Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

新生児代謝異常スクリーニングにおける検体測定の効率化

～アミノ酸およびアシルカルニチン分析と先天性副腎過形成症分析～

アプリケーションのメリット

従来は、測定手法の異なる、それぞれの試験毎に検体の測定が行われています。2次元UPLC®（2D-UPLC）を用いることにより、アミノ酸およびアシルカルニチン分析と先天性副腎過形成症分析の結果を迅速に取得することが可能です。

ウォーターズのソリューション

LC装置 ACQUITY UPLC® 2D システム

MS装置 Xevo® TQD 質量分析計

ソフトウェア MassLynx®

アプリケーションマネージャ NeoLynx™、TargetLynx™

キーワード

Xevo TQD、質量分析計、トリプル四重極

UPLC、2次元UPLC（2D-UPLC）

新生児代謝異常スクリーニング

アミノ酸およびアシルカルニチン分析

先天性副腎過形成症分析

タンデムマス法

はじめに

平成23年3月31日付けで厚生労働省から都道府県・指定都市の母子保健主管部（局）長に対し、「先天性代謝異常の新しい検査方法（タンデムマス法）について」が通知されたことにより、近年では、新生児代謝異常の一部の対象疾病における検査法にLC/MS/MSシステムが用いられています。

タンデムマス法は、スループットに加えて発見できる代謝異常症の種類も多く、従来法では6疾患であったのが、LC/MS/MS法では、16疾患（最大で25疾患）の検査が、1回の注入で可能になります。

また新生児マス・スクリーニングには、それぞれ対象とする成分が極性に違いがあるため、測定手法も異なっており、一般的に、検体の測定は、それぞれの試験毎に行われています。そのため、1検体に対して、それぞれの結果を得るのに時間を要しており、その効率化が望まれていました。

このアプリケーションノートでは、2次元UPLCと四重極型質量分析計を組み合わせた手法により、1検体毎の測定および結果を効率よく取得する手法について検討しました。

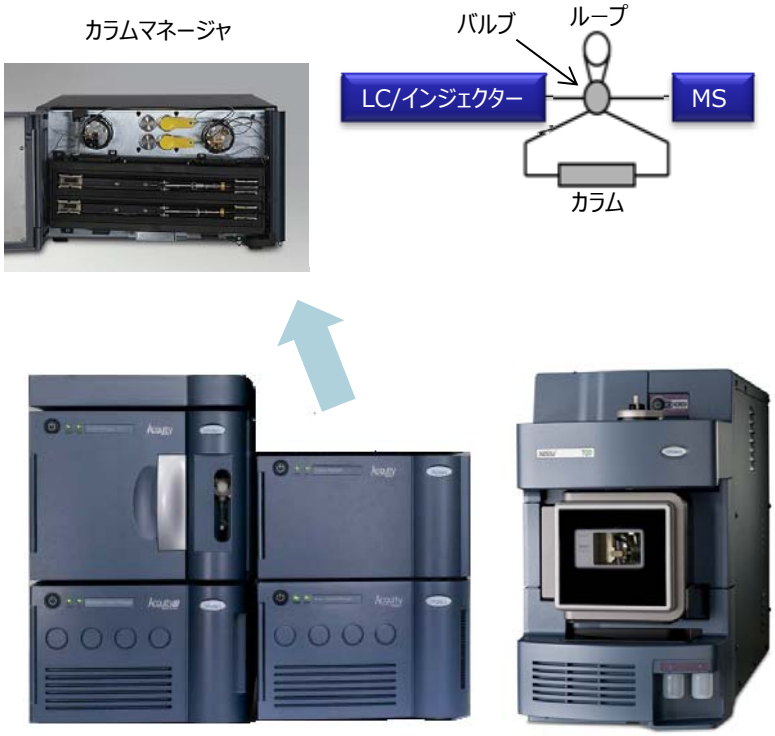

図1. ACQUITY UPLC 2Dシステム/Xevo TQD質量分析計
バルブと2つのポンプを用いることで、異なる分析手法を自動で切り替え、効率的に分析が可能。
ループ：アミノ酸およびアシルカルニチン分析に使用
カラム：先天性副腎過形成症分析に使用

