

Adrenoleukodystrophy の血清による生化学診断法の確立

東京慈恵会医科大学小児科 衛藤 義勝
木口 薫
井田 博幸

脱髄性疾患の一つである Adrenoleukodystrophy (ALD) は伴性劣性遺伝を示す脱髄疾患であるが本症の診断法として副腎、辜丸、末梢神経等の生検による形態的診断法と生化学的に脂肪酸を分析して超長鎖脂肪酸の分析による方法が報告されている。本研究では採取に容易な患者血清を用いてガスクロマトで診断が可能かどうか更にキャピラリーカラムを用いて本症患者の診断法を検討した。

材料並びに方法

臨床的あるいは生検にて ALD と診断された 7 例, heterozygote (母親) 2 例, 健康正常人 10 例の血清を用いて分析した。血清の 5 倍容のクロロフォルム-メタノール (2:1, V/V) を用いて脂質を抽出した。総脂質の一部を薄層クロマトにて展開しスフィンゴミエリンを分取抽出後 2.5% 塩酸メタノールを加え 100°C 4 時間加熱し, 脂肪酸メチルエステルを抽出し, ガスクロマト (島津) を用いて分析した。脂肪酸メチルエステルは 3% OV-1 カラムにて 150°C~270°C までの昇法により分析した。又, C_{22:0}, C_{24:0}, C_{26:0} 等の脂肪酸はガスマススペクトルで分与量を確認すると同時に, そのマスフラグメントより確定した。キャピラリーカラムは OV-101 を用いて流圧 0.3 kg カラムサイズ (0.35 mm φ × 12.5 m), 加圧電圧 3 kV, イオン化電圧 70 eV, イオンマルチ電圧 1.7 kV, イオン化電流 300 μA, そして反応ガスにアンモニアを用いてイオン化マスフラグメントグラフィーを行った。

結果

表 1 はガスクロマトにより患者並びに保因者 (母親) の総脂質並びにスフィンゴミエリン分画の C_{24:0}/C_{22:0}, C_{26:0}/C_{22:0} の比である。いずれも患者では対照の 7~10 倍, 保因者では 3 倍の増加を認めた。患者血清脂質の C_{22:0}, C_{24:0}, C_{26:0} の同定は各々標準脂質の分子量と同様のマスパターンを示すことから確定した。また図 1, 2 はキャピラリーカラムを用いて対照と ALD 患者を示した。図に示す如く C_{22:0}, C_{24:0}, C_{26:0} のピークは明確に分離されると同時に明らかに患者では C_{26:0}/C_{22:0} の比は高値を示している。

考察

本法を用いて微量の ALD 患者血清から診断が可能であり, ALD の簡便なスクリーニング法として使用出来る。また, 定量に要する時間は約 30 分程度であり時間も縮小出来る。また, 微量のピークである C_{26:0} の同定はガスマスでその分子量並びにフラグメントが標準物質のそれと一致していることから本法の特異性は実証されている。今後更に内部標準として重水素ラベルの脂肪酸メチルエステルを用いて定量する方法を開発する予定である。

表1 血清中(全脂質)の C_{26:0}/C_{22:0} および C_{24:0}/C_{22:0}

	C _{26:0} /C _{22:0}	C _{24:0} /C _{22:0}
Patient (n = 7)	0.074 ± 0.022	1.41 ± 0.29
Heterozygotes (n = 2)	0.034 ± 0.008	1.26 ± 0.07
Control (n = 10)	0.012 ± 0.009	0.79 ± 0.06

C_{26:0}/C_{22:0} and C_{24:0}/C_{22:0} in plasma

SAMPLE : Normal
 FILE : MSDS -LR1111
 DATA : INJECTION NO.1 CHANNEL NO.1 (M/Z 372.0) PEAK = 1

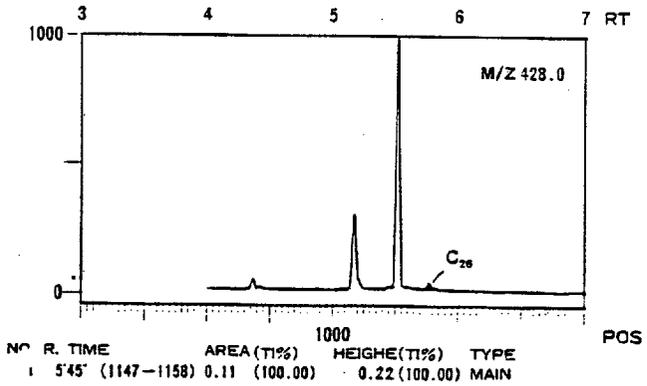
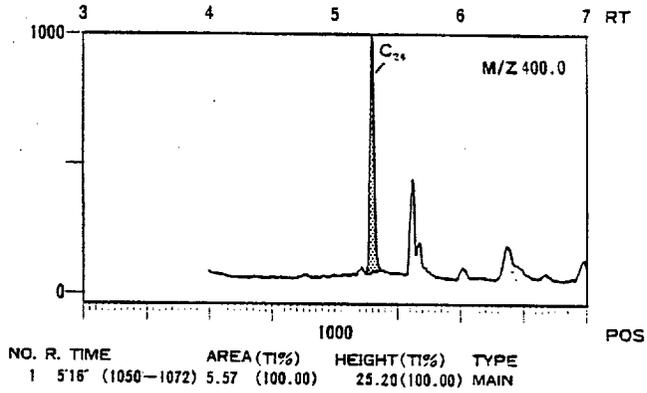
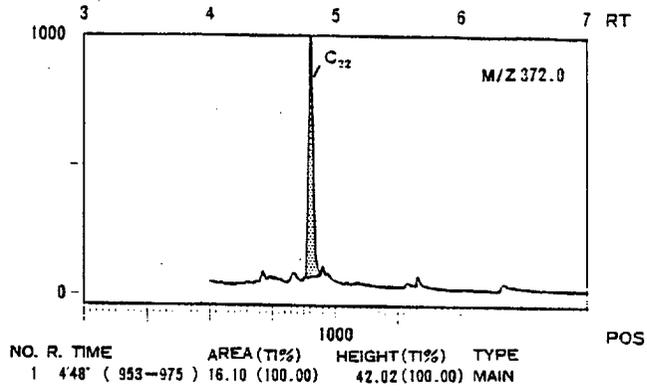


