

Tandem Mass Spectrometry를 이용한 선천성 대사이상질환 선별검사 7년간의 경험

서울의과학연구소 서울임상병리검사센터¹, 덕성여자대학교 약학대학²

송선미¹ · 윤혜란² · 이안나¹ · 이경률¹

Seven-year experience with inherited metabolic disorders screening by tandem mass spectrometry

Sean-Mi Song, M.D.¹, Hye-Ran Yoon, Ph.D.²
Anna Lee, M.D.¹ and Kyoung-Ryul Lee, M.D.¹

¹Seoul Clinical Laboratories, Seoul Medical Science Institute, Seoul

²College of Pharmacy, Duksung Womens University, Seoul, Korea

Purpose : In recent years, many countries have adopted newborn screening programs that use tandem mass spectrometry (MS/MS) to screen and the number of diseases screened has also increased. We began screening for inherited metabolic disorders using MS/MS in April, 2001. Our goal was to determine the overall prevalence of metabolic disorders and to assess the effectiveness of newborn screening by MS/MS in Korea.

Methods : From April, 2001 to December, 2007, we screened newborns and high risk groups using MS/MS. Acylcarnitines and amino acids were extracted and butylated and were introduced into the inlet of MS/MS. Confirmatory testing including a repeat newborn screening, and urine organic acid and plasma amino acid analysis were performed on a case-by-case basis.

Results : The total number of screened subjects 284,933 which comprised 251,799 neonates and 33,134 high risk subjects. The recall rate was 0.4% (1158 tests) and true positive cases were 117 (0.04%). Confirmed metabolic disorders (newborn/high risk group) were as follows; 78 (25/53) amino acid disorders, 27 (16/11) organic acid disorders, and 12 (5/7) fatty acid oxidation disorders. The estimated prevalence of inherited metabolic diseases in newborns was 1:5,000 and that in the total group was 1:2,000.

Conclusion : Newborn screening by MS/MS improved the detection of many inherited metabolic disorders. We therefore propose that all newborns be screened by a MS/MS national program and followed-up using a systemic organization strategy.

Key Words : Tandem mass spectrometry, Newborn screening, Inherited metabolic disorder

서 론

1961년 Robert Guthrie가 *Bacillus Subtilis* 균주를 이용한 bacterial inhibition assay(BIA)로 신생아들의 혈액여지내 페닐알라닌 농도를 정량적으로 측정하여 페닐케톤뇨증을 조기에 발견함으로써 신생아들에 대한 선천성대사이상 질환에

책임저자 : 송선미, 서울시 용산구 동빙고동 7-14번지
서울의과학연구소 서울임상병리검사센터
Tel : 02)790-6500 (내선 323), Fax : 02)790-6509
E-mail : drssm@scllab.co.kr

대한 신뢰성 있는 집단 선별검사법이 가능해졌다¹⁾. 그 후 효소색법, 효소면역법, 형광면역법 등 다양한 방법으로 일부 선천성대사이상 질환들에 대한 집단선별 검사가 이루어지게 되었다. 1980년대 중반, 처음으로 고위험군을 대상으로 지방산 산화 및 유기산 대사이상질환 진단을 위해 아실카르니틴을 탠덤매스(tandem mass spectrometry, MS/MS)에 도입하여 분석할 수 있게 되었다^{2,3)}. 1990년대 초부터 탠덤매스는 신생아 대상으로 선천성 대사이상질환 선별검사에도 적용하게 되었다. 탠덤매스는 기존의 검사방법과 달리 한번의 검사에 30여가지 이상의 대사산물에 대한 농도 분석이 가능하므로 많은 선천성 대사이상질환에 대한 선별검사가 가능하게 되었다^{4,5)}. 탠덤매스를 이용한 신생아 집단 선별검사는 현재 많은 나라에서 국가적 프로그램으로 운영되고 있다⁶⁻⁸⁾. 예를 들면, 미국의 경우 각 주마다 다른 제도를 갖고 있으나, 2005년 부터 32개 주에서 탠덤매스를 이용한 universal 신생아 집단 선별검사를 시행하고 있으며, 호주 역시 5개 지역으로 나누어 시행되고 있다. 2007년 현재 유럽에서도 독일을 포함한 많은 국가에서 탠덤매스 신생아 집단 선별검사를 시행하고 있다.

