

# グルタル酸尿症 (I 型) 例の尿中 グルタリルカルニチンの同定について

研究協力者 和田 義 郎

共同研究者 木戸内 清 杉山 成 司

森下 秀子 小林 正 紀

(名古屋市立大学医学部小児科)

有機酸代謝異常症の病態の解明に伴い、新しい治療法が試みられている。われわれもプロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症、およびグルタル酸尿症 (I 型) にカルニチン療法が有効であることを報告し、またカルニチン療法の生化学的指標として患児のミトコンドリア内に蓄積する有機酸とカルニチンが結合した特異的なアシルカルニチンの定量分析の重要性を指摘してきた<sup>1)</sup>。しかし臨床的に有用なアシルカルニチン分画の分析法が確立していないために、プロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症においてプロピオニルカルニチンが、またイソバレリル酸尿症でイソバレリルカルニチンが検出されているにすぎず、グルタリルカルニチンは未だ証明されていなかった。

われわれはカルボン酸分析計<sup>2)4)</sup>のカルボキシル基に特異的な反応系に着目し、高速液体クロマトグラフィーの分離カラムを用い、カルボン酸分析計を検出系としたカルニチンおよびアシルカルニチン分画分析法の開発に取り組んでいる。今回この方法によりグルタル酸尿症 (I 型) 例の尿中グルタリルカルニチンを同定したので、この新しい分析法について報告する。

## 研究方法および結果

症例はグルタル酸尿症 (I 型) 例の 1 歳の男児で<sup>2)</sup>、L-カルニチン 100 mg/kg/day の経口投与時の患児の尿を分析に用いた。患児の尿 300  $\mu$ l を陰イオン交換樹脂にかけて有機酸を除き凍結乾燥後に 300  $\mu$ l の分析用溶出液に溶解し、その 100  $\mu$ l を分析した。アセチルカルニチンは Bohmer, T. と Bremer, J. の方法<sup>5)</sup>により、またグルタリルカルニチンは彼らの方法を参考にしてグルタル酸無水物を用いて合成した。グルタル酸無水物 4.4 g と L-カルニチン 5.0 g をそれぞれ 8 ml のトリフルオロ酢酸に溶解し 40°C で一夜反応させたのち、反応液に 100 ml のアセトンを加え、0°C に冷却し不溶性物質を遠沈除去した。さらに 250 ml のエチルエーテルを加えて油脂状の析出物を得た。この油脂状物質を 2 ml の蒸留水に溶解し、DoweX 1-X8 を用いて未反応のグルタル酸を除いた。次に ODS カラム (20 mm  $\times$  250 mm) を用いた逆相クロマトグラフィーによりグルタリルカルニチン分画を採取し、凍結乾燥にて乾燥させた。グルタリルカルニ

表1 Elution times of carnitine, acylcarnitine, acetic acid and glutaric acid

| Compounds         | Elution times (m) |
|-------------------|-------------------|
| Carnitine         | 24.6              |
| Acetic acid       | 29.4              |
| Acetylcarnitine   | 33.0              |
| Glutaric acid     | 41.4              |
| Glutarylcarnitine | 55.8              |

