

有機酸代謝異常スクリーニングのための GC-MSデータ自動処理・検索システムの開発

折居忠夫, 山口清次, 安田寛二,
河野芳功 (岐阜大学小児科)

研究目的

GC-MSによる有機酸代謝異常スクリーニングを行うには、機器の維持の問題の他にデータ解析に熟練した技術・知識を必要とし、結果を得るまでにある程度の時間と人手がかかることが多い。そこで今回我々は有機酸代謝異常スクリーニングのためのGC-MSデータの自動検索・処理システムを開発し、データ解析の迅速化を試みた。

研究方法

(1) 分析方法

分析するサンプルは尿を既報¹⁾の方法に従って前処理を行い、ガスクロ(GC)分析と同一のものを用いた。分析機器は島津 AUTO 9020-DF で既報¹⁾の分析条件で行い、データ処理用コンピュータはDEC社PDP 11/23を用いた。

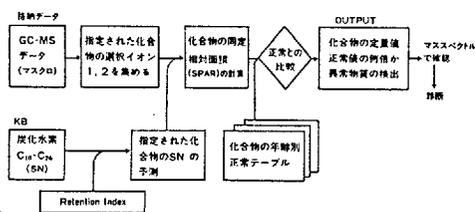


図1 MCS CRのプログラム概略

SPAR: マスクロによるISに対する相対面積
SN: scan number (ピーク保持時間に相当)
Retention Index: Tanaka²⁾の文献より
KB: キーボードより入力

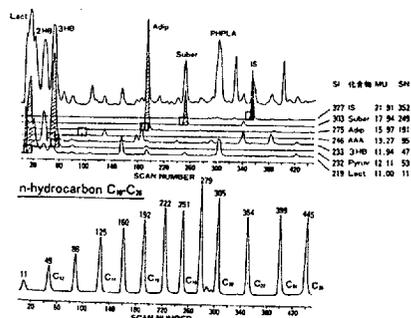


図2 マスクロとメチレンユニットの組合せによる有機酸の検索

Lact: lactate, 2HB: 2-hydroxybutyrate, 3HB: 3-hydroxybutyrate, Adip: adipate, Suber: suberate, PHPLA: P-hydroxyphenyllactate, IS: internal standard
MU: メチレンユニット値, SN: 予測されたピーク出現位置にあたる scan

(2) GC-MS用MCスクリーニングプログラム (MCSCR) の概略

今回開発したプログラム (MCSCR) の概略を図1, 2に示した。すなわちこれまでに知られている有機酸代謝異常をきたす疾患の診断の指標となる成分を中心に表1に示した53種の化合物をルチン検索させた。各化合物に対して2ヶずつの選択イオン (SI) を指定してマスクロマトグラムをコンピュータの中で作り、炭化水素C₁₀-C₂₆のキャリブレーションとTanakaらのガスクロ用 Retention Index から各化合物の出現位置を予測してこれら3者が一致することで化合物を同定させた。さらに2ヶのSIのうち第1選択イオン (SI-1) のピークの、内部標準物質のSI-1である m/e 327 のマスクロピークに対する相対面積 (SPAR) を計算して定量値とした。SPARの定量性をみるために一部の化合物の検量線を図3に示した。化合物とそのSPARを求めた後、年齢相当の正常値と比較して、有意に大きいSPARであったり、正常にはみられない成分である時異常成分とみなして化合物に*印を印字してoutputする。ここで検出された異常成分に

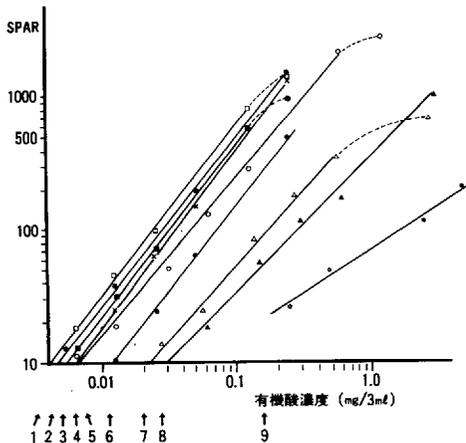


表1 MCSCRによってルチン検索の対象としている53種の成分 (昭和60年月1現在)

