

タンデムマス・スクリーニングにおける非誘導体化分析

重松陽介¹⁾, 畑 郁江²⁾, 稲岡一考³⁾

1) 福井大学医学部看護学科健康科学, 2) 福井大学医学部小児科

3) 大阪府立母子保健総合医療センター

要 旨

タンデムマス・スクリーニングが全国に拡大されるようになっている状況に対応するために、標準的なタンデムマス・スクリーニング分析法について解説した。今後マスクリーニングの前処理法として、非誘導体化法が推奨されるとともに、対象疾患を限定したデータ処理のための設定法の重要性が強調されるであろう。この方法に基づいて適切に精度管理が行われれば、より精度の高いマスクリーニングが実施出来ることを指摘した。

キーワード

非誘導体化, 精度管理, アシルカルニチン, アミノ酸

I. はじめに

タンデムマス・スクリーニングの分析法については、以前は主として機器の性能上の制約により、試料をブチルエステル化するという誘導体化による分析法（誘導体化法）が採用されていた。何よりも良好な感度が得られること、また誘導体化により測定対象物質の分子量が増加するため特異性も向上するという利点がある一方、濾紙抽出試料を十分に乾涸しないと誘導体化が不完全となり誤ったデータを生じること、腐食性の試薬を使用することに伴う対策が必要であるため手間や時間がかかることが欠点であった¹⁻³⁾。

これに対して、近年の機器性能の向上により、サンプルを誘導体化しない調製法（非誘導体化

法）でも十分な精度で分析が出来ることが示されてきている⁴⁾。非誘導体化法の利点は、とにかく簡便であるため大量検体処理に適していることである。また、誘導体化操作に対して不安定なアシルカルニチンのような物質も確実に測定でき、遊離カルニチンへの影響も考慮しなくてよい。しかしながら、分析感度や特異性が誘導体化法に比べ劣ることも事実であり、適切な手順に従って検査を行い、精度管理を行う必要がある。誘導体化法と非誘導体化法の比較を表1に示している。

このような背景を踏まえ、標準的なタンデムマス・スクリーニングの前処理法として非誘導体化法が推奨されている。前処理法には、①キット化された試薬（キット試薬）を使う方法と、②単体として購入した内部標準試薬（非キット試薬）を使う方法とがある。

キット試薬では内部標準試薬、調整器具、内部精度管理プログラムまでを含むマニュアル通りに行えば精度のよい分析が可能である。

一方、非キット試薬を使う場合は、分析方法に指定はなく、使用者に任されているので、それらに対する配慮が必要である。そこで本稿で

<連絡先>

重松 陽介

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23

福井大学医学部看護学科・小児科

Tel:0776-61-3111 Fax:0776-61-8563

E-mail:yosuke@u-fukui.ac.jp

表1. タンデムマス分析における誘導体化と非誘導体化の比較

	誘導体化	非誘導体化
長所	●イオン化効率が高い、感度のよい分析となる。 ●誘導体化で質量数が大きくなり、精度のよい分析となる。	●抽出操作のみであるので測定対象物質の分解が起こりにくい。 ●危険な試薬は使わないので特別の設備が要らない。 ●調製操作が単純であり大量検体処理に適している。手間がかからない（人件費削減）。
短所	●調製操作が複雑であり、前処理の時間と人手がかかるため、大量検体処理をする上で不利である。 ●腐食性のある試薬を取り扱うための設備が必要である。 ●誘導体化により測定対象物質の分解が起こることがある。 ●誘導体化反応不十分とき不適切な分析となることがある。	●イオン化効率の点で劣るため、より高性能の機器を使う必要がある。 ●質量数が小さい物質では干渉を受けやすく、精度が不十分になることがある。
その他	世界的にはまだ採用している検査施設数が多い。	分析キットを使用する施設では標準調製法となっている。

