

タンデムマスによる血中アミノ酸の一斉分析法の検討

手塚美智子 吉永美和 石川貴雄 野町祥介 東田恭明 三觜 雄

要 旨

先天性代謝異常症スクリーニングにおいて指標となるろ紙血中アミノ酸について、現行の二次検査法の分析可能数を上回る 14 種類を分析可能な LC-MS/MS による一斉分析法を開発した。精度管理用ろ紙血検体を分析したところ、日内変動、日間変動ともに小さく、精度良好であった。さらに、新生児マススクリーニング検体を分析し、現行の一次検査法の測定結果と良好な相関があることを確認した。

1. 緒 言

先天性代謝異常症スクリーニングにおいては、2005 年度から高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたフローインジェクション法 (以下、「タンデムマス法」という。) を一次検査として導入している¹⁾。しかし、対象疾患の 1 つであるメープルシロップ尿症においては、ロイシン及びイソロイシンが高値を示すとともに、これらの構造あるいは光学異性体であるアロイソロイシンが特異的に検出されるが、タンデムマス法ではこれらの質量が同一な異性体を個別に定量することが不可能であった。そのため、当所では、タンデムマス法導入以前の検査法である HPLC を用いた OPA 誘導体化法 (以下、「HPLC 法」という。)²⁾ を二次検査法として運用し、一次検査であるタンデムマス法においてロイシン高値であった検体について異性体の分別定量を実施してきたが、近年、HPLC の老朽化により代替法の確立が求められている。

そこで、LC-MS/MS を用いて、ロイシン及びその異性体、並びに一次検査と同等数のアミノ酸を一度に分析可能な二次検査法を構築することを目的とし、本研究を実施した。

2. 方 法

2-1 試料

(1) 試薬及び標準液

L-グリシン (Gly)、L-ロイシン (Leu)、L-フェニルアラニン (Phe)、L-メチオニン (Met)、L-シトルリン (Cit) は和光純薬 (株) 製特級を、L-アラニン (Ala)、L-バリン (Val)、L-イソロイシン (Ile)、L-チロシン (Tyr)、L-アスパラギン酸 (Asp)、L-オルニチン (Orn) 一塩酸塩、L-アルギニン (Arg) はナカライテスク (株) 製特級を、L-アロイソロイシン (*allo*-Ile) は東京化成 (株) 製を、L-グルタミン酸 (Glu) ナトリウム一水和物は関東化学 (株) 製特級を用いた。Gly、Ala、Val、Leu、Ile、*allo*-Ile、Glu はそれぞれを 25mM となるよう 0.1M 塩酸 50mL に溶解し、標準原液とした。Tyr は 5mM、Phe、Asp、Orn、Met、Arg、Cit はそれぞれを 2.5mM となるよう 0.1M 塩酸 50mL に溶解し、標準原液とした。標準原液を適宜混合し水で希釈して、表 1 に示す 3 濃度 (Low、Mid、High) の混合標準液を各 100mL ずつ調製した。

アミノ酸安定同位体内部標準溶液 (以下、「内標溶液」という。) については、既報¹⁾ に従った。

(2) 精度管理用ろ紙血検体

アメリカ疾病対策予防センター (CDC) より、2017 年 Quality Control 精度管理プログラムにおいて配布されたろ紙血検体 (Lot No : A1615~D1615、F1613~J1613) を使用した。なお、精度管理用ろ紙血検体の濃度は、A1615 及び F1613 については 1 日 3 回 3 日

表1 アミノ酸混合標準溶液の濃度

	濃度 (μM)		
	Low	Mid	High
Gly	300	600	900
Ala	200	400	600
Val	200	350	500
Leu	100	250	500
Ile	100	250	500
allo-Ile	100	250	500
Phe	100	200	300
Tyr	200	400	600
Asp	50	150	300
Glu	100	300	500
Orn	100	200	300
Met	50	150	250
Arg	25	75	150
Cit	25	100	250

