

# Acylcarnitine 分析による先天性有機酸代謝異常症の診断

小林正紀 木戸内清 和田義郎  
(名古屋市立大学医学部小児科)

## 研究目的

先天性有機酸代謝異常症のスクリーニングはカルボン酸分析計（以下 CAA）やガスクロマトグラフィー（以下 GC）、GC-マスマスペクトロメトリーによる尿有機酸分析法が専ら用いられている<sup>1)</sup>。しかし尿中の有機酸は患児の全身状態によって著しく変化するために、特異的な有機酸の検出ができず、診断が不可能な場合がある。最近、先天性有機酸代謝異常症で生体内に蓄積する有機酸のアシル CoA とカルニチンとが結合したアシルカルニチン、すなわち、メチルマロン酸尿症とプロピオン酸血症ではプロピオニルカルニチン、イソ吉草酸血症ではイソバレリルカルニチン、グルタル酸尿症 1 型ではグルタリルカルニチン<sup>2)</sup>、また中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症（以下 MCAD）ではオクタノイルカルニチンが尿中に排泄されることが明らかになった<sup>3)</sup>。杉山らはラジオアイソトープ法を用いて羊水中のプロピオニルカルニチンを定量し、プロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症の出生前診断が可能であることを報告した<sup>4)</sup>。またファーストアトムボンバードメントマスマスペクトロメトリー（以下 FAB-MS）を用いて、カルニチン負荷例の尿オクタノイルカルニチンを検出することにより、無症状の MCAD が診断された<sup>3)</sup>。わたしたちは CAA を応用したアシルカルニチン分画分析法を用いてグルタル酸尿症 1 型でグルタリルカルニチンを同定したが<sup>5)</sup>、この方法を先天性有機酸代謝異常症のスクリーニング法として確立するために検討したので報告する。

## 方法および対象

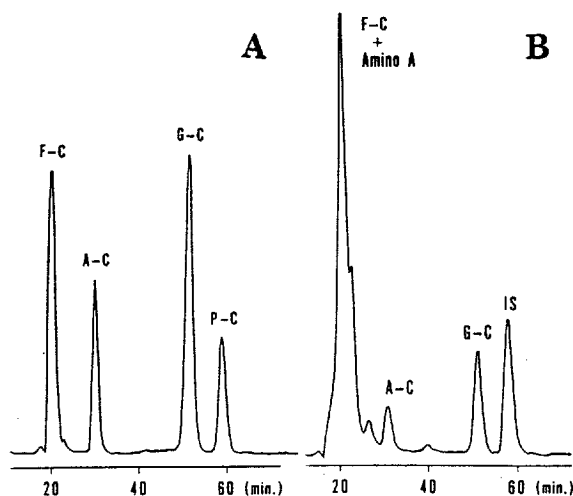
8 種のアシルカルニチンはカルニチンと有機酸の酸無水物あるいは酸クロライドと反応させ、95%以上の純度が得られるまで精製し、FAB-MS とプロトン NMR で同定した。

グルタル酸尿症 1 型例、プロピオン酸血症例および健常例の尿は陰イオン交換樹脂を用いて有機酸を除き分析した。バルプロ酸服用前後のてんかん例の尿 (10ml) は注射器で SEPAKC<sub>18</sub> カートリッジに注入し、10 ml の蒸留水と 5% のエタノール 2 ml で洗浄後、2 ml の 80% エタノール 2 ml で中鎖アシルカルニチンを溶出した。溶出液を凍結乾燥後に 0.5~1.0 ml の蒸留水に溶解し、その 100  $\mu$ l を分析した。

CAA（東京理科器械）によるアシルカルニチン分析は既に報告した方法<sup>5)</sup>を基にして、短鎖アシルカルニチン分析には 120 mM 過塩素酸ナトリウム（1 水塩）を加えた 10 mM 磷酸バッファー/5% アセトニトリル液を分離液とし、カラム温度は 40°C を用いた。中鎖アシルカルニチンの分析には 35% のアセトニトリル濃度を用いた。

