

め、マススクリーニングに向いている。

タンデムマスでは、アミノ酸とアシルカルニチンが同時分析される。アミノ酸に関しては、アミノ酸分析計に比べると精度が低く限られたアミノ酸のみが測定可能である。このため代謝異常スクリーニングに用いられる。一方アシルカルニチン分析では、遊離カルニチン(C0)とアシルカルニチンが測定され、有機酸代謝異常症や、脂肪酸 β 酸化異常症(脂肪酸代謝異常症)の診断、スクリーニングに応用される。定性のための情報はイオンの質量数のみであるため、異性体の分離測定が困難である。しかしアシルカルニチンプロファイルが得られるため、後述のGC/MSに比べて、脂肪酸代謝異常症の診断には非常に有用である。

B. GC/MS

ガスクロマトグラフ(GC)と質量分析計(MS)が連結した構造を持つ機器である。GC分析するためには揮発性の物質に変える必要があるため、生体試料から抽出した物質を誘導体化してGC分析する⁶⁾。GCから出てきた粒子は電子衝撃イオン化法で断片化されMSに導入される。マススペクトルは、分子構造の情報となる断片イオンが比較的多いため、異性体の同定も可能である。分析項目は尿中有機酸分析である。有機酸は弱酸であり体内に増加すると直ちに尿中に排出されるため尿の分析が用いられる。MSで一斉分析し、有機酸全体のプロファイルから代謝障害部位が特定される。

タンデムマスに比べGC/MSでは、機器のメンテナンスには比較的熟練を要し、また前処理も手間がかかり、分析時間も30~60分程度かかることが多い。しかし、詳細な代謝プロファイルが得られ、代謝異常の同定のみならず、乳酸ピルビン酸の増加、ケトーシス、ジカルボン酸尿症など患者の一過性の状態を把握することができ、病態評価、治療評価などに向いている。

IV. 質量分析による代謝異常症の生化学診断

体内に代謝障害があると、障害部位の上流物質とそれに由来する異常代謝産物がMSによる一斉分析で検出される。タンデムマスとGC/MSの分析プロファイルから、代謝障害部位が推定される。主な疾患とタンデムマスとGC/MS分析における診断マーカーをTable 2にあげた。

A. GC/MSによる尿中有機酸分析による生化学診断
ロイシンの代謝過程と有機酸代謝異常症をFig. 2に例示している。最下段のメチルマロン酸血症では、メチルマロニル-CoA ムターゼ欠損によって、methylmalonateとともにその上流のプロピオニル-CoAの代謝産物(methylcitrate, 3-OH-propionate, propionylglycine等)が増加する。このプロファイルから生化学診断する。

その上流のプロピオン酸血症では、propionyl-CoA由来の状代謝産物との上流の2-methyl-3-OH-butyrate, tiglylglycine等が増加し、この特徴的なプロファイルから生化学診断される。

さらに、プロピオン酸血症の上流の β ケトチオラーゼ欠損症では、上流の2-methyl-3-OH-butyrateやtiglylglycineが増加し、一方下流のpropionyl-CoA由来の代謝産物の増加はみられない。

B. タンデムマスによるアシルカルニチン分析

Fig. 2に示す3疾患のアシルカルニチン分析所見は、メチルマロン酸血症とプロピオン酸血症ではC3(propionylcarnitine)の増加がみられる。 β ケトチオラーゼ欠損症ではC5:1(tiglylcarnitine)とC5-OH(2-methyl-3-OH-butyrilcarnitine)の増加がみられる。メチルマロン酸血症とプロピオン酸血症は両疾患ともにC3の上昇しか見られないため、GC/MSによる尿中有機酸分析によって鑑別しなければならない。

V. GC/MS データ自動解析・自動診断プログラム

GC/MS分析では、ガスクロマトグラムに相当するTIC(total ion current)が得られるが、この段階では、ピークの情報はピーク保持時間のみである。そのあと質量分析されると、各ピークのマススペクトルが得られる。Fig. 3にプロピオン酸血症の尿中有機酸分析所見とマススペクトルを例示している。しかし尿中に含まれる有機酸は数百以上あるので、すべてのピークをマススペクトルで同定してピーク強度などで定量することは、時間がかかるうえに、極めて困難な作業である。さらに代謝産物とその量がわかっても、代謝異常症に関する知識を必要とし、GC/MSデータをマニュアルで解析して生化学診断をすることは、専門知識のみならず、時間と労力を要する。

