

## 有機酸代謝異常症の2カラムキャピラリーガスクロマトグラフィーによるハイリスクスクリーニング法について

山口 昭弘 三上 篤 水嶋 好清 福士 勝  
阿部 克己 菊地由生子 高杉 信男 楠 祐一\*

### 要 旨

医療機関にて、けいれん、意識障害、アシドーシスなどの臨床症状から、有機酸代謝異常症が少しでも疑われた場合に、2カラムガスクロマトグラフィー法により、速やかに尿中有機酸代謝物を測定し、これら患児の早期発見を行う、ハイリスクスクリーニング法を検討した。ガスクロマトグラフィーの測定は、一回のインジェクションで極性の異なる2本のキャピラリーカラムによる分析、データ処理が可能なシステムで行い、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、高乳酸血症およびジカルボン酸尿症患児試料の測定の結果、2カラムGC分析のみで、これら患児の検出、診断は、十分可能であった。これまでに、21例のハイリスク児に対してスクリーニングを行い、高乳酸血症1例が検出されている。

### 1. 緒 言

有機酸代謝異常症の多くは、新生児期に嘔吐、けいれん、意識障害などの、疾患に非特異的な症状で発症し、予後不良あるいは致死的な経過をたどるため、できるだけ早期に発見、診断する必要がある。診断法としては、Tanakaら<sup>1)</sup>が、ガスクロマトグラフィー(GC)およびガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)を用いた尿中異常有機酸代謝物の測定により、イソ吉草酸血症の診断に成功して以来、GC、GC-MSの有用性が注目され、現在では50種以上の有機酸代謝異常症の診断が可能となっている<sup>2)</sup>。また、我国の疫学調査の結果では、限られた調査機関による集計にも係わらず、発生頻度は、約100,000人に1人<sup>3)</sup>、またLehnertら<sup>4)</sup>の7年間のスクリーニング結果からも10,000~50,000人に1人と実際には、かなり頻度の高い先天性代謝異常症であることが分かってきている。

有機酸代謝異常症のスクリーニングに関しては、障害部位の多様性に対応できる簡便、安価かつ大量

検体処理が可能なスクリーニング方法が存在しないことから、一般新生児を対象としたマススクリーニングは不可能であり、臨床症状から、疑いもたれる患児に対して、GC、GC-MSを用いて尿中有機酸代謝物を測定する、ハイリスクスクリーニングの形で、いくつかの施設で行われている。使用装置として、GC単独の場合、通常の検査室レベルで容易に利用できる利点がある反面、保持時間のみを指標とした多成分分析のため、近接ピークの同定に十分な注意を払う必要があり、データ解析に限界が存在する場合がある。一方、GC-MSを用いれば、保持時間に加え、マススペクトルによる確実なピークの同定が可能であるのと引換に、操作、保守管理面での繁雑さと、非常に高価な設備投資を行う必要がある。このような理由から、有機酸代謝異常症のスクリーニングは、GC-MSを有する限られた施設でのみ行われているのが現状であるが、1982年にTanakaら<sup>5)</sup>は、2本の極性の異なるカラムを用い、メチレンユニットを保持時間の指標とした、GCの

\*旭川医科大学小児科学教室

みによる尿中有機酸代謝物の同定法を開発し、多くの有機酸代謝異常症が、GC-MSを用いなくとも検出、診断が可能であることを報告している。一方、近年では、従来のパックドカラムに代わり、分離能の格段に優れたキャピラリーカラムの開発、普及によりGC多成分分析の性能が著しく向上してきている。これらのことをふまえ、我々は、新生児先天性代謝異常症スクリーニング施設として、できるだけ早期に有機酸代謝異常症を検出、治療に結び付けることを第一の目的に、2カラムキャピラリーGC法によるハイリスクスクリーニングの信頼性、有用性についての検討を行った。

## 2. 方 法

### 2-1 試 薬

有機酸および関連化合物の標準品47品目を保持時間確認のため用いた。また、内部標準物質としてheptadecanoic acid (HD) および3-hydroxymyristic acid (3HM)を用い、それぞれ200 $\mu$ g/ml濃度のエタノール溶液を調製した。また、Oxime-TMS化には、NH<sub>2</sub>OH $\cdot$ HClおよびN,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA)を用いた。

