

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

血液ろ紙を用いたGC/MSによる 酸化異常症スクリーニング法の開発

研究要旨

脂肪酸 酸化異常症のスクリーニング法として、血液ろ紙を用いたGC/MSによる血中脂肪酸分析法を開発した。ろ紙血3mmパンチ5個をメチル化して、ヘキサンで抽出し、GC/MS（電子衝撃法/SIM法）で分析する。前処理の簡略化された方法である。内部標準nonanoic acid, tridecanoic acidをサンプルに加えメタノールと塩化アセチルでメチル化し、octanoic acid (C8), decanoic acid (C10), 4-decenoic (C10:1), 5-tetradecenoic acid (C14:1)を測定した。対象としてMCAD欠損症3例、VLCAD欠損症1例、グルタル酸尿症2（GA2）1例、ケトーシス5例、正常対照5例を分析した。正常対照例でもC8, C10は測定可能であった。MCAD欠損症でC8, C10の増加とC10:1が検出され、GA2ではC10:1とC14:1, VLCAD欠損症ではC14:1が検出された。本法によって血液ろ紙検体を用いた酸化異常症のスクリーニングの可能性が示された。

研究協力者

木村正彦, 山口清次 (島根医科大学小児科)

研究目的

脂肪酸 酸化異常症は安定期には無症状で、感染・下痢あるいは長時間の飢餓時などに急性の代謝不全症状を呈する。早期診断されると発作予防が可能であるため、スクリーニングの意義が大きい疾患である。

脂肪酸 酸化異常症のスクリーニング法として、従来から尿有機酸分析やアシルグリシン分析があり、最近タンデムマススペクトロメトリー分析が広く行われるようになってきた。血中脂肪酸分析も従来から行われ、通常ガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS)でも測定できるにもかかわらず、一般に普及していない。脂肪酸 酸化異常症の診断には複数のスクリーニング結果を総合に判断して、酵素活性測定などの特異的検査で確定診断に至ることが多い。われわれは血液ろ紙を用いて簡便で測定感度の高いGC/MSによる血中脂肪酸分析法を開発したので報告する。

研究方法

乾燥ろ紙血(ガスリーろ紙)を直径3mmのパンチ小片5個を1.5mlのマイクロチューブにとり、内部標準としてnonanoic acid, tridecanoic acidをそれぞれ1nmol添加し、メタノール500 μ lを加えた。氷上で塩化アセチル10 μ lを加えて室温で40分間攪拌しメチル化した。ついで6%炭酸カリウム300 μ lを加えた。ヘキサンを150 μ l加え溶媒抽出したのちヘキサンの層をGC/MS分析した。上記の前処理は

マイクロチューブ一本で行った。GC/MS分析は島津QP5000で、DB-5キャピラリーカラムを用いて、イオン化は電子衝撃法(EI法)で行った。気化室275℃, インターフェイス300℃とし、カラム温度を45-225℃まで昇温して分析した。イオンの測定はSelective ion monitoring (SIM) モードで、octanoic (C8), decanoic (C10), 4-decenoic (C10:1), 5-tetradecenoic acid (C14:1)を測定した。

また本測定系の基礎データとして、1)上記4種類の脂肪酸を含む標準液を用いて、0.01から0.5nmol/mlまでの直線性、および1nmol/ml溶液を用いて分析値の再現性(5回測定)、2)同一の血液ろ紙の3mm小片を1, 2, 5, 10枚にかえた時の標準曲線の直線性、および同一の血液ろ紙3mm小片5枚での分析値の再現性(5回測定)をそれぞれの脂肪酸について検討した。

分析した検体は、中鎖アシル-CoA脱水素酵素(MCAD)欠損症3例および極長鎖アシル-CoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症3例、グルタル酸尿症2型1例、ケトーシス5例、正常対照5例である。