본원에서는 2001년 4월부터 아실카르니틴 및 아미노산을 분석하는 탠덤매스 선천성 대사이상질환 선별검사를 시작하였다. 본 연구에서는 탠덤매스 선천성 대사이상질환 선별검사에 대한 검출율 및 유용성을 평가하고자 2001년 4월부터 2007년 12월까지 자료를 조사하였다.

대상 및 방법

2001년 4월부터 2007년 12월까지 의뢰된 검체 즉, 일반 신생아군과 고위험군(가족력 또는 과거력이 있는 경우, 다른 의료기관에서 탠덤매스 선천성 대사이상질환 선별검사상 양성 결과를 보인 경우 또는 대사이상질환을 의심할 만한 증상이나 검사 결과 등이 관찰된 경우)에 대해 분석하였다. 의뢰된 검체는 건조된 혈액여지(Schleicher and Schunel, Dassel, Germany)에 채취하여 24시간 동안 실온에서 건조하여 분석할 때까지 폴리프로필렌 봉투에 담아서 보관되어 운송되었다. 도착 후 혈액여지로부터 3.2 mm 원형으로 punching하여 96well 폴리프로필렌 microplate(Costar, Cambridge, MA, USA)에 담아, 일정농도의 동위원소 표지자의 내부표준물질이 첨가된 메탄올 150 μ L을 첨가하였다. 30°C에서 30분간 아미노산과 아실카르니틴을 추출한 후, 다른 96 well 폴리프로

필렌 microplate에 일정량을 옮겨 담아 질소가스를 사용하여 추출된 용액을 완전히 건조시켰다. 건조된 microplate의 각 well에 100 μ L butanolic 염산을 첨가하여 butyl ester 유도체화를 형성시켰다. 유도체화에 사용된 유기용매를 모두 제거하기 위해 질소가스를 사용하여 재건조 후 헥산(hexane)을 이용하여 세척 후 건조시켰다. 분석하기 위해 0.1% 포름산이 용해된 아세톤나이트릴 용액 75 μ L에 다시 용해시켰다. 분석 장비로는 API 2000 LC/MS/MS 시스템(Electrospray-MS/MS, PerkinElmer Life Science Inc. Boston, MA, USA)을 사용하였다. 용해된 시료를 자동검체 분주기에 장착하여 분석하였다. 아실카르니틴 프로파일을 얻기 위해 mass-to-charge ratio(m/z) 250-500범위에서 m/z 85를 갖는 precursor 이온 스캔을 사용하였으며 아미노산 분석을 위해서는 neutral loss 102, 119, 56 및 161 스캔과 multiple reaction monitoring(MRM) 기능을 사용하였다. Cut-off를 벗어난 검체에 대해서는 재검을 시행하였으며, 재검 결과상에서도 cut-off를 벗어난 경우 재검체를 요구하였다. 재검체 검사결과 역시 cut-off를 벗어난 경우 확진 검사를 요구하였다. 확진 검사로는 Table 1과 같이 시행하였다. 효소활성도를 포함한 일부 확진 검사의 경우 외부 기관에 의뢰하여 시행하였다. 검사의 정확성 검증을 위해 미국 Centers for Disease Control and Prevention에서 주관하는 신생아 선별검사 품질 보증 프로그램 및 College of American Pathologist에서 주관하는 Biochemical Genetics Survey 프로그램에 매년 참여하여 우수한 평가를 받았다.

결 과

2001년 4월부터 2007년 12월까지 총 의뢰건수는 284,933건으로 신생아 251,799건(88.4%), 고위험군 33,134건(11.6%)이었다. 신생아 평균 나이는 3일, 전체군 평균 나이는 3세이었다. 신생아 나이 분포는 0-3일, 61%, 4-7일, 21%, 8-30일, 6% 이었다. 2001-2007년도 총 의뢰건 284,933건 중, 소환율은 0.4%(1,158건)이었으며, 이들 중 true positive는 117건(0.04%)으로, 아미노산 대사이상질환은 총 78건, 유기산 대사이상질환은 27건, 지방산 산화 대사이상질환은 12건이 검출되었다. 검출된 아미노산 대사이상질환은 tetrahydrobiopterin 대사 및 페닐알라닌 대사질환 57명(신생아군 13명/고위험군 44명), 시트룰린혈증 9명(6/3), 단풍당뇨증 4명(4/0), 호모시스틴뇨증 3명(0/3), 타이로신혈증 2명(1/1), 고메티오

Table 1. Primary and Secondary Metabolites and Confirmatory Analysis for Disorders Detected by Tandem Mass Spectrometry