表2 精度管理用ろ紙血検体 (A1615~D1615) の濃度

	濃度 (μM)			
	A1615	B1615	C1615	D1615
Gly	265	565	865	1165
Ala	205	405	605	805
Val	65	265	415	565
Phe	24	124	224	324
Tyr	24	224	424	624
Orn	0	100	200	300
Met	8	28	158	258
Arg	0	100	200	300
Cit	13	38	113	263

表3 精度管理用ろ紙血検体 (F1613~J1613) の濃度

	濃度 (μM)				
	F1613	G1613	H1613	I1613	J1613
Leu	285	385	485	685	1085
Ile	57	157	257	457	857
allo-Ile	0	100	200	400	800

間測定した平均値を評価に用いた。なお、B1615~D1615 及び G1613~I1613 については CDC がホームページ (https://www.cdc.gov/labstandards/nsqap_resources.html) 上で公表する添加量を A1615 及び F1613 に加えたものとした (表2 及び表3)。

(3) 新生児マススクリーニング検体

2017 年度に札幌市の母子保健事業「新生児マススクリーニング」を受検し、検査結果が「正常」であった新生児ろ紙血検体のうち、無作為に抽出した100件とした (ただし、後述の2-4(1)における条件を満たしたものに限る)。

2-2 装置及び分析条件

装置：(株) 島津製作所製 LCMS-8050

カラム：Imtakt (株) 製 Intrada Amino Acid (100×3mm)

移動相：A … MeOH/H₂O/HCOOH = 85/15/0.3

B … CH₃CN/100mM NH₄COOH = 20/80

流量：0.4mL/min

グラジエント：表4 のとおり

カラム温度：35℃

注入量：アミノ酸標準液試料 2μL

ろ紙血液試料 5μL

表4 グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)
0	94	6
10	87	13
10.01	0	100
20	0	100
20.01	94	6
25	94	6

2-3 試験溶液の調製

(1) 標準溶液の調製

水もしくはアミノ酸混合標準液 10μL をポリプロピレン製96穴丸底プレートに入れ、内標溶液 100μL を加えてプレートシェイカーで20分間攪拌し、試

料溶液とした。

(2) 試料溶液の調製

ろ紙血検体 1 ディスク分をφ1/8 インチパンチャーで打ち抜き、96 穴平底プレートに入れ、内標溶液 100 μL を加えてプレートシェイカーで 20 分間攪拌抽出し、試料溶液とした。

2-4 倫理的配慮

(1) 検体の研究利用了承の取得

札幌市では新生児マススクリーニング受検時に、保護者もしくは代諾者に対し、申込書により「検査を終えた検体の他の研究等への利用」についての了承の可否を確認している。本研究における新生児ろ紙血検体及び検査データの利用は、この了承が得られたものについてのみ行った。

(2) 匿名化の取扱い及びその方法

新生児ろ紙血検体は、氏名等の個人情報は切り取られ検体番号のみが付けられた連結可能匿名化されたろ紙血検体を使用した。本研究における測定結果とスクリーニング測定結果を結合したうえで検体番号を削除し、連結不可能匿名化した上でデータ解析を行った。

(3) 倫理的配慮に関する審査

本研究計画については、札幌市衛生研究所倫理審査委員会により実施の許可を得たうえで実施している。

3. 結 果

3-1 クロマトグラム

今回検討した方法（以下、「本法」という）によるアミノ酸 14 種類のクロマトグラムを図 1 に示す。ロイシン及びその異性体を含むすべてのアミノ酸について、分離良好であった。

3-2 標準溶液の測定結果

水及び標準溶液を本法により 1 日 3 回 3 日間測定し、直線性及び R^2 値について図 2 に、定量結果及び精度（日内・日間変動）について表 5 に示した。14

種類すべてのアミノ酸において直線性は良好であり、 $R^2 > 0.999$ を満たしていた。また、すべてのアミノ酸で、今回検討した濃度域において日内変動日間変動ともに概ね CV5.0% 以内で安定しており、精度良好であった。

