

アシルカルニチン定量分析法の検討
—有機酸代謝異常症のスクリーニング法への応用—

木戸内 清

要約 カルボン酸分析計を応用したアシルカルニチン定量分析法について検討した結果、3種の異性体を含む12種のアシルカルニチンの同時定量分析が、1検体3時間30分で連続自動分析ができることを確認した。先天有機酸代謝異常症例の尿分析では、それぞれの疾患に特異的なアシルカルニチン（マルチプルアシル CoA 脱水素反応欠損症：イソバレリルー、イソプチリルー、グルタリルー、プチル、ヘキサノイル、オクタノイルカルニチン；プロピオン酸血症およびメチルマロン酸尿症：プロピオニルカルニチン；グルタル酸尿症 1 型：グルタリルカルニチン）を検出定量した。アシルカルニチンの尿中排泄量は患児の状態により著しく変動したが、本分析法は有機酸代謝異常症の診断に有用であることを確認した。

見出し語：カルボン酸分析計，アシルカルニチン，先天有機酸代謝異常症

研究目的 有機酸代謝異常症の化学診断には尿有機酸分析が広く用いられている。尿および血清中の有機酸は、酸素欠損や活性の低下によってミトコンドリア内に溜ったアシル CoA から遊離して未変化のまま細胞外に排泄されたものや、その有機酸が β 酸化や ω 酸化および $\omega - 1$ 酸化系によって代謝された産物を含む。それ故、尿および血清中の有機酸はかならずしも生体内に蓄積したアシル CoA を直接反映するものではない。蓄積したアシル CoA をより直接的に推定しうる尿中代謝産物として N-アシルグリシンとアシルカルニチンが知られている。両者は名古屋市立東市民病院小児科 (Dept. of Pediatrics, Nagoya City Higashi General Hospital)

代謝障害部位の推定と共に、有機酸の尿中排泄による解毒効果が期待されている。アシルカルニチン分析については、未だ臨床の場に対応できる定量分析法が報告されていないため、われわれはその確立に取り組み¹⁻³，短鎖および中鎖アシルカルニチンの分析法についてはすでに昨年の本班会議で報告した⁴。今回、他の分析法では定量できない異性体を含む12種のアシルカルニチンの同時定量分析が可能となったので報告する。

研究方法 高速液体クロマトグラフィー用のラム (CLC-ODS, 6 × 150 mm, 5 μ m, 島津) を装備したカルボン酸分析計 (東京理科器械,

以下CAA)をカラム温度37°Cで用いた。ステップグラジエントにより分離液(磷酸バッファー)のアセトニトリル濃度を3段階(1:5%, 0-50 min; 2:17%, 51-120 min; 3:38%, 121-190 min)に切り替え,オートサンプラー(100 μl)を用いて1サイクル3時間30分の自動連続分析を行った。有機酸除去のための前処理カラムは1 mlのデスポ注射器を用い,その末端にコネクターを挿入し,MCI-CAO8P陰イオン交換樹脂(Cl⁻型)を注射器で注入し,作製した。このカラムに内部標準のヘプタノイルカルニチン15 μgを加えた尿1 mlを約1分間で注入し,その流出液を300 μlに濃縮して分析に用いた。生体試料としては,マルチプルアシルCoA脱水素反応の欠損例,プロピオン酸血症例,メチルマロン酸尿症例およびグルタル酸血症I型例の尿を用いた。

結果および考察 前処理における12種のアシルカルニチンの回収率と分離時間の再現性を表1に示した。回収率は,3種の濃度の標品を用い

1. 尿(pH 5.2~7.3)中に加えた12種のアシルカルニチンの回収率
標品量(25~47 nmol, 13~28 nmol, 8~16 nmol, n=6)

A-C	G-C	P-C	iB-C	B-C	2MB-C	iV-C	nV-C	Hx-C	Hp-C	Vp-C	O-C
82±1.4	87±6.2	89±5.5	94±4.6	99±2.2	98±1.9	99±2.0	96±2.4	93±5.3	94±1.2	96±3.6	95±4.3

