

# タンデム質量分析計を用いた フローインジェクション法による尿中オロト酸定量法の開発

野町祥介 成田 慶 小田千恵 花井潤師 福士 勝 矢野公一

## 要 旨

オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に代表される尿素サイクル異常症疾患群において、化学的補助診断の有用な指標である尿中オロト酸をタンデム質量分析計のフローインジェクション法により定量する方法を開発した。本法は簡便な前処理と、短時間の測定による定量性の高いもので、特に治療中のオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症患者をフォローする等の目的で、尿中の当該物質の低濃度域を、高い定量性で安定して測定することが必要な場合、その有用性は高いと考えられる。

### 1. 緒 言

尿中オロト酸は、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (ornithine transcarbamylase deficiency ; OTC D)、シトルリン血症、アルギニコハク酸尿症、アルギニン血症等の尿素サイクル (図 1) 異常症疾患群の化学的補助診断における重要な生化学的指標の一つである<sup>1,2)</sup>。

札幌市衛生研究所では、調査研究「代謝異常症依頼検査 (ハイリスクスクリーニング)」<sup>3,4)</sup>において、医療機関の依頼に基づき、比色法<sup>5)</sup>および HPLC 法<sup>6-8)</sup>により尿中オロト酸の定量を実施してきた。しかし、両法とも低濃度域の定量性が低く、摂取タンパク制限等の治療を行っている対象のフォローの様に低濃度域の定量が求められる場合、精度に限界があった。

一方で、近年ではタンデム質量分析計を用いたオロト酸の定量法が試みられ、成果が報告されている<sup>9)</sup>。そこで、Rashed らの測定法に、独自に改良を加えることで、札幌衛生研究所の現有システムを活用した簡便な短時間測定法を開発したので、

その詳細を報告する。

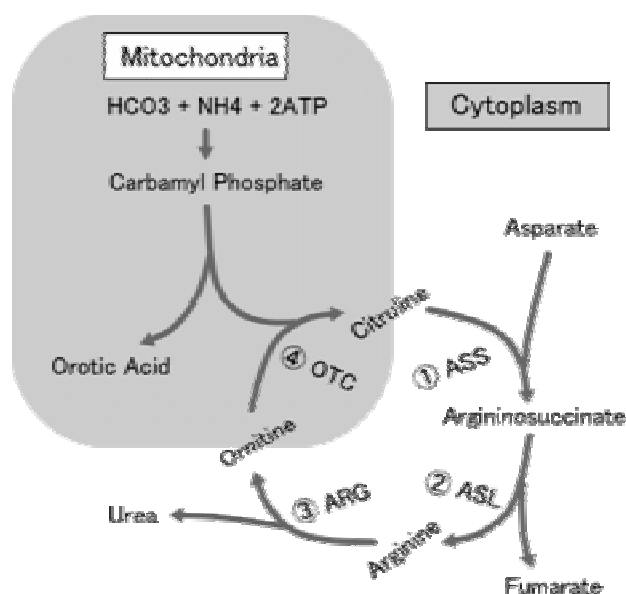


図1 尿素サイクルと関連酵素の代謝マップ

ASS; アルギニコハク酸合成酵素

ASL; アルギニコハク酸リアーゼ

ARG; アルギナーゼ

OTC; オルニチントランスカルバミラーゼ

## 2. 方法

### 2-1 前処理

前処理は、P.Muellerらの報告<sup>10)</sup>に従い、以下に示す手順で行った。

(1) 尿100 $\mu$ lにメタノール900 $\mu$ lを加え30分室温で放置

(2) 遠心ののち上澄み150 $\mu$ lを96穴マイクロプレートに移し、37 室素気流下で風乾

(3) 安定同位体標準 $1,3\text{-}^{15}\text{N}_2$  Orotic Acid ( Cambridge Isotope Laboratories ) 2 $\mu$ Mに調整したアセトニトリル：水：酢酸 (7:3:0.15) 溶液150 $\mu$ lで抽出

