

B-11 GC/MS による Reye および Reye-like syndrome の患者尿有機酸プロファイルの解析

研究協力者：松本 勇（金沢医科大学 人類遺伝学研究所生化学部門）

共同研究者：久原とみ子、井上義人、松本雅裕、大倉隆司

（金沢医科大学 人類遺伝学研究所生化学部門）

1. 目 的

われわれは従来バルプロ酸（VPA）代謝について研究してきたが、たまたま RS と疑われた VPA 服用中の患者尿を分析して生化学的解析を試み、興味ある知見を得て前回の研究会議で報告した。

本報告は、VPA 服用していない RS の尿中有機酸を GC/MS 分析した結果と、前回の結果とを合わせて RS 発症の生化学的機作について考察を試みたものである。

Gerber ら¹⁾は RS の患者血中に VPA 代謝中間体の 2-n-propyl-4-pentenoic acid, Δ^4 VPA を発見して、類似の構造を有する 4-pentenoic acid が β -酸化されて 3-oxo-4-pentenoyl CoA となり、ミトコンドリアの脂肪酸の β -酸化酵素複合体の終末酵素である 3-ketoacyl-thiolase をアルキル化して非可逆的に不活性化するように、 Δ^4 VPA がさらに β -酸化されて生成する 2-n-propyl-3-oxo-4-pentenoic acid (3-oxo- Δ^4 VPA) が、脂肪酸の β -酸化を障害すると予想した。Baillie ら²⁾はミクロゾーム P450 による ω -酸化で生成する Δ^4 VPA が、P450 のヘムに対する自殺基質として作用し、 ω -酸化を抑制することを発見した。このように、VPA の異化によって生成する上記 2 つの代謝中間体が、それぞれ β -酸化と ω -酸化とを同時に障害する。

RS で肝臓における脂肪変性と脂肪肝が起るのは、上述のように脂肪酸の β -酸化と ω -酸化とが同時に障害され、2 次的に起こったものと考えられる。

さらに RS のもう 1 つの生化学的特徴である高アンモニア血症は、VPA の β -酸化によって蓄積した propionyl-CoA が、カルバミルリン酸合成酵素を障害するためと考えられる。

以上の生化学的知見に基に、今回9名のRS患者尿の分析結果からRS発症機序を解析することを目的として本実験を企画した。

2. VPA 代謝と Reye 症候群

VPA は β -酸化、グルクロン酸抱合および ω 、 $\omega-1$ 酸化により代謝される⁴⁾。VPA を服用した小児尿中には、VPA-glucuronide、 β -酸化体として3-oxo-VPA、3-hydroxy-VPA、 ω -酸化体として2-n-propylglutarate(PGA)、5-hydroxy-VPA、4-hydroxy-VPAなどの代謝産物が検出される他、尿中には少量の未変化体もある。血中には大部分未変化のVPAが検出され、その他に2-n-propyl-3-ene-VPA (α 、 β -unsaturated VPA)が少量検出される。後者は、 β -酸化の中間代謝物と考えられる⁴⁾。また尿中にVPA-carnitineが同定されるが非常に少量で、生理的には余り重要ではないと考えられてきた。しかし、RSとの関係でVPA-carnitineが見なおされつつある。

前回報告したRS発症後VPAを服用した患者についてGC/MS分析したわれわれの症例⁵⁾と、Kochenら⁶⁾の症例はそれぞれ次の通りである。すなわち、

Kochenらの症例は、phenobarbitalとVPAとが長期間連続投与されていて、致死的肝障害を呈した7才男児で、尿中に通常検出されるVPAの β -酸化体である3-oxo-VPAとVPA-glucuronideが消失しており、またVPAの ω -酸化体であるPGAが著しく低下していた。代ってVPAの不飽和体が異常に増加した。PhenobarbitalをVPAと同時に投与するとP450が誘導されて、VPAの ω -酸化を亢進し、 Δ^4 VPA産生が促進される。このように産生された Δ^4 VPAが逆にVPAの ω -酸化を障害し、上記の結果をもたらしたと考えられる。

本症例ではRSに特徴的な脂肪変性がみられず、肝壊死が著明であった⁶⁾。

他方、著者らの症例はRS発症後VPAが投与されていて、通常最も多く検出される β -酸化体の3-oxo-VPAが消失し、代って ω -酸化体のPGAが著明に増加していた。VPAのグルクロン酸抱合体は対照の健常児と略々同量検出された。内在性有機酸では乳酸とアジピン酸が著明に増加していたが、ケトン体は殆んど検出されず、他の一般的なRSの尿中有機酸のプロファイルと一致した⁵⁾。

