COMMENTARY

タンデム質量分析法による新生児マススクリーニング

Expanded Newborn Screening by Electrospray Ionization
Tandem Mass Spectrometry重松陽介^{*a)}・畑 郁江^{b)}・田中幸枝^{c)}

Yosuke SHIGEMATSU, Ikue HATA, and Yukie TANAKA

(Received October 25, 2004; Accepted January 6, 2005)

Electrospray ionization tandem mass spectrometry enables us the sensitive and quantitative analysis of many ionic compounds with high polarity, such as acylcarnitines and amino acids. In newborn screening programs using this new technology, many inborn errors of metabolism can be diagnosed simultaneously by the measurement of one small punch of blood spots. Quality of life of patients with target diseases is thought to be improved by early medical intervention to prevent sudden death in infancy or brain damage. Based on the limitation of this program recognized, methodological difficulties to be overcome in view of the false negative and false positive rate and modifications in our program are described.

1. はじめに

質量分析法の医学応用については、分析対象が生体試料であるという点が共通であるものの、分析対象物質のサイズや存在状態に応じてさまざまな取り組みがあり、また基礎研究から臨床検査までといった実際の疾病を有するヒトとの距離という点での多様性もある。ここでは、先天性代謝異常症を対象としタンデム質量分析計を用いる新生児マススクリーニング (MS/MS スクリーニング) という、診療と直接結びついた取り組みを紹介し、医療現場での質量分析法応用の現状を解説する。

2. 質量分析法と先天性代謝異常症の歴史

先天性代謝異常症では、遺伝子変異により酵素や輸送タンパクなどの機能が損なわれ、代謝過程に障害をきたす。結果として、生体機能物質の生成が一義的に減少して生命活動維持に支障をきたす場合や、当該酵素の基質が体内に高濃度に蓄積し毒性を発揮して身体機能障害をきたす場合

などがある。歴史を振り返ると、先天性代謝異常症研究は、この患者の体内に蓄積した病因物質を分析する技術とともに展開してきたことがわかる。物質の分離技法からみると、脂質代謝異常症は薄層クロマトグラフィー、アミノ酸代謝異常症は液体クロマトグラフィー、有機酸代謝異常症はガスクロマトグラフィーの応用により病態研究がなされてきた。そして、質量分析法がこれらにより分離された物質の同定に使用されてきた。

疾患の診断に当たり、遺伝子変異を確認したり機能タンパクの活性を測定したりするまでもなく、患者の体内に異常蓄積した病的物質を同定することにより疾患名を精度良く推定することを化学診断という。化学診断の利点として、分析の手間が少なく経費も少なくて済む点とか、あるいは機能障害の程度や治療効果を判断するための重要な情報を与える点などが挙げられる。ガスクロマト質量分析計による尿中有機酸、アミノ酸、糖、核酸などの一斉分析は、関連の先天性代謝異常症の医療支援検査技術として欠くべからざるものとなっている¹⁾。

次に、FAB-MS/MS法を用いるとアシルカルニチンという極性の高い物質が簡便に精度良く分析できることが示された。アシルカルニチンとは、Fig. 1に示すように、カルニチンと脂肪酸が結合したもので、ミトコンドリア外膜

Fig. 1. Structures of free carnitine and acylcarnitine.

*a) 福井大学医学部看護学科健康科学 (〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月 23)

Division of Health Science, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui (23 Shimoaizuki, Matsuoka-cho, Fukui 910-1193, Japan)

b) 福井大学医学部小児科 (〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月 23)

Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui (23 Shimoaizuki, Matsuoka-cho, Fukui 910-1193, Japan)

c) 福井大学総合実験研究支援センター・バイオメディカル研究支援分野 (〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月 23)
Centers for Advanced Research Support, University of Fukui (23 Shimoaizuki, Matsuoka-cho, Fukui 910-1193, Japan)

