財團法人罕見疾病基金會委託研究計畫報告

申請編號 _____年_____號

計畫名稱	中文	脂肪酸代謝異常疾病檢體診斷服務				
	英文	Diagnostic service for acylcarnitine profile				
計劃主持人姓名		胡務亮	英文姓名 姓名	Wuh-Liang Hwu (Last Name) (First Name)		
服務單位		臺大醫院	職稱	醫師		
聯絡地址		100 臺大醫院基因醫學部，台北市中三南路七號				
聯絡電話		(公)23123456-7541				
傳真號碼		23314518	E-MAIL	hwu@ha.mc.ntu.edu.tw		
協同主持人 姓名			服務單位		職稱	
協同主持人 姓名			服務單位		職稱	
協同主持人 姓名			服務單位		職稱	
執行期限		自民國 93 年 7 月 1 日 起至 民國 94 年 2 月 28 日止				
申請研究經費		十五萬元整				
計畫連絡人		姓名：胡務亮	電話：(公) 23123456-7541			
通訊地址		100 臺大醫院基因醫學部，台北市中三南路七號				
傳真號碼		23314518	E-MAIL	hwu@ha.mc.ntu.edu.tw		

目錄

中文摘要	p.3
英文摘要	p.4
前言	p.5
材料與方法	p.8
結果	p.9
討論	p.11
參考文獻	p.12

中文摘要：

關鍵詞：脂肪酸代謝異常，串聯質譜儀分析，acylcarnitine

利用串聯質譜儀分析血液代謝產物是近十年來慢慢發展出來的技術。胺基酸有二十多種，他們的構造有共通之處，我們可以在同一次的檢體製備中掃描多種胺基酸。人體的脂肪酸進入粒腺體進行氧化時，需要經由 carnitine(肉鹼)來攜帶，所以 acylcarnitines 就反應出脂肪酸氧化之狀態。將胺基酸以及 acylcarnitine 這兩項分析結合起來，就是現代的串聯質譜儀代謝疾病分析，可針對二十種以上的疾病種類進行診斷分析。以前氨基酸分析尿液有機酸分析複雜度而且昂貴，另外無可取代的，就是脂肪酸代謝的分析了。

由於這項檢查的重要性，我們曾經向健保局爭取給付，但是並不成功。在台灣串聯質譜儀新生兒篩檢才剛剛開始，而且也還有漏檢以及晚發的病患需要這項檢查，為了服務病患，我們決定提供免費的服務。這樣複雜的檢查，其費用相當的昂貴，目前衛生署提供的台幣 1500 元的補助，並不符合成本的需求。本計畫的目的就是藉著罕見疾病基金會的補助，能夠繼續提供病患免費的脂肪酸代謝異常疾病檢體診斷服務，除了可以減輕病患的負擔，也可避免醫院、醫師以疾病患因為繁雜的付費手續，而降低了尋求診斷的意願。

在 93 年的下半年終去年本院一共執行 MSMS 檢查共 467 件，其中有 246 件來自外院。曾經寄送檢體之醫療院所包括高醫、高榮、亞東、成大、婦幼、慈濟、國泰、新光、三總、恩主公、中山、中榮、北醫等。我們都能在固定時間內發出報告，對患者的診斷或是追蹤有很大的幫助。其中初次診斷個案包含 3-methyl-glutaconic aciduria, MSUD, citrullinemia type 2, isoveleric acidemia 等，顯示出本系統的重要性。也希望未來能持續這一項服務。

Abstract

Key words: fatty acid oxidation defect, tandem mass spectroscopy, acylcarnitine

Analysis of body fluid metabolites with the tandem mass (MS/MS) technology just occurs recently. There are more than 20 amino acids in human, and all share a common molecular structure. Therefore we can scan all the amino acids with one function in the MS/MS analysis. When fatty acids are transported into the mitochondria, carnitine is a carrier. Therefore, by analyzing the acylcarnitine profile, we can know both the distribution of fatty and certain organic acids. Combining these two tests makes up the current MS/MS analysis. Around 20 diseases may be discovered by this technique. Previously, plasma amino acid analysis and urine organic acid analysis are both tedious and expensive. Mover, fatty acid oxidation defect totally depends on this test.