2. 分離時間の再現性(尿: pH 5.2~7.3, C.V., %, n=5)

A-C	G-C	P-C	iB-C	B-C	2MB-C	iV-C	nV-C	Hx-C	Hp-C	Vp-C	O-C
0.7	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1

表1. 前処理における回収率と再現性

A-C:アセチルカルニチン, G-C:グリタリルカルニチン, P-C:プロピオンカルニチン, iB-C:イソバチリルカルニチン,
B-C:バチリルカルニチン, 2MB-C:2メチルバチリルカルニチン, iV-C:イソバレリルカルニチン, nV-C:ノドバチリルカルニチン,
Hx-C:ヘキサノイルカルニチン, Hp-C:ヘプタノイルカルニチン, Vp-C:オクタノイルカルニチン, O-C:オクタノイルカルニチン

て検討した結果,82±1.4から99±2.2の範囲にあり,内部標準に対する相対的回収率も安定していた。分離時間の再現性は0.1から0.7 C.V.%の範囲内にあり,よい再現性を認めた。検

量線は前回報告したように3 nmolから100 nmolの間でよい直線性を確認した。図1-A

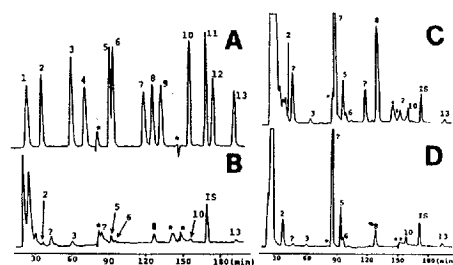


図1. 加減分析計を応用したアシルカルニチン定量分析法によるカルニチンおよび12種のアシルカルニチン標品のクロマトグラム(A)とマルチプルアシルCoA脱水素反応II型例の尿のクロマトグラム(B:カルニチン投与前, C:カルニチン投与14時間, D:カルニチン投与19日目)
ピーク:1.カルニチン, 2.アセチルカルニチン, 3.グリタリルカルニチン, 4.イソバチリルカルニチン,
5.バチリルカルニチン, 6.2メチルバチリルカルニチン, 7.2-メチルプロピルカルニチン, 8.イソバレリルカルニチン,
9.ノドバチリルカルニチン, 10.ヘキサノイルカルニチン, 11.ヘプタノイルカルニチン, 12.オクタノイルカルニチン,
13.オクタノイルカルニチン

は12種のアシルカルニチン25から47 nmolのクロマトグラムでバチリルカルニチンの異性体のピーク5(バチリルカルニチン)とピーク6(イソバチリルカルニチン)およびイソバレリルカルニチンの異性体のピーク7(2メチルバチリルカルニチン), 8(イソバレリルカルニチン), 9(バレリルカルニチン), さらにピーク12(バルプロイルカルニチン)とピーク13(オクタノイルカルニチン)もよく分離し定量できた。

図1のB-DはマルチプルアシルCoA脱水素反応の欠損症例の尿クロマトグラムであり,DLカルニチン投与後,最も尿中排泄量の多い特異的なアシルカルニチンはイソバレリルカルニチ

ン(ロイシン)からイソブチリルカルニチン(バリン)に変わることを確認した⁵。図1-Cの様にアセチルカルニチンの分離が不十分な尿については5×500mmの有機酸分析用の陰イオンカラムを用いて前処理し、再度分析した。またアシルカルニチンの同定には、それぞれのアシルカルニチン分画のFAB/MS分析(図2)と分画採取液を加水分解した後に、構成有