分析条件

アミノ酸およびアシルカルニチン分析

LC 条件

1D LC システム: ACQUITY UPLC I-Class（FTN）

分析時間: 3.5分

インラインフィルター: 5 µm

移動相 A: 0.1%ギ酸含有40%メタノール水溶液
(先天性副腎過形成症分析の初期組成)

移動相 B: 0.1%ギ酸含有80%アセトニトリル水溶液
(アミノ酸およびアシルカルニチン分析の初期組成)

注入量: 10 µL

グラジエント:

Time (min.)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)	Curve
initial	0.25	0	100	–
0.2	0.06	0	100	11
1.4	0.60	0	100	11
1.6	0.25	0	100	11
2.0	0.30	100	0	11

Curve11=ステップグラジエント

MS 条件

MS システム: Xevo TQD

イオン化モード: ESI

分析モード: MRM

キャピラリー電圧: 3.5 kV ポジティブ

ソース温度: 150℃

脱溶媒温度: 600℃

脱溶媒ガス: 1100 L/hr

コーンガス: 50 L/hr

アミノ酸およびアシルカルニチン分析

LC/MS/MSを用いたアミノ酸およびアシルカルニチン分析は、カラムを付けないフローインジェクションによる1サイクルの短い測定です。検体の濾紙血から試料を抽出する際、表1の内部標準を抽出溶媒に添加し、この内部標準とのマススペクトルのイオン強度比から定量値を求めます。

アミノ酸

化合物名
$^{15}N;2\text{-}^{13}C$-Glycine
$^{2}H_4$-Alanine
$^{2}H_8$-Valine
$^{2}H_3$-Leucine
$^{2}H_3$-Methionine
$^{13}C_6$-Phenylalanine
$^{13}C_6$-Tyrosine
$^{2}H_3$-Aspartate
$^{2}H_3$-Glutamate
$^{2}H_2$-Ornithine
$^{2}H_2$-Citrulline
$^{2}H_4;5\text{-}^{13}C$-Arginine

アシルカルニチン

化合物名
$^{2}H_9$-carnitine(free carnitine, C0)
$^{2}H_3$-acetylcarnitine(C2)
$^{2}H_3$-propionylcarnitine(C3)
$^{2}H_3$-butyrylcarnitine(C4)
$^{2}H_9$-isovalerylcarnitine(C5)
$^{2}H_3$-octanoylcarnitine(C8)
$^{2}H_9$-myristoylcarnitine(C14)
$^{2}H_3$-palmitoylcarnitine(C16)
L-Glutarylcarnitine(mono)(D3)(C5DC)
L-(3-Hydroxyisovaleryl)-carnitine(D3)(C5-OH)
L-Dodecanoylcarnitine(D3)(C12)
L-Octadecanoylcarnitine(D3)(C18)

表1. アミノ酸およびアシルカルニチン分析の内部標準成分例

定量値には、成分毎にカットオフ値が設けられており、内部標準成分とのイオン強度比を求め、その大小で疾患の判定を行います。図2は、アミノ酸代謝異常症のマススペクトルの例を示しています。NeoLynxアプリケーションマネージャを用いることで、各検体の対象成分の解析効率があがり、得られた値を疾患の判定に使用することが可能です。

