

分担研究課題

マススクリーニング検査精度向上に関する研究

研究分担者 重松陽介 (福井大学医学部 教授)

LC-MS による二次検査法開発

研究要旨

本邦では近年、新生児マススクリーニングにおいて質量分析装置の導入が進んだ。このスクリーニングで陽性となった場合、再採血や採尿を行った後、遺伝子検査を行ったり、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を使った分析などが行われたりしているが、このような検査は全ての施設で行うことは困難であり、診断の迅速化を妨げる原因となっている。このことから精度の高い二次検査法の開発が望まれている。本研究では、全国で用いられている質量分析装置でも導入可能な二次検査法として、本邦で新開発され市販化に成功したマルチモードクロマトグラフィーを用いて、代謝疾患マーカーを分離・定量分析する系の開発を行った。この系では一般の検査施設での一次検査では判別が難しいアミノ酸類やアシルカルニチン類の異性体判別が可能であったことに加え、従来のクロマトグラフィーでは分離困難だった有機酸やそのグリシン抱合体の分析も可能であった。この方法は一般検査施設で導入されている質量分析装置に「カラム」を接続するのみで行うことが可能であることから、診断の迅速化につながるのではないかと期待される。

研究協力者

中島英規 (国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室・研究員)

A . 研究目的

本邦において新生児マススクリーニング (NBS) 検査施設で使用されている質量分析装置は、カラムによる分離を行うことが可能な高速液体クロマトグラフィー (HPLC: LC) と三連四重極型質量分析装置 (QqQ-MS) が組み合わされた LC-MS が用いられている。しかしながら検査施設では多数の全新生児検体を測定する必要性から、スループット性を上げるためカラム分離を行わず、フローインジェクションという方法で一次検査が行われている。本研究は、診断の迅速化を目指すために

二次検査法としてこれまで GC/MS を用いた分析や、誘導体化しなければ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離分析が困難だったアミノ酸、有機酸などの代謝疾患マーカー分子をマルチモードクロマトグラフィーを用いて LC-MS による分離分析系を国内では初めて開発・市販化に成功した。

B . 研究方法

一般に HPLC カラムの充填剤にはシリカゲルやポリマーを担体として表面修飾を行ったものが使用される。最も汎用されるのはシリカゲル表面のシリル基をオクタデシルシリル基 (ODS) として修飾された逆相クロマトグラフィーである。このクロマトグラフィーは非常に優秀で、食品、環

境分野ばかりか薬物分析等にも使用される。

現在質量分析装置による NBS では、アミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常、有機酸代謝異常、脂肪酸代謝異常などが対象疾患であるが、これらの疾患マーカーはその代謝に関わる分子である。逆相クロマトグラフィーはその性質上、脂溶性の高い分子に対しては非常に有効であるが、質量分析装置によるマススクリーニングの対象疾患マーカーは水溶性のものが多く、一般に逆相クロマトグラフィーでは分離分析が困難であり、そのため煩雑な誘導体化方やガスクロマトグラフィーを用いた分析が行われてきた。本研究では Imtakt 社より市販化に成功したマルチモードクロマトグラフィーのカラムを用いた。このカラムはカラム充填剤担体表面を ODS による修飾を行うと同時に、陽イオン交換基、陰イオン交換基で「等価」に修飾したものが充填されている（図 1）。

