

LC-MS/MS によるろ紙血及び尿中総ホモシステインの測定

吉永美和 石川貴雄 手塚美智子
野町祥介 細海伸仁 矢野公一

要 旨

札幌市では、新生児マススクリーニング要精密検査児及び臨床症状等からマススクリーニング関連疾患が疑われる児を対象とした、マススクリーニング関連疾患依頼検査を行っている。本検査の検査項目の1つである、ろ紙血及び尿中総ホモシステインについて、タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による測定の検討を行い、現行法である高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた測定方法と比較したところ、測定結果について良い相関が得られたので報告する。

1. 緒 言

札幌市では、新生児マススクリーニングで要精密検査となった児及びマススクリーニング関連疾患が疑われる児を対象として、マススクリーニング関連疾患依頼検査¹⁾ (以下「依頼検査」という。)を行っている。

依頼検査の検査項目の1つである総ホモシステインは、新生児マススクリーニングの検査所見において、ホモシスチン尿症及びメチルマロン酸血症が疑われる場合、また、臨床所見から関連疾患を疑う場合に、ろ紙血検体及び尿検体を用いて測定することにより、疑い疾患の絞り込み等に有用なデータとして医療機関に提供している。

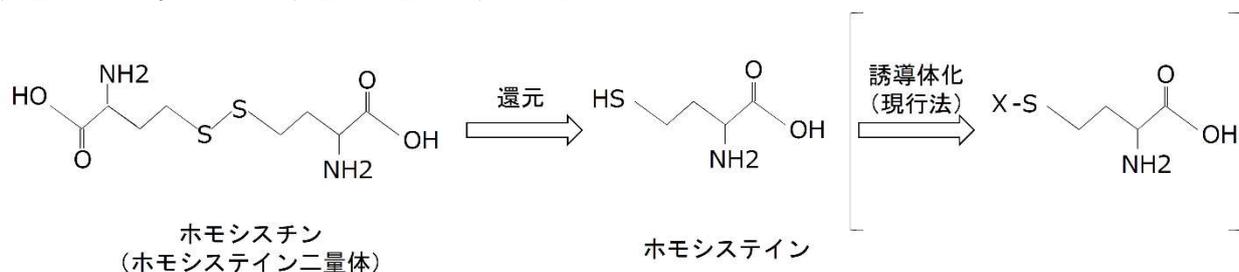
ホモシステインは、生体内では遊離型のホモシステインのみではなく二量体のホモシスチンや、チオール基を介し種々のタンパク質と結合した状態でも存在している。そのため、図1のとおり、これら

を還元して、全て遊離型のホモシステインとした「総ホモシステイン」として測定する必要がある。

2. 目 的

2-1 代替法の確立

現在、総ホモシステインの測定は、既報²⁾のとおり HPLC を用いて行っている (以下「現行法」という。) が、測定機器が老朽化しており、今後、測定に支障をきたす可能性がある。そこで、代替として、新生児マススクリーニングで使用している LC-MS/MS を用いた測定系を確立することを目的とした。なお、当所では、本機器を新生児マススクリーニングで通常使用しており、使用可能な時間に制限があるため、カラムを使用せず分析時間が短いフローインジェクション法を用いる測定系であることが当該目的の前提となる。



2-2 代替法における前処理方法の確立

当該測定系の確立にあたり、前処理における還元条件を確定すること、及びタンパク質除去操作の必要の有無について把握することを、検討の目的に加えた。

2-3 代替法での正常群の濃度分布

代替法の実用性を担保するため、正常群の濃度分布を把握することについても、併せて本研究の目的とした。

3. 方 法

3-1 試薬及び試料

(1) ホモシステイン標準品

測定条件の最適化を行い直線性及び日内変動を確認するため、ホモシステイン水溶液を、8点の希釈系列 (0.035 μ M \sim 4.5 μ M) により作成した。

(2) 内標物質

内部標準用のホモシステイン安定同位体 (3,3,4,4-D₄-DL-homocysteine CIL社製) を2 mM EDTA 溶液で溶解し、2.25 mM 内部標準原液として調整した。測定時は内部標準原液を精製水で希釈し、10 μ M (8.89 μ M EDTA) 溶液として使用した。