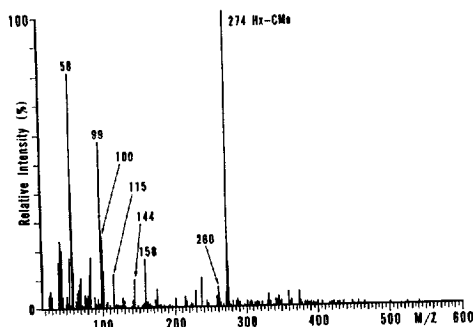


図2. 尿アシルカルニチン分析のバリン分画(図1-Cのピーク10)のFAB-MS分析

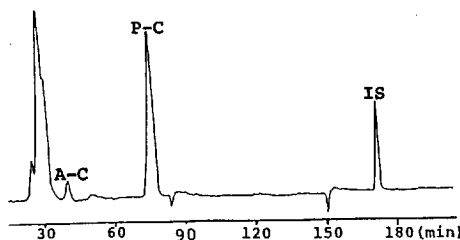


図3. プロピオン酸血症の尿アシルカルニチン分析のクロマトグラム
A-C:アセチルカルニチン、P-C:プロピオンカルニチン

機酸をCAAによる有機酸分析で確認した。図3はプロピオン酸血症例のカルニチン投与中で全身状態の良い時の尿クロマトグラムである。アセチルカルニチン(以下A-C)は459 nmol/mg creatinineでプロピオンカルニチン(以下P-C)3997 nmol/mg creatinineであった。他のアシルカルニチンは感度以下で検出できなかった。一方同じ症例の全身状態の悪い時の尿ではA-C:99, P-C:5245 nmol/mg crea-

tinineでA-Cの減少と、P-Cの増加が認められた。メチルマロン酸尿症例の全身状態の悪い時の尿ではA-C:351, P-C:1510 nmol/mg creatinineを検出した。図4はグルタル酸尿症の1型例の全身状態の悪い時の尿でA-C:628,

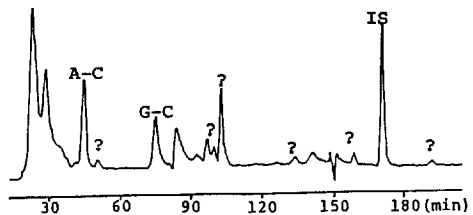


図4. グルタル酸尿症1型例の尿アシルカルニチン分析のクロマトグラム
A-C:アセチルカルニチン、G-C:グルタリルカルニチン、IS:内部標準(ヘキサノイルカルニチン)

グルタリルカルニチン:317 nmol/mg creatinineであった。またイソブチリルカルニチン、ブチリルカルニチン、ヘキサノイルカルニチン、オクタノイルカルニチンの分離時間に一致するピークを認めた。この尿の分析には分離液の1液として3%アセトニトリルリン酸バッファを用いており、5%アセトニトリルを用いた時よりもA-Cの分離は良くなった。

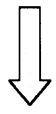
1983年にカーナーとビーバーが報告したアシルカルニチン分析法は高感度の分析ができるが、酵素の精製と放射性物質が必要であり、またイソバレリルカルニチンの異性体の分離定量ができない⁶。この報告以後に様々な試みがなされているが、いずれもCAAを用いた本分析法と比較して多くの制約をもっている。FAB/MSや同様の原理に基づくSIMSはアシルカルニチンのプロファイルを判定するには比較的良い方法であるが^{7,8}、試料中のアシルカルニチン量によって、それぞれのアシルカルニチンのイオン化が大きく影響を受けるために、定量分析にはそれぞれの安定同位体が必要になり⁹、また分子量が判別できるに過ぎないために、正確な同定のためにはリンクドスキャン等の採用が求

められる。イオン強度の弱いものには、そのアシルカルニチンの精製操作なしには同定不可能である。また異性体の同定にはガスケルらが用いたタンデムマスが必要となり¹⁰、定量にはやはり安定同位体が不可欠となる。現在のCAA法で12種のアシルカルニチンが定量できるが、今後ステップグラジェントからリネアグラジェント法に換えることにより、より正確な分離と、ジカルボン酸アシルカルニチンや不飽和脂肪酸および長鎖脂肪酸のアシルカルニチン同時定量分析が可能と思われる。アシルカルニチン分析による有機酸代謝異常症の化学診断は従来の有機酸分析に比較して、カルニチン療法を続けながら診断可能な点である。今後、臨床の場で用いることのできる、さらに優れたアシルカルニチン定量分析法として発展確立すると同時に、スクリーニング法としての応用についても検討したい。

