

先天性ケトン体代謝異常症の簡便な診断法に関する研究

(分担研究：効果的な小児慢性特定疾患治療研究事業の推進に関する研究)

研究協力者：山口清次*

共同研究者：木村正彦*、渡辺浩*

要旨：ケトーシスをきたす患者の中に隠れている先天代謝異常症を早期診断するためのシステムを検討した。尿中有機酸をGC/MSで分析し、そのデータを自動処理・自動診断するコンピュータープログラムを開発した。さらにGC/MSで診断できないケトン体代謝異常症を診断するために、末梢血リンパ球を用いた簡便な先天性ケトン体代謝異常症の酵素診断法を確立した。リンパ球をジギトニンで処理して遠心し、サイトソル画分とオルガネラ画分に分けて、ケトン体代謝関連酵素であるアセトアセチル-CoAチオラーゼ、3-ケトオクタノイル-CoAチオラーゼおよびサクシニル-CoA：3-ケト酸CoAトランスフェラーゼを測定した。分画効率の至適条件のもとで、酵素活性測定を行ったところ、細胞質型チオラーゼのほとんどがサイトソル画分に集まり、ミトコンドリア型チオラーゼのほとんどがオルガネラ画分に集まった。この所見はイムノプロトでも裏付けられた。本研究によって、これまで酵素診断の最も難しかったCT欠損症の酵素診断も可能になった。

見出し語：有機酸代謝異常症、ケトン体代謝異常症、GC/MS、酵素診断

研究目的

小児期のケトーシス患者は「自家中毒症」として片付けられることが多い。その中に有機酸代謝異常症などの先天代謝異常症が含まれていることがある。有機酸代謝異常症はGC/MSによる尿中有機酸分析によって診断される¹⁾。ケトン体代謝異常症は有機酸代謝異常症に含まれるが、GC/MSによって診断の困難なことがある。先天性ケトン体代謝異常症として現在β-

ケトチオラーゼ（ミトコンドリア・アセトアセチル-CoA）チオラーゼ欠損症（以下T2欠損症）、細胞質型チオラーゼ欠損症（以下CT欠損症）、サクシニル-CoA：CoAトランスフェラーゼ欠損症（以下SCO欠損症）の3つが知られている²⁾。これらを早期に診断して発作を予防できれば、障害予防につながる。そこで一般診療の場で応用できるようなGC/MSを用いた尿中有機酸分析システムと、末梢リンパ球を用いた先天

*：島根医科大学小児科

性ケトン体代謝異常症の簡便な酵素診断法を確立した。

研究方法

1) GC/MSデータ処理自動化

尿中有機酸を既報の方法¹⁾でGC/MS分析し、データを自動解析して、疑わしい病名をアウトプットするシステム²⁾を確立した。原理は、マスキロマトグラフィーとメチレンユニット値から化合物を同定し、定量は加えた内部標準に対する相対面積値で表わした。さらに正常値と比較して異常化合物を同定した。引きつづき異常化合物の組み合わせから、考えられる疾患をアウトプットする。

2) リンパ球を用いたケトン体代謝関連酵素測定法の確立

ヘパリン血から末梢リンパ球を分離して、EB-ウィルス・トランスホームリンパ球 (EB-

リンパ球)³⁾を調整した。リンパ球をジギトニンで処理して、サイトソル画分とミトコンドリアを含むオルガネラ画分に分けた⁴⁾。酵素活性はサイトソル画分に局在する細胞質型チオラーゼ (CT) と、ミトコンドリア酵素であるa)ミトコンドリアチオラーゼ (T2)⁵⁾、b)サクシニル-CoA: CoAトランスフェラーゼ (SCOT)⁶⁾を測定した。また分画効率を検討するため、サイトソル局在酵素の乳酸脱水素酵素 (LDH)、ミトコンドリア局在酵素のクエン酸脱水素酵素 (CS) の活性も測定した。

研究結果

1) GC/MSデータ自動解析システム

図1 β-ケトチオラーゼ欠損症の分析結果アウトプットの例を示した。異常物質として2-methyl-3-OH-butyrate、およびtiglylglycine-mono TMS, - di TMSを異常と判定し*印をつ