(3) 精度管理用ろ紙血検体

内部精度管理用ろ紙血検体は、アメリカ疾病対策予防センター (CDC) が実施している Newborn Screening Quality Assurance Program (Second-tier Methylmalonic/Propionic Acidemia and Homocystinuria Quality Control) で配布されたろ紙血検体 (Lot F1614 \sim J1614) を使用した。添加濃度及び CDC での測定値は表 1 のとおりである。

(4) 新生児マススクリーニング検体及び依頼検査検体

現行法との比較用及び正常検体のデータ収集用として、以下の① \sim ④の検体を使用した。

① 依頼検査ろ紙血検体 (データ比較用)

2012 \sim 2017 年度に依頼検査の依頼があったろ紙血検体のうち、HPLC で総ホモシステイン測定済の

65 件。

② 新生児マススクリーニングろ紙血検体 (データ収集用)

2017 年度に受付された新生児マススクリーニング検体で、採血時日齢 4 \sim 6 で、検査結果が正常判定であった検体のうち 200 件。

③ 依頼検査尿検体 (データ比較用)

2012 \sim 2017 年度に依頼検査の依頼があった尿検体のうち、HPLC で総ホモシステイン測定済の 65 件。

④ 依頼検査尿検体 (データ収集用)

2012 \sim 2017 年度に依頼検査の依頼があった尿検体で、採尿時年齢が 1 歳未満で典型的な代謝異常症の可能性が示唆されなかった検体のうち 100 件。

表 1 精度管理用ろ紙血検体 (F1614 \sim J1614) の添加濃度と CDC の測定値

	添加濃度	Mean	95%LL	95%UL
F1614	0	4.74	3.20	6.28
G1614	10	8.84	6.61	11.07
H1614	20	12.32	8.88	15.76
I1614	50	23.48	15.60	31.36
J1614	100	45.15	33.67	56.63

(単位: μ M)

3-2 装置及び分析条件

測定機器は、LC-MS/MS8050 及び NexeraX2 システム (島津製作所製) を用いた。

移動相及び LC のタイムプログラムは、新生児マススクリーニングのタンデムマス検査と同様とした。

MS の測定は MRM positive モードで行い、ホモシステインの濃度については、内標物質と測定物質の面積比から算出した。

前処理における還元反応が十分かについては、ホモシステインの二量体であるホモシスチンを指標として、検出されたイオンの面積値を確認することにより判断した。

測定におけるプリカーサーイオン、プロダクトイ

オンの m/z 候補、CE 等電圧の設定については、3-1(1)の標準溶液、3-1(2)の内標溶液を使用し、測定用ソフト LabSolutions LCMS の「メソッドの最適化」機能を用いて設定した。

最終的に決定した機器条件は、表 2、表 3 のとおりである。

表 2 LC の設定

分析時間	1.2 min
注入量	2 μ L
移動相	MeOH/CH ₃ CN/H ₂ O/=40/40/20 in 0.05% HCOOH
流速	0→0.15 min : 0.15→0.1 mL/min 0.15→0.9 min : 0.1→0.2 mL/min 0.9→1.2 min : 0.2→0.5 mL/min

表 3 MS の設定

	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョン エネルギー (V)	Q1 プリロッド バイアス (V)	Q3 プリロッド バイアス (V)
ホモシステイン (内標)	136.2 (140.2)	ろ紙血 : 90.1 (94.1)	-13	-26	-15
		尿 : 56.1 (59.1)	-20	-27	-22
ホモシスチン (内標)	269.0 (277.0)	136.1 (140.1)	-11	-19	-24
		88.1 (92.1)	-33	-19	-14
		90.1 (94.1)	-24	-19	-15

3-3 直線性及び再現性

3-1(1) のホモシステイン水溶液の希釈系列 (0.035 μ M~4.5 μ M) について、各 6 重測定を行い、得られたホモシステイン面積値/内標面積値を用いて変動係数の算出を行った。また、ホモシステイン面積値/内標面積値と、試料として用いたホモシステイン濃度をプロットし、直線性の評価を行った。

