

10・5 胎児ニーマン・ピック病肝から得られたスフィンゴミエリン のGC-MS分析

東北大学医学部

多田啓也

研究目的

ニーマン・ピック病(NPD)は sphingomyelinase の欠損により、全身臓器に sphingomyelin の蓄積する先天性代謝異常症である、吾々は出生前に酵素学的に診断した胎児NPDの肝において sphingomyelin の著明な増加を認めた、胎児NPD肝に蓄積した sphingomyelin の分子構造を明らかにする目的でガスクロマトグラフィー・マス・スペクトロメトリー(GC-MS)を用い分析を行った。

研究方法

胎生第17週目に経腹的に羊水穿刺を行い、得られた培養羊水細胞の sphingomyelinase 活性の測定を同位原素ラベルの sphingomyelin を用いて測定した、その結果著明な sphingomyelinase 活性の低下を認め胎児をNPDと診断した、両親の希望により胎生20週目に人工妊娠中絶を行った、この胎児と同時期の対照胎児について肝および脳の脂質分析を行った結果、胎児NPDの肝には対照に比し sphingomyelin の著明な増加が認められた。

sphingomyelin の分子種構造の解析は sphingomyelin をホスホリパーゼCにより酵素的に加水分解を行い、ceramide の分離抽出を行った。ホスホリパーゼCによる水解は Samuelsson らの方法に従い、sphingomyelin 約10mg を1.0ml の0.1M-Tris 緩衝液 pH 7.4 (0.03M CaCl₂ を含む) 5.0ml の diethylether 及び Clostridium welchii (Sigma) のホスホリパーゼC (1mg) を加えて、30℃、6~7時間強く振盪しつつ水解を行った。反応生成物は TLC により sphingomyelin が完全に水解されたことを確認した後、生成した ceramide を TLC plate より回収した。さらに得られた ceramide を pyridine 存在下で hexamethyldisilaz-

ane, trimethylchlorosilane 中で TMS 化し, ceramide の TMS 誘導体を chloroform で抽出し, 濃縮乾固後, 一定量の hexane に溶かして GC-MS による分析に用いた。

GC-MS は日立 RMU-6 MG 型装置で行い, GC カラム温度 250 ~ 300 °C (50 cm × 3 mm φ, 2% OV-17 カラム使用), イオン化電圧 20 eV, 加速電圧 3.2 kV, イオン源温度 180 °C で行った。

結 果 と 考 察

胎児肝 Sphingomyelin から得られる ceramide 分子種の TMS 誘導体を GC により分析すると control 及び NPD 胎児の ceramide は脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせにより, 約 7 つの主要ピークを分離した。それぞれのピークを GC-MS により解析すると, d18-14, d18-16, d18-18, d18-20, d18-22, d18-24, 及び d18-26 (各々 LCB の炭素数及び脂肪酸の炭素数を示す) が主成分で, その他の量の炭素数の異なる同族体からなる分子種であることが見出された。一般に, これらの ceramide 中には C_6 脂肪酸を含む分子種が最も多量に含まれるが, control 胎児 sphingomyelin ceramide には C_{14} 脂肪酸を含む分子種が多く, 約 20% を占める点が大きな特徴である。これらの TMS-ceramide の分子種構造の解析は, Samuelsen らの報告に従い, 分子量は M^+ , $M-15$, $M-90$ 及び $M-103$ から推測した。又脂肪酸部分の解析は $M-a$, $M-(a+89)$ 及び $M-(a-73)$ イオンより, 一方長鎖塩基部分の解析は $M-d$ 及び $M-(b+1)$ イオン等により行い, それぞれ $C_{14}:0$, $C_{16}:0$, $C_{18}:0$, $C_{20}:0$, $C_{22}:0$, $C_{24}:0$, 及び $C_{26}:0$ 脂肪酸を含むこと, 又いずれの分子種も長鎖塩基は $C_{18}:1$ を主成分とするが, $C_{18}:2$ 及び $C_{18}:0$ ($C_{16}:1$) LCB を少量ずつ含むことが明らかになった。

以上の結果をまとめて, NPD 及び control 胎児肝 sphingomyelin ceramide 分子種組成を Table 1 に示すと, NPD 及び control 両者の間に明らかな差 (C_{14} , C_{26} の減少, C_{16} , C_{18} の増量) があることが認められた。

要 約

羊水診断の結果、得られたニーマン・ピック病胎児の肝について蓄積した sphingomyelin の分子構造を GC - MS を用い分析した結果、対照胎児肝と比較し NPD 胎児肝の sphingomyelin ceramide の分子種組成に明らかな差異 (C₁₄, C₂₆ の減少, C₁₆, C₁₈ の増量) が見出された。

表 1

Ceramide molecular species composition of sphingomyelin from normal and Niemann-Pick liver

LCB	Fatty acid	Niemann-Pick	Control
d18:1 (18:2)	14:0	3.1	19.4
"	16:0	37.9	25.2
"	18:0	18.6	9.9
"	20:0	6.3	8.0
"	22:0	14.6	16.7
"	22:1	18.7	16.7
"	24:1	0.8	4.1
"	26:1		

↓
検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります
↓

研究目的

ニーマン・ピック病(NPD)は sphingomyelinase の欠損により,全身臓器に sphingomyelin の蓄積する先天性代謝異常症である,吾々は出生前に酵素学的に診断した胎児 NPD の肝において sphingomyelin の著明な増加を認めた,胎児 NPD 肝に蓄積した sphingomyelin の分子構造を明らかにする目的でガスクロマトグラフィー・マス・スペクトロメトリー(GC-MS)を用い分析を行った。