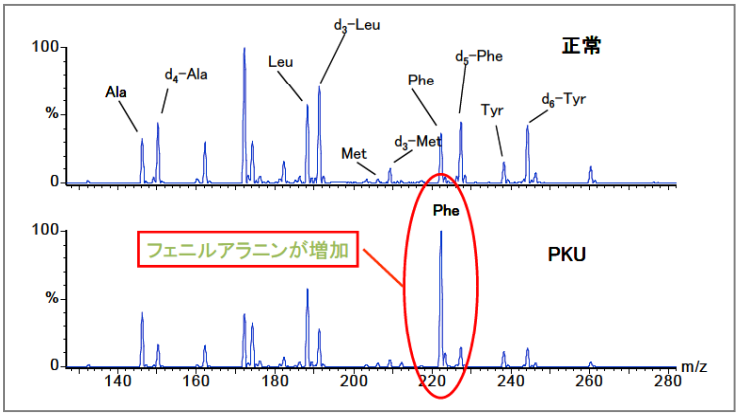

図2. アミノ酸代謝異常症のマススペクトル例
上段 正常、下段 フェニルケトン尿症

分析条件

先天性副腎過形成症分析

LC 条件

1D LC システム: ACQUITY UPLC I-Class（FTN）
分析時間: 3.5分
注入量: 10 µL
2D LC システム: ACQUITY UPLC BSM /カラムマネージャ
移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液
移動相 B: メタノール
カラム: ACQUITY HSS C_{18}
1.8 µm, 2.1 × 50 mm
カラム温度: 40℃
グラジエント:

Time (min.)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)	Curve
initial	0.20	60	40	–
0.2	0.20	60	40	6
0.5	0.20	45	55	6
1.2	0.20	45	55	6
3.0	0.20	1	99	6

Curve6=リニアグラジエント

MS 条件

MS システム: Xevo TQD
イオン化モード: ESI
分析モード: MRM
キャピラリー電圧: 2.0 kV ポジティブ
ソース温度: 150℃
脱溶媒温度: 600℃
脱溶媒ガス: 1100 L/hr
コーンガス: 50 L/hr

先天性副腎過形成症分析

従来、先天性副腎過形成症分析は、17-hydroxyprogesterone（17-OHP）の酵素免疫測定法（ELISA）によって測定が行われています。この手法に対し、LC/MS/MS法では、17-OHP以外の関連ステロイド（表2参照）も同時にスクリーニングが行えるため、より高精度な分析および判定が可能になります。
LC/MS/MS法では、カラムを用いて夾雑成分との分離をおこなうことで、対象成分の高感度な定量測定が可能になります。

化合物名	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	Dwell Time (秒)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (eV)
17-OHP	331.2	97.0	0.08	34	26
Δ4-アンドロステンダイオン (4-AD)	287.2	97.0	0.06	40	28
コルチゾール(F)	363.2	121.0	0.12	34	22
11-デオキシコルチゾール (11-DOF)	347.2	97.0	0.06	36	26
21-デオキシコルチゾール (21-DOF)	347.2	311.1	0.08	36	16

表2. 先天性副腎過形成症の対象成分とMRM条件

試料調製

各試料の調製は、非誘導体化法の以下の手順で行いました。

アミノ酸およびアシルカルニチン分析（参考資料1）

1. 1.5 mLチューブに5 mmの血液濾紙を入れる。
2. 固定液（アセトン/メタノール/水＝7/7/2）10 µLを血液濾紙に滴下。検体濾紙は、ヒタヒタの状態にする。蓋をして室温で10分間放置し、固定化を行う。
3. インキュベータ（37℃）で20-30分乾燥させ、固定化液を蒸発乾固し、室温で放冷。
4. 内部標準溶液を100 µL加え、蓋をして、室温で30分間穏やかに振とうし、抽出。
5. 遠心分離(3000 rpm/5分間)し、その上清をバイアルへ移し、分析試料とする。

先天性副腎過形成症分析（参考資料2）

1. 1.5 mLチューブに5 mmの血液濾紙を入れる。
2. 80%アセトニトリル水溶液180 µLで30分間、抽出。
3. 溶出液を乾固し、50%メタノール水溶液70 µLで溶解し、分析試料とする。

（参考資料 1）
重松 陽介、畑 郁江、稲岡 一孝：タンデムマス・スクリーニングにおける非誘導体化分析
日本マス・スクリーニング学会誌. 21(3)：13-18, 2011

（参考資料２）
藤倉 かおり、他：高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析計による先天性副腎過形成症スクリーニング二次検査法の検討
日本マス・スクリーニング学会誌. 23(1): 85-92, 2013

