

## 高速液体クロマトグラフィーによる尿中ポルフィリン・ パターン解析の診断システムへの応用

近 藤 雅 雄, 李 存 保

(国立公衆衛生院・栄養生化学部)

藤 岡 裕 二

(新日本製鉄㈱・先端技術研究所解析科学研究部)

柳 沢 久

(新日鉄情報通信システム㈱・科学技術システム部)

## Application of urinary porphyrin pattern analysis to a diagnosis system for porphyria by high-performance liquid chromatography

Masao KONDO, Chunbao LI

(from Department of Nutrition and Biochemistry, The Institute of Public Health)

Yuji FUJIOKA

(from Advanced Materials and Technology Research Laboratories Materials Characterization,  
Nippon Steel Corporation)

Hisashi YANAGISAWA

(from Science and Engineering System, Steelmaking System Division, Nippon Steel Information  
and Communication Systems Inc.)

M. KONDO, C. LI, Y. FUJIOKA, H. YANAGISAWA *Application of urinary porphyrin pattern analysis to a diagnosis system for porphyria by high-performance liquid chromatography*, Bull. Inst. Public Health, 43(4), 442-449, 1994.

Porphyrins, of which derivatives are known about twenty in human, are essential substances for biosynthesis of heme. Porphyria resulting from some disorders in metabolism of the porphyrins shows changes in their patterns of contents and components in organs and excreta. Kondo established recently a high sensitive and simple method for separation of the porphyrins such as uroporphyrin, carboxylic acid porphyrins of penta-, hexa-, and hepta-, and coproporphyrin isomers of I and III in a sample of human urine by high-performance chromatography with a reversed-phase column and for determination of their contents by fluometry, after oxidation of the corresponding porphyrinogens with glacial acetic acid and iodine.

In this study, the patterns of all urinary porphyrins from patients of various porphyria were analyzed by combination with the method described above and the computer system. One analytical procedure for these six porphyrins in a sample was completed within 10 min. From the porphyrin patterns obtained, the high accuracy diagnostic

[キーワード] 尿中ポルフィリン, 高速液体クロマトグラフィー, ポルフィリン症, パターン分析, 診断システム

[平成6年10月12日受理]

system for any types of porphyric disorder was established.

**Key Words** urinary porphyrin, high-performance liquid chromatography, porphyria, pattern analysis, diagnostic system

(Accepted for publication, October 12, 1994)

## I. はじめに

ポルフィリンはヘムやクロロフィル合成に必須の基質であり、ヒトの生体内では約20種類近くのポルフィリン誘導体が見出されている。その内、9種類の生成に酵素が関与している<sup>1)</sup>。残りは非酵素的および腸内細菌などによって側鎖が変化した物であり、主に糞便中に見出される<sup>2)</sup>。ポルフィリン類の分析法は高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) により1980年代に急速に改良されたが<sup>3)</sup>、これらポルフィリン類のパターン解析による疾患の診断ばかりでなく、一般検査室でのルーチン分析への応用もまだ行われていないのが現状である。

ポルフィリンの合成は、主に骨髄と肝臓で行われているが、その生合成過程での酵素障害などによってポルフィリンの代謝パターンは変化し、特定の障害部位に対応したポルフィリン成分の増加、あるいはパターンの変動が尿尿中で見られる<sup>4)</sup>。特に、ポルフィリン症のように遺伝的酵素障害によって発症する疾患および鉛中毒、各種肝、血液疾患などのように二次的にポルフィリンの代謝異常が惹起される疾患ではいずれも特定のポルフィリン体が体内に増加・蓄積し、尿尿中に排泄される。

本研究では、先に、近藤が開発した全ポルフィリン体のHPLC分析法<sup>5)</sup>をさらに改良し、分析時間の短縮を検討した。また、各種遺伝性ポルフィリン症患者および後天的ポルフィリン代謝異常疾患患者(5病型の遺伝性ポルフィリン症、鉛中毒、およびDubin-Johnson症候群)の尿中ポルフィリンのパターンを解析し、各種ポルフィリン誘導体の含有量の違いから各種疾患の診断を行うシステムの開発を試みた結果、これらの疾患を無侵襲に約10分で診断できる自動鑑別診断法を確立したので報告する。

