

# タンデム質量分析計による非誘導体化法アミノ酸・アシルカルニチン 一斉分析 - 現行のブチル誘導体化法との比較

野町祥介 仲島知美 櫻田美樹 太田紀之 福士 勝 矢野公一 Ulrich G Jensen<sup>\*1</sup>

## 要 旨

タンデム質量分析計によるアミノ酸及びアシルカルニチン類の一斉分析には、それらのブチル誘導体を用いる方法が一般的である。しかし、ブチル誘導体化のための前処理に2時間程度を要すほか、複数のプレートの前処理を同時に行えないなどの非効率的な側面が存在する。これを改良するために、Perkin Elmer社製のキットを用いた非誘導体化法による一斉分析が、当所の分析システムで使用可能かどうか、他の方法と比較等を行うことで検討したところ、良好な成績が得られた。

## 1. 緒 言

札幌市では、2005年4月から、新生児マス・スクリーニング事業の効果を高めることを目的として、「タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングの試験研究」を実施している<sup>1)</sup>。これはタンデム質量分析計(以下;タンデムマス)により、多種のアミノ酸とアシルカルニチン類を同時に測定することで、対象疾患を増やし、効率的かつ効果的なマススクリーニングを行うことを目的としている。一方で、タンデムマスによるこれらの指標物質の測定は、イオン化効率を上げるために、指標物質をブチル誘導体化して測定することが一般的<sup>2-8)</sup>で、そのために煩雑な前処理を必要とするデメリットがあった。

前処理を簡便化するために、ブチル誘導体化を必要としない分析方法(非誘導体化法)が、いくつか検討されているが<sup>9-11)</sup>、今回、Perkin Elmer社製のキット“NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Non-Derivatized Tandem Mass Spectrometry Kit”により、当所の分析システム〔Quattromicro API(英MicroMass)と送液装置 alliance-HT2795

(Waters)〕を用いて、誘導体化法と同等の検査が非誘導体化法により実施可能か検討した。また、合わせて、Perkin Elmer社製のブチル誘導体化キット“NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Tandem Mass Spectrometry Kit”についても検討を行い、比較による評価を行った。

## 2. 方 法

札幌市で試験研究開始時から用いているブチル誘導体化による方法(以下;A法)の前処理は、以下の手順で行っている<sup>12)</sup>。

### (1) 溶出液の調整

Labeled amino acid standards (set A) (Cambridge Isotope Laboratories; CIL)を0.5mlの水にて超音波振盪により溶出した後、メタノールで10mlにメスアップし、Set A stock solutionとする。また、Labeled acylcarnitine standards (set B) (CIL)を約1mlのメタノールにて超音波振盪により溶出した後、メタノールで10mlにメスアップし、Set B stock solutionとする。Set A stock solution 2mlにSet B stock solution 2mlを加え、これをメタノールで50mlにメ

\*1 PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Denmark

スアップすることで溶出液を調整する。

(2) 抽出

平底プレート (IMMUNO Plate 439454, nunc) に乾燥ろ紙血液検体から3mmディスクをパンチし、調整した溶出液100 µlを分注し、20分間の振盪により抽出し、抽出液とする。

(3) ブチル化

抽出液のほぼ全量をU底プレート (SJ103-22, 三光純薬) に移し、窒素気流下37度で溶媒を留去する。その後、10% 塩化水素1-ブタノール溶液 (Wako) 50 µlを分注し、ガラス製の蓋をし、60度で15分間反応させる。

(4) 試料溶液の調整

反応の終了後、ただちに窒素気流下37度で溶媒を留去したのち、アセトニトリル：水 (4:1) 溶液180 µlにより振盪溶出し、これを最終的な試料溶液とする。

Perkin Elmer社製のキット“NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Non-Derivatized Tandem Mass Spectrometry Kit”による非誘導体化法 (以下; B法) と、同じくPerkin Elmer社製のキット“NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Tandem Mass Spectrometry Kit”によるブチル誘導体化法 (以下; C法) の二法については、キットに付属しているプロトコールに従って、前処理を行った。また、プレート等の消耗品や安定同位体ラベルスタンダード等の試薬は、すべてキットに添付しているものを用いた (表1、表2参照)。

測定は、いずれの方法においても、分析システム Quattromicro API (英MicroMass) と送液装置 alliance-HT2795 (Waters) を使い、フローインジェ

クション法および Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードにより解析することで行った。

分析における断片化のプロセス (Collision Induced Dissociation; CID) を図1に、各指標物質および安定同位体ラベルスタンダードと、それぞれの方法において用いたプリカーサーイオン (Q1)、プロダクトイオン (Q3) 及びそれらの質量荷電比 (m/z) 等の測定条件を、測定項目ごとに表3に示す。

比較検討には、札幌市の新生児代謝異常症等検査において、タンデム質量分析計による多項目検査を希望し、かつ研究へ使用の了承の得られた621件の新生児検体<sup>1)</sup>のほか、アメリカ疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention; CDC)、Perkin Elmer、(財)日本公衆衛生協会新生児スクリーニング研究開発センターの各精度管理用検体を用いた。各法のアッセイ内変動係数とアッセイ間変動係数は、Perkin Elmerの精度管理用検体を用いて、6回測定することにより行った。

