009

Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1

Jamiyan Purevsuren · Hironori Kobayashi ·
Yuki Hasegawa · Kenji Yamada · Tomoo Takahashi ·
Masaki Takayanagi · Toshiyuki Fukao · Seiji Fukuda ·
Seiji Yamaguchi

Received: 24 July 2012 / Revised: 10 October 2012 / Accepted: 30 October 2012 / Published online: 10 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Mitochondrial fatty acid oxidation (FAO) disorders are caused by defects in one of the FAO enzymes that regulates cellular uptake of fatty acids and free carnitine. An in vitro probe acylcarnitine (IVP) assay using cultured cells and tandem mass spectrometry is a tool to diagnose enzyme defects linked to most FAO disorders. Extracellular acylcarnitine (AC) profiling detects carnitine palmitoyltransferase-2, carnitine acylcarnitine translocase, and other FAO deficiencies. However, the diagnosis of primary carnitine deficiency (PCD) or carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) deficiency using the conventional IVP assay has been hampered by the

presence of a large amount of free carnitine (C0), a key molecule deregulated by these deficiencies. In the present study, we developed a novel IVP assay for the diagnosis of PCD and CPT1 deficiency by analyzing intracellular ACs. When exogenous C0 was reduced, intracellular C0 and total AC in these deficiencies showed specific profiles clearly distinguishable from other FAO disorders and control cells. Also, the ratio of intracellular to extracellular C0 levels showed a significant difference in cells with these deficiencies compared with control. Hence, intracellular AC profiling using the IVP assay under reduced C0 conditions is a useful method for diagnosing PCD or CPT1 deficiency.

J. Purevsuren · H. Kobayashi · Y. Hasegawa · K. Yamada ·
T. Takahashi · S. Fukuda · S. Yamaguchi (✉)
Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine,
89-1 Enya,
Izumo, Shimane 693-8501, Japan
e-mail: sejiyam@med.shimane-u.ac.jp

M. Takayanagi
Division of Metabolism, Chiba Children's Hospital,
Chiba 266-0007, Japan

T. Fukao
Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,
Gifu University,
Gifu, Gifu 501-1194, Japan

T. Fukao
Medical Information Sciences Division, United Graduate School
of Drug Discovery and Medical Information Sciences,
Gifu University,
Gifu, Gifu 501-1194, Japan

J. Purevsuren
Medical Genetics Laboratory,
National Center for Maternal and Child Health,
Khuvisgalchdyn street, Bayangol district,
Ulaanbaatar 210624, Mongolia

Keywords Fatty acid oxidation · Carnitine cycle disorder ·
Acylcarnitine profile · ESI-MS/MS

Introduction

L-Carnitine plays an essential role in the transfer and activation of long-chain fatty acids across the outer and inner mitochondrial membranes during which it is acted upon by enzymes including carnitine transporter (OCTN2), carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1), carnitine palmitoyltransferase-2 (CPT2), and carnitine acylcarnitine translocase (CACT) (Fig. 1) [1, 2]. Carnitine penetrates into cells across the plasma membrane against a high concentration gradient of free carnitine with the aid of the plasma membrane OCTN2 protein encoded by the SLC22A5 gene [3]. Deficiency of OCTN2 causes primary carnitine deficiency (PCD, OMIM 212140), which is characterized by systemic carnitine deficiency in tissues and blood but in concord with increased excretion of free L-carnitine in the urine [4–6]. Clinical symptoms in patients with PCD such as cardiomyopathy,

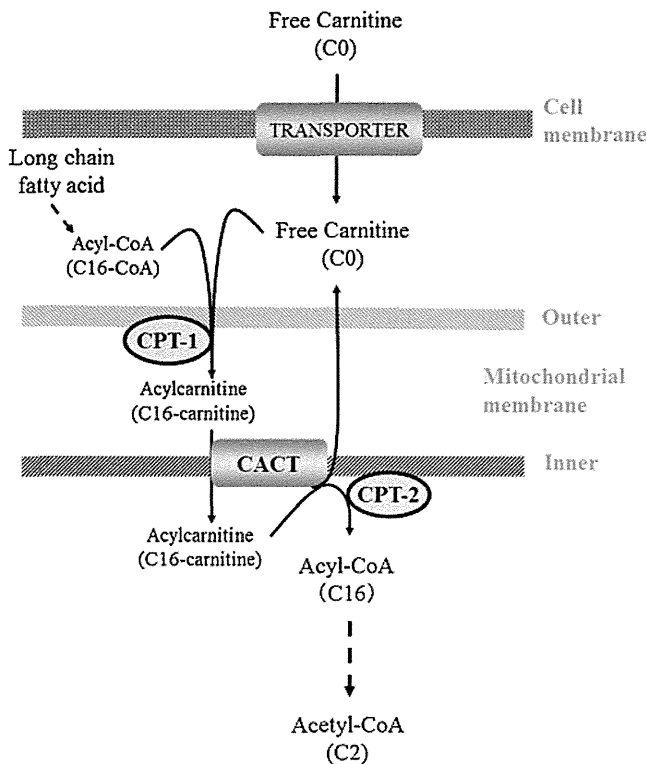


Fig. 1 Pathway for mitochondrial fatty acid beta-oxidation. Transporter: carnitine uptake transporter; *CPT-1*: carnitine palmitoyltransferase-1, *CACT*: carnitine acylcarnitine translocase, *CPT-2*: carnitine palmitoyltransferase-2. Solid arrows indicate single reactions; dashed arrows indicate multiple reactions or steps

encephalopathy, hepatomegaly, myopathy, hypoglycemia, and hyperammonemia, mainly result from low carnitine concentration in the tissues. On the other hand, secondary carnitine deficiency occurs in some conditions such as organic acidemias, renal dialysis, long-term medication (antiepileptic drugs or some antibiotics), and alimentary deficiency of L-carnitine [7–9].