## II. 材料および方法

### 1. 試薬

Porphyrin acid marker kit (uroporphyrin, heptacarboxylic acid porphyrin, hexacarboxylic acid porphyrin, pentacarboxylic acid porphyrin, coproporphyrinの各々I型異性体およびmesoporphyrin IXを含む, Lot No.75)およびcoproporphyrin IIIはPorphyrin products社(Logan UT, USA)より購入した。アセトニトリルはHPLC用、およびその他の試薬はすべて特級品を用いた。

### 2. 試料

臨床的および生化学的に確定診断された遺伝性ポルフィリン症患者47例、すなわち、先天性骨髄性ポルフィリン症 (congenital erythropoietic porphyria, CEP) 6例、多様性ポルフィリン症 (variegate porphyria, VP) 2例、急性間欠性ポルフィリン症 (acute intermittent porphyria, AIP) 15例、晩発性皮膚ポルフィリン症 (porphyria cutanea tarda, PCT) 22例、肝骨髄性ポルフィリン症 (hepatoerythropoietic porphyria, HEP) 2例、および二次的にポルフィリンの代謝異常が惹起される疾患13例、すなわち、急性鉛中毒 (acute lead poisoning, ALP) 2例、Dubin-Johnson症候群 (Dubin-Johnson syndrome, DJS) 11例、並びに健常者42例の尿試料を分析した。

### 3. 試料の調製

各尿0.1mlに0.05%ヨウ素-酢酸溶液を0.1ml等量混合してHPLC分析用試料とした。

### 4. HPLC分析システム

HPLC分析システムはJASCO GULLIVER SERIESを用いた、すなわち、PU-980型HPLC用ポンプ、AS-950型オートサンプラー、SC-802型システムコントローラ、LG-980-02型低圧グラジェントユニット、



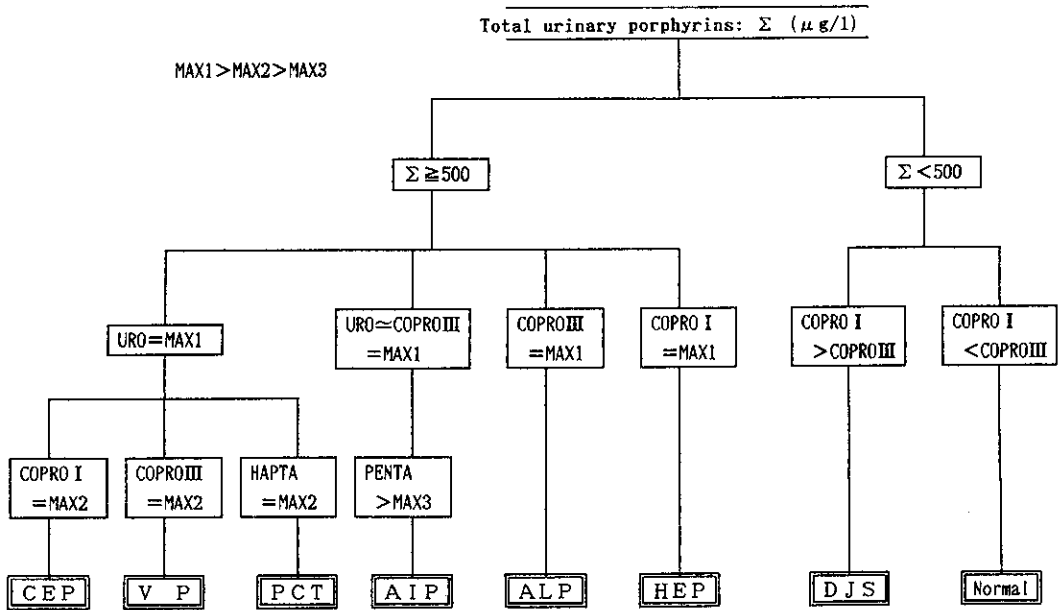


Fig. 2 Rule of diagnosis. Abbreviations of CEP, VP, PCT, AIP, ALP, HEP, DIS, URO, COPRO, HEPTA, HEXA, and PENTA are the same as described in Table 1 and 2.

