

## FAB/MS による尿中アシルカルニチン測定

和田義郎, 佐久間徹, 浅井清文  
杉山成司, 小林正紀

要約: FAB/MS を用いて尿中アシルカルニチンの分析を行った。グルタル酸尿症 I 型, II 型, プロピオン酸血症, ビタミン B<sub>12</sub> 不応性メチルマロン酸血症等のアシル CoA 蓄積性疾患ではその代謝障害から推定されるアシルカルニチンが検出された。また逆にアシル CoA が蓄積しない古典的メーブルシロップ尿症では有意なアシルカルニチンは検出されず, 尿中アシルカルニチンのパターン分析の病態理解における有用性が明瞭になった。今後の同法による分析は血中, 組織中の微量アシルカルニチンの測定のためと, また同法によるアシルカルニチンの定量化が課題と思われる。私達は D<sub>3</sub> カルニチンを用いて尿中の遊離カルニチン, アシルカルニチンの分析を始めているが, これにより, FAB/MS による有機酸代謝異常症のマスキングにおける有用性が一段と増すものと考えられる。

見出し語: FAB/MS, 有機酸代謝異常症, 定量, D<sub>3</sub> カルニチン

### はじめに

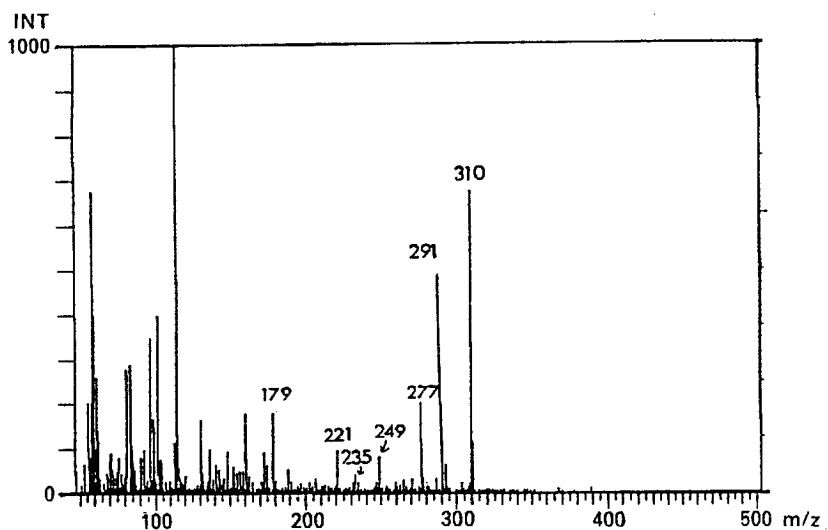
先天性有機酸代謝異常症の診断の一つに尿中アシルカルニチンの測定が有用であることが知られている。当教室では以前よりカルボン酸分析計を応用してアシルカルニチンの定量分析を行い報告している。さらに FAB/MS を用いて尿中アシルカルニチンスpekトルの解析も行っている。そこで今回数疾患における尿中アシルカルニチンの FAB/MS スペクトラムを呈示し, FAB/MS による分析の展望について報告する。

### 材料と方法

尿: すでに酵素学的に診断されているグルタル酸尿症 I 型, グルタル酸尿症 II 型, プロピオン酸血症, ビタミン B<sub>12</sub> 不応性メチルマロン酸血症, 古典的メーブルシロップ尿症の各患児の尿 0.1 ml を用いた。これに内部標準としてヘプタノイルカルニチン 10 nmol を加えて凍結乾燥し, それを 3.5 N 塩酸/メタノールの 20  $\mu$ l で溶解後, 45°C 10 分間の加熱処理を行い, メチル化した。その 1~2  $\mu$ l を FAB/MS で分析した。FAB/MS は日

