

タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの試験研究 2005年度実施成績

野町祥介 阿部敦子 太田 優 坂上絵理奈 白井知美 太田紀之
福士 勝 藤田晃三 長尾雅悦^{*1} 窪田 満^{*2}

要 旨

札幌市では2005年4月から、希望者を対象としたタンデム質量分析計による多項目新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始した。2006年3月までの1年間で15,377件を新生児代謝異常症等検査で受付けたが、このうち、15,156件(98.6%)がタンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの検査を希望した。検査の結果58例を再採血、3例を精密検査としたが、患者は見出されなかった。再採血の内訳はグルタル酸尿症 型疑いが最も多く29例あった。

1. 緒 言

札幌市では母子保健対策の一環として、アミノ酸代謝異常症 3 疾患（フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症）、ガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症および先天性副腎過形成症の検査を、「札幌市新生児マス・スクリーニング検査実施要綱」に基づいて実施し、後の治療とあいまって心身障害の防止に大きな成果をあげてきた。これに加え、タンデム質量分析計（以下、タンデムマス）を導入することで新生児マス・スクリーニングにおいて見出しうる疾患数を増やすことにより、新生児マス・スクリーニング事業の有用性を高めることを目的として、「札幌市 タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの研究実施要領」を制定し、希望者を対象とした検査を 2005 年 4 月から開始した¹⁻³⁾。見出される疾患の多くは、適切な治療機会が早期に得られることで、その後の生活の質を改善することが可能であり、とりわけ中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症に代表される脂肪酸 酸化異常症の諸疾患群は、比較的簡単な生活指導等により乳幼

児突然死症候群（SIDS）を回避することができると考えられており、そのような疾患を早期に見出すことで、より新生児マススクリーニングの効果が高まることが期待されている⁴⁻⁶⁾。

本報では、開始から 1 年間の試験研究「タンデムマスによる新生児マス・スクリーニング」の結果をまとめて報告する。

2. 方 法

検査対象は、2005年4月以降に札幌市内の医療機関で出生した新生児で、保護者が申込書において、タンデムマスによる新生児マス・スクリーニングの検査（以下；タンデム検査）を希望した者とした。検査は、安定同位体の標準物質を内部標準とするメタノール溶液を用いて、乾燥ろ紙血液ディスクからアミノ酸、アシルカルニチンを抽出し、塩酸の存在下ブタノールと反応させ、得られたブチルエステルをQuattromicro AP(Waters)と送液装置2795(Waters)を用いフローインジェクション法及びMRMモードにより測定することで行なった。また、データ解析はソフトMass Lynxにより行なった⁷⁾。

*1 独立行政法人国立病院機構西札幌病院小児科

*2 手稲溪仁会病院小児科

3. 結果

3-1 タンデムマスによる検査希望率

札幌市では2005年4月1日から2006年3月31日までの1年間で、15,377例の新生児代謝異常症等検査受検者があり、そのうち15,156例(98.6%)がタンデムマスによる検査を希望した。なお、上記申込書において同時に取得している検査済み検体の10年間保存と研究等二次利用の承諾率は92.4%(14,204/15,377)であった。

3-2 初回検査陽性例

初回検査の結果53例を再採血、2例を要精密検査とした。再採血を行なった53例のうち、52例は再採血検体による検査の結果、正常となったが、1例は引き続いて異常値を示したため、要精密検査とした。またこれらを含む陽性例の内訳を表1に、また、再採血例の内訳を表2に示す。

3-3 初回検査正常でかつ再採血時陽性例

初回正常であったが、低体重出生等の理由により再採血を行なった例のうち6例が再採血検体による検査の結果何らかの異常値を示した(表1)。その内訳は再採血時C5OH(3-OHisovaleryl)カルニチン高値が4例、同C3/C2(propioylカルニチン/acetylカルニチン比)高値が1例、同シトルリン高値が1例であった(表3,例 ~)。そのうち4例は3回目以降の採血で正常となったが、C5OHカルニチンの高値が改善しなかった3例と、初回から引き続いてC5OHカルニチンが高値を示した1例(表3,例)の計4例については、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症の除外診断を行なった。すなわち、採血医療機関の協力を得て対象

