

- [50] D. Wang, T. Wood, M. Sadilek, C.R. Scott, F. Turecek, M.H. Gelb, Tandem mass spectrometry for the direct assay of enzymes in dried blood spots: application to newborn screening for mucopolysaccharidosis II (Hunter disease), *Clin. Chem.* 53 (2007) 137–140.
- [51] S. Blanchard, M. Sadilek, C.R. Scott, F. Turecek, M.H. Gelb, Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for mucopolysaccharidosis I, *Clin. Chem.* 54 (2008) 2067–2070.
- [52] N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Tay–Sachs and Sandhoff diseases: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards, *Clin. Chim. Acta* 318 (2002) 133–137.
- [53] T.A. Duffey, T. Khaliq, C.R. Scott, F. Turecek, M.H. Gelb, Design and synthesis of substrates for newborn screening of Maroteaux–Lamy and Morquio A syndromes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5994–5996.
- [54] F. Turecek, C.R. Scott, M.H. Gelb, Tandem mass spectrometry in the detection of inborn errors of metabolism for newborn screening, *Methods Mol. Biol.* 359 (2007) 143–157.
- [55] Y. Li, C.R. Scott, N.A. Chamoles, A. Ghavami, B.M. Pinto, F. Turecek, M.H. Gelb, Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening, *Clin. Chem.* 50 (2004) 1785–1796.
- [56] T. Oguma, S. Tomatsu, A.M. Montano, O. Okazaki, Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 368 (2007) 79–86.
- [57] T. Oguma, S. Tomatsu, O. Okazaki, Analytical method for determination of disaccharides derived from keratan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo-ionspray ionization tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 356–362.
- [58] S. Tomatsu, A.M. Montano, T. Oguma, V.C. Dung, H. Oikawa, M.L. Gutierrez, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, M. Fukushi, L.A. Barrera, K. Kida, M. Kubota, T. Orii, Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolysaccharidosis II and III by tandem mass spectrometry, *Mol. Genet. Metab.* 99 (2010) 124–131.
- [59] A. Tluczek, C. Zaleski, D. Stachiw–Hietpas, P. Modaff, C.R. Adamski, M.R. Nelson, C.A. Reiser, S. Ghate, K.D. Josephson, A tailored approach to family-centered genetic counseling for cystic fibrosis newborn screening: the Wisconsin model, *J. Genet. Couns.* 20 (2011) 115–128.
- [60] S.J. Korzeniewski, W.I. Young, H.C. Hawkins, K. Cavanagh, S.Z. Nasr, C. Langbo, K.R. Teneyck, S.D. Grosse, M. Kleyn, V. Grigorescu, Variation in immunoreactive trypsinogen concentrations among Michigan newborns and implications for cystic fibrosis newborn screening, *Pediatr. Pulmonol.* 46 (2011) 125–130.
- [61] V. Paracchini, M. Seia, S. Raimondi, L. Costantino, P. Capasso, L. Porcaro, C. Colombo, D.A. Coviello, T. Mariani, E. Manzoni, M. Sangiovanni, C. Corbetta, Cystic fibrosis newborn screening: distribution of blood immunoreactive trypsinogen concentrations in hypertrypsinemic neonates, *J. Inher. Metab. Dis. Rep.* 4 (2012) 17–23.
- [62] A.M. Comeau, F.J. Accurso, T.B. White, P.W. Campbell III, G. Hoffman, R.B. Parad, B.S. Wilfond, M. Rosenfeld, M.K. Sontag, J. Massie, P.M. Farrell, B.P. O'Sullivan, Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report, *Pediatrics* 119 (2007) e495–e518.
- [63] A.M. Montañó, H. Oikawa, S. Tomatsu, T. Nishioka, C. Vogler, M.A. Gutierrez, T. Oguma, Y. Tan, J.H. Grubb, V.C. Dung, A. Ohashi, K. Miyamoto, T. Orii, Y. Yoneda, W.S. Sly, Acidic amino acid tag enhances response to enzyme replacement in mucopolysaccharidosis type VII mice, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 178–189.
- [64] J.E. Wraith, Enzyme replacement therapy for the management of the mucopolysaccharidoses, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 47 (2009) S63–S65.
- [65] S. Byers, T. Rozaklis, L.K. Brumfield, E. Ranieri, J.J. Hopwood, Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS, *Mol. Genet. Metab.* 65 (1998) 282–290.
- [66] M.P. Gallegos-Arreola, M.V. Machorro-Lazo, S.E. Flores-Martinez, G.M. Zuniga-Gonzalez, L.E. Figuera, A. Gonzalez-Noriega, J. Sánchez-Corona, Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy subjects and in patients with mucopolysaccharidoses, *Arch. Med. Res.* 31 (2000) 505–510.
- [67] P. Mabe, A. Valiente, V. Soto, V. Cornejo, E. Raimann, Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests, *Clin. Chim. Acta* 345 (2004) 135–140.
- [68] E.R. Berman, J. Vered, G. Bach, A reliable spot test for mucopolysaccharidoses, *Clin. Chem.* 17 (1971) 886–890.
- [69] K.C. Huang, K. Sukegawa, T. Orii, Glycosaminoglycan excretion in random samples of urine, *Clin. Chim. Acta* 151 (1985) 141–146.
- [70] K.C. Huang, K. Sukegawa, T. Orii, Screening test for urinary glycosaminoglycans and differentiation of various mucopolysaccharidoses, *Clin. Chim. Acta* 151 (1985) 147–156.
- [71] H. Humbel, S. Etringer, A colorimetric method for the determination of sulphated glycosaminoglycans, *Rev. Roum. Biochim.* 11 (1974) 21–24.
- [72] J.G. de Jong, R.A. Wevers, C. Laarakkers, B.J. Poorthuis, Dimethylmethylene blue based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses, *Clin. Chem.* 35 (1989) 1472–1477.
- [73] C.B. Whitley, M.D. Ridnour, K.A. Draper, C.M. Dutton, J.P. Neglia, Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion, *Clin. Chem.* 35 (1989) 374–379.
- [74] T.C. Wood, K. Harvey, M. Beck, M.G. Burin, Y.H. Chien, H.J. Church, V. D'Almeida, O.P. van Diggelen, M. Fietz, R. Giugliani, P. Harmatz, S.M. Hawley, W.L. Hwu, D. Ketteridge, Z. Lukacs, N. Miller, M. Pasquali, A. Schenone, J.N. Thompson, K. Tylee, C. Yu, C.J. Hendriksz, Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA, *J. Inher. Metab. Dis.* 36 (2013) 293–307.
- [75] C.B. Whitley, K.A. Draper, C.M. Dutton, P.A. Brown, S.L. Severson, L.A. France, Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. II. Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on a paper matrix, *Clin. Chem.* 35 (1989) 2074–2081.
- [76] J.G. de Jong, J.J. Hasselman, A.A. van Landeghem, H.L. Vader, R.A. Wevers, The spot test is not a reliable screening procedure for mucopolysaccharidoses, *Clin. Chem.* 37 (1991) 572–575.
- [77] S. Iwata, K. Sukegawa, M. Kokuryu, S. Tomatsu, N. Kondo, S. Iwasa, T. Orii, Glycosaminoglycans in neonatal urine, *Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal.* Ed. 82 (2000) F78.
- [78] S. Iwata, K. Sukegawa, T. Sasaki, M. Kokuryu, S. Yamasita, A. Noma, S. Iwasa, N. Kondo, T. Orii, Mass screening test for mucopolysaccharidoses using the 1,9-dimethylmethylene blue method: positive interference from paper diapers, *Clin. Chim. Acta.* 264 (1997) 245–250.
- [79] H.K. Berry, Screening for mucopolysaccharide disorders with the Berry spot test, *Clin. Biochem.* 20 (1987) 365–371.
- [80] V. Shih, "Toluidine Blue O Spot Test (Berry Spot Test)" and "Alcian Blue Spot Test", chap. 5, 103–106; 109–118, *Laboratory Techniques for the Detection of Hereditary Metabolic Disorders*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
- [81] C. Chih-Kuang, L. Shuan-Pei, L. Shyue-Jye, W. Tuen-Jen, MPS screening methods, the berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in Sanfilippo and Morquio syndromes, *J. Clin. Lab. Anal.* 16 (2002) 253–258.
- [82] G. Gray, P. Claridge, L. Jenkinson, A. Green, Quantitation of urinary glycosaminoglycans using dimethylene blue as a screening technique for the diagnosis of mucopolysaccharidoses: an evaluation, *Ann. Clin. Biochem.* 44 (2007) 360–363.
- [83] T. Orii, The urinary acid mucopolysaccharides in normal male children, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349 (1968) 816–822.
- [84] A. Kimura, S. Hayashi, K. Tsurumi, Chemical structure of urinary dermatan sulfate excreted by a patient with the Hunter syndrome, *Tohoku J. Exp. Med.* 131 (1980) 241–247.
- [85] A. Kimura, S. Hayashi, M. Koseki, H. Kochi, K. Tsurumi, Fractionation and characterization of urinary heparan sulfate excreted by patients with Sanfilippo syndrome, *Tohoku J. Exp. Med.* 144 (1984) 227–236.
- [86] J.J. Hopwood, H. Elliott, Urinary excretion of sulphated N-acetylhexosamines in patients with various mucopolysaccharidoses, *Biochem. J.* 229 (1985) 579–586.
- [87] K. Murata, K. Murata, K. Yoshida, High-performance liquid chromatographic identification of eight constitutional disaccharides from heparan sulfate isomers digested with heparitinases, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 670 (1995) 3–10.
- [88] L. Toma, C.P. Dietrich, H.B. Nader, Differences in the non-reducing ends of heparan sulfates excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: a new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes, *Lab. Invest.* 75 (1996) 771–781.
- [89] R. Hata, Y. Nagai, A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis, *Anal. Biochem.* 45 (1972) 462–468.
- [90] J.J. Hopwood, J.R. Harrison, High-resolution electrophoresis of urinary glycosaminoglycans: an improved screening test for the mucopolysaccharidoses, *Anal. Biochem.* 119 (1982) 120–127.
- [91] R. Humbel, N.A. Chamoles, Sequential thin layer chromatography of urinary acidic glycosaminoglycans, *Clin. Chim. Acta* 40 (1972) 290–293.
- [92] E. Wessler, Analytical and preparative separation of acidic glycosaminoglycans by electrophoresis in barium acetate, *Anal. Biochem.* 26 (1968) 439–444.
- [93] C.A. Pennock, I.C. Barnes, The mucopolysaccharidoses, *J. Med. Genet.* 13 (1976) 169–181.
- [94] E.J. Thonar, L.M. Pachman, M.E. Lenz, J. Hayford, P. Lynch, K.E. Kuettner, Age related changes in the concentration of serum keratan sulphate in children, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26 (1988) 57–63.
- [95] S. Tomatsu, A.M. Montañó, T. Oguma, V.C. Dung, H. Oikawa, T.G. de Carvalho, M.L. Gutiérrez, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, M. Fukushi, N. Sakura, L. Barrera, K. Kida, M. Kubota, T. Orii, Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I, *J. Inher. Metab. Dis.* 33 (2010) 141–150.
- [96] D.J. Rowan, S. Tomatsu, J.H. Grubb, A.M. Montañó, W.S. Sly, Assessment of bone dysplasia by micro-CT and glycosaminoglycan levels in mouse models for mucopolysaccharidosis type I, IIIA, IVA, and VII, *J. Inher. Metab. Dis.* 36 (2013) 235–246.
- [97] S. Tomatsu, A.M. Montañó, T. Oguma, V.C. Dung, H. Oikawa, T.G. de Carvalho, M.L. Gutiérrez, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, M. Fukushi, K. Kida, M. Kubota, L. Barrera, T. Orii, Validation of keratan sulfate level in mucopolysaccharidosis type IVA by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Inher. Metab. Dis.* (Jan 27 2010), <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-009-9013-x>.
- [98] J.P. Hintze, S. Tomatsu, T. Fujii, A.M. Montano, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, M. Fukushi, T. Ishimaru, T. Orii, Comparison of liquid chromatography–tandem mass spectrometry and sandwich ELISA for determination of keratan sulfate in plasma and urine, *Biomark. Insights* 6 (2011) 69–78.
- [99] L.A. Martell, R.L. Cunico, J. Ohh, W. Fulkerson, R. Furneaux, E.D. Foehr, Validation of an LC–MS/MS assay for detecting relevant disaccharides from keratan sulfate as a biomarker for Morquio A syndrome, *Bioanalysis* 3 (2011) 1855–1866.
- [100] J. de Ruijter, M.H. de Ru, T. Wagemans, L. Ijlst, A.M. Lund, P.J. Orchard, G.B. Schaefer, F.A. Wijburg, N. van Vlies, Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III, *Mol. Genet. Metab.* 107 (2012) 705–710.
- [101] J. de Ruijter, L. Ijlst, W. Kulik, H. van Lenthe, T. Wagemans, N. van Vlies, F.A. Wijburg, Heparan sulfate derived disaccharides in plasma and total urinary excretion of glycosaminoglycans correlate with disease severity in Sanfilippo disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 36 (2013) 271–279.
- [102] S. Tomatsu, A.M. Montañó, V.C. Dung, A. Ohashi, H. Oikawa, T. Orii, L. Barrera, W.S. Sly, Enhancement of drug delivery: enzyme replacement therapy for murine Morquio A syndrome, *Mol. Ther.* 18 (2010) 1094–1102.
- [103] M.H. de Ru, L. van der Tol, N. van Vlies, B.W. Bigger, C.E. Hollak, L. Ijlst, W. Kulik, H. van Lenthe, M.A. Saif, T. Wagemans, W.M. van der Wal, R.J. Wanders, F.A.

