

# GC/MS による精密・多項目 2次スクリーニングと応用例

研究協力者 松本 勇

共同研究者 久原とみ子 新家敏弘 井上義人

松本雅裕 大倉隆司

(金沢医科大学人類遺伝学研究所生化学部門)

## 1. 序

イソ吉草酸血症が Tanaka らによって1966年に発見されて以来、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) が有機酸代謝異常症の研究や診断に非常に有用な分析機器として用いられるようになり、Jellum らのガスクロマトグラフィー質量分析計—コンピュータ (GC-MS-COM) システムの積極的な応用に始まって、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、ピログルタミン酸血症などが相次いで発見され、GC/MS 分析が導入された1966年以前には7種類しか知られていなかった先天性有機酸代謝異常症が、1980年には45種類も知られるようになった。

厚生省の新生児スクリーニングが開始された同じ年の昭和52年4月から、われわれは GC-MS-COM システムを用いて先天性有機酸代謝異常症とアミノ酸代謝異常症の精密・多項目スクリーニングを開始した。当初22疾患を対象として発足したが、その後研究を重ねて順次診断対象の疾患数を増やし、昭和58年4月から100疾患についてスクリーニングを実施してきて、昭和61年2月末日までに47疾患、271症例の化学診断に成功した。

このように、従来その鑑別診断が不可能であった疾患群の中の個々の疾患の鑑別診断の系を逐次開発しながら、化学診断の対象とする疾患の数を順次増やして、より精密で、より多数の疾患の迅速な化学診断システムの開発を目指して研究をおこなっている。その成果の一部を紹介する。また本研究では、従来の手法では殆んど診断不可能であった疾患の化学診断と解析を可能にしてきた。その例として重篤な肝臓や腎臓障害を伴うチロジン症 I 型について得られた成果の概要を報告する。この化学診断法はまた薬物や毒物などの作用や副作用を解析する上でも、極めて有用である。抗てんかん薬、バルプロ酸 (VPA) 服用中の患者中から3名の先天性代謝異常症患者と、1人の Reye 症候群患者を発見したことについて最後に報告し、GC-MS-COM による化学診断の有用性を述べる。

## 2. 試料調製と GC/MS 分析

〔分析方法〕尿中有機酸は0.5 mg クレアチニンあたり20  $\mu$ g の内標準物質を加え、酸性下

表1 Cases chemically diagnosed in the authors' institute (Feb. 28, 1986)

Disease	Diagnosed cases
Lactic acidosis	58
Methylmalonic aciduria	38
Tyrosinosis	28
Ketotic dicarboxylic aciduria	16
Ornithine carbamoyl transferase deficiency	15
Propionic acidemia	12
Nonketotic hyperglycinemia	9
Cystinuria	6
Nonketotic dicarboxylic aciduria	6
Hyperlysinemia	6
Isovaleric acidemia	5
Imidazolamino aciduria	5
Histidinemia	5
4-Hydroxyphenylacetic aciduria	5
Alcaptonuria	5
Phenylketonuria	4
Citrullinemia	4
Carbamoylphosphate carboxylase deficiency	3
Hyperoxaluria	3
Dibasic aminoaciduria	3
Reye's syndrome	2
Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency	2
Hyperphenylalaninemia	2
Hypervalinemia	2
3-Aminoisobutyric aciduria	2
Liver disease	2
Pyruvate dehydrogenase deficiency	2
Generalized amino aciduria	2
Pyroglutamic aciduria	1
Multiple carboxylase deficiency	1
Maple syrup urine disease	1
$\beta$ -Ketothiolase deficiency	1
Argininemia	1
Hyperornithinemia	1
Hyperprolinemia	1
Hypermethioninemia	1
2-Ketoadipic aciduria	1
Transient hyperammonemia	1
Lysinuria	1
Iminoglycinuria	1
Adenine phosphoribosyltransferase deficiency	1
Neuroblastoma	1
Cytochrome aa <sub>3</sub> /b deficiency	1
Partial aa <sub>3</sub> deficiency	1
Pyruvate carboxylase deficiency	1
Cystathionine $\beta$ -synthase deficiency	1
Prolidase deficiency	1
Total	271

エーテル抽出し、トリメチルシリル (TMS) 化した後2 m の3% OV-17 カラムを用いて昇温分析による GC/MS 分析をおこなった。GC/MS は日本電子製 JMA-3500 データシステムを on-line した JMS-DX 300 を使用した。

尿中アジピン酸, スベリン酸, n-プロピルグルタル酸はマスクロマトグラフィーにより定量した。すなわち, 内標準物質 n-ヘプタデカン酸の TMS 誘導体の [M-15]<sup>+</sup> の m/z 327 のピークに対する上記ジカルボン酸類 TMS 誘導体の [M-15]<sup>+</sup> の, m/z 275, 303, 303 の強度比を用いて検量線を作成し, 定量した。

尿中 VPA のグルクロン酸抱合体の定量は, n-カプリル酸を内標準物質とし,  $\beta$ -glucuronidase 処理後, 酸性下, クロロホルム抽出し, 2 m の5% DEGA カラムを用いて GCあるいは GC/MS により分析した。血清 VPA は血清 0.2mlを用い, n-カプリル酸を内標準物質と

表2 Causes of lactic acidemia

- 
1. Disorders of gluconeogenesis
    - Glucose-6-phosphatase deficiency
    - Fructose 1,6-diphosphatase deficiency
    - Phosphoenolpyruvate carboxykinase deficiency
    - Pyruvate carboxylase deficiency
  2. Disorders of pyruvate metabolism
    - Pyruvate dehydrogenase (E<sub>1</sub>) deficiency
    - Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency
    - Dihydrolipoyl transacetylase (E<sub>2</sub>) deficiency
    - Dihydrolipoyl dehydrogenase (E<sub>3</sub>) deficiency\*
  3. Disorders of the Krebs cycle
    - 2-Oxoglutarate dehydrogenase deficiency
    - Dihydrolipoyl dehydrogenase (E<sub>3</sub>) deficiency\*
    - Isocitrate dehydrogenase deficiency
  4. Disorders of the mitochondrial electron transport system
    - Uncoupling of oxidative phosphorylation
    - Cytochrome b deficiency
    - Cytochrome aa<sub>3</sub> deficiency
    - Cytochrome aa<sub>3</sub>/b deficiency
  5. Disorders of branched-chain amino acid metabolism
    - Maple syrup urine disease (MSUD)
    - Isovaleric acidemia
    - $\beta$ -Ketothiolase deficiency Propionic acidemia
    - Methylmalonic aciduria
    - Multiple carboxylase deficiency
    - 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency
  6. Disorders of the mitochondrial membrane transport system
    - Monocarboxylic acid translocase deficiency
    - Carnitine deficiency
  7. Others
    - Glutaric aciduria type II
    - 4-Hydroxyphenylacetic aciduria
    - Phenylketonuria
- 

\* Dihydrolipoyl dehydrogenase (E<sub>3</sub>) deficiency belongs to both disorders of pyruvate metabolism and disorders of the Krebs cycle.