### 2-2 測定条件

測定は、分析システム QuattroMicro API (英 MicroMass) と送液装置 alliance-HT2795 (Waters) を使い、フローインジェクション法およびMultiple Reaction Monitoring (MRM) negativeモードにより行った。それぞれプリカーサーイオン>プロダクトイオンのm/zは、155>111 (オロト酸)、157>113 (同安定同位体標準)とした。溶離液の組成はアセトニトリル：水：酢酸 7:3:0.15 とし、Cone電圧は10V、Collisionエネルギーは18eVとした。濃度計算はMass Lynxにより濃度既知の安定同位体標準とのシグナル強度比から算出することで行った。

### 2-3 直線性の評価

濃度既知のオロト酸水溶液を調整し、本法により測定することで行った。

### 2-4 再現性の評価

アッセイ内変動係数の評価は、6.45  $\mu$ Mから645  $\mu$ Mの濃度範囲で7点に調整したオロト酸水溶液をそれぞれ連続して6回測定することで行った。アッセイ間変動係数の評価は、同じ溶液を用いて6日間それぞれ1回測定することで行った。

### 2-5 添加回収試験

1,000mg/l ( 6.41mM ) の高濃度オロト酸水溶液を調整し、これを正常プール尿に所定量添加し、3日間冷蔵放置することで調整した検討用試料を用い、測定値と理論値を比較することで行った。

### 2-6 その他

医療機関からの依頼に基づいて従来法 ( HPLC法もしくは比色法 ) によりオロト酸の測定を行った尿で、凍結保存していた尿検体を、本法により測定し、従来法の値との比較を行った。また、これと別に匿名化正常尿を用いてGC/MS法<sup>11)</sup>との測定値の比較を行った。加えて、臨床データとの整合性について血中アンモニア値と本法により得られたオロト酸の値を比較することで行った。

## 3. 結果

### 3-1 直線性

1,000 $\mu$ M以下の濃度域では良好な直線性を示した ( 図2 ) が、1,000 $\mu$ M以上の濃度域では測定値が理論値を下回り、この傾向は濃度の増加とともに低下した。

### 3-2 再現性

1,000 $\mu$ M以下の7種の濃度におけるアッセイ内変動係数及びアッセイ間変動係数を表1にまとめる。

### 3-3 添加回収試験

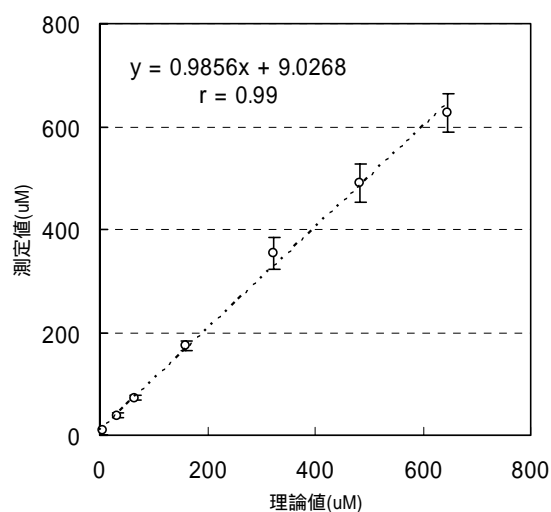
添加回収試験の結果を図3に示す。対象とした濃度域 ( 600 $\mu$ M以下 ) でおおよそ75 ~ 90%の回収率を示した。

### 3-4 血中アンモニア濃度との比較

治療中のOTCD患者の尿検体を用いて測定した尿中オロト酸値 ( クレアチニン補正值 ) と血中アンモニア値の相関の様子を図4に示す。

### 3-5 他の測定法との比較

実サンプルを用いた方法間における測定値の相関



を図5 (HPLC法、比色法)と図6 (GC/MS法)に示す。GC/MS法とは良好な相関を示したが、HPLC法、比色法とは測定値に開きがあった。

図2 標準オロト酸水溶液による定量性検討結果 (誤差はアッセイ間標準偏差 n=6 による)

表 再現性試験の結果

理論値 ( $\mu\text{M}$ )	アッセイ内 (n=6)			アッセイ間 (n=6)		
	平均値	SD	CV(%)	平均値	SD	CV(%)
6.45	8.32	0.83	10.0	8.14	0.99	12.1
32.3	36.1	5.91	16.4	38.3	4.58	12.0
64.5	69.7	2.40	3.44	72.3	4.92	6.80
161	171	8.85	5.19	174	8.60	4.93
323	351	18.93	5.39	354	31.5	8.92
484	501	32.12	6.41	489	36.6	7.48
645	652	9.56	1.47	628	37.2	5.92