### 2-2 試 料

メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、高乳酸血症、ケトーシス型および非ケトーシス型ジカルボン酸尿症患児尿5検体、正常コントロール小児尿35検体、医療機関よりハイリスクスクリーニング依頼のあった患児尿21検体を用いた。

### 2-3 装置および分析条件

GC装置は日立G-3000型を用い、一つの注入口から、3方ジョイント(ガスクロ工業製、Chromfit Y Splitter)で2本のOV-1, OV-17相当のキャピラリーカラム(ガスクロ工業製 Neutra Bond-1; 0.25mm $\times$ 25m, Quadrex製 007 series bonded OV 17; 0.25mm $\times$ 25m)に分岐し、それぞれFID検出器により測定されたシグナルを、2チャンネル

のデータ処理装置(SIC製 Labchart 180)により解析、ピークの同定を行う。GC測定条件は、キャリアーガスにHeを用い、カラム入り口圧1.6 kg/cm<sup>2</sup>、注入口、検出器温度は300 $^{\circ}$ Cとし、カラム温度、80 $^{\circ}$ Cで2分間保持後、280 $^{\circ}$ Cまで毎分6 $^{\circ}$ Cの昇温分析で行い、Oxime-TMS化試料2 $\mu$ lを、split比1/100で注入する(1本のカラムへの注入量としてはそれぞれ、1 $\mu$ l)。

### 2-4 操 作

有機酸化合物のOxime-TMS化は常法に倣い<sup>5)</sup>、以下に示す操作で行った。生尿または10倍希釈尿50 $\mu$ lを用いてHanaiら<sup>6)</sup>の方法(Jaffé反応)によりクレアチニンを測定し、100 $\mu$ gクレアチニン相当の尿を10ml遠心管にとる。内部標準溶液40 $\mu$ lを加え全量を1mlとした後、10N NaOH 100 $\mu$ l, 7.5% NH<sub>2</sub>OH $\cdot$ HCl 200 $\mu$ lを加え、60 $^{\circ}$ C, 30分間反応させ、ケトン基の保護のためoxime化を行う。Oxime化を行わない場合は、NH<sub>2</sub>OH $\cdot$ HClをH<sub>2</sub>Oで置換し、60 $^{\circ}$ Cの反応を省略した。次に、6N HCl 200 $\mu$ lでpHを1以下とし、diethyl ether 4.5mlで2回、ethyl acetate 4.5mlで1回、それぞれ2分間振とうし、抽出を行う。有機溶媒層を、無水H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>5gの入った30ml共栓付三角フラスコに取り、1時間放置後、10ml遠心管に移す。遠心エバポレーター(EYELA製 CVE-100 D型)を用いて約1mlに濃縮後、1.5mlのバイアル瓶に移し、N<sub>2</sub>気流下(ガスクロ工業製 Silli-Vap)完全に蒸発乾固し、BSTFA 75 $\mu$ lを加え60 $^{\circ}$ C, 1時間反応させTMS化を行う。

## 3. 結 果

### 3-1 保持時間の再現性

保持時間の再現性を調べたところ、G-3000に標準装備のSplit/Splitless用のキャリアーガス調圧器を用いた場合、ピークの同定に影響を及ぼす保持時間の変動が認められたため、通常のマスフロー調圧器に交換したところ、保持時間の変動はほとんどな

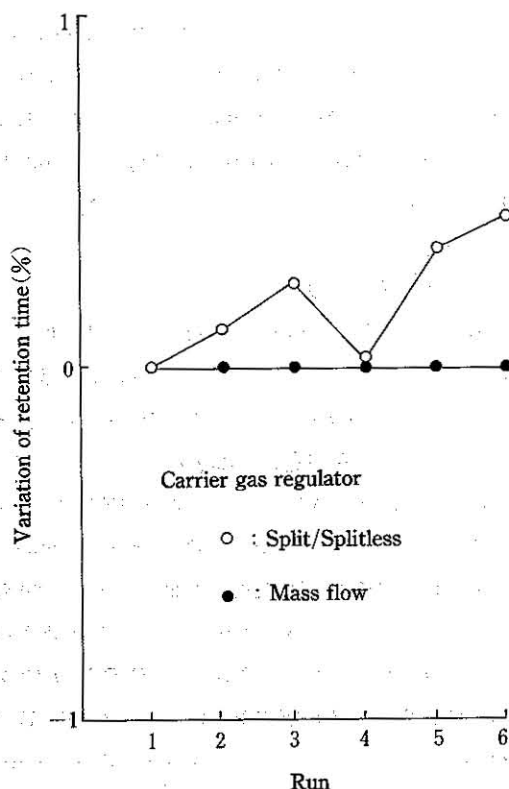


Fig 1. Effect of regulator on variation of retention time  
 Column: OV-1  
 Sample: C20 hydrocarbon (RT25 7min)

