

ハイリスク・スクリーニングにおいてGC/MSと タンデム質量分析計の有用性を示した2診断例

田上 泰子 花井 潤師 野町 祥介 阿部 敦子 成田 慶 太田 紀之 福士 勝

藤田 晃三 楠 祐一*1 窪田 満*2

要 旨

1990年から実施しているハイリスク・スクリーニングにおいて、2005年からタンデム質量分析計によるアミノ酸およびアシルカルニチン分析とガスクロマトグラフ質量分析計による有機酸分析の併用を開始した。この新しいシステムにより、グルタル酸尿症 型 1例を迅速に化学診断できたとともに、プロピオン酸血症の1例についても、より精度の高い化学診断が可能となることが明らかになった。

1. 緒 言

札幌市では1990年から新生児マス・スクリーニング検査における陽性例のフォローと、臨床症状等から強く代謝異常疾患が疑われる児の化学的補助診断を目的としてハイリスク・スクリーニングを実施し、成果をあげてきた¹⁻⁵⁾。一方で2005年4月、新生児マス・スクリーニングにおいてより多くの代謝異常疾患を見出すことを目的として、タンデム質量分析計(以下タンデムマス)を導入し試験研究を開始した⁶⁻⁹⁾。さらにハイリスク・スクリーニングにおいてもタンデムマスを導入し、従来から化学診断の対象としてきたアミノ酸代謝異常症(尿素サイクル異常関連を含む)や有機酸血症だけでなく、指標物質であるアシルカルニチンを定量することで脂肪酸酸化異常症も検出することが可能となった。

今回、タンデムマスを取り入れたハイリスク・スクリーニングにより、グルタル酸尿症 型、プロピオン酸血症の各1例が化学診断された。これらの症例の診断にはタンデムマスによる検査が非常に有効であったので、報告する。

2. 方 法

タンデムマスによる検査は Quattromicro API(日本ウォーターズ社製)と送液装置 2795(日本ウォーターズ社製)を用いて行った¹⁰⁾。尿中有機酸分析はガスクロマトグラフ質量分析計 GC/MS-Q02010(SHIMADZU)(以下GC/MS)を用いて有機溶媒抽出法¹¹⁻¹²⁾により、データ解析は新生児代謝異常スクリーニングシステム(島津エス・ディー製)により行なった。その他の検査は既報に従った³⁾。なお、GC/MSによる分析結果は、トータルイオンクロマトグラム(TIC)で示し、測定結果数値は該当化合物の面積比(MRA)によって表した。MRAは以下の計算式によって求めた。

面積比(MRA) = $\frac{Q \cdot ION \text{ [設定した質量数] の面積値}}{\text{内部標準物質の } Q \cdot ION \text{ [設定した質量数] の面積値}} \times 100$

3. 結 果

3-1 症例 グルタル酸尿症 型
症例

症例は生後5か月20日の男児で、筋緊張低下、

*1 北海道療育園小児科

*2 手稲溪仁会病院小児科

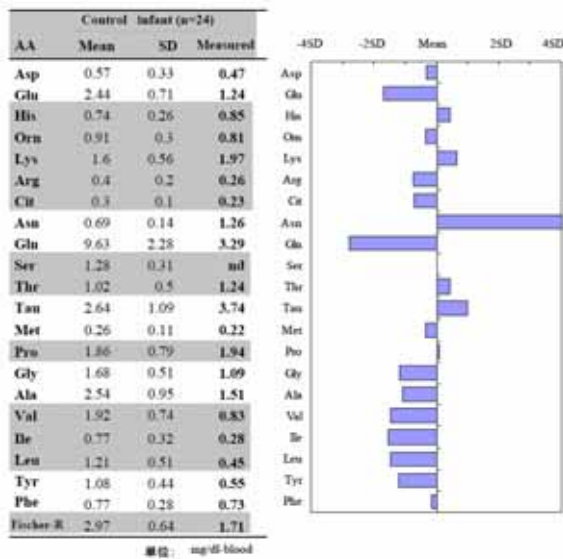
体重増加不良を主訴とし、肝機能異常、アシドーシス、低血糖、高アンモニア血症により、先天性代謝異常症が疑われ市内の医療機関からハイリスク・スクリーニングを依頼された。