して同様に分析した。

尿中アミノ酸は日本電子製 JLC-200A 全自動アミノ酸分析計で分析した。

### 3. GC-MS-COM による高乳酸血症と高アンモニア血症の 鑑別化学診断法

昭和61年2月末までに化学診断した疾患とその症例数とを纏めて Table I に示した。同一疾患で症例数の多いものから順にメチルマロン酸尿症, 高乳酸血症, チロジン症, ジカルボン酸尿症, 高グリシン血症, プロピオン酸血症などとなっている。このうち, メチルマロン酸尿症は化学診断が比較的容易で, 必ずしも GC-MS-COM による解析を必要としない。

メチルマロン酸尿症に次いで発生頻度が高い高乳酸血症は, Table II に示すように1) 糖新生系障害, 2) ピルビン酸代謝障害, 3) クエン酸回路系障害, 4) ミトコンドリアの電子伝達系障害, 5) 分岐鎖アミノ酸代謝 6) ミトコンドリアの膜輸送障害, 7) その他の疾患に大別されるが, 高乳酸血症には今日知られているだけで23種類以上の疾患が含まれており, 当然, 疾患の種類によって適切な治療法が異なってくる。したがって, 高乳酸血症をさらにその酵素欠損まで明らかにする精密, 鑑別診断が必要になる。これらの疾患の多くは Figure 1 に示すように, それぞれの疾患で体液中に排泄される異常代謝産物の GC 上の保持時間が互いに近接していて, 相互に鑑別診断が難しいものが多いが, 個々の疾患に特徴的な診断の指標となる物質がこれまで多数明らかにされているので, GC/MS を用いてそれらの物質を指標として注意深い解析をすれば, 大半の疾患の鑑別診断が可能である。

実際に GC-MS-COM で高乳酸血症の精密, 鑑別診断し, しかもわが国で最初に化学診断した 2, 3 の例を紹介する。

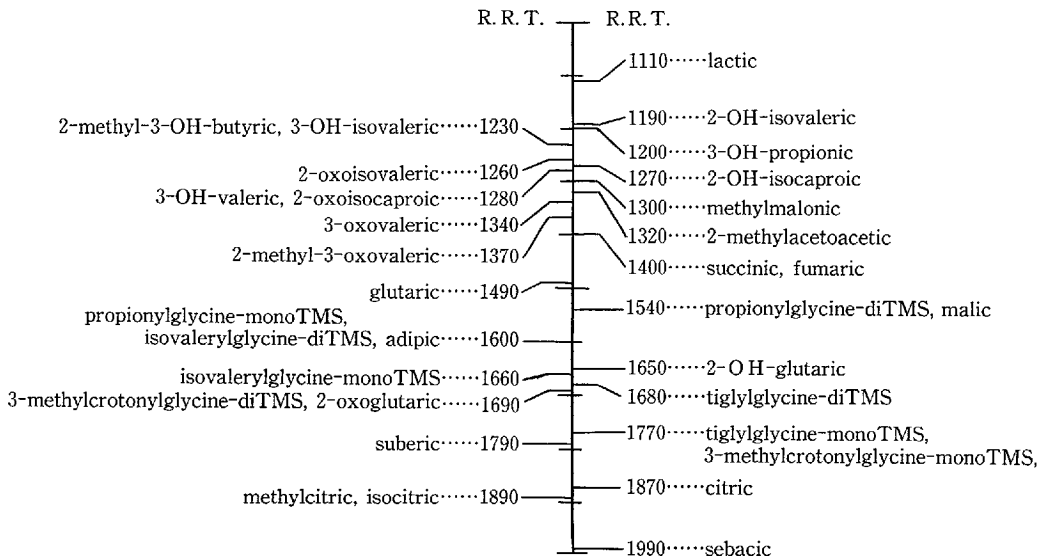


図1 The Relative Retention Times of Abnormal Metabolites on 3% OV-17 Found in Lactic Acidosis

血中のロイシンが高値を示す疾患の1つに、楓糖尿症 (MSUD) がある。本疾患は新生児スクリーニングの検査対象となっていて、治療が遅れると極めて重篤な症状を伴う。われわれは、最初新生児マススクリーニングで血中ロイシン値の高いことから MSUD と診断されていた患者について GC-MS-COM 分析し、分岐鎖  $\alpha$ -ケト酸類と分岐鎖  $\alpha$ -ヒドロキシ酸類だけでなく、乳酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸、 $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸の尿中異常排泄から、わが国では最初に E<sub>3</sub> 欠損症を発見した。その後、続いてわが国第2の症例を発見した。

また電子伝達系障害の疾患例として、骨格筋の運動調節ができず、また筋肉の緊張が失われた、いわゆる“ぐにゃぐにゃ病” (Floppy infant) の患者の尿中有機酸とアミノ酸分析のデータを解析して、本患児が典型的なチトクロームCオキシダーゼ (combined cytochrome aa3/b) 欠損症であることをわが国で最初に化学診断した。“ぐにゃぐにゃ病”は、主として形態学的観察結果に基づいて名づけられた疾患名で、その中には詳しい生化学的研究がなされている糖原病Ⅱ型と、チトクロームCオキシダーゼ欠損症などが含まれる。今回化学診断したチトクロームCオキシダーゼ欠損症は電子伝達系の障害のため、著明な高乳酸血症を呈する。本疾患では電子伝達を障害された他の基質分子も同時に尿中に異常排泄され、またエネルギー産生の低下による腎尿管における吸収不全のため、汎アミノ酸尿症がみられる。

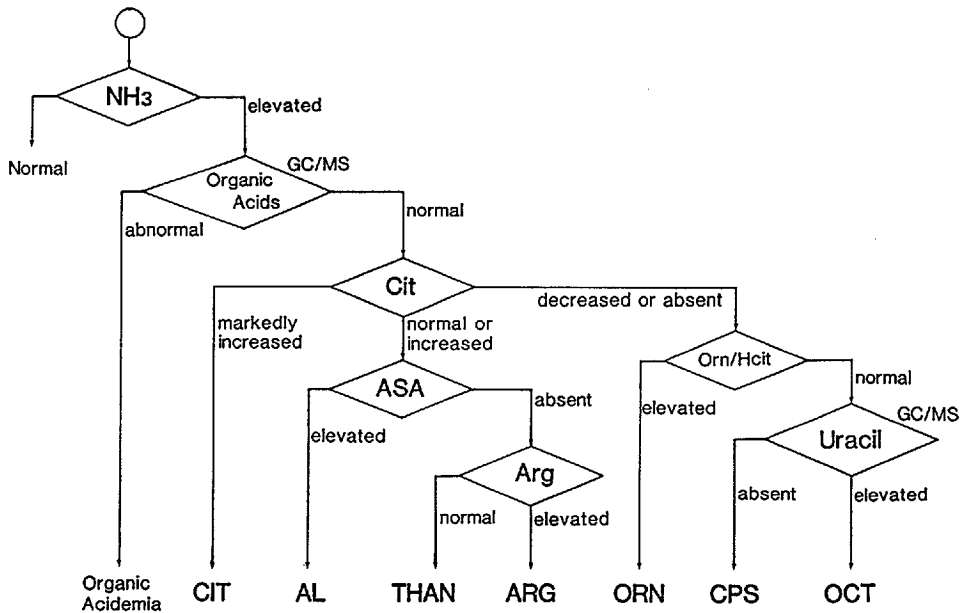
その後さらにチトクロームCオキシダーゼの部分欠損の症例も発見した。

さらに別の高乳酸血症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症についても化学診断することができた。この  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症は1971年に第1例が報告され、イソロイシンの異化中間体、2-メチルアセトアセチル CoA を加硫分解するチオラーゼの欠損に基づく疾患であることが解明された。患者は 2-メチルアセト酢酸とその還元型の 2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸、およびチグリルグリシンを尿中に多量に排泄する。本疾患は現在6家系9例が記載されており、1例を除いて出生後1~2年はほとんど無症状で、精神運動発達も正常であったと報告されていて、比較的予後のよい疾患である。本症例も感染を契機に発症したが、その後の治療によって完全に臨床症状が消滅し、現在、元気に小学校に通学し、知能の発達も正常である。