表2. タンデムマス分析非誘導体化用試薬の種類

	キット化試薬	非キット化試薬
長所	●内部標準試薬だけでなく分析用プレートなど調製に必要な器具が用意されている。 ●手順通りに調製すれば分析の精度が保証されている。 ●標準濾紙血が附属しており内部精度管理が容易である。	●比較的安価である（内部標準試薬のみであるため）。 ●調製操作の工夫等の自由度がある。
短所	●やや高い（試薬以外に調整用具、内部精度管理検体を含むため）	●調整用具を準備し、調製操作を自施設でマニュアル化しなければならない。 ●精度管理用の標準濾紙血を別途入手し、任意の精度管理が必要である。
その他	現在1社からのみ入手できる	1社から複数の試薬が入手できる

は、主に非キット試薬を使った分析方法を中心に解説する。

また、臨床検査法としてのアミノ酸・アシルカルニチン分析については、網羅的にできるだけ多くの疾患を診断できるような設定を別途設けておくことになる。キット試薬、非キット試薬に関わらず、分析やデータ解釈に応用できるよう precursor ion, product ion, あるいは診断メーカーのカットオフ参考値もあげた。必要に応じて使い分ければ、タンデムマス・スクリーニングにおける倫理的問題への対応が可能となることを強調したい。

II. 新生児スクリーニングとしての標準的タンデムマス分析法

1. 内部標準の選択

わが国で内部標準として入手可能な試薬は2つのメーカーから提供されているのみである。前述のように、1つはキット試薬として提供されているものであり、もう1つは非キット試薬として、内部標準試薬単体で提供されているものである。その特徴は表2に示した通りであり、それぞれの施設の事情に合わせて採用するとよい。

キット試薬として提供される内部標準の取り扱い、同梱されている分析器具などの使用方法と共にマニュアル化されており、手順通り分

析することになる。ただし、後述するように、限定したスクリーニング対象疾患に合わせて分析対象物質を設定しリスト化することに留意する必要がある。

2. 非キット試薬を使用する時の調製法

単体で入手できる内部標準試薬にはアミノ酸分析用とアシルカルニチン分析用があり、それぞれ日本仕様のオプション試薬もある。ここでは、日本仕様のアミノ酸分析用試薬（AA用試薬）と、アシルカルニチン分析用試薬（AC用試薬）を使用する方法を述べる。オプション試薬でない元々の試薬も使用できるが、タンデムマス分析での分析設定の違いに留意する必要がある。

〔内部標準溶液の調製法〕

- ② HPLC用の蒸留水およびメタノールを使う。
- ③ アミノ酸内部標準試薬用バイアル（AA用バイアル）に蒸留水1mlを加え攪拌後、15分の超音波処理により溶解する。
- ④ アシルカルニチン内部標準試薬用バイアル（AC用バイアル）にメタノール1mlを加え、攪拌にて溶解する。
- ⑤ 各々をメスフラスコに移す。AA用バイアルに蒸留水1ml、AC用バイアルにメタノール1mlを加え、各々攪拌後メスフラスコに移す。その後メタノールで100mlにメスアップする。この操作により、内部標準溶液は水2%含有メタノール溶液となる。この溶液での各内部標準の濃度は、試薬に添付されている濃度表（ μM ）の値の1/100になる。

3. 濾紙固定液の作成

特級あるいはHPLC用のアセトン、メタノール、蒸留水を7:7:2の比率で混和する。

4. 移動相の作成

HPLC用のアセトニトリル、メタノール、蒸留水を2:2:1の比率で混和し、HPLC用のギ酸を0.05%となるように加え攪拌し、超音波により脱気する。

5. 濾紙血の処理方法

- ① 直径1/8インチ（血液3 μl 相当）の濾紙血をポリプロピレン製平底マイクロプレートに打ち抜く。
- ② 濾紙固定液10 μl を加え、蓋をして室温に10分間放置後、蓋を取り、インキュベータ（37 $^{\circ}\text{C}$ ）で20~30分間乾燥させる。
- ③ 内部標準液100 μl を分注後蓋をし、室温で緩やかに30分間振盪し抽出操作を行う。
- ④ 抽出液を新しいポリプロピレン製U底（あるいはV底）マイクロプレートに移す。
- ⑤ マイクロプレートをオートインジェクタのラックに載せ、タンデムマス分析を行う。マイクロプレートはアルミフォイルでカバーするのが一般的であるが、ラップでカバーし、小穴をあけた蓋をすると機密性はより高まる。アルミフォイル使用時は、ラックを冷却するとサンプル蒸発を少なくすることが出来る。