在胎週数 40 週、出生時体重は 2992g で、従来の 6 疾患を対象とした新生児マス・スクリーニングの結果は正常であった。また、1 か月検診

においても特記すべき異常は認められなかった。ハイリスク・スクリーニング検査結果

血中乳酸値は 23.9 (正常上限 40) mg/dl、ピルビン酸値は 0.47 (正常上限 1) mg/dl と正常範囲内であり、ろ紙血液および尿中アミノ酸分析も異常は認められなかった (図 1)。

ろ紙血アミノ酸分析結果



尿アミノ酸分析結果

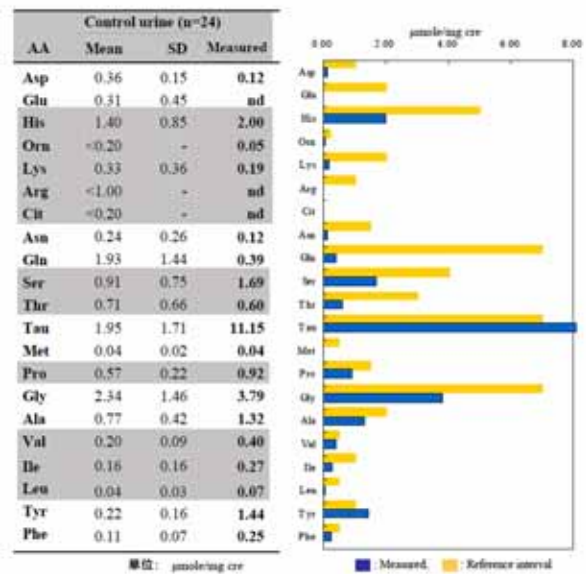
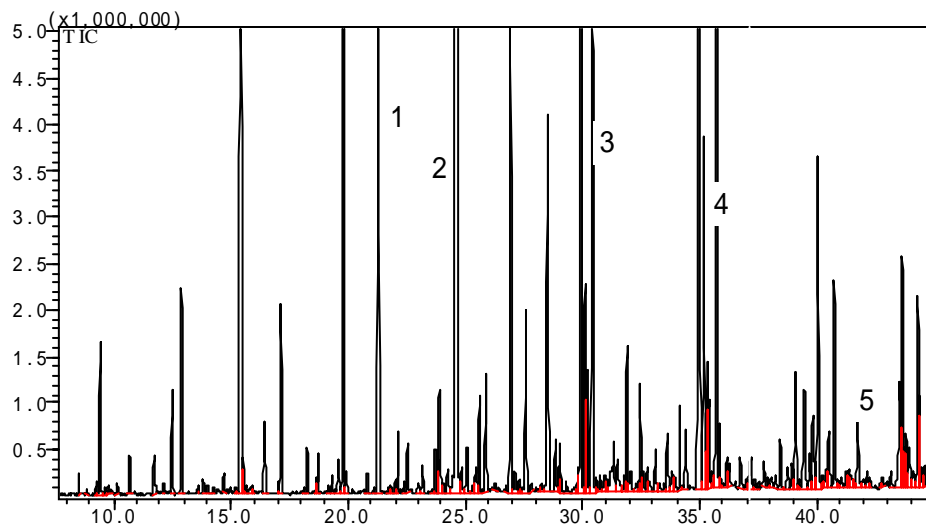


図 1. アミノ酸分析結果 (症例)



1:Grutaric-2, 2:Adipic-2, 3:Suberic, 4:Sebacic-2, 5:Internal STD

図 2 尿中有機酸 GC/MS トータルイオンクロマトグラム (症例 生後 5 カ月時)

尿中有機酸分析ではグルタル酸 677.8 (正常 8.4 以下)、アジピン酸 2959.8 (正常 13.0 以下)、スベリン酸 426.3 (正常 11.5 以下)と高値で、脂肪酸酸化障害の指標となるセバシン酸 549.9 (正常 11 以下)と高値で検出され、非ケトーシス性ジカルボン酸尿症の所見を得た(図2)。