E<sub>3</sub> 欠損症、典型的なチトクロームCオキシダーゼ欠損症および  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症は、いずれもわが国では最初の症例で、しかも世界でも数少ない臨床的にも、生化学的にも極めて貴重な症例である。

以上のようにいずれも高乳酸血症を伴う先天性代謝異常症を、GC-MS-COM を中心とした化学診断システムで正確に、且つ迅速に診断することができたが、そのクロマトグラムでは異常代謝産物のピークが相互に重なり合ったり、非常に近接していたりするため、通常の GC や高速液体クロマトグラフィーなどの分析法では、臨床症状も複雑で臨床診断が極端に難しい上記疾患の化学診断は困難である。

高乳酸血症と共に高頻度に発見される疾患群に、尿素回路系酵素障害と分岐鎖アミノ酸代謝異常症などの高アンモニア血症がある。われわれは高アンモニア血症をアミノ酸分析計と GC-MS-COM による化学診断システムで、Figure 2 に示したように系統的に鑑別診断をおこな



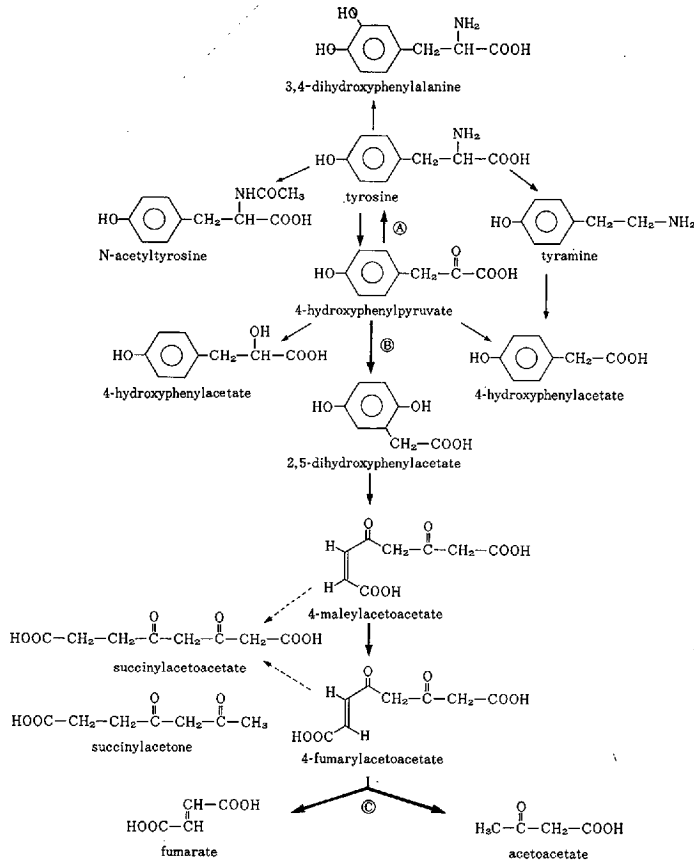
CIT, citrullinemia: AL, Aarginosuccinate lyase deficiency: THAN, transient hyperammonemia of newborn: ARG, argininemia: ORN, ornithinemia: CPS, carbamoylphosphate synthetase deficiency: OCT, ornithine carbamoyltransferase deficiency: ASA, argininosuccinic acid

図2 Flow Diagram for Differential Diagnosis Using GC/MS/COM and Amino Acid Analyser of Urea Cycle Enzyme Deficiency

っている。

#### 4. チロジン症 I 型の化学診断

遺伝性高チロジン血症 I 型は、肝腎型高チロジン血症とも呼ばれ、比較的発生頻度の高い先天性代謝異常症の 1 つである。本疾患は生後まもなくから重症の肝および腎障害を伴って発症し、多くの場合は幼児期の比較的早期に死亡し、慢性型に移行した場合でも小児期に肝硬変や肝ガンを併発して死亡する例が多く、これまでに報告されている生存例の最年長患者では、チロジン異化中間体の p-hydroxyphenylpyruvate (pHPPA), p-hydroxyphenyllactate (pHPLA) と p-hydroxyphenylacetate (pHPAA) が尿中に大量に排泄されるため、当初 p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (p-HPPA oxidase) の欠損がその病因と考えられてきた。事実、本疾患では本酵素活性の低下していることが *in vitro* の実験によって確められた<sup>23)</sup>。しかし、1977 年に Lindblad ら<sup>1)</sup> が本症患者尿中に succinylacetone (SA) および succinylacetoacetate (SAA) が異常排泄されることを発見し、本症の主因は fumarylacetoacetase (FAH) 欠損のためであろうと推測し、*in vitro* で本酵素活性の低下を証明して以来、肝の FAH の活性低下を伴った症例が相次いで報告され、現在では FAH の障害を主因とする説が有力である<sup>4)~9)</sup> (図 3)。しかし、わが国ではこれまで高チロジン血症 I 型患者尿中に SA



(A: tyrosine aminotransferase B: 4-hydroxyphenylpyruvate oxidase C: fumarylacetoacetase)

図 3 Metabolic Pathway of Tyrosine and Inherited Disorder of Tyrosine Metabolism

および SAA を検出した報告例はない。今回、われわれは肝、腎障害を伴った高チロジン血症 I 型患者 4 例について既報<sup>11)</sup>に従って尿中有機酸を精査し、2 例の慢性型と考えられる患者尿中にわが国で初めて SA と SAA を検出した。しかし、残りの急性型患者 2 例では SA も SAA も検出できなかった。

〔症例〕

症例 1；患者 F.T. は 38 歳の女性。生下時不詳。10 ヶ月で歩行を開始したがよたよた歩きであった。2 歳時にクル病を指摘され肝油を服用したが効果はなかった。この頃から腹部膨満があり、その後、下肢脱力、股関節および肩関節痛を訴え、38 歳で精査のため神戸大学医学部第 3 内科に入院した。入院時には汎血球減少を伴う肝硬変、Fanconi 症候群および骨軟化症などの臨床症状が認められ、また血中チロジン 9.0 mg/dl および尿中チロジンが 360 mg/day と上昇し、尿の 2,4-DNPH 反応は陽性であった。

症例 2；患者 M.K. は検査時11歳 8 ヶ月の女児で、5 歳頃より X 脚に気づき、7 歳時にクル病を指摘され、ビタミン D. (V.D.) の投与を受けたが改善されなかった。8 歳時に都立清瀬小児病院に入院し、Fanconi 症候群の診断で治療を受けていた。血中チロジン値は300~400  $\mu\text{mole/ml}$ と増加していた。その後 V.D., リン酸,  $\text{NaHCO}_3$  および  $\text{KHCO}_3$  による治療を受けていたが、肝ガンを併発して12歳で死亡した。