児から採取した尿を試料とし、GC-MS(ガスクロマトグラフィー質量分析器)によりlactate、3H-isovalerate、3M-crotonylglycineの増加を認めないことを確認することで正常とした。その結果、最終的には全例が正常であった。

3-4 要精密検査例

該当期間内の要精密検査3例の内訳(表4)は極長鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症疑、カルニチントランスポータ異常症疑、イソ吉草酸血症疑が各1例であった。精密検査の結果はいずれも正常であった。

3-5 検査データ

タンデム質量分析計により測定を行なった各指標物質の全ての初回検体の平均測定値と標準偏差を以下の表5に示す。

3-6 カットオフ値の変更

コンサルタント医の指導等に基づいて3つの指標についてカットオフ値の変更を行なった。一つはグルタル酸尿症型の指標で、カットオフ値をC10(decanoyl)カルニチン400pmol/mlから、C10カルニチン500pmol/mlかつC8(octanoyl)カルニチン300pmol/mlに変更した(図1)。また、高アルギニン血症の指標はArg(arginine)50mmol/mlから、同100mmol/mlに変更した。また、低体重児において再採血時に陽性となることが多いマルチプルカルボキシラーゼ欠損症等の指標はC5OHカルニチン500pmol/mlから1nmol/mlに変更した。C5OHカルニチンについて全ての再採血例の測定値を、低出生体重児とその他の児を比較する形で図2に示す。

表1 2005年度受付検体 陽性判定例一覧

初回検査結果	再採血検査結果	例数	備考
要精査	-	2	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症疑, イソ吉草酸疑
要再採血	要精査	1	カルニチントランスポータ異常症疑
要再採血	正常	52	
正常*	要再採血	6	低体重出生等により再検査を行なったもの。 6例とも最終的には正常

* 初回タンデム検査正常であったが、低体重、もしくは他項目で初回陽性により再採血を行い、2回目以降の検査でタンデム検査において陽性を示したもの

表 2 58 再採血の内訳

疑い疾患名	指標物質とカットオフ値	再採血例数*
グルタル酸尿症 型	C10 (200pmol/ml)	21
	C8 (300pmol/ml) かつ C10 (500pmol/ml)	8
アルギニン血症	Arg (50nmol/ml)	1
	Arg (100nmol/ml)	1
シトルリン血症	Cit (40nmol/ml)	3 (1)
カルニチントランスポータ異常症	COH (10nmol/ml)	4
イソ吉草酸血症	C5 (1nmol/ml)	5
極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症	C14:1 (0.4nmol/ml)	1
マルチプルカルボキシラーゼ 欠損症	C5OH (0.5nmol/ml)	7 (4)
	C5OH (1.0nmol/ml)	0
加ニチン ^β ミトトランスフェラーゼ 欠損症	C0/(C16+C18) (100)	1
メチルサリシ酸血症 or フ ^β ピ ^β サリシ酸血症	C3/C2 (0.25)	6 (1)

*再採血数における () 内の数字は、初回正常であったが、2 回目以降陽性であったものの数

表 3 初回タンデム検査の結果が正常であっても 2 回目以降の検査でタンデム検査陽性となった 6 例(~)、および初回から Arg の他に C5OH が高値であった 1 例() の経過

例 (出生時体重)	採血 日齢	初回検査結果	採血 日齢	再採血 検査結果	採血 日齢	3 回目採血 検査結果	その後・備考
(1,130g)	4	正常	51	C5OH 再採血	100	正常	
測定値	C5OH ; 0.25nmol/ml		C5OH ; 0.56nmol/ml		C5OH ; 0.48mol/ml		
(800g)	5	FT4 再採血 タ ^β ム 正常	69	FT4 再採血 タ ^β ム 正常	98	C5OH 再採血	尿検査で正常を確認 日齢 142 0.96nmol/ml
測定値	C5OH ; 0.18nmol/ml		C5OH ; 0.42nmol/ml		C5OH ; 0.57nmol/ml		日齢 268 0.41nmol/ml
(626g)	28	CAH 再採血 タ ^β ム 正常	147	C5OH 再採血			尿検査で正常を確認
測定値	C5OH ; 0.19nmol/ml		C5OH ; 0.67nmol/ml				
(910g)	14	FT4・CAH 再採血 タ ^β ム 正常	50	C5OH 再採血			
測定値	C5OH ; 0.34nmol/ml		C5OH ; 0.84nmol/ml				
(1,996g)	6	正常	48	C3/C2 再採血	55	正常	
測定値	C3/C2 ; 0.053		C3/C2 ; 0.259		C3/C2 ; 0.226		
(630g)	13	正常	139	Cit 再採血	165	正常	日齢 22 5.5nmol/ml
測定値	Cit ; 10nmol/ml		Cit ; 45nmol/ml		Cit ; 33nmol/ml		日齢 67 7.4nmol/ml 日齢 90 8.6nmol/ml
(949g)	107	Arg・C5OH 再採血	146	C5OH 再採血			尿検査で正常を確認
測定値	Arg ; 126nmol/ml C5OH ; 0.65nmol/ml		Arg ; 41nmol/ml C5OH ; 0.80nmol/ml				

