

Perkin Elmer社製非誘導体化キットNeoBase[®]の 新生児マススクリーニングへの応用に関する検討

野町祥介 小田千恵 花井潤師 福士 勝 矢野公一 穂積リサ子^{*1} Min Weng^{*2}

要 旨

タンデム質量分析計のアミノ酸及びアシルカルニチン類同時測定による新生児スクリーニングについては、すでにその有用性が示されつつあるが、PerkinElmer社製のキットNeoBase[®]では、従来のマーカーに加えて、チロシン血症 型のマーカーであるサクシニルアセトン、プロリン血症のマーカーであるプロリンを同時に測定することが可能である。そこで札幌市衛生研究所のシステムで当該キットを応用することにより、これらの新たな指標物質が十分な感度で測定可能か、また従来のマーカーについては、当所が現在測定している誘導体化法との間に十分な相関があるかどうかを検討したところ、いずれも良好な成績が得られた。

1. 緒 言

札幌市では、2005年4月から、新生児マス・スクリーニング事業の効果を高めることを目的として、「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」を実施し、従来は見出すことができなかった脂肪酸 酸化異常症や有機酸血症の患児を見出し、早期治療に結びつけることで効果をあげている¹⁾。一方で、タンデム質量分析計(以下;タンデムマス)による測定対象物質を拡充することで、検査の効果をより一層高める検討も多く報告されるようになってきており²⁻⁴⁾、中でもサクシニルアセトン(Succinylacetone)を指標物質として見出すことが可能なチロシン血症 型については、近年NTBC(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione)による治療法が効果を上げている⁵⁾こともあり、新生児スクリーニングの新たな対象疾患として注目されている。

PerkinElmer社が開発したタンデムマスのための

新生児スクリーニング非誘導体化法検査用キットNeoBase[®]は、従来の測定項目に加えて、チロシン血症 型の指標物質であるサクシニルアセトンとプロリン血症の指標物質であるプロリンが同時に測定できる点で注目される。

そこで、今回、私たちはNeoBase[®]により、当所の分析システム〔Quattromicro API(英MicroMass)と送液装置alliance-HT2795(Waters)〕を用いて、従来法⁶⁾と同等の検査が可能で、かつサクシニルアセトンとプロリンを検査項目に加えるための十分な感度が確保できるかどうか検討を行った。

2. 方 法

(1) 前処理

Perkin Elmer社製のキットNeoBase[®]に付属しているプロトコールに従って、前処理を行った。すなわち、ろ紙血液3ミリディスクを96穴マイクロプレートにpunch outし、アミノ酸とアシルカルニチ

*1 (株)パーキンエルマージャパン ジェネティックススクリーニング事業部

*2 PerkinElmer Life and Analytical Sciences, LAS

ンの安定同位体(表1)を溶解したキット添付の溶出液100 µlを添加する。これを45 で45分間振盪することにより抽出し、得られた抽出液75 µlをキット添付のV底プレートに移す。次いでプレートを2時間室温で静置し、この間酸性条件下でhydrazineによるサクシニルアセトンの誘導体化反応(図1)を進行させた後、これを測定用試料とした。

(2) 測定

分析システム Quattromicro API (英 MicroMass) と送液装置 alliance-HT2795 (Waters) を用い、フローインジェクション法およびMultiple Reaction Monitoring (MRM) モードにより解析を行った。各指標物質の定量は、濃度既知の安定同位体置換内部標準とのシグナル強度比から算出することで行った。

各指標物質及び安定同位体標準の測定条件は表2にまとめた。

なお、サクシニルアセトンは通常血中でタンパク質中のlysine側鎖のアミノ基に結合して存在している。そのため本法では、hydrazineによる分離誘導体化反応を行った後、サクシニルアセトンの誘導体化物である 3-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl) propanoic acid (MPP)を、キットに別バイアルで添付されている安定同位体内部標準物質 $^{13}\text{C}_5$ -3-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl) propanoic acid ($^{13}\text{C}_5$ -MPP)により定量することで、血中サクシニルアセトン値として算出した⁷⁾。

(3) 回収率

主な指標物質について、Perkin Elmerの精度管理用検体(2濃度)を用い、15回測定しその平均値を理論値と比較することで算出した。

(4) 安定性の評価

主な指標物質について、Perkin Elmerの精度管理用検体(2濃度)を用い、15回測定することによりアッセイ間変動係数を算出することで行った。

(5) 従来法との相関の評価

試料としては新生児代謝異常症等検査において、申し込み時に保護者から使用済み検体の研究等への利用の了承が得られ、かつタンデム質量分析計による多項目検査の希望があった検体(n=963)を用いた。相関の評価は、従来法の測定値と、今回検討したNeoBase[®]による測定値の相関係数を算出することで行った。従来法の測定方法は、既報⁶⁾に従った。この評価に際しては、個人情報等からは切り離された検体番号によるデータの付け合せの後、検体番号を切り離した上で統計処理を行う連結不可能匿名化により行った。これらの研究手法については、札幌市衛生研究所倫理審査委員会の承認を得た⁸⁾。