表2 各法の簡易プロトコル

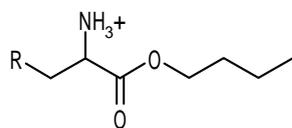
A法	B法	C法
<ul style="list-style-type: none"> <li>安定同位体を含むメタノール溶液で振盪抽出 (室温, 20分)</li> <li>窒素気流下で乾留 (37, 15分)</li> <li>塩酸ブタノールによるブチル化 (60, 15分)</li> <li>窒素気流下で乾留 (37, 20分)</li> <li>溶離液で振盪抽出 (室温, 5分)</li> <li>測定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定同位体を含むキット抽出液で振盪抽出 (30, 30分)</li> <li>測定</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定同位体を含むキット抽出液で振盪抽出 (30, 30分)</li> <li>窒素気流下で乾留 (37, 30分)</li> <li>塩酸ブタノールによるブチル化 (60, 30分)</li> <li>窒素気流下で乾留 (37, 20分)</li> <li>溶離液で振盪抽出 (室温, 10分)</li> <li>測定</li> </ul>

表1 各法における安定同位体ラベルスタンダード物質 (略表記した物質名称については表6を参照) d; 重水素 (<sup>2</sup>H; deuterium)

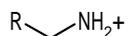
測定法	アミノ酸	アシルカルニチン
A法	<sup>15</sup> N, <sup>2-13</sup> C-Gly, d4-Ala, d8-Val, d3-Leu, d3-Met, <sup>13</sup> C6-Phe, <sup>13</sup> C6-Tyr, d5-OmHCl, d5-Cit, <sup>13</sup> C5-ArgHCl, d3-Asp, d3-Glu	d9-C0, d3-C2, d3-C3, d3-C4, d9-C5, d3-C8, d9-C14, d3-C16
B法、C法	<sup>15</sup> N, <sup>2-13</sup> C-Gly, d4-Ala, d8-Val, d3-Leu, d3-Met, d5-Phe, <sup>13</sup> C6-Tyr, d2-Om2HCl, d2-Cit, <sup>13</sup> Cd4-ArgHCl	d9-C0, d3-C2, d3-C3, d4-C4, d9-C5, d6-C5DC, d3-C6, d3-C8, d3-C10, d3-C12, d3-C14, d3-C16, d3-C18

・誘導体化法

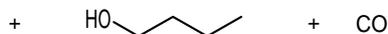
(1) アミノ酸の場合



Q1

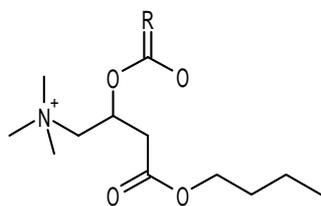


Q3

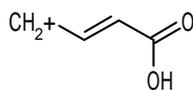


Neutral Loss of 102

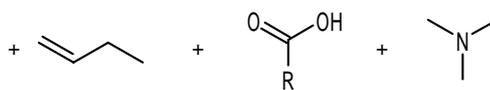
(2) アシルカルニチンの場合



Q1

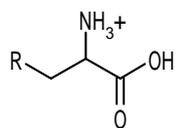


Q3 m/z = 85

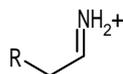


・非誘導体化法

(1) アミノ酸の場合



Q1

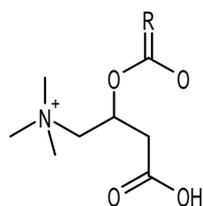


Q3

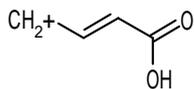


Neutral Loss of 46

(2) アシルカルニチンの場合



Q1



Q3 m/z = 85

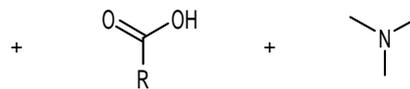


図1 各分析法における断片化のプロセス(Collision Induced Dissociation; CID)、および測定に用いるプリカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)の概略