結果および考察

新生児代謝異常スクリーニングの測定項目であるアミノ酸およびアシルカルニチン分析と副腎過形成症分析を検体毎に行うことにより、測定の効率化および判定の迅速化に向けて検討を行いました。

・アミノ酸およびアシルカルニチン分析(代謝)：ループによるフローインジェクション法

・副腎過形成症分析(内分泌)：カラム分離による測定手法

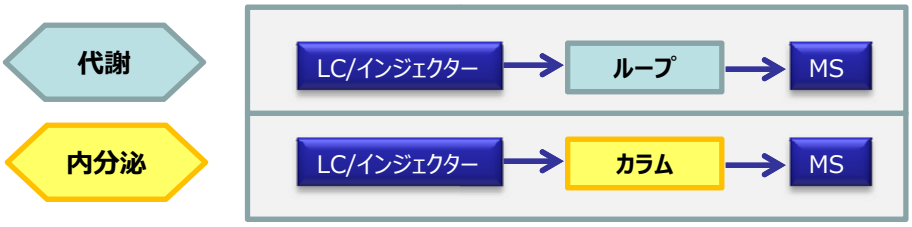

図3. 各測定項目のシステムフローのイメージ図

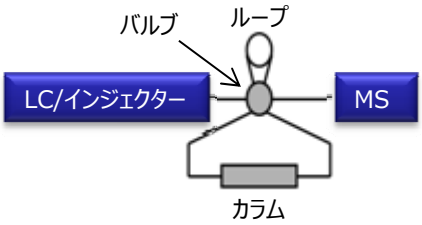

図4. 各測定項目のバルブによる切り替えイメージ図

各測定項目のデータ取得には、図3で示すように、システムフローの一部を替える必要があります。図4に示すように切り替えバルブが 1 つあれば、各測定項目をバッチごとで測定することが可能です。しかし、さらなる測定の効率化および検体毎での判定結果を迅速に取得するには、それぞれの移動相溶媒が異なっており、その切り替えをスムーズに行うことのできる配管や測定条件が必要です。また検体当たりの2項目に掛かっていた測定時間を短縮することを考慮し、内分泌項目のカラム平衡化時間に代謝項目の測定を行うことで、より迅速に検体の測定結果が得られるようにしました（図5,6参照）。