く、安定した測定が可能となった (図1)。

### 3-2 同定テーブルの作製

標準物質を用いて、保持時間および定量用換算係数を求めた。異常代謝産物の多くは、標準品が入手できないものであり、これらについては、Tanakaら<sup>5)</sup>のメチレンユニットの値を参考に、患者試料の測定から保持時間を求めた。

### 3-3 正常尿の測定結果

正常小児 (3カ月から12歳) 35例の測定結果をもとに正常値を求めたが、正常尿の主なピークとしては lactate, pyruvate, 3-OH-butyrate, 4-OH-phenylacetate, 2-oxo-glutarate, citrate,

isocitrate などであった (図2)。

### 3-4 患者試料の測定結果

患者試料のクロマトグラムを図3~7に、各疾患の診断の指標となる主な異常ピークを、以下に示した。

(1) メチルマロン酸尿症 (B<sub>12</sub>吸収障害)

methylmalonate, methylcitrate

(2) プロピオン酸血症 (Propionyl-CoA carboxylase 欠損症)

3-OH-propionate, propionylglycine, tiglylglycine, methylcitrate

(3) 高乳酸血症 (電子伝達系 complex I 欠損症)

lactate, pyruvate

(4) 非ケトーシス型ジカルボン酸尿症 (中鎖 Acyl-CoA 脱水素酵素欠損症)

glutarate, adipate, pimeraate, suberate, sebacate, 3-OH-sebacate

(5) ケトーシス型ジカルボン酸尿症 (低栄養状態)

3-OH-butyrate, 3-OH-isobutyrate, acetoacetate, glutarate, adipate, pimeraate, suberate, sebacate, 3-OH-sebacate

### 3-5 ハイリクススクリーニング結果

主に札幌市内の7カ所の医療機関にて、1990年4~9月の半年間の間に、嘔吐、発育不良、精神発達遅延あるいはアシドーシスなどにより、有機酸代謝異常症が疑われた。生後1日から11歳の患児21例に対し、ハイリクススクリーニングを行った結果、高乳酸血症1例 (生後1日) が検出された。その他、特定の有機酸代謝異常症を示すものではないが、クロマトグラム上の異常プロファイルとして、2-oxo-glutarate 高値例 (正常の約20倍)、低栄養状態によるケトーシス型ジカルボン酸尿症2例および抗てんかん薬 valproate 代謝物の認められた例が5例であった。