- Wijburg, Plasma and urinary levels of dermatan sulfate and heparan sulfate derived disaccharides after long-term enzyme replacement therapy (ERT) in MPS I: correlation with the timing of ERT and with total urinary excretion of glycosaminoglycans, *J. Inherit. Metab. Dis.* 36 (2013) 247–255.
- [104] C. Auray-Blais, P. Lavoie, H. Zhang, R. Gagnon, J.T. Clarke, B. Maranda, S.P. Young, Y. An, D.S. Millington, An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper, *Clin. Chim. Acta* 413 (2012) 771–778.
- [105] C. Auray-Blais, P. Bhérier, R. Gagnon, S.P. Young, H.H. Zhang, Y. An, J.T. Clarke, D.S. Millington, Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI, *Mol. Genet. Metab.* 102 (2011) 49–56.
- [106] R. Lawrence, J.R. Brown, K. Al-Mafraji, W.C. Lamanna, J.R. Beitel, G.J. Boons, J.D. Esko, B.E. Crawford, Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 197–204.
- [107] D.J. Rowan, S. Tomatsu, J.H. Grubb, B. Haupt, A.M. Montañó, H. Oikawa, A.C. Sosa, A. Chen, W.S. Sly, Long circulating enzyme replacement therapy rescues bone pathology in mucopolysaccharidosis VII murine model, *Mol. Genet. Metab.* 107 (2012) 161–172.
- [108] L.L. McCabe, E.R. McCabe, Expanded newborn screening: implications for genomic medicine, *Annu. Rev. Med.* 59 (2008) 163–175.
- [109] D.C. Grootendorst, K.J. Jager, C. Zoccali, F.W. Dekker, Screening: why, when, and how, *Kidney Int.* 76 (2009) 694–699.

Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan

Seiji Yamaguchi¹⁾, Jamiyan Purevusren¹⁾, Hironori Kobayashi¹⁾, Yuki Hasegawa¹⁾, Yuichi Mushimoto¹⁾, Kenji Yamada¹⁾, Tomoo Takahashi¹⁾, Midori Furui¹⁾, Takeshi Taketani¹⁾, Seiji Fukuda¹⁾, Toshiyuki Fukao²⁾, Yosuke Shigematsu³⁾

1) Department of Pediatrics, Shimane University, Japan

2) Department of Pediatrics, Gifu University, Japan

3) Department of Medical Science and Pediatrics, Fukui University, Japan

Abstract

Expanded newborn mass screening (NBS) with tandem mass spectrometry (MS/MS) and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan are described. Prognosis of patients with inborn metabolic disease was compared between groups detected in the symptomatic and pre-symptomatic stages. Furthermore, clinical, biochemical and genetic findings of Japanese children with MCAD deficiency, which is a most important target of MS/MS screening, was investigated. Our study concluded as follows: 1) the detection incidence in MS/MS screening in Japan is totally about 1 in 9,000, which might be smaller than that of the other countries; 2) Outcomes of patients detected by NBS (pre-symptomatic stage) is more favorable than that of cases detected after symptomatic onset; 3) the incidence of MCAD deficiency in the Japanese population is 1 in 110 thousands, which is approximately 10 times smaller than that in Caucasian; 4) Japanese patients with MCAD deficiency have a common mutation, c.449-452delCTGA, which covers about 45% of alleles of MCAD gene, but not have 985A>G, which is a common mutation of Caucasians patients; 5) genotype/phenotype correlation was not observed in MCAD deficiency; 6) prognosis of the non-symptomatic group is much more favorable than that of the symptomatic group. In conclusion, it is indicated that detection of inborn metabolic disease in the pre-symptomatic stage by NBS is essential to prevent children affected with target diseases of NBS including MCAD deficiency from neurological impairments or infant death.

