

有機酸代謝異常マス・スクリーニングのためのGC/MSデータ解析・診断プログラムの開発
(分担研究：スクリーニングの新しい対象疾患に関する研究)

山口清次*、木村正彦*、伊賀三佐子*、黒崎小百合*、山本孝**

【要約】有機酸代謝異常マス・スクリーニングを行うための、キャピラリーGC/MSで分析したデータを自動処理して、診断名をアウトプットするコンピュータープログラムを開発した。原理はマスクロマトグラフィーとメチレンユニットを組み合わせて尿中有機酸を同定、定量し、正常と比較して異常化合物を検出する。そして異常化合物のプロフィールから予想される疾患名をアウトプットする。診断名のわかっている30例の患児の尿を用いて試験したところ、異常化合物を正しく検出した。疾患名は正しい病名をはずすことはなかったものの、アウトプットする疾患数が多い傾向があった。条件づけを厳しくすればこの問題はクリアできると思われる。検体の前処理法について、一般的なスタンダード溶媒抽出法と最近提唱されている直接乾燥法について尿中化合物の回収率を比較検討した。有機酸に関しては大差なく、アミノ酸類や糖類に関しては直接乾燥法でのみ回収された。回収率、前処理時間、分析時間の面から直接乾燥法にこのコンピュータープログラムを組み込んだ形が、本症のマススクリーニングに実用的であると思われる。

【見出し語】有機酸代謝異常、マススクリーニング、GC/MS、コンピュータープログラム

【研究方法】

(1) GC/MSデータ自動解析・診断プログラムの作成

尿から有機酸を抽出しトリメチルシリル化したサンプルをキャピラリーGC/MSに注入したあと、有機酸の同定、定量、異常物質の検出および診断名をアウトプットするプログラムを開発した。

GC/MSデータ自動解析プログラム：GC/MSデータの中から、化合物はそれぞれのメチレンユニット値、2つの選択イオンのマスクロマトグラムとそれら2つのイオンの強度比で同定を行い、定量は内部標準に対する相対面積で表示する。定量値を正常値と比較し、異常と判定した化合物を星印で示す。

診断プログラム：異常と判定された化合物から考えられる疾患名を入力しておき、データ解析したあと引き続いて、疾患名をアウトプットする。

* 島根医科大学小児科 **島津エス・デー

(2) スタンダード溶媒抽出法と直接乾燥法による検体前処理法の比較検討

100 μ Lのサンプルを用いて、2つの方法¹⁾すなわち、一般的に行われているスタンダード溶媒抽出法と、サンプルを直接エバポレータで乾燥させて誘導体化する方法(直接乾燥法)で処理して、有機酸、アミノ酸、糖類の回収率を検討した。

ID	Compound	MRA	NORMAL	RANGE	FACTOR
1	Lactic-2	0.40	(0.10	0.00 - 1.40)	3.95
4	Glycolic-2	0.46	(0.00	0.00 - 0.10)	?
6	2-OH-butyrlic-2	0.16	(0.00	0.00 - 0.00)	?
8	3-OH-propionic-2	247.91 *	(0.00	0.00 - 0.00)	?
10	Pyruvic-OX-2	0.90	(4.50	0.00 - 24.10)	0.20
.....					
53	Propionylglycine-2	288.51 *	(0.00	0.00 - 0.00)	?
54	Isobutyrylglycine-2	9.46 *	(0.00	0.00 - 0.00)	?
55	2-Deoxytetrionic	6.33	(2.40	0.00 - 6.30)	2.64
.....					
105	Hippuric-2	32.93 *	(2.20	0.00 - 11.70)	14.97
106	Isocitric-4	11.26	(22.90	0.00 - 0.00)	0.49
107	Citric-4	329.83	(441.10	31.40 - 572.30)	0.75
109	Hippuric-1	19.29	(30.10	6.20 - 284.10)	0.64
110	Methylcitric-4(1)	103.54 *	(0.20	0.00 - 0.00)	517.70
112	Methylcitric-4(2)	76.05 *	(0.10	0.00 - 0.00)	760.54
114	Vanilmandelic-3(VMA)	49.06	(46.60	11.70 - 84.60)	1.05
115	Sebacic-2	4.47	(2.20	0.40 - 7.00)	2.03
117	4-OH-phenyllactic (PHPLA)-2	2.47	(1.80	0.00 - 7.00)	1.37
120	Indole-3-acetic-2	31.66	(27.60	0.00 - 78.70)	1.15
.....					
132	3,6-Epoxytetradecanedioic-2	0.09	(0.90	0.00 - 3.90)	0.10
133	Tetracosane (IS2)	70.97	(0.00	0.00 - 0.00)	?
.....					
No.	Diseases suspected of:				
7	ketosis				
16	propionic acidemia				
18	multiple carboxylase deficiency				