で産生されてミトコンドリア内に搬入され、脂肪酸 β 酸化系に長鎖アシル CoA を供給する。 β 酸化過程の一連の鎖長のアシルカルニチンの変化を検出することにより β 酸化異常症の化学診断が可能になる。しかしながら、アシルカルニチンはアシル基の鎖長で極性が大きく変化するので、生体試料中のアシルカルニチンを一斉分析することはそれまで困難だったのである。そして、1990年には、アシルカルニチンとアミノ酸を分析する新生児マススクリーニングへの研究的応用が報告されている²⁾。その後イオン化法として FAB 法に替わり、electrospray ionization (ESI) 法が実用化されると多検体処理が可能となり、1997年に実用的な MS/MS スクリーニングが報告され³⁾、欧米を中心に取り組みが進んでいる。

MS/MS スクリーニングの対象疾患は、脂肪酸 β 酸化異常症、有機酸代謝異常症、アミノ酸代謝異常症などの約 30 種類の先天性代謝異常症である。新生児のごく少量の血液をしみこませた直径 3 mm のろ紙ディスク 1 個に含まれるアシルカルニチンとアミノ酸を分析することにより、これらの疾患を一斉に診断することができる。早期診断と早期治療により、これらの疾患で見られる乳幼児期の突然死や脳障害を防ぐことができる。ただし、これらの疾患の中には、頻度が極めて低く治療の有用性が十分確認されていないものも含まれる。また人種により対象疾患の頻度も異なると考えられており、欧米でのこのマススクリーニングに関する知見が妥当かどうか検討する目的で、筆者らは日本において 1997 年よりパイロット研究を開始した^{4), 5)}。スクリーニング方法にも改良を加えながら、これまで約 23 万新生児の検査を行い 30 例の患者を見だし、その多くの患児において早期治療により生活の質の改善を実現してきている。

3. MS/MS スクリーニング機器と分析方法

MS/MS スクリーニングに使用するのは、トリプル四重極型タンデム質量分析計である。96 穴マイクロプレートのウェルに入れた分析試料 15 μ L を、液体クロマトグラフのオートインジェクタを用いて、流速 20 μ L/min の移動相に flow injection し、ESI 装置で質量分析計内に分析対象物質イオンを導入する。すなわち、LC カラムを用いたクロマト分離は行わない。試料液および移動相は 50% アセトニトリルである。注入サイクルは約 2 分であり、1 プレート分の検体を約 3 時間で分析できる。複数のマイクロプレートを搭載可能なオートインジェクターを使うことで、夜間自動運転が可能である。

MS/MS スクリーニングの古典的な MS/MS 分析では、アシルカルニチン分析では、Fig. 2 と 3 に示すように precursor ion scan を行い、アミノ酸分析では、Fig. 4 と 5 に示すように neutral loss scan を行うことで、一斉分析する。分析結果の視覚的確認や想定外の病変の認識にはこのようなスキャン分析が有用である。一方、高感度分析法としては、特にアミノ酸の分析においては、各々の物質ごとに、第 1 四重極 (Q1) での分子量関連イオンと第 3 四重極 (Q3) でのフラグメントイオンを連結し分析する selected reaction monitoring (SRM) が行われる。SRM でも、比較

Fig. 2. Fragmentation of acylcarnitine butyl esters in a collision chamber by collision-induced dissociation (CID).

Fig. 3. Acylcarnitine profiles obtained by ESI-MS/MS analysis with precursor ion scanning of m/z 85 in newborn blood spots of a patient with glutaric aciduria type I (A) and of a control infant (B). The ion peaks indicate the molecular ions of butyrate acylcarnitines as follows: free carnitine (C0, 218), acetyl (C2, 260), propionyl (C3, 274), glutaryl (C5DC, 388), C16-acyl (C16, 456), C18:1-acyl (C18:1, 482). The peaks with an asterisk indicate the stable isotope-labeled internal standards. Their masses are as follows: free carnitine- $^2\text{H}_3$ (221), acetylcarnitine- $^2\text{H}_3$ (263), propionylcarnitine- $^2\text{H}_3$ (277), butyrylcarnitine- $^2\text{H}_3$ (291), octanoylcarnitine- $^2\text{H}_3$ (347), glutaryl carnitine- $^2\text{H}_9$ (397), palmitoylcarnitine- $^2\text{H}_3$ (459).

Fig. 4. Fragmentation of amino acid butyl esters in a collision chamber by CID.

