

ミオパチー患者の尿ウレアーゼ処理GCMS分析スクリーニングで  
発見されたmitochondrial trifunctional protein deficiency の一例  
(分担研究：有機酸代謝異常症)

新家敏弘\*、井上義人\*、久原とみ子\*、松本 勇\*、宮嶋裕明\*\*、金子英蔵\*\*

要約：尿をウレアーゼ処理した後エタノールによる除タンパク操作のみの前処理法で得られる試料をトリメチルシリル誘導体化してGCMS分析する分析法は一度の分析で有機酸のみならずアミノ酸、糖、糖アルコール、塩基性化合物などカテゴリーの違う化合物を同時に分析できる分析系である<sup>(1)</sup>。

今回、本法のマススクリーニングの応用として進行性ミオパチー患者のスクリーニングを行ったところ中鎖ジカルボン酸及びその3-ヒドロキシ体の多量排泄の患者を発見し、酵素診断の結果mitochondrial trifunctional protein deficiencyである事が判明した。ウレアーゼ処理GCMS分析によるスクリーニングは新生児マススクリーニングだけでなく学童期を迎えてから発症することの多い代謝性疾患のマススクリーニングに非常に有用である。

見出し語：GCMS、化学診断、ウレアーゼ処理法、ミオパチー

研究目的：ウレアーゼ処理GCMS分析法による学童期生活習慣病の早期発見を目的とし、マススクリーニングの有用性を確かめるため、ハイリスク患者のスクリーニングを行った。

対象および方法：代謝性ミオパチーが疑われていた検査時21才の男性尿を分析した。患者両親はまたいとこ結婚で生下時は特に異常を示さなかったが、4才頃より感冒や1時間以

上の運動により下肢の筋痛を訴え、硬直して動かなくなる症状に見舞われた。その時は7、8日で自然治癒し、成長に連れて症状発現の頻度は減少していたが、中学卒業後食事を3度ほど抜くと同様の症状が出現していた。検査時2週間前に友人と空腹時に20kmのハイキングをした後、下肢筋痛、硬直のため起立困難となり、近医に入院。ミオグロビン尿を呈し筋の遊離カルニチンの低下、血清クレアチ

\*金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学研究部門、\*\*浜松医科大学第一内科

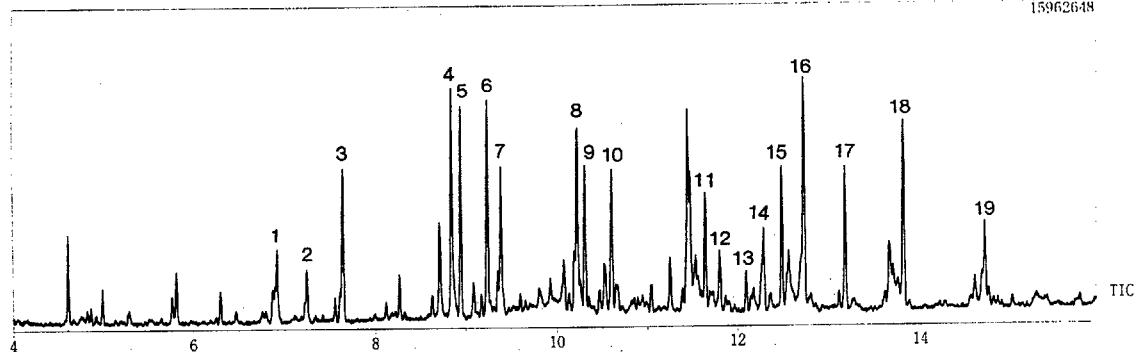


図1 ミオパチー患者尿のウレアーゼ処理GC/MS分析

1; phosphate 2; glycine-3TMS 3; 4-deoxytetronic acid 4; adipic acid 5; erythritol 6; erythronic acid 7; creatinine  
8; 3-hydroxyadipic acid 9; suberic acid 10; arabitol 11; sebacic acid 12; glucose 13; solubitol 14; glucose  
15; 3-hydroxymyristic acid (internal standard) 16; 3-hydroxysebacic acid 17; heptadecanoic acid (internal standard)  
18; 3-hydroxydodecanedioic acid 19; 3-hydroxytetradecanedioic acid