3-4 前処理

ろ紙血検体は、直径 1/8 インチのろ紙血ディスク 1 枚を平底マイクロプレートにとり、固定液 (メタノール、アセトン、精製水 (7:7:2)) を 10 μ L 加え、蓋をして 10 分放置後、蓋を取り 37°C で 30 分乾燥し、精製水 30 μ L、内標溶液 10 μ L (10 μ M d4-homocysteine in 8.89 μ M EDTA) を加え、30 分間振盪抽出した。

尿検体は、クレアチニン 50 μ g/mL に調整した尿検体 30 μ L に、ろ紙血検体と同様に内標溶液 10 μ L を加えた。

これらに、40 mM DTE/10 mM NH₄COOH (pH7) を 20 μ L 加え、振盪後、37°C で 20 分間放置し還元した。

ろ紙血検体では、抽出液は別ウェルに移さず、ろ紙血検体が入った状態のウェルに還元剤を加えた。

還元後、メタノール 100 μ L を加え、遠心後、上清を U 底マイクロプレートに移し、試料とした。

3-5 前処理における各条件の検討

(1) 還元条件 (pH) の検討

精度管理用ろ紙血検体を用いて、還元剤として pH5~9 に調製した 4 mM DTE/10 mM NH₄COOH あるいは精製水のみを使用し、還元条件以外は 3-4 の前処理方法で試料を作製した。

(2) 還元条件 (還元剤濃度) の検討

精度管理用ろ紙血検体を用いて、還元剤として DTE 濃度を 4、20、40 mM に調製した DTE/10 mM NH₄COOH (pH7) を使用し、還元条件以外は 3-4 の前処理方法で試料を作製した。

(3) 固定操作の検討

精度管理用ろ紙血検体を用いて、抽出後に、還元剤を加える際、①抽出液を別ウェルに移して還元反応を行う、②抽出後のウェル (ろ紙血検体が入った状態) のまま還元反応を行う、の 2 種類の方法につ

いて、固定操作の有無での違いを確認した。

固定条件以外は 3-4 の前処理方法で試料を作製した。

3-6 日内、日間変動

精度管理用ろ紙血検体を 3-4 の前処理方法により試料を作成し測定を行い、日内変動 (N=6) 及び日間変動 (N=6) を求めた。

3-7 新生児マススクリーニング検体及び依頼検査検体の測定

(1) 現行法 (HPLC 測定結果) との比較

3-1(4)①、③の検体を、3-4 の前処理方法により試料を作製し測定を行い、得られた測定結果と、HPLC での測定結果をプロットし、関連の検討を行った。

(2) データ収集用検体の測定

3-1(4)②、④の検体を、3-4 の前処理方法により試料を作製し測定を行い、平均値、SD 等を算出した。

3-8 検出限界及び定量下限値

「ろ紙血検体」及び「尿検体」の疑似ブランク検体として、それぞれ「ろ紙のみを抽出した溶液」、及び「クレアチニン 50 μ g/mL 水溶液」を作製し、3-4 の前処理方法により試料を作製し、各 84 回繰り返し測定し、その標準偏差から検出限界及び定量下限値を求めた³⁾。

3-9 倫理的配慮

本研究は、札幌市衛生研究所倫理審査委員会の承認を受けて実施した。なお、新生児マススクリーニング及びマススクリーニング関連疾患依頼検査の検体のうち、本研究に利用したものは、申込時に書面により検査終了後の検体の研究等への利用について包括的同意が得られているものである。

4. 結果

4-1 m/z の設定

(1) ホモシステイン m/z の設定

3-1(1)のホモシステイン水溶液、3-1(2)の内標溶液を使用し、測定用ソフト LabSolutions LCMS の「メソッドの最適化」機能を用いた結果、ホモシステインのプリカーサーイオンの m/z は、136.2 (内標 140.2)、プロダクトイオンの m/z は、面積順に 90.1、56.1、47.0 (内標 94.1、59.1、49.1) が得られた。