SD: standard deviation, CV: coefficient variation

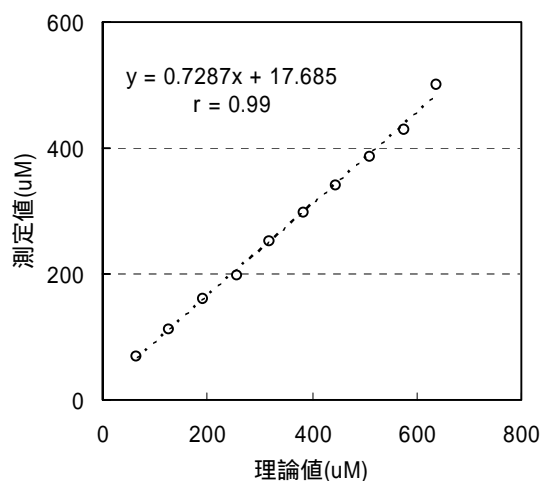


図3 正常尿へのオロト酸添加回収試験結果

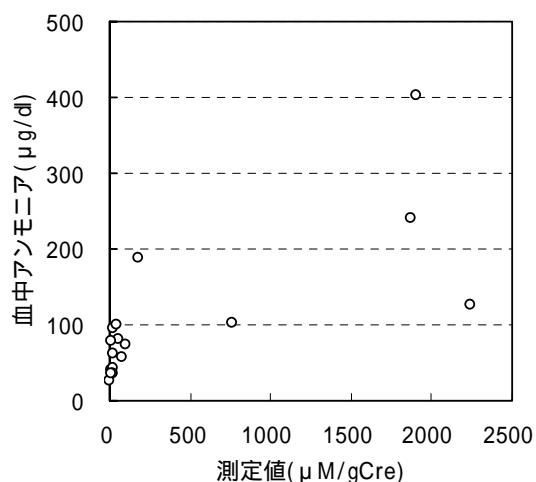


図4 尿中オロト酸値と血中アンモニア値の比較

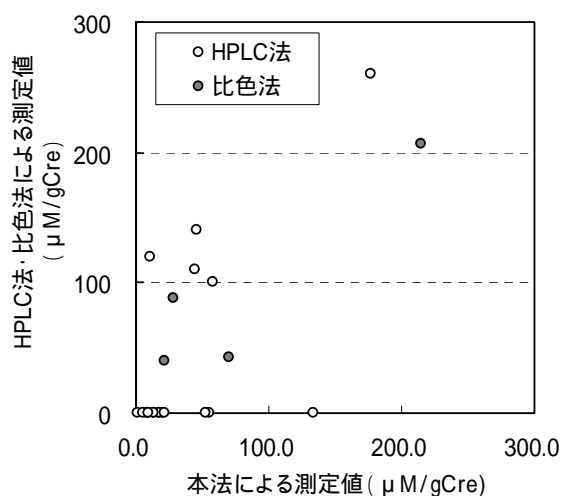


図5 HPLC法及び比色法との測定値の比較

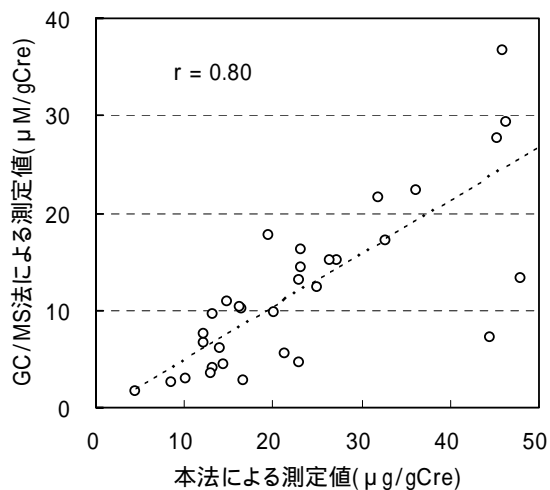


図6 GC/MS法との測定値の比較

#### 4. 考察

札幌市衛生研究所では医療機関の依頼に基づいて、血中アンモニア高値等から尿素サイクル異常症が疑われる児を対象に、尿中オロト酸の測定を実施してきた。尿中オロト酸値は尿素サイクル異常症の補助診断に有用なばかりでなく、OTCDの場合、タンパク制限食の治療効果の指標として、対象のフォローに有用である。また、同病患者や保因者らの残存酵素活性を推定する折に行なわれるアロプリノール負荷試験の際も経時変化をふまえた低濃度域の定量は重要である<sup>2)</sup>。更には2005年度から札幌市が開始した試験研究「タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング<sup>12)</sup>」においても、対象疾患であるアルギニノコハク酸尿症、アルギナーゼ欠損症、アルギニン血症が疑われた場合、尿中オロト酸値は補助診断に寄与するものであり、加えて、ウリジン1リン酸合成酵素欠損症や大球性淡色性巨赤芽球性貧血においても重要な生化学的指標と考えられる。

しかし、従来私たちが行ってきた比色法では定量性が低く、HPLC法も挟雑ピークの影響を受けやすい等、ともに低濃度域のオロト酸の安定した定量には限界があった。

検討にあたっては、Rashedらの方法<sup>7)</sup>(原法)を参考とした。原法では尿の前処理にろ過を要し、加えて、分析システムはカラムSupelco ABZ-plus column [3.3cm×2.1mm (i.d.); 3- $\mu$ m particles]を用いたものであったため、前処理の手順が多く、測定にも時間を要した。そこで、私たちはより簡便な測定系の確立を目指し、フローインジェクションによる連続分析が可能なオロト酸単独の測定系を開発することを主眼とした。

