

## GC/MSによる有機酸代謝異常スクリーニング： 疾患の検出感度に関する検討

(分担研究：マスキング対象疾患一次スクリーニング  
から二次スクリーニングのあり方に関する研究)

山口清次\*、木村正彦\*、付曉巍\*、  
和田真紀\*、井上真\*、山本孝\*\*

**要旨：**GC/MSを用いた有機酸代謝異常スクリーニングを検討するために、現在行っている検体の処理法の検出感度を検討した。溶媒抽出法とより簡便な直接乾燥法を比較した。標準品を用いた時、乳酸、オロト酸では溶媒法の回収率が良く、一方ヒドロキシメチルグルタル酸、ウラシル、クエン酸では直接法の回収率が良いという結果であった。患者37症例の検体を用いて比較したところ、両者で大きな差はみられなかった。しかしプロピオン酸血症などの一部の疾患において、尿100 $\mu$ lという検体量では十分な診断精度の得られない症例があった。スクリーニングの対象疾患を策定する際、念頭におく必要がある。またこれらの疾患に関しては安定同位体希釈法などの感度をあげる工夫が必要である。

**見出し語：**有機酸代謝異常、スクリーニング、GC/MS

### 研究目的

GC/MSを用いた有機酸代謝異常マスキングの実用化のために、尿100 $\mu$ lを用いた場合の疾患の検出感度を検討した。前処理法として、従来から行われている溶媒抽出法と、より簡便な直接乾燥法<sup>1,2)</sup>を用いて分析し比較した。

### 方法と対象

1) 標準品混合液：混合液AとBを作成した。混合液Aの1ml当たりの組成は、乳酸0.25mg、メチルマロン酸0.25mg、ウラシル0.20mg、グルタル酸0.25mg、イソバレリルグリシン0.5mg、ヒドロキシメチルグルタル酸0.5mg、 $\alpha$ ケトグルタル

\*島根医科大学小児科、\*\*島津エス・デー

酸0.25mg、4-ヒドロキシフェニル酢酸0.25mg、オロト酸0.25mg、乳酸0.25mg、乳酸1mg、クエン酸0.5mgである。混合液Bの1ml当たりの組成は、アラニン0.25mg、グリシン0.25mg、ロイシン0.25mg、メチオニン0.25mg、フェニルアラニン0.5mg、チロシン0.25mg、ガラクトール0.25mg、クレアチニン2.5mgであった。

2) 前処理：既報の方法<sup>3)</sup>に従って、溶媒抽出法(溶媒法)と直接乾燥法(直接法)で前処理しトリメチルシリル誘導体化した。検体として100 $\mu$ lを用いた。ろ紙を用いる方法(ろ紙法)では、検体500 $\mu$ lをろ紙にしみこませて室温で乾燥させた後、500 $\mu$ lの水を再度しみこませ遠心してろ液をとり、このうちの100 $\mu$ lをとって直接乾燥法で分析した。回収率を調べるために、TMS誘導体化する前にペンタデカン酸(PDA)10 $\mu$ gを加えて再乾固して誘導体化した。回収率の比較は、PDAに対する相対面積(%)を計算して比較した。

3) GC/MS分析：カラムはDB-5キャピラリーカラム(0.25mm.i.d.X30m、膜厚0.25 $\mu$ m)を用いた。試料1 $\mu$ lを注入し10:1スプリットモードで

分析した。カラムオーブンの温度条件は、100 $^{\circ}$ C 1分間保持後、10 $^{\circ}$ C/分昇温、290 $^{\circ}$ Cで8分間保持して終了した。

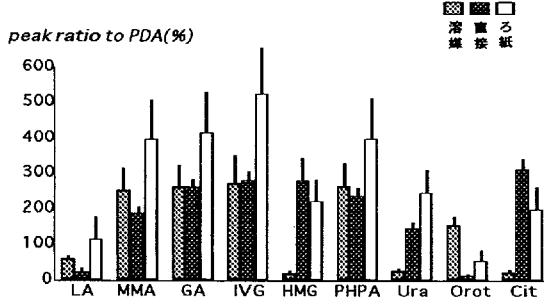
4) 患者の検体：表1に示すような疾患のわかっているを患者37例の尿を分析した。

## 結果

1) 標準品混合液の溶媒法、直接法、ろ紙法の回収率の比較：図1に示すように、有機酸に関しては、溶媒法と直接法を比較すると、乳酸、オロト酸では溶媒法が回収率は良く、一方ヒドロキシメチルグルタル酸、ウラシル、クエン酸では直接法の回収率が良いという結果であった。またろ紙法は、原理的には直接法と同じであるがいずれの化合物でも直接法より見かけ上回収率が良かった。これはろ紙から水を加えて遠心するとき水分が幾分蒸発して濃縮されるためではないかと思われる。