Regardless the importance of MS/MS analysis, we are not able to get insurance reimbursement. Neonatal screening with MS/MS just starts, and there are a lot of babies not screened. Therefore, we want to offer this test without extra-expense. Since this test is very complicated and expensive, currently we can only get NT 1500 from DOH, which doesn't meet our cost. Therefore in this project we want to get the support from the TFRD, to support this test. We want to make the test free of cost to the referring doctor, to decrease their paper work and to increase their motivation to send test.

In the latter half of 2004, we perform 467 tests for MS/MS. Among them 246, more than half of the total tests, are referred from other hospitals. There are more than 10 hospitals who regularly send MS/MS test to our lab. For all of them we can send back the results within the defined time frame. This test helps a lot the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors. We have made initial diagnosis for diseases including 3-methyl-glutaconic aciduria, MSUD, citrullinemia type 2, and isoveleric acidemia, which demonstrates the value of the test. We hope this system can be continue in the future.

前言

串聯質譜儀技術的全名為 LC-electrospray-triple-quadropol mass spectroscopy。也就是用高壓液相幫浦推動檢體，經過管柱先做初步分離，再經過電灑法將溶液氣化並且產生離子，經由三段四極桿來做離子的分離以及鑑定。利用串聯質譜儀分析血液代謝產物是近十年來慢慢發展出來的技術。胺基酸有二十多種，他們的構造有共通之處，也就是有相同的官能基。利用這樣的特性，我們可以在同一次的檢體製備中掃描多種胺基酸。比如胺基酸的種類有 phenylalanine 苯丙胺酸、leucine 白胺酸、valine 纈胺酸、methionine 甲硫胺酸、tyrosine 酥胺酸、glycine 甘胺酸及 citrulline 瓜胺酸等；而其相對之胺基酸代謝異常疾病則有苯丙胺酸引起的苯酮尿症、白胺酸引起的楓糖尿症、纈胺酸引起的楓糖尿症、甲硫胺酸引起的高胱胺酸尿症、酥胺酸引起的酥胺酸血症、甘胺酸引起的高甘胺酸血症及瓜胺酸引起的高瓜胺酸血症等。

人體的脂肪酸進入粒腺體進行氧化時，需要經由 carnitine(肉鹼)來攜帶，所以 acylcarnitines 就反應出脂肪酸氧化之狀態。脂肪酸是人體能量的最主要來源。脂肪酸氧化障礙可能以新生兒急性腦病變、嬰幼兒期代謝異常，或心臟及肌肉病變來表現。會發生低血糖、高血氨及昏迷。急性期可能在患者之尿液有機酸檢查中看到過量之雙酸 (dicarboxylic acid)。這些疾病常常需要特殊檢查始能確診，因其種類繁多又十分罕見，所以很不容易早期診斷。在西方人中鏈脂肪酸氧化異常是一種很常見的疾病。在台灣脂肪酸氧化異常的發生率不太清楚，但是長鏈脂肪酸以及中鏈脂肪酸氧化異常疾病都有被報告過。

將胺基酸以及 acylcarnitine 這兩項分析結合起來，就是現代的串聯質譜儀代謝疾病分析，可針對三類，約二十種以上的疾病種類進行診斷分析。以前的技術中，氨基酸分析儀可以針對氨基酸作很好的分析，但是這樣的分析速度很慢，也非常的昂貴，只有在高度可疑的個案，才會去使用。尿液有機酸分析對於有機酸血症也是非常好的工具，可是同樣的，它的複雜度以及價格限制這項檢查只能使用在高度懷疑的病人。然而串聯質譜儀分析中，最獨特而且是無可取代的，就是脂肪酸代謝的分析了。

脂肪酸氧化的過程，可以區分為四部份，包括 carnitine cycle，ß-oxidation，electron transfer 以及 ketone bodies 的合成。Beta-oxidation 是在粒線體內進行。脂肪酸是一種很長的碳鏈，氧化時以兩個碳為一個單位逐漸減短。每一次減短都要經過四個步驟，由 acyl-CoA 變成 enoyl-CoA、3-OH-acyl-CoA、3-keto-acyl-CoA 最後在回到 acyl-CoA(圖一)。但是代謝不同長度的脂肪酸有時需要不同的酵素，這使得需要的酵素種類增加，所引起之疾病也更為複雜。