本法における定量性は、オロト酸濃度1,000 $\mu$ M以下の領域で安定した直線性を示し、繰り返し測定による誤差も微小な範囲内で収まった。一方で濃度が1,000 $\mu$ M以上の領域では、測定値が理論値に比して頭打ちに低くなる傾向が認められた。このため良好な定量性が確保される領域は、1,000 $\mu$ M以下と特定でき

た。そのため、実際の測定においては、測定上限を超える高濃度検体の場合には、希釈により定量範囲内に納めるか、もしくは事前にクレアチニンを測定し、その濃度に応じて希釈するなどの対応をとる必要がある。

アッセイ内変動係数、アッセイ間変動係数ともに16%以下で、十分な再現性が確認できた。

添加回収試験では、およそ75-90%の回収率が得られた。この回収率について、オロト酸水溶液による直線性の評価試験に際しては、ほぼ理論値に近い値が得られていたことと合わせるで考えると、添加回収試験の回収率が100%とならなかったのは、尿内に含まれる他の成分によるマトリクス効果の影響であると考えられる<sup>13)</sup>。しかし、本法の回収率は安定した定量系として十分なものであると思われる。

治療下にあるOTCD欠損症の患者においては、尿中へのオロト酸排泄量は血中アンモニア値の増減にリンクしていると考えられることから、血中アンモニアと尿中オロト酸測定値の比較を行った結果、おおむね臨床データと合致した結果が得られた。なお、低値域で相関が乏しくなるのは、血中アンモニアの増減と尿中オロト酸の増減にはタイムラグがあること、他の異化経路が存在すること等に起因するため、必ずしもただちに矛盾となるものではないと考える。

他の測定法との比較では、比色法、HPLC法の各法間とも測定値の相関は乏しかったが、GC/MSによる測定値とは十分な相関が認められた。このことから、本法は従来法であるHPLC法や比色法と比較して定量性が高く、ことに低濃度域の定量に優れていると考えられる。

また、今回、GC/MS法も良好な定量性を持っていることが認められたが、GC/MS法による場合、トリシリルメチル化など煩雑な前処理が必要な点がデメリットと言える。本法の場合、前処理がきわめて簡便なことに加え、原法で使用していたろ過のためのフィルター及びカラム等の消耗品を用いる必要がな

