

人を対象とする医学研究にかか研究計画書

1 研究課題名

LC-MS/MS による有機酸の分析法の基礎検討

2 研究担当者

研究責任者： 保健科学課母子スクリーニング検査係 手塚美智子

研究協力者： 保健科学課母子スクリーニング検査係 吉永美和、石川貴雄

3 研究申請年月日

平成 30 年（2018 年）6 月 27 日

4 研究期間

倫理審査委員会の承認時から平成 33 年（2021 年）3 月 31 日まで

5 研究の背景・目的

有機酸代謝異常症は、1960～1970 年代にかけて、GC/MS を用いた尿中有機酸分析法により主な疾患が同定された。有機酸が体内に増加すると pH は酸性に傾き、生体は酸を体外に排出しようとするため、有機酸濃度は血中では低く、尿中に多く検出される傾向があるが、GC/MS はこの尿中の種々の有機酸を分析可能であり、有機酸代謝異常症の診断において有用である。しかし、GC/MS による尿中有機酸分析は、前処理が煩雑であり、1 検体の分析に要する時間も長いため、スクリーニングへの運用は困難であった。

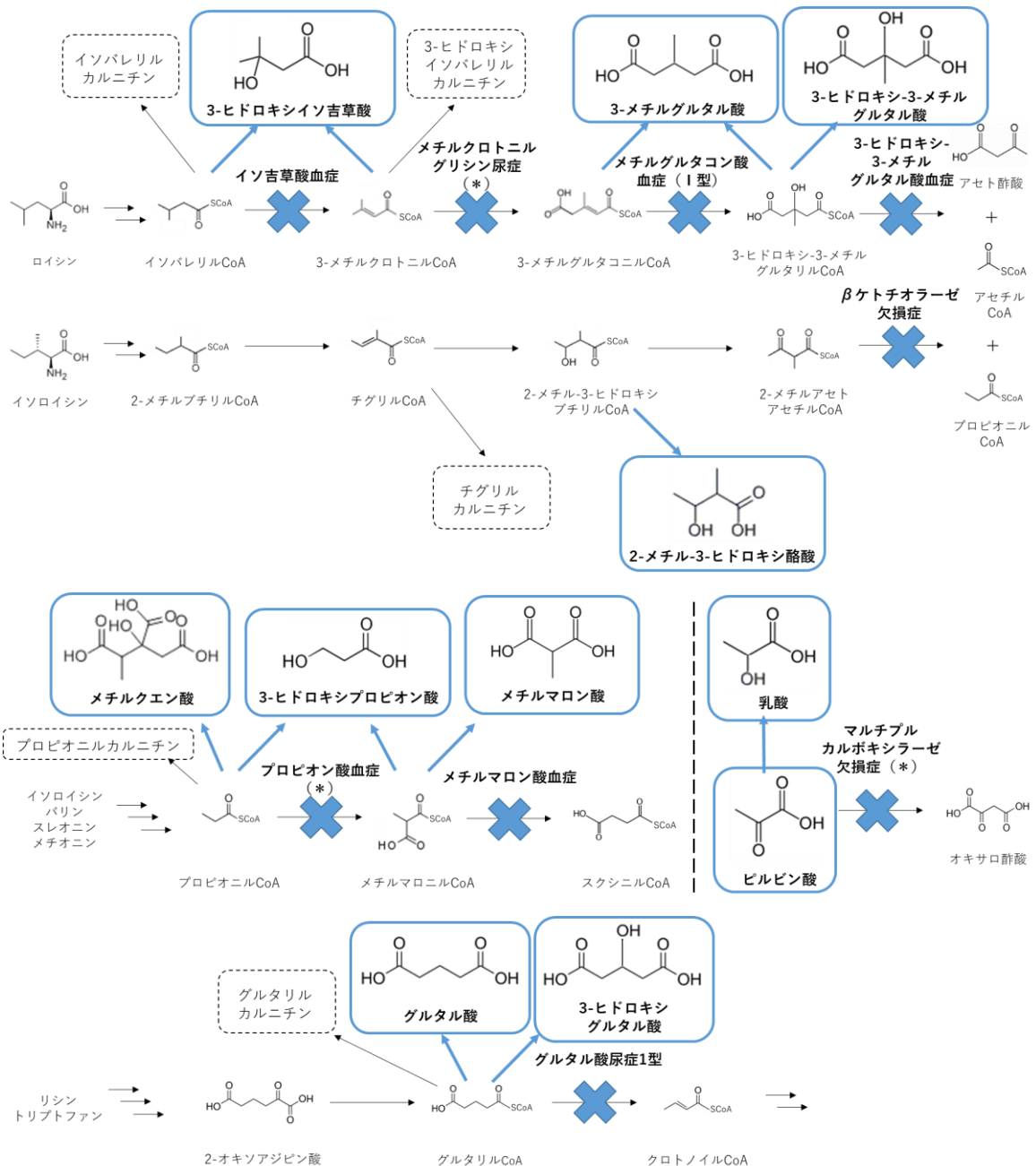
一方、日本においては 2000～2010 年代にタンデムマス・スクリーニングが普及した。タンデムマス・スクリーニングでは、ろ紙血液を用いて、アミノ酸が有機酸に異化する代謝経路上の中間代謝物に由来するアシルカルニチン類（図）を測定することが可能となり、それによって有機酸代謝異常症の疑いを指摘できるようになった。しかし、代謝経路においてより下流の酵素欠損に起因する疾患の場合は、アシルカルニチンの分析のみでは疾患名の特定までは至らないほか、抗生剤の使用による偽陽性例の分別が不可能であるなど、検査の精度には限界があった。