タンデムマスによる検査では、オクタノイルカルニチン(C8)~パルミトイルカルニチン(C16:1)の中鎖~長鎖の多種に渡ったアシルカルニチンの

上昇が認められた。以上の結果より、グルタル酸尿症型と化学診断した。さらに、インフォームドコンセントを得た上で新生児マス・スクリーニング受検時に採取され、その後冷凍保存されていた紙血を用いたタンデムマスによる検査の結果、デカノイルアシルカルニチン(C10)の顕著な上昇が認められ、新生児マス・スクリーニング検査にタンデムマスが導入されていれば、新生児期に見出されていたことが明らかとなった(表1)。

表1. 症例のアシルカルニチン値 (pmol/ml)

指標(名称)	新生児期	5か月時	平均値±標準偏差	カットオフ値
COH (Free)	43,080	9481.0	26,517 ± 8,176	10,000
C2 (Acetyl)	16,630	6864.0	22,426 ± 6,582	
C3 (Propionyl)	1,496	194.4	1,762 ± 657	
C4 (Butyryl)	987.9	536.4	210 ± 68	
C5:1 (Tiglyl)	15.7	8.9	10.8 ± 6.5	100
C5 (Isovaleryl)	945.2	111.6	128 ± 113	1000
C6 (Hexanoyl)	771.0	222.1	45.7 ± 26.7	200
C5OH (3-hydroxy-isovaleryl)	130.6	93.8	109 ± 37	500
C8 (Octanoyl)	1,013.3	477.9	63.3 ± 30.2	300
C10:1 (Decenoyl)	413.9	207.6	84.4 ± 30.0	300
C10 (Decanoyl)	1,902.9	945.4	124 ± 71	500
C5DC (Glutaryl)	206.1	48.4	39.6 ± 16.2	200
C12 (Dodecanoyl)	787.4	730.4	124 ± 59	500
C14:1 (Myristoleyl)	850.2	1,088.5	87.9 ± 43.3	400
C14 (Myristoyl)	909.6	1,203.8	215.4 ± 61.2	800
C14OH (3-hydroxy-myristoyl)	20.3	19.2	14.2 ± 5.5	100
C16:1 (Palmitoleyl)	458.6	946.3	126 ± 57	500
C16 (Palmitoyl)	2,987.0	2,532.8	2,374 ± 856	8,000
C16OH (3-hydroxy Palmitoyl)	16.4	20.3	14.3 ± 5.8	50
C18 (Stearoyl)	1,505.1	1,559.7	746 ± 231	3,000
C18:1 (Oleyl)	28.4	29.2	10.6 ± 3.7	50
C0/(C16+C18)	9.59	2.32	9.4 ± 4.7	100
C3/C2	0.09	0.03	0.08 ± 0.03	0.25
C8/C10	0.53	0.51	0.54 ± 0.13	1.5

3-2 症例 プロピオン酸血症

症例

症例は女児で、2004年（2歳6ヶ月時）に意識障害、痙攣を主訴として市内の医療機関からハイリスク・スクリーニングの最初の依頼があった。その際は、HPLCによる尿中および血中アミノ酸分析とガスクロマトグラフィー（以下GC）による尿中有機酸分析を行ったが、特定の疾患を指摘できる異常は検出できなかった。その後、ハイリスク児として当所のハイリスク・スクリーニングでフォローされた。2006年6月（4歳8ヶ月）の3回目の検査依頼時には、タンデムマスとGC/MSを併用することにより、プロピオン酸血症として化学診断するに至った。なお、表2に医療機関における検査依頼時の臨

床所見および検査所見を示した。

ハイリスク・スクリーニング検査結果

ろ紙血及び尿を用いたアミノ酸分析の結果、4回の検査を通してグリシンの高値を認めた（図3）、他のアミノ酸は異常を認めなかった。乳酸・ピルビン酸値は正常範囲内であった。