脂肪酸氧化的致病機轉大致可分為兩方面，首先是代謝方面的影響。當身體遇到能量不足的壓力時，就會增加脂肪酸的氧化。當脂肪酸氧化發生異常時，除了無法藉由此

代謝途徑得到能量外，一些脂肪酸代謝中間產物會開始堆積產生毒性。因此臨床上會看到腦病變(意識昏迷)，肝功能不正常，甚至影響其他的代謝途徑而發生低血糖、高血氨等症狀。這樣的表現也被稱作肝臟型表現。第二方面的影響是肌肉病變，脂肪酸氧化是肌肉能源的主要來源，脂肪酸氧化異常會導致心肌病變及肌肉病變。慢性的肌肉病變以肌肉無力來表現，急性的肌肉病變則引起肌肉溶解，可能併發腎臟衰竭，甚至死亡。

各項相關疾病中，在台灣較為重要的可能有下列幾項

1. Carnitine transporter defect (CTD) CTD 影響到的是 Carnitine 細胞膜的穿透及運輸。CTD 患者血漿、肌肉及心臟的 Carnitine 濃度非常的低，導致脂肪酸進入粒線體及氧化的過程受阻，引起能量的缺乏。患者在 1 至 2 歲的時候，遇到身體上的壓力如飢餓或感染時，可能會發生低血糖、低酮體的症狀，有些會引起昏迷，甚至危及性命。患者在 1 至 2 歲以後，其臨床表現主要在心臟及肌肉，出現漸進性的肌肉無力及心臟衰竭。以超音波檢視心臟可見到心室肥厚及收縮力不良。這樣的心臟衰竭會持續惡化，如果沒有治療，患者會在 2 至 4 歲左右死亡。

2. Carnitine palmitoyl transferase 2 (CPT2) 缺乏症 CPT2 缺乏症臨床上可以兩種類型來表現。典型的表現是肌肉的病變，患者通常是成年人，在運動過後發生肌肉疼痛，無力以及 myoglobinuria。這樣的症狀常常在 15-30 歲之間首次發生，也可能和飢餓或心理上的壓力有關。在沒有發病的時候肌肉酵素可能是正常的，也只有小部分患者肌肉切片中呈現脂肪的堆積。嬰兒型的 CPT2 缺乏症較為少見，可能是致死的。症狀包括低酮體性低血糖，抽筋及昏迷。其他症狀有肝臟腫大及心臟肥大。實驗室檢查包括在尿中發現雙酸，血漿 free carnitine 降低，長鏈 acylcarnitines 升高等。

3. 中鏈脂肪酸去氫酶缺乏症 Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency. MCAD 缺乏症在台灣相當少見，可是在西方國家卻是一種相當常見的疾病，其發生率可高達萬分之一。MCAD 患者主要以肝臟病變來表現，並不會產生心臟或肌肉的症狀。患者可能起初沒有症狀，直到身體遭遇到大的壓力或長時間的飢餓，比如當小孩子因為腸胃炎而無法正常進食的時候才發病。較常發病的年齡為 3 至 24 個月大，而患者成長以後對飢餓的承受度會增高。因為飢餓而發病是脂肪酸氧化異常疾病的典型表現，在停止進食的前 12 至 14 小時，身體的代謝沒有什麼異常，因為脂肪酸的分解和脂肪酸的氧化並沒有被激發。繼續的飢餓引起脂肪酸的分解和脂肪酸濃度增高，可是在 MCAD 缺乏症的病人酮體卻沒有辦法正常的升高，表示脂肪酸的氧化受阻。患者典型的症狀為嘔吐、肝臟腫大、低血酮性低血糖、意識模糊、昏迷及抽搐。低血糖表示能源耗盡，神經學的症狀和脂肪酸中間代謝產物的毒性有關聯。如果沒有及時治療病情會快速的進行，患者可能呼吸心跳停止而死亡。MCAD 缺乏症患者首次發病時常被誤認為雷氏症候群，一部份新生兒猝死的案例也和 MCAD 缺乏有關。雖然有些病人直到青春期或成人期才有臨床表現，也有一些患者

完全沒有症狀，但是此疾病有 25%的病例在第一次發作時死亡，有相當大的危險性。

治療及預後方面，脂肪酸氧化異常的治療最方便的是 carnitine。這種藥物目前已被列為孤兒藥，健保也有給付。對原發性 carnitine 缺乏的病人而言，每天每公斤體重 100 mg 的 carnitine，分三次服用，可以有效的控制病情，讓患者能過著正常的生活。可是對於其他的脂肪酸氧化異常而言，carnitine 就不一定有效，甚至可能產生害處。比如在長鏈脂肪酸氧化異常時，突然給予 carnitine 會將大量的脂肪酸帶入粒線體而加重病情。所以比較安全的作法是先測定血漿 free carnitine 濃度，如果有次發性 carnitine 缺乏時再給予適度 carnitine 的補充。中鏈脂肪酸對長鏈脂肪酸氧化異常可能有效，但是如果給予中、短鏈脂肪酸氧化異常的患者時，將會造成很大的毒性，所以使用上一定要小心。在診斷還不是很清楚時，最安全而有效的做法就是能量的供應與避免飢餓。因為只要身體有充足的能量，不再去激發脂肪酸的氧化，患者就會慢慢的好起來。

