

フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ欠損症の
尿中糖リン酸によるスクリーニング
(分担研究：マス・スクリーニング対象疾患検討に関する研究)

須藤正克、重松陽介、中井昭夫

要約：フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ欠損症の急性発症時の尿中異常代謝産物を検索し、イオン交換樹脂抽出有機酸画分の中に、特異的な糖リン酸である fructose-1,6-diphosphate, glycerol-3-phosphate を多量に検出した。この同定には、通常の有機酸分析に用いる誘導体化とガスクロマトグラフによる分析法を用いたが、糖リン酸はこのような誘導体化や高温での処理に対して不安定であり、定量的な分析は困難であった。誘導体化を行わない分析法として、IonSpray イオン化による質量分析法を用いて水溶液標品での検討を行ったところ、感度良く疑似分子イオンを測定できた。糖リン酸を効率的に抽出し、HPLCによる分離操作を追加すれば精度良く分析できる可能性が示唆され、ハイリスクグループの迅速なスクリーニングに利用できるのではないかと考えられた。

(見出し語) フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ欠損症、糖リン酸

はじめに：フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ欠損症は、新生児・乳児期に重篤な低血糖と酸血症で急性発症する先天代謝異常症であり、迅速な診断が困難で治療が不適切となる場合もある。これまでの化学診断法として、ガスクロマトグラフ (GC) による尿の有機酸分析が利用されていたが、特異性の点で充分とはいえなかった。今回疾

患に特異的と考えられる糖リン酸を中心に分析する試みを行った。

研究方法：糖リン酸の GC 分析のために TMS 誘導体化する方法が報告されているが、糖リン酸はこの誘導体化に体して不安定であり、誘導体化条件 (誘導体化試薬、反応温度と時間) の最適化を検討した。尿での糖リン酸などの有機酸画分は、DEAE-sephadex イオン交換樹脂を用いて抽出し、凍結乾燥した。誘導体化は、BSTFA/ピリジン(4:1)

福井医科大学小児科学教室

を加え80°Cで1時間加熱することで行った。GC/MS分析は、HP-GC 5890A/Finnigan-MAT-Ion Trap Detector により行った。

誘導体化を行なわない糖リン酸分析の試みとしては、検出系にMS/MSを用いる分析を行なった。FAB/MS/MS分析は、Finnigan-MAT-TSQ700を用いて、IonSpray-LC/MS分析は、PE-Sciex-API-IIIを使用して行った。

結果および考察：糖リン酸、特にケトースリン酸はTMS誘導体化に際して不安定で、強力な誘導体化条件ではほとんどが分解してしまう結果であった。逆に弱い誘導体化条件では誘導体化が完全には進行せずGCクロマトグラム上の分離が不十分であった。今回のGC分析条件での回収率は、fructose-1-phosphateで約45%、fructose-1,6-diphosphateで約20%であった。

このTMS誘導体化による方法での分析では、患者尿中に異常有機酸および糖リン酸としてglyceraldehyde, glycerol-3-phosphate, 3-phosphoglycerate, fructose-1,6-diphosphateを同定した。この中で、glycerol-3-phosphateを除く物質は、この疾患では今回初めて見いだした物質である。Glycerol-3-phosphateやglyceraldehydeは、本症の急性発症時やfructose負荷時だけでなく、早朝空腹時にも認められることがあり、本症ではないと考えられる状態でも尿中に認められることがあるようであった。これに対し、Fructose-1,6-diphosphateは急性発症時やfructose負荷時の患者尿中にのみみられ、

疾患特異性が高いと考えられた。

これに対して、誘導体化を行わずMS/MS分析する方法では、比較的高濃度のfructose-1,6-diphosphate溶液を用いて行ったFAB-MS/MS分析では、[M-H]⁻イオンであるm/z 339が確認でき、ドータスキャンモードでリン酸イオンに由来すると考えられるドータイオンm/z 95を認めた。しかしながらこのドータイオンは強度が不十分で、m/z 95をモニターするペアレントスキャンモードでは定量的な分析は行なえなかった。