3-3 精度管理用ろ紙血検体の測定結果

精度管理用ろ紙血検体を本法により 1 日 3 回 3 日間測定し、直線性及び R^2 値について図 3 に、定量結果及び精度について表 6 に示した。Orn を除く 11 種類のアミノ酸においては、直線性良好かつ $R^2 > 0.99$ を満たしていた。Orn はピークの検出強度が低く、ベースラインのノイズピークの影響を受けて定量結果のばらつきが大きく、精度不良であった。Asp、Glu は精度管理用ろ紙血検体には無添加であったため、検討対象外とした。

3-4 新生児マススクリーニング検体の測定結果

3-3 の A1615~D1615 の分析結果を検量線として用い、本法により新生児マススクリーニング検体を測定し、タンデムマス法による測定結果と比較した（図 4）。Orn は精度不良であったが、残る 9 種類のアミノ酸で相関係数 $R = 0.71 \sim 0.97$ と良好な相関が得られた。

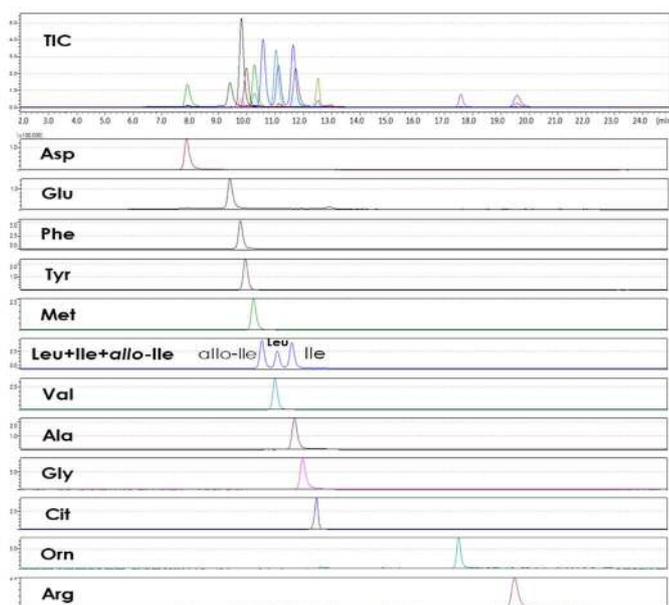
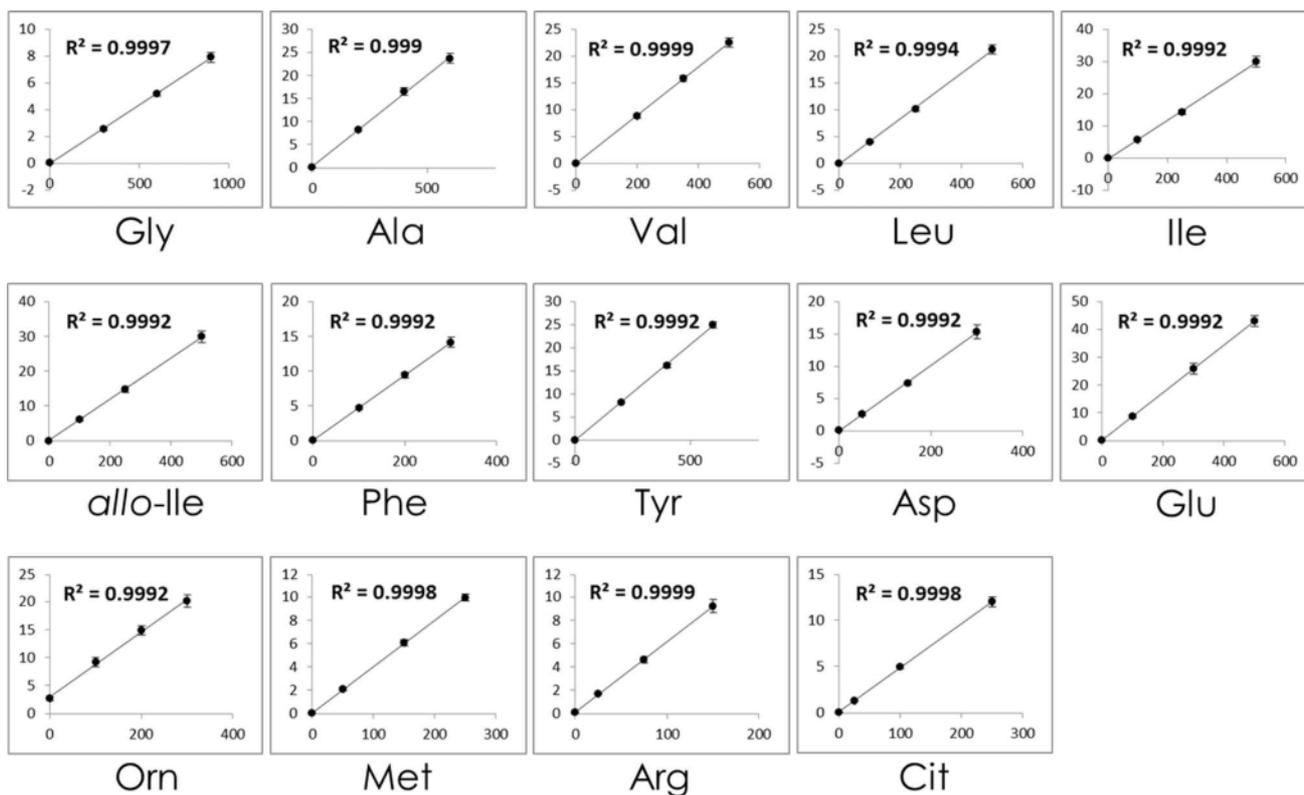