C2, acetyl carnitine; C3, propionyl; C5OH, 3-OH isovaleryl; Arg, arginine, Cit, citrulline e. カットオフ値については表 2 を参照

表 4 3 精査例の内訳

精査理由	初回 (日齢)	再採血 (日齢)	精検時 (日齢)	精査結果
C14:1 高値	0.5nmol/ml (5)	-	0.058nmol/ml (19)	一過性の高値 (母乳栄養が確立する前の-10%の体重減少と関連)
C5 高値	3.7nmol/ml (5)	-	0.34nmol/ml (13)	B 群溶耐性連鎖球菌に対して処方された塩酸セフカペンピボキシルによるピバロイルカルニチンを検出
COH 低値	8.1nmol/ml (4)	7.5nmol/ml (11)	20.8nmol/ml (22)	一過性の低値 (-13.6%の体重減少、母乳不足)

表 5 タンデム質量分析計による検査における各指標物質の初回検体の平均値と標準偏差

略表記	正式名称	平均値 ± 標準偏差 (SD)	暫定カットオフ値 (SD 比)	主な対象疾患
Phe	phenylalanine	50.3 ± 9.6 nmol/ml	120 (+7.3SD)	フェニルケトン尿症*3
Leu + Ile	leucine + isoleucine	202.3 ± 43.4 nmol/ml	300 (+2.3SD)	メブリンシロップ尿症*3
Met	methionine	21.7 ± 4.9 nmol/ml	50 (+5.8SD)	ホモシスチン尿症*3
ASA	argininosuccinic acid	99.4 ± 45.2 *2	500 (+8.9SD)	アルギニノコハク酸尿症
Arg	arginine	13.5 ± 7.9 nmol/ml	100 (+10.9SD)	高アルギニン血症
Cit	citrulline	11.1 ± 3.7 nmol/ml	40 (+7.8SD)	高シトルリン血症
COH	free carnitine	27.1 ± 8.1 nmol/ml	10 (-2.1SD)	カルニチントランスポータ異常症
C5:1	tiglyl carnitine	11.3 ± 4.1 pmol/ml	100 (+21.6SD)	ケチオラーゼ欠損症
C5	isovaleryl carnitine	123 ± 85 pmol/ml	1000 (+10.3SD)	イソ吉草酸血症
C5OH	3-OH-isovaleryl carnitine	107 ± 33.6 pmol/ml	1000 (+26.6SD)	複合カルボキシルーゼ欠損症
C8	octanoyl carnitine	62.1 ± 30.6 pmol/ml	300 (+7.8SD)	中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症
C10	decanoyl carnitine	124 ± 69.3 pmol/ml	500 (+5.4SD)	グルタル酸尿症 型
C5DC	glutaryl carnitine	37.5 ± 15.8 pmol/ml	200 (+10.7SD)	グルタル酸尿症 型
C14:1	myristoyl carnitine	99.5 ± 44.2 pmol/ml	400 (+6.8SD)	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症
C16	palmitoyl carnitine	2.44 ± 0.89 nmol/ml	8.0 (+6.3SD)	長鎖 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素欠損症
C18	steroyl carnitine	0.78 ± 0.24 nmol/ml	3.0 (+9.3SD)	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症
C0 / (C16+C18) *1		9.52 ± 4.68	100 (+19.3SD)	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症
C3 / C2	propionyl carnitine / acetyl carnitine	0.084 ± 0.027	0.25 (+6.1SD)	プロピオン酸血症 メチルマロン酸血症