Key words

expanded newborn mass screening, MS/MS, MCAD deficiency, genotype/phenotype correlation, prevention of neurological impairment

< Correspondence >

Seiji YAMAGUCHI, MD
Professor, Department of Pediatrics,
Shimane University School of Medicine
89-1, En-ya-cho, Izumo, Shimane 693-8501, Japan
Tel: +81-853-20-2220 Fax: +81-853-20-2215
E-mail: seijiyam@med.shimane-u.ac.jp

1. Introduction

The expanded newborn screening (NBS) using tandem mass spectrometry (MS/MS) is becoming popular worldwide. In Japan, a pilot screening was initiated at Fukui University in 1997 (1), and the national

project of MS/MS screening (Principle Investigator, Dr. Seiji Yamaguchi, Shimane University) funded by Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour, and Welfare was started in 2004. For the pilot screening, about 10 laboratories in Japan joined up to 2012. The Japanese government issued notice urging implementation of MS/MS to NBS in 2011. Eventually, the MS/MS screening is becoming spread from 2012 to 2013 (2), and will initiate officially nationwide in next year (2014).

In the expanded NBS, it is considered that medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency is a most important screening target, particularly in Caucasian people, because the incidence is high (1 in 10,000), and MCAD deficiency is a causative disease of sudden infant death, and preventable by detection in NBS (3). In this paper, clinical and genetic aspects of MCAD deficiency as well as the results of the pilot MS/MS screening in Japan are described.

2. Pilot MS/MS Screening In Japan

a) Results of pilot MS/MS screening in Japan

A total number of babies screened by MS/MS during the period between 1997 and 2012 was 1,949,987 (about 1.95 million), and 217 cases affected with disease were found as shown in Table 1. The detection incidence of Japanese babies was calculated to be 1 in 8,986, while that in USA was estimated to be 1 in 4,353 (4). The prevalence of Japanese is likely smaller than that of the other countries.

b) The detection prevalence of each disease group

The incidence of amino acidemias was totally 1 in 27 thousands; that of organic

acid disorders, 1 in 22 thousands; and that of fatty acid disorders, 1 in 34 thousands. The most common disease in Japan was propionic acidemia, which was found in 1 in 45,349 (about 45 thousands); and phenylketonuria, 1 in 52,702 (53 thousands); followed by methylmalonic acidemia and MCAD deficiency, each of which in 1 in 108,333 (110 thousands). A considerable number of Japanese patients with propionic acidemia show a mild phenotype with a common mutation, 1304T>C (Y435C) in *PCCB* gene (5).

c) Comparison of outcomes between cases detected by NBS and by tests after symptomatic onset

Outcomes of cases with organic and fatty acid disorders detected in NBS were compared with those detected after symptomatic onset by MS/MS, GC/MS and/or molecular investigation in Shimane University. As shown in Table 2, in organic acid disorder, normal development was achieved in 58 of 70 cases (83%) of the NBS group, as of at least 1 year of age. In contrast, normal development was gotten in only 28 of 114 cases (19%) in the "symptomatic" group.

In fatty acid disorder, normal development was achieved in 40 of 45 cases (89%) in the NBS group, although that was in 25 of 52 cases (48%) in the symptomatic group. Hence, beneficial effect of NBS using MS/MS was indicated. Through the results of the pilot study, we proposed 16 kinds of disease which should be screened as primary targets as marked with black circle in Table 1, in consideration of the false negative rate, complexity of diagnostic approaches, or the benefit of detection by NBS.

Table 1. Results of the pilot screening using MS/MS in Japan (1997 to 2012)

Disease	No. of Cases	Incidence (Japan)	Estimated in USA*
AMINO ACIDEMIA	72	(1:27 K)	(1:15 K)
• Phenylketonuria	37	1: 53 K	1: 19 K
• MSUD	1	1: 1,950 K	1: 159 K
• Homocystinuria	3	1: 650 K	1: 38 K
• Citrulinemia type I	6	1: 330 K	1: 173 K
• Argininosuccinic A	2	1: 980 K	1: 591 K
Citrin deficiency	23	1: 85 K	n.a.
ORGANIC ACIDEMIA	87	(1: 22 K)	(1:16 K)
• Methylmalonic acidemia	18	1: 110 K	1: 67 K
• Propionic acidemia	43	1: 45 K	1: 276 K
• Isovaleric acidemia	3	1: 650 K	1: 129 K
• MCD	3	1: 650 K	1: 1,380K
• Methylcrotonylglycinuria	13	1: 150 K	1: 44 K
• HMGL deficiency	—	—	1: 1,380K
• Glutaric acidemia type1	7	1: 280 K	1: 109 K
β-ketothiolase deficiency	—	—	1: 591 K
FATTY ACID DISORDER	58	(1: 34 K)	(1:10 K)
• CPT1 deficiency	5	1: 390 K	n.a.
• VLCAD deficiency	12	1: 160 K	1: 69 K
• MCAD deficiency	18	1: 110 K	1: 17 K
• TFP/LCHAD deficiency	2	1: 980 K	1: 276 K
CPT2 deficiency	7	1: 280 K	n.a.
CACT deficiency	—	—	n.a.
Glutaric acidemia type 2	6	1: 330 K	n.a.
Carnitine uptake defect	7	1: 280 K	1: 49 K
SCHAD deficiency	1	1: 1,950 K	n.a.
TOTAL	Affected cases	217	
	Screened babies	1,949,987	
		1: 8,986	1: 4,353

●, primary target disease in the MS/MS screening in Japan. "K" means thousands. * Estimated incidence in USA, based on live birth for 2006 (n=4,138,349) (4). Abbreviation: —, not detected; n.a., not applicable; MCD, multiple carboxylase deficiency; HMGL, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase; CPT1 and CPT2, carnitine palmitoyl transferase-I and -II, respectively; VLCAD and MCAD, very-long-, and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, respectively; TFP, mitochondrial trifunctional protein; CACT, carnitine acylcarnitine translocase; LCHAD and SCHAD, long- and short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, respectively.

3. Clinical, Biochemical and Genetic Investigation of Japanese MCAD Deficiency

a) Outline of MCAD deficiency

MCAD deficiency was first discovered in children with sudden infant death syn-

drome-like illness in 1982, and has been found at an incidence of 1 in 10,000. A common mutation, 985A>G, covering about 90% of the alleles in this disease was seen among Caucasian population. Acute symptoms of MCAD deficiency include acute

Table 2. Comparison of outcomes between presymptomatic and symptomatic detection cases in Japanese children with organic academia and fatty acid disorder.

Disease	NBS (MS/MS screening)	Symptomatic (Shimane)
No. of cases	115	196
ORGANIC ACID DISORDER	70	144
Normal development	58 (83%)	28 (19%)
Handicaps or death	12 (17%)	116 (81%)
FATTY ACID DISORDER	45	52
Normal development	40 (89%)	25 (48%)
Handicaps or death	5 (11%)	27 (52%)

NBS, newborn mass screening, MS/MS screening, cases detected by the pilot study between 2004 and 2011. Symptomatic, cases after symptomatic onset and detected by MS/MS, GC/MS or molecular tests in Shimane University from 2001 to 2011.

encephalopathy-like symptoms, or even sudden death (6), following after long fasting or infection, although the patients have no symptoms in the stable condition. Concerning the prognosis, it has been claimed that as many as 35% of MCAD deficiency patients are asymptomatic lifelong, but that over 25% of the symptomatic cases die suddenly during the first episodic attack (3).

Abnormal laboratory tests in the acute condition include hypoglycemia or hyperammonemia. Biochemical markers in MS/MS analysis of blood acylcarnitines are elevation of C8, C6 or C10, or C8/C10. Elevation of hexanoylglycine (HG) and suberylglycine (SG) as well as dicarboxylic acids is often observed by GC/MS analysis of urinary organic acids.

b) Prevalence of MCAD deficiency in Japan

According to the results of pilot screening using MS/MS, MCAD deficiency was found at the incidence of 1 in 110 thousands, and was most common among fatty acid disorders in the pilot study of Japan, as shown in Table 1. However, the incidence is

about 10 times smaller than that of Caucasian whose incidence is 1 in 10 thousands (3).

c) Subjects of MCAD deficiency

Ages at onset, and diagnosis, clinical, biochemical and genetic findings of a total 20 Japanese cases whose blood C8 acylcarnitine, a diagnostic marker of MCAD deficiency, was over the cut off value (0.3 nmol/mL) in MS/MS analysis were investigated (Table 3). Cases 1 through 9 were identified after symptomatic onset (symptomatic group), while cases 10 through 18 were detected in the non-symptomatic or pre-symptomatic stage (non-symptomatic group). Cases 10 through 17 were detected by NBS while Case 18 was by the sibling screening using MS/MS. Acylcarnitine analysis was performed at Shimane University or the other laboratories. GC/MS analysis (7) and gene analysis (8) were performed at Shimane University. The final diagnosis was confirmed by gene analysis, which revealed that cases 19 and 20 were heterozygotes (carrier group). Clinical information was surveyed using questionnaire.