## 4. 考 察

先天性代謝異常症の治療法の開発にあたっては、

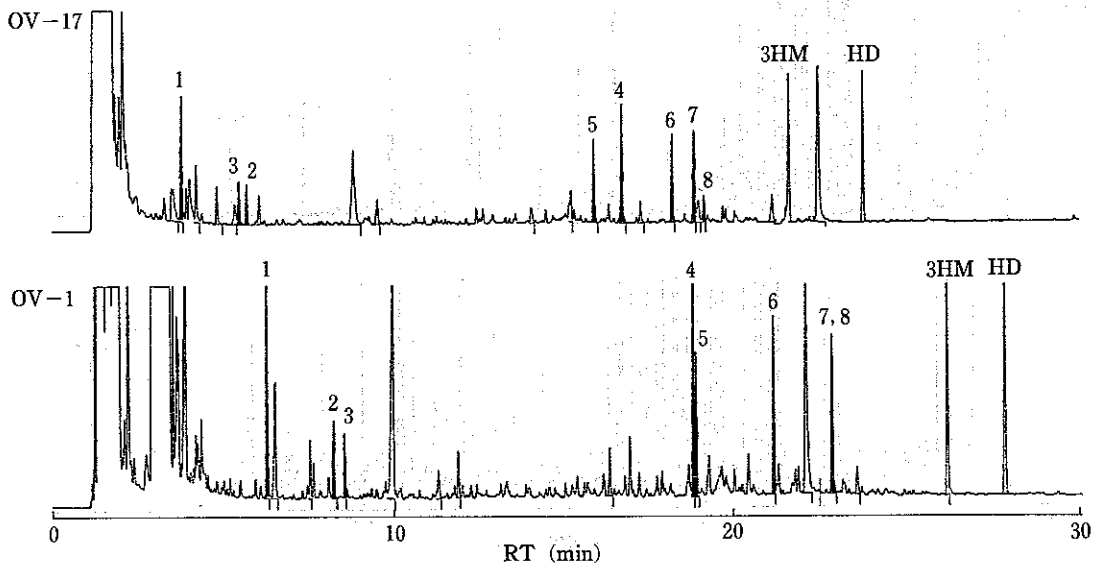


Fig.2. Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a normal infant.

1 : lactate, 2 : pyruvate, 3 : 3-OH-butyrate, 4 : 4-OH-phenylacetate,  
5 : 2-oxo-glutarate, 6 : cis-aconitate, 7 : citrate, 8 : isocitrate

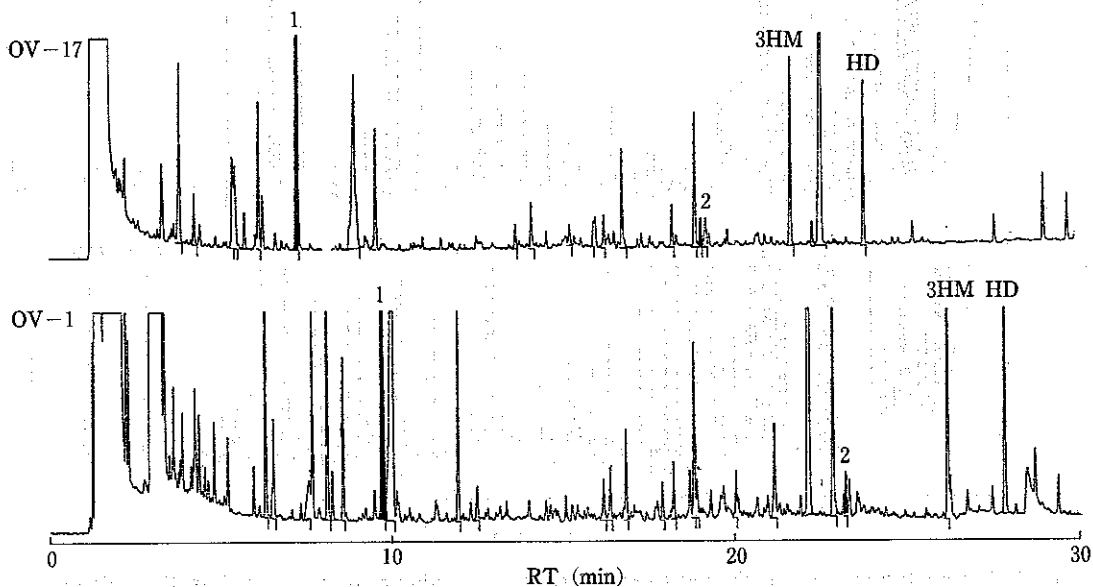


Fig.3 Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient with methylmalonic acidemia.