It is necessary to make a differential diagnosis of PCD from the secondary carnitine deficiency or other false-positive cases, and diagnosis is confirmed by demonstrating reduced transport in skin fibroblasts from the patients. Until now, cluster-tray method using radioisotope-labeled substrate was used for the diagnosis of PCD [4, 10–12]. However, such a diagnostic method requires handling of radioactive substrates and focused only on diagnosis of PCD. Gene sequencing in *SLC22A5* is one diagnostic method for PCD. However, it is molecularly heterogeneous, and around 50 different mutations have been identified [6]. After acylcarnitine analysis using tandem MS analysis became available in the worldwide, blood acylcarnitine analysis was used as an initial method for diagnosis of FAO disorders and a detection of FAO disorders has been increased. However, it is necessary to confirm the diagnosis of the diseases with detailed analysis. The *in vitro* probe acylcarnitine (IVP) assay using cultured fibroblasts and tandem mass spectrometry (MS/MS)

has been used to evaluate FAO capacity in the cultured cells and make a diagnosis of FAO disorders [13–15]. However, conventional IVP assay is not feasible to diagnose PCD or *CPT1* deficiency, because excess amount of free carnitine is added to the experimental medium at the beginning. Estimation of free carnitine, which is the key marker for the above diseases, in experimental medium was nonsense for diagnosis of these disorders. We developed a novel functional assay for PCD and *CPT1* deficiency using the IVP assay, with some modifications. This method uses different concentrations of exogenous free carnitine and measures intracellular as well as extracellular acylcarnitine (AC) levels, which overcomes the disadvantage of the conventional IVP assay in the diagnosis of carnitine cycle disorders.

Materials and methods

Materials

Hexanoylcarnitine (C6), octanoylcarnitine (C8), decanoylcarnitine (C10), and palmitoylcarnitine (C16) were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Methanol, acetonitrile, and formic acid were purchased from Wako (Osaka, Japan). As an internal standard, a labeled carnitine standard kit (NSK-B), which contains $^2\text{[H]}_9$ -carnitine, $^2\text{[H]}_3$ -acetylcarnitine, $^2\text{[H]}_3$ -propionylcarnitine, $^2\text{[H]}_3$ -butyrylcarnitine, $^2\text{[H]}_9$ -isovalerylcarnitine, $^2\text{[H]}_3$ -octanoylcarnitine, $^2\text{[H]}_9$ -myristoylcarnitine, and $^2\text{[H]}_3$ -palmitoylcarnitine, was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Preparation of standard solutions of ACs

Standard solutions containing 1, 10, 25, and 50 $\mu\text{mol/L}$ each of C6, C8, C10, and C16 were used to validate the recovery and determine linear concentration range of ACs after extraction by the Folch method [16]. The ACs were dissolved in methanol (99.8 %), and the prepared standard solution was analyzed directly and after extraction by the Folch method.

Subjects

Human skin fibroblasts from six healthy controls (volunteers) and seven patients with various carnitine cycle disorders—three each with PCD and *CPT2* deficiency and one with *CPT1* deficiency—were analyzed. In all cases, diagnoses were confirmed by mass spectrometric analyses (gas chromatography-mass spectrometry and MS/MS), enzyme assay, and protein or mutational analyses. Informed consent was obtained from the patients or their families. This study was approved by the Ethical Committee of the Shimane University School of Medicine.

In vitro probe acylcarnitine (IVP) assay using MS/MS

An IVP assay was performed, as described, with some modifications [13, 15, 17], and principle of IVP assay was shown Fig. 2. Briefly, 3×10^6 cells were seeded in triplicate onto a six-well microplate (35 mm i.d.; Iwaki) and cultured until confluent. After washing twice with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the cells were subsequently cultured for 96 h in 1 ml of a special experimental minimal essential medium (MEM) containing bovine serum albumin (0.4 % essential fatty acid-free BSA; Sigma), two different concentrations of C0 (Sigma)—10 $\mu\text{mol/L}$ (reduced level, lower compared with physiological level) and 400 $\mu\text{mol/L}$ (excess level)—and unlabelled palmitic acid (0.2 mmol/L; Nacalai Tesque). C0 and AC levels in the culture medium (extracellular fraction) and in the intracellular extract were analyzed after a 96-h incubation period using MS/MS (API 3000; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as described [18].

