

# 有機酸代謝異常スクリーニング法の研究

## — ガスクロデータ自動処理プログラムの開発 —

折居忠夫，山口清次，安田寛二，  
河野芳功，鈴木康之（岐阜大学小児科）

### 研究目的

有機酸代謝異常症の診断，スクリーニングにGC-MSが応用されるようになったが，設置される施設，分析件数に限りがある。多数検体をスクリーニングするためには，ガスクロ(GC)による一次スクリーニングが不可欠であると思われるので，我々はGCとコンピューターを連結して，データ処理と異常判定を迅速に行うプログラムを開発した。

### 研究方法

#### (1) 検体の前処理

0.2 mg クレアチニン相当の尿をとり，一定の内部標準物質(IS)を加えて塩酸酸性下で，酢酸エチルとエーテルによる溶媒抽出を行う。溶媒層を脱水乾固したのち，TMS誘導体化してGC用試料とした。

#### (2) GC分析方法

カラムは2 m，3 mm $\phi$  3%OV-17を用いて，温度は90 $^{\circ}$ C 4分間保持 $\rightarrow$ 6 $^{\circ}$ C/分昇温 $\rightarrow$ 280 $^{\circ}$ C 4分間保持とした。GC機器は島津GC-7A，検出器はFID，連結したコンピューターはDEC社PDP 11/23である。

#### (3) GCデータの処理方法

①メチレンユニット値(MU)：図1に示すように，炭化水素C<sub>10</sub>～C<sub>26</sub>混合溶液の各ピーク保持時間(RT)からMUを計算した。

②相対面積(PAR)：図1上段のクロマトに示すように，各ピーク面積(AR)のISに対する相対面積比を計算した。

図2に示すようにMUはRTに比べ，昇温速度，キャリアーガス流量の変化に影響を受けず一定の値をとるので定性に有用であり，施設間の比較にも便利である。

③MUとPARに換算して，各年齢正常テーブルを図3のように作成した。横軸がMU，縦軸がPARで，棒グラフの中間の線は平均値であり，上端は平均値+ISDである。この正常テーブルと比較して，正常平均PARの5倍以上のピークまたは正常にみられないMUをもつピークを異常ピークとした。