そこで、有機酸代謝異常症のスクリーニングにおいては、タンデムマス・スクリーニングで異常が疑われた児に対し、別途精密検査先の病院で尿検体を採取し、GC/MS による尿中有機酸分析で疾患の鑑別を行い、両検査法を補完的に運用することが推奨されている。

近年、分析手法の開発が進み、LC-MS/MS によるろ紙血中有機酸の分析例が報告されるよう

になってきた。スクリーニングのろ紙血液を用いて有機酸代謝異常症に特有の有機酸を分析することができれば、疾患の鑑別に要する時間を短縮することができ、より早期に適切な治療を開始することが可能になる。

本研究は、有機酸代謝異常症の鑑別において重要な有機酸（表）の分析条件を確立し、正常群と患者群のろ紙血液中有機酸を測定し、スクリーニングへ応用するために十分な感度及び精度が得られるかどうか検討することを目的として実施する。



(*) マルチプルカルボキシラーゼで欠損 有機酸 アシルカルニチン

図 有機酸代謝異常症に関連する代謝経路

表 有機酸代謝異常症と特徴的な中間代謝物

有機酸代謝異常症	アシルカルニチン	有機酸
メチルマロン酸血症	プロピオニルカルニチン	コハク酸 メチルマロン酸 3-ヒドロキシプロピオン酸 メチルクエン酸
プロピオン酸血症		3-ヒドロキシプロピオン酸 メチルクエン酸
イソ吉草酸血症	イソバレリルカルニチン	3-ヒドロキシイソ吉草酸
β ケトチオラーゼ欠損症	チグリルカルニチン 3-ヒドロキシイソバレリルカルニチン	2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	3-ヒドロキシイソバレリルカルニチン	乳酸 ピルビン酸 3-ヒドロキシプロピオン酸 メチルクエン酸 3-ヒドロキシイソ吉草酸
メチルクロトニルグリシン尿症		3-ヒドロキシイソ吉草酸
3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸血症		3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸 3-メチルグルタル酸
メチルグルタコン酸血症		3-メチルグルタル酸
グルタル酸尿症 1 型	グルタリルカルニチン	グルタル酸 3-ヒドロキシグルタル酸

6 研究の対象

- (1) 2008年度以降に受付された新生児マススクリーニングろ紙血液検体のうち、正常群として50件、患者群として7件（プロピオン酸血症5件、メチルクロトニルグリシン尿症2件）、偽陽性群として34件（プロピオニルカルニチン高値9件、抗生剤使用によるイソ吉草酸血症疑い8件、3-ヒドロキシイソバレリルカルニチン高値8件、グルタリルカルニチン高値9件）を使用する。なお、本研究期間中に新規の患者が発見された場合には、そのろ紙血液検体を本研究の対象に追加する。
- (2) 2012年度以降に受付された札幌市の母子保健事業「マススクリーニング関連疾患依頼検査」（以下「依頼検査」という。）のろ紙血液検体のうち、表の疾患に該当する患者であることが確定している患者検体8件（メチルマロン酸血症2件、プロピオン酸血症1件、メチルクロトニルグリシン尿症1件、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症2件、グルタル酸尿症1型2件）を使用する。なお、本研究期間中に新規の患者が発見された場合には、そのろ紙血液検体を本研究の対象に追加する。