Intracellular acylcarnitine extraction

Intracellular C0 and ACs were extracted using the Folch method, with some modification [16]. Briefly, harvested cells were washed twice with DPBS buffer. The cell pellet was resuspended in 100 μl volume of DPBS buffer and immediately frozen in liquid N_2 . In order to separate phospholipids and cell debris, 250 μl of Folch reagent (chloroform/methanol, 2:1) was added to the resuspended cell pellet. After vigorous mixing using a vortex mixer, the solution was centrifuged for 10 min at 15,000 rpm at 4 $^\circ\text{C}$. The debris layer around the interface between the aqueous and lipid phases was removed, and the extracted aqueous and lipid phases were mixed and thereafter dried under a nitrogen stream at 50 $^\circ\text{C}$. ACs in culture medium supernatants and extracted intracellular ACs lysate were analyzed

using MS/MS (API 3000; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, methanol (200 μl) including an isotopically labeled internal standard (Cambridge Isotope Laboratories, Kit NSK-A/B, Cambridge, UK) was added to 10 μL of supernatant from culture medium and extracted intracellular ACs, for 30 min. Portions were centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min, and then 150 μL of supernatant was dried under a nitrogen stream and butylated with 50 μL of 3 N *n*-butanol-HCl at 65 $^\circ\text{C}$ for 15 min. The dried butylated sample was dissolved in 100 μL of 80 % acetonitrile/water (4:1 v/v), and then the ACs in 10 μL of the aliquots were determined using MS/MS [18] and quantified using ChemoView™ software (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada).

Protein concentration and cell viability

Protein concentrations were measured by a modification of the Bradford method using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [19]. The percentage of viable cells was determined at 24, 48, 72, and 96 h of incubation using the modified 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay [20].

Data and statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SD from at least three independent experiments for IVP assay in each cultured cell and three intra-assays and three inter-assays for recovery of standard AC solutions, and statistical significance was evaluated using Student's *t* test in Microsoft Excel. The AC concentrations were expressed as nanomoles per milligram protein.

Results

Recovery of ACs during Folch extraction

The AC standards in the aqueous or lipid fraction were analyzed separately using MS/MS, after extraction by the Folch procedure, and compared with direct analysis of the total mixed standard solutions using three inter-assays and three intra-assays of analysis of standard AC solution. As shown in Fig. 3, most of the C6 and C8-carnitines fractionated to the aqueous phase, while almost all C16-carnitine was exclusively retained in the lipid phase. The amount of C10-carnitine was comparable in both aqueous and lipid phases.

To determine the loss of C0 and ACs during Folch extraction, the standard AC solution was analyzed directly after routine sample preparation for MS/MS and compared with that after Folch extraction. The recovery of ACs in the

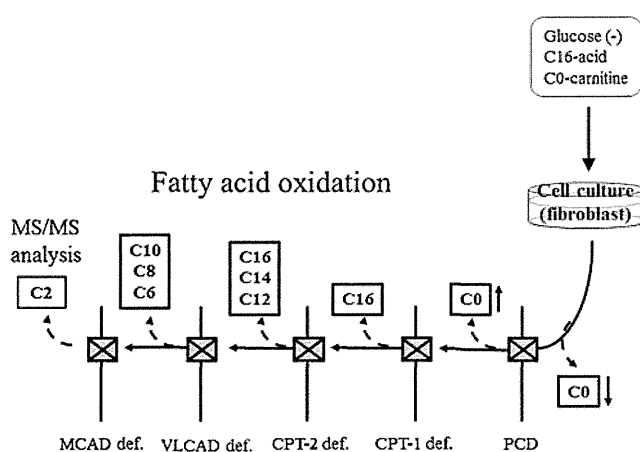


Fig. 2 Principle of in vitro probe acylcarnitine assay. C2, C4, C6, C8, C10, C12, C14, and C16 represent acylcarnitines

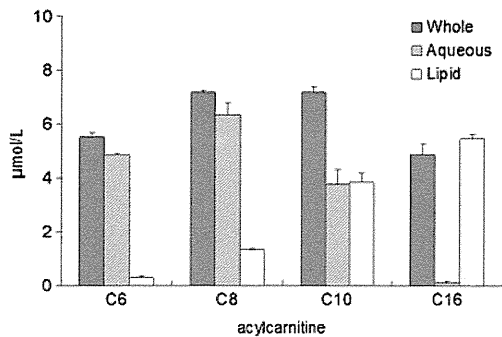


Fig. 3 Recovery of ACs during extraction using the Folch method. Standard solutions of 10 $\mu\text{mol/L}$ each of C6-, C8-, C10-, and C16-carnitine were used to determine the recovery of ACs in the aqueous and lipid fractions during extraction using the Folch method. *Grey column*: ACs in the whole extract after Folch method; *striped column*: ACs in the aqueous fraction of Folch extraction; *open column*: ACs in lipid fraction of Folch extraction. Data are expressed as mean \pm SD (micromoles per liter) from three intra-assays and three inter-assays, and statistical significance was evaluated using Student's *t* test in Microsoft Excel

standard solutions after direct analysis and Folch extraction procedure was analyzed three times by inter-assay. The inter-assay CV of acylcarnitines ranged from 3.21 to 8.33 %. No statistical difference was seen between direct analysis and after Folch extraction.

Acylcarnitine profile in extracellular medium of cultured fibroblasts with excess and reduced concentrations of free carnitine

Using fibroblasts from various carnitine cycle disorders, AC profiles were determined in the extracellular medium with reduced or excess concentration of C0. Reported conventional IVP assay used excess levels of C0 (400 $\mu\text{mol/L}$) [14,

15, 17, 21]. With excess amount of C0 (Table 1, "Medium (C0-excess, 400 μM)"), a selective increase in C16 and a decrease in acetylcarnitine (C2) was observed in cases of CPT2-deficient fibroblasts. AC profiles in media from PCD- and CPT1-deficient fibroblasts were similar to that of healthy controls. In PCD fibroblasts, C2 was 53.1 % of the normal control while C2 in CPT1-deficient fibroblasts was 140 % of the normal control. No statistical difference in C0 level was observed among CPT2-, PCD-, and CPT1-deficient fibroblasts and a healthy control.