6. タンデムマス（MS/MS）分析

MRM分析を行い、対象疾患に合わせて測定物質を限定する。MRM分析については、数多くの対象物質を測定できるように設定し、分析結果のリスト化の段階で対象疾患に合わせて分析対象物質を選択することは許容される。また、日常のスクリーニングには使用しないが、アシルカルニチン一斉分析用にprecursor ion scanを設定しておく、臨床検査としての利用にも、また精度管理にも役立てることが出来る⁹⁾。

(1) LCとMS/MSとの接続

ピークチューブ配管の途中にフィルターを付ける。フィルターまでは内径0.25mm、フィルター後は内径0.13mmのピークチューブとする。フィルターはMetal-Free in-Line Filters (Grace Davison Discovery Science) を推奨する。

(2) LCの設定

- ① 注入サンプル量：充分量（5-20 μl ）を注入する。ただし、多量注入時には、イオンサプレッション現象による感度低下が見られていないか確認する必要がある。
- ② タイムプログラムの設定：機種に応じて、1~1.5分の分析サイクルになるようにする。

表3. タンデムマス分析 (MRM) での測定物質と内部標準物質 (IS) のm/z設定値

(A) アミノ酸

	m/z		定量用内部標準
	precursor	product	
<u>Val</u>	118.1	72.1	(Val IS)
Val IS	126.1	80.1	
<u>Leu</u>	132.1	86.1	(Leu IS)
Leu IS	135.1	89.1	
<u>Met</u>	150.1	104.1	(Met IS)
Met IS	153.1	107.1	
<u>Phe</u>	166.1	120.1	(Phe IS)
Phe IS	172.1	126.1	
<u>Cit</u>	176.1	113.1	(Cit IS)
Cit IS	178.1	115.1	
<u>Arg</u>	175.1	70.1	(Arg IS)
Arg IS	180.1	75.1	
<u>Tyr</u>	182.1	136.1	(Tyr IS)
Tyr IS	188.1	142.1	
<u>ASA</u>	291.1	116.1	(Arg IS)

(B) アシルカルニチン

	m/z		定量用内部標準
	precursor	product	
<u>C0</u>	162.1	103.0	(C0 IS)
C0 IS	171.1	103.0	
<u>C2</u>	204.1	85.0	(C2 IS)
C2 IS	207.1	85.0	
<u>C3</u>	218.1	85.0	(C3 IS)
C3 IS	221.1	85.0	
<u>C4</u>	232.1	85.0	(C4 IS)
C4-OH	248.1	85.0	(C4 IS)
C4 IS	235.2	85.0	
<u>C5:1</u>	244.2	85.0	(C5 IS)
<u>C5</u>	246.2	85.0	(C5 IS)
C5 IS	255.2	85.0	
<u>C5-OH</u>	262.2	85.0	(C5-OH IS)
C5-OH IS	265.2	85.0	
<u>C5DC</u>	276.2	85.0	(C5DC IS, or C8 IS)
C5DC IS	279.2	85.0	
<u>C6</u>	260.2	85.0	(C8 IS)
<u>C8</u>	288.2	85.0	(C8 IS)
C8 IS	291.2	85.0	
<u>C10:1</u>	314.3	85.0	(C8 IS)
<u>C10</u>	316.3	85.0	(C8 IS)
C12:1	342.3	85.0	(C12 IS)
<u>C12</u>	344.3	85.0	(C12 IS)
C12 IS	347.3	85.0	
<u>C14:1</u>	370.3	85.0	(C14 IS)
<u>C14</u>	372.3	85.0	(C14 IS)
C14 IS	381.3	85.0	
<u>C16</u>	400.3	85.0	(C16 IS)
C16 IS	403.3	85.0	
<u>C16-OH</u>	416.4	85.0	(C16 IS)
<u>C18:1</u>	426.4	85.0	(C18 IS, or C16 IS)
<u>C18</u>	428.4	85.0	(C18 IS, or C16 IS)
C18 IS	431.4	85.0	
<u>C18:1-OH</u>	442.4	85.0	(C18 IS, or C16 IS)