図 1 クロマトグラム



横軸：理論濃度 縦軸：内部標準物質との面積比（AA Area/AA-IS Area）

図2 アミノ酸標準溶液の直線性及びR²値

表5 アミノ酸標準溶液の定量結果及び精度（日内・日間変動）

濃度：Low	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	allo-Ile	Phe	Tyr	Asp	Glu	Orn	Met	Arg	Cit
Mean (μM)	292	202	196	97.9	97.9	102	99.9	200	51.3	100	107	51.1	25.7	25.3
日間変動 (%)	3.6	2.0	1.7	2.0	2.2	1.8	2.7	3.3	4.3	2.1	10.3	4.5	6.2	5.0
日内変動 (%)	1.9	1.3	2.7	1.6	2.3	2.3	2.8	1.4	5.4	4.4	12.4	4.0	4.5	2.9
純日間変動(%)	1.8	0.8	0	0.7	0	0	0	1.7	0	0	0	1.2	2.5	2.3
濃度：Mid	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	allo-Ile	Phe	Tyr	Asp	Glu	Orn	Met	Arg	Cit
mean (μM)	596	411	352	243	243	247	200	393	146	300	204	151	74.3	102
日間変動 (%)	2.3	1.9	0.9	3.1	2.3	3.4	2.2	2.7	3.4	4.9	0.4	1.6	2.1	1.2
日内変動 (%)	1.9	2.2	3.0	3.8	4.2	4.0	3.4	2.2	6.3	5.8	4.3	3.1	3.7	2.1
純日間変動(%)	0.8	0	0	0	0	0	0	0.9	0	0	0	0	0	0
濃度：High	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	allo-Ile	Phe	Tyr	Asp	Glu	Orn	Met	Arg	Cit
mean (μM)	905	592	500	504	504	501	300	605	302	500	295	249	150	249
日間変動 (%)	0.9	0.7	0.2	0.7	0.5	0.8	0.7	0.8	0.9	1.7	1.1	0.7	0.6	0.1
日内変動 (%)	0.8	1.1	1.4	0.9	0.9	0.9	1.5	0.9	1.5	2.0	1.9	1.0	0.8	0.3
純日間変動(%)	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