Table 3. Clinical, biochemical and genetic profiles of Japanese cases of MCAD deficiency

No.	Age at onset	Age at diag.	NBS	MS/MS	GC/MS		Genotype		Outcome
				C8 (<0.3)	HG	SG	Allele 1	Allele 2	
Symptomatic group									
1	8m	8m	—	5.97	11.1	44.5	c.449-452del	c.157C>T	impair
2	1y0m	1y0m	—	4.52	n.a	n.a	IVS4+1G>A	c.422 A>T	SID
3 ^a	1y0m	8y10m	—	1.57	45.4	29.6	c.449-452del	c.449-452del	impair
4	1y1m	1y1m	—	7.00	14.7	112.2	del. ex 11-12	del. ex 11-12	impair
5	1y3m	1y3m	—	high*	n.a	n.a	del. ex 11-12	del. ex 11-12	impair
6 ^b	1y4m	1y4m	—	3.33	9.9	15.3	c.449-452del	c.449-452del	impair
7	1y7m	1y7m	—	4.12	6.1	6.4	c.275C>T	c.157C>T	impair
8 ^a	1y8m	1y8m	—	4.75	69.3	1.2	c.449-452del	c.449-452del	SID
9	2y2m	2y2m	—	1.71	n.a	n.a	c.449-452del	c.449-452del	normal
Non-symptomatic group									
10	—	5d	+	5.92	12.9	14.8	c.1085G>A	c.843A>T	normal
11	—	5d	+	5.37	6.3	39.9	c.449-452del	c.154A>G	normal
12	—	5d	+	4.82	15.3	3.8	IVS3+2T>C	c.843 A>T	normal
13	—	5d	+	4.04	n.a	n.a	c.449-452del	c.212 G>A	normal
14	—	5d	+	2.78	11.5	5.9	c.449-452del	c.134 A>G	normal
15	—	5d	+	2.59	3.1	(-)	c.1085G>A	c.1184A>G	normal
16	—	5d	+	2.58	(-)	3.2	c.449-452del	IVS3+5G>A	normal
17	—	5d	+	0.49	9.7	1.5	c.449-452del	c.820 A>C	normal
18 ^b	—	5y5m	—	1.37	n.a	n.a	c.449-452del	c.449-452del	normal
Carrier group									
19	—	5d	+	0.44	(-)	(-)	c.845C>T	(-)	normal
20	—	4m	—	0.51	(-)	(-)	c.843A>T	(-)	normal

Cases 3 and 8 (a-a), and cases 6 and 18 (b-b) are sibling cases, respectively. Abbreviation: diag, diagnosis; NBS, newborn mass screening; —, none; +, NBS received; MS/MS, blood acylcarnitine analysis; GC/MS, urinary organic acid analysis; HG and SG, hexanoylglycine and suberylglycine, respectively; high*, elevated but detailed value not available. n.a, data not available in Shimane University; (-), not detected; SID, sudden infant death; c.449-452del, 4 base deletion of CTGA. impair, neurological impairments as sequellae. Unit: C8, nmol/mL (cut off, <0.3); HG and SG, peak area ratio to IS (%) (7) on GC/MS (normal, both undetectable).

d) Comparison between Symptomatic and non-symptomatic groups of MCAD deficiency

1) **Ages at onset and diagnosis:** In the symptomatic group, the ages at onset was 8 mo to 2 yr 2 mo. Cases 3 and 8, and cases 6 and 18, were siblings. In 9 cases of the non-symptomatic group, 8 cases were detected on 5 day after birth by NBS, and the other one (case 18) was identified at the age of 5 yr 5 mo by sibling screening.

2) **Clinical findings of symptomatic case:** In the symptomatic group, all 9 cases had acute encephalopathy or sudden death-like illness in the acute stage. Hypoglycemia was observed in all 7 cases tested, while hyperammonemia was seen in 4 of the 9 cases.

3) **Biochemical findings:** As shown in Table 2, C8 (cut off, <0.3 nmol/mL) ranged between 1.57 and 7.00 in the symptomatic group, while C8 did between 0.49 and 5.92

in the non-symptomatic group. No significant difference between these two groups was seen in the level of C8. The C8 value of the carrier group (cases 19 and 20) was 0.44 and 0.51, respectively, which was lower compared to those of the 18 affected cases. No significant difference was seen in the urinary excretion amounts of HG or SG between these two groups (Table 3).

4) Gene mutation: c.449-452delCTGA (c.449del4) was identified in 16 of 36 alleles (44%) in 18 Japanese patients with MCAD deficiency. The homozygote of c.449del4 mutants were observed in 4 and 1 cases in the symptomatic and non-symptomatic groups, respectively. A common mutation, 985A>G, found in Caucasian population was never identified in Japanese cases (8). On the other hand, it was reported that the c.449del4 mutation was in 3 of 5 alleles of 3 Korean MCAD deficiency cases (9). It would be interesting to investigate and compare the genotypes of Japanese MCAD deficiency with those of the other Asian countries and the other ethnic groups.

5) Outcomes: With respect to the outcomes, 8 of 9 cases of the symptomatic group resulted in severe handicaps or sudden death, whereas all 9 cases of the non-symptomatic group showed normal development and growth (Table 3). It was likely that there were no genotype/phenotype correlation, although existence of the correlation is not clear enough in the present point (10). These findings indicate that pre-symptomatic detection is important for the favorable outcome in MCAD deficiency. Namely, NBS is essential (11, 12). Furthermore, our data suggests no clear genotype/phenotype in MCAD deficiency.

4. Conclusion

Our study indicated that: 1) the detection incidence in MS/MS screening is totally about 1 in 9,000 in Japan, which might be 2 times smaller than that of other countries; 2) the outcomes of patients detected by NBS is more favorable compared with that of cases detected after symptomatic onset; 3) the incidence of MCAD deficiency is 1 in 110 thousands in Japanese population. This is approximately 10 times smaller than that in Caucasian population; 4) 45% of alleles of *MCAD* gene in Japanese patients have a common mutation, c.449-452delCTGA. The genetic background of Japanese cases is likely the same with Korean patients, but different from those in Caucasians with MCAD; 5) clinical severity of MCAD deficiency may be similar despite the different genetic mutations, suggesting that genotype does not necessarily predict phenotype in MCAD deficiency; 6) prognosis of the symptomatic cases with MCAD deficiency was poor, whereas that of the non-symptomatic group was excellent, indicating "pre-symptomatic detection" is essential to prevent children affected with MCAD deficiency from impairments or sudden death.

Acknowledgement

This study was supported in part by Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and the Grants-in-Aid Scientific Research. We thank the group member of the National Promotion Project for Newborn Mass Screening (PI, S. Yamaguchi) for providing precious information of the patients.

References

- 1) 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 Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 77639-48, 2002.
- 2) Yamaguchi S: Annual report of the national project of the Neonatal Mass Screening funded by the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan, 2013 (in Japanese).
 - 3) Stanley CA, Bennet MJ: Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation. *Nelson's Textbook* 19th ed. (eds by Berman RE, Kliegman RM, Jenson HB), Saunders, Philadelphia, p456-462, 2011.
 - 4) Therrell B, Lorey F, Frazier D, Hoffman G, Boyle C, Green D, Devine O, Hannon H: Impact of Expanded newborn screening - United States, 2006. *MMWR* 57: 1012-1015, 2008.
 - 5) Yorifuji T, Kawai M, Muroi J, Mamada M, Kurokawa K, Shigematsu Y, Hirano S, Sakura N, Yoshida I, Kuhara T, Endo F, Mitsubuchi H, Nakahata T: Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. *Human Genet* 111: 161-5, 2002.
 - 6) Ding JH, Roe CR, Iafolla AK, Chen YT, Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency and sudden infant death, *N Engl J Med* 325: 61-62, 1991.
 - 7) Kimura M, Yamamoto T, Yamaguchi S, Automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system, *Tohoku J Exp Med* 188: 317-334, 1999.
 - 8) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Clinical and Molecular Aspects of Japanese Children with Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Mol Gen Met* 107: 237-240. 2012.
 - 9) Ensenauer R, Winters JL, Parton PA, Kronn DF, Kim JW, Matern D, Rinaldo P, Hahn SH: Genotypic differences of MCAD deficiency in the Asian population: novel genotype and clinical symptoms preceding newborn screening notification. *Genet Med* 7: 339-43, 2005.
 - 10) Waddell L, Wiley V, Carpenter K, Bennetts B, Angel L, Andresen BS, Wilcken B: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: genotype-biochemical phenotype correlations, *Mol Genet Metab* 87: 32-39, 2006.
 - 11) Derks TG, Reijngoud DJ, Waterham HR, Gerver WJ, van den Berg MP, Sauer PJ, Smit GP: The natural history of medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands: clinical presentation and outcome, *J Pediatr* 148: 665-670, 2006.
 - 12) Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K: Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry, *N Engl J Med* 348: 2304-2312, 2003.
- 受付日：平成25年11月12日