3. 結果

3-1 安定性及び回収率の評価

主な指標物質のアッセイ間変動係数及び平均回収率を表3にまとめる。アッセイ間変動係数は10~25%程度であり、平均回収率は70~110%の範囲内にほぼ収まった。

3-2 一般検体の測定結果

963件の新生児検体を用いた主な指標物質の測定値の従来法との相関及び相関係数(r)を図2-A,Bにまとめる。また、NeoBase[®]を用いることで新たに測定可能な指標物質となるサクシニルアセトンとプロリンの平均値±標準偏差は、それぞれ $0.28 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 、 $220 \pm 61 \mu\text{M}$ であった。これらのヒストグラムを図3に示す。

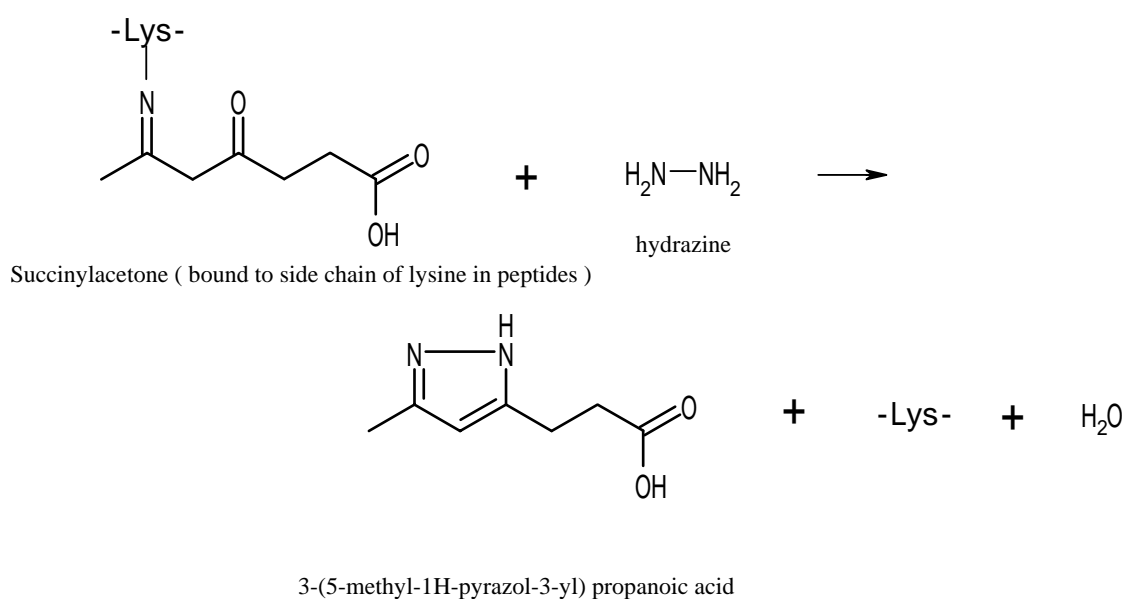


図1 NeoBase[®]におけるサクシニルアセトン定量のための前処理反応の概略

表1 PerkinElmer社キットNeoBase[®]に添付されている安定同位体標準品一覧

安定同位体置換体 ;略記号	濃度 (μ mol/vial)	安定同位体置換体 ;略記号	濃度 (μ mol/vial)
¹⁵ N, ² - ¹³ C-Glycine ;Gly*	2.5	² H ₉ -Free Carnitine (² H ₉ -C0) ;C0*	0.152
² H ₄ -Alanine ;Ala*	0.5	² H ₃ -Acetylcarnitine (² H ₃ -C2) ;C2*	0.019
² H ₆ -Valine ;Leu*	0.5	² H ₃ -Propionylcarnitine (² H ₃ -C3) ;C3*	0.0114
² H ₃ -Leucine ;Leu*	0.5	² H ₃ -Butyrylcarnitine (² H ₃ -C4) ;C4	0.0076
² H ₃ -Methionine ;Met*	0.5	² H ₉ -Isovalerylcarnitine (² H ₉ -C5) ;C5*	0.0076
¹³ C ₆ -Phenylalanine ;Phe*	0.5	² H ₆ -Glutarylarnitine (² H ₆ -C5DC) ;C5DC*	0.0076
¹³ C ₆ -Tyrosine ;Tyr*	0.5	² H ₃ -Hexanoylcarnitine (² H ₃ -C6) ;C6*	0.0076
² H ₆ -Ornithine.HCl ;Orn*	0.5	² H ₃ -Octanoylcarnitine (² H ₃ -C8) ;C8*	0.0076
² H ₂ -Citruilline ;Cit*	0.5	² H ₃ -Decanoylcarnitine (² H ₃ -C10) ;C10*	0.0076
² H ₄ , ¹³ C-Arginine.HCl ;Arg*	0.5	² H ₃ -Lauroylarnitine (² H ₃ -C12) ;C12*	0.0152
¹³ C ₅ -Proline ;Pro*	0.5	² H ₃ -Myristoylarnitine (² H ₃ -C14) ;C14*	0.0152
¹³ C ₅ -3-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl) propionic acid (¹³ C ₅ -MPP) ; MPP*	0.4	² H ₃ -Palmitoylcarnitine (² H ₃ -C16) ;C16*	0.0152
		² H ₃ -Octadecanoylcarnitine (² H ₃ -C18) ;C18*	0.0152