因此計畫的目的就是藉著罕見疾病基金會的補助，能夠繼續提供病患免費的脂肪酸代謝異常疾病檢體診斷服務，除了可以減輕病患的負擔，也可避免醫院、醫師以疾病患因為繁雜的付費手續，而降低了尋求診斷的意願。

材料與方法

串聯質譜儀操作

登記：檢體到達時，先將基本資料鍵入資料庫中。檢體編號冰凍儲存

檢體製備

1. 打洞：打兩個 3mm 含血率使圓盤於 96 孔盤(PS 盤)中的指定位置。
2. 析出：加入 200ul Methanol 於每一個 96 孔盤的小孔中，輕輕震盪 30 分鐘。
3. 移轉：於每一個小孔中取 100 ul 到一個新的 96 孔盤(PP 盤)中的相對應位置小孔。
4. 吹乾：在抽風櫃中，將 96 孔盤至於加熱板上，打開氮氣開關，讓氮氣輕輕吹向液面。約 20 分鐘後 Methanol 會被蒸乾。
5. 衍生物製作：在每一個小孔中加入 100 ul 的 Butanoic HCl。將盤子封住。將盤子放入 60 度的烤箱中 20 分鐘。
6. 吹乾：在抽風櫃中，將 96 孔盤至於加熱板上，將蒸發氣之針頭對準每一個小孔，打開氮氣開關，讓氮氣輕輕吹向液面。約 30 分鐘後 Butanoic HCl 會被蒸乾。
7. 溶解：在每一個小孔中加入 100 ul 的 Acetonitrite。用鋁箔紙將盤子封住。將盤子放入自動注射儀中。

檢體分析：

自動注射儀每 2 分鐘注射一個檢體到串聯質譜儀中進行分析，檢體由液相幫浦推動，注射口由氮氣推動，串聯質譜儀內部為高真空，每次注射可做三種分析，定量二十餘種化合物，並自動產生結果。

資料分析

將檢驗結果並入資料庫中
由資料庫中產生報告單
由負責醫師分析結果，打報告
印出報告單，由負責醫師完章
寄送報告

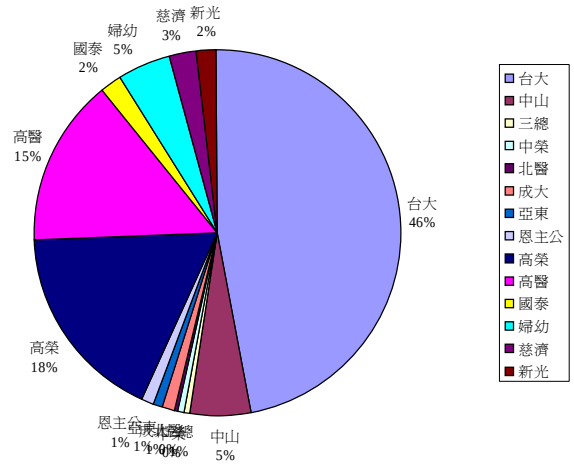
結果

在 93 年的下半年終去年本院一共執行 MSMS 檢查共 467 件，其中有 246 件來自外院。曾經寄送檢體之醫療院所包括高醫、高榮、亞東、成大、婦幼、慈濟、國泰、新光、三總、恩主公、中山、中榮、北醫等。我們都能在固定時間內發出報告，對患者的診斷或是追蹤有很大的幫助。其中初次診斷個案包含 3-methyl-glutaconic aciduria, MSUD, citrullinemia type 2, isoveleric acidemia 等，顯示出本系統的重要性。也希望未來能持續這一項服務。