有機酸以外の化合物について、直接法とろ紙法で比較した結果を図1Bに示した。いずれもろ紙法の回収率が高いという結果であった。この理由

A. 有機酸の回収率



B. アミノ酸などの回収率

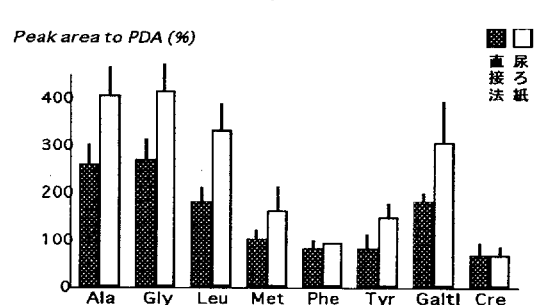


図1. 標準品の回収率の比較検討

略字：LA, lactate; MMA, methylmalonate; GA, glutarate; IVG, isovalerylglycine; HMG, hydroxymethylglutarate; PHPA, p-hydroxyphenylacetate; Ura, uracil; Orot, orotate; Cit, citrate; Ala, alanine; Gly, glycine; Leu, leucine; Phe, phenylalanine; Tyr, tyrosine; Galtl, galactitol; Cre, creatinine.

は上述のように遠心中に濃縮される可能性が考えられる。少なくともろ紙法で回収率が低下することはないと考えられる。

2) 患者の診断精度の検討：すでに診断名のわかっている患者の尿を100 $\mu$ l用いて、溶媒法と、

直接法で分析し診断指標物質の検出感度について検討した。表1に示すように、メチルマロン酸血症、 $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症、イソ吉草酸血症、グルタル酸血症1型など、もともと診断指標物質が大量にみられる疾患では、溶媒法、直接法とも

表1. 直接乾燥法と溶媒抽出法の診断精度の比較

	年齢	Creat. mg/dl	直接乾燥法		溶媒抽出法	
			判定	検出物質	判定	検出物質
メチルマロン血症	新 新 乳 乳 幼 幼	18.3	◎	MMA	◎	MMA
		20.6	◎	MMA	◎	MMA
		9.7	◎	MMA	◎	MMA
		46.6	◎	MMA	◎	MMA
		132.4	◎	MMA	◎	MMA
		81.4	◎	MMA	◎	MMA
プロピオン酸血症	新 新 乳 乳 幼 幼	18.7	○	3HP, MC	○	3HP, MC
		13.8	△	MC	×	(MC)
		10.8	△	3HP	△	3HP
		22.6	×	(3HP)	×	(3HP)
		68.8	○	3HP, MC	○	3HP, MC
		25.2	○	3HP, MC	○	3HP, MC
$\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症	幼	65.9	◎	2M3HB, TG	◎	2M3HB, TG
イソ吉草酸血症	新 新	57.5	◎	IVG	◎	IVG
		27.8	◎	IVG	◎	IVG
グルタル酸血症1型	乳 乳 乳	57.5	◎	GA, 3HG	◎	GA, 3HG
		27.8	◎	GA, 3HG	◎	GA, 3HG
		54.5	◎	GA, 3HG	◎	GA, 3HG
グルタル酸血症2型	新 乳	57.5	×	—	△	IVG
		27.8	×	—	△	IVG
グリセロール尿症	新 乳 幼 幼	15.5	◎	glycerol	◎	glycerol
		32.8	◎	glycerol	◎	glycerol
		25.6	◎	glycerol	◎	glycerol
		10.6	◎	glycerol	◎	glycerol
メチルクロトニルグリシン尿症	学	53.0	◎	MCG	◎	MCG
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	乳	4.8	△	MCG	△	MCG
ヒドロキシメチルグルタル酸 (HMG) 尿症	乳 乳	16.2	◎	HMG, MGC, MG	◎	HMG, MGC, MG
		25.3	◎	HMG, MGC, MG	◎	HMG, MGC, MG
グリセリン酸血症	乳	21.4	◎	GC	◎	GC
2-OH-グルタル酸尿症	幼	53.7	◎	2HG	◎	2HG
フェニルケトン尿症	新 学 学 学	20.6	△	Phe	△	(PLA)
		106.9	○	PLA, Phe	○	PLA
		30.6	○	PLA, Phe	○	PLA
		316.4	○	PLA, Phe	○	PLA
メープルシロップ尿症	新	19.1	○	2HIV, 2HIC, Val	○	2HIV, 2KIV, 2KIC
チロジン血症1型	乳	9.1	△	PHPL	△	PHPL, (SA)
オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症	新 乳 幼 学	5.7	△	orot	△	orot
		8.3	△	uracil	○	uracil
		107.3	○	orot, uracil	○	orot, uracil
		77.1	○	orot, uracil	○	orot, uracil