表2 NeoBase[®]における全測定物質の分析条件 *安定同位体ラベルスタンダード;表1参照

指標物質 (略称)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)
Gly	76	32	0.05	14	7
Gly*	78	32	0.05	14	7
Ala	90	44	0.05	15	8
Ala*	94	48	0.05	15	8
Pro	116.1	70.1	0.05	6	16
Val	118.1	72.1	0.05	15	9
Pro*	121.1	74.1	0.05	6	16
Val*	126.1	80.1	0.05	15	9
Leu/Ile	132.1	86.1	0.05	15	10
Orn	133.1	70.1	0.05	14	14
Leu*	135.1	89.1	0.05	15	10
Orn*	139.1	76.1	0.05	14	14
Met	150.1	104.1	0.05	15	10
Met*	153.1	107.1	0.05	15	10
SA (MPP)	155.1	109.1	0.05	10	22
MPP*	160.1	114.1	0.05	10	22
Phe	166.1	120.1	0.05	15	12
Phe*	172.1	126.1	0.05	15	12
Arg	175.1	70.1	0.05	20	20
Cit	176.1	113.1	0.05	13	16
Cit*	178.1	115.1	0.05	13	16
Arg*	180.1	75.1	0.05	20	20
Tyr	182.1	136.1	0.05	15	12
Tyr*	188.1	142.1	0.05	15	12

C3DC/C4OH; Malonylcarnitine/3-Hydroxy-butrylcarnitine
 C4DC/C5OH; Methylmalonylcarnitine/3-Hydroxy-isovalerylcarnitine
 C5:1; Tiglylcarnitine C6DC; Adipylcarnitine
 C5DC/C6OH; Glurarylcarnitine/3-Hydroxy-hexanoylcarnitine
 C8:1; Octenoylcarnitine C10:1; Decenoylcarnitine
 C10:2; Decadienoylcarnitine C12:1; Dodecenoylcarnitine
 C14:1; Tetradecanoylcarnitine C14:2; Tetradecadienoylcarnitine
 C14OH; 3-Hydroxy-tetradecanoylcarnitine
 C16:1; Hexadecenoylcarnitine
 C16OH; 3-Hydroxy-hexadecanoylcarnitine
 C16:1OH; 3-Hydroxy-hexadecenoylcarnitine
 C18:1;Oleylcarnitine C18:2; Linoleylcarnitine
 C18OH; 3-Hydroxy-octadecanoylcarnitine
 C18:1OH; 3-Hydroxy-octadecenoylcarnitine
 他の略記号については表3を参照

指標物質 (略称)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)
COH	162.1	103	0.05	23	19
COH*	172.1	103	0.05	23	19
C2	204.1	85	0.05	20	17
C2*	207.1	85	0.05	20	17
C3	218.1	85	0.05	22	17
C3*	221.1	85	0.05	22	17
C4	232.2	85	0.05	25	18
C4*	235.2	85	0.05	25	18
C5:1	244.2	85	0.05	25	18
C5	246.2	85	0.05	25	18
C4OH/C3DC	248.1	85	0.10	25	18
C5*	255.2	85	0.05	25	18
C6	260.2	85	0.05	25	19
C5OH/C4DC	262.1	85	0.10	25	18
C6*	263.2	85	0.05	25	19
C5DC/C6OH	276.1	85	0.10	28	22
C5DC*	282.1	85	0.10	28	22
C8:1	286.2	85	0.05	28	20
C8	288.2	85	0.05	28	20
C6DC	290.2	85	0.10	28	22
C8*	291.2	85	0.05	28	20
C10:2	312.2	85	0.05	28	22
C10:1	314.2	85	0.05	28	22
C10	316.2	85	0.05	28	22
C10*	319.2	85	0.05	28	22
C12:1	342.3	85	0.05	30	23
C12	344.3	85	0.05	30	23
C12*	347.3	85	0.05	30	23
C14:2	368.3	85	0.05	30	24
C14:1	370.3	85	0.05	30	24
C14	372.3	85	0.05	30	24
C14*	375.3	85	0.05	30	24
C14OH	388.3	85	0.05	30	24
C16:1	398.3	85	0.05	32	25
C16	400.3	85	0.05	32	25
C16*	403.3	85	0.05	32	25
C16:1OH	414.3	85	0.05	32	25
C16OH	416.3	85	0.05	32	25
C18:2	424.3	85	0.05	34	26
C18:1	426.4	85	0.05	34	26
C18	428.4	85	0.05	34	26
C18*	431.4	85	0.05	34	26
C18:1OH	442.4	85	0.05	34	26
C18OH	444.4	85	0.05	34	26

表3 主な測定物質の平均値、標準偏差(SD)、アッセイ間変動係数(CV)および平均回収率(n=15)