	NO.	COMPOUND NAME	MW.	MU.
乳酸	1	LACTIC	234	11.00
	2	PYRUVIC-OX	247	12.11
	3	2-H-BUTYRIC	248	11.61
		3-H-BUTYRIC	248	11.94
	4	ACETOACETIC-OX	261	13.27
ケトン体	5	3-H-PROPIONIC	234	11.94
	6	3-H-VALERIC	262	12.70
	7	2-M-3-H-BUTYRIC	262	12.25
分枝アミノ酸	8	3-H-GLUTADNIC	262	12.35
	9	3-H-3-M-GLUTARIC	288	15.60
系成分	10	3-M-GLUTADNIC	378	16.48
	11	CITRIC	378	19.76
TCAサイクル	12	ACONITIC	390	18.40
	13	ISOCITRIC	260	19.86
成分	14	2-K-GLUTARIC-OX	377	17.11
	15	SUCCINIC	262	14.02
ジカルボン酸	16	FUMARIC	260	14.03
	17	MALIC	350	15.49
	18	DIALOACETIC	348	16.14
	19	ADIPIC	290	15.97
	20	SUBERIC	318	17.94
	21	SEBACIC	346	19.95
	22	GLUTARIC	276	14.87
	23	3-H-GLUTARIC	364	16.34
	24	GLUTADNIC	274	15.56
	25	ETHYLMALONIC	276	13.48
芳香族アミノ酸	26	M-SUCCINIC	276	13.98
	27	4-H-PHENYLACETIC	296	17.61
	28	3-H-PHENYLACETIC	368	19.93
	29	4-H-PHENYLPYRUVIC-OX	411	20.59
	30	PHENYLACETIC	208	14.37
	31	PHENYLACETIC	310	16.99
	32	PHENYLPYRUVIC-OX	323	17.81
	33	HOMOVANILLIC	326	19.32
	34	VANILLYLMANDELIC	414	20.28
	35	HIPURIC(I)	251	21.10
その他の異常成分	36	PYDGLUTAMIC	273	16.80
	37	2-H-ISOVALERIC	262	11.98
	38	2-K-ISOVALERIC-OX	275	12.73
	39	2-K-3-M-VALERIC-OX	289	13.24
	40	2-K-ISOCAPROIC-OX	289	13.39
	41	TIGLYLGLYCINE(I)	229	17.59
	42	PROPIONYLGLYCINE(I)	263	15.37
	43	M-ACETOACETIC	260	13.76
	44	M-CITRIC	494	19.92
	45	M-MALONIC	262	12.86
46	ISOVALERYLGLYCINE(I)	231	16.56	
47	M-CROTONYLGLYCINE(I)	301	16.97	
48	OROTIC	362	19.59	
49	URACIL	256	14.60	
50	OXALIC	234	12.29	
51	GLYCOLIC	220	11.27	
52	GLYCOLIC	308	12.63	
53	GLYCOLIC			

MW:分子量

MU:メチレンユニット

-OX:オキシム-TMS誘導体, それ
以外はTMS誘導体

-H-:hydroxy-の略

-M-:methyl-の略

-K-:keto-の略

有機酸名の末尾の acid は省略

図3 マスクロマトグラフィーによるSPAR (定量値) の検量線

化合物1:lactate, 2:2-hydroxybutyrate, 3:pyruvate, 4:methylmalonate, 5:adipate, 6:p-hydroxyphenylacetate, 7:o-hydroxyphenylacetate, 8:succinate, 9:citrate

