

▷第59回学術集会 シンポジウム7: 臨床検査への質量分析の応用(4)◁

小児科領域におけるタンデムマスと GC/MS の臨床応用 : 最近の進歩

山口 清次*

Clinical Application of Mass Spectrometry in the Pediatric Field:
Current Topics

Seiji YAMAGUCHI, MD*

Mass spectrometry, including tandem mass spectrometry (MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), is becoming prominent in the diagnosis of metabolic disorders in the pediatric field. It enables biochemical diagnosis of metabolic disorders from the metabolic profiles obtained by MS/MS and/or GC/MS. In neonatal mass screening for inherited metabolic disease (IMD) using MS/MS, amino acids and acylcarnitines on dried blood spots are analyzed. The target diseases include amino acidemia, urea cycle disorder, organic acidemia, and fatty acid oxidation disorder. In the MS/MS screening, organic acid analysis using GC/MS is required for differential and/or definite diagnosis of the IMDs. GC/MS data processing, however, is difficult, and metabolic diagnosis often requires the necessary skills and expertise. We developed an automated system of GC/MS data processing and autodiagnosis, and the biochemical diagnosis using GC/MS became markedly easier and user-friendly. Mass spectrometric techniques will expand from research laboratories to clinical laboratories in the near future. 【Review】

[Rinsho Byori 61 : 817~824, 2013]

Corresponding author: Seiji YAMAGUCHI, MD, Department of Pediatrics, Shimane University School of Medicine, Izumo 693-8501, Japan. E-mail: seijiyam@shimane-med.ac.jp

【Key Words】 tandem mass spectrometry (タンデムマス), gas chromatography-mass spectrometry: GC/MS (ガスクロマトグラフ質量分析計), organic acidemia (有機酸代謝異常症), fatty acid oxidation disorder (脂肪酸代謝異常症), neonatal mass screening (新生児マススクリーニング)

質量分析は、生体試料中の微量物質を高感度・高精度に網羅的分析が可能な機器である。微量の検体で同時に多くの情報が得られるため、メタボロミクス、プロテオミクス解析に応用されている。従来質量分析は、もっぱら研究室で使われていたが、最近臨床検査として使われるようになりつつある。

小児科領域では、代謝異常の診断に質量分析が普及しつつある。なかでも、「ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) による先天代謝異常症の診断」と「タンデム型質量分析 (タンデムマス) によるアシルカルニチン分析」は、条件付きではあるものの最近保険収載された。さらに最近ガスリー血液ろ

*島根医科大学小児科(〒693-8501 出雲市塩冶町 89-1)

Table 1 Clinical features of amino acidemia, urea cycle disorder, organic acidemia, and fatty acid oxidation disorder, and biochemical diagnosis

Clinical features	Tools for biochemical diagnosis
Amino acidemia	
<ul style="list-style-type: none"> • Neurological impairment • Convulsion, unconsciousness • Liver dysfunction • Renal stone 	Amino acid analysis (Organic acid analysis)
Urea cycle disorder	
<ul style="list-style-type: none"> • Convulsion, unconsciousness • Mental retardation • Hyperammonemia 	Amino acid analysis Blood ammonia Organic acid analysis
Organic acidemia	
<ul style="list-style-type: none"> • Acute onset with hypotonia, unconsciousness from early infancy • Intermittent episodes of ketosis, hypoglycemia • Neurological retardation • Other (ex. intractable eczema) 	Organic acid analysis Acylcarnitine analysis
Fatty acid oxidation disorder	
<ul style="list-style-type: none"> • Lethargy, hypotonia, myalgia • Acute encephalopathy, sudden death • Cardiomyopathy • Non-ketotic hypoglycemia • Liver dysfunction, CK elevation 	Acylcarnitine analysis Organic acid analysis

II. アミノ酸・有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的特徴

Table 1 に示すように、アミノ酸代謝異常症は血液(または尿)のアミノ酸分析、尿素回路異常症では血中アンモニア値とアミノ酸分析などによって診断される。有機酸代謝異常症と脂肪酸代謝異常症は、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によって生化学診断される。両者ともカルボン酸の増加する点で類似しているが臨床的特徴に違いがみられる。前者は有機酸の臓器毒性の所見がみられることが多く、後者はエネルギー産生不全による症状が前面に出る。

タンデムマス法ではアミノ酸とアシルカルニチン分析が可能であり、これら上記 4 種類の疾患群のスクリーニングに用いられる。GC/MS による尿中有機酸分析では、有機酸代謝異常症の生化学診断に最も威力を発揮するが、一部のアミノ酸血症でも補助的診断に用いられる。例えば、有機酸分析によって、フェニルケトン尿症でフェニルピルビン酸やフェニ-

ル乳酸、メープルシロップ尿症で分枝鎖 α ケト酸の増加が観察される。尿素回路異常症では、一部の疾患でウラシル、オロト酸の増加がみられ診断に有用である。さらに脂肪酸代謝異常症の家長鎖脂肪酸代謝異常症では非ケトン性ジカルボン酸尿症がみられ、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症ではヘキサノイルグリシンやスベリルグリシンのような診断的に有用な有機酸が検出される。