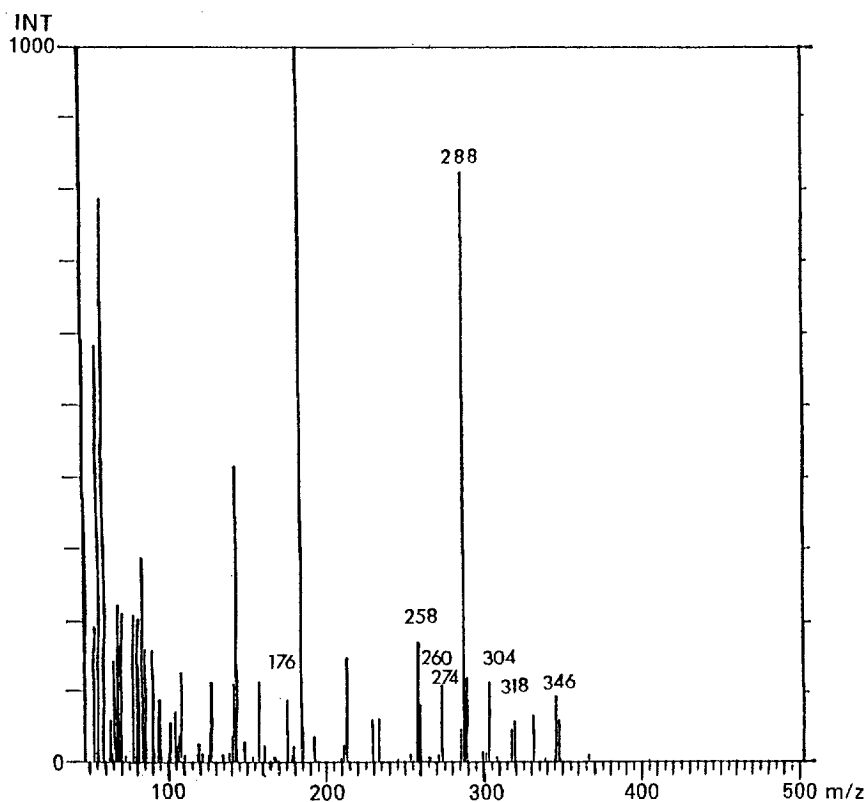
名古屋市立大学小児科

Department of Pediatrics, Nagoya City University Medical School



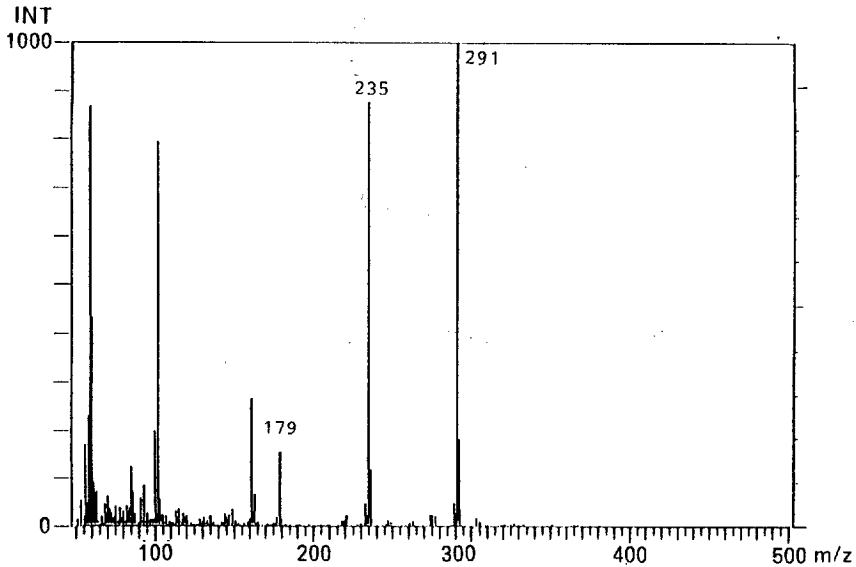
179: carnitine, 221: acetylcarnitine, 235: propionylcarnitine, 249: butyryl/isobutyrylcarnitine, 277: hexanoylcarnitine, 291: heptanoylcarnitine (IS), 310: glutarylcarnitine.