尿中有機酸分析では、初回、2回目依頼検体を用いた検査では異常所見は認められなかった。しかし、3回目依頼では、GC/MS分析が可能となりプロピオン酸血症のパターンを得る事が出来た（図4）。その後、初回依頼時の検体を用いてGC/MSにより行った尿中有機酸分析においては、プロピオン酸血症関連指標物質の増加が認められ、その後の検査では変動が認められた（表3）。

表2 症例 の検査依頼時の医療機関における臨床および検査所見

項目 / 依頼回数		初回	2回目	3回目	4回目
年齢（日 齢）		2才7ヶ月 (922日)	4才6ヶ月 (1,638日)	4才8ヵ月 (1,721日)	4才10ヵ月 (1,766日)
主 訴		意識障害・痙攣・右肩麻痺・眼球左方偏位・軽度発達障害	嘔 吐	嘔 吐	
依 頼 内 容		癲癇からミトコンドリア脳筋症を疑う	メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症の軽度なものを疑う	メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症の軽度なものを疑う	(プロピオン酸血症診断後フォロー)
検 査 所 見	アシドーシス	±	+	-	未検査
	高乳酸血症	-	-	- (乳酸 11mg/dl)	未検査
	ケトーシス	-	+	+	未検査
	低血糖	-	+	-	未検査
	高アンモニア血症	-	+	+	未検査
特 記 事 項		髄液中 乳酸 30.8mg/dl ピルビン酸 3.4mg/dl			

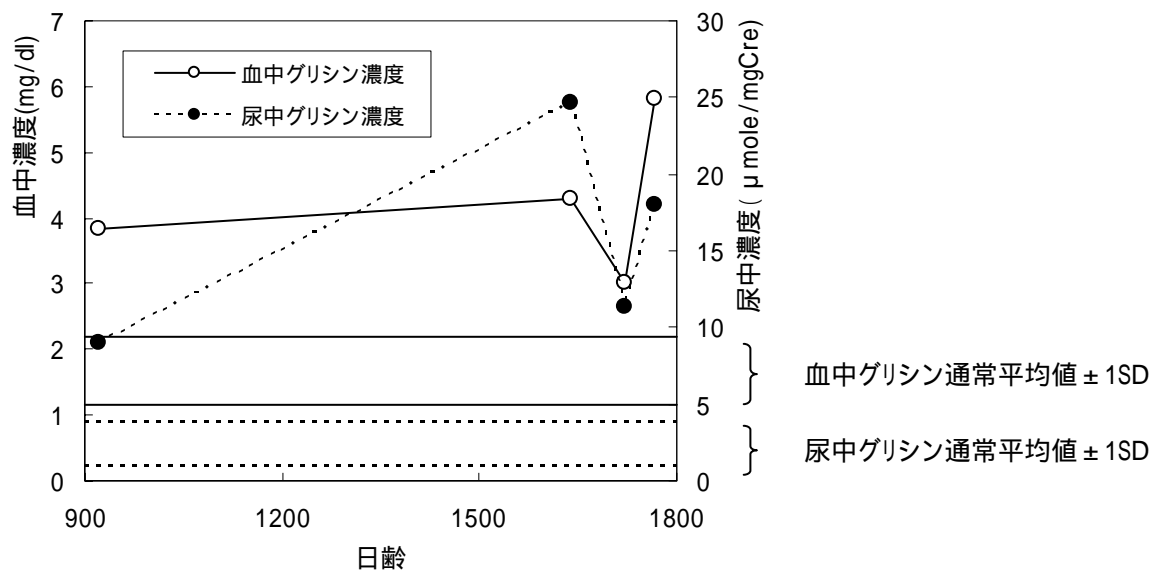
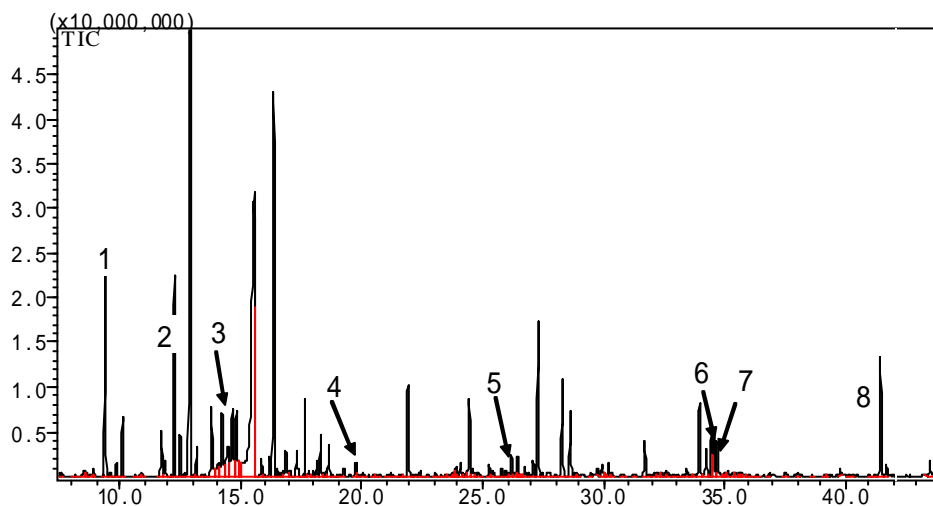