【研究結果】

(1) 自動解析・診断プログラム：プロピオン酸血症の分析結果の一部を図1に例示した。

左に化合物名、右に定量値(相対面積%)および正常平均と範囲が示されている。異常と判断されたものには定量値のあとに星印をつけている。分析結果のあとに、星印のついた異常物質から考えられる疾患名を上げている。診断のわかっている約30例の有機酸代謝異常症の尿を用いて、このプログラムを試験したが、すべての症例において疾患に特異的な異常化合物を正しく検出した。一方診断プログラムの方は、正しい疾患名をはずさないものの、異常化合物に対応した疾患名を単純にアウトプットするため疑う疾患数が多すぎる傾向があった。代謝プロフィールの条件づけを厳しくすることによってこの問題は解決できると思われ、現在改良中である。

(2) 回収率の検討

プロピオン酸血症の尿100 μ Lを、従来のスタン

図1. GC/MSデータ自動解析・診断プログラムのアウトプットの例。プロピオン酸血症患児(抜粋)。MRA:相対面積(定量値)、NORMAL、RANGE:正常児の平均値と範囲、FACTOR:正常の何倍か、?:正常では検出されないものであることを示す、*:異常化合物と判定したことを示す。解析データに続いて疑われる疾患名がアウトプットされている。

ード溶媒抽出法と直接乾燥法で処理してGC/MS分析したクロマトグラムを図2に示した。両方ともに、本症に特徴的な3-OH-プロピオン酸、プロピオニルグリシン、メチルクエン酸などが検出され、診断が可能であった。さらに直接乾燥法を用いた時のクロマトグラムには、以上の有機酸の他にグリシン、スレオニンなどのアミノ酸の増加も同時に検出され、診断をより確実にする情報が得られた。

いくつかの標準品の溶液を用いて、溶媒抽出法と直接乾燥法で前処理し、誘導体化する直前に外部標準物質としてペンタデカン酸20 μ gを加えて、相対面積を求め、両者の回収率を比較した。有機酸に関しては α ケト酸だけは直接乾燥法では回収されなかったが、その他の物質では両者とも比較的良好に回収された。アミノ酸類、ガラクトースやブドウ糖など

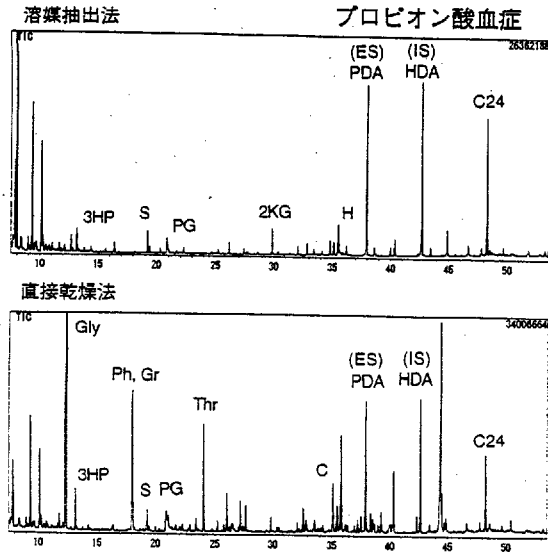


図2. スタンダード溶媒抽出法と直接乾燥法による前処理のガスクロマトグラムの比較。上段：スタンダード溶媒抽出法、下段：直接乾燥法。3HP, 3-OH-propionic; S, succinic; PG, propionylglycine; 2KG, 2-ketoglutaric-oxime; H, hippuric; Gly, glycine; Ph, phosphoric; Gr, glycerol; Thr, threonine; C, citric; PDA, pentadecanoic; HDA, heptadecanoic; C24, tetracosane; ES, external standard; IS, internal standard. 下段の直接乾燥法ではglycine, threonineなどのアミノ酸の増加も検出している。