ニンキナーゼおよびLDH上昇を認めた。しかし、その他の生化学的検査では特に異常が認められなかった。

患者早朝尿0.1mlに300単位のウレアーゼを加え37°Cで30分間インキュベートし、尿中に多量に含まれている尿素を分解した。反応液に1mlのエタノールを加えて遠心除タンパクし、遠心上清を減圧下濃縮乾固の後、トリメチルシリル誘導体化してShimadzu QP-5000 四重極型質量分析計(J&W DB-5 capillary column)でGCMS分析した。

結果：図1は患者尿分析のGCMSクロマトグラムである。この分析法では有機酸だけでなくアミノ酸や糖、塩基性化合物も同時に分析可能であるため、有機酸の分析結果だけで判定を下すよりも遥にその判定精度は向上する。患者尿中にはアジピン酸、スベリン酸、セバシン酸といった中鎖ジカルボン酸の他、炭素数6から14個のジカルボン酸の3-ヒドロキシ体の排泄増加が認められた。このことより、患者は脂肪酸β酸化系の中の3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenaseの障害が推測された。この分析結果をもとに、患者皮膚繊維芽細胞のmitochondrial trifunctional proteinの酵素活性につ

いて検索したところ、正常値の2%に低下していることが判明した。

考察：先天性代謝異常症を含めて代謝異常症の診断には一般的な生化学的検査のほかに我々が行っているGCMSを用いた尿中あるいは血中の有機酸、アミノ酸、糖、核酸塩基などの代謝物を分析が疾患の特定の決め手になることは承知のことである。しかし、一般的にはこれらのカテゴリーの異なる化合物は別々の分析系で分析されることが常で、その結果を得るためには非常にたくさんの日数、労力及び費用を要する。従って、最終診断の酵素化学的判定やDNA診断にまで結び付けるためにはかなりの日数を要することになる。

しかし、今回、我々の研究グループが開発したウレアーゼ処理法を用いたGCMS分析法は唯一回の分析で上記の何れの化合物群も同時に分析できるため従来の分析体制とはけた違いの時間の短縮及び費用の低下をもたらした。また、同時検索であるためその判定結果も格段に精度が上昇した。

今回検索したミオパチー患者の場合、発症は既に4才のころであり、おそらく発症期或いは学童期に検査をしていれば度重なる入院

や治療は防げ得た可能性もある。ウレアーゼ処理GCMS分析法は時間的にも分析コストから言っても健康診断などの検診にも十分対応できる分析法であり、進行性のミオパチーのみならず食生活の欧米化によって近年急増している生活習慣病などの検索に予防医学の観点からもその応用が期待されるものと考える。

文献：

- (1) 久原とみ子ら、ガスクロマトグラフ-質量分析を用いる化学診断法のマススクリーニングへの応用、金沢医科大学雑誌 20：521-526 (1995)
- (2) 村田英明ら、GCMSによる化学診断、島津評論 53：35-41 (1996)
- (3) Cong Ning et al, Gas chromatographic-mass spectrometric metabolic profiling of patients with fatal infantile mitochondrial myopathy with de Toni-Fanconi-Debre syndrome, Acta Paediatrica Japonica 38:661-666(1996)



## 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:尿をウレアーゼ処理した後エタノールによる除タンパク操作のみの前処理法で得られる試料をトリメチルシリル誘導体化して GC/MS 分析する分析法は一度の分析で有機酸のみならずアミノ酸、糖、糖アルコール、塩基性化合物などカテゴリーの違う化合物を同時に分析できる分析系である。

今回、本法のマススクリーニングの応用として進行性ミオパチー患者のスタリーニシグを行ったところ中鎖ジカルボン酸及びその 3-ヒドロキシ体の多量排泄の患者を発見し、酵素診断の結果 mitochondrial trifunctional protein deficiency である事が判明した。ウレアーゼ処理 GC/MS 分析によるスクリーニングは新生児マススクリーニングだけでなく学童期を迎えてから発症することの多い代謝性疾患のマススクリーニングに非常に有用である。