表3 おもな測定物質の各法におけるタンデムマスでの分析条件 \*安定同位体ラベルスタンダード;表1参照

指標物質 (略称)	A法					B法					C法				
	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)
Gly	132	76	0.02	20	10	76	29.9	0.05	15	7	132	75.9	0.05	15	7
Gly*	134	78	0.02	20	10	78	31.9	0.05	15	7	134	77.9	0.05	15	7
Ala	146	44	0.05	20	15	90	43.9	0.05	15	10	146	43.9	0.05	16	10
Ala*	150	48	0.05	20	15	94	47.9	0.05	15	10	150	47.9	0.05	16	10
Val	174	55	0.2	20	30	118.1	72	0.05	16	10	174	71.9	0.05	16	10
Val*	182	62	0.2	20	30	126.1	80	0.05	16	10	182	79.9	0.05	16	10
Leu / Ile	188	86	0.02	20	15	132.1	86	0.05	16	11	188.1	85.9	0.05	16	12
Leu*	191	89	0.02	20	15	135.1	89	0.05	16	10	191.1	88.9	0.05	16	12
Met	206	104	0.02	20	15	150.1	104	0.05	15	10	206	103.9	0.05	16	12
Met*	209	107	0.02	20	15	153.1	107	0.05	15	10	209	106.9	0.05	16	12
Phe	222	120	0.02	20	15	166.1	120	0.05	15	12	222.1	119.1	0.05	18	14
Phe*	228	126	0.02	20	15	171.1	125	0.05	15	12	227.1	124.9	0.05	18	14
Arg	231	70	0.05	30	25	175.1	70	0.05	18	20	231.1	70	0.05	30	27
Arg*	236	75	0.05	30	25	180.1	75	0.05	18	20	236.1	75	0.05	30	27
Cit	232	70	0.05	20	25	176.1	113	0.05	15	15	232.1	112.9	0.05	18	18
Cit*	234	72	0.05	20	25	178.1	115	0.05	15	15	134.1	114.9	0.05	18	18
Tyr	238	136	0.02	20	15	182.1	136	0.05	15	12	238.1	136	0.05	18	16
Tyr*	244	142	0.02	20	15	188.1	142	0.05	15	12	244.1	142	0.05	18	16
Orn	189	70	0.05	20	25	133.1	70	0.075	18	15	189.1	69.9	0.05	25	20
Orn*	191	72	0.05	20	25	135.1	72	0.075	18	15	191.1	71.9	0.05	25	20
C0	218	85	0.05	30	25	162.1	102.9	0.05	20	16	218.2	102.9	0.05	25	18
C0*	227	85	0.05	30	25	171.1	102.9	0.05	20	16	227.2	102.9	0.05	25	18
C2	260	85	0.05	25	20	204.1	84.8	0.05	20	18	260.1	84.9	0.05	25	20
C2*	263	85	0.05	25	20	207.1	84.8	0.05	20	18	263.1	84.9	0.05	25	20
C3	274	85	0.05	25	20	218.1	84.8	0.05	20	18	274.1	84.9	0.05	25	20
C3*	277	85	0.05	25	20	221.1	84.8	0.05	20	18	277.1	84.9	0.05	25	20
C4	288	85	0.05	25	25	232.1	84.8	0.05	20	20	288.2	84.9	0.05	25	20
C4*	291	85	0.05	25	25	235.1	84.8	0.05	20	20	291.2	84.9	0.05	25	20
C5:1	300	85	0.05	25	25	244.2	84.9	0.05	20	22	300.2	84.9	0.05	25	20
C5	302	85	0.05	25	25	246.2	84.9	0.05	20	22	302.2	84.9	0.05	25	20
C5*	311	85	0.05	25	25	255.2	84.9	0.05	20	22	311.2	84.9	0.05	25	20
C5OH	318	85	0.05	25	25	262.2	84.9	0.05	20	22	318.2	84.9	0.05	25	20
C6	316	85	0.05	25	25	260.2	84.9	0.05	20	22	316.3	84.9	0.05	25	20
C6*						263.2	84.9	0.05	20	22	319.3	84.9	0.05	25	20
C5DC	388.1	85	0.05	30	30	276.2	84.9	0.10	20	22	388.2	84.9	0.05	30	25
C5DC*						282.2	84.9	0.10	20	22	394.2	84.9	0.05	30	25
C8	344	85	0.05	30	30	288.2	84.9	0.05	20	25	344.3	84.9	0.05	25	22
C8*	347	85	0.05	30	30	291.2	84.9	0.05	20	25	347.3	84.9	0.05	25	22
C10	372.1	85	0.05	30	30	316.3	84.9	0.05	20	25	372.3	84.9	0.05	25	22
C10*						319.3	84.9	0.05	20	25	375.3	84.9	0.05	25	22
C12	400.1	85	0.05	30	30	344.3	84.9	0.05	20	25	400.3	84.9	0.05	30	25
C12*						347.3	84.9	0.05	20	25	403.3	84.9	0.05	30	25
C14	428.2	85	0.05	30	30	372.3	84.9	0.05	25	25	428.4	84.9	0.05	30	25
C14*	437.2	85	0.05	30	30	375.3	84.9	0.05	25	25	431.4	84.9	0.05	30	25
C14:1	426.2	85	00.05	30	30	370.3	84.9	0.05	25	25	426.4	84.9	0.05	30	25
C16	456.3	85	0.05	35	30	400.3	84.9	0.05	25	25	456.4	84.9	0.05	35	25
C16*	459.3	85	0.05	35	30	403.3	84.9	0.05	25	25	459.4	84.9	0.05	35	25
C18	484.3	85	0.05	35	30	428.4	84.9	0.05	25	30	484.4	84.9	0.05	40	30
C18*						431.4	84.9	0.05	25	30	487.5	84.9	0.05	40	30

略称により表記した物質の正式名称は表6を参照 Dwellは1スキャン内の分析所要時間、Coneはコーン電圧、Collはコリジョン電圧を示す

表4 各測定法のアッセイ内変動係数 (Coefficient of variation; CV) n=6 SD: 標準偏差 (standard deviation)

