

新生児21-ヒドロキシラーゼ欠損症のGCMSによる確定診断 第1報 — GCMS法とGC法との比較 —

(分担研究：マス・スクリーニングシステムの情報収集・利用に関する研究)

安蔵 慎^{*1}, 松尾宣武^{*1}, 本間桂子^{*2}

要約：17-hydroxyprogesterone (17-OHP)及びその代謝物は、新生児21-hydroxylase欠損症(21-OHD)診断上最も有用な指標である。今回ガスクロマトグラフ(GC)法(HP5880A)及びガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)法(HP5890A, HP5971A)により、pregnanetriol (PT, 17-OHP主要代謝物), 16 β -hydroxydehydroepiandrosterone (16 β HD, GCチャート上PTと保持時間がほぼ等しい)を含む51種標準物質混合物(各標準物とも500ng/tube含有), 及びPT標準物質希釈物(5, 10, 20, 30, 40, 50, 100ng/tube含有)を定量した。PTと16 β HDとの分別定量は、GC法では困難であったが、GCMS法では明確に行ない得た。PTの最小検出感度は、GC法50ng/tube, GCMS法5ng/tubeであった。

新生児21-hydroxylase欠損症の早期診断上、GCMS法はGC法に比し、特異性及び感度の点でより信頼性の高い情報を提供することが示唆された。

見出し語：ガスクロマトグラフ質量分析法, 21-hydroxylase欠損症, 尿中17-OHP代謝物

【緒言】

われわれは、尿中17-hydroxyprogesterone (17-OHP)代謝物3分画(17-hydroxy-pregnanolone (17HP), pregnanetriol (PT), pregnanetriolone (Ptl)), cortisol代謝物(tetrahydrocortisone), 胎児副腎・胎児肝由来の16-hydroxy Δ 5steroid 4分画(16 α -hydroxydehydroepiandrosterone,

16-oxoandrostenediol, androstenetriol, 16-hydroxypregnenolone)をガスクロマトグラフ(GC)法により測定し、新生児21-hydroxylase欠損症(21-OHD)の確定診断を行っている¹⁾。しかし新生児早期においては、GCチャート上17-OHP代謝物のピークが胎児副腎・胎児肝由来のステロイドのピークと重なり、GC法による17-OHP代謝物の測定が困難な場合がある。今回GC法及びガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)法により、胎児型ステロイド16 β -hydroxydehydroepiandrosterone (16 β HD)の存在下でPT

^{*1} 慶大小児科, ^{*2} 慶大中央臨床検査部 (Dep. of Pediatrics and Clinical Laboratories, Keio University School of Medicine)

を定量し、17-OHP代謝物の分別定量性を比較検討した。

【GCMS法の原理と用語(図1)】

今回用いたGCMS法は、GCにより分離した尿中ステロイド代謝物に熱電子線を照射し、生ずる分子イオン及びフラグメントイオンを連続的に質量分析する方法である。図の左側の棒グラフはある時刻での質量分析の結果で、マススペクトルという。特定の分子イオン又はフラグメントイオンの強度を経時的に追跡することを、選択的イオンモニタリング(SIM)といい、得られたグラフをマスクロマトグラムという。すべての分子イオン及びフラグメントイオンのマスクロマトグラムを重ね合わせたものを、総イオンクロマトグラム(TIC)という。

【方法】

分別定量性の比較は、PT及び16 β HDを含む51種類の標準物質混合物(各標準物とも500ng/tube含有)によった。感度の比較は、PT標準物質希釈物(5, 10, 20, 30, 40, 50, 100ng/tube含有)によった。

GC法による定量は、上記標準混合検体及びPT単独検体をmethoxime-trimethylsilyl誘導化し、HP5880A(Heキャリア, methylsiliconカラム, 昇温速度1 $^{\circ}$ C/分)を用いて行なった。PTの最小検出感度は、GCチャート上、そのピークを基線のノイズと明らかに区別し得る最少PT量とした。

GCMS法による定量は、上記標準混合検体及びPT単独検体をGC法と同様に誘導化し、HP5890A(Heキャリア, methylsiliconカラム, 昇温速度2 $^{\circ}$ C/分), HP5971A(四重

極型質量分析計)を用いて行なった。PT及び16 β HDに特有のフラグメントイオンと既知量の内部標準物質とのSIMマスクロマトグラム上でのピーク面積比から、検体中のPT及び16 β HD含有量を求めた。PTの最小検出感度は、検体中のPT量とGCMS法による測定値とが比例する最少PT量とした。

【成績】

1) GC法

標準混合検体のGCチャート上では、PTと16 β HDのピークが重なり、PTを選択的に検出することはできなかった(図2)。GC法によるPTの最小検出感度は、50ng/tubeであった。