前述のように、もしVPAが発症の原因であれば、 Δ^4 VPAと3-oxo- Δ^4 VPAがそれぞれ β -酸化と ω -酸化を同時に障害する著で、Kochenらの症例はこの

ケースに該当する。われわれの症例は ω -酸化が全く障害されなくて、 β -酸化のみが特異的に障害されていて、 Δ^4 VPA による障害がなかったことを示している。事実、発症前に薬物の投与がなく、したがって、少なくとも発症前にはVPAによる障害がなかった筈である。剖検の結果、脂肪変性が著明で、また感染症を前駆症状としている点や、その他の特徴もよくRSと一致していた。

以上のように、典型的なRSと考えられるわれわれの症例では、特異的にミトコンドリア内でおこなわれる β -酸化のみが障害され、 β -酸化の低下に対応してミクロゾーム酵素 P450 や glucuronyl-transferase、あるいは細胞質に局在するアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素が関与する ω -酸化、グルクロン酸抱合などが亢進、又は正常に機能していたことが明らかである。他方VPAが原因と考えられるKochenらの症例は β -酸化、 ω -酸化とグルクロン酸抱合が全て障害されていて、肝壊死による2次的なVPA代謝を観察したと思われ、典型的なRSとは生化学的発症機序が異なる。さらにこのような症例の多くは、phenobarbitalなどの併用がおこなわれていて、ミクロゾーム P450 が事前に誘導されている可能性が極めて高い。

VPAは血漿タンパクと結合している遊離脂肪酸と置換する⁷⁾。急性ウイルス性肝炎の患者でRSに先行するウイルス感染では、phospholipase A が遊離され、遊離脂肪酸の生成が亢進する結果、VPAと血漿タンパクとの結合を競合的に低下させる。また遊離脂肪酸は酸化リン酸化を脱共役させ、ミトコンドリア内の代謝を阻害する⁸⁾。事実、肝ミトコンドリアは in vitro で遊離脂肪酸により膨潤し、またRS患者で肝ミトコンドリアが膨潤していることが報告されている。尿路回路や糖質代謝系のうち、RSで活性低下をきたすのはミトコンドリアに局在する酵素に特異的で、細胞質の酵素は障害されないという報告が多い。このように急性ウイルス性肝炎などによるRSとVPAによるRS様の発症とは明らかに代謝の違いがみられる。さらに人の遺伝的な体質、すなわち、代謝特異性も発症に大きく関与していると考えられる。

3. Reye 症候群における有機酸代謝

以上、これまでに得られた知見に基づいて、本年度の研究期間中に得られたステージ I~IV の9名のRS患者尿中有機酸と転帰について纏めた結果を表1に

示す。

症例 8 と 8' は代謝異常の可能性が強い患者で、RS ではないと考えられている。臨床的に RS と診断された 7 名の患者では、ステージ I で著明な高乳酸尿、ケトン尿およびジカルボン酸尿が認められ、生存している症例ではいずれもステージ II 以降で殆んど正常の値に復している。これに対し、死亡例 9 ではステージ III でも、症例 1 に比べてやや低いものの、著明な高乳酸尿とケトン尿を呈している。

典型的な RS ではミトコンドリア内の β -酸化抑制される。筋肉の glucose や分岐鎖アミノ酸が動員され、alanine として肝臓に運ばれる。肝臓でアミノ基転移反応で生成した pyruvate はミトコンドリア内の pyruvate carboxylase が障害されているため、malate へ代謝されず、細胞質内に蓄積し、乳酸の生成に用いられる。筋肉で動員された分岐鎖アミノ酸のうち、valine と isoleucine はクエン酸回路で酸化分解されるが、leucine はケトン体生成に用いられるため、ケトン体が増加する。またミトコンドリア内で分解できない長鎖脂肪酸は、リポゾームで ω -酸化されて大量のジカルボン酸を生成する。しかし、ステージ II 以降で β -酸化能の低下と筋肉タンパク質の動員がさらに進行し、乳酸、ケトン体およびジカルボン酸が消失したものと考えられる。死の転機を辿った症例 9 ではこの障害が回復せずに進行し、そのため高乳酸尿やケトン尿が持続していたのであろう。一方、ステージ II 以降で生存している症例では、障害が徐々に回復したため上記の生化学的所見が消失していることが示唆される。