物質名	理論値 nmol/ml	A法			B法			C法		
		平均値	SD	CV(%)	平均値	SD	CV(%)	平均値	SD	CV(%)
Leucine (Leu)	578	533.2	10.4	1.9	505.9	29.0	5.7	582.4	29.4	5.1
	1466	1470	106	7.2	1590	65.4	4.1	1858	100.7	5.4
Phenylalanine (Phe)	283	226.4	7.7	3.4	246.4	8.6	3.5	240.6	11.2	4.7
	827	663.1	35.4	5.3	769.9	36.4	4.6	741.5	48.0	6.5
Methionine (Met)	120	85.0	2.3	2.7	61.3	7.1	11.6	103.2	4.1	4.0
	369	284.3	15.4	5.4	252.5	17.9	7.1	340.8	67.1	19.7
Citrulline (Cit)	189	123.6	5.5	4.4	169.7	14.3	8.4	159.2	8.2	5.1
	572	409.1	24.1	5.9	535.6	74.9	14.0	540.7	33.2	6.1
Free Carnitine (C0)	163	130.8	3.8	2.9	117.4	4.8	4.2	147.9	5.8	3.9
	395	325.8	22.3	6.9	306.6	17.3	5.6	405.3	14.3	3.5
Acetyl Carnitine (C2)	41.2	57.5	24.3	4.2	47.2	5.7	12.1	41.4	2.6	6.3
	89.2	130.1	76.9	5.9	129.6	9.3	7.2	96.2	7.3	7.6
Propionyl Carnitine(C3)	5.5	11.2	0.6	5.4	7.7	0.9	11.1	9.8	0.5	5.4
	14.3	28.1	2.3	8.1	21.8	1.9	8.8	27.4	1.8	6.5
Glutaryl Carnitine(C5DC)	0.5	0.33	0.03	10.1	0.96	0.14	14.8	0.59	0.04	6.8
	1.5	0.92	0.05	5.6	2.73	0.30	10.9	1.57	0.06	4.1
Octanoyl Carnitine(C8)	1.2	0.79	0.05	6.7	0.61	0.06	9.8	0.64	0.05	8.4
	3.1	2.15	0.11	5.3	1.79	0.24	13.5	2.02	0.08	4.0
Decanoyl Carnitine(C10)	0.6	0.94	0.05	5.4	0.57	0.11	19.4	0.54	0.03	5.1
	1.5	2.53	0.16	6.3	1.52	0.13	8.5	1.70	0.31	18.1

表5 各測定法のアッセイ間変動係数 (Coefficient of variation; CV) n=6 SD: 標準偏差 (standard deviation)

物質名	理論値 nmol/ml	A法			B法			C法		
		平均値	SD	CV(%)	平均値	SD	CV(%)	平均値	SD	CV(%)
Leucine (Leu)	578	542.0	48.3	8.9	535.7	55.5	10.4	569.4	58.1	10.2
	1466	1505	62.6	4.2	1485	52.5	3.5	1712	110.5	6.5
Phenylalanine (Phe)	283	227.3	16.1	7.1	243.2	24.4	10.0	238.2	23.6	9.9
	827	675.2	20.3	3.0	716.5	37.6	5.2	695.2	51.3	7.4
Methionine (Met)	120	86.2	7.2	8.3	79.8	11.3	14.2	103.1	8.8	8.5
	369	281.8	5.5	2.0	266.0	16.5	6.2	344.3	19.7	5.7
Citrulline (Cit)	189	121.4	11.9	9.8	142.9	13.6	9.5	158.9	13.8	8.7
	572	414.6	32.9	7.9	470.3	68.5	14.6	511.5	34.6	6.8
Free Carnitine (C0)	163	129.1	8.9	6.9	97.7	14.4	14.8	149.5	11.0	7.3
	395	313.0	6.8	2.2	236.3	22.1	9.4	371.5	22.2	6.0
Acetyl Carnitine (C2)	41.2	57.3	4.2	7.4	50.1	7.0	13.9	41.7	4.7	11.2
	89.2	131.9	5.7	4.3	107.7	9.3	8.6	90.0	5.0	5.6
Propionyl Carnitine(C3)	5.5	10.8	0.7	6.8	8.1	1.0	12.4	10.1	1.0	9.5
	14.3	28.3	1.6	5.5	19.5	1.9	9.6	26.9	1.9	6.9
Glutaryl Carnitine(C5DC)	0.5	0.34	0.04	10.8	0.52	0.13	24.8	0.56	0.07	11.5
	1.5	0.88	0.06	7.2	0.97	0.09	9.3	1.42	0.12	8.6
Octanoyl Carnitine(C8)	1.2	0.80	0.07	9.2	0.61	0.10	16.3	0.67	0.08	11.4
	3.1	2.22	0.13	5.7	1.55	0.16	10.3	1.91	0.14	7.4
Decanoyl Carnitine(C10)	0.6	0.97	0.09	8.8	0.59	0.16	27.3	0.51	0.03	6.2
	1.5	2.61	0.13	5.0	1.28	0.10	8.0	1.41	0.09	6.2