の糖類は直接乾燥法でのみ検出できた。この結果から、直接乾燥法は、有機酸以外の化合物も同時に分析でき、少量の検体で、より短時間に分析できる点で、マススクリーニングを目的とした前処理法として期待できる方法であると思われた。

表1. 有機酸代謝異常症の主な発症形態

発症形態	代表的疾患
1) 新生児乳児期早期から急激な経過で発症する	プロピオン酸血症, メチルマロン酸血症, イソ吉草酸血症, ヒドロキシメチルグルタル酸血症, 2-ヒドロキシグルタル酸血症, グルタル酸血症2型(新生児型), D-グルセリン酸血症, ピログルタミン酸血症, マルチプルカルボキシラーゼ欠損症, グリセロール血症
2) 感染などを契機に間欠的にアシドーシスなどの発作を起こす	β -ケトチオラーゼ欠損症, イソ吉草酸血症, マルチプルカルボキシラーゼ欠損症, グリセロール血症, グルタル酸血症2型(遅発型), メチルグルタコン酸血症, 脂肪酸 β 酸化異常症
3) 乳児突然死候群, ライ症候群様症状で発症する	脂肪酸 β 酸化異常症, ヒドロキシメチルグルタル酸血症, メチルクロトニルグリシン血症
4) 乳幼児期から神経症状が現れ, 徐々に進行する	グルタル酸血症1型, α -ケトアジピン酸血症, 2-ヒドロキシグルタル酸血症, 4-ヒドロキシ酪酸血症, メバロン酸血症, ピログルタミン酸血症, フマラーゼ欠損症, ピオチニダーゼ欠損症
5) その他(湿疹, 尿路結石など)	マルチプルカルボキシラーゼ欠損症(ピオチニダーゼ欠損症, ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症), シュウ酸血症1型, シュウ酸血症2型

【考察】

有機酸代謝異常症の発症形態は、表1に示すように、a)メープルシロップ尿症のような新生児期から急性症状で発症するもの、b)自家中毒のように間欠的に発作をきたすもの、c)ライ症候群の様な発症形態をとるもの、d)徐々に神経症状が進行するものおよびe)その他のにタイプを分けることができる²⁾。有機酸代謝異常の中には早期発見しても予後のきびしい疾患が存在するのも事実であるが、早期発見が重要な意義を持つ疾患が多い。

有機酸分析法として、これまでポピュラーに行われてきたスタンダードの溶媒抽出法では、前処理、分析ともに時間がかかりすぎる欠点がある。尿の直接乾燥法は、最近Schoemaker³⁾や松本らが提唱している方法を一部改変したものである。本法では有機酸の他にアミノ酸なども同時に分析できる利点があるが、短時間で昇温分析するためデータの再現性などの点でまだ検討の余地がある。また1991年にTuchman⁴⁾らの提唱した尿ろ紙による方法も感度の面で検討の余地が残っている。Roe, Millingtonら⁵⁾の開発してきたtandem MSによる方法は血液ろ紙を使える点、前処理の簡便な点で期待できると思われるが、

データの再現性、分析機器のメンテナンスなどの点で検討の余地がある。

今回報告したGC/MSデータ自動解析・診断プログラムは、化合物の同定にマスクロマトグラムとメチレンユニットを採用しているので、GC/MS分析全般に広く応用できる。また内部標準

物質を複数個設定できるので、直接乾燥法による多種類の同時分析にも威力を発揮するものと思われる。マススクリーニングのために本プログラムにセットすべき疾患と検索する化合物名を、試案として表2にあげた。今後このプログラムの実用性について検討してゆきたい。

【文献】

- 1) 山口清次：有機酸分析、最新のマススペクトロメトリー（丹羽利充編）、化学同人、1995
- 2) 山口清次ら：日児誌、96:1058-64、1992
- 3) Schoemaker et al.: J Chromatogr 562:125-38, 1991
- 4) Tuchman et al.: Pediatr Res 30:315-21, 1991
- 5) Millington et al.: New Developments in Fatty Acid Oxidation eds by Coates P & Tanaka K, Wiley-Liss, 1992, p339-