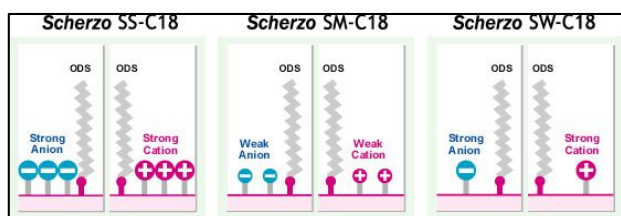


図 1 マルチモード担体表面構造

これまで海外メーカーからは陽イオン交換基あるいは陰イオン交換基いずれかで修飾されたものは市販化されていたが、「等価」に修飾することが非常に困難であり、Imtakt 社によって初めて市販化が成功した。この担体では、逆相クロマトグラフィーの性質と同時にイオン交換クロマトグラフィーの性質を持つことから、逆相クロマトグラフィーでは分離が困難だった様々な代謝疾患マーカーが分離分析することが可能となった。本研究における分離カラムは Imtakt 社製マルチモードカラム Scherzo SS-C18 (3.0 X 150 mm) を用い、グラディエント分離を行った。移動相には A pump: 0.5%ギ酸、B pump: (0.5 M ギ酸アンモニウム/0.5 M アンモニア = 9 : 1)/メタノール = 1 : 9 を用いた。つまり移動相 B へ移行するに従い、有機溶媒濃度を上げて ODS と相互作用する分

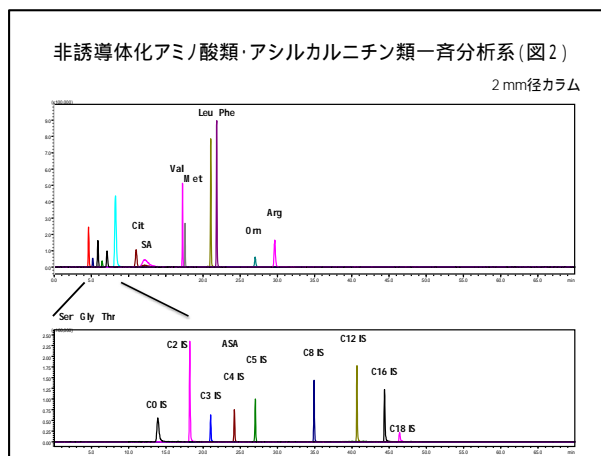
子を分離しつつ、イオン強度を上げてイオン交換基と相互作用する水溶性物質を分離するという方法である。測定対象分子によってグラディエント分析条件は変更した。流速は 0.4 mL/min、カラム温度は 37 とした。検出には島津 LCMS-8030 を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究では主に試薬として市販されている代謝疾患マーカー化合物を分析に用いたため、倫理面への配慮は特段必要ないと判断した。また市販されていない化合物については当研究室内で自己有機合成するか、株式会社ナード研究所から提供を受けた。実際の患者乾燥ろ紙血を用いた分析結果については、東京都予防医学協会石毛信之氏、福井大学医学部健康科学重松陽介教授より提供・実証いただいた。

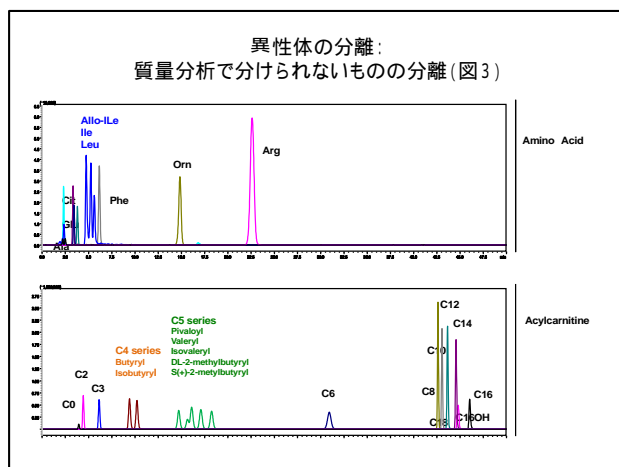
C. 研究結果

一般的な NBS において測定対象となるアミノ酸類・アシルカルニチン類は全て分離可能であった（図 2）。



またこの分離系では、メープルシロップ尿症のマーカー分子で一般の一次検査で行われるカラムを介さないフローインジェクションによる分析では判別が不可能な、アロイソロイシンの分離判別が可能であった。同様な例抗生剤投与時に高値となることで知られるイソバレリルカルニチンの異性体、特にピボシルカルニチンの分離判別

もが可能であった (図 3)