☒ 1. Glutaric aciduria, type I

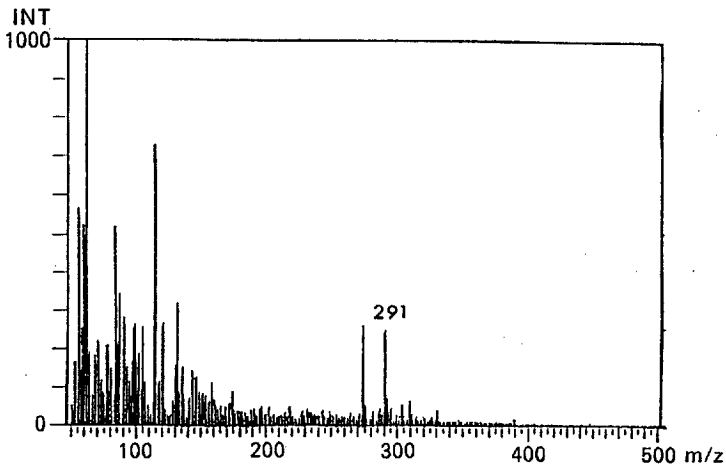


176: carnitine, 246: butyryl/isobutyrylcarnitine, 258: tiglylcarnitine, 260: isovaleryl/2-methylbutyrylcarnitine, 274: hexanoylcarnitine, 288: heptanoylcarnitine (IS), 300: octenoylcarnitine, 302: octanoylcarnitine, 304: glutarylcarnitine, 318: adipyl/3-methylglutarylcarnitine, 346: suberylcarnitine.

☒ 2. Glutaric aciduria, type II



179: carnitine, 221: acetylcarnitine, 235: propionylcarnitine, 291: heptanoylcarnitine.  
 図 3. Propionic acidemia



291: heptanoylcarnitine (IS).  
 図 4. Maple syrup urine disease

本電子製の2重集束型質量分析計 JMS-DX 300 を使用した。ガスはアルゴンガス、ガン電圧 3 keV, 2次電圧 6 keV とした。マトリックスにはグリセロールを用いた。質量較正は CsI+KI を用いた。

結 果

図 1 より図 4 までに各々の FAB/MS スペ

クトラムを示した。図 1 は D<sub>3</sub> メタノールでメチル化したグルタル酸尿型 I 型のものである。M/Z 310 のグルタリルカルニチンのみが主なイオンであった。図 2 は D<sub>0</sub> メタノールでメチル化したグルタル酸尿症 II 型のものである。M/Z 246 の *n*-ブチリル/イソブチリルカルニチン, M/Z 260 の *n*-バレリル/イソバレリル/2メチルブチリルカルニチン,

M/Z 302 のオクタノイルカルニチン, M/Z 304 のグルタリルカルニチン, M/Z 318 のアディピル/3-メチルグルタリルカルニチン等の種々のイオンが検出されている。グルタル酸血症 I 型, II 型とも各 2 症例の分析を行ったが同一のスペクトラムであった。図 3 は  $D_3$  メタノールでメチル化したプロピオン酸血症の症例である。M/Z 179 の遊離カルニチンと M/Z 235 のプロピオニルカルニチンが主なイオンであった。メチルマロン酸血症の FAB/MS スペクトルはプロピオン酸血症のそれと同様であり, メチルマロニルカルニチンのイオンは検出されなかった。図 4 はメープルシロップ尿症のものであるが, アシルカルニチンの有意なイオンの出現は観察されなかった。