*1 C0 は COH の値 *2 シグナル強度 (ピーク高) の値 *3 通常の新生児代謝異常症等検査の対象疾患

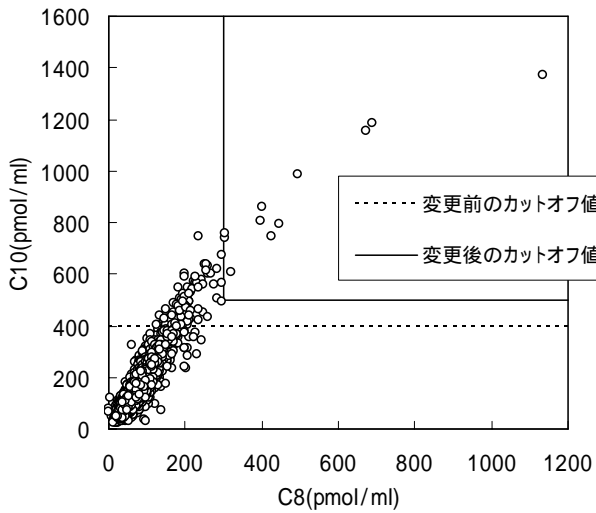


図1 グルタル酸尿症 型のカットオフ値と初回採血検体の測定値
C8; octanoyl carnitine C10; decanoyl carnitine

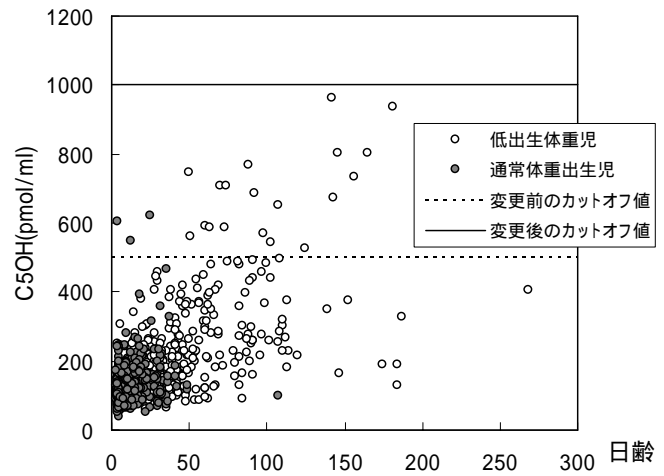


図2 マルチプルカルボキシラーゼ欠損症のカットオフ値と全再採血例の測定値
C5OH; 3-OH-isovaleryl carnitine

4. 考察

4-1 検査結果について

タンデムマスによる新生児マススクリーニングの試験研究において、開始1年間で15,156例がタンデム検査を希望した。これは新生児代謝異常症等検査受検総数の98.6%にあたる。高い検査希望率が得られたのは、前もって保健センター等で検査に関する啓蒙が行なわれていること、新生児代謝異常症等検査申込時に通常の検査申込書の書面で検査希望が容易に行なえるシステムを導入したことによると考えられる。また、保護者の立場からは新たな負担を伴わずに新生児の疾患について検査を受ける機会は活用でき、検査を申し込む産婦人科等の採血医療機関においてはタンデム検査が心身障害の発生防止に有用であるとの認識がさらに高まっているものと考えられる。

本試験研究においてはまだ患児を見出していないが、2005年1月に市内で出生し、その後本市のハイリスクスクリーニングにおいてグルタル酸尿症 型と化学診断された症例は、その後、あらためてインフォームド・コンセントを取得し、新生児代謝異常症等検査において使用した乾燥紙血液(冷凍保存)を用いてタンデムマスによる検査