ろ紙血検体でのプロダクトイオンは、面積が最大の m/z 90.1 (内標 94.1) を定量に使用した。

尿検体では、3-7 での検体測定時に、 m/z 90.1 (内標 94.1) で図 2 のとおりベースラインが高くなる検体が多かったため、ろ紙血検体とは異なる設定 (m/z 56.1 (内標 59.1)) とした。

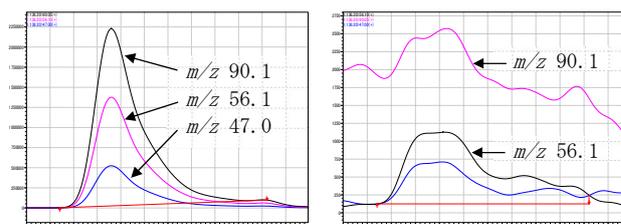


図 2 ホモシステイン溶液 (左) と尿検体のホモシステインピーク形状 (右) 例

(2) ホモシステイン m/z の設定

ホモシステインと同様にメソッドの最適化を行った結果、ホモシステインのプリカーサーイオン m/z は 269.0 (内標 277.0)、プロダクトイオン m/z は面積順に 136.1、88.1、90.1 (内標 140.1、92.1、94.1) が得られた。

当初、プロダクトイオンは最大の面積が得られた m/z 136.1 (内標 140.1) を設定したが、3-7 の測定時に、一部の検体で夾雑物由来と考えられる大きな妨害ピークが検出された。そのため、2 種類のプロダクトイオン m/z (88.1、90.1 (内標 92.1、94.1)) を追加で設定したところ、図 3、図 4 のとおり追加したプロダクトイオンでは妨害ピークは検出されず、還元反応の進行を確認できた。

以上をふまえて、ホモシスチンの検出については、3種類のプロダクトイオン m/z (136.1、88.1、90.1 (内標 140.1、92.1、94.1)) を設定した。

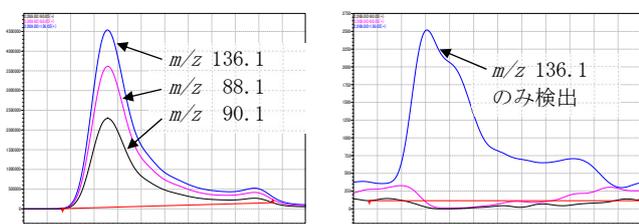


図3 ホモシスチン溶液 (左) とろ紙血検体の妨害ピーク形状 (右) 例

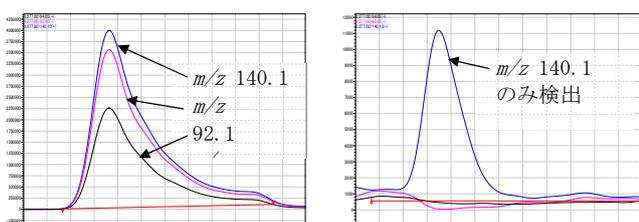


図4 内標溶液のホモシスチン (左) とろ紙血検体の妨害ピーク形状 (右) 例

4-2 直線性及び再現性

3-3 のとおりホモシスチン水溶液について各 6 重測定を行ったところ、図 5 のとおり直線性は良好 (R^2 値は 0.99 以上) であった。また、日内変動は変動係数 (CV) 2.6%~7.4% であった。

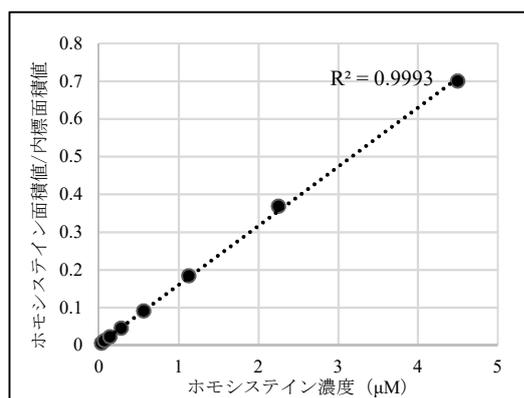


図5 ホモシスチン溶液の測定結果

4-3 前処理方法の検討

(1) 還元条件 (pH) の検討

還元剤として用いている DTE の還元効率が pH に依存することから、3-5(1) のとおり、還元時の溶液

の pH について精度管理用ろ紙血検体を用いて pH5 ~9 の条件で前処理を行い測定したところ、図 6 のとおりホモシスチンのピーク形状は pH8 程度まで pH 依存的に S/N 比が改善される傾向があった。また、得られる面積値はホモシスチン及び内標共に pH7~8 程度まで増加する傾向があり、pH9 では急激に低下した。