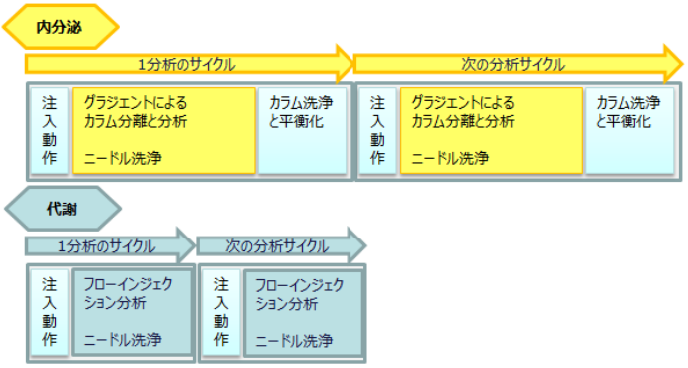

図5. 各測定項目のバッチごとでのシーケンス

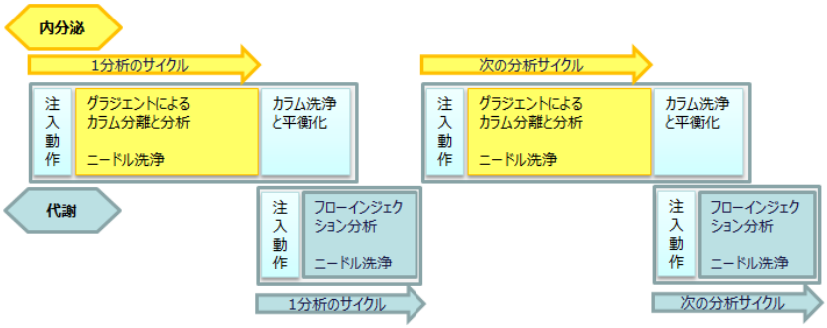

図6. 2D UPLCを使用した1検体毎の各項目測定シーケンス

LCポンプ2台とバルブ２つをソフトウェア上で制御できる2次元LCシステムを用いて、図7、図8の配管を自動で切り替え、測定を行いました。またそれぞれの分析項目に使用されている移動相は異なるため、バルブ切り替えおよび移動相の置換もLCメソッドに組み込み、図9のように測定の実行リストで、LCメソッドを自動で切り替え、行の上から順に各サンプルの測定を行いました。

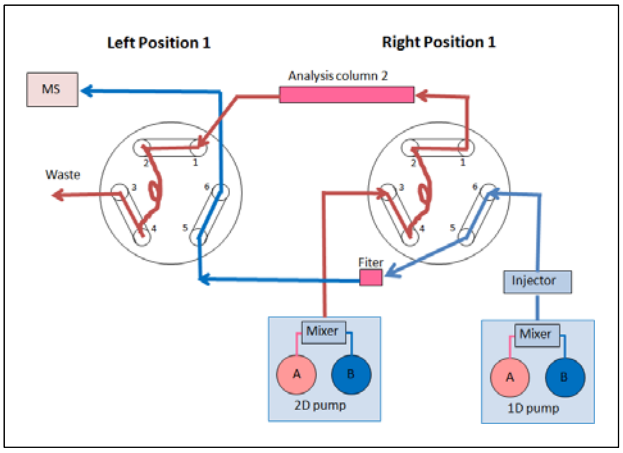

図7. アミノ酸とアシルカルニチン分析時の流路図（1Dで注入と測定）

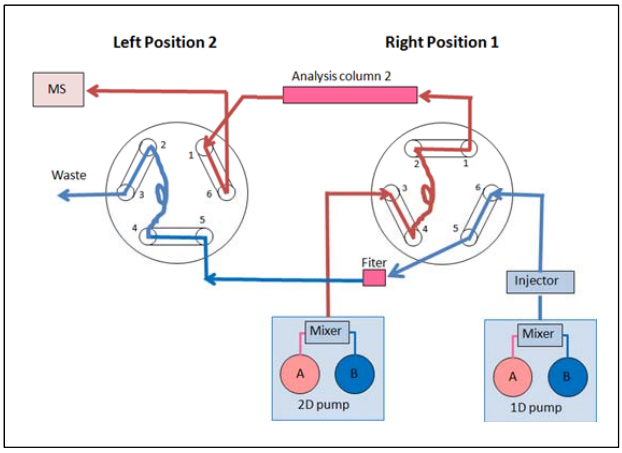

図8. 先天性副腎過形成症分析時の流路図（1Dで注入、2Dでグラジエント分析）

File Name	File Text	MS File	Inlet File	Bottle	Inj.Vol.
Steroid_01	Sample_blank	2D_Parallel_Steroid	2D_Parallel_Steroid_HSST3_50mm	1:D,1	10
AAaAC_01	1225 n1	2D_Parallel_AAsACs	2D_Parallel_AAsACs_HSST3_50mm	1:E,1	10
Steroid_02	Sample_5 n1	2D_Parallel_Steroid	2D_Parallel_Steroid_HSST3_50mm	1:D,2	10
AAaAC_02	1228 n1	2D_Parallel_AAsACs	2D_Parallel_AAsACs_HSST3_50mm	1:E,2	10
Steroid_03	Sample_25 n1	2D_Parallel_Steroid	2D_Parallel_Steroid_HSST3_50mm	1:D,3	10
AAaAC_03	1265 n1	2D_Parallel_AAsACs	2D_Parallel_AAsACs_HSST3_50mm	1:E,3	10
Steroid_04	Sample_75 n1	2D_Parallel_Steroid	2D_Parallel_Steroid_HSST3_50mm	1:D,4	10
AAaAC_04	1268 n1	2D_Parallel_AAsACs	2D_Parallel_AAsACs_HSST3_50mm	1:E,4	10
Steroid_05	Sample_125 n1	2D_Parallel_Steroid	2D_Parallel_Steroid_HSST3_50mm	1:D,5	10
AAaAC_05	1225 n2	2D_Parallel_AAsACs	2D_Parallel_AAsACs_HSST3_50mm	1:E,1	10