1 : methylmalonate, 2 : methylcitrate

非可逆的な障害をきたす以前に、疾患をできるだけ早期に、しかも正確に診断する必要がある。有機酸代謝異常症の多くは、現在、完全な治療法が確立さ

れてはいないが、近年の、GC-MSによる尿中有機酸代謝物測定法の開発、発展により、早期発見、診断が可能となってきたことから、治療法の面でも

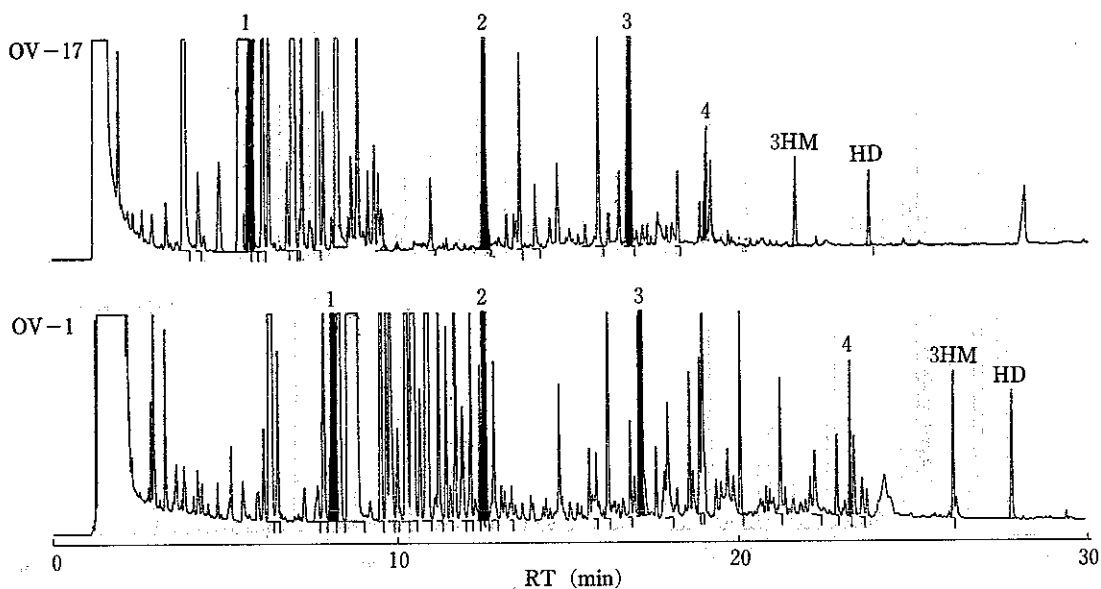


Fig.4. Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient with propionic acidemia.  
 1 : 3-OH-propionate, 2 : propionylglycine, 3 : tiglylglycine, 4 : methylcitrate

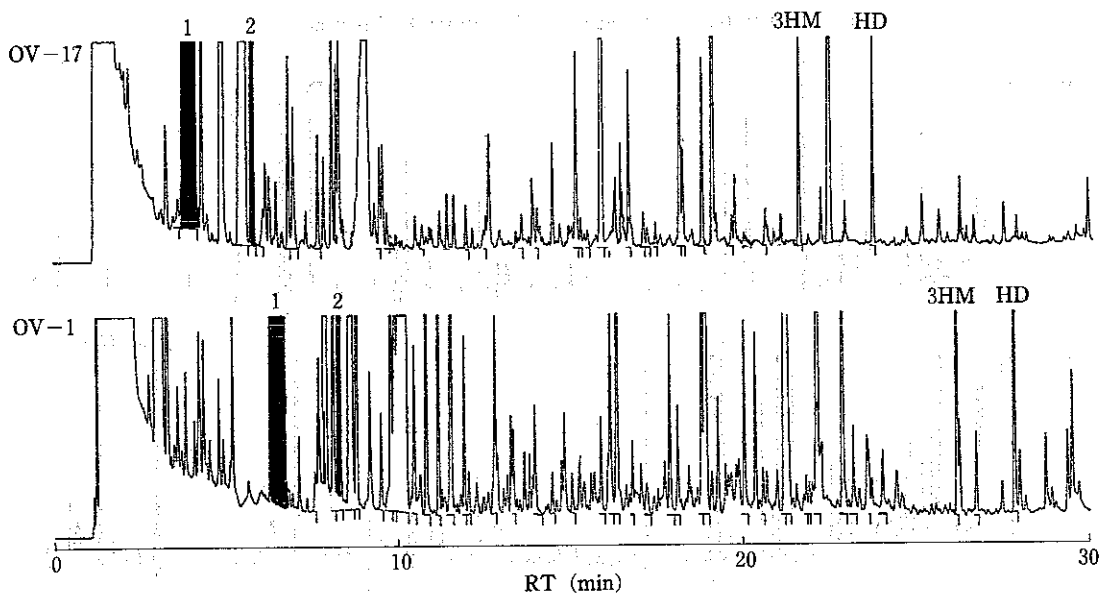


Fig.5. Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient with lactic acidemia.  
 1 : lactate, 2 : pyruvate

今後、新しい展開が期待されている。我々も、新生児先天性代謝異常症スクリーニング施設として、有機酸代謝異常症患児の早期発見に寄与することを目的に、設備投資、保守管理の容易な2カラムGC法