Disorder	Primary and secondary metabolites	Confirmatory analysis
Phenylketonuria	Phe, Tyr	Plasma amino acids; Urine pterin studies
Tyrosinemia type 1	Tyr	Plasma amino acids; Succinylacetone in urine
Maple syrup urine disease	Leu (Ile), Val	Plasma amino acids and presence of alloisoleucine; Urine organic acids; Enzyme activity in fibroblasts*
Citrullinemia	Cit	Plasma amino acids; Enzyme activity in fibroblast*
Homocystinuria	Met	Plasma amino acids; Urine organic acids; Enzyme activity in fibroblasts*; Mutational analysis*
Propionic aciduria	C3, C2	Tiglylglycine, 3-hydroxypropionic acid, methylcitrate in urine; Enzyme activity in fibroblasts*
Methylmalonic aciduria	C3, C2, C4DC	Methylmalonic acid in urine; Homocysteine in plasma; Enzyme activity in fibroblasts*
Isovaleric aciduria	C5	3-Hydroxyisovaleric acid and isovalerylglycine in urine; Enzyme activity in fibroblasts*
Glutaric aciduria, type 1	C5DC	Glutaric and 3-hydroxyglutaric acid in urine; Enzyme activity in fibroblasts*
3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency	C5OH	3-hydroxyisovaleric acid and 3-methylcrotonylglycine in urine; Enzyme activity of fibroblasts*
Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	C4	Enzyme activity in fibroblasts/muscle*; Mutational analysis*; Ethylmalonic acid in urine
Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency	Multiple elevations from C4 to C18	Enzyme activity in fibroblasts*; Lactic, glutaric and ethylmalonic acid in urine
Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	C6, C8, C10, C10:1	Enzyme activity in fibroblasts/lymphocytes*; Mutational analysis*; Hexanoyl and suberylglycine in urine
Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	C14:1, C14, C16	Enzyme activity in fibroblasts/lymphocytes*

*Enzyme and molecular studies were not performed in our laboratory but were outsourced to accredited laboratories; Phe, phenylalanine; Tyr, tyrosine; Leu, leucine; Ile, isoleucine; Val, valine; Cit, citrulline; Met, methionine; C2, C3, C4, C4DC, C5, C5DC, C5OH, C6, C8, C10, C10:1, C14:1, C14, C16, acetyl-, propionyl-, butyryl-, methylmalonyl-, isovaleryl-, glutaryl-, hydroxyisovaleryl-, hexanoyl-, octanoyl-, decanoyl-, decenoyl-, tetradecenoyl-, tetradecanoyl-C16, palmitoyl-carnitine, respectively.

Table 2. Results of Inherited Metabolic Disorders Screening by Tandem Mass Spectrometry from April 2001 to December 2007

	Newborns (N=251,799)		High risk group (N=33,134)		Total (N=284,933)	
	Confirmed case (N)	Prevalence	Confirmed case (N)	Prevalence	Confirmed case (N)	Prevalence
Amino acid disorders	25	1:10,000	53	1:600	78	1:4,000
Organic acid disorders	16	1:16,000	11	1:3,000	27	1:11,000
Fatty acid oxidation disorders	5	1:50,000	7	1:5,000	12	1:24,000
Total	46	1:5,000	71	1:500	117	1:2,000

N, number

닌혈증 1명(0/1), ornithine transcarbamylase(OTC) 결핍증 1명(0/1) 및 hyperornithinemia, hyperammonemia, hypercitrullinemia(HHH) 증후군 1명(1/0)이었다. 아미노산 대사이상 질환의 신생아 발병률은 1:10,000 이었으며, 전체군 발병률은 1:3,700이었다. 검출된 유기산 대사이상질환은 총 27건으로, 아이소발레릴 혈증 9명(5/4), 프로피온산혈증 7명(5/2), 3-메틸크로톤산혈증 4명(2/2), 메틸말론산혈증 3명(1/2), 1형 글

루타릭산혈증 2명(2/0) 및 말론산혈증 1명(1/0)이었다. 유기산 대사이상질환의 발병률은 신생아 1:16,000 및 전체군 1:11,000 이었다. 지방산 산화 대사이상질환은 총 12명으로, long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase 결핍증(LCHAD) 5명(3/2), very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase(VLCAD) 2명(1/1), 2형 글루타릭산혈증 1명(0/1), mitochondrial trifunctional protein(M-TFP) 결핍증 1명

(0/1), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase(MCAD) 1명(0/1), short-chain acyl-CoA dehydrogenase(SCAD) 1명(1/0) 및 long-chain-3-ketoacyl-CoA thiolase(LCKAT) 1명(0/1) 이었다. 지방산 산화 대사이상질환 발병률은 신생아 1:50,000 및 전체군 1:24,000이었다. 탠덤매스 이용한 아미노산, 유기산 및 지방산 산화 대사이상질환 발병률은 신생아 1:5,000 및 전체군 1:2,000이었다.