症例 3；患者 A.K. は検査時7 ヶ月の女児で、出生直後より高ビリルビン血症、哺乳力低下をきたし、生後5 ヶ月目に胆道閉鎖の診断で開腹手術したが、その時は新生児肝炎の所見のみがみられた。その後黄疸が続き、発育遅延、高メチオニン血症、高チロジン血症をきたし、生後9 ヶ月で大量吐血をきたして死亡した。剖検の結果、肝の p-HPPA oxidase 活性が正常値の9.2%, FAH 活性が正常値の22%に低下していた。

症例 4；患者 N.N. は検査時3 ヶ月の女児で、生後8 日目より哺乳力低下をきたして、10 日目より嘔吐出現、血中チロジン10.5  $\text{mg/dl}$ , メチオニン6.7  $\text{mg/dl}$  と高値を示した。生後3 ヶ月より黄疸増強、嘔吐出血傾向出現し始め痙攣も発現していた。生後4 ヶ月に肝不全で死亡した。この時の血中アンモニアの値は429  $\mu\text{g/dl}$ ,  $\alpha$ -フェトプロテインは25.6  $\text{mg/ml}$ と上昇していた。患者白血球の p-HPPA oxidase 活性は、正常値の22~25%に低下していた。

#### 〔結果〕

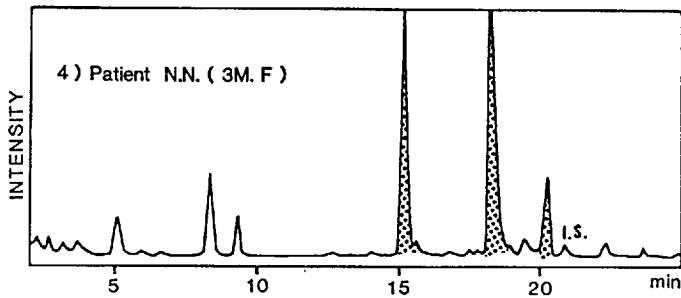
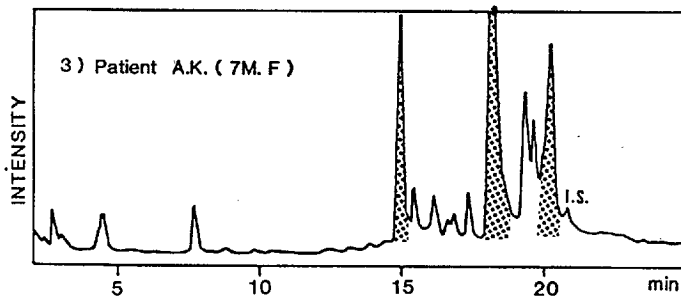
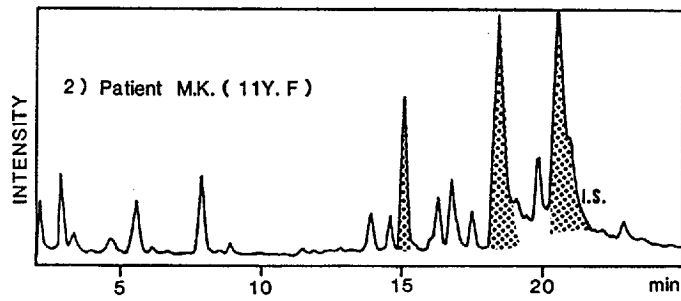
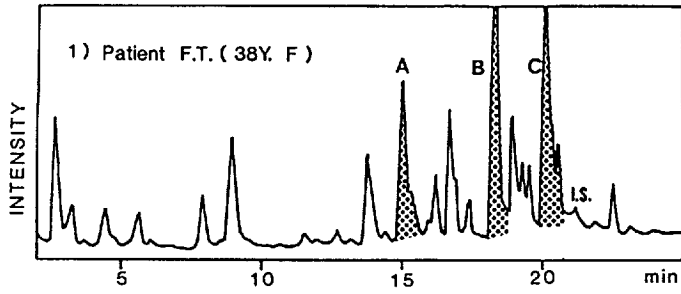
図4は4症例の患者尿中有機酸の RIC クロマトグラムを示した。このうち、1) と2) が慢性型、3) と4) が急性型のチロジン症 I 型患者のクロマトグラムである。4 症例ともに大量に pHPAA, pHPLA と pHPPA が排泄されている。図5は患者 F.T. の尿中 SA と SAA のマスキロマトグラフィーによる検索のクロマトグラムである。本法は、ごく微量の成分や他の化合物との分離のよくない場合にその化合物に特有のイオンで検索するため、非常に選択的で且つ高感度の優れた方法である。図中、矢印で示したのが SA および SAA である。

ところで、高チロジン血症 I 型患者尿中に SA と SAA の検出されなかった理由が、上記2つの化合物が不安定性なためであるという可能性が指摘されてきたが、凍結保存した場合の SA と SAA の安定性について検討した結果、凍結状態では SA と SAA は共に2 ヶ月後でも検出可能で、特に SA の場合は、凍結保存すると7 ヶ月後でも検出可能であった。表Ⅲには検索した4名の高チロジン血症 I 型患者の尿中有機酸およびアミノ酸の排泄量を示した。4 症例とも pHPPA, pHPLA, pHPAA, チロジンおよびグリシンの異常排泄が認められたが、SA と SAA は慢性型患者 M.K. と F.T. でのみ観測され、急性型患者 N.N. と S.K. では検出されなかった。逆にメチオニンは急性型患者で異常増加していたが、慢性型患者では正常値内にあった。

#### 〔考察〕

遺伝性高チロジン血症の診断には、血中または尿中に蓄積あるいは異常排泄するチロジンと、その異化中間体の検出、特に SA および SAA の検出が決め手となる。わが国ではこれまで SA および SAA を検出した症例は報告されていない。その理由は、この2つの化合物が不安定で、保存中あるいは試料調製中に分解したという可能性が指摘されてきた。今回、わ





A: 4-hydroxyphenylacetate B: 4-hydroxyphenyllactate  
 C: 4-hydroxyphenylpyruvate

⊠ 4 RIC Chromatograms of Urinary Organic Acids in the Patients with Hypertyrosinemia