を検討したわけである。

測定に用いた、GC装置、汎用タイプのキャピラリー専用G-3000型は、方法で述べた装置構成により、1度の試料注入により、2カラムでの高分解

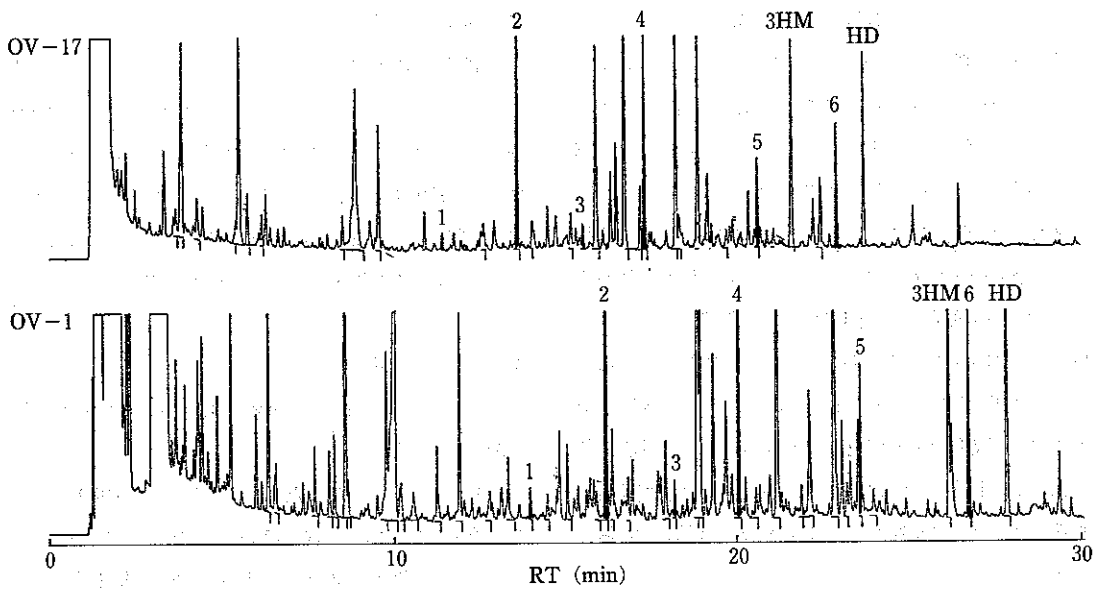


Fig. 6. Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient with nonketotic dicarboxylic acidemia  
 1 · glutarate, 2 · adipate, 3 · pimelate, 4 · suberate, 5 · sebacate, 6 · 3-OH-sebacate