を行なったところ、あきらかな陽性を示したことから、仮にタンデムマスによる検査の開始後にこれを受検していれば、早期発見の機会が得られたと考えられる⁸⁾。

4-2 カットオフ値について

従来からの新生児代謝異常症等検査の対象疾患と同様に、初回タンデム検査で比較的軽度な陽性を示した場合は、再採血による検査を行なっている。開始1年間の初回検査で要再採血となったのは53例で、初回要再採血率は0.35%であった。再採血でもっとも多かったのはグルタル酸尿症 型疑いで、53例中29例あったこれについては、コンサルタント医の指導に基づいて、当初用いていたグルタル酸尿症 型のカットオフ値(C10(decanoyl)カルニチン400pmol/ml)を、2005年10月からC10カルニチン500pmolかつC8(octanoyl)カルニチン300pmol/mlに変更した。この変更により旧カットオフ値では陽性であった22例中17例は陰性となり、以後再採血率は4分の1程度に抑えられている。

また、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症の指標物質であるC5OH(3-OH-isovaleryl)カルニチンは、低体重出生児において、再採血を行なった際、測定値が上昇する傾向が認められた(図2)。それらの例の半数

は、上昇傾向が継続したことから、該当疾患の尿中指標物質の検査により患者でないことを確認した。このように低体重児におけるC50Hカルニチン遅発上昇例が全て正常であったことから、たび重なる再採血を防ぐため、福井大学における同様のパイロット・スタディから提唱されたカットオフ値⁹⁾を参考にして、私達の用いるカットオフ値を500pmol/mlから1nmol/mlに変更した。

このように現段階ではカットオフ値に見直しを加え、再採血率を低下させながら、運用していくことが必要である。なお、再採血時の検査でC50Hカルニチンの上昇が認められた例は、全例が1,000g以下の超低出生体重児か1,000～1,500gの極低出生体重児であり、出生時体重が1,500g以下の極低出生体重児や超低出生体重児に関しては、その栄養法との関連も含め、さらに検討が必要と思われる。

4-3 二次検査体制について

タンデム検査の開始に伴い、通常の先天性代謝異常症等検査におけるアミノ酸代謝異常症3疾患(フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症)の検査法も、タンデムマス法に移行した¹⁰⁾。タンデムマスによる一次検査でこれらの3疾患の指標物質がカットオフ値を上回った場合は、HPLCにより確認検査を実施した。特にメープルシロップ尿症の指標物質であるLeucineは、タンデムマスではIsoleucineとの分別ができないため、HPLCを確認検査に用いることは必須である。参考までにタンデムマスによるLeuの測定値がカットオフ値を越え、HPLCによる確認検査が必要となった例は全体のおよそ2.3%であった。

また、タンデム検査で有機酸血症が疑われる場合、尿を用いたGC-MSによる確認検査はきわめて有効であった。今回、マルチプルカルボキシラーゼ欠損症疑例において、lactate、3OH-isovalerate、3M-crotonylglycineを指標物質とする尿を試料としたGC-MSの定性検査により疾患の可能性を除外することができた。このように多くの有機酸血症において重要な指標物質が尿中で検出される場合が多く、タンデムマスによる新生児マススクリーニングを実施していく上で、GC-MSを中心とした化学診断に基づく二次検査法を準備しておくことはきわめて重要である。

特に、札幌市のハイリスク・スクリーニングで確立した様々な代謝異常疾患の化学診断法と蓄積した症例データ^{11,12)}は、今後、新生児マススクリーニング対象疾患の拡充を図る上で貴重な財産と考えられる。

4-4 抗生剤の影響について

特徴的だった偽陽性例の一つに抗生剤の使用によるC5(isovaleryl)カルニチン高値を示すイソ吉草酸血症疑が5例あった。例えばB群溶耐性連鎖球菌等の感染症に対して塩酸セフカペンピボキシルやセフトレンピボキシルのようなピボキシル基を含む抗生剤が処方されている場合、血中のピバロイルカルニチンを検出することで偽陽性となる。その際は、投与終了ののち3日程度経過してから、もう一度採血を依頼し、正常を確認した。今回は実施しなかったが、尿を用いたGC-MSでイソ吉草酸血症を除外する場合には、3-OH-isovalericとIsovaleryl-glycineを指標物質として行なうことも可能であり、今後の検討課題としたい。