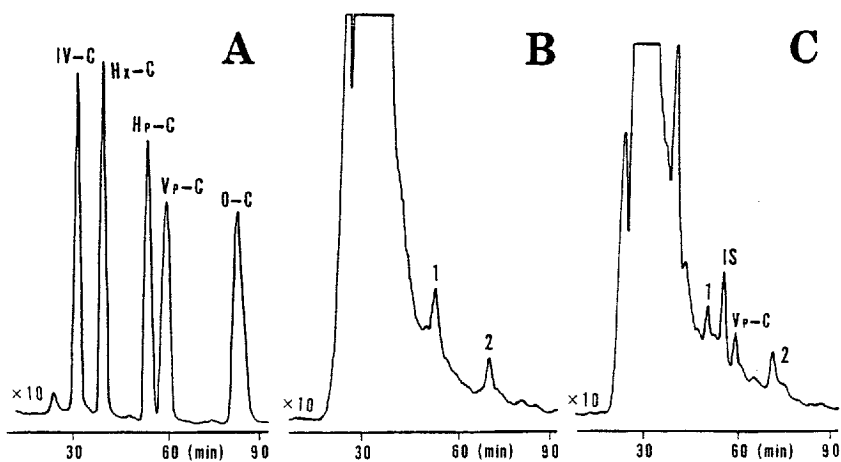
## 結 果

短鎖および中鎖アシルカルニチンの分離は良く (図 1A, 図 2A), その分離時間 (分) はア



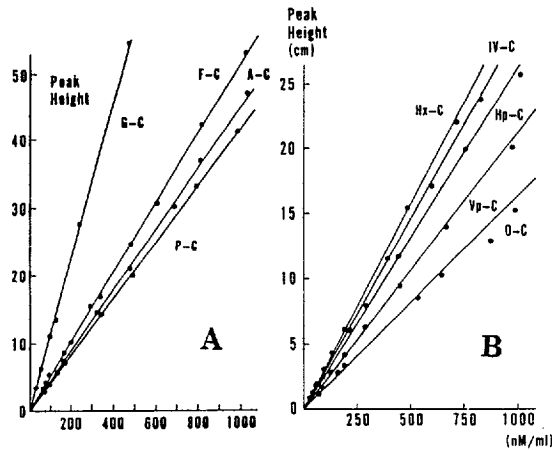
A: Chromatogram showing separation of free carnitine (F-C), acetylcarnitine (A-C), glutarylcarnitine (G-C) and propionilcarnitine (P-C).  
 B: Chromatogram of urine sample from a patient with glutaric aciduria type 1. IS=internal standard (propionylcarnitine).

図 1



Chromatogram showing separation of 5 medium chain acylcarnitines.  
 A: Separation of synthesized isovalerylcarnitine (IV-C), hexanoylcarnitine (Hx-C), heptanoylcarnitine (Hp-C), valproylcarnitine (Vp-C) and octanoylcarnitine (O-C).  
 B: Chromatogram of urine sample from a patient with epilepsy before valproate therapy. Peaks; 1 and 2=unknown. C: Chromatogram of urine sample from the same patient on valproate therapy (8.2 mg/kg/day). Peaks; 1 and 2=unknown, IS=internal standard (heptanoylcarnitine).

図 2



Calibration curves for synthesized acylcarnitines.

A: Carnitine (F-C) and short chain acylcarnitines; acetylcarnitine (A-C), glutarylcarnitine (G-C) and propionylcarnitine (P-C).

B: Medium chain acylcarnitines; isovalerylcarnitine (IV-C), hexanoylcarnitine (Hx-C), heptanoylcarnitine (Hp-C), valproylcarnitine (Vp-C) and octanoylcarnitine (O-C).

図 3

セチルカルニチン 29.7, グルタルカルニチン 51.0, プロピオニルカルニチン 59.4, イソバレルカルニチン 33.0, ヘキサノイルカルニチン 40.8, ヘプタノイルカルニチン 55.1, バルプロイルカルニチン 59.5, オクタノイルカルニチン 84.2であった。尿中に加えた標品の分離時間もそれぞれ同じであり、安定していた。100 mM の過塩素酸・リン酸バッファーでは尿アミノ酸等のピークとアセチルカルニチンの分離は不十分であったが<sup>5)</sup>、この分析条件ではアセチルカルニチンの分離もよく、70分以内にプロピオニルカルニチンの検出が可能になった。標品の検量曲線は 30 nmol/ml~70 nmol/ml から 1000 nmol/ml の間で原点を通るよい直線性が認められた (図 3)。

グルタル酸尿症 1 型の尿ではアセチルカルニチンと健常例の尿には認められないグルタルカルニチンを検出し (図 1B), FAB-MS 分析の結果と同様なパターンであった<sup>6)</sup>。またプロピオン酸血症例の尿にはプロピオニルカルニチンを検出した。

