

Tandem Mass Spectrometry를 이용한 선천성 대사이상 질환 선별검사: 2년 경험을 통한 효용성평가 및 향후 전망

독집자 의료재단

이 은 희

서 론

신생아를 대상으로 한 선천성 대사이상 질환에 대한 선별검사는 1961년 Robert Guthrie가 bacterial inhibition assay 방법으로 phenylketoruria 선별검사를 수행한 이래 계속적으로 그 종류가 증가해 오고 있고, 검사방법도 효소면역방법, 형광면역방법 등으로 발전되어져 왔다. 1990년초 부터는 tandem mass spectrometry(MS/MS)를 선천성 대사이상 질환 선별검사에 적용함으로써 선천성 대사이상 질환 선별검사에 산업혁명과 같은 획기적인 발전의 전환점이 되었다. 이 선별 검사법은 현재 빠른 속도로 확산되어 가고 있는 추세이다. 종전에는 질환마다 각각의 검사를 시행하여야 하므로 질환의 종류가 증가함에 따라 검사에 소요되는 시간도 비례적으로 증가하므로, 신속한 결과를 내야 하는 조건을 만족시키지 못하는 단점과 비례적으로 비용이 증가하는 단점이 있다. 그러나 MS/MS는 한가지 검체로 2-4분내에 여러 종류의 acylcarnitine, amino acids를 분석함으로써 해서 20가지 이상의 대사이상 질환의 여부를 검출해 낼 수 있다.

본 검사실에서는 2000년 10월에 전 세계에서 MS/MS를 이용한 선천성 대사이상 질환 검사를 가장 많이 시행하고 있는 기관(500,000건/년 이상)인 Neogen Screening사와 기술제휴를 맺고, 2001년 6월부터 MS/MS를 이용한 선천성 대사이상 질환 선별검사를 수행해 왔기에 2년간의 검사경험에 대한 결과를 정리하여 보고하고, MS/MS를 이용한 선천성 대사이상 질환 선별검사에 대한 향후 방향을 전망해 보고자 한다.

검사 방법

본 검사실에서 사용하고 있는 MS/MS는 Perkin Elmer사의 API 3000 model로서 기존의 API 2000 model보다 그 sensitivity가 높은 기종이다. 의뢰된 검체는 건조된 혈액여지로 생후 2-30일 사이였으며, 이중 98%의 검체는 생후 7일 이내였으며, 약 2%는 7일 이후의 검체였다. 검사방법은 혈액여지로부터 3 mm로 punching하여 punching된 여지를 각 well에 isotope-enriched internal standards와 함께 methanol 용액이 들어있는 96 well microtiter plate에 넣었다. 30분간 물질을 추출한 후, 추출된 용액을 second set 96 well microtiter plate에 옮겨 넣은 다음 nitrogen gas를 이용하여 추출된 solvent를 증발시켰다. 건조된 microtiter plate의 각 well에 3N butanolic HCl을 첨가하여 butyl ester 유도체를 형성시켰다. Butyl ester 유도체를 0.02% formic acid가 포함된 50% acetonitrile solution으로 재부유 시킨 후 MS/MS의 solvent flow stream내로 주입하였다. 주입된 용액내 물질은 electrospray 방식에 의해 first mass spectrometer(MS1)에서 이온화된 후 collision cell 내에서 이온들이 다시 fragmentation 과정을 거친 후 2nd mass spectrometer(MS2)에서 각각의 mass와 charge에 의해 70여개의 물질들로 분획되어진다. 각각의 분획들은 detector에서 internal standard의 농도에 비교해서 정량화되어 지게 된다.

결 과

본원의 MS/MS 검사로서 70여개의 acylcarnitine과 amino acid 분석을 분석함으로써 Table 1과 같이 26개의 대사이상질환을 검출할 수 있었다. 약 28,000개의 검체에 대해 검사를 수행하였고 소환율은 84건(0.3%)였으며, 이중 amino acid profile 이상은 50건이었으며, acylcarnitine profile 이상(organic acid 혹은 fatty acid 이상)은 34건이었다. 이상을 보인 84 검체 중 true positive는 16건(0.057%)으로, Amino acid 이상은 12건이었으며(PKU; 4, MSUD; 2, Tyrosinemia; 2, Citrullinemia; 3, Homocystinemia; 1), acylcarnitine profile에 이상을 보이는 organic acid 혹은 fatty acid 대사이상 질환은 4건(propionic aciduria; 1, MCAD; 1, LCHAD; 2)이었다. MS/MS를 이용한 Amino acid, organic acid, fatty acid에 대한 inborn error metabolic disease 26종의 검출률(combined incidence)은 1,750명 중 한 명이었다.