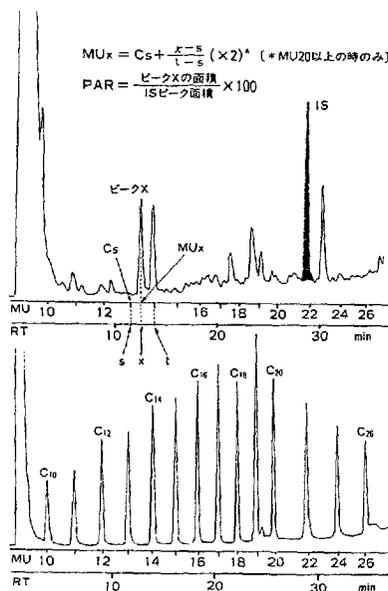


図1. MU, PARの求め方

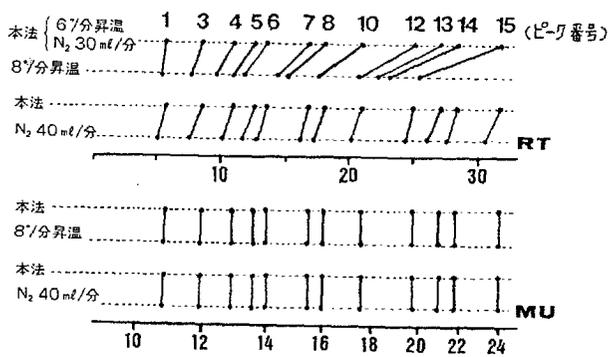


図2. GC条件によるRT, MUの変化

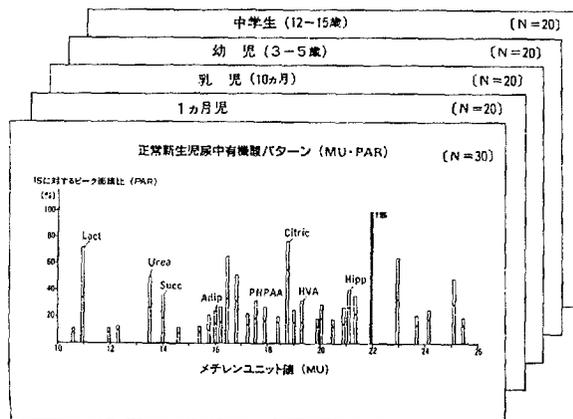
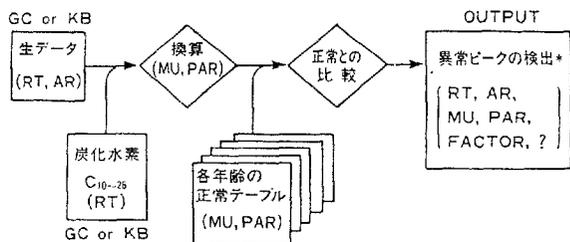


図3. MU, PARによる年令別正常テーブル

#### (4) データ処理自動化プログラム

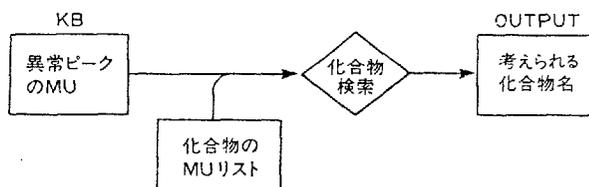
① GC スクリーニングプログラム (図4) : GC データの RT, AR が入力されると, 炭化水素の RT (HC テーブル) から MU を計算し, また PAR も計算する。さらに MU, PAR を用いて正常テーブルと比較し, あるピークが正常の何倍の大きさか, または正常に存在しないかの表示をする (=Factor)。さらに異常ピークと判定したピークには \*印を印字する。



(GC or KB : ガスクロまたはキーボードより入力, FACTOR : 正常 PAR の何倍か)

図4. GCスクリーニングプログラムの概略

②化合物検索プログラム(図5) : Tanaka<sup>1)</sup>の示したorganic acid retention index を参考にして約 170 種の化合物の MU リストを作成し, あらかじめ化合物 MU テーブルとして入力しておいた。異常ピークの印



(KB : キーボードより入力)

図5. 化合物検索プログラムの概略

が印字されたピークの MU をキーボードから入力すると, 化合物 MU テーブルから  $\pm 0.10$  MU の範囲内にある化合物名を "考えられる化合物" として output する。

#### (5) 対 象

有機酸代謝異常を認めた 7 疾患, 計 19 例の尿を分析した。内訳は表 3 に示す通りである。

### 研究結果

1. 症例 : イソ吉草酸血症, 8 才女児の分析結果を図 6 に示した。中央部に 2 本の巨大ピークがみられた。これを GC スクリーニングプログラムで output させた例を表 1 に示している。上段は PAR 5.0 以上のピークを全部拾ったもので, 下段は PAR 20.0 の threshold を設けて output したものである。これによると, MU 16.06 と 16.60 の 2 本のピークに対し, 異常ピークの \*印がつき, Factor に ? が印字されて, 正常にみられないピークであることが示された。

次に化合物検索プログラムで異常ピークの MU を入力して "考えられる化合物" を検索したところ, 表 2 のように MU 16.06 に対して 5 ケの化合物, MU 16.60 に対して 3 ケの化合物名をリストアップした。表 2 のうち O 印を付した化合物すなわち, isovalerylglycine di TMS 体と mono TMS 体が GC-MS によって同定した化合物であり, このプログラムのリストアップした化合物名の中に正しい化合物がふくまれていたことを確認した。

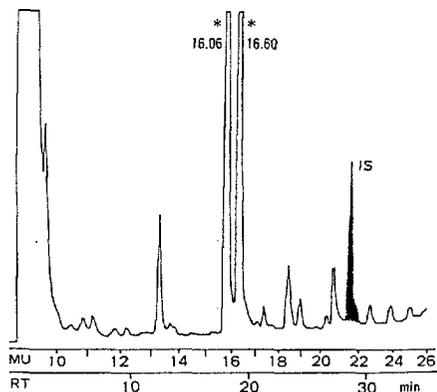


図6. イソ吉草酸血症のガスクロマトグラム

表1. GCスクリーニングプログラム out put例 (イソ吉草酸血症)