表6 一般検体を用いた各測定平均値及び標準偏差の比較 (n = 621), 単位 nmol/ml

略称	正式名称	A 法		B 法		C 法	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
Phe	phenylalanine	50.0	9.5	61.4	13.2	54.6	12.9
Leu + Ile	leucine + isoleucine	242.7	50.8	159.5	42.0	164.9	39.0
Met	methionine	21.5	4.5	18.3	5.5	27.9	6.7
Cit	citrulline	13.8	4.9	15.5	7.0	14.0	4.4
Arg	arginine	13.3	6.4	20.3	10.1	16.3	8.0
Gly	glycine	374.2	140.0	361.4	132.4	435.9	147.6
Ala	alanine	440.0	149.3	281.6	84.8	314.3	99.3
Val	valine	92.6	23.9	119.9	28.9	146.9	39.0
Tyr	tyrosine	113.1	53.2	130.1	63.0	121.1	57.9
Asp	aspartic acid	49.1	26.5				
Glu	glutamic acid	337.9	83.6				
Orn	ornithine	115.0	55.2	108.4	42.9	127.2	54.8
CO	free carnitine	22.9	7.0	18.1	6.2	27.0	8.3
C2	acetyl carnitine	26.6	7.6	20.7	6.8	20.8	5.6
C3	propionyl carnitine	2.10	0.89	1.40	0.63	1.80	0.80
C4	butyryl carnitine	0.234	0.068	0.209	0.091	0.198	0.069
C5	isovaleryl carnitine	0.124	0.088	0.113	0.089	0.146	0.097
C5:1	tiglyl carnitine	0.009	0.003	0.009	0.015	0.014	0.013
C6	hexanoyl carnitine	0.040	0.012	0.047	0.035	0.053	0.091
C5OH	3-OH-isovaleryl carnitine	0.126	0.034	0.134	0.054	0.115	0.035
C8	octanoyl carnitine	0.070	0.028	0.056	0.041	0.055	0.025
C10:1	decenoyl carnitine	0.103	0.068	0.074	0.045	0.052	0.033
C10	decanoyl carnitine	0.149	0.068	0.081	0.052	0.085	0.042
C5DC	glutaryl carnitine	0.056	0.018	0.171	0.060	0.108	0.129
C12	dodecanoyl carnitine	0.115	0.053	0.091	0.050	0.162	0.110
C14:1	myristoyl carnitine	0.082	0.036	0.037	0.021	0.086	0.073
C14	myristoyl carnitine	0.210	0.056	0.116	0.040	0.198	0.111
C14OH	3-OH-myristoyl carnitine	0.020	0.006	0.007	0.007	0.016	0.011
C16:1	palmitoleyl carnitine	0.122	0.051	0.132	0.062	0.140	0.060
C16	palmityl carnitine	2.40	0.81	2.61	0.94	2.59	0.86
C16OH	3-OH-palmityl carnitine	0.018	0.006	0.017	0.012	0.021	0.078
C18	steroyl carnitine	0.932	0.279	0.647	0.212	0.727	0.207
C18:1OH	3-OH-oleyl carnitine	0.016	0.005	0.021	0.011	0.016	0.014