についてはマススペクトルで確認して化学診断を最終的に行った。

(3) 対象

本プログラム (MCSCR) は表2に示した疾患をスクリーニング対象疾患としている。今回テストした検体は表3に示した代謝異常児35例と正常児11例の尿である。

表2 MCSCRによるスクリーニング対象疾患

—分枝アミノ酸系—	—その他—
1) イソ吉草酸血症	12) 高乳酸血症
2) メチルクロトニルグリシン尿症	13) ジカルボン酸尿症
3) メチルグルタコン酸尿症	14) グリセロール尿症
4) ヒドロキシメチルグルタル酸尿症	15) ビログルタミン酸尿症
5) β -ケトチオラーゼ欠損症	16) ウラシルオロト酸尿症 (OTC欠損症)
6) プロピオン酸血症	17) ケトosis
7) メチルマロン酸血症	18) 神経芽細胞腫
—リジン系—	—アミノ酸代謝異常—
8) グルタル酸尿症I型	19) 撓糖尿症
—複数部位の障害—	20) フェニルケトン尿症
9) マルチアルカルボキシラーゼ欠損症	21) チロジン血症
10) E ₃ 欠損症	
11) グルタル酸尿症II型	

研究結果

(1) 分析例

グルタル酸尿症I型, 7カ月女児例。生後4カ月検診の時, 首のすわりの悪いことを指摘されて岐阜大学小児科関連病院より有機酸代謝異常スクリーニングを依頼された症例である。尿中有機酸は図4のようなガスクロマトグラムを示し, GC-MS分析後MCSCRによって処理させたところ図5のようにoutputした。すなわち*印のついた異常成分として, 大量の glutarate と, 正常で見られることのない glutaconate, 3-hydroxyglutarate があり, また adipate, 2-Ketoglutarate も増加していた。これらのプロフィールを文献と照らして本症と化学診断した。

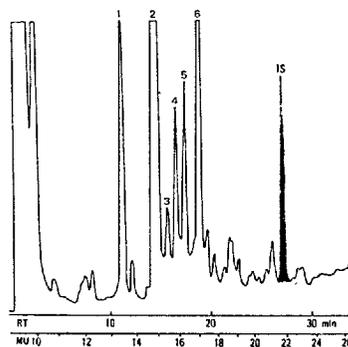


図4 グルタル酸尿症I型(7カ月女児)のガスクロマトグラム

ピーク1: urea, 2: glutarate,
3: glutaconate, 4: adipate,
5: 3-hydroxyglutarate,
6: 2-ketoglutarate,
1S: internal standard

NO.	COMPOUND NAME	SPAR.	NORMAL	RANGE	FACTOR
1	LACTIC	1.9	1.6	1.1-2.2	1.2
2	PYRUVIC-OX	15.0	10.0	4.2-14.6	1.5
5	ACETOACETIC-OX	0.9	0.0	0.0-0.0	0.9
11	3-H-3-M-GLUTARIC	2.9	0.2	0.0-1.1	* 14.4
12	CITRIC	11.5	19.5	1.5-56.5	0.6
13	ACONITIC	3.5	10.4	3.9-13.9	0.3
14	ISOCITRIC	16.7	7.6	1.0-17.7	2.2
15	2-K-GLUTARIC-OX	90.3	13.3	0.9-30.9	* 6.8
16	SUCCINIC	0.7	15.9	5.1-30.4	0.5
17	FUMARIC	13.0	5.1	2.5-14.6	* 7.7
20	ADIPIC	43.1	5.6	1.9-14.6	* 0.7
21	SUBERIC	4.1	5.9	0.9-5.5	* 441.3
23	GLUTARIC	1432.1	3.2	0.0-0.0	* ?
24	3-H-GLUTARIC	61.4	0.0	0.0-0.0	* ?
25	GLUTAONIC	20.5	0.0	0.0-0.0	* ?
28	4-H-PHENYLACETIC	13.9	29.0	10.6-38.7	0.5
34	HOMOVANILLIC	5.1	7.4	3.8-11.3	0.7
35	VANILLYLMANDELIC	0.7	0.0	0.0-0.0	0.7
37	PYDOGLUTAMIC	2.0	0.0	0.0-0.0	2.0
51	OXALIC	0.9	0.0	0.0-0.0	0.9

図5 グルタル酸尿症I型例(図4)のMCSCRによるoutput

SPAR: 定量値
NORMAL: 年令相当正常児の平均 SPAR
RANGE: 正常児における SPAR の範囲
FACTOR: 正常平均の何倍か
?: 正常ではみられない成分である
*: 異常成分であることを示す