Fig. 5. An amino acid profile obtained by ESI-MS/MS analysis with neutral loss scanning of m/z 102 in a control newborn blood spot. The ion peaks indicate the molecular ions of butyrate amino acids as follows: alanine (Ala, 146), valine (Val, 174), leucine and isoleucine (Leu, 188), phenylalanine (Phe, 222), tyrosine (Tyr, 238). The peaks with an asterisk indicate the stable isotope-labeled internal standards. Their masses are as follows: alanine- $^2\text{H}_3$ (149), valine- $^2\text{H}_8$ (182), leucine- $^2\text{H}_{10}$ (198), phenylalanine- $^2\text{H}_5$ (227), tyrosine- $^2\text{H}_2$ (240).

的多数の物質の分析を設定でき、また、各々に CID 電圧を最適化し高感度分析ができる⁵⁾。

試料調製は、メタノールによる抽出と誘導体化のステップのみで、比較的単純である。新生児の血液をしみこませたろ紙を直径 3 mm の円形ディスクに打ち抜き、96 穴マイクロプレートのウェルに各々 1 個ずつ入れる。そこに一定量のメタノール溶液（定量用の安定同位体標識内部標準を含む）を加え、一定時間振とうしアシルカルニチンとアミノ酸を抽出する。抽出液は、別のマイクロプレートに移し、ノズル式ドライヤーの窒素気流下で乾涸する。これに塩酸ブタノールを加え、ふたで密閉した上でオーブンに入れ 65°C に加熱し、カルボン酸をブチルエステルとする。これを再び窒素気流下で乾涸し、50% アセトニトリルに再溶解し、MS/MS 分析に供する。

4. スクリーニング検査の実際と課題

新生児マススクリーニングの主な要件として、①早期発見が可能で早期治療が有効である疾患を対象にすること、②大量検体処理が現実的な経費で可能な方法が存在すること、③疾患頻度や医療経費を考慮したうえで便益性があること、などが挙げられる。

①の要件については、MS/MS スクリーニングで検出できる約 30 疾患のすべてが該当するわけではないので、該

当するもののみを選択する必要がある。このためには、スキャン分析を行わないで、SRM により特定の物質のみを分析し対象疾患を限定することになる。

②については、夜間自動分析を行うことで 1 台の機器で年間 5~10 万検体を分析できる。日本で生まれる年間 110 万人の新生児をスクリーニングするのに約 20 台の機器があればよい計算になる。1 サンプル当たりの分析費用は多く見積もっても 100 円は超えない。現在、国や自治体が行っている新生児マススクリーニングでは、アミノ酸、糖、ホルモンの 6 検査項目を HPLC や ELISA 法で分析しており、その分析経費として一人当たり約 2,000 円が支出されている。アミノ酸分析 3 項目は MS/MS スクリーニングでも可能であり、年間約 2 万検体以上分析すると、機器償却費や人件費を加味しても、現行のアミノ酸分析に要する費用で MS/MS スクリーニングもまかなえる。このように、大規模検体処理とすれば MS/MS スクリーニングは経済的といえる。

③については、個々の対象疾患の頻度は希であるが、すべての対象疾患の累積頻度はパイロット研究では 7,000 人に一人程度であり、十分対応する意義があると判断される。しかも、多くの対象疾患の治療は、食事療法や飢餓を避けるといった日常生活での対応が主であり、高額な医療費を必要としない。ただ、そのような対応のみで心身障害を予防できるという証明がまだ十分でないので、さらに発見された患者に対する医療支援体制の整備と実績の積み重ねが必要である⁶⁾。

MS/MS スクリーニングの方法論はほぼ確立されているといえるが、解決すべき問題がないわけではない。

一つには、アシルカルニチン定量分析の精度が必ずしも良くないことである。アシルカルニチンのアシル基の結合は必ずしも強固ではなく、室温での自然放置によっても徐々にアシル基がはずれ遊離カルニチンが生成する。ましてや、塩酸ブタノールを用いた誘導体化の過程でアシルカルニチンから比較的多くの遊離カルニチンが生じる。このことは、前記の MS/MS スクリーニングの方法では、遊離カルニチンの定量値は実際の値と比べ過大であり、精度が十分でないことを意味する。体内の遊離カルニチンが低下し脂肪酸代謝不全をきたす「カルニチントランスポータ異常症」のスクリーニングには、遊離カルニチンの減少を正確に同定することが必要であるが、この点で上記の問題は深刻である。この「カルニチントランスポータ異常症」は、日本人に比較的多い（4 万人に一人）疾患であり、かつカルニチン服用により簡単に確実に治療できるという点で重要な対象疾患と考えられる。