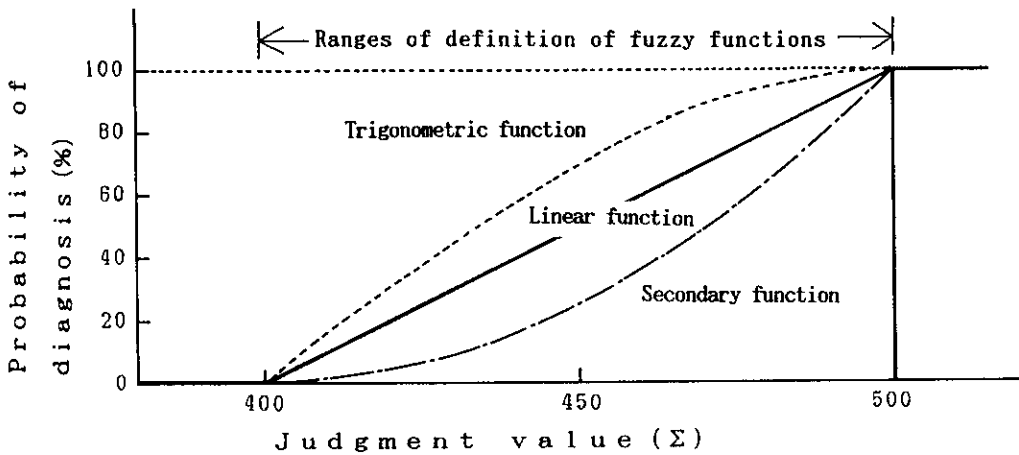


Fig. 3 Manipulations of fuzzy.

(Fig.3). このファジィ手法の適用により、変動の大きい判断基準ではファジィ関数の定義域を広く設定し、また、各病型の特徴的な判断基準の場合には狭く設定することで、判断の精度を向上させた。また、この手法は確率を伴った複数の診断結果が得られるため、微妙な判断には有利である。

### III. 結 果

#### 1. HPLC 分析条件の検討

標準ポルフィリン類 (Porphyrin acid marker kit, 各々10nmol を含む)の結晶を2.5N-HCl 0.2ml および 50%酢酸199.8mlにて完全に溶解した標準液 (0.5

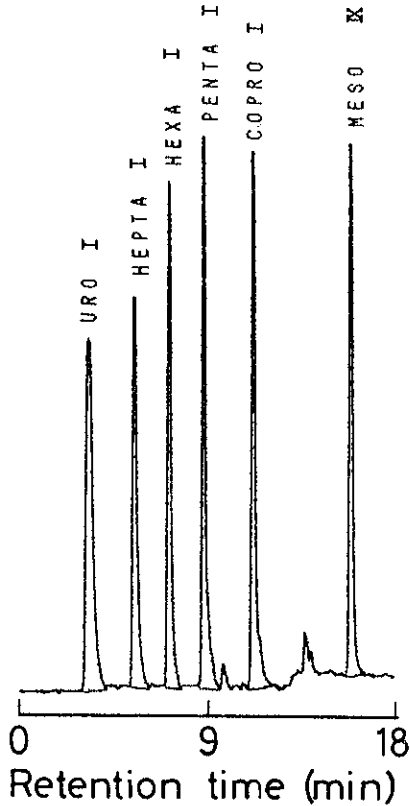


Fig. 4 Chromatogram of porphyrin standards, each at 0.125pmol/injection. Abbreviations of porphyrins are the same as described in Table 1.

pmol/10 $\mu$ l) を 5  $\mu$ l カラムに注入した (Fig.4). この標準液を 5  $\mu$ l から 50 $\mu$ l まで注入した時のピーク面積とピーク高さとの相関係数は  $r=0.999$  であり, 両者共に原点を通る直線が得られた.

標準ポルフィリン類を 10 回注入した時の保持時間, 変動係数および検出限界を Table 1 に示した.

Fig.5 に健常者および各種ポルフィリン代謝異常症患者の典型的な尿中ポルフィリンパターン of クロマトグラムを, また Table 2 には各々 1 例の分析結果を示した. ポルフィリン症および ALP では健常者に比べて尿中のポルフィリン量が極端に増え, また各々の病型に特有の代謝パターンが認められた.

## 2. システムによる診断結果

尿中のポルフィリン分析結果を診断処理装置に入力し, Fig.2 に示してある判断基準で診断を行った結果を Table 3 に示した.

### 1) 先天性骨髄性ポルフィリン症 (CEP)

尿中の総量は  $URO > COPRO I > PENTA > HEPTA > COPRO III$  の順で多かった. また, COPRO I が III 型異性体の 10 倍以上である特徴から, 6 例とも高い診断確率で的中した.

### 2) 多様性ポルフィリン症 (VP)

URO 総量に対する割合が  $URO > COPRO III > PENTA > HEPTA > COPRO I > HEXA$  の順であ

Table 1 Retention time of standard porphyrins peaks.