図3 症例 の血中および尿中グリシンの推移



1:Lactate, 2:3-OH-propionic-2, 3:2-Methyl-3-OH-butyric-1-2, 4:Propionylglycine-1
 5:Tiglylglycine, 6:Methylcitric-4(1), 6:Methylcitric-4(2), 8:Internal STD

図4 症例 の3回目検査依頼時尿中有機酸 GC/MS トータルイオンクロマトグラム

表3 症例 の尿中有機酸分析におけるプロピオン血症関連物質の値

物質名 \ 日齢	922日	1,638日	1,721日	1,766日	カット値
3-OH-propionic-2	21.3	8.3	114.2	0.7	2.0
Methylcitric-4(1)	14.7	ND	10.5	ND	1.8
Methylcitric-4(2)	9.2	ND	7.8	ND	1.5
Propionylglycine-1	2.1	0.5	4.0	ND	0.5
2-Methyl-3-OH-butyric-1-2	1.1	1.4	8.4	ND	7.7
Tiglylglycine-1	2.8	ND	3.2	ND	0.5

ND:測定限界以下

また、3 回目依頼時、本症例におけるタンデムマスによる検査の有効性を検討するため、インフォームドコンセントを得た上で、当時測定条件等を検討する段階であった乾燥ろ紙血によるタンデムマスによる検査を実施した。その結果、プロピオン酸血症およびメチルマロン酸血症の指標となるプロピオニルカルニチン (C3) ・アセチルカルニチン (C2) 比の上昇を確認することができた。加えて、GC/MS による尿中有機酸分析で尿中のプロピオン酸血症関連物質の顕著な増加を認めた (表 4, 1721 日齢)。これらの結果から症例 についてはプロピオン酸血症の化学診断に至った。さらに 922 日齢、1638 日齢の依頼検体においても、タンデムマスによる検査を遡って実施することで、全経過を通じて C3 の高値 C3/C2 比の上昇を確認した (表 4)。

4. 考 察

従来のハイリスク・スクリーニングは、HPLCによる血中及び尿中のアミノ酸分析とGCによる尿中有機酸分析によって代謝異常症の化学診断を行ってきた。しかし、有機酸代謝異常症と脂肪酸異常症には発症形態の類似したものがあること、また、それらの検査法では脂肪酸 酸化異常症の指標物質が測定できない事等の理由により、鑑別の難しい疾患があった。

このたび、タンデムマスも導入したことにより、脂肪酸代謝異常症の指標物質である血中のアシルカルニチンを定量することが可能となった。症例 においては、尿中有機酸分析により非ケトン性ジカルボン酸尿症が認められたが、ジカルボン酸尿症自体が非特異的所見であり、脂肪酸 酸化異常症を疑う

表4 症例 のろ紙血中アシルカルニチン値 (pmol/ml)