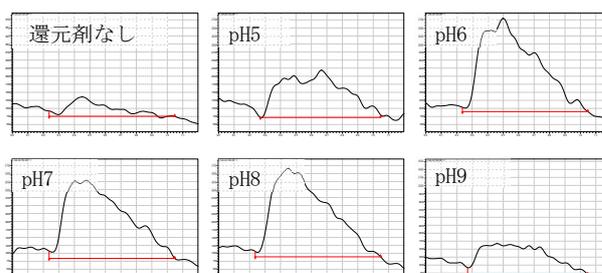


図6 還元剤溶液の pH と精度管理用ろ紙血検体 (G1614) のピーク形状

(2) 還元条件 (還元剤濃度) の検討

3-5(2) のとおり、還元反応に用いる DTE 濃度について、精度管理用ろ紙血検体を用いて 4、20、40 mM の条件で前処理を行い測定したところ、図 7 のとおり、ホモシスチン内標の面積値は 20、40 mM で大きく低下した。また、図 8 のとおり、ホモシスチン面積値はホモシスチン添加濃度の高い J1614 検体で DTE 20 mM 以上の条件で面積値の低下がみられた。

(1)、(2) から、還元条件について、3-4 のとおり「溶液の pH7、DTE 濃度 40 mM」に決定した。

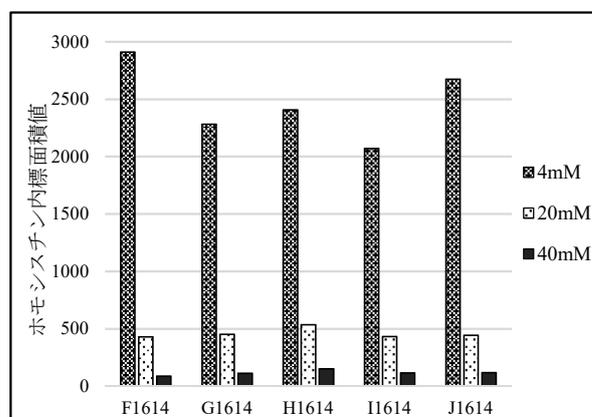


図7 還元剤濃度とホモシスチン内標面積値

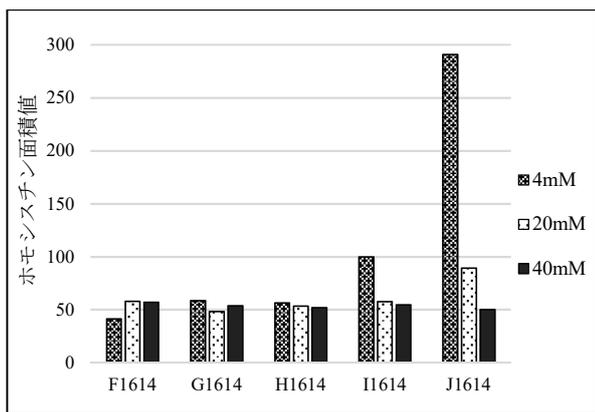


図 8 還元剤濃度とホモシスチン面積値

(3) 固定操作の検討

3-5(3)のとおり、精度管理用ろ紙血検体を用いて、固定操作の有無における測定値とピーク形状の比較を行った。

図 9 のとおり、固定操作有りの方が、ピーク形状が良好であり、検出される面積も増加していた。

また、図 10 のとおり、抽出液を別ウェルに移して還元反応行った場合、固定操作無しでは、抽出後のウェルにそのまま還元剤を加えた場合と同様の測定値であったが、固定操作有りでは、抽出液を別ウェルに移した場合の方が、測定値が低値となった。