図9. 測定実行リスト

得られた結果は、それぞれの試験項目を別にして解析を行いました。アミノ酸およびアシルカルニチン分析は、NeoLynxアプリケーションマネージャを用いることで、内部標準とのイオン比を自動算出し、各サンプルの結果を確認することができます（図10参照）。

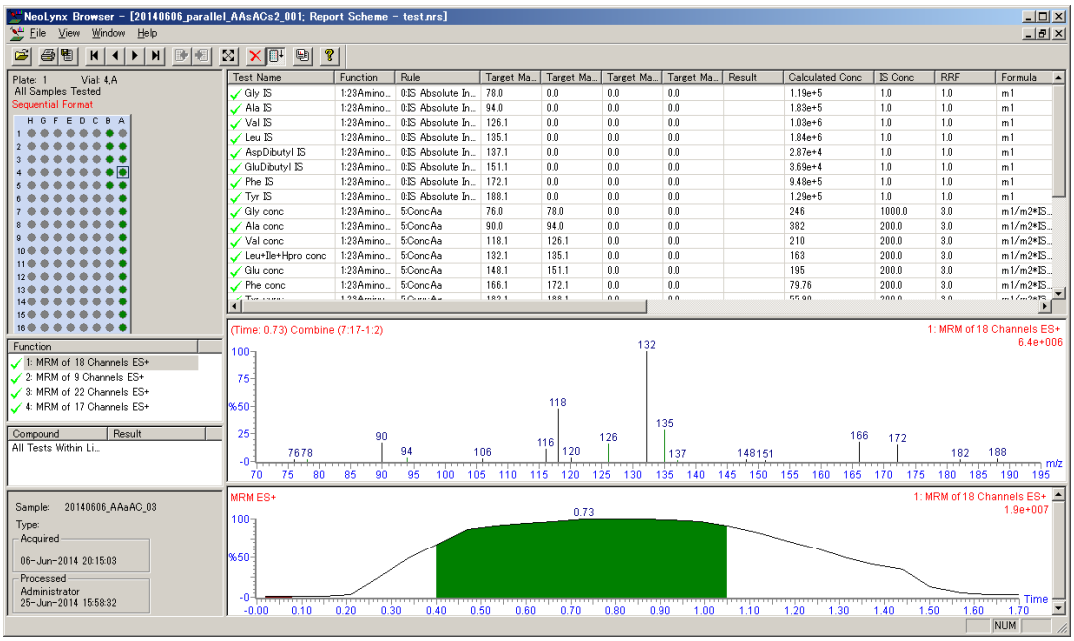

図10. NeoLynxアプリケーションマネージャによる解析結果画面

副腎過形成症の解析には、TargetLynxアプリケーションマネージャを用いて、多点検量線を作成しました。各成分の5 ppbにおけるMRMクロマトグラムと5-500 ppbの範囲の検量線を図11に示します。それぞれ相関係数0.98以上の直線性が得られています。