III. タンデムマスと GC/MS について

A. タンデムマス

MS が直列に並んだ構造 (MS1 と MS2) 構造を持ち、MS1 と MS2 で測定された粒子の質量数を比較して分子量が推定される。そしてそれぞれの分子のイオン強度によって定量される。非常に高感度な分析が可能であり⁴⁾、新生児マススクリーニングでは、血液ろ紙の 3mm 大のディスクでよく、血清 10 μ L で分析可能である⁵⁾。また分析試薬等がキット化され前処理も非常に簡単になっている。1 検体の分析時間は 2 分程度であり、ランニングコストも安価な

Table 2 Main target diseases detectable by MS/MS and diagnostic markers

Disease	Diagnostic marker	
	MS/MS*	GC/MS**
Amino acidemia		
Phenylketonuria	Phe	PPA, PLA
Maple syrup urine disease	Ileu, Leu, Val	2KIV, 2M3VA, 2KIC
Homocystinuria	Met	—
Urea cycle disorder		
Citrullinemia (type I)	Cit	Orot, Uracil
Argininosuccinic aciduria	Cit (ASA)	Orot, Uracil
Organic acidemia		
Methylmalonic acidemia	C3, C3/C2	MMA, MC, 3HPA, PG
Propionic acidemia	C3, C3/C2	MC, 3HPA, PG
Isovaleric acidemia	C5	IVG
Methylcrotonylglycinuria	C5-OH	MCG, 3HiVA
HMG-CoA lyase deficiency	C5-OH	HMGA, MGA, MGCA
Multiple carboxylase deficiency	C5-OH	MC, MCG, 3HPA
Glutaric acidemia type I	C5-DC	GA, 3HGA
β -ketothiolase deficiency	C5-OH, C5:1	2M3HBA, TG
Fatty acid oxidation disorder		
MCAD deficiency	C8	HG, SG
VLCAD deficiency	C14:1	DIC
TFP deficiency	C16-OH, C18-OH	DIC, 3HDIC
CPT-1 deficiency	C0/[16+C18]	DIC
CPT-2 deficiency	(C16+C18:1)/C2, C16	DIC
Primary carnitine deficiency	C0 (reduced)	DIC
Glutaric acidemia type II	C8, C10, C12, etc	DIC, EMA, IVG, GA, etc

*MS/MS, amino acid and acylcarnitine in blood; GC/MS, urinary organic acid.

Abbreviations: MCAD and VLCAD, medium-chain- and very-long-chain-acyl-CoA dehydrogenases, respectively; TFP, mitochondrial trifunctional protein; CPT-1 and CPT-2, carnitine palmitoyltransferase-I and -II, respectively; PPA, phenylpyruvate; PLA, phenyllactate; 2KIV, α -ketoisovalerate; 2M3VA, α -keto-3-methylvalerate; 2KIC, α -ketoisocaproate; Orot, orotate; MMA, methylmalonate; MC, methylcitrate; 3HPA, 3-OH-pyruvate; PG, propionylglycine; IVG, isovaleryl-glycine; MCG, methylcrotonylglycine; 3HiVA, 3-OH-isovalerate; HMGA, 3-OH-3-methylglutarate, MGA, methylglutarate; MGCA, methylglutaconate; GA, glutarate; 3HGA, 3-OH-glutarate; 2M3HBA, 2-methyl-3-OH-butyrate; TG, tiglylglycine; HG, hexanoylglycine; SG, suberylglycine; DIC, dicarboxylate; 3HDIC-3-OH-dicarboxylate; EMA, ethylmalonate.

し、考えられる診断名をアウトプットできる。このため、代謝異常症や GC/MS データに知識のない人でも短期間のうちに使えるようになる。Fig. 4 に自動解析結果を例示している。これによると異常として検出した代謝産物に 3-OH-propionate, propionylglycinem, および methylcitrate があるので、下の段に「疑わしい疾患」としてプロピオン酸血症をあげている。患者の臨床経過やタンデムマスデータなどを総合すれば、プロピオン酸血症という最終診断に比較的容易に到達することができる。

VI. タンデムマスによるアシルカルニチン分析

血液ろ紙や血清 10 μ L 程度の微量検体で、約 2 分間の分析時間のあいだに、アミノ酸とアシルカルニチンを分析し、そして Fig. 5 に示すような、アシルカルニチンとアミノ酸のデータを得ることができる。アシルカルニチンはアシル基の炭素数に対応して、C2, C3, C4.....と表示がされる。またアシル基に水酸基がついていれば C5-OH のように表示され、不飽和結合をもつアシル基ならば C5:1, ジカルボキシル基であれば C5-DC のように表現される。一方、