ID	Compound	VALUE	NORMAL	RANGE	FACTOR
1	Lactic-2	0.51	{ 0.80	{ 0.00 - 4.70 }	0.63
4	Glycolic-2	1.63	{ 0.70	{ 0.00 - 2.20 }	2.32
9	Pyruvic-OX-2	5.00	{ 4.50	{ 0.00 - 24.10 }	1.11
11	3-OH-butyrac-2	0.17	{ 0.70	{ 0.00 - 3.70 }	0.24
12	3-OH-isobutyric-2	2.12	{ 2.50	{ 0.00 - 9.00 }	0.85
14	2-Methyl-3-OH-butyrac-1-2	23.75 *	{ 0.00	{ 0.00 - 0.30 }	?
19	Ethylhydracrylic-2	1.29	{ 0.00	{ 0.00 - 2.90 }	?
20	Urea-2	144.11	{ 376.10	{ 104.60 - 763.00 }	0.38
(中略)					
71	5-Oxoproline-2(pyroglutamic)	1.58	{ 0.90	{ 0.00 - 7.60 }	1.76
72	3-methyladipic	0.64	{ 4.30	{ 0.00 - 23.30 }	0.15
76	5-OH-methyl-2-furoic-1	2.03	{ 0.00	{ 0.00 - 0.00 }	?
77	Tiglylglycine-2	277.85 *	{ 0.00	{ 0.00 - 0.00 }	?
79	Tiglylglycine-1	37.35 *	{ 0.10	{ 0.00 - 0.00 }	373.49
81	2-OH-glutaric-3	0.61	{ 2.30	{ 0.60 - 5.90 }	0.26
86	3-OH-phenylacetic-2	0.35	{ 0.40	{ 0.00 - 0.90 }	0.88
87	2-Ketoglutaric-OX-2(1)	3.75	{ 26.10	{ 3.00 - 102.90 }	0.14
88	4-OH-benzoic-2	3.54	{ 3.80	{ 0.00 - 7.80 }	0.93
89	4-OH-phenylacetic	17.88	{ 27.10	{ 8.60 - 73.20 }	0.66
(中略)					
131	3,6-Epoxytetradecanedioic-2	0.39	{ 0.90	{ 0.00 - 3.90 }	0.44
132	Tetracosane(C24)	58.10	{ 0.00	{ 0.00 - 0.00 }	?

No. Diseases suspected of:

3 3-ketothiolase deficiency

図1. GC/MSデータ自動解析のアウトプットの例

症例: βケトチオラーゼ欠損症。MRA, 定量値; MEAN, 正常平均値; RANGE, 正常者の範囲; *, 異常高値であることを示す。Deases suspected of: , 考えられる疾患をアウトプット。

けて検出している。このプロフィールから考えられる診断名として 3-ketothiolase deficiency をアウトプットしている。同様にしてこの他の症例をテストしたが、正しい診断名をはずさないことを確認した。

2) ケトン体代謝関連酵素測定法の検討

a) EB-リンパ球を用いて、サイトソルとオルガネラ画分が効率的に分離する条件を検討した。その結果、ジギトニン濃度1mg/ml、接触時間1分、細胞密度は $5 \times 10^7/\mu\text{l}$ の条件が良いことを確認した。

b) 各分画のケトン体関連酵素活性の検討：
以上の条件下で、EB-リンパ球を用いてケトン体関連酵素を調べたところ、表1に示したように、サイトソル画分にはLDHの88%、一方オルガネラ画分にはCSの80%が分布した。アセトアセチル-CoAを基質としたチオラーゼ活性は、サイトソル画分ではKイオンで活性化されず+K/-K比は1.0であった。オルガネラ画分のそれは+K/-K比が2.3であり、Kイオンによる活性化が認められた。またオルガネラ画分には、3-ケトオクタノイル-CoAチオラーゼ活性の94%、SCOT活性の97%が認められた。

3) イムノプロット解析：CT、T2およびミトコンドリア中鎖型チオラーゼ (T1) について、サイトソル画分とオルガネラ画分の酵素タンパクを調べた。図2に示すように、CTは

オルガネラ画分には検出されず、サイトソル画分、細胞ホモジネート、剖検肝のレーンに検出された。またミトコンドリア局在酵素であるT2、T1はサイトソル画分には認められず、オルガネラ画分、細胞ホモジネート、剖検肝のレーンに検出された。

考察

小児期のケトーシスは比較的よく遭遇する病態である。感染・下痢などの種々の急性疾患に引き続いてみられたり、長時間絶食後や糖尿病の急性増悪、あるいはケトン性低血糖症などの病態も有名である。先天代謝異常症として、有機酸代謝異常症、先天性ケトン体代謝異常症、糖新生系異常症、ミトコンドリア脳筋症などがある。有機酸代謝異常症の診断にはGC/MS分析が不可欠であるが、GC/MSデータの解析には熟練を要する。しかも今回GC/MSデータ処理の自動化が実現した。

