

安定同位体希釈法を利用したタンデムマスによる新生児スクリーニングにおける溶媒中の水分含量と塩酸添加の影響

阿部敦子 太田紀之 福士 勝 藤田晃三

要 旨

タンデムマスにより新生児スクリーニングを行う際、アミノ酸、アシルカルニチンなどの指標物質は、乾燥ろ紙血液から安定同位体を内部標準物質として含むメタノール溶液で抽出することとなるが、このメタノール溶液について、水分含量、塩酸添加の有無の異なる3種類の抽出溶媒を用いた場合の正常検体の各指標物質の血中濃度の分布を検討したところ、オルニチンとアルギニノコハク酸などのアミノ酸では分布が異なっていたが、他のアミノ酸、アシルカルニチンについては、検討した範囲内では分布にそれほど差は無かった。

1. 緒 言

安定同位体希釈法を用いたタンデムマスによる新生児スクリーニングは、1990年代半ばから、メープルシロップ尿症¹⁾、ホモシスチン尿症²⁾、MCAD欠損症³⁾などの疾患で成果が報告されている。2005年4月から札幌市でも本法を用いたパイロットスタディを行っているが、それに先立ち行った添加回収試験の結果では、メチオニン、バリン、アルギニンなどのアミノ酸の回収率が50%程度と低く⁴⁾、メタノール溶液はアミノ酸の抽出効率が悪いと考えられた。そこで、抽出溶媒A(0.06%含水、塩酸酸性)、抽出溶媒B(0.2%含水)、抽出溶媒C(1%含水)の3種類の抽出溶媒を用いてそれぞれ1000検体程度の正常検体を分析し、血中濃度値の分布を比較したのでその概要を報告する。

2. 方 法

2-1 試 薬

安定同位体標準物質：SetA(グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチン、シトルリン、アルギニンの安定同位体混合

物)及びsetB(フリーカルニチン(C0d9)、アセチルカルニチン(C2d3)、プロピオニルカルニチン(C3d3)、プチリルカルニチン(C4d3)、イソ吉草酸カルニチン(C5d9)、オクタノイルカルニチン(C8d3)、ミリストイルカルニチン(C14d9)、パルミトイルカルニチン(C16d3)の安定同位体混合物)(Cambridge Isotope Lab.Inc.)

アミノ酸安定同位体標準液原液1：SetAに、0.1N塩酸溶液0.3 mlを加え溶かした後、10mlのメスフラスコに移し、メタノールで定容した。

アミノ酸安定同位体標準液原液2：SetAに、水1 mlを加え溶かした後、10mlのメスフラスコに移し、メタノールで定容した。

アシルカルニチン安定同位体標準液原液：SetBにメタノールを加え溶かした後、10mlに定容した。

抽出溶媒A：アミノ酸安定同位体標準液原液1、アシルカルニチン安定同位体標準液原液それぞれ2 mlを100 mlのメスフラスコで混合し、メタノールで定容した。

抽出溶媒B：アミノ酸安定同位体標準液原液2、アシルカルニチン安定同位体標準液原液それぞれ2 mlを100 mlのメスフラスコで混合し、メタノールで定

容した。

抽出溶媒C：アミノ酸安定同位体標準液原液2、アシルカルニチン定同位体標準液原液それぞれ2mlと水0.8 mlを100 mlのメスフラスコで混合し、メタノールで定容した。

ブチル化用10%塩酸ブタノール試薬はガスクロマトグラフィー誘導体化用（東京化成）、アセトニトリル及びメタノールは液クロ用（和光純薬、関東化学）を用いた。

タンデムマス用移動相溶媒

アセトニトリル：水=8：2

2-2 検体

抽出溶媒A：2004年12月受付の994正常検体、抽出溶媒B：2005年4月～8月受付の5033正常検体、抽出溶媒C：2005年2月受付の1040正常検体は、いずれも検体の目的外使用の承諾のあるものを使用した。

2-3 装置

測定機器はQuatromicro API(Waters)、送液装置として2795(Waters)を用いた。

振とう抽出用シェーカー：SANKO MX-4

ブチル化用ヒーター：トーホーエコサームIC22

2-4 前処理

直径3mmのろ紙ディスク1枚を平底のマイクロプレートに取り、抽出溶媒200µLを加え、シールをして20分間緩やかに攪拌した。抽出液すべてを別の丸底マイクロプレートに移し、窒素気流下40℃で乾固させた。10%塩酸ブタノール試薬50µLを加え、ガラス板で蓋をし、60℃で15分間加熱しブチル化した後、窒素気流下40℃で乾固させた。残渣に移動相溶媒180µLを加えブチルエステルを溶かし、うち10µLをタンデムマスに注入した。