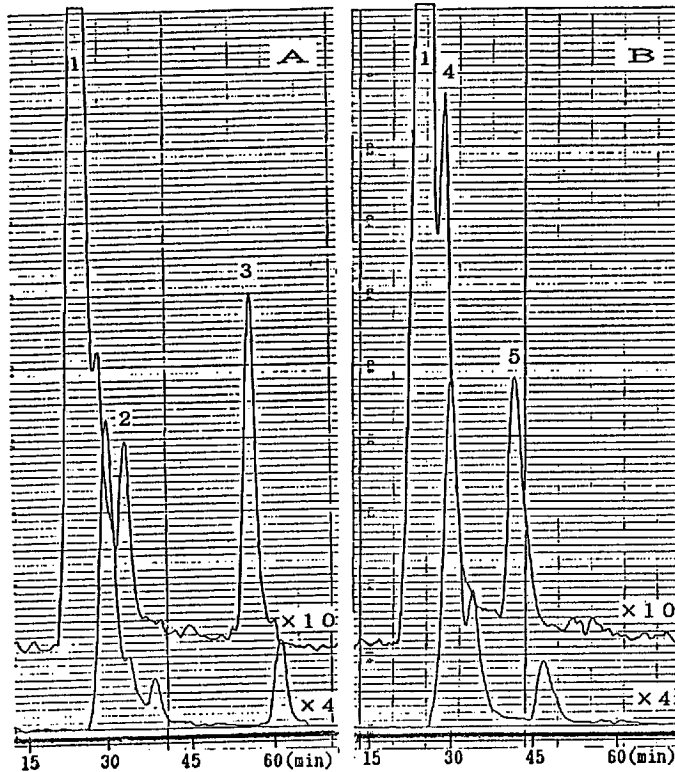


図1 A : Chromatogram of the urine from the patient with glutaric aciduria type 1 on L-carnitine 100mg/kg daily.  
 Peaks : 1=carnitine+amino acids ; 2=acetylcarnitine ; 3=glutarylcarnitine.  
 B : Chromatogram of the hydrolyzed urine of the same patient.  
 Peaks : 1=carnitine+amino acids ; 4=acetic acid ; 5=glutaric acid.

チンは結晶として得られなかったので、その同定は、下記のアシルカルニチン分析法により溶出時間55.8分の単一のピークを得たことと、加水分解後にそのピークが消失し、カルニチンとグルタル酸を検出したことにより行った。

分析はカルボン酸分析計(東京理科 KK)に CLC-ODS カラム [(15 cm×6 mm) 島津

KK, 60°C] を接続し, 100 mmol の過塩素酸 Na を含む 10 mmol のリン酸バッファー (PH 2.38) を溶出液として流速 0.2 ml/min で分析した。

カルニチン, 酢酸, アセチルカルニチン, グルタル酸, グルタリルカルニチンの溶出時間 (分) はそれぞれ 24.6, 29.4, 33.0, 41.4, 55.8 であり良好な分離を得た (表 1)。しかしアミノ酸の溶出時間 (分) は 22.0 から 25.0 であり, この分析条件下ではカルニチンとアミノ酸との分離はできなかった。症例の尿分析クロマトグラムでは, アミノ酸およびカルニチンとアセチルカルニチンのピークの他に正常児の尿では認められないグルタリルカルニチンの溶出時間に一致したピークを認めた (図 1 A)。この試料の加水分解後の分析クロマトグラムにはアセチルカルニチンとグルタリルカルニチンの溶出時間に一致するピークは消失し, 代わって酢酸とグルタル酸の溶出時間に一致した 2 つのピークが現れていた。同時にカルニチンの溶出時間に一致するピークの増加も認められた (図 1 B)。またグルタリルカルニチンの分画は加水分解後の分析でグルタリルカルニチンの溶出時間に一致するピークは消えて, カルニチンとグルタル酸のピークに分離した。以上の結果よりグルタル酸尿症 (I 型) 例において尿中グルタリルカルニチンを同定した。

## 考 案

カルニチンはミトコンドリア内膜を介しての脂肪酸の輸送に関与し, 脂肪酸の酸化, ミトコンドリア内の遊離 CoASH の調節, 側鎖アミノ酸の酸化にも影響を及ぼすために, 周生期の病態生理や先天性有機酸代謝異常症などの種々の疾患におけるカルニチン代謝が注目されている。しかしカルニチンの代謝産物であるアシルカルニチン分画の定量分析法は isotope exchange 法<sup>6)</sup>と Fast atom bombardment mass spectrometry を検出系にした液体クロマトグラフィー法<sup>7)</sup>が報告されているにすぎない。これらの分析法は放射性物質や質量分析計が必要であり, 分析法として大きな制約を持ち, また分析可能なアシルカルニチンの種類が限られている。臨床の場で用いることができ, 広範囲のアシルカルニチン分画の分析が可能な方法が確立されていないために, カルニチンの代謝動態の解明に障害となっている。これは, 非揮発性で, 従来の定量的分析法では検出できなかった四級アンモニウム基とカルボキシル基しかもたず, 熱とアルカリに不安定なエステル結合をもつアシルカルニチンの物理化学的物性に起因している。