同様な例としてメチルマロン酸血症では、メチルマロン酸が血中で検出されるが、これは TCA サイクルの構成分子であるコハク酸と分子量が同一であるため質量分析装置のみでは判別不可能であるが、このクロマトグラフィーと併用することで分離分析が可能であった (data not shown)。この系では、これら分子ばかりでなく有機酸代謝異常症や脂肪酸代謝異常症とともに異常値を示すグリシン抱合体など他の疾患マーカーも分離分析及び判別定量が可能であった。例えば、プロピオン酸血症のマーカーである Propionylglycine、イソ吉草酸血症のマーカーである Isovalerylglycine、中鎖アシル - CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症のマーカーである Hexanoylglycine、ケトチオラーゼ欠損症、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症のマーカーである Tiglylglycine、これと同一分子量のメチルクロトニルグリシン尿症、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症のマーカーである 3-Methylcrotonylglycine など分離分析可能であったことから判別可能となったと考えられる。

D. 考察

これまでアミノ酸代謝異常症や尿素サイクル代謝異常症で異常値を示すアミノ酸の分析にはアミノ酸に特異な吸光吸収がないため、特異吸光や異性体分離を用意とするため、煩雑で測定値の

不確かさを増大させる要因になる誘導体化法による分析が行われてきた。

本研究によって、この測定値の不確かさ増大要因が極力少なくなる非誘導体化法で既に検査施設に導入されている質量分析装置を用いてアミノ酸の判別が可能となった。特にメープルシロップ尿症で判別が重要なアロイソロイシンに加え、ロイシン、イソロイシンの分離分析が可能になったことは非常に有益であると思われる。マルチモードクロマトグラフィーでは、逆相クロマトグラフィーによるカラム担体との相互作用要因の多様性がこのようなことを可能にしたと考えられる。

同様に検査施設で問題となっているピボキシル含有抗生剤投与時の C5 アシルカルニチン高値とイソ吉草酸血症の C5 アシルカルニチン高値について、その分別判定が可能となったことは再採血率低下に非常に有用と考えられる。

またこれまで有機酸、脂肪酸の分析には誘導体化して GC/MS 分析することが必須であったが、マルチモードクロマトグラフィーによって測定可能なものが増えてくるとと思われる。

また、今回条件決定した移動相、A pump: 0.5% ギ酸、B pump: (0.5 M ギ酸アンモニウム/0.5 M アンモニア = 9 : 1)/メタノール = 1 : 9 を用いれば HPLC の条件変更をするのみでカラム交換等行わずに様々な代謝疾患マーカーの分離・定量分析が可能になるとと思われる。検査施設の負担を減らす意味でも有用と考えられる。加えて、初回乾燥ろ紙血検体を用いて分析できる点は有利な点であり発展の可能性が高い。

今後、実際の患者検体を用いた実証試験、判定値の決定等必要になって来るとと思われる。また実際に検査施設で二次検査が行われるなら、精度管理体制の構築も必要になって来ると考えられる。

E. 結論

今回開発した方法を用いれば、一次検査で陽性となった検体、つまりこれまでは新生児家族に依

頼して再採血あるいは採尿して遺伝子検査や GC/MS によって診断しなければならなかったような症例でも、初回採取した乾燥ろ紙血検体で LC を併用した LC-MS によって高精度な二次検査法が可能になると考えられる。初回乾燥ろ紙血検体で判定可能になるということは、再採血あるいは採尿時に新生児家族の同意、説明が不要になるので、家族の負担軽減にも役立つ。初回乾燥ろ紙血検体を同一施設内で分析できるので診断の迅速化にもつながることが期待される。

F．健康危険情報

該当事項なし

G．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

1) 日本マス・スクリーニング学会 第 41 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、広島県、広島大学広仁会館、平成 26 年 8 月 22 日、23 日

2) 日本医用マススペクトル学会 第 39 回年会シ

ンポジウム、千葉県三井ガーデンホテル千葉、平成 26 年 10 月 16 日、17 日

3) 日本先天代謝異常学会 第 56 回日本先天代謝異常学会総会 第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、宮城県、江陽グランドホテル、平成 26 年 11 月 13 日～15 日

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

該当なし

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

株式会社積水メディカルより本成果の一部を応用した新生児マススクリーニングキット “アミノ酸・アシルカルニチン測定用内部標準液セット” NeoSMAAT™ ” 2015 年 2 月より上市予定