| FILE NAME: | 0253X3F.GCO | M.U. ALLOWANCE: | 0.10    |          |        |      |
|------------|-------------|-----------------|---------|----------|--------|------|
| PEAK:      | 18          | M.U.:           | 21.94   |          |        |      |
| P. NO.     | 1           | AREA            | M.U.    | PAR. (C) | FACTOR |      |
|            | 2           | 6.21            | 22077.  | 11.01    | 13.32  | 1.42 |
|            | 3           | 7.96            | 80215.  | 11.31    | 17.03  | 1.63 |
|            | 4           | 9.33            | 15399.  | 11.99    | 9.29   | 1.13 |
|            | 5           | 9.95            | 13616.  | 12.39    | 7.85   | 0.76 |
|            | 6           | 11.31           | 8986.   | 12.91    | 5.35   | 0.23 |
|            | 7           | 12.85           | 129811. | 13.54    | 84.35  | 6.93 |
|            | 8           | 13.67           | 23747.  | 13.87    | 14.33  | ?    |
|            | 9           | 18.50           | 547740. | 16.07    | 330.47 | ?    |
|            | 10          | 19.57           | 859877. | 16.68    | 518.26 | ?    |
|            | 11          | 21.62           | 21184.  | 17.95    | 16.70  | 0.58 |
|            | 12          | 23.71           | 72943.  | 19.79    | 44.01  | 0.78 |
|            | 13          | 24.76           | 31565.  | 19.35    | 19.06  | 1.45 |
|            | 14          | 26.93           | 13246.  | 20.68    | 7.99   | ?    |
|            | 15          | 27.58           | 64621.  | 21.98    | 39.11  | 0.83 |
|            | 16          | 28.97           | 165744. | 21.94    | 109.04 | 1.00 |
|            | 17          | 30.66           | 22592.  | 23.07    | 13.63  | ?    |
|            | 18          | 32.37           | 18512.  | 24.23    | 11.23  | ?    |
|            | 19          | 33.99           | 12369.  | 25.39    | 7.46   | 0.46 |

(THRESHOLD PAR 20.0 以上) \* 異常ピークの検出

| FILE NAME: | 0253X3F.GCO | M.U. ALLOWANCE: | 0.10    |          |        |      |
|------------|-------------|-----------------|---------|----------|--------|------|
| PEAK:      | 18          | M.U.:           | 21.94   |          |        |      |
| P. NO.     | 1           | AREA            | M.U.    | PAR. (C) | FACTOR |      |
|            | 2           | 6.21            | 22077.  | 11.01    | 13.32  | 1.42 |
|            | 3           | 7.96            | 80215.  | 11.31    | 17.03  | 1.63 |
|            | 4           | 9.33            | 15399.  | 11.99    | 9.29   | 1.13 |
|            | 5           | 9.95            | 13616.  | 12.39    | 7.85   | 0.76 |
|            | 6           | 11.31           | 8986.   | 12.91    | 5.35   | 0.23 |
|            | 7           | 12.85           | 129811. | 13.54    | 84.35  | 6.93 |
|            | 8           | 13.67           | 23747.  | 13.87    | 14.33  | ?    |
|            | 9           | 18.50           | 547740. | 16.07    | 330.47 | ?    |
|            | 10          | 19.57           | 859877. | 16.68    | 518.26 | ?    |
|            | 11          | 21.62           | 21184.  | 17.95    | 16.70  | 0.58 |
|            | 12          | 23.71           | 72943.  | 19.79    | 44.01  | 0.78 |
|            | 13          | 24.76           | 31565.  | 19.35    | 19.06  | 1.45 |
|            | 14          | 26.93           | 13246.  | 20.68    | 7.99   | ?    |
|            | 15          | 27.58           | 64621.  | 21.98    | 39.11  | 0.83 |
|            | 16          | 28.97           | 165744. | 21.94    | 109.04 | 1.00 |
|            | 17          | 30.66           | 22592.  | 23.07    | 13.63  | ?    |
|            | 18          | 32.37           | 18512.  | 24.23    | 11.23  | ?    |
|            | 19          | 33.99           | 12369.  | 25.39    | 7.46   | 0.46 |

(ピーク番号) ↑ 保持時間 ↑ 面積 ↑ メチレンユニット値 ↑ 相対面積 ↑ 正常の何倍

また、これら2つのプログラムによって2本の異常ピークとそれに対する計8ヶの「考えられる化合物名」の情報を得た段階で、この患児が乳児期より頻回のケトーシス発作がありそのたびに「足のむれた異様な体臭」に気づかれていたことなどの病歴、臨床所見などをあわせて考えれば、本患児が「イソ吉草酸血症」であることを推定することも可能である。