4-5 今後の方針について

タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングの有用性は様々に検討されている^{13,14)}。わけでも米国のSchoen EJらはタンデムマスによる新生児マススクリーニングにより1QALY(質を改善された生存年数)を獲得するのに必要な費用はおよそ\$8,400～\$23,100と算出した¹⁵⁾。一般的に1QALYを獲得する費用が\$50,000以下である事が検査等実施の十分条件とされている¹⁶⁾ことを考えると、その有用性はきわめて高い。しかし、対象疾患の頻度が国により異なること、また、疾患の重さによって治療効果が異なることなどを踏まえて、長期的に評価を継続していくことが重要である。札幌市では、昨年から小児慢性疾患事業における医療意見書をマススクリーニングの追跡調査に用いることができる様式にしている¹⁷⁾。これによって、対象疾患の患者情報を適切に管理し、検査の疫学的評価や検査法の精度の検討に用いることが可能となった。将来、より有用性の高いスクリーニングシステムを構築し、社会に還元していくために、これらのシステムを継続発展させていくことが必要である。

5. 文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, et al.: Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination. *J Chromatogr B* 792, 63-72, 2003
- 5) Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, et al.: Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111: 1399-1406, 2003
- 6) AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS: Kaye CI and Committee on Genetics: Introduction to the newborn screening fact sheets: *Pediatrics* 118: 1304-1312, 2006
- 7) 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, 厚生労働科学研究費補助金, 子ども総合研究事業, わが国の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, 90-97, 2005
- 8) 城 和歌子, 中本 哲, 奥原宏治他: タンデム質量分析計により診断されたグルタル酸尿症2型の1例, 日本マス・スクリーニング学会誌 15(2): 54, 2005
- 9) 重松陽介: 厚生労働省科学研究費補助金, 子ども家庭総合研究事業「わが国の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」新しい新生児マススクリーニング対象疾患の手引き.
- 10) 野町祥介, 花井潤師, 田上泰子他: アミノ酸代謝異常症一次検査法としてのタンデム質量分析計法, 日本マス・スクリーニング学会誌, 16(1): 85-90, 2006
- 11) 田上泰子, 花井潤師, 野町祥介他: 札幌市における先天代謝異常症ハイリスク・スクリーニング結果(1996~1999年度), 札幌市衛生研究所報 27: 32-37, 2000
- 12) 田上泰子, 花井潤師, 野町祥介他: 札幌市における先天代謝異常症ハイリスク・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 -, 札幌市衛生研究所報, 28: 42-52, 2001
- 13) Feuchtbaum L, Cunningham G: Economic evaluation of tandem mass spectrometry screening in California. *Pediatrics*, 117: S280-S286, 2006
- 14) Venditti LN, Venditti CP, Berry GT, et al.: Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A cost-effectiveness analysis. *Pediatrics* 112: 1005-1015, 2003
- 15) Schoen EJ, Baker JC, Colby CJ, et al.: Cost-benefit analysis of universal tandem mass spectrometry for newborn screening. *Pediatrics*, 110: 781-786, 2002
- 16) Groeneveld PW, Kwong JL, Liu Y, et al.: Cost-effectiveness of automated external defibrillators on airlines. *JAMA* 286: 1482-1489, 2001
- 17) 野町祥介, 阿部敦子, 坂上絵理奈他: タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングのシステム構築(1)体制整備, 札幌市衛生研究所報, 32: 54-61, 2005

Results of the Pilot Study of Newborn Screening Using Tandem Mass Spectrometry in 2005

Shosuke Nomachi, Atsuko Abe, Yu Ota, Erina Sakagami, Tomomi Usui, Noriyuki Ota, Masaru Fukushi, Kozo Fujita, Masayoshi Nagao^{*1} and Mitsuru Kubota^{*2}

In April 2005, under the auspices of the Sapporo city council, we started our pilot study for newborn screening with tandem mass spectrometry in Sapporo city. The purpose of this study is to evaluate the usefulness and effectiveness of this screening.

Until March 2006, we carried out tandem mass screening for 15,156 newborns (98.6%) with the informed consent of their guardians out of 15,377 babies who took newborn screening. 58 cases took reexamination and 29 those cases were labeled falsely as having glutaric acidemia type II. Three cases took medical examination but we could not find out any patient during the first one year. We are going to continue our study with the minor change of program as cut-off level of some metabolites.

*1 Department of Pediatrics, Nishi Sapporo National Hospital

*2 Department of Pediatrics, Teine Keijinkai Hospital