Porphyrins	Retention Time (min <sup>a</sup> )	Coefficient of Variation (%)	Discriminative quantity at S/N=2 (pg) <sup>b</sup>
URO I	3.21 $\pm$ 0.08	2.3	1.76
HEPTA I	5.35 $\pm$ 0.07	1.3	3.12
HEXA I	6.92 $\pm$ 0.13	1.9	1.62
PENTA I	8.74 $\pm$ 0.07	0.7	1.37
COPRO I	11.12 $\pm$ 0.12	1.1	1.22
MESO IX	15.89 $\pm$ 0.05	0.3	1.00

<sup>a</sup> Values represent means  $\pm$  SD (n=10). <sup>b</sup> Signal/noise ratio better than 2. URO, uroporphyrin; HEPTA, heptacarboxylic acid porphyrin; HEXA, hexacarboxylic acid porphyrin; PENTA, pentacarboxylic acid porphyrin; COPRO, coproporphyrin; MESO, mesoporphyrin.

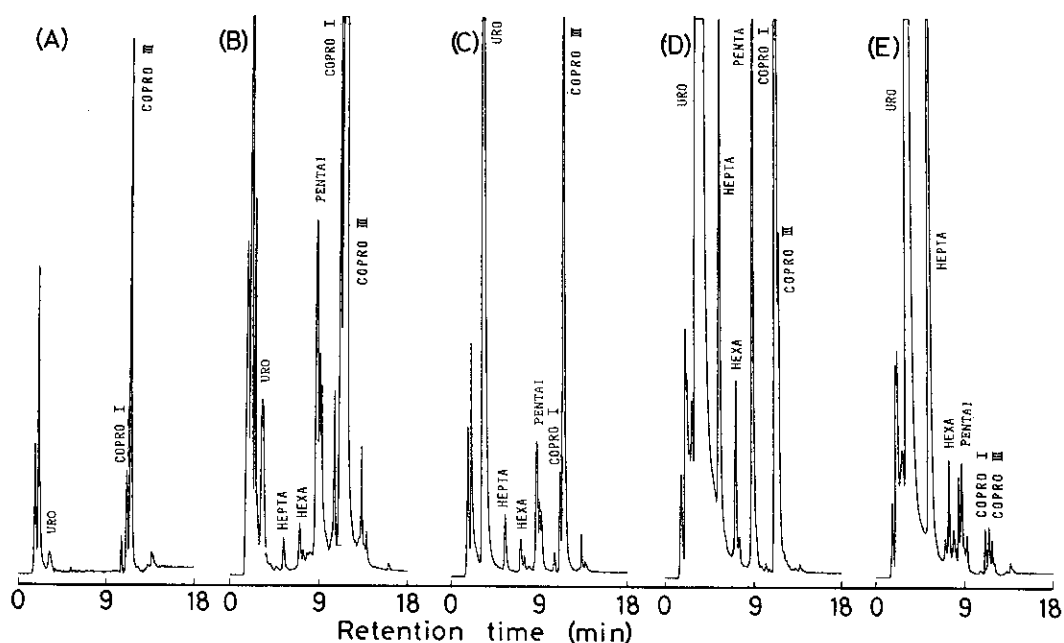


Fig. 5 Chromatographic separations of urinary porphyrins. Abbreviations of porphyrins are the same as described in Table 1. (A) urine from a normal subject, (B) urine from a patient with acute lead poisoning, (C) urine from a patient with acute intermittent porphyria, (D) urine from a patient with congenital erythropoietic porphyria, (E) urine from a patient with porphyria cutanea tarda. Urine samples were oxidized with iodine-acetate solution. Each urine sample volume is equivalent to 2.5 $\mu$ l in A, 1.25 $\mu$ l in B, C, D, and E, respectively. Each porphyrin value is listed in Table 2.

Table 2 Results of analysis of urinary porphyrins.

Type of porphyria	Urinary porphyrins ( $\mu$ g/l)							COPRO I / III
	URO	HEPTA	HEXA	PENTA	COPRO I	COPRO III	Total ( $\Sigma$ )	
CEP	66104	2656	777	4313	22317	844	97311	26.44
VP	8852	1396	88	1520	312	1930	14096	0.16
AIP	1518	76	57	271	85	1025	3032	0.08
PCT	480	204	8	26	10	41	796	0.24
HEP	1214	541	166	487	2570	850	5855	3.02
ALP	130	23	16	72	87	4520	4848	0.02
DJS	<1	<1	<1	<1	32	4	36	8.00
Normal	14.4	5.3	<1	3.4	12.8	34.0	69.9	0.38
Mean $\pm$ SD	$\pm$ 8.4	$\pm$ 4.3		$\pm$ 3.5	$\pm$ 6.2	$\pm$ 21.0	$\pm$ 34.8	$\pm$ 0.20