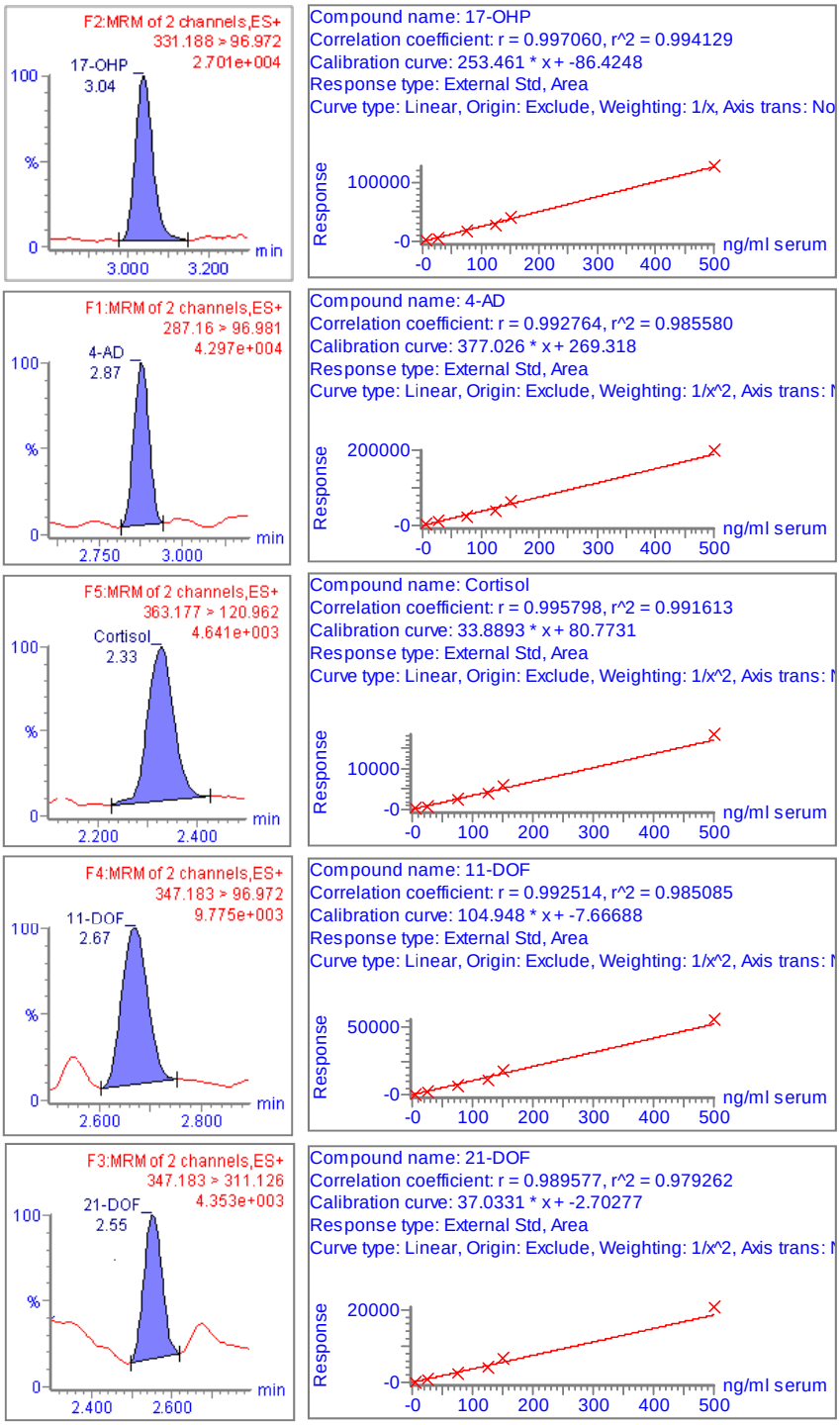

図11. 各成分のMRMクロマトグラムと検量線

結論

新生児代謝異常スクリーニングの項目であるアミノ酸・アシルカルニチン分析と副腎過形成症分析の測定において、2D UPLC-MS/MSを使用することで、ループ方式とカラム分離の各測定手法の切り替えおよび測定を、簡単な操作で自動で効率よく行うことができます。このシステムを用いた手法では、試料の誘導体化がなくとも測定を行う事ができるため、容易な前処理で済みます。これにより検体毎の結果を迅速に求めることが可能になります。

謝辞

今回のアプリケーション構築にあたり、サンプルを札幌市衛生研究所様よりご提供頂きました。ここに謹んで御礼申し上げます。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-347'-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、Xevo、MassLynx および The Science of What's possible は
Waters Corporation の登録商標です。NeoLynx および TargetLynx は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年5月 MKT15052 PDF