研究結果

1)4種類の脂肪酸を含む標準液の濃度を0.01から0.5nmol/mlまで変えた時、相関係数 r^2 は0.992~1.0と良好な相関を示した。1nmol/mlの標準液5回の測定では再現性(Coefficient of variation: CV)は1.5~6.9%と良好であった。

2)ガスリーろ紙血3mmパンチを1~10個を用いた時の直線性(相関係数)は、 r^2 が0.961~0.999であった。ガスリーろ紙血3mmパンチ5個を5回別々に分析した時の再現性は1.5~14.9%で

あった。健常児でもC8, C10は測定可能であった。MCAD 欠損症 3 例全例においてC8, C10の増加が認められ、さらにC10:1が検出された。GA2ではC8, C10の増加がみられ、さらにC10:1とC14:1が検出された。VLCAD欠損症ではC14:1が検出された(表1)。

考察

脂肪酸 酸化には複数の反応が関与するため、その代謝異常症を正確に特定することはしばしば困難を伴う。そのため、血清カルニチン分析、尿中有機酸分析、アシルグリシン分析、アシルカルニチン分析、そして今回報告した血中脂肪酸分析などのスクリーニング法を組み合わせることで酵素活性など特異的診断に結びつける必要がある。

脂肪酸 酸化異常症のなかで、MCAD 欠損症では血中遊離脂肪酸は4-decenoic acid (C10:1) がみられ、VLCAD欠損症では5-tetradecenoic acid (C14:1)が特徴的に増加することは知られていた^{1, 2, 3)}。またGA2ではこの両者が増加するといわれる。今回開発した方法でも従来と同様の結果を得ることができた。本法はOnkenhoutらの方法2)を基礎にして改良を加えた方法である。すなわち、GC/MS分析でのイオン測定にSIM法を用いたこと、前処理をマイクロチューブ1本で行うことの2点で工夫した。これにより微量の検体で感度良く測定することが可能になり、手技も簡便になった。現在主

流となっているタンデムマス法は感度の面でまだ検討の余地があるが、今回の方法とタンデムマス法を組み合わせれば相補的な役割を果たすことが期待できる。本症スクリーニングに応用することにより、酸化異常症の化学診断の精度を高めることができる。

参考文献

- 1) Morton H, Kelley RI. Diagnosis of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the neonatal period by measurement of medium-chain fatty acids in plasma and filter paper blood samples. *J Pediatr* 117: 439-442, 1990.
- 2) Onkenhout W, Menizelos V, van der Poel PFH, Van den Heuvel MPM, Poorthuis BJHM. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin Chem* 41: 1467-1474, 1998.
- 3) Martinez G, Jimenez-Sanchez G, Divry P, Vianey-Saban, Riudor E, Rodes M, Briones P, Ribes A. Plasma free fatty acids in mitochondrial fatty acid oxidation defects. *Clin Chim Acta* 267: 143-154, 1997.

表1. 血中遊離脂肪酸分析結果

疾患名		C8	C10	C10:1	C14:1	
VLCAD欠損症	(N=3)	1.8	2.1	nd	10.4	*
		4.1	3.1	7.9	19.8	*
		3.4	7.4	nd	74.1	
MCAD欠損症	(N=3)	7.6	5.0	1.0	nd	
		19.7	11.2	6.8	nd	*
		25.2	12.9	13.9	nd	*
グルタル酸尿症 2 型	(N=1)	18.5	30.8	1.4	24.7	
MCTミルク	(N=1)	119.7	9.7	nd	nd	*
ケトース	(N=5)	3.6-9.6	3.5-17.2	nd	nd	
正常対照	(N=5)	2.3-5.5	2.1- 4.9	nd	nd	

umol/L whole blood (* : umol/L serum)

nd: not detect

C8=octanoic acid; C10=decanoic acid; C10:1=4-decenoic acid; C14:1=5-tetradecenoic acid;

VLCAD=very long chain acyl-CoA dehydrogenase;

MCAD=medium chain acyl-CoA dehydrogenase; MCT=midium chain triglyceride