物質名	理論値(μM)	平均測定値(μM)	SD	CV(%)	平均回収率(%)
Alanine	930	753.9	139.5	18.4	81.6
(Ala)	1,878	1,683	183.1	10.9	89.6
Citrulline	100	95.0	11.2	11.7	95.0
(Cit)	300	289.2	28.1	9.7	96.4
Glycine	920	1,015	179.8	17.7	110.4
(Gly)	2,700	2,974	397.2	13.4	110.2
Leucine / Isoleucine	350	285.8	56.6	19.8	81.7
(Leu / Ile)	1,100	706.3	148.5	21.0	64.2
Methionine	110	106.7	16.3	15.3	97.0
(Met)	344	385.0	54.3	14.1	111.9
Phenylalanine	240	205.5	24.3	11.8	85.6
(Phe)	674	619.0	81.9	13.2	91.8
Proline	650	505.2	93.9	18.6	77.7
(Pro)	1,690	1,548	228.1	14.7	91.6
Succinylacetone	5.0	3.9	0.8	20.6	78.2
(SA)	15.0	11.2	1.7	15.0	74.3
Tyrosine	372	324.0	51.4	15.9	87.1
(Tyr)	1,156	1,048	148.1	14.1	90.6
Valine	383	346.2	74.1	21.4	90.4
(Val)	867	912.6	142.2	15.6	105.3
Free Carnitine	120	104.6	15.2	14.5	87.1
(C0)	260	278.8	40.2	14.4	107.2
Acetylcarnitine	70	53.6	7.5	13.9	76.6
(C2)	153	140.2	16.6	11.8	91.6
Propionylcarnitine	10.9	9.5	1.5	16.3	86.8
(C3)	28.0	27.0	3.5	13.0	96.3
Butylcarnitine	2.7	1.97	0.30	15.1	73.0
(C4)	6.5	6.08	0.74	12.2	93.5
Isovalerylcarnitine	1.3	0.87	0.21	24.5	67.2
(C5)	3.3	2.50	0.36	14.5	75.7
Glutaryl Carnitine	0.7	0.53	0.12	21.9	76.2
(C5DC)	1.8	1.38	0.26	18.8	76.8
Hexanoylcarnitine	0.6	0.67	0.17	25.9	111.6
(C6)	1.8	1.97	0.47	23.9	109.4
Octanoylcarnitine	0.6	0.56	0.12	20.6	93.9
(C8)	1.8	1.57	0.22	13.8	87.1
Decanoylcarnitine	1.0	0.70	0.13	18.6	69.9
(C10)	2.8	2.18	0.43	19.9	77.8
Lauroylcarnitine	1.6	1.44	0.21	14.8	89.9
(C12)	5.2	4.87	0.82	16.9	93.7
Myristolcarnitine	1.8	1.13	0.14	12.1	62.6
(C14)	4.8	3.73	0.40	10.7	77.8
Palmitoylcarnitine	12.7	8.5	1.4	16.6	67.3
(C16)	31.2	27.9	4.3	15.2	89.5
Octadecanoylcarnitine	2.3	1.84	0.27	14.5	79.8
(C18)	5.0	4.72	0.80	17.0	94.4

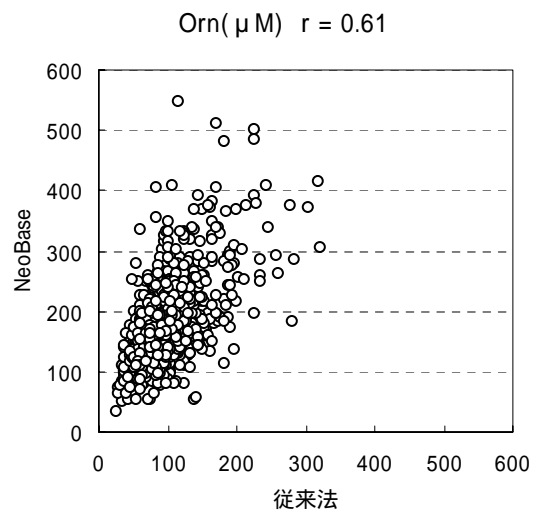
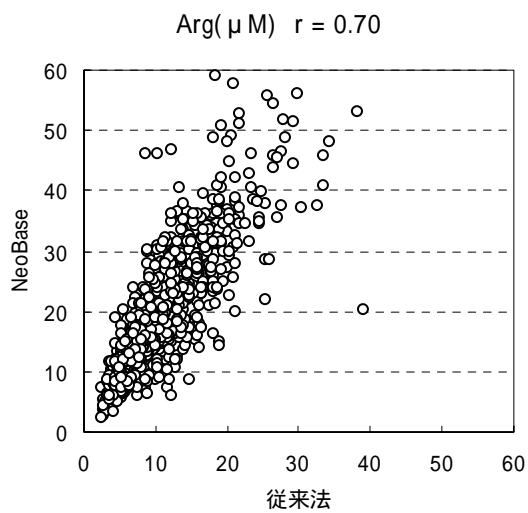
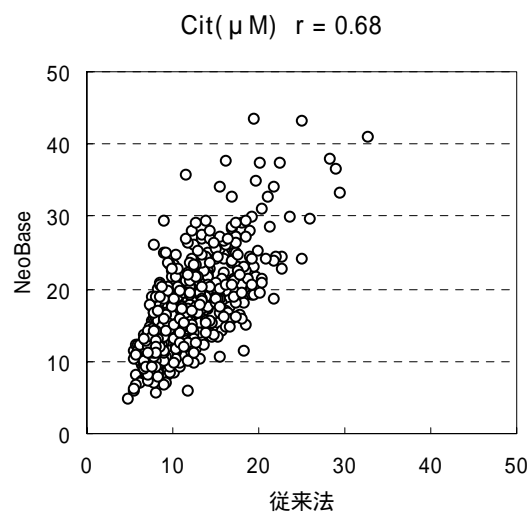
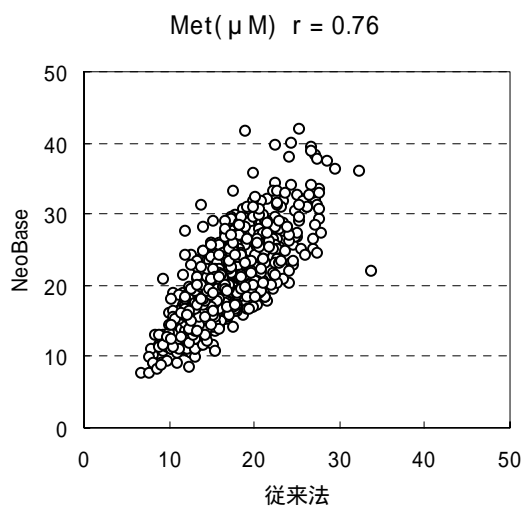
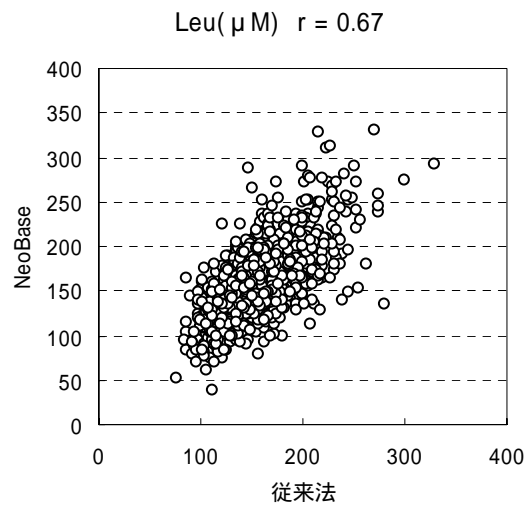
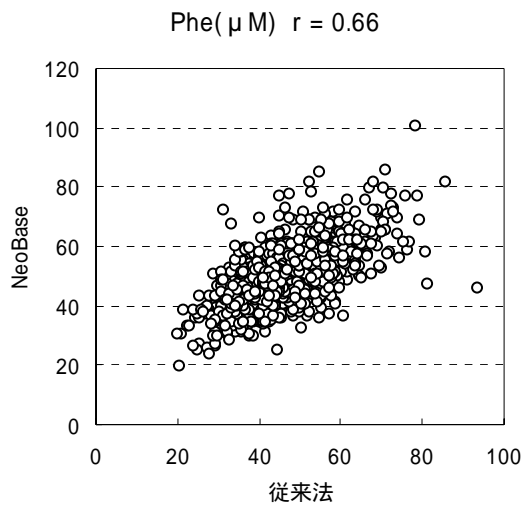