(2) MCSCRの診断精度の検討

今回テストした正常、異常検体の分析結果を表3に示した。GCの段階ではごく一部に false positive または false negative 例があったが、GC-MSデータをMCSCRによって解析処理させた結果では、異常検体35例全例に診断の指標となる異常成分を検出することができ、一方正常児11例に関しては異常成分を検出した例はなかった。

表3 MCSCRによる異常成分検出の精度

疾患名	検体数	MCSCR(GC-MS)によって異常成分**の検出された件数	GCSCR(GC)によって異常ピークの検出された件数
イソ吉草酸血症	2	2	2
β-ケトチオラーゼ欠損症	1	1	1
プロピオン酸血症	4	4	4
メチルマロン酸血症	10	10	10
グルタル酸尿症I型	1	1	1
高乳酸血症	7	7	7
楓糖尿症(発作時)	1	1	1
(非発作時)	2	2	0
フェニルケトン尿症	3	3	3
チロシン血症	4	4	4
正常児(新生児)	37	0/5	2
(乳幼児)	28	0/6	0

* 新生児一過性高チロシン血症をふくむ ** 診断の指標となる異常成分

考 按

これまでにGC-MSデータの処理法に関していくつかの報告がある。Gates, Sweely⁴⁾⁵⁾らは retention index とマスマスペクトルのライブラリー検索を行う機能を備えたプログラムを報告しているが、MCSCRはこれと原理的には共通点があるものの、有機酸代謝異常症の異常成分を中心に編集された Tanaka²⁾らの Retention Index を採用したこと、SIを2ケのみに限ってスクリーニングの目的に不要の化合物は原則的に無視することで簡略化したこと、さらに検体前処理に溶媒抽出・オキシムTMS誘導体化法を採用して分析時間を短くした点などにおいて異なる。

我々は今回開発したMCSCRによっていくつかの検体テストした結果、次のような結論を得た。

- 1) MCSCRによって有機酸代謝異常スクリーニングにおけるGC-MSデータ解析、ルチン検索の作業がきわめて簡略化された。
- 2) MCSCRによる異常成分検出の精度はきわめて良好であった。
- 3) 最終的に化学診断する時、MCSCRによって得られた異常成分についてはマスマスペクトルで確認することが望ましい。
- 4) MCSCRによって、化学診断のみならず、他の中間代謝過程の成分の増減も知ることができるので各種の病態を把握する上にも有力な情報が得られると思われた。

最後にソフトウェアの開発に御協力いただいた島津制作所 山本孝氏、石田勝氏、窪寺俊也氏に深謝いたします。

文 献

1) 山口清次, 安田寛二, 折居忠夫: ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)による小児の有機酸代謝異常症の診断, 小児科 25(7): 769-782, 1984

- 2) Tanaka, K. and Hine, : Compilation of gas chromatographic retention indices of 163 metabolically important organic acids, and their use in detection of patients with organic acidemias, *J. Chromatography*, 239 : 301 — 322, 1982
- 3) Goodman, S.I. and Markey, S.P. : Diagnosis of organic acidemias by gas chromatography mass spectrometry.
Alan R. Liss, Inc., New York, 1981
- 4) Gates, S.C., Sweely, C.C., Krivit, W., Dewitt, D. and Blaisdell, B.E. : Automated metabolic profiling of organic acids in human urine. II. Analysis of urine samples from "healthy" adults, sick children, and children with neuroblastoma, *Clinical Chemistry*, 24 : 1680 — 1689, 1978
- 5) Mizuno, T., Abe, N., Teshima, H., Yamauchi, E., Itagaki, Y., Matsumoto, I., Kuhara T. and Shinka, T. : Application of a gas chromatography mass spectrometry computer system for clinical diagnosis, *Biomed. Mass Spectrometry*, 8 : 593 — 597, 1981



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

GC-MS による有機酸代謝異常スクリーニングを行うには、機器の維持の問題の他にデータ解析に熟練した技術・知識を必要とし、結果を得るまでにある程度の時間と人手がかかることが多い。そこで今回我々は有機酸代謝異常スクリーニングのための GC-MS データの自動検索・処理システムを開発し、データ解析の迅速化を試みた。