2) GCMS法

標準混合検体のTIC(図3)上PT分画のピークがあると思われる44.994分でのマススペクトル(図4)において、PT及び16 β HDに特有でかつ共通でない質量255m/z(PT), 446m/z(16 β HD)のフラグメントイオンを選択し、これらのSIMを行なうことにより、GC上保持時間がいずれも約45分であるPTと16 β HDとを明確に分別定量し得た(図5)。GCMS法によるPTの最小検出感度は、5ng/tubeであった(図6)。

【考察】

今回の検討から、GCMS法によりGC法では困難であった胎児型ステロイド存在下でのPTの明確な分別定量が可能であること、PTの定量においてGCMS法はGC法に比し10倍高感度であることが判明した。これは、Yongら²⁾のGCMS法を用いた成熟21-OHD児(生後1~30日)及び対照児(生後

1日～4週)各16例での成績に一致するものである。Yongらは、尿中17-OHP代謝物を指標とする21-OHDの鑑別診断が、生後数日以内に5例中4例において可能で、5例中1例において困難であったと報告し、GCMS法の有用性を確認している。

GCMS法による新生児21-OHD早期診断法の限界については、今後多数例での検討が必要である。

文献

- 1)本間桂子他.:尿ステロイドプロフィールを用いる新生児21-hydroxylase欠損症の診断について:ホルモンと臨床,39,1057-1062,1991
- 2)A.B.W.Yong, et al.:Diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in newborn infant by GC-MS of urinary steroids :Aust. Paediatr. J., 24,280-285,1988

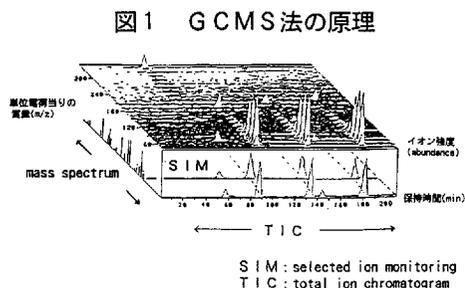


図2 標準混合検体のGCチャート

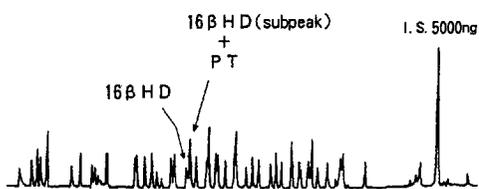


図3 標準混合検体の総イオンクロマトグラム

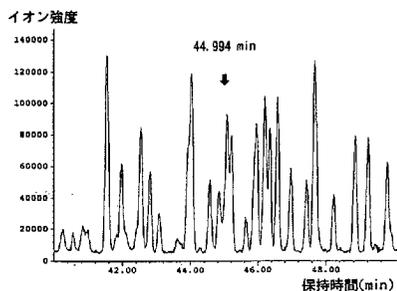


図4 標準混合検体のマスペクトル(44.994分)

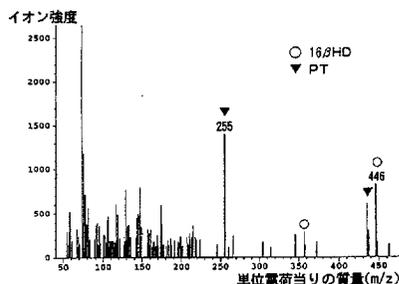


図5 標準混合検体のSIMマスキロマトグラム

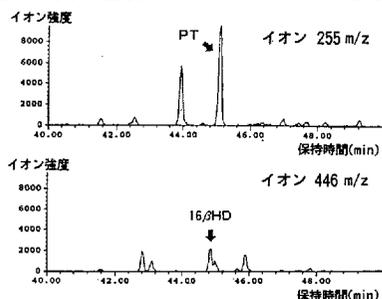
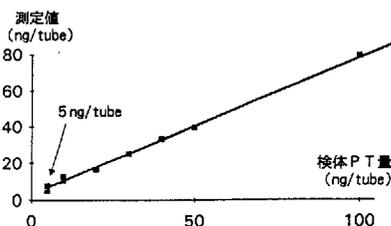


図6 GCMS法によるPT希釈試験





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:17-hydroxyprogesterone(17-OHP)及びその代謝物は,新生児 21-hydroxylase 欠損症(21-OHD)診断上最も有用な指標である。今回ガスクロマトグラフ(GC)法(HP5880A)及びガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)法(HP5890A,HP5971A)により,pregnanetriol(PT,17-OHP主要代謝物),16 β -hydroxydehydroepiandrosterone(16 β HD,GC チャート上 PT と保持時間がほぼ等しい)を含む 51 種標準物質混合物(各標準物とも 500ng/tube 含有),及び PT 標準物質希釈物(5,10,20,30,40,50,100ng/tube 含有)を定量した。PT と 16 β HD との分別定量は,GC 法では困難であったが,GCMS 法では明確に行ない得た。PT の最小検出感度は,GC 法 50ng/tube,GCMS 法 5ng/tube であった。

新生児 21-hydroxylase 欠損症の早期診断上,GCMS 法は GC 法に比し,特異性及び感度の点でより信頼性の高い情報を提供することが示唆された。