固定有りの方がピーク形状良好であり、測定値も同様であったことから、機器への汚れの蓄積の軽減も期待できるため、3-4 のとおり「固定有り、抽出後のウェルに還元剤を加える」方法に決定した。

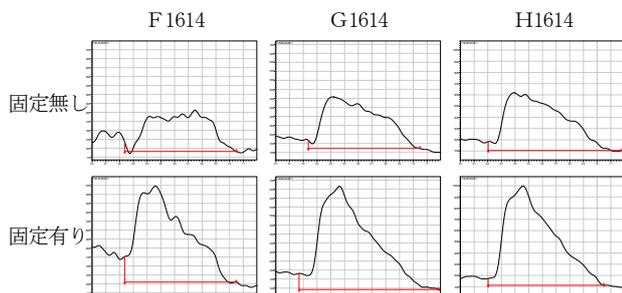


図 9 固定操作とホモシスチンのピーク形状

4-4 日内、日間変動の検討

ホモシスチンが添加された 6 濃度の CDC 内部精度管理用ろ紙血検体 (Lot:F1615~J1615) を測定

したところ、日内変動 (N=6) (CV1.5%~5.1%) 及び日間変動 (N=6) (CV4.3%~7.5%) は小さく、良好な結果が得られた。(表 4、表 5)

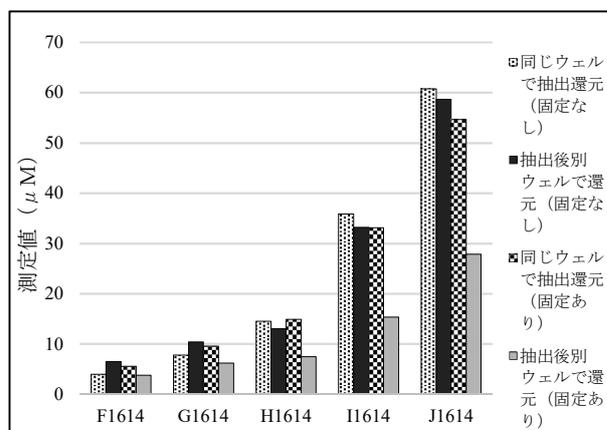


図 10 還元時の抽出液の移し替えと測定値

表 4 精度管理用ろ紙血検体測定値の日内変動

	CDC Mean	平均	SD	CV (%)
F1614	4.74	4.46	0.23	5.14
G1614	8.84	8.64	0.23	2.65
H1614	12.32	12.57	0.63	5.05
I1614	23.48	28.10	0.62	2.21
J1614	45.15	55.29	0.85	1.54

(単位: μM)

表 5 精度管理用ろ紙血検体測定値の日間変動

	CDC Mean	平均	SD	CV (%)
F1614	4.74	4.84	0.37	7.54
G1614	8.84	9.98	0.52	5.23
H1614	12.32	14.77	0.89	6.00
I1614	23.48	34.35	2.58	7.50
J1614	45.15	58.99	2.54	4.31

(単位: μM)

4-5 現行法 (HPLC 測定結果) との比較

(1) 依頼検査ろ紙血検体 (データ比較用)

3-1(4)①の依頼検査ろ紙血検体 65 件を測定した結果、図 11 のとおりタンデムマスでの測定値の方がやや高い値 (傾き 1.7) であったが、HPLC 測定結果との良い相関 (R^2 値は 0.97) を示した。

(2) 依頼検査尿検体（データ比較用）

3-1(4)③の依頼検査尿検体 65 件を測定した結果、結果、図 12 のとおりタンデムマスでの測定値の方がやや高い値（傾き 1.1）であったが、HPLC 測定結果との良い相関（ R^2 値は 0.89）を示した。