MS 解析による代謝障害の診断

山口清次*

SUMMARY

質量分析 (MS) によって生体内の微量成分を一斉分析し、その代謝プロフィールから代謝障害部位が特定 (生化学診断) される。保険収載されている MS は、タンデム型質量分析計 (タンデムマス) とガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) である。タンデムマスで血中アミノ酸とアシルカルニチンを同時測定し、GC/MS によって尿中有機酸分析がおこなわれ、アミノ酸代謝異常症、有機酸・脂肪酸代謝異常症が診断される。チアミン (ビタミン B1) 欠乏症 (脚気)、ピオチン欠乏症、カルニチン欠乏症、あるいは肝硬変によるチロシン代謝障害などの後天性代謝障害も診断される。最近カルニチン欠乏症が注目されているが、その評価にはタンデムマスが不可欠である。

はじめに

代謝異常症の診断に質量分析 (mass spectrometry : MS) が普及しつつある。先天代謝異常診断のためのメタボロミクス解析、プロテオミクス解析に MS が応用されている。なかでも「ガスクロマトグラフィー質量分析計 (gas chromatograph MS : 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計 (タンデムマス) によるアシルカルニチン分析」は条件つきではあるものの最近保険収載された。さらに新生児マススクリーニングにタンデムマスが導入され、MS の臨床応用が広がりつつある¹⁾²⁾。MS では、微量の検体で高感度・高精度な網羅的分析が可能であり、先天的な代謝異常のみならず、後天的な代謝障害の評価にも応用される。また最近注目されているカルニチン欠乏の診断にも、タンデムマスが不可欠である。そこで、上記のタンデムマスと GC/

MS による代謝障害の評価法について述べたい。

代謝障害の診断に使われる MS

1) タンデムマス

タンデムマスは、MS が 2 つ直列に並んだ構造 (MS1 と MS2) で、高感度分析が可能である³⁾。MS1 と MS2 で測定された粒子の質量数を比較して測定したい代謝産物の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。検体の量は、新生児マススクリーニングでは、血液ろ紙の 3 mm 大のディスクでよく、血清ならば 10 μ L でも分析可能である⁴⁾⁵⁾。

タンデムマスでは、アミノ酸とアシルカルニチンが同時分析される。アミノ酸に関しては、アミノ酸分析計にくらべると精度は低く、分析項目も少ない。アシルカルニチン分析では、遊離カルニチン (C0) とアシルカルニチンが測定される。

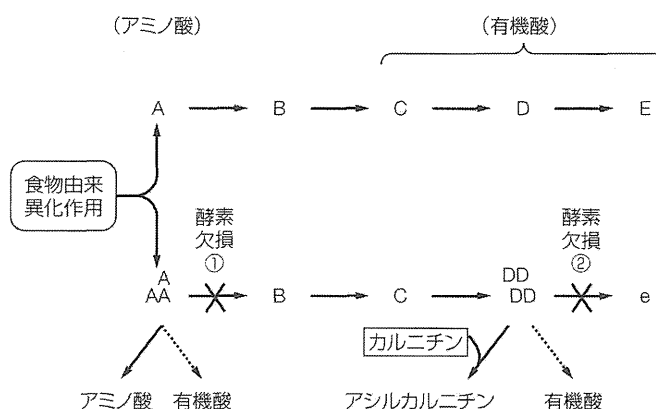
2) GC/MS

検体を誘導体化して揮発性の物質に変えて GC 分析する。GC から出てきた粒子は電子衝撃イオン化法で断片化され MS に導入される⁶⁾。マススペクトルは、分子構

KEY WORDS

- タンデムマス
- ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS)
- アシルカルニチン
- 有機酸
- カルニチン欠乏症

*YAMAGUCHI Seiji/島根大学医学部小児科



図① 先天代謝異常と生化学診断の原理

酵素欠損①はアミノ酸代謝異常，酵素欠損②は有機酸代謝障害の例である。アミノ酸代謝異常では，上流アミノ酸とそれから由来する特徴的な有機酸が検出される。有機酸代謝異常では，上流の中間体にあたる有機酸とそれに由来する代謝産物が増加する。

造の情報となる断片イオンが比較的多いため，異性体の同定も可能である。分析項目は尿中有機酸分析である。有機酸は弱酸であり体内に増加するとただちに尿中に排出されるため，尿の分析が用いられる。MSで一斉分析し，有機酸全体のプロフィールから代謝障害部位が特定される。

MSによる代謝異常の生化学診断

体内で代謝障害があると，図①に示すように障害部位の上流物質とそれに由来する異常代謝産物がMSで一斉分析される。タンデムマスとGC/MSの分析プロフィールから，代謝障害部位が推定される⁷⁾。

1) 生化学診断の原理

食物あるいは体内タンパクの異化に由来するアミノ酸の第1段階（または第2段階）の代謝障害のために，アミノ酸が増加した状態をアミノ酸代謝異常症という（図①のA→B）。タンデムマス（またはアミノ酸分析計）でアミノ酸を測定し，さらにGC/MSによる有機酸分析によってアミノ酸由来の代謝産物を検出して代謝障害部位を特定する。たとえば，表①に示すようにフェニルケトン尿症では，アミノ酸分析やタンデムマス分析で血中

フェニルアラニン（Phe）の増加，GC/MS分析（尿中有機酸）でフェニルピルビン酸などのような有機酸の増加がみられる。高チロシン血症では，血中チロシン（Tyr）の増加と，有機酸分析で4-OH-フェニル乳酸，サクシニルアセトンなどの増加がみられる。

有機酸代謝異常症は，アミノ酸の中間代謝過程に障害によって有機酸が増加し臓器障害を起こす疾患である（図①のD→E）。脂肪酸代謝異常症は，ミトコンドリアβ酸化障害のためにエネルギー産生不全に陥る疾患である⁸⁾。有機酸・脂肪酸代謝異常症では，特異的なアシルカルニチン，および有機酸プロフィールから生化学診断される。

2) 先天代謝異常症

アミノ酸の上昇があればそれに対応するアミノ酸代謝異常症が推定される。一方，有機酸・脂肪酸代謝異常症では，増加した有機酸や脂肪酸がアシルカルニチンとして細胞の外に排出される。血液中に排出されたアシルカルニチンをタンデムマスで測定する。そのアシルカルニチンプロフィールとGC/MS分析による有機酸プロフィールによって，障害部位が特定される。

たとえば，表①に示すように，プロピオン酸血症とメチルマロン酸血症は，アシルカルニチン分析（タンデム

表① 代謝障害と診断マーカーの例

分類	疾患	タンデムマス所見	有機酸所見 (GC/MS)
アミノ酸代謝異常	フェニルケトン尿症	Phe	フェニルピルビン酸 フェニル乳酸
	高チロシン血症	Tyr	4-OH-フェニル乳酸 サクシニルアセトン
有機酸代謝異常	プロピオン酸血症	C3	メチルクエン酸 プロピオニルグリシン
	メチルマロン酸血症		メチルクエン酸 プロピオニルグリシン メチルマロン酸
	イソ吉草酸血症	C5	イソバレリルグリシン
	ピパロイル基結合抗菌薬の長期投与によるカルニチン欠乏症		ジカルボン酸
脂肪酸代謝異常	MCAD 欠損症	C8	ヘキサノイルグリシン スベリルグリシン ジカルボン酸
	CPT2 欠損症	C16	ジカルボン酸
	原発性カルニチン欠乏症	C0 低下	ジカルボン酸
その他	B1 欠乏症 (脚気)	—	乳酸・ピルビン酸 分枝鎖 α ケト酸 α ケトグルタル酸