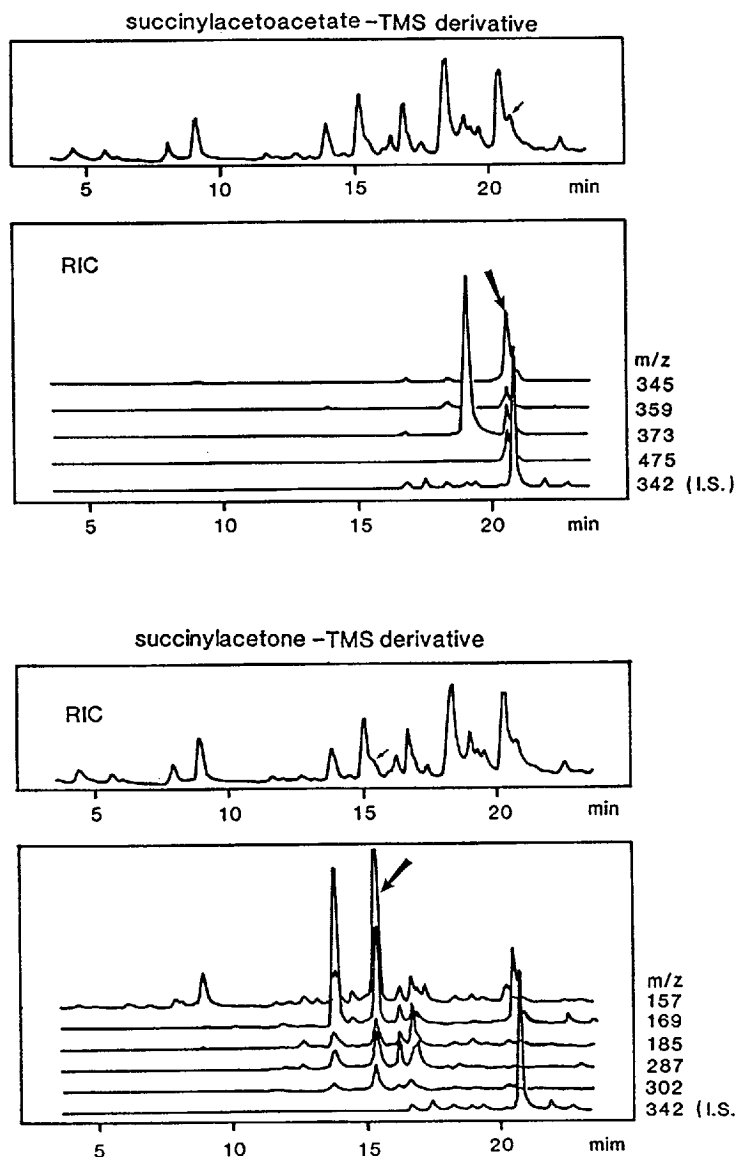


図5 Mass Chromatographic Identification of Succinylacetate TMS and Succinylacetone TMS

われわれは上記2つの化合物を異常排泄するFAH欠損症患者尿を分析し、さらに $-20^{\circ}\text{C}$ に凍結保存した際の安定性について検討した結果、2ヵ月後でも十分に検出可能であることが分かった。したがって、FAH欠損症患者尿を、採尿後直ちに凍結保存すれば、われわれのスクリーニング法で確実に化学診断可能であることが分かった。これまでわれわれは24症例のチロシン症患者の化学診断を行ってきたが、SAおよびSAAを検出したのは今回の2症例が最初で、しかもこの2症例は共に慢性型高チロシン血症I型である。従来報告されてきたFAH欠損症患者は慢性型の症例が多いが、その多くは幼児期に死亡することが多い。患者F.T.は高チロ

表3 Urinary Excretion of Tyrosine and Its Metabolites and Gly and Met in Patients with Hypertyrosinemia

Patient	N.N. (3M. F)	A.K. (7M. F)	M.K. (11Y. F)	F.T. (38Y. F)	Control (1~4 Y)
<b>Organic acids*1</b>					
p-HPAA	1.42	0.50	0.30	0.25	0.06
p-HPLA	3.00	2.11	2.49	0.80	<0.01
p-HPPA	0.11	0.98	6.74	1.06	N.D.
SA	N.D.*3	N.D.	0.018 (0.05)*4	0.037(0.19)	N.D.
SAA	N.D.	N.D.	— (0.06)	— (0.32)	N.D.
<b>Amino acids*2</b>					
Gly	15.1	13.2	18.5	15.1	0.72~2.74
Tyr	6.86	2.46	4.31	5.25	0.06~0.41
Met	1.76	1.64	0.15	0.08	0.05~0.12

\*1 Values were expressed as mg/mg creatinine.

\*2 Values were expressed as  $\mu$ moles/mg creatinine.

\*3 N.D. means not detectable.

\*4 Relative peak ratios to the internal standard which were measured by mass chromatogram.

ゾン血症 I 型としては極めて珍らしく 38 歳の高年令であった。急性型高チロジン血症 I 型の 2 症例は、典型的な臨床像を呈して、共に死の転帰を辿ったが、そのうちの患者 S.K. は剖検で肝の FAH 活性が対照の 22% に低下していた。それにも拘らず、SA も SAA も検出されなかった。その理由は明らかではないが、本患児では FAH 活性の低下よりも pHPPA oxidase 活性の低下が大きく、FAH の基質となるホモゲンチジン酸が十分量生成、または蓄積し得なかったことが原因ではないかと考えられる。あるいは本疾患では SA や SAA の蓄積が徐々に進行するので、急性型の場合にはわれわれの分析法で検出できる限界量以下であった可能性も考えられる。われわれがこれまで化学診断したチロジン症患者のうち、肝腎型と考えられた症例は今回の 4 例も含めて全部で 10 症例で、上記 4 症例以外は全て生後 4 ヶ月以内に検索した。pHPLA や pHPPA などに比して SA と SAA は量的に非常に少ないため、その検出にはマスキンググラフィーによって検索したが、いずれの場合も SA と SAA は検出されなかった。このように、非常に微量であることが本疾患の解析を困難にしている大きな理由である。ところで、もし FAH 欠損が本症の真の原因であり、pHPPA や pHPLA などの異常排泄が肝障害による 2 次的なものであるとすると、肝腎型高チロジン血症の全ての症例で SA と SAA が必ず検出される筈である。今回の検索では、完全な肝障害をきたしている 2 例の慢性型高チロジン血症患者でのみ、これら 2 つの化合物が検出され、急性型で検出されなかったのは、単に検出感度だけの問題ではなさそうである。事実、肝障害の程度と pHPPA や pHPLA の排泄量との間に必ずしも相関々係が認められず、Furukawa ら<sup>11)</sup> のデータでも、肝ガン患者の pHPPA oxidase 活性はそれ程低下していない。Berger ら<sup>9)</sup> は、fumarylacetoacetate はメチオンおよび 5-アミノレブリン酸の代謝を阻害するが、pHPPA oxidase 反応は直接阻害しないと報告している。その他にも FAH 欠損をチロジン症 I 型の原因として説明するのは無理が

あるような症例報告も 2, 3 あり, 今後の研究を俟たねばならない。

ところで, われわれが経験した 2 症例の tyrosine aminotransferase 欠損症患者尿中の, pHPLA/pHPPA 比は, 肝腎型チロジン症に比べて可なり高い<sup>12)</sup>。

重症の肝障害では, 時として高チロジン血症を呈するが, チロジン異化中間体の尿中異常排泄は少なく, 高チロジン血症の原因は, tyrosine aminotransferase の活性低下にあるという報告もある<sup>13)</sup>。

大部分の肝腎型高チロジン血症患者の症例では, pHPPA oxidase 活性の低下が確認されている。今回の急性型患者 N.N. と S.K. でも pHPPA oxidase の活性低下が認められたが, tyrosine aminotransferase の活性低下は認められていない。われわれも以前に FAH 欠損を伴わない pHPPA oxidase 欠損症の高チロジン血症の例を報告したが, その症例ではチロジンの他にグリシンやセリンも尿中に異常排泄されていたにも拘らず, 著明な肝障害は認められなかった<sup>14)</sup>。したがって, 肝腎型高チロジン血症の原因が pHPPA oxidase 欠損, FAH 欠損, あるいは他の何らかの調節因子によるものかなど, 現段階では明らかでなく, 今後この問題の解明を進めてゆきたいと考えている。