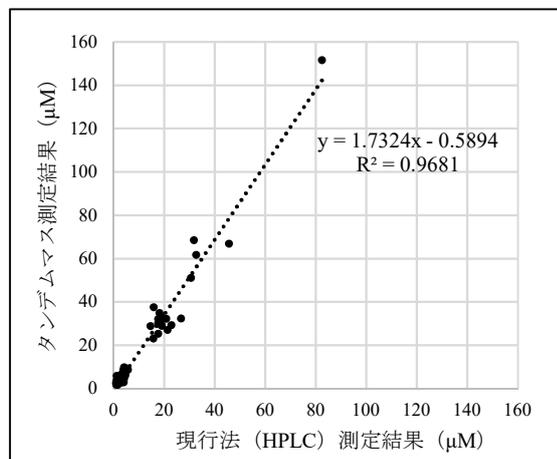


図 11 依頼検査ろ紙血検体の現行法との比較

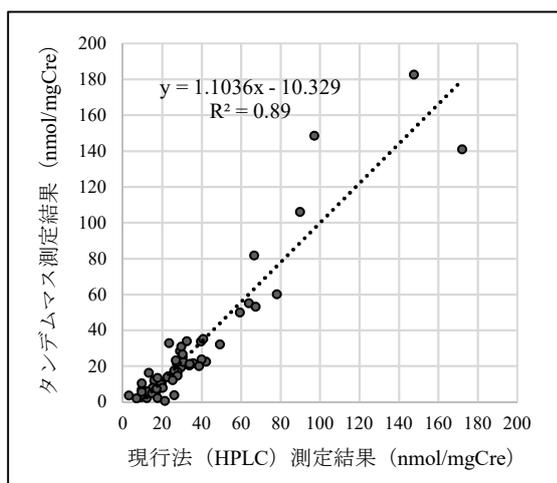


図 12 依頼検査尿検体の現行法との比較

4-6 測定結果（データ収集用検体）

3-1(4)②の新生児マススクリーニング検体 200 件、3-1(4)④の依頼検査尿検体（データ収集用）100 件を測定した結果は、表 6、表 7 のとおりであった。

4-7 検出限界及び定量下限値

「ろ紙血検体」及び「尿検体」の疑似ブランク検体として、それぞれ「ろ紙のみを抽出した溶液」、及び「クレアチニン 50 μ g/mL 水溶液」について、

各 84 回繰り返し測定したところ、表 8 の結果が得られた。平均値+3SD を検出限界として、平均値+10SD を定量下限値として求めると、前者では検出限界 0.88 μ M、定量下限値 1.77 μ M、後者では検出限界 0.37 nmol/mgCre、定量下限値 0.82 nmol/mgCre であった。

表 6 新生児マススクリーニングろ紙血検体

測定結果（200 検体）

平均値	3.43
SD	0.90
最小値	1.81
最大値	7.06

（単位： μ M）

表 7 依頼検査尿検体（データ収集用）

測定結果（100 検体）

平均値	20.20
SD	15.58
最小値	4.01
最大値	98.54

（単位：nmol/mgCre）

表 8 ブランク検体の測定結果と
検出限界及び定量下限値

	ろ紙血検体	尿検体
平均値	0.49	0.17
SD	0.12	0.06
検出限界	0.88	0.37
定量下限値	1.77	0.82

（単位 ろ紙血検体： μ M、

尿検体：nmol/mgCre）

5. 考 察

5-1 ホモシステイン水溶液の測定による直線性

4-2 において、水溶液では 4.5 μ M まで直線性を確認した。これは、検体に換算すると、ろ紙血検体では 239 μ M、尿検体では 477 nmol/mgCre に相当する。当所に依頼があった患者検体の現行法での測定値が、最大でろ紙血検体で 82.6 μ M、尿検体で 147.7

nmol/mgCre であったことから、本範囲で直線性を維持できれば、検体の測定も可能であるものと考えた。

5-2 前処理条件

(1) 還元剤濃度の検討

測定には、試料中のホモシステイン類を全て還元できる条件並びに LC-MS/MS による検出を妨げない条件が必要である。還元剤量の少ない 4 mM 条件では、ホモシステイン添加量の多い検体で検出されるホモシスチン面積値が大きく、還元の不十分性を示唆するものと考えた。還元剤濃度を増やすにつれ、面積値が減少し、40 mM で下限に達したと思われた。また、還元剤量 40 mM 条件においても、ホモシステイン内標、ホモシステインの検出面積値に急激な減少等は認められなかったことから、LC-MS/MS における検出には影響を及ぼさないものと判断し、前処理条件を設定した。