—：異常認めず。

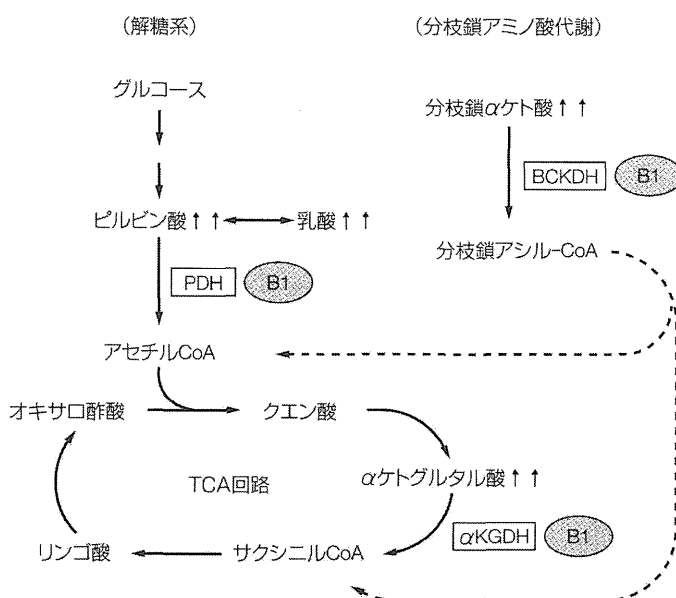
C3：プロピオニルカルニチン，C5：ペンタノイルカルニチン（イソバレリル，またはピパロイルカルニチン），C8：オクタノイルカルニチン，C16：パルミトイルカルニチン。

マス) では C3 が上昇するが両者の区別はできない。有機酸分析 (GC/MS) によって鑑別される。脂肪酸代謝異常症である中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase : MCAD) 欠損症では C8 の増加，長鎖脂肪酸代謝障害のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-2 (carnitine palmitoyl-transferase 2 : CPT2) 欠損症では C16 などの増加が決め手となる。

3) 後天性代謝異常症

後天的代謝異常として脚気を例示する (図②)。清涼飲料水の過剰摂取，アルコール中毒などのような栄養の偏りによって，現在でもチアミン (ビタミン B1) 欠乏が起こることが知られている。B1 を補酵素とする酵素とし

て，分枝鎖 α ケト酸脱水素酵素 (branched chain α -keto acid dehydrogenase : BCKDH) 複合体，ピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase : PDH) 複合体，あるいは α ケトグルタル酸脱水素酵素 (α -ketoglutarate dehydrogenase : α KGDH) 複合体などがある。B1 が欠乏するとこれら 3カ所が同時に障害され，それに対応する有機酸の異常がみられる⁹⁾。このほかにも後天的要因によるビオチン欠乏や，カルニチン欠乏，あるいは重篤な肝障害によるチロシン代謝産物の増加なども，MS による生化学診断が可能である。



図② ビタミン B1 欠乏症の代謝障害
 B1 欠乏症では、B1 を補酵素とする 3 つの酵素が同時に障害されて、乳酸、ピルビン酸、分枝鎖 α ケト酸、 α ケトグルタル酸が増加する。

カルニチンと代謝障害

1) 生体におけるカルニチンの役割

カルニチンは、体内では 99% 以上が組織内（大半は骨格筋、心筋）に貯蔵されている。カルニチンのおもな役割は以下の 2 つである（図③）。

- ① β 酸化の活性化：長鎖脂肪酸をミトコンドリアに転送して β 酸化の基質を供給する。
- ② 蓄積物質の解毒：代謝障害のためにミトコンドリア内に増加した有機酸や脂肪酸を細胞外に排出する。

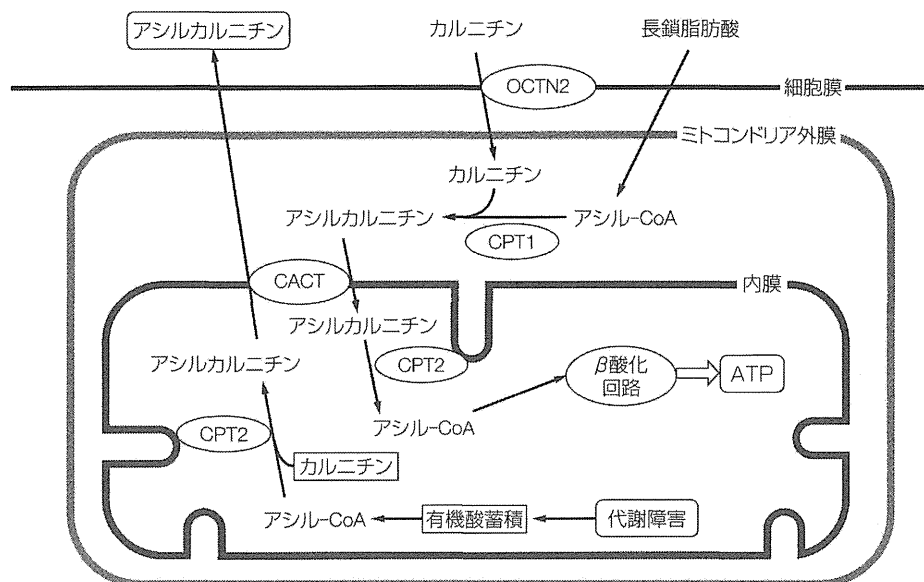
2) カルニチン欠乏をきたす疾患

カルニチン欠乏をきたす疾患を表②にあげている。

- ① 原発性カルニチン欠乏症（primary carnitine deficiency：PCD）¹⁰⁾：カルニチントランスポーター（organic cation transporter novel type 2：OCTN2）の先天的欠損によって起こる。とくに尿管におけるカルニチン再吸収障害のために、尿中にカルニチンが失われ、一方、体内ではカルニチン欠乏をきたす。したがって、カルニチンクリアランスは高値を

示す。タンデムマス分析で C0 低値、GC/MS 分析では β 酸化障害を反映して非ケトン性ジカルボン酸尿症を呈する。大量のレボカルニチン塩化物投与が奏効する。

- ② 有機酸代謝異常症：蓄積する有機酸によってカルニチンが過剰に消費されるために低カルニチン血症をきたす。C0 低下のほかに、疾患特異的なアシルカルニチンがみられる。脂肪酸 β 酸化異常症の一部〔CPT2 欠損症やカルニチン・アシルカルニチントランスロカーゼ（carnitine acylcarnitine translocase：CACT）欠損症〕でもカルニチン転送の障害のためにカルニチン低下をきたす。これらは原則としてレボカルニチン塩化物の投与が必要である。
- ③ カルニチン摂取障害：カルニチンの 75% は食物から摂取され、25% が体内で生合成される。偏った食事などによる食事性欠乏や、慢性腸疾患などによるカルニチン吸収障害があると、カルニチン欠乏が起こることがある。タンデムマス分析では PCD と類似した所見がみられるが、尿中 C0 排泄の増加はみられない点が異なる。



図③ カルニチンの役割

- ①β酸化の活性化：長鎖脂肪酸をアシルカルニチンとしてミトコンドリアに運搬しβ酸化の基質を提供する。
- ②異常代謝産物の解毒：蓄積した有機酸とアシルカルニチンとして細胞外に排出。

表② カルニチン欠乏の起こる原因

1. 原発性カルニチン欠乏症 OCTN2異常, カルニチン転送障害
2. 過剰消費による2次性欠乏 有機酸代謝異常症
3. カルニチン摂取障害 食事性欠乏, 慢性腸疾患(吸収障害)
4. 薬剤性 ピバロイル基結合抗菌薬の長期投与, バルプロ酸投与
5. 過剰喪失 透析(腎不全), 重症下痢
6. その他 肝硬変, 新生児などにおける合成能低下

④薬剤性：ピバロイル基をもつ抗菌薬（セフェム系など）の長期投与，バルプロ酸投与などによってカルニチンの消費が亢進して低カルニチンをきたすことがある¹¹⁾。とくにピバロイルカルニチンは炭素鎖5の脂肪酸であるため，タンデムマス分析ではC0の

低下とC5の増加がみられる。この所見はイソ吉草酸血症のそれに類似しているが，鑑別できない。有機酸分析をおこなうと図④に示すような2つのパターンがある。イソ吉草酸血症ならばイソバレリルグリシンが増加し，ピバリン酸によるカルニチン欠乏ならばβ酸化障害を反映してジカルボン酸尿がみられる。GC/MS分析によって先天性疾患か，後天性代謝異常かが鑑別される（表①参照）。

⑤カルニチンの過剰喪失：腎不全の透析患者¹²⁾，重篤な下痢などである。

⑥その他：肝硬変患者，新生児（とくに未熟児）のようなカルニチン合成能の低下などである。

3) カルニチン欠乏の臨床所見

低カルニチン血症とは，遊離カルニチンの血中濃度が20μM以下，アシルカルニチン/遊離カルニチンのモル比0.4以上をいう。カルニチンが欠乏するとβ酸化が阻害され，表③に示すようなβ酸化異常症に類似した所見を呈する。すなわち，全身倦怠，筋力低下，不整脈，心筋症状，急性脳症（痙攣，意識障害）などである。検査