검사의 정확성 검증을 위해 내부정도관리와 외부정도관리를 시행하였으며, 내부정도관리는 이미 농도를 알고 있는 amino acid 혈액여지를 미국의 CDC로부터

공급받아 test 때마다 시행하였으며, acylcarnitine에 대해서는 미국의 CDC 및 Neogen으로부터 공급받아 test 때마다 사용하였다. 외부정도관리는 미국의 CDC로부터 받고 있다.

고 찰

MS/MS를 이용한 선천성 대사이상 질환에 대한 선별검사시 중요한 것은 양성자를 가려내는 cut off치의 산정이다. 본원에서는 초기에는 이러한 cut off치가 아직 우리나라에 설정되어 있지 않았으므로 세계적으로 가장 많이 검사를 시행하고 있고, 미국의 Mayo Clinic에서도 도입하여 사용하고 있는 Neogen screening사의 cut off치 및 판독 guideline(1,000,000건 이상의 검사결과를 토대로 설정됨)을 참조하여 판독하였다. 또한 미국의 CDC로부터 공급받은 정도관리용 혈액여지를 매 시험마다 사용함으로써 신뢰성 있는 정확한 검사결과를 제공하고자 하였다.

판독시 몇 개의 질환은 생후 1주 후의 reference range가 생후 1주 전과는 다르므로 재검사에 대한 guideline은 생후 1주 후와 생후 1주 이내가 달라야 false negative를 줄일 수 있다. 따라서 임상에서 출생

Table 1. Disorders Detectable by Amino Acid and Acylcarnitine Profiling Using MS/MS

No	Amino acid metabolism	Fatty acid metabolism	Organic acid metabolism
1	Argininemia	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency	Glutaric Acidemia Type I (GA-1)
2	Argininosuccinic aciduria	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency	Isovaleric Acidemia
3	Citrullinemia	Mitochondrial trifunctional protein(TFP) deficiency	3-Ketothiolase deficiency
4	Homocystinuria	Long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase(LCHAD) deficiency	3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency
5	Maple syrup urine disease	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency	3-Methylglutaconyl-CoA hydratase deficiency
6	Phenylketonuria	Carnitine-acylcarnitine translocase(CACT) deficiency	Multiple carboxylase deficiency
7	Tyrosinemia type I	Glutaric acidemia type II(GA-2; multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency)	Methylmalonic Acidemias
8	Tyrosinemia type II	2,4-Dienonyl-CoA reductase deficiency	Propionic acidemia
9		3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) lyase deficiency	
10		Carnitine palmitoyl-transferase deficiency type II(CPT-2)	

일을 기입해서 검사실로 검체를 보내는 것은 매우 중요한 일이다. 또한 false positive를 보이는 경우의 주된 원인은 신생아 중환자 혹은 1,500 g 이하의 저체중 신생아, hyperalimantation하는 경우가 많았으므로, 양성결과를 보였을 때 false positive를 배제하기 위한 방법으로 임상적으로 이에 해당되는지의 확인이 필요하다. 이러한 경우는 2주 간격으로 또한 퇴원 전에 선별검사를 실시하여야 한다.

MS/MS 검사 방법은 기존의 선별검사에 비해 판독시 단독의 분획만 보는 것이 아니고, 다른 물질과의 ratio를 함께 고려하여 판단(예를 들어 PKU 진단시 phenylalanine 뿐 아니라, Phe/Tyr ratio를 함께 봄)을 내리므로 specificity가 높고, low level까지도 검출할 수 있으므로 예민도도 높은 검사방법이라는 장점이 있다. 또한 검체 하나로 2-4분의 분석시간내에 26개 질환에 대한 동시 검출이 가능하므로 매우 효율적인 검사라 할 수 있다. 이러한 장점들 때문에 현재 외국에서도 점차적으로 MS/MS를 이용한 선천성 대사 이상 질환검사가 확산일로에 있다.

결 론

26개 질환에 대한 각각의 발생빈도(single disease incidence)는 매우 낮지만, MS/MS를 이용하여 검사를 수행한 결과 전체적인 검출률(combined incidence)은 1,750명당 1명으로 매우 높기 때문에 검사를 수행할 의미가 있다고 판단되었다. 또한 MS/MS를 이용해 검출할 수 있는 질환의 대부분이 확실한 증상이 보이지 전(presymptomatic period)에 조기 진단을 함으로써 평생 지녀야 할 장애를 막을 수 있고, 사망률, 유병률을 줄일 수 있는 질환들이기 때문에 이러한 질환의 검출은 매우 중요한 의미를 지닌다 하겠다. 또한 계속적으로 MS/MS를 이용해서 검출할 수 있는 질환이 26개 질환 이외에 glycosylation에 대한 선천성 대사 이상, Peroxisomal disorders, steroid disorder, galactosemia, lysosomal disorder 등의 적용도 시도되고 있으므로 더 많은 질환들을 한 번의 검사로 시행할 수 있게 될 전망이다.