図2-A 主なアミノ酸の従来法とNeoBase^Rによる測定値の相関

アミノ酸の略記号については表3を参照

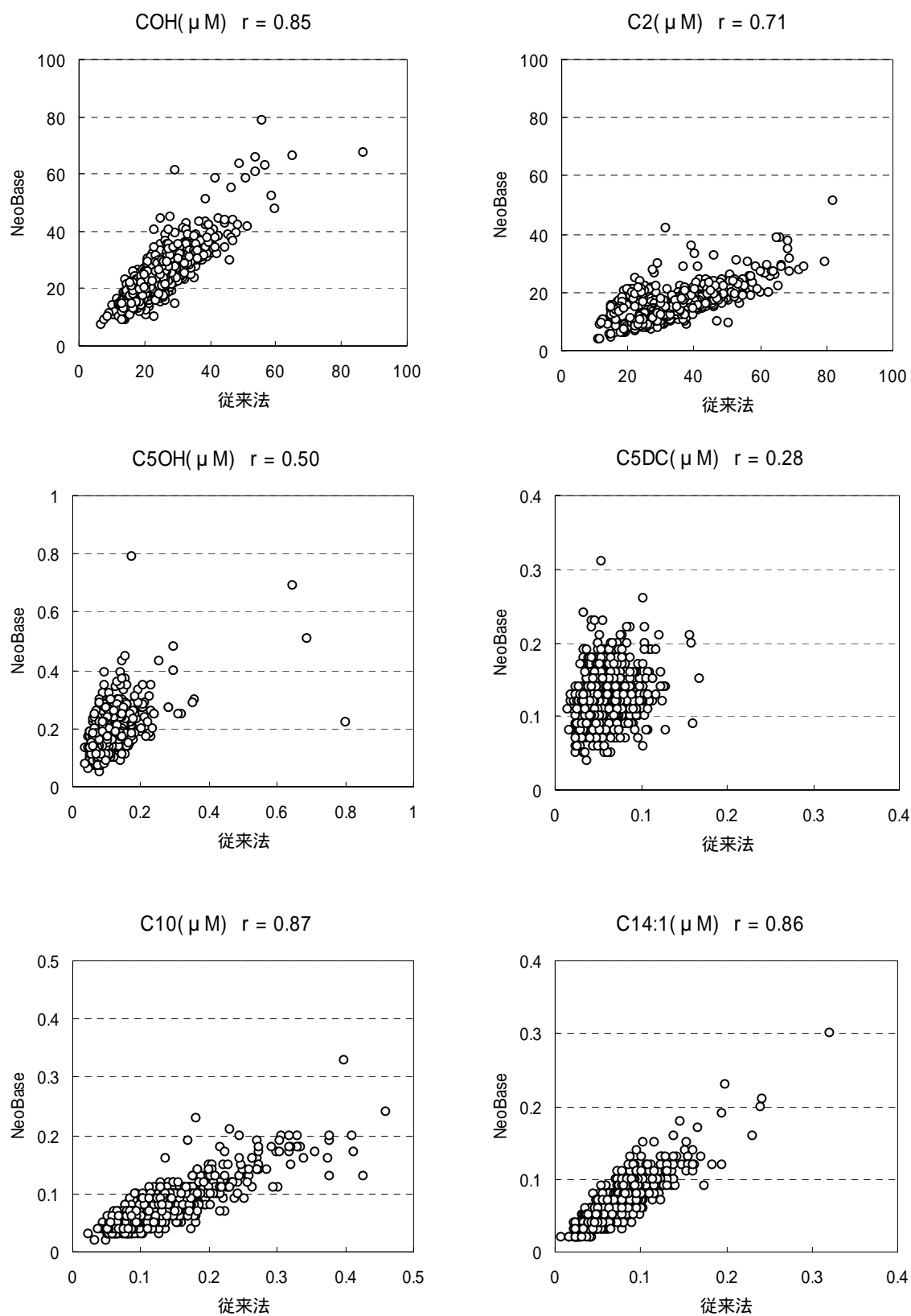


図2-B 主なアシルカルニチンの従来法とNeoBase[®]による測定値の相関