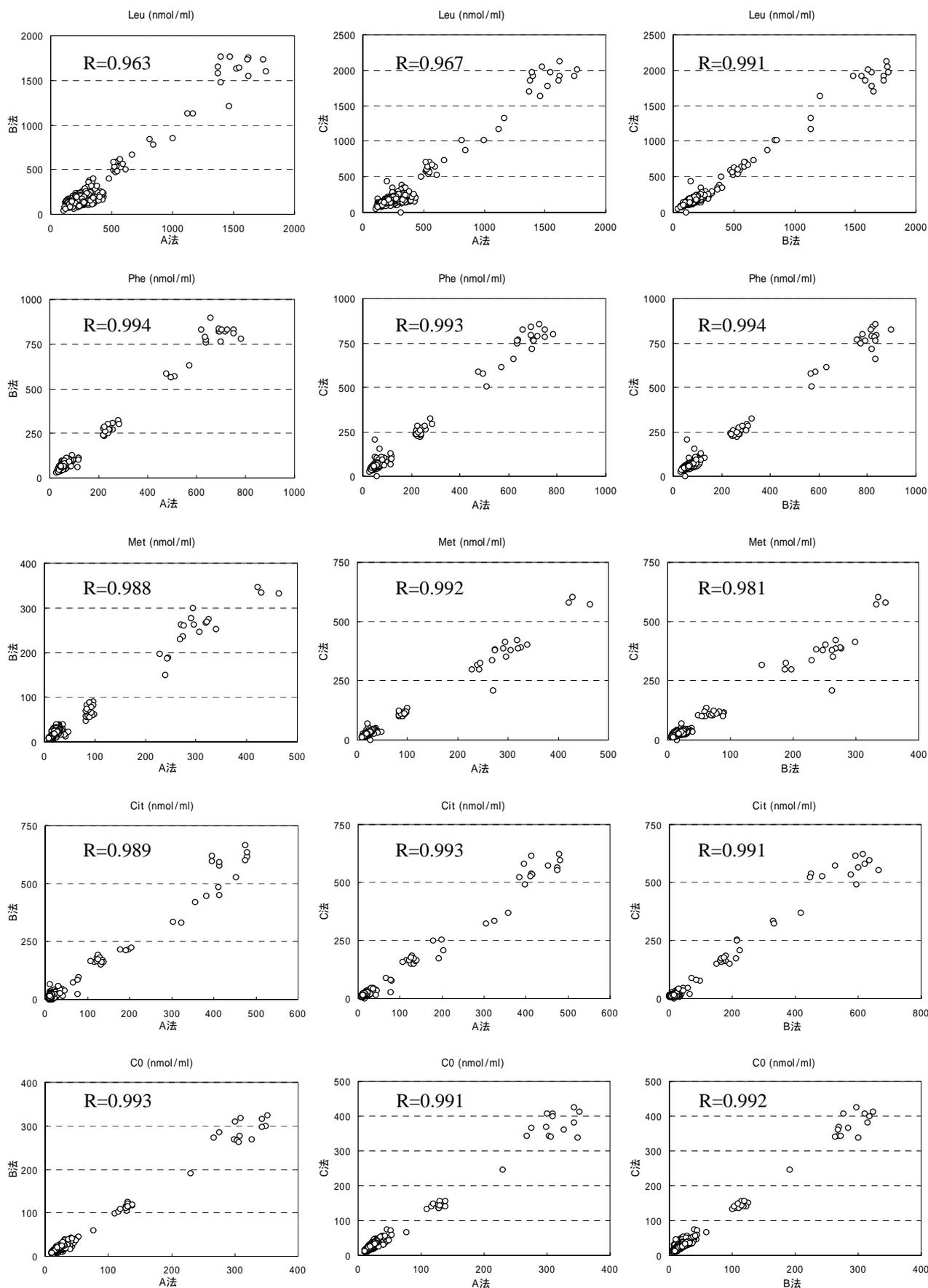


図2-A 主な測定物質の、測定法間における測定値の相関

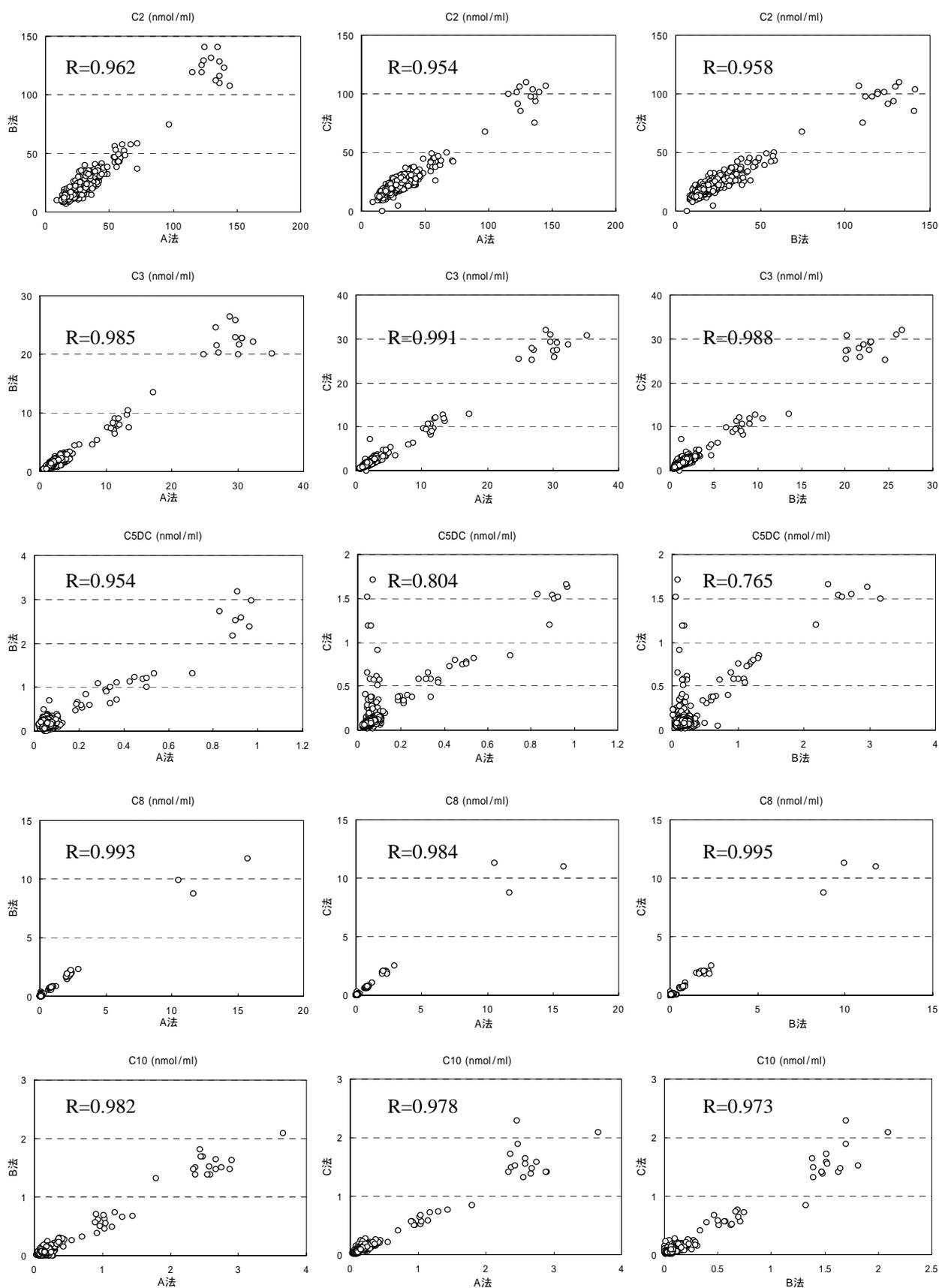


図2-B 主な測定物質の、測定法間における測定値の相関

### 3. 結果

#### 3-1 変動係数による評価

各法におけるアッセイ内変動係数を表4に、アッセイ間変動係数を表5にまとめる。

#### 3-2 一般検体の測定結果

各法における621件の新生児検体を用いた主な測定項目の平均値と標準偏差を表6にまとめる。また、おもな指標物質について、その相関と相関係数を図2-A、Bにまとめる。

### 4 考察

従来、新生児マス・スクリーニングにおいて、タンデムマスによりアミノ酸とアシルカルニチンを一斉分析する場合、感度を上げるためにカルボキシル基をブチル化して測定する方法が用いられてきた<sup>2-8)</sup>。しかし、前処理の手順を簡略化するため、ブチル誘導体化を必要としない分析法について様々な検討が行われている<sup>9-11)</sup>。

今回私たちは、Perkin Elmer社の非誘導体化キットを用いて当所のシステムで新生児マス・スクリーニング検査が可能か、現行のブチル誘導体化法と比較すること等により検討を行った。

#### 4-1 前処理について

現在私たちが、調査研究「タンデム質量分析計による新生児マススクリーニング」で用いているA法において、前処理の所要時間はおよそ2時間であり、加えて複数のプレートを前処理する場合は、窒素気流器やプレート加熱装置の処理能力に制限があるため、さらに前処理に時間を費やす必要がある。

しかし、B法を用いた場合、前処理の手順は溶出液の調整と振盪による溶出のみで、それらの所要時間はおよそ40分程度と短く、しかも複数のプレートを、機器的な制約を受けずに同時に処理できるため、数百件以上の検体を同時に処理する場合、他の二法と比べて圧倒的に有利であった。