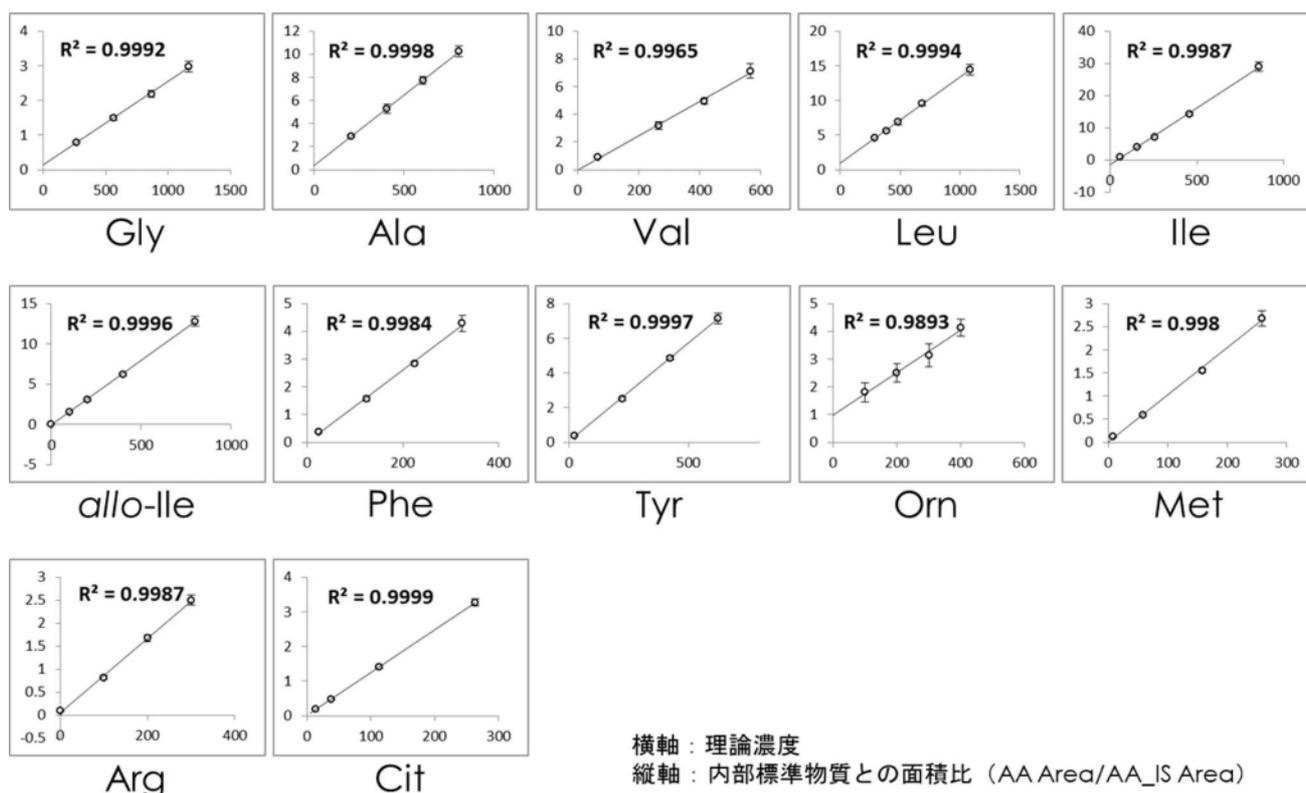


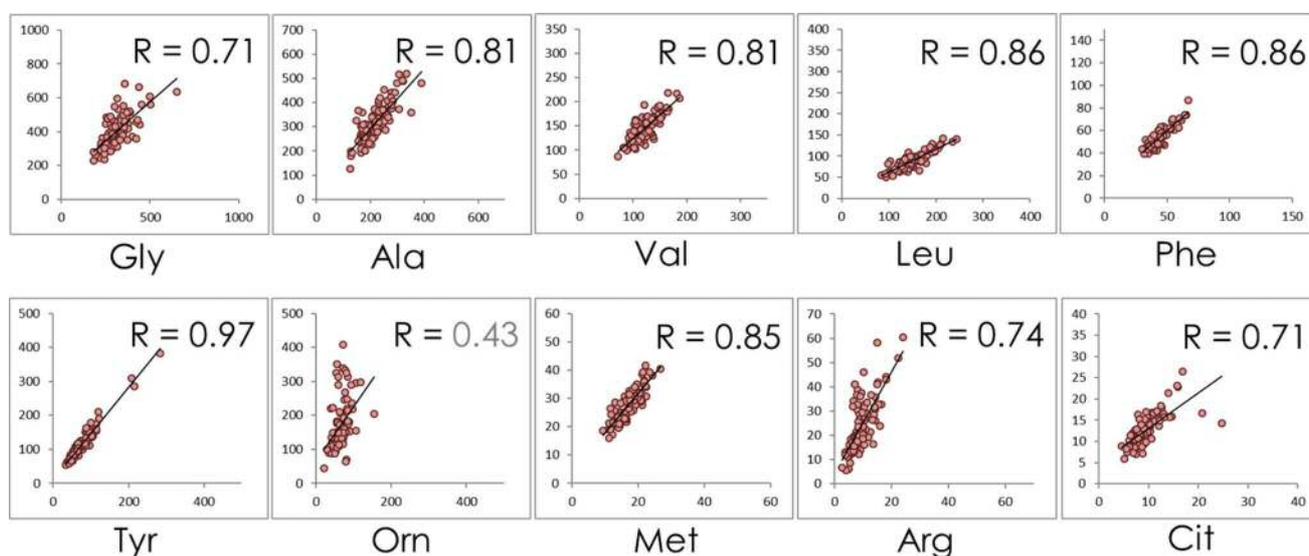
図3 精度管理用ろ紙血検体の直線性及びR²値

表6 精度管理用ろ紙血検体の定量結果及び精度 (日内・日間変動)

A1615 / F1613	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	allo-Ile	Phe	Tyr	Orn	Met	Arg	Cit
Mean (μM)	268	206	72.6	292	70.6	6.4	27.6	27.8	6.8	11.1	4.3	14.1
日間変動 (%)	11.8	12.9	24.6	2.5	8.3	144	29.7	37.0	179	28.6	152	3.1
日内変動 (%)	8.3	8.8	15.8	5.2	11.3	105	20.6	27.6	206	26.3	64.3	9.5
純日間変動 (%)	4.8	5.5	10.9	0	0	57.0	12.4	14.2	0	6.5	79.2	0
B1615 / G1613	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	allo-Ile	Phe	Tyr	Orn	Met	Arg	Cit
Mean (μM)	567	405	259	377	158	100	121	218	98.9	57.3	93.6	36.8
日間変動 (%)	8.2	10.6	11.6	1.2	1.6	3.6	8.7	7.3	8.3	6.7	6.8	6.3
日内変動 (%)	4.5	4.6	5.7	4.2	3.9	3.5	4.7	4.4	10.8	2.8	3.1	3.0
純日間変動 (%)	3.9	5.5	5.8	0	0	0.5	4.2	3.4	0	3.5	3.5	3.2
C1615 / H1613	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	allo-Ile	Phe	Tyr	Orn	Met	Arg	Cit
Mean (μM)	851	603	402	478	245	196	219	425	182	152	200	113
日間変動 (%)	1.0	2.9	3.8	6.2	5.9	3.9	4.4	4.3	12.6	3.6	5.2	2.8
日内変動 (%)	4.1	3.5	3.4	3.8	3.8	3.8	3.5	2.4	18.6	4.1	4.4	3.0
純日間変動 (%)	0	0	1.0	2.8	2.6	0.6	1.5	2.0	0	0	1.6	0