※ ISとして2種類あげている部分は、オプションとして使用される場合があることを示す。

たとえば、注入直後は高流速 (1ml/分) とし、サンプルピーク出現 (開始後6秒程度) 後は低流速 (0.07ml/分) にし、30~40秒間の分析の後再び高流速にして回路の洗浄を行えば、分析積算回数確保と分析時間の短縮が可能となる。

(3) 対象疾患を限定したMRM設定

表3にMRMにおける設定イオンのm/z値を示した。一次対象疾患と二次対象疾患 (高チロシン血症1型, 高アルギニン血症, 短鎖ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素欠損症を除く) をスクリーニングするためには、下線で示した物質およびそれらの比のみをリストに抽出しデータを得るようにする。これは、それ以外の疾患をスクリーニングしないために重要である。

(4) 定量とスクリーニング指標値

各々の機器の定量用ソフトウェアで定量する。定量のために入力すべき項目は表4を参照されたい。

対象疾患スクリーニングのための指標値とカットオフ値については表5を参照されたい。これらのカットオフ値については、福井大学での患者検体分析やタンデムマススクリーニング試験研究で発見された患者での分析値を参考にして設定したもので⁵⁻⁹⁾、すべての施設にそのまま数値を当てはめることができるとは限らない。各施設の機器ごとの測定値の分布は必ずしも一定ではないので、その分布により修正されるべきである。

測定値の経時変化に対応して定期的にチェックする必要がある。また今後、偽陽性の例数低減などのスクリーニング精度向上のため更に指標値が追加されたり、患者での分析データに基づきカットオフ値が変更されたりすることがあることにも留意すべきである。

表4. 定量のための入力項目

- (1) サンプル量: 3 μ l (濾紙血量)
- (2) 内部標準液量: 100 μ l
- (3) 内部標準濃度: AA用試薬あるいはAC用試薬の1ml溶解液濃度の1/100値

表5. タンデムマススクリーニングの対象疾患とカットオフ値 (福井大学で作成した基準値)

一次対象疾患	疾患名	再採血依頼基準値 [nmol/ml]・判定式	即精密検査基準値 [nmol/ml]
一次対象疾患	フェニルケトン尿症	Phe>180	Phe>600
	メーブルシロップ尿症	Leu+Ileu>350 & Val>250	Leu+Ileu>600
	ホモシスチン尿症	Met>80	
	シトルリン血症1型	Cit>100	Cit>300
	アルギノコハク酸尿症	Cit>100	Cit>300
	メチルマロン酸血症	C3>3.6 & C3/C2>0.25	C3>8 & C3/C2>0.25
	プロピオン酸血症	C3>3.6 & C3/C2>0.25	C3>8 & C3/C2>0.25
	イソ吉草酸血症	C5>1.0	C5>5 (C0<10なら特に急ぐ)
	メチルクロトニルグリシン尿症	C5-OH>1.0	C5-OH>2 (C0<15なら特に急ぐ)
	ヒドロキシメチルグルタル酸血症	C5-OH>1.0	C5-OH>2 (C0<15なら特に急ぐ)
	複合カルボキシラーゼ欠損症	C5-OH>1.0	C5-OH>2 (C0<15なら特に急ぐ)
	グルタル酸血症1型	C5DC>0.25	
	MCAD欠損症	C8>0.3 & C8/C10>1.4	C8>0.6 (血清で分析する)
	VLCAD欠損症	C14:1>0.4 & C14:1/C2>0.013	C14:1>1.0 (血清で分析する)
	三頭酵素/LCHAD欠損症	C16-OH>0.1 & C18:1-OH>0.1	
	CPT1欠損症	C0/(C16+C18)>100	
二次対象疾患	シトリン欠損症	Cit>38 & Cit/Ser>0.25, (Tyr>200, Phe>120, Met>80)	
	βケトチオラーゼ欠損症	C5OH>1.0 & C5:1>0.01	C5-OH>2
	CPT2欠損症	C16>3.0 & (C16+C18:1)/C2>0.62	
	TRANS欠損症	C16>3.0 & (C16+C18:1)/C2>0.62	
	全身性カルニチン欠乏症	C0<10	
	グルタル酸血症2型	C8>0.3 & C10>0.4 & C12>0.4 & C10/C2>0.014	
	SCAD欠損症	(スクリーニングしない)	
	SCHAD欠損症	(スクリーニングしない)	
	高チロシン血症1型	(スクリーニングしない)	
	高アルギニン血症	(スクリーニングしない)	