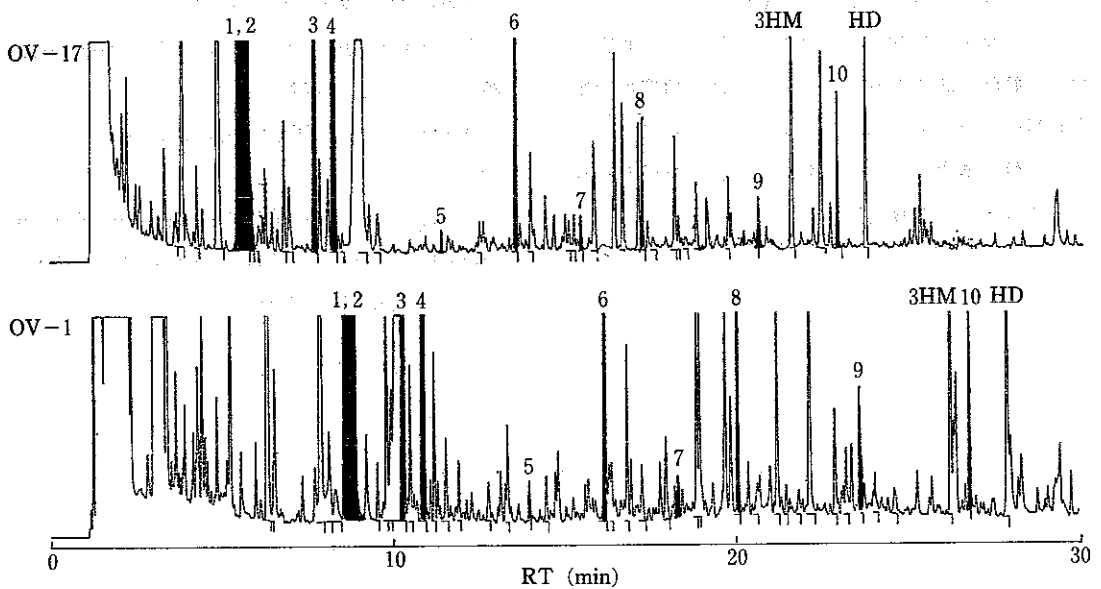


Fig. 7. Chromatogram of organic acids extracted from the urine of a patient with ketoic dicarboxylic acidemia.  
 1 · 3-OH-butyrate, 2 · 3-OH-isobutyrate, 3, 4 · acetoacetate, 5 · glutarate, 6 · adipate,  
 7 · pimelate, 8 · suberate, 9 · sebacate, 10 · 3-OH-sebacate

能同時測定が可能であり、理想的な2カラムGC分析のシステムと言える。しかし、標準装備のキャリアーガス調圧器では、保持時間の再現性に乏しく、

マスフロー調圧器に変更する必要がある点は(図1)、ピーク同定において重大な問題であり、注意が必要である。

本報で測定した患者試料5例の解析においては、標準物質の測定から求めた保持時間およびTanakaら<sup>5)</sup>の作製した163種の有機酸関連化合物のメチレンユニット表を用いることにより、容易にしかも確実に診断可能であった(図3~7)。

また、ハイリスクスクリーニングとしては、開始以来、わずか半年であるが、21例の対象患児の中から、高乳酸血症が生後1日の尿で発見されており、以前から指摘されているように<sup>3)</sup>、非常に発生頻度の高い疾患であることが分かる。しかし、高乳酸血症をきたす酵素障害部位は多岐にわたり<sup>7)</sup> GCあるいはGC-MSによっても、これらの鑑別は困難であることから、診断法としての限界を認識しておく必要がある。

今回、検討した患児は、数多く知られている有機酸代謝異常症の極一部であるが、これまでの蓄積データを参考にすれば、GC-MSにより診断されている大部分の疾患を、2カラムGCのみの測定で検出、診断可能であると思われ、今後、他疾患の患者試料の測定およびハイリスク児に対するスクリーニング数を増やし、さらに本システムの有用性を確認して行きたいと考える。

## 5. 結 語

有機酸代謝異常症のハイリスクスクリーニング法として、2カラムキャピラリーGC法による尿中有機酸代謝物の測定を検討した結果、代表的な疾患の検出、診断は十分に可能であり、これまでスクリーニングを行った21例のハイリスク児の中から、実際に1例の高乳酸血症の早期発見に成功した。

## 6. 文 献

- 1) Tanaka, K., et al : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **56**, 236-242, 1966.
- 2) 松本 勇 : 代謝, **26**(4), 81-94, 1989.
- 3) 多田啓也 : 厚生省心身障害研究「マススクリーニングに関する研究」昭和59年度研究報告書, 68-71, 1984.
- 4) Lehnert, W. and Niederhoff, H. : Eur. J. Pediatr., **142**, 208-210, 1984.
- 5) Tanaka, K. and Hine, D. G. : J. Chromatogr., **239**, 301-322, 1982.
- 6) Hanai, J., et al : Clin. Chem., **33**, 2043-2046, 1987.
- 7) Scriver, C. R., et al : The Metabolic Basis of Inherited Disease (Sixth Ed.), 869-888, McGraw-Hill, inc, 1989.

## Selective Screening for Organic Acidemia by Double Column Capillary Gas Chromatography

Akihiro Yamaguchi, Atsushi Mikami, Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi,  
Katsumi Abe, Yuko Kikuchi, Nobuo Takasugi and Tomoichi Kusunoki\*

### ABSTRACT

Selective screening for infants with acute illness suspecting organic acidemia was studied by gas chromatography (GC) involved double capillary column analysis with single injection. This GC system with high-efficiency resolution of urine metabolites showed its usefulness for successful diagnosis of patients with methylmalonic acidemia, propionic acidemia, lactic acidemia and dicarboxylic acidemia. We have screened 21 high-risk patients and detected one lactic acidemia at the first day of life.

---

\*Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College