指標 (名称) \ 日齢	922 日	1,638 日	1,721 日	1,766 日	平均値 ± 標準偏差	カット値
COH (Free)	24,730	21,670	14,330	19,050	26,517 ± 8,176	10,000
C2 (Acetyl)	13,770	10,290	8,957	14,940	22,426 ± 6,582	
C3 (Propionyl)	23,670	21,610	13,140	7,736	1762 ± 657	
C4 (Butyryl)	135.2	140.0	197	92.2	210 ± 68	
C5:1 (Tiglyl)	31.4	19.4	27.5	15.2	10.8 ± 6.5	100
C5 (Isovaleryl)	56.9	49.7	95	37.6	128 ± 113	1,000
C6 (Hexanoyl)	38.7	30.8	37.4	20.1	45.7 ± 26.7	200
C5OH (3-hydroxy-isovaleryl)	200.3	96.7	106.5	135.3	109 ± 37	500
C8 (Octanoyl)	32.4	37.6	46.2	36.1	63.3 ± 30.2	300
C10:1 (Decenoyl)	37.4	49.6	71.8	75.5	84.4 ± 30.0	300
C10 (Decanoyl)	81.5	76.9	85.3	78.9	124 ± 71	500
C5DC (Glutaryl)	23.3	21.3	31.2	17.4	39.6 ± 16.2	200
C12 (Dodecanoyl)	32.4	21.9	23.7	37.5	124 ± 59	500
C14:1 (Myristoleyl)	38.9	38.8	54.3	48.5	87.9 ± 43.3	400
C14 (Myristoyl)	67.7	27.0	38.7	50.8	215.4 ± 61.2	800
C14OH (3-hydroxy-myristoyl)	5.9	12.5	8.6	8.9	14.2 ± 5.5	100
C16:1 (Palmitoleyl)	41.5	22.5	33.3	35.0	126 ± 57	500
C16 (Palmitoyl)	425.0	287.6	432.3	510.5	2374 ± 856	8,000
C16OH (3-hydroxy Palmitoyl)	7.2	4.9	6.1	7.4	14.3 ± 5.8	50
C18 (Stearoyl)	244.2	205.8	286.9	267.1	746 ± 231	3,000
C18:1 (Oleyl)	6.3	6.9	10.8	10.0	10.6 ± 3.7	50
C0/(C16+C18)	37.0	43.9	19.93	24.50	9.4 ± 4.7	100
C3/C2	1.72	2.10	1.47	0.52	0.08 ± 0.03	0.25
C8/C10	0.40	4.79	0.54	0.46	0.54 ± 0.13	1.5

ことはできたが、原因が一次性か二次性が特定する事が困難であった。しかし、タンデムマスによる検査を行うことにより該当疾患の指標物質であるオクタノイルカルニチン(C8)及びデカノイルカルニチン(C10)の高値からグルタル酸尿症型と化学診断するに至った。また、新生児マス・スクリーニングにおいて脂肪酸酸化異常症を見出すためには、採血時期として出生直後の飢餓期が適当であると考えられるが、本症例において、新生児期ろ紙血を用いたタンデムマスによる検査でも同様の結果が得られたことは、現行の生後4~6日目の採血により実施している新生児マス・スクリーニング検査により、グルタル酸尿症型を見出し得ることが明らかとなった。さらに、グルタル酸尿症型疾患のように臨床型として新生児型(重症型)と遅発型(間欠的発作)が存在する疾患においては、遅発型を見出す上で、ハイリスク・スクリーニングにおいてタンデムマスによる検査を実施する意義は大きい。

プロピオン酸血症は新生児期に発症する重症型(発生頻度40万に1人)と、乳児期以降に症状を呈する晩発型(発生頻度3万人に1人)が知られている。軽症~中等症の患児では脳障害が徐々に進み乳児期以降に発達の遅れや痙攣の症状がみられるが早期治療により症状を軽減することができる。

症例の場合、従来から行われてきたGCによる尿中有機酸分析だけでは、3回目依頼検体を用いた検査を行なうまで異常を認めることは出来なかった。しかし、タンデムマスによる検査を行うことで、初回依頼時よりC3/C2比の異常高値により疾患を検出できることが明らかとなった。これにより従来の尿中有機酸分析の限界とタンデムマスによる検査の有用性が示され、タンデムマスによる検査を実施することで当該疾患をより早期に見出すことが可能であることが明らかとなった。なお、松本らによって指摘されている通り、プロピオン酸血症における血中および尿中アミノ酸におけるグリシンの著増¹¹⁾も改めて確認する事が出来た。