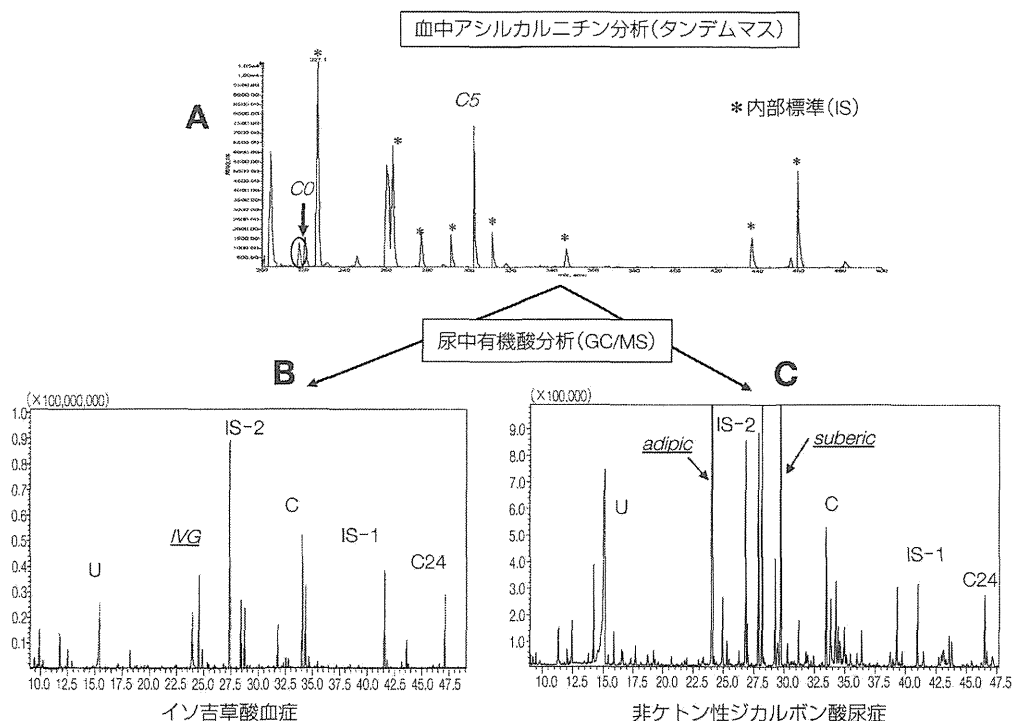


図4 アシルカルニチンの異常と有機酸分析による鑑別の例

- A) アシルカルニチン分析. 炭素鎖5 (C5) の増加と遊離カルニチンの低下を示している.
 - B, C は尿中有機酸分析所見である.
 - B) イソ吉草酸血症. イソバレリルグリシンの増加がみられる.
 - C) ピバロイル基結合抗菌薬の長期投与によるカルニチン欠乏症である. β 酸化障害を反映して非ケトン性ジカルボン酸尿症がみられる.
- IS2, IS1, および C24 は内部標準として加えた化合物である (それぞれトロパ酸, ヘプタデカン酸, およびテトラコサン).
- C5: ペンタノイルカルニチン (イソ吉草酸血症では, イソバレリルカルニチン, 抗菌薬長期使用例ではピバロイルカルニチンである), C0: 遊離カルニチン, U: 尿素, IVG: イソバレリルグリシン, C: クエン酸, adipic: アジピン酸, suberic: スベリン酸 (いずれもジカルボン酸である).

表3 カルニチン欠乏の臨床所見

症状	検査所見
全身倦怠	低血糖
筋力低下	低ケトン血症
不整脈	肝機能障害
心筋症状	高アンモニア血症
急性脳症	高乳酸血症

所見では, 低血糖, 肝機能障害, 高アンモニア血症, 高乳酸血症, および低ケトン血症などがみられる. タンデムマスで迅速な診断が可能である.

おわりに

MSの普及によって, 生体内の微量化合物の高精度分析が可能になり, 今後臨床への応用が拡大すると思われる. 小児科領域における先天代謝異常のみならず, 後天的な要因による代謝障害, すなわち栄養性のビタミン欠乏, カルニチン欠乏, 高乳酸血症, ケトーシス, 肝障害にとまなうチロシン代謝の障害など, 内科領域でもMSによる網羅的代謝病態の評価を通じて, 治療向上にも貢献することが期待される.



文 献

- 1) Miller JH 4th, Poston PA, Karnes HT : A quantitative method for acylcarnitines and amino acids using high resolution chromatography and tandem mass spectrometry in newborn screening dried blood spot analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **903** : 142-149, 2012
- 2) Janečková H, Hron K, Wojtowicz P *et al* : Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. *J Chromatogr A* **1226** : 11-17, 2012
- 3) 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
- 4) 重松陽介, 布瀬光子, 畑都江ほか : 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. *日マス・スクリーニング会誌* **8** : 13-20, 1998
- 5) 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
- 6) Yamaguchi S, Iga M, Kimura M *et al* : Urinary organic acids in peroxisomal disorders : a simple screening method. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **758** : 81-86, 2001
- 7) 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, 山口清次 (編著), 診断と治療社, 東京, 2011
- 8) Bennett MJ : Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis* **33** : 533-537, 2010
- 9) 山口清次, 長谷川有紀, 虫本雄一ほか : GC/MS 有機酸分析で発見される小児の後天性ビタミン欠乏症 : ビタミン B₁欠乏症とピオチン欠乏症. *ビタミン* **86** : 32-36, 2012
- 10) Nezu J, Tamai I, Oku A *et al* : Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* **21** : 91-94, 1999
- 11) Calò LA, Vertolli U, Davis PA *et al* : L carnitine in hemodialysis patients. *Hemodial Int* **16** : 428-434, 2012
- 12) Makino Y, Sugiura T, Ito T *et al* : Carnitine-associated encephalopathy caused by long-term treatment with an antibiotic containing pivalic acid. *Pediatrics* **120** : e739-e741, 2007

新生児スクリーニングの新時代：タンデムマス法の導入

島根大学医学部小児科

山口 清次

Key words

tandem mass
neonatal mass screening
prevention from impairments
inborn metabolic disease

はじめに

新生児マススクリーニング(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。1960年代にガスリーテストが開発されて以来、新生児MSは急速に広まった¹⁾。

最近、新しい検査法であるタンデムマス法を導入して、新生児MSの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²⁾。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。

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³⁾。1回の分析で多項目を非常に感度よく検査できるため、多数の疾患を同時にスクリーニングできる。

タンデムマス法では、オートサンプラーで自動的に試料を注入し連続的に分析する。1検体2分間の分析時間で済む。対象疾患は図1に示すように、現行のアミノ酸血症3疾患を含む20種類以上に拡大する。

タンデムマスを導入した拡大スクリーニング

従来の新生児MSは、6疾患を対象として原則として6種類の検査をしてきた。タンデムマス法では、一斉分析するためone test, multiple diseaseの検査である。

測定項目はアミノ酸とアシルカルニチンで、アミノ酸測定によってアミノ酸代謝異常症(尿素回路異常症を含む)、アシルカルニチン測定によって有機酸代謝異常症と脂肪酸代謝異常症がスクリーニングされる。

タンデムマス・スクリーニングの対象疾患

タンデムマス法では発見できる疾患数は多くなるが、新生児MSでは、多くの疾患を見つければよいものではなく、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。

厚生省研究班では、見逃しが少なく、発見されれば障害が予防または軽減できると判断された16疾患を「1次対象疾患」として提言している。一方、現時点では見逃す可能性の高いもの、あるいは発見されても障害予防効果が確認できないため引き続き検討するとしたものを「2次対象疾患」としている⁴⁾。

陽性者に対する対応

タンデムマス法で陽性者が発生した場合、現場での対応として以下のような方針で対応すべきであろう。

①測定値とカットオフ値の比較：測定値がカットオフ値をはるかに超えている場合、ほぼ疾患の可能性が高いとみて、精密検査で診断を確認する。疾患によっては、カットオフぎりぎりでも重大な健康被害をもたらす疾患もあるので注意を要する。

②再検査：検査施設で、同じ検体を用いて再度分析して、測定値を確認して結果を追加報告する。

③再採血検査：もう一度採血を依頼することをさす。この場合、家族の精神的ストレスは大きいので、慎重にすべきである。疾患頻度や再度採血すべき理由を丁寧に説明する必要がある。

④精密検査：疾患の可能性が高い場合、あるいは迅速に確定診断する必要があるとき、表1に示すような特殊検査によって確定診断を進められる。特殊検査とは、タンデムマスによる精密なアシルカルニチン分析、GC/MSによる尿中有機酸分析、リンパ球や培養細胞を用いる酵素活性、遺伝子解析などの遺伝学的検査をさす。