そこで我々は、独自に「GC/MS データ自動解析・自動診断プログラム」を開発した⁷⁾。これを使えば、GC/MS分析後に数分以内に、異常代謝産物を検出

Table 2 Main target diseases detectable by MS/MS and diagnostic markers

| Disease | Diagnostic marker | |
|--------------------------------------|---------------------|------------------------|
| | MS/MS* | GC/MS** |
| Amino acidemia | | |
| Phenylketonuria | Phe | PPA, PLA |
| Maple syrup urine disease | Ileu, Leu, Val | 2KIV, 2M3VA, 2KIC |
| Homocystinuria | Met | — |
| Urea cycle disorder | | |
| Citrullinemia (type I) | Cit | Orot, Uracil |
| Argininosuccinic aciduria | Cit (ASA) | Orot, Uracil |
| Organic acidemia | | |
| Methylmalonic acidemia | C3, C3/C2 | MMA, MC, 3HPA, PG |
| Propionic acidemia | C3, C3/C2 | MC, 3HPA, PG |
| Isovaleric acidemia | C5 | IVG |
| Methylcrotonylglycinuria | C5-OH | MCG, 3HiVA |
| HMG-CoA lyase deficiency | C5-OH | HMGA, MGA, MGCA |
| Multiple carboxylase deficiency | C5-OH | MC, MCG, 3HPA |
| Glutaric acidemia type I | C5-DC | GA, 3HGA |
| β -ketothiolase deficiency | C5-OH, C5:1 | 2M3HBA, TG |
| Fatty acid oxidation disorder | | |
| MCAD deficiency | C8 | HG, SG |
| VLCAD deficiency | C14:1 | DIC |
| TFP deficiency | C16-OH, C18-OH | DIC, 3HDIC |
| CPT-1 deficiency | C0/[16+C18] | DIC |
| CPT-2 deficiency | (C16+C18:1)/C2, C16 | DIC |
| Primary carnitine deficiency | C0 (reduced) | DIC |
| Glutaric acidemia type II | C8, C10, C12, etc | DIC, EMA, IVG, GA, etc |

*MS/MS, amino acid and acylcarnitine in blood; GC/MS, urinary organic acid.

Abbreviations: MCAD and VLCAD, medium-chain- and very-long-chain-acyl-CoA dehydrogenases, respectively; TFP, mitochondrial trifunctional protein; CPT-1 and CPT-2, carnitine palmitoyltransferase-I and -II, respectively; PPA, phenylpyruvate; PLA, phenyllactate; 2KIV, α -ketoisovalerate; 2M3VA, α -keto-3-methylvalerate; 2KIC, α -ketoisocaproate; Orot, orotate; MMA, methylmalonate; MC, methylcitrate; 3HPA, 3-OH-pyruvate; PG, propionylglycine; IVG, isovalerylglycine; MCG, methylcrotonylglycine; 3HiVA, 3-OH-isovalerate; HMGA, 3-OH-3-methylglutarate, MGA, methylglutarate; MGCA, methylglutaconate; GA, glutarate; 3HGA, 3-OH-glutarate; 2M3HBA, 2-methyl-3-OH-butylate; TG, tiglylglycine; HG, hexanoylglycine; SG, suberylglycine; DIC, dicarboxylate; 3HDIC-3-OH-dicarboxylate; EMA, ethylmalonate.

し、考えられる診断名をアウトプットできる。このため、代謝異常症や GC/MS データに知識のない人でも短期間のうちに使えるようになる。Fig. 4 に自動解析結果を例示している。これによると異常として検出した代謝産物に 3-OH-propionate, propionylglycinem, および methylcitrate があるので、下の段に「疑わしい疾患」としてプロピオン酸血症をあげている。患者の臨床経過やタンデムマスデータなどを総合すれば、プロピオン酸血症という最終診断に比較的容易に到達することができる。

VI. タンデムマスによるアシルカルニチン分析

血液ろ紙や血清 10 μ L 程度の微量検体で、約 2 分間の分析時間のあいだに、アミノ酸とアシルカルニチンを分析し、そして Fig. 5 に示すような、アシルカルニチンとアミノ酸のデータを得ることができる。アシルカルニチンはアシル基の炭素数に対応して、C2, C3, C4.....と表示がされる。またアシル基に水酸基がついていれば C5-OH のように表示され、不飽和結合をもつアシル基ならば C5:1, ジカルボキシル基であれば C5-DC のように表現される。一方、