고 찰

신생아 선천성 대사이상질환 선별검사를 하기 위해 가장 적합한 검사시기는 생후 48시간 이후 7일 이내다. 2001-2007년도 총 의뢰건 284,933건 중, 접수된 신생아 251,799건(88.4%)으로 평균 나이는 3일이었으나, 나이가 8일 이상-30일 이하인 경우가 17,153명(6.8%)이었다. 8일 이상 신생아들의 접수율이 높은 빈도로 관찰되는 원인으로 저자들은 적합한 검사시기를 놓쳐서 검사가 시행되는 경우, 다른 의료기관에서 2차 정밀검사가 필요하여 전원된 경우 또는 대사이상질환을 의심할 만한 증상이나 검사 결과 등이 있는 경우 등으로 해석할 수 있었다. 또한 2007년도까지의 소환율에 대한 자료를 분석한 결과, 검체 접수 단계에서 신생아의 인적사항 등록 시 많은 개선의 노력이 필요하였다. 특히 출생직후 신생아 이름이 아닌 산모 이름이 다양한 형식으로 접수된 경우 및 신생아를 확인할 수 있는 고유번호 등이 없음으로 의뢰기관으로의 재확인 과정이 없이는 과거력을 포함한 관련 검사확인 과정 및 추적 관찰에 어려움이 많았다. 2006년에 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)에서 신생아 선별 검사 프로그램을 통한 신생아들에 대한 추적 관리의 질을 향상시키고자 추적 프로세스 지침을 발표하였다⁹⁾. 현재 국내에서는 탠덤매스 선별검사가 비급여 종목이나, 향후 국가 지원이 이루어지는 경우, 신생아 집단검사에 대한 효율성 및 발견 또는 의심되는 환아에 대한 효율적인 추적 관리를 위해 국내의 신생아 선별 검사 추적 프로세스 시스템 구축이 필요할 것으로 판단된다.

본원의 신생아 집단의 아미노산, 유기산 및 지방산 산화 대사이상질환의 유병률은 아미노산 대사이상질환은 25명(유병률 1:10,000), 유기산 대사이상질환은 16명(유병률 1:16,000)이었으며 지방산 산화 대사이상질환은 5명으로 유병률은 1:50,000 이었으며 전체적으로 1:5,000 유병률을 보였다. 독일의 Schulze 등¹⁰⁾이 보고한 자료에 의하면 총 검사한 신생아

들은 250,000명으로 아미노산 대사이상질환은 28명(유병률 1:9,000), 유기산 대사이상질환은 16명(유병률 1:16,000)이며 지방산 산화 대사이상질환은 12명으로 유병률은 1:21,000이었으며 전체적으로 1:4,000 유병률을 보이는 것으로 보고하였다. 미국 North Carolina주는 처음으로 탠덤매스 장비를 이용한 신생아 대사이상 선별검사 프로그램을 1997년부터 시행하였으며 2005년도까지의 결과를 Frazier DM 연구자들이 결과를 발표하였다¹¹⁾. 총 신생아 검사는 944,078건이었으며, 아미노산 대사이상질환은 62건(유병률 1:15,000), 유기산 대사이상질환은 58건(유병률 1:16,000), 지방산 산화 대사이상질환은 99건(유병률 1:10,000)으로 보고하였다. 본원, Schulze과 Frazier^{10, 11)}의 연구 결과를 보면 아미노산 및 유기산 대사이상질환별 유병률 및 3개 질환의 전체에 대한 유병률은 큰 차이가 없었다. 그러나, 지방산 산화 대사이상질환 유병률은 기관별로 차이를 보이고 있었다. 지방산 산화 대사이상질환은 현재 국내의 국가 지원 신생아 집단 선별검사법으로는 검출될 수 없으며 환아가 장기간의 금식 상태에 노출되기 전까지는 임상적으로 의심하기 어려운 특징이 있다. 또한 지방산 산화 대사이상질환은 영아급사증후군(sudden infant death syndrome)의 주요한 원인이라는 연구 결과도 보고되었다¹²⁻¹⁵⁾. 그러므로, 지방산 산화 대사이상질환에 대한 정확한 유병률을 얻기 위해서는 적극적인 검사가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