Ⅲ. 臨床検査法としてのアミノ酸・アシルカルニチン分析法

脂肪酸酸化異常症を含めた先天代謝異常症の化学診断を目的としてアミノ酸・アシルカルニチン分析を行う場合には、表3で示した測定物質を全て利用するとよい。

更に必要に応じて分析対象物質を追加してもよい。たとえば、グリシン、アラニン、セリンなどのアミノ酸や、C8:1, C16:1などのアシルカルニチンであるが、それらを測定することの意義や問題点などはここでは触れない。

この分析の精度管理は、基本的には、タンデムマス・スクリーニングでの精度管理と同様であり、データの出力と判定を別立てにすることが肝要である。

Ⅳ. まとめ

タンデムマス・スクリーニングにおける前処理法としてキット試薬と非キット試薬の特徴と実際について述べた。重要な点は、測定物質を限定して精度管理を行いやすくすることと、非対象疾患に対する評価を行わないですむようにして倫理的問題を回避することである。この点が臨床検査と違う点であることを強調してまとめとしたい。

文 献

- 1) 重松陽介, 畑 郁江. タンデム質量分析新生児マススクリーニングのピットフォール. 2007.
- 2) 重松陽介, 畑 郁江, 田中幸枝. タンデム質量分析法による新生児スクリーニング. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* 53: 133-136, 2005.
- 3) 重松陽介, 畑 郁江, 眞弓光文, 田中幸枝, 小林圭子, 佐伯武頼. タンデム質量分析法によるシトリン欠損症の新生児マススクリーニング: 新生児期濾紙血アミノ酸ではスクリーニング困難な患者の存在. *日本マス・スクリーニング学会誌.* 17(1): 43-48, 2007.
- 4) 重松陽介, 畑 郁江: 非誘導体化試料調製によるタンデムマス・スクリーニング. *日本マス・スクリーニング学会誌.* 19(1): 11-17, 2009.
- 5) 重松陽介, 平野聡子, 畑 郁江, 藤澤和郎, 眞弓光文, 田中幸枝, 須藤正克. タンデム質量分析計を用いた新生児代謝異常マススクリーニング—スクリーニング地域拡大と患者検体分析による知見の蓄積—. *日本マス・スクリーニング学会誌.* 11(1): 57-67, 2001.
- 6) Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 758: 27-48, 2001.
- 7) Shigematsu Y, Hata I, Tajima G. Useful second-tier tests in expanded newborn screening of isovaleric acidemia and methylmalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 33(Suppl.s): S283-288, 2010.
- 8) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S. Newborn mass screening and selective screening using electrospray and tandem mass spectrometry in Japan. *J Chromatogr B.* 776: 39-48, 2002.
- 9) 重松陽介. タンデムマスによるスクリーニングの効果の検討. 厚生労働省科学研究費補助金・成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業「タンデムマス導入による新生児マススクリーニング体制の整備と質的向上に関する研究」平成22年度総括・分担研究報告書. 49-57, 2011.

受付日:平成 年 月 日