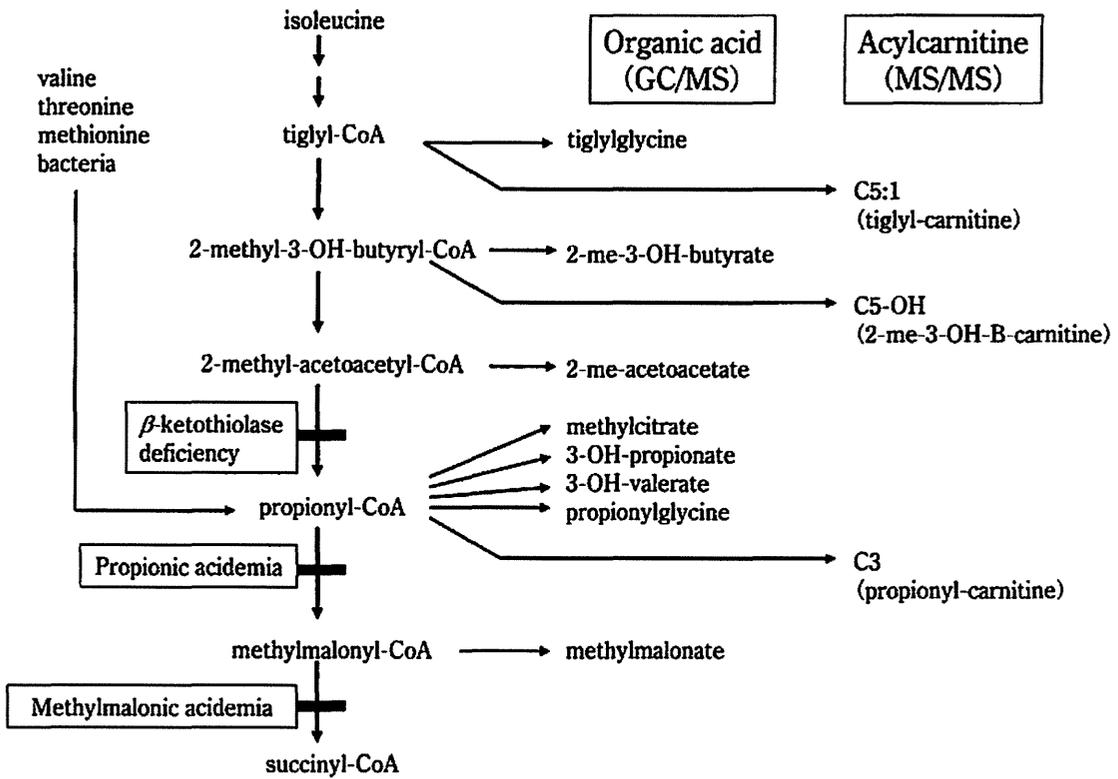


Figure 2 Metabolic pathways of isoleucine and related organic acidemia.

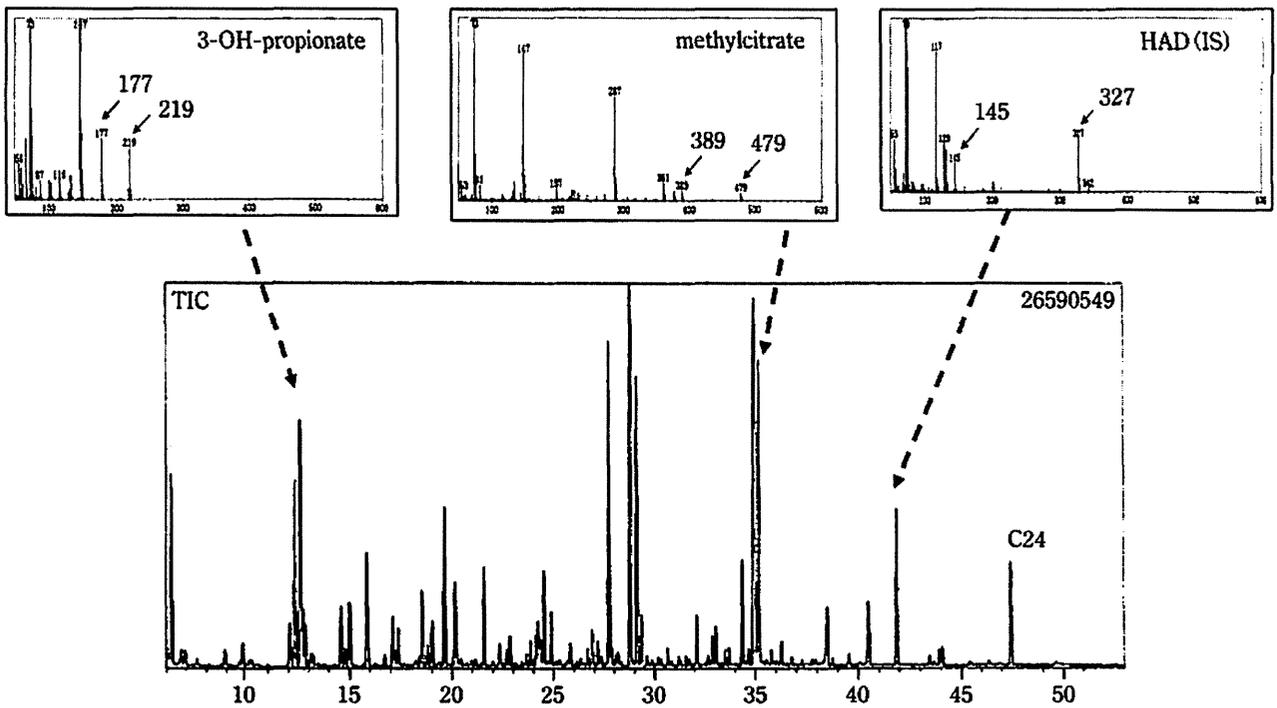


Figure 3 Gas chromatograms of urinary organic acids and mass spectrum of some peaks in propionic acidemia.
HDA, and C24 are heptadecanoate and tetracosane added internal standard.