一方、同じ濃度の標準溶液を用いたIonSpray-LC/MS分析では、各種の糖リン酸について、十分な強度を有する疑似分子イオンが得られた。図にfructose-1,6-phosphateのマススペクトルを示す。この分析では、LCによる分離操作を行なわないで直接シリンジ注入を行った。この方法で、GC分析用に抽出した患者サンプルの分析を試みたが、十分なSN比が得られず、糖リン酸は同定出来なかった。サンプルのさらなる精製とLCによる分離操作が重要と考えられた。これまで糖およびその関連物質は、誘導体化せずLC分析する場合、感度よく検出する方法がなく、測定が困難であったが、検出器としてMS/MSを用いることで高感度測定ができる可能性が示唆された。

文献：

中井昭夫, 他：Fructose-1,6-diphosphatase欠損症の姉妹例 一尿中有機酸分析による早期診断の有用性について一。日本小児科学会雑誌 96;372-376:1992

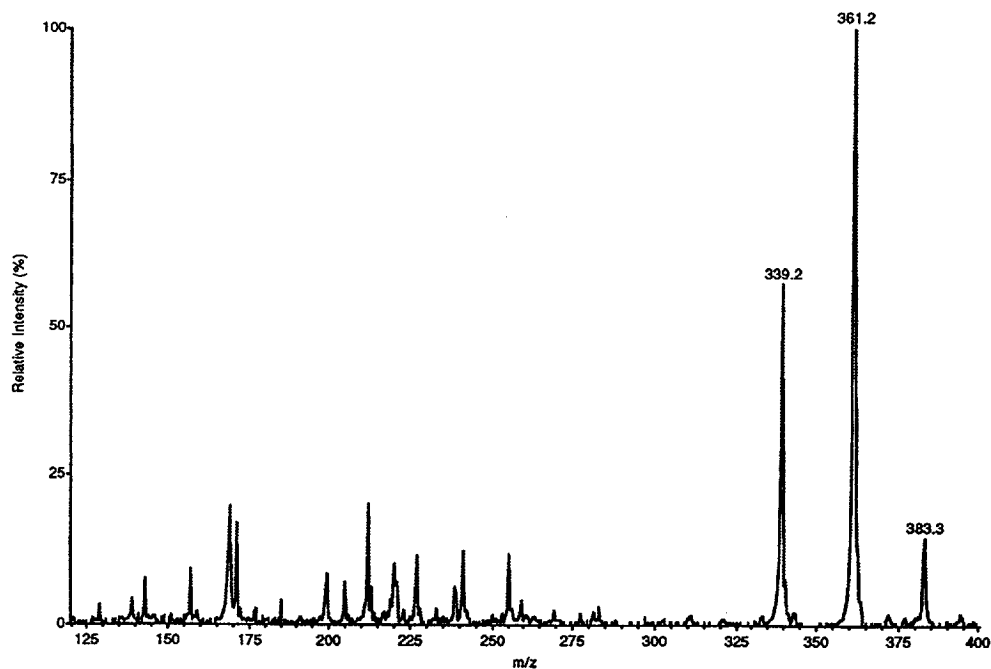


Figure. IonSpray™ LC/MS spectrum of fructose-1,6-diphosphate.
The ion of m/z 339 corresponds to $[M-H]^-$, m/z 361 to $[M-2H+Na]^+$,
and m/z 383 to $[M-3H+2Na]^+$.



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:フルクトース-1,6-ジフォスファターゼ欠損症の急性発症時の尿中異常代謝産物を検索し、イオン交換樹脂抽出有機酸画分の中に、特異的な糖リン酸である fructose-1,6-diphosphate, glycerol-3-Phosphate を多量に検出した。この同定には、通常の有機酸分析に用いる誘導体化とガスクロマトグラフによる分析法を用いたが、糖リン酸はこのような誘導体化や高温での処理に対して不安定であり、定量的な分析は困難であった。誘導体化を行わない分析法として、IonSpray イオン化による質量分析法を用いて水溶液標品での検討を行ったところ、感度良く疑似分子イオンを測定できた。糖リン酸を効率的に抽出し、HPLC による分離操作を追加すれば精度良く分析できる可能性が示唆され、ハイリクスグループの迅速なスクリーニングに利用できるのではないかと考えられた。