アシルカルニチンの略記号については表2及び表3を参照

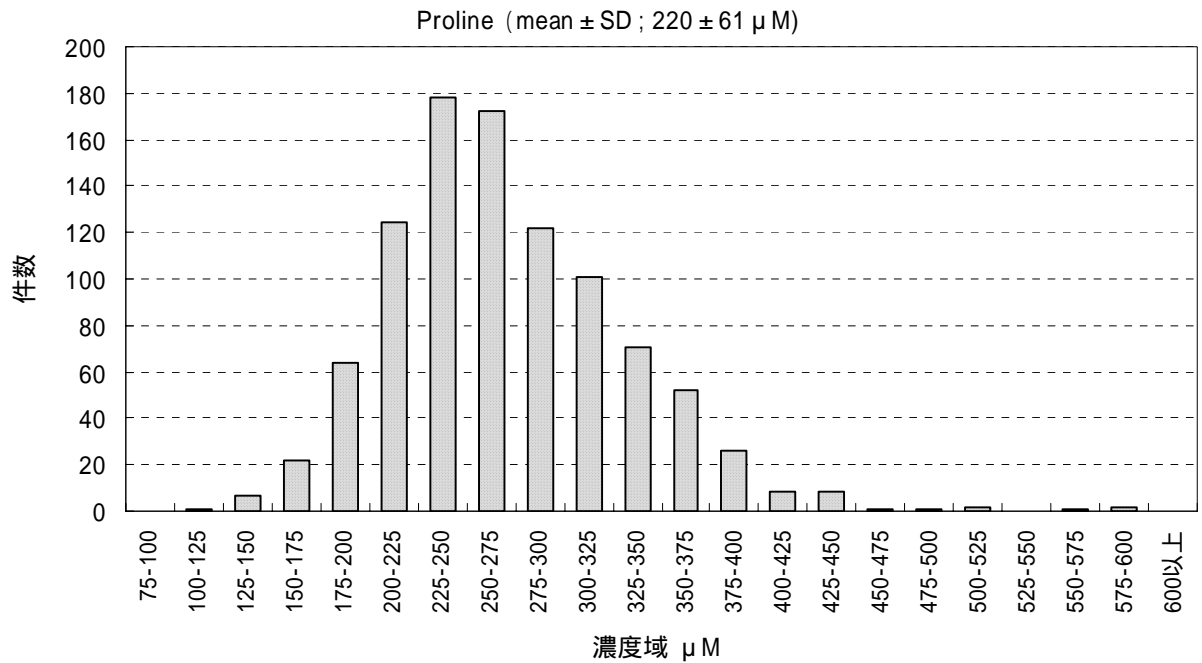
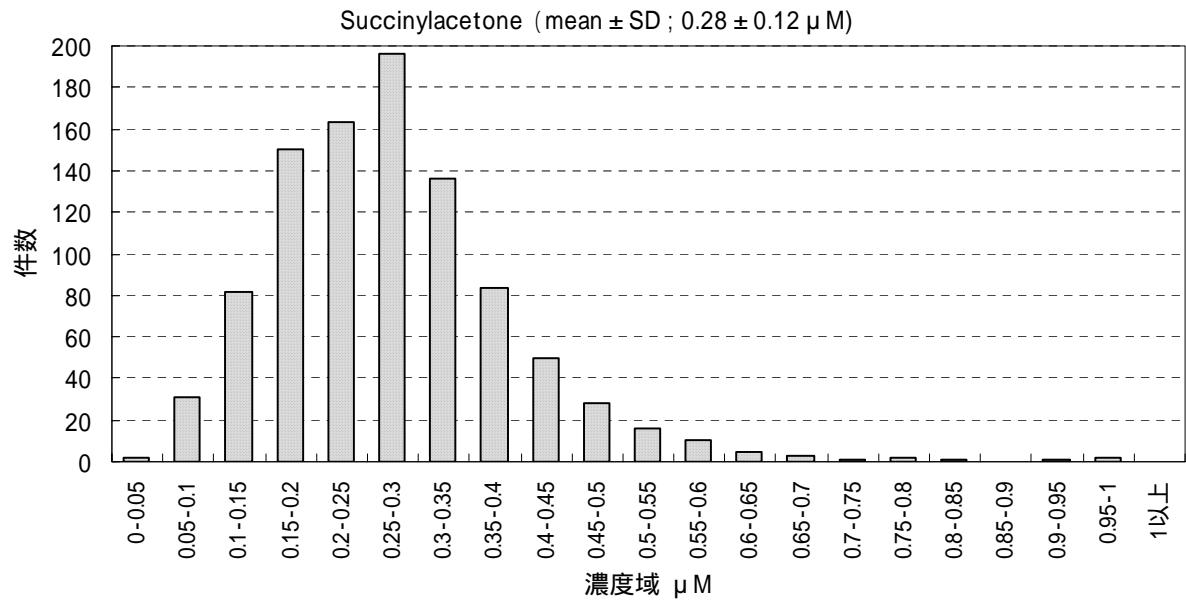