表2. 有機酸代謝異常症のマス・スクリーニングの対象疾患と検索項目

疾患名	検索項目
1) メチルマロン酸血症	methylmalonic, methylcitric
2) プロピオン酸血症	3-OH-propionic, propionylglycine, methylcitric
3) β -ケトチオラーゼ欠損症	2-methyl-3-OH-butyric, tiglylglycine
4) イソ吉草酸血症	isonalerylglycine
5) メチルクロトニルグリシン尿症	methylcrotonylglycine
6) メチルグルタコン酸尿症	methylglutaconic
7) ヒドロキシメチルグルタル酸尿症	3-OH-3-methylglutaric, methylglutaconic methylglutaric
8) メバロン酸血症	mevalonic, mevalonolactone
9) グルタル酸尿症1型	glutaric
10) グルタル酸尿症2型	hexanoylglycine, glutaric, 2-OH-glutaric, ethylmalonic, adipic
11) 2-ケトアジピン酸尿症	2-OH-adipic, 2-aminoadipic
12) 先天性高乳酸血症	lactic
13) ジカルボン酸尿症	adipic, suberic, sebacic
14) グリセロール尿症	glycerol
15) 2-ケトグルタル酸尿症	2-ketoglutaric, lactic
16) フマル酸尿症	fumaric,
17) マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	3-OH-propionic, methylcitric
18) ピログルタミン酸尿症	pyroglutamic
19) グリセリン酸尿症	glyceric
20) 2-ヒドロキシグルタル酸尿症 (有機酸代謝異常症以外)	2-OH-glutaric
21) フェニルケトン尿症	phenylalanine, phenyllactic
22) メーブルシロップ尿症	isoleucine, 2-OH-isovaleric
23) オロット酸尿症 (OTC欠損症)	uracil, orotic
24) ガラクトース血症	galactose, galactitol
25) 神経芽細胞腫	VMA, HVA

ABSTRACT

Development of an automated profiling and disease-detection system from urinary organic acid analysis by capillary GC/MS connected to a personal computer for mass screening of organic acidemias.

Seiji Yamaguchi, Masahiko Kimura, Misako Iga, Sayuri Kurosaki, and Takashi Yamamoto

Using a personal computer, we have developed an automated profiling and disease detection system from urinary organic acid analysis by capillary GC/MS. In this program, identification of organic acids is carried out with mass chromatograms of two selected ions for each compound and the methylene unit value, and quantification was expressed as the relative area (%) on mass chromatogram of the selective ion (Q-ion) of a compound to that of an internal standard. Further, the values are compared with those of age-matched controls, and compounds judged as abnormal are indicated with asterisks. The program also suggests names of disease suspected from the metabolic profiles.

Recovery of urinary metabolites in preparation of two methods, standard solvent extraction and direct dry-up was compared. Organic acids were collected by the two methods at a similar degree, but amino acids and carbohydrates such as galactose or glucose could be collected only by the direct dry-up method. Further the direct dry-up method required shorter time both for preparation of samples and for GC/MS analysis. We concluded that we should employ the direct dry-up method with the program we have developed for organic acidemia mass screening.



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】有機酸代謝異常マス・スクリーニングを行うための、キャピラリー GC/MS で分析したデータを自動処理して、診断名をアウトプットするコンピュータープログラムを開発した。原理はマスクロマトグラフィーとメチレンユニットを組み合わせることで尿中有機酸を同定、定量し、正常と比較して異常化合物を検出する。そして異常化合物のプロフィールから予想される疾患名をアウトプットする。診断名のわかっている 30 例の患児の尿を用いて試験したところ、異常化合物を正しく検出した。疾患名は正しい病名をはずすことはなかったものの、アウトプットする疾患数が多い傾向があった。条件づけを厳しくすればこの問題はクリアーできると思われる。検体の前処理法について、一般的なスタンダード溶媒抽出法と最近提唱されている直接乾燥法について尿中化合物の回収率を比較検討した。有機酸に関しては大差なく、アミノ酸類や糖類に関しては直接乾燥法でのみ回収された。回収率、前処理時間、分析時間の面から直接乾燥法にこのコンピュータープログラムを組み込んだ形が、本症のマススクリーニングに実用的であると思われる。