CEP, congenital erythropoietic porphyria; VP, variegate porphyria; AIP, acute intermittent porphyria; PCT, porphyria cutanea tarda; HEP, hepatoerythropoietic porphyria; ALP, acute lead poisoning; DJS, dubin-Johnson syndrome. URO, uroporphyrin I + III; HEPTA, heptacarboxylic acid porphyrin I + III; HEXA, hexacarboxylic acid porphyrin I + III; PENTA, pentacarboxylic acid porphyrin I + III; COPRO, coproporphyrin.

Table 3 Results of automated differential diagnosis of porphyrias.

Classification	Cases of experiment	Cases of accuracy	% of accuracy	Urinary porphyrin pattern
CEP	6	6	100	URO>COPRO I ≧ PENTA>HEPTA>COPRO III
VP	2	2	100	URO>COPRO III ≧ PENTA>HEPTA>COPRO I
AIP	15	11	73	URO=COPRO III ≧ PENTA>COPRO I >HEPTA
PCT	22	22	100	URO>HEPTA ≧ COPRO III >PENTA>COPRO I
HEP	2	2	100	COPRO I >URO>COPRO III >HEPTA ≧ PENTA
ALP	2	2	100	COPRO III >URO>COPRO I >PENTA>HEPTA
DJS	11	11	100	COPRO I >COPRO III

ること、PENTAが多いこと、およびCOPRO I/IIIの比率などから2例ともの中した。

### 3) 急性間欠性ポルフィリン症 (AIP)

URO, COPRO IIIおよびPENTAの増量が見られたが、URO>PENTA>COPRO III, URO>COPRO III>PENTA,あるいはCOPRO III>URO>PENTAとなるような変動が大きく、15例中4例が「ポルフィリン症の疑いあり」と診断され、的中しなかった。

### 4) 晩発性皮膚ポルフィリン症 (PCT)

他の病型に比べHEPTAが多い特徴があり、そのパターンはURO>HEPTA>PENTAとなることから22例の全部が的中した。

### 5) 肝骨髄性ポルフィリン症 (HEP)

COPRO Iが最大となるのが特徴であり、他の病型と容易に識別することができた。そのパターンはCOPRO I >URO>COPRO III >HEPTA >PENTA>HEXAとなり、2例ともの中した。

### 6) 急性鉛中毒 (ALP)

COPRO IIIが圧倒的に多いことが特徴であり、総量に対するCOPRO IIIの比率から容易に識別することができ、2例ともの中した。

### 7) Dubin-Johnson 症候群 (DJS)

他のポルフィリン代謝異常症と比べて、尿中のポルフィリン総量は正常範囲内、またはその下限であったが、COPRO I/IIIの比率が高いことが特徴であった。すなわち、健常者ではI/IIIの比率が0.3-0.6程度であったが、DJSではほぼ3以上であり、検討した11例のすべてが的中した。

## IV. 考 察

尿中ポルフィリンのHPLC分析法は数多く報告さ

れているが<sup>3)</sup>、ポルフィリンのパターン解析により疾患を診断する試みはなされていない。この理由として、ポルフィリン症患者の数が少ないことやポルフィリン測定が一般化されていないことなどがあげられる。

我々は本研究によって、従来30分以上を要した尿中全ポルフィリンHPLC分析<sup>3)</sup>を20分間短縮し、約10分で測定可能な方法を開発した。また、最新の分析機器およびカラムを用いることにより検出感度を従来の<sup>3)</sup>約30倍上昇させた。本法はポルフィリン症患者のスクリーニングに有用であり、実際にこの方法を某高校の定期検診に採用した結果、新しくポルフィリン症の不顕性遺伝子保有者(キャリアー)を2病型発見している<sup>5)</sup>。現在までに発見されたポルフィリン症患者は612例<sup>6)</sup>であるが、キャリアーはこの数倍存在するものと思われる<sup>7)</sup>のでこの方法の活用は有意義である。また、鉛中毒、Dubin-Johnson症候群、各種肝炎において特徴的なポルフィリンの代謝異常が知られており<sup>8)</sup>、これら疾患の早期発見および予後判定などにポルフィリン分析は重要である。