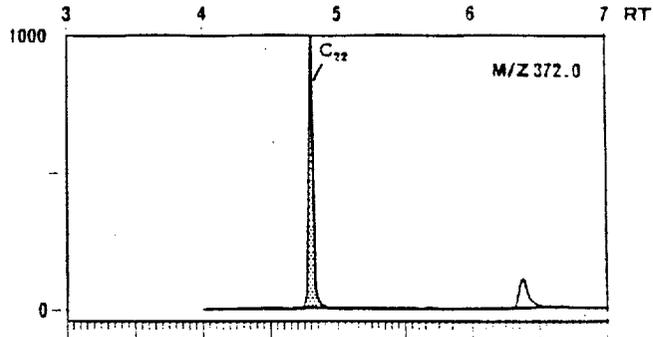
図1 マスフラグメントグラフィーより得られた正常健康人のパターン

SELECTED ION MONITOR : PEAK DETECTION

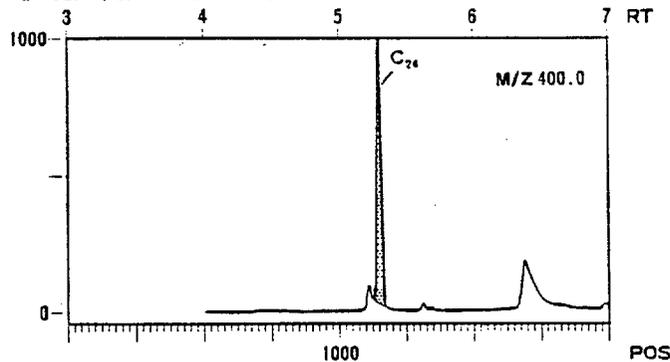
SAMPLE : Patient

FILE : MSDS -LR1111

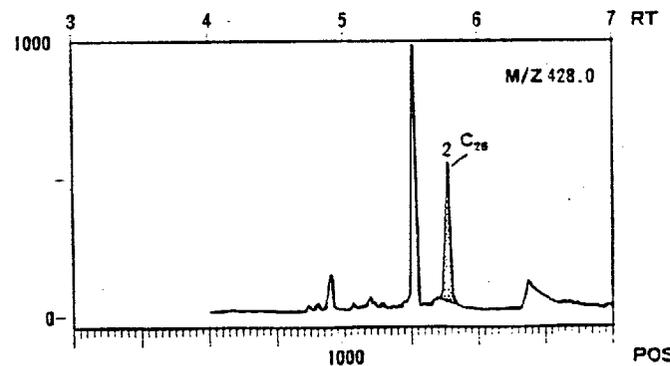
DATA : INJECTION NO.4 CHANNEL NO.1 (M/Z 372.0) PEAK=2



NO.	R. TIME	AREA (T1%)	HEIGHT (T1%)	TYPE
1	4.48 (950-1000)	52.83 (76.67)	23.81 (90.04)	MAIN
2	6.21 (1253-1331)	16.08 (23.33)	3.41 (9.96)	MAIN



NO.	R. TIME	AREA (T1%)	HEIGHT (T1%)	TYPE
1	5.17 (1051-1070)	51.23 (100.00)	32.36 (100.00)	MAIN



NO.	R. TIME	AREA (T1%)	HEIGHT (T1%)	TYPE
1	5.30 (1088-1114)	2.28 (59.70)	1.42 (65.47)	MAIN
2	5.45 (1145-1171)	1.54 (40.30)	0.75 (34.53)	MAIN

図2 マスフラグメントグラフィーより得られたALDのパターン



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



脱髄性疾患の一つである Adrenoleukodystrophy (ALD) は伴性劣性遺伝を示す脱髄疾患であるが本症の診断法として副腎, 睾丸, 末梢神経等の生検による形態的診断法と生化学的に脂肪酸を分析して超長鎖脂酸の分析による方法が報告されている。本研究では採取に容易な患者血清を用いてガスクロマトで診断が可能かどうか更にキャピラリーカラムを用いて本症患者の診断法を検討した。