## 5. バルプロ酸の副作用と紛らわしい高アンモニア血症患者の化学診断

### — けいれん患児に対する先天性代謝異常症の精査の意義 —

バルプロ酸 (VPA) は比較的副作用の少ない抗けいれん剤として開発されたが, 極く一部の患者ではこの薬剤を服用中に, 肝障害, 高アンモニア血症など, 劇症肝炎や Reye 様症状をきたした症例が最近報告され始め, 注目されている。しかし, このような重篤な副作用を呈した症例は極めて稀なため, その発症原因は患者の特異体質によるという考えが一般的であるが, 患者の特異体質の本質についての知見はこれまで全く報告されていない。また感染などの特殊条件, 既知の遺伝性疾患の潜在や, 他の因子などの関与について生化学的に解析された報告例も殆んどない。

われわれは, けいれんの重積を伴うなどの臨床症状改善のため, VPA 治療を受けていて高アンモニア血症を呈した 4 名の患者尿中有機酸の GC/MS 分析と, 尿中と血中アミノ酸分析のデータとを合わせて解析し, その中の 1 名はプロピオン酸血症, 他の 2 名はそれぞれ尿素回路系酵素の障害であるオルニチントランスカルバミラーゼ (OCT) 欠損症とシトルリン血症とであることを発見した。プロピオン CoA カルボキシラーゼの障害によるプロピオン酸血症は, ミトコンドリア内にプロピオン CoA が蓄積してカルバミル磷酸合成酵素を阻害する結果, 高アンモニア血症をきたす (続発性高アンモニア血症)。また OCT 欠損症とシトルリン血症では, 尿素合成が障害されるため高アンモニア血症をきたす (原発性高アンモニア血症)。化学診断後 3 名の患者には抗けいれん剤を中止し, それぞれの先天性代謝異常症に適した治療が速やかにおこなわれて, けいれん発作が消失し, 著明な臨床像の改善を見た。

VPA で重い副作用がみられる個々の患者の特異体質として, 上述のような既知の先天性代

謝異常症の遺伝型質以外の特殊性も考えられるが、ここでは、GC/MS 分析で VPA 服用中に高アンモニア血症、肝障害を呈した 3 名の患者の遺伝的特異性を明らかにすることができた。さらに、Reye 症候群発症後に VPA を服用した患者の VPA 代謝パターンの特有な変化について、本症の病態代謝と関連して考察した。

#### 〔症例〕

##### 5-a) VPA 副作用の疑いを契機に化学診断した 3 例の先天性代謝異常症

症例 1；新生児期に異常はなかったが、やがて、精神運動発達遅滞と筋緊張低下が認められるようになり、生後 5 ヶ月時、大発作型の痙攣を起こして、浜松医科大学病院に入院、10 生月時、痙攣のコントロールのために VPA が投与された。VPA 投与後、嘔吐、嗜眠をきたし、ケトン尿を呈し、また血中アンモニア  $150 \mu\text{g}/\text{dl}$  と高値を認めた<sup>15)</sup>。

症例 2；宮崎医科大学病院に入院した 2 歳 7 ヶ月の女児で、VPA を服用していた。入院時昏睡、チューンストークスの呼吸状態、意識レベル低下を認めた。アシドーシスはなく、血中アンモニアが  $1400 \mu\text{g}/\text{dl}$  と著明に増加していた。

症例 3；昭和 61 年 8 月生まれの女児；精神運動発達遅滞を認め、生後 11 生月より頻回のけいれん発作のため、入退院を繰り返す。1 歳 1 ヶ月時、肝機能障害と、高アンモニア血症が認められ、VPA による Reye 症候群の疑いで、VPA 投与は中止、新潟市民病院に入院した。VPA 中止後も肝機能障害、意識レベル低下などがあり、1 ヶ月後に GC/MS 分析した。

##### 5-b) RS 発症後に VPA を服用した患者例

症例 4；6 歳女児。3 歳時、1 時間程の熱性全身痙攣があったが、精神身体発達は正常。昭和 58 年 10 月 9 日夕方より左耳下腺腫脹、疼痛、発熱、やがて全身痙攣が起きた。ジアゼパム、セコバルビタールで痙攣消失したが、その後、意識レベルが急激に低下し、11 月 3 日に死亡した。

軽度の脳浮腫、著明な筋肉の脂肪変性を認めた。VPA その他 6 種の薬剤が、10 月 11 日より 4 日間投与された。VPA 投与量は  $30 \text{ mg}/\text{day}$  で、VPA 服用 2 日目の尿を GC/MS 分析した。

Reye の診断基準中、本例は、GOT, GPT, LDH, アンモニアなどの上昇、プロトロンビン時間の延長、CSF に異常なく、黄疸もないなど Reye 症候群の特徴を満足している。臨床的には急性の脳症を呈し、進行性で、除脳硬直に至っている。肝生検ができず、筋生検で脂肪の沈着を認めた。感染症を前駆症状としているなどの臨床症状と合わせて本例は Reye と診断した。なお後述するように、本患児の代謝の特徴は、先天性の、いわゆる中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症を強く疑わせるものであったが、低血糖がないこと、遊離脂肪酸、トリグリセリドの上昇のないこと、精神運動発達遅延がないことなどから後者の可能性は否定された<sup>16)</sup>。

#### 〔結果〕

症例 1 の尿有機酸のクロマトグラムには、VPA の  $\beta$  酸化、 $\omega$  酸化代謝物、グルクロン酸抱

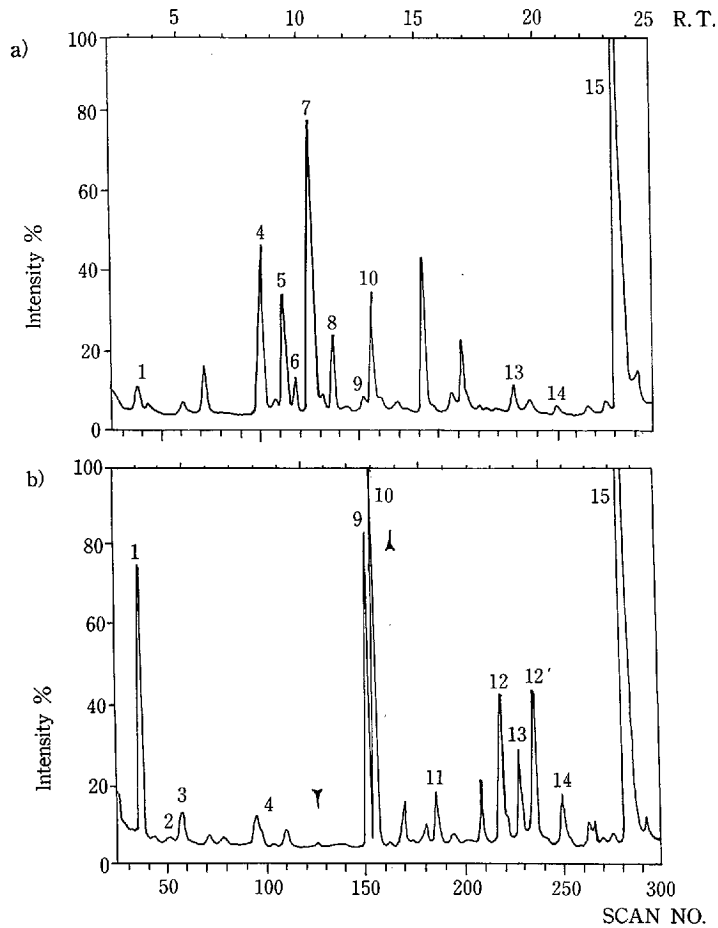


図6 Reconstituted Ion Chromatograms of TMS Derivatives of Acids from the Urine of a 8-year-old VPA-receiving Patient with Normal VPA Metabolism (a) and the Patient in the Present Study (b).