なお、このことより、還元の十分性については、二量体であるホモシスチンの面積値でモニタリングできるものと考えた。

(2) 固定操作の検討

固定操作は、LC-MS/MS 測定を妨害し得る余分な血中タンパク質をろ紙に沈着させ、抽出液から除くために行っている。ただし、本検査においては固定操作によってホモシステインが結合したタンパク質も同じく沈着することを考慮する必要がある。

現行法では、抽出後別ウェルにて還元反応を行っているが、固定操作を行った場合にはホモシステインが結合したタンパク質が抽出されず、ウェルの移し替えにより、以降の測定系に反映されなくなる可能性が考えられた。そこで、固定操作の有無とウェルの移し替えの有無を組合わせて検討した結果、固定操作有り、抽出液を別ウェルに移して還元反応を行った場合、同じウェルに還元試薬を加えた場合と比べて、測定値が低値となった。

これは、タンパク質と結合して存在しているホモシステインが、固定操作によって以降の反応系から

除かれることを示すと考えた。また、固定・抽出後のろ紙血検体と同ウェルで還元反応を行った場合に最終的な定量濃度の低下を示さなくなることは、還元操作がウェル内のろ紙血検体にも作用することによって、タンパク質と結合していたホモシステインも分離され、測定できたことによるものと考えられる。

5-3 妨害ピークへの対応

検体の一部にはホモシスチン及びホモシスチン内標で、プロダクトイオン m/z 136.1 (内標 140.1) に大きな妨害ピークを示すものが認められた。当該ピークは検出に用いる m/z を変更することで消失することから、同一 m/z に検出される別の物質であると考えた。

ホモシスチン由来のプロダクトイオン m/z (136.1、88.1、90.1 (内標 140.1、92.1、94.1)) は還元状態の目安に使用するのみであるが、測定の際には複数の m/z を設定し、モニタリングすることが必要と考えている。

5-4 精度及び現行法との相関

本法は、分析時間の縮減のため、カラムによる分離を採用していない。そのため、同じ m/z の物質を分離できないことが考えられたが、今回の検討の結果、当該影響は小さく、検体を用いての測定値の比較では、現行法との間に良好な相関を得ることができた。また、精度管理用ろ紙血検体の測定結果から得られた日内変動及び日間変動はともに小さく、検査精度も十分なものであることが確認できた。

5-5 検出限界及び定量下限値

検出限界及び定量下限値は、ろ紙血検体では、3-1(4)②のデータ収集用検体の平均値 $-2.83SD$ 及び $-2.15SD$ 、尿検体では 3-1(4)④のデータ収集用検体の平均値 $-1.29SD$ 及び $-1.24SD$ に相当するものであり、有意に高値を示す疾患疑い検体を判別するのに十分な精度が得られるものであった。

6. 結 語

現在 HPLC を用いて測定している総ホモシステイン測定について、LC-MS/MS による測定の検討を行った。

前処理方法は、現行法の HPLC と異なり、誘導体化を行わず還元処理のみで分析を行うため、試薬や前処理時間について削減することができる。また、現行法で必要な移動相の作成も不要である。

精度及び現行法との相関により、現行法の代替法として使用可能である。

7. 文 献

- 1) 吉永美和, 手塚美智子, 石川貴雄 他: マスククリーニング関連疾患依頼検査 代謝異常症検査結果 (2012~2017 年度), 札幌市衛生研究所年報, **45**, 88-92, 2018
- 2) 山口昭弘, 福土勝, 水嶋好清 他: 高速液体クロマトグラフィーによる血中総ホモシステインおよび総システイン測定法の開発, 臨床小児医学, **37**, 109-113, 1989
- 3) 上本道久: 検出限界と定量下限の考え方, ぶんせき, **425**, 216-221, 2010