一方、タンデムマスによる検査では、メチルマロン酸血症とプロピオン酸血症の鑑別は難しく、GC/MSによる尿中有機酸分析によって、はじめて鑑別が可能である。

本報で紹介した2例を通じて、タンデムマスによるアシルカルニチン分析と、GC/MSによる尿中有機酸分析を相補的に行うことで、化学診断の精度を大きく向上させることができることを示すことができた。

今後は、ハイリスク・スクリーニングにおいてタンデムマスによる検査とGC/MSによる尿中有機酸検査の実施を継続し、多様な病態を示す先天性代謝異常疾患の化学診断のため、より有用な検査システムを構築していきたい。

5. 文 献

- 1) 山口昭弘, 福士 勝, 佐藤泰昌他: 札幌市における先天性代謝異常症のハイリスク・スクリーニング, 日本マス・スクリーニング学会誌, 7(1), 21-28, 1997
- 2) 藤田晃三, 田上泰子, 花井潤師他: 札幌市の先天性代謝以上症ハイリスク・スクリーニング, 臨床小児医学, 50, 139-144, 2002
- 3) 田上泰子, 花井潤師, 野町祥介他: 札幌市における先天性代謝異常症のハイリスク・スクリーニング(1996~1999年度), 札幌市衛生研究所年報, 27, 32-37, 2000
- 4) 田上泰子, 花井潤師, 野町祥介他: 札幌市における先天性代謝異常症のハイリスク・スクリーニング(第2報) JICA 関連諸国からの検体の検査状況, 札幌市衛生研究所年報, 28, 45-52, 2001
- 5) 田上泰子, 花井潤師, 野町祥介他: 札幌市における先天性代謝異常症のハイリスク・スクリーニング結果, 札幌市衛生研究所年報, 32, 31-39, 2005
- 6) 野町祥介, 阿部敦子, 花井潤師他: 札幌市におけるタンデムマスによる新生児スクリーニングシステムの構築, 平成16年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「わが国に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」報告書，
98-103, 2005
- 7) 野町祥介，本間かおり，花井潤師他：札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのための体制整備，日本マス・スクリーニング学会誌，16(1)，65-72, 2006
- 8) 本間かおり，花井潤師，野町祥介他：札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのためのデータ処理システム(1)事務処理システム，日本マス・スクリーニング学会誌，16(1)，73-77, 2006
- 9) 花井潤師，本間かおり，野町祥介他：札幌市におけるタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのためのデータ処理システム(2)検査データ処理と内部精度管理，日本マス・スクリーニング学会誌，16(1)，79-84, 2006
- 10) 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，平成 16 年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「わが国に 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」報告書，90-97, 2005
- 11) 松元勇，坂本正一：臨床化学診断学，ソフトサイエンス社(東京都)，平成 7 年 初版第一印刷発行，30-31，144
- 12) 山口清次：有機酸・脂肪酸代謝異常研究の進歩，日本先天代謝異常学会雑誌，20，26-36, 2004

Usefulness of Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry for Screening of High Risk Patients

-Two Biochemically Diagnosed Cases-

Yasuko Tagami, Junji Hanai, Shosuke Nomachi, Atsuko Abe, Kei Narita,
Noriyuki Ota, Masaru Fukushi, Kozo Fujita, Yuichi Kusunoki^{*1} and Mitsuru Kubota^{*2}

We have been carrying on screening for high risk patients in Sapporo city since 1990. We installed tandem mass spectrometry to analyze amino acids and acylcarnitine, and also gas chromatography-mass spectrometry to analyze organic acids in 2005. By this new screening system, we could diagnose chemically a patient illness as Glutaric acidemia type and another patient illness as propionic acidemia. Our system would be useful for high risk patient screening with highly precise biochemical data.

*1 Department of Pediatrics, Medical and Training School Hokkaido Ryoikuen

*2 Department of Pediatrics, Teine Keijinkai Hospital