実は、遊離カルニチンとアシルカルニチンの定量は、誘導体化なしでも部分的には可能である⁷⁾。遊離カルニチンの定量については Fig. 6 に示すように実用的に行える。ただしアシルカルニチンについては、通常使用される MS/MS 機器の性能では、イオン化効率が悪いいため、実用的な精度での高感度分析にはならない。特に、重要な対象疾患であるグルタル酸尿症の診断指標物質グルタリルカルニチ

Fig. 6. Mass spectra obtained by ESI-MS/MS analysis with product ion scanning of m/z 162, that is, molecular ion of underivatized carnitine (A), and with precursor ion scanning of m/z 102 in blood spot of a control newborn (B). The ion peak C0 (162) indicates the molecular ion of free carnitine, and the peak with an asterisk (165) indicates free carnitine- $^2\text{H}_3$.

ンの分析でこの傾向が著しい。Fig. 3 に示したように、誘導体化による分析でもグルタリルカルニチンの下限カットオフ値の設定は難しく、カットオフ値が高すぎたため見逃しが生じたとする報告もある。

この解決法として、一つには遊離カルニチンの分析だけ、誘導体化しないで別途行うか、あるいはさらに高感度分析が可能な MS/MS 機器を使用して、すべての項目を誘導体化なしで分析するかを選択することになる。前者は、手間と時間（あるいは機器）が余分に必要であり、後者は機器が高額となるので、どちらにしても経費が膨らむことになる。

5. ま と め

MS/MS スクリーニングでは MS/MS が医療用機器として使用されている。この場合、医療現場での生命倫理の観点から、検出される病的状況が個人の生活に与える影響を常に意識していなければならない。マススクリーニング検査であるので、対象疾患を適切に選択する作業が必須である。次に、選択した対象疾患について、診断の精度が問われる。MS/MS スクリーニングに本質的に存在する疑陽性や偽陰性（見逃し）を最小化するために、高感度分析あるいは補助診断法の追加とその精度管理が必要である。

大量検体分析という観点からは、分析の迅速性や経済性

への要求に応える必要がある。検査検体受付から結果報告までという臨床検査としてのシステム整備も必要である。ここでは、コンピュータシステムを利用して、使いやすさと無誤謬化が追求されなければならない。これらは相反する要件を含み、必ずしも容易に対処できるわけではないが、今後の検討課題である。

文 献

- 1) T. Kuhara, *J. Chromatogr. B*, **758**, 3 (2001).
- 2) D. S. Millington, N. Kodo, D. L. Norwood, and C. R. Roe, *Inher. Metab. Dis.*, **13**, 321 (1990).
- 3) M. S. Rashed, M. P. Buchnall, D. Little, A. Awad, M. Jacob, M. Al Amoudi, M. Al Wattr, and P. T. Ozand, *Clin. Chem.*, **43**, 1129 (1997).
- 4) Y. Shigematsu, I. Hata, Y. Kikawa, M. Mayumi, Y. Tanaka, M. Sudo, and N. Kado, *J. Chromatogr. B*, **731**, 97 (1999).
- 5) Y. Shigematsu, I. Hata, Y. Tanaka, M. Sudo, N. Sakura, G. Tajima, and S. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **776**, 39 (2002).
- 6) R. P. Insinga, R. H. Laessig, and G. L. Hoffman, *J. Pediatr.*, **141**, 524 (2002).
- 7) A. Schulze, C. Schmidt, D. Kohlmuller, G. F. Hoffmann, and E. Mayatepek, *Clin. Chim. Acta*, **335**, 137 (2003).

Keywords: Tandem mass spectrometry, Newborn screening, Carnitine, Inborn error of metabolism