In the extracellular medium containing reduced C0, C16 remains higher in cells with CPT2 deficiency, while AC profiles were similar to those observed in C0-excess for PCD- and CPT1-deficient cells and the healthy controls (Table 1, "Medium (C0-reduced, 10 μM)").

Acylcarnitine profile in intracellular lysate with various concentrations of free carnitine

The intracellular C0 and ACs were measured after AC extraction using the Folch method. C16 in the intracellular lysate from CPT2-deficient fibroblasts was significantly elevated in both reduced and excess C0 conditions similar to those in extracellular medium, and diagnostic significant was kept. In the excess C0 condition, CPT1- and PCD-deficient fibroblasts could not be distinguished clearly; based on the C0 levels, even C16 level was relatively low (Fig. 4a). On the other hand, the intracellular C0 under conditions with reduced C0 was 41.78 ± 1.47 and 6.31 ± 2.88 nmol/mg protein/96 h in the normal controls ($n=6$) and patients with PCD ($n=3$), respectively, and the C0 levels of PCD cells were significantly lower ($p<0.001$) as shown in Fig. 4b. This indicated that the C0 uptake was significantly decreased in PCD compared with control in

Table 1 Acylcarnitine profiles of in vitro probe acylcarnitine assay

	Acylcarnitines, nmol/mg protein/96 h						
	C0	C2	C6	C8	C12	C14	C16
Medium (C0 excess, 400 μM)							
Control ($n=6$)	411.74 \pm 23.08	11.80 \pm 1.54	2.60 \pm 0.09	1.70 \pm 0.47	0.79 \pm 0.22	0.34 \pm 0.19	2.06 \pm 0.77
PCD ($n=3$)	432.18 \pm 18.76	6.25 \pm 0.96	2.09 \pm 0.40	0.94 \pm 0.54	0.41 \pm 0.33	0.20 \pm 0.10	1.72 \pm 0.57
CPT-1 ($n=1$)	357.69 \pm 34.16	16.52 \pm 5.60	1.73 \pm 0.87	0.54 \pm 0.94	0.18 \pm 0.14	0.17 \pm 0.16	1.36 \pm 0.98
CPT-2 ($n=3$)	376.56 \pm 42.71	6.88 \pm 0.72	0.94 \pm 0.65	0.41 \pm 0.22	1.70 \pm 0.35	0.80 \pm 0.05	18.73 \pm 1.07
Medium (C0 reduced, 10 μM)							
Control ($n=6$)	9.85 \pm 0.30	1.70 \pm 0.74	0.78 \pm 0.30	0.18 \pm 0.09	0.10 \pm 0.08	0.03 \pm 0.01	0.51 \pm 0.11
PCD ($n=3$)	10.03 \pm 0.71	0.74 \pm 0.33	0.75 \pm 0.31	0.06 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.20 \pm 0.08
CPT-1 ($n=1$)	11.06 \pm 0.75	7.56 \pm 3.10	0.98 \pm 0.30	0.55 \pm 0.62	0.09 \pm 0.09	0.08 \pm 0.07	0.01 \pm 0.02
CPT-2 ($n=3$)	9.73 \pm 1.94	0.64 \pm 0.23	0.54 \pm 0.20	0.11 \pm 0.03	0.22 \pm 0.06	0.04 \pm 0.01	2.79 \pm 0.38

The results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments with triplication in each cell line. The AC concentration was expressed as nanomoles per milligram protein. C0 free carnitine, C2 acetylcarnitine, C6 hexanoylcarnitine, C8 octanoylcarnitine, C12 dodecanoylcarnitine, C14 myristoylcarnitine, C16 palmitoylcarnitine

C0-reduced condition. Concentration of C16 was also significantly low in PCD in C0-reduced condition. Under the C0-reduced condition, intracellular C0 was much higher, but C16 was much lower in CPT1-deficient fibroblasts, compared with the levels in controls (Fig. 4b).

The ratio of intracellular C0 to extracellular C0 in PCD was significantly lower than that of the controls ($p < 0.001$) in the C0-reduced condition, while that in C0-excessive condition was not significantly different (Fig. 5). Cell viability was measured using the MTT assay under reduced or excess concentrations of C0. The percentage of viable cells cultured in C0-reduced medium was equivalent to that in C0-excess media (data not shown).

Discussion

The present study developed a novel IVP assay for the accurate diagnosis of PCD and CPT1 deficiency. Although previous studies reported that IVP assay was a powerful method for the diagnosis of most FAO disorders [13, 14, 21], this assay turned out to be unable to identify PCD and CPT1 deficiencies. At first, we used a C0-excess experimental medium, which contained 400 $\mu\text{mol/L}$ of C0, according to previous reports [13, 14, 21]. Extracellular