#### 考 案

尿の各種アシルカルニチンスペクトラムはミトコンドリア内の代謝状態を反映する良い指標であると考えられる。アシルカルニチンの化学的特質より, 質量分析法として FAB/MS 法は最も適していると考えられる。この方法は利点として, 尿の前処理が不用で, 測定が短時間で済むこと, また血中, 組織中の微量測定などに関してはその有用性が充分発揮されることなどが挙げられる。反面 FAB/MS では異性体の分別が不可能である。このため私達はカルボン酸分析法との併用解析が最も確実な分析法であると考えている。今後 constant B/E ratio linked scanning も行いさらに分析の幅を広げる予定である。

各種疾患におけるアシルカルニチンは図 1 より図 3 までの代表的なアシル CoA 脱水素酵素, 脱水素反応, カルボキシル化の障害に

基づく症例であるが, その代謝障害により推定される異常パターンが明瞭に示されている。これに対して図 4 のメープルシロップ尿症は, 分枝鎖アミノ酸の酸化的脱炭酸反応の障害のためにこれらの中間アシル CoA 代謝物は蓄積されず, 尿中アシルカルニチンの異常イオンが検出されないものと考えられる。このように FAB/MS スペクトラムの解析はパターン認識という点から優れた診断法の 1 つといえる。

今後の FAB/MS による解析の課題は, FAB/MS を用いた定量法である。すでにアセチル基に  $D_3$  が着いた  $D_3$  アセチルカルニチンを用いたアセチルカルニチンの定量法は報告されている。しかしこうした安定同位体法による解析では種々の安定同位体標識アシルカルニチンの入手が困難であった。私達はすでに報告しているように 16 種についてのアシルカルニチンの合成を行っているので, その経験より,  $D_3$  カルニチンを用いてアシル  $D_3$  カルニチンの合成を行い, 遊離カルニチンとともに尿中の主要なアシルカルニチンの FAB/MS による同時定量を行う予定である。図 5 にアセチル  $D_3$  カルニチンを内部標

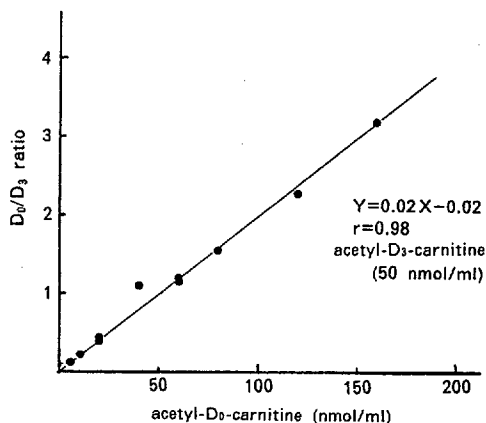
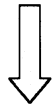


図 5

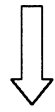
準として用いた時の尿中 アセチルカルニチンの定量曲線を示したが、有意な相関が得られている。今後この D<sub>3</sub> 体を用いた尿中アシルカルニチンの分析により、有機酸代謝異常

症のスクリーニングに、FAB/MS による定性定量分析がより有力な手段となり得るものと考えられる。



## 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:FAB/MS を用いて尿中アシルカルニチンの分析を行った。グルタル酸尿症 1 型, 型, プロピオン酸血症, ビタミンB12 不応性メチルマロン酸血症等のアシルCoA 蓄積性疾患ではその代謝障害から推定されるアシルカルニチンが検出された。また逆にアシル CoA が蓄積しない古典的メープルシロップ尿症では有意なアシルカルニチンは検出されず,尿中アシルカルニチンのパターン分析の病態理解における有用性が明瞭になった。今後の同法による分析は血中,組織中の微量アシルカルニチンの測定のためと,また同法によるアシルカルニチンの定量化が課題と思われる。私達は D3 カルニチンを用いて尿中の遊離カルニチン,アシルカルニチンの分析を始めているが,これにより,FAB/MS による有機酸代謝異常症のマスクリーニングにおける有用性が一段と増すものと考えられる。