図3 NeoBase[®]による新生児紙血中サクシニルアセトン及びプロリンの測定値のヒストグラム

4 考 察

従来、新生児マス・スクリーニングにおいて、タンデムマスによりアミノ酸とアシルカルニチンを一斉分析する場合、感度を上げるためにカルボキシル基をブチル化して測定する方法が用いられてきた⁹⁻¹⁵⁾。しかし、前処理の手順を簡略化するため、ブチル誘導体化を必要としない分析法について様々な検討が

行われている¹⁶⁻¹⁸⁾。先に私たちは、Perkin Elmer社の非誘導体化キットを用いて当所のシステムで新生児マス・スクリーニング検査が可能か、現行のブチル誘導体化法（以下；従来法）と比較すること等により検討を行ったところ、良好な結果を得ていた^{6,19)}。今回はPerkin Elmer社が非誘導体化を前提としながら、加えてサクシニルアセトン、プロリンを追加して測

定が可能なキットNeoBase[®]について同様の検討を行った。

4-1 前処理について

現在私たちが、調査研究「タンデム質量分析計による新生児マススクリーニング」で用いている従来法では、前処理の所要時間はおよそ2時間であり、加えて複数のプレートを前処理する場合は、窒素気流器やプレート加熱装置の処理能力に制限があるため、さらに前処理に時間を費やす必要がある。

一方、今回検討したNeoBase[®]による方法では、hydrazineによるサクシニルアセトンの誘導体化反応を含めた前処理の所要時間はおよそ3時間であった。しかし、この反応は加温振盪と静置のみの簡単な手順であり、そのため複数のプレートを処理する場合でも同時に行うことが出来た。また、サクシニルアセトンを定量しない場合は、前処理は45分の加温振盪のみでよく、その場合は作業の効率化に結びつけることができると考えられた。

4-2 変動係数の評価

アッセイ間変動係数(表3)は全測定対象を通じて10-25%程度であり、現行法がおおむね15%以下である点と比べてやや大きかった。この原因として、誘導体化を行わないことによるイオン化効率の低下と、抽出溶媒の含水率が従来法と比較して高いことにより、ろ紙血検体からタンパクが溶出し、測定機器のサンプリング部分が汚染することにより、イオン化効率が下がることが考えられた。しかし、陽性の判定には概ね問題のないレベルであり、スクリーニング検査への応用というレベルでは問題ないと考えられた。

4-3 測定値の評価

一般検体を用いた従来法とNeoBase[®]の測定値の相関はGlutaryl carnitin(C5DC)を除いて概ね良好であった。

アミノ酸においては、citrulline(Cit)、arginine(Arg)、ornithine(Orn)の二塩基アミノ酸でNeoBase[®]の測定値が従来法より高い傾向が認められた。これは従来法ではブチル誘導体化反応を行う際、アミノ基の存在により副反応生成物が生じ、そのため回収率が低くなる傾向があるためと考えられる⁷⁾。そのためマススクリーニング法をNeoBase[®]に移行する場合は、これら

の指標についてカットオフ値を再検討することが必要である。

アシルカルニチンにおいては、Acetylcarnitine(C2)、Decanoylcarnitine(C10)等でNeoBase[®]の測定値が従来法より高い傾向が認められた。原因としては、従来法の場合中・長鎖域アシルカルニチンの安定同位体ラベルスタンダードの種類が少ない(表1)ため、濃度の算出に用いる内部標準分子自体が異なり、結果として分子間のイオン化効率に差が生じる程度が大きいために考えられた。しかし、相関は良好であるため、いずれの方法でも、アミノ酸同様適切なカットオフ値の設定を行うことでスクリーニング検査への応用には問題ないと考えられた。

C5DCの測定値については、他の測定対象に比べて相関が低かった(図2-B)。これは、C5DCがカルボキシル基を二つ有する構造を持つため、従来法ではモノブチル体の他、ジブチル体が副生成物として生じ、その結果、測定値にバラツキを生じること、NeoBase[®]ではC5DCの安定同位体ラベルスタンダードを含んでいるが、従来法はC5DCの定量に、分子構造の大きく異なるC8の安定同位体ラベルスタンダードを用いていること、加えて誘導体化を行わないNeoBase[®]の場合、3-Hydroxy-hexanoylcarnitine(C6OH)がC5DCと分離されず、C5DCの測定値をかさ上げしていることなどが要因となっていると考えられる。いずれの方法でも、高値に調製した精度管理検体では、十分に異常高値な測定値を示したが、C5DCのより精度の高い測定方法の開発は、今後の課題の一つとなる。