一方でC法は、窒素気流器やプレート加熱装置を必要とする点でA法と同様であり、しかも溶出液の含水率はA法の0.2%に対し約29%と高いことから、溶媒の留去により時間を要した。そのためC法における前処理所要時間はおよそ2時間30分であった。

#### 4-2 変動係数の評価

アッセイ間変動係数(表4)とアッセイ内変動係数(表5)の双方において、B法はやや変動が大きい傾向を示した。これは非誘導体化法による場合、イオン化効率の低下から感度が下がることで、ゆれ幅が大きくなるためであると考えられる。しかし、変動係数はおおむね15%程度以下に収まっていることから、B法をマススクリーニングに用いる場合、ある程度カットオフ値を慎重に考慮し、カットオフ値を上回った場合、再測定による確認を行うこと等で、補いうる範囲内であると考えられた。A法とC法はどちらも高い安定性を示した。

またC5DC (glutaryl carnitine) の変動係数は全法を通じて高かった(表4.5)が、これはC5DCが、カルボキシル基を二つもつ構造を有しており、このことによりB法ではイオン化効率を低下させる作用があること、またA法やC法ではジブチル化による影響を受けること等の要因により、いずれの測定法を用いた場合でも標準偏差が大きくなると考えられる。

#### 4-3 測定値の評価

一般検体の測定値平均は、アミノ酸類ではLeucine (Leu) 以外ほぼ同等な値となったが、アシルカルニチン類においては、各法間で差が認められた(表6)。

このうち、中・長鎖域のアシルカルニチン類の測定値が方法間で差のある原因については、B法及びC法に比し、A法ではアシルカルニチン類の安定同位体ラベルスタンダードの種類が少ない(表1)ため、A法と他の二法では濃度の算出にもちいる内部標準分子自体が異なること、そしてB法においては誘導体を用いていないことで、他の二法と比し感度が低いことによると考えられる。

Leuの測定値については、変動係数の検討を行った濃度領域では、各法間の測定値の差があまりなかった(表4.5)にもかかわらず、一般検体を用いた測定ではA法において測定値が高くなる傾向が認められ(表6)、今後の検討課題であると思われる。