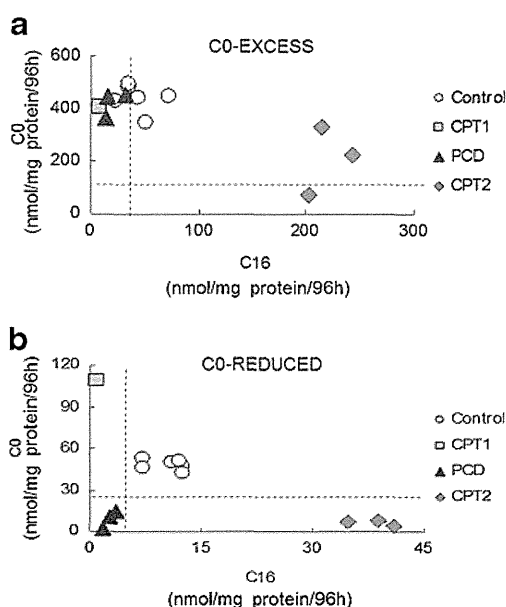


Fig. 4 Intracellular C0 and C16 correlation in patients with carnitine cycle disorders. **a** C0-excessive condition ($-E$); **b** C0-reduced condition ($-R$). *open circle*: healthy control ($n=6$); *closed triangle*: PCD ($n=3$); *closed square*: CPT1 deficiency ($n=1$); *closed diamond*: CPT2 deficiency ($n=3$). Cells were incubated in experimental medium with 400 or 10 $\mu\text{mol/L}$ of free carnitine and 200 $\mu\text{mol/L}$ of palmitic acid. After 96-h incubation, cells were harvested, and intracellular free carnitine (C0) and palmitoylcarnitine (C16) were extracted using Folch method and measured using MS/MS. Data of mean values of triplicates are presented (nanomoles per milligram protein per 96 h)

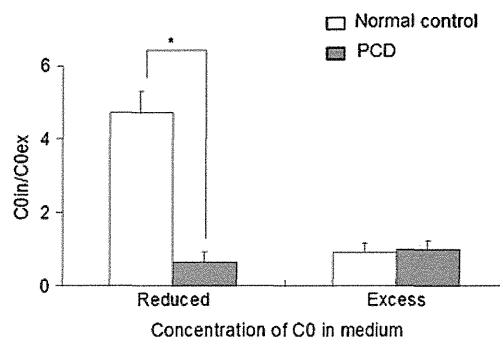


Fig. 5 Ratio of intracellular C0 to extracellular C0. *Open square*: normal control ($n=6$); *closed square*: PCD ($n=3$). Extra- and intracellular C0 of cells with normal control and PCD were measured in C0-reduced (10 $\mu\text{mol/L}$) and C0-excess (400 $\mu\text{mol/L}$) conditions using MS/MS. Data are expressed as mean \pm SD of six normal controls and three patients with PCD. Experiment in each cell line was repeated twice with triplications. Significant differences between normal control and PCD are shown as $*p < 0.001$

AC profiles of patients with PCD and CPT1 deficiency showed a pattern similar to that of normal controls by the conventional assay that contains excessive C0 (400 $\mu\text{mol/L}$) in the culture medium, since C0 moves across the cell membrane down its concentration gradient by passive diffusion. Long-chain fatty acids are transferred across the inner mitochondrial membrane with the assistance of carnitine and carnitine cycle enzymes. The subsequent FAO functions normally even in PCD, and AC profile in PCD is similar to that in normal FAO. Next, we used 50 $\mu\text{mol/L}$ of C0 because the normal range of free carnitine in human plasma was approximately 25 to 50 $\mu\text{mol/L}$ [6]. However, there was no diagnostic difference compare with C0-excess condition, and data are not shown. We analyzed IVP assay in C0-deficient condition (10 $\mu\text{mol/L}$ of C0).

It is known that fibroblasts and muscle and cardiac cells have a high-affinity, low-capacity transporter system [22], and carnitine concentrations in the tissues are much higher than those in serum [23]. Analysis of intracellular C0 and ACs is more relevant for the diagnosis of PCD and CPT1 deficiency because it was shown that C0 was decreased in PCD and increased in CPT1 deficiency in those tissues. When we analyzed cell lysates with MS/MS after direct sonication, artificial peaks of ACs were detected, and the background peaks of mass spectrum were high and hampered the subsequent analyses (data not shown). Hence, we extracted intracellular ACs using a modified Folch method and analyzed both the intracellular lysate and the extracellular medium. This allowed visualization of clear peaks of C0 and ACs in the intracellular lysate, validating that the Folch extraction can be used for simultaneous quantitation of intracellular C0 and a wide range of ACs (short- to long-chain AC).

Uptake of C0 and abnormalities in ACs were associated with the concentration of C0 in culture medium. In the C0-excess condition, it was hard to differentiate PCD from control

cells. Levels of C0 and C16 were overlapped with those of normal control. On the other hand, in the C0-reduced condition, intracellular C0 was significantly decreased in PCD while being increased in CPT1 deficiency, compared with that in normal control. C0-reduced medium was changed after fibroblasts equilibrated in MEM, and normal control could force to uptake free carnitine in C0-deficient condition while cells with PCD could not uptake sufficiently in that condition. Furthermore, the following fatty acid oxidation cycle interrupted, and C16 also decreased in PCD. This correlation of C0 and C16 in the C0-reduced condition is more informative for the diagnosis of carnitine cycle disorders (Fig. 4b). Since cells with PCD cannot uptake C0 via the cell membrane, the finding of reduction of both C0 and C16 is specific for PCD. In case of CPT1 deficiency, C0 uptake is normal, but it cannot bind acyl-CoA ester, resulting in reduced long-chain acylcarnitine production, and FAO is disturbed. Therefore, the stored intracellular ACs were consumed by FAO, and intracellular C16 as well as total ACs were decreased, and C0 was accumulated in intracellular lysate. In contrast, the AC profile of low level of C0 and high level of C16 is diagnostic for CPT2 deficiency. In this disease, normally transferred long-chain AC cannot be converted back from ACs to acyl-CoA esters and C0, the substrate for FAO. Additionally, the ratio of intracellular and extracellular C0s can sensitively distinguish PCD from control in the C0-reduced medium because carnitine transporter of normal cells was forced to uptake C0 up to physiological level in C0-reduced condition while cells with PCD failed for it. In excessive C0 condition, ratio of intracellular and extracellular C0 was similar to that in normal control and PCD since C0 transfer by passive diffusion across the cell membrane.