文 献

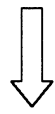
1. Kidouchi K, Sugiyama N, Morishita H, Kobayashi M, Wada Y, Nohara D. Identification of glutaryl-carnitine in glutaric aciduria type 1 by carboxylic acid analyzer with an ODS reverse-phase column. *Clin Chim Acta* 1987; 164: 261-266.
2. Kidouchi K, Sugiyama N, Morishita H, Kobayashi M, Wada Y, Nagai S and Sakakibara J. Identification of Glutaryl-carnitine in Glutaric Aciduria Type 1. *J. Inher. Metab. Dis.* 10: (Suppl. 2) 279-281.
3. Kidouchi K, Sugiyama N, Morishita H, Wada Y, Nagai S, Sakakibara J. Analytical method for urinary glutaryl-carnitine, acetylcarnitine and propionyl-carnitine with a carboxylic acid analyser and a reversed-phase column. *J Chromatogr* 1987; 423: 297-303.
4. 小林正紀, 木戸内 清, 和田義郎, Acylcarnitine分析による先天性有機酸代謝異常症の診断, 厚生省心身障害研究マスキリーニングに関する研究, 昭和61年度研究報告書, 187-190, 1987.
5. Kidouchi K, Niwa T, Nohara D, Asai K, Sugiyama N, Morishita H, Kobayashi M, Wada Y. Urinary acylcarnitines in a patient with neonatal multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency, quantified by a carboxylic acid analyzer with a reversed-phase column. *Clin Chim Acta* 1988 (in press).
6. Bieber LL, Kerner J. Short-chain acylcarnitines: identification and quantitation. In: Chytil F, McCormick, DB eds, *Methods in Enzymology, Vitamins and coenzymes, Part H.* New York: Academic Press, 1986; 123: 264-276.
7. 山本重則, 柿沼宏明, 西牟田敏之, 森和夫, 高柳正樹. 有機酸尿症における尿中アシルカルニチン・プロフィール - 内部標準物質にD₃-acetylcarnitineを用いたSIMSによる尿中アシルカルニチンの半定量分析. 医用マス研究会講演集 1987; 12: 243-251.

8. Roe CR, Millington DS, Maltby DA, Kinnebrew P. Recognition of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in asymptomatic siblings of children dying of sudden infant death or Reye-like syndromes. J Pediatr 1986; 108: 13-18.
9. Millington DS, CR Roe, Maltby DA. Application of high Resolution fast atom bombardment and constant B/E ratio linked scanning to the identification and analysis of acylcarnitines in metabolic disease. Biomed Mass Spectrom 1984; 11: 236-241.
10. Gaskell SJ, Guenat C, Millington DS, Maltby DA, Roe CR. Differentiation of isomeric acylcarnitines using tandem mass spectrometry. Anal Chem 1986; 58: 2801-2805.



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



要約 カルボン酸分析計を応用したアシルカルニチン定量分析法について検討した結果, 3 種の異性体を含む 12 種のアシルカルニチンの同時定量分析が, 1 検体 3 時間 30 分で連続自動分析ができることを確認した。先天有機酸代謝異常症例の尿分析では, それぞれの疾患に特異的なアシルカルニチン(マルチプルアシル CoA 脱水素反応欠損症: イソバレリルー, イソプチリルー, グルタリルー, ブチル, ヘキサノイルー, オクタノイルカルニチン; プロピオン酸血症およびメチルマロン酸尿症プロピオニルカルニチン; グルタル酸尿症 1 型: グルタリルカルニチン)を検出定量した。アシルカルニチンの尿中排泄量は患児の状態により著しく変動したが, 本分析法は有機酸代謝異常症の診断に有用であることを確認した。