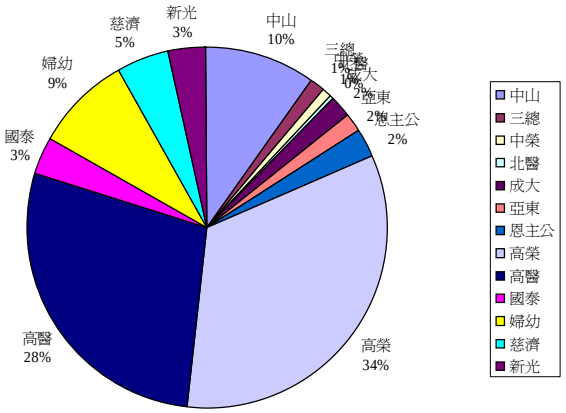
個案數

台大	219
中山	25
三總	3
中榮	2
北醫	1
成大	5
亞東	4
恩主公	6
高榮	82
高醫	70
國泰	8
婦幼	22
慈濟	12
新光	8

分布圖


台大 46%
中山 5%
三總
中榮
北醫
成大
亞東
恩主公 1%
高榮 18%
高醫 15%
國泰 2%
婦幼 5%
慈濟 3%
新光 2%
台大
中山
三總
中榮
北醫
成大
亞東
恩主公
高榮
高醫
國泰
婦幼
慈濟
新光

分布圖(不含台大)


中山 10%
三總
中榮
北醫
成大
亞東
恩主公 2%
高榮 34%
高醫 28%
國泰 3%
婦幼 9%
慈濟 5%
新光 3%
中山
三總
中榮
北醫
成大
亞東
恩主公
高榮
高醫
國泰
婦幼
慈濟
新光

討論

1. MS/MS 是最方便的代謝疾病檢查。醫師只要採取血片，乾燥以後用信件送出就可以了。其他血液檢查則需要用快遞或冰凍，方便程度差很多。
2. MS/MS 是範圍最廣的代謝疾病檢查。不論是胺基酸疾病、有機酸疾病、或是脂肪酸疾病，MS/MS 都有可能偵測出來。
3. MS/MS 是最快速的代謝疾病檢查。初步結果一般一週內得到，報告一般兩週內發出，許多時候可以用更快的速度檢出。
4. MS/MS 是最經濟的代謝疾病檢查。目前比氨基酸分析尿液有機酸分析成本都低，而且操作方便。
5. 罕見疾病的必須檢查項目不應該收費，以避免增加醫師以及病患不合理的負擔。只有不收費才能鼓勵醫師從事罕見疾病的診斷與治療。

參考文獻

Burlina AB, Bonafe L, Zacchello F. Clinical and biochemical approach to the neonate with a suspected inborn error of amino acid and organic acid metabolism. Semin Perinatol. 1999 Apr;23(2):162-73.

Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. Clin Chem. 2003 Nov;49(11):1797-817. Review.

Dezateux C. Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: evaluating the effects on outcome. Eur J Pediatr. 2003 Dec;162 Suppl 1:S25-8. Epub 2003 Nov 20.

Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G (Eds). Inborn Metabolic disease. Berlin: Springer, 2000.

Hwu WL, Chiang SC, Chang MH, Wang TR. Carnitine transport defect presenting with hyperammonemia: report of one case. Acta Paediatr Taiwan 2000;41:36-8.

Levy HL, Albers S. Genetic screening of newborns. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2000;1:139-77.

Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. Curr Opin Pediatr. 2004 Aug;16(4):427-33.

Rinaldo P, Matern D. Disorders of fatty acid transport and mitochondrial oxidation: challenges and dilemmas of metabolic evaluation. Genet Med. 2000 Nov-Dec;2(6):338-44.

Seashore MR. Tandem spectrometry in newborn screening. Curr Opin Pediatr. 1998 Dec;10(6):609-14

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (Eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

Sim KG, Hammond J, Wilcken B. Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. Clin Chim Acta. 2002 Sep;323(1-2):37-58.

Tang NL, Hwu WL, Chan RT, Law LK, Fung LM, Zhang WM. A founder mutation (R254X) of SLC22A5 (OCTN2) in Chinese primary carnitine deficiency patients. Hum Mutat. 2002;20:232.

Venditti LN, Venditti CP, Berry GT, Kaplan PB, Kaye EM, Glick H, Stanley CA. Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cost-effectiveness analysis. Pediatrics. 2003 Nov;112(5):1005-15.

Wilcken B. Ethical issues in newborn screening and the impact of new technologies. Eur J Pediatr. 2003 Dec;162 Suppl 1:S62-6. Epub 2003 Nov 14.