C0の測定値については、特にB法で低めを示す傾向があり、この物質の低値により見出されるカルニチントランスポータ異常症のスクリーニングにおいては、B法を用いた場合、偽陽性が多くなる可能性が示唆さ

れた。

C5DCの測定値については、各法間で測定値に大きな開きがある(表6)だけでなく、C法において、散発的に測定値が高くなる傾向が認められた(図2-B)。これは、C法では、抽出溶媒の含水率が高いため、乾燥が不十分な場合、特にC5DCの測定値に与える影響が大きくなるためであると考えられる。そのため、抽出液に水分の多いC法においては、留去を慎重に行わねばならない。また、B法およびC法ではC5DCの安定同位体ラベルスタンダードを含んでいるが、A法ではC5DCの定量に、分子構造の大きく異なるC8の安定同位体ラベルスタンダードを用いていること(表3)も、方法間でC5DCの測定値に差が生じる一因となると考えられる。

なお、C法においてC5DCの測定値が0.15nmol/ml以上を示した55件(平均±SD; 0.36±0.34nmol/ml)について、C法により再測定を行ったところ、いずれの検体においても再測定値は当初の値より低下し(平均±SD; 0.11±0.03nmol/ml)、A法及びB法によるものとほぼ同等の値を得た。このことから、前述のC法において散発的にC5DC高値を示した検体では、前処理における手技上の問題が影響したと考えられる。

Asp (aspartic acid) と Glu (glutamic acid) に関しては、B法及びC法では安定同位体ラベルスタンダードが存在しないため、定量対象となっていない(表1)。しかし、Asp、Gluを主たる指標とすることで新生児マススクリーニングの対象となりうる疾患は知られていないため、特に問題はないと思われる。

#### 4-4 各法間の相関の評価

主要な指標物質における相関係数(R)はC5DCを除いていずれも0.95以上で良好であった(図2)。またC5DCの測定値においても、C法の再測定を経た場合、相関係数0.95以上の良好な結果を得ることが出来た。このことから、ある程度データ収集によりカットオフ値の検討を行うことで、検査法を非誘導体化法へ移行することは十分可能であると考えられた。

#### 4-5 まとめ

タンデム質量分析計によるアミノ酸・アシルカルニチン

一斉分析法において、ブチル誘導体化を用いない非誘導体化法は、誘導体化法との間に十分な相関を示した。また、非誘導体化法は前処理がきわめて簡便であり、大量の検体を扱うのに適していると考えられた。今回の検討結果から、検査法の移行に際しては、カットオフ値の検討等が必要であると考えられたが、非誘導体化法は、当所のシステムにおいても、新生児マススクリーニングの検査法として十分使用可能なものである。

## 5. 文献

- 1) 野町祥介, 阿部敦子, 坂上絵理奈 他: タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのシステム構築(1)体制整備, 札幌市衛生研究所年報, 32, 54-61, 2005.
- 2) Chace DH, Millington DS, Terada N et al. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry, clinical chemistry, 39, 66-71, 1993.
- 3) Chace DH, Hillman SL, Millington DS et al. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 41, 62-68, 1995.
- 4) Chace DH, Hillman SL, Millington DS et al. Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethionemias from newborns' blood spots by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 42, 349-355, 1996.
- 5) Chace DH, Hillman SL, Van Hove LK et al. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 43, 2106-2113, 1997.
- 6) Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D et al. Tandem mass spectrometry analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England newborn screening program, Clinical Chemistry, 47, 1945-1955, 2001.
- 7) Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA et al. Rapid

- diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns, *Clinical Chemistry*, 47, 2040-2044, 2001.
- 8) Schulze A, Lindner M, Kohimuller 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.
- 9) Piraud M, Vianey-Saban C, Konstantinos P et al. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionization mode, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 1297-1311, 2003.
- 10) Nagy K, Takats Z, Pollreisz F et al. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 983-990, 2003.
- 11) 稲岡一孝, 竹島清美, 中村しのぶ 他: 検査施設におけるアミノ酸・アシルカルニチンの無誘導体化測定, 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18年度研究報告書, 113-119, 2007.
- 12) 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17年度研究報告書, 90-97, 2005.

## Multiple Analysis of Amino Acids and Acylcarnitines by Non-derivatized Method using Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening -Comparison between Derivatized and Non-derivataized method-

Shosuke Nomachi, Tomomi Nakajima, Miki Sakurada, Noriyuki Ota,  
Masaru Fukushi, Koichi Yano, Ulrich G Jensen<sup>\*1</sup>

In the neonatal screening using tandem mass spectrometry, derivataized method by butylation as a pretreatment is widely accepted because it increases the sensitivity of the measurement. However, this method is time consuming and laborious due to its many procedures for butylation.

To simplify the pretreatment procedures, we studied whether the non-derivatized method could be applied to our present protocol or not. The results showed a difference in the measured values between derivataized method and non-derivatized method. However, the correlation of measured values between derivatized method and non-derivataized method was acceptable.

We conclude that non-derivatized method is useful and convenient even though we need to adjust the cut-off values of amino acids and acylcarnitines.

---

\*1 PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Denmark