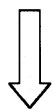
われわれは優れた分離能を有する高速液体クロマトグラフィーの分離カラムをカルボキシル基の特異的検出定量が可能なカルボン酸分析計に接続した新しいアシルカルニチン分画分析法を開発し, これを用いて L-カルニチンを投与したグルタル酸尿症 (I 型) 例の尿中にグルタリルカルニチンの存在を証明した。このことは, われわれが既に報告したカルニチン療法の有用性を生化学的に裏づけるものであり, 同時に種々の有機酸代謝異常症にカルニチン療法を適用できる可能性を示していると思われた。またグリタリルカルニチンの存在は短鎖脂肪酸に特異性のあるカルニチンアセチルトランスフェラーゼがグルタリルカルニチンの生成にも関与す

るカルニチンアシルトランスフェラーゼとして作用するのか、あるいはカルニチンオクタノイルトランスフェラーゼの存在をうかがわせるもので極めて興味のある点である。

カルニチン、アセチルカルニチンおよびグリタリルカルニチンの標品の分析クロマトグラムでそれらの良好な分離を得たことより、本分析法によりそれら3種のアシルカルニチンの同時分析が可能であった。生体資料の分析ではアミノ酸とカルニチンとの溶出時間が同じであるために、前処理で有機酸とともにアミノ酸を除くか、あるいは溶出液をさらに検討する必要がある。分析条件の調整によりイソバレリルカルニチンやバルプロイルカルニチンなどの他のアシルカルニチン分画の分析にも本法を用いることができ、有用な臨床アシルカルニチン分画分析法として確立できると思われた。

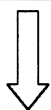
## 文 献

- 1) Sugiyama, N. et al. : Biochemical Evidence of Carnitine Effect on Propionate Elimination. *J. Inher. Metab. Dis.*, **7** : 137, 1984.
- 2) 森下秀子, 他 : 急性脳症で発症したグルタル酸尿症 I 型—新しい治療の試み—第28回日本先天代謝異常学会発表 (於熊本), 1981.
- 3) 木戸内清 : カルボン酸分析計の臨床的応用, 1. 基礎的検討. *名市大医学会誌*, **36** : 285, 1985.
- 4) 小林正紀, 他 : VB 12不応性メチルマロン酸尿症の出生前診断に関する検討. *日児誌*, **85** : 1589, 1981.
- 5) Bohmer, T. et al. : Propionylcarnitine, Physiological Variations in vivo. *Biochim Biophys Acta.*, **152** : 559, 1958.
- 6) Kerner, J. et al. : A Radioisotopic-Exchange Method for Quantitation of Short-Chain(Acid-Soluble)Acyl-Carnitines. *Anal. Biochem.*, **134** : 459, 1983.
- 7) Millington, D.S. et al. : Application of High Resolution Fast Atom Bombardment and Constant B/E ratio Linked Scanning to the Identification and Analysis of Acylcarnitines in Metabolic Disease. *Biomed. Mass Spectromet.*, **11** : 236, 1984.



## 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



有機酸代謝異常症の病態の解明に伴い,新しい治療法が試みられている。われわれもプロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症,およびグルタル酸尿症(Ⅰ型)にカルニチン療法が有効であることを報告し,またカルニチン療法の生化学的指標として患児のミトコンドリア内に蓄積する有機酸とカルニチンが結合した特異的なアシルカルニチンの定量分析の重要性を指摘してきた。しかし臨床的に有用なアシルカルニチン分画の分析法が確立していないために,プロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症においてプロピオニルカルニチンが,またイソバレリル酸尿症でイソバレリルカルニチンが検出されているにすぎず,グルタリルカルニチンは未だ証明されていなかった。

われわれはカルボン酸分析計のカルボキシル基に特異的な反応系に着目し,高速液体クロマトグラフィーの分離カラムを用い,カルボン酸分析計を検出系としたカルニチンおよびアシルカルニチン分画分析法の開発に取り組んでいる。今回この方法によりグルタル酸尿症(Ⅰ型)例の尿中グルタリルカルニチンを同定したので,この新しい分析法について報告する。