HPLCは物質の分離定量を目的とした分析機器であり、これを取り入れた病態診断装置の開発はこれまでに行われていなかった。今回、我々は各種ポルフィリン代謝異常症患者の尿中ポルフィリンパターンの変動に注目し、尿中ポルフィリンの総量および各種ポルフィリン量比などのパターンをコンピューターに入力して解析するポルフィリン代謝異常症の自動診断装置の開発を検討した。

ポルフィリン症およびALPは健常者に比べて尿中のポルフィリン量が著しく増加するため、健常者と容易に区別することができた。さらに、ポルフィリン量が増加している場合には、各病型特有の代謝パターン

が観察できることから、ポルフィリン症などの鑑別診断が可能であった。しかし、AIPについては15例中4例が「ポルフィリン症の疑いあり」と判定された。これは尿中ポルフィリンの各成分の比率が異なるが総量は健常者とはほぼ同じである。例えばUROやPENTAが著しく増加しているケースに対しての診断結果である。今後AIPに関しては症状が間欠的に出現することから、患者の治療経過に伴う症状と採尿時期との関係などを正確に検討する必要があると思われる。

一方、健常者として測定した試料の中に、意外にも健常者の平均的な成分比率と異なるケースが42例中4例見出された。これらはUROの増加が顕著なため、「ポルフィリン症の疑いあり」と診断されたが、詳細は今のところ不明であり、ポルフィリン代謝異常の既往歴や家族歴などの調査が必要と思われた。また、最近、我々は肝硬変や肝癌などの肝疾患では、COPRO I型異性体の軽度ないし著明な増量、およびI/III型の比率が変化することを見出し<sup>8)</sup>、肝障害と健常者との相違および肝疾患の病理組織学的診断と尿中ポルフィリン・パターンの変化について、現在詳細に検討を行っている。このように、尿中ポルフィリンの総量が健常者に近い場合においても、疾患によって、その成分比率、異性体パターンが変化する。したがって、今後はポルフィリン代謝異常症のデータ数を増やすと共に、「ポルフィリン症の疑い」を含む診断精度向上や、各種重金属、芳香族ハロゲン化合物、有機溶剤などポルフィリン代謝に影響を及ぼす化学物質の暴露時や肝疾患などへの応用の拡大を図るためにも、健常者のパターン解析について更に詳細に検討する必要がある。

以上、今回5病型の遺伝性ポルフィリン症、ALPおよびDJS患者の尿中ポルフィリン類のHPLC分析結果を診断処理装置に入力し、診断を行った結果、高い

診断確率で病型を推定できることができた。今後、更に症例数を増やし、ファジィ関数及びその定義域を改良することによって、より高い診断確率および中例数の増加を図ると共に、鉛作業者の検診や肝疾患などの適用についても検討する必要があるものと思われる。また、ポルフィリン症や鉛中毒のように障害酵素がはっきりしていても、尿中に排泄されるポルフィリンの種類と障害酵素との関係が説明できないことが多いが、これらポルフィリン代謝異常の病態生化学的解明においても今後ポルフィリンのHPLC分析が利用されるものと思われる。

## 文 献

- 1) 近藤雅雄：ポルフィリンの検査法、検査と技術、1994；22(6)：411-418.
- 2) 近藤雅雄：糞便ポルフィリンの測定と臨床的意義、ポルフィリン、1993；2：85-91.
- 3) 近藤雅雄、梶原正宏：高速液体クロマトグラフィーによるポルフィリン体測定の臨床診断への応用、LC Family, Jasco-Report, 1987；22(2)：5-10.
- 4) 近藤雅雄：ポルフィリン代謝異常症の鑑別診断について、臨床代謝学会記録、1990；27：192-193.
- 5) 中沢俊二：高校定期検診で発見した遺伝性ポルフィリン症。その2病型、聖マリアンナ医大誌、1992；20：83-94.
- 6) M. Kondo, Y. Yano: Porphyria in Japan. In Regulation of Heme Protein Synthesis, H. Fujita ed.,  $\alpha$ Med Co. Ltd, New York: 1994; p.125-132.
- 7) 矢野雄三：ポルフィリン症—日本の現状と問題点、ポルフィリン、1992；1：173-179.
- 8) 依伯俊一、若島将伸、林星舟、田中武、柴山高尾、大竹寛雄、田中慧、藤岡裕二、近藤雅雄：各種肝疾患における尿中ポルフィリンの分析とその意義ポルフィリン、ポルフィリン、1992；1：279-284.