D1615 / I1613	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	<i>allo</i> -Ile	Phe	Tyr	Orn	Met	Arg	Cit
Mean (μM)	1174	806	577	694	447	393	329	626	313	262	302	263
日間変動 (%)	1.5	1.7	2.6	6.4	5.9	8.3	2.4	1.8	5.6	1.2	2.7	0.4
日内変動 (%)	2.2	2.3	2.3	2.4	2.5	1.9	1.9	1.3	7.4	1.4	1.8	0.5
純日間変動(%)	0	0	0.6	3.4	3.1	4.7	0.8	0.8	0	0	1.1	0

J1613	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	<i>allo</i> -Ile	Phe	Tyr	Orn	Met	Arg	Cit
Mean (μM)	-	-	-	1083	865	805	-	-	-	-	-	-
日間変動 (%)	-	-	-	1.4	1.2	1.8	-	-	-	-	-	-
日内変動 (%)	-	-	-	1.0	0.8	0.6	-	-	-	-	-	-
純日間変動(%)	-	-	-	0.5	0.5	1.0	-	-	-	-	-	-



横軸：タンデムマス法の測定値 縦軸：本法の測定値 (μM)

図4 新生児マススクリーニング検体の検査法による定量結果の比較

4. 考 察

4-1 Leu 及び異性体について

本法では、新生児マススクリーニング検体において、Leu 及び Ile をそれぞれ同程度の強度のピークで良好に分離することが出来た。本法における Leu の定量値はタンデムマス法において Leu と Ile の総和として得られる定量値のほぼ半分程度であった(図4 Leu 参照)。また、患者検体でのみ特異的に検出される *allo*-Ile のピークは、新生児マススクリーニング検体からは検出されなかった。

また、精度管理ろ紙血検体においては、Leu、Ile、*allo*-Ile のいずれもが低～高濃度のすべての濃度域で良好な定量結果が得られた。

よって本法は、一次検査で Leu 高値であった検体を対象とした二次検査法として、十分な能力を有していると考えられる。

4-2 精度について

先天性代謝異常症スクリーニングの一次検査法であるタンデムマス法は、短時間で多くの検体を処理

することが可能な効率の良い検査法である。しかし、前処理において精製過程の無い試料溶液をフローインジェクションで分析に供するため、試料中のマトリックス効果やコンタミネーションの影響を受けやすく、定量値の日内変動、日間変動がともに大きいという特徴がある。

一方、本法では、分析時間は1サンプル25分間と長くなるものの、カラムを使用することで試料中のマトリックス効果の影響を回避しやすい上、個々の物質の検出ピークが良好に分離されていることから、物質間相互のイオン化の競合を受けにくく、各分析対象物質の定量性は高いものとなっている。その結果、日内変動、日間変動はともに小さく、精度は非常に良好であった。

このことから、一次検査で陽性となった検体、もしくは測定結果にバラつきの大きかった検体に対し本法で二次検査を行うことで、より安定した精度でスクリーニングを実施することができると考えられる。

5. 結 語

本法は、メープルシロップ尿症患者検体の迅速な発見が可能であり、新たな二次検査法として有用であることがわかった。また、コンタミネーション等が疑われ一次検査で正確性に欠ける分析結果が得られた検体に対しても用いることで、スクリーニングの精度をより高める効果が期待できる。

6. 文 献

- 1) 野町祥介, 仲島知美, 櫻田美樹 他: タンデム質量分析計による非誘導体化アミノ酸・アシルカルニチンの一斉分析ー現行ブチル誘導体化法との比較ー, 札幌市衛生研究所報, **34**, 37-47, 2007
- 2) 田上泰子, 野町祥介, 花井潤師 他: 高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸代謝異常スクリーニングー1. 検査法の変更にとまなう基礎検討ー, 札幌市衛生研究所報, **29**, 31-37, 2002