2-5 定量

測定条件は前報⁴⁾に同じ。

各指標物質の血中濃度は、安定同位体同位物質とのピーク高比からろ紙ディスク1枚が血液3µLに相当するとして計算した。安定同位体同位物質が無いアシルカルニチンのうち、ヘキサノイルカルニチン(C6)と3-ヒドロキシイソ吉草酸カルニチン(C50H)

はC5d9を、デセノイルカルニチン(C10:1)、デカノイルカルニチン(C10)及びグルタリルカルニチン(C5DC)はC8d3を、ドデカノイルカルニチン(C12)と3-ヒドロキシミリスチルカルニチン(C140H)はC14d9を、C16:1, C160H, C18, C18:10HはC16d3をそれぞれ用いて血中濃度計算を行った。また、アルギニノコハク酸(A S A)については、カットオフ値の設定などは、濃度ではなくピーク高で行っているため、ピーク高の分布を比較した。

3. 結果及び考察

抽出溶媒A～Cを用いて得られた各物質の血中濃度値から度数分布表を作成し、最も度数の大きい級の高さをあわせ、折れ線グラフとして表した図をFig 1～Fig 3 2に示した。

オルニチンでは、抽出液の水分含量が増すにつれ、分布が僅かに高濃度側にシフトしており、水分含量の増加により、多少抽出効率が向上したと考えられる。また、メチオニン、シトルリン、及びA S Aにおいては、抽出溶媒Bより水分含量が多い抽出溶媒Cの方が分布が高濃度側にシフトしているが、抽出溶液に塩酸を含むAは、Bと同等かより高濃度側にシフトした分布となっており、これは、塩酸の添加により抽出効率が改善されたためと考えられる。逆にロイシン、グルタミン酸では、水、塩酸の添加により低濃度側にシフトする傾向があった。A S Aでは分布の差が顕著であったが、この物質を指標とするA S Aリアーゼ欠損症患者のピーク高は正常値の数十から数百倍程度の高値となるため、抽出液の水分含量の多少のずれがスクリーニング結果に影響を与えることはないと考えられる。

その他のアミノ酸、アシルカルニチンについては、水分含量、塩酸の添加の影響は顕著には現れなかった。

4. 結 語

正常検体の分布を比較することにより、アミノ酸等の乾燥ろ紙ディスクからの回収率をある程度予想

することができた。アミノ酸の中には溶媒の差により分布が異なるものもあったが、スクリーニングには支障ないと考えられた。

5. 文 献

- 1) Donald H. Chace, Steven L. Hillman et al :
Rapid Diagnosis of Maple Syrup Urine
Disease in Blood Spots from Newborns by
Tnadem Mass Spectrometry.Clin. Chem.,41,62-
68,1995
- 2) Donald H. Chace, Steven L. Hillman, David S.
Millington et al:Rapid Diagnosis of
homocystinuria and other
hypermethioninemias from newborns' blood
spots by tandem mass spectrometry. Clin.
Chem. ,42,349-355,1996
- 3) Donald H. Chace, Steven L. Hillman et al:
Rapid diagnosis of MCAD deficiency:
quantitative analysis of octanoylcarnitine
and other acylcarnitines in newborn blood
spots by tandem mass spectrometry. Clin.
Chem. ,43,2106-2113,1997
- 4) 阿部敦子、野町祥介、花井潤師 他：タンデム
マスによる新生児スクリーニングの基礎的検討 .
厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研
究事業 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 平成16年
度 総括分担研究報告書,90-97, 2004

The Effect of Water Content and Hydrochloric Acid in Extract Solution for Newborn Screening using Tandem Mass Spectrometry

Atsuko Abe, Noriyuki Oota, Masaru Fukushi and Kozo Fujita

The effect of water content and addition of hydrochloric acid was examined by comparing the frequency distribution of concentration values of compounds in normal samples using three kinds of methanol solution with stable isotope internal standards. Solution A contains 0.06 micro molar HCl and 0.06v/v % H₂O, solution B contains 0.2 v/v% H₂O, and solution C contains 1v/v% H₂O.

Generally, higher water content of the extraction solution is found to make the extraction efficiency of amino acids from dried blood spots better. In Ornithne, higher water content (solution B or C) shifted the distribution to higher concentration. In methionine, citrulline, and argininosuccinate(ASA), efficiency using solution A is same or higher than solution B, which is supposed to be the effect of HCl. Although the small difference of efficiency in ASA, of the extract solution gives prominent difference in distribution, misjudgement will not occur because ASA-lyase deficiency patients have 100 times higher value than normal newborns.In other amino acids or acylcarnitines, difference of solution did not affect much in the extraction efficiency.