4-4 新しい測定項目について

NeoBase[®]を用いることで測定が可能となるサクシニルアセトン及びプロリンの平均値±標準偏差は、それぞれ $0.28 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 、 $220 \pm 61 \mu\text{M}$ であり、回収率も75-90%で安定していた。また、変動係数も15-20%程度であり、他の測定対象物質と比較した場合でも、感度、安定性ともに良好な結果であった。これらの測定対象を追加することで、チロシン血症^{5,7)}及びプロリン血症のスクリーニングも可能であると考えられるが、両疾患とも国内ではきわめて稀な疾患であり²⁰⁾、仮に検査方法を移行するとした場合、

NeoBase[®]を用いるためにかかる追加コストと疾患頻度、QOLの評価など多くの側面から慎重な検討が必要であると考えられた²¹⁾。なお、新生児の血中サクシニルアセトンの濃度については今回の私たちの結果と大きく異なる平均値を報告しているものもあり²²⁾、今後、十分な基礎データを蓄積していく必要性がある。

4-5 まとめ

タンデムマスを用いたアミノ酸・アシルカルニチン一斉分析法による新生児マススクリーニングにおいて、PerkinElmer社のキットNeoBase[®]を用いることで、簡便な前処理で検査が感度よく可能であり、かつ新たにサクシニルアセトン、プロリンの二種の指標物質を追加することが可能であった。これらの新たな指標物質を検査項目に追加することで発見可能と考えられる疾患については、そのスクリーニング効果について検討を継続する必要があるが、少なくとも十分簡便な方法で検査が可能であることは示されており、今後の新生児マススクリーニングの発展の一つの可能性を示唆するものだった。また総じて同キットは大量検体処理に優れており、カットオフ値の検討等を踏まえることで、当所のシステムにおいても、新生児マススクリーニングの検査法として十分に使用可能なものである。

5. 文献

- 1) 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, 札幌市衛生研究所年報, 32, 54-61, 2005.
- 2) Kaye CI. Introduction to the newborn screening fact sheets, Pediatrics, 1304-1312, 2006.
- 3) Santer R, Fingerhut R, Lassker U et al. Tandem mass spectrometric determination of malonylcarnitine: diagnosis and neonatal screening of malonyl-CoA decarboxylase deficiency, Clinical Chemistry, 49, 660-662, 2003.
- 4) Matern D, He M, Berry SA et al. Prospective diagnosis of 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in the Hmong population by newborn screening using tandem mass spectrometry, Pediatrics, 112, 74-78, 2003.
- 5) Pass KA, Morrissey M. Enhancing newborn screening for tyrosinemia type I, Clinical Chemistry, 54, 627-629, 2008.
- 6) 野町祥介, 仲島知美, 櫻田美樹 他. タンデム質量分析計による非誘導体化法アミノ酸・アシルカルニチン一斉分析 - 現行のプチル誘導体化法との比較 -, 札幌市衛生研究所年報, 34, 37-47, 2007.
- 7) Sander j, Janzen N, Peter M et al. Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia: tandem mass spectrometric quantification of succinylacetone, Clinical Chemistry, 52, 482-487, 2006.
- 8) 野町祥介, 福士 勝, 武口 裕, 宮下妙子, 矢野公一, 藤田晃三, 札幌市衛生研究所におけるヒトを対象とする医学研究を実施するための体制整備 - 倫理審査委員会の設置 -, 札幌市衛生研究所年報, 35, 43-49, 2008.
- 9) Chace DH, Millington DS, Terada N et al. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 39, 66-71 1993.
- 10) Chace DH, Hillman SL, Millington DS et al. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 41, 62-68 1995.
- 11) Chace DH, Hillman SL, Millington DS et al. Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethionemias from newborns' blood spots by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 42, 349-355 1996.
- 12) Chace DH, Hillman SL, Van Hove LK et al. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry, Clinical Chemistry, 43, 2106-2113 1997.
- 13) Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D et al. Tandem mass spectrometry analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New

- England newborn screening program, *Clinical Chemistry*, 47, 1945-1955, 2001.
- 14) Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA et al. Rapid Diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns, *Clinical Chemistry*, 47, 2040-2044, 2001.
- 15) Schulze A, Lindner M, Kohimuller 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.
- 16) Piraud M, Vianey-Saban C, Konstantinos P et al. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionization mode, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 1297-1311, 2003.
- 17) Nagy K, Takats Z, Pollreisz F et al. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical dervatization for neonatal screening, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 983-990, 2003.
- 18) 稲岡一孝, 竹島清美, 中村しのぶ 他. 検査施設におけるアミノ酸・アシルカルニチンの無誘導体化測定, 厚生労働科学研究費補助金 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 平成18年度研究報告書, 113-119, 2007.
- 19) 野町祥介, 仲島知美, 櫻田美樹 他. タンデムマスによる新生児マススクリーニングにおける非誘導体化法の検討, 厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書, 76-80, 2007.
- 20) 加藤忠明, 小児慢性特定疾患治療研究事業に登録された新しいマススクリーニングで発見する疾患, 厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書, 119-126, 2008
- 21) 大日康史, 菅原民枝, 山口清次. タンデムマス法を用いた新生児マス・スクリーニングの費用対効果分析, *日本マス・スクリーニング学会誌*, 17(3), 27-34, 2007.
- 22) Turgeon C, Magera MJ, Allard P et al. Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots, *Clinical Chemistry*, 54, 657-664, 2008.