ID	Compound	VALUE	NORMAL	RANGE	FACTOR	
1	Lactic-2	3.7703	(0.60	0.00 - 4.70)	4.71	abnormal metabolite judges → 3-OH-propionate
4	Glycolic-2	8.8298 *	(0.70	0.00 - 2.20)	12.61	
7	Glyoxylic-Ox-2	25.6281 *	(1.20	0.00 - 6.10)	21.38	
8	3-OH-propionic-2	49.2909 *	(0.20	0.00 - 1.10)	246.45	
9	Pyruvic-Ox-2	19.8531	(4.50	0.00 - 24.10)	4.41	
11	3-OH-butyric-2	1.2034	(0.70	0.00 - 3.70)	1.72	
12	3-OH-isobutyric-2	3.0097	(2.50	0.00 - 9.00)	1.20	
20	Urea-2	21.4587	(376.10	104.60 - 763.00)	0.06	
26	Benzoic-1	5.6808	(4.40	0.00 - 18.70)	1.29	
28	Octanoic-1	0.7222 *	(0.10	0.00 - 0.40)	7.22	
31	Glycerol-3	2.2787	(0.30	0.00 - 0.80)	7.60	
35	Acetylglucine-1	0.7546 *	(0.00	0.00 - 0.10)	?	
38	Maleic-2	2.1030 *	(0.00	0.00 - 0.40)	?	
39	Succinic-2	18.6158	(32.70	6.50 - 65.80)	0.57	
40	Methylsuccinic-2	2.6841	(1.30	0.00 - 6.40)	2.08	
42	Uracil-2	12.9867	(2.80	0.00 - 7.00)	4.64	
43	Fumaric-2	15.0581 *	(2.00	0.00 - 7.30)	7.53	
44	Propionylglycine-1	8.9201 *	(0.00	0.00 - 0.00)	?	
49	Isobutyrylglucine-1	0.9291 *	(0.00	0.00 - 0.40)	?	
50	Mesaconic (Methylfumaric)-2	1.1288	(1.50	0.00 - 8.90)	0.76	
51	Glutaric-2	1.8928	(1.90	0.00 - 4.00)	1.00	
55	Propionylglycine-2	21.6209 *	(0.00	0.00 - 0.00)	?	→ propionylglycine
56	Isobutyrylglucine-2	1.9196 *	(0.00	0.00 - 0.00)	?	
57	2-Deoxytetronic	4.1206	(2.40	0.00 - 6.30)	1.72	
59	3-Methylglutamic-2	2.4716	(1.10	0.00 - 4.20)	2.25	
● ● ●						
107	Citric-4	244.8967	(441.10	31.40 - 572.30)	0.58	
109	Hippuric-1	27.0143	(30.10	6.20 - 284.10)	0.90	
110	Methylcitric-4(1)	14.6752 *	(0.20	0.00 - 1.10)	73.38	
111	3-(3-OH-phenyl)-3-OH-propionic-3	4.3026	(0.30	0.00 - 0.00)	14.34	
112	Methylcitric-4(2)	11.2599 *	(0.10	0.00 - 1.00)	112.60	→ methylcitrate
113	3-OH-octanedioic-3	2.1124	(1.50	0.00 - 5.30)	1.41	
114	3-OH-suberic-3	1.6198	(1.20	0.00 - 4.80)	1.35	
115	Vanilmandelic-3(VMA)	42.5950	(46.60	11.70 - 84.80)	0.91	
116	Sebacic-2	0.3455	(2.20	0.40 - 7.00)	0.16	
117	Decadenedioic-2	1.1074	(0.70	0.00 - 2.30)	1.58	
118	4-OH-phenyllactic (PHPLA)-2	3.4487	(1.80	0.00 - 7.00)	1.91	
121	Indole-3-acetic-2	89.0636	(27.60	0.00 - 78.70)	3.23	
125	2-OH-hippuric-2	0.4832	(1.20	0.00 - 17.60)	0.40	
128	Uric-4	4.5905	(2.60	0.00 - 7.20)	1.77	
No. Disease suspected: → Propionic acidemia is suspected!!						
2. Propionic acidemia						

Figure 4 Results from the automated system of GC/MS data processing and autodiagnosis of propionic acidemia
*: abnormal metabolites flagged.

アミノ酸は、Phe, Tyr, Met, Leu, Valなどのように表示される。

アシルカルニチンやアミノ酸の全体のプロフィールを見る方法を「スキャン法」というが、最初から測定する目標化合物を決めて、その化合物に対応するイオン質量数を設定して分析する方法をMRM法という。MRM法はスキャン法に比べて測定感度が数十倍に上がるが、全体のプロフィールを見ることはできなくなる。血液ろ紙を使用する新生児マススクリーニングでは、感度を上げるためMRM分析の方がポピュラーになっている²⁾。

VII. 後天性代謝異常症の診断

小児救急の場で急性脳症などに遭遇すると背景疾患のスクリーニングのために、タンデムマス分析やGC/MS分析がポピュラーになりつつある。先天代謝異常の診断のみならず、後天性代謝障害を評価することもできる。例えば、ケトン性ジカルボン酸尿症は非常に強いケトーシスによってβ酸化が抑制されていることを表わし、非ケトン性ジカルボン酸尿症では、何らかの要因でβ酸化が抑制されていることが推測される。この他、食事性のビオチン欠乏やビタミンB12欠乏、あるいは、チアミン欠乏による高乳酸血症、あるいは肝障害に伴うチロシン代謝の