合体の他に、プロピオン酸血症患児にみられる一連の化合物が検出され、この患者でプロピオニル CoA の代謝が障害されていることを示していた。近年 VPA の副作用として、高アンモニア血症、高グリシン血症、プロピオン酸の蓄積などの報告がある。本症例の尿中グリシンは健常人の30倍と著しく増加していた。そこで、本症例も、VPA 投与により2次的にプロピオニル CoA の代謝障害をきたした、あるいは本来プロピオン酸血症であって、VPA 投与によって症状が悪化したという2つの可能性が考えられる。そこで VPA 服用中止後の尿中有機酸分析をおこなったところ、VPA の代謝産物が完全に消失しているにもかかわらず、プロピオニル CoA のメタボライトの排泄量は全く減少しなかった。したがって、本症例は、先天性代謝異常症のプロピオン酸血症と診断した。その後、培養皮膚繊維芽細胞のプロピオニル CoA 活性が対照健常児の2%に低下していることが確認され、患者にプロピオン酸血症用特殊ミルク投与による治療が開始された。その結果、痙攣は徐々に消失の傾向を示した。

高アンモニア血症をきたした症例2では、1) VPA 投与下であったので、VPA の副作用なのか、2) 先天的な尿素サイクルの異常によるのか、3) 2次的に高アンモニア血症をきたすプロピオン酸血症とかメチルマロン酸血症などの有機酸血症によるかを解明する目的で、GC/MSによる尿有機酸の分析をおこなった。

尿素サイクルの2番目の酵素であるオルニチントランスカルバミラーゼ以降の酵素欠損症では、ウラシルやオロト酸が増加し、且つアミノ酸の異常パターンは欠損部位によりそれぞれ固有であるため、ウラシル、オロト酸およびアミノ酸の分析によって、どの酵素が異常であるかが分かる。尿のエーテル抽出液をマスクロマトグラフィーで分析したところ、この患者では、ウラシルとオロト酸が著明に増加しており、且つグルタミンは増加しているが、シトルリンその他のアミノ酸の異常がないことから、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症と化学診断した。その後、肝生検で本酵素の著明な低下が確認され、VPA 投与を中止し、代わりに原発性高アンモニア血症としての治療が開始され、症状の著明な改善をみた。

症例3は、同様にシトルリン血症と診断した。

症例4は、Reye 症候群発症後に VPA が投与された患者で、したがって、本症例は Reye 症候群患者における VPA の代謝プロファイルの異常を示すものである。図6は本症例および対照の痙攣のある子供の尿中有機酸の TIM クロマトグラムである。上のクロマトグラムは対照とした VPA 服用中の子供の尿中有機酸で、典型的な VPA 代謝物の排泄パターンである。 $\beta$ 酸化生成物の2-プロピル-3-ヒドロキシ吉草酸、2-プロピル-3-ケト吉草酸、 $\omega$ 酸化生成物の2-プロピル-4-ヒドロキシ吉草酸、2-プロピル-5-ヒドロキシ吉草酸、2-プロピルグルタル酸およびグルクロン酸抱合体が検出される<sup>17)~19)</sup>。この通常のパターンに比べて下図の Reye 患者のパターンでは、2つの  $\beta$ 酸化体のピークが共に完全に消滅している。逆に  $\omega$ 酸化体のピークは著しく増加している。グルクロン酸抱合体は対照と同様に検出される。なお本 Reye 患児でも既報<sup>20)</sup>の通り、乳酸とアジピン酸が著明に増加していた。

#### 〔考察〕

症例1は2次的に高アンモニア血症を呈する有機酸血症で、症例2は原発性高アンモニア血症である。最近、著者らは1歳未満から高グリシン血症、高アンモニア血症を呈した14歳の子供の尿中有機酸を分析し、プロピオン酸血症と化学診断した。本症の診断はかなり難しく、VPA 服用後重篤な症状を呈する痙攣の子供の中にはプロピオン酸血症患児が本症例以外にも多数いることが予想される。したがって、前記のような症状を呈した患者では、是非、先天性アミノ酸・有機酸代謝異常症の精密スクリーニングを試みるべきである。症例4は6歳までに特筆すべき既往症がなく、今回ウイルス感染を先駆症状として Reye を呈した。致死的な肝障害を呈した Kochen らの7歳男子<sup>21)</sup>では、 $\omega$ 酸化により生成される2-プロピルグルタル酸の著明な低下、 $\beta$ 酸化により生成される2-プロピル-3-ケト吉草酸の消失、グルクロン酸抱合体の消失が観察され、このような生化学的所見は、肝機能の様な低下のためと考えることができる。これに対して本症例(4)では、 $\omega$ 酸化体が著しく増加し、これと対照的に  $\beta$ 酸化体は完全に消失していた。またグルクロン酸抱合体が正常に生成されていた。VPA の  $\omega$ 酸化はまず

ミクロゾーム酵素 P-450 系で水酸化され、ついで、細胞質に局在するアルコール脱水素酵素によりアルデヒドに酸化され、最後に、やはり細胞質に局在するアルデヒド脱水素酵素により 2-プロピルグルタル酸に酸化される。従って $\omega$ 酸化は、ミトコンドリア外で起きる一連の酵素反応である。グルクロン酸抱合も、ミトコンドリアでなくミクロゾーム酵素 UDP-glucuronyltransferase により生成する。したがって、本患児における VPA 代謝の特徴は、特異的なミトコンドリア病である Reye 症候群に従属した 2 次的な反応によるもので、本症における代謝の特異性をよく反映していると考えられる。

Reye に先行するウイルス感染ではフォスホリパーゼ A が遊離され、その結果、遊離脂肪酸の生成が亢進し、その結果細胞内に増加した遊離脂肪が酸化的リン酸化を脱共役し、ミトコンドリアの形態変化をおこすことが知られている。したがって、Reye 患者に VPA を投与することは、すでに発現しているミトコンドリアの障害を助長する可能性がある。

## ま と め

GC-MS-COM とアミノ酸分析計を用いた先天性代謝異常症のスクリーニングシステムを開発し、昭和61年2月末までに47疾患、271症例の化学診断に成功した。本システムは、従来の手法では診断が不可能か極端に困難な代謝疾患の化学診断に極めて有用である。また本システムでわが国で最初にプロピオン酸血症、E<sub>3</sub>欠損症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、典型的なチトクロームCオキシダーゼ欠損症、フマリルアセトアセターゼ欠損症（チロジン症 I 型）と  $\alpha$ -ケトアジピン酸- $\alpha$ -アミノアジピン酸尿症を発見し、その異常代謝について研究した。

重症の肝障害を伴った高チロジン血症 I 型について、4名の患者の尿中有機酸を GC-MS-COM システムで分析し、本症の 4-hydroxyphenylpyruvate oxidase 欠損との関係について解析を試みた。全ての症例で 4-hydroxyphenylpyruvate, 4-hydroxyphenyllactate と 4-hydroxyphenylacetate の大量排泄が認められたが、慢性型患者2名ではその他に succinylacetone (SA) と succinylacetoacetate (SAA) が検出された。しかし、残りの急性型患者2名では SA も SAA も検出されなかった。この理由は SA と SAA の不安定性によるのかも知れないという可能性について検討した結果、SA と SAA は、採尿後直ちに凍結保存すると可なり安定で、2ヵ月後でも検出可能であった。殊に SA は7ヵ月後でも十分検出可能であった。