上記の考えは、RS で VPA 服用中の患者で観察された VPA 代謝の実験結果とよく符合する。

4. 結 論

Reye 症候群でVPA 服用患者の尿中VPA 代謝産物についてGC/MS 分析の結果から、典型的な RS ではミトコンドリアの β -酸化だけが特異的に障害されていることを示した。またいろいろなステージの9名のRS 患者の尿中有機酸を分析して、ステージI では脂肪酸の β -酸化が特異的に障害され、ステージ II 以降で生存している症例はその障害が回復しており、死の転機を辿った症例では障害が継続していることを示唆する結果を得た。

5. 文 献

1. N. Gerber, R. G. Dickinson, R. C. Harland, R. K. Lynn, D. Houghton, J. I. Antonias and J. C. Schimschock (1979) J. Pediatr., 95, 142 ~ 144
2. T. A. Baillie (1984) 医用マス研究会講演集、 9, 15 ~ 29
3. D. L. Coulter and R. J. Allen (1980) Lancet (June), 1310 ~ 1311
4. I. Matsumoto, T. Kuhara and M. Yoshino (1976) Biomed. Mass Spectrom., 3, 235 ~ 240
5. T. Kuhara, Y. Inoue, M. Matsumoto, T. Shinka, I. Matsumoto, K. Kitamura, H. Fujii and N. Sakura (1985) Clin. Chim. Acta, 145, 135 ~ 142
6. W. Kochen, A. Schneider and A. Ritz (1983) Eur. J. Pediatr., 141, 30 ~ 35
7. I. H. Patel and R. H. Levy (1979) Epilepsia, 20, 85 ~ 90
8. L. Vazquez-colon, F. D. Ziegler and W. B. Elliot (1966) Biochem., 5, 1143 ~ 1149

尿中代謝物パターンの特徴とステージ、転帰との関係

No.	ステージ	RS?	転帰	高乳酸尿	ケトン尿	ジカルボン酸尿
1	I	確定	生存	7400	270	168
6	II	典型的(ND)	生存	170	28	10以下
7	II	ND	生存	140	17	11
2	III	FC	生存	100	0	10以下
3	III	FC	生存	590	0	10以下
4	III	非定型(ND)	生存	14	5	10以下
9	III	?	死亡	1020	16	10以下
5	IV	否定	生存	14	9	10以下
8	II	代謝異常?	死亡	27500	252	422
8'	IV			17600	50	126
対照値				14-33	5以下	10以下

ND : Liver biopsy was not performed. FC : Fatty change was found.



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



1. 目的

われわれは従来バルプロ酸(VPA)代謝について研究してきたが、たまたまRSと疑われたVPA服用中の患者尿を分析して生化学的解析を試み、興味ある知見を得て前回の研究班会議で報告した。

本報告は、VPA服用していないRSの尿中有機酸をGC/MS分析した結果と、前回の結果とを合わせてRS発症の生化学的機作について考察を試みたものである。

Gerberら¹⁾はRSの患者血中にVPA代謝中間体の2-n-propyl-4-pentenoic acid, 4VPAを発見して、類似の構造を有する4-pentenoic acidが一酸化されて3-oxo-4-pentenoyl CoAとなり、ミトコンドリアの脂肪酸の一酸化酵素複合体の終末酵素である3-ketoacyl-thiolaseをアルキル化して非可逆的に不活性化するように、4VPAがさらに一酸化されて生成する2-n-propyl-3-oxo-4-pentenoic acid(3-oxo-4VPA)が、脂肪酸の一酸化を障害すると予想した。Baillieeら²⁾はミクロゾームP450による一酸化で生成する4VPAが、P450のヘムに対する自殺基質として作用し、一酸化を抑制することを発見した。このように、VPAの異化によって生成する上記2つの代謝中間体が、それぞれ一酸化と一酸化とを同時に障害する。

RSで肝臓における脂肪変性と脂肪肝が起るのは、上述のように脂肪酸の一酸化と一酸化とが同時に障害され、2次的に起こったものと考えられる。

さらにRSのもう1つの生化学的特徴である高アンモニア血症は、VPAの一酸化によって蓄積したpropionyl-CoAが、カルバミルリン酸合成酵素を障害するためと考えられる。以上の生化学的知見に基に、今回9名のRS患者尿の分析結果からRS発症機序を解析することを目的として本実験を企画した。