In conclusion, the simultaneous analysis of intracellular and extracellular C0 and ACs under the various concentrations of free carnitine in the culture medium is useful for diagnosis of FAO, especially carnitine cycle disorders. This study confirms that the newly modified IVP assay is an easy and safe method to diagnose PCD and CPT1 deficiency.

Acknowledgments We thank all the attending physicians for providing clinical information regarding each patient. We are also grateful to Y. Ito, M. Furui, T. Esumi, and N. Tomita for their technical assistance. This work was supported by a Grant-in-Aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science (J.P., and S.Y.) and a Grant from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture of Japan and the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (S.Y.).

References

- McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244:1–14
- Sim KG, Hammond J, Wilcken B (2002) Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chim Acta* 323:37–58
- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A et al (1998) Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 273:20378–20382
- Treem WR, Stanley CA, Finegold DN, Hale DE, Coates PM (1988) Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle, and fibroblasts. *N Engl J Med* 319:1331–1336
- Eriksson BO, Gustafson B, Lindstedt S, Nordin I (1989) Transport of carnitine into cells in hereditary carnitine deficiency. *J Inher Metab Dis* 12:108–111
- Longo N, di San A, Filippo C, Pasquali M (2006) Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C:77–85
- Nakajima Y, Ito T, Maeda Y, Ichiki S, Sugiyama N et al (2010) Detection of pivaloylcarnitine in pediatric patients with hypocarnitinemia after long-term administration of pivalate-containing antibiotics. *Tohoku J Exp Med* 221:309–313
- Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M et al (2010) Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *Tohoku J Exp Med* 221:191–195
- Tein I, DiMauro S, Xie ZW, De Vivo DC (1993) Valproic acid impairs carnitine uptake in cultured human skin fibroblasts. An in vitro model for the pathogenesis of valproic acid-associated carnitine deficiency. *Pediatr Res* 34:281–287
- Pons R, Carozzo R, Tein I, Walker WF, Addonizio LJ et al (1997) Deficient muscle carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Pediatr Res* 42:583–587
- Scaglia F, Wang Y, Longo N (1999) Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. *Arch Biochem Biophys* 364:99–106
- Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N (1999) Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2356–2360
- Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y et al (2010) In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type 2. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878:1673–1676
- Law LK, Tang NL, Hui J, Ho CS, Ruiten J et al (2007) A novel functional assay for simultaneous determination of total fatty acid beta-oxidation flux and acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using (2)H(31)-palmitate by isotope ratio mass spectrometry and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 382:25–30
- Okun JG, Kolker S, Schulze A, Kohlmuller D, Olgemoller K et al (2002) 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
- Jauregui O, Sierra AY, Carrasco P, Gratacos E, Hegardt FG et al (2007) A new LC-ESI-MS/MS method to measure long-chain acylcarnitine levels in cultured cells. *Anal Chim Acta* 599:1–6
- Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiten J, Allers P et al (1999) Quantitative acylcarnitine profiling in fibroblasts using [U-13C] palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clin Chim Acta* 281:1–17
- Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J et al (2010) Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial beta-oxidation: comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain Dev* 32:362–370

19. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
20. Honma Y, Ishii Y, Yamamoto-Yamaguchi Y, Sassa T, Asahi K (2003) Cotylenin A, a differentiation-inducing agent, and IFN- α cooperatively induce apoptosis and have an antitumor effect on human non-small cell lung carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 63:3659–3666
21. Schulze-Bergkamen A, Okun JG, Spiekerkotter U, Lindner M, Haas D et al (2005) 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
22. Tein I, De Vivo DC, Bierman F, Pulver P, De Meirleir LJ et al (1990) Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr Res* 28:247–255
23. Stanley CA (1987) New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv Pediatr Infect Dis* 34:59–88

PEDIATRICS®

OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS

Coagulopathy in Patients With Late-Onset Ornithine Transcarbamylase Deficiency in Remission State: A Previously Unrecognized Complication

Kenji Ihara, Makoto Yoshino, Takayuki Hoshina, Nawomi Harada, Kanako Kojima-Ishii, Mika Makimura, Yuki Hasegawa, Yoriko Watanabe, Seiji Yamaguchi and Toshiro Hara

Pediatrics 2013;131:e327; originally published online December 3, 2012;
DOI: 10.1542/peds.2012-0030

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://pediatrics.aappublications.org/content/131/1/e327.full.html>

PEDIATRICS is the official journal of the American Academy of Pediatrics. A monthly publication, it has been published continuously since 1948. PEDIATRICS is owned, published, and trademarked by the American Academy of Pediatrics, 141 Northwest Point Boulevard, Elk Grove Village, Illinois, 60007. Copyright © 2013 by the American Academy of Pediatrics. All rights reserved. Print ISSN: 0031-4005. Online ISSN: 1098-4275.