い。そのため、ランニングコストも1件あたり10円以下と廉価である。また、カラムを用いる必要がないことは、現在「タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニング」で用いている分析器を、溶離液を置換することのみで本法による分析に用いることができるため、当所の通常の検査に大きな負荷を与えることなく運用できる点も大きな利点である。

一方、従来法であるHPLC法では、オロト酸と同時にウラシルを定量することが可能であった<sup>6-8)</sup>が、本法ではオロト酸のみの濃度測定に限られる。タンデム質量分析計による尿中ウラシルの定量については報告がある<sup>14)</sup>が、当所においてウラシル測定系を組む必要性があるかどうかの検討を含めて今後の課題としたい。

## 5. 結 語

有用性の高い生化学的臨床指標の一つである尿中オロト酸について、タンデム質量分析計を用いたフローインジェクション法による簡便で安定性の高い測定方法を確立した。今後は、当該検査の方法を、従来法（HPLC法、比色法）から本法に移行した上で、ウラシル同時測定の必要性の有無、治療例のフォローアップやアロプリノール負荷試験の評価等、検査目的と照らしながら、本法を有効な形で運用していくことが望ましい。

## 6. 文 献

- 1) Koch R. Introduction to urea cycle symposium, *Pediatrics*, 68, 271-272, 1981.
- 2) Scaglia F, Zheng Q, William E et al. An integrated approach to the diagnosis and prospective management of partial ornithine transcarbamylase deficiency, *pediatrics*, 109, 150-152, 2002.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Harris ML, Oberholzer VG. Conditions affecting the colorimetry of orotic acid and orotidine in urine, *Clin Chem*, 26, 473-479, 1980.
- 6) Ohba S, Kidouchi K, Katoh T. Automated determination of orotic acid, uracil and pseudouridine in urine by high-performance liquid chromatography with column switching, *Journal of Chromatography*, 568, 325-332, 1991.
- 7) Kidouchi K, Nakamura C, Katoh T, Kibe T, Ohba S, Wada Y. Automated quantitative analysis for orotidine and uridine / thymine in urine by high-performance liquid chromatography with column switching, *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII, Part B* 31-34, 1991.
- 8) Ikeda M, Sumi S, Ohba K et al. Screening for pyrimidine metabolism disorders using dried filter-paper urine samples: Methods development and a pilot study in Nagoya city, Japan, *Tohoku J, Exp. Med*, 190, 23-32, 2000.
- 9) Rashed MS, Jacob M, AL-Amoudi M et al. Rapid determination of orotic acid in urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Clin Chem*, 49, 499-501, 2003.
- 10) Mueller P, Schulze A, Schindler I, Ethofer T, Buehrdel B, Ceglarek U. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults, *Clin Chem Acta* 327, 47-57, 2003.
- 11) McCann MT, Thompson MM, Gueron JC, Tuchman M. Quantification of orotic acid in dried filter-paper urine samples by stable isotope dilution. *Clin Chem* 41: 739-743, 1995.
- 12) 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.

13) Annesley TM. Methanol-associated matrix effects in electrospray ionization tandem mass spectrometry, Clin Chem, 53, 1827-1834, 2007.

14) Lenthe HV, Kuilenburg AV, Ito T et al. Defects

in pyrimidine degradation Identified by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of urine specimens or urine-soaked filter paper strips, Clin Chem, 46, 1916-1922, 2000.

## Development of a Multiple Reaction Monitoring Quantitative Method to Determine Urinary Concentration of Urinary Orotic Acid Using Tandem Mass Spectrometry

Shosuke Nomachi, Kei Narita, Chie Oda, Junji Hanai, Masaru Fukushi, Koichi Yano

Urinary orotic acid is an important biochemical marker for ornithine carbamylase deficiency and the other urea cycle disorders (UCD). In addition to auxiliary diagnosis, urinary orotic acid is useful in cases which to following up the patients with UCD under the treatment. In such cases, it is also important to know lower concentration of urinary orotic acids. However our previous method, it was poor to determine the concentration in lower range.

To improve our data, we developed a new quantitative method using tandem mass spectrometry. The method is simple and stable enough to measure urinary orotic acid quantitatively comparing to other previous methods. So we conclude that our method is useful, especially in the cases that we need to determine lower concentration of urinary orotic acids.