略字は以下の通り。新：新生児、乳：乳児、幼：幼児（1～5歳）、学：学童（6歳以上の小児）。MMA: methylmalonate, 3HP: 3-hydroxypropionate, MC: methylcitrate, 2M3HB: 2-methyl-3-hydroxybutyrate, TG: tiglylglycine, IVG: isovaleryl-glycine, GA: glutarate, 3HG: 3-hydroxy-glutarate, MCG: methylcrotonyl-glycine, HMG: 3-hydroxy-3-methylglutarate, MGC: 3-methyl-glutaconate, MG: methylglutarate, GC: glycerate, 2HG: 2-hydroxyglutarate, Phe: phenylalanine, PLA: phenyllactate, 2HIV: 2-hydroxyisovalerate, 2HIC: 2-hydroxyisocaproate, Val: valine, 2KIV: 2-ketoisovalerate, 2KIC: 2-keto-isocaproate, PHPL: p-hydroxyphenyllactate, SA: succinylacetone, orot: protate. ( ) : 痕跡的に検出されたことを示す。◎ : ほぼまちがいに診断できると思われたもの。○ : おおむね診断可能と思われたもの。△ : 診断精度に問題あり。× : 診断困難。

に診断精度に問題はないと思われた。一方、プロピオン酸血症、グルタル酸血症2型などのように一般的に診断指標物質の量が比較的少ない疾患では、ケースによっては診断困難と思われる症例があった。

アミノ酸代謝異常症として、表1に示した4疾患を検討したが、診断可能な症例が多かったが、検出される化合物の量が十分でないと思われる例もあった。

### 考察と結論

われわれはGC/MSを応用した新生児マススクリーニングの実用化に向けて以下の研究を進めている。a) GC/MSデータの自動処理・診断プログラムの開発<sup>9)</sup>、b) 島根地区におけるパイロットスタディー、c) スクリーニング方法の検出感度の検討である。今年度、松江日赤病院、島根医大などで出生した新生児についてパイロットスタディーを開始して、平成8年12月末までに約700例を分析した。採尿パックで採尿する方法をとったが、採尿成功率は松江日赤病院産科の一般新生児を調査したところ95.8%であり、採尿は当初予想したほど難しくない印象を受けた。

北米において尿ろ紙を用いて溶媒法でスクリーニングする試みもある<sup>9)</sup>。しかし今回の経験から、少なくとも直接法で感度は悪くなく、検体処理能力は1台のGC/MSで1日30検体、年間1200検体は可能である。

また今回尿100 $\mu$ lという検体量を用いて、現在採用している方法の検出感度を調べた。従来からポピュラーに用いられる溶媒法と簡便な方法として開発された直接法<sup>12)</sup>、およびろ紙法で比較検討

した。標準品を用いて行った比較では、溶媒法と直接法での回収率はいくつかの化合物で差がみられたが、疾患の検出感度は大きな差はみられなかった。しかしプロピオン酸血症など比較的ポピュラーな有機酸血症でも異常物質の量が少なく、診断精度に問題のある疾患もあった。これらに関しては安定同位体希釈法など感度を上げる工夫が必要になると思われる。またマススクリーニングを実施するならば、疾患ごとの検出感度を念頭において対象疾患を設定する必要がある。

### 文献

- 1) Schoemaker JD, Elliott WH: J Chromatogr 562:125-138, 1991.
- 2) Ning C, Kuhara T, Inoue Y, Zhang CH, Matsumoto M, Shinka T, Furumoto T, Yokota K, Matsumoto I: Acta Paediatr Jap 38:661-666, 1996.
- 3) 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、京都 1995、p58-79.
- 4) 山口清次、木村正彦、伊賀三佐子、黒崎小百合、山本孝: 厚生省心身障害研究「新しいマススクリーニングのあり方に関する研究」平成7年度報告書 p72-75, 1996.
- 5) Tuchman M, McCann MT, Johnson PE, Lemieux B: Pediatr Res 30: 315-321, 1991.



## 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



要旨: GC/MS を用いた有機酸代謝異常スクリーニングを検討するために、現在行っている検体の処理法の検出感度を検討した。溶媒抽出法とより簡便な直接乾燥法を比較した。標準品を用いた時、乳酸、オロト酸では溶媒法の回収率が良く、一方ヒドロキシメチルグルタル酸、ウラシル、クエン酸では直接法の回収率が良いという結果であった。患者 37 症例の検体を用いて比較したところ、両者で大きな差はみられなかった。しかしプロピオン酸血症などの一部の疾患において、尿 100  $\mu$ l という検体量では十分な診断精度の得られない症例があった。スクリーニングの対象疾患を策定する際、念頭におく必要がある。またこれらの疾患に関しては安定同位体希釈法などの感度をあげる工夫が必要である。