表2. 化合物検索プログラム out put例 (イソ吉草酸血症)

| COLUMN NO.: | 3     | M.U. ALLOWANCE:         | 0.10    |
|-------------|-------|-------------------------|---------|
| 0253X3F     |       |                         |         |
| ISOVALERIC  |       |                         |         |
| M.U.:       | 16.06 |                         |         |
|             | 76    | VINYLAACETYLGLYCINE (I) | (15.96) |
|             | 77    | ADIPIIC A.              | (15.97) |
|             | 78    | ISOVALERYLGLYCINE (I)   | (16.02) |
|             | 79    | UNDECANOIC A.           | (16.04) |
|             | 80    | OXALACETIC A.           | (16.14) |
| M.U.:       | 16.60 |                         |         |
|             | 91    | CROTONYLGLYCINE (I)     | (16.52) |
|             | 92    | ISOVALERYLGLYCINE (I)   | (16.56) |
|             | 93    | N-VALERTLGLYCINE (I)    | (16.67) |

↑ 異常ピークのMU ↑ 考えられる化合物名 ↑ 化合物のMUリスト

2. 有機酸代謝異常を認めた7疾患、計19例の分析結果を表3に示した。19検体の計56本の異常ピークについて、正しい化合物がリストアップされなかったのは2本のみであった。この2本中1本はメチルマロン酸、他は乳酸のピークであったがいずれも他症例に比べ極端に大きなピークであり、MUがシフトしたものと思われた。そこでこの2検体の試料を希釈して再検したところ正しい化合物名がリストアップされた。

表3. ±0.10 MUの範囲の化合物検索結果 (3% OV-17)

| 疾患名              | 症例数 | 異常ピーク数 | リストされなかった化合物の数* |
|------------------|-----|--------|-----------------|
| メチルマロン酸血症        | 9   | 24     | 1               |
| 高乳酸血症            | 2   | 18     | 1               |
| プロピオン酸血症         | 1   | 11     | -               |
| イソ吉草酸血症          | 1   | 2      | -               |
| チロシン症            | 1   | 2      | -               |
| マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 | 1   | 2      | -               |
| 神経芽細胞腫           | 1   | 2      | -               |
| 計                | 16  | 56     | 2               |

\* GC-MSで同定した化合物がリストされなかったピーク数

## 考 按

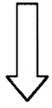
GCによる有機酸代謝異常スクリーニング法とコンピュータ連結による作業の迅速化について報告した。有機酸代謝異常7疾患計19例の検体を分析、検索したところ、異常ピークのうち正しい化合物名がリストアップされなかったのは計56本中2本のみであった。しかし、この2本ともに試料を希釈して再検することによって正しい化合物名がリストアップされたことから、この問題は解決されると考えられた。

## 結 論

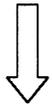
1. GCデータから異常ピークの検出、およびその化合物名を予測する作業が、この2つのコンピュータプログラムによって著しく迅速化された。
2. ある一定以上の巨大なピークに遭遇する時、試料を希釈して再検してみるべきである。
3. 臨床所見とあわせて異常ピークの化合物名を予測することにより、GCの段階で疾患を推定することも可能である。
4. MUを利用した化合物検索プログラムで、異常ピークの「考えられる化合物」として予測した化合物名の中に、正しい化合物が的中する確率がきわめて高かったことから、GC-MS分析にも有用な情報が得られ、解析作業を効率化することができる。
5. Tanakaら<sup>1)</sup>の示した2種類のカラムを用いたGCのみによるスクリーニング法にも、本プログラムは応用できると思われる。

## 文 献

- 1) Tanaka, K and Hine, D.G.: Compilation of gas chromatographic retention indices of 163 metabolically important organic acids, and their use in detection of patients with organic acidurias. J. Chromatography, 239: 301-322, 1982.



**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

有機酸代謝異常症の診断,スクリーニングに GC-MS が応用されるようになったが,設置される施設,分析件数に限りがある。多数検体をスクリーニングするためには,ガスクロ(GC)による一次スクリーニングが不可欠であると思われるので,我々は GC とコンピューターを連結して,データ処理と異常判定を迅速に行うプログラムを開発した。