7 研究の方法

札幌市衛生研究所が保有する分析システム「高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS-8050 及び NexeraX2 システム)」を用いて、以下の項目について分析法の検討を行う。なお、分離カラムは、Hilic カラム (Shodex HILICpak VG-50 2D、Acquity BEH Amide) 及び逆相カラム (Gemini C6-Phenyl、InertSustain C18、Scherzo SW-C18) の中から今後の検討により決定する。

- (1) 濃度既知の有機酸溶液を調製し、検出条件、分離条件等について検討し、測定方法を構築する。
- (2) 有機酸の添加された精度管理用ろ紙血液、もしくは譲渡血液に任意の濃度の有機酸を添加して作製するろ紙血液を用いて、(1)の測定方法で分析を行い、感度及び精度について評価する。
- (3) 6のろ紙血液検体を本法により分析し、正常群と患者群のろ紙血中有機酸量について比較する。

8 新たに収集する資料等

なし

9 既存資料等の利用

(1) 既存資料等の種類

- ① 6(1)の新生児マススクリーニングろ紙血液検体、タンデムマス・スクリーニング検査結果、採血時日齢、採血日、疾患名
- ② 6(2)の依頼検査ろ紙血液検体、タンデムマス・スクリーニング検査結果、採血時日齢、採血日、疾患名

(2) 匿名化の取扱い及びその方法

6(1)及び6(2)のろ紙血液検体は、氏名等の個人情報が入り取られ、検体番号のみが付けられた状態で使用する。測定後、本研究における測定結果と9(1)①及び9(1)②に示した属性情報及びタンデムマス・スクリーニング検査結果を結合した後、患者群及び偽陽性群に関しては、既存の検体番号は削除して連結不可能匿名化した上で解析を行う。

正常群に関しては、患者データとの比較解析の際に統計的な正常値としてのみ使用する。ただし、測定の結果、異常値が認められた検体があった場合は、倫理審査委員会と再度協議したうえで、その取り扱いについて、決定するものとする。

なお、測定結果の結合と検体番号の削除およびそのための台帳の管理は本研究に関与しない者が行う。

(3) インフォームドコンセントの手続き

①新生児マススクリーニングろ紙血検体

6(1)のろ紙血液検体は、新生児マススクリーニング申込書（別添資料）で「新生児マススクリーニングを終えた血液検体の他の研究等への利用について」に関して了承が得られているものを対象としており、本研究のための新たなインフォームドコンセントは取得しない。

②依頼検査ろ紙血液検体

6(2)のろ紙血液検体は、依頼検査承諾書（別添資料）で「検査終了後の検体の利用について」に関して了承が得られているものを対象としており、本研究のための新たなインフォームドコンセントは取得しない。

1 0 予測される成果

新生児マススクリーニング検体を使用する新しい分析法を導入することによって、より迅速かつ高い精度で、スクリーニング正常者と陽性者の判定が可能になる。さらに、早期に疾患を鑑別することができれば、患児の治療に有用となる情報を提供できるので、治療効果を上げることにも寄与できる。

1 1 費用負担

研究対象者の費用負担はない。

研究に必要な経費については、衛生研究所の事業費（スクリーニング検査費）から負担する。

1 2 研究を実施した場合の不利益

本研究では不利益は生じない。

1 3 利益相反に係る申告

以下のとおり申告する。

ア 企業・団体からの収入の有無: 無し

イ 株式・新株予約権等の取得・保有・売却、出資の有無: 無し

ウ 融資、保証の有無: 無し

エ 産学官連携活動の有無、種類、金額: 無し

オ 産学官連携相手先との関係（株式（公開・未公開を問わない。）、出資金、ストック

オプション、受益権等)の有無、種類、数量:無し

カ 無償での機材・役務・物品・試料等の提供の有無、種類、数量:無し

キ 企業・団体の役員等への就任の有無:無し

ク 企業・団体への兼業の有無:無し

1 4 研究成果の取扱い

本研究の成果は、札幌市衛生研究所年報、学会等での学術的な発表、学術論文などで発表する予定である。