以上の結果から、チロジン血症 I 型は FAH 欠損が主因とされているが、全てのチロジン血症 I 型が FAH 欠損によるとする結論は得られなかった。

VPA 服用中に高アンモニア血症を呈した3例の VPA 服用患児について、先天性代謝異常症の可能性について検討し、1例はプロピオン酸血症、他の1例はオルニチンカルバミルトランスフェラーゼ欠損症、残りの1名はシトルリン血症と化学診断した。この3症例から薬害が顕著な場合には先天性代謝異常症の精密スクリーニングをおこなう必要があることが強く示唆される。さらに、けいれん患者について、先天性代謝異常症の可能性を調べる必要性も示唆した。



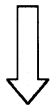
Reye 症候群では VPA の  $\beta$  酸化が抑制され、代りに  $\omega$  酸化が亢進する。このような VPA 代謝の特徴は Reye 症候群に従属した 2 次的なものであり、先天性代謝異常症の診断に際して、病態における薬物代謝の変化を考慮すべきである。

以上のように、GC-MS-COM とアミノ酸分析計とを用いた先天性代謝異常症のスクリーニングシステムは、生体の代謝を広範に解析できるため、単に先天性代謝異常症のみでなく、薬物の作用機序や難病の解明などにも大きな威力を発揮する。

謝辞：本研究にあたりチロジン症の貴重な試料を提供して頂いた筑波大学臨床医学系中村了正先生、京都府立医科大学古川宣明先生、都立清瀬小児病院土屋裕先生および神戸大学医学部福岡佳宏先生、VPA 服用患者の貴重な試料を提供して頂いた浜松医科大学岡成寛先生、宮崎医科大学浜田恵亮先生、新潟市民病院高野美紀子先生、並びに広島大学医学部佐倉伸夫先生に深謝します。

## 文 献

- 1) Lindblad, B., Lindstedt, S. and Steen, G. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74** : 4641, 1977.
- 2) Sakai, K. and Kitagawa, T. : Jikeikai, Med. J., **4** : 1, 1957.
- 3) Taniguchi, K. and Gjessing, L.R. : Br. Med. J., **1** : 968, 1965.
- 4) Berger, R., Smith, G.P.A., Stoker-deVries, S.A., Duran, M., Ketting, D. and Wadman, S.K. : Clin. Chim. Acta., **114** : 37, 1981.
- 5) Kvittingen, E.A., Jellum, E. and Stokke, O. : Clin. Chim. Acta., **115** : 311, 1981.
- 6) Christensen, E., Jacobsen, B.B., Gregersen, N., Hjeds, H., Pedersen, J.B., Brandt, N.J. and Baekmark, U.B. : Clin. Chim. Acta., **116** : 331, 1982.
- 7) Grenier, A., Lescault, A., Laberge, C., Gagne, R. and Mamer, O. : Clin. Chim. Acta. **123** : 93, 1982.
- 8) Kvittingen, E.A., Halvorsen, S. and Jellum, E. : Pediatr. Res., **14** : 541, 1983.
- 9) Berger, R., van Faassen, H. and Smith, G.P.A. : Clin. Chim. Acta., **134** : 129, 1983.
- 10) 松本 勇 : 質量分析, **32** : 79, 1984.
- 11) Furukawa, N., Kinugasa, A., Seo, T., Ishii, T., Ota, T., Machida, Y., Inoue, F., Ima shuku, S., Kusunoki, T. and Takamatsu, T. : Pediatr. Res., **18** : 463, 1984.
- 12) Shinka, T., Kuhara, T. and Matsumoto, I. : NEONATAL SCREENING, ed. by Naruse, H. and Irie, M., Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 314, 1983.
- 13) Andersson, S.M., Salaspuro, M. and Ohisals, J.J. : Gastroenterology, **82** : 554, 1982.
- 14) Endo, F., Kitano, A., Uehara, I., Nagata, N., Matsuda, I., Shinka, T., Kuhara, T. and Matsumoto, I. : Pediatr. Res., **17** : 92, 1983.
- 15) 岡成 寛, 五十嵐良雄, 成沢邦明, 多田啓也 : 脳と発達, **16** : 32~37, 1984.
- 16) Kuhara, T., Inoue, Y., Matsumoto, M., Shinka, T., Matsumoto, I., Kitamura, K., Fujii, H. and Sakura, N. : Clin. Chim. Acta., **145** : 135~142, 1985.
- 17) Kuhara, T. and Matsumoto, I. : Biomed. Mass Spectrom., **1** : 291~294, 1974.
- 18) Matsumoto, I., Kuhara, T. and Yoshino, Y. : Biomed. Mass Spectrom., **3** : 1976.
- 19) Kuhara, T., Hirokata, Y., Yamada, S. and Matsumoto, I. : Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., **3** : 171~177, 1978.
- 20) Harrington, W., Lin, A., Lonsdale, D. and Igou, D. : Clin. Chim. Acta., **74** : 247~254.
- 21) Kochen, W., Schneider, A. and Ritz, A. : Eur. J. Pediatr., **141** : 30~35, 1983.



## 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



### 1.序

イソ吉草酸血症がTanakaらによって1966年に発見されて以来,ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)が有機酸代謝異常症の研究や診断に非常に有用な分析機器として用いられるようになり,Jeilum らのガスクロマトグラフィー質量分析計・コンピュータ(GC-MS-COM)システムの積極的な応用に始まって,メチルマロン酸尿症,プロピオン酸血症,ピログルタミン酸血症などが相次いで発見され,GC/MS分析が導入された1966年以前には7種類しか知られていなかった先天性有機酸代謝異常症が,1980年には45種類も知られるようになった。

厚生省の新生児スクリーニングが開始された同じ年の昭和52年4月から,われわれはGC-MS-COMシステムを用いて先天性有機酸代謝異常症とアミノ酸代謝異常症の精密・多項目スクリーニングを開始した。当初22疾患を対象として発足したが,その後研究を重ねて順次診断対象の疾患数を増やし,昭和58年4月から100疾患についてスクリーニングを実施してきて,昭和61年2月末日までに47疾患,271症例の化学診断に成功した。

このように,従来その鑑別診断が不可能であった疾患群の中の個々の疾患の鑑別診断の系を逐次開発しながら,化学診断の対象とする疾患の数を順次増やして,より精密で,より多数の疾患の迅速な化学診断システムの開発を目指して研究をおこなっている。その成果の一部を紹介する。また本研究では,従来の手法では殆んど診断不可能であった疾患の化学診断と解析を可能にしてきた。その例として重篤な肝臓や腎臓障害を伴うチロジン症型について得られた成果の概要を報告する。この化学診断法はまた薬物や毒物などの作用や副作用を解析する上でも,極めて有用である。抗てんかん薬,バルプロ酸(VPA)服用中の患者中から3名の先天性代謝異常症患者と,1人のReye症候群患者を発見したことについて最後に報告し,GC-MS-COMによる化学診断の有用性を述べる。