バルプロ酸服用例の尿ではその服用前 (図 2B) には認められないバルプロイルカルニチンを検出した (図 2C)。その値はバルプロ酸服用 1 日目と 5 日目の尿で 40.7~47.7 nmol/mg creatinine であった。これらの尿にはオクタノイルカルニチンのピークは認められず、その尿中濃度は 7 nmol/ml 以下であった。

## 考 案

先天性有機酸代謝異常症におけるカルニチンの欠乏状態は、生体内に蓄積したアシル CoA

がアシルカルニチンとして尿中に排泄される結果生じると考えられている。アシルカルニチンの生成系は重要な有機酸代謝系として位置づけられる。アシルカルニチン分析によってカルニチン療法の生化学的指標が得られるに留まらず、その診断的価値が確立されると思われる。しかしアシルカルニチン分析による先天性有機酸代謝異常症の診断における有用性の報告は未だ少ない<sup>34)</sup>。これは臨床の場で用いることのできる簡便なアシルカルニチン定量分析法が確立していないためと思われる。CAAを用いた分析法は尿中の有機酸を除くのみで分析でき、分離液のアセトニトリル濃度を変えることにより、短鎖および中鎖アシルカルニチンの分析が可能となった。ステップグラジエント法を用いてアセトニトリル濃度を段階的に変えればイソバレルカルニチンやヘキサノイルカルニチンを含めたより広範囲のアシルカルニチンの同時定量分析が可能となる。またバルプロイルカルニチンの定量に用いた前処理法は容易に試量の濃縮ができ、中鎖アシルカルニチン、特にオクタノイルカルニチンの微量定量分析法に応用できるので、中鎖 acyl CoA 脱水素酵素欠損症 (MCAD) の寛解時の診断にも有用であると思われる。

## 文 献

- 1) 小林正紀, 他: VB<sub>12</sub> 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.
- 2) 森下秀子, 他: 急性脳症で発症したグルタル酸尿症 1 型—新しい治療の試み—. 日本先天代謝異常学会誌, 2: 94, 1986.
- 3) Roe CR, *et al.*: Recognition of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in asymptomatic siblings of children dying of sudden infant death or Reye-like syndromes. *J. Pediatr.*, 1986; 108: 13-18.
- 4) 杉山成司, 他: 有機酸代謝異常の発症予防に関する一つの試み: プロピオン酸血症, メチルマロン酸尿症における尿中, 羊水中プロピオニルカルニチンの意義. 厚生省心身障害研究先天異常のモニタリングに関する研究, 昭和 59 年度研究報告書, p. 122, 1984.
- 5) Kidouchi K., *et al.*: Identification of glutaryl carnitine in glutaric aciduria type 1 by carboxylic acid analyzer with an ODS reverse-phase column. *Clin. Chim. Acta*, 1987; (in press).
- 6) 木戸内 清, 他: グルタル酸尿症 1 型の尿有機酸分析とグルタリルカルニチンの同定について, 医用マス研究会講演集, 11: 239, 1986.



## 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

先天性有機酸代謝異常症のスクリーニングはカルボン酸分析計(以下 CAA)やガスクロマトグラフィー(以下 GC),GC-マススペクトロメトリーによる尿有機酸分析法が専ら用いられている.しかし尿中の有機酸は患児の全身状態によって著しく変化するために,特異的な有機酸の検出ができず,診断が不可能な場合がある.最近,先天性有機酸代謝異常症で生体内に蓄積する有機酸のアシル CoA とカルニチンとが結合したアシルカルニチン,すなわち,メチルマロン酸尿症とプロピオン酸血症ではプロピオニルカルニチン,イソ吉草酸血症ではイソバレリルカルニチン,グルタル酸尿症 1 型ではグルタリルカルニチン,また中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症(以下 MCAD)ではオクタノイルカルニチンが尿中に排泄されることが明らかになった.杉山らはラジオアイソトープ法を用いて羊水中のプロピオニルカルニチンを定量し,プロピオン酸血症とメチルマロン酸尿症の出生前診断が可能であることを報告した.またファーストアトムボンバードメントマススペクトロメトリー(以下 FAB-MS)を用いて,カルニチン負荷例の尿オクタノイルカルニチンを検出することにより,無症状の MCAD が診断された.わたしたちは CAA を応用したアシルカルニチン分画分析法を用いてグルタル酸尿症 1 型でグルタリルカルニチンを同定したが,この方法を先天性有機酸代謝異常症のスクリーニング法として確立するために検討したので報告する.