American Academy of Pediatrics

DEDICATED TO THE HEALTH OF ALL CHILDREN™



Coagulopathy in Patients With Late-Onset Ornithine Transcarbamylase Deficiency in Remission State: A Previously Unrecognized Complication

AUTHORS: Kenji Ihara, MD, PhD,^a Makoto Yoshino, MD, PhD,^b Takayuki Hoshina, MD, PhD,^a Nawomi Harada, PhD,^b Kanako Kojima-Ishii, MD, PhD,^a Mika Makimura, MD, PhD,^a Yuki Hasegawa, MD, PhD,^c Yoriko Watanabe, MD, PhD,^b Seiji Yamaguchi, MD, PhD,^c and Toshiro Hara, MD, PhD^a

^aDepartment of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; ^bDepartment of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine; and ^cDepartment of Pediatrics, Shimane University School of Medicine

KEY WORDS

coagulopathy, late-onset type, ornithine transcarbamylase deficiency

ABBREVIATIONS

ALT—alanine aminotransferase
AST—aspartate aminotransferase
OTC—ornithine transcarbamylase
PIVKA-II—des-γ-carboxyprothrombin
PT—prothrombin time
VK—vitamin K

www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-0030

doi:10.1542/peds.2012-0030

Accepted for publication Jul 31, 2012

Address correspondence to Kenji Ihara, MD, PhD, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan. E-mail: k-ihara@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

PEDIATRICS (ISSN Numbers: Print, 0031-4005; Online, 1098-4275).

Copyright © 2013 by the American Academy of Pediatrics

FINANCIAL DISCLOSURE: The authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

FUNDING: No external funding.

abstract

The late-onset type of ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency is almost asymptomatic before an abrupt onset of metabolic crisis in adolescence. This study focused on coagulopathy in OTC deficiency. We collected laboratory data regarding coagulation from OTC-deficient patients in Kyushu University Hospital in Japan or from cases reported from previous articles. Five patients with late-onset OTC deficiency, admitted to Kyushu University Hospital at the first metabolic attack or who presented at the outpatient clinic in the hospital, were analyzed, and 3 additional cases of OTC deficiency with coagulopathy in previous articles were included. As a result, the blood ammonia levels in these patients were remarkably high at the time of the metabolic attack, and prothrombin times were far below the normal level. The prothrombin times remained significantly abnormal on remission, despite almost normal levels of blood ammonia, serum aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase. Coagulation abnormality is a previously unidentified complication of OTC deficiency in remission state. This information will aid in the identification of patients with OTC deficiency before a lethal metabolic crisis occurs during adolescence. *Pediatrics* 2013;131:e327–e330

Ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency, an X-linked disorder, is the most frequent urea cycle disorder characterized by an acute clinical manifestation of hyperammonemia, accounting for >60% of all urea cycle disorders.¹ The classic type of OTC deficiency demonstrates a severe hyperammonemia during infancy and sometimes proves fatal, whereas the late-onset type is almost asymptomatic before an abrupt onset of metabolic crisis in adolescence.²⁻⁴ The early diagnosis of the late-onset type is sometimes difficult because the first crisis usually appears in either adolescent or adult patients who have exhibited normal growth and development. Specific findings of abnormal metabolites in urine such as orotic acid or uracil are critical for making an accurate diagnosis of OTC deficiency.⁵ In contrast, the biochemical markers in routine examinations are usually within the normal ranges. Consequently, the identification of specific markers in a routine biochemical analysis would be clinically beneficial for patients with OTC deficiency. Coagulopathy in OTC deficiency is usually accompanied by acute liver failure, and slight changes in the coagulation data in a remission state have been overlooked as nonspecific findings. Hence, coagulopathy is not recognized as a consequence of OTC deficiency by itself. This report focused on the presence of any underlying coagulation abnormality in OTC deficiency during a metabolically compensated state. We retrospectively collected laboratory data on coagulation from the clinical records of OTC-deficient patients of Kyushu University Hospital in Japan. A bibliographic search was also conducted to determine whether any coagulopathy had previously been noticed before the abrupt onset of metabolic attack in cases of OTC deficiency.

METHODS

Patients with OTC deficiency, admitted to Kyushu University Hospital at the first

metabolic attack or who presented at the outpatient clinic in the hospital from January 1993 to December 2010, were enrolled in this study. A systematic search of the PubMed database was conducted for all articles from 1990 through 2012 with the terms "OTC deficiency," "coagulopathy," "coagulation," or "prothrombin time" in the title, abstract, or key words to determine whether any articles described coagulation abnormality before and after the onset of metabolic attack in OTC-deficient patients.

RESULTS

Five patients were identified at our hospital as follows: patient 1 was a 10-year-old boy with OTC deficiency underlying asymptomatic coagulopathy of unknown etiology before the onset of metabolic crisis. Two patients (patients 2 and 4) were diagnosed during the asymptomatic period because the brother of patient 2 and the maternal uncle of patient 4 died of OTC deficiency at the first metabolic attack. Patients 3 and 5 experienced the first attack during infancy (10 months) and childhood (10 years), respectively. The database search identified 3 publications, and 3 cases of OTC deficiency from these articles with the description of the coagulation at remission state are shown in Table 1 (patients 6-8).⁶⁻⁸

Six of these 8 patients were male. Five patients were successfully treated and maintained normal growth and development for years. One patient died a sudden death at 19 years of age. The 2 patients described in the literature developed a metabolic attack at 24 years of age and died at the first attack. The levels of blood ammonia of these patients were remarkably high during the metabolic attack, whereas other laboratory data such as aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were indistinctive.