先天性ケトン体代謝異常症として、a) β ケトチオラーゼ欠損症 (ミトコンドリアアセトアセチル-CoAチオラーゼ欠損症、T2欠損症)、b) 細胞質型チオラーゼ (CT) 欠損症およびSCOT欠損症が知られている。本研究によって、末梢血リンパ球を用いる簡便なケトン体代謝異常症の酵素診断法が確立した。リンパ球をサイトソルとミトコンドリアに分画して、CT、T2、

表1. EB-リンパ球の細胞内分画後のケトン体代謝関連酵素活性分布 (%)

	LDH	CS	acetoacetyl-CoA thiolase			C8-CoA	SCOT
			K(+)	K(-)	(K+/K-比)		
サイトソル画分	88	20	62	78	(1.0)	6	3
オルガネラ画分	12	80	38	22	(2.3)	94	97
活性総和	100	100	100	100	(1.9)	100	100

LDH: サイトソル乳酸脱水素酵素、CS: ミトコンドリアクエン酸合成酵素、K(+), K(-)はKイオン存在下および非存在下のチオラーゼ活性、(K+/K-比)は、K(+)とK(-)の活性値の比を表わす。C8-CoA: 3-ケトオクタノイル-CoAチオラーゼ活性; SCOT, サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoAトランスフェラーゼ活性。

SCOTの活性を分けて測定できることが確認された。

本研究において、われわれは「アセトン血性嘔吐症」と診断されている患者の中に隠れている可能性のある先天性有機酸代謝異常症、特にケトン体代謝異常症の簡便な鑑別診断法を確立した。本疾患は早期発見によって障害予防が期待できる。今後本システムを実際の臨床の場に応用してゆきたい。

文献

- 1) 山口清次 (1995) 有機酸の分析. 最新のマススペクトロメトリー (丹羽利充/編)、化学同人, p58-79.
- 2) Saudubray JN, Specola N, Middleton B, Lombes A, Bonnefont JP, Jacobs C, Vassault A, Charpentier C, Day R (1987) *Enzyme* 38: 80-90.

- 3) 木村正彦、山口清次、渡辺宏雄、深尾敏幸、山本孝 (1995) 日本医用マススペクトル学会講演集, 20: 185-188.
- 4) Steinitz M, Klein G, Koskimies S, Makel O (1977) *Nature*. 269: 420-422.
- 5) Mackall J, Meredith M, Lane MD (1979) *Anal. Biochem.* 95: 270-274.
- 6) Yamaguchi S, Orii T, Sakura N, Miyazawa S, Hashimoto T (1988) *J. Clin. Invest.* 81: 813-817.
- 7) Sakazaki H, Hirayama, K, Murakami S, Yonezawa H, Shintaku Y, Sawada Y, Fukao T, Watanabe H, Orii T, Isshiki G (1995) *J. Inher. Metab. Dis.* 18: 323-325.

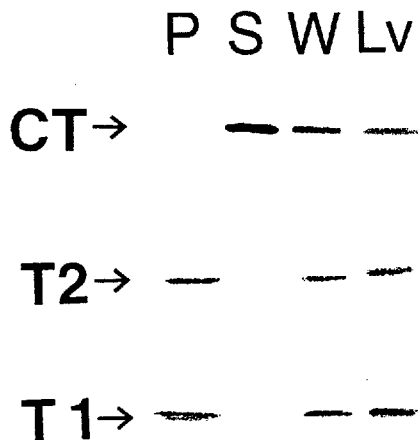


図2. イムノブロット解析

略字: CT, cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase;
 T2, mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase;
 T1, mitochondrial medium-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase;
 P, pellet (organelle fraction); S, supernatant (cytosol fraction);
 W, whole cell homogenate; Lv, autopsied human liver.



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



要旨:ケトーシスをきたす患者の中に隠れている先天代謝異常症を早期診断するためのシステムを検討した.尿中有機酸を GC/MS で分析し、そのデータを自動処理・自動診断するコンピュータプログラムを開発した. さらに GC/MS で診断できないケトン体代謝異常症を診断するために、末梢血リンパ球を用いた簡便な先天性ケトン体代謝異常症の酵素診断法を確立した. リンパ球をジギトニンで処理して遠心し、サイトソル画分とオルガネラ画分に分けて、ケトン体代謝関連酵素であるアセトアセチル-CoA チオラーゼ、3-ケトオクタノイル-CoA チオラーゼおよびサクシニル-CoA : 3-ケト酸 coA トランスフェラーゼを測定した. 分画効率の至適条件のもとで、酵素活性測定を行ったところ、細胞質型チオラーゼのほとんどがサイトソル画分に集まり、ミトコンドリア型チオラーゼのほとんどがオルガネラ画分に集まった. この所見はイムノプロトでも裏付けられた. 本研究によって、これまで酵素診断の最も難しかった CT 欠損症の酵素診断も可能になった.