図1 タンデムマス導入によって拡大する対象疾患と頻度

* = 1997～2011年まで計156万人検査の結果(1997年からの福井大学のデータと2004年から始まった厚労省研究班試験研究のデータ)⁴⁾、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; TRANS=カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ。●=1次対象疾患、また2次対象疾患のうち略字: ア=アミノ酸代謝異常症; 有=有機酸代謝異常症; 脂=脂肪酸代謝異常症。

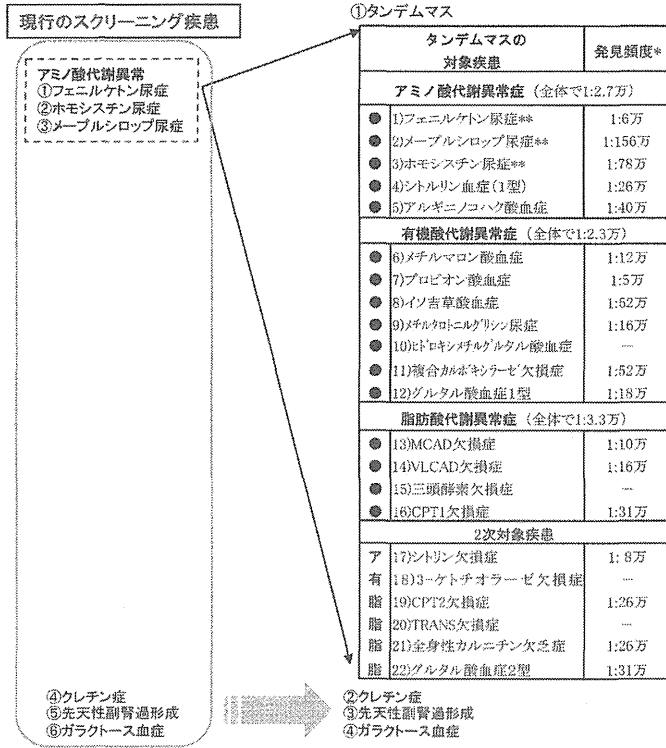


表1 確定診断のために必要な検査

疾患群	アミノ酸分析	有機酸分析(GC/MS)	遺伝学的検査	その他
アミノ酸代謝異常症	●	○	△	BH4負荷試験
尿素回路異常症	●	○	△	プテリン分析 血中アンモニアなど
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。△: 原則として不要。

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。

新生児マススクリーニングの課題

新生児MS事業が開始されて35年が経過する。この間、以下に示すような検討すべきいくつかの課題が提起されている⁵⁾。

(1) 精度管理

新生児MSは、生涯に1回きりの検査であり、見逃しは許されない。タンデムマス法のような高精度分析では特に重要である。第三者機関も含めた内部、外部の精度管理を継続的に続ける必要がある。

(2) 全国的診療支援ネットワーク体制

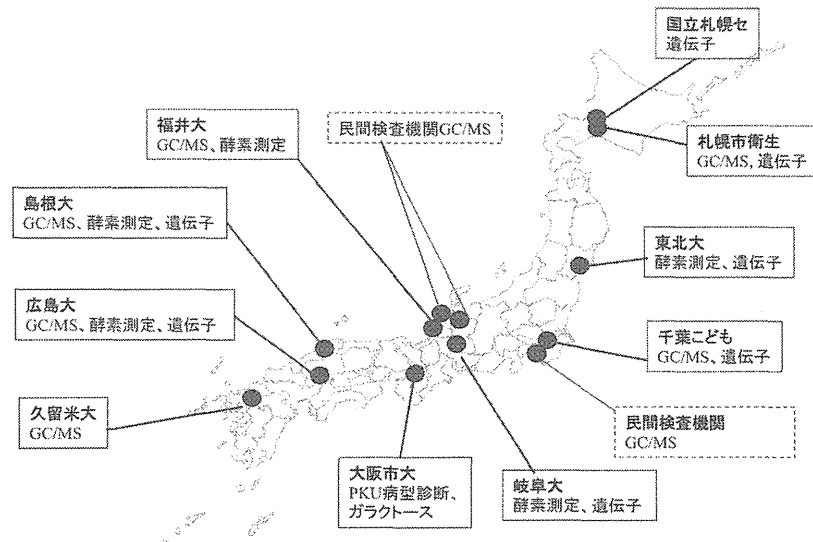
タンデムマス法によって発見される疾患は稀少疾患

である。各地域にこれらの専門家を置くことは現実的でない。そこで、特殊検査やコンサルタントを提供できる専門施設の全国ネットワーク体制を作っておく体制が現実的である。厚労省研究班では、図2に示すような2012年時点で専門施設の地図を作って、この体制作りを進めている。

どこでも適切な対応の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て、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効率的である。その他、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⁶⁾。

図2 確定診断のための特殊検査提供施設 (2012年時点)⁴⁾

特殊検査とは、負荷試験やブテリジン分析、アシルカルニチン分析、尿中有機酸分析、酵素活性測定、遺伝子解析などをさす。



(3) 患者の長期追跡体制

平成13年度より新生児MS事業が自治体事業となって以後、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、稀少疾患に対する診療技術向上、あるいは新生児MSの効果を社会に啓発するためにも、長期的な患者追跡体制は不可欠である。

(4) 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、孤独におちいりやすい。患者家族会や、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。

(5) 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いるが、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。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。またこれまで、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。

(6) 検査機関の効率的配置

タンデムマス1台で年間5万検体以上を分析する能力がある。従って1台の機器でできるだけ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。

タンデムマス導入にあたっては、1台のタンデムマスで少なくとも年間3万検体以上の検体を分析する効

率的配置を提言している。

(7) 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は自治体事業に移行した。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が自治体によって温度差が生じている。何らかの中央組織において、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。

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) 黒田泰弘：わが国における新生児マス・スクリーニングのあゆみ。小児科診療2000；63：1293-1302
- 2) McCabe LL, McCabe ERB：Expanded Newborn Screening：Implications for Genomic Medicine. Annual Review of Medicine 2008；59：163-175
- 3) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, et al：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：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
- 5) 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 2011；27(1)：36-41
- 6) 北川照男, 松田一郎, 多田啓也, 大浦敏明, 大和田操, 青木菊麿, 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スクリーニング対象疾患の治療指針。特殊ミルク改良開発部会編。恩賜財団母子愛育会, 2007

特集

新生児マススクリーニングの方法が大きく変わります

②

タンデムマス・スクリーニングとは



島根大学医学部小児科 やまぐち せいじ 山口清次

新生児マススクリーニングとは

知らずに放置すると障害を残すような生まれつきの代謝異常の病気を、新生児期の発症する前に見つけ早期介入して障害を予防する事業のことです¹⁾²⁾。

わが国では1977年から新生児マススクリーニング事業(新生児MS)が始まり、これまで6種類の病気を対象にしてきました。その結果を表1に示しています。日本人での頻度、治療効果、および費用便益も評価されています。

新生児マススクリーニングの方法

生後5日前後に、赤ちゃんの足底から微量の血液をとって、ろ紙(ガスリーろ紙)に染み込ませて、室温で乾燥させて検査センターに郵送

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

疾患	頻度	費用便益
1) フェニルケトン尿症	1:7万	○
2) メープルシロップ尿症	1:50万	△
3) ホモシスチン尿症	1:80万	△
4) ガラクトース血症(全体)	1:3万*	
(1型)	(1:80万)	△
(2型)	(1:60万)	
5) 先天性甲状腺機能低下症	1:3,000	◎
6) 先天性副腎過形成	1:2万	○

*ガラクトース高値の多くは酵素欠損でなく、門脈奇形やシトリン欠損症等の2次性のもので、真の先天性ガラクトース血症はきわめてまれである。6疾患全体での発見頻度(約1,600人に1人の頻度)

します。検査センターでは、血液ろ紙から3mm大のディスクを切り抜き、血液ろ紙に含まれるいろいろな成分を測定して病気を見つけます。

このうち枯草菌の培地の上にこの血液ろ紙のディスクをおき、一晚フラン器において菌の増殖輪の大きさによって調べる方法をガスリーテストといいます。微量の血液で、多く

の検体を安価に検査することができるので長い間新生児MSの代名詞になってきました。

タンデムマス法とは

タンデムマス法は、ガスリーテストに代わる方法として、1990年代から登場した検査法です。質量分析計を直列に2台並べた構造の分析

著者プロフィール 1975年岐阜大学医学部卒業。同小児科、徳島大学酵素研、信州大学生化学、米国エール大学遺伝研などでの研修を経て、1993年より現職。専門：有機酸・脂肪酸代謝異常の病因と病態の研究。現在、厚生労働省研究班の班長として、タンデムマス法を導入した新生児マススクリーニングの研究を進めている。