In contrast, prothrombin times (PTs) were below the normal level at the metabolic attack and were also considerably abnormal during remission. The blood ammonia, serum AST, ALT, or albumin levels were close to normal ranges while the patients were being managed by using either mild restriction of protein intake or oral arginine supplementation (Table 1).

DISCUSSION

Coagulation abnormalities have rarely been recognized in association with OTC deficiency. Coagulopathy may occur if the metabolic attacks cause severe liver damage or disseminated intravascular coagulation, but such critical conditions were not found in any of these patients. These cases also demonstrated the presence of abnormalities in coagulation even during remission. The findings suggest that coagulopathy may be a useful sign for detecting an underlying OTC deficiency, especially in boys with nonspecific clinical symptoms such as cyclic vomiting or psychological problems. To the best of our knowledge, no common genetic coagulopathy has yet been identified in the Japanese population; therefore, it is likely that this coagulation abnormality may be specific to OTC deficiency.

The pathogenesis of such a coagulation abnormality is unclear. This coagulopathy does not seem similar to that in fulminant hepatic failure with the collapse of protein synthesis in the liver. The coagulopathy in OTC deficiency might be under the same mechanism that occurs with vitamin K (VK) deficiency because elevation of serum des- γ -carboxyprothrombin (PIVKA-II) levels was sometimes detected, and VK administration seemed effective for these patients. The coagulation factors II, VII, IX, and X are activated in a VK-dependent manner during carboxylation at the γ -terminus-glutamate in

TABLE 1 Clinical, Molecular, and Laboratory Data of the Patients

Variable	RR	Patient No.							
		1	2	3	4	5	6 (Thurlow et al, ⁷ 2010)	7 (Schimanski et al, ⁶ 1996)	8 (Zammarchi et al, ⁸ 1996)
Gender		M	M	M	M	M	M	F	F
Proband		Himself	Brother ^a	Himself	Maternal uncle ^a	Himself	Himself	Herself	Herself
Transmission type		ND	Maternal	Maternal	Maternal	ND	Maternal	ND	ND
OTC gene mutation		R40H	R40H	IVS2-1G>A	R40H	R40H	R40C	Deletion	ND
Diagnosis									
Age		10 y	PP	8 mo	1 mo	10 y	24 y	24 y	11 mo
Method		BDx	GDx	BDx	BDx	BDx	BDx	BDx	BDx
Age at first attack		10 y	12 y	7 d	None	10 y	24 y	24 y ^c	None
Representative data at attack									
AST/ALT, U/L	13–33/6–30	31/23	16/14	86/126 ^d	—	67/154 ^d	114 (AST) ^d	52/47 ^d	—
PT, % [INR]	≥70% [0.90–1.10]	44 [1.59] ^d	56 [1.37] ^d	11 ^d	—	17.5% ^{d,e}	ND [2.7] ^d	ND [3.0] ^d	—
APTT, s	26.0–41.0	38.3	38.4	64.0 ^d	—	60.7 ^d	ND	ND	—
Ammonia, μmol/L	7–39	175 ^d	399 ^d	112 ^d	—	214 ^d	348 ^d	380 ^d	—
Representative data at remission, age		15 y	17 y	23 y	16 y	12 y	24 y	24 y	11 m
AST/ALT, U/L	13–33/6–30	21/21	12/11	25/34 ^d	16/8	29/18	Normal	32/32 ^d	223/103 ^d
PT, % [INR]	≥70 [0.90–1.10]	58 [1.40] ^d	68 [1.20] ^d	69 [1.22] ^d	82 [1.11] ^d	64.1 ^{d,e}	ND [2.2] ^d	ND [3.0] ^d	50 ^d
APTT, s	26.0–41.0	42.1 ^d	40.6	44.0 ^d	32.0	30.3	47.0 ^d (RR: 29–37)	Normal	42 (RR: 30–45)
Ammonia, μmol/L	7–39	19	27	41	9	19	Normal	23.5	74 ^d
PIVKA-II, mAU/mL	<40	32	27	37	56 ^d	ND	ND	ND	ND
Serum albumin, g/dL	4.0–5.0	4.1	4.2	3.9	5.0	4.0	ND	ND	ND
Frequency of severe attack		Once	3 times	3 times	None	3 times	Once	Once	None
Long-term treatment		A, P	A	A, P	A	A, B	—	—	B, P, C
Outcome (age)		Healthy adolescent (16 y)	Healthy adolescent (17 y)	Healthy adult (24 y)	Healthy adolescent (17 y)	Dead (19 y)	Dead (24 y)	Dead (24 y)	Healthy (ND)

A, oral arginine supplement; APTT, activated partial thromboplastin time; B, oral sodium benzoate treatment; BDx, biochemical diagnosis based on the hypersecretion of orotic acid and uracil in urine without elevation of any specific amino acid in blood; C, oral citrulline treatment; GDx, genetic diagnosis by the analysis of the *OTC* gene; INR, international normalized ratio; ND, not described or not available; P, intake protein restriction; PP, during the prenatal period; RR, reference range.

^a Dead.

^b Deletion, T892del,G893del in exon 9.

^c In pregnancy.

^d The laboratory data out of RRs.

^e Hepaplastin test (normal range: 67%–138%).