탠덤매스를 이용한 신생아 선별검사는 검체 하나로 2-4분의 분석 시간 내에 30개 이상의 질환에 대한 동시 검출이 가능하므로 매우 효율적인 검사이며, 외국에서는 이미 현재 탠덤검사를 신생아 선별 검사 프로그램으로 적용하고 있다. 국내에서도 조기 진단 및 치료가 필요한 아미노산, 유기산 및 지방산 산화 대사이상질환이 발견되고 있으며 이들 환아들에 대한 사회경제적 비용을 고려할 때 국내에서도 향후 모든 신생아들에 대한 탠덤매스 신생아 선별 검사가 국가지원 사업에 포함되어야 할 것으로 판단된다.

한글요약

목적 : 최근 여러 국가에서 빠르게 탠덤매스 신생아 선천성 대사이상질환 선별 프로그램을 채택하고 있으며 많은 질환들이 검출되고 있다. 본 기관에서는 2001년 4월부터 탠덤매스 선천성 대사이상 질환 신생아 선별 검사를 시작하였다. 연구자들은 한국에서의 탠덤매스 선천성 대사이상질환 검출

을 및 탠덤매스 유용성에 대해 평가하고자 하였다.

방법 : 2001년 4월부터 2007년 12월까지 본원에서는 탠덤 매스를 이용하여 신생아 및 고위험군에 대해 선별검사를 시행하였다. 검체로부터 아실카르티과 아미노산을 추출하여 부탄올로 유도체화시킨 후 탠덤매스에 장착하여 분석하였다. 탠덤매스 선별검사 재검, 소변 유기산 및 혈장 아미노산 검사 등을 포함한 확진 검사는 개별적으로 시행되었다.

결과 : 총 의뢰건수는 284,933건으로 신생아 251,799건 및 고위험군 33,134건이었다. 소환율은 0.4%(1158건)이었으며, 이들 중 true positive는 117건(0.04%)이었다. 아미노산 대사 이상 질환은 총 78건(25/53), 유기산 대사이상 질환은 총 27건(16/11건) 및 지방산 산화대사이상 질환은 총 12건(5/7건)으로 전체 질환에 대한 검출율은 신생아 1:5,000이었으며 전체군 1:2,000이었다.

결론 : 탠덤매스 신생아 선별검사는 조기 진단 및 치료가 필요한 많은 선천성 대사이상질환의 검출을 용이하게 해주었다. 그러므로, 반드시 모든 신생아들에 대한 국가지원 탠덤매스 선별검사 확대 적용 및 추적관리 시스템이 구축이 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.
- Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. *Pediatr Res* 1984; 18:1325-8.
- Roe CR, Millington DS, Maltby DA, Bohan TP, Kahler SG, Chalmers RA. Diagnostic and therapeutic implications of medium-chain acylcarnitines in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1985;19: 459-66.
- Chace DH, Kalas T, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003;49:1797-817.
- Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applicants of tandem mass spectrometry in newborn screening. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:427-33.
- Feuchtbaum L, Faulkner L, Verghese S. Tandem mass spectrometry program implementation challenges for state newborn screening programs: national survey of barriers and issues. *Pediatrics* 2006;117:S253-60.
- 윤혜란. 국외 선천성 대사이상 검사의 최근 동향 및 탠덤매스의 도입현황. 대한유전성대사질환 2003;3:75-85.
- Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inher Metab Dis* 2007; 30:439-44.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Newborn screening follow-up; approved guideline. CLSI document I/LA27-A. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- Schulze A, Linder M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome and implications. *Pediatrics* 2003;111:1399-406.
- Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, Koeberl DD, Weavil SD, Chaing SH, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inher Metab Dis* 2006;29:76-85.
- Rached MS, Ozand PT, Bennett MJ, Barnard JJ, Govindaraju DR, Rinaldo P. Inborn errors of metabolism diagnosed in sudden death cases by acylcarnitine analysis of postmortem bile. *Clin Chem* 1995;41:1109-14.
- Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK, et al. Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem liver of 418 cases of sudden death in the first year of life. *J Pediatr* 1998;132:924-33.
- Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF, Naylor EW. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. *Clin Chem* 2001;47:1166-82.
- Shekhawat PS, Matern D, Strauss AW. Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatr Res* 2005;57: 78R-86R.